

부채마의 스테로이드 사포닌 및 생리활성

박경진¹ · 서원세¹ · 차준민¹ · 박종일^{1,2} · 우경완^{1,2} · 김선여³ · 이강노^{1*}

¹성균관대학교 약학대학 천연물약품화학연구실, ²한약진흥재단 한약재연구팀, ³가천대학교 약학대학

Steroidal saponins from *Dioscorea nipponica* Rhizomes and Their Biological Activity

Kyoung Jin Park¹, Won Se Suh¹, Joon Min Cha¹, Jong Eel Park^{1,2}, Kyeong Wan Woo^{1,2},
Sun Yeo Kim³ and Kang Ro Lee^{1*}

¹Natural Product Laboratory, School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 16419, Republic of Korea

²Traditional Korean Medicines Research Team, National Development Institute of Korea Medicine, 288, Woodlandgil, Anyangmyeon, Jangheunggun, Jeollanamdo 59338, Republic of Korea

³College of Pharmacy, Gachon University, 191, Hambakmoero, Yeonsu-gu, Incheon 21936, Republic of Korea

Abstract – As part of the search for bioactive constituents of Korean medicinal plants, twelve steroids (**1-12**) were isolated from the rhizomes of *Dioscorea nipponica*. The isolated compounds were identified as diosgenin (3 β , 25*R*)-spirost-5-en-3-ol (**1**), 25(*R*)-dracaenoside E (**2**), dioscin (**3**), gracillin (**4**), prosapogenin B (**5**), 25(*R*)-dracaenoside G (**6**), diosgenin 3-*O*- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranoside (**7**), ophipogonin C' (**8**), 7-oxodioscin (**9**), protodioscin (**10**), hypoglauцин F (**11**), and protoneogracillin (**12**). Their structures were characterized by spectroscopic data and identified by comparing these data with those in the literatures. All the isolates (**1-12**) were evaluated for their neuroprotective effects through induction of nerve growth factor in C6 glioma cells and effects on nitric oxide (NO) production in murine microglia cell line BV-2. Compounds **7** and **12** were found to induce upregulation of NGF secretion without causing significant cell toxicity and compound **4** exhibited potent anti-neuroinflammatory activity.

Keywords – *Dioscorea nipponica*, Dioscoreaceae, Steroidal saponin, Neuroprotection, Anti-inflammation

부채마(*Dioscorea nipponica*)는 마과(Dioscoreaceae)에 속하며, 한국, 일본, 중국에 널리 분포하는 다년생 덩굴식물이다.¹⁾ 근경은 옆으로 뻗고 딱딱하며 원주형의 형태를 띠고 전통적으로 류머티즘, 천식, 기관지염의 치료에 처방 되어 왔다.^{2,3)} 부채마에서 연구된 식물화학적 성분으로는 steroidal saponin,⁴⁾ phenanthrene⁵⁾ 및 phenolic 화합물⁶⁾ 등이 있으며 기존에 보고 된 약리학적 연구에서 부채마의 추출물이 신경영양학적 활성을 가지는 것으로 보고된 바 있다.⁷⁾

본 연구에서는 국내에 자생하는 천연자원으로부터 활성 성분 연구의 일환으로 부채마(*D. nipponica*) 근경의 추출물에서 추가적인 성분연구를 진행 하였다. 50% EtOH 추출한 부채마 근경 추출액을 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol을 이용해 순차적인 용매분획을 시행하였고, 이 중

chloroform 층과 ethyl acetate 층으로부터 column chromatography법을 이용하여 12종의 스테로이드 사포닌 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 ¹H, ¹³C NMR 및 MS를 이용하여 결정하였으며 기존에 보고된 문헌과 비교하여 확인하였다(Fig. 1). 이들 화합물(**1-12**)은 C6 glioma cell에서 nerve growth factor(NGF)의 분비 유도를 통한 신경보호 활성과 murine microglia BV-2 cell에서 nitric oxide(NO) 생성 억제를 통한 항염증 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 연구에 사용된 부채마는 2009년 1월 경동시장(서울)에서 구입하여 사용하였다. 표본(SKKU-NPL-0913)은 성균관대학교 약학대학 표본실에 보관하고 있다.

기기 및 시약 – ¹H NMR과 ¹³C NMR spectra는 Varian UNITY INOVA 500 NMR spectrometer를 이용하여 측정하

*교신저자(E-mail): krlee@skku.edu
(Tel): +82-31-290-7710

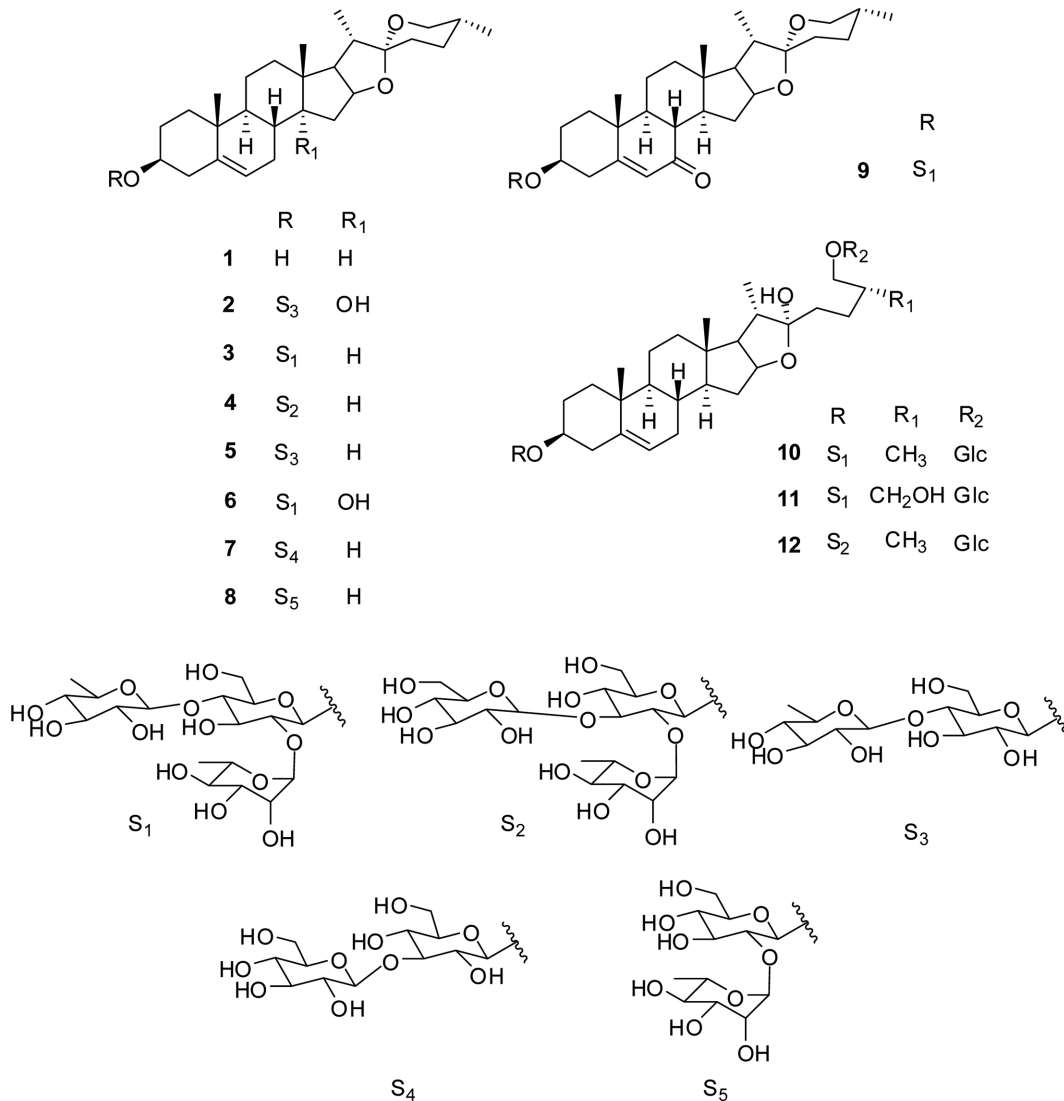


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1-12.

었다. FAB mass spectra는 JEOL JMS700 mass spectrometer를 이용하였다. Semi-preparative HPLC는 Gilson 306 pump와 Shodex refractive index detector를 함께 이용하였고, column으로는 Encosil[®] RP-C₁₈ 10 μ column(250 \times 10 mm)을 이용하였다. Low-pressure liquid chromatography는 Lichroprep Lobar[®]-A RP-C₁₈(240 \times 10 mm) column이 FMI QSY-O pump (ISCO)와 함께 이용되었다. Column chromatography에 이용된 충전제는 silica gel 60(Merk Co., 70 - 230 mesh), RP-C₁₈ silica gel(YMC GEL ODS-A, 12nm, S-75 μ m)과 sephadex LH-20(Pharmacia Co.)가 이용되었다. TLC는 Merck precoated silica gel F254 plates를 이용하였으며, RP TLC로는 RP-C₁₈ F_{254s} plates가 이용되었다. 254 nm와 365 nm 파장에서의 UV light를 이용하여 1차적으로 확인하고 anisaldehyde-sulfuric acid를 이용하여 발색 확인하였다.

추출 및 분리 - 부채마(*D. nipponica*)의 근경(10 kg)은

50% EtOH 용매를 이용하여 상온에서 추출 및 여과하였다. 여과된 추출액은 감압 농축기를 이용, 농축하여 EtOH 농축액(1 kg)을 얻었다. EtOH 농축액을 증류수 800 ml에 녹인 후에 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol을 이용해 순차적인 용매분획을 시행하여 각각 1 g, 35 g, 10 g, 200 g을 얻었다. Chloroform 분획 9.5 g을 silica gel column[230-400 mesh, 360 g; chloroform/MeOH(60:1~1:1)]을 수행하여 7개의 소분획(C1-C7)으로 나누었다. 소분획 C2(5.2 g)는 RP-C₁₈ silica gel column(70% MeOH)을 이용하여 7개(C21-C27)로 나누었다. 소분획 C24(1.2 g)을 Sephadex (80% MeOH)와 RP-C₁₈ semi-prep. HPLC(28% CH₃CN)으로 정제과정을 거쳐 화합물 **10**(18 mg), **11**(6 mg), 그리고 **12**(98 mg)을 얻었다. 소분획 C26(30 mg)은 RP-C₁₈ semi-prep. HPLC(85% MeOH)으로 정제과정을 거쳐 화합물 **6**(7 mg)을 얻었다. 소분획 C27(3.4 g)을 RP-C₁₈ silica gel column(90% MeOH)과

silica gel column (chloroform/MeOH=10:1)을 반복 실시하여 화합물 **3**(280 mg), **4**(60 mg), 그리고 **5**(5 mg)을 얻었다. 소분획 C4(400 mg)는 Sephadex(methylene chloride/MeOH=1:1), Lobar[®]-A RP-C₁₈(60% MeOH), 그리고 RP-C₁₈ semi-prep. HPLC(35% CH₃CN) 정제과정을 순차적으로 거쳐 화합물 **1**(5 mg)을 얻었다. Ethyl acetate 분획 10 g에 대해 silica gel column[230-400 mesh, 360 g; chloroform/MeOH(20:1~1:1)]을 실시하여 10개의 소분획(E1-E10)을 얻었다. 소분획 E6(1.3 g)은 Sephadex(80% MeOH)을 이용하여 11개(C61-C611) 소분획으로 분획하였다. 소분획 E65(45 mg)를 RP-C₁₈ semi-prep. HPLC(100% MeOH)로 정제과정을 거쳐 화합물 **2**(10 mg)를 얻었고, 소분획 E69(100 mg)를 silica gel column(chloroform/MeOH=10:1)과 RP-C₁₈ semi-prep. HPLC(100% MeOH) 정제과정을 순차적으로 거쳐 화합물 **7**(7 mg)을 얻었다. 소분획 E8(2.9 g)을 RP-C₁₈ silica gel column(85% MeOH)과 RP-C₁₈ semi-prep. HPLC(90% MeOH) 정제를 통해 화합물 **8**(5 mg) 과 **9**(2 mg)를 얻었다.

화합물 1 – Colorless gum; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 5.34 (1H, m, H-6), 4.40 (1H, m, H-16), 3.45 (1H, overlap, H-26a), 3.36 (1H, t, *J*=11.5 Hz, H-26b), 1.02 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, d, *J*=4.0 Hz, H-21), 0.79 (3H, s, H-18), 0.78 (3H, d, *J*=4.0 Hz, H-27); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 140.7 (C-5), 121.4 (C-6), 109.2 (C-22), 80.8 (C-16), 71.7 (C-3), 66.8 (C-26), 62.0 (C-17), 56.5 (C-14), 50.0 (C-9), 42.2 (C-4), 41.5 (C-20), 40.2 (C-13), 39.7 (C-12), 37.2 (C-1), 36.6 (C-10), 32.0 (C-7), 31.8 (C-15), 31.6 (C-2), 31.4 (C-8), 31.3 (C-23), 30.2 (C-25), 28.7 (C-24), 20.8 (C-11), 19.4 (C-19), 17.1 (C-27), 16.3 (C-5); FAB MS: *m/z* 415 [M+H]⁺.

화합물 2 – Colorless gum; ¹H NMR (Pyridine-*d*₅, 500 MHz) δ 5.82 (1H, brs, H-1''), 5.34 (1H, brd, H-6), 4.98 (1H, overlap, H-1'), 4.62-3.54 (10H, overlap, sugar-H), 3.47 (1H, m, H-26b), 3.42 (1H, m, H-26a), 1.65 (3H, d, *J*=6.5 Hz, H-6''), 1.12 (3H, d, *J*=6.5 Hz, H-21), 1.02 (3H, s, H-18), 0.94 (3H, s, H-19), 0.61 (3H, d, *J*=5.0 Hz, H-27); ¹³C NMR (Pyridine-*d*₅, 125 MHz) δ 140.3 (C-5), 122.2 (C-6), 109.5 (C-22), 102.6 (C-1''), 102.3 (C-1'), 86.3 (C-14), 81.8 (C-16), 78.3 (C-4'), 78.1 (C-3), 77.0 (C-5'), 76.6 (C-3'), 75.4 (C-2'), 73.9 (C-4''), 72.7 (C-3''), 72.5 (C-2''), 70.3 (C-5''), 66.7 (C-26), 61.4 (C-6'), 59.8 (C-17), 45.0 (C-13), 43.5 (C-9), 42.0 (C-20), 39.8 (C-15), 39.2 (C-4), 37.6 (C-10), 37.3 (C-1), 35.9 (C-8), 35.5 (C-23), 31.9 (C-12), 30.5 (C-25), 30.2 (C-2), 29.2 (C-24), 26.6 (C-7), 20.3 (C-11), 19.9 (C-18), 19.2 (C-19), 18.4 (C-6''), 17.2 (C-27), 15.2 (C-21); FAB MS: *m/z* 739 [M+H]⁺.

화합물 3 – White powder; ¹H NMR (Pyridine-*d*₅, 500 MHz) δ 6.13 (1H, brs, H-1''), 5.61 (1H, brs, H-1'''), 5.22 (1H, dd, *J*=2.0, 4.8 Hz, H-6), 4.76 (1H, brs, H-1'), 4.71-3.72

(14H, overlap, sugar-H), 3.41 (1H, m, H-26b), 3.37 (1H, m, H-26a), 2.64 (1H, d, *J*=10.5 Hz, H-4b), 2.55 (1H, dd, *J*=2.0, 8.4 Hz, H-4a), 1.58 (3H, d, *J*=6.4 Hz, H-6''), 1.45 (3H, d, *J*=6.4 Hz, H-6'''), 0.99 (3H, d, *J*=6.0 Hz, H-21), 0.86 (3H, s, H-18), 0.68 (3H, s, H-19), 0.61 (3H, d, *J*=6.0, H-27); ¹³C NMR (Pyridine-*d*₅, 125 MHz) δ 140.7 (C-5), 121.6 (C-6), 109.1(C-22), 102.6 (C-1'''), 101.8 (C-1''), 100.1 (C-1'), 81.0 (C-16), 78.5 (C-4'), 78.2 (C-3), 78.0 (C-3'), 77.7 (C-2'), 76.6 (C-5'), 74.2 (C-4''), 73.8 (C-4'''), 72.6 (C-3''), 72.4 (C-3'''), 72.2 (C-2'', 2'''), 72.2 (C-5'''), 69.3 (C-5''), 66.7 (C-26), 62.8 (C-17), 61.1 (C-6'), 56.6 (C-14), 50.2 (C-9), 41.8 (C-20), 40.3 (C-3), 39.8 (C-12), 38.8 (C-4), 38.3 (C-25), 37.4 (C-1), 37.0 (C-10), 32.2 (C-7), 32.1 (C-15), 31.7 (C-8), 31.6 (C-23), 26.5 (C-24), 18.4 (C-6''), 18.2 (C-6'''), 17.2 (C-27), 16.3 (C-19), 16.2 (C-18), 14.9 (C-21); FAB MS: *m/z* 869 [M+H]⁺.

화합물 4 – White powder; ¹H NMR (Pyridine-*d*₅, 500 MHz) δ 6.25 (1H, brs, H-1''), 5.26 (1H, brd, H-6), 4.99 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-1'''), 4.84 (1H, d, *J*=7.0 Hz, H-1'), 4.81-3.72 (16H, overlap, sugar-H), 3.50 (1H, d, *J*= 10.5 Hz, H-26b), 3.43 (1H, m, H-26a), 2.70 (1H, m, H-4b), 2.64 (1H, m, H-4a), 1.65 (3H, d, *J*=6.0 Hz, H-6''), 1.06 (3H, d, *J*=7.0 Hz, H-21), 0.98 (3H, s, H-19), 0.75 (3H, s, H-18), 0.63 (3H, d, *J*=5.5 Hz, H-27); ¹³C NMR (Pyridine-*d*₅, 125 MHz) δ 140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 109.2 (C-22), 104.4 (C-1'''), 102.1 (C-1''), 99.9 (C-1'), 89.3 (C-3'), 81.0 (C-16), 78.5 (C-5'''), 78.3 (C-3'''), 77.7 (C-3), 77.6 (C-5'), 77.0 (C-2'), 74.8 (C-2'''), 74.0 (C-4''), 72.7 (C-3''), 72.3 (C-2''), 71.4 (C-4'''), 69.5 (C-4'), 69.5 (C-5''), 66.8 (C-26), 62.8 (C-17), 62.3 (C-1'), 62.3 (C-1'''), 56.6 (C-14), 50.2 (C-9), 41.9 (C-20), 40.4 (C-13), 39.8 (C-12), 38.6 (C-4), 37.4 (C-1), 37.1 (C-10), 32.2 (C-7), 32.1 (C-15), 31.7 (C-23), 31.6 (C-8), 30.5 (C-25), 30.0 (C-2), 29.2 (C-24), 21.0 (C-11), 19.3 (C-19), 18.6 (C-6''), 17.2 (C-27), 16.2 (C-18), 14.9 (C-21); FAB MS: *m/z* 885 [M+H]⁺.

화합물 5 – Colorless gum; ¹H NMR (Pyridine-*d*₅, 500 MHz) δ 5.84 (1H, brs, H-1'') 5.27 (1H, d, *J*=4.0 Hz, H-6), 4.83 (1H, d, *J*=7.6 Hz, H-1'), 4.64-3.40 (10H, overlap, sugar-H), 2.64 (1H, d, *J*=10.5 Hz, H-4b), 2.40 (1H, m, H-4a), 1.66 (3H, d, *J*=6.4 Hz, H-6''), 1.07 (3H, d, *J*=7.2 Hz, H-21), 0.86 (3H, s, H-18), 0.78 (3H, s, H-19), 0.64 (3H, d, *J*=6.0, H-27); ¹³C NMR (Pyridine-*d*₅, 125 MHz) δ 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 109.2 (C-22), 102.6 (C-1''), 102.4 (C-1'), 81.0 (C-16), 78.3 (C-4'), 78.2 (C-3'), 76.6 (C-5'), 75.4 (C-2'), 73.9 (C-4''), 72.7 (C-3''), 72.5 (C-2''), 70.3 (C-5''), 66.8 (C-26), 62.8 (C-17), 61.5 (C-6'), 56.6 (C-14), 50.2 (C-9), 41.9 (C-20), 40.4 (C-3), 40.2 (C-13), 39.8 (C-12), 39.2

(C-4), 37.4 (C-1), 37.0 (C-10), 32.1 (C-7), 31.7 (C-15), 31.6 (C-2), 31.4 (C-8), 31.3 (C-23), 30.5 (C-25), 29.9 (C-24), 21.0 (C-11), 19.3 (C-19), 18.4 (C-6''), 17.2 (C-27), 16.3 (C-19), 16.2 (C-18), 14.9 (C-21); FAB MS: m/z 723 $[M+H]^+$.

화합물 6 – White powder; 1H NMR (Pyridine- d_5 , 500 MHz) δ 6.36 (1H, brs, H-1''), 5.81 (1H, brs, H-1'''), 5.34 (1H, brs, H-6), 4.90 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-1'), 5.08-3.41 (14H, overlap, sugar-H), 1.74 (3H, d, $J=5.5$ Hz, H-6''), 1.57 (3H, d, $J=5.4$ Hz, H-6'''), 1.13 (3H, d, $J=5.5$ Hz, H-21), 1.07 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19), 0.62 (3H, brs, H-27); ^{13}C NMR (Pyridine- d_5 , 125 MHz) δ 140.2 (C-5), 122.3 (C-6), 109.5 (C-22), 102.8 (C-1'''), 102.0 (C-1''), 100.1 (C-1'), 86.3 (C-14), 81.8 (C-16), 78.4 (C-3), 77.9 (C-2'), 77.7 (C-5'), 77.7 (C-4'), 76.9 (C-3'), 74.1 (C-4'), 73.9 (C-4'), 72.8 (C-3'''), 72.8 (C-3''), 72.7 (C-2'''), 72.5 (C-2''), 70.3 (C-5'''), 69.5 (C-5''), 66.7 (C-26), 61.1 (C-6'), 60.3 (C-17), 45.0 (C-13), 43.5 (C-9), 42.0 (C-20), 39.8 (C-15), 38.9 (C-4), 37.7 (C-1), 37.4 (C-10), 35.5 (C-8), 31.9 (C-12), 31.9 (C-23), 30.5 (C-2), 30.1 (C-25), 29.3 (C-24), 26.6 (C-7), 20.3 (C-18), 19.3 (C-19), 18.6 (C-6''), 18.4 (C-6'''), 17.3 (C-27), 15.3 (C-21); FAB MS: m/z 885 $[M+H]^+$.

화합물 7 – White powder; 1H NMR (Pyridine- d_5 , 500 MHz) δ 5.29 (1H, overlap, H-1''), 5.27 (1H, brs, H-6), 4.94 (1H, overlap, H-1'), 4.49-3.84 (12H, overlap, sugar-H), 3.52 (1H, m, H-26b), 3.45 (1H, m, H-26a), 2.63 (1H, m, H-4b), 2.38 (1H, m, H-4a), 1.06 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-21), 0.84 (3H, s, H-18), 0.77 (3H, s, H-19), 0.64 (3H, d, $J=6.0$, H-27); ^{13}C NMR (Pyridine- d_5 , 125 MHz) δ 140.5 (C-5), 121.5 (C-6), 109.0 (C-22), 105.7 (C-1''), 101.9 (C-1'), 88.5 (C-3'), 80.8 (C-16), 78.5 (C-5''), 78.5 (C-3''), 78.0 (C-3), 78.0 (C-5'), 77.8 (C-2''), 75.4 (C-2'), 73.8 (C-4'), 71.4 (C-4''), 66.6 (C-26), 62.6 (C-6'), 62.3 (C-6''), 62.2 (C-17), 56.4 (C-14), 50.0 (C-9), 41.7 (C-20), 40.2 (C-13), 39.6 (C-12), 39.0 (C-4), 37.1 (C-1), 36.7 (C-25), 36.7 (C-10), 32.0 (C-7), 31.9 (C-15), 31.9 (C-8), 31.5 (C-23), 30.3 (C-2), 29.0 (C-24), 20.8 (C-11), 19.1 (C-27), 17.0 (C-18), 16.1 (C-19), 14.8 (C-21); FAB MS: m/z 739 $[M+H]^+$.

화합물 8 – Colorless gum; 1H NMR (Pyridine- d_5 , 500 MHz) δ 6.31 (1H, brs, H-1''), 5.25 (1H, brs, H-6), 4.74 (1H, brs, H-1'), 4.57-3.84 (10H, overlap, sugar-H), 3.52 (1H, m, H-26b), 3.42 (1H, m, H-26a), 2.73 (1H, d, $J=10.5$ Hz, H-4b), 2.68 (1H, dd, $J=2.0$, 8.4 Hz, H-4a), 1.71 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-6''), 1.07 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-21), 0.99 (3H, s, H-18), 0.76 (3H, s, H-19), 0.63 (3H, d, $J=6.0$, H-27);

^{13}C NMR (Pyridine- d_5 , 125 MHz) δ 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 109.2 (C-22), 102.0 (C-1''), 100.3 (C-1'), 81.0 (C-16), 79.6 (C-5'), 78.2 (C-3), 77.9 (C-3'), 77.8 (C-2'), 74.1 (C-4''), 72.8 (C-4'), 72.5 (C-3''), 69.4 (C-5''), 66.8 (C-26), 62.8 (C-17), 62.6 (C-6'), 56.6 (C-14), 50.2 (C-9), 41.9 (C-20), 40.4 (C-13), 39.8 (C-12), 38.9 (C-4), 37.4 (C-1), 37.1 (C-25), 37.1 (C-10), 32.2 (C-7), 32.1 (C-15), 31.8 (C-8), 31.6 (C-23), 29.2 (C-24), 19.3 (C-6''), 18.6 (C-27), 17.2 (C-18), 16.2 (C-19), 14.9 (C-21); FAB MS: m/z 723 $[M+H]^+$.

화합물 9 – Colorless gum; 1H NMR (Pyridine- d_5 , 500 MHz) δ 6.35 (1H, brs, H-1''), 5.78 (1H, brs, H-1'''), 5.71 (1H, s, H-6), 4.98 (1H, overlap, H-1'), 4.79-3.22 (14H, overlap, sugar-H), 2.87 (1H, m, H-4b), 2.73 (1H, m, H-4a), 1.69 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-6''), 1.57 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-6'''), 1.08 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-21), 1.05 (3H, s, H-19), 0.78 (3H, s, H-18), 0.61 (3H, brd, H-27); ^{13}C NMR (Pyridine- d_5 , 125 MHz) δ 201.4 (C-7), 165.6 (C-5), 126.5 (C-6), 109.6 (C-22), 103.2 (C-1'''), 102.2 (C-1''), 100.8 (C-1'), 81.6 (C-16), 78.1 (C-4'), 77.7 (C-5'), 77.6 (C-2'), 77.3 (C-3'), 77.0 (C-3), 74.4 (C-4'''), 74.2 (C-4''), 73.0 (C-3'''), 72.8 (C-3''), 72.7 (C-2'''), 72.5 (C-2''), 70.7 (C-5'''), 69.8 (C-5''), 67.1 (C-26), 62.2 (C-17), 61.4 (C-6'), 50.3 (C-14), 50.1 (C-9), 45.3 (C-8), 42.2 (C-20), 41.5 (C-13), 39.0 (C-4), 39.0 (C-10), 39.0 (C-12), 36.7 (C-1), 34.6 (C-15), 32.1 (C-23), 30.8 (C-25), 30.2 (C-2), 29.5 (C-24), 21.4 (C-11), 18.9 (C-6'''), 18.8 (C-6''), 17.6 (C-19), 17.3 (C-27), 16.7 (C-18), 15.4 (C-21); FAB MS: m/z 883 $[M+H]^+$.

화합물 10 – Colorless gum; 1H NMR (Pyridine- d_5 , 500 MHz) δ 6.35 (1H, brs, H-1''), 5.81 (1H, brs, H-1'''), 5.24 (1H, brd, H-6), 4.76 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'''), 4.63-3.46 (20H, overlap, sugar-H), 2.72 (1H, d, $J=10.5$ Hz, H-4b), 2.66 (1H, dd, $J=2.0$, 8.4 Hz, H-4a), 1.70 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-6''), 1.58 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-6'''), 1.28 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-21), 0.99 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-27), 0.83 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (Pyridine- d_5 , 125 MHz) δ 140.7 (C-5), 121.8 (C-6), 110.6 (C-22), 104.9 (C-1'''), 102.8 (C-1'''), 102.0 (C-1''), 100.2 (C-1'), 81.0 (C-16), 78.5 (C-4'), 78.4 (C-5'''), 78.4 (C-3'''), 78.2 (C-3), 78.0 (C-3'), 77.9 (C-2'), 76.9 (C-5'), 75.2 (C-2'''), 75.1 (C-26), 74.0 (C-4''), 73.8 (C-4'''), 72.8 (C-3''), 72.7 (C-3'''), 72.5 (C-2'''), 72.5 (C-2''), 71.6 (C-4'''), 70.3 (C-5'''), 69.5 (C-5''), 63.8 (C-17), 62.7 (C-6'''), 61.2 (C-6'), 56.5 (C-14), 50.3 (C-9), 40.7 (C-13), 40.6 (C-20), 39.8 (C-12), 38.9 (C-4), 37.4 (C-1), 37.1 (C-10), 37.1 (C-23), 34.2 (C-25), 32.4 (C-7), 32.3 (C-15), 31.6 (C-8), 30.1 (C-2), 28.3 (C-24), 21.0 (C-11), 19.3 (C-19), 18.6 (C-6'''), 18.4 (C-6''),

17.4 (C-27), 16.4 (C-18), 16.4 (C-21); FAB MS: m/z 1049 $[M+H]^+$.

화합물 11 – Colorless gum; 1H NMR (Pyridine- d_5 , 500 MHz) δ 6.37 (1H, brs, H-1''), 5.82 (1H, brs, H-1'''), 5.26 (1H, brd, H-6), 4.92 (1H, overlap, H-1'), 4.73 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'''), 4.61-3.37 (20H, overlap, sugar-H), 2.74 (1H, d, $J=10.5$ Hz, H-4b), 2.67 (1H, dd, $J=2.0, 8.4$ Hz, H-4a), 1.71 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-6''), 1.59 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-6'''), 1.05 (3H, d, $J=6.9$ Hz, H-21), 0.99 (3H, s, H-19), 0.75 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (Pyridine- d_5 , 125 MHz) δ 140.7 (C-5), 121.7 (C-6), 109.5 (C-22), 105.0 (C-1'''), 102.8 (C-1''), 102.0 (C-1'), 100.2 (C-1), 81.1 (C-16), 78.6 (C-4'), 78.6 (C-3'''), 78.5 (C-5'''), 78.5 (C-3), 78.0 (C-2'), 77.9 (C-3'), 76.8 (C-5'), 75.1 (C-2'''), 74.1 (C-4''), 73.8 (C-4'''), 72.8 (C-3''), 72.7 (C-3'''), 72.5 (C-2''), 72.4 (C-2'), 71.9 (C-26), 71.6 (C-4'''), 70.4 (C-5'''), 69.4 (C-5''), 63.6 (C-27), 62.8 (C-17), 62.8 (C-6'''), 61.3 (C-6'), 56.6 (C-14), 50.2 (C-9), 41.9 (C-20), 40.4 (C-13), 39.8 (C-12), 38.9 (C-4), 37.4 (C-1), 37.1 (C-10), 36.6 (C-25), 32.2 (C-7), 32.1 (C-15), 31.6 (C-8), 31.2 (C-23), 30.1 (C-2), 23.9 (C-24), 21.0 (C-11), 19.3 (C-19), 18.6 (C-6''), 18.4 (C-6'''), 16.2 (C-18), 14.9 (C-21); FAB MS: m/z 1065 $[M+H]^+$.

화합물 12 – White powder; 1H NMR (Pyridine- d_5 , 500 MHz) δ 6.34 (1H, brs, H-1''), 5.25 (1H, brd, H-6), 5.05 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H-1'''), 4.89 (1H, d, $J=7.3$ Hz, H-1'), 4.76 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'''), 4.53-3.86 (22H, overlap, sugar-H), 2.81 (1H, m, H-4b), 2.75 (1H, m, H-4a), 1.70 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-6''), 1.27 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-21), 1.00 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-27), 0.83 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (Pyridine- d_5 , 125 MHz) δ 140.7 (C-5), 121.8 (C-6), 110.6 (C-22), 104.9 (C-1'''), 104.4 (C-1''), 102.1 (C-1'), 99.9 (C-1), 89.4 (C-3'), 81.0 (C-16), 78.6 (C-5'''), 78.5 (C-5'''), 78.5 (C-3'''), 78.4 (C-3'''), 77.8 (C-5'), 77.7 (C-3), 76.9 (C-2'), 75.2 (C-26), 75.1 (C-2''), 74.9 (C-2'''), 74.1 (C-4''), 72.7 (C-3''), 72.4 (C-2'), 71.7 (C-4'''), 71.4 (C-4'''), 69.5 (C-5''), 69.5 (C-4'), 63.8 (C-17), 62.8 (C-6'''), 62.8 (C-6'''), 62.4 (C-6'), 56.5 (C-14), 50.3 (C-9), 40.7 (C-13), 40.6 (C-20), 39.9 (C-12), 38.7 (C-4), 37.4 (C-1), 37.1 (C-10), 37.1 (C-23), 34.2 (C-25), 32.4 (C-7), 32.3 (C-15), 31.6 (C-8), 30.0 (C-2), 28.3 (C-24), 21.0 (C-11), 19.3 (C-19), 18.6 (C-6''), 17.4 (C-27), 16.4 (C-21), 16.3 (C-18); FAB MS: m/z 1065 $[M+H]^+$.

신경세포보호 효과 – C6 glioma 세포를 24-well plate에 1×10^5 cells/well 농도로 분주한 뒤 24시간 동안 배양하였고, 다양한 농도의 시료와 함께 24시간 동안 serum-free DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 처리하였

다. NGF 수치는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 키트를 통해 측정 되었고, MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay를 통해 세포 생존율을 측정하였다. 양성 대조군으로는 6-Shogaol이 사용되었고, NGF 분비율과 세포 생존율은 각각 $151.88\% \pm 1.32\%$ 와 $104.49 \pm 4.19\%$ 로 확인되었다.⁸⁾

NO생성과 세포생존율 측정 – LPS(lipopolysaccharide) 활성화 된 BV-2세포에서 NO 생성 억제를 측정하기 위해서 여러 농도 별로 처리한 실험군과 대조군을 LPS(100 ng/mL) 와 함께 24시간 세포 배양 후 griess 시약(0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid)을 이용하여 NO수치가 측정되었다. 96-well plate에 세포 배양 상등액과 griess 시약을 1:1 혼합 하여 넣고 10분간 반응시킨 후 microplate reader(Emax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포 생존율은 MTT assay를 통해 측정되었다.⁸⁾

결과 및 고찰

부채마(*D. nipponica*) 근경의 50% EtOH 추출물로부터 극성 별 용매 분획을 통해서 얻은 분획물을 각종 column chromatography법을 이용하여 총 12종의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물들은 NMR(1H , ^{13}C NMR)과 FAB-MS 데이터를 기존 문헌과 비교하여 구조를 동정 하여 diosgenin (β , 25*R*)-spirost-5-en-3-ol (**1**),⁹⁾ 25*R*-dracaenoside E (**2**),¹⁰⁾ dioscin (**3**),¹¹⁾ gracillin (**4**),¹²⁾ prosapogenin B (**5**),¹³⁾ 25*R*-dracaenoside G (**6**),¹⁰⁾ diosgenin 3-*O*- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranoside (**7**),¹⁴⁾ ophipogonin C' (**8**),¹³⁾ 7-oxodioscin (**9**),¹⁵⁾ protodioscin (**10**),¹⁶⁾ hypoglaurin F (**11**),¹⁶⁾ 및 protoneogracillin (**12**)¹⁷⁾으로 확인하였다. 이들 중 화합물 **2**, **7**, **11**은 부채마(*D. nipponica*)에서 처음 분리된 화합물로 구조 동정에 응용 된 기기분석 자료를 하기에 간단히 토의 하였다(Fig. 1).

화합물 **2**는 무색의 gum 형태의 물질로서 FAB-MS spectrum에서 molecular ion peak가 m/z 739 $[M+H]^+$ 로 관찰 되었으며, 1H NMR spectrum에서 δ 5.34(1H, brd, H-6)의 olefinic proton과 δ 1.12(3H, d, $J=6.5$ Hz, H-21), 1.02(3H, s, H-18), 0.94(3H, s, H-19), 0.61(3H, d, $J=5.0$ Hz, H-27)에서 4 개의 methyl proton을 포함한 특징적인 peak들을 화합물 **1**과 비교했을 때 spirostane계 steroid의 골격임을 확인할 수 있었다. 그리고 추가적인 δ 5.82(1H, brs, H-1''), 4.98 (1H, overlap, H-1')에서 당의 anomeric proton과 δ 4.62-3.54(10H, overlap, sugar-H) peak를 통해 steroidal saponin의 형태를 추정할 수 있었다. ^{13}C NMR spectrum에서는 화합물 **1**과 비교 했을 때 추가적인 δ 102.6(C-1'), 102.3(C-1')에서

당의 anomeric carbon과 δ 78.3(C-4'), 77.0(C-5'), 76.6(C-3'), 75.4(C-2'), 73.9(C-4''), 72.7(C-3''), 72.5(C-2''), 70.3(C-5''), 61.4(C-6'), 18.4(C-6'')에서 10 개의 특징적인 당peak를 통해 glucose와 rhamnose가 존재하는 것을 추정할 수 있었다. 화합물 1과의 ^{13}C NMR data 비교에서 C-3이 δ 71.7에서 δ 78.1로 downfield shift하는 것을 통해 glucose의 C-1'이 모핵의 C-3에 연결되어 있음을 예상했고, 화합물 8과의 비교를 통해 glucose의 C-4'의 peak가 δ 72.8에서 δ 78.3으로 downfield shift하는 것을 확인하여 glucose의 C-4'과 rhamnose C-1''의 연결을 예상할 수 있었다. 이상의 기기분석 자료와 기존에 보고된 문헌과의 비교를 통해 화합물 2의 구조를 25R-dracaenoside E로 확인하였다.¹⁰⁾

화합물 7의 성상은 흰색 분말로 FAB-MS spectrum에서 m/z 739[M+H]⁺ 값을 통해 분자량을 확인하였고, 화합물 2와의 ^1H , ^{13}C NMR data 비교에서 rhamnose moiety의 차이를 제외하고 유사한 구조임을 예상할 수 있었다. ^1H NMR spectrum에서 δ 5.29(1H, overlap, H-1'), 4.94(1H, overlap, H-1')에 존재하는 2 개의 anomeric proton을 확인하였다. ^{13}C NMR spectrum에서는 δ 105.7의 anomeric carbon과 δ 77.8(C-2''), 78.5(C-3''), 71.4(C-4''), 78.5(C-5''), 62.3 (C-6'')을 확인함으로써 추가적인 glucose의 존재를 추정할 수 있었다. 그리고 화합물 2와 비교했을 때 glucose의 C-3'이 δ 76.6에서 δ 88.5으로 downfield shift하는 것을 통해 C-1''과 C-3'의 연결을 예상할 수 있었다. 이상의 spectroscopic data를 기존 문헌과 비교하여 화합물 7의 구조가 diosgenin 3-O- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranoside임을 확인할 수 있었다.¹⁰⁾

화합물 11은 무색의 gum 형태로 FAB-MS spectrum에서 molecular ion peak가 m/z 1065 [M+H]⁺로 관찰되었고, 화합물 7 과의 ^1H , ^{13}C NMR data 비교를 통해 spirostane steroid의 F-ring이 개환 된 형태임을 확인하였다. ^1H NMR spectrum에서 δ 5.26(1H, brd, H-6)의 olefinic proton과 δ 6.37(1H, brs, H-1''), 5.82(1H, brs, H-1'''), 4.92(1H, overlap, H-1'), 4.73(1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1''')의 4 개의 anomeric proton 존재를 확인할 수 있었고, δ 1.05(3H, d, $J=6.9$ Hz, H-21), 0.99(3H, s, H-19), 0.75(3H, s, H-18)에서 나타난 methyl proton을 확인할 수 있었다. ^{13}C NMR spectrum에서는 2 개의 olefinic carbon(δ 140.7, 121.7)과 5개의 oxygenated carbon(δ 109.5, 78.5, 71.9, 63.6, 81.1)이 확인되었다. 그리고 105.0(C-1'''), 102.8(C-1'''), 102.0(C-1'), 100.2(C-1')의 4 개의 anomeric carbon과 20개의 peak를 통해 4개의 당이 존재하는 것을 예상할 수 있었고, rhamnose의 특징적인 methyl carbon(δ 18.6, 18.4)을 관찰함으로써 2개의 rhamnose의 존재를 확인하였다. 이상의 spectroscopic data를 기존에 보고된 문헌과 비교하여 화합물 11은 hypoglaurin F임을 확인하였다.¹⁶⁾

Table I. Effects of compounds 1–12 on NGF secretion and cell viability in C6 cells

Compounds	NGF secretion ^a (%)	Cell viability ^b (%)
1	126.12±0.22	89.30±0.96
2	91.94±0.95	107.54±2.43
3	92.68±5.41	69.70±6.16
4	108.36±3.04	88.45±5.54
5	106.69±1.95	97.03±2.05
6	109.32±0.31	94.52±2.03
7	178.82±4.75	97.43±2.83
8	97.06±2.7	38.26±0.42
9	80.44±2.67	107.65±4.16
10	165.42±1.84	73.43±2.31
11	92.34±1.22	99.87±4.77
12	107.69±1.37	79.65±0.51
6-Shogaol ^c	151.88±1.32	104.49±4.19

^aC6 cells were treated with 20 μM of compounds. After 24 h, the content of NGF secretion in C6-conditioned media was measured by ELISA. The level of secreted NGF cells is expressed as percentage of the untreated control. The data shown represent the means \pm SD of three independent experiments performed in triplicate; ^bcell viability after treatment with 20 μM of each compound was determined by MTT assay and is expressed in percentage (%). The results are averages of three independent experiments, and the data are expressed as mean \pm SD; ^c6-Shogaol as positive control.

Table II. Inhibitory effect of compounds 1-12 on NO production in LPS-activated BV-2 cells

Compounds	IC ₅₀ ^a (μM)	Cell Viability ^b (%)
1	155.4	86.7±8.0
2	72.1	105.7±8.6
3	7.7	17.8±2.7
4	13.8	108.2±2.9
5	109.8	107.0±3.3
6	549.7	116.7±4.6
7	73.8	107±2
8	>500	5.9±0.2
9	51.0	136.5±2.7
10	102.5	153.7±2.6
11	113.4	134.3±3.0
12	117.6	91.1±5.7
L-NMMA ^c	24.7	106.4±4.9

^aIC₅₀ value of each compound was defined as the concentration (μM) that caused 50% inhibition of NO production in LPS-activated BV-2 cells; ^bcell viability after treatment with 20 μM of each compound was determined by MTT assay and is expressed in percentage (%). The results are averages of three independent experiments, and the data are expressed as mean \pm SD; ^cL-NMMA as positive control.

분리된 화합물 1-12의 신경보호 활성은 C6 cell에서 NGF 분비 유도 효과를 통해 확인되었고, 양성 대조군으로는 6-shogaol이 사용되었다(Table I). 그 결과, 화합물 7 과 10은 6-shogaol(151.88±1.32%)과 비교했을 때 C6 cell에 대한 강한 세포독성 없이 유효한 NGF 분비 유도 효과를 나타내었다(7; 178.82±4.75, 10; 165.42±1.84%). 그리고 화합물 1, 4-6, 12는 일반적인 NGF 분비 유도 효과를 나타내는 것으로 확인하였다(1; 126.12±0.22, 4; 108.36±3.04, 5; 106.69±1.95, 6; 109.32±0.31, 12; 107.69±1.37%).

또한, 화합물 1-12의 항염증 활성을 알아보기 위하여 LPS-stressed murine microglia BV-2 cell에서 생성된 NO 수치를 측정하였고, 양성 대조군으로 L-NMMA가 사용되었다(Table II). 화합물 4는 L-NMMA(IC₅₀ 24.7 µM)와 비교했을 때 BV-2 cell에 대한 세포독성 없이 NO 생성을 상당히 저해하였다(IC₅₀ 13.8 µM). 또한 화합물 3은 더 강한 NO 생성 저해 수치를 나타내었지만(IC₅₀ 7.7 µM), BV-2 cell의 세포 생존율을 17.8±2.7%로 감소시키는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 화합물 3의 BV-2 cell에 대한 세포 독성으로 인해 세포 내에서 NO 생성에 영향을 미쳤을 것으로 예상된다.

결 론

부채마 근경의 EtOH 추출물로부터 column chromatography 법을 통해 총 12종의 steroidal saponin을 분리하였고, 이들의 구조는 spectroscopy법과 기준에 보고된 논문과 비교하여 각각 동정하였다. 화합물 2, 7, 11은 부채마에서 처음으로 분리된 것으로 확인하였다. 화합물 1-12에 대한 신경보호 및 항염증 활성을 측정하였으며, 화합물 7과 10은 강한 NGF 분비 유도 효과를 나타내었고 화합물 4는 현저한 NO 생성 억제 활성을 나타내었다.

사 사

이 논문은 2017년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2012R1A5A2A28671860).

인용문헌

- Yang, M. H., Yoon, K. D., Chin, Y. W. and Kim, J. W. (2009) Phytochemical and pharmacological profiles of *Dioscorea* species in Korea, China and Japan. *Korean J. Pharmacogn.* **40**: 257-279.
- Lee, T. B. (2003) Coloured Flora of Korea, 789, Hyang-Moon Sa, Seoul.
- Kwon, C. S., Sohn, H. Y., Kim, S. H., Kim, J. H., Son, K. H., Lee, J. S., Lim, J. K. and Kim, J. S. (2003) Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. *Biosci. Biotechnol. Biotechn.* **67**: 1451-1456.
- Zhang, L. J., Yu, H. S., Kang, L. P., Feng, B., Quan, B., Song, X. B., Ma, B. P. and Kang, T. G. (2012) Two new steroidal saponins from the biotransformation product of the rhizomes of *Dioscorea nipponica*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **14**: 640-646.
- Lu, D., Liu, J. P., Li, H. J. and Li, P. Y. (2010) Phenanthrene derivatives from the stems and leaves of *Dioscorea nipponica* Makino. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **12**: 1-6.
- Lu, D., Liu, J., Zhao, Y., Chen, S. and Li, P. (2010) Chemical constituents in aerial parts of *Dioscorea nipponica* (II). *Zhongcaoyao* **41**: 700-703.
- Kim N., Kim S. H., Kim J. J., Kim J. K., Nam M. K., Rhim H., Kim Yoon S., Choi S. Z., Son M., Kim S. Y. and Kuh H. J. (2011) Neurotrophic activity of DA-9801, a mixture extract of *Dioscorea japonica* Thunb. and *Dioscorea nipponica* Makino, in vitro. *J. Ethnopharmacol.* **137**: 312-319.
- Reif D. W. and McCreedy S. A. (1995) *N*-Nitro-L-arginine and *N*-monomethyl-L-arginine exhibit a different pattern of inactivation toward the three nitric oxide synthases. *Arch. Biochem. Biophys.* **320**: 170-176.
- Kang, S. Y., Sung, S. H., Park, J. H., Cho, J. H. and Kim, Y. C. (2000) A phenolic glucoside and steroidal saponins of *Solanum iyratum*. *Yakhak Hoeji* **44**: 534-538.
- Zheng, Q. A., Zhang, Y. J., Li, H. Z. and Yang, C. R. (2004) Steroidal saponins from fresh stem of *Dracaena cochinchinensis*. *Steroids* **69**: 111-119.
- Huang, H. L., Liu, R. H. and Shao, F. (2009) Structural determination of two new steroidal saponins from *Smilax china*. *Magn. Reson. Chem.* **47**: 741-745.
- Shim, S. H., Lee, S. Y., Kim, J. S., Son, K. H. and Kang, S. S. (2005) Norditerpenoid alkaloids and other components from the processed tubers of *Aconitum carmichaeli*. *Arch. Pharm. Res.* **28**: 1239-1243.
- Hou, S. J., Zou, C. C., Zhou, L., Lei, P. S. and Yu, D. Q. (2006) Synthesis of three natural diosgenyl glycosides. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **8**: 689-696.
- Zhang, Y., Yu, H. Y., Chao, L. P., Qu, L., Ruan, J. Y., Liu, Y. X., Dong, Y. Z., Han, L. F. and Wang, T. (2016) Anti-inflammatory steroids from the rhizomes of *Dioscorea septemloba* Thunb. *Steroids* **112**: 95-102.
- Ali, Z., Smillie, T. J. and Khan, I. A. (2013) 7-Oxodioscin, a new spirostan steroid glycoside from the rhizomes of *Dioscorea nipponica*. *Nat. prod. Commun.* **8**: 319-321.
- Hu, K., Dong, A. J., Yao, X. S., Kobayashi, H. and Iwasaki, S. (1997) A furostanol glycoside from rhizomes of *Dioscorea colletii* var. *hypoglauca*. *Phytochemistry* **44**: 1339-1342.
- Challinor, V. L., Piacente, S. and De Voss, J. J. (2012) NMR assignment of the absolute configuration of C-25 in furostanol steroidal saponins. *Steroids* **77**: 602-608.

(2017. 9. 15 접수; 2017. 10. 30 심사; 2017. 12. 1 게재확정)