

## 털진득찰의 L1210 세포독성물질 Pubetalin의 분리

김 선 희 · 안 병 준  
충남대학교 약학대학

Pubetalin, the Cytotoxic Principle of *Siegesbeckia pubescens* Makino against L1210 Cell

Seon-Hee Kim and Byung-Zun Ahn

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 302-764, Korea

**Abstract**—A cytotoxic sesquiterpene against L1210 cell, named pubetalin, was isolated from the herb of *Siegesbeckia pubescens* Makino. Its structure was identified as 6-formyl-2, 3, 3 $\alpha$ , 4, 5, 8, 9, 11 $\alpha$ -octahydro-10-hydroxymethyl-5-methoxy-3-methylene-2-oxocyclodeca[ $\beta$ ] furan-4-ylester of 2-methyl-2-propenoic acid.

**Keywords**—*Siegesbeckia pubescens* • sesquiterpene • pubetalin • cytotoxic against L1210 cell

털진득찰(*Siegesbeckia pubescens*)은 국화과 식물로서 한방에서는 회첩이라하여 소염제, 강압제로 처방하고 있다. 중국에서 수입하고 있는 회첩은 *S. orientalis*로서 털진득찰과는 그 모양이 다르다. *S. orientalis*는 제주도에서도 자라고 있고 한국명으로는 제주 진득찰이라 부른다.

국내에서는 이 두종의 진득찰은 구별없이 사용되고 있다. 제주 진득찰은 제주도, 홍콩을 포함한 남중국에서 자라며 높이 20~55 cm, 잎 양면에 복모가 있고 잎의 뒷면에 분비선점을 보이고 있는 것이 털진득찰과의 차이이다.<sup>1)</sup> 털진득찰은 한반도의 남부지방과 바닷가에서 자라고 있으며 평균 높이가 1 m에 달한다. 원 줄기와 잎에는 털이 왕성하게 자란다. 털 진득찰로부터는 diterpenoid<sup>2)</sup>, diterpene glycoside<sup>3)</sup>, darutoside<sup>4)</sup>, alkaloid<sup>5)</sup> 등이 분리되어 있고, diterpenoide 성분은 항암,<sup>6)</sup> 항염작용<sup>7)</sup>을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 최근 본 실험실에서도 털진득찰의 에테르 추출물이 L1210세포에 대하여 세포독성을 나타낸다는 사실을 발견하였다.<sup>8)</sup> 저자 등은 털진득찰에 함유되어 있는 그와같은 세포독성물질을 단리하여 구조를 동정하였으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

### 실 험

#### 1. 시약 및 기기

용매류는 국내외의 일급을 사용하였으며, 공업용용매는 3차분별증류하여 사용하였다. Silica gel 60 G(70~230 메쉬 및 230~400 메쉬) 및 precoated silica gel GF254는 Merck사 제품을 사용하였다. 시약류는 일급 및 특급을 사용하였다. NMR은 Varian FT-80 NMR spectrometer를 IR은 Pekin-Elmer Model 783 IR spectrophotometer를 UV/VIS.은 Pye Unicam PU 8800 UV spectrophotometer를 mass spectrum은 Jeol GM X-303 mass spectrometer를 사용하여 측정하였다.

#### 2. L1210세포의 유지 배양 및 세포독성 시험

L1210세포는 Fischer씨 배지(Gibco)에서 1주일에 2회 계대배양하면서 유지하였다. 세포독성의 측정<sup>9)</sup>은 미국 National Cancer Institute의 방법에 따라 행하였다.<sup>10)</sup>

#### 3. 물질의 분리(Fig. 1)

1986년 9월 대전근교에서 직접 채취한 털진득찰을 음건한 후 분쇄하였다. 이 중 5 kg을 취하

여 100 l 크기의 스텐레스 추출기에 넣고 메탄올 35 l씩으로 3회 환류추출 하였다.

여과후 여액을 감압농축하고 여기에 증류수를 가하여 현탁시킨 후 2 l 크기의 percolator에 가하고 석유에테르 2 l씩으로 3회 추출하였다. 수층에 남아있는 석유에테르를 제거한 다음 수층을 분획여두에 옮기고 벤젠 1.2 l씩으로 5회 진탕추출하였다. 합한 벤젠추출액에는 건조용 망초를 가하여 혼든다음 벤젠층을 취하여 증발 건조시켰다.

벤젠 액기스는 14 g씩 달아 silica gel column (70~230 mesh, 지름 6.7×높이 20 cm)에 가하고 벤젠/아세톤(gradient: 5~20% 아세톤)을 용매로 하여 6개의 분획을 얻었다. 이중 분획 4와 5가 세포독성을 나타내었다. 분획 4와 5는 벤젠/아세톤(7/3)의 용매에서 전개시켰을 때 공통 spot의 Rf치가 0.4를 나타내고 요드증기에서 갈색, 50% 황산에서 갈색을 나타내었다. 분획 4와 5를 모아 건조하고 에테르/클로로폼/메탄올(65/30/5)로 된 용매 소량에 녹인 다음 같은 용매로 안정화 시켜둔 silica gel flash column에 가하고 분획하였다. 이 때 7개의 분획이 얻어졌으며 이중 분획 6'가 가장 강한 세포독성을

나타내었다. 이 분획은 위 조건의 TLC상에서 단일 반점을 보였다. 이 분획을 건조하여 건조 물을 메탄올로 포화된 N-hexane에 용해시키고 방치하여 결정을 얻었다. 다시 한번 결정화하여 결정 약 20 mg을 얻었다. 분리한 물질의 silica gel TLC상의 반점은 254 nm의 UV하에서 검은 색, 50% 황산 분무후 가열시 갈색, 과망간산카리시액 분무후 황색, 2,4-dinitrophenylhydrazine 분무후 황색, 그리고 Liebermann-Burchard시액 분무시 갈색을 나타내었다.

UV,  $\lambda$  max(methanol) 215, 220 nm(conjugated aldehyde); IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ : 3550(OH), 1780(five ring lactone), 1725(conjugated C=O), 1690(conjugated C=O) and 1660  $\text{cm}^{-1}$ (C=C);  $^1\text{H-NMR}$  ppm (80 MHz in acetone- $d_6$ ): 3.09(3 H, s, methoxy) 4.04(1 H, dd,  $J=8.2$  Hz, 9-CH), 4.47(2 H, bd, m, 15- $\text{CH}_2$ ), 5.63(2 H, t, 3- $\text{C}_2$ ), 5.71 (2 H, d,  $J=3.1$  Hz, 13- $\text{CH}_2$ ), 6.08(2, d,  $J=3.5$  Hz, 13- $\text{CH}_2$ ), 6.15(2 H, bd, s, 3- $\text{CH}_2$ ). 6.57(1 H, dd,  $J=8, 1$  Hz, 8-CH), 7.02(1 H, dd,  $J=8.9$  Hz, 1-CH), 9.45(1 H, d,  $J=2.0$  Hz, 14-CH); MS,  $m/z$ (rel. int): 376( $\text{M}^+$ ).

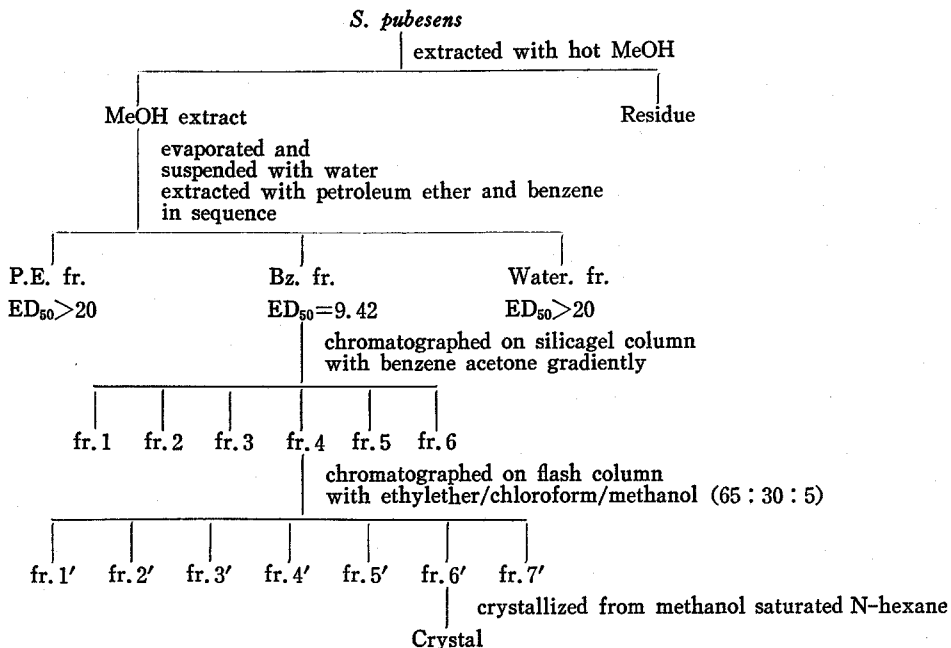


Fig. 1. Extraction and isolation of the cytotoxic substance.

실험결과 및 고찰

털진득찰을 석유에테르, 에테르 및 초산에칠로 차례대로 추출하여 용매분획을 만들어 그 각각에 대하여 L1210 세포에 대한 세포독성을 측정하였다(Tab. I). 세포독성물질은 에테르와 초산에칠층에 축적되었으며 석유에테르나 물층에는 유효한 세포독성을 발견할 수 없었다. 이는 식물중에 극성이 다른 두개 이상의 세포독성물질이 함유되어 있는지, 또는 한 종류의 세포독성물질이 에테르에는 잘 용해되지 않고 초산에칠에 잘 녹는 성질을 갖고 있음을 뜻한다. 이들 작용물질은 벤젠에 가장 잘 용해되었으므로 대량추출을 위한 용매로서 벤젠을 택하였다(Fig. 1). 식물을 메탄올로 추출하고 석유에테르로 탈지한 후 벤젠으로 추출하였다. 이렇게하여 얻은 벤젠엑기스는 L1210 세포에 대하여 좋은 독성을 나타내었다( $ED_{50}=9.42 \mu\text{g/ml}$ ). 이 벤젠층을 silica gel 크로마토그래피하여 얻은 6개의 분획중 분획 4와 5가 세포독성을 나타내었다. 분획 4 및 5는 TLC상에서 공통된 반점을 보이며

분획 4의 그것이 더 크며 세포독성 또한 강하였다. 이 사실로부터 그 공통반점을 나타내는 물질이 세포독성을 가질 것이라는 것은 쉽게 짐작할 수 있다. 이들 두 분획을 합하여 flash column 상에서 다시 분획하여 7개의 2차 분획을 얻었다. 이들중 분획 6'가 가장 강한 작용을 보였다. 이 분획을 진고한 후 메탄을 포함 N-hexane에 용해시켜 재결정 하였다. 동일 조건하에서 다시 재결정하여 순수물질을 얻었다. 이 물질의 L1210 세포에 대한  $ED_{50}$ 값은  $0.318 \mu\text{g/ml}$ 로서 비교물질인 Me-CCNU의  $1.7\sim 7.5 \mu\text{g/ml}$ 보다 더 강한 세포 독성을 보였다.

이 물질은 과망간산카리 시액 분무시 황색을 띄는 것을 보아 terpene류의 물질일 가능성이 있다. 또한 Liebermann-Burchard 반응이 갈색으로 나타나므로 ester 또는 lactone일 수 있으며, 2,4-dinitrophenyl hydrazine과 황색반응을 하는 것으로 미루어 알데히드나 케톤일 수도 있다. 이 물질의 NMR(Fig. 2)상의 9.45 ppm의 피이크를 보고 알데히드의 존재를 쉽게 확인할 수 있다. 이 시그날이  $J=2.0 \text{ Hz}$ 의 doublet인 것으로 보아 four bond coupling을 하고 있음을 알 수 있

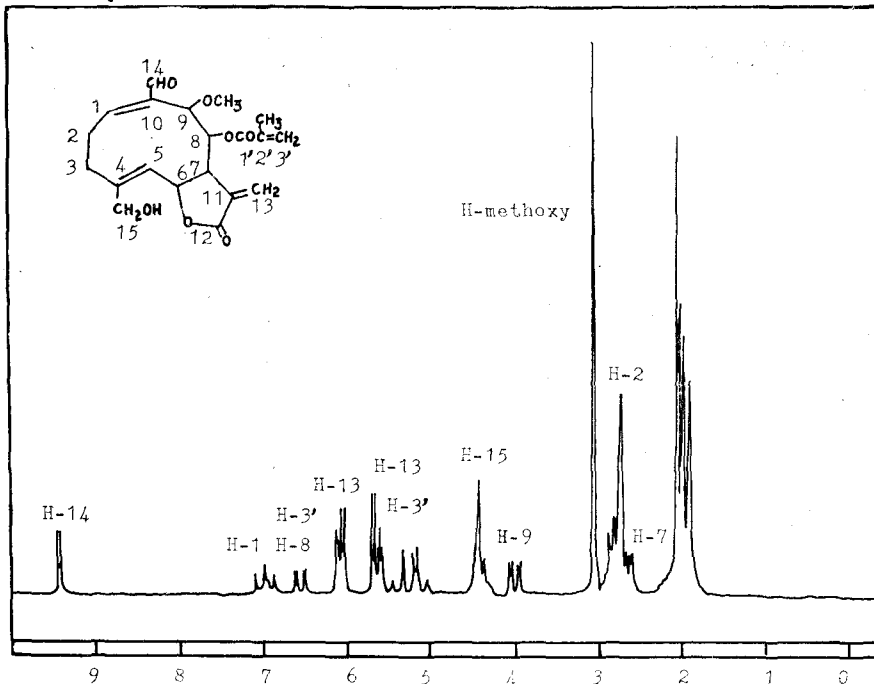
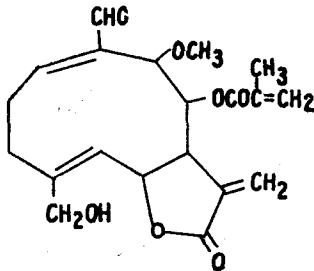


Fig. 2. NMR spectrum of cytotoxic substance.

다. 220 nm의 UV 흡수와 1690 cm<sup>-1</sup>의 IR 흡수를 보면 이는 α,β-unsaturated aldehyde임을 알 수 있다. IR상의 1780과 1725 cm<sup>-1</sup>의 흡수대를 5환 lactone 및 직쇄 ester에 해당한다. <sup>1</sup>H-NMR상의 화학이동 6.1 ppm(d, J=3.5)와 5.7 ppm(d, J=3)이 이루는 quartet는 α,β-unsaturated five ring lactone에 결합되어 있는 전형적인 exomethylene기에 해당한다. 이 불포화상태의 lactone은 UV의 220 nm에서도 확인할 수 있다.

<sup>1</sup>H-NMR상의 화학이동 6.15 ppm과 5.63 ppm을 보면 이는 methacrylate의 CH<sub>2</sub>와 유사하다.<sup>12)</sup> IR의 1725 cm<sup>-1</sup>... 흡수도 이 부분구조의 존재를 증명해주고 있다. 그러므로 이 물질은 ester로서 methacrylate에 해당하는 부분구조를 갖고 있다. 그외에 수산기, 메톡시기 등을 확인할 수 있다.

질량분광의 결과 분자량이 376으로 나타났다. 이상의 결과를 문헌<sup>13-16)</sup>의 그것과 비교한 결과가 세포독성 물질은 2-methyl-propenoic acid의 6-formyl-2, 3, 3α, 4, 5, 8, 9, 11α-octahydro-10-hydroxymethyl-5-methoxy-3-methylene-20-oxocyclodeca<β> furan-4-yl ester와 같았다. 이의 관용명이 제시되어 있지 않았으므로 pubetalin 이라고 명명하였다.



Pubetalin은 Barua<sup>13)</sup> 등이 동속식물인 *S. orientalis*(국명: 제주 진득찰)로 부터 분리하였지만 털진득찰로 부터는 처음 분리된 것이다.

Flash column으로 부터 얻은 다른 분획중에도 약하기는 하지만 세포독성을 나타내는 것들이 있다. 용매분획에서도 이미 시사한바와 같이 털진득찰은 두개 이상의 세포독성물질을 함유하고 있다. 이들은 silica gel상에서 분획 6'와 같은 정척반응을 하는 것으로 보아 서로 유사한 구조를 갖는다고 보아야 한다. 이들을 분리하여 구조와 세포독성간 관계를 연구해볼 가치가 있다

고 생각한다.

결 론

털진득찰(*Siegesbeckia pubescens* Makino)의 벤젠 추출물로부터 마우스의 백혈세포인 L1210 세포에 대하여 세포독성을 보이는 물질을 분리하였다. 물질구조 결정 및 분리과정에서 얻은 몇 가지 결론을 도출한 바 다음과 같다.

1. 털진득찰로 부터 제조한 벤젠추출물은 L1210 세포에 대하여 ED<sub>50</sub>=9.42 μg/ml를 나타내었다. 털진득찰의 항암성 연구에 이 추출물을 직접 사용할 수 있을 정도로 강한 세포독성이다.

2. 벤젠추출물이 함유하는 주된 세포독성물질은 pubetalin(6-formyl-2, 3, 3α, 4, 5, 8, 9, 11α-octahydro-10-hydroxymethyl-5-methoxy-3-methylene-2-oxocyclodeca<β> furan-4-yl ester of 2-methyl-2-propenoic acid)이다. 이 성분은 털진득찰로 부터는 처음 분리된 것이다.

3. Pubetalin의 L1210 세포에 대한 ED<sub>50</sub>=0.318 μg/ml로서 매우 강한 세포독성을 나타내었다.

<1988년 11월 1일 접수: 12월 6일 수리>

문 헌

1. 이창복: 대한식물도감, 향문사, 서울, 762-763 (1985).
2. Kim, J.H.: *Haksurwon Nonmunjip Chayon Kwahak pyon* 12, 185 (1973).
3. Kim, J.H., Han, K.D., Yamasaki, K. and Tanaka, O.: *Phytochemistry*, 18, 894 (1979).
4. Yamasaki, K., Kihara, C., Kasai, R., Tanaka, O., and Kim, J.H.: *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu*. 21st. 504011 (1978) Chemical Abstract, 90-121957, j.
5. Woo, L.K., Yun, H.S., Chi, H.J. and Woo, W. S.: *Seoul Taehakkyo Sangyak Yonguso Opjukjip* 17, 17 (1978).
6. Kim, J.H., Yu, J.C., Chang, I.M., Lee, J.H. and Kim, J.S., *Seoul Taehakkyo Saengyak Yonguso Opjukjip* 19, 73(1980).
7. Han, K.D., Kim, J. H. and Oh, S.J.: Terpenoids,

- Proc, Symp., 17(1974) Chemical Abstract, 84-130259m.
8. Lee, J.H., Kang, S.K., and Ahn, C.Z.: 생약학 회지 17, 286(1986).
  9. Thayer, P.S., Himmelfarb, P. and Watt, G.L.: *Cancer Chemother. Rep.* 2, 1(1971).
  10. National Cancer Institute USA: Cell Culture Technical Procedures (1972).
  11. Still, W. Kahn M. and Mitra: *A. J. Org. Chem.* 43, 2923(1978).
  12. Baruah, R.N., Sharma, R.P., Madhusudanan, K.P., Thyagarajan, G., Herz, W. and Murari, R.: *Phytochemistry* 18, 991(1979).
  13. Barua, R.N., Sharma, R.P., Thyagarajan, G., Herz, W. and Govindan, S.V.: *Phytochemistry* 19, 323(1980).
  14. Herz, W. and Kalyanaman, P.S.: *J. Org. Chem.* 40, 3486(1975).
  15. Herz, W. and Sharma, R.P.: *J. Org. Chem.* 41, 1015(1976).
  16. Bohlmann, F., Miiller, L., Gupta, R.K., King, M. and Robinson, H.: *Phytochemistry* 20, 2233(1981).