



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사 학위논문

섬괴불나무의 화학 성분

Chemical Constituents from *Lonicera insularis*

2017 년 2 월

서울대학교 대학원

약학과 생약학전공

김 미 송

국문초록

섬피불나무 (*Lonicera insularis* Nakai)는 인동과 (Caprifoliaceae) 식물로서 울릉도, 독도 지역에 분포하는 한국특산식물이다. 인동속 (*Lonicera*) 의 많은 식물들에서 organic acid, iridoid, secoiridoid, flavonoid, saponin 등의 물질들이 보고되었다. 이에 본 연구에서는 인동속에서 상대적으로 연구되지 않은 한국 특산식물인 섬피불나무에서 phenylpropanoid와 secoiridoid 계열의 화학 성분을 찾고자 하였다.

섬피불나무 뿌리의 EtOAc 분획과 *n*-BuOH 분획에서 다양한 chromatography 기법을 이용하여 15종의 화합물을 분리하였으며, 그 구조는 각종 이화학적 특성 및 분광학적 데이터를 종합하여 동정하였다. 분리된 화합물 중 화합물 **1**은 특징적으로 β -D-apiofuranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucose가 붙은 phenylpropanoid 계열 화합물이며, 화합물 **16**은 특징적으로 guanidine 구조를 포함한 secoiridoid glycoside 계열 화합물로 천연에서 처음 분리 보고되는 물질이다. 이 외에도 분리된 화합물들은 salidroside I (**2**), *p*-coumaryl alcohol-4-*O*-glucoside (**3**), loganic acid (**4**), 7-deoxyloganic acid (**5**), loganin (**6**), periclymenoside (**7**), 7-*O*-*E*-feruloylloganic acid (**8**), sweroside (**9**), secologanin (**10**), secologanol (**11**), (*E*)-aldosecologanin (**12**), kinginoside (**13**), threninosecologanin (**14**), 5 α -carboxystrictosidine (**15**) 으로 동정하였으며, 화합물 **1-3**은 phenylpropanoid 계열, **4-8**은 iridoid 계열, **9-16**은 secoiridoid 계열 물질이었다. 화합물 **2, 3, 8, 11**은 이 속에서 처음 보고된 물질이었다.

또한 국내에 자생하는 인동속 (*Lonicera*) 식물 중 섬피불나무, 홍피불나무, 피불나무, 인동덩굴, 구슬댕댕이, 울피불나무 등 6종을 대상으로 이차대사산물의 특성을 비교 분석을 통해 화학적 분류를 시도하였다. UPLC-DAD/ESI-qTOF-MS를 이용한 대사체 프로파일링과 다변량분석기법을 활용하여 진행한 결과, 통계적으로 유의미한 화학적 분류 가능성을 확인하기 어려웠다. 다만, 섬피불나무의 특징적인 이차대사물질로

kinginoside (**13**)의 가능성을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터 섬괴불나무의 화학적 특성을 규명하였을 뿐 아니라, 신규 화합물을 포함하는 아미노산이 결합된 특징적인 secoiridoid 화합물 (**14-16**)의 존재를 확인함으로써, secoiridoid 화합물의 화학적 다양성을 확인할 수 있었다.

주요어 : 섬괴불나무(*Lonicera insularis* Nakai), 인동과(Caprifoliaceae), iridoid, secoiridoid, phenylpropanoid, UPLC-qTOF-MS, HT22세포주

학 번 : 2015-21864

Contents

국문초록.....	i
Contents.....	iii
List of Tables.....	vi
List of Figures.....	vii
List of Abbreviations.....	ix
I. 서 론.....	1
II. 섬피불나무 뿌리로부터 화합물의 분리.....	3
A. 실험 재료 및 방법.....	3
1. 실험재료.....	3
2. 시약 및 기기.....	3
2.1. 시약.....	3
2.2. 기기.....	4
3. 실험방법.....	6
3.1. 섬피불나무 뿌리의 추출 및 분획.....	6
3.2. 섬피불나무 <i>n</i> -BuOH 분획으로부터 화합물의 분리.....	7
3.3. 섬피불나무 EtOAc 분획으로부터 화합물의 분리.....	15
3.4. 당 분석.....	17
4. HT22 세포주에서 neuroprotection 활성 검색.....	31
4.1. HT22 세포주 배양 및 glutamate 에 의한 독성 저해 활성 검색용 시약.....	31
4.2. HT22 세포주의 배양.....	31
4.3. Glutamate 에 의한 신경독성 유도.....	31
4.4. MTT assay.....	31

4.5. 통계처리.....	32
B. 결과 및 고찰.....	33
1. 섬피불나무 뿌리에서의 물질 분리.....	33
1.1. 화합물 1 의 구조 분석.....	33
1.2. 화합물 2 의 구조 분석.....	36
1.3. 화합물 3 의 구조 분석.....	38
1.4. 화합물 4 의 구조 분석.....	41
1.5. 화합물 5 의 구조 분석.....	43
1.6. 화합물 6 의 구조 분석.....	45
1.7. 화합물 7 의 구조 분석.....	47
1.8. 화합물 8 의 구조 분석.....	50
1.9. 화합물 9 의 구조 분석.....	52
1.10. 화합물 10 의 구조 분석.....	54
1.11. 화합물 11 의 구조 분석.....	56
1.12. 화합물 12 의 구조 분석.....	58
1.13. 화합물 13 의 구조 분석.....	60
1.14. 화합물 14 의 구조 분석.....	62
1.15. 화합물 15 의 구조 분석.....	66
1.16. 화합물 16 의 구조 분석.....	69
2. HT22 세포주에서의 신경세포 보호활성.....	75
III. UPLC/MS 를 이용한 인동속 식물의 이차대사체 분석.....	77
A. 실험 재료 및 방법.....	77
1. 실험재료.....	77
2. 시약 및 기기.....	78

2.1. 시약.....	78
2.2. 기기.....	78
3. 시료의 제조.....	78
4. 기기분석 방법.....	79
4.1. UPLC/MS 측정과 분석.....	79
4.2. 다변량 분석 방법.....	80
B. 결과 및 고찰.....	81
1. UPLC/MS 를 이용한 섬피불나무의 이차대사체 분석.....	81
1.1 대사산물의 동정.....	81
1.2. 섬피불나무의 이차대사체 MS profiling.....	84
2. 인동속 식물에서의 비교분석연구.....	89
2.1. UPLC/MS 를 이용한 TIC peak area 비교 분석.....	89
2.2. 다변량 분석.....	94
IV. 결론.....	96
V. 참고문헌.....	97
Abstract.....	102

List of Tables

Table 1. ¹ H NMR spectral data of compounds 1-3	18
Table 2. ¹³ C NMR spectral data of compounds 1-3	19
Table 3. ¹ H NMR spectral data of compounds 4-6	20
Table 4. ¹³ C NMR spectral data of compounds 4-6	21
Table 5. ¹ H, ¹³ C NMR spectral data of compounds 7-8	22
Table 6. ¹ H NMR spectral data of compounds 9-11	24
Table 7. ¹³ C NMR spectral data of compounds 9-11	25
Table 8. ¹ H, ¹³ C NMR spectral data of compounds 12	26
Table 9. ¹ H, ¹³ C NMR spectral data of compounds 13	27
Table 10. ¹ H, ¹³ C NMR spectral data of compounds 14	28
Table 11. ¹ H, ¹³ C NMR spectral data of compounds 15	29
Table 12. ¹ H, ¹³ C NMR spectral data of compounds 16	30
Table 13. Neuroprotective activities of compounds from <i>L. insularis</i> on HT22 cells injured by glutamate.....	76
Table 14. Components that were identified from <i>L. insularis</i>	86
Table 15. Sample numbers of Six <i>Lonicera</i> species.....	89
Table 16. Statistical comparison on the normalized TIC areas of the peaks from <i>Lonicera</i>	91

List of Figures

Figure 1. Roots of <i>Lonicera insularis</i> Nakai.....	3
Figure 2. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 1	34
Figure 3. HMBC spectrum of compound 1	35
Figure 4. Sugar analysis of compound 1	35
Figure 5. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 2	37
Figure 6. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 3	39
Figure 7. HMBC spectrum of compound 3	40
Figure 8. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 4	42
Figure 9. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 5	44
Figure 10. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 6	46
Figure 11. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 7	48
Figure 12. HMBC spectrum of compound 7	49
Figure 13. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 8	51
Figure 14. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 9	53
Figure 15. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 10	55
Figure 16. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 11	57
Figure 17. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 12	59
Figure 18. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 13	61
Figure 19. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 14	63
Figure 20. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of compound 14	64
Figure 21. ROESY spectrum of compound 14	65
Figure 22. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 15	67
Figure 23. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of compound 15	68
Figure 24. HSQC spectrum of compound 15	68
Figure 25. ¹ H, ¹³ C NMR spectra of compound 16	71
Figure 26. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of compound 16	72

Figure 27. HMBC spectrum of compound 16	72
Figure 28. ¹ H- ¹⁵ N HSQC spectrum of 4-Guanidinobutyric acid	73
Figure 29. ¹ H- ¹⁵ N HSQC spectrum of compound 16	73
Figure 30. Structures of the compounds isolated from <i>L.insularis</i> roots	74
Figure 31. Samples of <i>Lonicera</i> species.....	77
Figure 32. MS spectral data and fragmentation patterns of salidroside I	82
Figure 33. MS spectral data and fragmentation patterns of di-caffeoyl quinic acid	82
Figure 34. MS spectral data and fragmentation patterns of secologanin	83
Figure 35. MS spectral data and fragmentation patterns of loganin	83
Figure 36. Representative BPI chromatograms of <i>L.insularis</i> A: root, B: stem.....	85
Figure 37. Mass spectrum of <i>Lonicera</i> species	90
Figure 38. PCA score plots of <i>Lonicera</i> species	94
Figure 39. S-plot of OPLS-DA from <i>Lonicera insularis</i>	95

List of Abbreviations

$[\alpha]_D$: specific rotation

ACN: acetonitrile

C.C.: column chromatography

CHCl₃: chloroform

COSY: correlation spectroscopy

d: doublet

D₂O: deuterium oxide

dd: doublet of doublet

DMSO: dimethylsulfoxide

EtOAc: ethyl acetate

HMBC: heteronuclear multi-bond correlation

HPLC: high performance liquid chromatography

HRESIMS: high-resolution electron spray ionization mass spectrometry

HSQC: heteronuclear single quantum coherence

Hz: hertz

IC₅₀: the half maximal inhibitory concentration

IR: infrared spectroscopy

m: multiplet

MeOD: methanol-d₄

MeOH: methanol

MS: mass spectrometry

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

n-BuOH: *n*-butanol

NMR: nuclear magnetic resonance

NP: normal phase

OPLS-DA: orthogonal projections to latent structure-discriminant analysis

PCA: principal component analysis

qTOF: quadrupole-time of flight

RDA: Retro-Diels–Alder reaction

R_f : migration distance relative to solvent front in TLC

ROESY: rotating-frame nuclear overhauser enhancement spectroscopy

R_t : retention time

s: singlet

t: triplet

TLC: thin layer chromatography

t_R : retention time (RT)

UPLC: ultra high performance liquid chromatography

UV: ultraviolet absorption spectroscopy

I. 서론

섬피불나무 (*Lonicera insularis* Nakai)는 인동과 (Caprifoliacea) 인동속 (*Lonicera*) 에 속하는 관목으로 울릉도와 독도의 해안가 지역에 분포하는 한국특산식물이다. 섬피불나무는 소지가 비어있고, 꽃은 백색에서 황색으로 변하고 잎겨드랑이에 2 송이씩 달린다. 열매는 장과이며 서로 떨어져 있고 둥근 모양이며 붉게 익는다. 식물체 표면의 맥에만 털이 있고, 뒷면에 융모가 있는 것이 특징이다 (한반도 고유종 총람, 2011).

섬피불나무에 대한 연구는 울릉도 민속식물 추출물의 항염증 효과 (Kim et al., 2013)과 섬피불나무 줄기를 이용한 분리 논문 (Lee et al., 2001)이 보고되었다.

섬피불나무가 속한 인동속 (*Lonicera*)은 약 200 여종이 전세계에 분포하고 있으며, 중국(약 100 여종), 일본(약 25 여종), 한국(약 30 여종)을 중심으로 동아시아 지역이 주요 분포지로 알려져 있다 (Jeong et al., 2014). 중국에는 대표적인 인동속 식물인 인동덩굴의 꽃을 관절염, 당뇨병, 종기, 수포, 항바이러스 등의 질병예방에 이용하고 있으며 500 가지 이상의 처방에 금은화가 쓰이고 있다. 이전의 많은 연구를 통해 iridoid glycosides, caffeoyl quinic acids, flavonoids, saponins, cerebrosides 등이 보고 되었고, 그 중 iridoid, secoiridoid glycoside 가 대표적인 화학적 성분으로 알려져 있다 (Liu et al., 2015).

Iridoid 로부터 에폭시화, 산화, 수소화 그리고 에스터화를 거쳐 합성되는 secoiridoid 는 7,8-seco-cyclopenta[c]-pyranoid skeleton 을 골격으로 한 monoterpenoids 이다 (Dinda et al., 2007). Secologanin 은 indole, cinchona, ipecacuanha alkaloid 그리고 pyrroloquinoline alkaloid 의 생합성의 핵심 중간체이다. Nitrogen 을 함유하게 하는 아미노산이나 아민과의 결합 반응은 생물학적 활성을 더욱 증대시키는 반응이며 1000 개 이상의 alkaloids 는 천연물 내에서 secologanin 으로부터 생성된다. 이전 연구에서 secoiridoid 계열 많은 화합물이 항알러지, 항관절염, 항염증 등의

뛰어난 생물학적 활성을 나타내었다 (Dinda et al., 2007). 가장 잘 알려진 의약품으로써 급성백혈병의 치료에 쓰이는 dimeric indole alkaloid leurocristine (vincristine)가 개발되어 있다 (Tietze et al., 1988). 인동속 식물에서 secoiridoid 계열 물질로는 간단한 secologanin, secoxyloganin, kingside, secologanoside 등과 alkaloid 계열의 pyridinium alkaloid 가 결합한 secoiridoids (lonijaposides), L-phenylalaninosecologanin 등 보고되었으며 이는 동속식물에서 다양한 secoiridoid 유도체의 존재 가능성을 시사하였다 (Shang et al., 2011).

UPLC-qTOF-MS 를 이용한 추출물에서의 화합물 분석은 복잡한 matrix 에서도 정확한 분석과 선택성을 높이고 감도 높은 분석을 가능하게 한다는 것에 특이적인 장점이 있다. 이 장점은 extracted ion chromatograms (XICs)를 이용하여 낮은 정량값, 낮은 함유량의 성분이라도 명백한 확인을 가능하게 한다 (Ren et al., 2008). 이에 본 연구에서는 더욱 이차대사체의 분석을 용이하게 하기 위해 sep-pak C18 필터를 사용하여 시료를 제작하였다. 그리고 UPLC/MS 를 기반한 섬괴불나무에서 이차대사체 프로파일링을 수행하였다. 이를 토대로 다변량 분석 (multivariate analysis)을 실시하여 대사체에 따라 인동속 식물간에 구분이 있는지 확인하고 섬괴불나무의 구분에 크게 영향을 주는 마커를 발굴하였다.

그리고 이전 연구에서 인동덩굴 꽃인 금은화의 쥐의 뇌세포에서 glutamate 독성에 대한 보호작용 (Weon et al., 2011)과 산수유에서 분리한 iridoid 의 뇌종양세포에서의 보호작용 (Wang et al., 2009)이 보고 되었다. 그리고 인동속 식물의 다양한 항산화 활성이 보고되었다 (Choi et al., 2007, Wu et al., 2015). 이를 근거로 인동속에서 실험되지 않았던 HT22 세포의 신경세포보호 활성을 확인 해 보았다.

II. 섬괴불나무 뿌리로부터 화합물의 분리

A. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 섬괴불나무 (*Lonicera insularis* Nakai)의 뿌리 (건조 중량 1988 g)는 2015 년 7 월에 서울대학교 약학대학 약초원에서 채집하였다.



Figure 1. Roots of *Lonicera insularis* Nakai

2. 시약 및 기기

2.1. 시약

2.1.1. 분석용 시약

컬럼크로마토그래피용 silica gel

Kiesgel 60 (40-60 μm , 230-400 mesh, Art. 9385, Merck, Germany)

컬럼크로마토그래피용 Sephadex LH-20

Sephadex LH-20 (bead size 25-100 μm , Pharmacia, Sweden)

박층 크로마토그래피용 precoated plates
Kieselgel 60 F₂₅₄ (Art. 5715, Merck, Germany)
RP-18F₂₅₄ (Art. 15389, Merck, Germany)

발색시약
Anisaldehyde-H₂SO₄

2.1.2. 추출용매 및 기타 시약

추출, 분획, 분리에 사용된 용매

First grade 용매 - Dae Jung Pure chemical Eng. Co. Ltd., Korea

HPLC 용 용매 - J.T. Baker®, Avantor Performance Materials. Inc., USA

2.2. 기기

Analytical balance: Mettler AE 50, Switzerland

Autoclave: Sanyo MLS 3000, Japan

Centrifuge: Effendroff centrifuge 5810, Germany

Elisa reader: Molecular Devices E_{max}, USA

Evaporator: EYELANE, Japan

Sonicator: Branson 8510, USA

Analytical HPLC system

- Dionex 3000 Ultimate RLSC system, Thermo Dionex, St Albans, UK

- Column: YMC triart C18 column, 4.6 x 250mm, 5 μm, YMC Co. Ltd.,
Japan

Preparative HPLC system

- Waters® Delta Prep coupled with Waters 2489 UV/vis detector, USA

- Gilson 321 Pump and UV/Vis-151 detector, USA

- Waters 600 pump coupled with Waters 486 tunable absorbance detector and
Hitachi D-2500 chromato-integrator

- Column: 1) YMC triart C18 column, 20 x 250mm, 5 μm, YMC Co. Ltd.,

Japan

2) Phenomenex column, 20 x 250mm, 5 μ m, Sungmoon Systech
Co. Ltd., Seoul, Korea

UPLC-QTOF MS system

- Waters Acquity UPLC® system, Waters Co., Milford, MA, USA
- Column: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 mm x 100 mm, 1.7 μ m
- Waters Xevo G2 QTOF mass spectrometer, Waters MS Technologies,
Manchester, UK

Drying oven: CO-2D-1S, Wooju Sci. Co., Korea

Hot plate: Corning PC-400, USA

NMR: Jeol JMN-LA300 Spectrometer 300 (300 MHz), Japan

Bruker AVANCE digital Spectrometer 300 (300 MHz), Germany

Bruker AVANCE digital Spectrometer 500 (500 MHz), Germany

Bruker AVANCE digital Spectrometer 600 (600 MHz), Germany

Bruker AVANCE III HD spectrometer with a 5-mm TCI CryoProbe (800 MHz),
Germany

Polarimeter: JASCO P-2000, Japan

Infrared spectrometer: JASCO FT/IR-4200, USA

UV lamp: UVP UVGL-58, USA

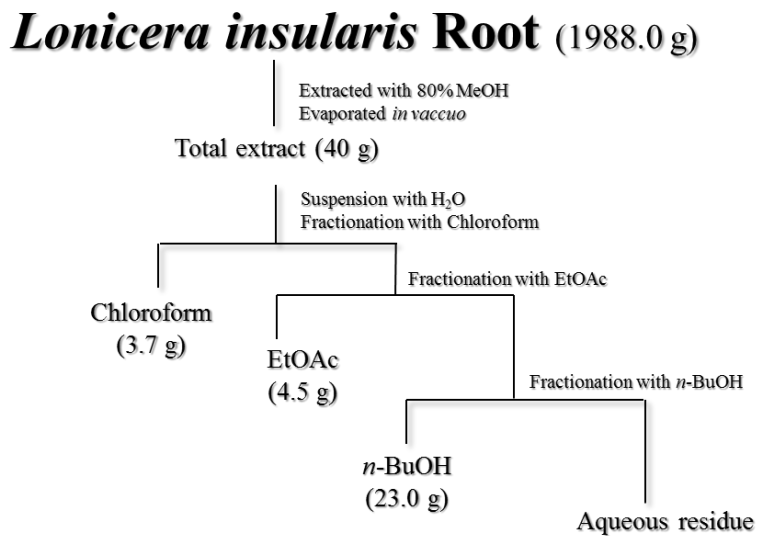
MPLC: Reveleris, Grace Davision, USA

MPLC column: Reveleris C 18 Reversed-phase, 120 g, 128 - 80 ml/min, USA

3. 실험방법

3.1. 섬괴불나무 뿌리의 추출 및 분획

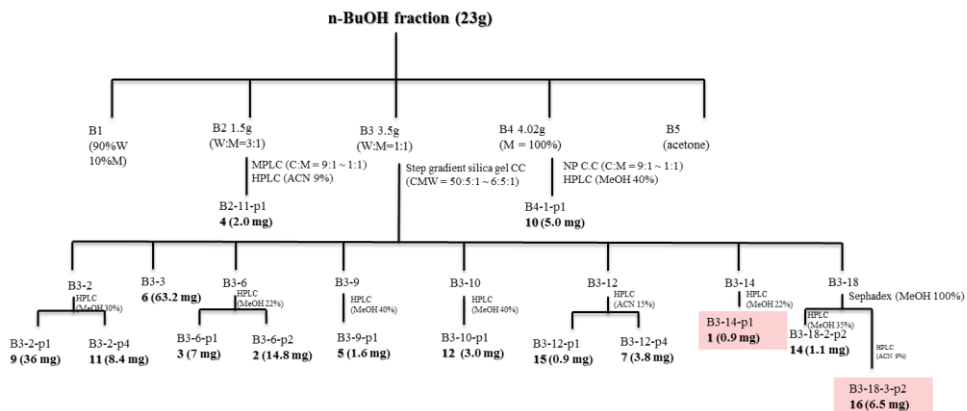
건조된 섬괴불나무 뿌리 1988 g 을 80% MeOH 로 3 시간씩 초음파 추출기를 사용하여 4 회 추출하였고, 그 추출액을 감압 농축하여 총 추출물 40 g 을 얻었다. 이를 증류수에 현탁시킨 후 CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH 로 순차적으로 극성을 높여가며 분획하고, 이들 분획물을 각각 감압 농축하여 CHCl₃ 분획 (3.7 g), EtOAc 분획 (4.5 g), *n*-BuOH 분획 (23.0 g)을 얻었다 (Scheme 1).



Scheme 1. Extraction and fractionation of *L.insularis* root

3.2. 섬피불나무 *n*-BuOH 분획으로부터 화합물의 분리

n-BuOH 분획을 HP-20 Diaion C.C. (MeOH 10% → 100%)를 사용하여 5 개의 분획 (B1 ~ B5)으로 나누어 소분획 B2를 MPLC NP (CHCl₃ : MeOH = 9:1 → 1:1)를 시행하여 14 개의 분획으로 나누고 소분획 B2-11 에서 화합물 **4** 을 얻었다. 소분획 B3를 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 6:5:1)를 실시하여 20 개의 분획 (B3-1 ~ B3-20)을 얻었다. B3-2, B3-3, B3-6, B3-10, B3-12, B3-14, B3-59 에서 화합물 **1-3, 5-7, 9, 11-12, 14-16** 을 얻었다. 소분획 B4 (4.02 g)를 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 10:5:1)을 시행하여 10 개의 분획으로 나누고 소분획 B4-1 (85 mg)에서 화합물 **10** 을 얻었다 (Scheme 3).



Scheme 3. Isolation of the compounds from the *n*-BuOH fractions of *L.insularis*

3.2.1. 화합물 1의 분리

n-BuOH 분획을 HP-20 Diaion C.C. (MeOH 10% → 100%)를 사용하여 5개의 분획 (B1 ~ B5)으로 나누어 5개의 분획 (B1 ~ B5) 중 소분획 B3을 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 6:5:1)를 실시하여 20개의 분획 (B3-1 ~ B3-20)을 얻었다. 이 중 소분획 E3-14 (100 mg)로부터 HPLC (22% MeOH)를 수행하여 노란색 결정의 화합물 1 (0.9 mg)을 분리하였다. 화합물 1은 UV가 263 nm에서 최대 흡광을 보였다.

pale yellowish needles

C₂₀H₂₈O₁₁

$[\alpha]_D^{25}$ -66.05 (c 0.1, MeOH)

HRESIMS *m/z*: Found 443.1553, Calcd 443.1553 for C₂₀H₂₇O₁₁

¹H NMR (MeOD, 600 MHz): See table 1

¹³C NMR (MeOD, 150 MHz): See table 2

3.2.2. 화합물 2의 분리

소분획 B3을 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 6:5:1)를 실시하여 20개의 분획 (B3-1 ~ B3-20) 중 소분획 E3-6 (136 mg)로부터 HPLC (22% MeOH)를 수행하여 흰색 무정형 분말 형태의 화합물 2 (14.8 mg)을 분리하였다. 화합물 2는 UV 256 nm에서 최대 흡광을 보였다.

A white amorphous powder

C₁₅H₂₀O₇

$[\alpha]_D^{25}$ -16.5 (c 0.1, MeOH)

IR (KBr) ν_{\max} 3596-3271 (OH), 2933, 2878 (CH₂), 1883, 1615, 1518 (benzene ring)

HRESIMS *m/z*: Found 335.1090, Calcd 335.1107 for C₁₅H₂₀O₇Na

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): See table 1

¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): See table 2

3.2.3. 화합물 3의 분리

소분획 B3을 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 6:5:1)를 실시하여 20 개의 분획 (B3-1 ~ B3-20) 중 소분획 B3-6 (136 mg)로부터 HPLC (22% MeOH)를 수행하여 무색의 결정의 화합물 3 (8 mg)을 분리하였다. 화합물 3은 UV 262 nm에서 최대 흡광을 보였다.

A Colorless needles

C₁₅H₂₀O₇

[α]_D¹⁷ -57.4 (c 0.94, MeOH)

IR (KBr) ν_{max} 3440(OH), 1603, 1518, 964

HRESIMS m/z: Found 335.1092, Calcd 335.1091 for C₁₅H₂₀O₇Na

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): See table 1

¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): See table 2

3.2.4. 화합물 4의 분리

n-BuOH 분획을 HP-20 Diaion C.C. (MeOH 10% → 100%)를 사용하여 5 개의 분획 (B1 ~ B5)으로 나누어 소분획 B2를 MPLC NP (CHCl₃ : MeOH = 9:1 → 1:1)를 시행하여 14 개의 분획으로 나누고 소분획 B2-11에서 HPLC를 이용하여 (ACN 9%) 무색의 결정 형태인 화합물 4 (2 mg)를 얻었다. 화합물 4는 UV 237 nm에서 최대 흡광을 보였다.

Colourless needles

C₁₆H₂₄O₁₀

[α]_D¹⁷ -75.8 (c 1.3, MeOH)

IR (KBr) ν_{max} 3421, 1706, 1685, 1636, 1376, 1077

HRESIMS, m/z: Found 375.1293, Calcd 375.1291 for C₁₆H₂₃O₁₀

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): See table 3

¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz): See table 4

3.2.5. 화합물 5의 분리

소분획 B3을 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 6:5:1)를 실시하여 20 개의 분획 (B3-1 ~ B3-20) 중 B3-9에서 HPLC (ACN 25%)를 이용하여 흰색의 무정형 분말의 화합물 5 (1.6 mg)을 분리하였다. 화합물 5는 UV 238 nm에서 최대 흡광을 보였다.

A white amorphous powder

C₁₆H₂₄O₉

[α]_D¹⁷ -84.34 (c 0.25, MeOH)

IR (KBr) ν_{max} 3426 (br), 2945, 2877, 1687, 1631, 1074, 1018.

HRESIMS, m/z: Found 359.1331, Calcd 359.1342 for C₁₆H₂₃O₉

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): See table 3

¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): See table 4

3.2.6. 화합물 6의 분리

소분획 B3을 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 6:5:1)를 실시하여 20 개의 분획 (B3-1 ~ B3-20) 중 B3-3에서 흰색의 무정형 분말의 화합물 6 (63.2 mg)을 분리하였다. 화합물 6는 UV 237 nm에서 최대 흡광을 보였다.

A white amorphous powder

C₁₇H₂₆O₁₀

[α]_D¹⁷ -82.7 (c 0.015, MeOH)

IR (KBr) ν_{max} 3421, 1706, 1685, 1636, 1376, 1077

HRESIMS, m/z: Found 389.1447, Calcd 389.1448 for C₁₇H₂₅O₁₀

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): See table 3

¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz): See table 4

3.2.7. 화합물 7의 분리

소분획 B3을 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 6:5:1)를 실시하여 20개의 분획 (B3-1 ~ B3-20) 중 B3-12에서 흰색의 무정형 분말의 화합물 7 (3.8 mg)을 분리하였다. 화합물 7는 UV 220, 234, 293, 318 nm에서 최대 흡광을 보였다.

A white amorphous powder

C₃₃H₄₄O₁₈

$[\alpha]_D^{20}$ -54.2 (c 0.71, MeOH)

IR (KBr) ν_{\max} 3420(br, OH), 1700(conj. ester), 1630-1635(C=C), 1510(arom.ring).

HRESIMS, m/z: Found 727.2468, Calcd 727.2449 for C₃₃H₄₃O₁₈

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): See table 5

¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): See table 5

3.2.8. 화합물 9의 분리

소분획 B3을 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 6:5:1)를 실시하여 20개의 분획 (B3-1 ~ B3-20) 중 B3-2에서 HPLC 정제를 통해 흰색의 무정형 분말의 화합물 9 (36 mg)을 분리하였다. 화합물 9는 UV 244 nm에서 최대 흡광을 보였다.

A white amorphous powder

C₁₆H₂₂O₉

$[\alpha]_D^{20}$ -237 (c 0.020, H₂O)

HRESIMS, m/z: Found 357.1180 Calcd 357.1186 for C₁₆H₂₁O₉

IR (KBr) ν_{\max} 3440-3380 (OH), 1700 (C=O), 1615, 1280, 1070, 900-840

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): See table 6

¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): See table 7

3.2.9. 화합물 **10** 의 분리

소분획 B4 (4 g)를 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 10:5:1)을 시행하여 10 개의 분획으로 나누고 소분획 B4-1 (85 mg)에서 HPLC (40% MeOH)을 이용하여 흰색 무정형 분말 형태인 화합물 **10** (5.0 mg)를 얻었다. 화합물 **10** 의 UV 는 237 nm 에서 최대 흡광을 보였다.

A white amorphous powder

C₁₇H₂₄O₁₀

[α]_D²⁰ -174.8 (c 0.1, MeOH)

IR (KBr) ν_{max} 3430 (OH), 1704 (C-G), 1630 (C-C)

HRESIMS, m/z: Found 433.1349, Calcd 433.1346 for C₁₈H₂₅O₁₂

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): See table 6

¹³C NMR (D₂O, 125 MHz): See table 7

3.2.10. 화합물 **11** 의 분리

소분획 B3 을 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 6:5:1)를 실시하여 20 개의 분획 (B3-1 ~ B3-20) 중 B3-2 에서 HPLC (30% MeOH)을 이용하여 노란색 시럽형태의 화합물 **11** (8 mg)을 분리하였다. 화합물 **11** 는 UV 239 nm 에서 최대 흡광을 보였다.

A yellowish syrup

C₁₇H₂₆O₁₀

HRESIMS, m/z: Found 389.1432, Calcd 389.148 for C₁₇H₂₅O₁₀

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): See table 6

¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz): See table 7

3.2.11. 화합물 **12** 의 분리

소분획 B3 을 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 6:5:1)를 실시하여 20 개의 분획 (B3-1 ~ B3-20) 중 B3-10 에서 HPLC (MeOH 40%)를 이용하여 흰색의 무정형 분말의 화합물 **12** (3.0 mg)을 분리하였다. 화합물 **12** 는 UV 256 nm 에서 최대 흡광을 보였다.

A white amorphous powder

C₃₄H₄₆O₁₉

$[\alpha]_D^{20}$ -135.6 (c 0.295, MeOH)

IR (KBr) ν_{\max} 3393(OH), 1691, 1635, 1439, 1299, 1078, 1025

HRESIMS, m/z: Found 757.2571, Calcd 757.2555 for C₃₄H₄₅O₁₉

¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz): See table 8

¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz): See table 8

3.2.12. 화합물 **14** 의 분리

소분획 B3을 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 6:5:1)를 실시하여 20개의 분획 (B3-1 ~ B3-20) 중 B3-18로부터 Sephadex LH-20 (MeOH 100%) 를 수행하여 8개의 분획 (B3-18-1 ~ B3-18-8)을 얻었다. 그 중 B3-18-2번 분획을 HPLC (MeOH 35%)를 이용하여 정제하여 흰색의 무정형 분말의 화합물 **14** (1.1 mg)을 분리하였다. 화합물 **14**는 UV 240 nm에서 최대 흡광을 보였다.

A white amorphous powder

C₂₀H₂₇NO₁₁

$[\alpha]_D^{20}$ -156.8 (c 0.37, H₂O)

IR (KBr) ν_{\max} 3326, 1720 (C=O), 1657, 1584

HRESIMS, m/z: Found 456.1505, Calcd 456.1506 for C₂₀H₂₆NO₁₁

¹H NMR (D₂O, 800 MHz): See table 10

¹³C NMR (D₂O, 200 MHz): See table 10

3.2.13. 화합물 **15**의 분리

소분획 B3을 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 6:5:1)를 실시하여 20개의 분획 (B3-1 ~ B3-20) 중 B3-12에서 HPLC (ACN 15%)를 이용하여 노란색 분말의 화합물 **15** (0.9 mg)을 분리하였다. 화합물 **15**는 UV 251 nm에서 최대 흡광을 보였다.

A yellow powder

C₂₈H₃₅N₂O₁₁

[α]_D²⁰ -280 (c 0.95, MeOH)

IR (KBr) ν_{max} 3400(OH), 1734(C=O), 1650(C=O)

HRESIMS, m/z: Found 575.2247, Calcd 575.2241 for C₂₈H₃₅N₂O₁₁

¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz): See table 11

¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz): See table 11

3.2.14. 화합물 **16**의 분리

소분획 B3을 NP C.C. (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 6:5:1)를 실시하여 20개의 분획 (B3-1 ~ B3-20) 중 B3-18로부터 Sephadex LH-20 (MeOH 100%)를 수행하여 8개의 분획(B3-18-1 ~ B3-18-8)을 얻었다. 그 중 B3-18-3번 분획을 HPLC (ACN 9%)를 이용하여 정제하여 노란색 분말의 화합물 **16** (6.5 mg)을 분리하였다. 화합물 **16**는 UV 239 nm에서 최대 흡광을 보였다.

A yellow powder

C₂₂H₃₃N₃O₁₀

IR (KBr) ν_{max} 3694, 3680, 2971, 2921, 2864, 1748, 1679, 1054, 1032, 1013

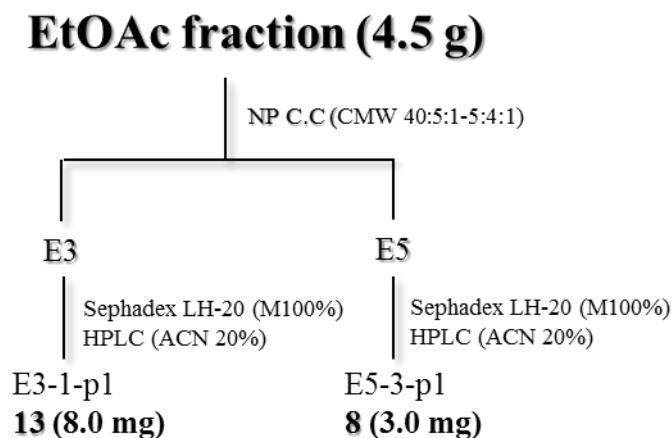
HRESIMS, m/z: Found 500.2257, Calcd 500.2244 for C₂₂H₃₄N₃O₁₀

¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz): See table 12

¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz): See table 12

3.3. 섬괴불나무 EtOAc 분획으로부터 화합물의 분리

섬괴불나무 뿌리의 EtOAc분획을 NP C.C. ($\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 50:5:1 \rightarrow 10:5:1$)로 진행하여 11개의 분획 (E1 ~ E11)으로 나누고 소분획 E3 (350 mg), E5 (164 mg)에서 각각 화합물 **8**, **13**를 얻었다 (Scheme 2).



Scheme 2. Isolation of the compounds from the EtOAc fractions of *L.insularis*

3.3.1. 화합물 **13**의 분리

섬괴불나무 뿌리의 EtOAc 분획을 NP C.C ($\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 50:5:1 \rightarrow 10:5:1$)를 실시하여 11 개의 분획 (E1 ~ E11)으로 나누었다. 그리고 소분획 E3 (350 mg)로부터 sephadex LH-20 (MeOH)을 실시하여 6 개의 분획(E3-1 ~ E3-6)으로 나누었다. E3-1 에서 HPLC 를 이용하여 정제를 하였다. 화합물 **13** (8 mg)은 무정형 분말형태로 UV 226, 230, 280, 308(sh)에서 최대 흡광을 보였다.

A colorless amorphous powder

$\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_{16}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} -88.3$ (c 0.1, MeOH)

IR (KBr) ν_{max} 3700-3100(OH), 1710, 1695(C=O), 1620(C=C), 1515

HRESIMS, m/z: Found 679.2248, Calcd 679.2238 for $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{O}_{16}$

^1H NMR (CD_3OD , 800 MHz): See table 9

^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz): See table 9

3.3.2. 화합물 8 의 분리

섬괴불나무 뿌리의 EtOAc 분획을 NP C.C (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 50:5:1 → 10:5:1)를 실시하여 11 개의 분획 (E1 ~ E11)으로 나누었다. 그리고 소분획 E5 (164 mg)로부터 sephadex LH-20 (MeOH)을 실시하여 4 개의 분획(E5-1 ~ E5-4)로 나누었다. E5-3 에서 HPLC 를 이용하여 정제를 하였다. 화합물 12 (3 mg)은 무정형 분말형태로 UV 222(sh), 235, 305, 325 에서 최대 흡광을 보였다.

A colorless amorphous powder

C₂₆H₃₂O₁₃

$[\alpha]_D^{25}$ -30.5 (c 0.85, MeOH)

IR (KBr) ν_{\max} 3300(OH), 1670, 1625, 1590, 1425, 1590, 1510, 1270, 1150, 1075

HRESIMS, m/z: Found 551.1756, Calcd 551.1765 for C₂₆H₃₁O₁₃

¹H NMR (CD₃OD, 800 MHz): See table 5

¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz): See table 5

3.4. 당 분석

화합물 **1** (0.5 mg)을 0.1N HCl (1 ml)을 넣어 100°C 로 2 시간 중탕 시켜 가수분해한 후 포화 Na₂CO₃ 수용액을 이용하여 중화시켰다. 또한, silica gel TLC 를 이용해 이동상 (*n*-BuOH : acetone : pyridine : water = 10 : 10 : 5 : 5) 조건으로 화합물의 가수분해 결과를 확인하였다.

이어서 HPLC 분석을 위해 thiocarbamoyl thiazolidine 유도체를 합성하였다. 가수분해 시킨 화합물 **1** 과 D-glucose (2 mg), D-apiose (2 mg) 각각을 L-cysteine methyl ester hydrochloride (2 mg)을 pyridine (100 µl)에 녹인 후 오븐 60°C 에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그 다음, *o*-tolyl isothiocyanate (100 µl)를 첨가하여 오븐 60°C 에서 1 시간 동안 반응시켰다 (Tanaka et al., 2007).

HPLC 분석은 Thermo Dionex Ultimate 3000 HPLC system 에서 컬럼 YMC triart C18 column, 4.6 x 250 mm i.d. (YMC Co. Ltd., Japan)을 이용하였고 액체크로마토그래피의 이동상은 0.1% 포름산을 포함한 물 (A)과 ACN (B)를 사용하여 1 mL/min 으로 흘려주었고 컬럼온도 25°C 에서 분석을 시행하였다. 각 시료는 10 µL 씩 주입하였다. 이동상의 gradient 조건은 다음과 같다. 0-30 분 20-40 %B, 이후 컬럼의 washing 을 위하여 100% B 로 5 분간 흘려주었다. 각 시료로부터 얻어진 크로마토그램은 Chromeleon (version 6.8, Dionex Co., UK) 소프트웨어를 이용하여 UV 피크의 retention time 과 UV spectrum 을 비교하였다.

Table 1. ¹H NMR spectral data of compounds **1-3**

POSITION	δ_{H} in ppm (<i>J</i> in Hz)					
	1		2		3	
2	7.27	d (8.4)	7.25	d (8.5)	7.34	d (8.6)
3	6.74	d (8.4)	6.72	d (8.5)	7.04	d (8.6)
5	6.74	d (8.4)	6.72	d (8.5)	7.04	d (8.6)
6	7.27	d (8.4)	7.25	d (8.5)	7.34	d (8.6)
7	6.6	d (15.8)	6.56	d (15.8)	6.54	d (15.9)
8	6.18	dt (15.8 , 6.4)	6.15	dt (15.8 , 6.4)	6.24	dt (15.9)
9	4.47, 4.28	dd (5.8, 12.2)	4.48, 4.26	dd (7.0, 12.5)	4.19	d (5.0)
1'	4.35	dd (7.8)	4.35	dd	4.91	dd
2'	3.21	m	3.10-3.38	m	3.29-3.46	m
3'	3.35	m	3.10-3.38	m	3.29-3.46	m
4'	3.28	m	3.10-3.38	m	3.29-3.46	m
5'	3.4	m	3.10-3.38	m	3.29-3.46	m
6'	4.00, 3.63	dd	3.87, 3.65	dd	3.88, 3.68	dd
1''	5.04	d (2.0)				
2''	3.93	d				
4''	3.78, 3.99	d				
5''	3.6	s				

Table 2. ^{13}C NMR spectral data of compounds **1-3**

	1	2	3
POSITION	δ_c		
1	158.6	159.2	159.44
2	129	129.6	129.2
3	116.45	117.12	118.6
4	129.9	130.5	131.99
5	116.45	129.6	129.2
6	129	117.12	118.6
7	134.4	134.9	133.6
8	123.42	124.14	129.21
9	71.29	71.87	64.58
1'	103.24	103.9	103.05
2'	75.22	75.91	75.71
3'	78.19	78.89	78.96
4'	71.89	72.47	72.17
5'	77.08	78.75	78.79
6'	68.81	63.58	63.31
1''	111.14		
2''	78.18		
3''	80.69		
4''	75.12		
5''	65.71		

Table 3. ¹H NMR spectral data of compounds **4-6**

	4		5		6	
POSITION	δ_{H} in ppm (<i>J</i> in Hz)					
1	5.24	d, (4.3)	5.2	d, (5.7)	5.26	d
3	7.29	s	7.38	s	7.39	s
5	3.09	m	2.86		3.1	m
6	2.19, 1.66	m	2.19, 1.40		2.22, 1.60	m
7	4.02	t	1.87, 1.19		4.03	t
8	1.86	m	1.98		1.86	m
9	1.99	m	1.72		2.02	m
10	1.07	d, (6.9)	1.08	d, (6.7)	1.08	d
CH₃COO					3.64	s
1'	4.62	d, (7.9)	4.66	d, (7.9)	4.65	d
2'	3.15	m	3.19	m	3.19	m
3'	3.43 – 3.16	m	3.40 – 3.33	m	3.40-3.27	m
4'	3.43 – 3.16	m	3.40 – 3.33	m	3.40-3.27	m
5'	3.43 – 3.16	m	3.40 – 3.33	m	3.40-3.27	m
6'	3.87, 3.63	m	3.89, 3.66	m	3.89, 3.64	m

Table 4. ^{13}C NMR spectral data of compounds **4-6**

	4	5	6
POSITION	δ_c		
1	98.25	98.55	98.36
3	152.9	152.96	152.84
4	114.6	114.6	114.64
5	33.15	36.22	32.87
6	43.47	34.16	43.39
7	75.95	35.01	75.86
8	42.9	37.35	42.86
9	47.45	48.94	48.95
10	14.23	21.68	14.26
11	170.1	170.1	170.18
CH₃COO			52.48
1'	100.79	100.94	100.66
2'	75.57	75.57	75.74
3'	78.82	78.83	78.6
4'	72.4	72.4	72.29
5'	79.14	79.15	78.97
6'	63.56	63.55	63.43

Table 5. ¹H, ¹³C NMR spectral data of compounds **7-8**

POSITION	7	8	7	8
	δ_{H} in ppm (<i>J</i> in Hz)		δ_{C}	
1	5.3 d (4.9)	5.3 d (5.2)	98.22	98.442
3	7.44 s	7.36 s	153.45	153.2
4			113.84	116.49
5	3.15 m	3.16 m	33.57	33.71
6	2.11, 1.88 m	2.34, 1.97 m	41.27	41.33
7	5.3 m	5.25 m	79.38	79.3
8	2.19 m	2.08 m	41.9	41.93
9	2.34 m	2.18 m	47.86	47.96
10	1.1 d (6.8)	1.02 d	14.57	14.64
11			170.15	169.68
CH ₃ COO	3.69 s		52.53	
1'	4.66 d (6.3)	4.66 d (7.8)	100.98	101
2'	3.55 – 3.44 m	3.42 – 3.2 m	75.56	75.57
3'	3.55 – 3.44 m	3.42 – 3.2 m	78.79	78.84
4'	3.55 – 3.44 m	3.42 – 3.2 m	72.39	72.44
5'	3.55 – 3.44 m	3.42 – 3.2 m	79.22	79.21
6'	3.86, 3.66 m	3.96, 3.66 m	63.58	63.61
1''			131.18	128.53
2''	7.28 s	7.2 s	113.05	112.49
3''			151.8	151.443
4''			150.75	150.21
5''	7.17 s	6.79 d (8.2)	118.03	117.27
6''	7.17 s	7.08 d (8.2)	124.29	127.14
7''	6.46 d (15.9)	6.37 d (15.9)	118.27	124.95
8''	7.63 d (15.9)	7.6 d (15.9)	146.98	147.58
9''			169.29	169.68
ArOCH ₃	3.9 s	3.85 s	57.5	57.26

1"	4.96 d, (7.4)	103.02
2"	3.55 – 3.44 m	75.53
3"	3.55 – 3.44 m	78.63
4"	3.55 – 3.44 m	72.02
5"	3.55 – 3.44 m	79.08
6"	3.93 – 3.83, 3.73 – 3.60 m	63.21

Table 6. ¹H NMR spectral data of compounds **9-11**

	9	10	11
POSITION	δ_{H} in ppm (<i>J</i> in Hz)		
1	5.54 d	5.49 d	5.52 d
3	7.59 d	7.41 d	7.45 d
5			2.84 m
6	1.71 m	2.96, 2.62 m	1.89, 1.66 m
7	4.36 m	9.66 s	3.53 m
8	5.54 m	5.72 m	5.75 m
9	2.69 dd	2.7 m	2.62 m
10	5.28 dt	5.26 dt	5.24 m
CH ₃ COO		3.68 s	3.69 s
1'	4.67 d	4.66 d	4.67 d
2'	3.15 m	3.38-3.14 m	3.38-3.10 m
3'	3.40-3.30 m	3.38-3.14 m	3.38-3.10 m
4'	3.40-3.30 m	3.38-3.14 m	3.38-3.10 m
5'	3.40-3.30 m	3.38-3.14 m	3.38-3.10 m
6'	3.88, 3.65 dd	3.88, 3.65 dd	3.89, 3.65 dd

Table 7. ^{13}C NMR spectral data of compounds **9-11**

	9	10	11
POSITION		δ_c	
1	98.69	96.95	97.93
3	154.7	153.15	153.67
4	106.77	108.75	111.79
5	29.2	26.68	30.94
6	26.7	43.71	33.85
7	70.49	206.81	61.29
8	134.08	132.81	136.00
9	44.57	43.83	45.50
10	121.61	120.71	119.48
11	169.26	169.4	169.61
CH ₃ COO		51.72	51.91
1'	100.41	98.69	100.27
2'	78.6	75.53	74.80
3'	79.12	76.25	78.14
4'	72.25	69.45	71.71
5'	75.45	72.49	78.57
6'	63.42	60.59	62.91

Table 8. ¹H, ¹³C NMR spectral data of compounds **12**

POSITION	H		C
	δ_{H} in ppm (<i>J</i> in Hz)		δ_{c}
1	5.56	d	98.51
3	7.53	s	155.02
4			100.96
5	3.09	m	31.79
6	2.42, 3.09	m	30.52
7	6.7	dd	157.76
8	5.75	m	136.408
9	2.78	m	46.21
10	5.30, 5.37	d	121.19
11			169.88
CH₃COO	3.71	s	52.8
1'	4.69	d	100.96
2'	3.21	dd	75.45
3'	3.33	m	79.1
4'	3.33	m	72.27
5'	3.33	m	79.15
6'	3.63, 3.89	dd	63.56
1''	5.48	d	98.15
3''	7.46	s	152.94
4''			100.96
5''	4.05	m	31.79
6''			144.09
7''	9.21	s	197.82
8''	5.56	m	136.219
9''	2.59	m	47.26
10''	5.03, 5.08	d	120.19
11''			169.88
CH₃COO'	3.58	s	52.47
1'''	4.67	d	100.58
2'''	3.21	dd	75.45
3'''			79.1
4'''	3.33	m	72.27
5'''			79.15
6'''	3.85	dd	63.41

Table 9. ^1H , ^{13}C NMR spectral data of compounds **13**

POSITION	H		C
	δ_{H} in ppm (J in Hz)		δ_{C}
1	5.43	d (1.7)	98.68
3	7.58	s	154.59
4			106.85
5	1.73 – 1.52	m	29.23
6	1.73 – 1.52	m	26.64
7	4.34, 4.27	m	68.49
8	5.52	m	134.05
9	2.66	m	44.68
10	5.28 – 5.22	m	121.76
11			169.14
1'	4.69	d (7.9)	100.465
2'	3.23 – 3.17	m	75.56
3'	3.47	m	78.63
4'	3.23 – 3.17	m	71.25
5'	3.40 – 3.35	m	77.66
6'	3.98, 3.72	m	68.23
1''	4.78	d (1.5)	102.61
2''			72
3''	3.40 – 3.35	m	73.05
4''	5.02	dt (15.0, 9.7)	76.33
5''	3.94	dq (9.9, 6.3)	70.41
6''	1.15	d (6.3)	18.95
1'''			128.48
2'''	7.19	d (1.9)	112.58
3'''			151.55
4'''			150.24
5'''	6.81	d (8.1)	117.35
6'''	7.08	dd (8.2, 1.8)	124.99
7'''	7.64	d (15.9)	147.89
8'''	6.39	d (15.9)	116.42
9'''			169.57
ArOCH ₃	3.86	s	57.32

Table 10. ¹H, ¹³C NMR spectral data of compounds **14**

POSITION	H		C
	δ_{H} in ppm (<i>J</i> in Hz)		δ_{C}
1	5.54	s	99.71
3	7.41	s	150.55
4	5.29, 4.83	d	109.76
5	3.05	ddd	
6	1.39, 2.26	m	32.3
7	5.16	dd (3.7, 9.8)	89.77
8	5.53	m	134.19
9	2.82	m	45.11
10	5.35	d (16.5)	123.45
11			166.68
1'			100.88
2'	3.28	m	75.33
3'	3.5	dt (5.73, 18.53)	78.12
4'	3.4	t (9.49, 9.49)	72.25
6'	3.92, 3.72	dd (1.98, 12.34), dd(6.02,12.38)	78.96
1''			178.78
2''	3.95	d (8.06)	68.32
3''	4.16	dq (12.4, 6.1)	80.61
4''	1.48	d (6.0)	20.93

Table 11. ^1H , ^{13}C NMR spectral data of compounds **15**

POSITION	H	C
	δ_{H} in ppm (J in Hz)	δ_{C}
2		128.99
3	4.62 d (15.3)	51.77
5	3.94 dd (12.2, 5.0)	58.12
6	3.45, 3.02 m	22.64
7		106.99
8		126.17
9	7.28 d (8.2)	117.85
10	7.14 – 7.08 m	119.29
11	7.02 dd (11.2, 4.2)	122.09
12	7.46 d (7.9)	110.87
13		137.21
14	2.42, 2.22 m	33.25
15	2.77	31.35
16		107.32
17	7.80 s	155.86
18	5.36, 5.29 – 5.21 m	118.44
19	5.83 m	133.86
20		44
21	5.89 d (9.2)	96.02
22		172.03
23		170.47
1'	4.79 d	99.13
2'	3.22-3.38 m	73.32
3'	3.22-3.38 m	76.65
4'	3.22-3.38 m	70.44
5'	3.22-3.38 m	77.53
6'	4.00, 3.66 m	61.78
CH ₃ COO	3.78 s	51.52

Table 12. ¹H, ¹³C NMR spectral data of compounds **16**

POSITION	H		C
	δ_{H} in ppm (<i>J</i> in Hz)		δ_{C}
1	5.57	s	97.73
3	7.55	s	154.36
4			110.38
5	3.18	m	33.76
6	3.07	m	30.6
6	2.51	m	30.6
7	6.84	t (7.3)	157.76
8	5.74	m	135.29
9	2.72	m	45.49
10	5.28	m	120.46
11			169
CH ₃ COO	3.7	s	51.82
1'	4.68	d (7.9)	100.25
1''	9.41	s	197
2'	3.19		74.77
2''			141.34
3'	3.36	d	78.12
3''	2.51	m	24.98
4'	3.25	d	71.6
4''	3.21	m	40.89
5'	3.32		78.63
6'	3.91	d (11.0)	62.98
	3.66	dd (11.8.6.4)	
Guanidine			158.76

4. HT22 세포주에서 neuroprotection 활성 검색

4.1. HT22 세포주 배양 및 glutamate 에 의한 독성 저해 활성 검색용 시약

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS) – Hyclone , UT, USA

Penicillin and Streptomycin, trypsin – Sigma, St.Louis, USA

Sulfanilamide, N-1-naphylethylenediamine dihydrochloride and phosphoric acid – Sigma, St.Louis, USA

4.2. HT22 세포주의 배양

HT22 세포주는 건국대학교 병원 노인성 뇌신경 질환 연구 센터에서 공급받아 10% FBS, 100 µg/mL penicillin and 100mg/mL streptomycin 을 포함하는 DMEM 을 배양액으로 하여 37°C 배양기에서 공기 (95%)와 CO₂ (5%)의 혼합기체를 지속적으로 공급해주며 배양하였다. 세포가 일정하게 자라면 trypsin 을 이용하여 세포를 배양용기에서 분리한 후 5.0 x 10³ cells/well 로 희석하여 배양용기에 이식하였다. 세포주는 2 일에 한 번씩 계대배양하여 사용하였다.

4.3. Glutamate 에 의한 신경독성 유도

HT22 세포를 5.0 x 10³ cells/well 로 희석하여 96 well plate 에 100 µL 씩 seeding 후 24 시간 후 시료를 농도 별로 배양 세포에 처리하였다. 1 시간 후에 4 mM (final concentration)의 glutamate 를 처리하여 세포 독성을 유도하였으며, 15 시간 후 MTT assay 로 세포 생존율을 측정하였다.

4.4. MTT assay

배양 중인 HT22 세포의 배양액에 MTT (5 mg/ml)를 배양액의 10%가 되도록 가하고 계속하여 1 시간 더 배양한 후 생성된 formazan 을 DMSO 로 녹여낸 다음 540nm 에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 측정하였다

4.5. 통계처리

통계적 유의성을 검토하기 위해 Control 로부터의 변동을 ANOVA test 에 의해 판정하였다. P 값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

B. 결과 및 고찰

1. 섬피불나무 뿌리에서의 물질 분리

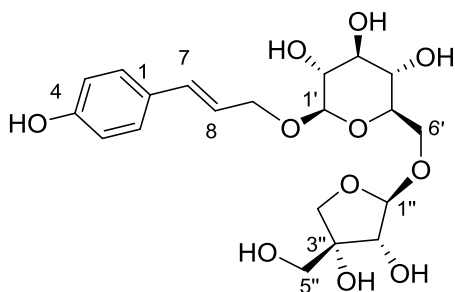
1.1. 화합물 1의 구조 분석

화합물 1은 노란색 결정으로 ESI-qTOF-MS 에서 m/z 443.1553 의 $[M-H]^-$ peak 를 확인하고 ^{13}C NMR spectrum 에서 탄소가 20 개로 나타나 분자식 $C_{20}H_{28}O_{11}$ 로 예상하였다.

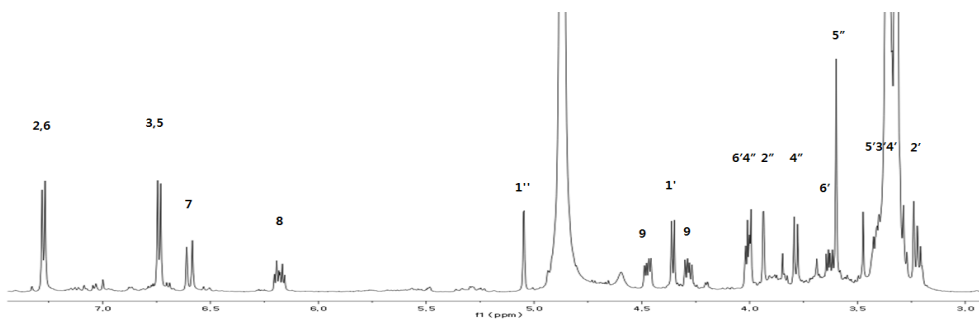
1H NMR spectrum 에서 δ 7.27 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2,6), δ 6.74 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3,5)에서 2 개의 doublet 을 통해 *para* di-substituted benzene ring 의 존재를 확인하였고 δ 6.60 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), δ 6.18 (1H, dt, $J = 15.8, 6.4$ Hz, H-8)을 통해 이중 결합이 *trans* - olefinic proton 을 확인하여 *p*-coumaryl group 을 확인 할 수 있었다. 또한, anomeric proton 1 \rightarrow 6 *O*-glycosidic linkage 를 형성하여 5ppm 부근으로 down-field 된 δ 5.05 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-1'')와 C-9 의 영향으로 downfield 된 chemical shift δ 4.36 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1')을 통해 당 2 개의 존재를 확인하였다.

^{13}C NMR spectrum 에서 δ 103.24 (C-1'), δ 111.14 (C-1'')을 통해 두 개의 anomeric carbon 의 존재와 quaternary carbon δ 80.69 (C-3'') 및 이들의 HMBC correlation 을 통해 apiose 가 말단당으로 결합된 이당체의 존재를 유추하였다 (Prasad et al., 2000). 이당체의 구성당을 확인하기 위해 산 가수분해로 당분석을 진행하였다. TLC (*n*-BuOH : acetone : pyridine : water = 10 : 10 : 5 : 5) 상에서 D-apiose (R_f : 0.7), D-glucose (R_f : 0.4)의 존재를 확인하였다. 그리고 HPLC 상의 UV spectrum 을 비교하여 D-apiose (R_t : 24.59 min), D-glucose (R_t : 12.63 min) (ACN 20-40 %, 30 min)에서 동일한 UV 피크를 확인 할 수 있었다. HMBC spectrum 으로 apiosyl group 의 δ 5.04 (H-1'') 이 δ 68.81 (C-6'')으로 correlation 을 형성하였고 H-1''의 coupling constant ($J = 2$ Hz)로부터 β -configuration 임을 확인하였다. glucosyl group 의 H-1'이 *p*-coumaryl group 의 C-9 (δ 71.29)와 HMBC correlation 을 확인하였으며, H-1'의 coupling constant ($J = 7.8$ Hz)로부터 glucose 의 배열을 β -configuration 로 결정하였다 (Prasad et al., 2000).

이상의 결과를 종합하여 화합물 1 을 *p*-coumaryl 9-*O*-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 6)]-*O*- β -D-glucopyranoside 로 동정하였다.



< ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz)>



< ^{13}C NMR (CD_3OD , 150 MHz)>

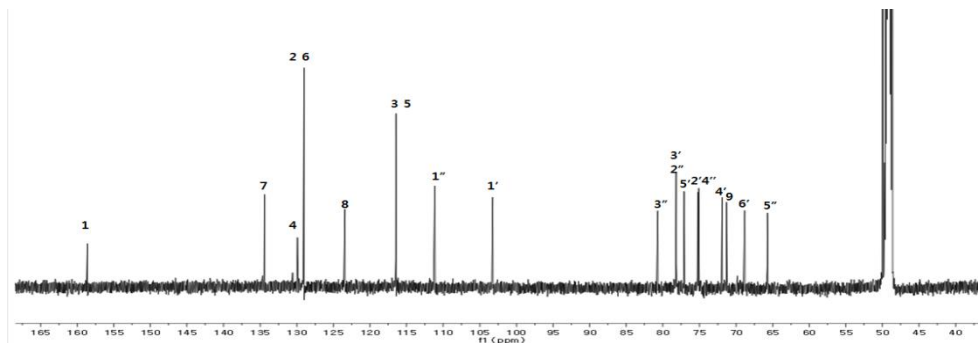


Figure 2. ^1H , ^{13}C NMR spectra of compound 1

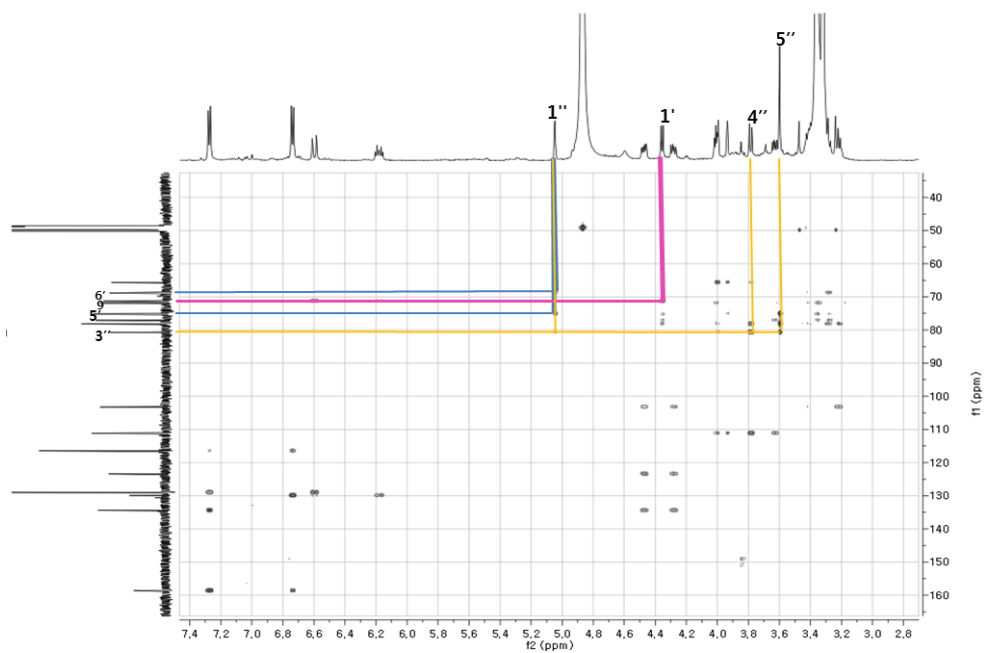


Figure 3. HMBC spectrum of compound 1

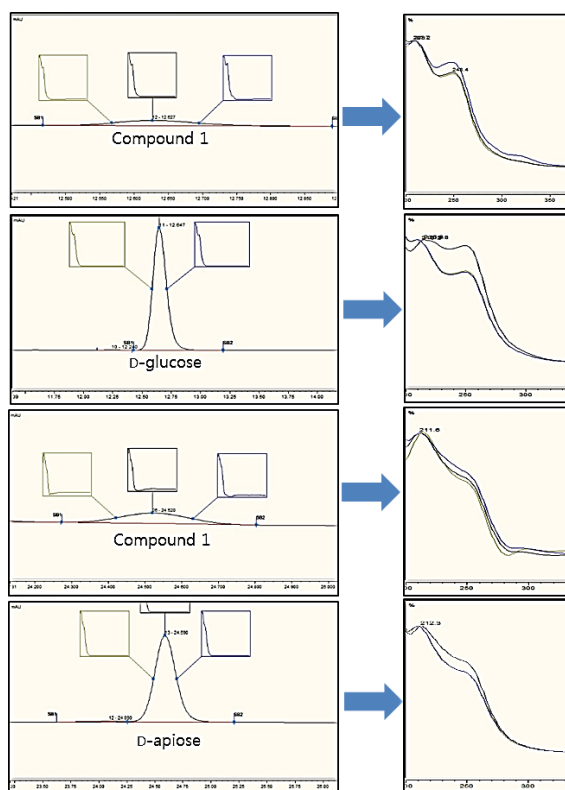


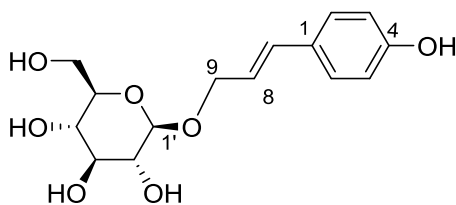
Figure 4. Sugar analysis of compound 1

1.2. 화합물 2의 구조 분석

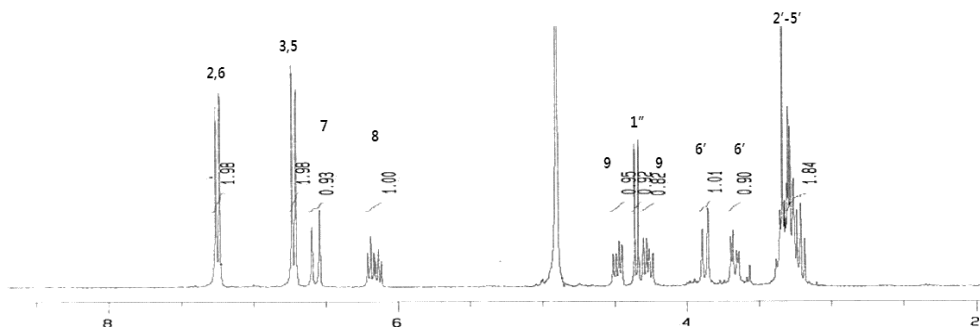
화합물 2는 흰색의 무정형 분말로 ESI-qTOF-MS에서 m/z 335.1090의 $[M+Na]^+$ peak를 확인하고 ^{13}C NMR spectrum에서 탄소가 15개로 나타나 분자식 $C_{15}H_{20}O_7$ 로 예상하였다.

1H NMR spectrum에서 δ 7.25 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2), δ 6.73 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3)에서 2개의 doublet을 통해 *para* di-substituted benzene ring의 존재를 확인하였고 δ 6.56 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-7), δ 6.15 (1H, dt, $J = 6.4, 15.8$ Hz, H-8)을 통해 이중 결합이 *trans*-configured olefinic proton을 확인하여 *p*-coumaryl group을 확인할 수 있었다. 또한, anomeric proton δ 4.35 (H-1')을 통해 당의 존재를 확인하였다. δ 4.48 (1H, dd, $J = 7.0, 12.5$ Hz, H-9), 4.26 (1H, dd, $J = 7.0, 12.5$ Hz, H-9)로부터 9번 위치에 당이 연결된 것으로 유추하였다.

이상의 결과와 1H NMR, ^{13}C NMR spectrum을 문헌치와 비교하여 화합물 2를 salidroside I로 동정하였다 (Mizuno et al, 1991).



< ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz)>



< ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz)>

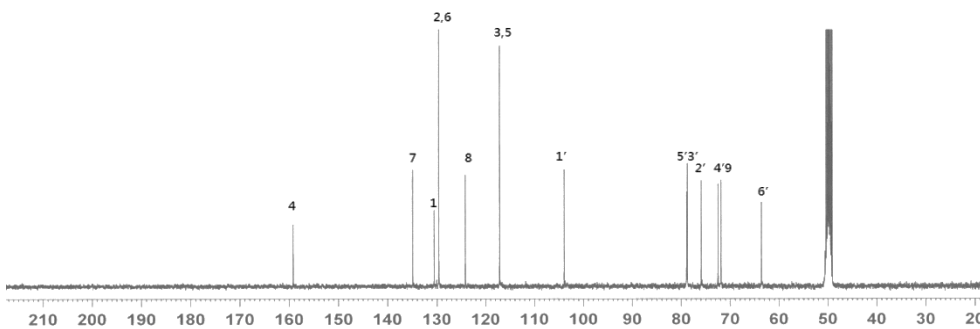


Figure 5. ^1H , ^{13}C NMR spectra of compound 2

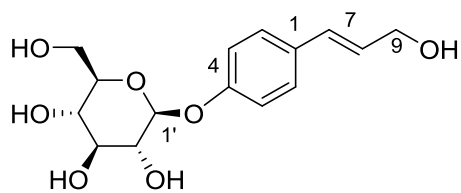
1.3. 화합물 3의 구조 분석

화합물 3은 무색의 결정으로 ESI-qTOF-MS에서 m/z 335.1092의 $[M+Na]^+$ peak를 확인하고, ^{13}C NMR spectrum에서 탄소가 15개로 나타나 분자식 $C_{15}H_{20}O_7$ 로 예상하였다.

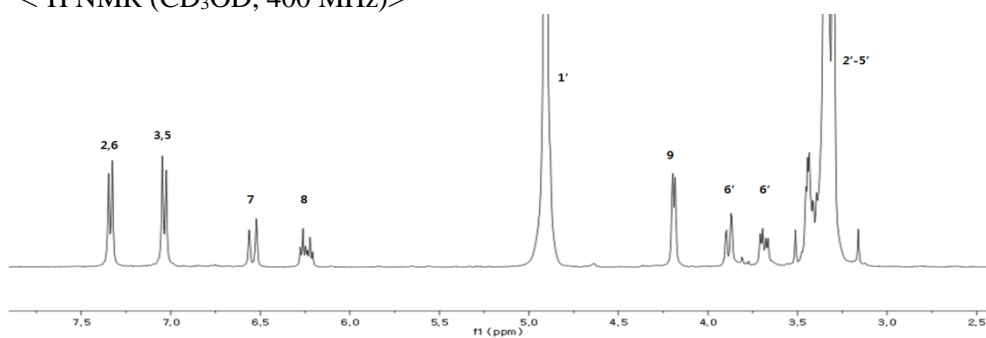
1H NMR spectrum에서 δ 7.34 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2), δ 7.04 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3)에서 2개의 doublet을 통해 *para* di-substituted benzene ring의 존재를 확인하였고 δ 6.54 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), δ 6.24 (1H, dt, $J = 15.8, 5.8$ Hz, H-8)을 통해 이중 결합이 *trans*-configured olefinic proton을 확인하여 *p*-coumaryl group을 확인할 수 있었다. δ 4.19 (H-9)의 split pattern이 화합물 2와 다른 것으로 확인되어, 화합물 3의 당의 결합위치가 다를 것으로 추론하였다. HMBC spectrum에서 δ 159.44 (C-4)와 δ 4.88 (H-1')의 glucose anomeric proton과의 correlation을 확인하여 glucose의 연결 부위를 결정하였다.

HMBC spectrum에서 δ 159.44 (C-4)와 δ 4.88 (H-1')의 glucose anomeric proton과의 correlation을 확인하여 glucose의 연결 부위를 결정하였다.

이상의 결과와 문헌치를 비교하여 화합물 3을 *p*-glucocoumaryl alcohol로 동정하였다 (Terashima et al., 1996).



<¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz)>



<¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz)>

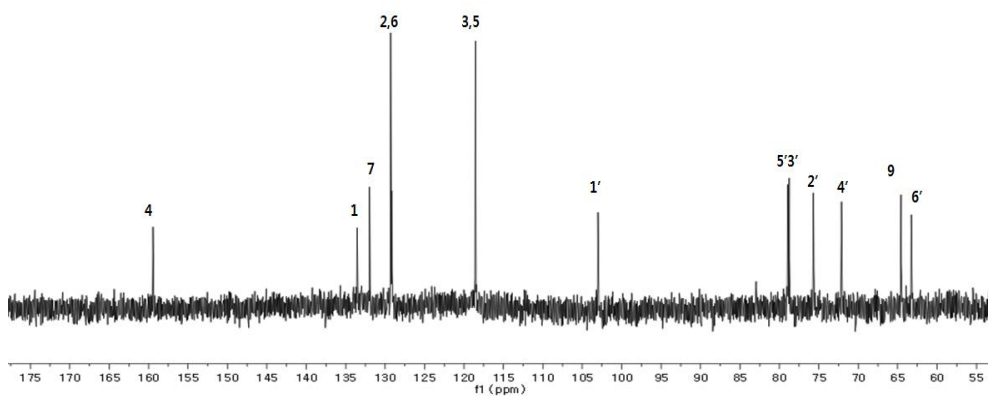


Figure 6. ¹H, ¹³C NMR spectra of compound **3**

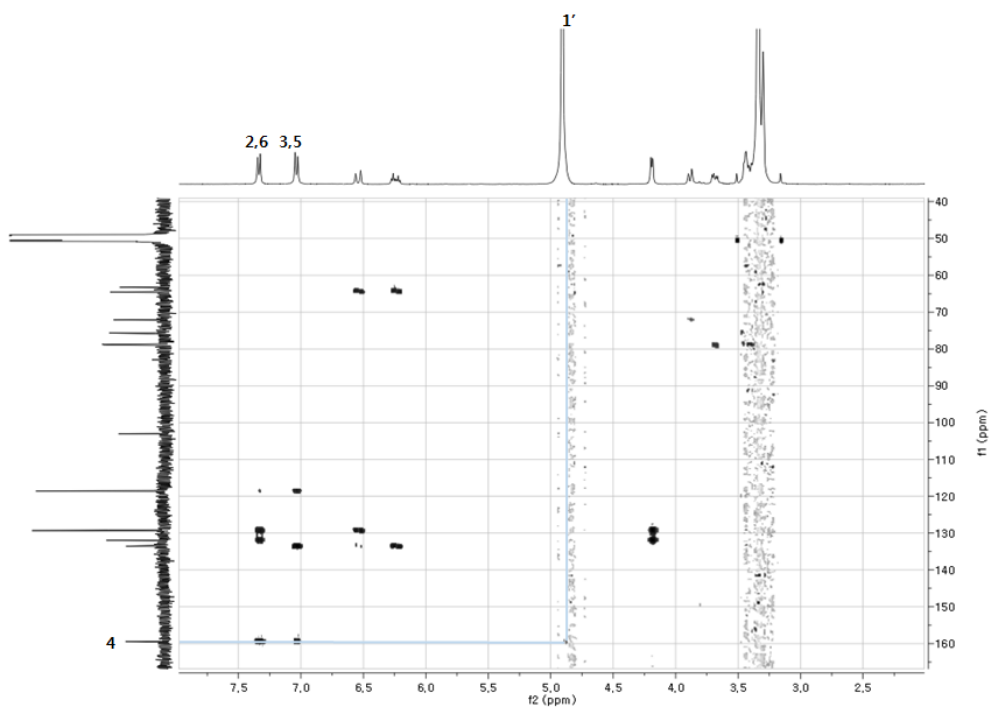


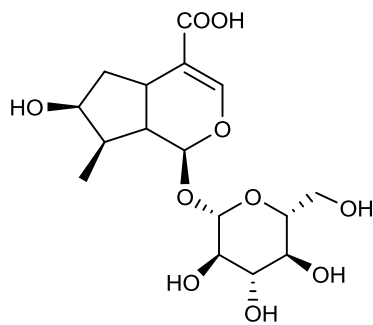
Figure 7. HMBC spectrum of compound 3

1.4. 화합물 4의 구조 분석

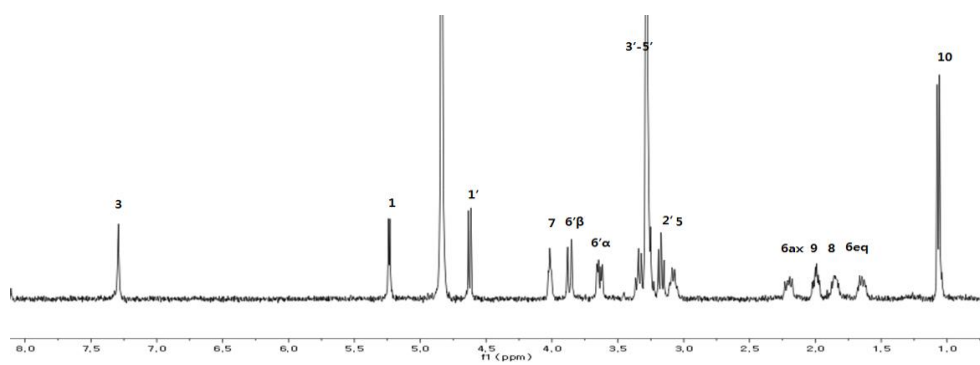
화합물 4는 무색의 결정으로 ESI-qTOF-MS에서 m/z 375.1293의 [M-H]⁻ peak를 확인하고 ¹³C NMR spectrum에서 탄소가 16개로 나타나 분자식 C₁₆H₂₄O₁₀로 예상하였다.

¹H NMR spectrum에서 δ 7.29 (1H, s, H-3)의 tri-substituted olefinic proton, δ 1.07 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-10)의 doublet 피크와 δ 5.24 (1H, d, $J = 4.3$ Hz, H-1)의 acetal proton을 통해 화합물 4가 iridoid 골격의 화합물임을 유추하였다. 또한, δ 4.02 (1H, t, H-7)로 hydroxyl 기와 anomeric proton δ 4.62 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1')을 통해 당의 존재를 확인하였다. ¹³C NMR spectrum에서 δ 173.1 (C-11)의 carboxylic acid 및 δ 75.95 (C-7)의 hydroxyl carbon 존재를 확인하였다. 또한 δ 152.9 (C-3), δ 114.6 (C-4)의 olefinic carbon을 확인하였고 δ 98.25 (C-1)의 acetal carbon을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하여 ¹H NMR, ¹³C NMR spectrum을 문헌치와 비교하여 화합물 4를 loganic acid로 동정하였다 (Zhang et al., 2003).



< ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz)>



< ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz)>

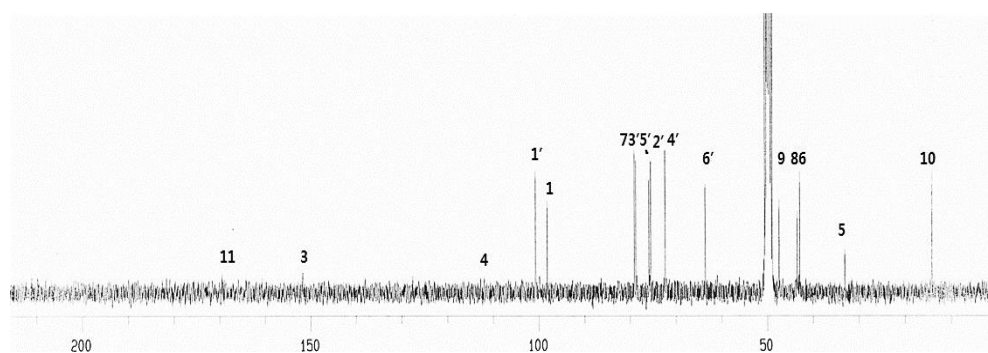


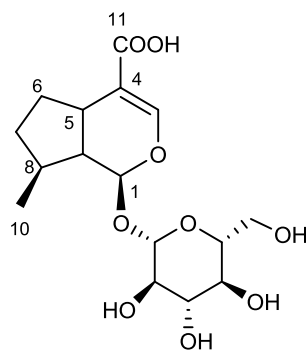
Figure 8. ^1H , ^{13}C NMR spectra of compound **4**

1.5. 화합물 5의 구조 분석

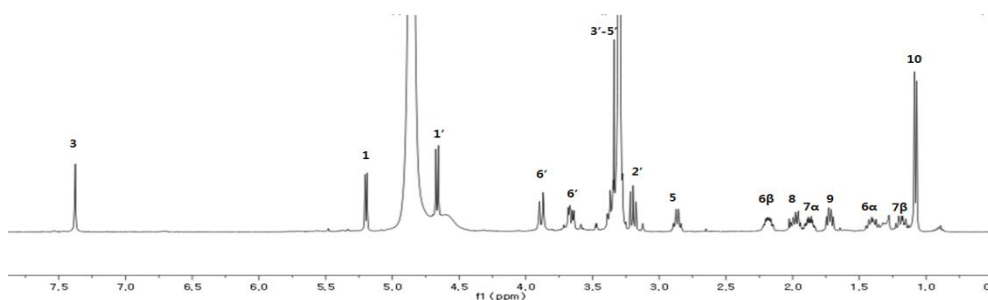
화합물 5는 흰색의 무정형 분말로 ESI-qTOF-MS에서 m/z 359.1331의 $[M-H]^-$ peak를 확인하고 ^{13}C NMR spectrum에서 탄소가 16개로 나타나 분자식 $C_{16}H_{24}O_9$ 로 예상하였다.

1H NMR spectrum에서 δ 7.38 (1H, s, H-3)의 tri-substituted olefinic proton, δ 1.08 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-10)의 doublet 피크와 δ 5.2 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-1)의 acetal proton을 통해 화합물 5가 iridoid 골격의 화합물임을 유추하였다. 또한, 화합물 4와 비교하였을 때 δ 1.19, 1.87 (H-7)로 7번 위치에 hydroxy 치환기가 부재함을 확인하였다. Anomeric proton δ 4.66 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1')을 통해 당의 존재를 확인하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 δ 170.1 (C-11)의 carboxylic acid 존재를 확인하였다. 또한 δ 152.96 (C-3), δ 114.6 (C-4)의 olefinic carbon을 확인하였고 δ 98.25 (C-1)의 acetal carbon을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하여 1H NMR, ^{13}C NMR spectrum을 문헌치와 비교하여 화합물 5를 7-deoxy loganic acid로 동정하였다 (Teng et al., 2005).



< ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz)>



< ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz)>

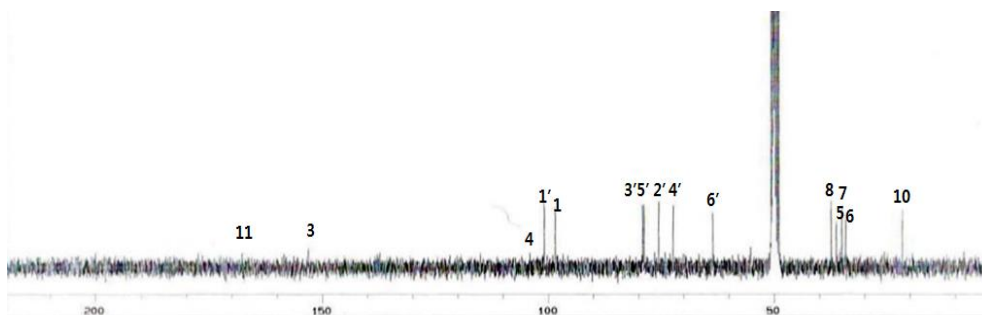


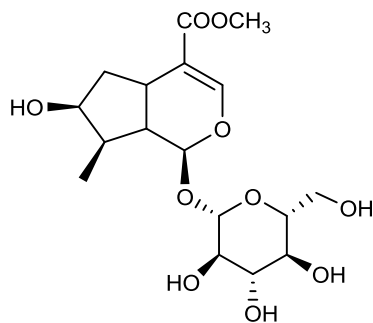
Figure 9. ^1H , ^{13}C NMR spectra of compound 5

1.6. 화합물 6의 구조 분석

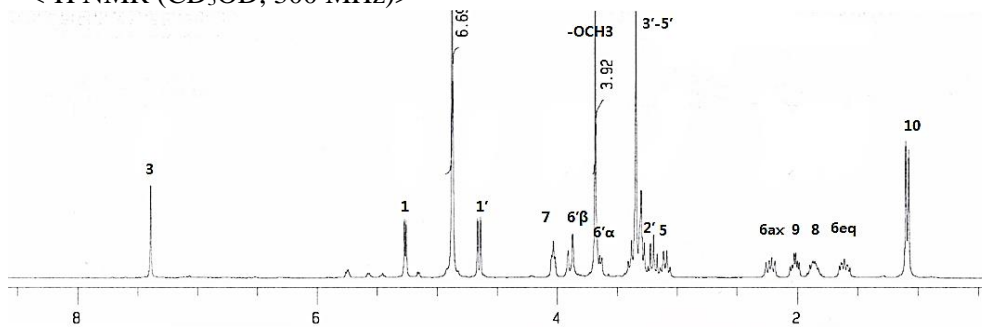
화합물 6는 흰색의 무정형 분말로 ESI-qTOF-MS에서 m/z 389.1447의 $[M-H]^-$ peak를 확인하고 ^{13}C NMR spectrum에서 탄소가 17개로 나타나 분자식 $C_{17}H_{26}O_{10}$ 로 예상하였다.

1H NMR spectrum에서 δ 7.39 (1H, s, H-3)의 tri-substituted olefinic proton, δ 1.08 (3H, d, H-10)의 doublet 피크와 δ 5.26 (1H, d, H-1)의 acetal proton을 통해 화합물 6이 iridoid 골격의 화합물임을 유추하였다. 또한, δ 4.03 (1H, t, H-7)로 hydroxyl 기와 anomeric proton δ 4.65 (1H, d, H-1')을 통해 당의 존재를 확인하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 δ 170.18 (C-11)의 carboxyl carbon 과 δ 52.48 (CH_3COO)의 methoxy carbon을 확인하였다. 또한, δ 152.84 (C-3), δ 114.64 (C-4)의 olefinic carbon을 확인하였고 δ 98.36 (C-1)의 acetal carbon을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하여 1H NMR, ^{13}C NMR spectrum을 문헌치와 비교하여 화합물 6을 loganin으로 동정하였다 (Prasad et al., 2000).



< ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz)>



< ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz)>

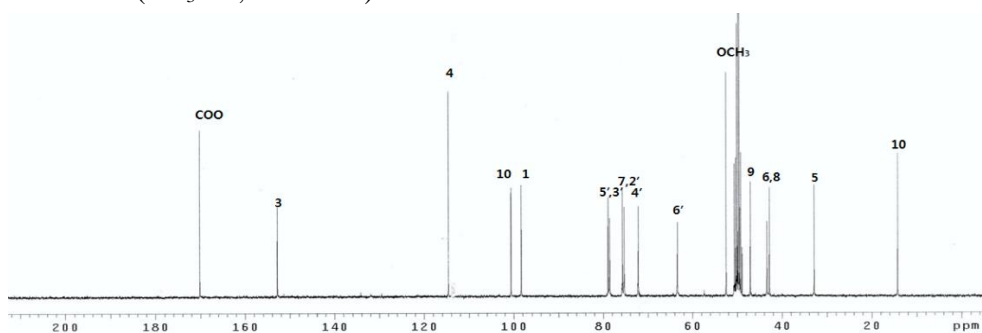


Figure 10. ^1H , ^{13}C NMR spectra of compound **6**

1.7. 화합물 7의 구조 분석

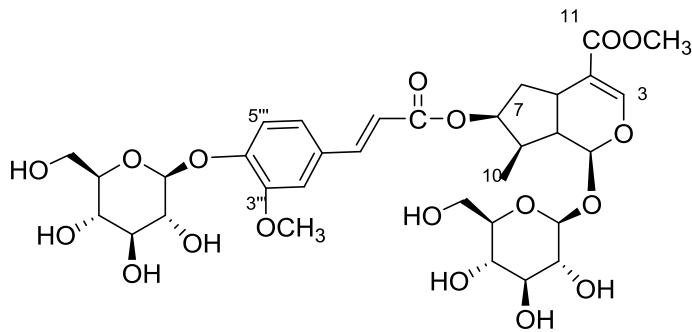
화합물 7은 흰색의 무정형 분말로 ESI-qTOF-MS에서 m/z 727.2468의 $[M-H]^-$ peak를 확인하고 ^{13}C NMR spectrum에서 탄소가 33개로 나타나 분자식 $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{O}_{18}$ 로 예상하였다.

^1H NMR spectrum에서 δ 7.44 (1H, s, H-3)의 tri-substituted olefinic proton, δ 1.1 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-10)의 doublet 피크와 δ 5.3 (1H, d, $J = 4.9$ Hz, H-1)의 acetal proton을 통해 화합물 7이 iridoid 골격의 화합물임을 유추하였다. 그리고 anomeric proton δ 4.66 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-1'), δ 4.96 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1'')을 통해 두 개의 당의 존재를 확인하였다. δ 6.46 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7''), δ 7.63 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'')을 통해 *trans*-olefinic proton을 확인하였고, δ 7.28 (1H, s, H-2''), δ 7.17 (2H, s, H-5'', 6'')의 두 broad singlet peak를 통해 1,3,4-tri-substituted benzene ring을 확인하였다. δ 3.90 (3H, s, CH_3OAr)로부터 benzene ring에 치환된 methoxy 그룹의 존재를 확인하였고 *trans*-feruloyl group을 결정하였다.

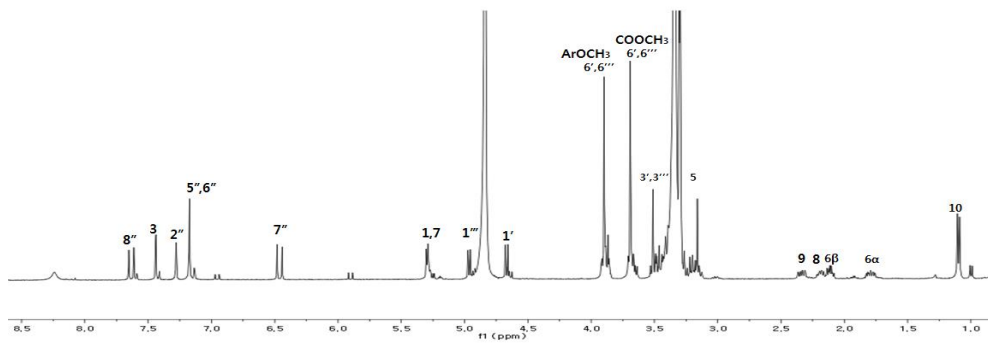
^{13}C NMR spectrum에서는 δ 79.38 (C-7)으로부터 화합물 4와 비교하여 7번 위치에 치환된 acyloxy 그룹의 영향임을 유추하였다.

HMBC spectrum에서 δ 3.90 (3H, s, ArOCH_3)와 δ 151.95 (C-3'')의 correlation을, δ 3.70 (CH_3COO)는 δ 170.36 (C-11), δ 7.44 (H-3)의 correlation을 확인하여 4번 위치에 연결된 methylester를 확인하였다. 또한, δ 7.63 (H-8'')은 δ 169.29 (C-9'')의 acyl-CO와 결합하고 δ 5.3 (H-7)와 ester bond로 연결됨을 확인하였다. 당의 연결은 δ 150.75 (C-4'')와 δ 4.97 (H-1'')의 correlation으로 4''번 위치에 glucose의 연결을 확인하였고 δ 98.42 (C-1)와 δ 4.68 (H-1')의 correlation으로 iridoid 배당체를 결정하였다.

이상의 결과를 종합하여 ^1H NMR, ^{13}C NMR spectrum을 문헌치와 비교하여 화합물 7을 periclymenoside로 동정하였다 (Calis et al., 1984).



< ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz)>



< ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz)>

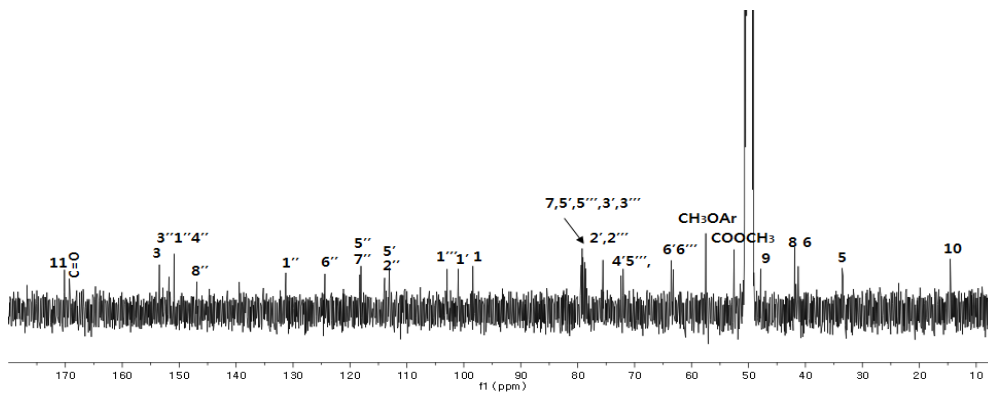


Figure 11. ^1H , ^{13}C NMR spectra of compound 7

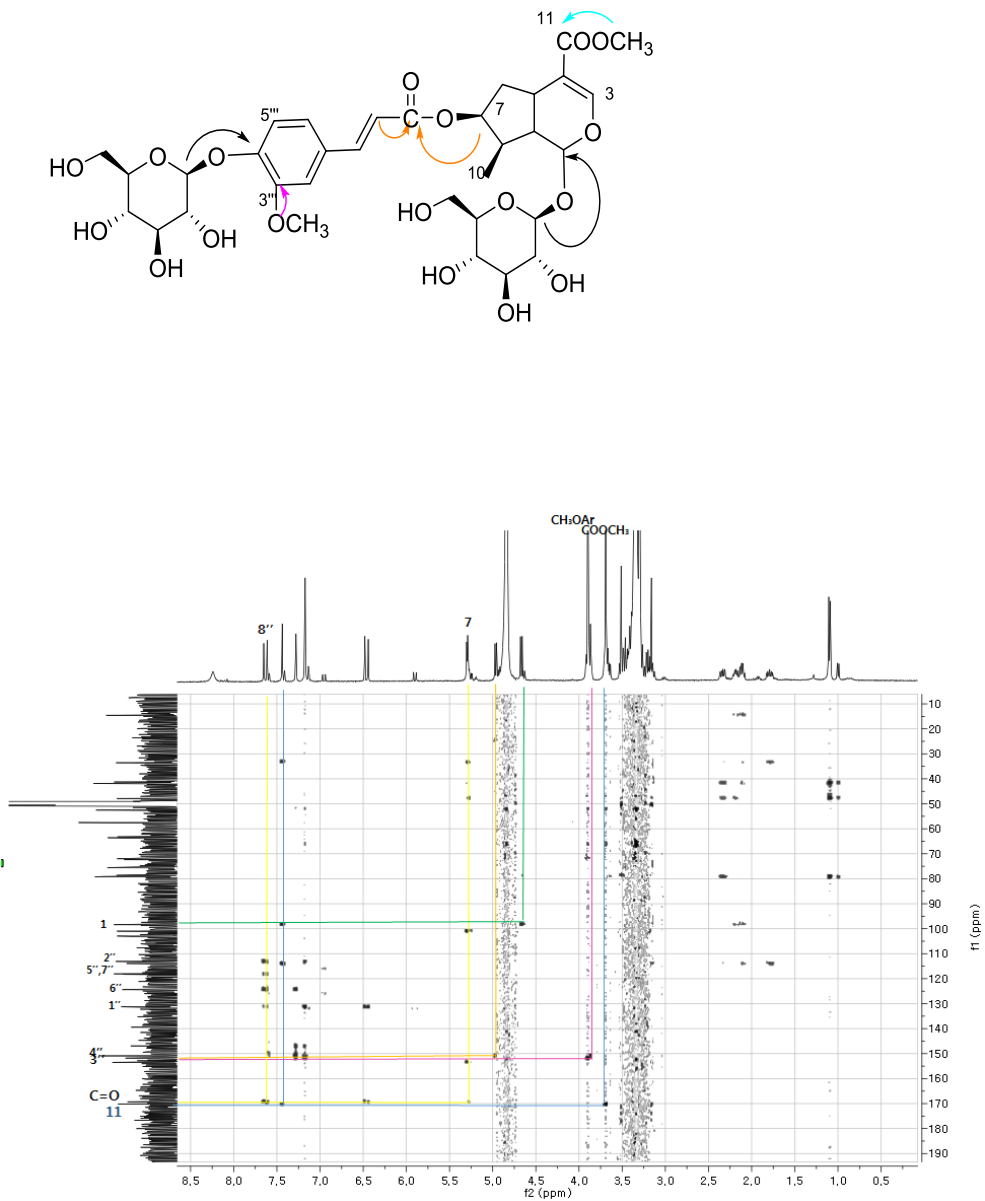


Figure 12. HMBC spectrum of compound 7

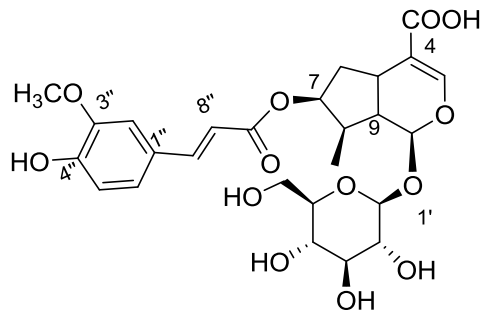
1.8. 화합물 8의 구조 분석

화합물 8는 무색의 무정형분말로 ESI-qTOF-MS에서 m/z 551.1756의 $[M-H]^-$ peak를 확인하고 ^{13}C NMR spectrum에서 탄소가 26개로 나타나 분자식 $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$ 로 예상하였다.

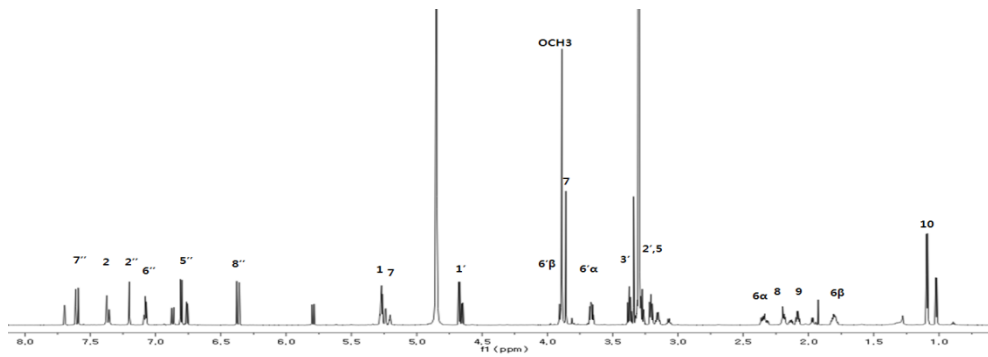
^1H NMR spectrum에서 δ 7.36 (1H, s, H-3)의 tri-substituted olefinic proton, δ 1.02 (3H, d, H-10)의 doublet 피크와 δ 5.3 (1H, d, H-1)의 acetal proton을 통해 화합물 8이 iridoid 골격의 화합물임을 유추하였다. 그리고 anomeric proton δ 4.66 (1H, d, H-1')을 통해 당의 존재를 확인하였다. δ 6.37 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7''), δ 7.6 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'')을 통해 *trans*-olefinic proton을 확인하였고, δ 7.2 (1H, s, H-2''), δ 6.79 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5''), δ 7.08 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6'')을 통해 1,3,4-tri-substituted benzene ring을 확인하였다. δ 3.85 (3H, s, CH_3OAr)로부터 benzene ring에 치환된 methoxy 그룹의 존재를 확인하였고 *trans*-feruloyl group을 결정하였다.

^{13}C NMR spectrum에서 δ 169.68 (C-11)의 carboxylic acid 및 δ 79.30 (C-7)으로 7번 위치에 carboxyl 기의 연결을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하여 ^1H NMR, ^{13}C NMR spectrum을 문헌치와 비교하여 화합물 8을 7-O-*E*-feruloylloganin acid로 동정하였다 (Otsuka et al., 1996).



< ^1H NMR (CD_3OD , 800 MHz)>



< ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz)>

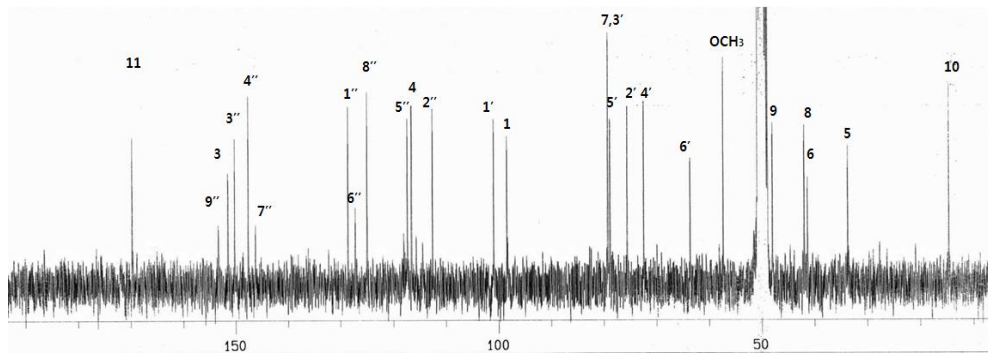


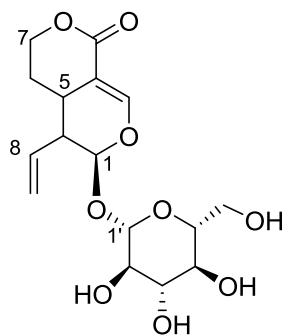
Figure 13. ^1H , ^{13}C NMR spectra of compound **8**

1.9. 화합물 9의 구조 분석

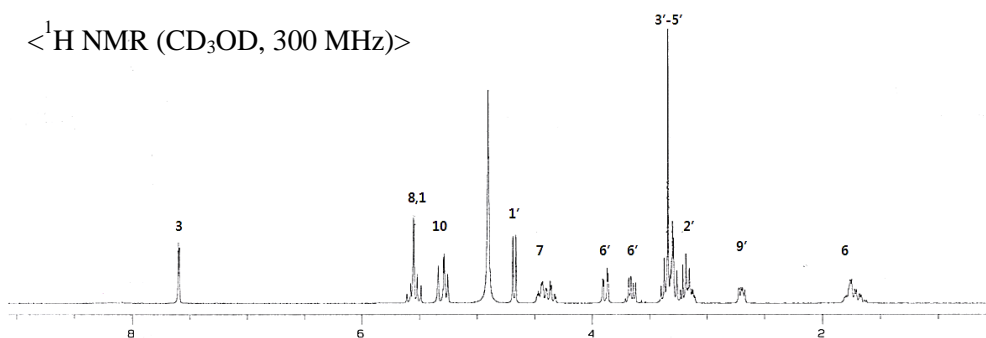
화합물 9는 흰색의 무정형분말로 ESI-qTOF-MS에서 m/z 357.1180의 $[M-H]^-$ peak를 확인하고 ^{13}C NMR spectrum에서 탄소가 16개로 나타나 분자식 $C_{16}H_{22}O_9$ 로 예상하였다.

1H NMR spectrum에서 δ 7.59 (1H, s, H-3)의 tri-substituted olefinic proton을 확인하였고, δ 5.54 (1H, m, H-8)의 methine, δ 5.28 (2H, dt, H-10)의 exomethylene 및 δ 5.54 (1H, d, H-1)의 acetal proton 으로부터 화합물 9가 secoiridoid 골격임을 확인하였다. 그리고 δ 1.71 (2H, m, H-6)의 methylene와 δ 4.36 (2H, m, H-7)의 oxymethylene의 존재로부터 환을 형성한 secoiridoid임을 확인하였으며, anomeric proton δ 4.67 (1H, d, H-1')을 통해 당의 존재를 확인하였다. ^{13}C NMR spectrum에서 δ 169.26 (C-11)으로 11번 위치의 carboxyl기를 확인하였다.

이상의 결과를 종합하여 1H NMR, ^{13}C NMR spectrum을 문헌치와 비교하여 화합물 9를 sweroside로 동정하였다 (Prasad et al., 2000).



<¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz)>



<¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz)>

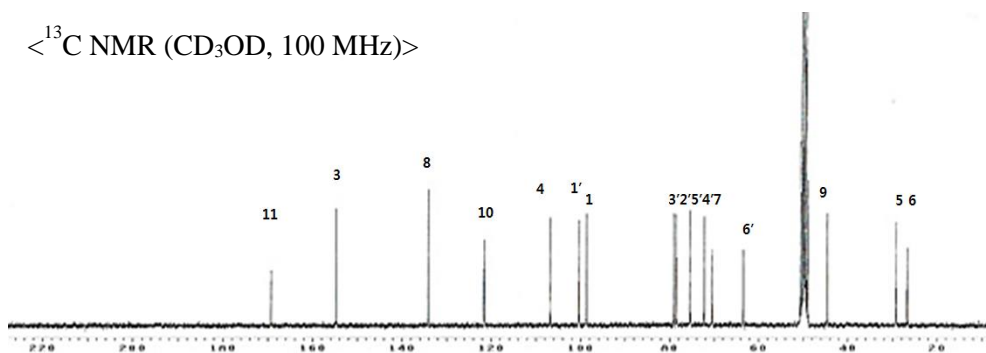


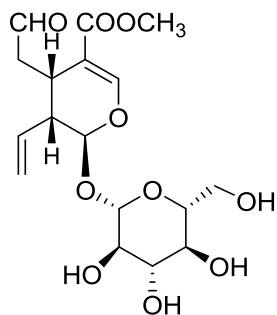
Figure 14. ¹H, ¹³C NMR spectra of compound **9**

1.10. 화합물 **10** 의 구조 분석

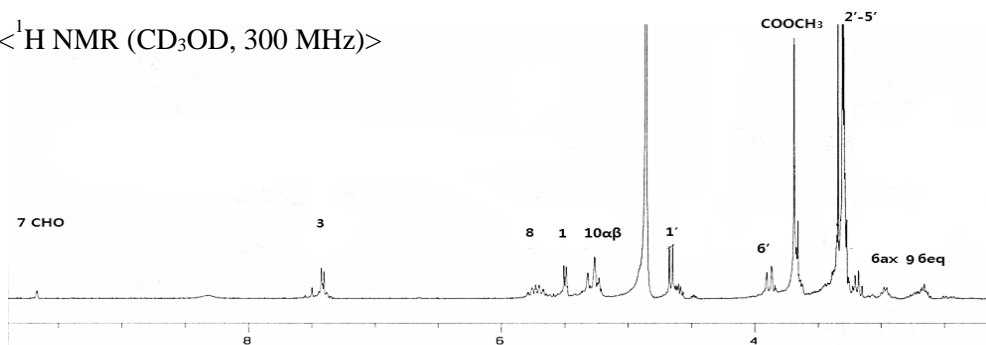
화합물 **10** 은 흰색의 무정형분말로 ESI-qTOF-MS 에서 m/z 433.1349 의 $[M+HCOO]^-$ peak 를 확인하고 ^{13}C NMR spectrum 에서 탄소가 17 개로 나타나 분자식 $C_{17}H_{24}O_{10}$ 로 예상하였다.

1H NMR spectrum 에서 δ 7.41 (1H, s, H-3)의 tri-substituted olefinic proton 을 확인하였고, δ 5.72 (1H, m, H-8)의 methine, δ 5.26 (2H, dt, H-10)의 exomethylene 및 δ 5.49 (1H, d, H-1)의 acetal proton 으로부터 화합물 **10** 이 secoiridoid 골격임을 확인하였다. 그리고 δ 2.62 (1H, m, H-6b), 2.96 (1H, m, H-6a)의 methylene 과 δ 9.66 (s, H-7)로부터 aldehyde proton 을 확인하였다. 또한, anomeric proton δ 4.66 (1H, d, H-1')을 통해 당의 존재를 확인하였다. ^{13}C NMR spectrum 에서 δ 169.4 (C-11)의 carboxyl carbon 과 δ 51.72 (CH_3COO)의 methoxy carbon 을 확인하여 11 번 위치의 methylester 기를 확인하였다.

이상의 결과를 종합하여 1H NMR, ^{13}C NMR spectrum 을 문헌치와 비교하여 화합물 **10** 을 secologanin 으로 동정하였다 (Tietze et al., 1988).



<¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz)>



<¹³C NMR (D₂O, 125 MHz)>

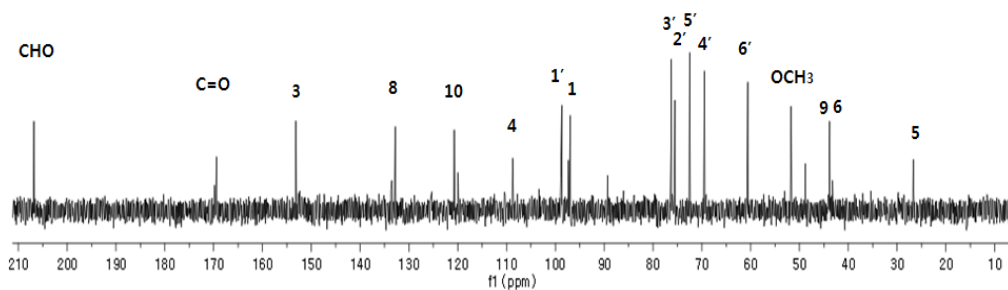


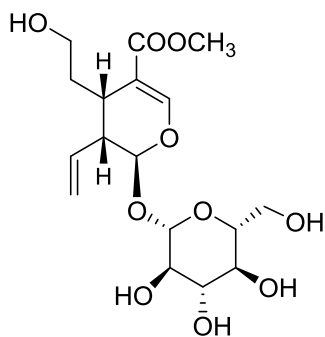
Figure 15. ¹H, ¹³C NMR spectra of compound **10**

1.11. 화합물 **11** 의 구조 분석

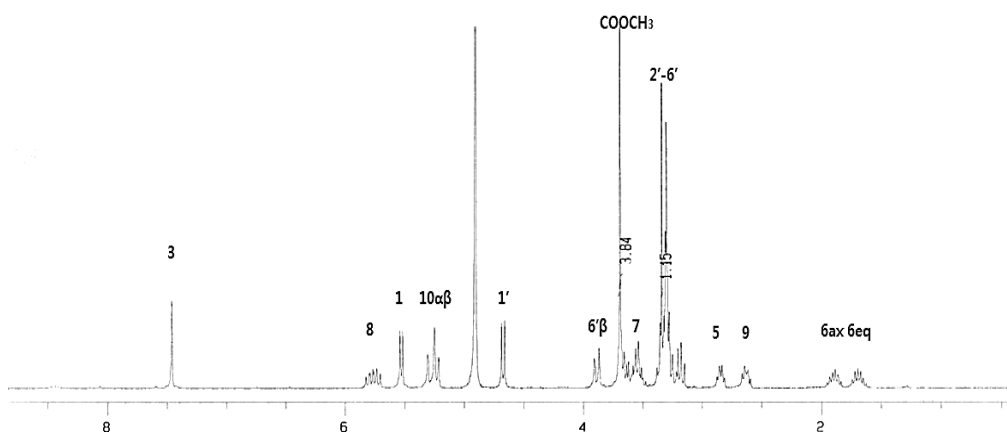
화합물 **11** 은 노란색 시럽으로 ESI-qTOF-MS 에서 m/z 389.1432 의 $[M-H]^-$ peak 를 확인하고 ^{13}C NMR spectrum 에서 탄소가 17 개로 나타나 분자식 $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ 로 예상하였다.

^1H NMR spectrum 에서 δ 7.45 (1H, s, H-3)의 tri-substituted olefinic proton 을 확인하였고, δ 5.75 (1H, m, H-8)의 methine, δ 5.24 (2H, dt, H-10)의 exomethylene 및 δ 5.52 (1H, d, H-1)의 acetal proton 으로부터 화합물 **11** 이 secoiridoid 골격임을 확인하였다. 그리고 δ 1.89 (1H, m, H-6a), δ 1.66 (1H, m, H-6b)의 methylene 과 δ 3.53 (2H, m, H-7)로부터 hydroxyl 기가 연결된 oxymethylene 을 확인하였다. 또한, anomeric proton δ 4.67 (1H, d, H-1')을 통해 당의 존재를 확인하였다. ^{13}C NMR spectrum 에서 δ 169.61 (C-11)의 carboxyl carbon 과 δ 51.91 (CH_3COO)의 methoxy carbon 을 확인하여 11 번 위치의 methylester 기를 확인하였다.

이상의 결과를 종합하여 ^1H NMR, ^{13}C NMR spectrum 을 문헌치와 비교하여 화합물 **11** 을 secologanol 로 동정하였다 (Mpondo et al., 1989).



< ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz)>



< ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz)>

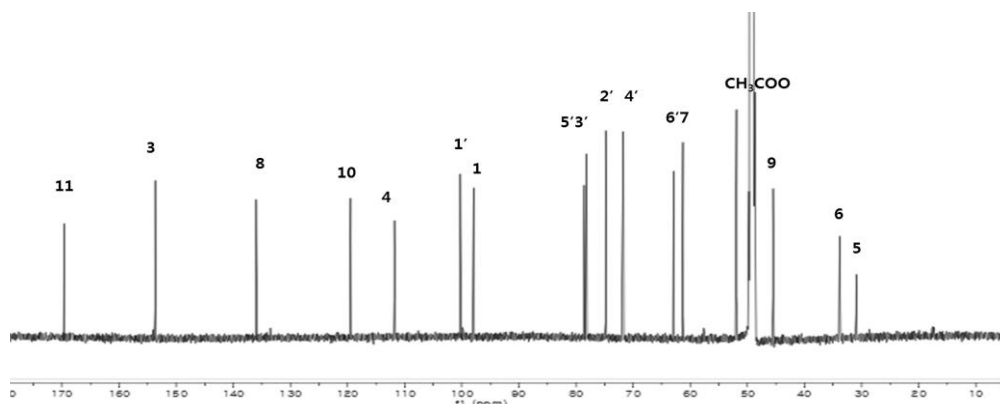


Figure 16. ^1H , ^{13}C NMR spectra of compound **11**

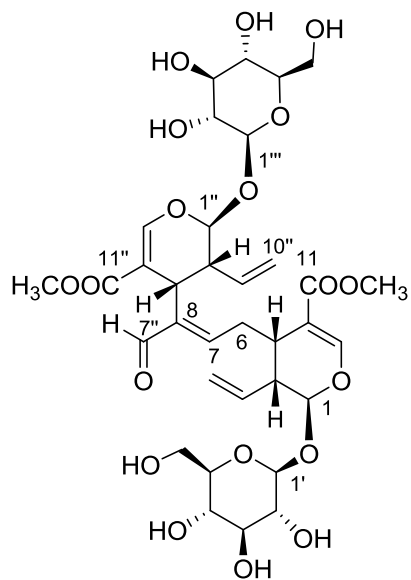
1.12. 화합물 12의 구조 분석

화합물 12는 흰색의 무정형분말로 ESI-qTOF-MS에서 m/z 757.2571의 $[M-H]^-$ peak를 확인하고 ^{13}C NMR spectrum에서 탄소가 34개로 나타나 분자식 $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{O}_{19}$ 로 예상하였다.

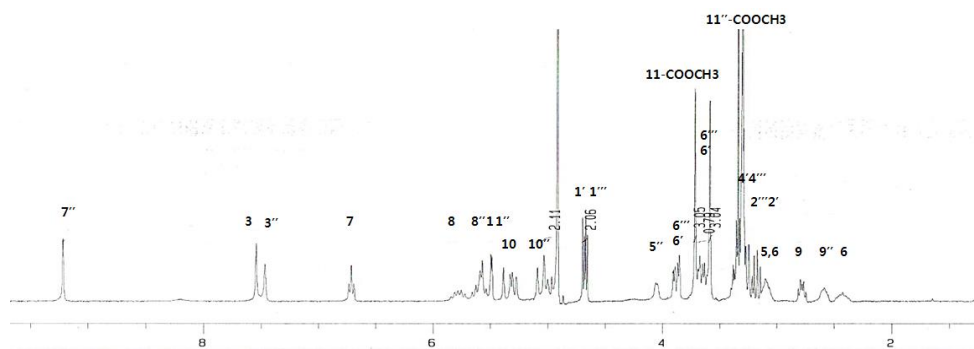
^1H NMR spectrum에서 특징적으로 쌍을 이루어 피크들이 존재함을 보였다. δ 7.53 (H-3), 7.46 (H-3'')의 tri-substituted olefinic proton과 δ 5.75 (H-8), δ 5.56 (H-8''), δ 5.30, 5.37 (H-10), δ 5.03, 5.08 (H-10'')의 olefinic proton, δ 5.56 (1H, d, H-1), δ 5.48 (1H, d, H-1'')의 acetal proton, δ 3.71 (3H, s, H-11), δ 3.58 (3H, s, H-11'')의 methoxy를 확인하여 화합물 12가 secologanin dimer 골격을 이루고 있음을 확인하였다. 또한, tri-substituted olefin proton의 δ 6.71 (H-7)를 확인하고 δ 9.21 (1H, s, C-7'')의 aldehyde를 문헌에 보고된 (Z)-aldosecologanin의 aldehyde δ 10.2와 (E)-aldosecologanin의 aldehyde δ 9.22를 비교하여 E-form으로 존재함을 결정하였다. 그리고 anomeric proton δ 4.69 (1H, d, H-1'), δ 4.67 (1H, d, H-1'')을 통해 두 개의 당의 존재를 확인하였다.

^{13}C NMR spectrum에서 δ 169.88 (C-11), δ 169.88 (C-11'')의 carboxyl carbon과 δ 52.8 (CH_3COO), δ 52.47 ($\text{CH}_3\text{COO}'$)의 methoxy carbon을 확인하여 2개의 methylester기를 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 ^1H NMR, ^{13}C NMR spectrum을 문헌치와 비교하여 화합물 12를 (E)-Aldosecologanin로 동정하였다 (Machida et al., 2002).



< ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz)>



< ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz)>

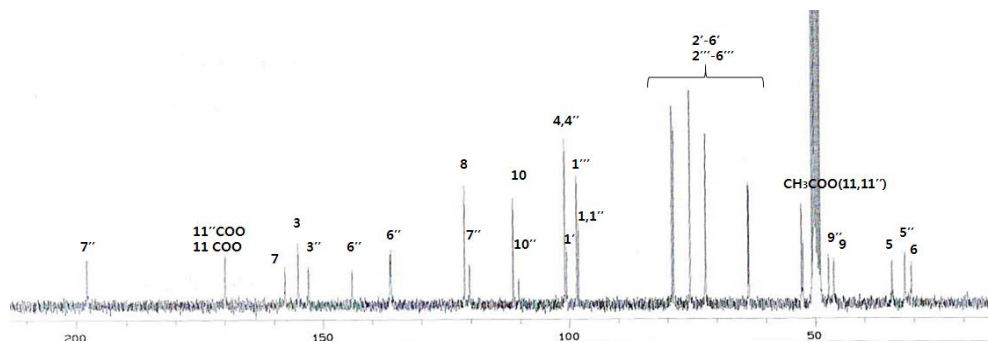


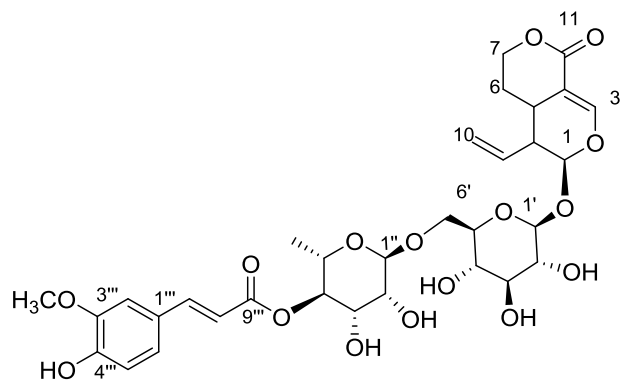
Figure 17. ^1H , ^{13}C NMR spectra of compound 12

1.13. 화합물 **13** 의 구조 분석

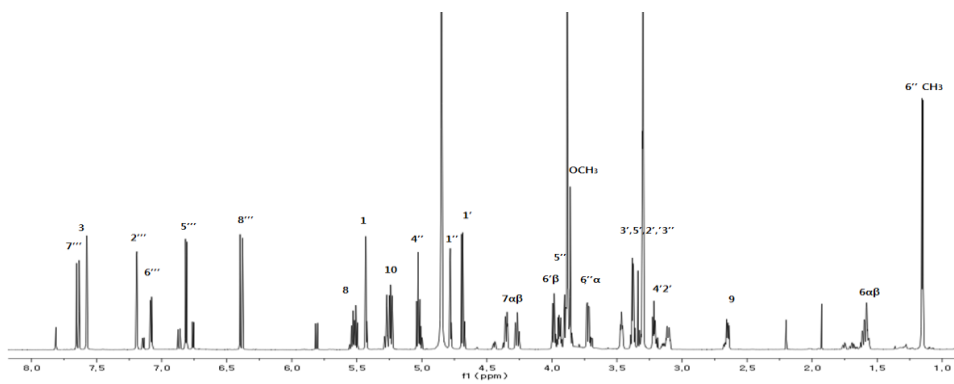
화합물 **13** 은 무색의 무정형 분말로 ESI-qTOF-MS 에서 m/z 679.2248 의 [M-H]⁻ peak 를 확인하고 ¹³C NMR spectrum 에서 탄소가 32 개로 나타나 분자식 C₃₂H₄₀O₁₆ 로 예상하였다.

¹H NMR spectrum 에서 δ 7.58 (1H, s, H-3)의 tri-substituted olefinic proton 을 확인하였고, δ 5.52 (1H, m, H-8)의 methine, δ 5.22-5.28 (2H, m, H-10)의 exomethylene 및 δ 5.43 (1H, d, H-1)의 acetal proton 으로부터 화합물 **13** 이 secoiridoid 골격임을 확인하였다. 그리고 δ 1.52-1.73 (2H, m, H-6) 의 methylene 과 δ 4.34 (1H, m, H-7), δ 4.27 (1H, m, H-7)의 oxymethylene 의 존재로부터 환을 형성한 sweroside moiety 를 확인하였다. 또한, anomeric proton δ 4.69 (1H, d, H-1'), δ 4.78 (1H, d, H-1'') 을 통해 당 2 개의 존재를 확인하였다. δ 1.15 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-6'')의 당 내 특징적인 한 개의 methyl 기를 확인하여 이당체의 구성당으로 rhamnose 와 glucose 를 유추하였다. 또한, δ 7.19 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'''), δ 6.81 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'''), δ 7.08 (1H, dd, $J = 8.2, 1.6$ Hz, H-6''') 으로부터 1,3,4-tri-substituted benzene ring 을 확인하였고, δ 3.86 (ArOCH₃)의 benzene ring 에 치환된 methoxy 를 확인하였다. 그리고 δ 7.64 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'''), δ 6.39 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8''')을 통해 *trans*-configured olefinic proton 을 확인하여 feruloyl 기를 확인할 수 있었다. ¹³C NMR spectrum 에서 δ 169.14 (C-11)의 carboxyl carbon 을 확인하였다. Glucose 의 δ 68.23 (C-6')로부터 rhamnose 와의 연결을 (C-6 in glucose: δ 63.5), rhamnose 의 δ 76.3 (C-4'')로부터 feruloyl 기와의 연결을 확인하였다. (C-4 in methyl α -rhamnoside: δ 73.9)

이상의 결과를 종합하여 ¹H NMR, ¹³C NMR spectrum 을 문헌치와 비교하여 화합물 **13** 을 kinginoside 로 동정하였다 (Norio et al., 1993).



< ^1H NMR (CD_3OD , 800 MHz)>



< ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz)>

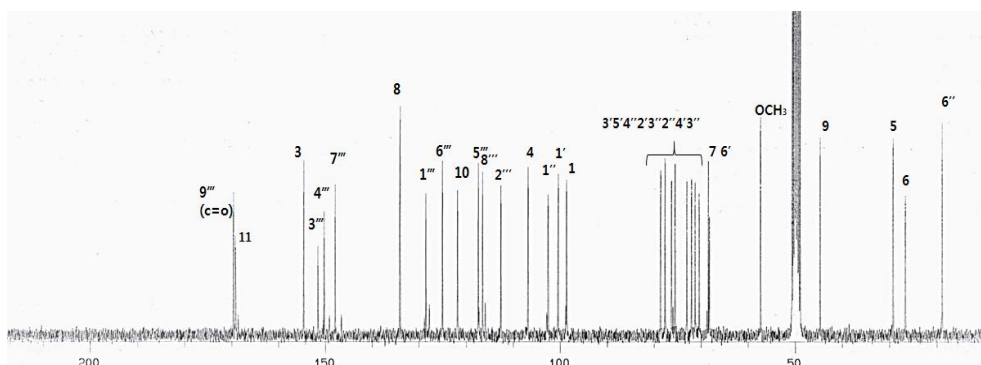


Figure 18. ^1H , ^{13}C NMR spectra of compound **13**

1.14. 화합물 **14** 의 구조 분석

화합물 **14** 는 흰색의 무정형 분말로 ESI-qTOF-MS 에서 m/z 456.1505 의 [M-H]⁻ peak 를 확인하고 ¹³C NMR spectrum 에서 탄소가 20 개로 나타나 분자식 C₂₀H₂₇NO₁₁ 로 예상하였다.

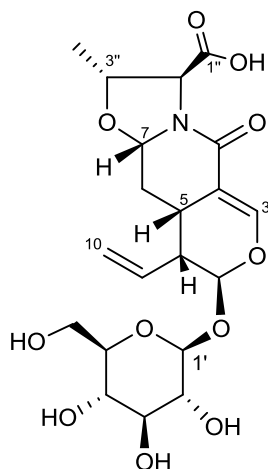
¹H NMR spectrum 에서 δ 7.41 (1H, brs, H-3)에서 tri-substituted olefinic proton 을 확인하였고, δ 5.54 (1H, d, H-1)와 δ 5.16 (1H, dd, $J = 3.7, 9.8$ Hz, H-7)에서 2 개의 acetal proton 을 확인하고, δ 5.58 - 5.49 (1H, m, H-8), δ 5.36 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, H-10a), δ 5.29 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-10b)로부터 mono-substituted vinyl 그룹을 확인하여 화합물 **14** 가 secoiridoid 골격임을 확인하였다. 그리고 δ 3.08 - 3.03 (1H, m, H-5), δ 2.84 - 2.77 (1H, m, H-9)의 두 methine 과 δ 1.45 - 1.30 (1H, m, H-6a), δ 2.34 - 2.14 (1H, m, H-6b)로 methylene 을 확인하였고, anomeric proton 인 δ 4.83 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1')로 당의 존재를 확인하였다.

¹³C NMR spectrum 에서는 δ 178.78 (C-1'')과 δ 166.68 (C-11)의 2 개의 carbonyl carbon 을 확인하였으며, δ 109.6 (C-4)에서 quaternary olefinic carbon 을 확인하였다. 또한, tri-substituted carbon 인 δ 89.77 (C-7)에서 threonine 기의 아민기와 말단의 산소원자와 secoiridoid 골격에 연결됨을 유추하였다. 이 화합물은 특이적으로 threonine unit 이 붙은 secoiridoid glycoside 로서 2D NMR data 로 추가 확인하였다.

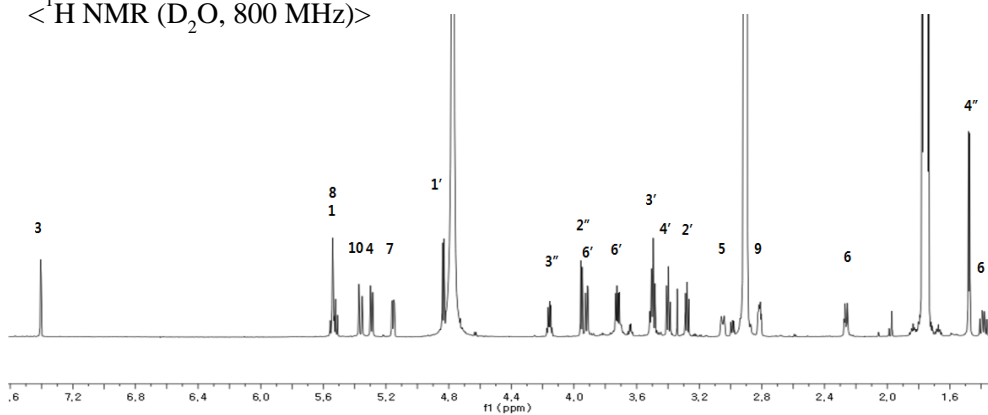
¹H-¹H COSY spectrum 에서 δ 3.95 (H-2'')와 δ 4.16 (H-3'')의 correlation 을, δ 4.16 (H-3'')과 δ 1.48 (H-4'')의 correlation 으로 threonine 기의 구조를 확인하였다.

ROESY spectrum 을 통해 H-2''는 H-4''와 correlation 을 이루었다. 또한, H-7 은 H-3'', 5, 6 와의 공명을 증가시키는 correlation 을 이루었다.

이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물 **14** 를 L-threonine 이 secologanin 에 결합한 threoninosecologanin 임을 동정하였다 (Song et al., 2014).



< ^1H NMR (D_2O , 800 MHz)>



< ^{13}C NMR (D_2O , 200 MHz)>

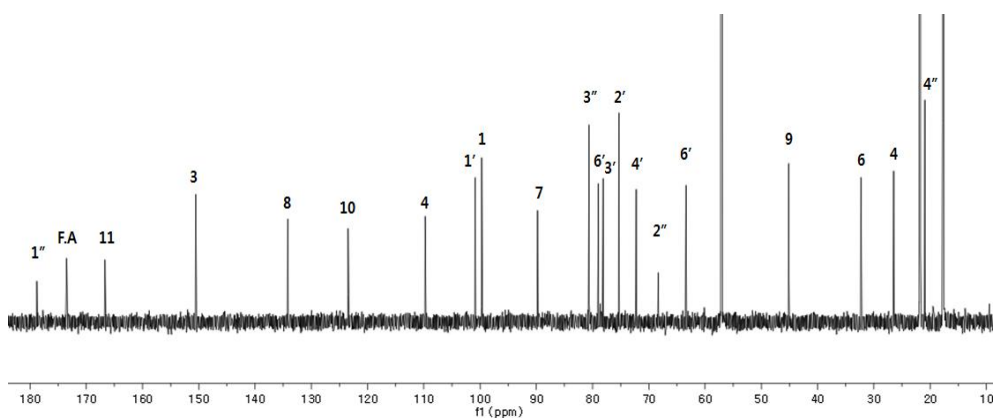


Figure 19. ^1H , ^{13}C NMR spectra of compound **14**

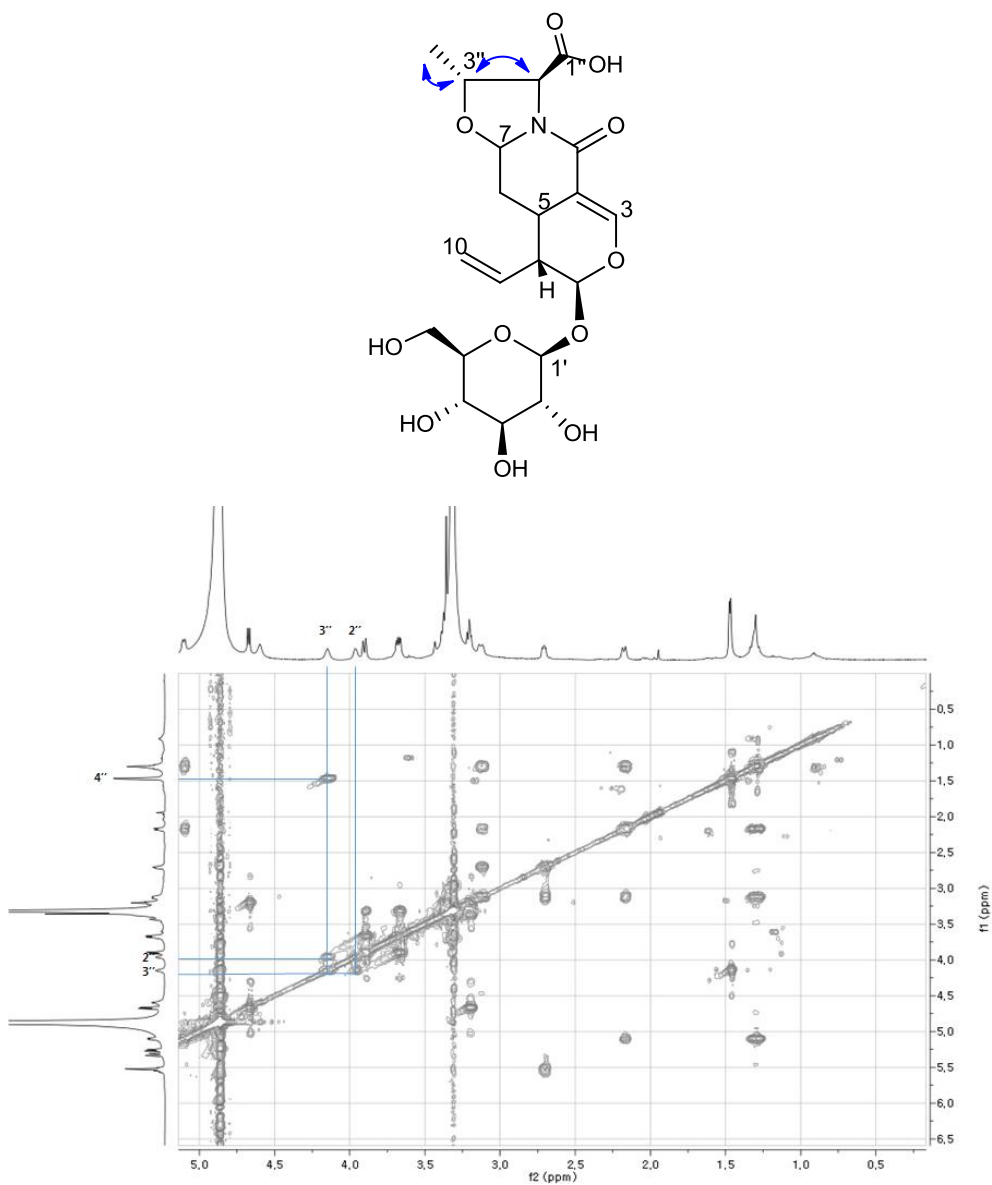


Figure 20. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound **14**

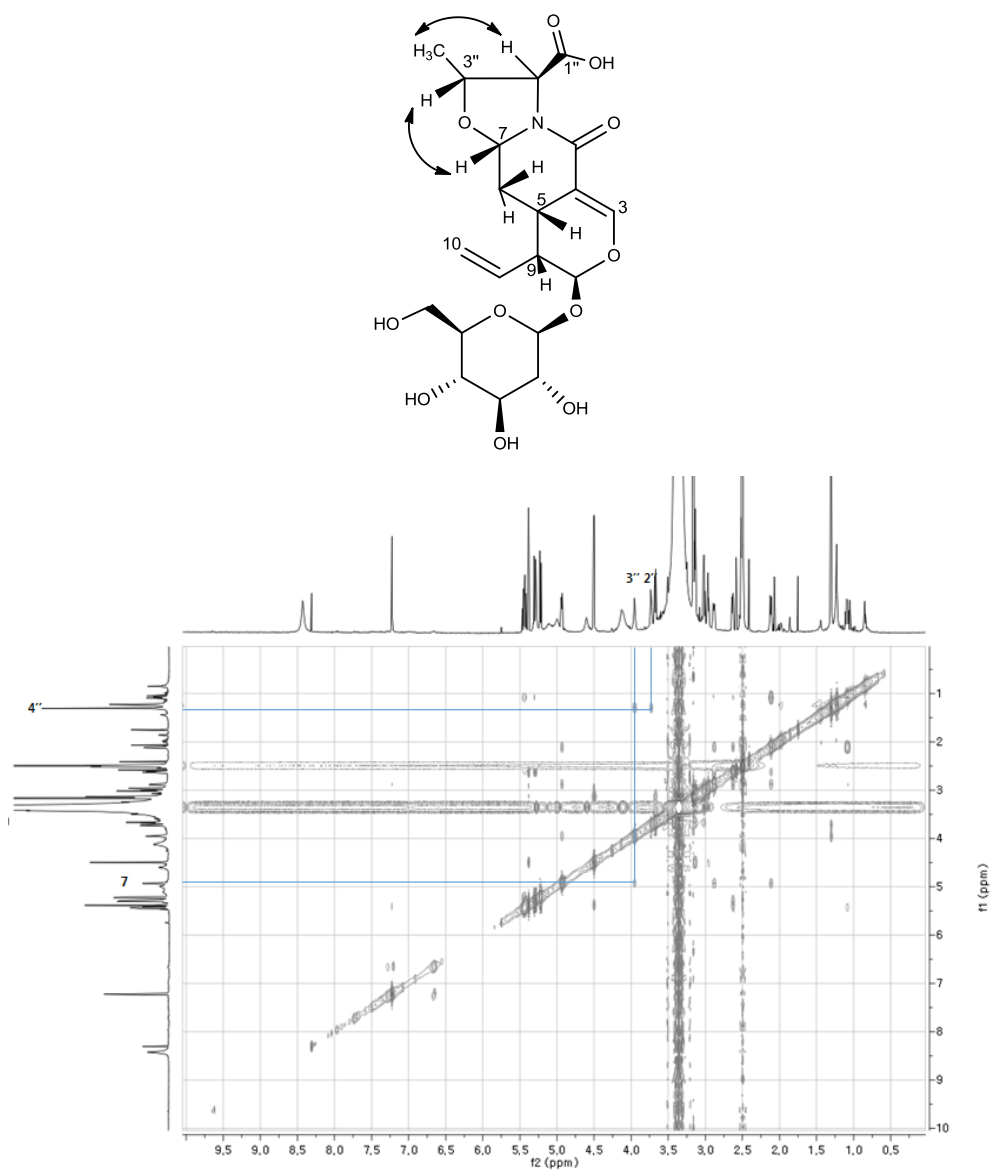


Figure 21. ROESY spectrum of compound **14**

1.15. 화합물 **15** 의 구조 분석

화합물 **15** 는 노란색 분말로 ESI-qTOF-MS 에서 m/z 575.2247 의 $[M-H]^-$ peak 를 확인하고 ^{13}C NMR spectrum 에서 탄소가 28 개로 나타나 분자식 $C_{28}H_{35}N_2O_{11}$ 로 예상하였다.

1H NMR spectrum 에서 δ 7.80 (1H, s, H-17)의 tri-substituted olefinic proton 을 확인하였고, δ 5.83 (1H, m, H-19)의 methine, δ 5.36 (1H, m, H-18a), δ 5.29 – 5.21 (1H, m, H-18b)의 exomethylene 및 δ 5.89 (1H, d, H-21)의 acetal proton 그리고 δ 3.78 (CH_3COO)으로부터 화합물 **15** 가 secologanin 골격임을 확인하였다. 그리고 δ 2.42 (1H, m, H-14a), δ 1.22 (1H, m, H-14b)의 methylene 과 δ 4.62 (1H, d, $J = 15.3$ Hz, H-3)의 tri-substituted proton 을 확인하고 δ 4.79 (1H, d, H-1')의 anomeric proton 을 통해 당의 존재를 확인하였다. δ 7.79 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, H-12), δ 7.46 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-9), δ 7.28 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-10), δ 7.02 (1H, dd, $J = 11.2, 4.2$ Hz, H-11) 에서 1,2-di-substituted benzene ring 구조를 확인할 수 있었다.

^{13}C NMR spectrum 에서는 δ 172.03 (C-22)의 carboxylic acid 을 확인하였으며, δ 170.47 (C-23)의 carboxyl carbon 과 δ 51.52 (CH_3COO) 의 methoxy carbon 을 확인하였다. Tri-substituted carbon δ 51.77 (C-3)로부터 secologanin 3 번 위치에 질소원자와의 연결을 유추하였다. 또한, 앞서 확인한 benzene ring 과 함께 HSQC spectrum 으로 확인한 quaternary carbon 인 δ 137.21 (C-13), δ 128.99 (C-2), δ 126.17 (C-8), δ 106.99 (C-7)을 통해 indole ring 구조를 확인하였다.

1H - 1H COSY spectrum 에서 δ 3.94 (1H, dd, H-5)와 δ 3.45, 3.02 (m, H-6)의 correlation 을 확인하였다.

이상의 결과를 종합하여 문헌치와 비교하여 화합물 **15** 를 tryptamine 이 secologanin 에 결합한 5 α -carboxystrictosidine 임을 동정하였다 (Norio et al., 1992).

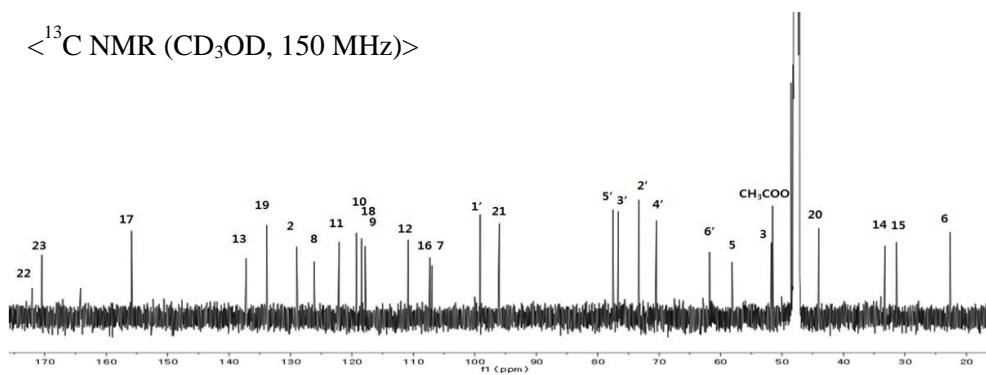
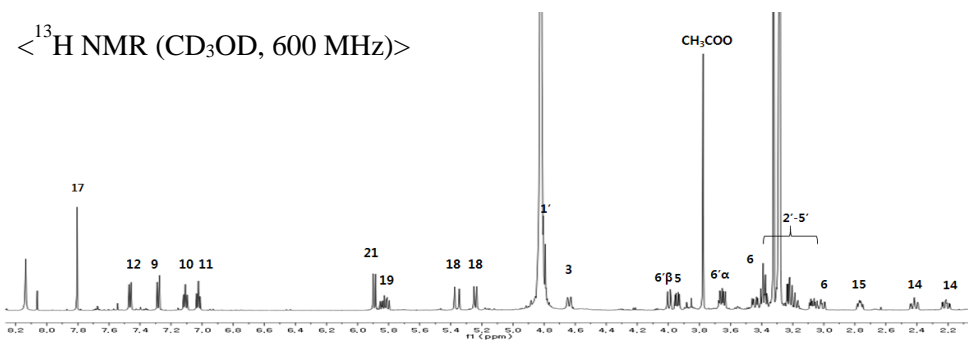
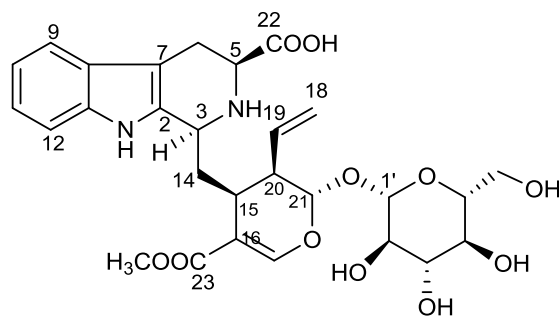


Figure 22. ¹H, ¹³C NMR spectra of compound **15**

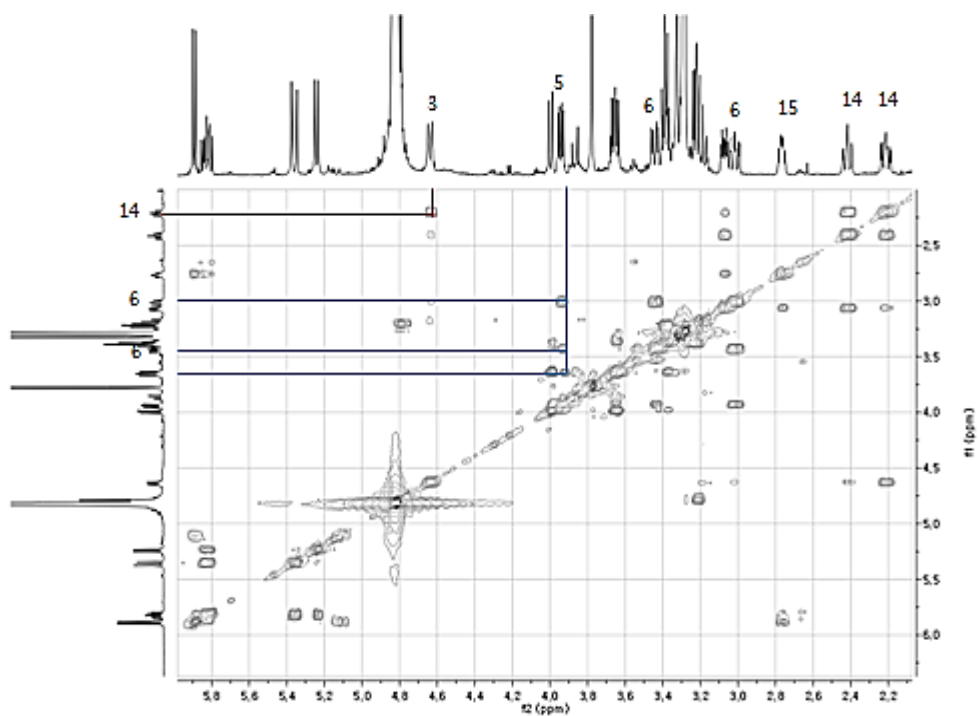


Figure 23. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound **15**

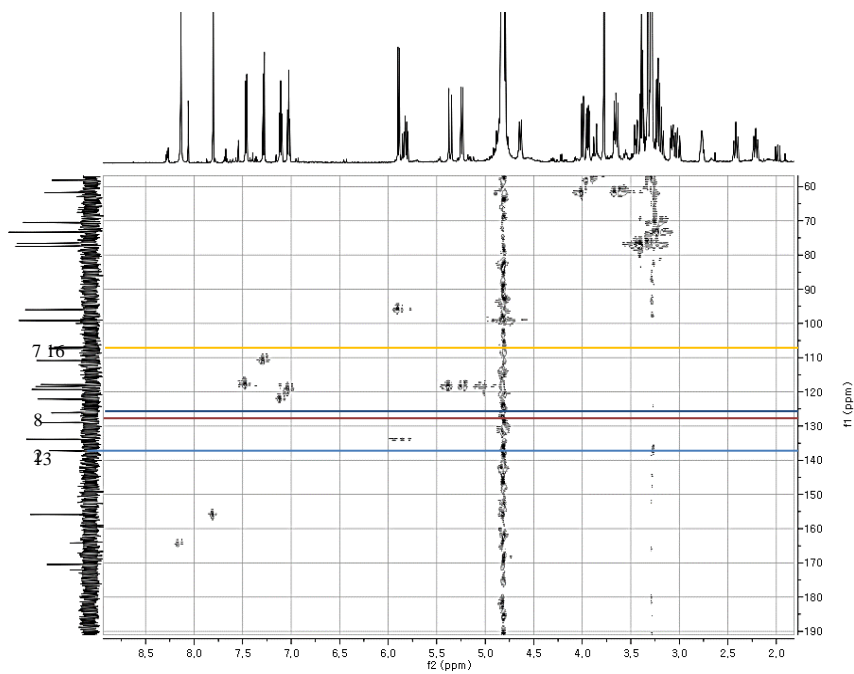


Figure 24. HSQC spectrum of compound **15**

1.16. 화합물 16의 구조 분석

화합물 16는 노란색 분말로 ESI-qTOF-MS에서 m/z 500.2257의 $[M+H]^+$ peak를 확인하고 ^{13}C NMR spectrum에서 탄소가 22개로 나타나 분자식 $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_{10}$ 로 예상하였다.

^1H NMR spectrum에서 δ 7.55 (1H, s, H-3)의 tri-substituted olefinic proton을 확인하였고, δ 5.74 (1H, m, H-8)의 methine, δ 5.28 (2H, m, H-10)의 exomethylene 및 δ 5.57 (1H, s, H-1)의 acetal proton 그리고 δ 3.7 (3H, s, CH_3COO)으로부터 화합물 16이 secologanin 골격임을 확인하였다. 그리고 δ 3.07 (1H, m, H-6a), δ 2.51 (1H, m, H-6b)의 methylene 과 δ 6.84 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-7)의 tri-substituted proton을 확인하였고, δ 4.68 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1')의 anomeric proton을 통해 당의 존재를 확인하였다. δ 9.41 (1H, s, H-1'')의 aldehyde proton 과 downfield 된 δ 6.84 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-7)의 olefinic proton의 존재로 olefin-aldehyde 구조를 확인하였다.

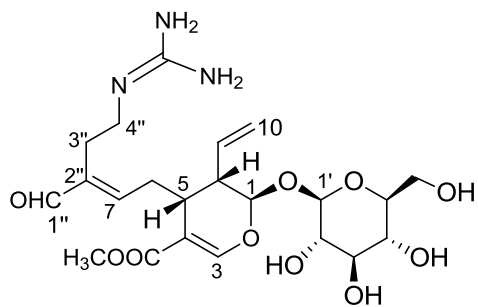
^{13}C NMR spectrum에서는 δ 197 (C-1'')로 aldehyde carbon을 확인하였으며, δ 169 (C-11)의 carboxyl carbon 과 δ 51.82 (CH_3COO)의 methoxy carbon을 확인하였다. 특징적인 δ 158.76의 quaternary carbon 과 3 분자의 nitrogen으로부터 guanidine 구조의 존재를 유추하였다 (Li et al., 2011).

^1H - ^1H COSY spectrum에서 δ 2.51 (H-3'')와 δ 3.21 (H-4'')의 correlation을, δ 3.07, 2.51 (H-6ab)과 δ 6.84 (H-7)의 correlation을 확인하였다. HMBC spectrum으로 C-3''에서 H-4'', H-7 및 aldehyde proton과의 correlation을 통해 aldehyde 기가 2'' 위치의 olefin carbon에 연결됨을 확인하였고, H-4''만이 유일하게 guanidine carbon 골격과의 correlation을 이루는 것을 확인하였다.

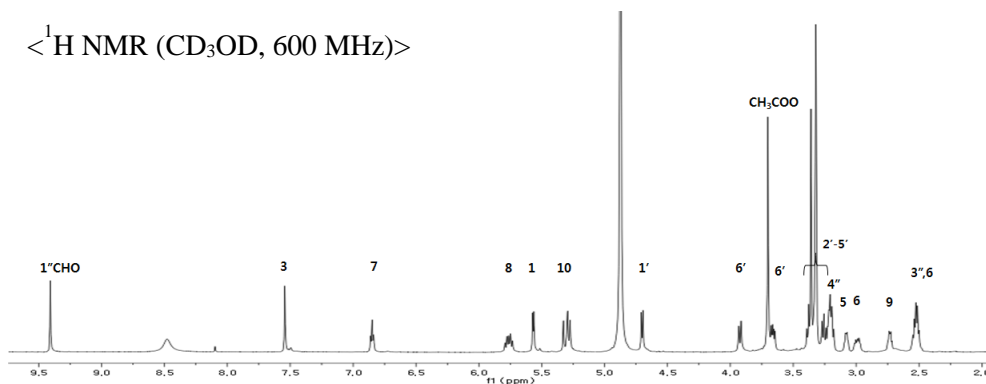
^1H - ^{15}N HSQC spectrum으로 guanidine 구조를 확인하였다. 그 결과, δ 7.52 ppm의 proton 과 δ 77.50 ppm의 nitrogen 원소간의 유일한 correlation을 확인하였다. 표준품 4-guanidinobutyric acid을 동일한 조건에서 ^1H - ^{15}N HSQC spectrum을 측정하였을 때도 유사한 위치 (δ 6.58 과 δ 80.90 ppm)에서 correlation을 확인할 수 있었다. 기존 연구에 따르면, dihydrofolate reductase 와 methotrexate 복합체의 ^1H - ^{15}N HSQC spectrum에서

arginine 결가지의 amide proton 의 ^{15}N chemical shifts 는 79.2 ppm 과 75 ppm 에서 관찰되었다 (Gargaro et al., 1996). 또한, arginine 유도체인 herdmanine A 를 DMSO 에 녹여 측정 한 결과, guanidine 구조의 proton signal 은 9.29 ppm (s, NH)과 7.20 ppm (brs, NH_2)이 보고 되었지만 (Li et al., 2011), 화합물 **16** 의 경우 9 ppm 의 proton signal 이 관찰되지 않아, terminal amine 가 2 개로 치환된 guanidine 구조로 함유하는 것으로 결정하였다.

이 모든 결과를 종합하여 화합물 **16** 을 **argininosecologanin** 으로 동정하였다.



< ^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz)>



< ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz)>

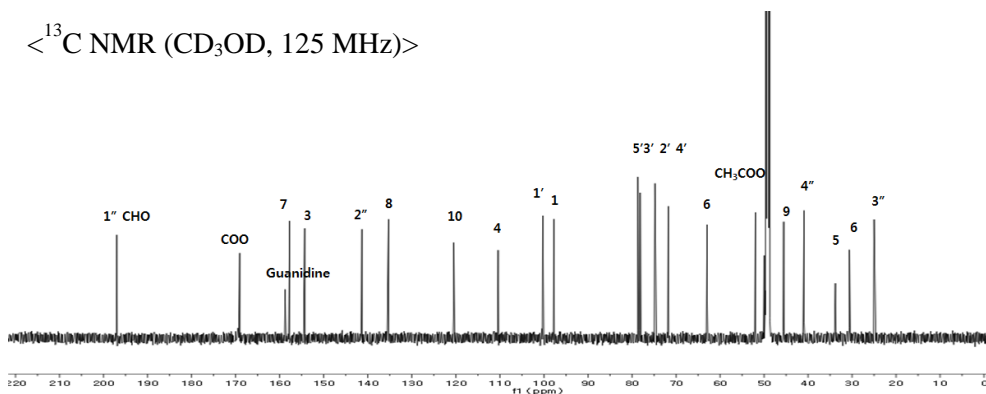


Figure 25. ^1H , ^{13}C NMR spectra of compound **16**

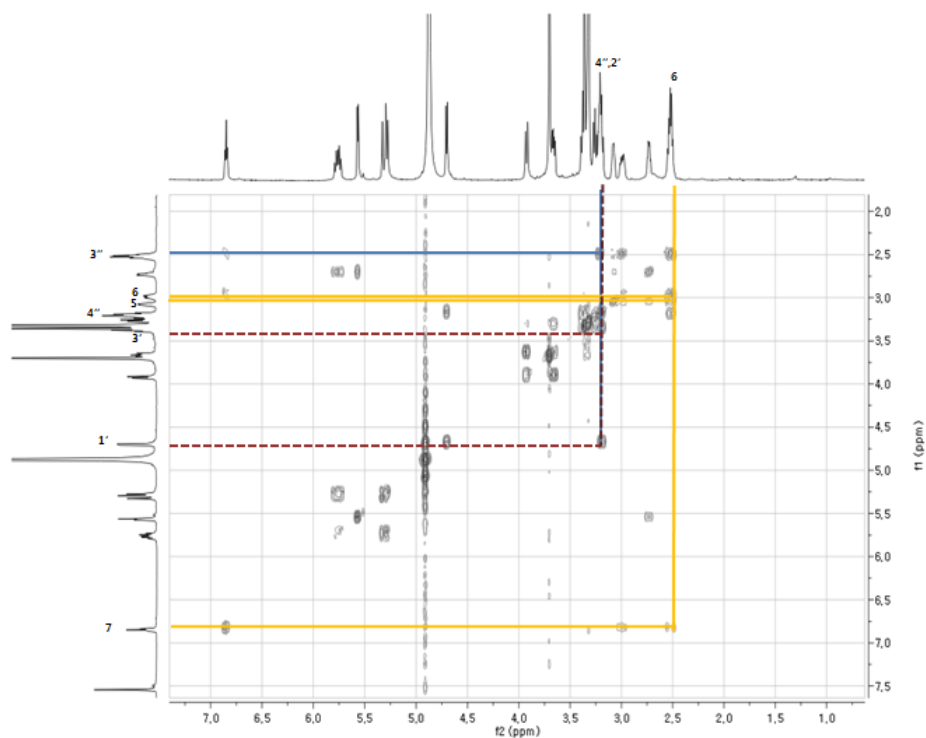


Figure 26. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound **16**

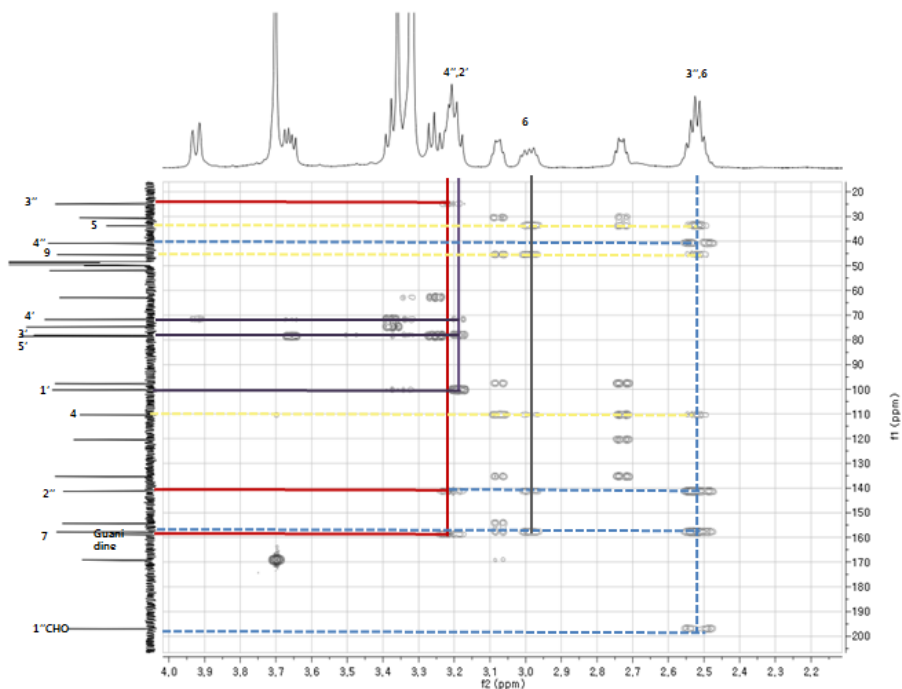


Figure 27. HMBC spectrum of compound **16**

< ^1H - ^{15}N HSQC spectrum (DMSO, 800 MHz)>

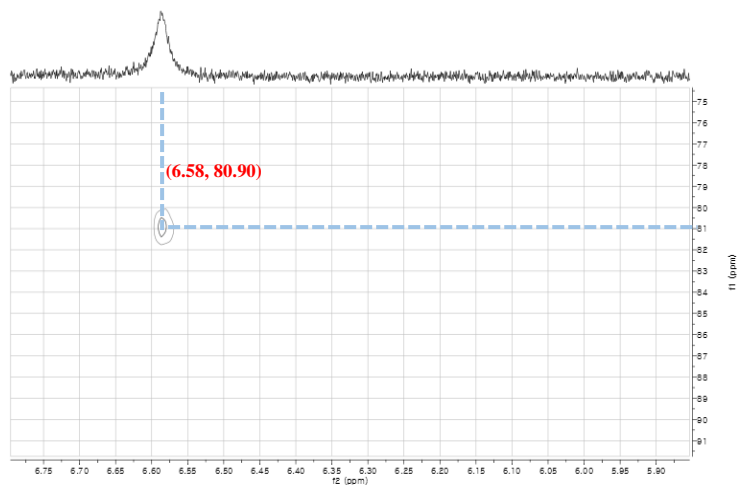


Figure 28. ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of **4-Guanidinobutyric acid**

< ^1H - ^{15}N HSQC spectrum (DMSO, 800 MHz)>

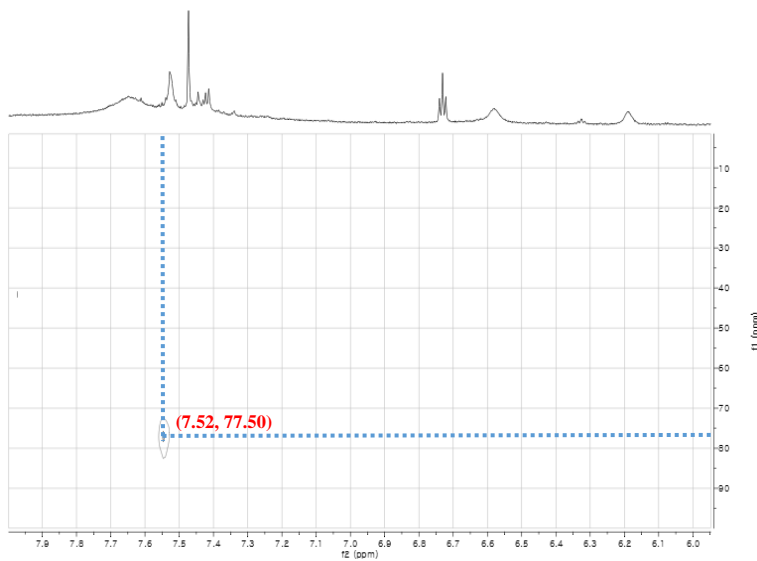


Figure 29. ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of compound **16**

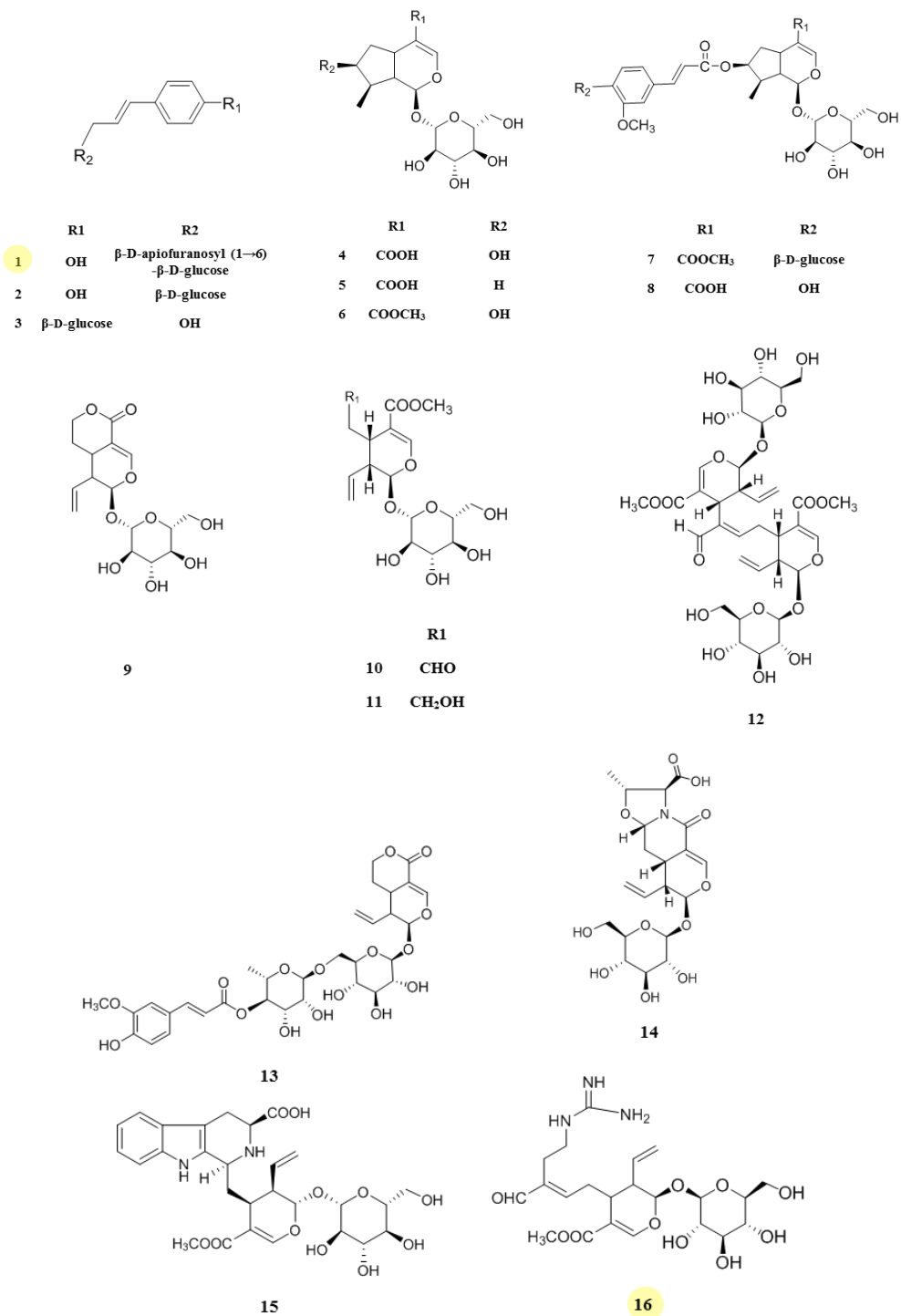


Figure 30. Structures of the compounds isolated from *L.insularis* roots

2. HT22 세포주에서의 신경세포 보호활성

섬괴불나무 뿌리로부터 분리한 총 12 종의 화합물을 대상으로 뇌신경세포 보호 활성을 mouse hippocampus 에서 유래된 HT22 cell 을 이용하여 glutamate 로 세포사멸의 유도를 통해 알아보았다. 3 종 (**1**, **5**, **15**)은 활성 검색 하기에 양이 충분하지 않았기 때문에 실험을 시행하지 못하였다. 배양 중인 HT22 세포에 분리한 화합물을 각각 1, 10, 100 μM 로 전처리 한 후 1 시간 뒤에 glutamate 를 투여하여 독성을 유발 한 후, 18 시간 뒤에 MTT assay 를 통하여 활성을 평가하였다. Control 과 비교하였을 때 모든 화합물에서 큰 활성은 없었지만 화합물 **3** 과 **10** 이 20% 정도의 HT22 세포주에서 뇌신경 세포 보호 활성을 나타내었다.

Table 13. Neuroprotective activities of compounds from *L. insularis* on HT22 cells injured by glutamate.

Compound	cell viability (%)		
	1 μ M	10 μ M	100 μ M
Control		100 \pm 1.29	
Glutamate		33.84 \pm 0.78	
2	41.75 \pm 4.23	49.62 \pm 3.18*	48.93 \pm 0.86
4	40.53 \pm 2.02	40.48 \pm 1.84	37.27 \pm 0.46
7	35.62 \pm 1.76	41.10 \pm 2.54	50.01 \pm 0.28
8	34.65 \pm 1.02	34.78 \pm 1.56	38.63 \pm 3.30*
11	43.50 \pm 3.69	45.40 \pm 1.10	45.65 \pm 0.79
13	40.00 \pm 2.46	45.40 \pm 1.10	38.12 \pm 0.39

compound	cell viability (%)		
	1 μ M	10 μ M	100 μ M
Control		100 \pm 1.20	
Glutamate		36.61 \pm 1.63	
3	53.35 \pm 0.40	60.45 \pm 2.74	48.93 \pm 0.86
6	39.10 \pm 3.76	46.05 \pm 5.06*	48.40 \pm 6.71*
9	49.46 \pm 1.54	51.00 \pm 1.64	53.70 \pm 6.58
10	41.13 \pm 1.25	57.76 \pm 3.26	60.53 \pm 2.14
12	46.81 \pm 3.52	51.29 \pm 2.75	38.97 \pm 2.10
16	44.92 \pm 0.67	50.03 \pm 3.17	44.10 \pm 1.01

HT22 cells were treated with samples at the concentration of 1,10 and 100 μ M respectively. Samples were pretreated with 1, 10 and 100 μ M 1hr before exposure to 4mM glutamate. Control was incubated with a vehicle alone. The cell viability was measured by MTT assay. Results are expressed as the mean \pm S.D. of three independent experiments, each performed using triplicate wells. * p <0.05, ** p <0.005 and *** p <0.001 compared with control

Ⅲ. UPLC/MS 를 이용한 인동속 식물의 이차대사체 분석

A. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 섬괴불나무 (*Lonicera insularis* Nakai), 홍괴불나무 (*Lonicera sachalinensis* (F.Schmidt) Nakai), 괴불나무 (*Lonicera maackii* (Rupr.) Maxim.), 울괴불나무 (*Lonicera praeflorens* Batalin), 인동덩굴 (*Lonicera japonica* Thunb.), 구슬덩굴이 (*Lonicera vesicaria* Kom.)의 총 6 종의 인동속 식물의 지상부, 지하부는 2015 년 7 월에 서울대학교 약학대학 약초원에서 채집하였다.



Figure 31. Samples of *Lonicera* species

2. 시약 및 기기

2.1. 시약

실험재료의 추출과 시료 제조 시 메탄올은 Dae Jung Pure chemical Eng. Co. Ltd., Korea 을 사용하였고 물은 증류수를 이용하였다. UPLC 분석에 사용한 아세토나이트릴, 메탄올과 물은 J.T. Baker®의 HPLC grade 용매 (Avantor Performance Materials, Inc., USA)를 사용하였고 질량분석용 포름산은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입한 것을 사용하였다.

2.2. 기기

Centrifuge: Micro 17TR micro high speed centrifuge, Hanil, Korea

Sonicator: Branson 8510, USA

UPLC-QTOF MS system

- Waters Acquity UPLC® system, Waters Co., Milford, MA, USA
- Column : Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 mm x 100 mm, 1.7 µm
- Waters Xevo G2 QTOF mass spectrometer, Waters MS Technologies, Manchester, UK

Analytical balance: Mettler AE 50, Switzerland

3. 시료의 제조

시료의 지하부, 지상부를 나누어 시료의 건조중량의 10 배의 solvent 를 넣어 80% MeOH 수용액으로 만든 후 90 분씩 3 회 초음파 추출 하였다. 추출 후에 원심 분리하여 그 상층액을 Sep-pak filter (Sep-pak® plus C18 cartridges, waters, Ireland)을 이용하여 HPLC 용 물을 이용하여 포화시킨 후 HPLC 용 물을 사용해 6 번 여과시킨 후 HPLC 용 MeOH 로 6 번 여과하여 제조하였다. Sep-pak filter MeOH 여과물을 최종 농도 1mg/ml 로 UPLC/MS 측정용 시료를 제작하였다.

4. 기기분석 방법

4.1. UPLC/MS 측정과 분석

액체크로마토그래피의 이동상은 0.1% 포름산을 포함한 물 (A)과 AcCN (B)을 사용하여 유속 0.3 mL/min 로 흘려주었고, 칼럼 온도 40°C, 시료 온도 20°C에서 분석을 시행하였으며 각 시료는 2 µL 씩 주입하였다. 이동상의 gradient 조건은 다음과 같다. 0-5 분 gradient 5-12%B, 5-16 분 gradient 12-25% B, 16-18 분 gradient 25-45%B, 18-24 분 gradient 45-90% B, 24-26 분 isocratic 100% B, 이후 분석 시작 상태이자 칼럼 평형상태를 위하여 5% B 를 2 분간 흘려주었다.

질량분석은 ESI source 로 negative mode 에서 진행되었다. 분무기와 보조 가스로 고순도 질소 가스, 충돌 가스로 아르곤 가스를 사용하였다. 질량 분석 범위는 50-1200 m/z 로 모세관전압은 2.0 kV, 샘플 cone 전압은 50 V 로 조절하였으며, source 와 desolvation 온도는 각각 120°C, 350°C로 정하였다. cone 가스와 desolvation 가스 유속은 각각 50 L/hour, 800 L/hour, 이온 획득 속도는 0.2 초로 정하였다. 대사체 규명단계를 위하여 CID(collision-induced dissociation)용 조건으로 MS^E 모드를 사용하였고, 전구체 이온을 얻기 위한 낮은 충돌에너지는 3V, MS/MS 조각 정보를 위한 강한 충돌에너지의 ramp 값은 40 에서 45 V 로 설정하였다 (Zheng et al., 2009). 정확성 확보를 위한 calibration 물질로 sodium formate 를 사용하였으며, lock-mass 로 leucine enkephalin 을 5 µL/min 로 흘려주며 검출된 값을 동시적이면서도 독립적으로 보정하였다.

각 시료로부터 얻어진 크로마토그램과 질량분석 데이터는 MassLynx™ (version 4.1, Waters Co., Milford, MA, USA) 소프트웨어를 이용하여 in-house library 를 제작하는데 활용되었다. MarkerLynx™ XS (version 4.1, Waters Co., Milford, MA, USA)로 이용할 피크를 수집하였다. 시료 표본의 피크들은 머무름 시간, 질량 대 전하 비 (RT- m/z)로 표시하고 이온 강도는 면적 값으로 나타내었다. 머무름 시간의 범위는 3-24 분, 질량 범위는 100-900 Da, XIC Window 는 0.01 Da 로 설정하였고, 마커 강도 역치 10 으로 시료 간에 같은 머무름 시간 (허용오차 0.20 분)과 질량 대 전하 비 (허용오차

0.05 Da)인 피크는 동일한 이온으로 수집되었다. 5% 높이에서의 피크 폭, 피크-피크 baseline noise 는 피크의 적분값에 따라 자동으로 계산되도록 하였고, noise 제거 수치는 50 으로 설정하였다. 수집된 각 피크의 이온강도 값은 각 분석 내 모든 피크의 이온 강도 합으로 normalize 하였다.

4.2. 다변량 분석 방법

데이터와 NMR 데이터 모두에 대하여 시행한 주성분 분석 (PCA, Principal Component Analysis)는 가장 대표적이고 기본적인 다변량 통계 분석법으로, 차원을 축소하여 주성분을 찾아내는 unsupervised 분석법으로 경향성을 파악하는데 유용한 방법이다 (Suberu et al., 2016).

본 연구에서는 MassLynx 로 프로세싱한 데이터와 ID 된 성분만을 변수로 정한 데이터로 PCA 를 수행하여 비교해 본 결과, 군집이 이루어지는 경향의 차이가 없었다. PCA 결과 군집을 이루는지의 여부를 확인한 후, 섬피불나무 만의 변인에서는 OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis)를 추가로 시행해 다른 군 간의 명확한 판별을 재평가하였다. OPLS-DA 는 종속변수로서 각 그룹의 정보를 부여하여 판별에 기여하는 변수의 영향력을 높이는 supervised 분석법이다 (Kim et al., 2014). OPLS-DA 의 loading S-plot 로부터 각 그룹 간 가장 확연하게 차이 나는 대상을 추출하고자 cut off 수치를 covariance $p[1] \geq |0.1|$ 이면서 correlation 의 $p(\text{corr})[1] \geq |0.5|$ 로 정하였다. 이로부터 확보한 대사체는 보다 신뢰성 있는 검출을 위하여 VIP (Variable Importance on Projection) 값이 1.2 이상임을 확인하였다.

B. 결과 및 고찰

1. UPLC/MS 를 이용한 섬피불나무의 이차대사체 분석

1.1. 대사산물의 동정

UPLC-QTOF MS 로 측정하여 얻어진 고해상도 분자량, 머무름 시간, MS/MS fragmentation 정보를 바탕으로 대사체를 동정하였다. Elemental composition 을 통해 tolerance 10 ppm 이내에서 분자식 후보를 얻고 화합물 데이터베이스인 SciFinder®로부터 인동속 (*Lonicera*)에서 해당 분자식의 물질이 발견되는지 확인하였다. Figure 32 - 35 에서 대표적으로 보여지는 MS/MS fragmentation 패턴과 같이 화합물을 추정할 수 있었다. phenylpropanoid, phenolic acid, secoiridoid, iridoid 계열의 MS/MS fragmentation 패턴을 보면 phenylpropanoid 계열은 MS 상 positive mode 에서 $[M+Na]^+$ 의 형태 검출되며, 당이 떨어진 매스 값이 확인되었다.

Phenolic acid 계열은 특이한 UV spectrum 236, 325 nm 에서 봉우리가 발견되며, caffeoyl 기와 caffeic acid 가 떨어지는 매스 값이 확인되었다. 이 정보는 본 연구에서 LC-MS 을 이용하여 이 계열을 제외시키고 분리 실험을 진행하는 것에 근거가 되었다.

Secoiridoid 계열은 formic acid 가 붙은 형태가 주된 peak 로 검출되었고, RDA 반응과 당이 떨어지는 fragmentation 을 보였다.

Iridoid 계열은 formic acid 가 붙은 형태가 주된 peak 로 검출되었고 당이 떨어지는 fragmentation 을 보였다. 이러한 방법과 함께 해당 문헌을 참조하여 동정되었고, 동일한 분자식을 가지면서 유사한 fragment 패턴을 보이는 성분들은 문헌의 용출 순서와 비교하여 동정할 수 있었다 (Qi et al., 2009, Ren et al., 2008).

• Salidroside I

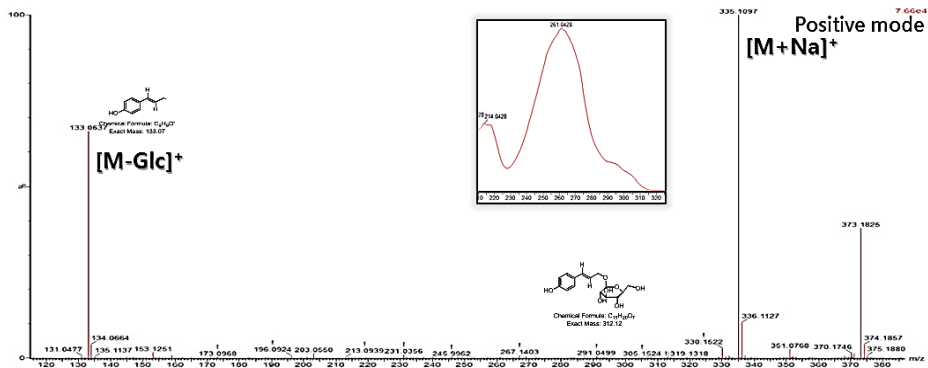


Figure 32. MS spectral data and fragmentation patterns of **salidroside I**

• Di-caffeoyl quinic acid

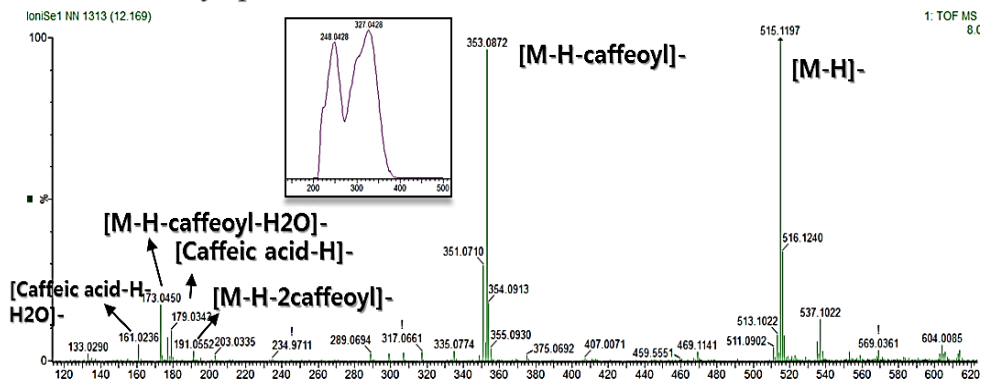


Figure 33. MS spectral data and fragmentation patterns of **di-caffeoyl quinic acid**

- **secologanin**

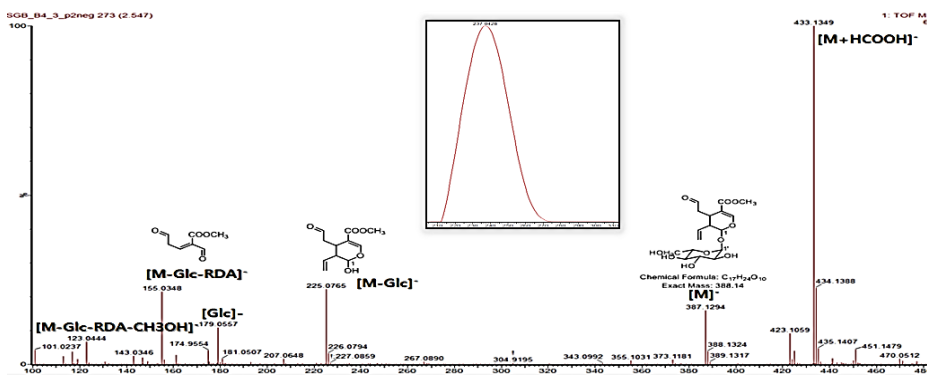


Figure 34. MS spectral data and fragmentation patterns of **secologanin**

- **loganin**

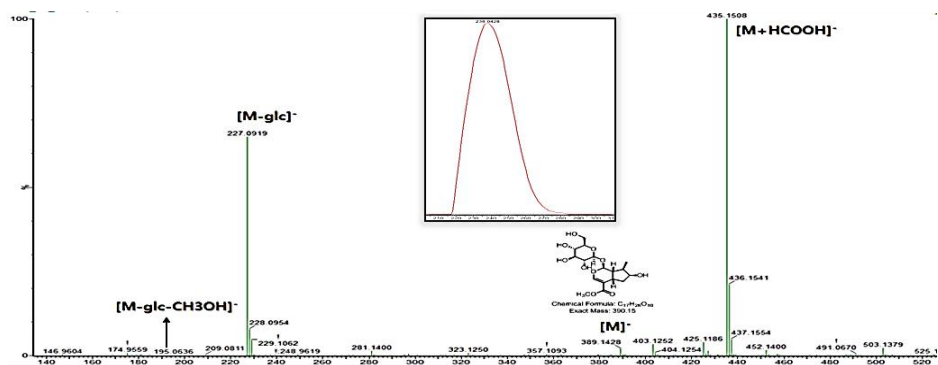


Figure 35. MS spectral data and fragmentation patterns of **loganin**

1.2. 섬피불나무의 이차대사체 MS profiling

섬피불나무 추출물의 대표적인 UPLC/MS 크로마토그램을 figure 36 에 나타내었다. 그 결과 35 개 성분이 확인되었고 9 개의 성분은 이번 연구에서 분리 동정되었다. 섬피불나무 추출물에서 identification 된 대사체는 table 14 에 나타내었다.

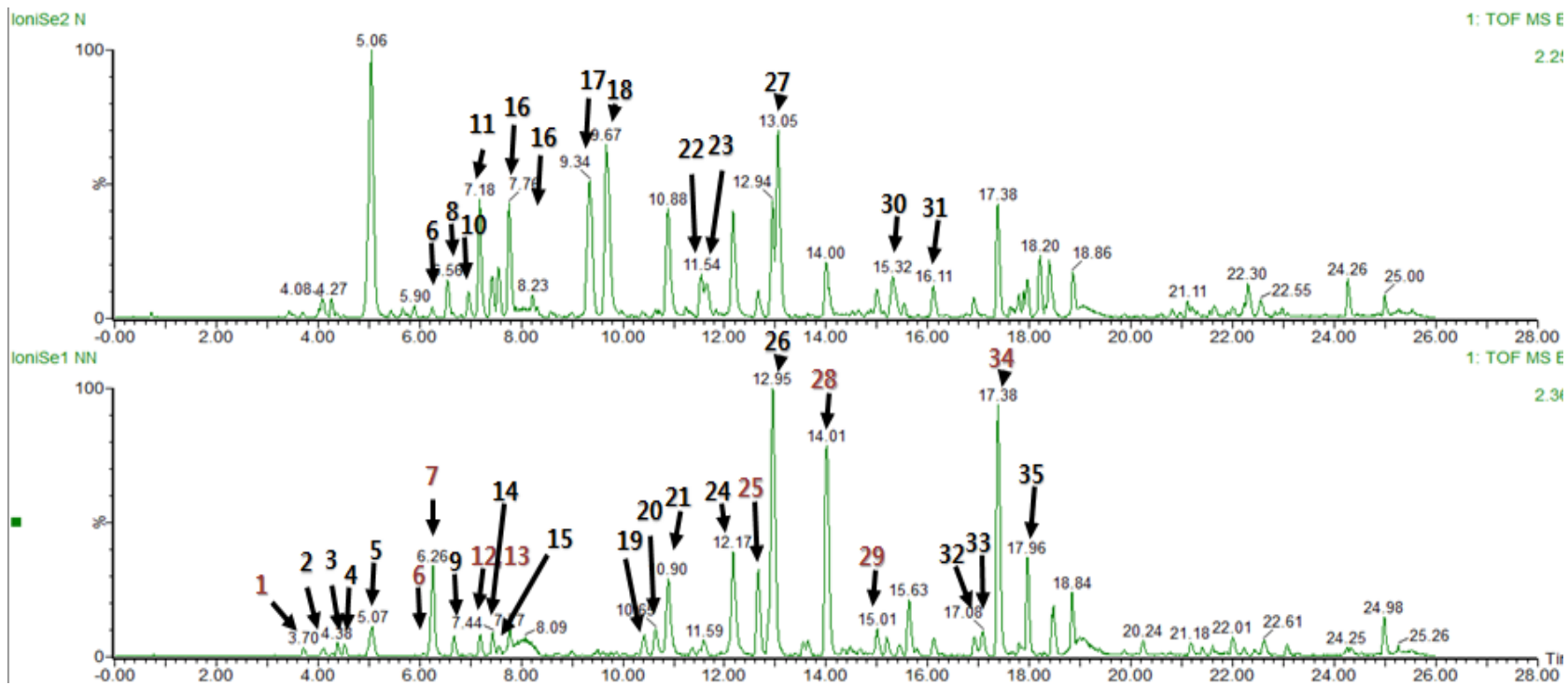


Figure 36. Representative BPI chromatograms of *L.insularis* A: root, B: stem

Table 14. Components that were identified from *L. insularis*

No.	Identity	Classification	$t_{R'}$ min	Observed MS [M-H]-	Calculated MS [M-H]-	Error (ppm)	Molecular formular
1	Loganic acid	Iridoid	3.7	375.1286	375.1291	-1.3	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀
2	Quinic acid derivative	organic acid	4.073	191.0554	191.0556	-1	C ₇ H ₁₂ O ₆
3	Loganic acid derivative	Iridoid	4.38	375.127	375.1291	-5.6	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀
4	unknown	unknown	4.53	469.1454	469.1499	-9.6	C ₂₅ H ₂₆ O ₉
5	secologanic acid	Iridoid	5.07	373.1127	373.1135	-2.1	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀
6	Loganin	Iridoid	6.19	389.085	389.0873	-5.9	C ₁₉ H ₁₈ O ₉
7	Sweroside	Iridoid	6.26	357.1182	357.1186	-1.1	C ₁₆ H ₂₂ O ₉
8	unknown	unknown	6.54	519.2454	519.2442	2.3	C ₂₄ H ₄₀ O ₁₂
9	6'-O-β-D-Apiofuranosylsweroside	Iridoid	6.68	489.161	489.1608	0.4	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₃
10	Luteolin-7-O-β-D-glucopyranosyl- (1→6)-glucopyranoside	flavonoid	6.97	609.1474	609.1456	3	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
11	unknown	Iridoid	7.2	419.1531	419.1553	-5.2	C ₁₈ H ₂₈ O ₁₁
12	Secologanol	Iridoid	7.36	389.1467	389.1448	4.9	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀

13	secologanin	Iridoid	7.41	387.1288	387.1291	-0.8	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀
14	unknown	phenyl propanoid	7.45	503.1772	503.1765	-1.4	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₃
15	Kingside	iridoid	7.57	403.1245	403.124	1.2	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁
16	secologanin isomer	Iridoid	7.77	387.1277	387.1267	-0.2	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀
17	Miscanthoside	flavonoid	9.33	449.1084	449.1084	0	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁
18	luteolin-7-O-glucoside	flavonoid	9.69	447.0916	447.0927	-2.5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
19	unknown	unknown	10.432	743.242	743.2399	2.8	C ₃₃ H ₄₄ O ₁₉
20	3,5-di-O-caffeoylquinic acid	organic acid	10.651	515.1194	515.119	0.8	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂
21	3,4-di-O-caffeoylquinic acid	organic acid	10.888	515.1188	515.119	-0.4	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂
22	Miscanthoside isomer	flavonoid	11.54	447.0921	447.0927	-1.3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
23	Cosmociin	flavonoid	11.67	431.0981	431.0978	0.7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
24	4,5-di-O-Caffeoylquinic acid	organic acid	12.17	515.1197	515.119	1.4	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂
25	E-Aldosecologanin	iridoid	12.66	757.0552	757.2555	-0.4	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₉
26	grandifloroside	iridoid	12.96	537.1614	537.1614	1.1	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₃
27	Hesperetin	flavonoid	13.05	301.0711	301.0712	-0.3	C ₁₆ H ₁₄ O ₆
28	Pericyclenoside	iridoid	14.01	727.2451	727.2449	0.3	C ₃₃ H ₄₄ O ₁₈
29	7-O-E-Feruloylloganic acid	iridoid	15.01	551.1734	551.1765	-5.6	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₃

30	luteolin	flavonoid	15.32	285.0403	285.0399	1.4	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
31	Lonitocide	terpenoid	16.11	461.1998	461.2023	-5.4	C ₂₁ H ₃₄ O ₁₁
32	unknown	unknown	16.92	649.2116	649.2132	-2.5	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₅
33	unknown	unknown	17.09	539.1765	539.1765	0	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃
34	Kinginoside	Iridoid	17.39	679.2232	679.2238	-0.9	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₆
35	unknown	Iridoid	17.96	565.1916	565.1921	-0.9	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₃
36	Onjixanthone I	Xanthone	18.22	301.071	301.0712	-0.7	C ₁₆ H ₁₄ O ₆
37	Diflavonoid	Flavonoid	18.39	537.0839	537.0822	3.2	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀
38	unknown	unknown	18.83	329.2325	329.2328	-0.9	C ₁₈ H ₃₄ O ₅
39	Diflavonoid	Flavonoid	18.86	537.0836	537.0822	2.6	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀

2. 인동속 식물에서의 비교분석연구

2.1. UPLC/MS 를 이용한 TIC peak area 비교 분석

섬피불나무에서 다른 인동속 식물들과 구별되는 특징적으로 많은 함량의 marker 화합물을 파악하기 위해 MarkerLynx™ XS (version 4.1, Waters Co., Milford, MA, USA)로 앞서 MS profiling 으로 identified 된 주요성분들의 피크를 수집하였다. 인동속 식물 시료 표본의 numbering 과 이름을 table 15 에 기재하였다. 시료 표본의 피크들은 이온 강도는 면적 값으로 나타내고 수집된 각 피크의 이온강도 값은 분석 내 모든 피크의 이온 강도 합으로 normalize 되었다. 그 결과, 동속 식물의 피크 면적 값으로 비교 분석을 진행하였다. 시료 표본들의 각 화합물의 이온강도 값의 평균치를 구하고 그에 대한 백분율 값으로 나타낸 후 이온강도가 0 일 때는 0, 1~50%일 때 --, 51~100%일 때 -, 100~200%일 때 +, 200~300%일 때 ++, 300% 초과일 때 +++으로 나타내었다. 결과적으로 섬피불나무에서 secoiridoid 계열이 다른 성분 보다 많음을 파악하였다.

Table 15. Sample numbers of Six *Lonicera* species

No.	Name	No.	Name
1	섬피불나무 지하부	7	올피불나무 지하부
2	섬피불나무 지상부	8	올피불나무 지상부
3	홍피불나무 지하부	9	인동덩굴 지하부
4	홍피불나무 지상부	10	인동덩굴 지상부
5	피불나무 지하부	11	구슬덩댕이 지하부
6	피불나무 지상부	12	구슬덩댕이 지상부

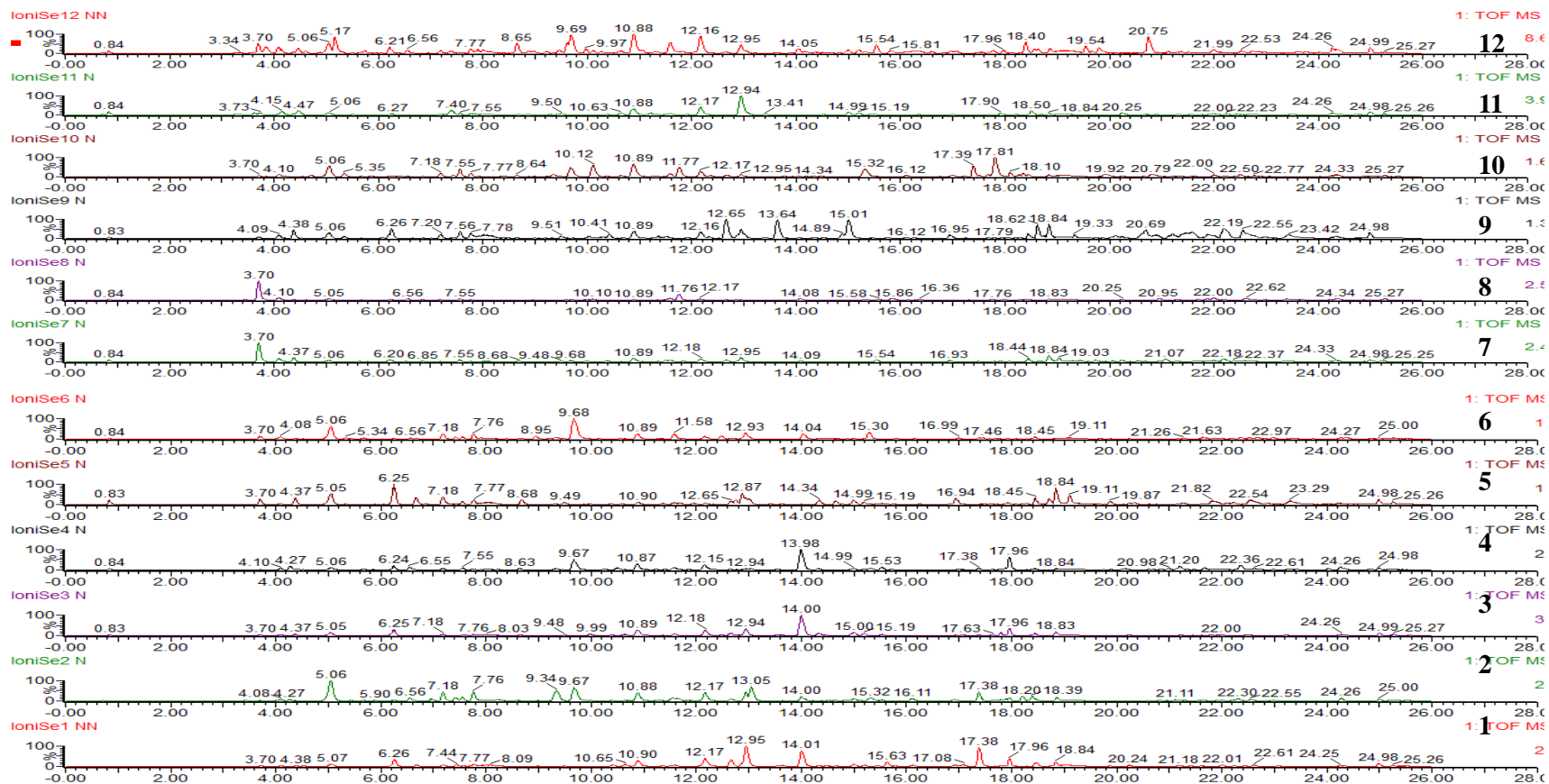


Figure 37. Mass spectrum of *Lonicera* species

Table 16. Statistical comparison on the normalized TIC areas of the peaks from *Lonicera*

No.	Identity	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Loganic acid	--	--	--	--	-	--	+++	+++	--	--	--	-
2	Quinic acid	--	-	-	-	--	+	++	++	+	+	-	+
3	Loganic acid derivative	--	--	-	--	++	--	++	-	++	--	+	--
4	unknown	+++	-	--	0	+	--	++	--	-	+	--	--
5	secologanic acid	--	++	-	--	+	++	--	--	-	+	-	-
6	Loganin	+	--	+	-	+	--	++	-	+	0	--	+
7	Sweroside	+	--	+	+	+++	--	-	--	+	--	--	--
8	unknown	--	++	0	+++	--	+	--	++	0	-	0	+
9	6'-O- β -D- Apiofuranosylsweroside	++	0	--	0	+++	+	--	-	0	0	--	--
10	Luteolin- glucopyranoside	0	+++	0	+	0	--	--	0	0	0	--	0
11	unknown	-	++	-	-	++	++	--	--	-	+	--	--
12	Secologanol	+++	-	+	-	+	+	-	+	+	0	-	0
13	secologanin	-	+++	-	0	+	++	0	--	+	+	-	-
14	unknown	+++	+++	--	-	+	-	0	0	0	0	0	0

15	Kingside	--	+	--	-	-	-	+	+	+	++	-	--
16	secologanin isomer	+	+++	+	0	-	-	0	0	++	0	+	0
17	Miscanthoside	0	+++	0	-	0	+	0	--	0	0	--	--
18	luteolin-7-O-glucoside	0	++	--	++	--	+++	--	--	0	+	0	+
19	unknown	++	-	+	--	-	--	-	--	+++	0	--	--
20	unknown	++	-	++	0	0	0	0	0	0	0	+++	+
21	3,5-di-O-caffeoylquinic acid	-	+	+	-	--	-	-	--	-	++	++	+
22	Miscanthoside isomer	0	--	--	0	0	0	0	0	--	--	--	--
23	Cosmociin	0	+	0	+	0	+++	0	--	0	+	--	+++
24	4,5-di-O-Caffeoylquinic acid	+	+	+	+	--	--	-	--	-	-	++	+
25	E-Aldosecologanin	++	-	+	--	-	--	-	--	+++	-	--	--
26	grandifloroside	++	-	+	--	-	-	-	--	-	--	+++	--
27	Hesperetin	--	+++	--	+	--	0	0	0	0	0	0	0
28	Periclymenoside	++	--	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
29	7-O-E-Feruloylloganic acid	-	+	--	--	0	0	0	0	+++	--	0	0
30	luteolin	0	+	--	+	--	-	--	+	--	+++	--	-
31	Lonitocide	++	+++	-	--	--	--	--	0	+	++	--	0

32	unknown	+++	+++	0	--	--	0	0	--	0	0	0	0
33	unknown	+++	--	++	+	+	-	0	--	--	0	0	0
34	Kinginoside	+++	++	--	-	--	-	0	0	0	0	0	--
35	unknown	++	-	+++	+++	--	--	--	--	--	0	0	--
36	Onjixanthone I	0	+++	0	-	0	0	0	0	--	0	0	0
37	Diflavonoid	--	+++	--	--	--	-	--	++	--	0	--	+++
38	unknown	+	--	+	--	++	--	++	-	++	--	-	--
39	Diflavonoid	--	+++	--	+	--	-	--	+	--	0	--	+++

2.2. 다변량 분석

이차대사체에 대한 PCA 결과에서 울피불나무가 특징적으로 다른 그룹과 구분 되는 것과 달리 섬피불나무는 다른 종과 구분 지어지지 않아 비슷한 성분이 함유 되어 있음을 예상하였다 (Figure 38).

섬피불나무를 구분하여 설정한 변인에서는 OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis)를 추가로 시행해 다른 군 간의 명확한 관별을 재평가하였다. S-plot 결과 kinginoside 와 hesperetin 함량 차이가 다른 종과 구분 짓는데 큰 영향을 끼친 것으로 확인되었다. 지상부에서 함량이 많은 flavonoid 인 hesperetin 을 확인 할 수 있었고 kinginoside 란 phenylpropanoid 와 secoiridoid 가 결합된 화합물이 다른 종과 다르게 특징적으로 지하부에 분포한다는 것을 확인하였다. 그리고 loganic acid 라는 기본적인 iridoid 계열 화합물은 다른 종보다 낮은 함량을 나타내었다 (Figure 39).

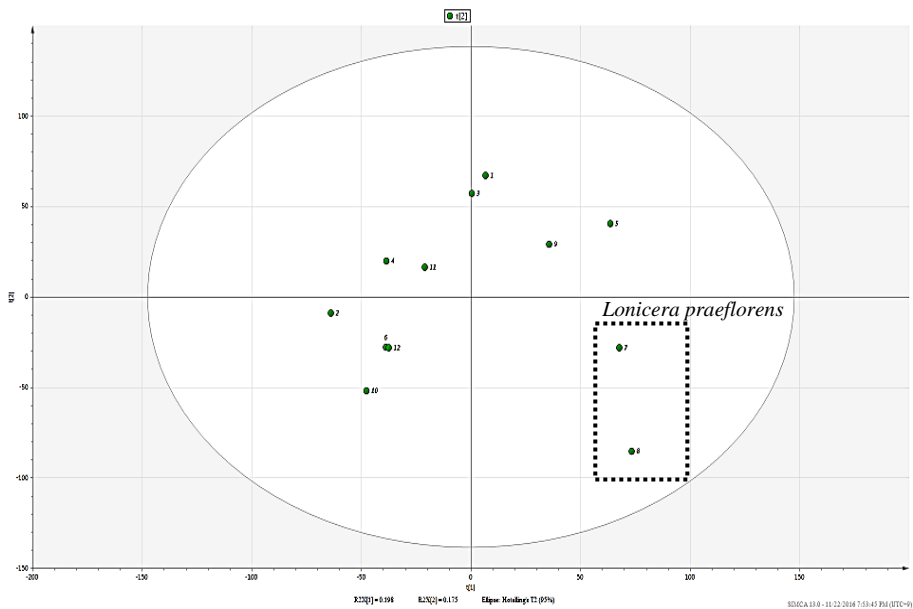


Figure 38. PCA score plots of *Lonicera* species

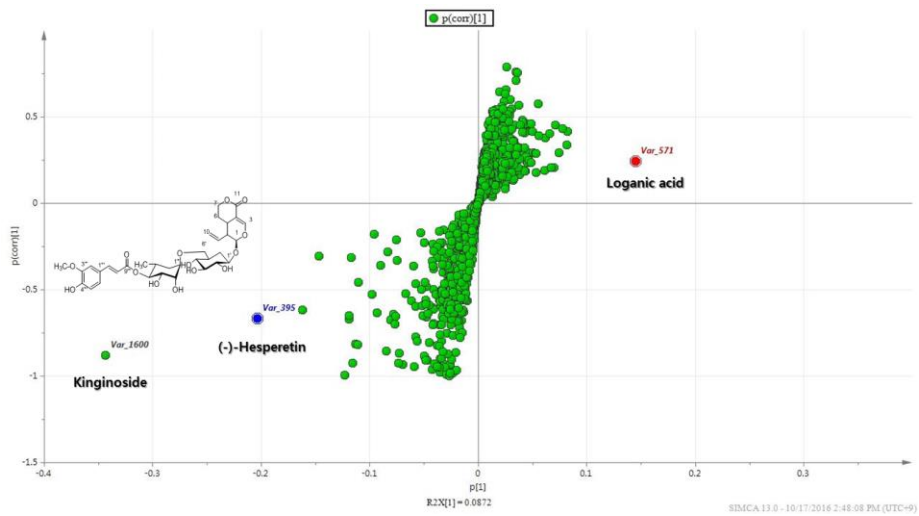


Figure 39. S-plot of OPLS-DA from *Lonicera insularis*

IV. 결론

1. 섬괴불나무 (*Lonicera insularis* Nakai)의 분리를 위해 UPLC-qTOF-MS를 이용하여 MS profiling과 다변량분석을 선행하였다.
2. 섬괴불나무의 EtOAc 분획, n-BuOH 분획으로부터 LC-MS의 기법을 이용하여 총 16종의 화합물을 분리하였다. 각각의 화합물은 이화학적 성상 및 분광학적 데이터를 종합하여 화합물 **1-3**은 phenylpropanoid, **4-8**은 iridoid, **9-16**은 secoiridoid 계열 물질이었다.
3. 화합물 **1, 16** 은 *p*-coumaryl 9-*O*-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 6)]-*O*- β -D-glucopyranoside, argininosecologanin 으로서 천연에서 처음 분리, 보고되는 물질이었다.
4. 화합물 **2, 3, 8, 11**은 인동속 (*Lonicera*)에서 처음 보고되는 물질이었다.
5. HT22세포주에서 뇌세포보호활성 screening을 화합물 12개에서 진행하였다. 대부분의 뇌세포보호활성은 미미하였지만 그 중 화합물 **3**에서 $60.45 \pm 2.74\%$, **10**에서 $60.53 \pm 2.14\%$ 정도로 가장 좋은 세포보호 활성을 보였다.

V. 참고문헌

안연순. 『한반도 고유종 총람』. 인천: 국립생물자원관, 1911.

Choi, C. W., Jung, H. A., Kang, S. S., & Choi, J. S. (2007). Antioxidant constituents and a new triterpenoid glycoside from *Flos Lonicerae*. *Archives of Pharmacal research*, 30, 1-7.

Calis, I., Lahloub, M. F., & Sticher, O. (1984). Loganin, loganic acid and periclymenoside, a new biosidic ester iridoid glucoside from *Lonicera periclymenum* L.(Caprifoliaceae). *Helvetica Chimica Acta*, 67, 160-165.

Dinda, B., Debnath, S., & Harigaya, Y. (2007). Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. A review, part 2. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55, 689-728.

Gao, W., Yang, H., Qi, L. W., Liu, E. H., Ren, M. T., Yan, Y. T., & Li, P. (2012). Unbiased metabolite profiling by liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry and multivariate data analysis for herbal authentication: Classification of seven *Lonicera* species flower buds. *Journal of Chromatography A*, 1245, 109-116.

Gao, W., Wang, R., Li, D., Liu, K., Chen, J., Li, H. J., & Yang, H. (2016). Comparison of five *Lonicera* flowers by simultaneous determination of multi-components with single reference standard method and principal component analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 117, 345-351.

Gargaro, A. R., Frenkiel, T. A., Nieto, P. M., Birdsall, B., Polshakov, V. I., Morgan, W. D., & Feeney, J. (1996). NMR Detection of Arginine-Ligand Interactions in Complexes of *Lactobacillus casei* Dihydrofolate Reductase. *European Journal of Biochemistry*, 238, 435-439.

- Jeong, K. S., Kim, M. S., Lee, W., & Pak, J. H. (2014). Intraspecific variation and geographic study of *Lonicera insularis* (Caprifoliaceae) based on chloroplast DNA sequences. *Korean Journal of Plant Taxonomy*, 44, 202-207.
- Kim, H. J., Lee, D. J., Ku, J. J., Choi, K., Park, K. W., Kang, S. H., & Lee, P. J. (2013). Anti-inflammatory effect of extracts from folk plants in Ulleung Island. *Korean Journal of Plant Resources*, 26, 169-177
- Kim, H. J., Seo, Y. T., Park, S.I., Jeong, S. H., Kim, M. K. & Jang, Y. P. (2014). DART–TOF–MS based metabolomics study for the discrimination analysis of geographical origin of *Angelica gigas* roots collected from Korea and China. *Metabolomics*, 11, 64-70.
- Lee, J. S., Kim, H. J., Woo, E. R., Park, Y. A. W., Lee, Y. S., & Park, H. (2001). 7-Feruloylloganin: an iridoid glucoside from stems of *Lonicera insularis*. *Planta Medica*, 67, 99-102.
- Li, J. L., Han, S. C., Yoo, E. S., Shin, S., Hong, J., Cui, Z., & Jung, J. H. (2011). Anti-inflammatory amino acid derivatives from the ascidian *Herdmania momus*. *Journal of Natural Products*, 74, 1792-1797.
- Liu, Z. X., Liu, C. T., Liu, Q. B., Ren, J., Li, L. Z., Huang, X. X., & Song, S. J. (2015). Iridoid glycosides from the flower buds of *Lonicera japonica* and their nitric oxide production and α -glucosidase inhibitory activities. *Journal of Functional Foods*, 18, 512-519.
- Machida, K., Sasaki, H., Iijima, T., & Kikuchi, M. (2002). Studies on the constituents of *Lonicera* species. XVII. New iridoid glycosides of the stems and leaves of *Lonicera japonica* THUNB. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50, 1041-1044.

- Mizuno, M., Kato, M., Misu, C., Iinuma, M., & Tanaka, T. (1991). Chaenomeloidin: a phenolic glucoside from leaves of *Salix chaenomeloides*. *Journal of Natural Products*, 54, 1447-1450.
- Mpondo, E. M., Garcia, J., & Lestani, J. (1989). New secoiridoid glucosides from *Gentiana verna*. *Journal of Natural Products*, 52, 1146-1149.
- Norio AIMI, Hideo SEKI & Shin-ichiro SAKAI (1992). Synthesis of lyaloside, a prototypal. β -carboline gluco indole alkaloid in rubiaceous plants. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40, 2588-2590.
- Otsuka, H., Kashima, N., & Nakamoto, K. (1996). A neolignan glycoside and acylated iridoid glucosides from stem bark of *Alangium platanifolium*. *Phytochemistry*, 42, 1435-1438.
- Prasad, D., Juyal, V., Singh, R., Singh, V., Pant, G., & Rawat, M. S. (2000). A new secoiridoid glycoside from *Lonicera angustifolia*. *Fitoterapia*, 71, 420-424.
- Qi, L. W., Chen, C. Y., & Li, P. (2009). Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in Flos *Lonicerae Japonicae* by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23, 3227-3242.
- Ren, M. T., Chen, J., Song, Y., Sheng, L. S., Li, P., & Qi, L. W. (2008). Identification and quantification of 32 bioactive compounds in *Lonicera* species by high performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 48, 1351-1360.
- Shang, X., Pan, H., Li, M., Miao, X., & Ding, H. (2011). *Lonicera japonica* Thunb.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 1-21.

Song, W. X., Yang, Y. C., & Shi, J. G. (2014). Two new β -hydroxy amino acid-coupled secoiridoids from the flower buds of *Lonicera japonica*: isolation, structure elucidation, semisynthesis, and biological activities. *Chinese Chemical Letters*, 25, 1215-1219.

Suberu, J., Gromski, P. S., Nordon, A., & Lapkin, A. (2016). Multivariate data analysis and metabolic profiling of artemisinin and related compounds in high yielding varieties of *Artemisia annua* field-grown in Madagascar. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 117, 522-531.

Tanaka, T., Nakashima, T., Ueda, T., Tomii, K., & Kouno, I. (2007). Facile discrimination of aldose enantiomers by reversed-phase HPLC. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55, 899-901.

Teng, R. W., Wang, D. Z., Wu, Y. S., Lu, Y., Zheng, Q. T., & Yang, C. R. (2005). NMR assignments and single-crystal X-ray diffraction analysis of deoxyloganic acid. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43, 92-96.

Terashima, N., Ralph, S. A., & Landucci, L. L. (1996). New facile syntheses of monolignol glucosides; *p*-glucocoumaryl alcohol, coniferin and syringin. *Holzforschung*, 50, 151-155.

Tietze, L. F., Henke, S., & Bärtels, C. (1988). Biomimetic transformations of the biogenetic key intermediate secologanin: First synthesis of the secoiridoid secogalioside. *Tetrahedron*, 44, 7145-7153.

Wang, W., Sun, F., An, Y., Ai, H., Zhang, L., Huang, W., & Li, L. (2009). Morroniside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *European Journal of Pharmacology*, 613, 19-23.

Welthagen, W., Shellie, R. A., Spranger, J., Ristow, M., Zimmermann, R., & Fiehn, O. (2005). Comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry (GC× GC-TOF) for high resolution metabolomics: biomarker discovery on spleen tissue extracts of obese NZO compared to lean C57BL/6 mice. *Metabolomics*, 1, 65-73.

Weon, J. B., Yang, H. J., Lee, B., Yun, B. R., Ahn, J. H., Lee, H. Y., & Ma, C. J. (2011). Neuroprotective activity of the methanolic extract of *Lonicera japonica* in glutamate-injured primary rat cortical cells. *Pharmacognosy Magazine*, 7, 284.

Wu, S., He, X., Wu, X., Qin, S., He, J., Zhang, S., & Hou, D. X. (2015). Inhibitory effects of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea L*) on adjuvant-induced arthritis in rats: Crosstalk of anti-inflammatory and antioxidant effects. *Journal of Functional Foods*, 17, 514-523.

Zhang, X., Xu, Q., Xiao, H., & Liang, X. (2003). Iridoid glucosides from *Strychnos nux-vomica*. *Phytochemistry*, 64, 1341-1344.

Abstract

Chemical Constituents from *Lonicera insularis*

MI SONG KIM

Department of Pharmacy
The Graduate School
Seoul National University

Lonicera insularis Nakai (Caprifoliaceae) is Korean endemic plant that lives along the shore of Ulleungdo and Dokdo. *L. insularis* is rarely researched herb compared to other *Lonicera* species. The constituents of *Lonicera* species have been reported as organic acids, iridoids, flavonoids and saponins. It also exhibits various bioactivities such as anti-inflammatory, anti-virus, anti-diabetic, hepatoprotective and anti-oxidant effect.

The 80% methanolic extract was suspended in H₂O and then subsequently fractionated with CHCl₃, EtOAc and *n*-BuOH. Sixteen compounds were isolated from EtOAc, *n*-BuOH by chromatographic techniques. Structure of compounds have been identified as *p*-coumaryl 9-*O*-[β-D-apiofuranosyl(1→6)]-*O*-β-D-glucopyranoside (**1**), salidroside I (**2**), *p*-coumaryl alcohol-4-*O*-glucoside (**3**), loganic acid (**4**), 7-deoxyloganic acid (**5**), loganin (**6**), periclymenoside (**7**), 7-*O*-*E*-feruloylloganic acid (**8**), sweroside (**9**), secologanin (**10**), secologanol (**11**), (*E*)-aldosecologanin (**12**), kinginoside (**13**), threninosecologanin (**14**), 5α-carboxystrictosidine (**15**), argininosecologanin (**16**). Compound **1** and **16** are newly reported in nature and **2**, **3**, **8** and **11** are newly reported from *Lonicera* genus.

These compounds showed relatively mild neuroprotective effect on glutamate-induced neurotoxicity on HT22cell. Among these compounds, Compound **3** and **10** showed moderate activity.

Using UPLC-qTOF-MS allows a comprehensive analysis for authentication of *L. insularis*. Secondary metabolites of *L. insularis* were identified through the metabolic MS profiling. The various phenolic acids, iridoids, secoiridoids, saponins and flavonoids were identified through the MS profiling. Principal component analysis (PCA) was performed for secondary metabolites in 6 samples of *Lonicera*. Orthogonal projections to latent structure-discriminant analysis (OPLS-DA) models for discriminated cases were used to obtain the markers that contributed to the difference between *L. insularis* and the other species and metabolite markers were finally determined by S-plot. Kinginoside (**13**) which is secoiridoid conjugated phenylpropanoid was determined as discriminative compound.

In conclusion, these results found existence of a various derivatives of secoiridoids in *L. insularis* and valuable base data for comparison among *Lonicera* species for future study.

Keywords : *Lonicera insularis* Nakai, Caprifoliaceae, iridoid, secoiridoid, phenylpropanoid, UPLC-qTOF-MS, HT22

Student Number : 2015-21864