생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
27(3) : 238~245(1996)

굴피나무잎으로부터 항암활성을 갖는 천연물질의 분리

김양일, 이승호,[1]* 조태순

성균관대학교 약학대학, [1]영남대학교 약학대학

Isolation of Anticancer Agents from the Leaves of *Platycarya strobilacea* S. et Z.

Yang Il Kim, Seung-Ho Lee[1,*] and Tai Soon Cho

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-776, Korea; and [1]College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea;

Abstract – The activity guided fractionation of CH_2Cl_2 soluble part of *Platycarya strobilacea* leaves(Juglandaceae) has led to the isolation of eight active principles, identified as 5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone(1), ursolic acid(2), gallic acid(3), 4,8-dihydroxynaphthalene 1-*O*-β-$_D$-glucoside(4), eriodictyol(5), quercetin 3-*O*-(2″-*O*-galloyl)-β-$_D$-glucoside(6), quercetin 3-*O*-(2″-*O*-galloyl)-β-$_D$-galactoside(7) and quercetin 3-*O*-α-$_L$-rhamnoside (8) by the means of chemical and spectral evidence, respectively.

Key words – *Platycarya strobilacea*; Juglandaceae; naphtoquinone; naphthalene; flavonoid; cytotoxicity.

항암제는 암의 발병원인 및 진행상황등이 아직까지 밝혀지지 않은 부분이 너무 많고, 고도의 선택성과 안전성을 요구하는 약물의 특수성때문에 개발에 어려운 점이 많다. 따라서 항암제의 개발에 있어서도 이제까지 알려져 있는 특정 type의 항암제를 chemical modification을 통해서 새로운 의약품을 개발해내는 방법과 고등식물이나 미생물과 같은 천연자원으로부터 새로운 항암활성성분을 탐색하고 이들을 토대로하여 lead compound가 될수있는 물질을 찾아내고자하는 연구를 병행하여 수행하고 있다.

저자등은 항암활성을 갖는 천연물을 개발 할 목적으로 항암활성이 인정되는 고등식물을 선정하여(약 120종), 이들로부터 얻어진 solvent partition(약 360종)에 대하여 5종의 human tumor cell lines에 대한 *in vitro*에서의 cytotoxicity를 측정하여 이들을 data base화 하고, 이를 토대로 Table I에 나타낸 바와 같이 강한 활성을 보인 굴피나무(*Platycarya strobilacea*)잎으로부터 활성물질을 추적 단리 구조를 구명하였다. 굴피나무는 Juglandaceae(가래나무과)에 속하는 우리나라 전역에 풍부하게 분포하고 있는 낙엽활엽 소교목으로 잎은 기수우상복엽이고 작은 잎은 피침형으로 끝이 뾰족하고 가장자리에 날카로운 톱니가 있다. 漢名은 必栗香으로 球果는 황색염료에, 뿌리는 소염제, 지사제, 수피는 어망염료에 사용된다.[1)]

*교신저자 : Fax 053-811-3871

재료 및 방법

실험재료 – 실험에 사용한 굴피나무(*P. strobilacea*)의 잎은 1995년 8월중순 대전광역시 유성구에서 채집, 충북대학교 약학대학 이경순 교수에게 감정을 받아 사용하였으며 표본은 영남대학교 약학대학 천연물연구실에 보관중이다.

Table I. Cytotoxic activity of each solvent partitions from the *Platycarya strobilacea* against the human tumor cell lines *in vitro*

Sample	Conc. (μg/ml)	Net growth as % of control				
		A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
CH_2Cl_2 fr.	125	-90.9152	21.5165	-89.5066	-38.1222	-95.9225
EtOAc fr.	125	-58.0491	19.9908	-63.9205	10.1163	-53.7207
H_2O fr.	500	29.6407	81.6535	38.0983	46.5944	6.8949

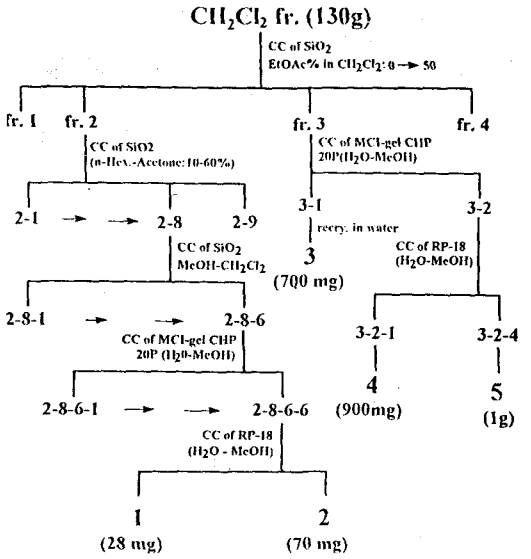
기기 및 시약－융점은 Buchi 510-K melting point apparatus로 측정하고 보정하지 않았다. 비선광도는 JASCO DIP-181 Digital polarimeter, UV는 Shimadzu UV-240 spectrometer, FAB-MS는 VG Trio 2 instrument를 사용하여 측정하였다. ^{1}HNMR(300MHz) 및 ^{13}CNMR(75MHz) spectrum은 Bruker AM 300 spectrophotometer를 이용하여 측정하였으며 chemical shift는 TMS를 내부표준물질로 하여 δ치(ppm)으로 표시하고, coupling constant(*J* value)는 Hz로 나타냈다. Column chromatography는 silicagel (70-230 mesh, Merck), MCI-gel CHP 20P(75-150 μm, Mitsubishi Chemical Co., Ltd.), *Cosmosil OPN-75*(42-105 μm, Nacalitesque), Lichroprep RP-18(40-63 m, Merck)를 사용하였고, TLC는 *kiesel gel 60* F_{254} plate(Merck), Cellulose F_{254} plate(Merck)를 사용하였으며, 발색시약은 *vanillin-sulfuric acid* 시약, FeCl3-EtOH 시약, 10% sulfuric acid, phthalic acid anillin 시약 및 UV lamp를 이용하였다.

Cytotoxicity의 측정－항암활성을 측정하기 위하여 미국의 국립암연구소(NCI)로부터 분양받아 한국화학연구소에서 계대배양중인 5종의 Human tumor cell lines를 사용하였고, 활성측정은 미국의 NCI에서 약물의 *in vitro* 항암활성을 측정하기위하여 개발된 Sulforhodamine B(SRB) assay 방법을 사용하였다[2]. 즉 계대배양중인 암세포들을 tryosin-EDTA용액으로 부착면으로부터 분리시키고 well flat bottom microplate에 분주한다. 분주된 암세포들은 CO_2 incubator에서 24시간 배양하여 바닥에 부착시킨 후 media를 제거하고 medium으로 희석한 test material 용액들을 well에 넣어주고 48시간 더 배양한다. 배양된 세포들에 TCA를 가하여 plate의 바닥면에 고정시킨후 plate에 남아있는 TCA용액을 완전히 제거하고 건조시킨다. 건조된 plate는 SRB용액을 가하여 30분간 세포를 염색하고 acetic acid로 세척하여 세포와 결합하지 않은 SRB를 제거한다. 이렇게 염색된 cell plate들은 건조후 trisma base용액으로 염색약을 용출시킨후 microplate reader를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정한다. 암세포들에 대한 약물의 활성을 계산하기위하여 약물을 가할때의 세포수(Tz)와 약물이 들어있지 않은 medium을 가하여 48시간 배양했을때의 세포수(C) 및 각농도의 약물과 함께 48시간 배양했을때의 세포수(T)등을 측정하여 다음의 수식에 의해 항암활성을 계산한다. 즉 Tz>T인 경우에는 [(T-Tz)/(C-Tz)]×100으로 계산하고, Tz<T인 경우에는 [(T-Tz)/Tz]×100의 수식으로 계산한다. 이렇게 계산된 값들로부터 LOTUS program의 data regresion을 이용하여 약물이 암세포의 성장을 50% 억제하는 농도인 50% effective dose (ED_{50})를 계산하여 각 약물의 항암활성도를 비교하였다.

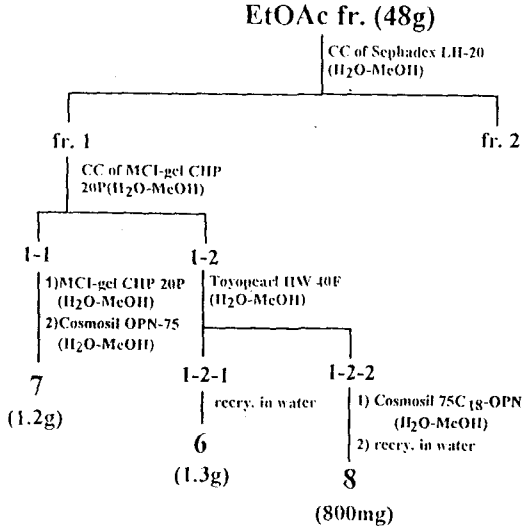
추출 및 분리－굴피나무잎 11 kg을 세절하고 음건하여 MeOH로 1주일간 실온에서 2회 반복 추출하였다. 추출액은 감압하에서 MeOH을 제거하고 MeOH Ex(830 g)을 얻었다. 얻어진 MeOH Ex를 물에 현탁시킨 후 CH_2Cl_2, EtOAc로 순차적으로 분획하여 CH_2Cl_2 fr.(420 g), EtOAc fr.(48 g), H_2O fr.(360 g)을 얻었다. 이들 분획의 human tumor cell lines에 대한 cytotoxicity를 검토하여(Table I), 활성이 강한 CH_2Cl_2 fr. 및 EtOAc fr.에 대하여 활성성분을 activity guided fractionation에 의하여 추적 단리하였다(Scheme 1, 2).

화합물 1－무정형 황색분말, positive FAB-MS *m/z*: 205$(M+H)^+$, ^{1}HNMR 및 ^{13}CNMR spectal data는 Table II 참조.

화합물 2－^{13}CNMR(75MHz, acetone-d_6) δ: 15.4,



Scheme 1.



Scheme 2.

16.3, 17.1, 17.2, 21.3, 23.5, 28.6(CH_3), 77.0(-OCH-), 124.8, 138.4(C=C), 178.5(COO).

화합물 3 - 무색침상결정(H_2O), mp 270-272 ° (decomp.), IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}: 1650(COO), ^{1}HNMR (300MHz, acetone-d_6+D_2O) δ: 7.14(2H, s), ^{13}CNMR(75MHz, acetone-d_6+D_2O) δ: 168.4(c-1), 146.1(c-4,6), 138.7(c-5), 122.0(c-2), 110.0(c-3,7).

화합물 4 - 담갈색분말(H_2O), mp 170-173 °, positive FAB-MS *m/z*: 339(M+H)$^+$, ^{1}HNMR (300MHz, acetone-d_6) δ: 5.06(1H, d, *J*=7Hz, glc-1), 6.77(1H, d, *J*=8Hz, H-2), 6.82(1H, d, *J*=8Hz, H-6), 7.25(1H, *d*, J=8Hz, H-3), 7.32 (1H, t, *J*=8Hz, H-7), 7.69(1H, d, *J*=8Hz, H-8). ^{13}CNMR(75MHz, acetone-d_6) δ: 61.1(c-6'), 70.2(c-4'), 73.8(c-3'), 76.7(c-5'), 77.9(c-2'), 104.0(c-1'), 107.6(c-2), 111.2(c-7), 112.1(c-3), 113.4(c-5), 116.4(c-9), 126.3(c-6), 127.2(c-10), 146.9(c-1), 149.1(c-4), 153.6(c-8).

화합물 5 - 담황색분말(H_2O), mp 267 °, ^{1}HNMR(300MHz, pyridine-d_5) δ: 2.90(1H, dd, *J*=3, 17Hz, H-3), 3.30(1H, dd, *J*=13, 17Hz, H-3), 5.48(1H, dd, *J*=3, 13Hz, H-2), 6.35(1H, d, *J*=2Hz, H-6), 6.44(1H, d, *J*=2Hz, H-8), 7.08 (1H, dd, *J*=2, 8Hz, H-6'), 7.23(1H, d, *J*= 8Hz, H-5'), 7.52(1H, d, *J*=2Hz, H-2'), 12.8 (1H, br s, 5-OH). ^{13}CNMR(75MHz, pyridine-d_5) δ: 42.2(c-3), 78.4(c-2), 95.1(c-8), 95.9(c-6), 102.0(c-10), 114.5(c-2'), 115.6(c-5'), 117.9 (c-6'), 129.7(c-1'), 145.3(c-3'), 145.7(c-4'), 162.9(c-9), 163.6(c-5), 166.7(c-7), 196.0(c-4).

화합물 6 - 담황색분말(H2O), $FeCl_3$: 청록색, Mg(Zn)+HCl test: positive, $[\alpha]_D^{20}$ -129 °(c= 0.1, MeOH), mp 205 °, UV, λ_{max}(MeOH): 258, 356 nm, λ_{max}(NaOMe): 274, 352, 408 nm, max ($AlCl_3$): 270, 396 nm, λ_{max}($AlCl_3$+HCl): 270, 380 nm, λ_{max}(NaOAc+H_3BO_3): 262, 372 nm, ^{1}HNMR(300MHz, DMSO-d_6+D_2O) δ: 5.44 (1H, d, *J*=8Hz, H-1''), 5.80(1H, d, *J*=2Hz, H-6), 6.00(1H, d, *J*=2Hz, H-8), 6.40(1H, d, *J*= 7Hz, H-5'), 6.56(2H, s, H-3''', 7'''), 6.98 (1H, d, *J*=2Hz, H-2'), 7.06(1H, dd, *J*=2,7Hz, H-6'), ^{13}CNMR(75MHz, DMSO-d_6+D_2O) δ: 62.4(c-6''), 71.6(c-4''), 75.5(c-3''), 76.0(c-2''), 77.0(c-5''), 94.4(c-8), 99.5(c-1''), 100.0 (c-6), 105.6(c-10), 110.4(gal-3,7), 115.9(c-2'), 117.3(c-5'), 121.9(c-2'''), 122.9(c-1'), 123.0(c-6'), 134.4(c-3), 138.9(c-5'''), 145.3(c-3'), 145.9(c-4''', 6'''), 149.1(c-4'), 157.5(c-2), 157.7(c-9), 163.1(c-5), 164.9(c-1'''), 166.4(c-7), 178.6(c-4).

화합물 7 - 황색분말, ^{1}HNMR(300MHz, DMSO-

d_6+D_2O) δ: 5.28(1H, t, J=8Hz, H-2″), 5.73 (1H, d, J=8Hz, H-1″), 6.37(1H, d, J=2Hz, H-6), 6.40(1H, d, J=2Hz, H-8), 6.83(1H, d, J=8Hz, H-5′), 7.04(2H, s, H-3‴, 7‴), 7.50 (1H, d, J=2Hz, H-2′), 7.68(1H, dd, J=2, 8Hz, H-6′). ^{13}CNMR(75MHz, DMSO-d_6+D_2O) δ: 61.9(c-6″), 70.2(c-4″), 72.9(c-3″), 74.3(c-2″), 76.7(c-5″), 94.4(c-8), 99.4(c-1″), 105.6 (c-10), 110.4(c-3‴, 7‴), 115.9(c-2′), 117.3 (c-5′), 122.0(c-2‴), 123.0(c-1′), 123.1(c-6′), 134.4(c-3), 138.8(c-5‴), 145.4(c-3′), 145.9(c-4‴, 6‴), 149.1(c-4′), 157.5(c-2, 9), 157.7(c-5), 163.1(c-1‴), 164.9(c-7), 178.7(c-4).

화합물 8 - 담황색분말(H_2O), $FeCl_3$: 오록색, Mg(Zn)+HCl: 홍색, ^{1}HNMR(300MHz, acetone-d_6+D_2O) δ: 0.89(3H, d, J=5Hz, H-6″), 5.49(1H, d, J=2Hz, H-1″), 6.23(1H, d, J=2Hz, H-6), 6.44(1H, d, J=2Hz, H-8), 6.96 (1H, d, J=8Hz, H-5′), 7.38(1H, dd, J=2.8Hz, H-6′), 7.46(1H, d, J=2Hz, H-2′), ^{13}CNMR (75MHz, acetone d_6+D_2O) δ: 17.8(c-6″), 71.3, 71.4, 72.1, 73.0(c-2″ ,3″,4″ ,5″), 94.5(c-8), 99.4(c-6), 102.7(c-1″), 105.8(c-10), 116.1, 116.7(c-2′,5′), 122.6, 122.9(c-1′,6′), 135.8(c-3), 145.8(c-3′), 148.9(c-4′), 158.0, 158.3(c-2, 9), 162.9, 164.8(c-5,7), 179.3(c-4).

화합물 4의 산 가수 분해 - 화합물 4(50 mg)를 8% HCl-dioxane 용액 3 ml에 현탁시킨후 80 ° 수욕상에서 reflux 시킨뒤 반응액을 완전히 농축시킨다. 농축액은 소량의 물에 녹인후 Sephadex LH-20 column에 걸어, 물로 elution시켜 glucose를 얻어, 표품과 함께 co-TLC를 실시하여 확인하였다.

화합물 6의 산가수분해 - 화합물 6(50 mg)을 8% HCl-dioxane 3 ml에 용해한 후 80o에서 1시간 reflux시켰다. 반응액은 동량의 EtOAc로 분획하여 물층에서 glucose를, EtOAc층에서 gallic acid 및 quercetin을 확인 하였다.

결과 및 고찰

화합물 1은 황색분말로 positive FAB-MS에 있어서 m/z 205에 $[M+H]^+$ ion peak를 나타낸다. ^{1}HNMR spectrum은 δ 3.85에 aromatic carbon에 결합한 methoxyl proton에 기인하는 3H 분의 singlet이, δ 6.04에 olefinic proton에 기인하는 1H분의 singlet이, δ 7.20, 7.41, 7.52에 coupling pattern으로 보아 각각 인접해 있는 aromatic proton signal이, 그리고 δ 12.5에 hydrogen bonding을 하고 있는 전형적인 hydroxyl proton signal 이 관찰된다. 또 ^{13}CNMR spectrum에서는 δ 56.7의 methoxyl carbon signal을 제외하고 δ 109.5, 119.6, 125.2, 135.5에 olefinic methine carbon signal이, 114.1, 131.0, 161.0 및 161.1에 olefinic quaternary carbon signal이, 그리고 δ 179.4 및 190.7에 carbonyl carbon signal이 관찰되어, 화합물 1은 dihydroxy 1.4-naphthoquinone(1a 혹은 1b)의 2개의 hydroxyl group중 하나가 methoxyl group으로 치환된 화합물로 추정된다(Table II)[3]. 2,5-dihydroxynaphthoquinone(1a)과 3,5-dihydroxynaphthoquinone(1b)는 2개의 carbonyl carbon signal의 chemical shift가 크게 차이가 나고 있으며 화합물 1에 있어서 carbon signal의 chemical shift가 1a에 매우 유사하여, 화합물 1은 2,5-dihydroxy-1,4-naphthoquinone의 methyl ether로 추정되며, methyl group의 결합위치는 1HNMR spectrum에서 12.5에 hydr-

Table II. ^{1}H and ^{13}CNMR spectral data(δ value) of compounds 1, 1a and 1b.

	1[a]	1a[b]	1b[b]
C-1	179.4	180.4	183.5
C-2	161.0	160.5	111.1
C-3	109.5	110.3	159.5
C-4	190.7	191.7	185.3
C-5	161.1	159.8	160.3
C-6	125.2	124.5	122.8
C-7	135.5	135.2	136.9
C-8	119.6	118.6	117.7
C-9	131.0	130.6	132.2
C-10	114.1	113.8	114.1
OCH_3	56.7	-	-
H-3	6.04	6.11	6.13
H-6	7.20	7.28	7.25
H-7	7.52	7.64	7.71
H-8	7.60	7.50	7.45

[a]$CDCl_3$, [b]DMSO-d_6.

ogen bonding을 하고 있는 hydroxyl proton signal이 관찰되므로 2위로 결정했다. 따라서 화합물 1은 5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone으로 결론, 표품과 각종 spectral data를 직접 비교하여 확인했다.[4]

화합물 2는 백색분말로 Liebermann Buchard 반응에 양성을 나타내었다. 화합물 2의 ^{13}CNMR spectrum에서는 δ 15.4, 16.3, 17.1, 17.2, 21.2, 23.5 및 28.6에 methyl carbon signal이 관찰되고, δ 124.8, 138.4에 olefinic carbon signal, δ 178.5에 carboxyl carbon signal, δ 77.0에 oxygen bearing carbon signal이 관찰된다. 또 ^{1}HNMR spectrum에서는 0.5-3.5 사이의 복잡한 methine, methylene 및 methyl proton signal 이외에 δ 4.30의 oxygen bearing methine proton 및 δ 5.10에 olefinic proton에 귀속되는 proton signal이 관찰된다.

이상의 각종 spectral data의 검토 결과, 화합물 2는 분자내에 double bond, -OCH- 및 carboxyl group을 각각 1개씩 갖고 있는 triterpene인 ursolic acid로 결론짓고, 표품과 각종 spectral data를 직접 비교하고, co-TLC를 실시하여 확인하였다.[5]

화합물 4는 담갈색분말로 positive FAB-MS에 있어서 *m/z* 339에 $[M+H]^+$ ion peak를 나타낸다. ^{1}HNMR spectrum에서는 aliphatic field에서 1개의 hexose에 기인하는 methine 및 methylene proton peak가 관찰되고, anomeric proton peak가 down field shift(δ 5.06)되어 관찰된다. Aromatic field에서는 잘 분리된 5개의 proton peak(δ 6.77, 6.82, 7.25, 7.32, 7.69)가 관찰된다. 이들 aromatic proton peak는 ^{1}H-^{1}H-COSY spectrum의 검토결과 두개의 인접한 proton(δ 6.77, 7.25)과 3개의 인접한 proton peak (δ 6.82, 7.32, 7.69)임이 밝혀졌다. 화합물 4의 ^{13}CNMR spectrum에서는 δ 65-105사이에 1개의 hexose에 기인하는 6개의 carbon signal이 관찰되고 aromatic field에서는 모두 10개의 carbon signal이 관찰되는데 이들중 δ 146.9, 149.1, 153.6등 3개의 carbon은 산소가 결합된 carbon임을 시사하고 있다. 이상의 MS, ^{1}H- 및 ^{13}CNMR spectrum의 검토 결과 화합물 4는 1,4,8-trihydroxynaphthalene ring에 hexose가 glycosidic linkage를 하고 있는 것으로 추정된다. 또 본 화합물을 HCl-dioxane중에서 가수분해하여 glucose를 얻었다. 따라서 화합물 4는 4,8-dihydroxynaphthalene 1-*O*-β-$_D$-glucoside로 결론, 표품과 각종 spectral data를 직접 비교하고 co-TLC를 실시하여 확인하였다.[6]

화합물 5는 담갈색분말로, $FeCl_3$에 의해 오록색으로 발색하며 FAB-MS에 있어서 *m/z* 288에 molecular ion peak를 나타낸다. ^{1}HNMR spectrum에서는 δ 2.90, 3.30에 각각 1H분의 geminal methylene proton 및 이들과 각각 coupling하고 있는 methine proton이 δ 5.48에서 관찰된다. 또 aromatic field에 있어서는 δ 6.35 및 6.44에 서로 m-coupling하고 있는 2개의 proton signal 이외에 δ 7.08, 7.23 및 7.52에 서로 o-, m-coupling 하고 있는 3개의proton signal이 관찰된다. ^{13}CNMR spectrum에서는 δ 42.2에 methylene carbon, δ 78.4에 oxygen bearing methine carbon sinal이 관찰되고, aromatic field에서는 13개의 carbon signal중 δ 196.0의 carbonyl carbon signal 외에 δ 145.3, 145.7, 162.9, 163.6 및 166.7등 5개의 carbon signal이 저자장 shift하여 관찰된다. 이상 ^{1}H- 및 ^{13}CNMR의 결과와 ^{13}C-^{1}H-COSY 및 ^{1}H-^{13}C long range COSY spectrum의 검토결과 화합물 5는 분자내에 1,3,4-trisubstituted benzene ring, 1,2,3,5-tetra substituted benzene ring 및 -OCHCH$_2$C(O)-의 부분구조가 확인되고 MS에서 *m/z* 288에 molecular ion peak가 관찰되는 점으로 보아 flavanone인 eriodictyol이라 결론, 표품과 각종 spectral data를 비교하여 확인했다.[7]

화합물 6은 담황색분말로 얻어졌으며 $FeCl_3$에 청록색으로 발색하고 Mg(Zn)+HCl test에 양성을 나타내는 것으로 보아 flavonoid임을 추정할 수 있다. 본 화합물의 ^{1}HNMR spectrum은 aromatic field에 있어서 1개의 hexose에 기인하는 모두 7H분의 methine 및 methylene proton signal이 관찰되고 이중 2개의 methine proton signal (δ 4.72 및 5.44)이 저자장 shift하여 관찰되며 이들은 ^{1}H-^{1}H-COSY spectrum의 검토 결과 hexose의 2 및 1위의 proton signal에 귀속되었다.

도 aromatic field에서는 서로 *m*-coupling 하고 있는 2개의 proton(δ 5.80, 6.00) 및 o- 또는 *m*-coupling 하고있는 3개의 proton signal(δ 6.40, 6.98, 7.06)이 관찰되고, galloyl group에 기인하는 2H분의 singlet이 관찰된다. 이상의 spectrum의 검토 결과 본 화합물은 hexose에 quercetin 및 galloyl group이 결합한 화합물로 추정된다. 또 화합물 6을 HCl-dioxane으로 가수분해하여 glucose, quercetin 및 gallic acid를 얻었다. 이상의 결과로부터 화합물 6는 quercetin-3-*O*-(2″-*O*-galloyl)-β-$_D$-glucopyranoside로 결론, 표품과 각종 spectral data를 직접 비교하고 co-TLC를 실시하여 확인 하였다.[8]

화합물 7은 황색분말로 ^{1}HNMR spectrum이 화합물 6과 매우 유사한 pattern을 보이고 있고 ^{13}CNMR에서도 aliphatic field의 carbon signal이 약간 차이가 날 뿐 매우 유사한 chemical shift를 나타내고 있다. 따라서 본 화합물은 화합물 6의 구조이성체로 생각되며 단지 quercetin에 결합된 sugar가 다른 화합물로 추정된다. Sugar의 경우 저자장 shift하고 있는 2위의 proton signal이 *J* value가 큰 것으로 보아 glucose와 1, 2, 3위의 배위가 같은 것임을 알 수 있다. 본 화합물을 8% HCl-dioxane으로 산가수분해하여 gallic acid, galactose 및 quercetin을 얻었다. 따라서 본 화합물은 Quercetin 3-(2″-*O*-galloyl)-*O*-β-$_D$-galactoside로 결론, 표품과 각종 spectral data를 비교하여 확인 했다.[9]

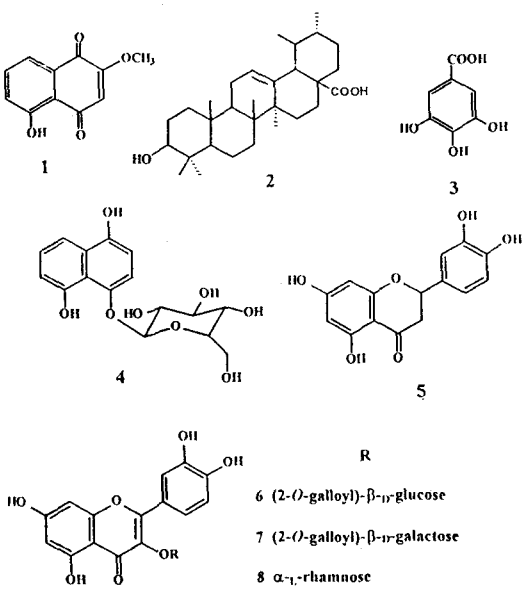


Fig. 1.

화합물 8은 담황색분말로 얻어졌으며 $FeCl_3$에 오록색, Zn(Mg)+HCl test에 홍색을 나타내는등 flavonoid 확인반응에 양성을 나타내었다. 화합물 8의 ^{1}HNMR spectrum은 aliphatic field에 1개의 anomeric proton signal이 저자장 shift하여 관찰되고(δ 5.49) 또 δ 0.89에 rhamnose의 methyl group에 기인하는 전형적인 3H분의 doublet이 관찰된다. 또 aromatic field의 잘 분리된 5H분의 proton signal은 화합물 7에 있어서 1HNMR spectrum의 aromatic 영역과 매우 유사하다. 따라서 본화합물은 quercetin의 3위에 rhamnose가 glycosidic linkage를 하고있는 화합물로 추정되며, anomeric center의 배위는 anomeric proton signal의 coupling constant가 2Hz로 작은 것으로 보아 α-위로 추정했다. 이상의 결과로부터 화합물 8은 quercetin-3-*O*-α-$_L$-rhamnopyranoside로 결론, 표품과 각종 spec-tral data를 직접 비교하여 확인 하였다.[10]

굴피나무잎의 CH_2Cl_2 soluble part로부터 분리한 8종의 화합물에 대하여 SRB법에 의한 5종의 인체고형암 세포에 대한 *in vitro*에서의 cytotoxicity를 측정하여 Table III에 나타내었다. Table에 나타낸 바와 같이 6종의 화합물이 활성에 큰 차이를 나타냈으며 그중 화합물 1이 모든 세포주에 대

Table III. Cytotoxic activity of the compounds from the *Platycarya strobilacea* against the human tumor cell lines *in vitro*

Compounds	ED_{50}(μg/ml)[a]				
	A 549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF-498	HCT-15
1	1.56	1.70	1.50	2.17	1.23
2	2.78	2.83	3.44	5.07	4.89
3	23.72	21.04	6.18	28.16	18.98
4	>100	>100	31.72	>100	46.91
5	36.25	23.89	30.27	31.30	37.85
6	>100	98.71	>100	>100	>100
7	>100	87.86	78.63	>100	>100
8	>100	>100	58.89	>100	>100

[a]ED_{50} value of compound against each cancer cell line, which was defined as a concentration that caused 50% inhibition of cell growth *in vitro*.

하여 가장 강한 활성을 나타내었다. 화합물 1은 1986년 Barre등에[3] 의하여 합성되어 HIV에 대한 항virus 효과등이 밝혀져 있는 화합물로 천연에서 분리된 예는 아직 보고되고 있지 않다. 화합물 2는 전형적인 ursan계통의 triterpene으로 이미 *Prunella vulgaris*에서 분리되어 항virus효과 및 암세포에 대한 cytotoxicity가 알려져 있다.[11] 화합물 3은 gallic acid로 식물체 내에서 hydrolysable tannin 혹은 condensed tannin을 구성하는 중간체로 알려져 있고, 이미 상당수의 tannin류가 각종 인체암세포에 대하여 *in vitro*에서 세포독성을 나타낸다는 보고가 있다.[12,13] 화합물 4는 naphthalene의 glycoside로 활성 자체는 그리 강하지 않으나 가래나무과의 Juglans속 식물로부터 분리된 juglone이 암세포에 대한 성장저해작용이 있다는 보고가 있고,[14] *Juglans mandshurica* 뿌리로부터 분리된 유사한 구조를 가진 화합물들이 역시 암세포에 대하여 독성을 나타낸다는 보고[15]와 함께 약리활성과 구조와의 상관관계에 대한 많은 연구가 있어야겠다. 화합물 5, 6, 7, 8은 모두 flavonoid계열로, 화합물 5가 화합물 6, 7, 8에 비해 훨씬 강한 활성을 나타내고 있다. 구조적으로는 화합물 5가 flavone의 2, 3위가 saturation 되어 있고, 화합물 6, 7, 8이 unsaturation되어 있는 점이 크게 다른 점으로 구조-활성관계에 있어서 흥미있는 점이라 할 수 있다. 또 화합물 6, 7은 분자내에 galloyl group을 가지고 있는 화합물로 gallic acid(3) 단독인 경우보다 약한 활성을 보인 것도 흥미있는 사실이다.

결 론

천연물로부터 항암활성을 나타내는 물질을 개발할 목적으로 굴피나무잎의 MeOH Ex에 대하여 activity guided fractionation에 의하여 8종의 active compounds를 단리하였으며 이들은 각종 spectral data의 검토 및 표품과의 직접적인 비교에 의하여 각각 5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone, ursolic acid, gallic acid, 4,8-dihydroxy naphthalene1-*O*-β-$_D$-glucoside, eriodictyol, quercetin 3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-β-$_D$-glucoside, quercetin 3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-β-$_D$-galactoside 및 quercetin 3-*O*-α-$_L$-rhamnoside로 확인 되었다. 분리된 화합물들의 인체 고형암세포에 대한 세포독성은 5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone이 가장 강했으며 flavonoid계열의 화합물중에서는 flavone계열 보다는 flavanone계열의 화합물이 강한 활성을 나타내었다.

사 사

본 연구의 일부는 학술진흥재단 1995년도 학술연구조성비(과제번호, 04 F 0090)에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 육창수. (1990) 원색 한국 약용식물도감, 117. 아카데미서적, 서울.
2. Ryu, S. Y., Lee, C. K., Lee, C. O., Kim. H. S. and Zee, O. P. (1992) Antiviral triterpenes from *Prunella vulgaris*. *Arch. Pharm. Res.* 15(3): 242-245.
3. Barre, G., Hocquaux, M., Jacquet, B., Min, M., Maurette, M. T. and Oliveros, E. (1986) Differenciation entere les dihydroxy-2,5-et-3,5-naphthoquinones-1,4 parresonance magnetique nucleaire du ^{13}C et ^{1}H, et heteronucleaire a deux dimensions. *Tetrahedron Letters* 51: 6197-6200.
4. Khanna, R. N., Singh, K. P., Yadav, S. K. and Srinivas, S. (1989) Iodine catalized alkoxylation of naphthoquinones. *Syn. Commun.* 19: 3151-3157.
5. Tabba, H. D., Chang, R. S. and Smith, K. M. (1989) Isolation, purification and partial characterization of prunellin, an anti HIV component from aqueous extracts of *Prunella vulgaris*. *Antiviral Res.* 11: 263-267.
6. Muller, W.-U. and Leistner, E. (1978) Aglycones and glycosides of oxigenated naphthalenes and a glycosyltransferase from *Juglans*. *Phytochemistry*. 17: 1739-1742.
7. Hoffmann, B. G and Lunder, L. T. (1984) Flavonoids from *Mentha piperita* leaves. *Planta Medica* 50: 361-364.
8. Isobe, T., Fukushige, T. and Noda, . (1979) A new flavonoid glycoside from *Polygonum no-*

dosum. *Chemistry Letters* 27-30.
9. Pachaly, P. and Klein, M. (1987) Constituents of *Andromeda prolifolia*. *Planta Medica* 53: 442-443.
10. Markham, K. R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H. and Mabry, T. J. (1978) Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III. Naturally accurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* 34: 1389-1397.
11. Ryu, S. Y., Choi, S. U., Lee, S.-H., Lee, C. O., No, Z. and Ahn, J. W. (1994) Antitumor triterpenes from medicinal plants. *Arch. Pharm. Res.* 17: 375-377.
12. Miyamoto, K.-I., Murayama, T., Nomura, M., Hatano, T., Yoshida, T., Furukawa, T., Koshiura, R. and Okuda, T. (1993) Antitumor activity and interleukin I induction by tannins. *Anticancer Res.* 13: 37-42.
13. Galli, H. U., Perchellet, E. M., Klish, D. S., Johnson, J. M. and Perchellet, J.-P. (1992) Antitumor promoting activities of hydrolysable tannins in mouse skin. *Calcinogenesis* 13: 715-718.
14. Bhargave, U. C. and Westfall, B. A. (1968) Anticancer activity of *Juglans nigra* (black walnut) extractives. *J. Pharm. Sci.* 57: 1074-1077.
15. 조윤기 (1994) 가래나무(*Juglans mandshurica*) 뿌리로부터 세포 독성물질의 분리 및 구조결정. 석사학위논문, 영남대학교.

(1996년 8월 29일 접수)