

碩士學位論文

우묵사스레피(*Eurya emarginata*)의
생리활성성분 분리·동정에 관한 연구



濟州大學校 大學院

化學科

梁 弘 哲

2001年 12月

우묵사스레피(*Eurya emarginata*)의
생리활성성분 분리·동정에 관한 연구

指導教授 李 南 昊

梁 弘 哲

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2001年 12月

梁弘哲의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 印

委 員 _____ 印

委 員 _____ 印


濟州大學校 大學院

2001年 12月

Separation and Identification of the Bioactive
Compounds Using *Eurya emarginata*

Hong-Chul Yang

(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF
NATURAL SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2001. 12.

ABSTRACT

iii

We have examined the effect of extracts of *Eurya emarginata* on the growth of HL-60 leukemia cells. By way of MTT assay method, the crude aq. methanolic extract and ethyl acetate fraction were observed to have considerable cell growth inhibitory effects.

Trial was made to isolate and identify the bioactive components. The 80% methanol extracts was partitioned to hexane, ethyl acetate, *n*-butanol and residual water fractions. The ethyl acetate fraction, which showed desirable activities, was further purified using SiO₂ column chromatography(CC) followed by reverse phase silica gel CC, then another normal CC to give fraction **4-1-8** as a pure compound. The compound **4-1-8** and its acetylated derivative(fr. **4-1-8-Ac**) were analyzed by NMR spectrometry using ¹H, ¹³C, DEPT, HMQC and HMBC spectra, and finally proved to be well-known flavono glycoside, Quercitrin. The other interesting fraction **4-1-2'** was also examined to elucidate the chemical structure. Even though the partial substructure was identified, the whole complete structure is unclear and still under investigation.

목 차

iii

ABSTRACT	i
List of Figures	iii
List of Tables	v
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재료	4
2. 시약 및 기기	4
3. 실험방법	5
1) 세포배양	5
2) 세포수의 측정	5
3) 세포의 대사활성 측정	5
4) DNA fragmentation assay	6
5) 시료의 추출 및 유효성분분리	6
III. 결과 및 고찰	11
1) 80% 메탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 암세포 증식 억제효과	11
2) EtOAC층과 각 EtOAC fraction들에 대한 암세포 증식 억제효과	11
3) HL-60세포의 세포증식 억제효과를 나타내는 성분의 분리	12
4) fr. 4-1-8의 구조분석	15
5) fr. 4-1-2'의 구조분석	31
6) fr. 4-1-8에 대한 암세포 증식 억제효과	35
IV. 결 론	38
V. 참 고 문 헌	40

List of Figures

Figure 1. Isolation procedure of <i>Eurya emarginata</i>	8
Figure 2. Isolation procedure of fr. 4-1 by Prep-TLC with CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (7.5/2.5/0.3)	9
Figure 3. Isolation procedure of fr. 4-1 by normal-phase column chromatography with CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (7.5/2.5/0.3)	9
Figure 4. Acetylation procedure of fr. 4-1-8	10
Figure 5. Inhibitory effect of several extracts of <i>Eurya emarginata</i> on the growth of HL-60 cells	12
Figure 6. DNA fragmentation by several extracts of <i>Eurya emarginata</i> in HL-60 cells	13
Figure 7. Inhibitory effect of EtOAc fractions of <i>Eurya emarginata</i> on the growth of HL-60 cells	13
Figure 8. TLC of EtOAc extracts using EtOAc/MeOH (10/1) as an eluent	14
Figure 9. TLC spots of fr. 4-1	15
Figure 10. UV spectrum of fr. 4-1-8	18
Figure 11. IR spectrum of fr. 4-1-8	19
Figure 12. ¹ H-NMR spectrum of fr. 4-1-8	19
Figure 13. ¹³ C-NMR spectrum of fr. 4-1-8	20
Figure 14. DEPT of fr. 4-1-8	20

Figure 15. HMQC of fr. 4-1-8	21
Figure 16. HOMO cosy of fr. 4-1- ⁱⁱⁱ 8	21
Figure 17. HMBC of fr. 4-1-8	22
Figure 18. 2D-NMR correlation of fr. 4-1-8	22
Figure 19. ¹ H-NMR spectrum of fr. 4-1-8-Ac	23
Figure 20. ¹³ C-NMR spectrum of fr. 4-1-8-Ac	23
Figure 21. HMQC of fr. 4-1-8-Ac	24
Figure 22. ROESY of fr. 4-1-8-Ac	24
Figure 23. HMBC of fr. 4-1-8-Ac	25
Figure 24. ROESY correlation of fr. 4-1-8-Ac	25
Figure 25. HMBC correlation of fr. 4-1-8-Ac	26
Figure 26. Structure of fr. 4-1-8(Quercitrin)	26
Figure 27. ¹ H-NMR spectrum of authentic Quercitrin	29
Figure 28. ¹³ C-NMR spectrum of authentic Quercitrin	29
Figure 29. ¹ H-NMR spectrum of fr. 4-1-2'	32
Figure 30. ¹³ C-NMR spectrum of fr. 4-1-2'	32
Figure 31. DEPT of fr. 4-1-2'	33
Figure 32. HETERO cosy of fr. 4-1-2'	33
Figure 33. HOMO cosy of fr. 4-1-2'	34
Figure 34. Fragmentation structure of fr. 4-1-2'	34
Figure 35. Inhibitory effect of fr. 4-1-8 of <i>Eurya emarginata</i> on the growth of HL-60 cells	36
Figure 36. DNA fragmentation by fr. 4-1-8 of <i>Eurya emarginata</i> in HL-60 cells	37

List of Tables

Table 1. NMR data of fr. 4-1-8	27
Table 2. NMR data of fr. 4-1-8-Ac	28
Table 3. NMR data of authentic Quercitrin	30
Table 4. NMR data of fr. 4-1-2'	35



I. 서 론

iii

최근 들어 인류 문명의 빠른 변화로 인해 나타난 환경오염과 생활 습관의 변화는 여러 가지 문제점들을 가져왔다. 그중 하나로 산업사회가 발달해 감에 따라 인류의 주요 사망 원인으로 전쟁이나 기아를 제외하고는 암을 비롯한 성인병 및 교통사고가 가장 높게 나타나게 된 것이며, 이에 대한 효과적인 치료법이 절실히 요망되고 있다. 이러한 암 질환의 치료를 위하여는 수술요법, 방사선요법과 더불어 항암화학요법이 주로 사용되어지고 있다. 이중 항암화학요법이란 분열을 많이 하는 암세포의 특성을 이용하여 암세포의 대사경로에 개입 DNA와 직접 작용하여 DNA의 복제, 전사, 번역과정을 차단하거나 핵산 전구체의 합성을 방해 및 세포분열을 저해함으로써 암세포에 세포독성을 나타내는 항암제를 사용해 치료하는 방법이다. 그러나 인체에는 암세포의 분열 특성과 같은 방식으로 분열하는 정상세포가 여러 곳 있는데 현재 항암화학요법에 사용되고 있는 모든 항암제들은 이러한 정상세포와 암세포에 대한 선별력이 부족하여 암세포의 완전제거를 위해 다량 투여했을 때 정상세포에도 세포독성을 유발할 뿐만 아니라 다른 감염증에 대한 저항성마저도 약하게 만들어 버리는 한계성이 있다.

항암화학요법의 한계를 극복하는 문제와 관련하여, 최근에는 민간에서 오랫동안 사용되어오던 천연물에서 항암효과를 보이는 물질을 찾으려는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 이미 주목나무껍질에서 추출된 Taxol이 항암제로 사용되고 있으며, 유럽에서는 겨우살이 식물에서 추출된 lectin, viscotoxin, alkaloid 등의 항암효과를 나타내는 성분들이 분리 정제되어 그 구조가 밝혀지고 있다¹⁻⁵⁾. 암이 우리의 식생활 및 생활 습관 등의 환경인자에 의한 영향을 크게 받는 것으로 알려지면서 각 지역별 또는 국가별로 다르게 나타나는 암 발생률에 대한 원인을 규명하는 연구들이 활발히 이뤄지고 있으며, 국내에

서도 민간에서 사용되어오던 천연물에서 항암효과를 보이는 물질들을 찾으려는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 갯장 전통적인 음식인 김치의 추출물이 AFB₁에 대해 돌연변이 억제효과와 HL-60혈액암 세포의 생존저해 효과를 보이고 있다고 보고하고 있다⁶⁾. 민간에서 해열, 이담, 항균 지혈 및 한습을 몰아내는데 효능이 있다는 쪽도 항암효과를 보인다고 한다⁷⁾. 과일과 야채 및 녹차 등의 많은 식물에 함유되어있는 성분인 genistein 역시 phenolic compound인 Flavonoid의 일종으로 전립선암세포의 성장을 억제하는 효과가 있음이 밝혀졌다⁸⁾. 그러나, 국내에서는 제주도라는 특이적인 환경에서 자생하고 있는 식물체들인 경우 이들이 지니고 있는 생리활성성분들이 타 지역과는 상이한 점들이 많을 것으로 여겨지나, 그 성분들의 생리활성 및 구조에 대한 연구들은 미흡한 실정에 있었다. 최근에는 주목할만하게 제주대학교 의과대학 약리학실험실에서 제주산 자생식물체들에 대한 항암효과 검색 및 작용기전에 대한 연구가 진행되고 있다. 이에 본 연구에서는 제주도에 자생하고 있는 식물중 민간에서 항암효과가 있다고 사용되어오던 것들에 대해 관심을 갖게 되었고, 항암효과를 검색한 결과 항암효과가 탁월하게 나타난 우묵사스레피(*Eurya emarginata*)에 중점을 두게 되었다.

열매가 쥐똥같고 섬에서 주로 자란다 하여 섬쥐똥나무 또는 개사스레피나무 라고도 불리는 우묵사스레피(*Eurya emarginata*)는 차나무과의 상록관목수로 따뜻한 지방의 바닷가 산지에서 자란다. 높이 약 2m이내의 키작은 나무로 작은 가지에는 연노란 빛을 띤 갈색의 짧은 털이 뺨뺨이 나있고 잎은 어긋나며 2줄로 늘어서 있어 작은 가지에 보통 털이 없으며 잎 끝이 뾰족한 사스레피나무(*Eurya japonica*)와는 구별된다. 또한 잎 자체는 혁질(革質:가죽 같은 질감)로서 두껍고 좁으며 긴 달걀을 거꾸로 세워놓은 모양이고 길이 1~5cm, 나비 1~1.2cm이다. 끝이 둥글고 가장자리는 찢혀지며 둔한 톱니가 있다. 양면에 털이 없으며 잎자루는 길이 약 2mm이다. 꽃은 암수딴그루로서 3~4월에 녹색을 띤 흰색으로 피며 지름 4~5mm이고 잎겨드랑이에 여러 개씩 다발

로 핀다. 꽃받침조각은 5개로서 길이 1.5~2mm이고 가장자리가 막질(膜質:얇은 종이처럼 반투명한 것)이다. 꽃잎은ⁱⁱⁱ 달걀 모양이고 길이 약 2mm이다. 수술은 여러 개이고 암술은 1개이다. 열매는 장과(漿果)이며 지름 7~10mm이고 10월에 자줏빛을 띤 검은색으로 익는다. 번식은 꺾꽂이나 종자로 하며 정원수로 즐겨 심는다. 민간에서는 이노와 담 제거 등에 약재로 쓰이며 공해에는 강하나 추위에는 약하여 우리 나라의 제주도와 남부도서지방에 주로 분포한다.

우묵사스레피의 생리활성성분에 대한 연구결과들을 거의 찾을 수 없는 것으로 보아 우묵사스레피에 대한 연구는 아직 부족한 상태인 것으로 보인다. 본 연구의 목적은 이런 제주산 우묵사스레피(*Eurya emarginata*)에서 항암효과를 나타내는 물질을 찾아 그 구조를 분석하는데 있다.



II. 재료 및 방법

iii

1. 재료

우묵사스레피 - 우묵사스레피의 잎은 제주대학교 시계탑 주변에 관상수로 심어져 있는 시료를 사용하였다. 우묵사스레피의 잎만 채집하여 실내에서 통풍 건조한 후 분쇄기로 갈아 미분쇄한 분말로 냉장 보관하면서 사용하였다.

2. 시약 및 기기



본 실험에서 시료의 추출에 사용된 용매들은 Merk Co., Junsei Co., Hyman Co.사의 제품을 사용하였다. Normal-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 60(230-400mesh ASTM, Merck)이 사용되었으며, 분리과정에서 사용된 TLC(Thin-Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0mm, Merck)를 사용하였다. TLC상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 3% KMnO₄, 20% K₂CO₃ 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다. HPLC(High Performance Liquid Chromatography)는 Waters 2487(Dual λ absorbance detector, Waters)를 사용하였고, ODS column(Prep Nova-Pak HR C18, 7.8×300mm column)을 장착하여 분리했다. 구조분석에 이용되는 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400

(FT NMR system, JEOL)을 이용하였다.

iii

3. 실험방법

1) **세포배양** - 급성전골수성 백혈병 환자에서 유래한 HL-60 세포주를 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 fetal bovin serum(FBS)이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다.

2) **세포수의 측정** - 배양된 HL-60 혈액종양 세포를 24 well plate에 2.0×10^5 cells/ml의 농도로 넣고 24시간 배양한 후, 시료를 100µg/ml의 농도로 첨가하여 48시간 더 배양하였다. 용매로 사용한 에탄올의 최종 농도는 0.1% 이하로 하였으며, 대조군에도 시료와 같은 양의 PBS와 에탄올의 혼합용매를 가하였다. 배양 후 plate를 교반한 다음 일정량씩을 취하여 hemocytometer로 세포수를 측정하였다. 시료 처리군의 세포수와 대조군의 세포수를 비교하여 암세포 성장 저해효과를 관찰하였다.

3) **세포의 대사활성 측정** - HL-60 세포를 3×10^5 cells/ml의 농도로 96well plate의 각 well에 넣고, 시료를 100µg/ml의 농도로 첨가하였다. 이를 4일간 배양한 후 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 100µg을 가하고, 4시간동안 더 배양하였다. plate를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide (DMSO) 150µl를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan침전물을 용해시킨 후 micro plate reader를 사용하여 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한

평균 흡광도 값을 구하여 대조군의 흡광도 값과 비교해 성장억제정도를 조사하였다.

iii

4) **DNA fragmentation assay** - HL-60 세포(3×10^6 cells/ml)에 시료를 $100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가한 후 12시간동안 배양하였다. 세포를 수집하여 Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit를 사용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 1.5% agarose gel에서 4시간(50V)동안 전기영동을 한 다음 ethidium bromide로 염색하고 UV-transilluminator하에서 DNA단편화 현상을 관찰하였다.

5) 시료의 추출 및 유효성분 분리

① **우묵사스레피로부터 유효성분 분리과정** - 제주대학교내의 시계탑 주변에 관상수로 심어져 있는 우묵사스레피의 잎만을 채집하여 실내에서 통풍 건조한 후 분쇄기로 미분쇄한 분말을 시료로 사용하였다. 우묵사스레피 건조분말 175.8g을 80% 메탄올 2L에 침적하고, 실온에서 24시간동안 교반하여 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압여과하여 잔사를 분리한 후 여액만을 취하였다. 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일하게 2-3회 반복 실시해 여액만을 따로 취한다. 이 여액을 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 에서 회전농축기를 이용 농축하여 80% 메탄올 추출물을 58g가량 얻었다. 이 80% 메탄올 추출물을 증류수에 현탁하고 separate funnel에서 *n*-Hexane과 EtOAc, *n*-Butanol을 순차적으로 사용하여 Hexane층, EtOAc층, *n*-Butanol층 및 H_2O 층으로 용매분획 하였다. 이렇게 얻어진 각각의 유기용매 분획들 가운데 EtOAc층(9.976g)을 normal-phase column chromatography로 분리하여 다시 8개의 분획들을 얻었다. 이 분획들 중 fr. 4를 가지고 40%, 60%, 80%, 100% 메탄올을 사용하여 reverse-phase column chromatography로 각각의 분획들로 분리하였다. 이 중 40% 메탄올 분획을 가지고 일부는 Prep-TLC에 의해 7개의 분획들을 얻었으며,

나머지는 normal-phase column chromatography를 이용하여 10개의 분획들을 얻었다. 이렇게 얻어진 분획들을 NMR 기기로 확인하였다.

② Normal-phase column chromatography에 의한 분리과정 - 용매 분획하여 얻어진 각각의 유기용매층들 중에서 EtOAc층(9.976g)을 fraction으로 분리하기 위하여 glass column(5×22)에 silica gel(Kieselgel 60, 230-400 mesh ASTM, Merck)을 충전시킨다. EtOAc층 가운데 일부를 소량의 용매에 녹인 후 충전된 column에 전개용매(EtOAc/MeOH = 10/1)를 사용하여 전개시킨다. 이렇게 얻어진 fraction들을 감압 회전농축기로 농축하여 8개의 분획들을 얻었다(Figure 1).

③ Reverse-phase column chromatography에 의한 분리과정 - 과정 ②에서 얻어진 각 분획들을 40%, 60%, 80%, 100% 메탄올을 순차적으로 사용하여 reverse-phase column chromatography(3×15, Silica gel 100 C18-Reversed phase)로 분리하였다. 이렇게 얻어진 fraction들을 회전농축기로 농축하여 각각 40%, 60%, 80%, 100% 메탄올의 4개의 분획들을 얻을 수 있었다(Figure 1).

④ Prep TLC에 의한 분리과정 - 과정 ③에서 얻어진 분획들을 TLC plate(20 PLC plates 20×20cm, Silica gel 60 F₂₅₄, 0.5mm)를 사용하여 TLC chamber에서 전개용매(CHCl₃/MeOH/H₂O = 7.5/2.5/0.3)로 전개시켜 7개의 분획들을 얻을 수 있었다(Figure 2).

⑤ Normal-phase column chromatography에 의한 분리과정 - 과정 ③에서 얻어진 분획들을 normal-phase column chromatography(3×25, Kieselgel 60)에서 CHCl₃/MeOH/H₂O(7.5/2.5/0.3)의 전개용매로 전개시켜 10개

의 분획들을 얻을 수 있었다(Figure 3).

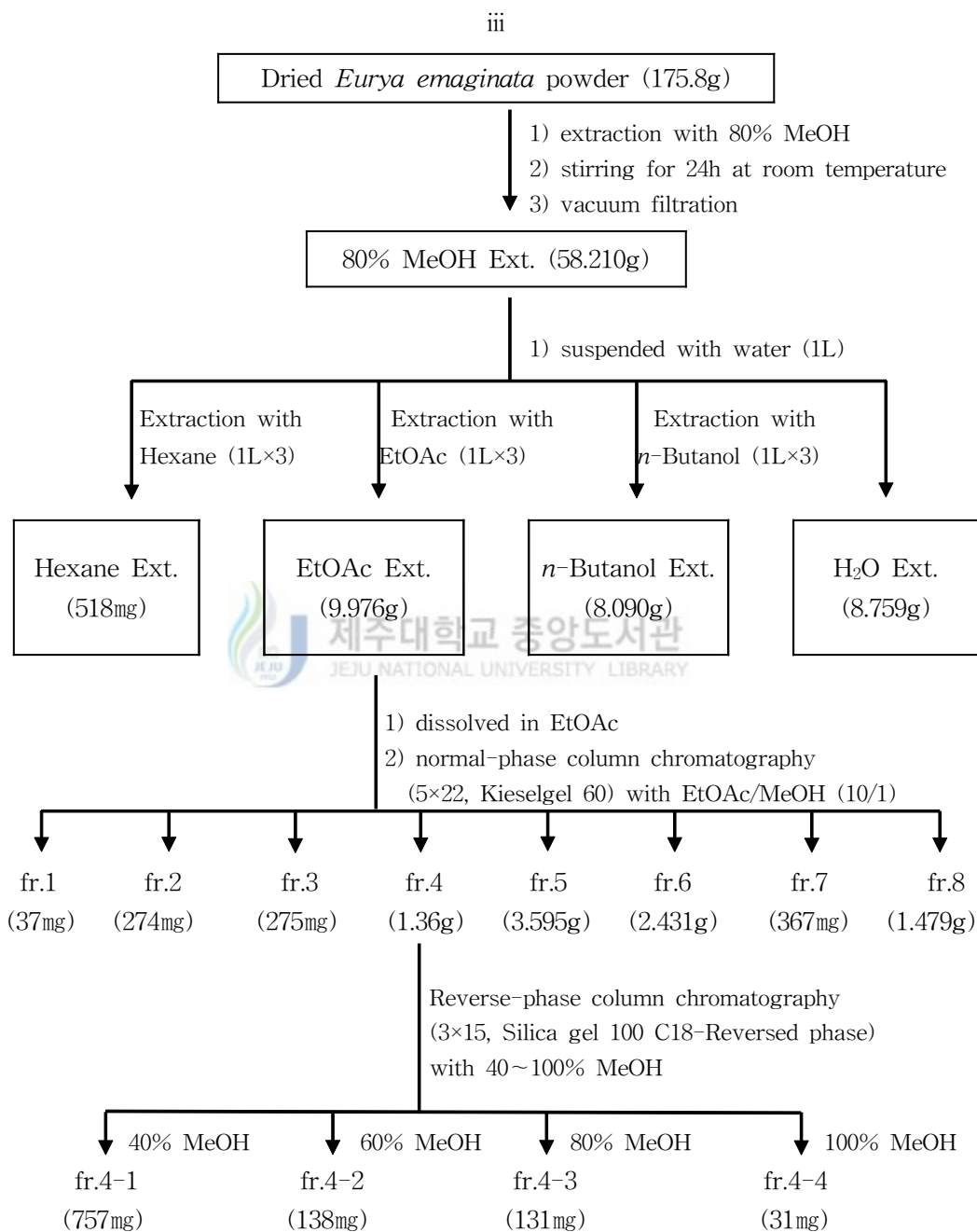
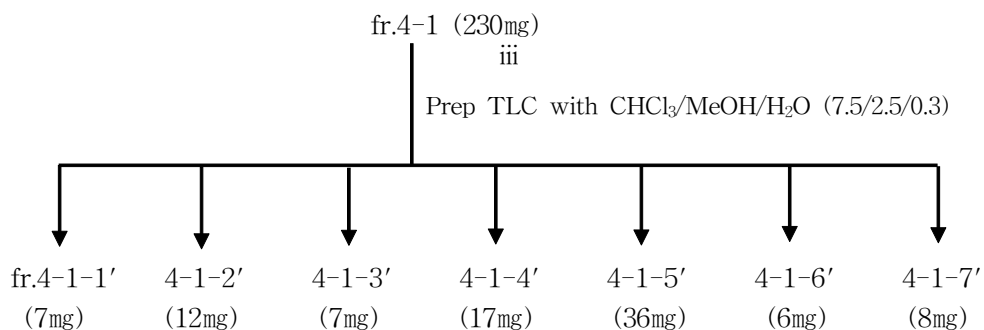
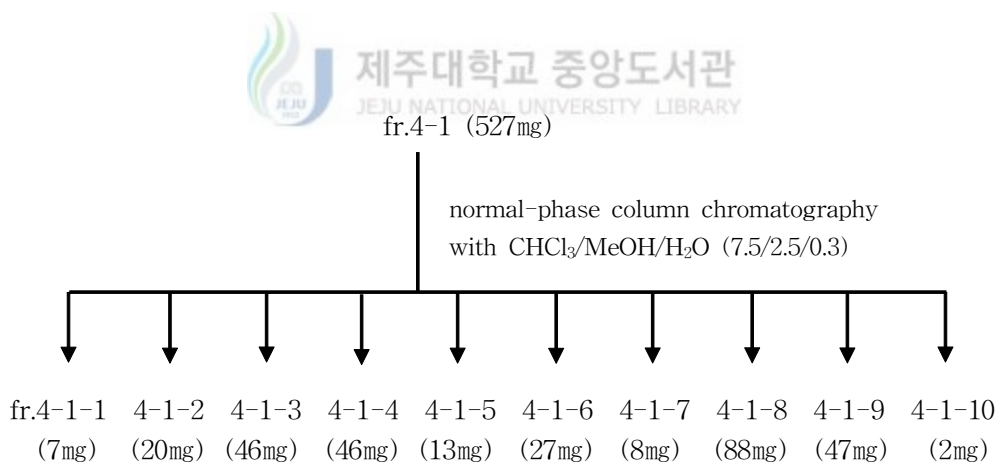


Figure 1. Isolation procedure of *Eurya emaginata*



**Figure 2. Isolation procedure of fr. 4-1 by Prep TLC
with CHCl₃/MeOH/H₂O (7.5/2.5/0.3)**



**Figure 3. Isolation procedure of fr. 4-1 by normal-phase
column chromatography with CHCl₃/MeOH/H₂O
(7.5/2.5/0.3)**

⑥ **fr.4-1-8의 Acetylation** - 분리한 4-1-8분획 20mg에 Acetic anhydride 400 μ l와 Pyridine 400 μ l를 가하고 실온에서 4시간동안 교반하여 4-1-8분획을 acetylation시켰다. 이렇게 acetylation된 분획 4-1-8-Ac을 CHCl₃과 H₂O를 사용하여 용매분획 한 후 CHCl₃층만을 취하여 NMR로 확인하였다 (Figure 4).

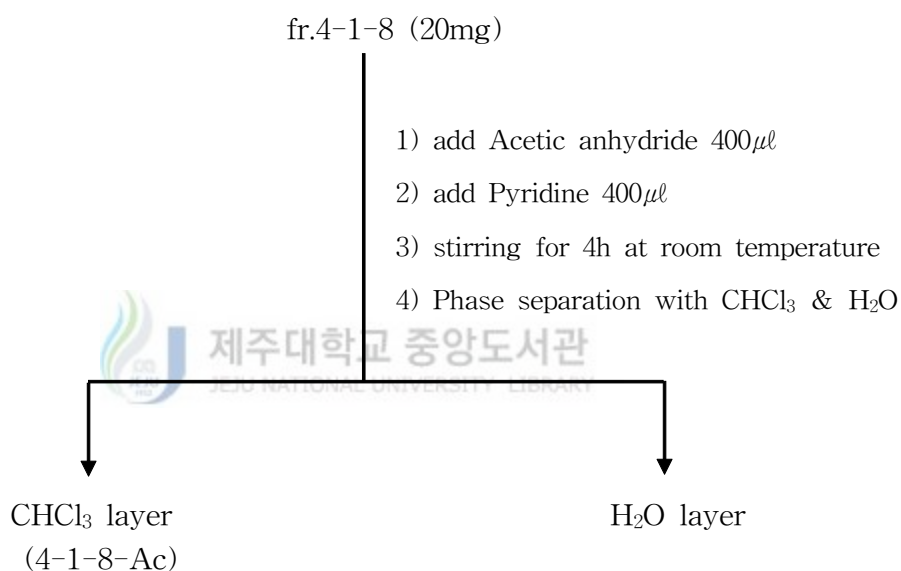


Figure 4. Acetylation procedure of fr. 4-1-8

III. 결과 및 고찰

iii

1) 80% 메탄올 추출물과 각 용매분획들에 대한 암세포 증식 억제효과 - 우묵사스레피 건조분말(175.8g)을 80% MeOH로 추출한 후, *n*-Hexane, EtOAc, *n*-Butanol을 사용하여 순차적으로 각각 Hexane층, EtOAc층, *n*-Butanol층 및 H₂O층으로 용매분획 하였다. 이렇게 얻어진 80% 메탄올 추출물과 각각의 용매분획들을 100 μ g/ml의 농도로 사용하여 HL-60세포를 처리한 후, MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도를 측정함으로써 HL-60세포의 세포 증식에 따른 대사활성을 확인하였다. 그 결과, 80% 메탄올 추출물과 EtOAc층에서 HL-60세포의 세포 증식을 현저히 억제시킴을 알 수 있었다(Figure 5). 또한 이러한 HL-60세포의 세포증식에 대한 억제효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 확인하기 위해 apoptosis 유도에 의하여 나타나는 현상중 하나인 DNA 단편화 현상을 관찰하였다. 80% 메탄올 추출물과 각각의 용매분획들을 100 μ g/ml의 농도로 처리한 후 12시간 뒤에 DNA 단편화 현상을 관찰한 결과, EtOAc층에서 DNA 단편화 현상이 가장 잘 나타남을 확인할 수 있었다(Figure 6). 이러한 결과로부터 우묵사스레피의 EtOAc분획이 나타내는 HL-60세포의 세포 증식 억제효과가 HL-60세포의 apoptosis 유도에 의한 것임을 알 수 있었다.

2) EtOAc층과 EtOAc fraction들에 대한 암세포 증식 억제효과 - EtOAc층을 normal-phase column chromatography로 분리하여 8개의 fraction들을 얻었다. 이렇게 얻은 각각의 EtOAc fraction들과 EtOAc층을 100 μ g/ml의 농도로 사용하여 HL-60세포를 처리한 후 MTT assay한 결과, fr.1한 개를 제외한 EtOAc층과 모든 EtOAc fraction들이 HL-60세포의 세포증식 억제효과를 나타내었다. 그 중에서도 fr.3, fr.4, fr.5, fr.6의 4개의 fraction들이

현저한 세포증식 억제효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(Figure 7).

iii

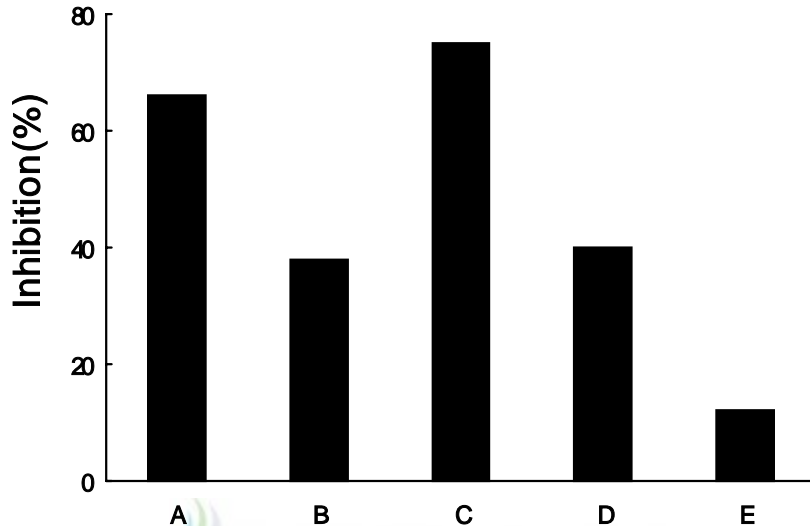


Figure 5. Inhibitory effect of several extracts of *Eurya emarginata* on the growth of HL-60 cells

A : treatment of 80% MeOH Ext. B : treatment of Hexane Ext.
C : treatment of EtOAc Ext. D : treatment of n-Butanol Ext.
E : treatment of H₂O Ext.

3) HL-60세포의 세포증식 억제효과를 나타내는 성분의 분리 - 우묵사스레피 건조분말(175.8g)을 80% MeOH 로 추출한 후 *n*-Hexane, EtOAc, *n*-Butanol을 사용하여 순차적으로 각각 Hexane층, EtOAc층, *n*-Butanol층 및 H₂O층으로 용매분획 하였다. 그중 EtOAc층을 가지고 EtOAc/MeOH (10/1)의 전개용매를 사용하여 normal-phase column chromatography로 분리한 결과 8개의 fraction들을 얻을 수 있었다. 다음은 normal-phase column chromatography로 분리하기 전에 TLC로 확인해본 EtOAc층의 분리패턴이다(Figure 8).

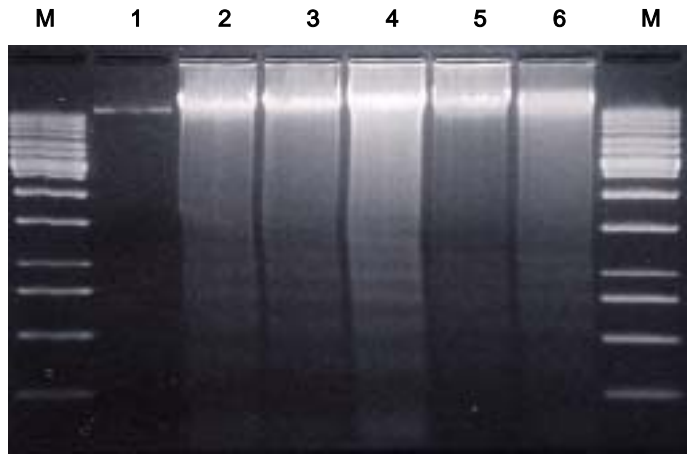


Figure 6. DNA fragmentation by several extracts of *Eurya emarginata* in HL-60 cells

Lane 1 : control , Lane 2 : 80% MeOH Ext. ,
 Lane 3 : Hexane Ext. , Lane 4 : EtOAc Ext. ,
 Lane 5 : n-Butanol Ext. , Lane 6 : H₂O Ext.

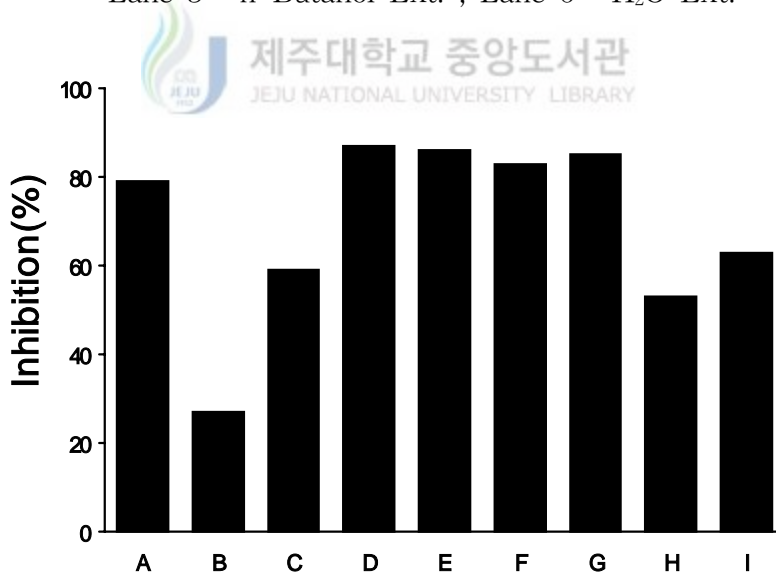


Figure 7. Inhibitory effect of several EtOAc-fraction of *Eurya emarginata* on the growth of HL-60 cells

A : EtOAc Ext. , B : EtOAc fr.1 , C : EtOAc fr.2 ,
 D : EtOAc fr.3 , E : EtOAc fr.4 , F : EtOAc fr.5 ,
 G : EtOAc fr.6 , H : EtOAc fr.7 , I : EtOAc fr.8

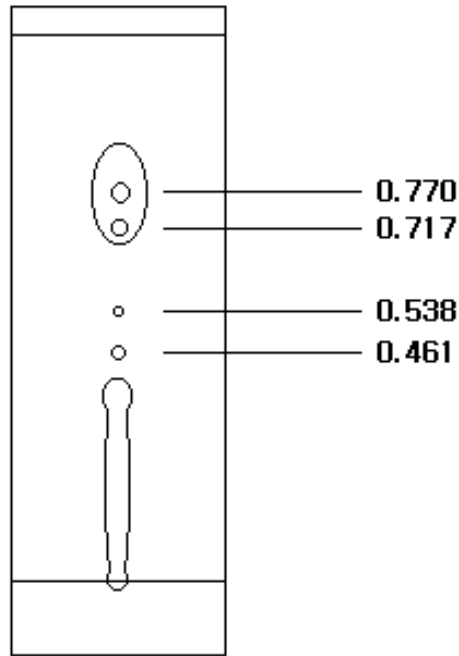


Figure 8. TLC of EtOAc extracts using EtOAc/MeOH(10/1) as an eluent

분리한 EtOAc fraction들 중 HL-60세포의 세포 증식 억제효과가 가장 현저하게 나타난 EtOAc-fr.4을 가지고 40%, 60%, 80%, 100% MeOH 용매를 사용하여 reverse-phase column chromatography로 분리한 결과, 순차적으로 40%, 60%, 80%, 100% MeOH fraction의 4개의 fraction들을 얻을 수 있었다. 다음은 fr.4-1을 normal-phase column chromatography로 분리하기 전에 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}(7.5/2.5/0.3)$ 의 용매를 사용하여 TLC로 확인해본 fr. 4-1의 분리패턴이다(Figure 9).

Reverse-phase column chromatography로 분리한 fraction중 40% MeOH fr.을 다시 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}(7.5/2.5/0.3)$ 의 전개용매를 사용하여 일부는 Prep TLC로 분리하였고, 일부는 normal-phase column chromatography로 분

리하였다. Prep TLC로는 7개의 fraction을 얻을 수 있었고, normal-phase column chromatography로는 10개의 fraction들을 얻을 수 있었다. 이렇게 얻어진 fraction들을 NMR 기기로 확인하였다.

NMR로 확인한 결과, Prep TLC로 분리한 fraction중 4-1-2'분획(Figure 2)과 normal-phase column chromatography로 분리한 fraction중 4-1-8분획(Figure 3)은 순수하게 분리가 된 것으로 보여진다.

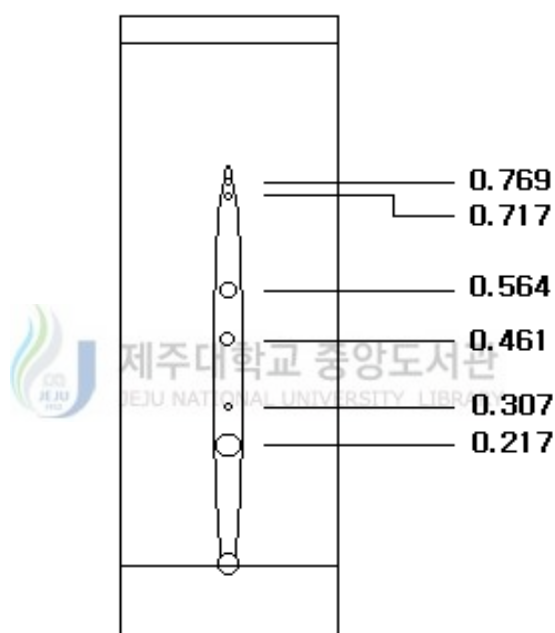


Figure 9. TLC spots of fr. 4-1

4) **fr. 4-1-8의 구조분석** - ESI-MS[m/z 449.1 (M+H)⁺, m/z 447.2 (M-H)⁺] 에 의해 분자량이 448.37이고 분자식이 C₂₁H₂₀O₁₁ 이라는 것을 알 수 있었다. UV spectrum이 256 및 349nm에서 흡수극대를 나타내는 것으로 보아 Flavonoid 의 한 형태일 것으로 예상되었다(Figure 10). IR spectrum을 확

인한 결과 3373cm^{-1} 에서 강하고 broad하게 나타나는 것으로 보아 hydroxyl group이 존재함을 알 수 있었고, 1654cm^{-1} 에서 강하게 나타나는 것으로 보아 큰슈게이트된 carbonyl group 또한 존재함을 알 수 있었다(Figure 11). 분자식을 기준으로 불포화도를 계산한 결과 불포화도가 12였고 이는 구조상에서 8개의 이중결합과 4개의 고리에 해당됨을 알 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ 을 확인한 결과 6.12(1H, d, $J=2.2\text{Hz}$)ppm, 6.28(1H, d, $J=2.2\text{Hz}$)ppm, 6.81(1H, d, $J=8.3\text{Hz}$) ppm, 7.24(1H, dd, $J=8.3, 2.2\text{Hz}$)ppm, 7.28(1H, d, $J=2.2\text{Hz}$)ppm에서 나타나는 signal로 보아 방향족 고리의 수소가 있음이 예상되었고, 3.31(1H, dd, $J=9.3, 9.0\text{Hz}$)ppm, 3.38(1H, dd, $J=9.0, 6.1\text{Hz}$)ppm, 3.71(1H, dd, $J=9.3, 3.4\text{Hz}$)ppm, 4.19(1H, $J=3.4, 1.7\text{Hz}$)ppm, 5.30(1H, d, $J=1.7\text{Hz}$)ppm에서 나타나는 signal들은 Sp^3 혼성구조에 전기음성도가 큰 O원자가 붙어 있는 형태라는 것을 예상할 수 있게 해주었다. 그리고, 0.90(3H, $J=6.1\text{Hz}$)ppm에서 나타나는 signal은 methyl group의 수소가 나타내는 것임을 예상할 수 있었다(Figure 12, Table 1). $^{13}\text{C-NMR}$ 을 통해서도 탄소의 수가 21개임을 확인할 수 있었고, 179.5ppm에서 나타나는 작은 intensity의 signal로 보아 carbonyl group의 존재를 확인할 수 있었다. 90.0ppm이상 170.0ppm이하에서 나타나는 signal들로 Sp^2 혼성구조를 갖는 불포화탄화수소 및 방향족 고리의 탄소가 존재함을, 70.0ppm에서 80.0ppm범위 사이에서 나타나는 signal들로는 Sp^3 혼성구조에 전기음성도가 큰 O원자가 붙어 있는 형태라는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 17.6ppm에서 나타나는 가장 큰 intensity의 signal로 보아 methyl group의 탄소가 있음도 예상되었다(Figure 13, Table 1). DEPT 기법으로는 carbonyl을 포함하여 4차 탄소가 10개 있음을 알 수 있었고, 그외 나머지 탄소들은 methyl group의 탄소 1개와 10개의 CH탄소들임을 알 수 있었다(Figure 14, Table 1). HMQC 기법으로 각각의 탄소들에 직접 결합되어있는 수소들을 확인한 결과 각 탄소들의 position을 임의로 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 기준으로 carbonyl 탄소부터 알파벳 대문자순으로 나타내었고 각 탄소에 결합되어있는 수소들은

소문자로 나타내었다(Figure 15, Table 1). HOMO cosy로 각 수소들간의 coupling을 확인한 결과 j-k, j-l, o-p, q-r, q-s사이에 coupling이 일어남을 알 수 있었다(Figure 16, Table 1). HMBC 기법으로 각각의 탄소들과 2~3시그마결합 분리 위치에 있는 수소들간의 coupling을 확인한 결과 B, O, C, M, E, P 와 D, I, J, L, F, G, K 및 H, N, S, Q, R, T, U로 이뤄지는 3가지의 구조적인 연결성이 존재함을 알 수 있었다(Figure 17, Figure 18, Table 1).

구조상에서 hydroxyl group의 위치를 확인하고 정량하기 위해 초산무수물을 사용하여 acetylation시킨 후 MS와 NMR로 확인하였다. 그 결과 ESI-MS [m/z 701.1 (M+H)⁺, m/z 699.3 (M-H)⁺]에 의해 분자량이 700.58이고 분자식이 C₃₃H₃₂O₁₇ 이라는 것을 알 수 있었다.

¹H-NMR을 확인한 결과 1.5~2.5ppm범위 사이에서 나타나는 6개의 signal은 acetyl group의 methyl수소가 나타내는 것임을 알 수 있었다(Figure 19, Table 2). ¹³C-NMR을 통해서 165~170ppm과 19~20ppm범위 사이에서 나타나는 6개씩의 signal들로 각각 acetyl group의 carbonyl과 methyl탄소가 존재함을 알 수 있었다(Figure 20, Table 2). 이러한 acetyl group은 HMQC로도 확인할 수 있었다(Figure 21, Table 2). ROSEY기법으로 구조상 3,3',4',5,7-Pentahydroxy-flavon고리와 3-Rhamnose고리와 공간적인 근접성을 확인한 결과 position U의 methyl group의 수소와 R, Q, F, G의 acetyl group의 methyl수소들이 coupling을 이루고 있고, position J, L, K의 수소들이 R, Q의 acetyl group의 methyl수소 및 S, U의 수소들과 coupling을 이루고 있는 것으로 보아 position J, L, F, G, K, I로 이뤄진 catechol고리와 3-Rhamnose고리가 공간적으로 근접해 있음을 알 수 있었다(Figure 22, Figure 24, Table 2). HMBC 기법으로 확인한 결과 position B, F, G, T, R, Q의 탄소들과 acetyl group의 methyl수소들간에 coupling이 일어나는 것으로 보아 hydroxyl group의 위치가 position B, F, G, T, R, Q에 결합되어 있다는 것을 알 수 있었고 B, O, C, M, E, P, A 와 D, I, J, L, F, G, K 및 H, N, S, Q, R, T, U로

이뤄지는 3가지의 구조적인 연결성이 존재함을 알 수 있었다(Figure 23, Figure 25, Table 2).

iii

이상과 같은 결과들로부터 분리한 fr.4-1-8의 구조가 3,3',4',5,7-Pentahydroxy-flavon고리에 Rhamnose고리가 결합되어 있는 구조임을 알 수 있었다. 또한 문헌을 확인해 본 결과 분리한 fr. 4-1-8이 기존의 Quercitrin이라는 물질임을 알 수 있었다(Figure 26). 문헌에서 찾아낸 Quercitrin과 우묵사스레피에서 분리한 fr. 4-1-8이 동일물질인지 알아보기 위해 SIGMA에서 시판되고 있는 Quercitrin을 구입하여 NMR로 확인한 결과 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 모두 동일함을 알 수 있었고(Figure 27, Figure 28, Table 3), 이로써 우묵사스레피에서 분리한 fr. 4-1-8이 Quercitrin이라고 확신할 수 있었다. 한편, 우묵사스레피에서 Quercitrin에 대한 분리는 Morita 등에 의하여 보고된 바 있다.

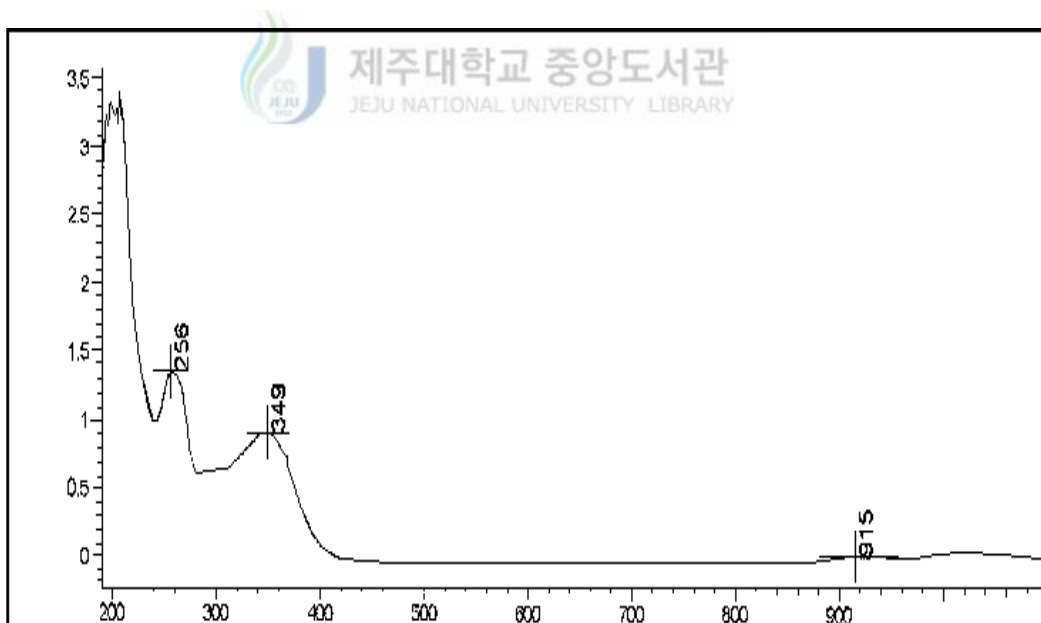
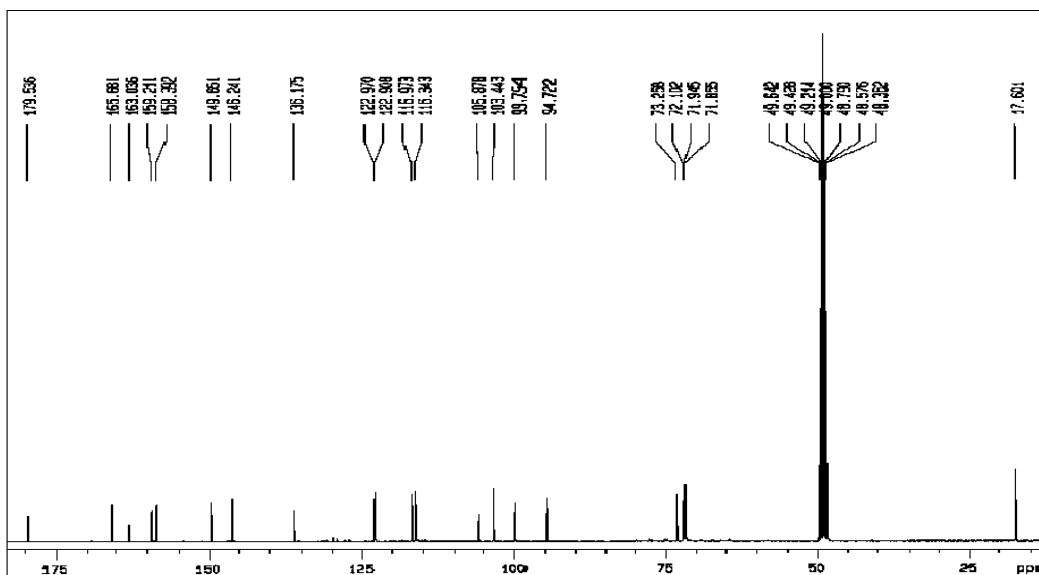
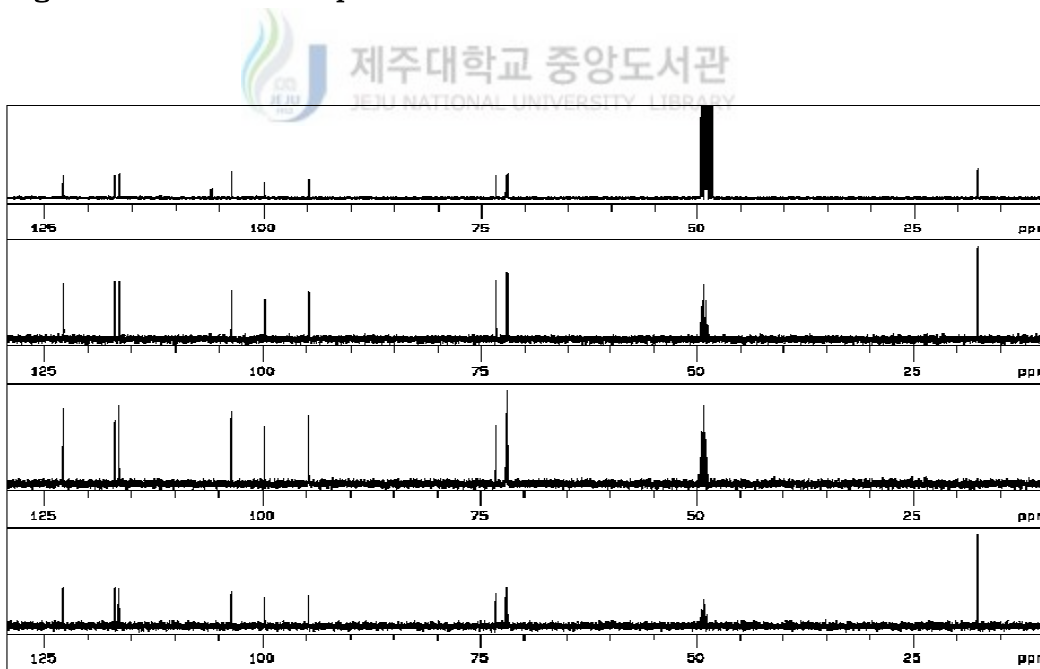


Figure 10. UV spectrum of fr. 4-1-8



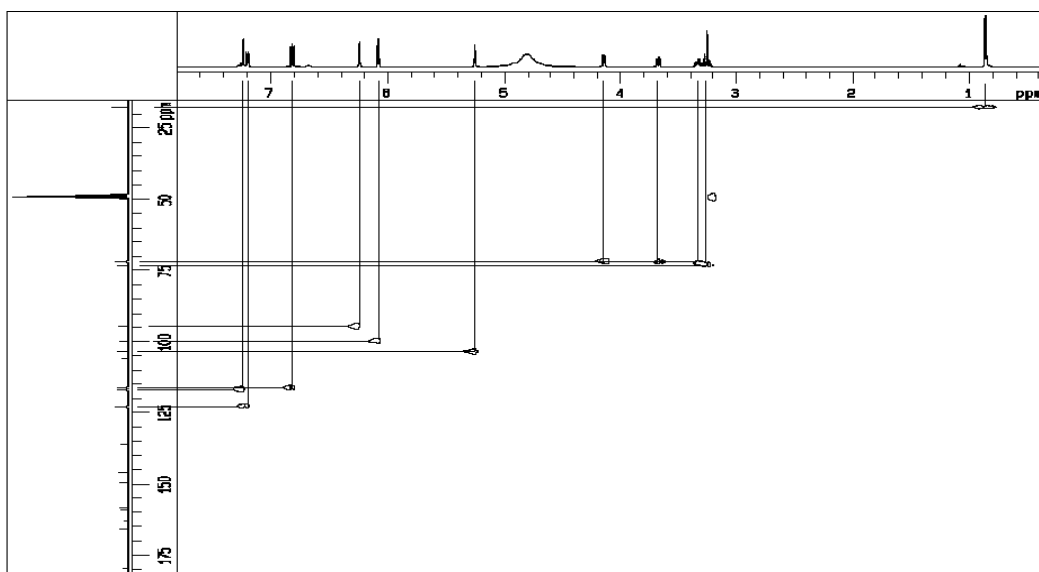
$^{13}\text{C-NMR}$: 100MHz in CD_3OD .

Figure 13. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of fr. 4-1-8



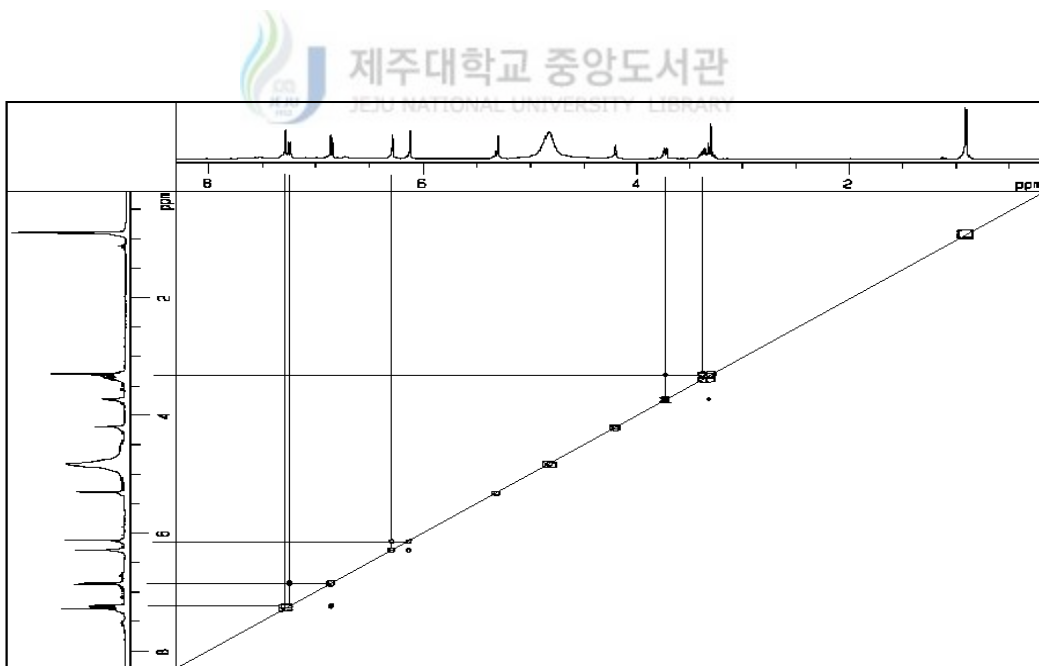
$^{13}\text{C-NMR}$: 100MHz in CD_3OD .

Figure 14. DEPT of fr. 4-1-8



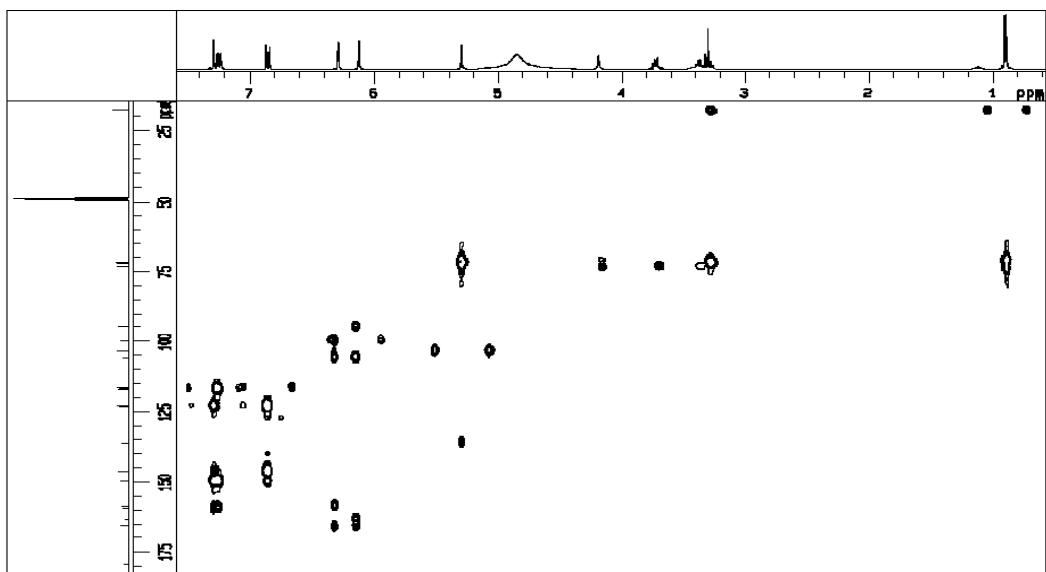
$^1\text{H-NMR}$: 400MHz in CD_3OD , $^{13}\text{C-NMR}$: 100MHz in CD_3OD .

Figure 15. HMQC of fr. 4-1-8



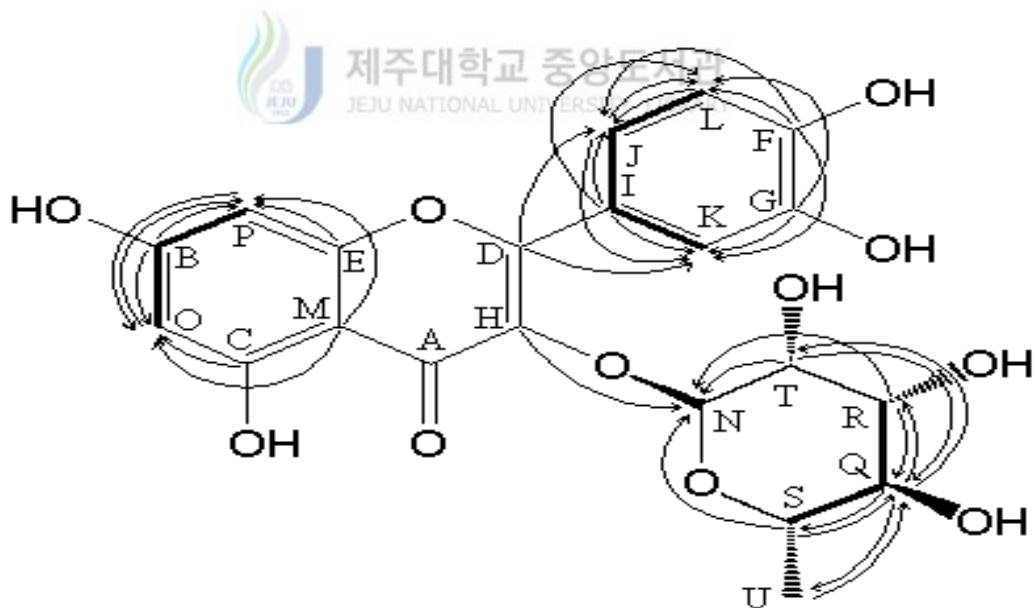
$^1\text{H-NMR}$: 400MHz in CD_3OD .

Figure 16. HOMO cosy of fr. 4-1-8



$^1\text{H-NMR}$: 400MHz in CD_3OD , $^{13}\text{C-NMR}$: 100MHz in CD_3OD .

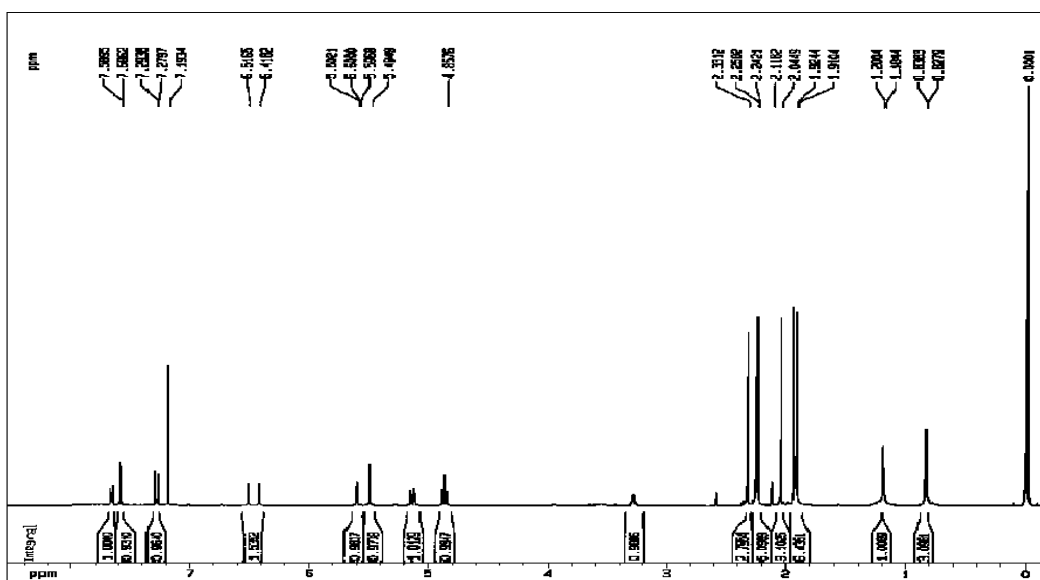
Figure 17. HMBC of fr. 4-1-8

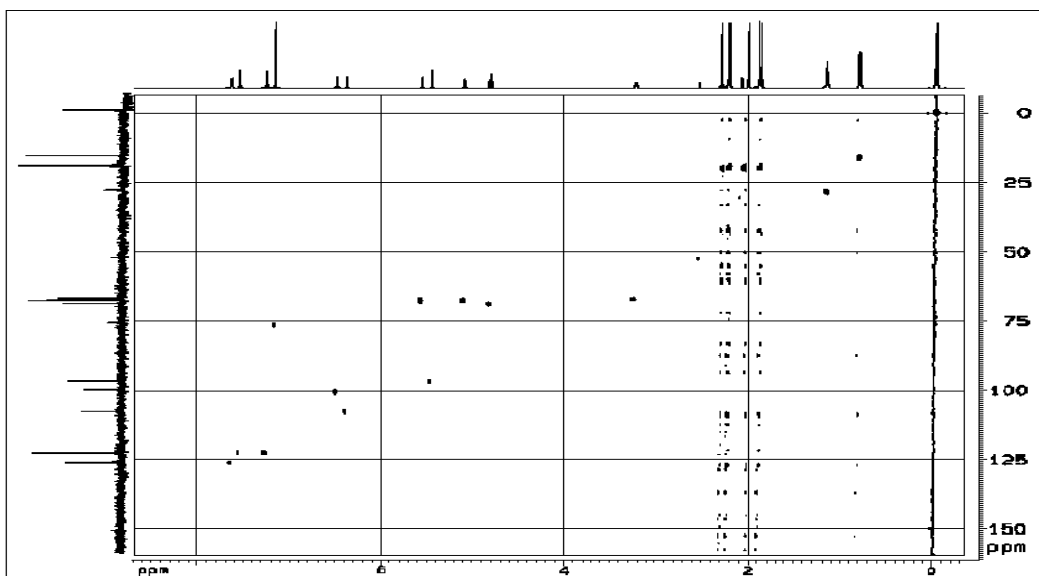


— : HOMO cosy

→ : HMBC

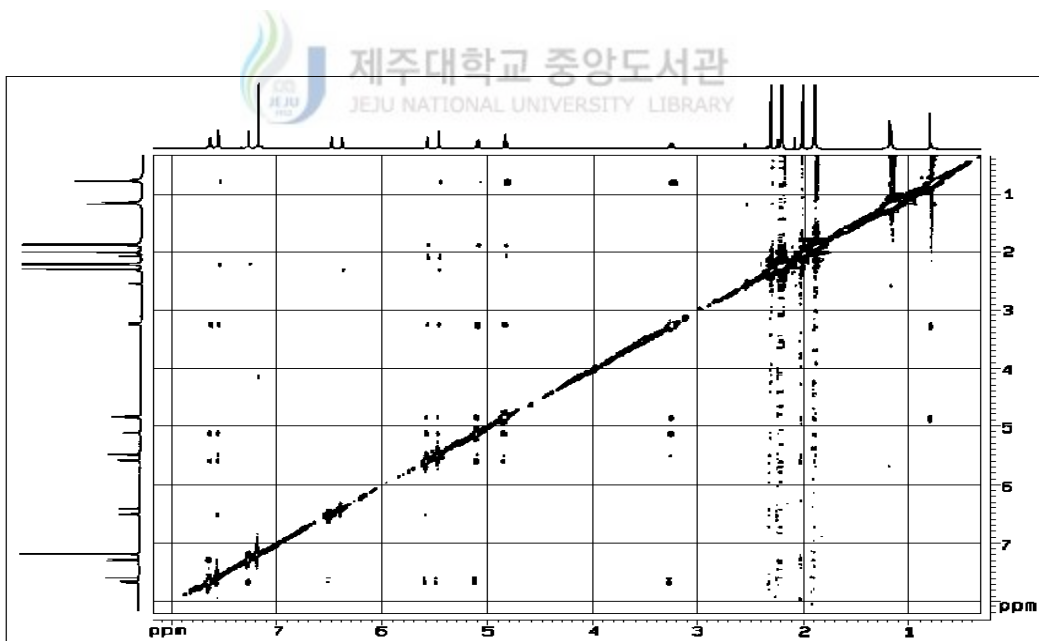
Figure 18. 2D-NMR correlation of fr. 4-1-8





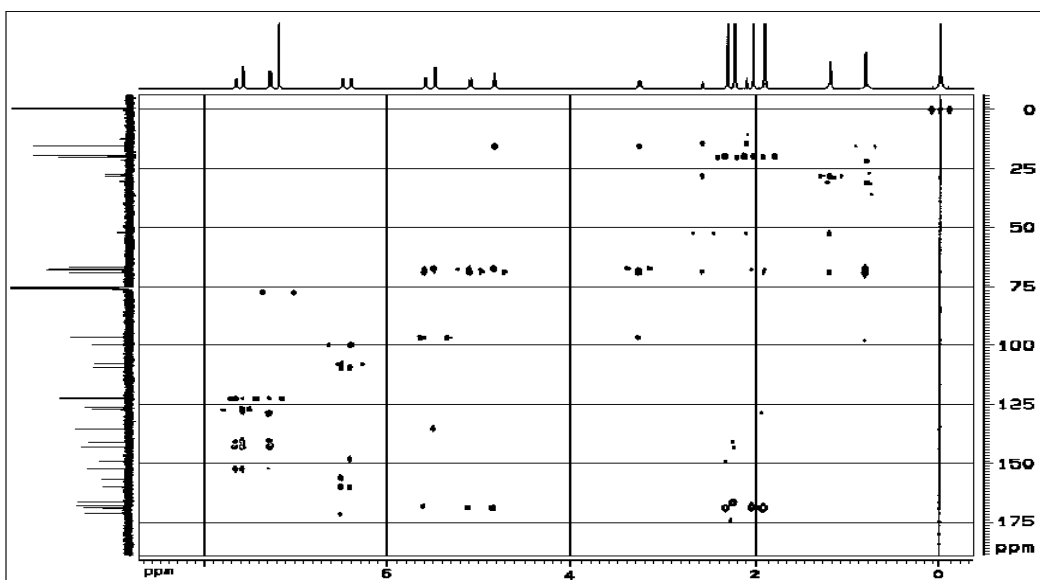
$^1\text{H-NMR}$: 600MHz in CDCl_3 , $^{13}\text{C-NMR}$: 150MHz in CDCl_3 .

Figure 21. HMQC of fr. 4-1-8-Ac



$^1\text{H-NMR}$: 600MHz in CDCl_3 .

Figure 22. ROESY of fr. 4-1-8-Ac



$^1\text{H-NMR}$: 600MHz in CDCl_3 , $^{13}\text{C-NMR}$: 150MHz in CDCl_3 .

Figure 23. HMBC of fr. 4-1-8-Ac

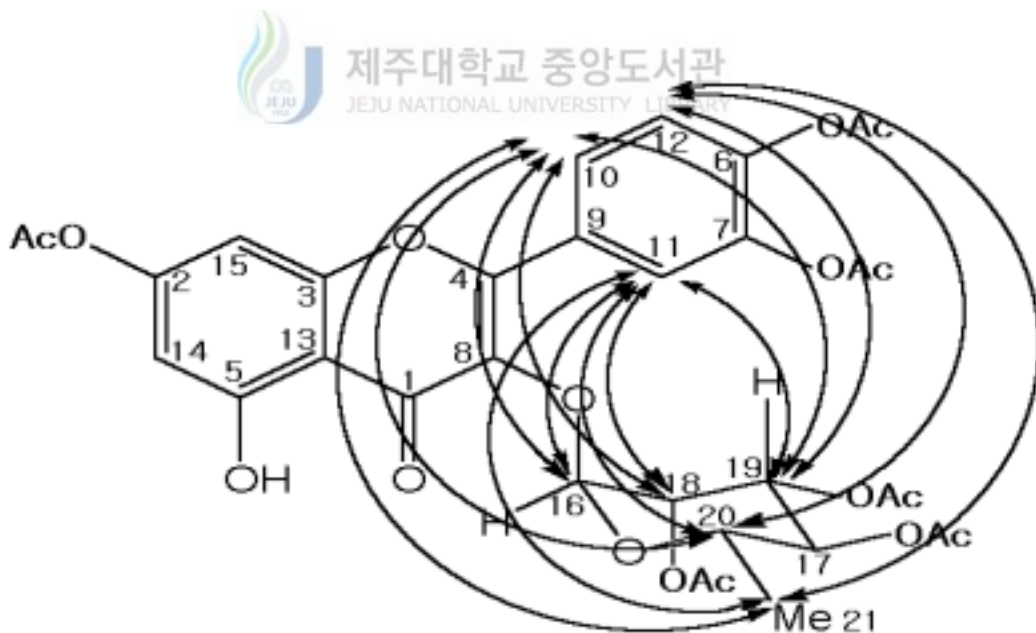


Figure 24. ROESY correlation of fr. 4-1-8-Ac

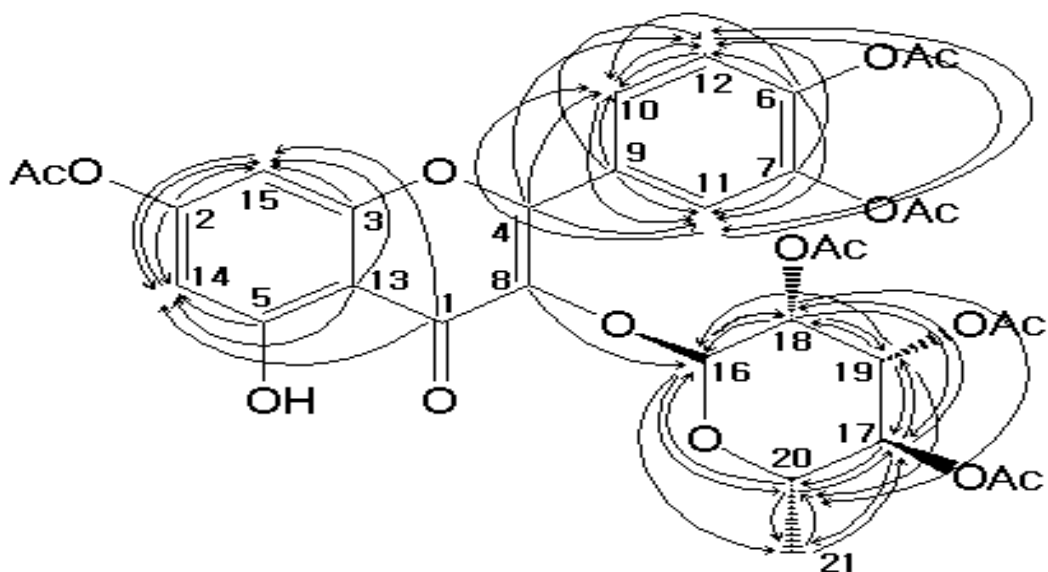


Figure 25. HMBC correlation of fr. 4-1-8-Ac

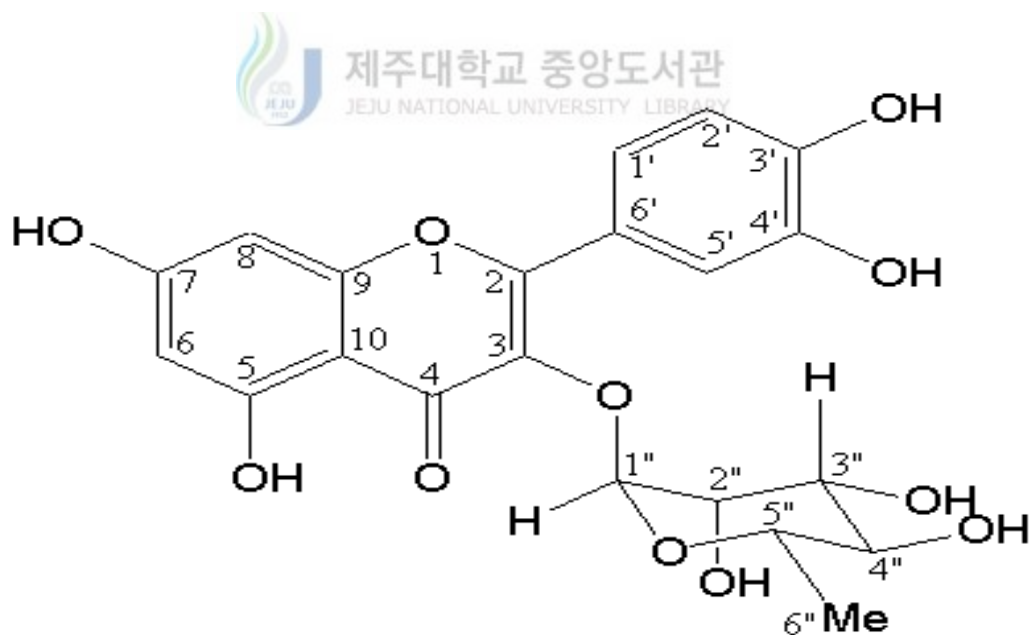


Figure 26. Structure of fr. 4-1-8(Quercitrin)

Table 1. NMR data of fr. 4-1-8

position	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multi, J Hz) ⁱⁱⁱ	HMBC (H positon)	비고	Acetylated ^{13}C (position)
A	179.5			carbonyl	1
B	165.7		p, o	4차탄소	2
C	163.0		o	4차탄소	5
D	159.2		j, k	4차탄소	4
E	158.4		p	4차탄소	3
F	149.6		k, j, l	4차탄소	6
G	146.3		k, l	4차탄소	7
H	136.2		n	4차탄소	8
I	122.97		k, l	CH	9
J	122.90	7.24(1H, dd, 8.3, 2.2Hz)	k, l	4차탄소	10
K	117.0	7.28(1H, d, 2.2Hz)	j	CH	11
L	116.3	6.81(1H, d, 8.3Hz)	j	CH	12
M	105.9		o, p	4차탄소	13
N	103.4	5.30(1H, d, 1.7Hz)		CH	16
O	99.8	6.12(1H, d, 2.2Hz)	p	CH	14
P	94.7	6.28(1H, d, 2.2Hz)	o	CH	15
Q	73.3	3.31(1H, dd, 9.3, 9.0Hz)	r, s, t, u	CH	17
R	72.1	3.71(1H, dd, 9.3, 3.4Hz)	n, q	CH	19
S	71.90	3.38(1H, dq, 9.0, 6.1Hz)	n, q	CH	20
T	71.85	4.19(1H, dd, 3.4, 1.7Hz)	n, q	CH	18
U	17.6	0.90(3H, d, 6.1Hz)	q	CH ₃	21

^1H -NMR : 400MHz in CD_3OD , ^{13}C -NMR : 100MHz in CD_3OD .

HOMO cosy correlation : j-k, j-l, o-p, q-r, q-s

Table 2. NMR data of fr. 4-1-8-Ac

position	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multi, J_{H}/Hz)	HMBC (H position)	비고
1	171.4			carbonyl
2	160.3		14, 15, 2-Ac	4차탄소
3	156.6		15	4차탄소
4	152.2		10, 11, 12	4차탄소
5	149.5		14	4차탄소
6	143.1		10, 11, 12, 6-Ac	4차탄소
7	141.3		11, 12, 7-Ac	4차탄소
8	135.7		16	4차탄소
9	127.7		10, 11, 12	CH
10	126.3	7.66(1H, dd, 8.5, 2.0Hz)	11, 12	4차탄소
11	122.91	7.58(1H, d, 2.0Hz)	10, 12	CH
12	122.90	7.28(1H, d, 8.5Hz)	10, 11	CH
13	109.7		14, 15	4차탄소
14	108.2	6.42(1H, s)	15	CH
15	100.2	6.52(1H, s)	14	CH
16	97.2	5.49(1H, d, 1.9Hz)	18, 20, 21	CH
17	69.3	4.86(1H, t, 10.0Hz)	18, 19, 20, 21	CH
18	68.1	5.60(1H, dd, 3.3, 1.9Hz)	16, 17, 19, 20	CH
19	68.0	5.13(1H, dd, 10.0, 3.3Hz)	16, 17, 18, 20	CH
20	67.5	3.28(1H, dq, 10.0, 6.2Hz)	16, 17, 21	CH
21	15.9	0.83(3H, d, 6.2Hz)	17, 20	CH ₃
2-Ac	169.4		14, 15	carbonyl
	20.2	2.33(3H, s)		CH ₃
6-Ac	166.8			carbonyl
	19.7	2.24(3H, s)		CH ₃
7-Ac	167.0			carbonyl
	19.9	2.26(3H, s)		CH ₃
17-Ac	169.3		17	carbonyl
	19.5	1.91(3H, s)		CH ₃
18-Ac	168.8		18	carbonyl
	19.65	2.05(3H, s)		CH ₃
19-Ac	169.2		19	carbonyl
	19.63	1.92(3H, s)		CH ₃

¹H-NMR : 600MHz in CDCl₃, ¹³C-NMR : 150MHz in CDCl₃.

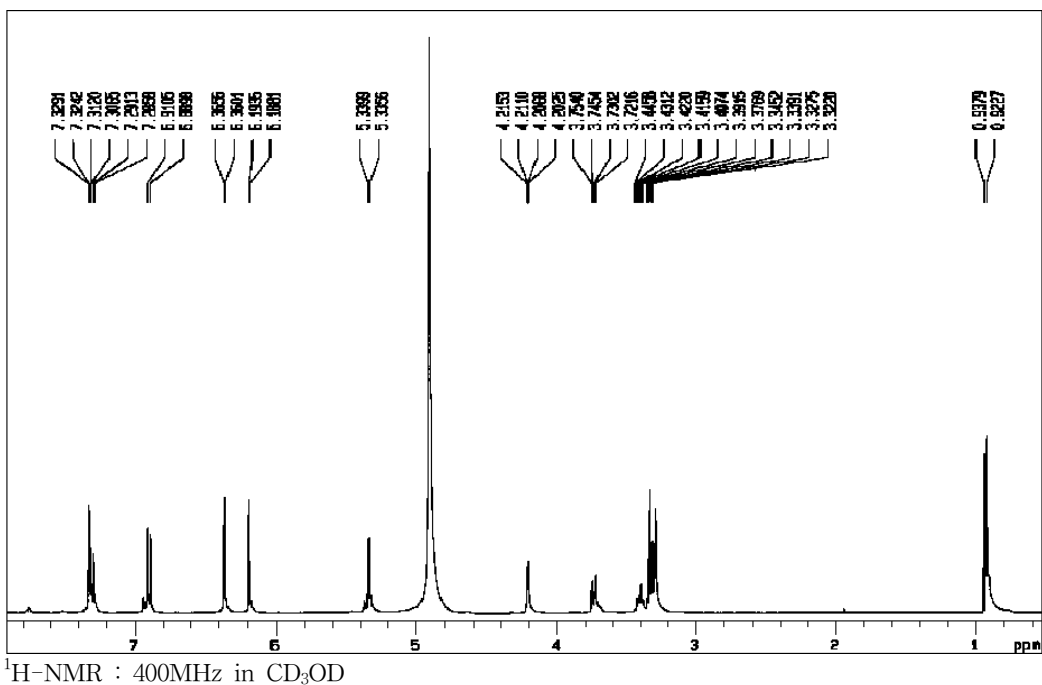


Figure 27. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of authentic Quercitrin obtained from SIGMA

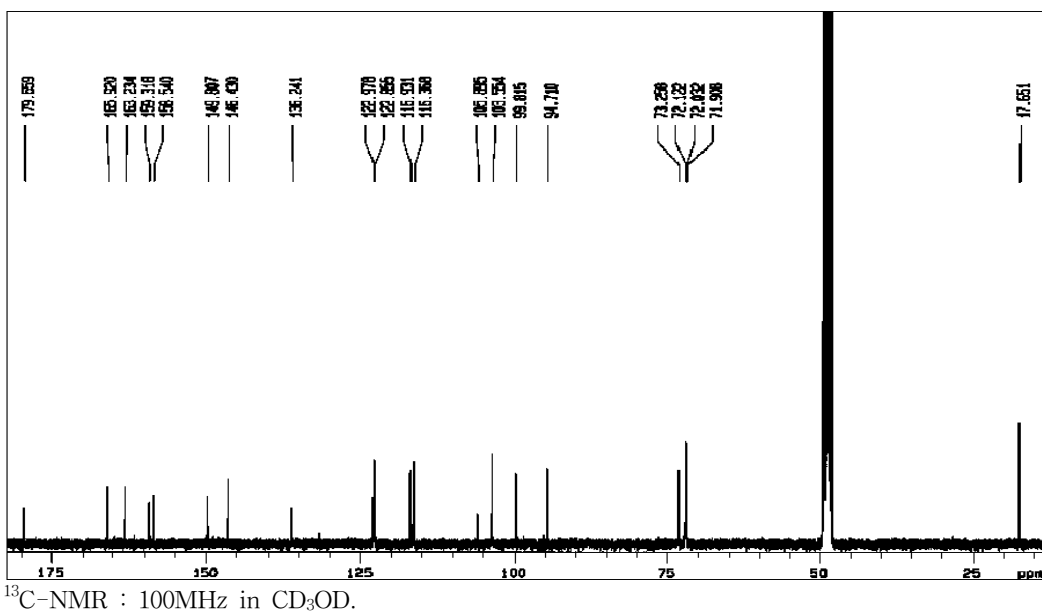


Figure 28. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of authentic Quercitrin

Table 3. NMR data of authentic Quercitrin

position	$\delta^{13}\text{C}$	iii $\delta^1\text{H}(\text{multi, } J\text{Hz})$
A	179.6	
B	165.9	
C	163.2	
D	159.3	
E	158.5	
F	149.8	
G	146.4	
H	136.2	
I	122.97	
J	122.85	7.29(1H, dd, 8.1, 2.2Hz)
K	116.9	7.31(1H, d, 2.2Hz)
L	116.3	6.90(1H, d, 8.1Hz)
M	105.9	
N	103.5	5.34(1H, d, 1.7Hz)
O	99.8	6.19(1H, d, 2.2Hz)
P	94.7	6.36(1H, d, 2.2Hz)
Q	73.2	3.33(1H, dd, 9.4, 9.0Hz)
R	72.1	3.74(1H, dd, 9.4, 3.4Hz)
S	72.0	3.41(1H, dq, 9.0, 6.1Hz)
T	71.9	4.21(1H, dd, 3.4, 1.7Hz)
U	17.6	0.93(3H, d, 6.1Hz)

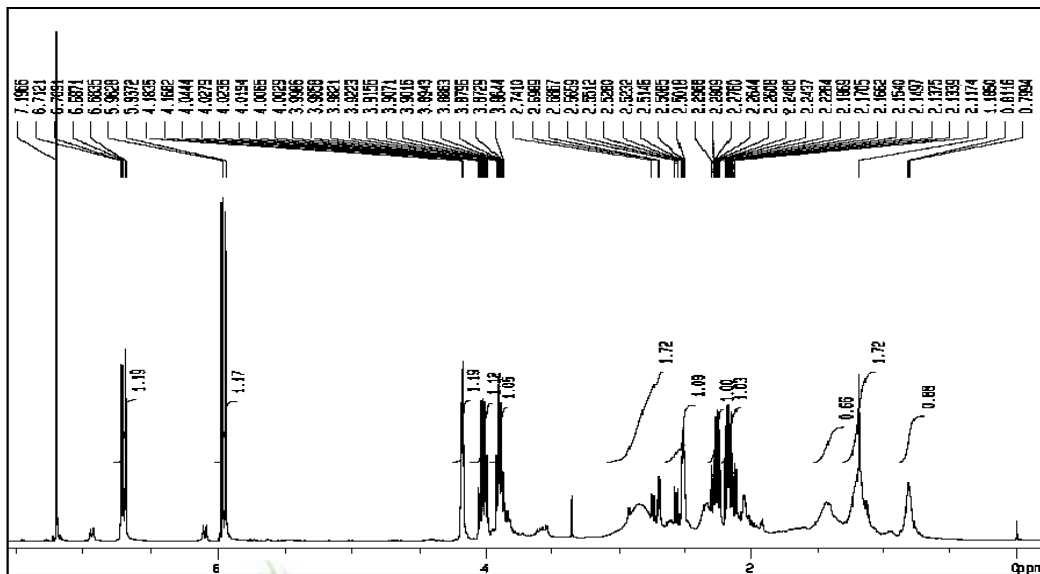
$^1\text{H-NMR}$: 400MHz in CD_3OD , $^{13}\text{C-NMR}$: 100MHz in CD_3OD .

5) fr. 4-1-2'의 구조분석 - $^1\text{H-NMR}$ 을 확인한 결과 6.70(1H, d, $J=10.28$ Hz)ppm, 5.95(1H, d, $J=10.28$ Hz)ppm에서 나타나는 signal로 보아 육각 고리 내에 있는 Sp^2 혼성구조를 이루고 있는 수소가 존재함을 알 수 있었고, 4.17(1H, d, $J=4.88$ Hz)ppm, 4.02(1H, dt, $J=8.3, 6.6$ Hz)ppm, 3.99(1H, dt, $J=8.3, 6.4$ Hz)ppm에서 나타나는 signal들은 Sp^3 혼성구조에 전기음성도가 큰 O원자가 붙어있는 경우에 나타나는 Sp^3 혼성구조의 수소들임을 알 수 있었다. 그리고, 2.71(1H, dd, $J=16.8, 4.6$ Hz)ppm, 2.53(1H, dd, $J=17.1, 5.6$ Hz)ppm, 2.26(1H, dq, $J=8.1, 6.4$ Hz)ppm, 2.15(1H, dq, $J=8.3, 6.6$ Hz)ppm의 signal로 보아 Sp^3 혼성구조의 탄소가 Sp^2 혼성구조의 탄소와 결합되어 있는 경우에 나타나는 Sp^3 혼성구조의 수소들이 있음을 알 수 있었다(Figure 29, Table 4). $^{13}\text{C-NMR}$ 을 확인한 결과 탄소수가 12개라고 예상되어졌고, 196.6ppm에서 작은 intensity의 signal이 나타나는 것으로 보아 carbonyl이 존재함도 알 수 있었다. 147.7ppm, 128.9ppm에서 나타나는 signal들은 육각 고리 내에 있는 Sp^2 혼성구조의 탄소임을 알 수 있었고, 66.3ppm, 40.2ppm, 39.6ppm의 signal들은 Sp^3 혼성구조에 전기음성도가 큰 O원자가 붙어있는 경우에 나타나는 것임도 예상할 수 있었다(Figure 30, Table 4). DEPT 기법으로 확인한 결과 1개의 carbonyl과 3개의 CH_2 및 3개의 CH와 1개의 4차탄소가 있음을 알 수 있었지만, 몇차탄소인지 파악이 어려운 것도 4개가 있었다(Figure 31, Table 4). HETERO cosy로 각각의 탄소들에 직접 결합되어있는 수소들을 확인한 결과 각 탄소들의 position을 임의로 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 기준으로 carbonyl 탄소부터 알파벳 대문자 순으로 나타내었고 각 탄소에 결합되어있는 수소들은 소문자로 나타내었다(Figure 32, Table 4). HOMO cosy로 각 수소들간의 coupling을 확인한 결과 b-c, d-i, d-i', g-g', g-l, g-l', g'-l, g'-l', i-i', l-l'사이에 coupling이 일어남을 알 수 있었다(Figure 33).

이상과 같은 결과로부터 Figure 34와 같은 fragmentation 구조를 확인할 수 있었다. 그러나, 분리된 물질의 순도가 만족할만한 수준이 아니어서 전체적인

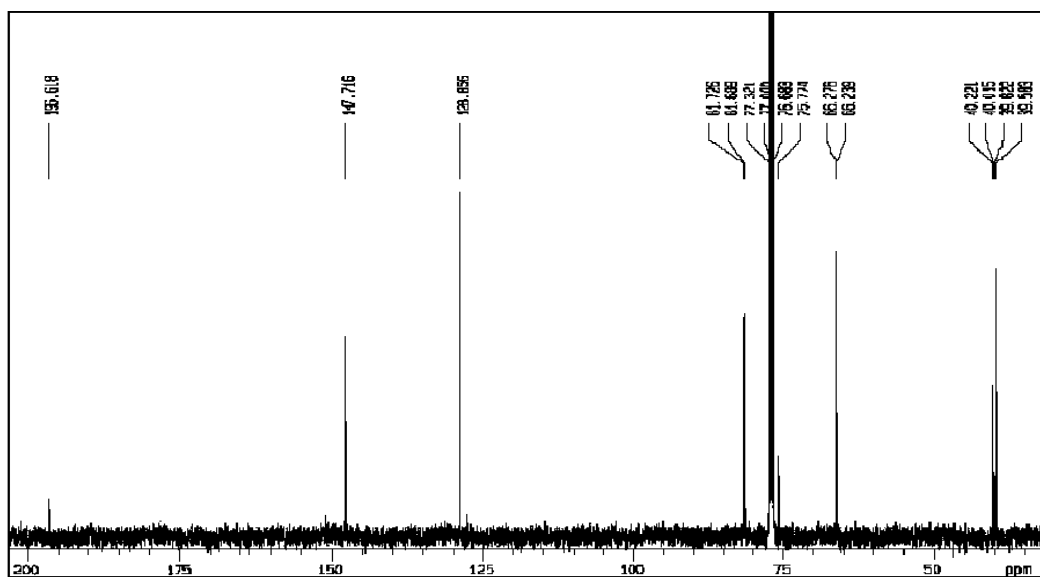
구조의 파악은 불가능하였다. 현재 fr. 4-1-2'을 더욱 순수하게 얻기 위한 과정이 진행 중에 있다.

iii



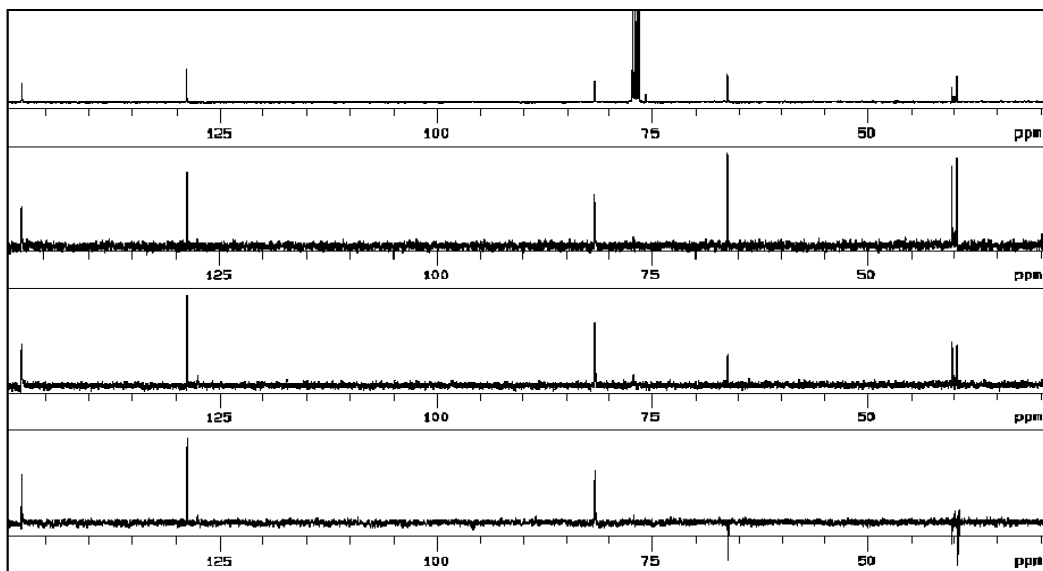
¹H-NMR : 400MHz in CDCl₃

Figure 29. ¹H-NMR spectrum of fr. 4-1-2'



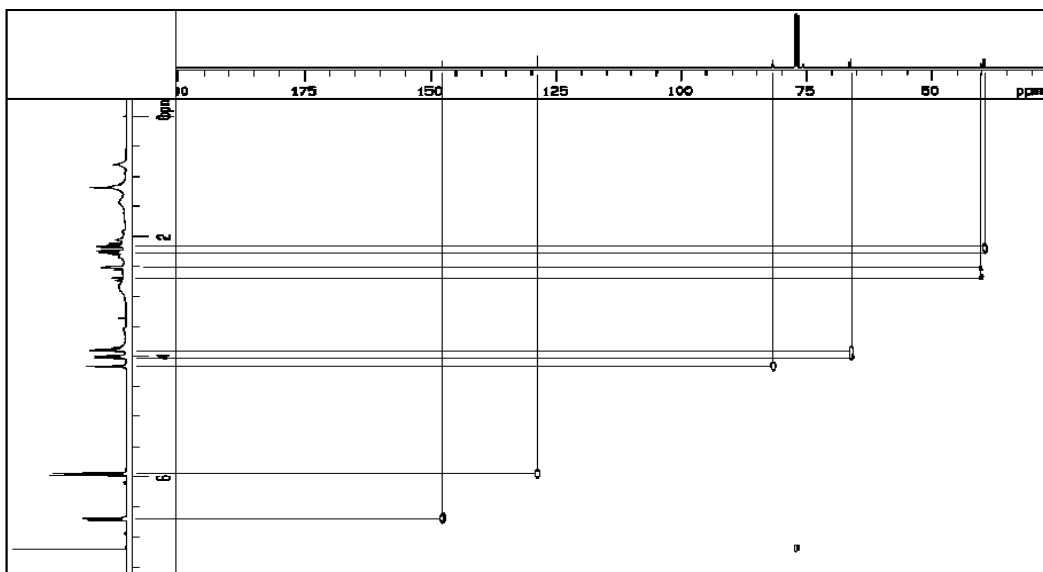
¹³C-NMR : 100MHz in CDCl₃

Figure 30. ¹³C-NMR fr. 4-1-2'



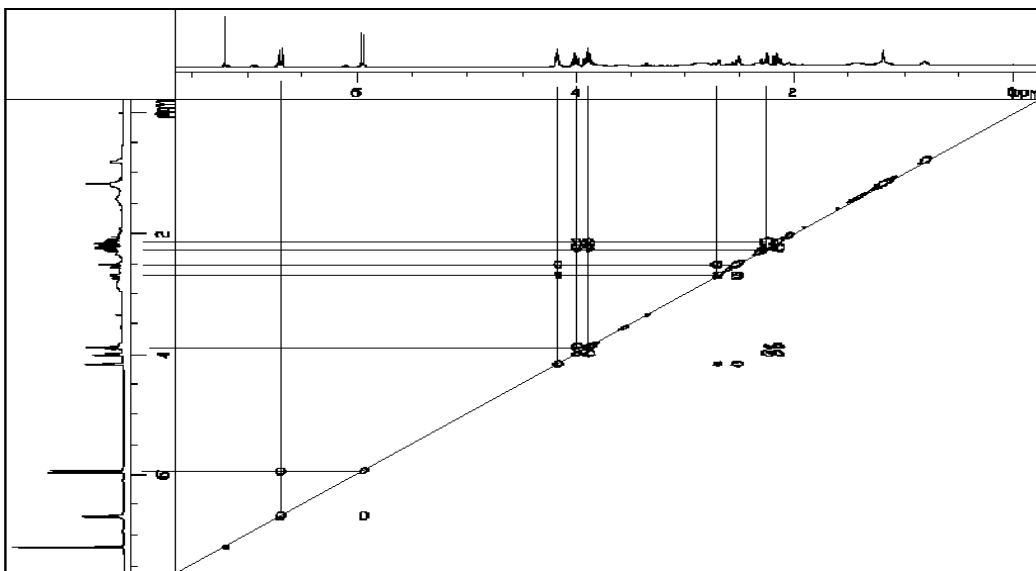
$^1\text{H-NMR}$: 400MHz in CDCl_3 , $^{13}\text{C-NMR}$: 100MHz in CDCl_3

Figure 31. DEPT of fr. 4-1-2'



$^1\text{H-NMR}$: 400MHz in CDCl_3 , $^{13}\text{C-NMR}$: 100MHz in CDCl_3

Figure 32. HETERO cosy of fr. 4-1-2'



¹H-NMR : 400MHz in CDCl₃

Figure 33. HOMO cosy of fr. 4-1-2'

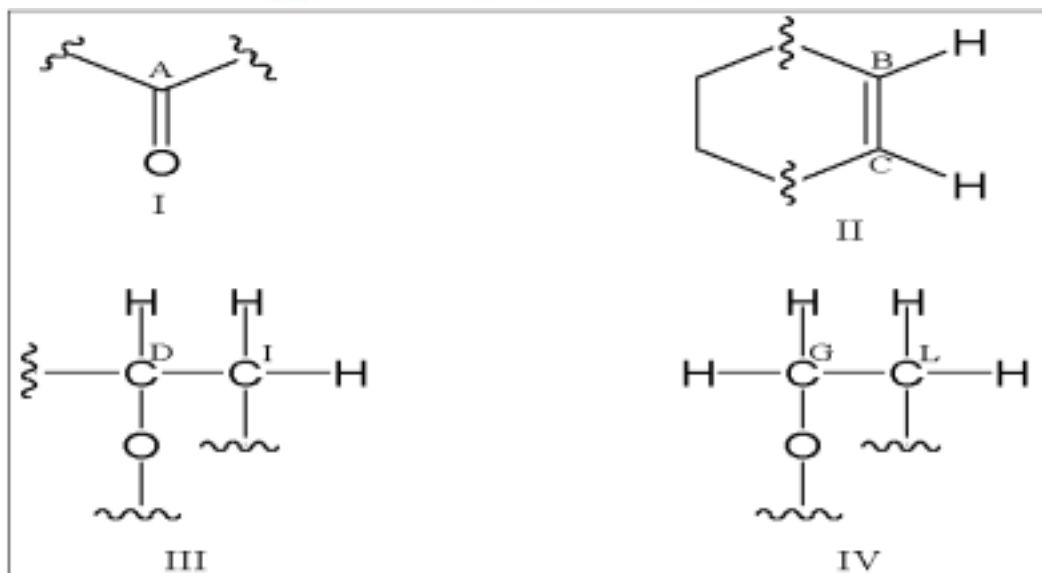
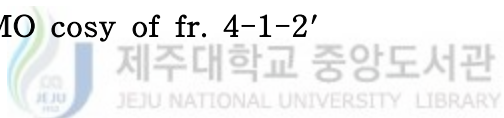


Figure 34. Fragmentation structure of fr. 4-1-2'

Table 4. NMR data of fr. 4-1-2'

position	$\delta^{13}\text{C}$	δ^{H} (multi, J/Hz)	비고
A	196.6		carbonyl
B	147.7	6.70(1H, d, 10.28Hz)	CH
C	128.9	5.95(1H, d, 10.24Hz)	CH
D	81.7	4.17(1H, d, 4.88Hz)	CH
E	81.6		
F	75.7		4차 탄소
G	66.3	4.02(1H, dt, 8.3, 6.6Hz) 3.99(1H, dt, 8.3, 6.4Hz)	CH ₂
H	66.2		
I	40.2	2.71(1H, dd, 16.9, 4.6Hz) 2.53(1H, dd, 17.1, 5.9Hz)	CH ₂
J	40.0		
K	39.8		
L	39.6	2.26(1H, dq, 8.1, 6.4Hz) 2.15(1H, dq, 8.3, 6.6Hz)	CH ₂

¹H-NMR : 400MHz in CDCl₃, ¹³C-NMR : 100MHz in CDCl₃

HOMO cosy correlation : b-c, d-i, d-i', i-i', g-l, g-l', g'-l, g'-l', g-g', l-l'

6) fr. 4-1-8에 대한 암세포 증식 억제효과 - 순수하게 분리된 fr. 4-1-8을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용하여 HL-60세포를 처리한 후, MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도를 측정함으로써 HL-60세포의 세포 증식에 따른 대사활성을 확인하였다. 그 결과, fr. 4-1-8에서 HL-60세포의 세포 증식을 억제하는 효과가 현저하게 감소했음을 확인할

수 있었다.(Figure 35). 그러나, HL-60세포에 대해 apoptosis를 유도하는지를 확인하기 위해 apoptosis 유도에 의하여 나타나는 현상중 하나인 DNA 단편화 현상을 관찰한 결과는 fr. 4-1-8에서 DNA 단편화 현상이 또렷하게 가장 잘 나타남을 확인할 수 있었다(Figure 36). 이러한 결과로 볼 때 fr. 4-1-8이 MTT assay에 의한 HL-60세포의 세포증식억제효과가 떨어지게 나타난 것은 순수하게 분리되기 전에는 다른 성분들에 의한 세포증식억제효과들이 기여한 것으로 여겨지며, 또렷한 DNA단편화 현상을 보인 것은 fr. 4-1-8이 HL-60세포에 대하여 apoptosis를 유도하는 물질임을 알 수 있게 해주었다.

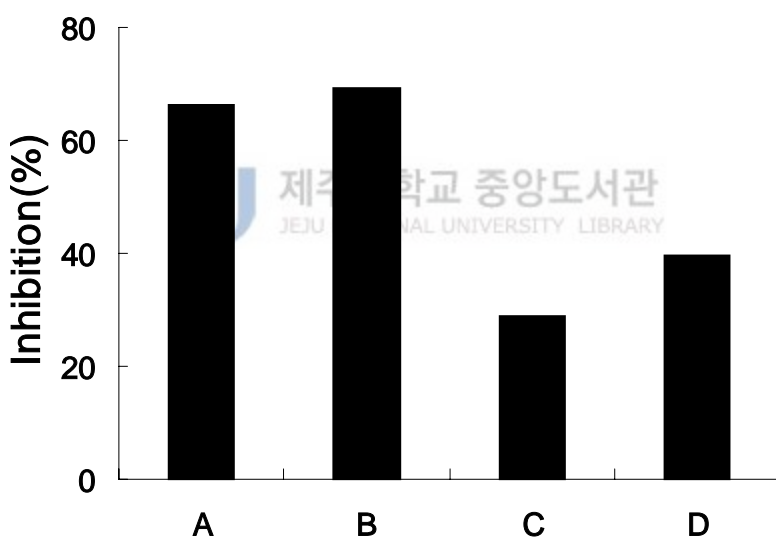


Figure 35. Inhibitory effect of fr. 4-1-8 of *Eurya emarginata* on the growth of HL-60 cells

- A : treatment of 80% MeOH Ext. ,
- B : treatment of EtOAc Ext.
- C : treatment of fr. 4-1-8(100 μ g/ml)
- D : treatment of fr. 4-1-8(200 μ g/ml)

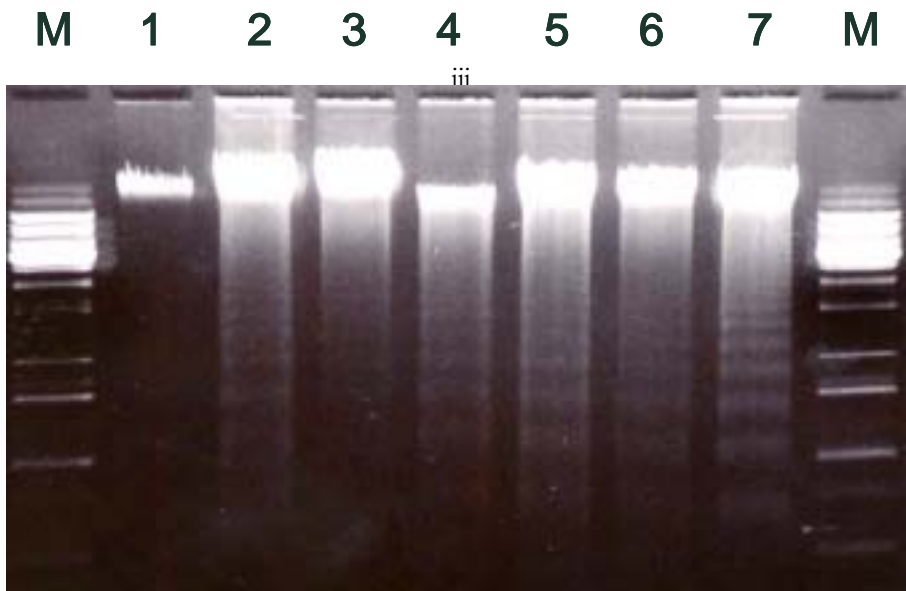


Figure 36. DNA fragmentation by fr. 4-1-8 of *Eurya emarginata* in HL-60 cells

Lane M : 1 Kb DNA ladder size maker, Lane 1 : control ,
 Lane 2 : 80% MeOH Ext. , Lane 3 : Hexane Ext. ,
 Lane 4 : EtOAc Ext. , Lane 5 : n-Butanol Ext. ,
 Lane 6 : H₂O Ext. , Lane 7 : fr. 4-1-8

IV. 결론

iii

80% 메탄올 추출물과 각각의 용매분획들을 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용하여 HL-60세포를 처리한 후, MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도를 측정함으로써 HL-60세포의 세포 증식에 따른 대사활성을 확인하였다. 그 결과, 80% 메탄올 추출물과 EtOAc층에서 HL-60세포의 세포 증식을 현저히 억제시킴을 알 수 있었다. 또한, 이러한 HL-60세포의 세포 증식에 대한 억제효과가 apoptosis 유도에 의한 것인지 확인하기 위해 apoptosis 유도에 의하여 나타나는 현상중 하나인 DNA 단편화 현상을 관찰하였다. 80% 메탄올 추출물과 각각의 용매분획들을 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후 12시간 뒤에 DNA 단편화 현상을 관찰한 결과, EtOAc층에서 DNA 단편화 현상이 가장 잘 나타남을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 우묵사스레피의 EtOAc분획이 나타내는 HL-60세포의 세포 증식 억제효과가 HL-60세포의 apoptosis 유도에 의한 것임을 알 수 있었다. 그중에서 가장 활성이 잘 나타난 EtOAc-fr.3, 4, 5, 6 가운데 EtOAc-fr.4을 가지고 활성성분들을 분리하였으며 그 결과 Normal-phase column chromatography로 10개의 fraction을 얻을 수 있었고, Prep TLC로는 7개의 fraction을 얻을 수 있었다. 이렇게 얻어진 각각의 fraction들을 NMR기기로 확인한 결과 fr. 4-1-8과 fr. 4-1-2'이 순수하게 분리된 것으로 보여졌다. fr. 4-1-8은 MASS, UV, IR, NMR 기기를 사용하여 구조분석을 시도한 결과 3,3',4',5,7-Pentahydroxy-flavon고리에 Rhamnose고리가 결합되어 있는 배당체로 Quercitrin이라는 물질임을 알 수 있었고(Figure 26), fr. 4-1-2'의 경우에는 양이 적어 UV, IR, MASS에 의한 확인은 못하였으며 NMR에 의해 확인한 결과 몇가지 fragmentation구조들을 확인할 수 있었다(Figure 34).

순수하게 분리된 fr. 4-1-8에 대하여 MTT assay에 의한 HL-60세포의 세

포 증식에 따른 대사활성을 확인한 결과 HL-60세포의 세포 증식을 억제하는 효과는 상당히 많이 떨어져 있음을 확인할 수 있었다. 그러나, apoptosis 유도에 의하여 나타나는 현상중 하나인 DNA 단편화 현상을 관찰한 결과 DNA 단편화 현상이 아주 뚜렷하게 나타나는 것으로 보아 fr. 4-1-8이 MTT assay에 의한 HL-60세포의 세포증식억제효과가 떨어진 것은 순수하게 분리되기 전에는 다른 성분들에 의한 세포증식억제효과들이 함께 기여한 것으로 여겨지며, 뚜렷한 DNA단편화 현상을 보인 것은 fr. 4-1-8이 HL-60세포에 대하여 apoptosis를 유도하는 물질임을 알 수 있게 해주었다.

우묵사스레피의 EtOAc층 가운데 아직 MTT assay에 의한 활성이 좋은 fraction들이 3개나 남아있기 때문에 충분히 MTT assay에 의한 활성이 좋은 성분들을 분리해낼 수 있는 가능성은 충분하다고 보이며, Quercitrin역시 생리활성으로는 강심작용, 모세혈관 강화작용 및 이뇨작용등이 연구되어 알려져 있을 뿐 항암활성에 대한 문헌을 찾기 어려운 것으로 보아 Quercitrin에 대한 항암활성 연구는 가능성이 충분하다고 보인다.

fr. 4-1-2'의 경우에는 그 양을 좀더 얻기 위한 분리과정과 함께 UV, IR, MASS 및 다양한 NMR기법들을 통한 계속적인 구조분석이 필요하며 MTT assay에 의한 HL-60세포의 세포증식억제효과와 apoptosis를 유도하는 물질인지를 확인하는 항암활성Test도 거쳐야 할 것이다. 더불어 기존의 알려진 항암물질들과의 비교를 통해 이미 알려져 있는 기존의 물질인지 아니면 새로운 물질인지 확인하는 과정도 필요하다.

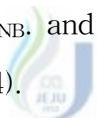
V. 참고문헌

iii

1. Khwaja, T. A., Dias, C. B., and Pentecost, S. : Recent studies on the anticancer activities of mistletoe (*Viscum album*) and its alkaloids, *Oncology*, 43, 42-50(1986)
2. Jung, M. L., Baudino, S., Ribereau-Gayon, G., and Beck, J. P. : Characterization of cytotoxic proteins from mistletoe(*Viscum album L.*), *Cancer Lett.*, 51, 103-108(1990)
3. Park WB, Ju YJ, and Han SK : Isolation and characterization of β -galactoside specific lectin from korean mistletoe (*Viscum album var. coloratum*) with lactose-BS-A-Sepharose 4B in changes of lectin conformation, *Arch. Pharm. Res.*, 21, 429-435(1998)
4. Krauspenhaar R, Eschenburg S, Perbandt M, Kornilov V, Kornareva N, Mikailova I, Stoeva S, Wacker R, Maier T, Sinh T, Mikhailor A, Voelter W, Betzel C : Crystal structure of mistletoe lectin I from *Viscum album*, *Biochem, Biophys. Res. Commun.*, 257, 418-424(1999)
5. Mockel, B., Schwarz, T., Zinke. H., Eck, J., Langer, M., and Lentzen, H. : Effects of mistletoe lectin 1 on human blood cell lines and peripheral blood cells Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines, *Arzneimittelforschung*, 47, 1145-1151(1997)
6. 조은주, 이숙희, 이선미, 박건영 (1997) 김치 분획물의 In vitro 항돌연변이 및 항암효과. *Journal of Korean Association of Cancer Prevention* 2: 113-121
7. 김경하, 정대영, 민태진, 박시원 (1999) 황해쑥(*Artemisia argyi*)의 H9(AT CC HTB176)세포에 대한 세포독성 및 항산화효소 활성. 약학회지 제43권

제5호 598-605

8. 최영현, 이수재, 김민, Lijuan Zhang, 이원호, 박건영 (1998) 인체 암세포 주 에서 Genistein에 의한 세포분열 억제 및 Apoptosis 유발. *J Korean Cancer Assoc* 30(4): 800-808
9. 하재청, 최은상, 류태형, 양한석, 박건영 (1991) Sarcoma 180에 대한 약용 식물 성분의 항암효과. *Journal of Korean Cancer Association* 23, 2
10. 박수영, 강희경 (2000. 12) HL-60 세포의 성장에 대한 제주자생 식물체의 효과. *Cheju Journal of Life Science*, Vol.3.No.3 : 85-94
11. 강삼식, 손건호 (2000. 11. 30) 천연물성분 구조결정법. 서울대학교 출판부, 585-740pp
12. Morita, N., Shimizu, M., Arisawa, M., Koshi, M., Kubo, Y. : Studies on Medical Resources. XXXIV. The Constituents of Genus *Eurya*. (1). *E. japonica* THUNB. and *E. emarginata* MAKINO, *Yakugaku Zasshi*, 94, 872-874 (1974).



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY