

韓國產 牛膝의 Ecdysterone 抽出과 그 生理活性에 관한 研究

金正一 · 李在鎔 · 金春洙 · 朴光義*

韓國科學技術院 *서울대학교 農科大學

Purification and Biological Activity of Ecdysterone from Korean *Achyranthes* radix.

Jeong Il Kim, Jae Yong Lee, Chun Su Kim, and Kwang E. Park*

Korea Advanced Institute of Science and Technology, Seoul 132, Korea

*College of Agriculture, Seoul National University, Suwon 170, Korea

SUMMARY

It has been known that the insect molting hormone and its analogues exist also in plant kingdom and their concentration has been found to be about 0.1~2.0% of dry matter, which is equivalent to $10^3\sim 10^5$ times of those in insects.

This study was carried out; 1) to isolate the phytoecdysones from Korean *Achyranthes* radix and characterize their physico-chemical properties. 2) to investigate the biological activity of this phytoecdysone on *Bombyx mori* larvae.

The results were summarized as follows;

1. The extraction method of phytoecdysones was optimized by three consecutive reflux for 1hr using 200g of dried and milled radix per 1l methanol.
2. The purification from the crude extract was made by a series of steps such as precipitation of gum-type polymer with n-Butyl acetate, adsorption on technical grade silica and chromatography with neutral alumina. The conditions of each step were optimized and the resulting crude crystal was about 500mg per kg dry radix.
3. The crude crystal from the cultivated *Achyranthes* (*Achyranthes japonica*) contained ecdysterone (20-hydroxyecdysone) and inokosterone in the proportion of one to one. In order to separate these, a series of processes such as acetylation, separation by alumina column chromatography, deacetylation by alcoholysis, deionization and crystallization were introduced and optimized. 125mg of ecdysterone and 18mg of inokosterone per kg dry radix were thus obtained.
4. The wild *Achyranthes* (*Achyranthes obtusifolia*) radix was found to contain the ecdysterone only. A 284mg of ecdysterone was crystallized per kg dry radix.
5. Isolated ecdysterone, inokosterone and acetylated compounds were characterized by IR., UV., NMR spectroscopy, mp, TLC and densitometry.
6. Ligation experiment was undertaken to confirm the biological activity of the purified ecdysterone; the ecdysterone could induce larval-pupal metamorphosis in the ligated abdomen of 4th instar larvae injecting 0.5~1.0 μ g per larva.

7. By ecdysterone feeding experiment using artificial diet, it was elucidated that the critical time of feeding would be the first half of each instar resulting in increased weight of silk layer.
8. The ecdysterone was fed to 5th instar silkworm at the level of 1, 2, 3, 5ppm of dry feed of artificial diet containing 5% mulberry leaves for 72hrs. At 2ppm of the concentration, body weight and silk layer weight were arrived at maximum.

But at higher concentrations body weight and silk layer weight decreased than the control group. At 2ppm of the concentration, body weight was increased by 12% and the silk layer weight also by 12.5%.

9. Feeding 2ppm of ecdysterone at the later half of 5th instar, the duration of larvae was shortened by 20hrs.

I. 緒 論

昆蟲은 後胚子의 發生過程中에 脫皮와 變態를 하게 되며 이러한 現象에 關與하는 物質을 脫皮호르몬, 變態호르몬, 또는 ecdysone이라 부르고 있다.

누에의 脫皮호르몬은 腦의 자극에 의해서 前胸腺에서 分泌된다는 事實이 實驗形態學的인 研究에 의해서 증명되었으며(Fukuda, 1944) 이러한 物質이 누에 번데기에서 抽出, 結晶化되어 ecdysone이라 불리워지게 되었고(Butenandt and Karlson, 1954) 그後 前胸腺이 α -ecdysone을 生合成 하는 것이 證明되었다(Chino et al., 1974).

α -ecdysone은 X線 解析에 의해서 化學構造가 2β , 3β , 14α , $22R$, 25-pentahydroxy- 5β -cholest-7-en-6-one인 것으로 밝혀지게 되었다(Huber and Hoppe, 1965).

α -ecdysone의 化學構造가 決定되면서, ecdysone의 活性을 나타내는 類似體들이 動物, 植物에서 發見되어 動物由來의 ecdysone 類似體를 zooecdysone이라 부르게 되었으며, 昆蟲에 存在하며 化學構造가 밝혀진 ecdysone類는 現在 11種이 알려져 있고 가장 보편 적으로 存在하고 있는 것은 α -ecdysone과 β -ecdysone(20-hydroxyecdysone 또는 ecdysterone)으로 알려져 있다(長谷川, 1979).

한편 植物由來의 ecdysone 類似體를 phytoecdysone 이라고 부르게 되었으며 現在 30여種의 phytoecdysone 이 報告 되고 있다(Nakanishi, 1971). ecdysone과 그 類似體의 存在가 報告된 植物들이 우리나라에도 自生 또는 栽培되고는 있으나 現在까지 韓國產 植物에서 이 런 物質들에 關한 理化學的 特性, 生理活性, 또는 그 應用에 關한 研究報告가 전혀 없다. Ito等(1970)은 5齡 初期에 飼料에 添食하면 經過를 延長시키고 繭重과 繭層重을 增加시킨다고 報告하였으나 齡 初期에 飼料

添加效果가 經過를 延長시키는 現象에 대해서는 ecdysterone 效果面에서 볼 때 다시 究明할 必要가 있다고 생각된다.

따라서 本 研究에서는, 첫째, 우리나라에 널리 自生 하고 一部 栽培되고 있는 牛膝(*Achyranthes*屬)의 뿌리에서 ecdysterone을 效果의으로 抽出, 精製 할 수 있는 理化學的 方法을 究明하였으며, 둘째, 이 產物의 生理活性을 누에의 結紮試驗을 通하여 確認하였고, 셋째, 이 物質을 언제, 어떻게 누에에게 經口의으로 投與함으로써 누에 經過를 延長시키지 않고 絹物質을 增加시키느냐를 究明하였다.

本 研究의 遂行에 陰陽으로 激勵해 주신 文在裕 博士님, 姜錫權 博士님, 그리고 夫庚生 博士님께 衷心으로 感謝를 드립니다. 아울러 本 研究를 遂行하는데 物心兩面으로 도와 주신 飼料營養研究室 同僚여러분께 깊은 感謝를 드립니다.

II. 研究史

植物體에서 α -ecdysone의 分離는 *Polypodium vulgare* L.(고란초과; 미역고사리)의 地下莖에서 처음으로 이루어졌으며(Jizba et al., 1966)이어 *Pteridium aquilinum* (참고사리과; 층층고사리)에서도 이를 分離하였다(Kaplanis et al., 1967).

ecdysterone은 竹本等(1967a, c, d, e)에 의해 *Achyranthes*屬(비름과)에서 分離, 精製되었고 아울러 이屬에서 inokosterone의 存在와 이의 構造를 밝혔으며 Nakanishi(1971)에 의하면 植物界에는 ecdysterone이 α -ecdysone보다 더 널리 分布되어 있다고 報告되어 있다.

한편 Nakanishi等(1968)은 *Pedocarpus macrophyllus* 에서 makisterone의 存在를 確認하였고 竹本等(1968c)은 *Achyranthes*屬의 여러 植物 種, *Achyranthes*

fauriei, *A. japonica*, *A. bidentata*, *A. rubrofusca*, *A. longifolia*에서는 ecdysterone과 inokosterone이共存하며 *Achyranthes obtusifolia*의莖, 葉, 根에서는 ecdysterone만存在한다고報告하였다.

그의報告에는臺灣産의 *Achyranthes obtusifolia*를日本에서栽培하여成分을分析한바, 栽培地가 다른兩者間에도 ecdysterone이檢出되었으나栽培地의差異에 따라含量에差異가 있음을 보여주고 있다.

이보다 앞서竹本等(1967)은 누에의天然飼料인뽕잎에서乾物 kg當 10mg의 inokosterone과 1mg의 ecdysterone을分離, 精製한 바 있다.

이研究者들의抽出·精製方法을綜合해 보면溶媒抽出과再結晶方法을利用한 것으로竹本等(1967a)은 *Achyranthes*의뿌리에서 ecdysterone과 inokosterone을抽出·精製하기 위하여 methanol 또는蒸溜水로抽出한抽出物을 만들고 이를 ethyl acetate에轉溶하여 0.02%의粗結晶을 얻었고 이것을 methanol과 hexane으로 반복再結晶하여 이들을分離·同定했다.

그 후竹本等(1968)은風乾細斷한牛膝뿌리를 methanol로加熱還流抽出하여抽出液을濃縮하고 여기에同量の蒸溜水를加하여析出物을漉去한後濾液을 ether로抽出하였다. ether可溶部를除去한後水層을 ethyl acetate로抽出하고抽出液을濃縮하여殘留物을 얻고 이것을 alumina chromatography하여 *A. japonica* 全草에서는試料 kg當粗結晶 200mg을 얻었으며 이를純粹分離하여 ecdysterone 67mg과 inokosterone 50mg을 얻었다고 하였다. *A. obtusifolia*의地上部에서는試料 kg當 100mg의 ecdysterone만을精製하였으나 inokosterone은確認되지 않았다고報告했다.

또한宮崎等(1970)은抽出溶媒로서 methyl ethyl ketone (MEK)을使用했으며 iso-Butyl acetate에轉溶하는方法을考案했다.

한편Takemoto等(1969)은아세틸化方法과이온交換을 병용하여 *A. fauriei*뿌리에서試料 kg當 47mg의 ecdysterone을精製할 수 있는方法을考案한 바 있다.

이러한脫皮호르몬의生理活性檢定에는內分泌器官의結紮後一定時期에一定量の호르몬을注射하거나호르몬溶液에浸漬한後脫皮 또는變態誘發程度에 따라力價를判斷하는生物檢定法이利用되고 있는데實驗動物에 따라 Calliphora test (Karlson and Shayaa, 1964), Musca test (Kobayashi et al., 1967), Sarcophaga test (Ohtaki, 1968), Bombyx test (Kobayashi et al., 1967; Morohoshi, 1976) 외에 Chilo test (Nakanishi, 1971)가 있으며 이러한方法에 의해서 ecdysone의力價와 호르몬作用의臨界時期 및濃度を알 수 있

게 된다.

家蠶에 있어서는幼蟲期の臨界期와濃도가알려져있고(Fukuda, 1944; Kobayashi et al., 1967; Kimura, 1971; Morohoshi, 1976)永續蛹의分離腹部를利用한報告도 있다(Kimura and Kobayashi, 1975).

Ito等(1970)은人工飼料로飼育한누에의5齡脫皮初期에皮下에臨界量을注射하면1日以內에다시眠에 들어가 그중一部는6齡이 된다고 했으며反對로少量을注射하면齡期間이延長되거나效果가 없었다 했다. 또한齡의初期에飼料에添加하여給與하면經過를延長시켜繭重과繭層重을增加시키나, 5齡의中期以後後期에添加하면齡期間이短縮되어早期에營繭한다고 했다.

한편 Shigematsu等(1974)은人工飼料에 4, 5齡期間中繼續하여 ponasterone A, ecdysterone 및 inokosterone을添加한飼料로누에를飼育한바, ponasterone A는4齡期間中幼蟲의成長을遲延시키고一部누에만脫皮할 수 있었으며5齡期間中에生育이부진하여廢蠶이發生하였으나 inokosterone이나 ecdysterone의添加區에서는熟化가促進되며어느濃度 이상에서는 오히려熟化가遲延된다고報告하였다.

이런點들을미루어볼때,添食에 의한成長效果에는添加濃度, 投與時期의差異에 의하기는 하나一致되지 않는結果를 보여주고 있다.

III. Ecdysterone의抽出 및精製

竹本等(1967a)에 의하여 *Achyranthes*屬에서 ecdysterone과 inokosterone의存在가確認되었는데 우리나라에도野生種 및栽培種으로서 *Achyranthes*屬이分布되어 있다. 본래野生種이나現在栽培되기도 하는식우슬(*Achyranthes japonica*)은봄 또는 가을에播種하여 10a當乾物量으로 200~250kg의뿌리를收穫하고심우슬(*Achyranthes obtusifolia*)은南部島嶼地方에서自生하며 이들은 모두民間藥으로利用되고 있다.

그러나現在까지韓國産牛膝뿌리의 ecdysterone에關한研究가 보고된 바 없으므로, 이를抽出·分離·精製하고 이의理化學的 特性을알아보고자 본研究를行하였다.

實驗材料 및方法

1. 實驗材料

1) 試驗植物

*Achyranthes*屬(비름과 쇠무릎, 또는 우슬)을試驗植

物體로 選定하였으며 우슬뿌리를 심우슬(*Achyranthes obtusifolia*)과 식우슬(*Achyranthes japonica*)로 구별하여 購入하였다.

2) 試藥

• 抽出溶媒; methyl alcohol(工業用), methyl ethyl ketone (MEK, 工業用)

• 沈澱溶媒; n-Butyl acetate(日製, Wako, EP), iso-Butyl acetate(日製, Wako, EP)

• 結晶化 및 chromatography溶媒; ethyl alcohol(獨逸製, Merck, GR), methyl alcohol(獨逸製, Merck, GR), ethyl acetate(獨逸製, Merck, GR), petroleum ether(獨逸製, Merck, GR), 珪素(工業用 白카본), 中性 alumina(獨逸製, Merck, GR),

• 아세틸화 試藥; pyridine(獨逸製, Merck, GR), TLC plate(獨逸製, Silica gel GF 254, Merck), toluene(日製, Kanto), 2-Butyl alcohol(日製, Wako)

그 밖의 모든 用途의 試藥은 一級試藥(EP)을 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 抽出

效果的인 抽出을 위해서 購入한 牛膝뿌리를 常溫에서 充分한 時間동안(약 1~2일) 乾燥시킨 다음, hammer mill로 지름 2mm정도가 되도록 粉碎하였다.

抽出溶媒로는 極性物質인 phytoecdysone을 抽出하기 위해서 methyl alcohol과 MEK(宮崎等, 1970) 등의 極性溶媒를 選定, 比較하였다.

2) 熱湯槽에 還流冷却器를 裝置하고 試料와 溶媒의 比率, 抽出時間 抽出回數等を 달리하여 還流抽出한 結果를 比較하였다.

2) 精製

抽出液을 眞空回轉蒸發器에서 濃縮한 후 最少量의 methyl alcohol에 溶解하고 非極性溶媒인 IBA(iso-Butyl acetate)(宮崎等, 1970), NBA(n-Butyl acetate) 등을 넣어 gum形態의 高分子物質과 糖等を 除去하였다. 濾液을 工業用 珪素에 吸着시킨 후 眞空狀態에서 MEK로 溶離하여 多量으로 存在하는 結晶妨害物을 어느 정도 除去한 후 chromatography用 中性 alumina를 使用하여 吸着 chromatography를 하였다.

eluent로는 ethyl acetate·ethyl alcohol(4:1)을 使用하였으며, column의 規格은 길이/지름이 약 30정도로 하여 充分한 精製가 이루어 지도록 하였다.

chromatography eluate를 眞空回轉蒸發器에서 濃縮한 후 ethyl alcohol과 ethyl acetate를 使用하여 끓는 狀態에서 結晶化 하였으며 反復하여 2次, 3次 結晶을 얻었다.

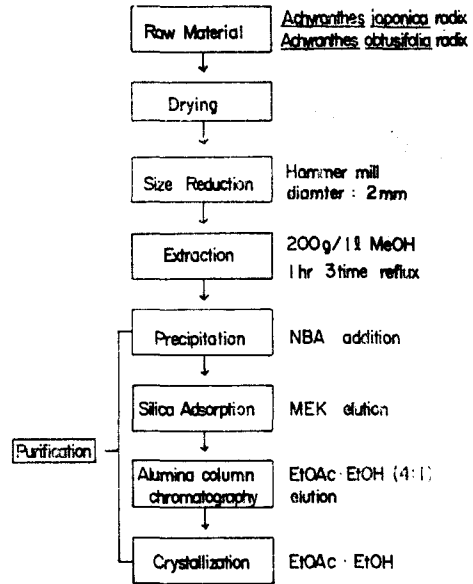


Fig. 1. Extraction and Purification Procedure of Ecdysterone from *Achyranthes* radix.

抽出·精製過程을 圖式化하여 그림 1에 나타내었다.

3) 分離

抽出·精製過程에서 얻어진 結晶은 ecdysterone과 inokosterone을 包含하고 있으나 두 物質의 構造的 類似性 때문에 一般的인 分離法으로는 分離가 어려우므로 아세틸화法과 再結晶方法을 썼다.

가) 아세틸화法

1g의 混合粗結晶을 5ml의 pyridine에 溶解한 후, 10ml의 acetic anhydride를 가하여 常溫에서 攪拌하면서 16~18時間 反應시켰다. ice-water bath에서 反應液을 50ml의 氷冷水에 攪拌하면서 조금씩 넣어 준 후 4時間동안 4°C에 放置하여 結晶을 生成시켰다. 生成된 結晶을 冷水로 洗滌하고, 80°C에서 乾燥하여 ecdysterone triacetate와 inokosterone tetraacetate의 混合結晶을 얻었다.

ecdysterone triacetate와 inokosterone tetraacetate를 分離하기 위해서 中性 alumina를 使用하여 alumina 吸着 chromatography를 하였다.

ethyl acetate·petroleum ether (4:1)로 溶離하여 inokosterone tetraacetate를 먼저 分離한 後 ethyl acetate·petroleum ether(1:1)로 溶離하여 ecdysterone triacetate를 分離하였다.

各各의 eluate를 眞空回轉蒸發器에서 濃縮한 다음, inokosterone tetraacetate는 ethyl alcohol과 petroleum ether로 結晶化 하였고, ecdysterone triacetate는 ethyl

alcohol과 물로 結晶化 하였다.

alumina吸着 chromatography에 의해 分離된 ecdysterone triacetate와 inokosterone tetraacetate를 methyl alcohol과 KHCO_3 存在下에서 脫아세틸화하였다.

脫아세틸化 反應에 存在하는 K^+ 이온을 除去하기 위해 陽이온 交換樹脂를 使用하여 이온交換을 하였다.

陽이온 交換樹脂로는 Dowex 50×8을 使用하였고 길이/지름이 1인 ㄷ形態의 column을 使用하여 溶離한 다음, 50% ethyl acetate로 洗滌 하였다.

eluate를 眞空回轉蒸發器에서 濃縮한 후, ethyl alcohol과 ethyl acetate로 부터 끓는 狀態에서 結晶化하였으며 ethyl acetate로 洗滌하여 純粹한 結晶을 얻었다.

ecdysterone, inokosterone을 같은 方法으로 이온交換하고 結晶化하였으며, 脫아세틸化法에 의한 ecdysterone과 inokosterone의 分離方法을 그림 2에 圖式化하였다.

나) 溶媒分離法

ecdysterone과 inokosterone의 溶媒에 對한 溶解度 差異에 의한 分離를 하였다. 溶媒로는 ethyl alcohol · petroleum ether(1 : 4) 混合溶媒를 使用하였으며 連續的인 再結晶方法으로 分離하였다.

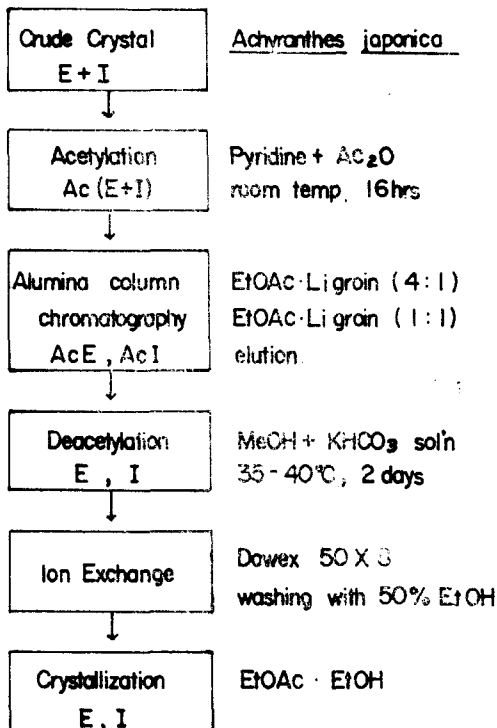


Fig. 2. Separation of Ecdysterone and Inokosterone by Acetylation from *Achyranthes japonica*.

4) 分析

ecdysterone, inokosterone, ecdysterone triacetate, inokosterone tetraacetate의 定性 · 定量分析을 위해서 Paper chromatography, Thin layer chromatography, 融點測定, UV absorption spectra, IR absorption spectra 등을 利用하였다.

• Paper chromatography

Whatman濾紙 No. 1 (15×50cm)에 約 20 μg 의 試料를 點滴한 후 descending chromatography를 하였다. 展開溶媒로는 Gilgan과 Farquharson (1973)에 의해 報告된 toluene · 2-Butanol · water(2 : 1 : 1)을 使用하였다. 分液깔대기에서 15時間동안 飽和平衡狀態로 만든 후 上層을 mobile phase로, 下層을 immobile phase로 하였다. 容器的 內部는 Whatman 濾紙 No. 1을 세워, 하루동안 polar immobile phase로 飽和시킨 후 展開하였다.

• Thin layer chromatography

precoated TLC plate (Silica gel GF 254)를 使用하여 chromatography하였다. 展開溶媒로는 paper chromatography에서 使用되었던 toluene · 2-Butanol · water(2 : 1 : 1)의 上層液을 使用하였으며, 2回 連續 展開한 후, UV에 의해 ecdysterone과 inokosterone을 分別하였다.

densitometer를 使用한 定量分析은 먼저 vanillin-sulfuric acid로 發色시킨 후, 乾燥器에서 炭化하고 440nm에서 吸收 spectra를 記錄하였다.

• UV吸收 spectra

Double beam spectrophotometer (Varian model 634)로 各試料의 UV scanning을 하였으며 이 結果를 定性 · 定量하였다.

• IR 吸收 spectra

Perkin Elmer 735B IR spectrophotometer에서 KBr과 試料를 混合하여 만든 pallet에 대해 赤外線 吸收 spectra를 얻었다.

• NMR spectra

Varian HA 100D NMR spectrophotometer (100 MHz)로 NMR spectra를 얻었다.

Base로서 TMS를 使用하였으며 溶媒로는 pyridine을 使用하였다.

• 融點測定

毛細管融點測定機, microscope hot stage type融點測定機 등 두 種類의 融點測定機를 使用하여 各試料의 融點을 測定하였다.

實驗 結果

1. 抽出方法的 最適化

市中에서 購入한 乾燥細切한(지름 0.5cm, 길이 1cm) 식우슬뿌리를 使用하여 抽出溶媒의 比較試驗을 하였다.

抽出溶媒로는 methyl alcohol과 MEK를 比較하였으며 methyl alcohol이 宮崎等 (1970)이 利用한 MEK보다 抽出效果가 높은 것으로 나타났다.(표 1).

이 結果는 Ogawa等 (1977)이 報告한 methyl alcohol의 抽出效果와 一致하며, ecdysterone과 inokosterone이 6個의 水酸基를 갖는 極性스테로이드 이기 때문에, 더 極性도가 큰 methyl alcohol이 抽出效果가 더 큰 것으로 보여진다. 그러나 methyl alcohol로 抽出하는 境遇에는 MEK의 境遇보다 gum形態의 高分子物質이나 糖 등의 다른 不純物이 더 많이 抽出되었으며 이들 不純物을 除去하기 위해서는 複雜한 精製過程이 要求되었다.

抽出溶媒의 量과 抽出回數를 增加시키고, 抽出時間을 짧게 했을 때, 抽出時間이 긴 境遇보다 粗結晶의 量이 많았으며(표 1) 이것은 抽出時間보다는 溶媒의 量과 抽出回數가 더 重要하다는 것을 나타낸다.

즉, 1회 15時間 還流抽出한 境遇보다 1時間씩 5회 還流抽出한 境遇가 더 抽出效率이 높은 것으로 밝혀졌다. 또한 試料를 粉碎한 境遇가 (지름 2mm) 粉碎하지 않은 境遇보다(길이 1cm, 지름 0.5cm) 約 50% 以上

Table 1. Comparison of two extracting solvent and radix granule size on the yield of crude crystal.

Methods	Solvent	Crude Crystal mg/kg radix	Solvent Quantity l/kg radix
1. Sliced radix 1time 15hrs reflux	MEK	143.1	5
2. Sliced radix 1time 15hrs reflux	MeOH	166.0	5
3. Sliced radix 5times 1hr reflux	MeOH	218.8	21
4. Milled radix 5times 1hr reflux	MeOH	318.3	21
5. Milled radix 3times 1hr reflux	MeOH	387.1	13

granule size;

sliced radix(method 1, 2, 3);
diameter; ca 0.5cm
length ; ca 1.0cm

milled radix (method 4, 5);

hammer milled to pass 0.2cm sieve.

粗結晶收率이 增加됨으로 보아 試料의 粒度가 抽出效率에 미치는 重要한 因子임을 보여주고 있다.

抽出溶媒의 量과 抽出時間을 最適化하기 위해, 抽出回數를 變化시키며 生成되는 粗結晶의 量을 比較한 結果, 3회 抽出한 境遇나 5회 抽出한 境遇에 生成되는 粗結晶의 量에는 거의 差異가 없는 것으로 나타났다(표 1).

結果적으로 얻어진 抽出의 最適條件은 抽出溶媒로 methyl alcohol을 使用하여 溶媒 1l當 粉碎한 試料 200g을 넣고 1時間씩 3회 還流抽出하는 境遇로 밝혀졌다.

2. 精製方法的 最適化

純粹한 結晶을 얻기 위해서 溶媒에 의한 不純物沈澱, 珪素吸着, alumina 吸着 chromatography를 하였으며 各 段階別로 最適化條件을 찾았다.

1) 溶媒에 의한 不純物沈澱

gum形態의 高分子物質, 糖등을 除去하기 위해 抽出液을 眞空回轉蒸發器에서 濃縮시킨 후, 다시 最小 부피의 methyl alcohol에 溶解시킨 다음 IBA를 넣어 沈澱을 生成시켰다.

methyl alcohol의 量과 IBA의 量의 比는 1:1.5인 境遇가 效果의이었으며 沈澱劑로서 NBA를 利用한 境遇와 比較해 보면 宮崎等 (1970)이 抽出物의 轉溶을 위하여 使用한 IBA보다 粗結晶收率에는 效果의인 것으로 나타났다(표 2).

沈澱劑로서 ethyl acetate를 使用했을 境遇에는 ethyl acetate가 methyl alcohol에 대하여 約 15倍 程度로 많이 消費되어 非效率的 이었다.

2) 珪素吸着

工業用珪素인 白카본을 使用하여 沈澱劑에 의한 沈澱 後에도 多量으로 殘存하는 不純物을 除去하기 위해 豫備의인 吸着 chromatography를 하였다. 試料 kg當 吸着用 珪素는 50g, 濾過用珪素는 30~50g으로 하여 吸着되도록 하였으며 濾過用珪素를 增加시키면 不純物의 除去量도 增加되었다.

eluent로는 試料 kg當 1l의 MEK를 使用하였다.

Table 2. Comparison of two precipitating solvent IBA and NBA on the yield of crude crystal from *Achyranthes* radix.

Precipitating agent	Solvent	Crude Crystal mg/kg radix
I B A	MeOH	363.3
N B A	MeOH	506.8

I B A : iso-Butyl acetate

N B A : n-Butyl acetate.

3) alumina 吸着 chromatography

效率인 chromatography 分離를 하기 위하여, alumina의 量은 分離對象物 1에 대하여 100, column의 길이/지름은 30, eluent의 量은 bed volume의 6배를 사용했으며 eluent로는 ethyl acetate · ethyl alcohol (4:1)의 混合溶媒가 效率의이었다.

3. 分離方法의 最適化

精製過程에서 精製된 結晶은 ecdysterone과 inokosterone이 共存하므로, 이들의 分離를 위해 溶媒再結晶法과 아세틸化法을 比較하였다.

溶媒에 의한 再結晶法の 境遇에는 4~5회의 連續的인 再結晶에 의해서도 完全한 分離가 이루어지지 않았으며, 이러한 方法은, 經驗에 依存하고 操作上 再現性이 낮으므로 適合하지 않았다.

아세틸化法은 ecdysterone과 inokosterone의 構造的인 差異를 利用한 方法으로서, 過程이 複雜하다는 問題點은 있으나 純粹한 分離가 可能하였다. ecdysterone과 inokosterone은 모두 6個의 水酸基 (-OH)를 가지고 炭素의 數도 같은 스테로이드이나, inokosterone은 C₂₇에 1° 水酸基를 가지며, ecdysterone은 C₂₆에 3°의 水酸基를 갖는다는 差異가 있다.

따라서 아세틸化 하면 ecdysterone은 triacetate를 形成하나 inokosterone은 tetraacetate를 形成하게 되어 chromatography의 操作에 의해 分離가 可能하게 된다.

아세틸化法에서는 아세틸化, alumina 吸着 chromatography, 脫아세틸化, 이온交換 後 結晶化의 過程를 거쳐 ecdysterone과 inokosterone을 分離하였다.

1) 아세틸化 反應

스테로이드의 아세틸化에서 一般的으로 使用되고있는 pyridine과 acetic anhydride를 使用하여 아세틸化하였다. 反復實驗에서 아세틸化의 收率は 85~90%로서 높은 收率로 아세틸化 反應이 이루어졌다. 反應物의 純度, 反應溫度等이 收率에 影響을 주는 主要한 因子였으며 常溫에서 16時間 以上 反應시킴으로써 副反應을 最少化할 수 있었다.

2) 아세틸化物의 分離

ecdysterone triacetate와 inokosterone tetraacetate을 分離하기 위해 alumina 吸着 chromatography를 하였다.

eluent의 選定에 의해 分割하지 않고도 分離가 可能하였으며 eluent로 ethyl acetate · petroleum ether (4:1), ethyl acetate · petroleum ether (1:1)를 選定하였다.

分離된 ecdysterone triacetate와 inokosterone tetraacetate는 각기 다른 溶媒로 結晶化 하였으며, TLC에

Table 3. Densitometric analysis of Ecdysterone, Inokosterone and their acetylated compounds.

Sample	Contents	Relative concentration
Crude crystal from <i>Achyranthes japonica</i> (E+I)	E	1
	I	1
Acetylated compound Ac(E+I)	AcE	3
	AcI	2
Ecdysterone	st'd E ₀	1
	E ₁	1.21
	E ₂	1.24

E: Ecdysterone

I: Inokosterone

AcE: acetylated ecdysterone; ecdysterone triacetate

AcI: acetylated-inokosterone; inokosterone tetraacetate

E₀: authentic ecdysterone

E₁: ecdysterone from *A. japonica*

E₂: ecdysterone from *A. obtusifolia*

TLC adsorbent: Silica gel GF 254

TLC developing solvent: toluene · 2-Butanol · water (2:1:1) upper phase

의해 簡單하게 分析이 可能 하였다. 또한 densitometer에 의한 混合結晶內의 相對的인 比도 알 수 있었다(표 3).

TLC densitometer의 分析結果 식우슬로 부터 얻은 混合粗結晶의 ecdysterone과 inokosterone의 比는 1:1로 밝혀졌으며, 아세틸化 反應後에는 3:2로 밝혀졌다 alumina吸着 chromatography에 의한 分離 後에 各各을 結晶化 할 때 ecdysterone triacetate는 쉽게 깨끗한 結晶을 얻을 수 있었으나 inokosterone tetraacetate는 어떤 溶媒를 使用하여도 깨끗하고 均一한 結晶을 얻기가 어려웠다.

ecdysterone triacetate와 inokosterone tetraacetate의 分離收率は 粗結晶의 ecdysterone과 inokosterone의 比率이 1:1 일때 94%와 57%로 나타났으며 이 結果로 보아 inokosterone이 많이 消失되었음을 알 수 있다.

3) 脫아세틸化

脫아세틸化를 위해서 알칼리 條件에서 alcohol 分解 反應을 시켰다. ecdysterone triacetate와 inokosterone tetraacetate의 알칼리에 대한 反應性이 다르기 때문에 서로 다른 條件에서 反應시켰다.

알칼리로는 KOH, KHCO₃를 比較하였는데, pH가 높은 境遇에는 脫아세틸化 反應外에 分解反應이 일어나 노란색을 띠었으며, 溫度가 높은 境遇에도 마찬가지로 되었다.

알코올로서 methyl alcohol이 ethyl alcohol 보다 副反應이 없이 脫아세틸化가 可能하였다.

ecdysterone triacetate의 境遇에는 5% KHCO₃ 水溶液과 methyl alcohol 1:8 混合液에 ml當 9.2 μ mole의 ecdysterone triacetate를 넣고 35°C에서 攪拌하면서 反應시켰으며 反應經過를 TLC로 確認하였는데 3日 經過後에 反應이 完了되었다.

그러나 inokosterone tetraacetate의 境遇에는 더 激烈한 反應條件이 要求되었으며, 5% KHCO₃ 水溶液과 methyl alcohol 1:4 混合液에 ml當 6.2 μ mole의 inokosterone tetraacetate를 넣고 40°C에서 攪拌하면서 反應시켰으나 TLC로 反應經過를 調査한 結果 單一物質로 脫아세틸化가 이루어지지 않고 두 物質이 存在하는 것으로 나타났다. 이 두 物質을 分離하기 위해서 alumina吸着 chromatography를 하였으며 ethyl acetate-ethyl alcohol (5:1) 混合溶媒의 elution에 의해 副産物의 除去가 可能하였다. 그러나 아세틸化 反應에서 分解 損失이 많았고, 連續的인 分離過程에 의해서도 inokosterone의 分離收率は 낮았다.

脫아세틸化 反應 後의 反應液內에 包含되어 있는 KHCO₃를 除去하기 위해 屢 形態의 column으로 이온 交換을 하였으며 脫아세틸化 反應에서 ecdysterone의 收率は mole單位로 55~60% 程度였다.

試料로 부터 ecdysterone까지의 收률을 살펴보면 식우슬의 境遇, 試料 kg當 約 125mg의 ecdysterone과 18mg의 inokosterone을 얻었다.

아세틸化法에 의한 分離過程의 收률을 綜合하여 整理하면 다음 표 4와 같다.

Table 4. Separation yield of Ecdysterone and Inokosterone by the process of acetylation, separation and deacetylation.

step	reaction	yield(%)
Acetylation	E+I→Ac(E+I)	87.7
Separation	Ac(E+I) $\begin{cases} \text{AcE} \\ \text{AcI} \end{cases}$	94.3
		57.3
Deacetylation	AcE→E	60.2
	AcI→I	23.5

see foot note Table 3.

4. 牛膝 種類의 比較

Achyranthes obtusifolia(섬우슬)의 뿌리, 잎, 줄기에서 모두 ecdysterone만이 檢出되었다고 Takemoto等(1967a)이 報告하였는데 이 報告에 根據하여 섬에서 自生하는 섬우슬에 대해서도 식우슬과 같은 方法으로 抽出·精製를 試圖하였다. 抽出·精製過程 후에

Table 5. Comparison of pure crystal yield between *A. japonica* and *A. obtusifolia*

species	yield	
	mg/kg radix	
<i>Achyranthes japonica</i>	Ecdysterone :	125
	Inokosterone :	18
<i>Achyranthes obtusifolia</i>	Ecdysterone:	284
	Inokosterone:	not detected

TLC分析結果 ecdysterone 單一物質만 存在하는 것으로 밝혀졌다. 이 境遇에는 分離過程이 不必要하며 收率 역시 試料 kg當 284mg으로서 식우슬로부터의 ecdysterone收率에 비해 約 2.3倍 높은 收率을 얻었다. 最適條件下에서 두 우슬로부터 精製·分離된 試料 kg當 最終物質의 收률을 整理하면 표 5와 같이 要約할 수 있다.

5. 精製한 Phytoecdysone의 分析 및 同定

上記의 過程을 通해서 얻어진 ecdysterone, inokosterone을 理化學的으로 同定하여 다음과 같은 分析結果를 얻었다.

1) Paper chromatography

toluene·2-Butanol·water (2:1:1)을 展開溶媒로 使用하여 ecdysterone과 inokosterone을 分離하였으며 實驗結果 얻어진 各各의 Rf값은 다음과 같다.

ecdysterone : 0.31±0.02

inokosterone : 0.42±0.03

2) TLC

현재까지 알려진 ecdysone 類의 TLC 分析에 使用된 여러 展開溶媒를 比較한 結果, ecdysterone과 inokosterone의 分離가 可能한 展開溶媒는 거의 없었으며, paper chromatography에서 使用되었던 toluene·2-Butanol·water(2:1:1)의 上層液이 가장 分解能力이 좋았다. 두 混合物를 2~3回 連續展開 함으로써 充分한 分離가 可能하였다.

螢光物質이 包含된 precoated TLC plate를 使用 함으로써, UV에 의해 쉽게 分別이 可能하였고, 또한 vanillin-sulfuric acid로 發色시켰을 때 ecdysterone은 파란色(blue)을 나타내었고 inokosterone은 붉은色(red)으로 發色이 되어 쉽게 分別이 可能하였다.

ecdysterone, inokosterone, ecdysterone triacetate, inokosterone tetraacetate 등의 여러 試料에 對하여 TLC 分析을 하고 그 結果를 比較하였다(표 6, 그림 3 참조).

densitometer를 使用하여, 식우슬로 부터 抽出·精製된 粗結晶內에서 ecdysterone과 inokosterone의 比, 아세틸化物內의 ecdysterone triacetate와 inokosterone

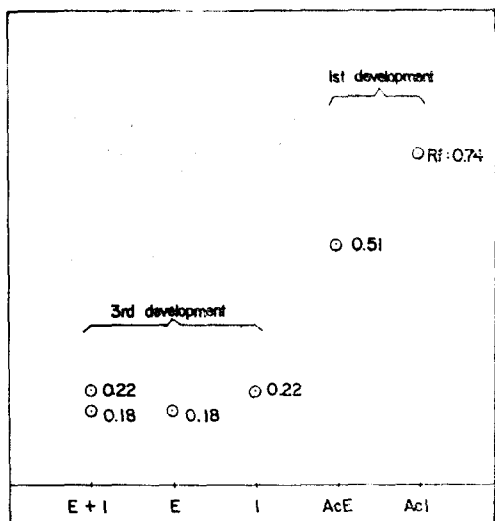


Fig. 3. TLC separation of Ecdysterone, Iokosterone and their acetylated products. see foot note Table 3

tetraacetate와의 比, 여러 ecdysterone試料의 標準 ecdysterone과의 純度比를 얻을 수 있었다(표 6).

本 實驗에서 抽出 精製된 ecdysterone이 Rhoto Pharmaceutical Co. (Osaka, Japan)의 標準 ecdysterone 보다 純度가 높은 것으로 densitometer의 分析結果 詳

Table 6. Characterization of mp, UV absorption and Rf of ecdysterone, inokosterone and their acetylated compounds.

Samples	mp(°C)	UV absorption		TLC Rf
		λ_{Max} (nm)	ϵ (EtOH)	
E ₀	242-4	242-3	13600	0.18(3)
E ₁	240-3	243	16128	0.18(3)
E ₂	243	243-4	16522	0.18(3)
I	256-7	244	13086	0.22(3)
AcE	195-7	243.5	13405	0.51(1)
AcI	164-6	243	16977	0.74(1)
E+I	250-4	243		

see foot note Table 3.

히졌다(표 6).

3) UV absorption spectra

ecdysterone, inokosterone, ecdysterone triacetate, inokosterone tetraacetate에 대해 ethyl alcohol을 溶媒로 하여 UV scanning을 한 바, 最大吸收波長은 243~244nm로 거의 같았으며, ϵ (extinction coefficient)의 값이 試料에 따라 달랐다. ecdysterone의 境遇에 ϵ 값은 約 16,000~16,500이었으며, 이값은 Rhoto Pharmaceutical Co.製의 ϵ 값보다 約 20%程度 큰 값으로서, 分離過程을 改善한 結果로 純度가 그만큼 높다는 것을

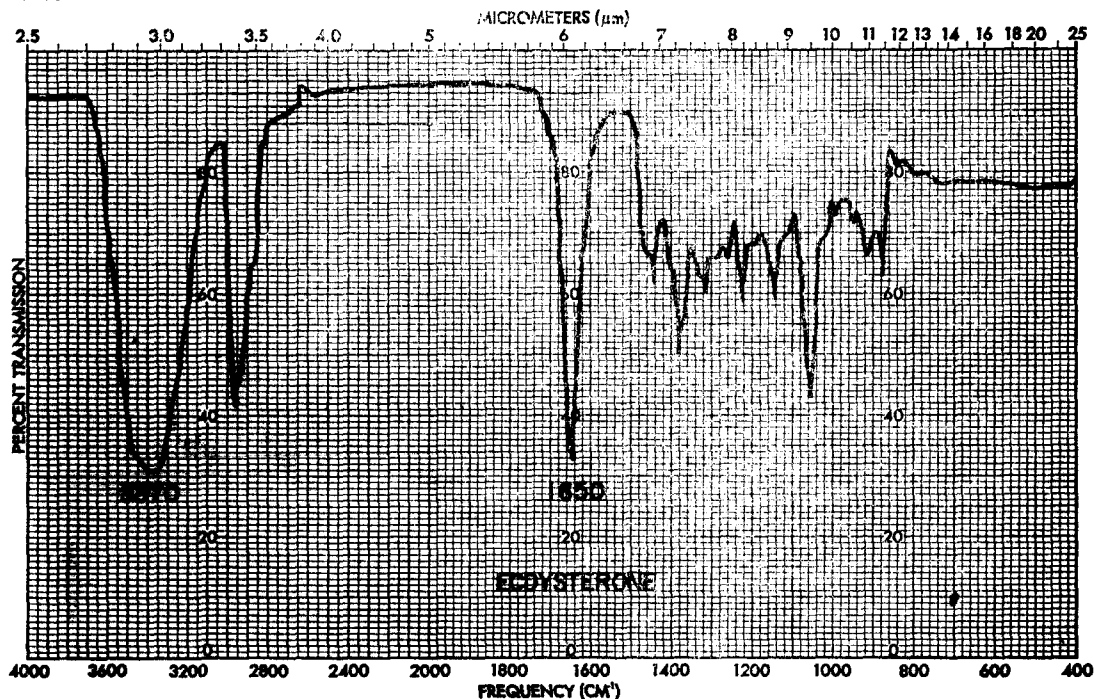


Fig. 4. IR spectrum of Ecdysterone

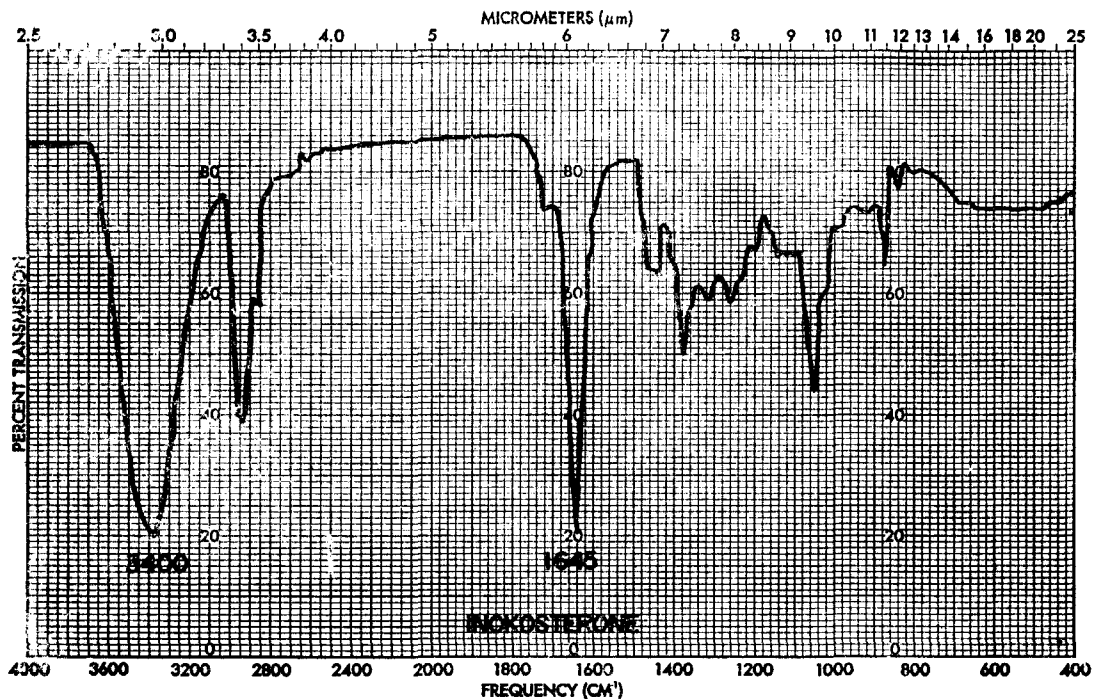


Fig. 5. IR spectrum of Inokosterone

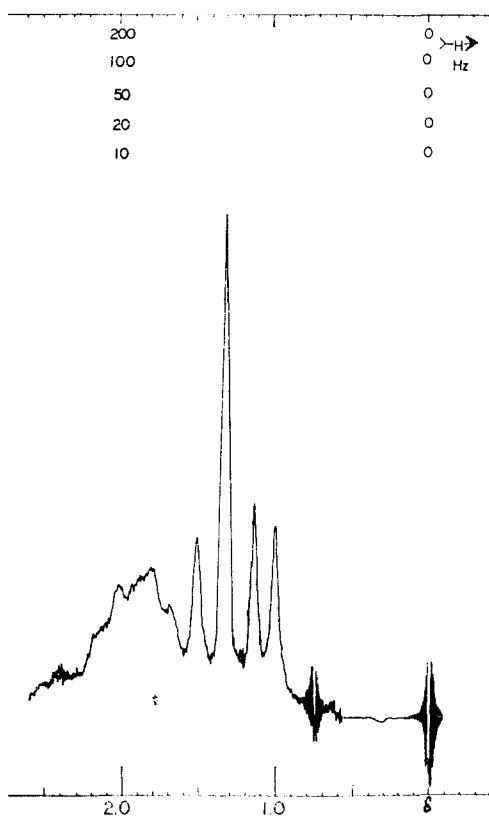


Fig. 6. NMR spectrum of Ecdysterone

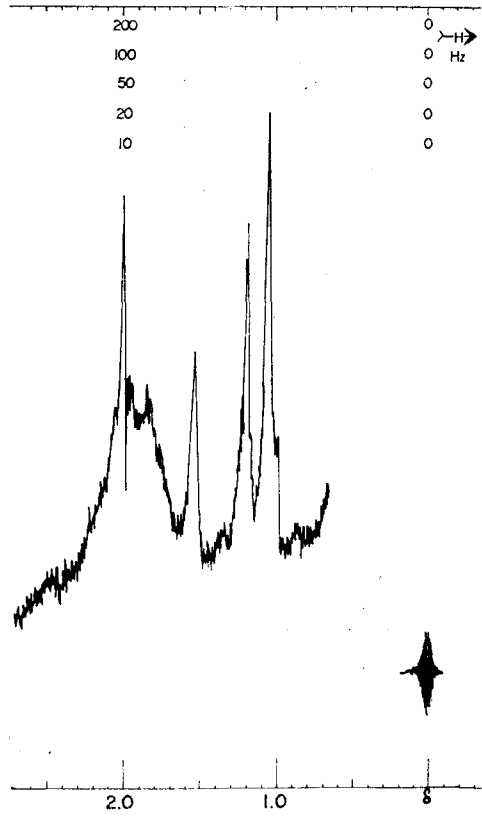


Fig. 7. NMR spectrum of Inokosterone

Table 7. IR (KBr) Spectrum of Ecdysterone, Inokosterone and their acetvlated compounds.

Sample	Absorption Spectrum(cm ⁻¹)
E ₁	3370(-OH) 1650(C=O) 1615(C=C)
E ₂	3370(-OH) 1650(C=O) 1615(C=C)
I	3400(-OH) 1645(C=O) 1615(C=C)
AcE	3470(-OH) $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ 1745(-\text{C}-\text{O}) \end{matrix}$ 1660(C=O) 1630(C=C)
AcI	3450(-OH) $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ 1745(-\text{C}-\text{O}) \end{matrix}$ 1660(C=O) 1630(C=C)

see foot note Table 3.

나타내 주고 있다. inokosterone 역시 Takemoto等(1969)의 報告보다 約 8%程度 純度가 높은 것으로 나타났다.

4) IR absorption spectra

섬우슬(*Achyranthes obtusifolia*), 식우슬(*Achyran-*



Plate 1. Photomicrograph of crystalline Ecdysterone (×300)

thes japonica)로 부터 精製한 ecdysterone은 같은 吸收 spectra를 보여 주었으며, inokosterone의 境遇에는 吸收波長에 약간의 變化를 보였다. 各 試料의 赤外線 吸收 spectra는 圖 7의 圖 4, 圖 5에 나타나 있으며 이러한 結果는 Takemoto等 (1967a)의 報告와 一致하였다.

5) 融點

ecdysterone의 境遇 242~243°C에서 溶解되었으며, inokosterone의 境遇는 256~257°C로서 文獻値와 一致하였고 ecdysterone triacetate, inokosterone tetraacetate의 境遇에도 各各 195~197°C와 164~166°C로서 Takemoto等 (1967a)의 報告와 一致하였다.

Table 8. NMR (TMS) Spectrum of Ecdysterone and Inokosterone

Sample	C-18	C-19	C-21	C-26, C-27
E	1.17	1.04	1.55	1.35(δ)
I	1.18	1.05	1.53	0.99(δ) 1.05(δ)

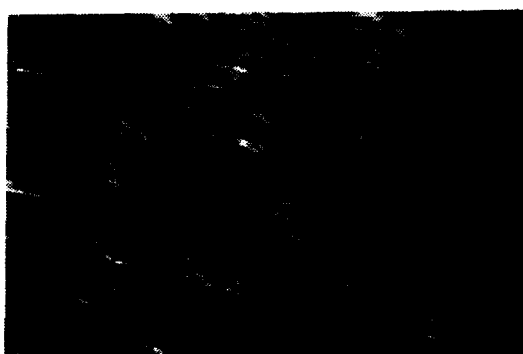


Plate 2. Photomicrograph of crystalline Inokosterone (×480)



Plate 3. Larval-pupal ecdysis by ecdysterone injection. (1.0μg/larva)
From right; 3 larvae are unchanged form
From left; 2 larvae are changed to pupae

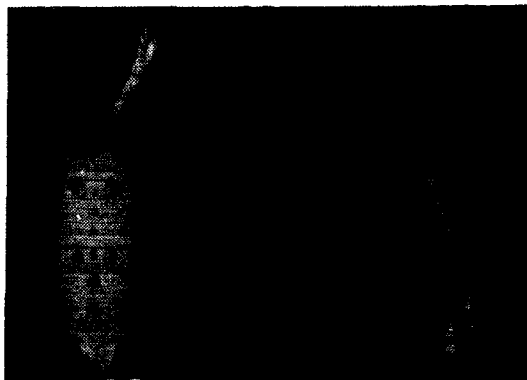


Plate 4. Induction of larval-pupal ecdysis by ecdysterone injection. Left; Control
Right; Induced pupal form (injected 1.0μg/larva)

6) NMR

ecdysterone과 linokosterone의 NMR spectra · 그림 6, 그림 7과 같이 약간 다른 양상을 보여주었으며 표 8에 요약되어 있다.

spectra · Takemoto等 (1967a)의 報告와 一致한다.

7) 結晶構造

光學顯微鏡을 통하여 觀察한 結果 ecdysterone과 inokosterone은 모두 無色透明한 針狀形의 結晶構造를 갖는 것으로 나타났다.

ecdysterone의 境遇는 inokosterone보다 큰, 水晶의 結晶形態에 가까운 針狀結晶이었으며, inokosterone은 바늘形態에 가까운 針狀結晶을 보여주었다(사진 1, 사진 2).

考 察

韓國産 牛膝뿌리에서 昆蟲脫皮호르몬인 ecdysterone을 效果의으로 抽出精製하기 위한 實驗을 하여 抽出 · 精製 · 分離의 各 過程에서 最適化가 이루어졌다.

抽出溶媒로 methyl alcohol을 使用할 境遇 phytoecdysyon外에 gum形態의 高分子物質이나 糖等の 多量의 妨害物이 같이 抽出되었으며 이러한 多量의 不純物을 除去하기 위해서는 여러 精製過程이 要求되었다.

그러나 MEK로 抽出할 境遇에는 精製過程이 簡單한 反面 粗結晶의 收率이 相對的으로 낮아서 methyl alcohol이 오히려 有利하였다.

methyl alcohol로 抽出한 후의 抽出液을 精製하는 方法으로 溶媒沈澱과 工業用硅藻吸着을 並行한 過程을 거쳐 높은 收率로 粗結晶을 얻을 수 있었다. Takemoto等(1969)은 methyl alcohol에 의한 一次 抽出후 ether에 의한 ether 可溶物의 抽出, ethyl acetate에 의한 連續抽出過程을 통하여 不純物을 除去하였으며, 試料 kg當의 313mg粗結晶을 얻었다.

그러나 本實驗에서는 抽出液을 最小부피로 濃縮하고 1.5倍 부피의 n-Butyl acetate를 添加하여 沈澱物을 除去한후 工業用 硅藻에 吸着하여 MEK로 elution한 結果 試料 kg當 506mg의 粗結晶을 얻었다. 이는 Takemoto等(1969)의 粗結晶收率보다 約 62%정도 높은 收率이며, 이의 原因으로서는 NBA에 의한 不純物沈澱, 工業用硅藻吸着의 過程이 效率的이라고 생각되나 牛膝의 產地가 다른데 따른 差異(竹木等, 1968c) 역시 考慮해야 할 必要가 있을 것이다.

TLC densitometer의 分析結果에 의하면 ecdysterone과 inokosterone이 1:1의 比率로 含有되어 있었으며 構造가 매우 類似한 이 두 物質의 分離는 어려운 것

로 알려져 있다.

構造가 類似한 이런 두 物質의 分離方法으로는 아세틸化方法이 效率的인 方法으로 評價되고 있다.

앞으로는 ecdysterone과 inokosterone의 構造의인 差異, 즉 側鎖의 末端炭의 水酸基가 3°와 1°라는 差異에 의해 選擇的으로 反應하는 化學物質을 使用하여 容易하게 分離 할 수 있는 方法의 研究가 期待된다.

Takemoto等(1969)에 의하면 아세틸化法에 의해 粗結晶 g當 0.15g의 ecdysterone을 얻었으나 本研究에서는 粗結晶 g當 0.25g의 ecdysterone을 얻었으며 約 67%以上 높은 收率을 나타내었다. 이러한 差異는 脫아세틸化, alcohol 分解反應 條件의 相異에 기인하는 것으로 생각된다.

脫아세틸化反應에서 Takemoto等 (1969)이 使用한 10% KOH와 本實驗에서의 5% KHCO₃를 比較實驗한 結果 10% KOH를 使用한 境遇에는 反應液의 pH가 높아서 副反應인 分解反應이 誘導됨에 따라 反應液의 색이 노란색으로 變化되어 脫아세틸化反應의 收率이 低下되었다.

또한 이 反應에 使用된 alcohol로서는 methyl alcohol이 Takemoto等 (1969)이 利用한 方法中的 ethyl alcohol보다 反應收率이 높고, 副反應이 적다는 것을 實驗的으로 알 수 있었다.

脫아세틸化反應은 Takemoto等 (1969)의 10% KOH 水溶液과 ethyl alcohol 1:10의 混合溶媒에서 熱湯條件으로 1時間 反應시키는 것 보다는 35°C條件下에서 5% KHCO₃ 水溶液과 methyl alcohol 1:8의 條件으로 3日間 反應시키는 것이 脫아세틸化反應의 副反應을 줄일 수 있었다.

inokosterone은 TLC densitometer 分析結果에 의하면, 아세틸化反應, chromatography, 脫아세틸化反應에서 상당량 分解되는 것으로 나타났으며, 脫아세틸化反應 후 TLC上에 單一發色點이 아닌 isomer의 混合物(Nakanishi, 1971)인 것으로 나타났다. inokosterone은 1° 水酸基를 가지고 있으므로 脫아세틸化反應에서는 좀 더 강한 反應條件이 要求되어 이에 따라 分解反應, 異性質化反應이 加重된 것으로 생각된다.

TLC上에 單一한 發色點의 化合物을 얻기 위해서 낮은 溫度에서 KHCO₃+MeOH에 의해 alcohol 分解한 후, TLC上에 두개의 發色點이 나타날때 反應을 中止하고, alumina chromatography에 의해 分離하는 過程을 거쳐 TLC上에 單一한 發色點의 inokosterone을 얻을 수 있으나 收率은 試料 kg當 18mg으로 매우 낮았다.

실제로 Nakanishi (1971)에 의하면 inokosterone은

C₂₅位置의 epimer 混合物로 存在하는 것이 밝혀졌으며 Ogawa等 (1977)의 *Achyranthes* 抽出物の HPLC 分析結果에서도 epimer가 存在함을 나타내 주고 있다.

本實驗에서는 *Achyranthes japonica*의 境遇 試料 kg當 125mg의 ecdysterone과 18mg의 純粹한 inokosterone을 얻을 수 있었고, *Achyranthes obtusifolia*의 境遇에는 TLC 分析結果 ecdysterone만이 存在하였으므로 分離過程이 不必要하였다. 抽出·精製 후, 試料 kg當 約 284mg의 ecdysterone을 얻었으며 *Achyranthes japonica*에 비해 約 2.3배의 ecdysterone을 더 얻을 수 있었다.

따라서 ecdysterone을 얻기 위해서는 抽出·精製過程이 簡單하고 收率이 높은 *Achyranthes obtusifolia*를 使用하는 것이 바람직하다고 볼 수 있다.

本實驗에서 얻은 最終產物を 同定하고 確認하기 위해서 Rhoto Pharmaceutical Co. 製의 ecdysterone과 比較하였으며, paper chromatography, TLC, 融點, UV., IR., NMR., TLC densitometer 等の 器機分析을 遂行한 結果, 抽出·精製된 ecdysterone, inokosteone은 모두 文獻과 一致되는 結果를 얻었다.

IV. Ecdysterone의 生物檢定과 人工飼料 添加效果

前章(Ⅲ章)에서 抽出·精製된 ecdysterone은 理化學的으로 既存의 報告와 一致되고 있으나 結紮試驗을 통하여 이의 生理活性을 確認하고 同時에 ecdysterone의 人工飼料에 對한 最適添加濃度, 添加時期等을 알아 보기 위해서 本實驗을 實施하였다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

- 가. 生物檢定: 桑葉으로 飼育한 蠶119×蠶 120
- 나. 人工飼料添加試驗: 蠶113×蠶114(實驗 #1)
無等×韓生 4號(實驗 #2)

2. 生物檢定方法

- 가) 結紮時期: 4齡 脫皮後 50時間 및 72時間제
- 나) 結紮部位 및 方法: 前胸과 中胸의 節間 및 胸·腹間을 綿絲로 結紮하였다.
- 다) 注射濃度 및 方法: ecdysterone의 抽出·精製研究結果 얻어진 ecdysterone을 滅菌蒸溜水에 1ml當 1mg의 濃度로 溶解하여 小量濃度別(頭當 0.5μg, 1.0μg, 1.5μg, 2.0μg)로 microsyringe를 利用하여 結紮部位後部の 節間에 注射하였다.

Table 9. Composition of experimental diet

ingredient	instar	
	1-4	5
mulberry leaf	25 (g)	5 (g)
corn starch	7.5	15
sucrose	8	—
glucose	—	12
soybean meal defatted	36	60
soybean oil	1.5	3
soybean sterol	0.2	0.5
salt mixture	3	2
cellulose	15	—
agar	7.5	5
ascorbic acid	1	2
citric acid	4	0.5
sorbic acid	0.2	0.2
(total)	(108.9)	(105.8)
vitamin B complex	added	added
antiseptics	added	added
water	2.57ml/g D.W	2.6ml/g D.W

라) 供試頭數: 各 試驗區 別로 25頭씩 注射하였고 4齡 脫皮後 50時間제의 注射當時 供試動物의 體重은 平均 508mg, 72時間제 注射當時의 體重은 平均 585mg이었으며 結紮後 26±2°C에 保護하였다.

3. 人工飼料添加試驗

本實驗에 利用한 人工飼料의 組成은 표9와 같으며 飼育管理는 稚蠶期는 29±0.5°C, 90±5% R.H.의 暗條件, 壯蠶期는 26±1°C, 65±10% R.H.의 自然光條件下에서 飼育했고, 稚蠶期는 2일에 1回, 壯蠶期는 1日 1回 飼料를 給與했다.

ecdysterone의 飼料添加는 蒸溜水 10ml當 1mg의 濃度로 稀釋한 溶液을 所定量의 飼料蒸着用蒸溜水에 添加하였다.

4. 飼料添加試驗設計

가. 實驗 # 1: 1~4齡까지는 표 9의 1~4齡 飼料로 飼育한 후 5齡 起蠶時부터 72時間제까지 1, 2, 3, 5ppm 添加飼料로 飼育하여 5齡期의 添加最適濃度를 알아보고자 하였으며 無添加의 對照區를 設定했고 5齡起蠶時 各區 100頭씩 供試하였다.

나. 實驗 # 2: 最適添加時期를 알아보기 위하여 各齡의 添加水準을 2ppm으로 統一하여 표 10과 같은 週期 投與計劃에 따라 ecdysterone 添加飼料를 給與하였으며 各區 4齡부터 250頭씩 供試하였다.

Table 10. Periodic administration schedule of ecdysterone

feeding treatment	1st		2nd		3rd		4th		5th	
	ante	poste	ante	poste	ante	poste	ante	poste	ante	poste
1) control	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2) con't-feeding	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
3) ante	○	—	○	—	○	—	○	—	○	—
4) poste	—	○	—	○	—	○	—	○	—	○
5) poste-ante	—	○	—	○	—	○	—	○	○	—

- 1) control ; non-feeding
- 2) con't-feeding ; feeding through whole larval stage
- 3) ante ; feeding anterior half of each instar
- 4) poste ; feeding posterior half of each instar
- 5) poste-ante ; feeding posterior half from 1st instar to 4th, but during 5th instar anterior 72hrs feeding

實驗 結果

1. 生物 檢定 結果

4齡 脫皮後 50時間제 및 72時間제의 누에에 胸節間 또는 胸腹間을 結紮하고 各各 所定濃度の ecdysterone 을 注射하여 이의 生物檢定을 한 바 표 11과 같은 結果를 얻었다. 즉 4齡 脫皮後 50時間제 前胸과 中胸間을 結紮하고 ecdysterone을 注射한 實驗에서는 0.5 μ g 注射區에서 40時후에 25頭中 11頭가 幼蟲脫皮가 誘導된 이 觀察되었고 (사진 3, 사진 4) 1.0 μ g 注射區에서는 30時間후에 25頭中 23頭가 幼蟲脫皮가 誘導되어 0.5 μ g 以上 注射區에서 ecdysterone의 脫皮誘導活性이 나타 났다.

한편 1.0 μ g 注射區에서는 注射後 144時間에 化蛹脫

皮現象이 觀察되었다. 이 實驗에서와 同一한 部位, 즉 前胸과 中胸間을 結紮하고 脫皮後 72時間제에 注射한 實驗에서, 0.5 μ g을 注射한 試驗區에서는 注射後 40時間제에 供試頭數의 80%인 20頭가 幼蟲脫皮가 誘導되었고 1.0 μ g區에서는 88%인 22頭가, 2.0 μ g 區에서는 96%인 24頭가 이런 反應을 보였다.

胸腹間을 脫皮後 72時間제 結紮한 實驗에서도 이와 비슷한 경향을 보였다. 즉 注射後 40時間제에 0.5 μ g 區에서 80%인 20頭가, 1.0 μ g區에서는 92%인 23頭가, 1.5 μ g區에서는 100%인 25頭가 幼蟲脫皮가 誘導되었다 즉 胸節間, 胸腹間을 結紮하여도 0.5 μ g以上 1.0 μ g 以內에서 供試幼蟲의 50% 以上이 幼蟲脫皮가 誘導됨을 나타내어 주고 있다.

2. 人工飼料添加 試驗結果

가. 實驗 *1

Table 11. Results of bioassay on each 25 silkworm larvae

injection dosage (μ g/larva)	time of ligature after ecdysis	50hrs		72hrs		72hrs	
		changed*	unchanged**	changed	unchanged	changed	unchanged
0		0	25	0	25	0	25
0.5		11 ^{a)}	14	20 ^{d)}	5	20	5
1.0		23 ^{b), c)}	2	22	3	23	2
1.5		—	—	—	—	25	0
2.0		—	—	24	1	—	—

a): 40hrs after injection larval ecdysis was observed.

b): 30hrs after injection larval ecdysis was observed.

c): 144hrs after injection pupal ecdysis was observed.

d): results of 40hrs after injection.

*: indicates larval-pupal ecdysis or larval pupal ecdysis

** : indicates unchanged larval form

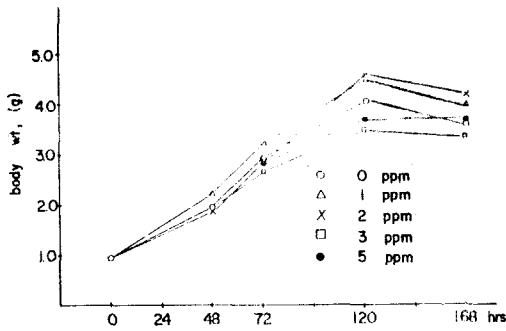


Fig. 8. Daily body weight changes by ecdysterone administration during anterior half of 5th instar (average value of 10 female and 10 male larvae)

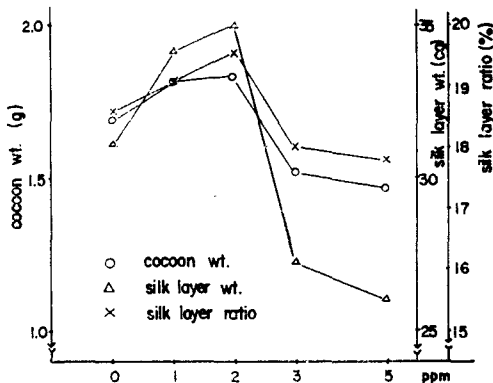


Fig. 9. Silk enhancing effect of ecdysterone administration during 5th instar (anterior half)

item	20-HE (ppm)					
	0	1	2	3	5	
cocoon wt.	\bar{X}	1.70(g)	1.82	1.88	1.53	1.47
	%	100(%)	107.1	107.6	90.0	86.5
silk layer wt.	\bar{X}	31.2(cg)	34.2	35.1	27.3	26.0
	%	100(%)	109.6	112.5	87.5	83.3
silk layer ratio	\bar{X}	18.8%	19.1	19.6	18.1	17.8
	%	100(%)	102.7	105.4	97.3	95.7

(average value of 15 female and 15 male cocoons)

Ecdysterone의 5齡期の 最適添加濃度を 알아 보기 위한 試驗結果, 日別體重의 變化는 다음과 같다(그림 8)

즉, 5齡 起蠶時부터 72時間동안 1, 2, 3, 5ppm의 ecdysterone을 飼料에 混合하여 계속 添食시킨 後, 日別體重增加의 變化를 보면 添加濃도가 높은 區가 5齡 後半으로 갈수록 體重이 變어지고 2ppm添加區가 가장 높으며, 다음이 1ppm區며 添加濃도가 2ppm보다 높을 때는 對照區나 1ppm 2ppm 添加區에 比해서 體

重이 가벼워 진다는 것을 보여주고 있다. ecdysterone 添加에 따른 收繭成績을 比較해 보면 그림 9와 같다.

즉 全繭重, 繭層重, 共히 2ppm, 1ppm, 無添加區, 3ppm, 5ppm 順으로 높은 傾向을 나타내고 있다. 즉 3ppm 以上 添加는 오히려 全繭重과 繭層重의 增加에 是 阻害의 效果를 나타내고, 實用形質의 增大를 위해서는 2ppm이 가장 좋은 것을 보여주고 있다. 2ppm添加區는 全繭重은 對照區에 比해서 7%, 繭層重은 12% 程度 增加되며 全繭重의 增加比率보다 繭層重의 增加比率이 높으므로 繭層比率도 指數로 약 5%增加됨을 나타내 주고 있다.

나. 實驗 #2

本 實驗은 實驗 #1의 結果에서 2ppm添加가 實用形質의 增大에 가장 效果의 實을 알고 표 10과 같은 週期投與計劃에 따라서, 添加의 最適時期를 알기 위해 各 期間에 投與濃도를 2ppm으로 固定하여 飼料에 添加한 後 給與하였다. 이 結果를 要約하면 표 12와 같다.

즉 1齡부터 4齡까지의 初期 48時間 동안과 5齡의 初期 72時間 동안에 2ppm 濃度の ecdysterone이 添加된 飼料를 給與하면 全繭重은 對照區에 比하여 6.6% 增加하나 繭層重은 12.9% 增加하며, 繭層比率도 指數로 6.5%, 實數로 1.1% 增加했다.

反面 各齡의 後期에 添加飼料를 給與하면 오히려 全繭重은 11.7%, 繭層重은 14.6%, 繭層比率도 指數로 4.6%, 實數로 0.6%가 減少됨을 나타내고 있다. 全齡 期間中 2ppm 濃度の ecdysterone 添加飼料給與區에서는 全繭重은 12.1%, 繭層重은 12.2%가 減少되어 各齡 後半에 添加飼料를 給與하는 方法과 거의 비슷한 傾向으로 收繭成績이 低下되고 있다.

한편 1齡부터 4齡까지는 各齡의 後期에 給與했으나 5齡에서만 前期에 給與하면 對照區에 比하여 全繭重은 4.5%가 減少하는 反面, 繭層重은 1.3% 增加하여 相對的으로 繭層比率는 指數로 5.3%, 實數로 0.9%가 增加되었다. 이를 統計的으로 分析해 보면 표 12와 같다.

즉, 全繭重, 繭層重, 繭層比率이 모두 高度로 有意性(1% 水準)을 갖고 있음을 알 수 있으며 繭層重에서는 Duncan의 多量比較 結果에서도 各 처리구가 相異함을 보여주고 있다. 이러한 現象에 對한 原因을 알아보기 위해서 各 처리구의 幼蟲 經過時間을 調査한바 표 13과 같다. 즉, 1齡부터 4齡까지의 經過時間은 各 處理區間에 差異가 없으나 5齡期에는 處理區間에 差異를 보이고 있다. 對照區와 各齡 前期給與는 5齡期間이 147時間인데 比하여 全齡給與區와 各齡後期 給與區는 127時間으로 20時間이 短縮되었다. 따라서 絹絲腺의 發育

Table 12. Silk enhancing effect of ecdysterone (2ppm, periodic administration)

n=60, ♀30+♂30 mean±S.D

feeding treatment \ item	cocoon wt.(g)	silk layer wt.(cg)	silk layer ratio(%)
1) control	2.24±0.42(100.0)	37.1±5.5(100.0)	16.7±1.90(100.0)
2) con't-feeding	1.97±0.30(87.9)	32.6±3.1(87.8)	16.6±1.80(99.4)
3) ante	2.39±0.45(106.6)	41.9±5.1(112.9)	17.8±2.08(106.5)
4) poste	1.98±0.29(88.3)	31.7±3.2(85.4)	16.1±1.63(96.4)
5) poste-ante	2.14±0.36(95.5)	37.6±5.2(101.3)	17.6±1.72(105.3)

() indicates index

ANOVA (of cocoon weight)

source	df	SS	MS	F
among treatment	4	7.0596	1.8744	13.44**
within treatment	295	41.1871	0.1396	

Duncan's new multiple range test (1% protection level)

2) 4) 5) 1) 3)

ANOVA(of silk layer weight)

source	df	SS	MS	F
among treatment	4	165438.087	41359.52	1966.5**
within treatment	295	6202	21.032	

ANOVA(of silk layer ratio)

source	df	SS	MS	F
among treatment	4	124.3617	31.090	9.20**
within treatment	295	996.6	3.378	

Duncan's new multiple range test (1% protection level)

4) 2) 1) 5) 3)

Table 13. Larval period of each instar by periodic administration.

feeding treatment \ instar	1	2	3	4	5	Total
control	97 ^{hrs}	95 ^{hrs}	124 ^{hrs}	121 ^{hrs}	147 ^{hrs}	24day 5 ^{hrs}
con't-feeding	97	95	124	121	127	23 12
ante	97	95	124	121	147	24 5
poste	97	95	124	121	127	23 12

可能 시간이 그 만큼 短縮되었다고 생각된다. 經過의 長短이 없는 1齡부터 4齡까지의 絹絲腺 發育狀態를 調査한 結果는 표 14와 같다.

이는 5齡 脫皮後 암·수 各各 10頭씩 3반복 採취하

여 解剖하고 生體重을 秤量하여 體重에 對한 全絹絲腺의 比率을 나타낸 結果인데 對照區에 比하여 各齡前期 給與는 약 12%정도 增加되는 傾向은 있으나 統計的 有意性은 없었다.

Table 14. Comparison of silk glands weight vs body weight of newly ecdysed 5th instar larvae. (periodic administration from 1st to 4th instar)

treatment	sex (mean)	body wt. (A)	whole silk glands wt. (B)	B/A × 100
control	♀	0.819g	0.027g	3.30%
	♂	0.734	0.028	3.81
	\bar{X}	0.776	0.028	3.56
con't-feeding	♀	0.861	0.030	3.48
	♂	0.752	0.031	4.12
	\bar{X}	0.806	0.031	3.80
ante	♀	0.846	0.029	3.43
	♂	0.767	0.034	4.43
	\bar{X}	0.807	0.031	3.93
poste	♀	0.838	0.027	3.41
	♂	0.744	0.029	3.90
	\bar{X}	0.791	0.028	3.65

(average value of triplicate of 10 female and 10 male larvae)

考 察

本實驗에서 抽出精製한 ecdysterone이 結紮 4齡 幼蟲의 脫皮를 誘發시키는 臨界濃度는 표 9에서와 같이 0.5 μ g이상 1.0 μ g이하인 것으로 나타났는데 이는 Kimura等 (1974)과 Morohoshi (1976)가 報告한 臨界濃도와 一致하며 韓國產 牛膝뿌리로 부터 抽出精製한 本實驗結果의 ecdysterone이 理化學的으로 辨 認되고 生理活性에 있어서도 ecdysterone이 갖는 脫皮 호르몬의 活性을 갖고 있음을 보여 주고 있다.

한편 ecdysterone이 蛋白質의 合成을 促進시킨다는 現象과 化蛹을 促進시키는 것은 오래 전부터 알려져 있으나 누에에의 投與效果에 대해서는 報告結果들이 一致되고 있지 않다.

Ito等(1970)은 牛膝뿌리의 未精製抽出物을 人工飼料에 添加하여 5齡의 初期에 給與하면 齡期間이 延長되어 全繭重과 繭層重이 增加하나, 中期나 後期에 給與하면 齡期間이 短縮된다고 報告하였다. 그러나 Shigematsu等(1974)은 5ppm의 ecdysterone이나 10ppm의 inokosterone을 人工飼料에 添加하여 連續給與하면 熟化를 促進시키나 10ppm 또는 20ppm의 ecdysterone이나 40ppm의 inokosterone을 連續給與하면 熟化를 지연시킨다고 했으며 5ppm의 ecdysterone을 連續給與받은 누에는 絹物質生成能力이 낮았다고 했다.

本實驗에서는 精製 ecdysterone의 最適添加濃度를 알아 보기 위하여 5齡 初期 72時間동안 連續적으로 1, 2, 3, 5ppm 濃度の 飼料을 給與한 結果 2ppm 濃도가 體重增加와 絹物質生産에서 가장 우수했으며 3ppm以上の 濃度는 오히려 全繭重, 繭層重을 劣化시켰다. 이것은 Shigematsu等 (1974)의 報告에서와 같이 高濃度給與가 고치를 劣化시킨다는 점에서는 一致하는 傾向을 보이고 있다. 그러나 Shigematsu等 (1974)의 ecdysterone給與 方法은 4齡과 5齡 全期間을 통한 給與로서 Ito等(1970)이 指摘하고 있는 바와 같이 5齡後半에 給與하면 齡期間이 短縮되어 고치를 劣化시킨다는 報告와는 給與方法과 濃度에서 相異點이 있다. 本實驗에서는 이런 相異點을 고려하여 添加濃度를 2ppm으로 一定하게 고정한 후, 1齡부터 4齡까지는 48時間을 기준으로 5齡期間은 72時間을 기준으로 하여, 各齡의 前後半을 分割하여 週期的으로 給與한 바, 1齡부터 4齡까지의 期間중의 前·後半給與區 및 全齡給與區中 各齡의 前期給與區가 5齡 起蠶時體重에 대한 絹絲腺의 무게 비율이 가장 높은 傾向을 보이고 있다. 그러나 5齡期의 前期給與區와 後期給與區 및 全齡給與區를 比較해 보면, 後期給與區와 全齡給與區는 共히 齡期間이 約 20時間 短縮되었고 全繭重, 繭層重, 繭層比率이 低下되었는데, 이점은 Ito等 (1970)의 報告와 一致하고 있다. 이 原因은 絹絲腺이 急激히 肥大해지는 5齡 3日 以後 ecdysterone을 給與하면 幼蟲期間이 短縮되어 絹絲腺肥大成長의 期間短縮으로 고치가 劣化되는 것으로 보인다.

各齡前期 特히 5齡前期의 ecdysterone給與가 絹物質의 生成을 促進시키는 原因으로서는 絹絲腺의 成長에 미치는 內分泌物質의 均衡, 즉 5齡 72時間까지는 juvenile hormone이 優위적으로 作用하고 脫皮호르몬의 分泌는 약한데, juvenile hormone은 絹絲腺의 發育을 抑制하나 前胸腺 호르몬은 絹絲腺의 發育을 促進시킨다는 報告(福田, 1942; 西村, 1949)와 人工飼料育누에의 腦 hormone 分泌機能은 柔葉育 누에의 그것에 비하여 약하므로 脫皮호르몬의 分泌가 적다고 하는 報告(Morohoshi and Shibata, 1976)를 관련시켜 볼 때 人工飼料에 ecdysterone을 첨가하면 이 두 호르몬의 均衡의 隔差를 좁혀 주어 各齡의 絹絲腺發育을 促進시키는 것으로 생각된다. 또한 外因性脫皮호르몬은 標的器管에 直接 作用하는 외에 前胸腺을 자극시켜 前胸腺의 脫皮호르몬 分泌機能을 positive feedback으로 促進한다는 報告(Kimura and Kobayashi, 1975)와 人工飼料에 대한 物質의 添加效果를 관련시켜 보면 ecdysterone의 絹物質增收效果가 理解될 수 있을 것으로 보인다.

5齡 72時間以後 前胸腺의 脫皮호르몬 分泌機能이 旺

盛해지는 時期에 外因性 ecdysterone을 投與하면 濃度의 蓄積效果(Kimura, 1974)와 함께 前胸腺刺戟效果(Kimura and Kobayashi, 1975)에 의해서 熟化가 促進되므로, 絹物質增加를 위한 5齡期의 ecdysterone 給與의 臨界時期는 5齡 72時間일 것으로 생각된다. 이 臨界期以後 投與는 絹絲腺細胞의 微細構造에 變化를 일으켜 微細構造를 變態形에 가까운 쪽으로 誘導한다는 電子顯微鏡 觀察結果(赤井, 1976)와 이 時期以後 ecdysterone의 給與가 齡期間을 短縮시키는 本實驗結果를 聯關시켜 보면 5齡後期의 ecdysterone 給與가 絹物質生産을 오히려 減少시키는 原因이 되는 것으로 보인다.

V. 給合考察

植物體에서 α -ecdysone과 ecdysterone의 存在가 確認된 以來(Gizba et al., 1966; 竹本等, 1967a) 많은 植物에서 이들의 存在가 發見되었고 또한 昆蟲脫皮호르몬으로서 生理活性을 갖는 여러 類似體 즉, phytoecdysone이 發見되었다(Nakanishi, 1971). 우리 나라에서 이러한 植物이 自生 또는 栽培되고있으나 이런 植物體로부터 昆蟲脫皮호르몬을 抽出·精製하여 이의 理化學의 特性을 同定해 본바 없으므로 本實驗에서는 韓國產 牛膝뿌리로부터 ecdysterone과 inokosterone을 純粹分離하여 이를 精製하고 理化學의 同定結果, 既存의 報告와 一致하였으며, 누에의 結紮試驗으로 이 物質이 生物學的으로 有效한 것임을 밝혔고, 누에에 添食하여 絹物質生産도 增加시킬 수 있음을 알았으므로 이러한 過程을 論議해 본다.

韓國產 牛膝中 섬우슬(*Achyranthes obtusifolia*)에는 ecdysterone만이 檢出되었고 抽出最適條件下에서는 뿌리 kg當 284mg의 結晶을 얻을 수 있었으며 식우슬(*Achyranthes japonica*)에서는 ecdysterone과 inokosterone이 檢出되었고 本實驗의 最適抽出條件下에서는 뿌리 kg當 125mg의 ecdysterone과 18mg의 inokosterone을 精製하였다.

竹本等(1968)은 *A. japonica*의 全草에서 試料 kg當 67mg의 ecdysterone을, *A. obtusifolia*의 地上部에서 100mg의 ecdysterone을 精製했다고 報告했는데 本實驗에서의 ecdysterone의 精製收率이 竹本等(1968)의 그것과 比較하여 높은 것은 牛膝의 產地의 差異에 그 原因이 있겠으며 抽出方法和 精製過程을 改善한 데도 그 原因이 있을 것으로 보인다. 즉, 抽出後 結晶化를 妨害하는 物質들을 n-Butyl acetate에 의해 除去하고 珪素吸着에 의한 豫備 chromatography, 脫아세틸化, alcohol 分解反應過程의 改善에 主要한 原因이 있을 것으로 보

인다.

精製 ecdysterone을 4齡누에에 結紮後 注射한 바 0.5~1.0 μ g 注射로써 幼蟲脫皮가 誘導된 것으로 보아 이 物質이 化學的으로 뿐만 아니라 生物學的으로도 脫皮호르몬으로서의 作用이 有效한 것을 알았다.

生物檢定에 의하여 確認된 ecdysterone을 누에人工飼料에 添加하여 飼育實驗한 結果 ecdysterone을 各齡前期에 2ppm의 濃度로 投與하면 絹物質生産을 10%以上 增加시킬 수 있었다.

이는 juvenile hormone과 ecdysterone의 均衡에 있어서 人工飼料로 飼育한 누에는 juvenile hormone의 分泌量이 桑葉飼育누에와 差異가 없으나 腦 hormone의 分泌가 不足하여 脫皮호르몬의 生産이 低下된다고(Morohoshi and Shibata, 1976) 報告되어있는데 이 報告와 本實驗結果를 聯關시켜보면 이와같은 호르몬均衡의 隔差를 外因性 ecdysterone에 의해서 좁히게 된 것으로 보이며, 또한 外因性 ecdysterone이 前胸腺을 刺戟하여 生體內에서 內因性 ecdysterone의 分泌를 促進시킨다는 점(Kimura and Kobayashi, 1974)들이 本實驗結果의 絹絲腺發育과 繭層重增加의 原因이 되는 것으로 보인다.

本實驗에서 5齡 72時間以後 ecdysterone을 給與하면 絹物質의 生産이 減少되는데, 이는 5齡中期以後에 이 物質을 投與하면 熟化가 促進된다는 報告(Ito et al., 1970)와 5齡 96時間以後 ecdysterone을 注射하면 絹絲腺의 細胞微細構造가 變態에 가까운 形態로 變한다는 電子顯微鏡의 觀察結果(赤井, 1976)와 關聯시켜보면 5齡後期의 ecdysterone 給與는 經過를 短縮시키고 細胞의 機能을 變態에 가까운 方向으로 誘導하여 結果的으로 絹物質生産이 減少된 것으로 보인다.

本實驗結果 ecdysterone의 效率의 抽出方法和 利用方案이 講究되었으므로 우리나라 賦存低利用資源의 活用이라는 觀點에서 ecdysterone의 生理活性을 가지는 牛膝以外的 다른 植物에 대한 分析調査를 해 볼 必要가 있다고 생각된다.

摘 要

植物界에 昆蟲의 脫皮 호르몬이 存在하고 있는 것은 잘 알려져 있다. 本實驗에서는 韓國에서 栽培또는 自生하고 있는 牛膝(*Achyranthes* 屬)에서 昆蟲 脫皮 호르몬을 抽出 精製하고 이의 最適抽出條件과 理化學의 性狀을 檢討했으며 이 物質의 家蠶에 對한 生理活性을 檢定하였는 바 이 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 乾燥 粉碎한 牛膝뿌리 200g에 對하여 1l의 메탄

올로 1時間씩 連續 3回 還流冷却 抽出하는 方法에서 ecdysterone 抽出의 收率이 가장 높았으며 試料의 粉碎 粒度가 重要함을 알았다.

2. 粗結晶의 分離 精製過程은 n-Butyl acetate에 의한 gum 狀의 高分子物質을 沈澱시킨 후 工業用硅藻에 吸着을 거쳐 알루미늄 chromatography에 의해서 이루어 졌으며 最適狀態에서의 粗結晶의 收率은 牛膝뿌리 kg當 約 500mg程度였다.

3. 원래 野生種이나 現在 栽培되기도 하는 *Achyranthes japonica*에서는 ecdysterone (20-hydroxyecdysone)과 inokosterone이 抽出되었으며 이들의 含量比는 1:1 임을 알았다. 이들을 純粹 分離하기 위하여 아세틸화를 한 後, 알루미늄 chromatography와 alcohol분해를 의한 脫아세틸化, 이온 交換法을 거쳐 最終 結晶을 얻었다.

*Achyranthes japonica*에서는 뿌리 kg當 125mg의 ecdysterone과 少量의 inokosterone이 結晶化 되었고 inokosterone은 分離 精製過程에서 많이 消失됨을 알았다.

4. 野生種으로 알려진 *Achyranthes obtusifolia*에서는 ecdysterone만이 分離 結晶되었고 收率은 뿌리 kg當 284mg 程度였다.

5. 分離된 ecdysterone과 inokosterone의 理化學的 性狀을 얻기 위하여 赤外線 分光分析, 紫外線分光分析, 核磁氣共鳴法, 融點測定, 薄層 chromatography를 하여 標準品 또는 文獻值와 一致함을 알았다.

6. 이 物質의 生理活性을 確認하기 위하여 4齡의 家蠶幼蟲을 結紮한 後 ecdysterone을 注射하여 結紮腹部의 幼蟲脫皮에 의하여 그 生理 活性을 確認하였으며 頭當 0.5~1.0 μ g 注射에 의하여 幼蟲脫皮가 誘導되었다.

7. 人工飼料를 利用하여 ecdysterone 給與에 따른 絹物質 增加效果의 臨界期를 알기 위한 試驗結果 ecdysterone 給與은 各齡의 前半部가 效果의 임을 알았다.

8. 5齡期 家蠶幼蟲에 5% 甕일 분말이 含有된 人工飼料를 利用하여 1, 2, 3, 5ppm의 ecdysterone을 脫皮後 72時間동안 給與한 바 2ppm 添加區에서 體重 및 繭層重이 가장 무거웠고 그 以上の 添加濃度에서는 오히려 體重과 繭層重 增加의 沮害效果를 나타내었다.

2ppm 添加區에서는 體重은 12%, 繭層重은 12.5% 增加를 보였고 全齡期間中 各齡의 前半部에 ecdysterone 2ppm添加의 人工飼料로 누에를 飼育하여 全繭重 6.6% 繭層重 12.9%의 增加를 보였다.

9. 5齡 後半의 ecdysterone 급여는 5齡 幼蟲期間을

20時間 단축시켰고 結果적으로 繭重 및 繭層重을 減少시켰다.

參 考 文 獻

- 赤井弘(1976) 昆蟲超微形態學 pp.95-107 學會出版センター.
- Butenandt A. and Karlson P. (1954) Über die Isolierung eines Metamorphose Hormones der Insekten in Kristallisierter Form. Z. Naturf. 9b, 381-391.
- Chino H., Sakurai S., Ohtaki T., Ikekawa N., Miyazaki H., Ishibashi M., and Abuki H. (1974) Biosynthesis of α -ecdysone by prothoracic glands *in vitro*. Science, Wash. 183, 529-530.
- 福田宗一(1942) Corpora allata 別出蠶兒に於ける絹絲腺の發育, 動雜 54, 11-13.
- Fukuda S. (1944) The hormonal mechanism of larval moulting and metamorphosis in the silkworm. J. Fac. Sci. Tokyo. Imp. Univ. Sec. 4, 477-532.
- Gilgan M.W. and Farquharson T.E. (1973) Paper chromatographic Separation of α -Ecdysone, Ecdysterone, Inokosterone, Makisterone A and Ponasterone A. Steroids, 22, 365.
- 長谷川金祚(1979) 昆蟲變態の生理化學 pp.160-161, 南江堂
- Hikino H., Okuyama T., Jin H. and Takemoto T. (1973) Screening of Japanese Ferns for Phytoecdysones. I. Chem. Pharm. Bull. 21(10) 2292-2302.
- Hikino H., Ohizumi Y. and Takemoto T. (1975) Detoxification mechanism of *Bombyx mori* against exogeneous Phytoecdysone. J. Insect Physiol. 21, 1953~63.
- Huber R. and Hoppe W. (1965) Zur Chemie des Ecdysones. VII. Die Kristall und Molekülstrukturanalyse des Insektenverpuppungshormons Ecdyson mit der automatisierten Faltmolekülmethode.
- Imai S., Fujioka S., Murata E., Sasakawa Y., and Nakanishi K. (1968) The structures of three additional Phytoecdysones from *Podocarpus macrophyllus*, makisterone B,C and D. Tetrahedron Lett., 3387-3890.
- Ito T., Horie Y. and Watanabe K. (1970) Effect of phytoecdysones on the length of the fifth-instar and the quality of cocoons in the silkworm,

- Bombyx mori*. Annot. Zool. Jap. 43, 175-181.
- Jizba J., Herout V. and Sorm F. (1967) Isolation of ecdysterone from *Polypodium vulgare* L. rhizome. Tetrahedron Lett., 18, 1689.
- Kaplanis J.N., Thompson M.J., Robbins W.E., and Bryce B.M. (1967) Insect Hormone: α -ecdysone and 20-hydroxyecdysone in bracken fern. Science, Wash. 157, 1436-1438.
- Karlson P. and Shayaa E. (1964) Der Ecdysontiter während der Insectenentwicklung-I. Eine Method zur Bestimmung des Ecdysongehalts. J. Insect Physiol. 10, 794-804.
- Kimura S. (1974) Relationship between hormone titers and RNA and protein syntheses when the change to the pupal programme occurs in the silk worm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 20, 887-895.
- Kimura S. and Kobayashi M. (1975) Prothoracotropic action of ecdysone analogues in *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 21, 417-421.
- Kobayashi M., Nakanishi K., and Koreeda M. (1967) The moulting hormone activity of ponasterones on *Musca domestica* (Diptera) and *Bombyx mori* (Lepidoptera). Steroid 9, 529-536.
- 宮崎浩, 加藤義郎(1970) 昆蟲變態活性物質の抽出分離法 日本特許 45-13339
- Morohoshi S. and Shibata R. (1976) The control of growth and development in *Bombyx mori* XXXV. Effects of nutrition during larval development on the release of brain hormone. Proc. Japan Acad, 52, 575-578.
- 諸星静次郎 (1979) 蠶の發育生理 pp. 216-232 學會出版センター
- Nakanishi K., Koreeda M., Sasaki S., Chang M.L., and Hsu H.Y. (1966) Insect hormones-I. The structure of ponasterone A, an insect moulting hormone from the leaves of *Podocarpus nakaii* Hay. Chem. Comm. 24, 915-917.
- Nakanishi K., Koreeda M., Chang M.L. and Hsu H.Y. (1968) The structures of Ponasterones B and C. Tetrahedron lett.: 1105-1110.
- Nakanishi K. (1971) The ecdysones. Pure Appl. Chem. 25, 167-195.
- 西村浩 (1949) 家蠶絹絲腺の成長に関する研究 I. 絹絲腺の相對成長, 動雜 58, 225-226.
- Ohtaki T., Milkman R.D., and Williams C.M. (1968) Dynamics of ecdysone secretion and action in the fleshfly *Sarcophaga peregrina*. Biol. Bull., Woods Hole 135, 322-334.
- Ogawa S., Yoshida A. and Katop. (1977) Analytical Steroids on the active constituents from crude drug III. High speed liquid chromatographic determination of ecdysterone and inokosterone in *Achyranthes radix*. Chem. Pharm. Bull. 25(5);904-8.
- Shigematsu H., Moriyama H., and Arai N. (1974) Growth and silk formation of silkworm larvae influenced by phytoecdysones. J. Insect Physiol. 20, 867-875.
- 竹本常松, 小川俊郎, 西本喜重(1967 a) 牛膝より昆蟲變態ホルモンの單離, 藥雜 87, 325-327.
- 竹本常松, 小川俊郎, 西本喜重, 在原重信, 武衛和雄 (1967 b) 生藥および植物の昆蟲變態活性(その 1) 藥雜 87, 1414-1418.
- 竹本常松, 小川俊郎, 西本喜重 (1967 c) 牛膝の成分研究(第 2 報) 昆蟲變態ホルモンの分離 藥雜 87, 1469-1473.
- 竹本常松, 小川俊郎, 西本喜重 (1967 d) 牛膝の成分研究(第 3 報) イノコステロンの構造 藥雜 87, 1474-1477.
- 竹本常松, 小川俊郎, 西本喜重 (1967 e) 牛膝の成分研究(第 4 報) 臺灣産イノコズチから昆蟲變態ホルモンの單離 藥雜 87, 1478-1480.
- 竹本常松, 小川俊郎, 西本喜重, 武衛和雄 (1967 f) 牛膝の成分研究(第 5 報) Ecdysterone および Inokosteroneの昆蟲ホルモン活性 藥雜 87, 1481-1483.
- 竹本常松, 小川俊郎, 守田實, 西本喜重, 堂目孜美暁, 森島惠藏 (1968 a) 牛膝の成分研究(第 6 報) 昆蟲變態ホルモンの定量 藥雜 88, 39-43.
- 竹本常松, 曳野靖子, 神久徳, ヒキノ ヒロシ (1968 b) キャラボクからボナスステロンAの單離 藥雜 88, 358.
- 竹本常松, 小川俊太郎, 西本喜重, 平山隴, 谷口忍(1968 c) 牛膝の成分研究(第 7 報) *Achyranthes*屬および *Cyathula*屬植物中の昆蟲變態活性物質(補遺) 藥雜 88, 1293-1297.
- Takemoto T., Ogawa S., Nishimoto N. (1969) Method for producing inokosterone and isoinokosterone. U.S. patent 3, 433, 814.