

독활의 세포독성 폴리아세틸렌 성분

박신영 · 김진웅*

서울대학교 약학대학

(Received November 9, 1995)

Cytotoxic Polyacetylenes from *Aralia cordata*

Shin-Young Park and Jinwoong Kim*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract - An *n*-hexane extract of the roots of *Aralia cordata* Thunb. (Araliaceae) was found to show significant *in vitro* cytotoxic activity against P388D₁ lymphocytic leukemia cell in culture. Bioactivity-directed fractionation of this extract led to the isolation of four polyacetylenes, faltarindiol (1), dehydrofaltarindiol (2), faltarindiol-8-acetate (3) and dehydrofaltarindiol-8-acetate (4). Cytotoxicity of compounds 1 and 3 was found to be better than that of compounds 2 and 4 when these compounds were tested against eight *in vitro* tumor cell lines, namely, A549, HCT15, DLD1, MCF7, SKOV3, HL60, K562 and P388D₁. The fact that the cytotoxicity of compounds 1 and 3 against series of tumor cell lines was much stronger than that of compounds 2 and 4 suggested that the saturated carbon chain at the terminal and the hydroxyl group at the C-3 are important for the activities. The requirement for the activity was further confirmed by synthesizing and assaying the acetate derivatives of compounds 1 and 2.

Keywords □ *Aralia cordata*, cytotoxicity, faltarindiol, dehydrofaltarindiol, faltarindiol-8-acetate, dehydrofaltarindiol-8-acetate.

독활(獨活, *Aralia cordata* Thunb.)은 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 다년초로서 전국 산지의 그늘에서 야생 또는 재배되고 있는 식물이다.¹⁾ 독활(獨活)은 이 식물의 근경 및 근이며 가을에서 다음 해 봄 사이에 채취, 햇볕에 건조하여 거풍(祛風), 화혈(和血), 발한(發汗), 지통(止痛), 이뇨(利尿); 소종(消腫) 등의 목적으로 사용하여 왔다.^{2,3)} 독활의 성분으로는 α -pinene, β -pinene, sabinene 등의 정유 성분⁴⁾과 diterpene acid인 *ent*-kaur-16-en-19-oic acid와 *ent*-pimara-8(14), 15-diene-19-oic acid⁵⁻⁶⁾, 그리고 15-hydroxy-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid가 보고되었고⁹⁾ 또한 지상부에서 oleanane type의 triterpenoid saponin인 udosaponin A, B, C, D, E, F가 분리 보고되었으며¹⁰⁾, ferulic acid와 caffeic acid¹¹⁾, anthocyanin glycoside

인 cyanidin 3-(*O*- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside)¹²⁾, *ent*-pimara-8(14), 15-dien-19-ol⁹⁾이 분리되었다.

본 실험실에서는 천연에서 우수한 항암제 개발을 위한 기초단계 연구로서 PS system (P388D₁ murine lymphocytic leukemia cell culture system)을 이용하여 40종 생약의 세포독성을 검색한 바 있다.¹³⁾ 그 중에서 독활의 *n*-hexane 엑스가 활성을 나타내어 유효성분 분석에 착수하였다. 그 결과 4종의 화합물을 분리하여 구조를 규명하였으며 8종의 암세포주 (A549, HCT15, DLD1, MCF7, SKOV3, P388D₁, K562, HL60)에 대한 *in vitro* 세포독성을 조사하였다. 생존 세포수 측정법으로는 MTT와 SRB assay법을 이용하였다. 이 두가지 assay방법은 모두 세포수와 흡광도의 상관계수가 1에 가깝고, 거의 유사한 결과를 보여주므로^{14, 15)} 어떠한 방법을 이용하여도 무방하나 각각 장단점을 가지므로 이를 고려하여 monolayer cell (A549, HCT15, DLD1,

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7853 (팩스) 02-888-0649

MCF7, SKOV3)의 경우는 반응이 안정하고 단백질의 양을 측정하는 SRB assay를, suspension cell (HL 60, K562, P388D₁)의 경우는 상대적으로 단시간에 결과를 얻을 수 있고 mitochondria dehydrogenase의 활성을 측정하는 MTT assay를 이용하였다.

실험방법

재료 - 독활(*Aralia cordata* Thunb.)은 1993년 5월에 경동시장에서 구입하여 서울대학교 한대석 명예 교수님으로부터 감정을 받은 후 사용하였다.

세포주 - P388D₁, A549, HCT15 세포주는 한국 화학연구소에서, MCF7은 한국 과학기술원 유전공학센터에서, K562, HL60, SKOV3, DLD1은 서울대 암연구소에서 각각 분주 받았다.

시약 - Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Media 1640과 penicillin-streptomycin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)의 제품을, Hank's balanced salt solution (HBSS), trypsin-EDTA, gentamycin, calf serum, fetal calf serum은 GIBCO Lab. (Grand Island, NY)의 제품을 사용하였다. Cell viability assay에 필요한 MTT와 SRB, trizma base, DMSO는 Sigma Chemical Co. 제품을, TCA는 Showa Chemicals Inc.에서 구입하였다. 식물재료 추출과 컬럼 크로마토그래피용 용매는 공업용을 1차 증류하여 사용하였고 그 외에는 분석용 1급 시약을 사용하였다.

기기 - FT-IR spectrum은 Perkin Elmer 1710 spectrophotometer, NMR spectrum은 JEOL GSX 400 spectrometer (400 MHz)와 Varian VXR 200 spectrometer (200 MHz), Mass spectrum은 VG Trio-2 spectrometer, UV spectrum은 Shimadzu 2100을 각각 사용하여 측정하였으며, MTT, SRB assay에서의 흡광도는 Flow Lab. Multiskan MCC/340 MKII Elisa reader로 측정하였다.

세포배양 - P388D₁, A549, HCT15, MCF7, K562 세포주는 5% heat-inactivated calf serum이, DLD 1, SKOV3, HL60 세포주는 5% heat-inactivated fetal calf serum이 포함된 RPMI 1640 media에서 37°C, 5% CO₂, 100% relative humidity의 조건에서 배양하였다. 각 세포주에 따라 2~6일마다 계대배양을 실시하였으며 P388D₁, K562, HL60을 제외한

monolayer 형성 세포주는 0.05% trypsin-EDTA 액으로 cell dissociation 하였다.

ED₅₀의 결정 - NCI가 제시한 방법에 따라 시행하였다.¹⁶⁾ 시료는 소량의 DMSO에 녹여 media로 단계별로 희석하여 5개 이상의 농도로 만들었으며 DMSO 최종 농도는 0.25%를 넘지 않도록 하였다. 시료의 최종농도는 최고 100 µg/ml로 하였다. Log phase에 있는 세포를 예비실험에서 정한 세포 농도로 맞춘 후, 세포 배양액을 100 µl씩 96 well microtiter plate에 넣고 24시간 배양하였다. 그 다음 시료를 포함한 media를 100 µl씩 quadruplicate로 넣고 48시간 동안 반응시킨 다음 MTT나 SRB assay를 실시하였다. Positive control로써 adriamycin을 사용하였다.

MTT assay¹⁷⁻²⁰⁾ - MTT용액 (5 mg MTT/ml PBS와 serum free media를 2 : 3의 비율로 혼합) 일정량을 각 well에 넣고 4시간 동안 반응시켰다. 2000 rpm에서 20분간 원심분리하여 생성된 formazan을 well plate 바닥에 가라 앉힌 후 배지를 재빠른 동작으로 쏟아버렸다. DMSO를 가하여 formazan을 용해시키고 540 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

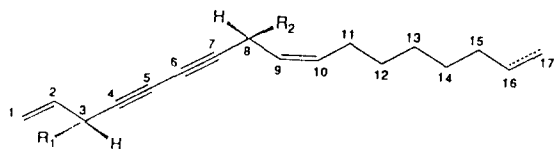
$$\text{저해율\%} = \frac{\text{흡광도(대조군)} - \text{흡광도(시료)}}{\text{흡광도(대조군)}} \times 100$$

SRB assay^{15,21)} - 반응이 끝난 plate의 각 well에 50% TCA를 50 µl씩 넣어준 후 4°C에서 1시간 방치하여 세포를 고정시키고 증류수로 5회 세척한 후 공기중에서 건조시켰다. 각 well에 0.4% SRB (wt./vol. in 1% acetic acid) 용액을 100 µl씩 넣어 30분간 반응시킨 후 1% acetic acid로 5회 세척하였고 다시 공기중에서 건조시켰다. 고정세포에 붙어있는 SRB를 10 mM trizma base (pH 10.5)로 용출시켜 515 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 각 plate에는 대조군과 함께 back ground level (media 자체내의 protein에 의한 흡광도)을 결정하기 위해 media도 포함시켰다.

$$\text{저해율\%} =$$

$$\frac{[\text{흡광도(대조군)} - \text{흡광도(background)}] - [\text{흡광도(시료)} - \text{흡광도(background)}]}{\text{흡광도(대조군)} - \text{흡광도(background)}} \times 100$$

추출 및 분리 - 독활 2.5 kg을 MeOH로 3회 초음파 추출하여 MeOH 엑스 340 g을 얻었다. 이 MeOH 엑스



- Compound 1 : R₁ = OH R₂ = OH
- Compound 2 : R₁ = OH R₂ = OH 16,17 = double bond
- Compound 3 : R₁ = OH R₂ = OCOC₂H₅
- Compound 4 : R₁ = OH R₂ = OCOC₂H₅ 16,17 = double bond
- Compound 1a : R₁ = R₂ = OCOC₂H₅
- Compound 2a : R₁ = R₂ = OCOC₂H₅ 16,17 = double bond

를 10% MeOH/H₂O에 현탁시킨 후 *n*-hexane, CHCl₃, BuOH로 순차적으로 분획하여 *n*-hexane 분획물 88 g, CHCl₃ 분획물 6 g, BuOH 분획물 40 g 및 H₂O 분획물 216 g을 얻었다. 각 분획물에 대하여 P388D₁ 세포주에 대한 세포독성을 측정 한 결과 *n*-hexane 분획물이 활성을 나타내어(ED₅₀=48.5 μg/ml) silica gel column chromatography (이하 cc로 표현)(*n*-hexane : EtOAc=30 : 1)하여 5개의 소분획으로 나누었으며(F1-F5) 각각의 세포독성을 측정하였다. 그 가운데 활성이 나타난 F3 (2.6 g, ED₅₀=22.7 μg/ml)을 silica gel cc(*n*-hexane : CHCl₃ : acetone =5 : 1 : 0.1)를 실시하여 4개의 분획(F9-F12)으로 나누었다. 이 중 F11 (0.4 g)에 대하여 vacuum cc (*n*-hexane : acetone=40 : 1)를 실시하여 미황색의 액상 물질인 compound 1 70 mg, compound 2 40 mg을 각각 얻었다. 또한 F2 (10.2 g, ED₅₀=65.9 μg/ml)는 silica gel cc (CHCl₃)하여 3개의 분획(F6-F8)으로 나누고 이 중 F8 (5 g)을 다시 silica gel cc (*n*-hexane : CHCl₃=1 : 1)하여 4개의 분획(F13-F16)으로 나누고 F14 (1.1 g)에 대하여 vacuum cc (*n*-hexane : acetone=40 : 1)를 실시하여 3개의 분획(F17-F19)을 얻었다. F18 (120 mg)을 Lobar cc (RP-8, H₂O : MeOH=100 : 0→0 : 100)하여 미황색의 액상 물질인 compound 3 35 mg과 compound 4 75 mg을 각각 얻었다.

Compound 1 - UV (CHCl₃) λ_{max} nm (log ε) : 285 (2.71), 268 (2.85), 257 (2.96), 224 (3.10); IR ν_{max} (neat, cm⁻¹) : 3300 (OH), 2260, 2160 (C≡C), 1650 (C=C) ; MS (EI, 30 eV, *m/z*, rel. int.) : 260 (M⁺, missing), 185 (3.0), 175 (allylic fission, 6.0), 157 (19.5), 129 (28.2), 105 (19.2), 91 (39.6), 72 (64.7), 59 (100); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ

Table I—¹³C-NMR chemical shifts of compounds 1-4

Carbon No.	1	2	3	4
1	117.35 t	117.29 t	117.30 t	117.32 t
2	135.77 d	135.82 d	135.70 d	135.68 d
3	63.49 d	63.47 d	63.39 d	63.38 d
4	79.84 s	79.85 s	78.50 s	78.54 s
5	70.28 s	70.28 s	70.06 s	70.04 s
6	68.68 s	68.73 s	69.20 s	69.24 s
7	78.20 s	78.30 s	76.44 s	76.39 s
8	58.58 d	58.59 d	60.07 d	60.06 d
9	127.63 d	127.81 d	123.67 d	123.77 d
10	134.70 d	134.48 d	136.42 d	136.25 d
11	27.67 t	27.62 t	27.82 t	27.72 t
12	31.77 t	29.69 ^{b)} t	31.75 t	28.58 ^{d)} t
13	29.08 ^{a)} t	28.68 ^{b)} t	27.85 ^{c)} t	28.64 ^{d)} t
14	29.14 ^{a)} t	29.08 ^{b)} t	29.05 ^{c)} t	28.90 ^{d)} t
15	29.25 ^{a)} t	33.63 t	29.07 ^{c)} t	33.64 t
16	22.61 t	114.33 d	22.59 t	114.30 d
17	14.08 q	138.96 t	14.06 q	138.93 t
8-CO			169.50 s	169.53 s
8-CH ₃			20.89 q	20.88 q

a), b), c), d) interchangeable

ppm) : 5.87 (1H, ddd, *J*=16.8, 10.4, 5.2 Hz, C₂-H), 5.50 (2H, m, C₉-H, C₁₀-H), 5.41 (1H, d, *J*=16.8 Hz, C₁₁-H), 5.20 (1H, d, *J*=10.4 Hz, C_{1c}-H), 5.14 (1H, *J*=7.6 Hz, C₈-H), 4.87 (1H, d, *J*=5.2 Hz, C₃-H), 2.07 (2H, m, C₁₁-H₂), 1.20 (10H, s, -(CH₂)₅-), 0.81 (3H, t, *J*=6.0 Hz, C₁₇-H₃) ; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : Table I.

Compound 2 - UV (CHCl₃) λ_{max} nm (log ε) : 240 (2.98), 220 (2.56), 211 (2.53); IR ν_{max} (neat, cm⁻¹) : 3300 (OH), 2250, 2150 (C≡C), 1650 (C=C) ; MS (EI, 30 eV, *m/z*, rel. int.) : 258 (M⁺, missing), 175 (allylic fission, 8.0), 129 (20), 72 (61.3), 59 (100); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 5.87 (1H, ddd, *J*=17.2, 10.4, 5.2 Hz, C₂-H), 5.74 (1H, ddt, *J*=17.2, 10.4, 6.4 Hz, C₁₆-H), 5.50 (2H, m, C₉-H, C₁₀-H), 5.29 (1H, d, *J*=17.2 Hz, C₁₁-H), 5.19 (1H, d, *J*=10.4 Hz, C_{1c}-H), 5.14 (1H, d, *J*=8.0 Hz, C₈-H), 4.93 (1H, d, *J*=17.2 Hz, C_{17c}-H), 4.90 (1H, d, *J*=5.2 Hz, C₃-H), 4.89 (1H, d, *J*=10.4 Hz, C_{17c}-H), 2.04 (4H, m, C₁₁-H₂, C₁₅-H₂), 1.19 (6H, s, -(CH₂)₃-); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : Table I.

Compound 3 - UV (CHCl₃) λ_{max} nm (log ε) : 286 (3.22), 271 (3.29), 255 (3.29), 240 (3.35); IR ν_{max} (neat, cm⁻¹) : 3320 (OH), 2260, 2150 (C≡C),

Table II—Cytotoxic activity of compounds 1-4, 1a and 2a

Cell line	ED ₅₀ ^a					
	1	2	3	4	1a	2a
P388D ₁	3.5	8.5	3.7	8.5	8.6	5.4
K562	26	46	32	50	>100	36
HL60	5.7	20	7.3	9.8	20	15
A549	43	>100	42	>100	>100	60
HCT15	18	34	28	43	34	31
DLD1	8.9	33	13	29	35	23
MCF7	18	30	16	82	55	29
SKOV3	44	67	48	77	67	>100

a: 단위는 µg/ml

1747 (C=O), 1682, 1652 (C=C), 1220 (C-O); MS (EI, 30 eV, *m/z*, rel. int.): 302 (M⁺, 10.0), 217 (allylic fission, 30.0), 157 (100), 129 (77.9), 115 (77.1), 91 (64.4), 77 (32.2); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 6.06 (1H, d, *J*=8.8 Hz, C₈-H), 5.84 (1H, ddd, *J*=17.2, 9.2, 5.2 Hz, C₂-H), 5.59 (1H, m, C₁₀-H), 5.39 (1H, m, C₉-H), 5.38 (1H, d, *J*=17.2 Hz, C₁₁-H), 5.17 (1H, d, *J*=9.2 Hz, C_{1c}-H), 4.85 (1H, d, *J*=5.2 Hz, C₃-H), 2.04 (2H, m, C₁₁-H₂), 1.99 (3H, s, COCH₃), 1.19 (10H, s, -(CH₂)₅-), 0.80 (3H, t, *J*=6.6 Hz, C₁₇-H₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): Table I.

Compound 4 - UV (CHCl₃) λ_{max} nm (log ε): 286 (3.36), 270 (3.45), 257 (3.45), 242 (3.50); IR ν_{max} (neat, cm⁻¹): 3310 (OH), 2220, 2180 (C≡C), 1750 (C=O), 1680, 1660 (C=C), 1230 (C-O); MS (EI, 30 eV, *m/z*, rel. int.): 300 (M⁺, 9.1), 217 (allylic fission, 9.0), 187 (30.7), 157 (100), 129 (64.8), 115 (61.4), 91 (61.4); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 6.06 (1H, d, *J*=8.8 Hz, C₈-H), 5.85 (1H, ddd, *J*=17.2, 10.4, 5.2 Hz, C₂-H), 5.72 (1H, ddt, *J*=17.2, 10.4, 6.6 Hz, C₁₆-H), 5.59 (1H, m, C₁₀-H), 5.40 (1H, m, C₉-H), 5.38 (1H, d, *J*=17.2 Hz, C₁₁-H), 5.18 (1H, d, *J*=10.4 Hz, C_{1c}-H), 4.92 (1H, d, *J*=17.2 Hz, C_{17c}-H), 4.87 (1H, d, *J*=5.2 Hz, C₃-H), 4.86 (1H, d, *J*=10.4 Hz, C_{17c}-H), 2.08 (4H, m, C₁₁-H₂, C₁₅-H₂), 1.99 (3H, s, COCH₃), 1.97 (2H, m, C₁₅-H₂), 1.2~1.3 (6H, -(CH₂)₃-); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): Table I.

Compounds 1 및 2의 acetylation - Compound 1, 2 각각 35 mg, 20 mg을 pyridine 200 µl에 녹이고 무

수초산 동량을 가하여 상온에서 1시간 방치시켰다. TLC로 반응이 완결된 것을 확인한 다음 CHCl₃을 넣고 3회 추출하여 농축하였다. 이때 CHCl₃ 층으로 이행된 pyridine을 완전 제거하기 위하여 *n*-heptane을 과량 가하였다. silica gel cc (*n*-hexane : acetone=50 : 1)를 통하여 무색의 액상 물질 compound 1a 20 mg, compound 2a 10 mg을 각각 분리하였다.

Compound 1a - IR ν_{max} (neat, cm⁻¹): 1747 (C=O), 1221 (C-O); MS (EI, 30 eV, *m/z*, rel. int.): 260 (33.0), 259 (50.0), 175 (43.2), 161 (100), 157 (75.0), 115 (42.0), 81 (67.0), 55 (54.2); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 6.05 (1H, d, *J*=9.2 Hz, C₈-H), 5.79 (2H, m, C₂-H, C₃-H), 5.60 (1H, m, C₁₀-H), 5.46 (1H, d, *J*=17.2 Hz, C₁₁-H), 5.40 (1H, m, C₉-H), 2.27 (1H, d, *J*=10.0 Hz, C_{1c}-H), 2.06 (2H, m, C₁₁-H₂), 2.02 (3H, s, OCH₃), 2.00 (3H, s, COCH₃), 1.22, (10H, s, -(CH₂)₅-), 0.80 (3H, t, *J*=6.6 Hz, C₁₇-H₃); ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 169.33 (3-C-COCH₃, 8-C-COCH₃), 136.46 (2-C), 131.87 (10-C), 123.84 (9-C), 119.67 (1-C), 76.49 (4-C), 75.05 (7-C), 70.71 (5-C), 69.10 (6-C), 64.35 (3-C), 60.02 (8-C), 31.77 (12-C), 28.94, 29.11 (13-C, 14-C, 15-C), 27.85 (11-C), 22.61 (16-C), 20.87 (3-C-COCH₃, 8-C-COCH₃), 14.08 (17-C).

Compound 2a - IR ν_{max} (neat, cm⁻¹): 1748 (C=O), 1221 (C-O); MS (EI, 30 eV, *m/z*, rel. int.): 258 (22.7), 257 (46.6), 175 (43.2), 161 (100), 157 (64.8), 115 (48.9), 81 (75.0), 55 (71.6); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 6.06 (1H, d, *J*=8.8 Hz, C₈-H), 5.71 (3H, m, C₂-H, C₃-H, C₁₆-H), 5.60

(1H, m, C₁₀-H), 5.47 (1H, d, *J*=16.0 Hz, C₁₁-H), 5.40 (1H, m, C₉-H), 5.27 (1H, d, *J*=9.2 Hz, C_{1c}-H), 4.93 (1H, d, *J*=17.2 Hz, C_{17c}-H), 4.87 (1H, d, *J*=10.0 Hz, C_{17c}-H), 2.03 (4H, m, C₅-H₂, C₁₁-H₂), 2.00 (3H, s, COCH₃), 1.98 (3H, s, COCH₃): ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 169.36 (3-C-COCH₃, 8-C-COCH₃), 138.91 (17-C), 136.31 (2-C), 131.88 (10-C), 123.76 (9-C), 119.71 (1-C), 114.30 (16-C), 76.37 (4-C), 75.22 (7-C), 70.75 (5-C), 69.22 (6-C), 64.37 (3-C), 60.03 (8-C), 33.67 (15-C), 28.65, 28.71, 28.96 (12-C, 13-C, 14-C), 27.82 (11-C), 20.83 (3-C-COCH₃, 8-C-COCH₃)

결과 및 고찰

Compound 1의 구조 - Compound 1은 미황색 유상물질로 anisaldehyde-H₂SO₄에서 흑색으로 발색하였다. IR spectrum에서 3300 (OH), 2160, 2260 (C≡C) 및 1650 (C=C) cm⁻¹에서 특징적인 band가 관찰되었다. UV spectrum은 224, 257, 268, 285 nm에서 흡수를 나타내는 것으로 보아 polyacetylene 중에서도 diene-diyne type임을 추정할 수 있었다.²¹⁾ ¹H-NMR spectrum에서 0.81 ppm의 3개의 proton에 해당하는 triplet으로부터 하나의 methyl signal과 5개의 CH₂에 해당하는 1.2 ppm 부근의 methylene signal, 5~6 ppm 사이의 olefinic proton signal이 확인되었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 17개의 carbon이 확인되었고 DEPT spectrum으로부터 68.68, 70.28, 78.20, 79.84 ppm에서 2개의 C≡C에 기인한 4개의 4급 carbon과 58.58, 63.49 ppm에서 oxygenated된 2개의 3급 carbon signal을 확인하였다. C=C에 기인된 4개의 carbon signal 중 하나는 말단 vinyl기에 해당하는 것이었고 (117.35, 135.77 ppm) 나머지 하나는 분자 내부의 이중결합에 해당하는 것이었다 (127.63, 134.70 ppm). 이로써 compound 1은 C₁₇-polyacetylene이며 한쪽 말단에는 vinyl기가 있으며 다른 한쪽은 포화되어 있고 내부에 C≡C 2개, C=C 1개, OH가 붙은 carbon이 1개 존재함을 알 수 있었다. Mass spectrum에서 *m/z* 260의 molecular ion peak는 나타나지 않았으나 *m/z* 175에서 1,9-dien-4,6-diyne polyacetylene의 특징인 allylic fission과 *m/z* 157, 129, 105, 91, 72등의 polyacetylene의 fragmentation

ion peak를 관찰할 수 있었다.²¹⁾ 이상의 기기분석 data 및 문헌치와의 비교로 compound 1은 1,9-heptadecadiene-4,6-diyne-3,8-diol인 falcarindiol로 추정하였다.²²⁾ 한편 compound 1을 pyridine과 acetic anhydride로 acetylation한 후의 ¹H-NMR spectrum을 보면 2.00, 2.02 ppm에서 2개의 acetyl signal이 관찰되었고 compound 1에서 4.87 ppm과 5.14 ppm에서 각각 나타났던 C₃-H와 C₈-H가 downfield shift하여 각각 5.79 ppm과 6.05 ppm에서 나타났다. 또한 ¹³C-NMR spectrum에서는 3-C가 63.49 ppm에서 64.35 ppm으로, 8-C가 58.58 ppm에서 60.02 ppm으로 각각 downfield shift 하고 20.87, 169.33 ppm에서 2개의 COCH₃ signal을 확인하였으며 문헌치²²⁾와 비교한 결과 falcarindiol-3,8-diacetate임을 확인하였다.

Compound 2의 구조 - Compound 2는 미황색의 유상물질로 TLC 상에서 compound 1과 거의 같은 Rf값을 가지며 anisaldehyde-H₂SO₄에 의하여 흑색으로 발색하였다. IR spectrum에서 3300 (OH), 2150, 2250 (C≡C), 1650 (C=C) cm⁻¹의 band가 보이고, UV spectrum에서 220, 240 nm의 흡수 band, 그리고 mass spectrum에서 *m/z* 175, 129, 72, 59등의 polyacetylene의 fragmentation ion peak를 관찰할 수 있었으므로 compound 1과 같은 polyacetylene계 물질임을 알 수 있었다. ¹H-NMR spectrum에서 1.19 ppm에 6개의 proton에 해당하는 methylene signal과 2.04 ppm의 multiplet으로 갈라진 2개의 methylene signal이 관찰되었고 5~6 ppm 사이에 olefinic signal이 나타났다. ¹³C-NMR과 DEPT spectrum으로부터 이 물질은 탄소수 17개의 polyacetylene이며 compound 1과 같이 2개의 C≡C (68.73, 70.28, 78.30, 79.85 ppm), 2개의 oxygenated carbon (58.59, 63.47 ppm)이 존재하나, 다른 점은 이중결합의 수가 2개에서 3개로 증가하였고 40 ppm보다 고자장 부분에서의 methylene signal이 5개로 1개가 줄었으며 methyl signal이 없어졌다는 점이다. 따라서 이 물질은 양쪽 말단이 모두 불포화 되어 있고 2개의 OH, 2개의 C≡C를 가진 물질이라 추정하였다. Compound 1의 ¹³C-NMR data와 비교해 본 결과 16-C와 17-C가 114.33, 138.96 ppm으로 탄화수소 chain의 말단이 불포화 되었을 때의 전형적인 signal pattern을 가지므로²³⁾ 이상의 기기분석 결과로 compound 1은 1,9,16-

heptadecatriene-4,6-diyne-3,8-diol 즉 dehydrofalcariindiol로 추정하였다. 한편 compound 2를 pyridine과 acetic anhydride로 acetylation시켜 compound 2a를 얻었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 보면 1.98, 2.00 ppm에서 2개의 acetyl signal이 관찰되었고 $\text{C}_3\text{-H}$ 와 $\text{C}_8\text{-H}$ 가 downfield shift 하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 보면 20.83, 169.36 ppm에서 2개의 acetyl기 carbon이 중복되어 나타나고 3-C와 8-C가 각각 0.90, 1.44 ppm씩 downfield shift하여 나타났으며 4-C, 9-C가 약간씩 upfield shift 하였다. 이상의 결과로부터 compound 2a는 dehydrofalcariindiol-3,8-diacetate임을 확인하였다.

Compound 3의 구조 - Compound 3은 미황색의 유상물질로 anisaldehyde- H_2SO_4 에 의하여 흑색으로 발색되었다. UV spectrum과 IR spectrum을 볼 때 이 물질 역시 diene-diyne type의 polyacetylene임을 짐작하였다. IR spectrum에서 3320 (OH), 2150, 2260 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1652, 1682 ($\text{C}=\text{C}$) cm^{-1} 의 band외에 1747 cm^{-1} 에서 $\text{C}=\text{O}$, 1220 cm^{-1} 에서 C-O기에 의한 band가 관찰되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 0.80 ppm의 triplet으로 갈라진 methyl signal, 1.19 ppm의 5개의 CH_2 에 해당하는 methylene signal, 2.04 ppm의 $\text{C}_{11}\text{-H}_2$ 그리고 5~6 ppm 사이에 olefinic proton signal외에 1.99 ppm에서 3개의 proton에 해당되는 COCH_3 signal이 관찰되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 과 DEPT spectrum으로부터 이 물질도 69.20, 70.06, 76.44, 78.50 ppm에서 $\text{C}\equiv\text{C}$ 2개, 60.07, 63.39 ppm에서 oxygenated carbon 2개, 117.30, 123.67, 135.70, 136.42 ppm에서 2개의 double bond를 가진다는 것이 확인되었다. 따라서 이 화합물 역시 C_{17} -polyacetylene이며 169.50, 20.89 ppm에서 보는 바와 같이 하나의 acetyl기가 3번 혹은 8번 OH에 치환되어 있다고 예측할 수 있었다. 일반적으로 OH기에 OCOCH_3 가 치환되면 α carbon은 downfield shift하며 아울러 양 옆의 β carbon은 약간 upfield shift한다. Compound 1의 $^{13}\text{C-NMR}$ data와 비교해 보면 8-C가 1.49 ppm downfield로, 7-C, 9-C가 1.76, 3.96 ppm씩 upfield shift 하였으므로 8번의 OH가 acetyl기로 치환되어 있음을 추정할 수 있었다. Mass spectrum에서는 m/z 302에서 molecular ion peak와 allylic fission에 의한 m/z 217 외에 m/z 157, 129등의 peak가 관찰되었다. 이상의 기기분석 결과 및 문헌치와의 비교

로 compound 3의 구조는 1,9-heptadecadiene-4,6-diyne-3,8-diol-8-acetate인 falcariindiol-8-acetate로 결정하였다.²⁴⁾

Compound 4의 구조 - Compound 4는 미황색의 유상물질로 이의 TLC pattern, IR, UV, mass spectrum으로 미루어 볼 때 compound 1, 2 및 3과 같은 C_{17} -polyacetylene계 물질로 추정하였다. IR spectrum에서 보면 compound 3과 같이 3310 (OH), 2180, 2220 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1660, 1680 ($\text{C}=\text{C}$) cm^{-1} 의 band외에 1750 cm^{-1} 에서 $\text{C}=\text{O}$ 과 1230 cm^{-1} 에서 C-O기에 의한 band를 관찰할 수 있었으며 mass spectrum에서는 m/z 300에서 molecular ion peak와 m/z 217에서 allylic fission에 의한 fragmentation ion peak를 확인할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 CH_3 에 의한 signal은 볼 수 없었고 1.99 ppm에서 하나의 acetyl signal과 2.08 ppm 부근에서 이중결합이 바로 옆에 붙어있는 2개의 CH_2 에 의한 4개의 proton에 해당하는 signal이 관찰되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 과 DEPT spectrum에서 19개의 carbon이 확인되었는데 그 중 $\text{C}\equiv\text{C}$ 에 의한 signal 4개, oxygenated carbon signal 2개, methylene signal 5개, acetyl기 signal이 2개, $\text{C}=\text{C}$ 에 의한 signal이 2개였다. Acetyl기는 compound 3의 $^{13}\text{C-NMR}$ data와 비교해 본 결과 8번에 위치한다는 것을 알 수 있었고 16, 17-C가 불포화되었다는 것을 추정할 수 있었으며 compound 2의 data와 비교하여 확인하였다. 이상의 기기분석 결과 compound 4의 구조는 1,9,16-heptadecatriene-4,6-diyne-3,8-diol-8-acetate인 dehydrofalcariindiol-8-acetate로 확인하였다.

Compounds 1-4의 세포독성 - 독활로부터 분리한 4개의 polyacetylene은 서로 구조적 연관성을 가지고 있다. Compound 1과 3의 16번, 17번 탄소에 이중결합이 생긴 것이 각각 compound 2와 4이며 compound 1과 2의 8번 탄소의 OH가 acetylation 된 것이 compound 3과 4이다. 이들 화합물들의 구조와 활성과의 연관성을 알아보기 위하여 1과 2의 diacetate체를 만들어 전부 6종의 화합물의 세포독성을 알아보았다 (Table II). 분리된 화합물 중에서 3번과 8번의 탄소에 OH가 존재하고 16, 17번 탄소가 포화된 화합물인 compound 1이 가장 강한 세포독성을 나타냈다. Compound 1의 8번 탄소의 OH가 acetylation된 화합물인 monoacetate체 (3)는 약간 활성이 떨어지는 경향이 나

거의 비슷한 수준을 유지하고 있었으며 16, 17번이 불포화된 dehydro체 (2)는 활성이 현저히 떨어졌다. 또한 1의 8번 탄소뿐 아니라 3번 탄소의 OH도 acetylation된 diacetate체 (1a)는 2와 세포독성이 비슷하거나 세포주에 따라서는 훨씬 더 활성이 떨어졌다. 화합물의 8번 탄소에 acetyl기가 있고 16, 17번이 불포화된 compound 4도 3와 비교해 볼 때 16, 17번에 생긴 이중결합의 차이로 인하여 모든 세포주에 대한 세포독성이 현저히 활성이 낮아졌다. 구조 중의 16, 17번 탄소에 이중결합을 가진 3개의 화합물인 2, 4와 2a의 활성을 비교해 보면 활성의 정도는 free OH의 개수와 상관없었다.

이상의 결과를 정리하면 포화된 탄소의 말단 chain이 활성에 매우 중요하며 일단 16, 17번 탄소가 불포화되면 acetyl기의 유무에 관계없이 활성이 현저히 저하됨을 알 수 있었다. 또한 3번 탄소의 OH기의 유무가 활성에 큰 영향을 미쳤음을 알 수 있었다. 즉, 포화된 말단 탄소 chain이 존재하더라도 3번에 acetyl기가 존재하는 1a의 경우에는 dehydro체만 활성이 저하됨을 관찰할 수 있었다. 그러나 8번 탄소의 OH기의 유무는 활성에 큰 영향을 주지 않았다.

일반적으로 polyacetylene계 화합물은 담자균류(Basidiomycetes)에서 많이 발견되며 식물에서는 국화과, 미나리과, 두릅나무과 등의 극히 제한된 과에만 존재하는 것으로 알려져 있다.²⁵⁾ 이들의 생리활성으로는 항균작용, 항진균작용등이 보고된 바 있다.²⁶⁾ 또한 우리나라의 특산 생약인 인삼의 엑스가 murine leukemia와 sarcoma cell의 성장을 억제하고 DNA, RNA 그리고 단백질의 합성을 저해하는 것으로 알려져 있는데 최근 그 활성성분이 polyacetylene으로 밝혀졌다.²⁷⁾ 그러나, 이들 화합물들은 구조 중에 다수의 불포화 결합이 존재하여 불안정한 화합물이 많으므로, 실용화하기 위해서는 이 문제를 해결해야 하는 어려움이 남아있다.

결 론

독활로부터 4종의 화합물, compound 1-4를 분리하였다. 4종 모두 C₁₇-polyacetylene으로서 compound 1은 falcarindiol로 밝혀졌으며 *Aralia*속에서는 처음으로 분리 보고되는 것으로 독활에서 분리한 4종의 화합물 가운데 가장 강한 세포독성을 나타내었다. Compound 2, 3 및 4의 구조는 각각 dehydrofalcarindiol,

falcarindiol-8-acetate 및 dehydrofalcarindiol-8-acetate로 결정하였으며, 이 3종의 화합물은 *Araliaceae*에서는 처음으로 보고되는 화합물이다. Compound 3은 1과 비슷한 정도의 세포독성을 나타내었으나 2와 4의 경우에는 활성이 현저히 저하되었다. 구조와 활성과의 관계를 알아보기 위하여 falcarindiol-3,8-diacetate(1a)와 dehydrofalcarindiol-3,8-diacetate(2a)를 합성하여 모두 6종의 화합물에 대한 활성을 조사해본 결과, 포화된 말단 탄소 chain과 3번 탄소의 OH가 매우 중요한 역할을 함을 밝혔다.

문 헌

- 1) 李昌福 : 大韓植物圖鑑, 郷文社, p. 575 (1989).
- 2) 相賀徹夫 : 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, 小學館, p. 1974 (1985).
- 3) 鄭普燮, 辛民教 : 圖解 郷藥 (生藥)大事典, 永林社, p. 435 (1989).
- 4) Sawamura, M., Kim, M. S., Shichiri, K., Tsuji, T. and Machida, K.: Volatile constituents of Japanese and Korean udo (*Aralia cordata* Thunb.) and butterbur (*Petasites japonicus* Miq.), *Kochi Daigaku Gakujutsu Kenkyu Hokoku Nogaku* **38**, 49 (1990) (CA 114: 100123h).
- 5) Mihashi, S., Yanagisawa, I., Tanaka, O. and Shibata, S.: Diterpenes of *Aralia* species, *Tetradheron Lett.* 1683 (1969).
- 6) Okuyama, E., Nishimura, S. and Yamazaki, M.: Analgesic principles from *Aralia cordata* Thunb., *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 405 (1991).
- 7) Shibata, S., Mihashi, S. and Tanaka, O.: The occurrence of (-)-pimarane-type diterpene in *Aralia cordata* Thunb., *Tetrahedron Lett.* 5241 (1967).
- 8) Wang, G., Liu, J., Cao, H., Liu, W., Wang, G. and Xu, J.: Studies on pharmacology of changbaicongmu (*Aralia continentalis*) III.: Effect of volatile oil of *Aralia continentalis* on the central nervous system, *Zhongcaoyao* **19**, 77 (1988) (CA 108: 180057).
- 9) Yahara, S., Ishida, M., Yamasaki, K., Tanaka, O. and Mihashi, S.: Minor diterpenes of *Aralia cordata*, 17-hydroxy-ent-kaur-15-en-19-oic acid and grandifloric acid, *Chem. Pharm. Bull.* **22**, 1629

- (1974).
- 10) Kawai, H., Nishida, M., Tashiro, Y., Kuroyanagi, M., Ueno, A. and Satake, M.: Studies on the structures of udosaponins A, B, C, D, E and F from *Aralia cordata* Thunb., *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2318 (1989).
 - 11) Han, B. H., Park, M. H., Han, Y. N. and Manalo, J. B.: Studies on the antiinflammatory activity of *Aralia continentalis* II. Isolation of two phenolic acids from the hydrolyzate of butanol fraction, *Arch. Pharm. Res.* **6**, 75 (1983).
 - 12) Kawano, K. and Sakamura, S.: Cyanidin 3-(O-β-D-xylopyranosyl(1→2)-β-D-galactopyranoside) from *Aralia elata* and *Aralia cordata*, *Agric. Biol. Chem.* **36**, 27 (1972) (CA 77: 58766k).
 - 13) 朴信映, 金鎮雄: 생약으로 부터 항암 성분의 검색(II), 서울대학교 약학논문집 **17**, 1-5 (1992).
 - 14) Rubinstein, L. V., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D. A., Monks A. and Boyd, M. R.: Correlation of screening data generated with a tetrazolium (MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **30**, 607 (1989).
 - 15) Rubinstein, L. V., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D. A., Monks A. and Boyd, M. R.: Comparison of *in vitro* anticancer drug screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines, *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1113 (1990).
 - 16) Monks, A., Scudiero, D. A., Skehan, P., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Vistica, D. T., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J. and Boyd, M. R.: Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 757 (1991).
 - 17) Alley, M. C. and Lieber, M. M.: Improved optical detection of colony enlargement and drug cytotoxicity in primary soft agar cultures of human solid tumor cells, *Br. J. Cancer* **49**, 225 (1984).
 - 18) Plumb, J., Milroy, R. and Kaye, S.: Effects of the pH dependence of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay, *Cancer Res.* **49**, 4435 (1989).
 - 19) Twentyman, P. R. and Luscombe, M.: A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity, *Br. J. Cancer* **56**, 279 (1987).
 - 20) Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D. A., Monks, A., Pittman, A. and Boyd, M. R.: Tetrazolium based assays for cellular viability, A critical examination of selected parameters affecting formazan production, *Cancer Res.* **51**, 2515 (1991).
 - 21) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D. A., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D. T., Warren, J., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R.: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening, *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107 (1990).
 - 21) Bohlmann, F., Burkhardt, T. and Zdero, C.: *Naturally Occurring Acetylenes*, Academic Press, London, p. 3 (1973).
 - 22) 金榮鎬: 섬소갈피나무의 성분과 生物學的 活性에 關한 研究, 서울대 博士學位論文 (1986).
 - 23) Silverstein, T., Bassler, G. and Morrill, T.: *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th ed., John Wiley & Sons, New York, p. 238 (1991).
 - 24) Bohmann, F. and Zdero, C.: Ein neues polyin aus Centella-Arten, *Chem. Ber.* **108**, 511 (1975).
 - 25) 柳庚秀, 韓大錫, 劉承兆, 鄭普燮, 成忠基: 天然物化學, 영림사, p. 67 (1989).
 - 26) Hansen, L. and Boll, P. M.: Polyacetylenes in Araliaceae. Their chemistry, biosynthesis and biological significance, *Phytochemistry* **25**, 285 (1986).
 - 27) 金信一: 人參의 항암 成分에 關한 研究, 忠南大 博士