

## 삼백초의 세포독성 성분연구

박시경\* · 오갑진 · 배춘일 · 김현중 · 환완식 · 정순간 · 조의환

삼진제약 (주) 중앙연구소

(Received August 18, 1997)

### Studies on the Cytotoxic Constituent of *Saururus chinensis*(L<sub>OUR.</sub>) B<sub>AILL.</sub>

Si-Kyung Park\*, Gab-Jin Oh, Choon-Il Bae, Hyun-Jong Kim,  
Wan-Sik Han, Sun-Gan Chung and Eui-Whan Cho

Central Research Institute, Samjin pharmaceutical Co., LTD., Hwasung Gun,  
Kyunggi Do, 445-920 Korea

**Abstract**—In our search for bioactive natural products with antitumor activity, we have evaluated various extracts of Saururi Herba (Saururaceae), which has been used in traditional medicine for edema, beriberi, jaundice, turbid urine, carbuncle and furuncle. The hexane extract of the aerial part of this plant was found to show a potent cytotoxicity against several kinds of cultured human solid tumor cell lines (AGS, A549, HCT15, SKOV3, HEP-3B) *in vitro*. Using cytotoxicity-guided chromatographic separation of the hexane extract, cytotoxic constituent: 10-aminomethyl-3-hydroxy-4-methoxy-phenanthrene-carboxylic acid lactam, was isolated and structurally identified by physico-chemical properties and spectroscopic evidences.

**Keywords** □ *Saururus chinensis*, Saururaceae, cytotoxic effect, 10-aminomethyl-3-hydroxy-4-methoxy-phenanthrene-carboxylic acid lactam (sauristolactam), phenanthrene alkaloid.

삼백초 *Saururus chinensis*(L<sub>OUR.</sub>) B<sub>AILL.</sub>는 삼백초과(Saururaceae)에 속하는 다년초로서 높이는 50~100 cm이고 근경은 백색이고 옆으로 뻗어간다. 잎은 호생하고 난형이며 끝이 뾰족하고 새잎은 백색이다. 꽃은 양성으로 6~8월에 피며 백색이고 과기는 7~9월이다. 잎, 꽃, 뿌리가 백색이고 윗부분에 달린 2~3개의 잎이 회어지기 때문에 삼백초라고 한다.<sup>1,2)</sup>

삼백초는 고래로부터 다양한 약효를 가지고 민간약으로 널리 사용되어 왔으며 특히 부종, 이뇨, 소종, 해독, 간염, 응종 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>3,4)</sup> 본 연구자들은 국내 천연자원으로 부터 새로운 항암제를 개발하기 위한 노력을 오랫동안 경주해 왔다. 그 중에서 삼백초의 추출물이 유의성있는 항암 효과를 나타

내는 것으로 부터 이에 대한 약효 성분 연구를 시도하였다. 이 추출물을 극성에 따라 순차적인 용매 분획을 실시하여 각각의 분획물을 얻었고 이 분획물들에 대한 세포 독성을 검색한 결과 hexane 엑스에서 강한 활성을 관찰 하였다. 따라서 이 엑스를 세포 독성에 따른 분획과 분리를 각종 칼럼 크로마토그래피를 시행하여 활성 물질을 분리 하였다.

#### 실험방법

**실험재료** - 본 실험에서 사용된 삼백초 *Saururus chinensis*(L<sub>OUR.</sub>) B<sub>AILL.</sub>는 1991년 8월경 제주도 오라동에서 재배품을 구매하여 감정 후 음건 세절하여 사용하였다.

**시약 및 기기** - 박층 크로마토그래피용 precoated TLC plate는 silca gel 60 F<sub>254</sub>(Merck Art. 5554)를

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 0339-353-1712 (팩스) 0339-353-8701

**Table I**—Cytotoxic activity of partitioned extracts from Saururi Herba

Group	IC <sub>50</sub> µg/ml				
	A549	AGS	HCT15	SKOV3	HEP3B
Hexane	50.2	43.7	82.5	41	30.5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	109.1	83.5	90.3	115.1	86.2
EtOAc	110.3	74.6	103.5	92.5	79.0
BuOH	>125	100.1	>125	>125	>125
H <sub>2</sub> O	>125	>125	>125	>125	?125

Human tumor cell lines : A549 (lung carcinoma), AGS (gastric adenocarcinoma), HCT15 (colon adenocarcinoma), SKOV3 (ovary adenocarcinoma), HEP 3B (hepatocellular carcinoma)

IC<sub>50</sub> value presents the concentration of a group required for 50% inhibition of cell growth *in vitro*.

이용하였고 컬럼 크로마토그래피는 silica gel 60(70~230 mesh, Merck)과 Sephadex LH 20(20~100µ, Pharmacia)등을 사용하였다. 사용기기로는 용점은 Electrothermal IA8100(uncorrected), IR spectrum은 Shimadzu IR-435, UV spectrum은 Hewlett-Packard 8452A, <sup>1</sup>H과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 Bruker AMX 500 그리고 MS spectrum은 Hewlett-Packard 5988을 사용하여 측정하였다.

**실험 동물** - 삼진제약(주) 중앙연구소 동물사육실에서 자체 생산한 ICR계 수컷생쥐(체중23±2g)를 실험에 사용하였으며 물과 사료를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 사료는 시판 고형사료(삼양유지 공업주식회사)를 사용하였으며 사육실의 내부온도는 23±1°C, 습도는 55±1%로 유지하였다.

**급성 독성실험** - ICR계 수컷 생쥐(체중23±2g) 6마리를 한 군으로 compound 1을 경구와 비경구 투여한 후 7일까지의 행동의 이상 유무와 사망 여부를 관찰하였다(Table IV).

**항암활성검색(SRB assay)<sup>5,6)</sup>** - 각 실험 대상 세포주를 96 well microplate에 분주하고 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양했다. 대조군과 더불어 적정 농도의 시

**Table II**—Cytotoxic activity of fractions from Hexane extract of Saururi Herba

Group	IC <sub>50</sub> µg/ml				
	A549	AGS	HCT15	SKOV3	HEP3B
HE-I	7.2	20.3	8.5	13.7	8.1
HE-II	39.8	32.1	37.6	45.1	44.6
HE-III	99.8	108.2	69.7	96.0	68.4

**Table III**—Cytotoxic activity of isolated compound 1 from Saururi Herba

Compounds	IC <sub>50</sub> µg/ml				
	A549	AGS	HCT15	SKOV3	HEP3B
Compound 1	1.4	1.7	0.9	1.5	0.6
Cisplatin	1.0	1.8	1.5	1.1	3.6

Administration route	Dose (mg/kg)	Number of treated	Number of died mouse
<i>po</i>	800	6	0
<i>ip</i>	400	6	0

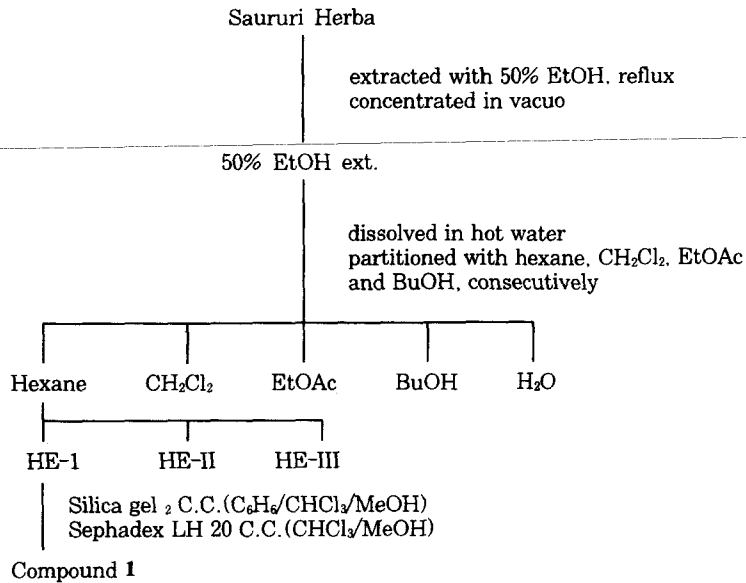
험물질을 가하고 48시간 배양 한 후 각 well의 배지를 제거하고 10% trichloroacetic acid(TCA)를 가해 cell들을 고정 시켰다. 0.4% SRB(sulforhodamin B)를 가해서 염색을 시켰으며 착색된 well에 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane를 넣어 용해시키고 ELISA reader로 파장 540 nm에서 optical density(O. D.)를 측정하였다. 각 세포주에서 IC<sub>50</sub>값(성장을 50% 억제하는데 요구되는 농도, 단위 : µg/ml)은 control O. D.의 50%감소를 초래하는 시험물질의 농도로 정하였다. 모두 3회 이상의 반복 실험을 하였으며 그 평균치를 다음의 공식에 의해 계산하였다. (1-mean O. D. in test well/ mean O. D. in control well)×100(%) 이로부터 각 시험 물질의 IC<sub>50</sub>

**Table IV.** NMR spectral data for compound 1\*

Carbon no.	<sup>13</sup> C(δ)	<sup>1</sup> H(δ, mult, J, Hz)	HMBC(C to H)
1	ND <sup>†</sup>		
2	113.5	7.64, s	OH
3	152.1		
4	148.8		H-2, OH, OCH <sub>3</sub>
4a	120.1		H-5
4b	126.3		H-6, H-8, H-9
5	126.8	9.12, <i>dd</i> , 7.5, 2.5	H-7
6	125.5	7.59, <i>m</i>	H-8
7	127.3	7.59, <i>m</i>	H-5
8	129.0	7.94, <i>dd</i> , 7.5, 2.5	H-6
8a	134.6		H-5, H-7
9	103.5	7.28, s	H-8
10	136.9		NCH <sub>3</sub>
10a	120.9		H-2, H-9
CO	166.7		H-2, NCH <sub>3</sub>
OCH <sub>3</sub>	59.5	4.04, s	
NCH <sub>3</sub>	26.1	3.30, s	
OH	-	10.30, s	

<sup>†</sup> Not Detected

\* <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectra were measured in DMSO-d<sub>6</sub> solutions at 500 and 125 MHz, respectively.



**Scheme 1**— Extraction and Isolation of compound 1 from Saururi Herba

μg/ml 값을 구하였다.

**추출 및 분리** - 건조된 삼백초 전초 분말(10 kg)을 50% EtOH(15 L)로 3시간씩 3회 환류냉각 추출하였고 추출액을 감압 농축하여 50% EtOH 엑스(780 g)을 얻었다. 이 엑스를 증류수에 현탁시킨 후 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여 hexane(35 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(40 g), EtOAc(71 g), BuOH(195 g), H<sub>2</sub>O(427 g)의 엑스를 각각 얻어 이것들에 대한 1차 약효 검색을 실시하였다(Table I). 이 중에서 hexane 가용부가 가장 활성이 강하게 관찰되었고 이 엑스를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>/CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH=8:2:1)로 3개의 분획(HE-I, HE-II, HE-III)으로 나누어 약효 검색한 결과 HE-I이 강한 활성을 나타내었다(Table II). 따라서 HE-I의 분획물(4 g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>/CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH=4:1:1)와 Sephadex LH 20 컬럼 크로마토그래피(MeOH→CHCl<sub>3</sub>, gradient)를 반복하여 활성 성분인 미황색의 침상결정인 compound 1(150 mg)을 분리하였다(Scheme I).

**Compound 1** - 미황색의 침상결정, mp: 292°C (decomp.), C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>(HRMS m/z 279.0871, calcd for 279.0895): UVλ<sub>max</sub><sup>EtOH</sup> nm: (log ε): 236(4.68), 266(4.61), 276(4.67), 284(4.68), 314(4.03), 388(4.07): IRν<sub>max</sub><sup>KBr</sup> cm<sup>-1</sup>: 3440(OH), 1690, 1650(C=O), 1430, 1320,

1260, 970, 740: MS(EI) m/z (relative intensity): 279(M<sup>+</sup>, 100), 264(M<sup>+</sup>-Me, 46), 236(M<sup>+</sup>-MeCO, 23), 180(16), 152(11), 139(10); 1H and <sup>13</sup>C-NMR (500/125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) data, see Table IV.

### 결과 및 고찰

**구조 확인** - Compound 1은 미황색의 침상결정으로 TLC상에서 Dragendorff시약에 정색한다. UV spectrum의 236, 266, 276, 314, 388 nm등의 흡수 peak로부터 phenanthrene alkaloid로 예상하였고 IR spectrum에서는 3440(OH)와 1690, 1650 cm<sup>-1</sup> (C=O)의 강한 band로 부터 lactam group이 존재하는 aristolactam의 구조로 추정할 수 있었다.<sup>8,9)</sup> <sup>1</sup>H-NMR spectrum으로부터 δ 10.30(1H, s, OH)와 δ 3.39(3H, s, N-CH<sub>3</sub>) 그리고 aromatic methoxy인 δ 4.03(3H, s, OCH<sub>3</sub>)의 signal과 aromatic proton에 해당하는 6개의 proton signal이 δ 7.28(1H, s, 9-H), δ 7.64(1H, s, 2-H), δ 7.59(2H, m, 6-H, 7-H), δ 7.94(1H, dd, 8-H) 및 δ 9.12(1H, dd, 5-H)에서 나타나는 것으로 부터 compound 1은 hydroxy, methoxy group이 치환된 N-methyl-disubstituted aristolactam의 구조로 예상하였다.<sup>10,11)</sup> <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 methoxy carbon(δ 59.6), N-methyl carbon(δ

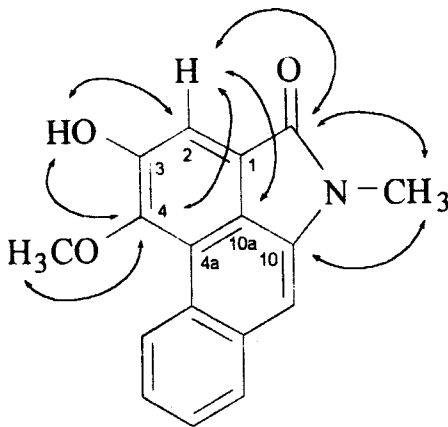


Fig. 1— Structure and Long-range  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  COSY NMR correlation of compound 1.

26.1) 그리고 aromatic oxycarbon ( $\delta$  152.1, 148.8)과  $\delta$  7.64의 H-2 signal 등으로 부터 compound 1은 aristolactam 구조중에서 A ring의 C-3에 hydroxy group과 C-4에 methoxy group이 치환된 구조로 추정할 수 있었다.<sup>12-15)</sup> 이것은 long range  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  cosy spectrum에서  $\delta$  148.8의 C-4가  $\delta$  10.30의 hydroxy group의 수소,  $\delta$  4.03의 methoxy group의 수소 그리고  $\delta$  7.64의 H-2등과 각각 coupling하고  $\delta$  7.64의 H-2는  $\delta$  166.7의 carbonyl carbon과,  $\delta$  113.5의 C-2는  $\delta$  10.30의 hydroxy수소와 각각 long range coupling 하는 것으로 부터 compound 1은 C-3에 hydroxy group, C-4에 methoxy group이 치환되어 있는 10-ami-nomethyl-4-methoxy-3-hydroxy-phenanthrene-1-carboxylic acid lactam구조로 확정하였으며 기존의 문헌 데이터와 비교 검토한 결과 잘 일치함을 알 수 있었다.<sup>16)</sup> (Fig. 1)

**항암활성 및 급성독성** - *In vitro* 상에서의 세포독성을 5종의 인체 유래 암세포(A549, AGS, HCT15, SKOV3, HEP3B)에 대하여 SRB법으로 측정하였다. 삼백초로 부터 추출 분획된 5개의 분획물에 대하여 약효 검색을 실시한 결과 Table I에 나타난 바와 같이 hexane엑스가 대체로 강한 활성을 나타내었다( $\text{IC}_{50}$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ : 30.5~82.5). Hexane엑스를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피하여 3개의 분획으로 나누고 이것을 약효 검색한 결과 HE-I분획물의  $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 7.2~20.3으로 가장 강한 세포독성을 관찰할 수 있었다(Table II). 따라서 HE-I분획물을 실리카겔, Sepha-dex LH 20 컬럼 크로마토그래피를 시행하여 활성 물질인 compound 1을 분

리 하였다. Compound 1은 Table III에 나타난 바와 같이 A549, AGS, HEP3B, HCT15, SKOV3에 대하여 각각  $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )값이 1.4, 1.7, 0.6, 0.9, 1.5로서 모든 cell line에 대해 강한 활성을 나타내었고 대조약물로 사용한 cisplatin에 비하여 거의 같은 정도의 활성을 나타내었으며 특히 간암세포에 대해 독성이 강한 것으로 나타났다. 반면에 생쥐에 대한 급성 독성 실험 결과 경구 투여에서는 800 mg/kg, 복강 주사에서는 400 mg/kg 용량에서 모두 독성을 나타내지 않았다. 이것은 대조약물인 cisplatin( $\text{LD}_{50}$  mg/kg : po=52.6, ip=14.6)<sup>17)</sup>에 비하여 독성이 매우 낮은 것을 알 수 있었다.

## 결 론

천연자원으로 부터 항암제 개발을 목적으로 삼백초 *Saururus chinensis*(Lour.) BAILL.의 추출물을 세포독성에 따른 분획과 분리를 위한 각종 컬럼 크로마토그래피를 시행하여 활성 물질인 compound 1을 단리하였다. 이 화합물은 물리 화학적 성질과 기기분석 데이터를 종합하여 10-aminomethyl-4-methoxy-3-hydroxy-phenanthrene-1-carboxylic acid lactam으로 확인 동정 되었다. 또한 이 화합물은 인체 유래 암세포(A549, AGS, HCT15, SKOV3, HEP3B)에 대한 세포 독성 효과가 강하게 나타나고( $\text{IC}_{50}$ : 0.6~1.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 생쥐에 대한 급성 독성 실험 결과 최소 사망용량이 경구투여는 800 mg/kg, 복강주사는 400 mg/kg 이상으로 cisplatin에 비하여 독성이 매우 낮은 것으로 평가 되었다.

## 문 헌

- 1) 이창복 : 대한식물도감, 향문사, 서울, p.252 (1979).
- 2) 김재길 : 원색 천연약물 대사전(하), 남산당, 서울, p. 174 (1984).
- 3) 新文豊 出判公司 : 新編 中藥大辭典(中), 臺北, p.62 (1971).
- 4) Hsu, H. Y., Chen, Y. P., Shen, S. J., Hsu, C. S., Chen, C. C. and Chang, H. C. : Oriental Materia Medica, Oriental healing arts institute, Long Beach, P. 308 (1986).
- 5) Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D. A., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxicity assay for an-

- ticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107 (1990).
- 6) Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, L., Cronise, P., Vaigro-Wolf, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J. and Boyd, M. R. : Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell line. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 757 (1991).
- 7) Egon Stahl : Thin-layer chromatography, Springer Verlag, New York, p.441 (1969).
- 8) Omar, S., Chang, L. C., Ahmad, F. Jiu, X. N., Hasan, J., Huang, J. and Nakatsu, T. : Phenanthrene lactams from *Goniothalamus velutinus*. *Phytochemistry* **31**, 4395 (1992).
- 9) Desai, S. J., Chaturvedi, R. and Mulchandani, N. B. : Piperolactam D, a new aristolactam from Indian Piper species. *J. of Natl. Prod.* **53**, 496 (1990).
- 10) Priestap, H. A. : Two carboxy and two hydroxymethyl substituted aristolactams from *Aristolochia argentina*. *Phytochemistry* **24**, 3035 (1985).
- 11) Achari, B., Bandyopadhyay, S., Chakravarty, A. K. and Pakrashi, S. C. : Carbon-13NMR spectra of some phenanthrene derivatives from *Aristolochia indica* and their Analogues. *Organic Magnetic Resonance* **22**, 741 (1984).
- 12) Priestap, H. A. :  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy of aristolochic acid and aristolactams. *Magn. Reson. Chem.* **27**, 460 (1989).
- 13) Priestap, H. A. : Seven aristolactams from *Aristolochia argentina*. *Phytochemistry* **24**, 849 (1985).
- 14) Crohare, R., Priestap, H. A., Farina, M., Cedola, M. and Ruveda, E. A. : Aristolactams *Aristolochia argentina*. *Phytochemistry* **13**, 1957 (1962).
- 15) Achari, B., Chakrabarty, S., Bandyopadhyay, S. and Pakrashi, S. C. : A new 4, 5-dioxoaporphine and other constituents of *Aristolochia indica*. *Heterocycle* **19**, 1230 (1982).
- 16) Rao, K. V. and Reddy, G. C. S. : Chemistry of *Saururus cernuus*. *J. of Natl. Prod.* **53**, 309 (1990).
- 17) Japan pharmaceutical information center : Drugs in Japan (ethical drugs), Yakugyo Jiho Co., Tokyo, p.522 (1995).