

염생식물 순비기나무의 화학적 성분연구

김유아 · 김호준 · 오광석[†] · 서영완^{‡,*}

한국해양대학교 해양환경·생명과학부

[†]한국해양대학교 해양공간건축학과

[‡]한국해양대학교 해양과학기술융합학과

(접수 2014. 9. 14; 게재확정 2014. 10. 6)

Chemical Constituents of the Halophyte *Vitex rotundifolia*

You Ah Kim, Hojun Kim, Kwang-suk Oh[†], and Youngwan Seo^{‡,*}

Division of Marine Environment and Bioscience, Korea Maritime and Ocean University, Busan 606-791, Korea

[†]Department of Architecture and Ocean Space, Korea Maritime & Ocean University, Busan 606-791, Korea

[‡]Ocean Science & Technology School, Korea Maritime & Ocean University, Busan 606-791, Korea.

*Email: ywseo@kmou.ac.kr

(Received September 14, 2014; Accepted October 6, 2014)

주제어: 염생식물, 순비기나무, 암세포 증식억제 효과, 세포독성

Key words: Halophyte, *Vitex rotundifolia*, Antiproliferative effect, Cytotoxicity

서 론

순비기나무(*Vitex rotundifolia*)는 한국, 일본, 중국 등의 해안가 모래땅에 서식하는 사구성 염생식물의 일종으로 마편초과(Verbenaceae)에 속하는 낙엽성 관목이다.¹ 순비기나무의 열매는 만형자라고 하며 두통, 안질, 귓병, 감기, 신경통, 습진 등 다양한 질병의 치료에 이용된다.²⁻⁴ 지금까지 순비기나무로부터 flavonoid와 terpenoid를 비롯한 여러 종류의 화학성분들이 분리되었으며⁵⁻¹⁴ 이 성분들의 항산화,⁵ 항암,⁶ 항염증,⁷ 항알러지,¹⁵ 진정효과¹⁶ 등이 보고되었다. 본 연구팀에서도 이미 순비기나무 추출물과 그 용매분획의 항산화¹⁷ 및 암세포증식 억제효과¹⁸ 그리고 분리된 flavonoid의 암세포 증식억제 효과를¹⁹ 확인한 바 있다.

순비기나무로부터 뛰어난 항암물질을 찾고자 하는 노력으로 4 종류의 인체암세포(HT-1080, AGS, HT-29, MCF-7)에 뛰어난 억제활성을 보였던 추출물의 85% aq.MeOH 용매분획으로부터¹⁹ 추가적으로 암세포 증식억제 성분을 분리하고자 하였다. 따라서 본 연구에서는 우리나라에 자생하는 순비기나무로부터 분리된 8 가지 화합물과 이들의 암세포 증식억제 효과에 대하여 보고하고자 한다.

실 험

시약 및 기기

화합물의 분리에 사용한 컬럼 충전제는 RP18(YMC-GEL ODS-A, 12 nm, S-75 μm)을 사용하였으며, TLC plate는 Silica F254s(Merck)를 사용하였다. 추출, 분획 및 컬럼 크로마토그래피에 사용한 모든 용매는 1급 시약을 사용하였다. RI detector가 장착된 High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Dionex P580) system을 이용하여 화합물을 분리 정제하였으며 HPLC column은 YMC pack ODS-A(250×10 mm, S 5 μm, 12 mm)를 사용하였다. 화합물의 구조결정은 Varian NMR(300 MHz)과 Bruker NMR(900 MHz)을 사용하였으며 NMR 측정 용매는 CD₃OD와 CDCl₃(Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA)를 사용하였다.

시료의 채집, 추출 및 분획

실험에 사용한 순비기나무(*Vitex rotundifolia*)는 2011년 7월 전라남도 무안군 해안에서 직접 채집하였으며 응달에서 건조 후 추출하기 전까지 -25 °C에서 냉동 보관하였다. 냉동보관된 순비기나무 시료(0.5 kg)는 추출하기 위하여 해빙 시킨 후, dichloromethane 속에 담그고 24시간 방치한 후 여과하였다. 이 과정을 2번 반복하였으며, 얻어진 추출액은 40 °C 수욕 상에서 진공 증발기로 농축하였다. Dichloromethane으로 추출하고 남은 잔사에 동량의 methanol (MeOH)을 부어 위와 동일한 과정을 반복하여 추출물을 얻었다. 두 용매로 추출한 양을 합하여 얻어진 추출물 145.3 g은 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여, *n*-hexane,

85% aq.MeOH, *n*-butanol(*n*-BuOH), 물(water)분획물을 각각 33.6 g, 21.0 g, 39.0 g, 47.8 g 얻었다.

화합물의 분리

순비기나무 추출물의 85% aq. MeOH 분획층 21.0 g을 MeOH과 물의 혼합용액(50, 60, 70, 80, 90% aq.MeOH and 100% MeOH)을 이용하여 C₁₈ 역상 진공 크로마토그래피를 실시하였으며 6개의 크로마토그래피 분획(Rfc 1~6)을 얻었다. 그 중 70% aq.MeOH 분획(Fr.3, 0.6 g)에 대한 역상 HPLC(YMC-A, 2 mL/min, 67% aq. MeOH)를 실시하여 luteolin (3, 117 mg)을 분리하였다. 80% aq.MeOH 분획(Fr.4, 3.1 g)에 대해서도 역상 HPLC(ODS-A, 78% aq.MeOH)를 실시하였으며 그 결과 vitexcarpin(2, 71 mg)과 6개의 혼합물 분획들(Mix.1~6)이 얻어졌다. 혼합물 분획 1~3(Mix.1~3)에 대한 reversed-phase HPLC(ODS-A, 50% aq.CH₃CN)를 다시 실시하여 화합물 artemitin(1, 24.8 mg), quercetin 3,7-dimethyl ether(4, 2.5 mg), vitetrifolin F(5, 15.0 mg), aurantiamide(8, 4.5 mg)가 분리되었다. HPLC 혼합물분획 5(Mix.5)와 6(Mix.6)에 대해서도 reversed-phase HPLC(ODS-A, 68/60% aq. CH₃CN)를 실시하여 vitetrifolin E(6, 55.7 mg)와 vitetrifolin D(7, 69.9 mg)를 얻었다.

Quercetin 3,7-dimethyl ether(4): a pale yellow solid; [α]_D²⁰ -30(c 0.03, MeOH); EIMS *m/z* 330[M]⁺; ¹H NMR(300MHz, CD₃OD) δ : 7.63(1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.54(1H, dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, H-6'), 6.89(1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 6.58(1H, s, H-8), 6.32(1H, s, H-6), 3.88(3H, s, 7-OMe), 3.79(3H, s, 3-OMe); ¹³C NMR(75MHz, CD₃OD) δ : 179.9(C, C-4), 167.1(C, C-7), 162.7(C, C-5), 158.2(C, C-2), 158.2(C, C-9), 149.9(C, C-4'), 146.3(C, C-3'), 139.6(C, C-3), 122.7(C, C-1'), 122.3(CH, C-6), 116.4(CH, C-2'), 116.3(CH, C-5'), 106.6(C, C-10), 98.8(C, C-6), 93.0(CH, C-8), 60.5(CH₃, 3-OMe), 56.5(CH₃, 7-OMe).

Aurantiamide(8): an amorphous white solid, FABMS *m/z* 403 [M+H]⁺; ¹H NMR (900 MHz, CDCl₃) δ : 7.70(2H, d, *J* = 11.3 Hz, H-2'/6'), 7.50(1H, t, *J* = 11.3 Hz, H-4'), 7.42(2H, t, *J* = 11.3 Hz, H-3'/5'), 7.31(2H, t, *J* = 11.3 Hz, H-3''/5''), 7.26(2H, d, *J* = 11.3 Hz, H-2''/6''), 7.25(1H, t, *J* = 11.3 Hz, H-4''), 7.16(2H, t, *J* = 11.3 Hz, H-3'''/5'''), 7.12(1H, t, *J* = 11.3 Hz, H-4'''), 7.06(2H, d, *J* = 11.3 Hz, H-2'''/6'''), 4.74 (1H, m, H-5), 4.07(1H, m, H-2), 3.44(1H, dd, *J* = 11.1, 3.5 Hz, H-1 α), 3.39(1H, dd, *J* = 11.1, 4.5 Hz, H-1 β), 3.26(1H, dd, *J* = 13.7, 6.0 Hz, H-8 α), 3.02 (1H, dd, *J* = 13.7, 8.8 Hz, H-8 β), 2.77 (1H, dd, *J* = 13.8, 7.5 Hz, H-9 α), 2.67 (1H, dd, *J* = 13.8, 7.3 Hz, H-9 β); ¹³C NMR(75 MHz, CDCl₃) δ : 170.6(C, C-4), 167.0(C, C-7), 133.5(C, C-1'), 137.1(C, C-1''), 136.7(C, C-1'''), 131.9(CH, C-4'), 129.3(CH, C-2''/6''), 129.0(CH, C-2'''/6'''), 128.8(CH, C-3''/5''), 128.6(CH, C-3'''/5'''), 128.5

(CH, C-3'''/5'''), 127.1(CH, C-4''), 127.0(CH, C-2'/6'), 126.5(CH, C-4'''), 63.6(CH₂, C-1), 55.3(CH, C-5), 52.9(CH, C-2), 38.8(CH₂, C-8), 36.9(CH₂, C-9).

세포 배양

HT-1080 인체 섬유육종 암세포(HT-1080 human fibrosarcoma cell), AGS 인체 위암세포(AGS human gastric adenocarcinoma cell), HT-29 인체 결장암세포(HT-29 human colon cancer cell) 및 MCF-7 인체 유방암세포(MCF-7 human breast cancer cell)는 한국 세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양 받아 배양하여 실험에 사용하였다. HT-1080과 MCF-7 암세포는 100 units/mL의 penicillin-streptomycin과 10%의 fetal bovine serum(FBS, Hyclone, Utah, USA)이 함유된 DMEM 배지(Hyclone, Utah, USA)를 사용하였으며, AGS와 HT-29 암세포의 경우, 100 units/mL의 penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640 배지(Hyclone, Utah, USA)를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ incubator (Forma Scientific, Japan)에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 2~3일 간격으로 배지를 교환하고 6~7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% Trypsin -0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 ml cell culture flask에 10 ml씩 일정 수 분할하여 주입한 후 다시 배양하였으며 계속해서 6~7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

세포 생존율 측정(MTT assay)

MTT assay는 생존 암세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase의 효소작용에 의해 황색의 수용성 물질인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)가 환원되어 보라빛의 formazan crystal로 생성하는 원리를 이용한 실험법으로,²⁰ formazan crystal이 침전되는 정도를 흡광도로 측정하여 암세포가 사멸 또는 증식 억제되는 정도를 파악할 수 있다. 배양된 암세포는 well당 2×10⁵ cells/ml가 되도록 96 well plate에 분주하여 37 °C, 5% CO₂배양기에서 24시간 배양 후 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지 90 μ l와 일정농도의 시료 10 μ l를 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 대조군에는 시료 대신 phosphate buffered saline (PBS) 20 μ l를 첨가하였다. 24시간 배양 후 시료가 첨가된 배지를 제거한 뒤 5 mg/ml의 농도로 제조한 MTT 용액 100 ml를 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4시간 동안 더 배양하였다. 생성된 formazan결정은 100 μ l DMSO로 녹여 ELISA reader (Bio-Tek instruments, Winooski, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포 증식 억제율(%)을 구하였다.

결과 및 고찰

순비기나무 추출물의 용매분획층인 85% aq.MeOH 분획을 C18 flash chromatography와 reversed-phase HPLC를 차례로 수행하여 8개의 화합물을 분리하였다. 분리한 화합물은 2D-NMR 실험을 통하여 화학구조를 결정하였으며 이미 보고된 물질의 문헌치와 비교하여 구조를 최종 확인하였다(Fig. 1). 화합물 1-3과 5-7은 본 연구그룹에서 이미 분리된 바 있으며 기존에 보고한 데이터와 비교하여 각각 artemetin(1), vitexcarpin(2), luteolin(3), xanthotoxin(4), vitetrifolin F(5), vitetrifolin E(6), vitetrifolin D(7)로 결정되었다.¹³⁻¹⁶

화합물 4는 노란색 고체로 분리되었으며 EI 질량분석 데이터와 ¹³C NMR 스펙트럼에 의해서 분자식은 C₁₇H₁₄O₇로 확인되었다. ¹H NMR 스펙트럼은 두 개의 이중선[δ 7.63(1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 6.89(1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5')]과 하나의 이중 이중선[δ 7.54(1H, dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, H-6')]을 보여 주어 전형적인 trisubstituted aromatic C ring 형태를 보여 주었다. 또한 gDQCOSY 실험에서 δ 7.54 신호가 δ 7.63 및 δ 6.89와 coupling하는 것이 관측됨으로써 이 사실을 지지하였다. 이미 분리 보고 되었던 플라보노이드 화

합물들 1-3과 비교해 보았을 때 δ 6.58(1H, s, H-8)과 δ 6.32(1H, s, H-6)에 나타난 단일선은 5,7 위치가 치환된 A ring의 6번과 8번의 수소들로 인식되었다. 이러한 스펙트럼 분석데이터와 분자식(C₁₇H₁₄O₇)을 고려할 때 3,5,7,3',4'-penta-oxygenated flavone으로 판단되었다. 2개의 methyl기의 위치는 gHMBC 실험에서 δ 3.88과 δ 3.79의 methoxy기의 수소 신호는 각각 C-7(δ 167.1)과 C-3(δ 139.6)에 long-ranged correlation을 보여 주어 화합물 4의 화학구조는 quercetin-3,7-dimethyl ether로 확인되었다. 문헌조사 결과 이 화합물은 이전에 육상식물에서 분리되었으며 NMR 스펙트럼 데이터는 같은 용매에서 측정하였을 때 문헌에 보고된 값과 잘 일치되었다.²¹⁻²⁴

화합물 8은 무정형의 흰색 고체로 분리되었으며 ¹³C NMR과 질량분석 데이터 분석에 의해서 C₂₅H₂₆N₂O₃로 결정되었다. ¹H NMR 스펙트럼에서 모두 9개의 방향족 고리 신호들이 관측되었으나 신호들의 면적비를 고려했을 때 모두 15개의 방향족 수소들이 존재하였으며 DEPT 실험에 의하면 3개의 quaternary carbon이 확인되어 모두 3개의 단일 치환된 벤젠고리들이 존재하는 것으로 판단되었다: benzoyl ring δ 7.70(2H, d, *J* = 11.3 Hz, H-2''/6''), 7.50 (1H, t, *J* = 11.3 Hz, H-4''), 7.42(2H, t, *J* = 11.3 Hz, H-3''/5''); 2개의 phenyl rings δ 7.31(2H, t, *J* = 11.3 Hz, H-3'''/5'''), 7.26 (2H, d, *J* = 11.3 Hz, H-2'''/6'''), 7.25(1H, t, *J* = 11.3 Hz, H-4'''), 7.16(2H, t, *J* = 11.3 Hz, H-3'''/5'''), 7.12(1H, t, *J* = 11.3 Hz, H-4'''), 7.06(2H, d, *J* = 11.3 Hz, H-2'''/6''').

또한 ¹³C NMR 스펙트럼과 DEPT 스펙트럼을 통하여 12개의 방향족 탄소 신호들 외에 두 개의 carbonyls(δ 170.6 and 167.0), 3개의 methylenes(δ 63.6, 38.8 and 36.9), 그리고 2개의 methines(δ 55.3 and 52.9) 신호들이 확인되었다. 이러한 NMR 스펙트럼 분석결과와 IR 스펙트럼 및 gDQCOSY 실험을 통하여 다음과 같은 부분구조들이 제안되었으며 이러한 부분구조들은 gHMBC 실험을 통하여 연결되어 화합물 8의 구조가 결정되었다. 문헌조사 결과 이 화합물은 이전에 보고되었던 aurantiamide로 확인되었으며 NMR 스펙트럼 데이터는 보고된 값과 잘 일치하였다.²⁵⁻²⁸

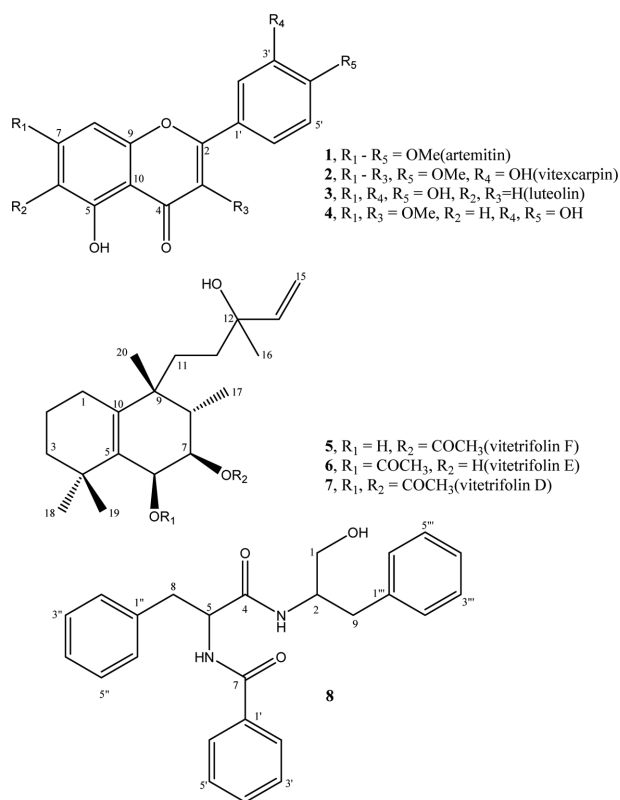


Figure 1. Chemical structures of compounds 1-8 isolated from *Vitex rotundifolia*.

암세포 증식억제 효과

HT-1080, AGS, HT-29, MCF-7 인체 암세포들에 대하여 화합물 4-8을 각각 100, 50, 10 μM의 농도로 처리한 결과

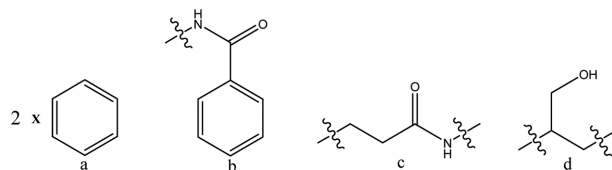


Figure 2. Partial structure of compound 8.

모든 화합물들이 농도의존적으로 인체암세포들의 증식을 억제하였다. HT-1080 섬유육종 세포와 AGS 위암세포의 경우에는 화합물 8이 가장 좋은 증식억제효과를 보여 100 μ M의 농도에서 각각 55.5, 58.9%의 억제율을 보였으며 HT-29의 경우에는 10 μ M의 농도에서도 32.2% 정도의 억제율을 보였다. 화합물 4도 상대적으로 좋은 억제활성을 보여 HT-1080과 AGS 세포들에 대해서 100 μ M의 농도

에서 약 49.0, 46.8%의 억제율을 보였으며 10 μ M의 농도에서도 약 35.7, 34.5%의 억제율을 보였다. MCF-7의 경우에는 화합물 6-8이 100 μ M의 농도에서 각각 51.4, 49.6, 43.3%의 억제율을 보여 주었다(Fig. 3). 대조 화합물로는 paclitaxel을 사용하였으며 이 화합물은 암세포 AGS, HT-29, HT-1080, MCF-7에 대해서 각각 7.1, 0.6, 30.7, 16.9 μ M의 IC₅₀ 값을 보여 주었다.

플라보노이드 1-3의 인체암세포 AGS, HT-29, MCF-7에 대한 증식억제 효과는 이미 보고된 바 있다.¹⁹ 50 μ M의 농도에서 화합물 1은 AGS, HT-29, MCF-7 세포에 대해서 순서대로 약 30, 10, 25%, 화합물 2는 약 60, 70, 30%, 그리고 화합물 3은 약 25, 30, 30%의 암세포 증식 억제효과가 있는 것으로 보고되었다. 유사한 화합물 4는 동일농도에서 인체암세포 AGS, HT-29, MCF-7에 대해서 약 40, 20, 20%의 증식억제효과를 나타내었다.

결론

모두 8개의 화합물들이 분리되었으며 이 중에서 quercetin dimethyl ether(4)와 aurantiamide(8)는 순비기나무에서는 처음으로 분리되었다. Quercetin dimethyl ether(4)의 생리활성으로 혈관이완효과와²³ 항산화활성이²⁹ 알려져 있으나 다른 생리활성에 대해서는 거의 보고되지 않았다. 이 물질의 4 종류의 인체암세포 증식억제활성을 측정할 결과 HT-1080과 AGS 세포에 대한 증식억제 활성이 비교적 좋았다. Aurantiamide(8)는 주로 acetate의 형태로 발견되었으며 amide 형태 자체로는 그렇게 많이 발견되지 않았다. 또한 특이하게 해양식물인 홍조류 *Acanthophora spicifera* 에서도 발견된 바 있다.²⁵ 이 물질에 대한 생리활성 결과도 거의 보고되지 않았으며 여기에서 처음으로 인체암세포에 대한 증식억제 효과가 검색되었으며 4종류 인체암세포 모두에 유의적인 억제활성을 나타내었다. 특히 HT-1080과 AGS 세포에 더 좋은 억제활성을 나타내었다. 이 논문에서 처음으로 aurantiamide(8)의 모든 수소와 탄소에 대한 NMR 스펙트럼 데이터가 완전하게 지정(assigned)되었다. 현재 암세포증식 억제활성을 보이는 또 다른 화학성분들의 분리를 시도하고 있다.

Acknowledgments. 본 연구는 2012년 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. 2012R1A1A2002851)이며 해양수산부의 지원으로 수행한 해양에너지 전문인력 양성사업의 연구결과입니다.

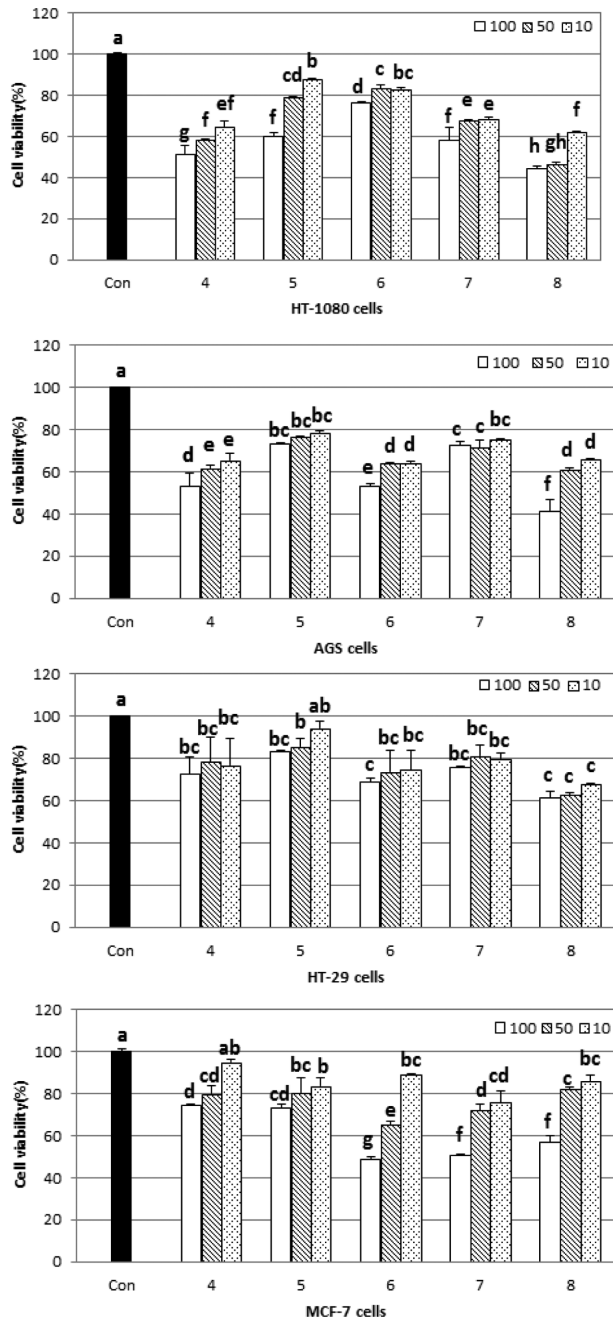


Figure 3. Inhibitory effects of compounds 5-8 from *Vitex rotundifolia* on the growth of human cancer cell lines.

REFERENCES

1. Yeeh, Y.; Kang, S. S.; Chung, H. G.; Chung, M. S. *J. Plant Research* **1996**, *109*, 161.
2. Ono, M.; Ito, Y.; Kubo, S.; Nohara, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1094.
3. Kim, D. K. *Biomol. Ther.* **2009** *17*, 412.
4. Kimura, T.; But, P. P. H.; Guo, J. X.; Sung, C. K. *International Collation of Traditional and Folk Medicine. Part I*; World Scientific: Singapore, 1996; p. 141.
5. Ono, M.; Yamamoto, M.; Masuoka, C.; Ito, Y.; Yamashita, M.; Nohara, T. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1532.
6. One, M.; Yanaka, T.; Yamamoto, M.; Ito, Y.; Nohara, T. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 537.
7. Lee, C.; Lee, J. W.; Jin, Q.; Lee, H. J.; Lee, S.-J.; Lee, D.; Lee, M. K.; Lee, C. K.; Hong, J. T.; Lee, M. K.; Hwang, B. Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6010.
8. Wang, X.-Q.; Zhang, T.; Zheng, B.; Xie, W.-D.; Shen, T. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2014**, *35*, 672.
9. Kondo, Y.; Sugiyama, K.; Nozoe, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 4829.
10. Ko, W. G.; Kang, T. H.; Lee, S. J.; Kim, N. Y.; Kim, Y. C.; Sohn, D. H.; Lee, B. H. *Food Chem. Toxicol.* **2000**, *38*, 861.
11. Kim, H.; Yi, L. M.; Kim, N. S.; Lee, Y. J.; Kim, J.; Oh, D. S.; Oh, S. M.; Bang, O. S.; Lee, L. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2012**, *55*, 433.
12. Kawazoe, K.; Yutani, A.; Takaishi, Y. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 1657.
13. Kouno, I.; Inoue, M.; Onizuka, Y.; Fujisaki, T.; Kawano, N. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 611.
14. Kawazoe, K.; Yutani, A.; Tamemoto, K.; Yuasa, S.; Shibata, H.; Higuti, T.; Takaishi, Y. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 588.
15. Shin, T. Y.; Kim, S. H.; Lim, J. P.; Suh, E. S.; Jeong, H. J.; Kim, B. D.; Park, E. J.; Hwang, W. J.; Rye, D. G.; Baek, S. H.; An, N. H.; Kim, H. M. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *72*, 443.
16. Okuyama, E.; Fujimori, S.; Yamazaki, M.; Takeshi, D. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 655.
17. Hong, J. W.; Jung, M. E.; Seo, Y. *Ocean and Polar Research* **2011**, *33*, 255.
18. Kim, Y. A.; Lee, J. I.; Kim, H.; Kong, C.-S.; Nam, T. J.; Seo, Y. *J. Appl. Biol. Chem.* **2009**, *52*, 174.
19. Kim, Y. A.; Kim, H.; Seo, Y. *Natural Product Communications* **2013**, *8*, 1405.
20. Hansen, M. B.; Nielsen, S. E.; Berg, K. *J. Immunol. Methods* **1989**, *119*, 203.
21. Banerji, A.; Ray, R. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 2217.
22. Wang, Y.; Hamburger, M.; Gueho, J.; Hostettmann, K. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2323.
23. Guerrero, M. F.; Puebla, P.; Carron, R.; Martin, M. L.; Roman, L. S. *J. Pharm. Pharmacol.* **2002**, *54*, 1373.
24. Kim, Y. A.; Lee, J. I.; H Bouktaib, M.; Lebrun, S.; Atmani, A.; Rolando, C. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 10001.
25. Banerji, A.; Ray, R. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 2217.
26. Wahidulla, S.; D'Souza, L.; Kamat, S.Y. *Phytochemistry* **1991**, *30* 3323.
27. Jinbiao, X.; Gang, N.; Shengping, Y.; *Chinese J. Chem.* **2013**, *31*, 72.
28. Wenhui, P.; Kanglun, L.; Yifu, G. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 663.
29. Küpeli, E.; Orhan, D. D.; Yesilada, E. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *103*, 455.