

참소리쟁이의 세포독성 성분

김대근[†] · 최상운* · 류시용* · 이강노[#] · 지옥표
성균관대학교 약학대학, *한국화학연구소, [†]우석대학교 약학대학
(Received February 26, 1998)

Cytotoxic Constituents of *Rumex japonicus*

Dae Keun Kim[†], Sang Un Choi*, Si Yong Ryu*,
Kang Ro Lee[#] and Ok Pyo Zee

Natural Product Laboratory, College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University,
Suwon 440-746, Korea

*Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107, Dae Jeon 305-342, Korea

[†]Natural Products Laboratory, College of Pharmacy, Woosuk University, Cheonju 565-800, Korea

Abstract—Activity-guided fractionation and repeated column chromatography afforded two cytotoxic compounds **R-3** and **R-4** from the root of *Rumex japonicus* HOUTT. Compounds were identified as musizin and emodin, respectively, by the physicochemical and spectral data. Besides **R-3** and **R-4**, two compounds **R-1** and **R-2**, chrysophanol and physcion, respectively, were also isolated. The compound **R-3** and **R-4** exhibited cytotoxicity against cultured human tumor cell lines, A-549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498 and HCT15 with ED₅₀ values ranging from 2.68 to 10.06 µg/ml.

Keywords □ *Rumex japonicus*, cytotoxicity, musizin, emodin.

참소리쟁이(*Rumex japonicus* HOUTT.)는 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 다년초로서 국내에 흔히 자생되고 있다. *Rumex*속 식물로 국내에 자생되고 있는 것으로 소리쟁이(*R. crispus*), 애기수영(*R. acetocella*), 수영(*R. acetosa*), 토대황(*R. aquatica*), 개대황(*R. longifolius*), 호대황(*R. gmelini*), 목발소리쟁이(*R. conglomeratus*) 및 금소리쟁이(*R. maritimus*) 등이 알려져있다. 참소리쟁이는 민간에서 어린순을 식용하며 한방에서는 뿌리를 양제근(羊蹄根)이라하여 대황 대용으로 대변조결(大便燥結), 황달(黃疸), 토혈(吐血), 기능성 자궁출혈(機能性 子宮出血), 개선(疥癬) 등에 이용되고있다.^{1,2)} 참소리쟁이를 비롯한 *Rumex*속 식물에 대해서는 많은 연구가 수행되었으며 성분연구로는 주로 flavonoid³⁻⁵⁾와 anthraquinone 유도체에 대한 보고⁶⁻⁸⁾가 대부분이다. *Rumex*속 식물은 전 세계적으로

풍부하게 자생되고 있으므로 chemotaxonomy,^{9,10)} 광합성,¹¹⁾ 및 중금속 축적 조사에의한 강의 오염도¹²⁾ 연구 등 여러 실험재료로 쓰이고 있다. 본 연구는 세포독성을 쫓아서 실험을 수행하여 참소리쟁이로부터 세포독성이 우수한 anthraquinone 화합물 1종과 naphthalene 화합물 1종을 분리하여 그 구조를 확인 동정하였으며, 이들 2종 외에 미약한 세포독성 anthraquinone 물질 2종도 분리 확인하였다.

실험방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 참소리쟁이는 1995년 9월에 경남 창녕군 일대에 자생하는 것을 채취하였다. 위 식물들은 정확히 감정한 후에 음건세절하여 실험에 사용하였다.

시약 및 기기 - column packing용 silica gel은 silical gel 60 (70~230 mesh and 230~400 mesh, Merck)을 사용하였고, TLC plate는 silica gel 60F₂₅₄

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0331-290-7710 (팩스) 0331-290-7745

(Merck)을 사용하였다. 발색 시약은 10% H₂SO₄ (in EtOH)을 사용하였으며 UV (254 nm, 365 nm) detection을 병행하였다. 용점 측정은 Gallenkamp melting point apparatus를 사용하였으며 온도보정은 하지 않았다. ¹H-NMR과 ¹³C-NMR은 Bruker AMX-500과 Varian INOVA-500을 사용하였다. IR은 JASCO FT/IR-5300을 사용하였다. EI-MS는 VG70-VSEQ (VG Analytical, UK)를 사용하였다. LPLC용 column은 Lobar A LiChroprep Si60 (Merck)을 사용하였다.

세포독성실험 - 세포독성 실험은 Sulforhodamin B Bioassay(SRB) 방법을 응용하여 수행하였다.¹³⁾ 실험에 사용한 암세포들은 A549 (non small cell lung carcinoma), SK-OV-3 (adenocarcinoma, ovary malignant ascites), SK-MEL-2 (malignant melanoma, metastasis to skin of thigh), XF498 (central nerve system tumor) 및 HCT15 (colon adenocarcinoma) 등이다.

추출및 분획 - 신선한 참소리쟁이 지하부 약 1 kg을 음건 세절하여 10일간 methanol로 2회 냉침하고, 50°C로 5시간 2회 온침하였다. 추출액을 수욕상에서 감압농축하여 methanol extract 250 g을 얻었으며, 이를 H₂O에 현탁시킨후 n-hexane (800 ml×2), methylene chloride (800 ml×2), ethyl acetate (800 ml×2) 및 butanol (800 ml×2)로 분획하였다. 각 분획에 대한 세포독성검색에서 CH₂Cl₂ 엑스가 강한 활성을 보였으므로 CH₂Cl₂ 엑스 15 g을 n-hexane : etOAc(3:1)를 유출용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 8개의 분획으로 나누었으며, 각 분획에 대하여 세포독성을 측정된 결과 3 및 6번 분획에서 높은 활성을 나타내어 이들 분획에 대해 column chromatography를 반복실시하여 화합물을 분리하였다.

Compound R-1 - CH₂Cl₂ 엑스를 silica gel column chromatography를 하여 얻은 8개의 분획 중 3번 분획물에 대하여 다시 n-hexane : CHCl₃ (1:4.5)를 유출용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 3개 소분획으로 나누었다. 이 중 1번 소분획을 silica gel column chromatography (n-hexane : THF=20:1)로 정제하여 주황색 결정 (THF) 15 mg을 얻었다.

mp : 195~197°C; UV λ_{max}(MeOH) nm : 224, 256, 276, 286, 430(sh); IR ν_{max}(Nujol, cm⁻¹) :

Table I—¹³C-NMR chemical shifts of compound **R-1**, **R-2**, **R-3** and **R-4**

C	R-1*	R-2*	R-4**	R-3**
1	162.9	162.8	161.3	153.9
2	124.5	124.7	124.0	123.0
3	149.5	148.8	148.1	133.0
4	121.3	121.3	120.3	118.6
5	119.8	108.5	108.7	119.0
6	137.4	167.0	165.5	128.0
7	124.6	107.0	107.8	108.4
8	162.6	165.7	164.4	152.8
9	192.6	191.0	189.5	
10	181.8	181.9	181.1	
4a	134.1	135.6	132.6	136.2
8a	116.4	110.5	108.8	112.6
9a	114.3	114.2	113.2	
10a	133.7	133.7	134.9	
-CH ₃	21.9	21.8	21.4	19.6
-OCH ₃		56.2		
-COCH ₃				33.2
-COCH ₃				204.2

* 125 MHz, Pyridine-*d*₅

** 125 MHz, DMSO-*d*₆

3390(OH), 1675(free C=O), 1627(chelated C=O), 1279; MS(EI, 70 eV, m/z, rel. int.): 254(M⁺, 100), 226(11), 197(10), 152(10); ¹H-NMR(500 MHz, Pyridine-*d*₅, δ ppm) : 12.18(2H, s, OH), 7.87(1H, *dd*, *J*=7.5, 0.9, H-5), 7.68(1H, *d*, *J*=1.2, H-4), 7.60(1H, *t*, *J*=7.5, H-6), 7.32(1H, *dd*, *J*=7.5, 0.9, H-7), 7.10(1H, *d*, *J*=1.2, H-2), 2.23(3H, s, CH₃); ¹³C-NMR(125 MHz, Pyridine-*d*₅, δ ppm) : (Table 1)

Compound R-2 - Compound **R-1**과 동일한 과정을 거쳐 얻은 3개의 소분획 중 2번 소분획을 n-hexane : THF(5:1)을 유출용매로 silica gel column chromatography로 정제하여 주황색 결정 (THF) 20 mg을 얻었다.

mp : 206~208°C; UV λ_{max}(MeOH) nm : 221, 253, 265, 285, 435(sh); IR ν_{max}(Nujol, cm⁻¹) : 3410(OH), 1670(free C=O), 1625(chelated C=O); MS(EI, 70 eV, m/z, rel. int.): 284(M⁺, 100), 255(9), 227(5), 213(6), 185(5), 139(5); ¹H-NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅, δ ppm) : 7.70(1H, *d*, *J*=1.2, H-4), 7.51(1H, *d*, *J*=2.7, H-5), 7.13(1H, *d*, *J*=1.2, H-2), 6.89(1H, *d*, *J*=2.7, H-7), 3.77(3H, s, OCH₃), 2.24(3H, s, CH₃); ¹³C-NMR(125 MHz, Pyridine-*d*₅, δ ppm) : (Table 1)

Compound R-3 - Compound **R-1**과 동일한 과정을

거쳐 얻은 3개의 소분획 중 3번 소분획을 n-hexane : THF(5:1)을 유출용매로 silica gel column chromatography로 정제하여 황색 침상결정(THF) 50 mg을 얻었다.

mp: 175~177°C; UV λ_{max} (MeOH) nm : 219, 275, 293sh, 336; IR ν_{max} (Nujol, cm^{-1}) : 3420 (OH), 1650(C=O); MS(EI, 70 eV, m/z, rel. int.) : 216 (M^+ , 67), 201(100), 155(14), 149(37), 127(22), 115(15); 1H -NMR(500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) : 7.28(1H, dd, J=8.1, 7.5, H-6), 7.21(1H, d, J=8.1, H-7), 7.09(1H, s, H-4), 6.76(1H, d, J=7.5, H-5), 2.58(3H, s, COCH₃), 2.26(3H, s, CH₃); ^{13}C -NMR(125 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) : (Table 1)

Compound R-4 - CH₂Cl₂ 엑스를 silica gel column chromatography를 하여 얻은 8개의 분획 중 6번 분획물에 대하여 다시 CH₂Cl₂ : MeOH(40:1)를 유출용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 3개 소분획으로 나누었다. 이중 2번 소분획을 silica gel column chromatography(CH₂Cl₂ : EtOAc=8:1)로 정제하여 주황색 결정(THF) 130 mg을 얻었다.

mp : 263~265°C; UV λ_{max} (MeOH) nm : 221, 252, 265, 287, 440(sh); IR ν_{max} (Nujol, cm^{-1}) : 3436(OH), 1680(free C=O), 1629(chelated C=O); MS(EI, 70 eV, m/z, rel. int.) : 270(M^+ , 55), 242(12), 213(22), 139(60), 77(78), 69(100), 51(88); 1H -NMR(500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) : 12.00 (1H, s, OH), 11.92(1H, s, OH), 7.38(1H, d, J=1.2, H-4), 7.07(1H, d, J=1.2, H-2), 7.04(1H, d, J=2.4, H-5), 6.53(1H, d, J=2.4, H-7), 2.37(3H, s, CH₃); ^{13}C -NMR(125 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) : (Table 1)

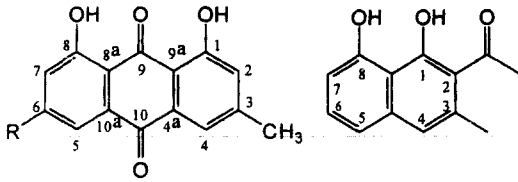
결과 및 고찰

참소리쟁이를 MeOH로 추출한 후 n-hexane, CH₂-Cl₂, EtOAc, n-BuOH 및 H₂O로 용매분획하여 각 분획물에 대한 세포독성을 측정하였다. 가장 강한 활성을 나타낸 CH₂Cl₂ 엑스를 silica gel column chromatography를 실시하여 8개의 분획으로 나누어 3번 분획에서 compound **R-1**, **R-2** 및 **R-3**를 분리하였으며, 6번 분획에서 compound **R-4**를 분리하였다.

Compound **R-1**은 주황색의 침상결정으로 1% KOH 시약에 의하여 적색으로 발색되었다. IR spec-

trum에서 3390 cm^{-1} 에서 OH를, 1675 cm^{-1} 에서 free C=O를, 1627 cm^{-1} 에서 chelated된 C=O band를 각각 확인할 수 있었다. UV spectrum에서 224, 256, 276, 286, 430(sh)nm에서 전형적인 anthraquinone 유도체의 흡수 band를 관찰할 수 있었다.¹⁴ EI-MS spectrum에서 분자 이온 peak가 m/z 254(M^+)에서 나타났다. 1H -NMR spectrum에서 δ 7.60(1H, t, J=7.5, H-6)의 peak와 좌우로 ortho coupling을 하는 δ 7.87(1H, dd, J=7.5, 0.9, H-5), δ 7.32(1H, dd, J=7.5, 0.9, H-7)의 2개의 peak가 관찰되었으며, δ 7.68(1H, d, J=1.2, H-4)과 meta coupling을 하는 δ 7.10(1H, d, J=1.2, H-2)의 peak가 관찰되었다. 또한 δ 12.18(2H, s, OH)의 분자내 chelated hydroxy signal 및 δ 2.23(3H, s, CH₃)에서 aromatic methyl proton을 각각 확인할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 δ 192.6 및 181.8에서 carbonyl carbon인 9번, 10번 peak를, δ 162.9 및 162.6에서 oxygenated carbon인 1번, 8번의 peak를, δ 149.5에서는 CH₃가 치환된 aromatic carbon을 관찰할 수 있었다(Table 1). 이상의 결과와 기존의 문헌¹⁵⁻¹⁷을 비교하여 compound **R-1**은 1,8-dihydroxy-3-methyl anthraquinone(chrysophanol)으로 구조를 확인 동정하였다.

Compound **R-2**는 주황색의 침상결정으로 KOH 시약에 의하여 적색으로 발색되었다. IR spectrum에서 3410 cm^{-1} 에서 OH, 1670 cm^{-1} 에서 free C=O, 1625 cm^{-1} 에서 chelated된 C=O를 각각 확인할 수 있었으며, UV spectrum에서 221, 253, 265, 285, 435(sh)nm에서 전형적인 anthraquinone 유도체의 흡수 band를 관찰할 수 있었다.¹⁴ EI-MS spectrum에서 분자 이온 peak가 m/z 284(M^+)에서 나타났다. 1H -NMR spectrum에서 δ 7.70(1H, d, J=1.2, H-4)의 peak와 meta coupling을 하는 δ 7.13(1H, d, J=1.2, H-2)의 peak가 관찰되었으며, δ 7.51(1H, d, J=2.7, H-5)과 meta coupling을 하는 δ 6.89(1H, d, J=2.7, H-7)의 peak가 또한 관찰되었다. 그리고 δ 3.77(3H, s, OCH₃)의 peak와 δ 2.24(3H, s, CH₃)에서 aromatic methyl proton을 각각 확인할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 δ 191.0 및 181.9에서 carbonyl carbon인 9번, 10번 peak를, δ 162.8, 165.7에서 oxygenated carbon인 1번, 8번의 peak를 δ 148.8에서는 CH₃가 인접한 aromatic carbon을 관찰할 수 있었으며, δ 167.0에서 OCH₃가 치환



Comp. R-1 R = H

Comp. R-3

Comp. R-2 R = OCH₃

Comp. R-4 R = OH

Fig. 1— Structures of isolated compounds from *Rumex japonicus*.

된 aromatic carbon을 관찰할 수 있었다(Table I). 이상의 결과와 기존의 문헌¹⁵⁻¹⁷⁾을 비교하여 compound **R-2**는 1, 8-dihydroxy-3-methyl-6-methoxyanthraquinone(phycion)으로 구조를 확인 동정하였다.

Compound **R-3**은 황색의 침상결정으로 UV 254 nm에서 형광을 띤 황색으로 보였으며, UV spectrum은 $\lambda_{\max}(\text{MeOH})$ 가 219, 275, 336 nm에서 나타나 전형적인 naphthalene 유도체의 흡수 band를 관찰할 수 있었다.¹⁸⁾ IR spectrum에서 3420 cm⁻¹에서 OH를, 1650 cm⁻¹에서 C=O를 확인할 수 있었으며 MS spectrum에서 분자 이온 peak가 m/z 216(M⁺)에서 나타났다. ¹H-NMR spectrum의 aromatic region에서 $\delta 7.28$ (1H, dd, J=8.1, 7.5, H-6), $\delta 7.21$ (1H, d, J=8.1, H-7), $\delta 7.09$ (1H, s, H-4) 및 $\delta 6.76$ (1H, d, J=7.5, H-5)의 peak를 관찰할 수 있었다. 또한 $\delta 2.58$ (3H, s, COCH₃) 및 $\delta 2.26$ (3H, s, CH₃)에서 methyl groups를 각각 확인할 수 있었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 $\delta 204.2$ 의 carbonyl carbon peak이외에, aromatic region에서 10개의 peaks를 관찰할 수 있었으며, aliphatic region에서는 $\delta 33.2$ 과 $\delta 19.6$ 에서

methyl peak 2개만을 관찰할 수 있었다(Table I). 이상의 결과로 compound **R-3**은 naphthalene핵에 tetrasubstituted된 화합물로 추정하였으며 기존 문헌¹⁹⁾과 비교하여 2-acetyl-3-methyl-1, 8-naphthalenediol(musizin)으로 확인 동정하였다.

Compound **R-4**는 주황색의 침상결정으로 KOH 시약에 의하여 적색으로 발색되었다. IR spectrum에서 3436 cm⁻¹에서 OH를, 1680 cm⁻¹에서 free C=O를, 1629 cm⁻¹에서 chelated된 C=O band를 각각 확인할 수 있었으며, UV spectrum에서 221, 252, 265, 287, 440(sh)nm에서 전형적인 anthraquinone 유도체의 흡수 band를 관찰할 수 있었다.¹⁴⁾ EI-MS spectrum에서 분자 이온 peak가 m/z 270(M⁺)에서 나타났다. ¹H-NMR spectrum에서 $\delta 7.38$ (1H, d, J=1.2, H-4)의 peak와 meta coupling을 하는 $\delta 7.07$ (1H, d, J=1.2, H-2)의 peak가 관찰되었으며, $\delta 7.04$ (1H, d, J=2.4, H-5)과 meta coupling을 하는 $\delta 6.53$ (1H, d, J=2.4, H-7)의 peak가 또한 관찰되었다. 그리고 $\delta 12.00$ (1H, s, OH)과 $\delta 11.92$ (1H, s, OH)의 분자내 chelated hydroxy signal 및 $\delta 2.37$ (3H, s, CH₃)에서 aromatic methyl proton을 각각 확인할 수 있었다. ¹³C-NMR spectrum에서 $\delta 189.5$, 181.1에서 carbonyl carbon인 9번, 10번 peak를, $\delta 161.3$, 164.4에서 oxygenated carbon인 1번, 8번의 peak를, $\delta 148.1$ 에서는 CH₃가 치환된 aromatic carbon을 관찰할 수 있었다(Table I). 이상의 결과와 기존의 문헌¹⁵⁻¹⁷⁾을 비교하여 compound **R-4**는 1, 6, 8-trihydroxy-3-methylanthraquinone (emodin)으로 구조를 확인 동정하였다. Anthraquinone 유도체인 compound **R-1**과 **R-2**는 약한 세포독성을 보인 반면 **R-4**는 ED₅₀($\mu\text{g}/\text{ml}$) 값이 5종의 cancer cell line에 대해서 10.06~3.13, naphthalene 유도체인 compound **R-3**은 3.19~2.68로 강한 세포독성을 나타냈다(Table II).

Table II— The cytotoxic activities of compounds from *Rumex japonicus* on some cancer cell lines

Compounds	ED ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)*				
	A-549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF-498	HCT 15
R-1	>100	>100	72.18	>100	>100
R-2	59.26	>100	44.94	95.18	65.82
R-3	6.47	7.48	3.13	10.06	6.53
R-4	2.68	3.19	2.72	3.08	3.00

* ED₅₀ value of compound against each cancer cell line, which was defined as a concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) that caused 50% inhibition of cells growth *in vitro*.

감사의 말씀

본연구는 한국과학재단 목적기초연구과제(KOSEF : 935-0400-70)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) 이창복 : 대한식물도감, 향문사, 서울 p. 297 (1989).
- 2) 동국대학교 한의과대학 본초학회 번역 : 중국본초도감 (제1권), 여강출판사, 서울 p. 154 (1994).
- 3) Vysochina, G. I. and Gontar, E. M. : Flavonoids of Rumex L. species of the Holoapathum Losinsk. section, *Resursyi Introduktsiya Polezn. Rast. Sibiri, Novosibirsk*, p. 154 (1981).
- 4) Kawasaki, M., Kanomata, T. and Yoshitama, K. : Flavonoids in the leaves of twenty-eight polygonaceous plants. *Bot. Mag.* **99**, 63 (1986).
- 5) Saleh, N. A. M., El-Hadidi, M. N. and Arafa, R. F. M. : Flavonoids and anthraquinones of some Egyptian Rumex species. *Biochem. Syst. Ecol.* **21**, 301 (1993).
- 6) Sayed, M. D., Balbaa, S. I. and Afifi, M. S. A. : Anthraquinone content of certain Rumex species growing in Egypt. *Egypt. J. Pharm. Sci.* **15**, 1 (1975).
- 7) Rada, K. and Hrochova, V. : Anthraquinones in some Rumex species. *Herba Hung* **14**, 7 (1976).
- 8) Demirezer, L. O. : Anthraquinone derivatives in Rumex gracilescens and R. crispus. *Pharmazie* **49**, 378 (1994).
- 9) Fairbairn, J. W. and El-Muhradi, F. J. : Chemotaxonomy of anthraquinones in Rumex. *Phytochemistry* **11**, 263 (1972).
- 10) Sagatov, S. S. : Chemotaxonomy of some middle-Asiatic Rumex species. *Opyt. Kul't. Nov. Syr'evykh Rast* **1**, 195 (1974).
- 11) Amthor, J. S., Koch, G. W. and Bloom, A. J. : Carbon dioxide inhibits respiration in leaves of Rumex crispus. *Plant Physiol.* **98**, 757 (1992).
- 12) Koh, S. D. and Shin, C. N. : Atomic absorption spectrophotometric analysis of heavy metals accumulated in river bed soils and plants in Seoul area. *Haksul Yonguchi-Chugnam Taehakkyo, Chayon Kwahak Yonguso* **8**, 109 (1981).
- 13) Ryu, S. Y., Lee, C. K., Lee, C. O., Kim, H. S. and Zee, O. P. : Antiviral triterpenes from *Prunella vulgaris*. *Arch. Pharm. Res.* **15**, 242 (1992).
- 14) Thomson, R. H. : Naturally occurring quinones 2nd ed., Academic Press, pp. 388, 419, 429 (1971).
- 15) Kato, T. : Anthraquinone Components in Rumex acetosa. *Shoyakugaku Zasshi* **41**, 67 (1987).
- 16) Tamano, M. and Koketsu, J. : Isolation of Hydroxyanthrones from the roots of Rumex acetosa. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1913 (1982).
- 17) Ko, S. K., Whang, W. K. and Kim, I. H. : Anthraquinone and Stilbene Derivatives from The Cultivated Korean Phubarb Rhizomes. *Arch. Pharm. Res.* **18**, 282 (1995).
- 18) Silverstein, R. M., Bassler, G. C. and Morrill, T. C. : Spectrometric identification of organic compounds 5th ed., John Wiley & Sons, INC., New York, p. 310 (1991).
- 19) Nishina, A., Kubota, K., Kameoka, H. and Osawa, T. : Antioxidizing component, musizin, in Rumex japonicus Houtt. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 735 (1991).