

## 인삼중의 세포독성물질 10-Acetyl panaxytriol 의 분리

김신일·이윤희·강규상

한국인삼연구초연연구소

(Received February 16, 1989)

### 10-Acetyl panaxytriol, A new cytotoxic polyacetylene from *Panax ginseng*

Shin Il Kim, You Hui Lee and Kyu Sang Kang

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon 302-345, Korea

**Abstract**—A new polyacetylene compound which has strong cytotoxic activity against L1210 cell, was isolated from Korean ginseng roots. The structure was determined to be heptadeca-1-ene-4,6-diyne-3,9-diol-10-acetate (10-acetyl panaxytriol, ED<sub>50</sub> = 1.2 μg/ml). The cytotoxicities of this compound and acetyl panaxydol lower than their starting substances, panaxytriol and panaxydol. The presence of one for the decreases in the cytotoxicities.

**Keywords** □ polyacetylene compound, cytotoxicity L1210 cell, *panax ginseng* isolation, 10-acetyl panaxytriol.

인삼은 동양에서 질병의 치료와 예방에 민간약으로 쓰여왔고, 고려시대부터 발달한 본초학에 종양치료에 사용되어 왔다는 기록이 있다.<sup>1)</sup> 최근에는 인삼 자체 또는 인삼의 엑기스 수준이나 사포닌 수준에서 항암효과가 인정되고 있는 보고들도 많다. 윤 등<sup>2,3)</sup>은 홍삼엑기스를 장기 경구투여하여 각종 화학적 발암물질에 의한 mouse 및 rat의 종양발생을 저하와 종양증식 억제효과를 병리조직학적 검색을 통하여 확인하였으며, Singh 등<sup>4)</sup>은 인삼이 interferon 생성을 유도하여 자연살세포(NK cell) 활성을 증진한다고 하였다. 인삼이 화학요법제 항암제의 부작용을 방지하는 효과가 있다고 보고한 예는 adriamycin, vincristine 등을 복용함으로써 야기되는 면역기능 저하를 사포닌 분획을 투여함으로써 회복할 수 있다고 보고하고 있다.<sup>5)</sup> Okuda는 간암 환자의 복수액에 있는 암독소물질의 작용을 홍삼이 그 작용에 억제한다고 보고하였다.<sup>6)</sup>

순수한 사포닌 단일성분으로 항암효과를 보고한 예도 있다. 인삼사포닌중의 한 성분인 ginsenoside Rh<sub>1</sub>과 Rh<sub>2</sub>이 B-16 cell의 melanogenesis를 증가

시키며,<sup>7,8)</sup> 또한 ginsenoside Rh<sub>2</sub>는 HeLa cell 등에 세포 독성이 있음을 보고하였다.<sup>9)</sup> 비사포닌계 성분으로 항암효과를 보고한 예로서 우 등<sup>10)</sup>은 alkaloid 성분이 항암작용이 있다고 보고하였고, Murata<sup>11)</sup>는 임상적 유효성을 입증한 자료로서 prostisol을 각종 암환자(위암, 대장암, 췌장암 등)에 3개월 이상 복용시킨 결과 약 70%가 개선효과가 있다고 보고하였다.

인삼의 지용성 성분에서 항암작용이 있다는 보고도 많다. 황 등<sup>12)</sup>은 인삼의 석유에틸 추출물의 부분 정제된 분획 PGX가 L1210, L5178Y, Sarcoma 180과 같은 동물암 세포증식을 억제함은 물론 인체 장암세포 HRT-18, HCT-48과 HT-29 세포의 증식을 억제한다고 보고하였다. 윤 등<sup>13)</sup>은 인삼의 석유에틸 분획이 L5178Y와 Sarcoma 180 세포에 세포독성이 있음을 발견하고 세포독성과 고분자(DNA, RNA, Protein) 합성 억제작용과 관련성을 검토하였다.

공 등<sup>14)</sup>도 Sarcoma 180 세포로 이식된 ICR mouse에 이 분획의 alkaloid fraction이 치료효

과가 있다고 하였으며, 류 등<sup>15)</sup> 역시 L1210 세포에 세포독성이 있다고 보고하였다. 임 등<sup>16)</sup>은 암세포와 정상세포의 일부 핵산대사에 관여하는 효소인 NDPase의 활성을 관찰하여 인삼의 지용성 성분과 세포증식 억제작용과의 관계를 검토하였다.

이와 같은 사실은 인삼의 지용성 분획중에서 항암 물질이 있음을 의미한다. 이 활성성분들을 규명하고자 한 연구결과로서 panaxydol(1)이 L1210 세포에 세포독성이 있다는 보고가 처음으로 발표되었다.<sup>17)</sup> 그후 panaxynol(2),<sup>18)</sup> panaxytriol(3),<sup>18)</sup> heptadeca-1, 8-t-diene-4, 6-diyne-3, 10-diol(4),<sup>19)</sup> acetyl panaxydol(5),<sup>20)</sup> panaxydol chlorhydrine(6)<sup>20)</sup>과 panaxyne(7)<sup>21)</sup>도 L1210 세포에 세포독성이 있음이 최근에 보고되었다. Katano 등<sup>22)</sup>은 panaxytriol이 몇종류의 암세포증식 억제 작용이 있다고 보고하였으며, Yoshida 등<sup>23)</sup>은 인삼 callus의 지용성 분획중에서 panaxacol과 dihydropanaxacol을 분리하여 Yoshida Sarcoma 세포의 증식억제효과가 있다고 하였다.

본 연구는 인삼의 지용성 분획중에서 L1210 cell에 대한 세포독성물질을 분리하는 과정의 일환으로 앞에서 언급한 polyacetylene 화합물 이외의 새로운 polyne를 분리하여 세포독성을 비교하였다.

## 실험방법

### 1. 인삼시료

본 실험에 사용한 인삼은 한국인삼연초연구소 경작시험장에서 87년 10월에 채취한 수삼으로 만든 백삼과 홍삼이며, 분말화하여 사용하였다.

### 2. 시약 및 기기

Column chromatography에는 silica gel 60(Merck, 70-230mesh)을 사용하였고, 용매류는 인삼추출의 경우 EP 급을 사용하였고 나머지는 GR 급을 사용하였다. HPLC에 사용된 용매는 Baker사 제품 HPLC 용을 사용하였다. 구조확인에 사용한 기기는 다음과 같다.

UV:Pye Unicam Model PU8800 Spectrophotometer

IR:Perkin-Elmer Model 599B Spectrophotometer

GC/MS:Varian Model MAT 212 GC/MS

Spectrometer

HPLC:Waters Model 244 Equipped with Model 6000 Pump

<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR:Bruker AM300 TMS

### 3. L1210 세포에 대한 세포독성시험

L1210 세포의 유지배양 및 이에 대한 작용물질의 ED<sub>50</sub>값의 측정에는 이 등<sup>24)</sup>의 방법에 의하였다.

### 4. 새로운 활성물질(compound 8) 분리

건조한 인삼 5kg을 분말화하여 석유 ether(pet. E) 20L을 가하고 상온에서 48시간 추출한 후 여과하였다. 잔사는 다시 똑같은 방법으로 2회 더 실시하여 여액을 합친다. 질소가스를 통하면서 용매를 저온하에서 날려보내고 잔사 40.2g을 얻었다. 이를 silica gel column(3×40cm)에서 석유 ether와 ethyl ether(E. E)의 비율을 바꾸면서 6개의 분획을 얻었다. 각 fraction의 세포독성을 측정하면서 semi preparative HPLC를 반복 실시하여 세포독성이 있는 활성성분을 chromatogram에 한개의 peak가 나올 때까지 순수하게 분리하였다. 이때의 분리조건은 다음과 같다.

Column:Allteck-NH<sub>2</sub>(10mm×30cm)

Solvent system:hexane/isopropyl alcohol(3:1)

Flow rate:3ml/min

Detector:UV 254nm

**Compound 8(10-acetyl panaxytriol)**-미황색의 액체, UV( $\lambda_{max}^{EtOH}$ ) 228, 240, 253. IR( $\nu_{max}$ , cm<sup>-1</sup>); 3400(OH), 1735(C=O), 2260(C≡C), 1640(C=C). <sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ppm);5.95(ddd, 16, 10, 5Hz, C-2), 5.45(dd, 16, 2, 1Hz, C-1a), 5.25(ddd, 10, 2, 1Hz, C-1b), 4.92(br, C-10), 4.90(br, C-3), 3.85(br, C-9), 2.58(dd, 16, 5Hz, C-8a), 2.50(dd, 16, 7Hz, C-8b), 2.12(s, C-COCH<sub>3</sub>), 0.89(t, C-17). MS m/z(rel %);149(100), 167(45), 57(38), 280(26), 71(26), 113(15), 207(6).

### 5. Panaxytriol triacetate(9) 제조

Pyridine 0.3ml에 panaxytriol 150mg과 10-acetyl panaxytriol 200mg을 따로 반응 플라스크에 넣고 여기에 acetic anhydride 0.3ml을 서서히 가한다. 반응혼합물을 교반하면서 하룻밤 방치한다. 반응혼합물에 얼음물 5ml를 가한다. ethyl ether 5ml로 3회 추출하고 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 탈수한 다음 ethyl ether를 날려 보냈다. 잔류물은 활성물질

분리때와 마찬가지로 semi preparative HPLC 로 순수분리 정제하여 각각 100, 85mg의 미황색 유상 물질을 얻었다.

**Compound 9(panaxytriol triacetate)**—미황색의 액체, UV( $\lambda_{max}^{EtOH}$  nm) 228, 240, 255. IR( $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ ) ; 1750(C=O), 2260(C=C), 1640(C=C).  $^1H$ -NMR( $CDCl_3$ ,  $\delta$ ppm) ; 5.90(m, C-3), 5.88(m, C-2), 5.52(ddd, 16, 2, 1Hz, C-1a), 5.35(ddd, 10, 2, 1Hz, C-1b), 5.08(m, C-9 & 10), 2.65(dd, 16, 5Hz, C-8a), 2.55(dd, 16, 7Hz, C-8b), 2.12(two, s, C-COCH<sub>3</sub>), 0.89(t, C-17)

### 결과 및 고찰

새로운 항암성분(8)의 분리는 인삼의 석유 ether 추출물을 Silica gel column(Pet. E: E. E., gradient)을 사용하여 6개의 분획으로 나누었을 경우 5번째 분획중에서 heptadeca-1, 8-t-diene-4, 6-diyne-3, 10-diol와 함께 분리할 수 있었다. 이 물질의 구조는 UV와 IR data로 이미 알려진 polyacetylene 화합물과 비교함으로써 관능기를 쉽

게 확인할 수 있었다. 물질 (8)의 UV spectrum에서 228, 240, 253nm의 흡수 peak들은 straight chain의 conjugated diyne(-C≡C-C≡C-) 구조가 있음을 나타내고, IR spectrum에서 3400 $cm^{-1}$ 은 hydroxy, 1735 $cm^{-1}$ 는 ester, 2260과 1640 $cm^{-1}$ 의 좁고 예리한 특징적 peak는 삼중결합과 이중결합에 의한 것이다.

이러한 사실들은  $^1H$ -NMR spectrum(Fig. 1)에서 확인될 수 있었다. 물질 8의  $^1H$ -NMR spectrum은 Fig. 1-c와 같다. 말단 allyl alcohol proton의 chemical shift는 panaxytriol(Fig. 1-a)과 마찬가지로 5.90(ddd, C-2), 5.45(ddd, C-1a), 5.25(ddd, C-1b), 4.90(broad, C-3)이었다. 4.90ppm의 doublet와 4.92ppm의 sextet(C-10)는 서로 중복되어 multiplet으로 나타나는데 이것의 면적은 2개의 proton에 해당된다. 즉, panaxytriol의 10번 탄소의 hydroxy가 acetyl화됨으로서 C10의 proton이 약 1.3ppm 정도 low field 쪽으로 이동하였음을 쉽게 알 수 있었다. 2.45-2.60ppm의 multiplet으로 C8에 있는 두 proton이 자기장내에서 동일한 환경에 있지 않음을 쉽게

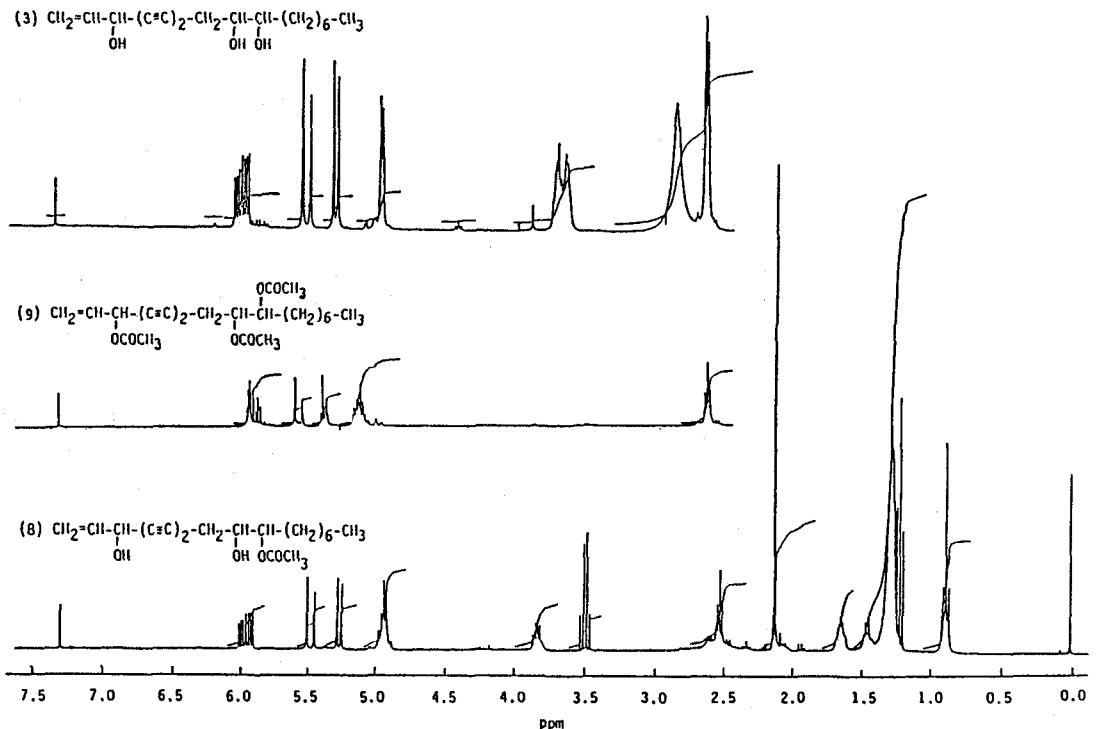
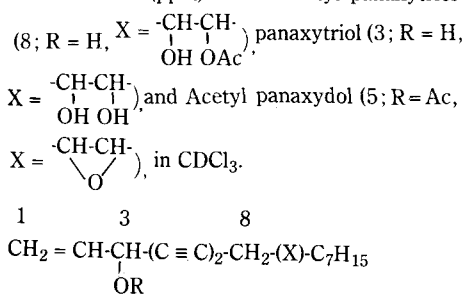


Fig 1—300MHz  $^1H$ -NMR spectrum of panaxytriol(3), panaxytriol triacetate(9) and 10-acetyl panaxytriol(8).

알 수 있다. 이것은 panaxydol의 butyleneoxide protons(-CH<sub>2</sub>-CH-CH-CH<sub>2</sub>-)이 이와 같은 환경을 나타내며, panaxydol chlorohydrine<sup>20)</sup>이나 물질 (8)을 acetylation (Fig. 1-b)함으로서도 나타났다. 이는 구조자체가 epoxy 화나 acetyl 화 됨으로서 부분적으로 경직된 상태가 되기 때문이라 생각된다. 3.85ppm의 C9 proton이 주위의 proton과 coupling하여 sextet로 나타나 있고, 2.10ppm의 singlet는 acetyl기에 의한 것이며, 그 이외의 pattern은 panaxytriol과 거의 같다.

Panaxytriol 이나 10-acetyl panaxytriol의

Table I—<sup>13</sup>C-NMR data(ppm) for 10-Acetyl panaxytriol



Carbon No.	8	3	5
1	117.0	117.1	119.5
2	136.0	136.0	132.1
3	63.3	63.3	64.4
4	75.4	74.8	71.4
5	70.4	70.8	—
6	65.8	—	—
7	76.6	—	—
8	25.0	24.9	19.4
9	73.6	72.1	53.5
10	74.9	78.1	56.9
11	31.7	31.8	27.5
12	25.2	25.6	26.4
13	29.3	29.5	29.4
14	29.1	29.2	29.1
15	30.3	33.4	31.7
16	22.6	22.6	22.6
17	14.0	14.1	14.1
Acetyl			
C = O	171.0	—	169.4
-CH <sub>3</sub>	21.0	—	20.9

hydroxy기를 모두 acetyl 화 함으로서 생성된 두 물질 (9)의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 Fig. 1-b와 같이 꼭 같았다. 5.92ppm의 peak는 C3 proton이 acetylation에 의하여 약 1.0ppm 정도 5.10ppm의 peak는 9, 10번 탄소의 proton들이 서로 인접한 acetyl기에 의하여 1.3-1.4ppm 정도 low field 쪽으로 shift 된 것을 알 수 있었다.

또한 acetyl 화 된 이 두 물질을 HPLC로 비교한 결과 같은 retention time에서 확인할 수 있었다(Column; Allteck-NH<sub>2</sub>, Solvent; Hexane/Isopropyl alcohol, 3:1, Detector; UV 254 nm). <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 특징적인 chemical shift는 이 물질을 panaxytriol과 acetyl panaxydol로 비교함으로서 확인할 수 있었다 (Table I).

113.0(C<sub>1</sub>)과 136.0(C<sub>2</sub>)ppm의 peak는 전형적인 terminal vinyl에 의한 이며 73.6과 74.9ppm은 C<sub>9</sub>와 C<sub>10</sub>의 hydroxy group에 의한 것이다. 171.0과 21.0ppm은 각각 acety group의 C=O와 -CH<sub>3</sub>에 해당된 것이며, 이외의 탄소는 panaxytriol과 acetyl panaxydol의 해당 탄소와 거의 같음을 알 수 있었다. 물질 8의 EI mass spectrum을 관찰한 결과 parent peak는 나타나지 않았으나 CH<sub>2</sub>=CH- $\begin{matrix} \text{CH} \\ | \\ \text{OH} \end{matrix}$ -(C=C)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- $\begin{matrix} \text{CH} \\ | \\ \text{OH} \end{matrix}$  (149m/z)가 base peak로 나타남으로서 acetyl기가 C<sub>9</sub>와 C<sub>10</sub>중의 C<sub>10</sub>에 위치함을 알 수가 있었다.

이상의 결과로서 이 물질 (8)이 heptadeca-1-ene-4, 6-diyne-3, 9-diol-10-acetate (10-acetyl panaxytriol)임을 확인할 수 있었다. 이 물질의 ED<sub>50</sub>값을 이미 밝혀진 화합물들과 비교하면 Table II와 같다.

*In vitro* 실험에서 L1210 세포에 대한 세포독성을 보면 인삼에서 분리된 polyacetylene계가 methyl CCNU (ED<sub>50</sub>=1.7-7.7μg/ml)에 비하면 상당히 강한 세포독성이 있음을 알 수 있으며 이 중에서 panaxydol이 다른 polyacetylene 화합물보다 약 10-40배 강한 것으로 나타났다. 이러한 세포독성은 polyacetylene계 화합물의 구조적인 특성 즉, 1-heptene-4, 6-diyne-3-ol의 기본골격과 입체 구조적인 특이성에 의한 것임을 이미 알려진 바 있다.<sup>26)</sup> 그러나 panaxydol과 panaxytriol에 하나

**Table II**—Polyacetylene compounds in Panax ginseng root and their ED<sub>50</sub> values on L1210 cell.

$n-C_7H_{15}(X)(C \equiv C)_2-CH-CH = CH_2$   
OR

Compounds	R	(X)	ED <sub>50</sub> (ug/ml)
Panaxydol (1)	H	$\begin{array}{c} -CH-CH-CH_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \quad O \end{array}$	0.03
Panaxynol (2)	H	$-CH = CH-CH_2$	0.38
Panaxytriol (3)	H	$\begin{array}{c} -CH-CH-CH_2 \\   \quad   \\ OH \quad OH \end{array}$	0.42
Heptadeca-1,8-t- dien-4,6-diyn- 3,10-diol (4)	H	$\begin{array}{c} -CH-CH = CH- \\   \\ OH \end{array}$	0.30
Acetyl panaxydol (5)	COCH <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} -CH-CH-CH_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \quad O \end{array}$	0.52
Panaxydol chlor- hydrin (6)	H	$\begin{array}{c} -CH-CH-CH_2 \\   \quad   \\ Cl \quad OH \end{array}$	0.50
10-acetyl panaxytriol (8)	H	$\begin{array}{c} -CH-CH-CH_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \quad OCOCH_3 \quad OH \end{array}$	1.20
Tetradeca- 13-en-1,3-diyn-6,7- diol (panaxyne) (7)	H-(C≡C) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	$\begin{array}{c} -CH-CH-(CH)_6-CH = CH_2 \\   \quad   \\ OH \quad OH \end{array}$	11.0

의 acetyl기가 도입됨으로서 그 독성이 15-25배 정도 감소한다는 사실은 polyacetylene 화합물의 강력한 세포독성에 대한 안전성을 고려한다면 흥미있는 사실이다.

문 헌

- 1) 홍사악, 임정규, 박찬웅, 차인준 : 인삼의 약리작용. 고려인삼학회지 **3**, 66(1979).
- 2) Yun, T.K., Yun, Y.S. and Han, I.W.: Study of tumor inhibitory effect of red ginseng in mice and rat exposed to various chemical carcinogens. Proc. 3rd Int. Ginseng Symp. 87 (1980).
- 3) 윤연숙, 조성기, 문혜선, 김영주, 오영환, 윤택구 : 홍삼이 urethane 및 benzo(a)pyrene에 의하여 폐선종이 유발된 마우스에서 natural killer 세포활성도에 미치는 영향. 한국생화학회지 **19**, 31 (1985).

- 4) Singh, V.K., George, C.S., Singh, N., Agarwal, S.S. and Gupta, B.M.: Combined treatment of mice with Panax ginseng extract and interferon inducer. *Planta Medica.* **47**, 234 (1983).
- 5) 김병수, 이원영, 김주덕, 조영동 : 인삼 특수성분에 의한 항암요법의 복합적 효능점검. 인삼연구보고서, 한국인삼연구연구소 (1984).
- 6) Okuda, H., Masuno, H. and Lee, S.J.: Effect & red ginseng powder on lypolytic and toxohormone-L from cancerous ascites fluid. Proc. 4th Int. Ginseng Symp. 145 (1984).
- 7) Odashima, S., Ohta, T., Kohno, H., Matsuda, T., Kitagawa, I., Abe, H. and Arichi, S.: Control of phenotypic expression of cultured B16 melanoma cells by plant glycosides. *Cancer Research* **45**, 2781 (1985).
- 8) Ota, T., Yamamoto, K. F., Zong, Z., Yamazaki, M., Odashima, S., Kitagawa, I., Abe, H. and Arichi, S.: Plant-glycoside modulation of cell surface related to control of differentiation in cultured B16 melanoma cells. *Cancer Research* **47**, 3863 (1987).
- 9) Kitagawa, I.: Chemical studies on crude drug processing red ginseng and white ginseng. Proc. 4th Int. Ginseng Symp. 159 (1984).
- 10) Woo, L.K., Nakamura, Y. and Donati, L.: *Arch. Ital. Pathol. Clin. Tumori.* **8**, 53 (1965).
- 11) Murata, I. and Hirono, T.: Clinical and immunological observation of prostisol for cancer patient. Metabolism and Diseases, Proc. Symp. Waken Yaku 10 (extraed), 601 (1973).
- 12) 이선희, 황우익 : 고려인삼중 petroleum ether 추출물의 인체 암세포 증식 억제효과. 고려인삼학회지 **10**, 141(1986).
- 13) 윤연숙, 이세영, 김병수, 윤택구 : 인삼의 세포독성 분획의 작용기작에 관한 연구 (1). 한국생화학회지 **13**, 203(1980).
- 14) Gong, T.H. and Lee, W.Y.: Effect of anti-cancer of Korean ginseng ext. prep. on mice sarcoma 180. *Proc. Jap. Med. Symp.* (1979).
- 15) Ryu, S.H., Moon, K.H. and Park, M.Y.: Primary screening for growth inhibitors of L1210 cells from oriental herbs. *Kor. J. Appl. Microbial. Bioeng.* **10**, 53 (1982).
- 16) 임미재, 민인숙, 임경희, 황우익 : 인삼성분의 항암 작용과 암세포 및 정상세포내의 NDPase 활성에 관한 연구. 인간과학 **3**, 164(1979).

- 17) Ahn, B.Z. and Kim, S.I.: Panaxydol, the cytotoxic principle of the Panax ginseng root against L1210 cell. *Archives of Pharmacol Res.* **8**, 283 (1985).
- 18) Ahn, B.Z. and Kim, S.I.: Relation between structure and cytotoxic activity of panaxydol analogues against L1210 cells, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **321**, 61 (1988).
- 19) Ahn, B.Z. and Kim, S.I.: 1,8-t-Heptadecadiene-4,6-diyne-3,10-diol, a further cytotoxic substance from Korean ginseng. *Planta Medica* **54**, 183 (1988).
- 20) Ahn, B.Z., Kim, S.I., Lee, Y.H., Kang, K.S. and Kim, Y.S.: The action of cytotoxic components of Korean ginseng and their structure-activity relationship. *Proc. 5th Int. Ginseng Sym.* (1988).
- 21) Kim, S.I., Kang, K.S., Kim, H.Y. and Ahn, B.Z.: Panaxyne, A new polyynes from Panax ginseng which has cytotoxicity against L1210. *The Natural Products*. in press (1989).
- 22) Katano, M., Yamamoto, H. and Matsunaga, H.: Antitumor substance from Korean red ginseng powder. *Proc. 5th Int. Ginseng Sym.* (1988).
- 23) Fujimoto, Y. and Satoh, M.: Acetylenes from the callus of Panax ginseng. *Phytochemistry* **26**, 2850 (1987).
- 24) 이정형, 강석균, 안병준: 한약재 및 민간약의 L1210 세포에 대한 세포독성. *한국생약회지* **17**, 286 (1986).
- 25) NCI Manual, Cell Culture Technical Procedure XX. 100-XX. 800.
- 26) 김신일: 인삼의 항암성분에 관한 연구. 박사학위논문, 충남대학교 (1988).