

암대극의 5 α -reductase 활성 억제물질

박성희 · 김정아 · 허광화 · 이종구 · 최지영 · 오인석 · 손애량 · 정시련 · 이승호*
영남대학교 약학대학

Isolation of 5 α -reductase Inhibitors from *Euphorbia jolkinii*

Sung Hee Park, Jeong Ah Kim, Xu Guang Hua, Chong Gu Lee, Ji Young Choi,
In Suk Oh, Ae Ryang Son, See Ryun Chung, and Seung Ho Lee*
College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract – Twenty eight compounds were isolated from the whole plant of *Euphorbia jolkinii* and evaluated for inhibitory effect on 5 α -reductase activity. Among the tested compounds, 1-desgalloyl eugenin, hippomanin A, euphorbin D, exocoecarianin, rugosin E, and pentagalloyl glucose showed potent inhibitory effect on the enzyme activity. The inhibitory potency of rugosin E and euphorbin D, which are dimeric ellagitannins on 5 α -reductase activity, was 7- to 8-fold stronger than that of γ -linolenic acid.

Key words – *Euphorbia jolkinii*, Euphorbiaceae, 5 α -reductase inhibitor, hydrolysable tannin, male pattern alopecia

간장의 microsome 중에 존재하는 5 α -reductase는 testosterone에 작용하여 dihydrotestosterone으로 환원되는 대사과정에 관여한다. 5 α -reductase에 의하여 생성된 dihydrotestosterone은 target cell에서 androgen receptor와 결합하여 남성호르몬으로서의 작용을 하게 되고, 그 결과 전립선 비대증, 전립선암, 여드름, 남성형 탈모 등을 유발시킨다. 따라서 5 α -reductase 억제물질은 고환의 기능이나, 성적 행동변화, 근육의 강화 등에 영향을 미치지 않는 농도에서 남성형 탈모를 억제할 수 있는 수단으로 이용될 수 있으며, 실제로 탈모 억제제를 개발하는데 있어서 이 효소의 활성 억제 효과가 중요한 screening 수단으로 평가되고 있다. 5 α -reductase 억제제는 대부분 steroid 골격을 가지고 있거나 steroid와 유사한 골격을 가지고 있는 물질이 많고, γ -linoleic acid와 같은 불포화 지방산, 녹차의 주성분인 catechin 류 등이 알려지고 있다.¹⁾

저자 등은 탈모 억제제를 개발하는데 유의하게 이용될 수 있는 천연물을 개발하기 위하여 100여 종의 고등식물 MeOH 엑스에 대하여 *in vitro*에서 효소활성 억제 효과를 검토하고, 그 중에서 강한 효소활성 억제효과를 보인 암대극의 전초로부터 활성물질을 분리하여 구조를 구명하고 효소활성 억제효과를 측정하였다.

암대극은 갯바위 대극이라고도 하며 다년초로서 높이가 40 – 80 cm로서 털이 없다. 잎은 호생하고 밀생하며 거꾸로 된 피침형이고 끝이 둔하거나 둥글며 밑 부분이 점차 좁아지고 가장자리가 밋밋하다. 종자는 다소 둥글고 길이 3 mm 정도이다. 대만 일본에도 분포하며, 한국에서는 제주, 전남, 경남의 해안가에 분포한다.²⁾

성분으로는 1991년에 Lee 등에 의하여 jolkianin³⁾이, Uemura 등에 의하여 1976년에 jolkinol A-D⁴⁾가, 1972년에 jolkinolide A, B⁵⁾가, 1974년에 C-E⁶⁾ 등이 분리 보고되었다.

민간에서 관상초로도 재배되고, 한방과 민간에서 전초를 풍습, 건선, 사독, 통경, 이뇨, 발한, 부종, 창종, 치통, 부인혈맥, 당뇨, 임질 등의 치료제로 이용하며, 독성이 있기 때문에 사용에 주의를 요하고 있다.⁷⁾

재료 및 방법

실험 재료 – 실험에 사용된 암대극(*E. jolkinii*)은 전북 고창의 해안가에서 2001년 6월에 채집하여 충북대학교 이경순 교수의 확인을 거친 후 음건하여 사용하였으며 표본(SH00136)은 영남대학교 약학대학에 보관하고 있다.

기기 및 시약 – 용점은 Fisher-Johns의 Melting Point Apparatus를 사용하여 측정하였으며, 온도는 보정하지 않았다. 선광도는 JASCO의 DIP-1000 (digital polarimeter, Tokyo,

*교신저자(E-mail) : seungho@yu.ac.kr
(FAX) : 053-810-4654

Japan)를 사용하였고, 자외선 흡광도 측정은 Pharmacia의 Ultrospec III를 사용하였다. Fraction collector는 Advantec의 SF-160을 사용하였다. ^1H 및 ^{13}C -NMR spectrum은 Unity plus 500 spectrometer (Varian Inc.), Bruker ARX 250 (250 MHz) spectrometer, JEOL PS 100 NMR (Varian Inc.)을 사용하였으며, 내부표준물질로는 tetramethylsilane (TMS)를 사용하였고, chemical shift value는 part per million (ppm) 단위로 나타내었다. EIMS spectrum은 Micromass mass spectrometer (AUTOSPEC, UK)를 사용하였다. 추출 및 column chromatography용 용매는 시약용 1급을 사용하였다. TLC plate는 Kiesel gel 60 F₂₅₄ (Merck) 및 RP-18 (Whatman)을 사용하였다. Column chromatography용 고정상은 silicagel (70 – 230 mesh, Merck), Sephadex LH-20 (25 – 100 μ , Sigma), MCI-gel CHP-20P (75 – 150 μ , Mitsubishi Chem. Co.), RP-18 (40 – 63 μ m, Merck), Toyopearl HW-40F (Tosho), Cosmosil (Nacalai tesque) 등을 사용하였다. 발색 시약은 vanillin-sulfuric acid 시액, 10% sulfuric acid 시액, 1% FeCl_3 /ethanol용액, anisaldehyde sulfuric acid 시액을 사용하였다.

암대극으로부터 활성물질의 분리 – 신선한 암대극 지상부 32 kg을 80% 수성 acetone으로 상온에서 1주일간 2회 반복 추출하였다. 추출물은 한데 모아 감압 하에서 acetone을 증발 농축하였다. 농축물을 여과해서 잔사를 제거하고 수용액을 농축하여 Sephadex LH-20 column에 loading하고 충분한 양의 증류수로 세척하였다. 이어서 MeOH의 양을 20, 40, 60, 80%(v/v)로 증가시키면서 elution 시키고 마지막으로 water-acetone(1:1, v/v)로 세척하여 4개의 fraction (Fr.1~Fr.4)으로 분획하였다.

Fr.1은 농축하여 MCI gel CHP 20P에 loading하고 H_2O -MeOH (0 – 50%)를 용매로 하여 용출시켜 Fr.1-1과 Fr.1-2로 분획하였다. Fr.1-1은 다시 Bondapak C₁₈ porasil B에 loading하고 H_2O -MeOH (0 – 40%)로 용출시켜 compound 1 (20 mg)과 compound 3 (410 mg)을 얻었다. Fr.1-2는 MCI gel CHP 20P에 loading하고 H_2O -MeOH (0 – 20%)를 용매로 하여 용출시켜 compound 4 (55 mg)을 얻었다.

Fr.2는 Prep Pak 500/C₁₈에 loading하고 H_2O -MeOH (0 – 40%)로 용출시키고 용출물을 모두 모아 Sephadex LH-20 column에 loading 하였다. H_2O -MeOH (10 – 50%)을 용매로 하여 용출시켜 Fr.2-1과 Fr.2-2로 분획하였다. 분획물 Fr.2-1은 다시 MCI gel CHP 20P에 loading 하고 H_2O -MeOH (0 – 30%)을 용출 용매로 하여 다시 Fr.2-1-1과 Fr.2-1-2로 분획하였다. Fr.2-1-1과 Fr.2-1-2는 다시 Bondapak C₁₈ (H_2O -MeOH, 20%)로 정제하여 각각 compound 8 (23 mg)과 compound 9 (74 mg)을 얻었다. Fr.2-2는 MCI gel CHP 20P (H_2O -MeOH, 10 – 40%)로 분획하여 Fr.2-2-1부터 Fr.2-2-3까지 세 개의 분획으로 분획하였다. 이 중에서 Fr.2-2-1

은 cellulose (2% AcOH)와 MCI gel CHP 20P (H_2O -MeOH, 20%)로 정제하여 compound 2 (360 mg)와 compound 7 (108 mg)을 얻었다. Fr.2-2-2는 Sephadex LH-20 (H_2O -MeOH, 30%)으로 분획하여 Fr.2-2-2-1과 Fr.2-2-2-2를 얻었다. Fr.2-2-2-1은 Prep Pak 500/C₁₈ (H_2O -MeOH, 25%)로 정제하여 compound 5 (420 mg)와 6 (49 mg)을 얻었다. Fr.2-2-2-2는 MCI gel CHP 20P (H_2O -MeOH, 30%)로 분획하여 Fr.2-2-2-2-1과 Fr.2-2-2-2-2로 분획하였다. 전자는 다시 cellulose(2% AcOH)와 MCI gel CHP 20P (H_2O -MeOH, 20%)로 연속적으로 정제하여 compound 10 (29 mg)을 얻었다. 후자는 Prep Pak 500/C₁₈ (H_2O -MeOH, 20%)로 정제하여 compound 11 (36 mg)을 얻었다.

Fr.3은 MCI gel CHP 20P에 loading하고 H_2O -MeOH (10 – 40%)을 용출용매로 하여 용출시켜 3개의 분획 (Fr.3-1-Fr.3-3)으로 분획하였다. Fr.3-1은 Sephadex LH-20에 loading하고 H_2O -MeOH (10 – 40%)로 용출시켜 Fr.3-1-1과 Fr.3-1-2로 분획하였다. 전자는 Fujigel ODS G3 (H_2O -MeOH, 20%)로 정제하여 compound 15 (16 mg)을 얻었고, 후자는 MCI gel CHP 20P (H_2O -MeOH, 20%)로 정제하여 compound 14 (1.2 g)을 얻었다. Fr.3-2는 Sephadex LH 20(20% EtOH)로 분획하여 Fr.3-2-1과 Fr.3-2-2를 얻었다. Fr.3-2-1은 Bondapak C₁₈/porasil B (H_2O -MeOH, 20%)로 분획하여 Fr.3-2-2-1과 Fr.3-2-2-2를 얻었다. 전자는 증류수에 현탁시킨 후 냉각시켜 석출하는 분말을 여취하여 compound 21 (80 mg)을 얻었다. Fr.3-2-2-2는 Fujigel ODS G3 (H_2O -MeOH, 20%)로 정제하여 compound 24 (128 mg)을 얻었다. Fr.3-3은 Sephadex LH 20 (H_2O -MeOH, 30%)로 분획하여 Fr.3-3-1과 Fr.3-3-2를 얻었다. 전자는 Fujigel ODS G3 (H_2O -MeOH, 20%)로 정제하여 compound 17 (1.5 g)을 얻었다. 후자는 Bondapak C₁₈/porasil B (H_2O -MeOH, 20%)로 분획하여 Fr.3-3-2-1과 Fr.3-3-2-2를 얻었다. 전자는 MCI gel CHP 20P (H_2O -MeOH, 30%)로 정제하여 compound 16 (28 mg)을 얻었다. 후자는 Fujigel ODS G3 (H_2O -MeOH, 20%)로 정제하여 compound 22 (23 mg)을 얻었다.

Fr.4는 MCI gel CHP 20P (H_2O -MeOH, 10 – 50%)로 분획하여 Fr.4-1부터 Fr.4-3까지 3개의 분획을 얻었다. Fr.4-1은 Fujigel ODS G3 (H_2O -MeOH, 20%)로 분획하여 Fr.4-1-1과 Fr.4-1-2를 얻었다. 전자는 다시 MCI gel CHP 20P (H_2O -MeOH, 15%)로 정제하여 compound 25 (230 mg)을 얻었으며, 후자는 Sephadex LH 20 (H_2O -MeOH, 25%)로 분획하여 Fr.4-1-2-1과 Fr.4-1-2-2를 얻었다. 전자는 Sephadex LH 20 (H_2O -MeOH, 20%)로 정제하여 compound 23 (17 mg)을 얻었으며, 후자는 Bondapak C₁₈/porasil B(H_2O -MeOH, 20%)로 정제하여 compound 26 (158 mg)을 얻었다. Fr.4-2는 Sephadex LH 20 (H_2O -MeOH, 30%)과 Fujigel ODS G3 (H_2O -MeOH, 20%)로 연속하여 column chromato-

graphy를 실시하여 fr.4-2-1과 fr.4-2-2를 얻었다. 각각의 분획은 증류수에 현탁시킨 후 냉각하여 석출하는 powder를 여취하여 compound **18** (2.4 g)과 compound **19** (1.1 g)를 얻었다. Fr.4-3은 Sephadex LH 20 (H₂O-MeOH, 20-40%)로 분획하여 Fr.4-3-1과 Fr.4-3-2를 얻었으며, 전자는 물에 현탁시켜 냉각후 석출하는 powder를 여취하여 compound **28** (1.1 g)로 하였고, 후자는 Bondapak C₁₈/porasil B(H₂O-MeOH, 20%)로 정제하여 compound **27** (120 mg)을 얻었다.

5 α -reductase의 활성 측정 - 5 α -reductase의 활성 저해 작용의 측정은 rat의 liver homogenate를 효소용액으로 활용하는 방법을 이용하였다.⁸⁾ 기질로 testosterone을 이용해서 rat liver homogenate와 반응시켜, 5 α -reductase에 의한 대사 산물을 정량하는 방법이다. 4.5 mM의 testosterone/ethanol액 100 μ L, 1 mM의 dithiothreitol 2,200 μ L, 시료용액 100 μ L를 첨가하여 37°C에서 10분간 incubation 시킨다. 여기에 1 mM의 NADPH 500 μ L, microsome 100 μ L을 첨가하여 10분간 반응시키고 3 M의 NaOH 용액을 가하여 반응을 정지시킨다. 반응액에 ether 30 mL를 가하여 추출하고 ether층을 농축하여 잔유물을 ethyl acetate에 용해시킨 후 gas chromatography로 정량하였다.

$$\text{Inhibition ratio (\%)} = (1 - B/A) \times 100$$

A: DHT in control / Cholesterol acetate in control

B: DHT in sample / Cholesterol in sample

효소용액(microsome)의 조제는 SD계 자성 rat의 간장을 적출하고, 냉각한 medium A(0.32M sucrose, 1 mM의 DTT, 20 mM의 Sod. phosphate, pH 6.5)로 homogenate 한 후, 10,000 g로 10분간 원심분리하고 얻어진 침전을 냉각시킨 medium A에 다시 현탁시키고, 10,000 g로 10분간 원심분리하였다. 2회의 원심분리로 얻어진 상층액을 약 110,000 g로 1시간 원심분리하고 얻어진 침전을 냉각한 medium A에 현탁시켰다. 이것을 다시 약 110,000 g로 1시간 원심분리하고, 얻어진 침전을 냉각한 medium A에 현탁시키고, 이어서 18G, 23G, 26G의 syringe로 순차적으로 통과시켜 현탁시켰다. 조제한 microsome을 1 mL씩 나누어 -50°C에서 보존하고 필요시 용해시켜 사용하였다.

Gallic acid (1)⁹⁾ - 무색침상정 (H₂O), mp 270-272°C, IR; $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1650 (COO).

Ellagic acid (2)⁹⁾ - 담황색침상정 (pyridine), mp > 300°C, IR; $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1725 (CO).

1-O-Galloyl- β -D-glucose (3)¹⁰⁾ - 무색침상정 (H₂O), mp 205°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -21.5° (c 0.6, acetone). ¹H-NMR (270 MHz, acetone-*d*₆) δ : 5.68 (1H, d, *J*=8 Hz, glc-1), 7.16 (2H, s, galloyl H).

1,6-Di-O-galloyl- β -D-glucose (4)¹⁰⁾ - 무색침상정

(H₂O), mp 203-205°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -23.0° (c 0.6, acetone). ¹H-NMR (270 MHz, acetone-*d*₆+D₂O): δ 4.36 (1H, dd, *J*=4, 12 Hz, glc-6), 4.60 (1H, dd, *J*=2, 12 Hz, glc-6), 5.72 (1H, d, *J*=8 Hz, glc-1), 7.12, 7.16 (each 2H, s, galloyl H).

2,3-Di-O-galloyl-D-glucose (5)¹⁰⁾ - 담황색무정형분말, $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ +133.3° (c 0.5, acetone). ¹H-NMR (100 MHz, acetone-*d*₆+D₂O): δ 4.96 (dd, *J*=4, 8 Hz, α -glc-2), 5.10 (t, *J*=8 Hz, β -glc-2), 5.40 (d, *J*=8 Hz, β -glc-1), 5.50 (d, *J*=4 Hz, α -glc-1), 5.80 (t, *J*=8 Hz, α -glc-3), 7.04, 7.06, 7.08 (4H in total, each s, galloyl-H).

2,6-Di-O-galloyl-D-glucose (6)¹⁰⁾ - 무색침상정(H₂O), mp 184-186°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ +18.5° (c 0.6, acetone). ¹H-NMR (100 MHz, acetone-*d*₆+D₂O): δ 3.56-3.88 (3H, m, glc-3,4,5), 4.36 (1H, dd, *J*=4, 12 Hz, glc-6), 4.61 (1H, br d, *J*=12 Hz, glc-6), 4.88-4.96 (2H, m, glc-1,2), 7.10 (4H, s, galloyl-H).

1,2,3-Tri-O-galloyl- β -D-glucose (7)¹⁰⁾ - 담황색무정형분말, $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ +32.0° (c 0.6, acetone). ¹H-NMR (100 MHz, acetone-*d*₆+D₂O): δ 5.44 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-2), 5.64 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-3), 6.10 (1H, d, *J*=8 Hz, glc-1), 7.02, 7.10, 7.12 (each 2H, s, galloyl H).

1,2,3,6-Tetra-O-galloyl- β -D-glucose (8)¹⁰⁾ - 무색침상정, mp 198-200°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +32.8° (c 0.9, acetone). ¹H-NMR (270 MHz, acetone-*d*₆): δ 4.61 (1H, br s, glc-6), 5.49 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-2), 5.68 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-3), 6.18 (1H, d, *J*=8 Hz, glc-1), 7.00, 7.07, 7.08, 7.18 (each 2H, s, galloyl H).

1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose (9)¹¹⁾ - 담황색무정형분말, $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ +18.0° (c 0.8, acetone). ¹H-NMR (100 MHz, acetone-*d*₆): δ 5.66 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-2), 5.69 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-4), 6.05 (1H, t, *J*=8 Hz, glc-3), 6.32 (1H, d, *J*=8 Hz, glc-1), 7.00, 7.03, 7.08, 7.10, 7.16 (each 2H, s, galloyl H).

3-O-Galloyl shikimic acid (10)¹⁰⁾ - 무색침상정(H₂O), mp 255°C (dec.), $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -110.0° (c 0.6, acetone). ¹H-NMR (100 MHz, acetone-*d*₆): δ 2.42 (1H, dd, *J*=6, 18 Hz, H-2), 2.88 (1H, dd, *J*=6, 18 Hz, H-2), 4.07 (1H, dd, *J*=4, 7 Hz, H-4), 4.56 (1H, t, *J*=4 Hz, H-5), 5.38 (1H, m, H-3), 6.94 (1H, d, *J*=4 Hz, H-6), 7.12 (2H, s, galloyl H).

4-O-Galloyl shikimic acid (11)¹⁰⁾ - 담황색무정형분말, $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -138.9° (c 0.9, MeOH). ¹H-NMR (100 MHz, acetone-*d*₆): δ 2.36 (1H, dd, *J*=6, 18 Hz, H-2), 2.74 (1H, dd, *J*=6, 18 Hz, H-2), 4.30 (1H, m, H-3), 4.72 (1H, t, *J*=4 Hz, H-5), 5.16 (1H, dd, *J*=4, 7 Hz, H-4), 6.88 (1H, d, *J*=4 Hz, H-6), 7.10 (2H, s, galloyl-H).

Corilagin (12)¹²⁾ - 백색분말(H₂O), mp 221-212°C.

$[\alpha]_D^{25}$ -23.2° (c 0.9, MeOH). $^1\text{H-NMR}$ (100 MHz, acetone- d_6 +D₂O): δ 6.38 (1H, d, $J=2$ Hz, glc-1), 6.71, 6.84 each 1H, s, hexahydroxydiphenoyl (HHDP)-H, 7.13 (2H, s, galloyl H).

Geraniin (13)¹² - 황색분말(H₂O), mp 218 - 221°C (dec.), $[\alpha]_D^{25}$ -147.8° (c 0.9, MeOH). $^1\text{H-NMR}$ (100 MHz, acetone- d_6): δ 4.28 - 4.54 (1H, m, glc-5), 4.68 - 5.00 (2H in total, m, glc-3,6), 5.17 (1H, s, DHHDP-H), 5.40 - 5.60 (3H in total glc-2,4,6), 6.53 [1H, s, dehydrohexahydroxy (DHHDP)-3'], 6.59 (1H, s, glc-1), 6.67, 7.11 (each 1H, s, HHDP-H), 7.19 (2H, s, galloyl H), 7.28 (1H, s, DHHDP-3).

Putranjivain A (14)¹² - 무색침상정(H₂O), mp 252 - 253°C (dec.), $[\alpha]_D^{25}$ -62.0° (c 1.0, MeOH). $^1\text{H-NMR}$ (100 MHz, acetone- d_6): δ 1.64 (1H, d, $J=14$ Hz, put-3), 2.72 (1H, dd, $J=1.5$, 14 Hz, put-3), 3.94 (1H, m, put-5"), 4.17 (1H, br s, put-4"), 4.19 (1H, m, put-5"), 4.25 (1H, s, put-3"), 4.45 (1H, dd, $J=8$, 11 Hz, glc-6), 4.72 (1H, dd, $J=9$, 12 Hz, glc-6), 4.75 (1H, d, $J=1.5$ Hz, put-1), 4.92 (1H, dd, $J=8$, 9 Hz, glc-5), 5.05 (1H, s, put-1"), 5.35 (1H, d, $J=4$ Hz, glc-3), 5.61 (1H, s, glc-2), 5.66 (1H, d, $J=4$ Hz, glc-4), 6.53 (1H, s, glc-1), 6.66, 7.08 (each 1H, s, HHDP-H), 7.19 (2H, s, galloyl H), 7.32 (1H, s, putranjivainoly-3').

Bischofinin (15)¹³ - 담백색무정형분말, $[\alpha]_D^{25}$ -15.2° (c 1.6, MeOH). $^1\text{H-NMR}$ (100 MHz, acetone- d_6 +D₂O): δ 1.66 (1H, d, $J=14$ Hz, bis-3), 3.02 [1H, dd, $J=2$, 14 Hz, bishofinoyl(bis)-3], 3.78 (1H, d, $J=9$ Hz, bis-6'), 4.07 (1H, dd, $J=7$, 9 Hz, bis-6'), 4.23 (1H, dd, $J=7$, 13 Hz, bis-5'), 4.30 (1H, d, $J=6$ Hz, H-4'), 4.49 (1H, d, $J=7$, 12 Hz, glc-6), 4.59 (1H, dd, $J=7$, 12 Hz, glc-6), 4.85 (1H, d, $J=2$ Hz, bis-1), 4.96 (1H, t, $J=7$ Hz, bis-5), 5.32 (1H, dd, $J=1.5$, 4 Hz, glc-3), 5.38 (1H, d, $J=4$ Hz, glc-4), 5.52 (1H, dd, $J=1.5$, 3 Hz, glc-2), 6.50 (1H, d, $J=3$ Hz, glc-1), 6.68, 7.05 (each 1H, s, HHDP-H), 7.20 (2H, s, galloyl H), 7.34 (1H, bis-3").

Rependusinic acid A monopotassium salt (16)¹³ - 담황색무정형분말, $[\alpha]_D^{25}$ $+19.8^\circ$ (c 1.6, MeOH). $^1\text{H-NMR}$ (100 MHz, acetone- d_6 +D₂O): δ 4.64-4.73 (2H in total, m, glc-5,6), 4.85 (1H, br d, $J=3$ Hz, glc-3), 4.91 (1H, br s, H-2'), 5.49 (1H, br s, H-3'), 5.56 (1H, br d, $J=3$ Hz, glc-4), 6.27 (1H, d, $J=4$ Hz, glc-1), 6.74, 6.85 (each 1H, s, HHDP-H), 6.96 (1H, s, H-5'), 7.13 (1H, s, H-3"), 7.17 (2H, s, galloyl-H).

Carpinusin (17)¹⁴ - 담황색분말(H₂O), mp 238 - 239°C, $[\alpha]_D^{20}$ $+34.4^\circ$ (c 1.0, MeOH). $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, acetone-

d_6): δ 4.06, 4.12 (1H in total, each d, $J=12$ Hz, glc-6), 4.50 - 4.80 (1H, m, glc-5), 5.01 (d, $J=2$ Hz), 5.24 (s), DHHDP-1, 5.30 - 5.60 (2H in total, m, glc-2,4), 6.08 (1H, m, glc-3), 6.26 (1H, br s, glc-1), [6.27(d, $J=2$ Hz), 6.57(s), DHHDP-3], 6.89, 6.91 (each 1H, s, HHDP-H), 7.18 (2H, s, galloyl H), 7.29 (1H, s, DHHDP-3').

Helioscopinin A (18) - 황색분말(H₂O), mp 245 - 247°C, $[\alpha]_D^{25}$ $+101.4^\circ$ (c 0.5, acetone). $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, acetone- d_6 +D₂O): δ 4.20 (1H, m, glc-6), 4.70 (1H, m, glc-5), 4.99 (d, $J=2$ Hz, DHHDP-1), 5.08 - 5.30 (3H in total, m, glc-2,4,6), 5.24 (s, DHHDP-1), 5.80, 5.92 (1H in total, each br s, glc-3), 6.27 (d, $J=2$ Hz, DHHDP-3), 6.59 (s, DHHDP-3), 6.56, 6.70, 6.89, 6.91 (2H in total each s, HHDP-H), 7.16 (2H, s, galloyl H), 7.26 (1H, s, DHHDP-3').

Helioscopinin B (19) - 백색분말(H₂O), mp 219 - 220°C, $[\alpha]_D^{25}$ $+74.0^\circ$ (c 0.5, acetone). $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, acetone- d_6 +D₂O): δ 3.99 (1H, dd, $J=3$, 6 Hz, glc-2), 4.70 (1H, t, $J=10$ Hz, glc-6), 5.25 (1H, t, $J=6$ Hz, glc-3), 5.87 (1H, d, $J=3$ Hz, glc-1), 6.76, 6.87 (each 1H, s, HHDP-H), 7.15 (2H, s, galloyl H).

Jolkianin (20)¹² - 담갈색무정형분말, $[\alpha]_D^{25}$ -0.8° (c 0.8, acetone). Negative FAB-MS m/z : 1887 [M-H]⁻.

Phenazine of jolkianin - 시료 (100 mg)을 10% AcOH-EtOH에 용해시키고, *o*-phenylenediamine (9 mg)을 가하여 0°C에서 24시간 반응시킨 phenazine 유도체를 얻었다. 황색분말(H₂O), mp > 300°C, $[\alpha]_D^{25}$ -68.3° (c 0.6, acetone). positive FAB-MS m/z : 1941 [M+H]⁺, $^1\text{H-NMR}$ (100 MHz, acetone- d_6 +D₂O): δ 4.03 (1H, dd, $J=5$, 11 Hz, glc- α -5), 4.44 (1H, dd, $J=5$, 11 Hz, glc- α -6), 4.54 (1H, dd, $J=4$, 11 Hz, glc- β -6), 4.56 (1H, m, glc- β -5), 4.76 (1H, t, $J=11$ Hz, glc- β -6), 4.97 (1H, br s, glc- α -4), 5.25 (1H, dd, $J=3$, 7 Hz, glc- β -4), 5.33 (1H, t, $J=11$ Hz, glc- α -6), 5.49 (1H, br s, glc- α -3), 5.53 (1H, dd, $J=3$, 7 Hz, glc- β -2), 5.71 (1H, br s, glc- α -3), 5.86 (1H, t, $J=7$ Hz, glc- β -3), 6.15 (1H, d, $J=3$ Hz, glc- β -1), 6.23 (1H, br s, glc- α -1), 6.68, 6.74, 6.83, 6.84 [each 1H, s, phenazine(phe)-3], 7.11, 7.12 [each 1H, d, $J=2$ Hz, dehydrodigalloyl(DHDG)-H], 6.85, 7.32 (each 1H, d, $J=2$ Hz, DHDG-H), 7.01 (1H, s, phe-3'), 7.11, 7.12 (each 2H, s, galloyl-H), 7.17 (1H, s, DHDG-H), 8.04 (1H, s, phe-3), 7.99 - 8.04, 8.28 - 8.33 (each 2H, m, phe-2", 3", 4", 5").

Furosin (21)¹² - 황색분말(H₂O), mp 197 - 198°C (dec.), $[\alpha]_D^{25}$ -142.1° (c 1.0, MeOH). $^1\text{H-NMR}$ (100 MHz, acetone- d_6 +D₂O): δ 5.34 (1H, s, DHHDP-1), 6.46 (1H, d, $J=2$ Hz, glc-1), 6.53 (1H, s, DHHDP-3), 7.23 (2H, s, galloyl H), 7.28 (1H, s, DHHDP-3').

2,5-(S)-HHDP-3,6-anhydromannofuranose (**22**)¹²⁾ – 백색분말(H₂O), ¹H-NMR (270 MHz, acetone-*d*₆+D₂O): δ 3.53 (1H, d, *J*=11 Hz, man-6), 3.85 (1H, dd, *J*=2.5, 11 Hz, man-6), 4.82 (4H in total, m, man-1,2,3,4), 5.12 (1H, dd, *J*=2.5, 4 Hz, man-5), 7.23, 7.24 (each 1H, s, HHDP-H).

1-Desgalloyl eugenin (**23**)¹²⁾ – 담황색무정형분말, $[\alpha]_D^{24} +100.8^\circ$ (c 1.3, acetone). ¹H-NMR (100 MHz, acetone-*d*₆): δ 3.38, 3.87 (each d, *J*=13 Hz, glc-6), 5.14 (d, *J*=8 Hz, β-glc-1), 5.57 (d, *J*=4 Hz, α-glc-1), 5.60 (t, *J*=9 Hz, β-glc-3), 5.89 (d, *J*=10 Hz, α-glc-3), 6.51, 6.52, 6.67 (2H in total, each s, HHDP-H), 6.97, 7.02, 7.08, 7.09 (4H in total, each s, galloyl H).

Excoecarianin (**24**)¹⁴⁾ – 황색무정형분말, $[\alpha]_D^{24} +12.2^\circ$ (c 0.9, acetone). ¹H-NMR (270 MHz, acetone-*d*₆+D₂O): δ [4.16, 4.34 (each 1H, dd, *J*=7, 10 Hz), 4.53, 4.60 (3H in total, m), 4.72 (1H, dd, *J*=9, 10 Hz), glc-5,5',6,6'), 4.92 (d, *J*=2 Hz, DHHDP-1), 5.12 (1H, br s, glc-3'), 5.15 (s, DHHDP-1), 5.28 (1H, d, *J*=3 Hz, glc-2'), [5.35 (d, *J*=4 Hz), 5.45 (s), 5.54–5.57 (m), 3H in total, glc-2,3,4], 5.75 (1H, d, *J*=3 Hz, gc-4'), 6.24 (d, *J*=2 Hz, DHHDP-3), 6.40 (1H, d, *J*=4 Hz, glc-1'), 6.53 (s, DHHDP-3), 6.54 (1H, d, *J*=6 Hz, glc-1), 6.40, 6.79, 7.00, 7.07, 7.12 (each 1H, s, HHDP and valenoyl H), 7.02, 7.15, 7.16 (each 2H, s, galloyl H), 7.20, 7.26 (each s, DHHDP-3').

Euphorbin D (**25**)¹⁵⁾ – 담황색분말, $[\alpha]_D^{24} +27.3^\circ$ (c 1.0, MeOH). ¹H-NMR (270 MHz, acetone-*d*₆+D₂O): δ [4.92 (d, *J*=2 Hz), 5.22 (s), DHHDP-1], [6.23 (d, *J*=2 Hz), 6.32 (s), DHHDP-3], 6.55, 6.56, 6.96, 6.98 (each s, HHDP-H), 6.93, 6.94, 7.23, 7.24 (each s, galloyl H).

Euphorbin D의 phenazine – 황색무정형분말(H₂O), mp > 300°C, ¹H-NMR (270 MHz, acetone-*d*₆+D₂O): δ 4.09 (1H, dd, *J*=4, 12 Hz, glc-6), 4.31 (1H, dd, *J*=4, 13 Hz, glc-6), 4.58 (1H, dd, *J*=4, 13 Hz, glc-6'), 4.73 (1H, dd, *J*=8, 12 Hz, glc-6), 4.90 (1H, d, *J*=8 Hz, glc-1'), 5.03 (1H, dd, *J*=4, 8 Hz, glc-5), 5.36 (1H, d, *J*=8 Hz, glc-2'), 5.44 (1H, d, *J*=9 Hz, glc-3'), 5.49 (1H, d, *J*=4 Hz, glc-4), 5.57 (1H, d, *J*=4 Hz), 5.63 (1H, t, *J*=9 Hz, glc-4'), 5.76 (1H, d, *J*=6 Hz, glc-2), 6.18 (1H, d, *J*=6 Hz, glc-1), 6.54, 6.55, 6.98, 7.24 (each 1H, s, aromatic H), 6.98, 6.99, 7.14 (each 2H, s, galloyl H), [7.54 (s), 8.31 (s), 7.95–8.07, 8.26–8.36 (each 2H, m), phe-H].

Rugosin E (**26**)¹⁵⁾ – 담갈색무정형분말, $[\alpha]_D^{23} +136.0^\circ$ (c 0.9, MeOH). ¹H-NMR (270 MHz, acetone-*d*₆): δ 6.17 (d, *J*=8 Hz, glc-1), 6.25, 6.47, 6.49, 6.67, 7.16 (each s, HHDP and valenoyl H), 6.99, 7.03, 7.08, 7.09 (8H in total, each s, galloyl H).

Hippomanin A (**27**)¹⁵⁾ – 담갈색무정형분말, $[\alpha]_D^{26} +62.1^\circ$ (c 0.6, H₂O). ¹H-NMR (100 MHz, acetone-*d*₆+D₂O): δ 4.91 (dd, *J*=4, 9 Hz, α-glc-2), 5.46 (d, *J*=4 Hz, α-glc-1), 6.62, 6.64, 6.72, 6.75 (each s, HHDP-H), 7.16, 7.17, (2H in total, s, galloyl H).

Jolkinin (**28**)¹⁷⁾ – $[\alpha]_D^{28} -55.4^\circ$ (c 0.7, acetone), IR n_{\max} (neat): 3448, 1719, 1614, 1526, 1446 1316, 1213 and 1036 cm⁻¹, FABMS *m/z* 1143 [M-H]⁻ Anal. Calcd for C₄₇H₃₆O₃₄ H₂O: C, 48.55 H, 3.29. Found: C, 48.31; H, 3.19. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): glucose δ 6.41 (1H, br s, H-1), 5.27 (1H, br s, H-2), 6.21 (1H, br t, *J*=3.0 Hz, H-3), 5.18 (1H, br d, *J*=3.0 Hz, H-4), 4.78 (2H, m, H-5, 6), 4.38 (1H, m, H-6), galloyl δ: 7.15 (2H, s, H-2, 6), HHDP δ 7.06 (1H, s, H-3), 6.63 (1H, s, H-3'), 2,4-acyl group δ: 4.86 (1H, s, H-1), 2.64 (1H, s, H-3), 4.31 (1H, dd, *J*=3.9, 4.2 Hz, H-5'), 3.79 (1H, dd, *J*=4.2, 11.6 Hz, H-6'), 3.67 (1H, dd, *J*=3.9, 11.6 Hz, H-6'), 7.01(1H, s, H-3''), ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): glucose δ 92.1 (C-1), 70.6 (C-2), 60.8 (C-3), 68.6 (C-4), 72.4 (C-5), 64.0 (C-6), galloyl δ 120.0 (C-1), 110.5 (C-2, 6), 145.9 (C-3, 5), 139.8 (C-4), 165.3 (C-7), HHDP δ 117.0 (C-1), 115.0 (C-1'), 124.2 (C-2), 125.7 (C-2'), 110.5 (C-3), 107.5 (C-3'), 144.6 (C-4), 145.3 (C-4'), 137.7 (C-5), 136.2 (C-5'), 145.1 (C-6), 144.9 (C-6'), 166.4 (C-7), 168.7 (C-7'), 2,4-acyl group δ 53.2 (C-1), 54.9 (C-2), 56.5 (C-3), 102.4 (C-4), 96.2 (C-5), 106.0 (C-6), 169.2 (C-7), 173.2 (C-1'), 86.6 (C-2'), 104.8 (C-3'), 86.9 (C-4'), 81.5 (C-5'), 62.7 (C-6'), 118.5 (C-1''), 115.3 (C-2''), 112.9 (C-3''), 147.3 (C-4''), 134.8 (C-5''), 149.9 (C-6''), 165.4 (C-7'').

결과 및 고찰

예비실험의 결과 암대극의 MeOH 엑스가 rat의 liver homogenate로부터 조제한 5α-reductase 활성을 강하게 저해한다는 사실을 알고 신선한 암대극의 전초로부터 활성물질의 분리를 시도, 28종의 화합물을 분리하여 구조를 결정하고 효소활성 억제효과를 측정하였다. 암대극에서 분리된 화합물은 모두 phenolic 화합물로 phenol carboxylic acid가 2종 (**1**, **2**), gallotannin이 9종 (**3-11**), ellagitannin이 17종 (**12-28**)이었다. 5α-reductase에 대한 효소활성 억제효과는 *in vitro*에서 시료의 첨가에 의하여 생성이 억제되는 되는 dihydrotestosterone (DHT)의 양을 GC-MS로 측정하고, 이를 γ-linoleic acid를 대조물질로 하여 억제율을 %로 표시하였다 (Table I).

분리된 화합물 중에서 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose (**9**)를 제외하고는 gallotannin 보다 ellagitannin의 경

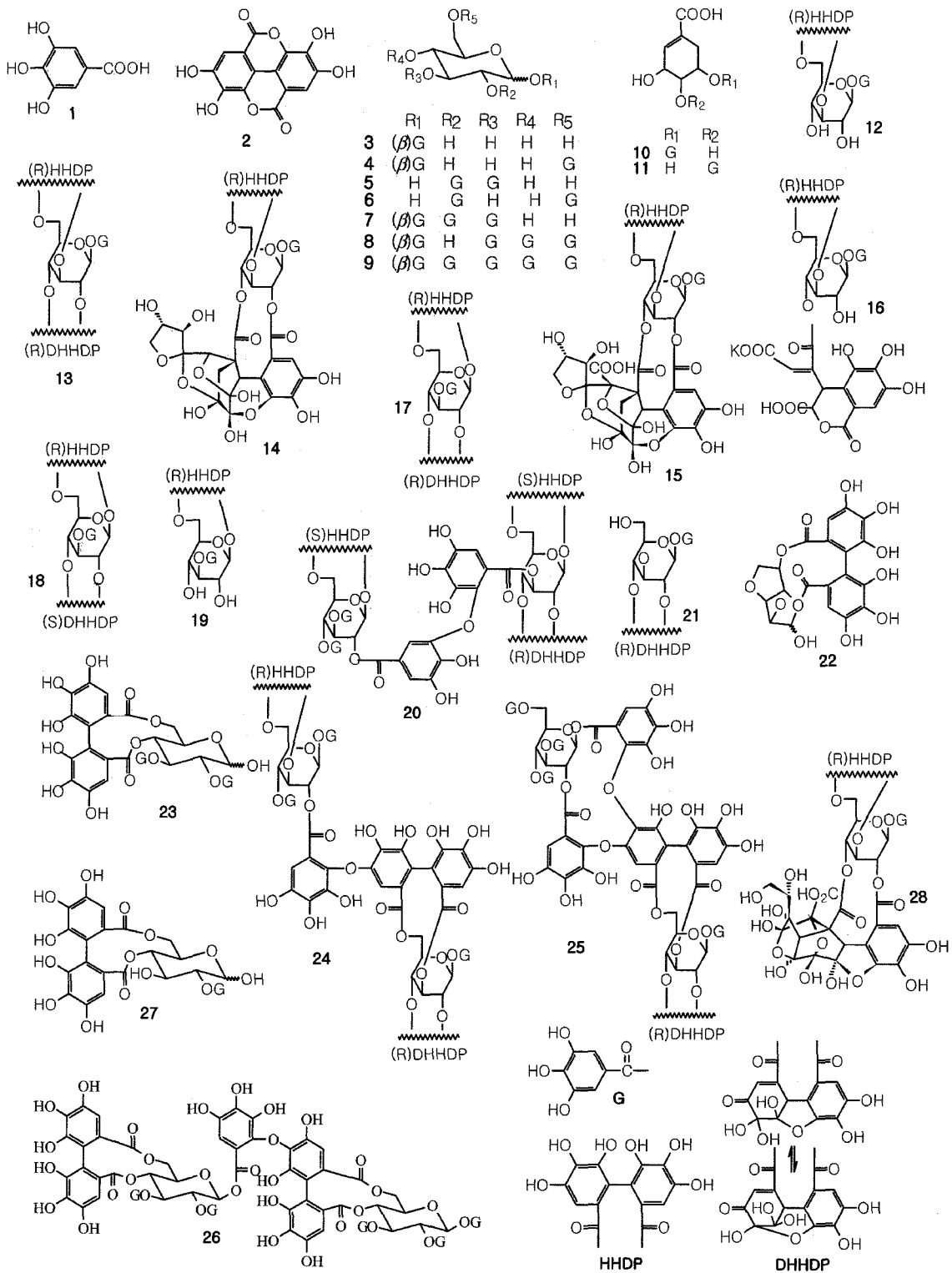


Fig. 1. Chemical structures of compounds isolated from *E. jokinii*

우가 비교적 강한 효소활성 억제효과를 나타내었으며, euphorbin D (25)가 가장 강한 효소활성 억제효과를 나타냈다. 2종의 phenol carboxylic acid (1, 2)의 경우는 효소에 대

한 억제활성이 거의 인정되지 않았다. Gallotannin의 경우에는 polyalcohol의 종류에 따른 활성의 변화는 인정되지 않았으며, glucose를 모핵으로 하는 경우에는 glucose의

Table I. Inhibitory effects of some natural compounds on 5 α -reductase activity of rat liver

Tested compounds	Inhibition ratio(%) of 5 α -reductase							
	Concentration of tested compounds (μ M)							
	2.5	5.0	10	20	40	80	100	200
Gallic acid(1)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	26
Ellagic acid(2)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1-O-G- β -D-glc(3)	NA	NA	NA	NA	15	18	38	40
1,6-Di-O-G- β -D-glc(4)	NA	NA	NA	NA	NA	27	30	31
2,3-Di-O-G-D-glc(5)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2,6-D-O-G-D-glc(6)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	24
1,2,3-Tri-O-G- β -D-glc(7)	NA	NA	NA	NA	NA	28	40	42
1,2,3,6-Tetra-O-G- β -D-glc(8)	NA	NA	NA	NA	16	49	52	59
1,2,3,4,6-Penta-O-G- β -D-glc(9)	30	36	41	65	72	83	100	100
3-O-G-Shikimic acid(10)	NA	NA	13	18	29	48	52	65
4-O-G-Shikimic acid(11)	NA	NA	NA	NA	23	27	49	56
Corilargin(12)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	23
Geraniin(13)	NA	NA	NA	NA	16	35	38	52
Putranjivain A(14)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Bischofinin(15)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Repandusinic acid(16)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Carpinusin(17)	NA	NA	NA	NA	28	37	39	48
Helioscopinin A(18)	NA	NA	14	19	37	39	51	55
Helioscopinin B(19)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	26
Jolkianin(20)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	26	38
Furosin(21)	NA	NA	NA	NA	NA	34	39	51
2,5-(S)-HHDP-3,6-anhydromannofuranose(22)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1-Desgalloyl eugenin(23)	24	24	26	30	46	83	100	100
Excoecarianin(24)	25	37	50	80	100	100	100	100
Euphorbin D(25)	48	62	93	100	100	100	100	100
Rugosin E(26)	32	80	100	100	100	100	100	100
Hippomanin A(27)	14	15	26	41	93	100	100	100
Jolkinin(28)	NA	NA	NA	NA	NA	24	29	31
γ -linoleic acid	NA	NA	12	35	48	74	100	100

Microsome were prepared from the liver of adult Sprague-Dawley female rats. NA: less than 10% inhibition

anomeric 탄소가 free인 경우(5-6) 보다는 galloyl group으로 치환되어 있는 경우(3-4, 7-11)가 비교적 강한 효소활성 억제효과를 나타내었다. 또한 galloyl group의 숫자에 의한 차이도 뚜렷하게 나타나지는 않았지만 galloyl group의 수가 증가 할수록 효소활성을 비교적 강하게 억제하는 경향을 나타내었다(7-9). Polyalcohol이 shikimic acid인 경우에는

galloyl group의 결합 위치에 따라서 효소활성이 약간 차이를 보였지만 유의성 있는 차이는 아니었다(10, 11). 따라서 gallotannin의 경우에 효소활성 억제효과를 나타내기 위해서는 모핵이 glucose이고, anomeric center가 galloyl group으로 치환이 되어있으며 galloyl group의 수가 많을수록 강한 활성이 기대될 수 있다.

Ellagitannin의 경우는 분자 내에 hexahydroxydiphenoyl (HHDP) group 외에 그의 산화물인 dehydrohexahydroxydiphenoyl(DHHDP) group이 결합되어 있는 화합물이 비교적 강한 활성을 보였다(12와 13, 18과 19). 또 ellagitannin의 monomer 보다는 dimer의 경우가 강한 활성을 보였으며 (24-26), 1-desgalloyl eugenin(23)의 경우에는 glucose의 anomeric center가 free인데도 불구하고 강한 효소활성 억제 효과를 나타내고 있으며 이는 gallotannin의 경우 대부분의 활성 물질이 anomeric center가 galloyl group으로 치환된 경우에 강한 활성을 나타낸 것과는 다른 결과라 할 수 있다. Glucose의 1, 6위에 HHDP group을 가지고 있는 ellagitannin (17-19)의 경우와 glucose의 3, 6위에 HHDP group을 가지고 있는 ellagitannin (12, 13)의 경우에는 효소활성 억제 효과에는 별 차이가 없었으나, 2, 4위에 결합하고 있는 DHHDP group의 conformation이 (S)-conformation을 갖는 ellagitannin (19)이 (R)-conformation을 갖는 ellagitannin (17)의 경우 보다 다소 효소 활성 억제효과가 낮았다.

결 론

천연물로부터 탈모의 억제 및 발모 촉진 효과를 나타내는 물질을 개발하기 위하여 5 α -reductase의 활성을 억제하는 물질을 암대극으로부터 분리하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 암대극의 알콜 추출물로부터 28종의 화합물을 분리하였으며, 분리된 화합물은 모두 phenolic 화합물로 gallotannin 및 관련화합물이 11종, ellagitannin이 17종 이었다.
2. 5 α -Reductase의 활성 억제효과는 ellagitannin이 비교적 강한 효소활성 억제효과를 나타내었으며, euphorbin D (25)가 가장 강한 효소활성 억제효과를 나타냈다.
3. Gallotannin의 경우 glucose를 모핵으로 하는 경우에는 glucose의 anomeric 탄소가 free인 경우보다는 galloyl group으로 치환되어 있는 경우가 비교적 강한 효소활성 억제효과를 나타내었으며, galloyl group의 수가 증가 할수록 효소 활성을 비교적 강하게 억제하는 경향을 나타내었다.
4. Ellagitannin은 분자 내에 hexahydroxydiphenoyl group 외에 dehydrohexa-hydroxydiphenoyl group이 결합되어 있는 화합물이 비교적 강한 활성을 보였으며, monomer 보다는 dimer의 경우가 강한 활성을 보였다.

5. Glucose의 2, 4위에 결합하고 있는 dehydrohexahydroxydiphenoyl group의 conformation이 (S)-conformation을 갖는 ellagitannin이 (R)-conformation을 갖는 ellagitannin의 경우가 효소 활성 억제효과가 낮았다.

인용문헌

1. 中擇陽介, 田島正裕(1997) 育毛薬劑としての不飽和脂肪酸, *Fragrance Journal*, **1997**: 60-66.
2. 이창복(2003) 원색대한식물도감(상), 678. 향문사.
3. Lee S. H., et al. (1991) *Chem. Pharm. Bull.* **39**: 630-638.
4. Uemura D. et al. (1976) *Tetrahedron Lett.* 4593.
5. Uemura D. et al. (1972) *Tetrahedron Lett.* 1387.
6. Uemura D. et al. (1974) *Tetrahedron Lett.* 819.
7. 김태정(1996) 한국의 자원식물 II, 286. 서울대학교 출판부.
8. 岡野 由利 (1997) 植物由来成分の育毛効果について. *Fragrance J.* **5**: 67-72.
9. Lee S. H., Tanaka T., Nonaka G., and Nishioka I. (1990) Tannins and related compound. XCV. Isolation and characterization of helioscopinins and helioscopins, four new hydrolysable tannins from *Euphorbia helioscopia*. *Chem. Pharm. Bull.* **38**: 1518.
10. Coxon D. T., Holmes A., Ollis W. D., and Vopa V. C. (1972) *Tetrahedron.* **28**: 2819.
11. Lee S. H., Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I., and Zhang B. (1991) Allose gallate from *Euphorbia fisheriana*. *Phytochem.* **30**: 1251.
12. Saizo R., Nonaka G., Nishioka I., Chen I. S., and Whang T. H. (1989) Tannins and related compounds. LXXXVIII. Isolation and characterization of hydrolysable tannins from *Mallotus japonicus* and *M. pilippinensis*. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 2940.
13. Lee S. H., Tanaka T., Nonaka G., and Nishioka I. (1989) Sedoheptulose digallate from *Cornus officinalis*. *Phytochem.* **28**: 3469.
14. Lee S. H., Tanaka T., Nonaka G., and Nishioka I., (2004) Structure and biogenesis of jolkinin, a highly oxygenated ellagitannin from *Euphorbia jolkinii*, *J. Nat. Prod.* **67**: 1018-1022.

(2005년 1월 7일 접수)