

Ranunculin 및 Protoanemonin의 합성법의 개선 및 세포독성 평가

방성철 · 김용 · 안병준*

충남대학교 약학대학

(Received February 10, 2004; Revised April 6, 2004)

Modified Synthetic Method & Cytotoxic Activity of Ranunculin and Protoanemonin

Seong-Cheol Bang, Yong Kim and Byung-Zun Ahn*

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract — Ranunculin, a potent cytotoxic component of *P. koreana*, was synthesized by reacting (s)-(-)-5-(hydroxymethyl)-2(5H)-furanone with 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl bromide and successive removal of the acetyl protecting group by 0.5 M HCl/MeOH. A new deacetylation process of the intermediate tetraacetylrunculin was devised giving a yield of 83% of ranunculin. Protoanemonin, the cytotoxic structural moiety of ranunculin, was synthesized by dehydration of (s)-(-)-5-hydroxymethyl-2(5H)-furanone. Ranunculin showed a moderate cytotoxic activity against A-549 (ED_{50} =7.53 μ g/ml), NIH3T (ED_{50} =13.6 μ g/ml), and SK-OV-3 (ED_{50} =17.5 μ g/ml). Meanwhile, protoanemonin also exhibited moderate cytotoxicity against A-549 (ED_{50} =9.38 μ g/ml), NIH3T (ED_{50} =13.8 μ g/ml), and SK-OV-3 (ED_{50} =15.1 μ g/ml). It was found that both of the synthetic products showed a potenter cytotoxicity against A-549.

Keywords □ ranunculin, protoanemonin, synthesis, cytotoxic activity

할미꽃(*Pulsatilla koreana*)¹⁾은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 식물이며 그 뿌리를 건조한 것을 백두옹(白頭翁)이라 하며 우리나라 각지에 분포하여 자생하고 있다. 백두옹은 항 amoeba 작용, 항 trichomonas 작용, 항 진균작용 등이 알려져 있으나, 한방에서는 산열(散熱), 해독(奚毒), 양혈(養血), 지사약(止瀉藥) 등으로서 열독성 혈리, 말라리아, 비출혈, 치출혈에 사용된다. 백두옹에는 약 9%의 사포닌이 함유되어 있고, 이는 주로 hederagenin, oleanolic acid 및 betulinic acid를 aglycone으로 하고 있고 protoanemonin, anemonin, ranunculin도 주성분으로 함유되어 있다.

또한, 최근에는 Wen²⁾ 등에 의해 pulsatillilic acid, 김³⁾ 등에 의해 deoxypodophyllotoxin(DPT)이 분리, 보고되었다. 특히 DPT는 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 농도보다 훨씬 낮은 농도에서 사람의 배꼽상피세포(human umbelical vein endothelial cells, HUVECs)에 대한 튜브모양형성(tube-like formation) 억제 효과를 나타내었다.

Ranunculin의 합성은 Camps 등⁴⁾에 의해 처음으로 D-ribonol-

actone을 출발물질로 하여 전합성되었다. 또한, ranunculin의 활성본태(active principle)로 알려진 protoanemonin(5-methylene-2(5H)-furanone)⁵⁾은 antifungal activity, antibiotic activity, mitotoxicity 등 여러 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며,⁶⁾ Li⁷⁾ 등은 이 물질의 세포독성을 확인하고, 그 작용기전을 DNA-polymerase 저해라고 보고하였다.

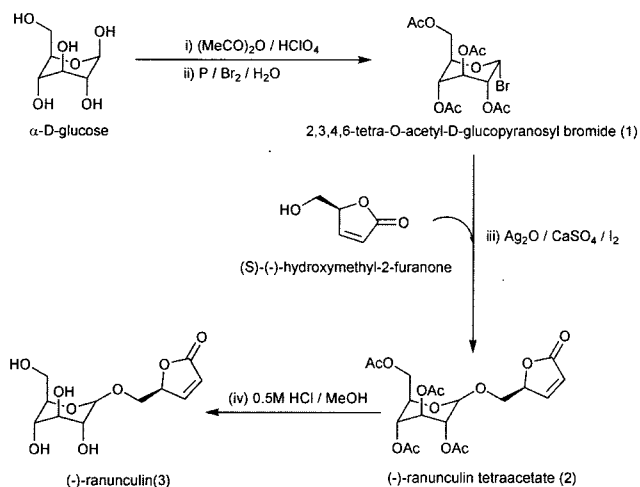
따라서, 본 실험실에서는 Camps 등이 제시한 합성방법을 참고하여 ranunculin 과 protoanemonin 을 직접 합성하였으며, A-549, NIH3T, SK-OV-3 세포에 대한 세포독성을 측정하고자 하였고, 동시에 Camps 등의 합성방법에 대한 문제점을 지적하고 이를 개선하여 보다 용이한 ranunculin 의 합성방법을 제시하였다.

실험재료 및 방법

시약 및 기기

화합물의 분리 정제에 사용된 column chromatography 용 silicagel(70~230 mesh)과 TLC용 박막은 Merck사 제품을, HPLC용 컬럼은 Metachem사 제품(polygosil 10 μ m C-18, 250 \times 10.0 mm)을 사용하였으며, 합성에 사용된 시약은 Aldrich사 제품을 구입하여 사용하였으며 반응 용매와 생성물의 분리를 위해 사용된 용매류는 국내외의 일급 또는 특급을 사용하였고, 공업

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 041-857-3686 (팩스) 041-857-7854
(E-mail) ahnbj@cnu.ac.kr



Scheme 1 – Synthetic pathway of ranunculin.

용인 경우에는 증류하여 사용하였다. 용점은 Electrothermal melting point apparatus를 사용하여 측정하였으며, IR spectrophotometer는 JASCO, IR Report-100를, NMR-spectrometer는 Bruker AMX 400 spectrometer, Bruker AMX 300 spectrometer 또는 Jeol EX-90(90 MHz)를 사용하였다. 시료는 CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$ 에 녹이고 chemical shift는 표준물질인 tetramethyl silane(TMS)을 사용하여 상대적인 δ 로 나타내었다.

Ranunculin의 합성

2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranosyl bromide(1)의 합성 – 100 ml 환저플라스크에 $(\text{AcO})_2\text{O}$ 232 g(200 ml, 2.14 mol)을 넣고 4°C로 냉각시킨 후, HClO_4 (60%) 1.2 ml를 교반하면서 적가하였다. 반응액을 30~40°C로 유지하면서 건조된 D-glucose 50 g(0.28 mol)을 소량씩 교반하면서 가한 후, 20°C로 다시 냉각시켰다. 반응액에 적린(phosphorus red, 15.5 g, 0.5 mol)을 소량씩 가하고, 곧바로 Br_2 (29 ml, 1.13 mol, 90.5 g)을 적가하였다. 반응액의 온도가 40 °C 이상으로 올라가지 않도록 주의하면서 18 ml의 증류수를 서서히 가하였다. 반응물을 상온에서 2시간 가량을 더 교반한 후, 1시간 동안 방치하여 생성되는 불순물은 셀라이트(cellite)를 이용하여 필터하였다. 여액은 400 ml의 포화 NaHCO_3 수용액을 이용하여 중화시킨 후, MC(methylene chloride)로 3회 추출(150 ml×3회)하고, 이를 합하고 무수 망초로 탈수, 여과하여 감압농축하였다. 이렇게 얻은 잔사를 gradient 용매조건(Cy.Hx-EA=5 : 1 → 3 : 1의 혼합용매조건)으로 Si gel column chromatography를 실시하여 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranosyl bromide을 87.4 g 얻었다.

Rf=0.56 (in Cy.Hx-EA=3 : 1), yield : 76%, IR (KBr, cm^{-1}) : 1750 (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, in CDCl_3) : δ 6.62 (d, $J=3.0$ Hz, 1H), 5.59 (t, 1H), 5.19 (t, 1H), 4.85 (t, 1H), 4.32 (m,

1H), 4.15 (d, $J=2.0$ Hz, 2H), 2.11~2.04 ($4\times\text{CH}_3$).

(-)-ranunculin tetraacetate(2)의 합성 – (S)-(-)-5-(Hydroxymethyl)-2(5H)-furanone 283 mg을 무수 CHCl_3 8 ml에 녹인 후 Ag_2O 629 mg, CaSO_4 1.7 g, I (iodine) 125 mg을 넣고 교반하면서 무수 CHCl_3 10 ml에 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranosyl bromide 1.02 g(2.48 mmol)을 녹인 용액을 서서히 적가하였다. 24시간, 48시간, 72시간이 지날 때 마다 각각 Ag_2O 315 mg과 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranosyl bromide 510 mg(1.47 mmol)을 무수 CHCl_3 8 ml에 녹인 용액을 천천히 적가하였다. 반응이 완결된 96시간 후, 반응물을 셀라이트로 여과하여 불용성물질을 여과하고, 여액을 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 수용액과 물로 세척한 후, MC 200 ml를 사용하여 3번 추출하고, 추출액을 감압 농축하였다. 이렇게 얻은 잔사를 Cy.Hx-EA=1 : 2 혼합용액을 전개용매로 Si gel column chromatography를 실시하여 무색 결정형인 (-)-ranunculin tetraacetate을 410 mg 얻었다.

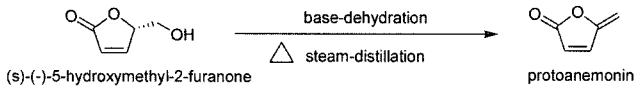
Rf=0.18 (in Cy.Hx-EA=1 : 2), yield : 37%; m.p : 136°C; $[\alpha]_D^{27}$: -24; IR (KBr) : 1750 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, in CDCl_3) : δ 7.48 (dd, $J=5.4$, $J=1.6$ Hz, 1H), 6.21 (dd, $J=5.6$, $J=2.8$ Hz, 1H), 5.24-4.98 (overlap, 3H), 4.61 (d, $J=6$ Hz, 1H), 4.27 (dd, $J=12$, $J=4.4$ Hz, 1H), 4.17 (dd, $J=12.4$, $J=2.4$ Hz, 1H), 4.02 (dd, $J=11.2$, $J=4.8$ Hz, 1H), 3.79 (dd, $J=11$, $J=6.8$ Hz, 1H), 3.69-3.72 (overlap, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H).

(-)-ranunculin(3)의 합성 – 0.5 M HCl 이 들어있는 MeOH 용액 100 ml에 (-)-ranunculin tetraacetate 130 mg(0.27 mmol)을 녹인 후 5°C로 유지하면서 24 시간 교반하고, 이를 40°C 이하에서 감압농축시켜 P_2O_5 가 들어있는 데시케이터에서 24시간동안 탈수시켰다. 이렇게 얻은 잔사에 30 ml MeOH를 가하여 녹인 후, 이를 800 mg Si gel에 흡착시켜 Si gel column chromatography(전개용매; MC-MeOH=4 : 1)를 실시하여 (-)-ranunculin 66 mg 얻었다.

Rf=0.3 (in MC-MeOH=4 : 1); yield : 83%; m.p : 140°C; $[\alpha]_D^{27}$: -80; IR (KBr) : 3380, 1750, 1580 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, in DMSO) : δ 7.83 (dd, $J=5.4$, 1.6 Hz, 1H), 6.28 (cd, $J=5.6$, 2.8 Hz, 1H), 5.34 (m, 1H), 5.05 (d, $J=2$ Hz, 1H), 5.04 (d, $J=1.6$ Hz, 1H), 4.98 (d, $J=9$ Hz, 1H), 4.53 (t, 1H), 4.21 (d, $J=8$ Hz, 1H), 4.02 (dd, $J=11.2$, 4.0 Hz, 1H), 3.63 (cd, $J=10.5$, 6.0 Hz, 6H), 3.69-2.96 (overlap, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, in DMSO): butenolide part : δ 173.3, 156.1, 121.8, 82.9 glucoside part : δ 103.5, 77.3, 76.9, 73.6, 70.2, 61.4.

Protoanemonin: 5-Methylene-2(5H)-furanone의 합성

Protoanemonin의 합성은 Scheme 2에서 보는 바와 같이, ranunculin 합성의 출발물질로 사용되는 (s)-(-)-5-hydroxymethyl-



Scheme 2 – Synthetic pathway of protoanemonin.

2-furanone을 염기조건하에서 수증기 증류(steam-distillation) 방법을 이용하여 탈수(dehydration)함으로써 간단히 합성할 수 있다.⁸⁾

50 ml 수증기 증류 환저플라스크에 1 M $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ (20 ml)에 (S)-(-)-5-hydroxymethyl-2-furanone 100 mg (0.88 mmol)을 넣은 후, 수증기증류를 1~2시간 가량을 실시한 다음, 증류물을 MC (200 ml \times 2회)을 사용하여 추출, 추출액을 합하여 무수망초로 탈수, 감압농축하였다. 이렇게 얻은 잔사를 flash Si gel column chromatography를 사용하여 분리, 정제하여 protoanemonin 27 mg (0.28 mmol)을 얻었다.

Yield : 32%, b.p : 58~60°C, IR (in CHCl_3) : 1785, 1750, 1650, 1565 cm^{-1} , $^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, in CDCl_3) : δ 7.30 (d, $J=5.3$ Hz, 1H), 6.14 (dd, $J=5.3$ Hz, 1.6 Hz, 1H), 5.13 (dd, $J=2.0$ Hz, 1.6 Hz, 1H), 4.81 (d, $J=2.0$ Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, in CDCl_3) : δ 169.3, 154.8, 143.2, 121.3, 97.5.

In vitro 세포독성

암세포에 대한 독성실험은 1989년에 미국 국립 암연구소에서 약물의 *in vitro* 항암활성을 측정하기 위하여 개발된 Sulfor-Rhodamine-B(SRB)법을 사용하였다.⁹⁾ 실험에 사용할 세포들을 0.5% trypsin-EDTA 용액으로 부착면으로부터 분리시키고 $3\sim 5 \times 10^4$ cells/ml의 세포 현탁액을 만든 다음 96 well plate의 각 well 에 180 μl 씩 가하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양하였다. 시료는 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여 실험에 필요한 농도까지 실험용 배지 또는, 3차 증류수로 희석하여 최종 DMSO의 농도가 0.2% 이하가 되도록 단계별로 희석하였다. 96 well plate의 각 well 에 단계별 농도로 희석한 시료를 각각 20 μl 씩 넣어준 다음, 37°C, 5% CO_2 배양기에서 48시간 배양하였다. 시료를 가한 시점에서 Time zero(Tz) plate를 수집하였다. Tz plate 및 배양이 끝난 후 각 plate의 media를 제거하고, 10% trichloroacetic acid(TCA)를 각 well당 50 μl 씩 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치하여 세포들을 plate의 바닥면에 고정시킨다. 세포의 고정이 끝난 후, plate는 well당 50 μl 의 1% 초산용액에 0.4% SRB를 녹인 염색용액을 가하여 30분간 세포를 염색하고 다시 1% 초산용액으로 수회 세척하여 세포에 결합하지 않은 SRB를 실온에서 제거시켰다. 남은 부분에는 10 mM Tris 용액 100 μl 를 가해 염료를 녹여 microplate reader로 520 nm에서 optical density(O.D.)값을 측정하였다. 암세포에 대한 ED_{50} (50% effective dose)값은 다음과 같이 계산하였다. 시료를 가하여 배양을

시작하는 시간에 수집하여 SRB-단백질의 양을 측정하여 그 값을 Tz로 하였다. 즉, 초기의 살아있는 세포수를 초기값(Tz)로 정했다. 시료를 처리하지 않고 배양한 O.D. 값을 대조군(C)으로 하고 시료를 처리하고 배양한 well의 O.D. 값을 약물 처리된 실험값(T)으로 하였다. Tz, C 및 T로부터 다음의 수식에 의해 물질들의 세포독성 정도를 측정하였다. 즉 $Tz=T$ 인 경우에는 $\{(T-Tz)/(C-Tz)\} \times 100$ 의 수식으로 계산하였다. 이렇게 계산된 값들로부터 Lotus program의 data regression 기능을 이용하여 약물의 암세포성장을 50% 억제하는 농도인 50% effective dose(ED_{50}) 값을 계산하여 각 물질들의 세포독성 정도를 비교하였다.

결과 및 고찰

Ranunculin의 합성

출발물질 중의 하나인 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-(D-glucopyranosyl bromide)의 합성은 Vogel¹⁰⁾ 등의 방법을 이용하여 수율 83%로 합성하였다. 먼저, α -D-glucopyranose의 5개 hydroxy기들이 $(\text{AcO})_2\text{O}$ 와 perchloric acid 존재하에서 아세틸화하고, 이어 anomeric acetyl기가 브롬화하였다. $^1\text{H-NMR}$ 상에서는 glucose (in D_2O)의 anomeric proton이 5.2 ppm 부근에서 나타나는데 반해, 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl bromide에서는 이웃한 브롬의 전자끌개효과로 인하여 6.62 ppm까지 저자장으로 이동하여 나타나는 것과 4개의 acetyl기의 CH_3 가 2.01~2.11 ppm에서 나타난 것으로 보아 목적하는 화합물이 합성되었음을 확인하였다(수율 : 86%). 또한, anomeric proton의 결합상수가 3 Hz 정도의 작은 값을 갖고 있으므로 α -form임을 알 수 있었다. 이렇게 합성된 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl bromide와 (S)-5-hydroxymethyl furanone을 Koenigs-Knorr reaction¹¹⁾을 이용하여 축합시킴으로써 백색결정의 ranunculin tetraacetate를 37%의 수율로 합성하였다. Ranunculin tetraacetate의 구조는 IR과 $^1\text{H-NMR}$ 을 이용하여 확인하였다.

$^1\text{H-NMR}$ 상에서 aglycone의 α - 및 β -proton이 서로 coupling하여 6.21 ppm과 7.48 ppm에서 dd(doublet of doublet)로 나타나고 있으며, anomeric proton이 4.61 ppm에서 d(doublet)로 나타나고 있음을 확인할 수 있었다. 이 때, anomeric proton의 결합상수가 비교적 큰 값($J=6$ Hz)을 갖고 있었으므로 α -form임을 알 수 있었으며, 3번과 4번 proton은 5.24~4.98 ppm에서 관찰할 수 있었다.

최종 물질인, ranunculin을 얻기 위한 ranunculin tetraacetate의 탈아세틸화반응(deacetylation)에 있어서 Camps 등⁴⁾은 1 ml의 dioxane과 5 ml의 1.5% aq. HCl 혼합용매에서 5시간 동안 환류냉각하고 남은 잔사를 P_2O_5 가 들어 있는 데시케이터에서 2주 동안 탈수시킨 후 메탄올로 재결정하는 방법을 사용하고 있다. 그러나, 본인은 이 방법을 추시해 보았으나, 소기의 목적을 달성

할 수 없었다. 이는 ranunculin의 glycosidic bonding이 수증기 증류라는 격렬한 반응조건에서 깨어지기 때문으로 사료된다. 실제로, Camps 등의 방법으로 ranunculin tetraacetate를 5시간 동안 환류하여 얻은 생성물을 박막 크로마토그래피(TLC)를 실시한 결과, MC-MeOH=4 : 1 용매조건에서 반응물의 Rf 값은 0.03으로 나타났으며, 이는 glucose 보다도 낮은 Rf 값이었다. 이러한 결과는 위와 같은 ranunculin tetraacetate의 탈아세틸화 반응 조건하에서는 glucose 보다도 극성이 높은 물질이 생성됨을 말해 주는 것으로, 이는 ranunculin의 물성에 위배되는 것이라 할 수 있다. 그러므로, ranunculin tetraacetate의 glycosidic bonding이 유지되면서 효과적으로 아세틸기를 제거시킬 수 있는, 보다 온화한 반응조건이 필요하였다. 이러한 이유로, ranunculin tetraacetate을 0.5 M HCl/MeOH 용액에 녹이고, 이 반응용액을 5°C 하에서 24시간 동안 교반함으로써 탈아세틸화를 유도하는 방법을 고안하였다. 실험결과, 위와 같은 방법에 의해 ranunculin을 우수한 수율(83%)로 합성할 수 있었으며, ranunculin tetraacetate을 탈아세틸화하여 최종 ranunculin을 얻기까지 소요되는 시간 역시, Camps 등이 제시한 2주(336시간)에서 24시간 내로 단축시킬 수 있었다.

합성된 ranunculin의 구조는 IR과 ¹H-NMR을 이용하여 확인하였다. 먼저, ¹H-NMR 상에서 2.09~2.01 ppm에서 아세틸 피크가 사라진 것으로 탈아세틸화가 진행되었음을 알 수 있었다. 또한, ranunculin tetraacetate 구조에서와 마찬가지로 furanone 구조의 α- 및 β-proton이 서로 coupling하여 dd로 각각 6.21과 7.48 ppm에서 나타나고 있으며, 4.21 ppm(*J*=8 Hz, d)에서는 anomeric proton을 관찰할 수 있었다. 이로써, ranunculin의 입체구조는 α-form임을 확인하였다.

Protoanemonin의 합성

Protoanemonin은 32%로 수율로 합성되었으며, 무색의 유상물질이었다.

먼저, IR 상에서 protoanemonin의 기본 골격인 α,β-unsaturated lactone 구조의 carbonyl group에 의해 1750 cm⁻¹에서 보통 크기의 흡수대를 볼 수 있었다. 또한, protoanemonin의 γ-position의 이중결합에 의해 1650 cm⁻¹ 근처에서 stretch 흡수대가 관찰되었다. ¹H-NMR 상에서는 protoanemonin의 α-proton은 β-proton 뿐만 아니라, trans 위치의 δ-proton과도 long range coupling하여 dd(*J*=5.3 Hz, 1.6 Hz)로 나타났다. 또한, β-proton 역시 α-proton과 coupling하여 α-proton과 동일한 결합상수(*J*=5.3 Hz)를 보이며 d로 나타났다. 나머지 2개의 δ-proton들 중, trans 위치에 있는 δ-proton은 cis 위치의 δ-proton과 coupling하여 d(*J*=2.0 Hz)로 나타남과 동시에, α-proton과도 서로 long-range coupling하여 d(*J*=1.6 Hz)로 나타났다. Cis, δ-proton 역시 trans, δ-proton과 동일한 결합상수로 coupling하여 d(*J*=2.0 Hz)

Table I – Cytotoxicity of ranunculin and protoanemonin against A-549, NIH3T, SK-OV-3

| ED ₅₀ : μg/ml | A-549 | NIH3T | SK-OV-3 |
|--------------------------|-------|-------|---------|
| Ranunculin | 7.53 | 13.6 | 17.3 |
| Protoanemonin | 9.38 | 13.8 | 15.1 |

*A-549 : human lung cancer, NIH3T : fibro-blast cancer, SK-OV-3 : human ovarian cancer.

로 나타났다.

¹³C-NMR에서는 각각의 탄소에 대한 chemical shift가 169.3 ppm(carbonyl carbon), 154.8 ppm(β-carbon), 143.2 ppm(γ-carbon), 121.3 ppm(α-carbon), 97.5 ppm(δ-carbon)에서 나타났다.

생리활성

합성된 ranunculin과 protoanemonin의 고형암세포 A-549, NIH3T, SK-OV-3에 대한 *in vitro* 세포독성은 Table I과 같다.

Li⁷⁾ 등은 ranunculin이 구강암 세포인 KB 세포와 간암 세포인 Bel-7402 세포 등에 대하여 IC₅₀이 각각 0.21과 0.35 μM의 세포독성을 갖는다고 연구 결과를 보고하고 있으나, Table I에서 볼 수 있는 바와 같이, A-549(human lung cancer), NIH3T (fibro-blast cancer), 그리고 SK-OV-3(human ovarian cancer)에 대해서는 각각 7.53, 13.6, 그리고 17.3 μg/ml의 세포독성(ED₅₀)을 나타냈으며, A-549에 대하여 보다 강한 세포독성을 가지고 있었다. Ranunculin의 생리활성물질로 알려져 있는 protoanemonin 역시 ranunculin과 비슷한 세포독성(A-549 : 9.38, NIH3T : 13.8, SK-OV-3 : 15.1 μg/ml, ED₅₀)을 나타내었다. 이와 같은 사실들로부터, ranunculin과 그의 활성물질인 protoanemonin은 KB 세포로 알려진 구강암세포와 Bel-7402인 간암세포에 대해서는 우수한 세포독성을 가진 반면, A-549, NIH3T, 그리고 SK-OV-3에 대해서는 보통의 세포독성만을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구의 수행을 위해 연구비 지원을 해준 한국학술진흥재단에 감사한다.

문헌

- 1) Bae, K. H. : The medicinal plants of korea (1999).
- 2) Wen, C. Y., Nine, N. J., Shou, X. Z., Jing, H. L., Mckervery, M. A. and Stevenson, P. : Triterpenoids from *Pulsatilla chinensis*, *Phytochemistry* 42(3), 799 (1996).
- 3) Kim, Y. : Medicinal chemical study on a preparation comprising of *pulsatilla koreana*, *panax ginseng*, *glycyrrhizae glabra* (2001).

- 4) Camps, P., Cardellach, J., Font, J., Ortuno, R. M. and Ponsati, O. : Studies on structurally simple α,β -butenolides-II. *Tetrahedron* **38**, 15, 2395 (1982).
- 5) Martin, M. L. and San, R. L. : Dominguez, A. *In vitro* activity of protoanemonin, an antifungal agent. *Planta Med.* **56**, 66 (1990).
- 6) Campbell, W. E., Cragg, G. M. L. and Powrie, A. H. : Anemonin, protoanemonin and ranunculin from *Knowltonia capensis*. *Phytochemistry* **18**, 323 (1979).
- 7) Li, R. Z. and Ji, X. J. : The cytotoxicity and action mechanism of Ranunculin *in vitro*, *Yao Hsueh Hsueh Pao.* **28**(5), 326 (1993).
- 8) Alibes, R., Josep, F., Mula, A. and Ortuno, R. M. : Studies on structurally simple α,β -butenolides. *Synthetic Communications* **20**(17), 2607 (1990).
- 9) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107 (1990).
- 10) Brian, S. F., Antony, J. H., Peter, W. G. S. and Austin, R. T. : Vogel's Textbook of practical organic chemistry, 5th edition (1989).
- 11) Bradford, P. M. and Michael, G. E. : Name Reactions and Reactions in Organic Synthesis in Wiley press, 3th edition, 126 (1999).
- 12) Peter Collins. Robin Ferrier : Monosaccharides in Wiley press, 5 (1995).
- 13) Jozef, A. J. M. V., Gabriel, A. M. F., Gordon, J. F. C. and Erik, F. G. : An efficient synthesis of (S)-5-hydroxymethyl-2(5H)-furanone, *Tetrahedron Letters* **28**, 20, 2299 (1987).