

산국으로부터 분리한 Sesquiterpene Lactones의 흰쥐 복수암에 대한 효과

남상해[†] · 최상도 · 최진상 · 장대식* · 최상욱* · 양민석*

진주산업대학교 식품가공학과

*경상대학교 농화학과

Effects of Sesquiterpene Lactones Isolated from *Chrysanthemum boreale* M. against Sarcoma180 Implanted in ICR Mice

Sang-Hae Nam[†], Sang-Do Choi, Jine-Shang Choi, Dae-Sik Jang*,
Sang-Uk Choi* and Min-Suk Yang*

Dept. of Food Processing, Chinju National University, Chinju 660-758, Korea

*Dept. of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

Abstract

For the investigation of antitumor agents, two kinds of sesquiterpene lactones were isolated and purified from *Chrysanthemum boreale* M. and designated as Compound I and II. And then *in vivo* antitumor test of the sesquiterpene lactones was carried out against ICR mice. *In vivo* test against Sarcoma180 implanted ICR mice, life prolongation effects of Compound I and II were showed as 143% and 134% at the dose of 10mg/kg, respectively. Besides, at the tested group mixed Compound I and II each 1mg/kg was showed rather high life prolongation effect as 158%.

Key words: sesquiterpene lactones, antitumor agents, life prolongation effect

서 론

산국(*Chrysanthemum boreale* M.)은 국화과에 속하는 야생국화로서 9~11월에 전국의 산야에 자생하며 1~1.5cm 크기의 노란색 꽃을 피우며, 일명 야국이라고 하는 다년생 초본이다(1,2). 현재까지 알려진 산국에 대한 성분연구로는 borneol, DL-camphor, pinenene, limonene, α -thujone, luteolin, camphene, chrysanthenone, α , β -terpinene 등의 essential oil(1,3-6)과 acacetin-7-rhamnoglucoside, luteoline-7-o- β -D-glucopyranoside, 2,2,4-trimethylcyclohexane(3)-1-carboxylic acid, buddleoglucoside, apigenin glucoside 등의 배당체(7,8), guaianolides, arteglinin A, angeloylajadin, yehuhua lactone 등의 sesquiterpenoids(9-11) 그리고 chrysanthemim(9,12,13) 등이 보고되어 있다. 산국이 우리나라에서 민간요법에 이용되는 것은 종기의 통증을 멎게 하는데 앞을 찐 즙이 효과가 있다고 하며, 주독을 푸는데는 꽃을 그늘에 말렸다가 한술갈 정도를 뜨거운 물에 넣어 한참 후에 마신다고 전해 내려오고 있다. 또한 최근

에 시판되고 있는, 국화주는 자양강장제 또는 두통치료제로 효과가 있다고 하여 예로부터 가정에서 상비약처럼 즐겨 담그던 술이었다고 한다(3,14,15). 현대의학적 연구로도 산국꽃의 추출물에는 중추신경의 진정작용이나, 혈압강하작용, 결핵균 및 각종 바이러스에 대한 억제효과가 있다는 것이 증명되었고(9,14), 폐암과 간암에도 효과가 있는 것으로 알려져 있으나(16), 그 성분에 대한 명확한 연구가 이루어지지 않고 있으므로, 우리는 산국에 대하여 연구를 시작하여 암세포독성, 항균성 등에 대한 결과는 이미 보고하였고(17,18), 일부 성분의 구조도 밝힌 바 있다(19). 여기서는 산국 꽃으로부터 2종의 sesquiterpene lactones을 분리정제하였으며, 이의 동물실험결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

생약재료

산국은 1993~1994년에 걸쳐서 9~10월경에 채취

[†]To whom all correspondence should be addressed

하였으며, 채취장소는 진주시 나동면, 함양군 안의면, 마천면 등지에서 채취하였으며, 이 중에서 꽃만 분리하여 음건한 후 사용하였다(dry wt. 14.8kg).

실험동물 및 암종

ICR female mouse를 구입(life science co.)하였으며, 구입당시 체중은 대부분 15g 정도였다. 구입일로부터 1주일 정도 사육장에서 적응기간을 둔 후, 생육이 왕성할 때 실험에 사용하였다. 이때 mouse의 체중은 20~25g 정도의 것을 대조군 및 각 실험군당 10마리씩을 사용하였는데 사료에 항생제는 전혀 첨가하지 않았고 자유로이 물과 사료를 먹게 하였다. 또한 생육실은 하루에 12시간을 조명하고 온도는 20~25°C, 습도는 50~60%가 되도록 조절하였다.

실험에 사용한 암종은 Sarcoma180(mouse ascites cell)로서 mouse의 복강내에 1×10^6 cells/ml을 주사하고 1주일 간격으로 복수를 채취하여 계대보존하면서 사용하였다.

Sesquiterpene lactones의 추출 및 정제

산국으로부터 methanol 추출물을 얻고 이를 용매분획하여 L1210, K562, A549 등의 암세포에 대한 세포독성실험을 수행한 바 있다(17). 그 결과에 따라 세포독성을 나타내는 물질을 분리정제한 결과 sesquiterpene lactones의 물질임을 알게 되었다. 따라서 산국으로부터 sesquiterpene lactones을 직접 추출하기 위하여 Herz and Högenauer의 방법(20)에 따라 Fig. 1과 같이 분리하였다.

물질의 순도확인

정제한 Compound I 과 II를 HPLC로서 순도검정을 하였다. 즉 Compound I과 II를 Table 1과 같은 분석조건으로 분리하였으며, 분리된 chromatogram의 총면적에 대한 Compound I과 II에 대한 면적의 비로서 결정하였다.

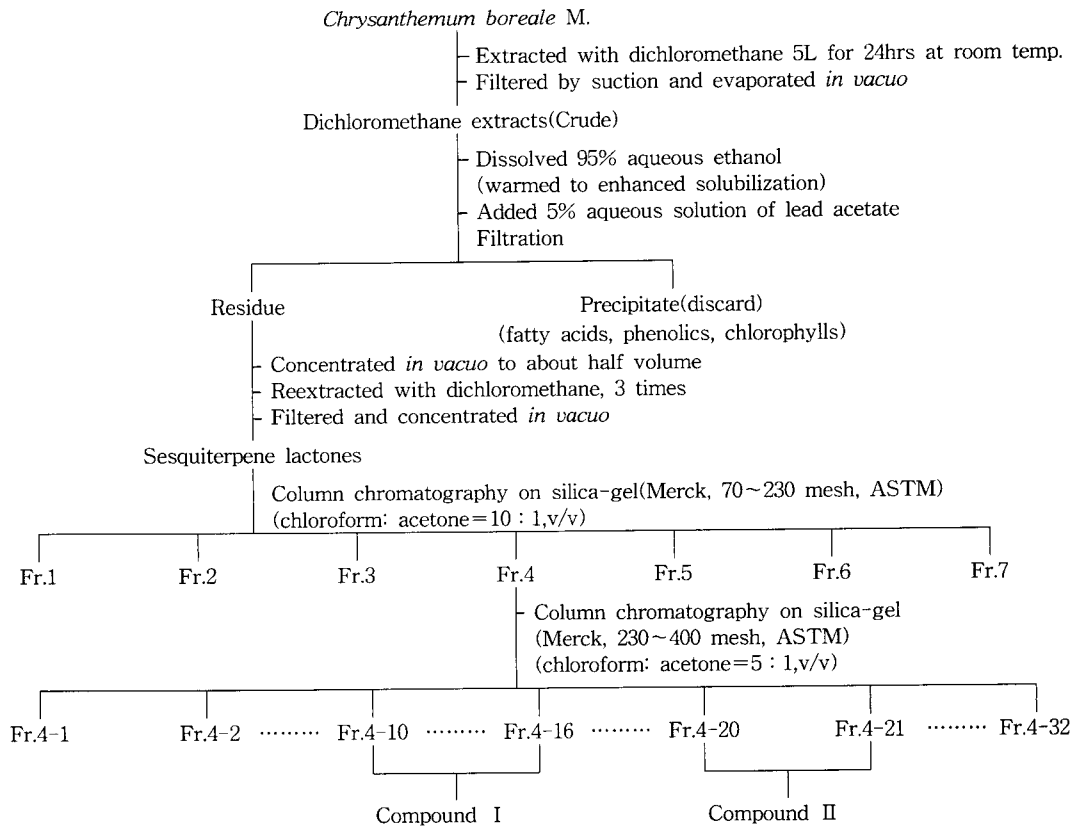


Fig. 1. The procedure of sesquiterpene lactones isolation and purification from *Chrysanthemum boreale* M. by Herz and Högenauer's method.

Table 1. Analysis conditions of sesquiterpene lactones with HPLC

Instrument	LKB LCC2252
Column	Shimpak CLC ODS(MØ 4.6×250mm)
Mobile phase	MeOH : Water=65 : 35,v/v
Flow rate	1ml/min
Detector	UV 210nm

동물실험

ICR계 mouse의 복강내에서 7일간 배양된 Sarcoma180 세포를 채취하기 위하여 mouse의 후두부에 충격을 가하여 급사시킨 후, 복부를 절개하여 복수를 멸균된 피펫으로 채취하였다. 여기에 빙냉 멸균 potassium buffered saline(PBS ; KCl 0.20g, KH₂PO₄ 0.20g, NaCl 8.00g, Na₂HPO₄·7H₂O 2.16g, final volume 1L, pH 7.2)을 가해 1500rpm에서 5분간 원심분리하여 침전된 세포를 분리하였으며, 최종적으로 1×10⁷cells/ml이 되도록 세포현탁액을 만들고, 복수암을 유발시키기 위해서 실험동물의 복강내에 치사량(1×10⁶cells/ml)에 해당하는 세포현탁액 0.1ml씩을 주사하였다. 실험약물은 Compound I 과 II로서 Table 2와 같이 4가지의 농도로 구분하여 10% DMSO(dimethyl sulfoxide) 용액에 용해시켜 암세포 이식 24시간 후부터 매일 1회씩 0.1~10mg/kg(2~200µg/mouse)씩을 5일간 복강내에 주사하였다.

항암효과의 평가

항암효과는 대조군의 평균수명에 대한 시험군의 평균수명(T/C)을 백분율로 계산하였으며, 실험결과에 대하여 극히 크거나 작은 값은 dangerous data로 판정하였고, Smirnov의 기각검정법을 적용하여 통계해석하기 전에 위험율 10%에서 제거하였으며(21), 결과치가 125% 이상일때에 유효하다고 판정하였다.

$$\text{Life prolongation ratio} \left(\frac{T}{C}, \% \right)$$

$$= \frac{\text{Average survival days of test group}(T)}{\text{Average survival days of control group}(C)} \times 100$$

결과 및 고찰**물질의 확인**

산국으로부터 분리 정제한 2종의 sesquiterpene lactones의 순도를 HPLC로서 확인해 본 결과 Compound I은 보유시간(retention time) 9.24min에서 나타났으며 순도는 99.2%였다. 그리고 Compound II는 보유시간 23.84min에서 분리되었으며 순도는 97.2%로 2종의 물질 모두 상당히 높은 순도까지 정제되었음을 알 수 있었다. 또한 이 물질들의 구조를 밝혀본 결과 다음과 같다.

Compound I : C₁₇H₂₂O₅(M.W. 306), m.p. 184~186°C,

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3} = 235\text{nm}, [\alpha]_{\text{D}}^{\text{CHCl}_3} = +95.2^\circ$$

Compound II : C₃₂H₄₀O₉(M.W. 568), m.p. 197~200°C,

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3} = 240\text{nm},$$

동물실험

산국으로부터 분리한 sesquiterpene lactones(Compound I & II)를 Sarcoma180 mouse ascites에 감염된 ICR mouse에 대한 동물실험을 수행한 결과는 Table 3과 같다.

실험 결과, 모든 실험군에서 대조군에 비하여 평균 생존일수가 긴 것으로 보아서 본 실험에 적용한 sesquiterpene lactones의 급성독성은 거의 없는 것으로 생각되었다. 그리고 Compound I의 경우에 비교적 많은 양의 약물을 투여한 C1-100과 C1-200에서는 각각 129%와 143%, Compound II의 경우에는 C2-200에서 134%

Table 2. Preparation of samples used *in vivo* test against ICR mice

Test groups	Dose	Remarks
	(mg/kg)/(µg/mouse)	
C1-200	10 /200	Compound I
C1-100	5 /100	
C1-20	1 / 20	
C1-2	0.1/ 2	
C2-200	10 /200	Compound II
C2-100	5 /100	
C2-20	1 / 20	
C2-2	0.1/ 2	
(C1-10)+(C2-10)	1 / 20	Compound I +Compound II
Control	10% DMSO	

All samples were dissolved in 10% DMSO

Table 3. Antitumor activities of sesquiterpene lactones isolated from *Chrysanthemum boreale* M. against Sarcoma 180 implanted in ICR mice

Test groups	Average survival days	Evaluations(%) (test group/control group)
C1-200	20.2	143
C1-100	18.3	129
C1-20	17.0	120
C1-2	17.5	124
C2-200	19.0	134
C2-100	15.1	107
C2-20	16.7	118
C2-2	14.6	103
(C1-10)+(C2-10)	22.3	158
Control	14.1	100

의 수명연장효과가 나타나 mouse ascites에 항암효과가 있는 것으로 나타났다. 그러나 Compound I 과 II를 10 μ g/mouse씩 섞어서 투여한 C1-10+C2-10에서 158%로서 훨씬 높은 항암효과를 나타내었다. 한편 산국의 경우에는 whole plant에서의 methanol 추출물의 ddD계 mouse에 대한 동물실험에서 Sarcoma180, Leukemia SN36, Ehrlich ascites carcinoma 그리고 HeLa-S3에 대하여 각각 122.2, 113.6, 109.0, 105.0%의 수명연장효과가 있는 것으로 보고된 바가 있다(22). 그러나 본 실험에서는 산국의 꽃만을 분리하여 사용하였으며, 또한 세포독성이 나타나는 유효물질을 분리정제하여 사용하였으므로 그 효과는 보다 상승되어 나타난 것으로 생각된다.

요 약

산국의 꽃으로부터 2종의 sesquiterpene lactones을 분리정제하였으며, 각각 Compound I 과 II로 명명하였으며, 이 두 물질을 Sarcoma180에 감염된 ICR mouse에 대하여 항암효과실험을 수행한 결과 Compound I 과 II의 투여농도가 10mg/kg일 때 수명연장효과가 각각 143%, 134%로 나타났다. 또한 Compound I 과 II를 1mg/kg 씩을 섞어서 투여하였을 때에 158%의 수명연장효과가 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농림수산부 첨단농업기술개발사업 연구비의 지원으로 수행된 연구의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. 고정식 : 한국식물검색도감. 아카데미서적(1991)
2. 이창복 : 대한식물도감. 향문사, p.648(1989)
3. 최옥자 : 약초의 성분과 이용. 일월서각(1991)

4. 김재길 : 원색천연약물대사전. 남산당(1982)
5. 생약학연구회 : 생약평가실험. 한국학습교재사(1993)
6. 신숙희, 최영임 : 구절초의 정유성분 및 동속생약 정유와의 비교 연구. 생약학회지, 13, 153(1986)
7. Chatterjee, A., Sarkar, S. and Saha, S. K. : Acacetin 7- α - β -D-galactopyranoside from *Chrysanthemum indicum*. *Phytochemistry*, 20, 1760(1982)
8. Woo, W. S., Lee, E. B., Shin, K. H., Kang, S. S. and Jee, H. J. : A review of research on plants for fertility regulation in Korea. *Korean J. Pharmacognosy.*, 12, 153(1981)
9. Dan, B. and Andrew, G. : Chinese herbal medicine, Eastland press, SEATTLE, p.59(1986)
10. 朱有昌 : 東北藥用植物. 黑龍江科學技術出版社(1989)
11. Mladenova, K., Tsankova, E. and Stoianova, B. : Sesquiterpene lactones from *Chrysanthemum indicum*. *Plant Med.*, 51, 284(1985)
12. 강삼식, 윤혜숙 : 천연물과학. 서울대학교 출판부(1988)
13. Tang, W. and Eisenbrand, G. : Chinese drugs of plant origin. *Springer-Verlag*(1992)
14. 최영진 : 한국민속식물. 아카데미서적(1992)
15. 竹谷孝一, 系川秀治 : 1993年度天然抗癌資源の開發에 관한 國際學術會議-生物活性スクリーニングによる天然物資源からの抗腫瘍活性物質の分離, 同定. 東洋資源植物學會. *Symposium proceeding*(1993)
16. 김수철 : 1993年度天然抗癌資源의 開發에 관한 國際學術會議-백두산 항암식물 유전자원의 조사연구. 東洋資源植物學會. *Symposium proceeding*(1993)
17. 남상해, 양민석 : 산국추출물의 항균력. 한국농화학회지, 38, 269(1995)
18. 남상해, 양민석 : 산국으로부터 항암활성 성분의 분리. 한국농화학회지, 38, 273(1995)
19. Yang, M. S., Park, G. H., Jang, D. S., Choi, S. U., Nam, S. H. and Moto, S. : Cumambrin A in *Crysanthemum boreale* M., *Korean J. Pharmacognosy.*, 27, 207 (1996)
20. Fischer, N. H. : Isolation of sesquiterpenoids from plants, In "Methods in plant biochemistry" Dey, P. M. and Harborne, J. B.(eds.), Academic Press, 7, 187(1991)
21. 정영진 : 현대통계학의 이론과 실제. 보진제, 서울, p.111 (1963)
22. Woo, W. S. : Biological screening of Korean medicinal plants. Annual Rep. of Natural Products Research Institute Seoul Nat'l Univ., 14, 69(1976)

(1996년 11월 5일 접수)