

## 미국자리공 (*Phytolacca americana*)에서 추출한 생물활성 물질의 동정 및 생물검정에 관하여

한상미 · 배기환\* · 최관삼

충남대학교 응용생물화학부 · 충남대학교 약학과\*

### Identification and Bioassay of Bioactive Compounds Isolated from *Phytolacca americana*

Han, Sang-Mi, Ki-Hwan Bae and Kwan-Sam Choi

Department of Applied Biology & Chemistry, Chungnam National University

Department of Manufacturing Pharmacy, Chungnam National University\*

Taejon 305-764, Korea

#### ABSTRACT

This study was carried out for the identification and bioassay of bioactive compounds which isolated from *Phytolacca americana* L. obtained results are summarized as follows:

1. Two biological active compounds were found from crude extracts of *P. americana* roots, using the systematic solvent fractionations, such as ethyl acetate fraction and butanol fraction. One biological compound was isolated from the ethyl acetate fraction with silicagel column chromatography, which was identified as a  $\alpha$ -spinasterol by spectral analysis of IR, H-NMR, C-NMR and MS. The other one is isolated from butanol fraction which was identified as phytolaccoside E by spectral analysis of IR, H-NMR, C-NMR and MS.
2. The  $\alpha$ -spinasterol and phytolaccoside E induced necrosis of primary root and resulted in death of the tested plant. These two compounds strongly inhibited to the growth of *Mucor racemosus* and *Phytophthora infestans* but did not inhibited the growth of *Colletotricum lagenarium* and *Fusarium oxisporum*.
3. Cytotoxicity of the two biological active compound was examined to the two different animal cancer cell lines (L1210, K562). The phytolaccoside E has some cytotoxic activity to the growth of cancer cell lines (L1210, K562) but  $\alpha$ -spinasterol has not cytotoxic effect.

**Key words** : Extraction of biological active compound,  $\alpha$ -Spinasterol, Phytolaccoside E, Bioassay.

#### 서론

미국자리공(*Phytolacca americana* L.)은 북아메리카 원산의 다년생 귀화 초본식물로서 인가나 도로가에 산재하여 분포하며 요즘엔 우리나라 산야 전역에서 찾아

볼 수 있다. 뿌리는 굵고 비대하며 원추형으로 외피는 담황색이다. 줄기는 1~2m 정도로 곧게 자라며 가지가 많이 갈라져 나오고 녹색 또는 자홍색의 세로로 된 홈이 있다. 핵과는 편평한 구형으로 보통 10개의 분리과이며 익으면 자홍색의 종자가 하나씩 들어 있다. 개화기는 5, 6월경이다. 우리나라와 일본 및 중국에서는 같은 과

(科)의 자리공(*Phytolacca esculenta* V. Hott.)의 뿌리를 상육(商陸=*Phytolaccae radix*)이라 하여 예로부터 한방(漢方)에서 종양, 이뇨의 목적으로 사용하여 왔다(육 1997). 한편, 민간에서도 신경통, 산후부종의 약으로 사용하고 있다. 미국에서는 미국자리공을 1880년 및 1890년도 USP(United States Pharmacopoeia, 미국약전)에 의약품으로 기술한 바 있고, 그 후 N.F.(National Formulary, 미국국민약품처방전)에 수록된 바 있으며, 하제, 마취제, 만성신경제, 기생충 감염, 암 등의 치료제로 사용되고 있었다는 기록이 있다(Chi and Kim 1985). 한편 미국자리공은 구미(歐美)에서는 열매의 즙을 술의 착료제로 사용하고 있으며, 어린 순은 식용한다고 한다. 특히, 열매는 tobacco mosaic virus에 강한 항virus성 단백질이 있으며 자신의 즙을 처리했을 때 발아가 되지 않는다는 보고가 있다(Woo and Kang 1985). 우리나라에서 새롭게 분리 추출한 미국자리공의 성분으로는 triterpenoids의 sapogenin의 계통물질인 phytolaccoside A, B, C, D, E, F, I의 7종의 신물질(Kang and Woo 1987)과 sterol saponin의 일종인  $\alpha$ -spinosterol, jaliconic acid 등(Woo 1975)이 있으며, 외국에서 보고된 것으로서는, phytolacca genin, esculentic acid 등이 알려져 있다(Herbert et al. 1986). 그리고 이들 물질이 갖고 있는 소염작용의 효과에 대한 보고 및 약리작용에 대한 연구가 1970년대 이후 서울대 천연물연구소 연구자들에 의해 정력적으로 연구되어 약용식물로서의 가능성이 매우 유망한 식물로 인정되고 있다(Woo and Kang 1974, Kang et al. 1976, Kang and Woo 1986, 김 등 1988, Natural Products Research 1996). 그러나, 최근 일부 생태학 연구자들에 의해 미국자리공의 뿌리에서 나오는 독극물질이 국내 고유식물을 말라 죽게 하여 생태적 피해가 우려되고 있다는 지적도 있다(Kil et al. 1994, 이 등 1997).

본 연구에서는 미국자리공의 뿌리로부터 직접 생리활성물질을 분리 추출하여 그 물질의 본체를 동정함과 아울러 이들 생리활성물질에 의한 식물의 생장억제 및 식물병원균에 대한 항균성, 암세포에 대한 독성 등 광범위한 생물검정을 실시하여 그 이용성에 관한 정보를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 생리활성물질의 추출

실험에 공시한 미국 자리공(*Phytolacca americana* L.)은 1995년 7월 부터 10월 사이에 충남대학교 주변 야산에서 채집하여, 식물도감(이 1989)을 참조하여 확인 동정하였고 그 뿌리를 음지에서 건조 세절하여 추출에 사용하였다. 분말상태의 미국자리공 뿌리 1 kg을 메탄올 3 l로 환류시키면서 3시간씩 3회 추출하여 온시 여과한 후 추출액을 감압농축하여 134 g의 메탄올 추출물을 얻었다. 메탄올 추출물을 1 l의 물에 현탁한 후 *n*-hexane 100 ml으로 3회 추출하여 추출물을 감압농축하여 2.5 g의 농축물을 얻었고, 남은 불층을 에틸 아세테이트 100 ml으로 3회 추출하여 추출액을 감압농축하여 5 g의 추출물을 얻었다. 다시 남은 불층은 수포화(水飽和) 부탄올 100 ml으로 3회 추출한 후 추출물을 감압농축하여 13 g의 추출물 I과 II를 얻었다.

### 1. 추출물 I로 부터 $\alpha$ -spinasterol의 분리 동정

추출분획인 에틸 아세테이트층에서 상처의 초기생육을 억제하는 것으로 나타난 물질을 확인하기 위해 에틸 아세테이트 분획물을 silicagel column chromatography로 벤젠과 아세톤 (3:1)의 혼합용매로 용출하여 결정을 얻은 후 아세톤으로 재결정하여 87 mg의 순수한 생물활성물질 I을 얻었다. 분리된 생물활성물질 I은 TLC하여 Rf 값을 0.41(TLC1, 핵산:벤젠:아세톤=1:1:0.5)과 0.35(TLC2, 벤젠:아세톤=6:1)을 얻었으며, 구조동정을 위하여 융점측정과 분광분석을 실시하였다. IR분석은 물질 I을 KBr로 disk를 만들어 4000~600  $\text{cm}^{-1}$  범위에서 percent transmittance를 측정하였다. NMR분석은 pyridine-*d*5로 물질을 녹인 뒤 tetramethylsilane (TMS)를 내부 물질로 하여 chemical shift를  $\delta$ (ppm)으로 나타내었다.

### 2. 추출물 II로 부터 phytolaccoside E의 분리 동정

생물활성이 있는 수포화 부탄올 추출물을 silicagel column chromatography로 클로로포름과 메탄올 1:10의 혼합용매로 용출하여 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 으로 발색시켰다. 각 반점의 Rf 값에 따라 7개의 fraction으로 나누어 상처에 처리하여 생육억제가 강하게 나타난 fraction 5와 6의 물질을 합친 후 클로로포름:메탄올:물(65:35:10)의 혼합용매로 silica gel column chromatography상에서 180 mg의 순수한 생물활성물질 II를 얻었다. 추출물질 II는 TLC상에서 Rf값이 0.33(TLC1, 클로로포름:메탄올:물

= 65:35:10)과 0.25(TLC2, 클로로포름:메탄올:암모니아:물 = 60:30:3:4)이었다. 순수 단리물질의 구조동정을 위하여 물질 I의 분석방법과 같이 용점측정 및 분광분석을 실시하였다.

상기의 실험을 위한 추출시약 및 기기로는 Column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60(70~230 mesh ASTM, MERK Art 7734), TLC용 plate로는 precoated TLC plate silica 60 F254(Merck)를 사용하였다. 기타 시약 및 용매류는 국내외의 1급 또는 특급을 사용하였다. 성분 분석용 기기로는 Melting Point Apparatus(Electrothermal, SERLES IA 9100), IR Spectrophotometer(Jasco Report-100), NMR Spectrophotometer, MS Spectrophotometer(JEOL., JMX-DX 303)등을 이용하였다

## 생물검정시험

### 1 식물의 초기생장 억제효과 실험

물질 I 과 II를 아세톤과 메탄올에 녹여 여지(Whatman No.2)를 2장 간 4.5 cm Petri dish에 10  $\mu$ g, 100  $\mu$ g, 1000  $\mu$ g로 조절하여 주입하고 유기용매는 완전히 날린 후 2 ml의 증류수를 첨가하였다. 각 Petri dish당 공시종자를 25립씩 치상하였다. 공시종자로는 상치(*Lactuca sativa* L.), 큰다닥냉이(*Lepidium sativum* L.), 피(*Echinochloa crus-galli* var. *frumentacea* Wight), 쇠비름(*Portulaca oleracea* L.), 그리고 큰달맞이꽃(*Oenothera lamarckiana* Ser.)의 종자를 사용하였다. 발아 및 초기생장의 조건은 상치 종자의 경우에만 암(暗) 조건에서 3일간 배양하였으며, 쇠비름, 큰달맞이꽃, 피의 종자는 장일조건으로 14시간 광조건(35 $^{\circ}$ C)과 10시간의 암조건(25 $^{\circ}$ C)하에서 3일 동안 배양하였다. 결과는 무처리구(control)와 추출물질 I 과 II 처리구와의 초기생장을 지상부(shoot)와 지하부(root)로 나누어 비교 분석하였다. 결과는 육안으로 mm 단위로 길이를 측정하였다. 다만 초기생육이 미약했던 쇠비름과 큰달맞이꽃은 실체경을 이용하였다(Raju *et al.* 1986, 1988).

### 2 식물병원균의 생장억제 효과 실험

공시한 식물 병원균주는 오이덩굴쫄김병균(*Fusarium oxysporum*), 수도문고병균(*Rhizoctonia solani*), *Mucor racemosus*, 감자역병균(*Phytophthora infestans*), 오이탄

저병균(*Colletotrichum lagenarium*), 사과반점낙엽병균(*Alternaria mali*) 등 6종이었다. 이들 균주는 실험 일주일전에 PDA(potato dextrose agar)배지상에서 생육시켜 충분히 자란 균체를 채집하여 멸균 증류수로 균질화시킨 후, 미리 멸균하여 둔 PDA 기본배지(basal layer) 위에 약 6 ml의 seed layer를 부어 접종시켰다(중층배지). 추출물질 I, II의 처리효과는 상기의 추출물을 유기용매로 녹여 일정 농도로 조절하여 paper disk에 주입시킨후, 유기용매를 완전히 날려 보낸 것만을 중층배지위에 올려놓고 25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C의 암 조건에서 1주일간 배양한 결과로 분석하였다. 최소발육 저지농도(minimal growth inhibitory concentration, MIC)는 균의 생장이 저지되는 최소농도를 최소발육저지 농도로 하였다(김 등 1990). 물질의 농도는 2  $\mu$ m/dish 간격으로 실시하였다.

### 3. 현탁 배양세포 및 암세포 생장억제 효과 실험

현탁배양의 포도세포는 MS 기본배지에 auxin계 호르몬인 2,4-D를  $2.3 \times 10^{-7}$ M을 첨가하고 sucrose 3%를 넣어 만든 액체배지를 300 ml의 flask에 80 ml 넣은 후 포도(*Vitis vinifera* L.) 잎의 세포현탁액을 8 ml 넣어 일주일 간격으로 계대배양하였다. 배양은 28 $^{\circ}$ C 광(光)조건하에서 110~115rpm으로 진탕배양하였다. 생장억제 효과는 배양후 4일째부터 대수생장기에 접어든 계대배양의 세포에 추출물질 I 과 II를 농도별로 조절하여 처리한 후 2일 간격으로 세포생장을 조사하였다. 세포수의 조사는 세포현탁배양액 0.5 ml를 취하여 1,200 rpm으로 원심분리한 후, mannitol 0.6M과 원형질 나출효소로서 cellulase 1%(w/v), macerozyme 0.05%(w/v)를 넣은 후 28 $^{\circ}$ C의 온탕 shaker에서 천천히 원형질을 나출시킨 후 0.7% mannitol로서 전체의 양을 1.0 ml이 되도록 조절한 뒤  $10 \times 10$ 배의 현미경하에서 조사하였다.

암세포에 대한 독성실험은 쥐의 임파성 백혈병 세포인 L1210세포를 Fisher's medium, 10% horse serum배양액을 사용하여 계대배양하였다. 세포독성 실험은 대수생장기에 도달한 세포를  $3 \times 10^5$  cells/ml의 농도가 되도록 조정 후 배양하였다. 추출물 I 과 II는 세포생장에 영향을 없는 0.2% 이하의 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시킨 후 시료액 0.1 ml에 배지액 0.9 ml를 넣어 10배(10 ml)로 희석하여 사용하였다(Ryu 1982). 미리 조제한 세포현탁액 5 ml을 Screw-capped tube에 넣은 후 시료 희석액을 각각 100  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 25  $\mu$ l씩 가하여 실험군으로 하였고, 대조군은 5 ml의 세포현탁액만을

넣어 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양한 후 세포 성장을 측정하고 아울러 ED<sub>50</sub> 값을 구하였다(National Cancer Institute 1972, Collins *et al.* 1977).

한편, 사람의 만성 골수성세포인 K562세포는 RPMI 1640, 10% fetal bovin serum을 사용하여 72시간 간격으로 계대배양하여 사용하였다. 상기의 L1210세포에 대한 독성실험과 마찬가지로 시료를 일정농도의 DMSO에 용해시킨 후 10배 희석하였다. 이 시료용액을 각각 40  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 10  $\mu$ l씩을 24 well plate에 가하였다. K562세포의 실험군과 대조군을 실험 24시간전에 배양활성화시킨 후,  $1.0 \times 10^5$  cells/ml로 희석하여 2 ml씩 주입 후 37°C 항온의 CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 배양한 후 hemocytometer로 세포 수를 산정하였다. ED<sub>50</sub> 값은 대조군의 50% 수준의 억제값에 상당하는 시료의 농도( $\mu$ g/ml)로 나타내었다(National Cancer Institute 1972, Ryu 1982).

## 결과 및 고찰

### 생리활성물질의 단리동정

#### 1. $\alpha$ -Spinasterol의 단리동정

에틸 아세테이트로 재 결정하여 얻은 물질 I은 무색 침상형으로 융점은 159~160°C 이고 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 발색하였다. IR spectrum의 분석 결과 3050~3650 cm<sup>-1</sup> 에서 hydroxyl group peak, 1650 cm<sup>-1</sup> 근처에서 7번과 8번 그리고 22번, 23번 탄소간의 double bond의 peak가 확인되었다(Fig. 1). <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 5.15 ppm에서 22, 23번 탄소에 위치한 수소가 multiplet으로 나타나고, 5.05 ppm에서 7, 8번 탄소에 위치한 수소가 multiplet으로 나타났다. 또한 3.59 ppm에서 hydroxyl group에 이웃한 2, 4번 탄소의 수소가 multiplet으로 나타나며 2.1~0.5 ppm에서 aliphatic 탄소의 수소가 중첩되어 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 2). <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 139.5~117.4 ppm에서 7, 8, 22, 23번의 이중결합된 탄소의 peak를 확인할 수 있고, 129 ppm에서는 7, 8번 탄소를 71 ppm에서 hydroxyl group에 결합된 3번 탄소의 peak, 그리고 24종의 aliphatic ring의 탄소가 55.8~12.0 ppm에서 확인할 수 있었다(Fig. 3). 또한 MS spectrum에서 보는 바와 같이 분자량은 414이며 이성질체인 7-stigmastenol이 m/e 412가 base peak인데 비해 m/e 271이 base peak로 나타났다(Fig. 4). 이상의 spectral data를 종합한 결과, 추출물질 I은  $\alpha$ -spinasterol로 동정되었다(Fig. 5). 이 물질은 Woo와 Kang(1974)에 의해 동정된 물질과 동일 물질임이 밝혀

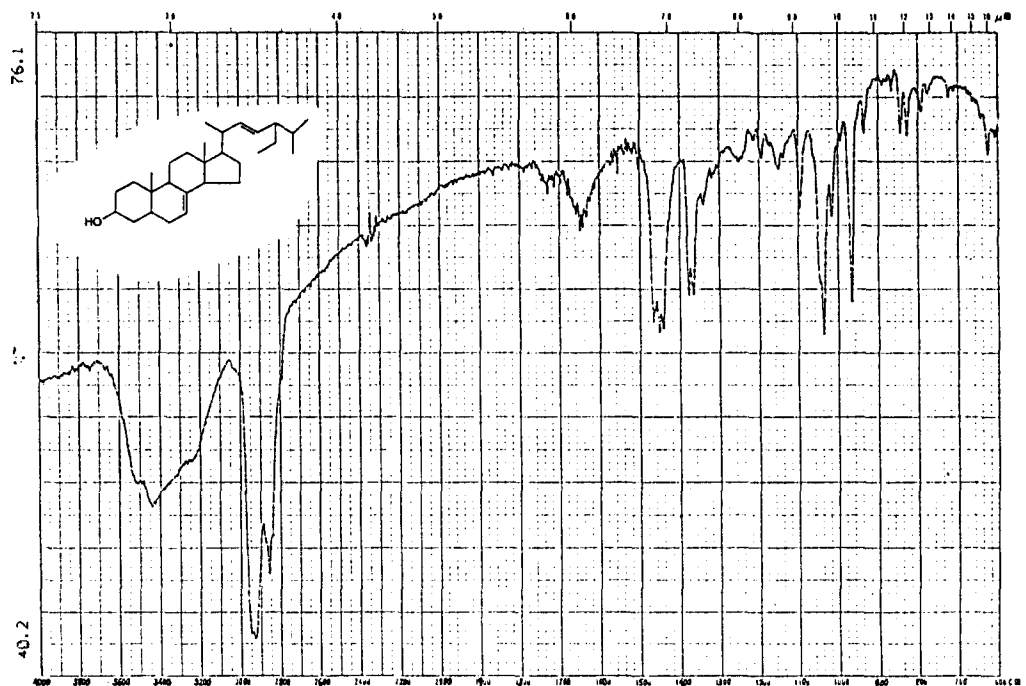


Fig. 1. IR spectrum of  $\alpha$ -spinasterol isolated from the root of *Rhytolacca americana* (KBr disk).

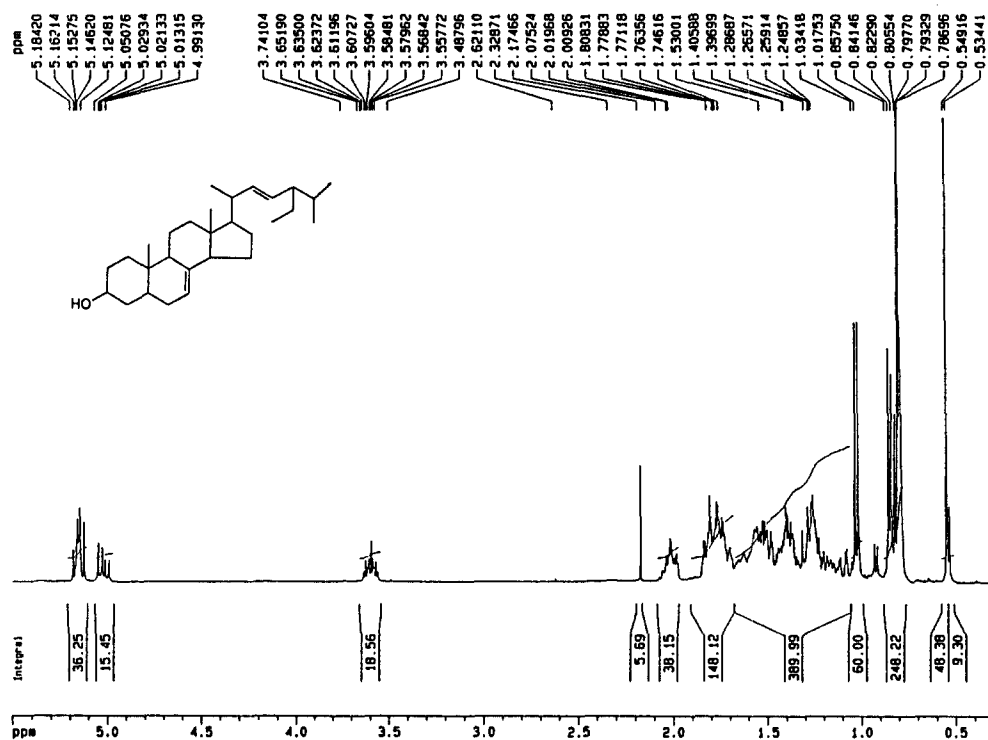


Fig. 2. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of  $\alpha$ -spinasterol isolated from the root of *Phytolacca americana* (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

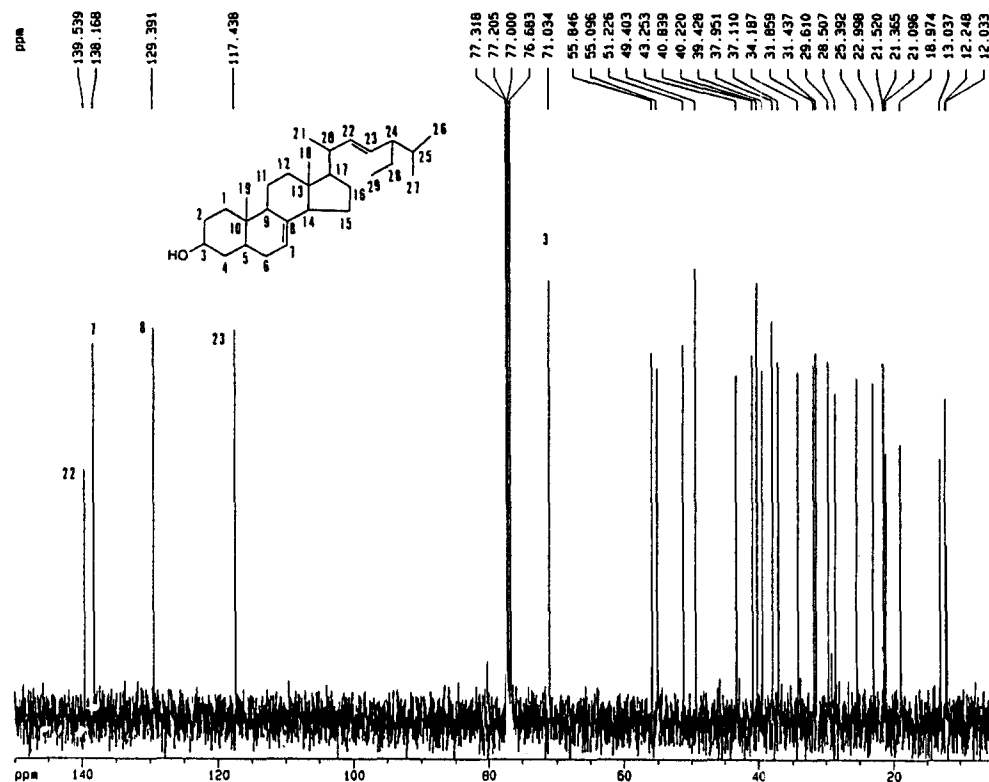


Fig. 3. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of  $\alpha$ -spinasterol isolated from the root of *Phytolacca americana* (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

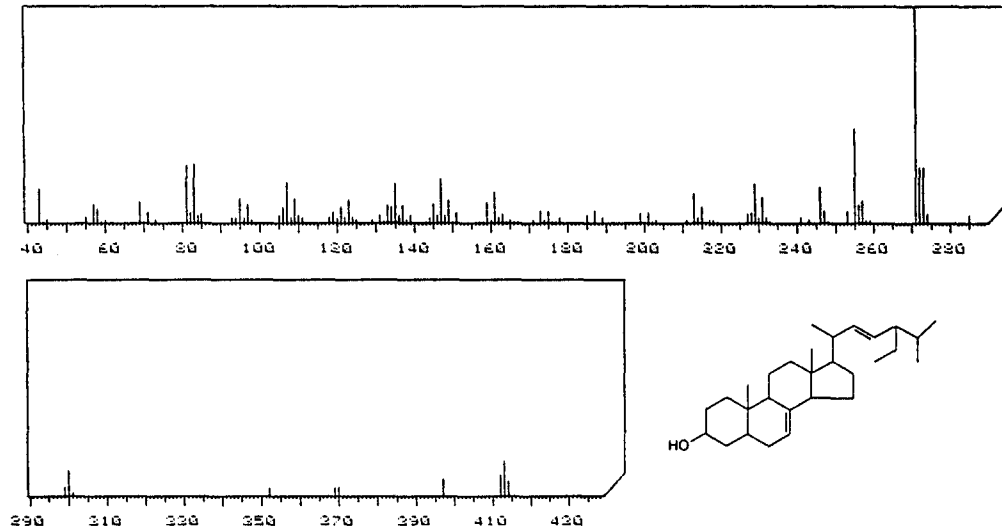


Fig. 4. MS spectrum of  $\alpha$ -spinasterol isolated from the root of *Phytolacca americana*.

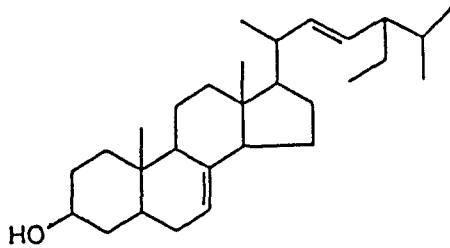


Fig. 5. Structure of  $\alpha$ -spinasterol.

졌다.

## 2. Phytolaccoside E의 분리 동정

한편, column chromatography를 통하여 분리한 물질 II는 흰색분말형으로 융점은 258~260°C이었다.  $H_2SO_4$ 에서 발색하였고, Liebermann-Buchard반응에서 자색을 띄었다. IR-Spectrum에서 3,400  $cm^{-1}$ (OH), 1,730  $cm^{-1}$ (COOR), 1,710  $cm^{-1}$ (COOH) 등을 보였고 1,650  $cm^{-1}$ 에서 이중결합이 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).  $^1H$ -NMR spectrum결과는 1.07, 1.22, 1.29, 1.34, 1.57 ppm에서 5개의  $CH_3$  peak가 singlet로 나타나며, 3.69 ppm에서 methoxyl group의 수소가 singlet로 나타났고, 5.63 ppm에서 카르복시산의 수소가 multiplet로 나타났다. 5.07, 5.05 ppm에서 glucose의 1번 탄소 주위의 산소가, 5.02, 5.00 ppm에서 xylose의

4번 탄소 주위의 산소를 확인하였다 (Fig. 7).  $^{13}C$ -NMR spectrum에서는 12, 13번의 이중결합된 탄소가 각각 122.0, 143.6 ppm에서 나타나며 31번 methoxyl group의 탄소는 58.1 ppm에서 나타난다. 또한 28, 30번의 carbonyl 탄소의 peak는 178.2, 176.3 ppm에서 나타나며 OH가 치환된 2번 탄소와 23번 탄소는 각각 69.7 ppm, 63.2 ppm으로 나타났다. 그리고 당(糖)부에 있어서는 xylose는 104.9(C-1), 73.4(C-2), 74.7(C-3), 76.3(C-4), 62.1(C-5)로서 확인되며, glucose는 101.6(C-1), 72.6(C-2), 77.0(C-3), 70.1(C-4), 76.3(C-5), 61.1(C-6)로서 나타남을 확인하였다 (Fig. 8). CI-mass spectrum에서는 분자량이 826임이 확인 되었다 (Fig. 9). 이상과 같은 spectral data와 물리 화학적 자료로서 물질 II를 phytolaccoside E로 동정되었다 (Fig. 10). 이 물질 역시 Woo(1975)가 보고한 물질과 동일한 것으로 밝혀졌다. 이로서 본 실험에서 얻어진 두 종류의 순수단리 물질은 Kang 등 (1976)이 보고한 소염작용을 갖는 물질과 동일한 것으로 밝혀졌다.

## 생물활성실험

### 1. 식물의 초기생장에 미치는 효과

지금까지 미국자리공의 성분이 갖는 동물세포에 대한 소염작용에 관한 보고는 있으나 고등식물의 생장억제 및 고등균류의 생장에 미치는 영향 등에 관한 생물분석

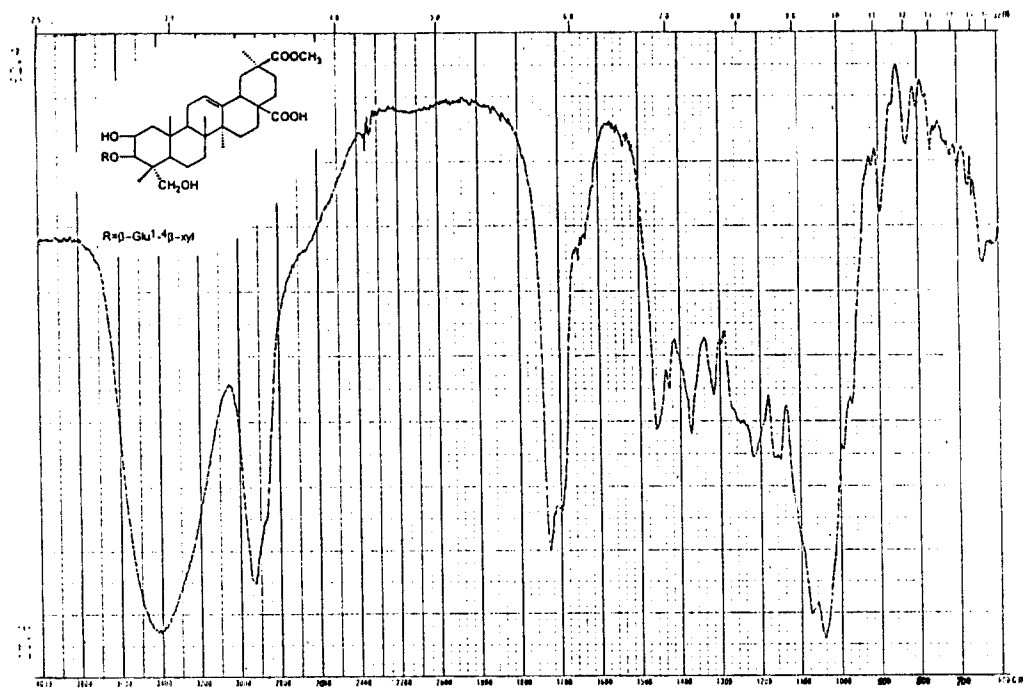


Fig. 6. IR spectrum of phytolaccoside E isolated from the root of *Phytolacca americana* (KBr disk).

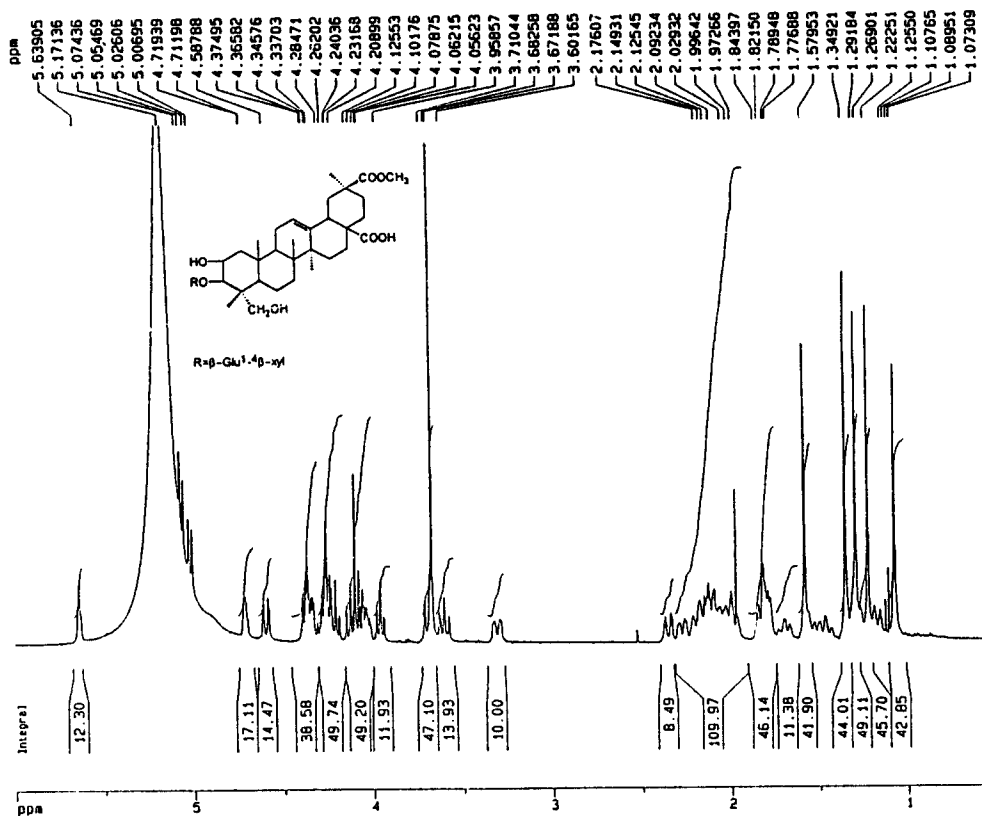


Fig. 7.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of phytolaccoside E isolated from the root of *Phytolacca americana* (Pyridine- $d_5$ , 400 MHz).

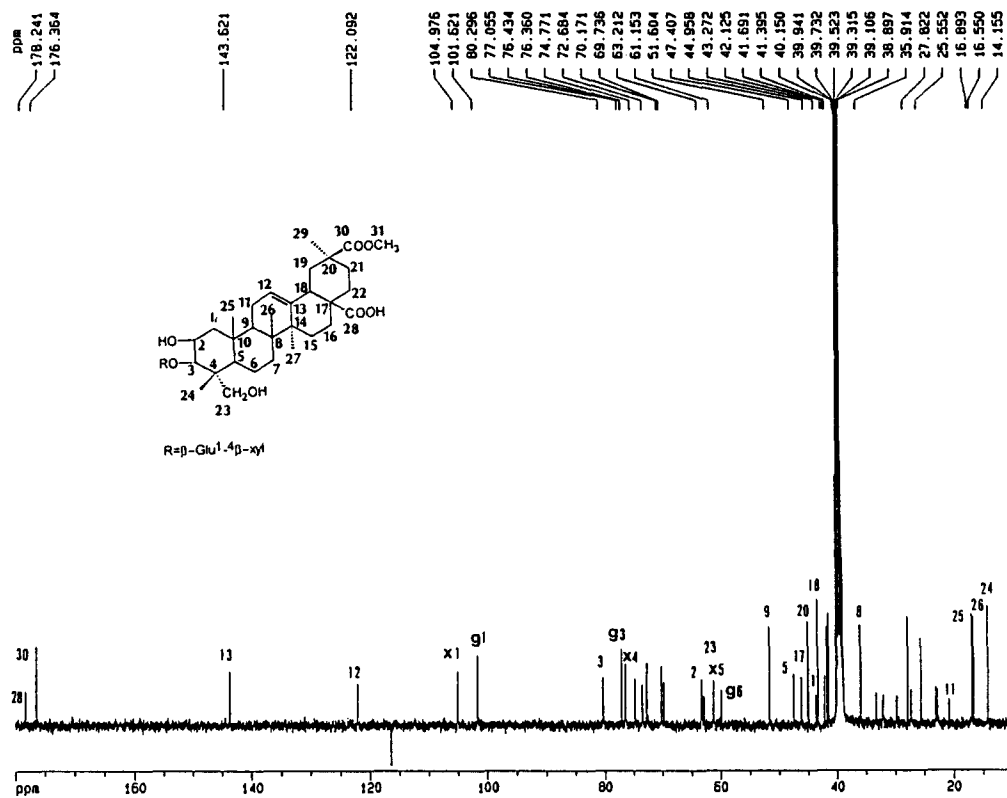


Fig. 8.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of phytolaccoside E isolated from the root of *Phytolacca americana* ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

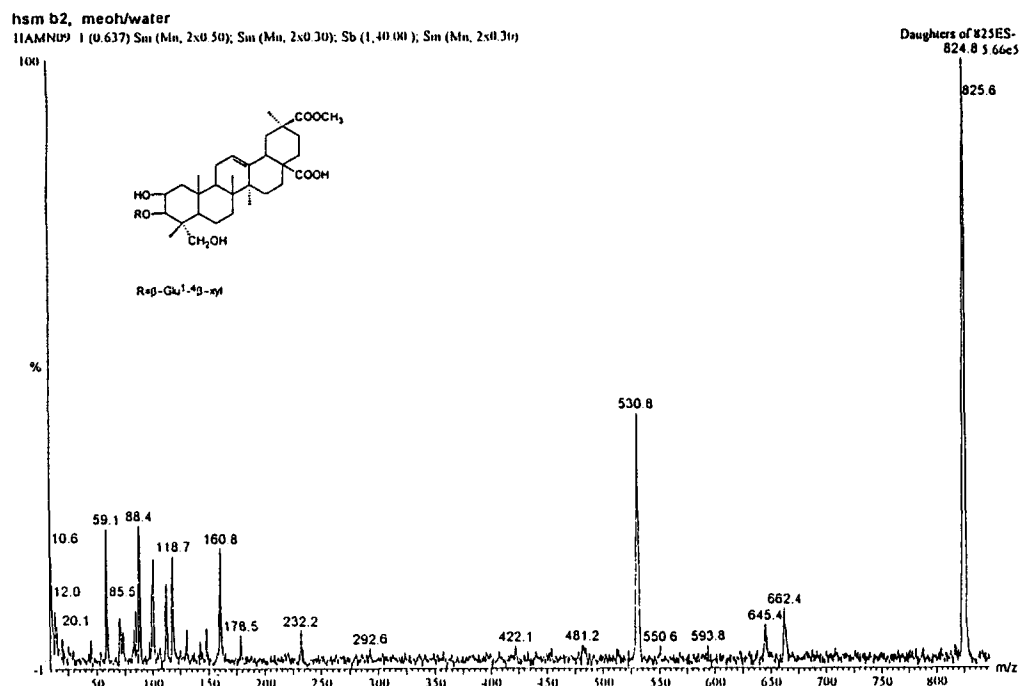
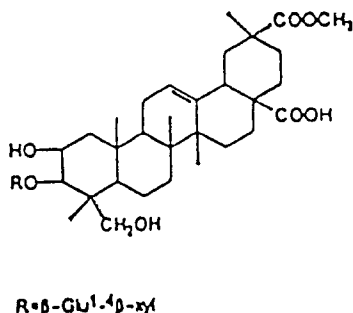


Fig. 9. MS spectrum of phytolaccoside E isolated from the root of *Phytolacca americana*.





**Fig. 10.** Structure of phytolaccoside E.

실험 (bioassay)은 적기 때문에 본 실험에서는 먼저 몇 가지의 고등식물(잡초)의 발아와 초기생장에 대해 알아 보았다. 그 결과 추출물 I, II를 식물의 종자에 처리했을 때는 발아에는 전혀 영향을 주지 않았으나, 초기생육에 있어서는 매우 강한 억제효과를 보였다. Table 1에서 보는 바와 같이 공시된 식물 전체가 shoot보다는 root의 성장이 매우 강하게 억제되었다. 또한 쇠

비름과 큰달맞이꽃 종자에서도 종자의 발아에는 영향을 주지 않았으나, 체의 생장에 있어서는 10 µg/ml의 농도로 처리했을 때는 각기 대조구에 비하여 65, 60%의 생장이 보였고, 100 µg/ml의 농도는 50, 40%의 생장을 1000 µg/ml의 농도에서는 단지 15, 10%만의 생장을 보였으며 결국에는 고사하였다. 두 가지 추출물 중 생장억제의 효과는 phytolaccoside E가 α-spinasterol 보다 더 큰 영향을 주었다. 대부분의 식물 뿌리끝이 괴사를 초래하면서 결국 식물 전체의 고사를 유발하였다. 이상의 결과로 유추해 볼 때 미국자리공의 뿌리에서 나오는 강력한 생리활성물질들은 동일한 서식지에서 생육하는 우리나라 고유종의 뿌리 생장을 크게 억제할 뿐만이 아니라, 말라 죽게까지 할 수 있는 것으로 사료되었으나, 이에 관한 더욱 상세한 연구가 있어야 할 것이다.

**2. 현탁 배양세포의 생장억제 효과**

Table 2는 포도의 현탁 세포배양계에서 세포생장에 미치는 두 가지 추출물의 첨가효과를 본 결과이다. 이

**Table 1.** The effects of α-spinasterol and phytolaccoside E on the seedling growth of some plant

Species	Organ	Treatment (µg/µl) (mean ± SE, n=10)						
		Control	α-Spinasterol			Phytolaccoside E		
			10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
<i>Lactuca sativa</i>	Shoot	20.5±1.5	19.8±1.2	19.0±1.0	14.7±1.0	11.0±1.0	8.2±0.3	1.6±0.3
	Root	30.3±1.2	22.8±1.5	15.0±0.9	12.0±1.2	8.0±1.2	1.5±0.3	0±0.0
<i>Lepidium sativum</i>	Shoot	22.0±1.2	15.9±1.3	15.1±0.9	14.1±0.9	14.8±1.0	8.7±0.9	2.8±0.3
	Root	38.0±1.2	19.8±1.3	17.8±0.6	10.3±0.9	5.0±0.6	1.5±0.6	0.7±0.6
<i>Echinochloa crus-galli</i> var. <i>frumentacea</i>	Shoot	36.5±1.3	28.5±1.5	26.5±0.6	21.2±0.6	20.1±0.6	17.3±0.3	12.7±0.9
	Root	50.3±1.3	35.0±1.2	28.0±0.3	11.5±0.6	4.0±0.9	1.5±0.3	0.7±0.3

Length of root and shoot (mm)

**Table 2.** The effects of α-spinasterol and phytolaccoside E on the cell growth of *Vitis vinifera* during suspension culture

Days treatment (µg/80 ml)	Incubation						
	0	2	4	6	8	10	
α-Spinasterol	1	2.5±0.3*	2.5±0.5	5.2±0.3	12.0±1.5	13.5±0.3	14.0±0.6
	10	2.5±0.3	2.7±1.3	2.7±0.7	6.0±0.9	8.6±0.3	9.0±0.3
	100	2.5±0.3	2.5±0.9	2.0±0.6	1.5±0.3	1.0±0.6	0±0.0
Phytolaccoside E	1	2.5±0.3	2.5±0.9	3.7±0.3	5.0±0.3	7.5±0.9	7.6±0.3
	10	2.5±0.3	2.5±0.3	2.0±0.3	1.8±0.6	1.0±0.3	1.0±0.0
	100	2.5±0.3	2.5±0.3	1.0±0.9	0±0.3	0±0.0	0±0.0
Control		2.5±0.3	4.0±0.6	12.0±0.3	17.5±0.3	22.5±0.6	23.5±0.3

\* numbers × 10<sup>6</sup> = Cells/ml, Mean ± SE (n=3)

결과에서 알 수 있듯이 양 추출물 모두 매우 크게 세포 성장을 억제하였다. 특히 플라스크당 1  $\mu\text{g}$  정도의 소량으로도 세포가 거의 죽어 버리는 것을 관찰할 수 있었다. 이들 물질에 대해 식물의 뿌리보다 현탁세포가 더욱 민감한 것을 알 수 있었다. 그것은 유리된 상태의 현탁 배양세포는 조직화된 뿌리세포보다는 세포벽형성이 (apoplast 영역의 형성) 느슨하기 때문에 보다 많은 추출물의 흡수가 빠르게 세포내로 흡수되었기 때문인 것으로 사료되었다. 따라서 식물의 세포 현탁배양계는 생리 활성물질의 탐색을 위한 적합한 실험계가 될 수 있을 것으로 여겨진다. 이 실험에서도 phytolaccoside E가  $\alpha$ -spinosterol 보다 강한 억제효과를 보였다.

### 3. 진균류의 성장억제 효과

식물병원균주 6종의 균사생장 억제효과를 disk plate 법에 의한 최소발육저지농도(MIC)로 측정한 결과, Phytolaccoside E가  $\alpha$ -spinosterol 보다 약 2배 정도 강하게 억제하는 것으로 나타났다. 그 중 효과가 가장 뚜렷한 균주로서는 *Mucor racemosus* 였고 그 다음으로는 *Phytophthora infestans*와 *Alternaria mali*였다(Table 3). 그러나 *Fusarium oxysporum*과 *Colletotrichum lagenarium*은  $\alpha$ -spinosterol에 대해서는 전혀 성장억제를 받지 않았다. 특히 토양에 가장 많이 존재하는 *Fusarium oxysporum*은 Phytolaccoside E에 대해서도 별로 영향을 받지 않았다. 이상의 결과로 식물병원성 진균들의 생장은 종에 따라 이들 두 물질에 대한 영향이 크게 다를 것을 보여 주었다. 즉 생장이 크게 억제된 것(2종)과 전혀 영향이 없는 것(2종), 약간의 영향을 받는 것(2종) 등으로 나타났다. 한편 지금까지 식물 병원성 균에 대한 미국자리공 추출물의 영향을 조사해 본 실험은 매우 드물기 때문에 토양 미생물들의 분포에 미치는 영향을 이번 결과로 가늠하기엔 무리가 많을 것으로 사료되었다.

### 4. 암세포에 대한 독성효과

미국 암연구소의 NCI manual(1972)에 따르면  $\text{ED}_{50}$  값이 약 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  정도일 때 항암작용을 인정하고 있다. 이것을 참조해 보았을 때 phytolaccoside E는 어느 정도 효과가 있다고 생각할 수 있었다(Larry et al. 1983). 그러나  $\alpha$ -spinosterol은 암세포에 대한 독성효과가 별로 없는 것으로 확인되었다(Table 4).

**Table 3.** Minimal Inhibitory Concentration(MIC) of  $\alpha$ -spinosterol and phytolaccoside E on the some fungal growth

Treatment ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$\alpha$ -Spinosterol	Phytolaccoside E
<i>Alternaria mali</i>	544*	250
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	1000	862
<i>Fusarium oxysporum</i>	1000	890
<i>Mucor racemosus</i>	200	22
<i>Phytophthora infestans</i>	280	24
<i>Rizotonia solani</i>	640	368

\* numbers are indicate quantity required for MIC( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

**Table 4.** Cytotoxicity( $\text{ED}_{50}$ ) of treatment( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) against on the two different cancer cell lines

Treatment ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$\alpha$ -Spinosterol	Phytolaccoside E	5-Fluorouacil <sup>a)</sup>
L1210	45.34*	28.12	0.02
K562	44.67	23.04	0.21

\* Cytotoxicity( $\text{ED}_{50}$ ) was evaluated by the procedure of Thayer et al. (1971).

<sup>a)</sup> Positive control.

## 적 요

미국 자리공에서 생물활성물질의 분리, 동정 그리고 생물활성검정 등을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 미국자리공의 메탄올 추출물을 용매분획하여 에틸 아세테이트 분획과 수포화 부탄올 분획에서 각각 한가지씩의 추출물 단리에 성공하여 물리화학적 분석을 통해  $\alpha$ -spinosterol과 phytolaccoside E로 동정하였다.
2.  $\alpha$ -spinosterol과 phytolaccoside E는 식물의 발아에는 영향을 주지 않으나 초기생육은 크게 억제하였다. 특히 뿌리의 괴사를 유발하여 식물체 전체의 고사를 유발하였다.
3. 포도현탁 배양세포에  $\alpha$ -spinosterol과 phytolaccoside E를 처리했을 때 두 물질 모두 강한 억제효과를 나타내었다.
4. 공시한 6종의 식물 병원성 진균들의 생장은 정도에 차이는 있을지라도 이들 두 물질에 의해 대부분이 성장억제를 받는 것으로 나타났다. 특히 *Mucor racemosus*가 가장 약해 phytolaccoside E

의 값이 약 22  $\mu\text{g/ml}$  정도에서도 생장억제가 나타나는데 반면 *Fusarium* 속은 890  $\mu\text{g/ml}$ 에서 나타나 약 40배 정도 이상 강한 것으로 나타났다.

5. 암세포에 대한 독성 실험에서는 phytolaccoside E의 경우는 어느 정도 그 효과를 생각할 수 있었으나  $\alpha$ -spinasterol은 효과가 별로 없는 것으로 확인되었다.

## 사 사

본 연구 수행에 있어서 성분분석에 큰 도움을 주신 기초과학지원연구소 질량분석 그룹 유종신 박사님께 감사드립니다.

## 인 용 문 헌

- 김상식, 윤혜옥, 장일부. 1988. 천연물과학, 서울대출판부, p. 32-50.
- 김종협, 이배암, 이지열. 1990. 미생물학 실험서, 대광문화사, 서울, p. 123-124.
- 이창복. 1989. 대한식물도감, 향문사, 서울, p. 323.
- 이호준, 김용옥, 장남기. 1997. 수 중 식물의 분비물질의 증가 발아와 균류 생장에 미치는 알레로 파시 효과. 한국생태학회지 20(3): 181-189.
- 육창수. 1997. 생약도감, 경원, 서울, p. 151-152.
- Chi, H.J. and H.S. Kim. 1985. Saponin from the callus mass of *Phytolacca americana*. Arch. Pharm. Res. 8(1): 15-20.
- Collins, S.T., R.C. Gallo and R.E. Gallagher. 1977. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture. Nature 270: 3347-3357.
- Kang, S.S. and W.S. Woo. 1987. Two new saponins from *Phytolacca americana*. Planta medica. 10: 338-340.
- Kang, S.S., W.S. Woo and C.M. Lee. 1976. Anti-inflammatory action of Phytolaccosides. Kor. J. Pharmacogn. 10(2): 95-97.
- Kang, S.S. and W.S. Woo. 1986. Triterpenes from the seed of *Phytolacca* sp. Kor. J. Pharmacogn. 17(1): 55-61.
- Kil, B.S., K.W. Yun, S.Y. Lee and D.M. Han. 1994. Influence of chemicals from *Artemisia argyi* on the growth of selected species of plants and microorganisms. Korean J. Ecol. 17(1): 23-35.
- Larry, M.W., A.M. Joye, L.D. Patricia and K.M. Cindy. 1983. A novel dye exclusion method for testing *in vitro* chemosensitivity of human tumor. Cancer reserch. 43: 749-757.
- National Cancer Institute(NCI) USA. 1972. Cell culture technical procedure.
- Natural Products Research in Korea. 1996. A half century of achievements. Nutural Products Research Institute of the Seoul National University. p. 421.
- Raju, M.V.S., A.I. Hsiao and G.I. McIntyre. 1986. Seed dormancy in *avena fatua*. III. the effect of mechanical injury on the growth and development of the root and scutellum. BOT. GAZ. 147(4): 443-452.
- Raju, M.V.S., A.I. Hsiao and G.I. McIntyre. 1988. Seed dormancy in *Avena fatua*. IV. Further observations on the effect of mechanical injury on water uptake and germination in different prue lines. BOT. GAZ. 149(4): 419-426.
- Ryu, S.H., K.H. Moon and M.Y. Pack. 1982. Primary screening for growth inhibition of L1210 cells from oriental herbs. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioengol. 10: 53-65.
- Thayer, P.S., P. Himnelfarb and G.L. Watt. 1971. National cancer institute manual. Cancer Chemother. Rep. 2: 1-20.
- Woo, W.S. 1975. The structure of esculentic acid : A new triterpence from *Phytollaca esculenta*. Phytochem. 14: 1885-1888.
- Woo, W.S. and S.S. Kang. 1974. The structure and stereochemistry of Phytolaccagenic acid. Yakkak Hoeji. 18: 231-235.
- Woo, W.S. and S.S. Kang. 1987. Triterpenoids and sterols from seeds of *Phytolacca esculenta*. Phytochem. 24: 1116-1117.

(1997년 11월 8일 접수)