

진달래 줄기의 세포독성 성분

홍혜선 · 전승호 · 권용수*
강원대학교 약학대학

Cytotoxic constituents from the stem of *Rhododendron mucronulatum*

He Sun Hong, Seung Ho Jeon and Yong Soo Kwon*

College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea.

Abstract – Seven compounds were isolated from the *n*-BuOH soluble fraction of stem of *Rhododendron mucronulatum* as cytotoxic principles against brine shrimp lethality test. On the basis of spectral data, seven compounds were identified as (–)-catechin (1), (+)-epicatechin (2), taxifolin (3), scopoletin (4), quercetin (5), taxifolin-3-O- α -L-arabinopyranoside (6), and astragalol (7). Among tested compounds, taxifolin-3-O- α -L-arabinopyranoside (6) exhibited potent activity with LC₅₀ value at 4.6 μ g/ml.

Key words – Cytotoxicity, *Rhododendron mucronulatum*, brine shrimp lethality test, taxifolin-3-O- α -L-arabinopyranoside

Brine shrimp lethality test는 cytotoxicity,^{1,2)} pesticide residues³⁾ 등의 생물활성을 검정하는 방법으로 사용되고 있으며, 이 실험은 조작이 간편하고 유의성 있는 결과를 얻을 수 있어 식물의 bioassay-guided isolation을 수행하는 효과적인 방법으로 사용되고 있다.⁴⁾

저자 등은 brine shrimp lethality test를 이용하여 천연물로부터 세포독성 성분을 분리하기 위한 연구의 하나로 약 40여 종의 식물 추출물을 대상으로 brine shrimp lethality test를 실시한 결과 진달래 (*Rhododendron mucronulatum*) 줄기의 MeOH 추출물 분획 중 *n*-BuOH 가용성 분획이 세포독성을 나타남을 알았다. 진달래의 성분연구는 정 등^{5,6)}이 꽃으로부터 flavonoids와 수종의 phenolic acids를 분리하여 보고하였으며, 이 등⁷⁾이 그 줄기로부터 flavonoids, coumarins 및 lignans을 분리 보고하였을 뿐 다른 연구는 찾아보지 못 하였다. 이에 세포독성을 나타내는 *n*-BuOH 분획으로부터 세포독성 성분으로 분리하기 위하여 실험에 착수하였으며 그 결과 진달래 줄기 추출물의 *n*-BuOH 가용성 분획으로부터 세포독성을 나타내는 화합물 7종을 분리하고 이들의 구조와 각각의 세포독성 활성을 밝혔기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용된 진달래의 줄기는 2005년 6월 강원도 양구군 남면 일대의 야산에서 채집, 음건하여 사용하였다. 표본은 강원대학교 약학대학 표본실에 보관중이다.

시약 및 기기 – 용점은 Fisher-Johns의 melting point apparatus를 사용하였으며 온도는 보정하지 않았다. UV spectrum은 JASCO V-530 Spectrophotometer를 사용하였으며, Infrared spectrum은 JASCO FT/IR 4200을 사용하여 측정하였다. ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectra는 Varian Gemini-200과 Bruker DPX-400을 사용하여 측정하였다. Mass Spectrum은 Autospec Micromass를 이용하여 FAB positive mode 및 EI mode로 측정하였다. 선광도는 JASCO의 D-1000 polarimeter를 사용하여 측정하였다. 각 분획의 추출 용매 및 column chromatography용 용매는 특급 시약을 사용하였다. TLC 전개용매 및 기타 시약은 일급 및 특급을 사용하였고, TLC plate는 Merck의 Precoated Kieselgel 60 F_{254S} (layer thickness 0.25 mm, 20 × 20cm, Merck, Art. No. 5715), RP-8 F_{254S}를 사용하였으며, column chromatography의 충전제는 Kieselgel 60(70-230 mesh ASTM, Merck, Art. No.7734), 및 YMC gel ODS-A(70-230 mesh)를 사용하였다. TLC spot의 발색은 254 nm UV lamp 및 20% alcoholic H₂SO₄용액을 사용하였다.

*교신저자 (E-mail): yskwon@kangwon.ac.kr
(FAX): 033-255-7865

Table I. Brine shrimp lethality test of MeOH ex., fractions, and isolated compounds from the stem of *Rhododendron mucronulatum*

Sample	LC ₅₀ (μg/ml) ^{a)}
MeOH ex.	56.7
<i>n</i> -hexane soluble fraction	64.1
CHCl ₃ soluble fraction	72.3
<i>n</i> -BuOH soluble fraction	62.7
Compound 1	84.3
Compound 2	69.2
Compound 3	17.6
Compound 4	20.1
Compound 5	12.9
Compound 6	4.6
Compound 7	43.9
Podophyllin ^{b)}	2.6

a): Lethal concentration necessary to kill 50% of the brine shrimp nauplii.

b): Used as positive control.

*: The data represent the average of triplicate experiments.

추출 및 분리 - 음건하여 세절, 분쇄한 진달래 줄기 (2.4 kg)에 MeOH을 가하여 실온에서 1주일씩 2회 반복 추출한 후 감압 농축하여 MeOH 엑스 (330 g)를 얻었다. 이 MeOH 엑스를 물에 현탁하여 *n*-hexane으로 추출 분획(12 g)하고, 남은 수층을 다시 취하여 CHCl₃로 추출, 분획하여 CHCl₃ 엑스(21 g)을 얻었고, 다시 남은 수층을 *n*-BuOH로 추출, 분획하여 *n*-BuOH 엑스(82 g)을 얻었다. 이렇게 얻어진 MeOH추출물과 각 용매의 분획을 대상으로 brine shrimp lethality test를 실시하여 100 μg/ml 이하에서 LC₅₀ value를 나타내는 분획만을 실험대상으로 하였으며, 이 실험에서는 예비실험에 사용한 추출물 중 *n*-hexane과 *n*-BuOH 가용성 분획이 활성이 비슷한 64.1과 62.7 μg/ml로 각각 나타났으나(Table I) 이 중 양이 상대적으로 많고 활성도 약간 높은 것으로 나타난 *n*-BuOH 엑스(50 g)를 대상으로 CHCl₃:MeOH(9:1)부터 CHCl₃:MeOH:H₂O(3:1:0.1)까지 stepwise gradient silica gel column chromatography를 실시하여 fr. 1부터 fr. 5까지 5개의 분획으로 나누었다. 이들 분획을 대상으로 brine shrimp lethality test를 실시한 결과 fr. 2와 fr. 3이 100 μg/ml 이하의 LC₅₀ 값을 나타내어 이들 두

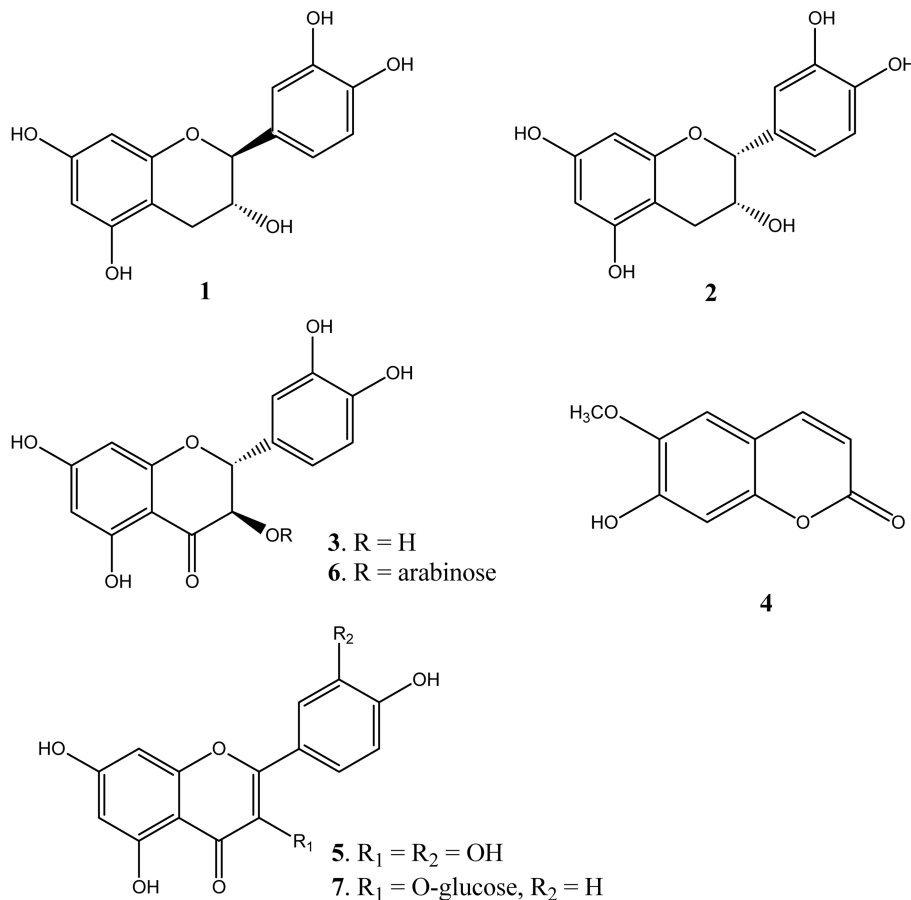


Fig. 1. Structures of 1-7.

개의 분획을 대상으로 silica gel 및 ODS column chromatography를 반복 실시하여 fr. 2로부터는 화합물 **1**(60 mg), 화합물 **2**(80 mg), 화합물 **3**(120 mg), 화합물 **4**(160 mg) 및 화합물 **5**(25 mg)를 분리하였으며 fr. 3으로부터는 화합물 **6**(80 mg)과 화합물 **7**(55 mg)을 각각 분리하였다.

화합물 1 - Brown powder (EtOH), $[\alpha]_D = -18.8^\circ$ ($c=0.545$, MeOH) m.p., 175~176°C IR, ν_{\max}^{KBr} 3321(OH), 1455(C=C), 1257, 1080(C-O) cm^{-1} ; UV, λ_{\max} (MeOH) 281, 372 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + NaOH) 288, 428 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + NaOAc) 280, 430 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + NaOAc + H_3BO_3) 287, 374 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + AlCl_3) 269, 303, 357, 424 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + AlCl_3 + HCl) 280, 374 nm; EI-MS, m/z 290 [M^+]; $^1\text{H-NMR}$, (200 MHz, MeOH- d_4) δ : 6.75 (3H, m, H-2', H-5' and H-6'), 5.93 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-8), 5.85 (1H, d, $J=2.4$ Hz H-6), 4.56 (1H, d, $J=7.4$ Hz H-2), 3.98 (1H, m, H-3), 2.85 (1H, dd, $J=5.2, 16.2$ Hz, H-4a), 2.50 (1H, dd, $J=8.2, 16.2$ Hz, H-4b); $^{13}\text{C-NMR}$, (50 MHz, MeOH- d_4) δ : 158.29 (C-9), 158.04 (C-5), 157.36 (C-7), 146.69 (C-3' and C-4'), 132.64 (C-1'), 120.47 (C-6'), 116.50 (C-5'), 115.67 (C-2'), 101.21 (C-10), 96.69 (C-6), 95.91 (C-8), 83.26 (C-2), 69.22 (C-3), 28.90 (C-4).

화합물 2 - Brown powder (EtOH); $[\alpha]_D = +3.1^\circ$ ($c=0.35$, MeOH); m.p. 235~237°C IR, ν_{\max}^{KBr} 3320(OH), 1456 (C=C), 1258, 1081 (C-O) cm^{-1} ; UV, λ_{\max} (MeOH) 280, 378 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + NaOH) 288, 431 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + NaOAc) 280, 432 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + NaOAc + H_3BO_3) 286, 380 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + AlCl_3) 287, 418 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + AlCl_3 + HCl) 280, 385 nm; EI-MS, m/z 290 [M^+]; $^1\text{H-NMR}$, (200 MHz, MeOH- d_4) δ : 6.98 (1H, br. s, H-2'), 6.75 (2H, m, H-5', H-6'), 5.95 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-8), 5.92 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-6), 4.80 (1H, s, H-2), 4.16 (1H, br. s, H-3), 2.87 (1H, dd, $J=4.6, 16.8$ Hz, H-4a), 2.73 (1H, dd, $J=2.8, 16.8$ Hz, H-4b); $^{13}\text{C-NMR}$, (50 MHz, MeOH- d_4) δ : 158.46 (C-5), 158.09 (C-3), 157.82 (C-9), 146.42 (C-3' and C-4'), 132.71 (C-1'), 119.86 (C-6'), 116.36 (C-5'), 115.74 (C-2'), 100.52 (C-10), 96.82 (C-6), 96.33 (C-8), 80.27 (C-2), 67.89 (C-3), 29.67 (C-4).

화합물 3 - Colorless powder (EtOH); $[\alpha]_D = +15.6^\circ$ ($c=0.28$, MeOH); m.p., 221~222°C IR, ν_{\max}^{KBr} 3409 (OH), 1610 (C=O), 1473 (C=C), 1261, 1070 (C-O) cm^{-1} ; UV, λ_{\max} (MeOH) 242(s), 277 nm; UV : λ_{\max} (MeOH + NaOH) 250(s), 286 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + NaOAc) 277 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + AlCl_3) 277 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + AlCl_3 + HCl) 277 nm; EI-MS, m/z 304 [M^+]; $^1\text{H-NMR}$, (200 MHz,

DMSO- d_6) δ : 11.97 (1H, s, 5-OH), 6.95~6.82 (3H, br. d, H-2', H-5' and H-6'), 5.98 (1H, br. s, H-8), 5.93 (1H, br. s, H-6), 5.05 (1H, d, $J=10.8$ Hz, H-2), 4.57 (1H, d, $J=10.8$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-NMR}$, (50 MHz, DMSO- d_6) δ : 197.23 (C-4), 166.98 (C-7), 163.39 (C-5), 162.63 (C-9), 145.82 (C-4'), 144.98 (C-3'), 128.10 (C-1'), 119.47 (C-6'), 115.38 (C-5'), 115.16 (C-2'), 100.46 (C-10), 96.06 (C-6), 95.04 (C-8), 83.07 (C-2), 71.57 (C-3).

화합물 4 - Colorless needles (benzene-EtOAc); m.p., 203~204°C; IR, ν_{\max}^{KBr} 3419(OH), 1724 (C=O), 1653, 1597 (C=C), 1207, 1176 (C-O) cm^{-1} ; UV : λ_{\max} (MeOH) 224, 252, 298, 341 nm; EI-MS, m/z 192 [M^+]; $^1\text{H-NMR}$, (200 MHz, Acetone- d_6) δ : 7.94 (1H, d, $J=9.8$ Hz, H-4), 7.29 (1H, s, H-5), 6.89 (1H, s, H-8), 6.27 (1H, d, $J=9.8$ Hz, H-3), 3.99 (3H, s, OCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$, (50 MHz, Acetone- d_6) δ : 160.65 (C-2), 151.63 (C-7), 150.29 (C-9), 145.55 (C-6), 144.04 (C-4), 112.13 (C-3), 110.97 (C-10), 109.47 (C-5), 103.03 (C-8), 55.87 (OCH_3).

화합물 5 - Yellow powder; m.p. : >300°C; IR, ν_{\max}^{KBr} 3298 (OH), 1655 (C=O), 1602, 1567, 1458 (C=C), 1222, 1165 (C-O) cm^{-1} ; UV, (MeOH) λ_{\max} 256, 271(s), 297, 372 nm; UV, (MeOH + NaOH) λ_{\max} 274, 328, 415 nm; UV, (MeOH + NaOAc) λ_{\max} 273, 325, 382 nm; UV, (MeOH + NaOAc + H_3BO_3) λ_{\max} 260, 387 nm; UV, (MeOH + AlCl_3) λ_{\max} 271, 439 nm; UV, (MeOH + AlCl_3 + HCl) λ_{\max} 267, 304, 356, 429 nm; EI-MS, m/z 302 [M^+]; $^1\text{H-NMR}$, (200 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.57 (1H, s, 5-OH), 7.75 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-2'), 7.62 (1H, dd, $J=2.2, 8.6$ Hz, H-6'), 6.96 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-5'), 6.48 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.26 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6).

화합물 6 - Colorless powder (EtOH); $[\alpha]_D = -16.4^\circ$ ($c=1.44$, MeOH); m.p., 190~192°C; IR, ν_{\max}^{KBr} 3362 (OH), 1636 (C=O), 1450 (C=C), 1253, 1160 (C-O) cm^{-1} ; UV, λ_{\max} (MeOH) 229(s), 292 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + NaOH) 246, 328 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + NaOAc) 251, 329 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + NaOAc + H_3BO_3) 293 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + AlCl_3) 295 nm; UV, λ_{\max} (MeOH + AlCl_3 + HCl) 227, 299 nm; FAB-MS, (positive-ion mode) m/z 437 [$\text{M}+\text{H}^+$]; $^1\text{H-NMR}$, (200 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.72 (1H, s, 5-OH), 6.91~6.77 (3H, m, H-2', H-5' and H-6'), 5.96 (2H, s, H-6 and H-8), 5.41 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-2), 4.75 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-3), 4.00 (1H, br. d, H-1''); $^{13}\text{C-NMR}$, (50 MHz, DMSO- d_6) δ : 193.62 (C-4), 167.45 (C-7), 163.48 (C-5), 162.09 (C-9), 145.93 (C-4'), 145.29 (C-3'), 126.70 (C-1'), 118.82 (C-6'), 115.45 (C-3'), 114.61 (C-2'), 100.97 (C-10), 100.43 (C-1'), 96.08 (C-6), 95.20 (C-8),

81.09 (C-2), 74.92 (C-3), 71.59 (C-2"), 69.82 (C-3"), 65.14 (C-4"), 62.26 (C-5").

화합물 7 - Yellow powder (MeOH); m.p., 178°C; IR, ν_{\max}^{KBr} 3343 (OH), 1661 (C=O), 1598, 1438 (C=C), 1214, 1105 (C-O) cm^{-1} ; UV, λ_{\max} (MeOH) 266, 302, 350 nm; UV, λ_{\max} (MeOH+NaOH) 274, 327, 400 nm; UV, λ_{\max} (MeOH+NaOAc) 268, 308, 355 nm; UV, λ_{\max} (MeOH+NaOAc+H₃BO₃) 266, 303, 350 nm; UV, λ_{\max} (MeOH+AlCl₃) 231(s), 275, 304, 350, 397 nm; UV, λ_{\max} (MeOH+AlCl₃+HCl) 231(s), 275, 303, 347, 397 nm; FAB-MS, (positive-ion mode) m/z 449 [M+H]⁺; ¹H-NMR, (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12.69 (1H, s, 5-OH), 8.12 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2' and H-6'), 6.96 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3' and H-5'), 6.50 (1H, d, $d=2.0$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 5.54 (1H, d, $J=7.0$ Hz, H-1"); ¹³C-NMR, (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 177.52 (C-4), 164.59 (C-7), 161.30 (C-5), 160.04 (C-4'), 156.51 (C-2), 156.27 (C-9), 133.24 (C-3), 131.00 (C-2' and C-6'), 120.97 (C-1'), 115.18 (C-3' and C-5'), 103.94 (C-10), 100.88 (C-1"), 98.84 (C-6), 93.76 (C-8), 77.54 (C-3"), 76.45 (C-5"), 74.24 (C-2"), 69.91 (C-4"), 60.84 (C-6").

당의 확인 - 화합물 6과 7을 각각 10 mg씩을 5% HCl을 이용하여 수욕상에서 1시간 가열하여 가수분해 한 후 가수분해 액을 NaHCO₃로 중화시켜 수층을 EtOAc로 분획하여 aglycone분획을 얻고, 남은 수층을 대상으로 cellulose TLC plate를 이용, *n*-buthanol-acetic acid-water(4:1:5)를 용매로 TLC 분석을 실시하고,isaldehyde-H₂SO₄시약으로 발색시켜 화합물 6로부터는 L-arabinose를 확인 할 수 있었고, 화합물 7로부터는 D-glucose를 각각 확인 할 수 있었다.

Brine shrimp의 부화 - Meyer 등⁸⁾의 방법을 이용하여 실시하였으며 요약하면 비대칭으로 칸막이를 설치한 수조에 천일염 (3.8 g/l)을 넣어 녹인 후 brine shrimp egg(San Francisco Bay Brand, USA) 약 2 g을 넣은 다음 aeration시 키면서 실온에서 24시간 부화시키고 부화된 brine shrimp nauplii를 주광성을 이용하여 포집한다.

Brine shrimp Bioassay - 모든 시료의 최종 농도가 1000, 100, 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 가 되도록 시료용액을 조제한 후 각 농도마다 3개의 vial을 준비하고 각 vial에 10마리씩을 가하여 모두 30마리가 되도록 하였다. 24시간이 지난 후 죽은 shrimp의 수를 세어 %-mortality를 측정하고 linear regression법을 이용하여 LC₅₀(Lethal concentration necessary to kill 50% of the brine shrimp nauplii)을 결정하였다.

결과 및 고찰

단리된 화합물의 화학구조 - 화합물 1의 IR spectrum을

보면 3321 cm^{-1} 에서 OH, 1455 cm^{-1} 에서 aromatic C=C, 1257, 1080 cm^{-1} 에서 C-O에 의한 흡수대가 나타나고, UV spectrum의 281, 372 nm에서 흡수극대가 나타나므로 이 화합물은 flavan계열의 화합물로 추정되었다. shift reagent로 NaOH를 가하면 band I이 428 nm로 장파장 이동하므로 B-ring의 4'위치에 OH가 존재함을 알 수 있고, NaOAc를 가하면 band I이 430 nm로 장파장 이동하고, 다시 H₃BO₃를 가하면 374 nm로 이동하는 것으로부터 이 화합물은 B-ring의 3'와 4'위치가 diol형태로 존재함을 알 수 있었다.⁹⁾ ¹H-NMR spectrum을 보면 6.75 ppm에서 3H에 해당하는 multiplet이 나타나는데 이는 flavonoid 모핵의 2', 5', 6'의 proton들에 의한 것으로 추정할 수 있으며, 5.93과 5.85 ppm에서 나타나는 $J=2.4$ Hz의 doublet들은 각각 H-8과 H-6에 의한 것임을 알 수 있다. 또한, 4.56 ppm에서 나타나는 $J=7.4$ Hz의 doublet, 3.98 ppm에서 나타나는 multiplet, 2.85 ppm에서 나타나는 $J=5.2, 16.2$ Hz의 double doublet 및 2.50 ppm에서 나타나는 $J=8.2, 16.2$ Hz의 double doublet으로부터 이 화합물은 전형적인 flavan-3-ol의 형태임을 알 수 있었다.¹⁰⁾ 이와 같은 사실은 ¹³C-NMR spectrum에 의해서도 확인 할 수 있었다. 즉, 83.26, 69.22 및 28.90 ppm에서 나타나는 2번, 3번 및 4번 탄소의 signal들로부터도 이 화합물이 flavan-3-ol의 형태임을 알 수 있었다.¹¹⁾ 위의 사실들과 MS spectrum에서 molecular ion peak가 m/z 290에서 관측되는 것을 비교하여 이 화합물은 3, 3', 4', 5, 7번에 OH가 치환된 flavan계열의 화합물임을 확인 할 수 있었고, 선광도가 -18.8°로 나타나므로 이들 결과를 문헌⁹⁻¹¹⁾과 비교하여 화합물 1을 (-)-catechin으로 동정하였다. 화합물 2는 화합물 1의 IR spectrum, UV spectrum, ¹H- 및 ¹³C-NMR spectrum이 매우 유사하므로 동일 계열의 화합물로 추정할 수 있었다. 그러나 ¹H-NMR spectrum을 보면 4.80 ppm에서 나타나는 singlet, 4.16 ppm에서 나타나는 broad singlet, 2.87 ppm에서 나타나는 $J=4.6, 16.8$ Hz의 double doublet 및 2.73 ppm에서 나타나는 $J=2.8, 16.8$ Hz의 double doublet으로 나타나는 signal들과 ¹³C-NMR spectrum의 80.27, 67.89 및 29.7 ppm에서 나타나듯이 2번과 3번 탄소의 signal들이 화합물 1 보다는 고자장 shift되어 나타나는 사실로부터 이 화합물은 화합물 1과는 다른 입체 배위를 하고 있음을 알 수 있었다. 또한, 선광도도 +3.1°로 나타나 화합물 1과는 다르게 나타나지만 MS spectrum을 보면 molecular ion peak가 m/z 290에서 관측되어 화합물 1과 동일한 분자량을 가지고 있음을 알 수 있었다. 이상의 결과와 문헌⁹⁻¹¹⁾를 비교하여 화합물 2를 (+)-epicatechin으로 동정하였다. 화합물 3은 IR spectrum의 3409 cm^{-1} 에서 OH, 1610 cm^{-1} 에서 carbonyl기에 의한 흡수대, 1473 cm^{-1} 에서 aromatic C=C에 의한 흡수대, 1261, 1070 cm^{-1} 에서 C-O에 의한 흡수대 등이 나타나고, UV spectrum의 277 nm에서 흡수극대가 나타나므로 이

화합물은 flavanone 또는 dihydroflavonol계열의 화합물로 추정되었다. 또한, shift reagent로 NaOH를 가하면 band가 286 nm로 장파장 이동하므로 B-ring의 4' 위치에 OH가 존재하는 flavanone 또는 dihydroflavonol계열의 화합물임을 알 수 있었다.⁹⁾ ¹H-NMR spectrum의 11.97 ppm에서 나타나는 singlet은 5번에 OH가 존재함을 나타내주며, 6.95~6.82 ppm에서 나타나는 3H에 해당하는 broad doublet은 B-ring의 H-2', H-5' 및 H-6'에 기인하는 것임을 알 수 있고, 5.98과 5.93 ppm에서 나타나는 broad singlet들은 각각 H-8과 H-6에 기인하는 것임을 알 수 있다. 또한, 그 위치가 다른 flavonoids 모핵의 경우보다 상당히 고자장 shift하는 것으로부터도 이 화합물이 flavanone이나 dihydroflavonol계열의 화합물임을 알 수 있었다. 5.05와 4.57 ppm에서 나타나는 $J=10.0$ Hz의 doublet으로부터 각각 H-2와 H-3의 proton들에 의한 것임을 알 수 있었으므로 이 화합물은 3번에 OH가 치환된 dihydroflavonol이며, coupling constant가 비교적 큰 값으로 나타나는 사실로부터 2번과 3번의 proton들은 *trans*로 배위함을 알 수 있었다.¹²⁾ 이와 같은 사실은 ¹³C-NMR에 의해서도 확인할 수 있었다. 즉, 197.23 ppm에서 4번의 C=O에 의한 signal이 나타나고, 83.07과 71.57 ppm에서 2번과 3번 탄소의 signal들이 각각 나타나므로 dihydroflavonol의 모핵을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.¹¹⁾ MS spectrum에서 molecular ion peak가 m/z 304에서 관측되므로 이 화합물은 3, 3', 4', 5, 7 위치에 OH를 가지고 있음을 알 수 있었다. 또한, 이 화합물의 선광도는 +15.6°를 나타내고 있음을 알 수 있었다. 이러한 사실들과 문헌^{9,11,12)}을 비교하여 화합물 3을 (+)-taxifolin으로 동정하였다. 화합물 4의 IR spectrum을 보면 3419 cm^{-1} 에서 OH에 의한 흡수 1724 cm^{-1} 부근에서 C=O, 1653, 1597 cm^{-1} 에서 aromatic C=C 결합을 나타내는 흡수대가 나타나고, UV spectrum을 보면 224, 252, 298, 341 nm에서 흡수 극대가 나타나는 것으로 보아 이 화합물은 coumarin계열의 화합물로 추정되었다.¹³⁾ ¹H-NMR spectrum의 7.94와 6.27 ppm에서 $J=9.8$ Hz로 나타나는 각각의 doublet은 coumarin 모핵의 4번과 3번 탄소에 존재하는 proton들에 의한 것임을 알 수 있었으며, 7.29와 6.89 ppm에서 나타나는 각각의 singlet들은 그 위치로 볼 때 coumarin의 5번과 8번의 탄소에 존재하는 proton들에 의한 것임을 알 수 있었다. 3.99 ppm에서 나타나는 3H에 해당하는 singlet은 한 개의 methoxy기에 기인하는 것임을 알 수 있었다.¹⁴⁾ 또한, ¹³C-NMR spectrum과 MS spectrum에 의해서도 위의 사실들을 확인할 수 있었다. 즉, ¹³C-NMR spectrum의 160.65 ppm에서 α -pyrone의 carbon signal이 나타나고, 144.04와 112.13 ppm에서 4번과 3번의 탄소 signal이 나타나며, 55.87 ppm에서 methoxy기에 기인하는 signal이 나타났다.¹⁵⁾ 한편, MS spectrum에서는 분자량인 m/z 192가 base peak로 나타나고, 기타 fragmentation ion

peak들이 전형적인 coumarin계열의 fragmentation을 보여주고 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하고 문헌^{13,15)}과 비교하여 화합물 4를 scopoletin으로 동정하였다. 화합물 5는 IR spectrum의 3298 cm^{-1} 에서 OH, 1655 cm^{-1} 에서 α , β -unsaturated carbonyl기에 의한 흡수대, 1602, 1567, 1458 cm^{-1} 에서 aromatic C=C, 1222, 1165 cm^{-1} 에서 C-O에 의한 흡수대가 나타나고, UV spectrum의 256, 271, 297, 372 nm에서 흡수극대가 나타나므로 이 화합물은 화합물 3과는 다르게 flavone이나 flavonol계열의 화합물로 추정되었다. shift reagent로 NaOH를 가하면 band I이 415 nm로 장파장 이동하므로 B-ring의 4' 위치에 OH가 존재함을 알 수 있었고, NaOAc를 가하면 band II가 273 nm로 장파장 하므로 A-ring의 7번에 OH가 존재하며, 다시 여기에 H_3BO_3 를 가하면 spectrum이 처음 상태로 되돌아가는 것으로 보아 이 화합물은 B-ring의 3'와 4'가 diol형태로 존재함을 알 수 있었다. 또한, AlCl_3 를 가하면 band I 및 band II이 271 nm와 439 nm에서 나타나 모두 장파장 이동하므로 3번이나 5번의 탄소에도 OH존재함을 추정할 수 있었고, 다시 여기에 HCl을 가하면 267, 304, 356 및 429 nm에서 흡수극대가 나타나므로 이 화합물은 3, 3', 4', 5, 7번에 OH가 치환된 화합물로 추정할 수 있었다.⁹⁾ ¹H-NMR spectrum을 보면 7.75 ppm에서 $J=2.2$ Hz의 doublet으로 나타나는 signal은 그 위치로 볼 때 B-ring의 H-2'에 기인하는 것임을 알 수 있고, 7.62 ppm에서 나타나는 $J=2.2, 8.6$ Hz의 double doublet은 H-6'에 의한 것임을 알 수 있었고, 6.96 ppm에서 나타나는 $J=8.6$ Hz의 doublet은 H-5'에 기인함을 알 수 있었다. 또한, 6.48과 6.26 ppm에서 $J=2.0$ Hz의 doublet으로 각각 나타나는 signal들은 H-8과 H-6'에 기인하는 것임으로 이 화합물은 UV spectrum에서와 마찬가지로 3, 3', 4', 5, 7에 OH가 치환된 화합물로 추정할 수 있었고, MS spectrum에서 분자량이 m/z 302에서 나타나므로 이와 같은 추정이 사실임을 확인할 수 있었다. 이상의 사실들과 문헌^{9,16)}을 비교하여 화합물 5는 quercetin으로 동정하였다. 화합물 6의 IR, UV spectrum이 화합물 3과 거의 유사하므로 동일계열의 화합물로 추정할 수 있었으며, ¹H-NMR spectrum도 4.00 ppm에서 나타나는 broad singlet과 3.81에서 3.02 ppm사이에 나타나는 multiplet이 다를 뿐 화합물 3과 거의 일치하였다. 이 사실로부터 이 화합물은 화합물 3의 모핵에 한개의 당이 α 로 배위하고 있는 화합물로 추정할 수 있었으며, 당의 결합위치는 H-2와 H-3의 signal들이 화합물 3의 경우보다 각각 0.18, 0.36 ppm 저자장 shift 하는 것으로부터 당은 3번에 치환되어 있음을 알 수 있었다.¹²⁾ 이와 같은 사실은 ¹³C-NMR spectrum에 의해서도 확인할 수 있었다. 즉, 화합물 3의 경우보다 2번 탄소는 1.98 ppm 고자장 shift하고, 3번 탄소는 3.35 ppm 저자장 shift하는 것으로부터도 확인할 수 있었다.¹¹⁾ 또한, 모핵의 일치 여부를 확인하기 위하여 이 화합물을 산 가수분해

한 후 약알칼리로 중화시켜 수층을 EtOAc로 분획, 농축하여 TLC 분석을 실시한 결과 모핵은 (+)-taxifolin으로 확인할 수 있었으며, 남은 수층을 TLC 분석하여 당은 L-arabinose임을 확인할 수 있었다. 이와 같은 사실은 FAB-MS spectrum에서 pseudo-molecular ion peak가 m/z 437에서 $[M+H]^+$ 로 나타나는 것으로부터도 확인할 수 있었다. 이상의 사실과 문헌치^{11,12,17}를 비교하여 화합물 6은 (+)-taxifolin-3-O- α -L-arabinoside로 동정하였다. 화합물 7은 FAB-Mass spectrum에서 pseudo-molecular ion peak가 m/z 449 $[M+H]^+$ 로 관측되었으며 IR spectrum을 보면, 3343 cm^{-1} 에서 OH에 의한 흡수, 1661 cm^{-1} 에서 C=O에 의한 흡수, 1598, 1438 cm^{-1} 에서 C=C에 의한 흡수 및 1214, 1105 cm^{-1} 에서 C-O에 의한 흡수가 나타나고, UV spectrum의 266, 302, 350 nm에서 흡수 극대가 나타나는 것으로 보아 이 화합물은 flavonoid 배당체로 추정할 수 있었다. Shift reagent로 NaOH를 가하면 이 화합물의 band I이 400 nm로 장파장으로 이동 이동하므로 C-4에 OH가 존재함을 알 수 있었고, NaOAc를 가하면 band II가 302 nm로 장파장으로 이동하는 것으로 보아 C-7에도 OH가 존재함을 알 수 있었다.⁹ ¹H-NMR spectrum의 8.12와 6.96 ppm에서 나타나는 2H분의 각각의 doublet ($J=8.8$ Hz)들은 flavonoid의 B-ring의 H-6'와 H-2' 및 H-5'와 H-3'에 기인하는 것임을 알 수 있으며, 6.50과 6.20 ppm에서 각각 나타나는 broad singlet들은 A-ring의 H-8과 H-6에 의한 것임을 알 수 있었다. 또한, 5.54 ppm에서 나타나는 $J=7.4$ Hz의 doublet과 ¹³C-NMR spectrum의 100.88, 77.54, 76.45, 74.24, 69.91, 60.84 ppm에서 나타나는 signal들로부터 이 화합물은 한 개의 glucose가 β 위로 결합되어 있는 배당체임을 알 수 있었다. 당의 결합 위치는 C-2가 ¹³C-NMR spectrum의 156.51 ppm에서 나타나므로 C-3에 결합되어 있음을 알 수 있었다.¹¹ 이상의 결과와 문헌^{9,11,18}을 비교하여 화합물 7을 astragalinalin으로 동정하였다.

단리된 화합물의 Brine shrimp lethality 활성 - 구조가 동정된 화합물에 대한 brine shrimp lethality test를 실시하고 LC₅₀을 구한 결과는 Table I에 나타내었다. (-)-catechin, (+)-epicatechin, astragalinalin 등의 화합물은 LC₅₀ value가 각각 84.3, 69.2, 및 43.9 μ g/ml로 나타나 약한 활성을 보였으며, taxifolin, scopoletin 및 quercetin 등의 화합물은 LC₅₀ value가 17.6, 20.1 및 12.9 μ g/ml로 나타나 중간 정도의 활성을 보였다. 또한 taxifolin-3-O- α -L-arabinoside가 LC₅₀ value 4.6 μ g/ml로 나타나 이 실험에서는 가장 강한 활성을 보였다. 이들 결과는 이미 연구 보고된 결과^{19,20}와 유사하지만 taxifolin 유도체 화합물의 경우는 Shen 등²¹이 colorectal carcinoma cell(HT29, COLO205 및 COLO320HSR)을 이용하여 flavonoids 화합물을 대상으로 cytotoxicity를 측정하여 발표한 flavanone 화합물의 경우 모핵에 치환된 OH기의

수가 적을수록 cytotoxicity가 강하다는 결과와는 다르게 나타나 보다 심도있게 검토할 필요가 있는 것으로 사료된다.

결 론

Brine shrimp lethality test를 이용하여 예비 실험한 결과 세포독성이 나타난 진달래 줄기의 *n*-BuOH 가용부로부터 세포독성 성분을 분리하기 위하여 각종 column chromatography를 반복 실시하여 7개의 물질을 분리하고, IR, UV, ¹H- 및 ¹³C-NMR, MS 등의 기기분석을 이용하여 각각의 구조를 동정하였으며, 그 구조는 각각 (-)-catechin (1), (+)-epicatechin (2), (+)-taxifolin (3), scopoletin (4), quercetin (5), (+)-taxifolin-3-O- α -L-arabinoside (6), astragalinalin (7)이었다. 또한, 화합물들의 brine shrimp lethality test를 이용하여 LC₅₀을 구한 결과는 각각 84.3, 69.2, 17.6, 12.9 및 4.6 μ g/ml로 나타났다. 이상의 결과만으로 진달래 줄기의 세포독성이 활성을 단정하기는 어려우므로 세포독성 활성의 계속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

인용문헌

- Anderson, J. E., Goetz, C. M., McLaughlin, J. L. and Sufness, M. A. (1991) A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem. Anal.* 2: 107-111.
- Solis, P. N., Wright, C. W., Anderson, M. M., Gupta, M. P. and Phillipson, J. D. (1993) A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Med.* 59: 250-252.
- Fatope, M. O., Ibrahim, H. and Takeda, Y. (1993) Screening of higher plants reputed as pesticides using the brine shrimp lethality assay. *Int. J. Pharmacogn.* 31: 250-254.
- McLaughlin, J. L., Chang, C. J. and Smith, D. L. (1991) Bench-top bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update. *Studies in Natural Product Chemistry*. Vol. 9. pp. 383-490, Ed. Atta-ur-Rahman. Elsevier, Amsterdam.
- Chung, T. Y., Kim, M. A. and Jones, A. D. (1996) Antioxidative activity of flavonoids isolated from Jindalrae flowers (*Rhododendron mucronulatum*). *Agric. Chem. Biotechnol.* 39: 320-326.
- Chung, T. Y., Kim, M. A. and Jones, A. D. (1996) Antioxidative activity of phenolic acids isolated from Jindalrae flower (*Rhododendron mucronulatum*). *Agric. Chem. Biotechnol.* 39: 506-511.
- Lee, J. H., Jeon, W. J., Yoo, E. S., Kim C. M. and Kwon, Y. S. (2005) The chemical constituents and their antioxidant activity of the stem of *Rhododendron mucronulatum*. *Nat. Prod. Sci.* 11: 97-102.

8. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. and McLaughlin, J. L. (1982) Brine shrimp : a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* **45**: 31-34.
9. Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1970) The systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, New York.
10. Morimoto, S., Nonaka, G. I., Nishioka, I., Ezaki, N. and Takizawa, N. (1985) Tannins and related compounds. X X IX. Seven new methyl derivatives of flavn-3-ols and a 1,3-dia-rylpropan-2-ol from *Cinnamomum cassia*, *C. obtusifolium* and *Lindera umbellata* var. *membranacea*. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**: 2281-2286.
11. Agrawal, P. K. (1989) Carbon-¹³ NMR of Flavonoids. Elsevier.
12. Nonaka, G. I., Goto, Y., Kinjo, J. E., Nohara, T. and Nishioka, I. (1987) Tannins and related compounds. LII. Studies on the constituents of the leaves of *Thujopsis dolabrata* SIEB. et ZUCC., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**: 1105-1108.
13. Goodwin, R. H. and Pollock, B. M. (1954) Ultraviolet absorption spectra of coumarin derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **49**: 1-6.
14. Steck, W. and Mazurek, M. (1972) Identification of natural coumarins by NMR spectroscopy. *Lloydia*, **35**: 418-439.
15. Kuroyanagi, M., Shiotsu, M., Ebihara, T., Kawai, H., Ueno, A. and Fukushima, S. (1986) Chemical studies on *Viburnum awabuki* K. Koch. *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 4012-4017.
16. Jin W. Y., Na, M. K., An, R. B., Lee, H. Y., Bae, K. H. and Kang, S. S. (2002) Antioxidant compounds from twig of *Morus alba*. *Nat. Prod. Sci.*, **8**: 129-132.
17. Sakushima, A. and Nishibe, S. (1988) Taxifolin 3-arabino-side from *Trachelospermum jasminoides* var. *pubescens*, *Phytochemistry*, **27**: 948-950.
18. Murakami, T., Wada, H., Tanaka, N., Kido, T., Iida, H., Saiki, Y. and Chen, C. M. (1986) Chemical and Chemotaxonomical studies of Filices. LXV. A new flavonoid glycosides. (2), *Yakugaku Zasshi*, **106**: 982-988.
19. Matsuo M., Sasaki, N., Saga K. and Kaneko, T. (2005) Cyto-toxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**: 253-259.
20. Sasaki, N., Toda, T., Kaneko, T., Baba, N. and Matsuo M. (2003) Protective effects of flavonoids on the cytotoxicity of linoleic acid hydroperoxide toward rat pheochromocytoma PC12 cells. *Chem-Biol. Interact.*, **145**: 101-116.
21. Shen, S. C., Ko, C. H., Tseng, S. W., Tsai, S. H. and Chen, Y. C. (2004) Structurally related antitumor effects of flavanones in vitro and in vivo: involvement of caspase 3 activation, p21 gene expression, and reactive oxygen species production. *Toxicol. Appl. Pharm.* **197**: 84-95.

(2007년 7월 3일 접수)