

## 재배 복령(*Poria cocos* Wolf)의 Triterpenoids 분획의 항균 활성 및 항암 활성

권미선 · 정신교<sup>†</sup> · 최종욱 · 송경식\* · 이인선\*\*

경북대학교 식품공학과

\*경북대학교 농화학과

\*\*계명대학교 식품가공학과

### Antimicrobial and Antitumor Activity of Triterpenoids Fraction from *Poria cocos* Wolf

Mi-Sun Kwon, Shin-Kyo Chung<sup>†</sup>, Jong-Uck Choi, Kyung-Sik Song\* and In-Seon Lee\*\*

Dept. of Food Science and Technology, and

\*Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

\*\*Dept. of Food Science and Technology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

#### Abstract

Seven fractions were separated by silica gel chromatography from the diethyl ether soluble portion of the methanolic extract of the cultured hoelen(*Poria cocos* Wolf). Three fractions were separated from the Fr. II and Fr. IV by rechromatography, respectively. The most active fraction, Fr. II-3 and Fr. IV-3, were separated to 2 and 4 fractions by preparative HPLC. On the result of antimicrobial test, triterpenoids fractions showed weaker effect than benzoic acid but Fr. II-3-1, Fr. II-3-2 had an excellent antimicrobial activity. Triterpenoids fraction of hoelen(*Poria cocos* Wolf) showed a high inhibition activity on the growth of lung cancer, ovary cancer, skin cancer, central nerve cancer and rectum cancer cell, especially the activity of Fr. II-3-1 and Fr. II-3-2 was the highest.

**Key words:** hoelen, triterpenoid, antimicrobial activity, anticancer activity

#### 서 론

복령(*Poria cocos* Wolf)은 소나무류를 절제한 5~6년 후 송근 주위에 기생하는 균핵으로 담백색을 백복령, 담갈색을 적복령, 송근을 포함하고 있는 것을 복신이라 한다(1). 복령의 주성분은 탄수화물, 수분, 조섬유질, 무기물 및 미량의 단백질 등이며(2), 이뇨작용, 진정작용, 심장수축강화작용 등이 있는 것으로 알려져 있다(3). 최근 복령의 항암 효과에 관하여 많은 연구(4-9)가 진전되고 있는데 Chihara 등(5)은 복령의 주성분인 복령다당체 pachyman의  $\beta$ -(1-6) linked branch를 제거하므로  $\beta$ -(1-3) linked glucan으로만 구성된 pachyman을 얻었다. 이때, 항종양 활성이 없는 pachyman이 pachyman으로서의 탁월한 항종양활성을 갖는다고 하였다. 그러나 pachyman은 물에 용해되지 않는 단점을 가지고 있으며, 이를 해결하기 위해 pachyman을 isopropanol, 30% aqueous sodium hydroxide, monochloroacetic acid 등과 혼

합시켜 water soluble carboxymethyl-pachyman을 얻었으며, 이것은 우수한 항종양 활성을 갖는다고 보고하였다. 또한 Takao 등(6)은 복령균핵의 내부조직으로부터 분리한 균사를 액체배양하여 얻은 균사체를 petroleum ether 등의 용매로 추출하여 soluble components를 제거한 후 남은 균사체에 6M-urea를 처리하여 crude polysaccharides를 얻어 U-pachyman fra 명명하고 구조는 pachyman과 유사하나 항암활성이 있음을 보고하였으며, Kanayama 등(7)은 mouse 종양 sarcoma-180에 대하여 강한 항종양 활성을 나타내는 물질로 (1,3)-(1,6)- $\beta$ -D-glucan에 관하여 보고하였다. 또한 복령 중의 triterpenoids성분은 향구토, 향염증, 향피부암 등의 효과를 가지며(8,9), pachymic acid, dehydropachymic acid, tumulosic acid, dehydrotumulosic acid, ergosterol, eburicoic acid, dehydroeburicoic acid 등을 분리하여 보고하였다(4,10-12). 국내에서도 본 연구진에 의해 자연산 및 재배 복령이 폐암, 난소암, 피부암, 중추신경암, 직장암 세

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

포 성장에 강한 저해활성을 가지는 것이 밝혀진 바 있다 (13). 이어서 본인 등은 재배 복령 중 triterpenoids 성분을 분리 분획하여 항균성 및 항암 활성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용된 국내 재배산 백복령(*Poria cocos* Wolf)은 1997년 10월 중순경 구미시 소재 농원에서 채취하여 45°C에서 열풍 건조한 후 80~100 mesh로 분쇄하여 분석용 시료로 이용하였다.

### 복령의 triterpenoids의 분리 및 정제

복령의 triterpenoids는 Tai 등의 방법(4)에 따라 Fig. 1과 같이 분리, 정제하였다. 분말 시료(1kg)를 MeOH 5L 씩 2회 환류추출한 후 감압농축하여 MeOH 조추출물을 얻었다. 이 MeOH 조추출물을 증류수 1L로 부유시켜 ethyl ether로 3회 추출하여 ethyl ether층과 H<sub>2</sub>O층으로 나누고, ethyl ether층을 감압농축하여 갈색의 ethyl ether 추출물을 얻었다. Ethyl ether 추출물을 CHCl<sub>3</sub>과 MeOH을 용매로 용매의 극성을 높이면서(CHCl<sub>3</sub>→CHCl<sub>3</sub>:MeOH,

4:1, v/v) silica gel column chromatography를 실시하여 Fr. I ~ Fr. VII을 얻었다. Fr. II, IV, V는 다시 silica gel column chromatography를 실시하여 정제하고 이들 분획의 UV spectrum을 관찰하였으며, 항균활성과 수율이 우수한 Fr. II-3과 Fr. IV-3은 preparative HPLC(LC-10A, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 정제하였다. 이때 사용된 칼럼은 econosphere silica 10U(250×10mm i.d., Alltech Co., USA), 용매는 CHCl<sub>3</sub>→CHCl<sub>3</sub>:MeOH (4:1, gradient, 50 min), 이동속도는 2ml/min, 검출기는 UV(242nm)이었다. Preparative HPLC로 정제하여 얻은 각 분획은 triterpenoid 성분임을 확인하기 위하여 TLC로서 Liebermann-Burchard test(14)를 실시하였다. 이때 전개용매는 CHCl<sub>3</sub>:MeOH(19:1), TLC plate는 silica gel 60 F<sub>254</sub>(20×20×0.25cm), 발색시약으로 Liebermann-Burchard 시약을 사용하였다.

### 항균성 시험

복령의 항균성 시험은 paper disc(Toyo 27, 8mm)를 이용하여 agar diffusion법(15)으로 행하였다. 고체배지에 미리 배양한 균액 100μl를 멸균 도말봉으로 도말하고 pa-

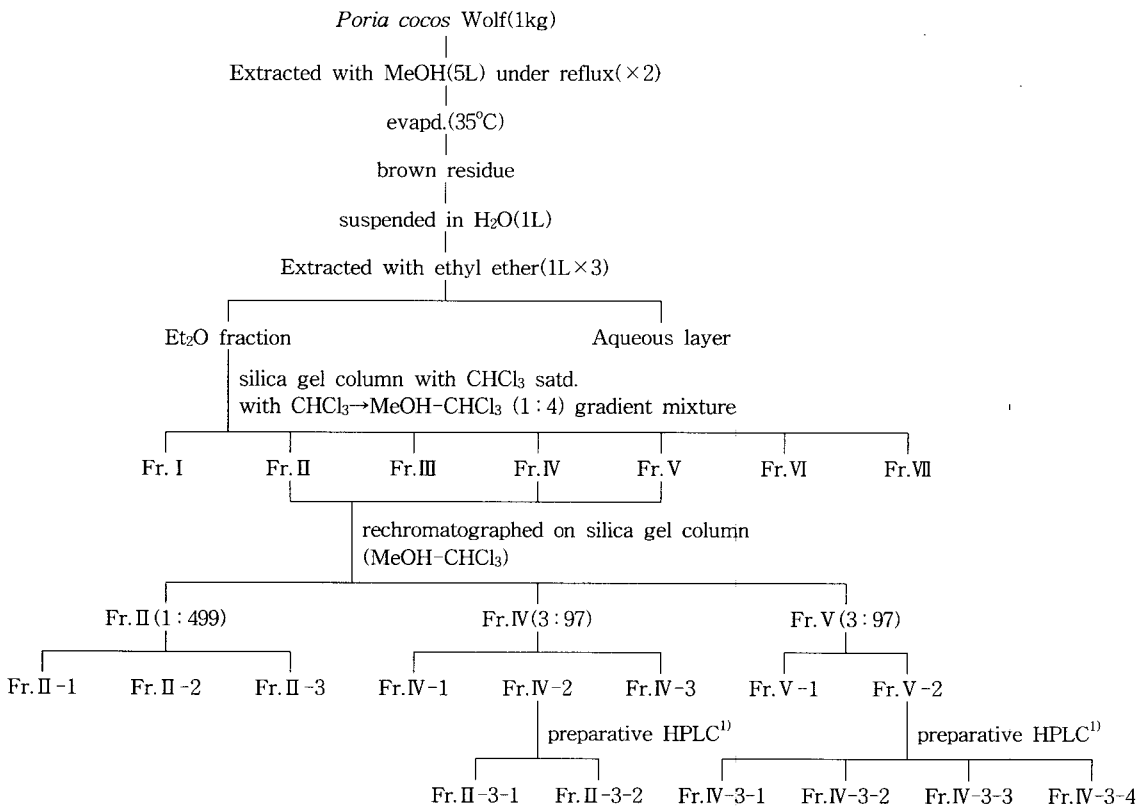


Fig. 1. Isolation procedure of the compounds from *Poria cocos* Wolf.

<sup>1)</sup>Column: Econosphere Silica 10U, 250×10mm i.d., Mobile phase: CHCl<sub>3</sub>→MeOH-CHCl<sub>3</sub>(1:4), gradient, Flow rate: 2ml/min, Detector: UV 242nm

per disc를 plate 표면에 얹은 후 각 추출물 80 $\mu$ l씩 흡수시킨 다음 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 disc주위의 inhibition zone의 직경(mm)으로 항균 활성을 측정하였다. 식품보존제로 광범위하게 이용되고 있는 benzoic acid를 대조구로 사용하여 비교하였다. 이때에 사용한 균주는 *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 11105, *Staphylococcus aureus* ATCC 6583, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10490, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 44888이며, 배지는 nutrient agar 배지를 사용하였다.

#### 암세포 성장 저해활성 검증

복령의 암세포 성장 저해활성 시험은 Skehan 등의 방법(16)에 따라 행하였다. 본 연구에서 사용된 암세포주는 A-549(폐암), DK-OV-3(난소암), SK-MEL-2(피부암), XF498(중추신경암) 및 HCT15(직장암)이고 RPMI 1640 배지에서 유지시켰으며 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 세포주를 각각 4.4 $\times$ 10<sup>4</sup>, 2.2 $\times$ 10<sup>5</sup> cell/ml로 RPMI 1640 배지에서 희석하여 microplate에 well당 0.2ml씩 접종하고 DMSO에 용해한 검체를 0.1%의 최종농도로 첨가하여 배양하였다. 4일간 배양된 세포를 단일세포부유액으로 만든 후 세포를 침전시키고 well당 80% TCA(trichloroacetic acid) 50 $\mu$ l를 가하여 4°C에서 2시간 정체 후 증류수로 10회 이상 세척하였다. Microplate를 speed-vac에서 건조시킨 후 1% 초산에 용해된 0.4% SRB(sulfurhadamine B)용액을 100 $\mu$ l씩 첨가하고 30분간 상온에서 정체하였다. 이후 1% 초산으로 10회 이상 세척 후 건조하고 10mM Tris base 100 $\mu$ l를 가하여 용해시킨 다음 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

재배 복령(*Poria cocos* Wolf)의 triterpenoids의 분리

재배 복령의 triterpenoid 성분을 분리하기 위하여 다시 silica gel column chromatography를 실시하여 Fig. 2와 같이 Fr. II-1, Fr. II-2, Fr. II-3, Fr. IV-1, Fr. IV-2, Fr. IV-3을 얻었다. 이들의 UV흡수 스펙트럼을 살펴본 결과는 Fig. 3과 같이 224~236nm와 241~243nm에서 흡수대를 보였다. 이는 문헌치와 비교하여 242nm에서 UV 흡수대를 나타내는 dehydropachymic acid(11), 3-epidehydropachymic acid(4), poricoic acid 유도체(12,17), methyl 25-hydroxyl-3-epidehydrotumulosate(4), 234nm에서 UV 흡수대를 나타내는 3-epidehydrotumulosic acid(4), dehydrotumulosic acid(4)와 유사하였다. 이외에도 지금까지

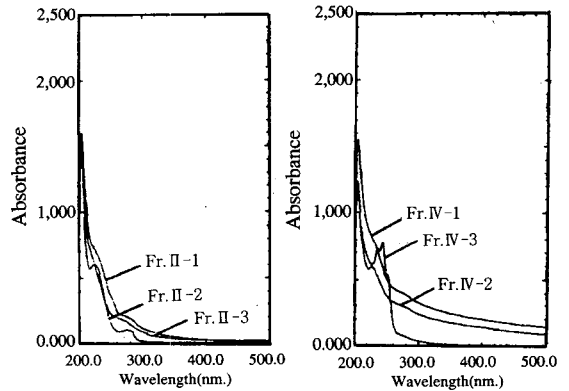


Fig. 2. UV spectrum of silica gel column fractions of *Poria cocos* Wolf. A: Fr. II, B: Fr. IV

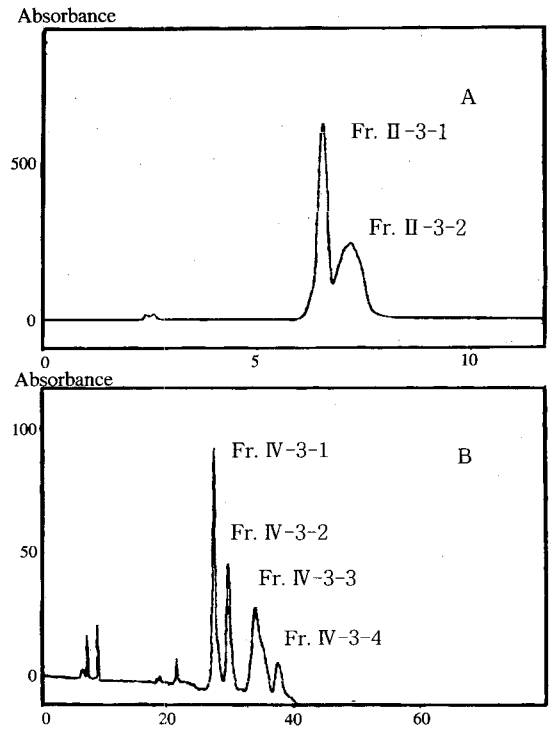


Fig. 3. Preparative HPLC chromatogram of silica gel column fraction from *Poria cocos* Wolf. A: Fr. II-3, B: Fr. IV-3

지 복령 중의 triterpenoids로는 pachymic acid(10,11), trametenolic acid(10,12), eburicoic acid(12), 16 $\alpha$ -hydroxy-trametenolic acid(9), 3-*o*-acetyl-16 $\alpha$ -hydroxydehydro-trametenolic acid(18) 등이 밝혀졌다. Fr. II-3과 Fr. IV-3을 preparative HPLC로 분획하여 Fr. II-3에서 2개, Fr. IV-3에서 4개의 분획물을 얻었다. 이들 모든 분획물에 대해 silica gel plate를 사용하여 TLC로서 Liebermann-Burchard test를 실시한 결과 Table 1과 같으며 모두 양성(적갈색 반점)을 나타내므로 triterpenoid 화합물로 추정되었다.

**Table 1. Rf values of each fractions from *Poria cocos* Wolf by TLC**

Fractions	Rf	LB test <sup>1)</sup>
Fr. II-3	0.08, 0.19	+
Fr. II-3-1	0.19	+
Fr. II-3-2	0.07	+
Fr. IV-3	0.43, 0.38, 0.24, 0.20	+
Fr. IV-3-1	0.43	+
Fr. IV-3-2	0.37	+
Fr. IV-3-3	0.28	+
Fr. IV-3-4	0.17	+

<sup>1)</sup>Liebermann-Burchard test.

### 분리된 triterpenoids의 항균성 및 항암 활성

복령에서 분리한 triterpenoids 분획물을 이용하여 식품 부패미생물 및 유산균에 대한 항균성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. Kwon 등(13)이 보고한 복령의 열수 추출물과 에탄올 추출물에 비해 triterpenoids 분획물의 항균 활성이 더 우수하게 나타났다. 이들 triterpenoids 분획물의 항균활성은 거의 유사하였으며, 특히 Fr. II의 활성이 가장 우수하였다. 또한 현재 식품 보존제로 이용되는 ben-

zoic acid에 비해 triterpenoids 분획물의 활성은 조금 약하게 나타났지만, 모든 분획물이 항균활성을 가졌다.

복령에서 분리한 triterpenoids 분획물을 silica gel chromatography 및 HPLC로 더욱 정제하여 식품 부패 미생물 및 유산균에 대한 항균성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. Triterpenoids 분획물을 정제한 결과 항균력이 더욱 높아졌고, Fr. II에서 분리한 분획물의 활성이 우수하였으며, 특히 Fr. II-3-1과 Fr. II-3-2의 활성이 높았다. 또한 현재 식품보존제로 이용되는 benzoic acid보다는 조금 약한 항균력을 나타내었지만 복령의 triterpenoids는 비교적 높은 항균력을 나타내므로 새로운 천연 항균소재의 식품보존제로서의 이용가능성이 있다고 사료된다.

복령에서 분리한 triterpenoids 분획물의 항암성을 조사하기 위하여 Fr. II-3, Fr. II-3-1, Fr. II-3-2, Fr. IV-3, Fr. IV-3-1, Fr. IV-3-2를 농축한 후 다시 DMSO에 녹인 각 시료를 암세포주 A-549(폐암), SK-OV-3(난소암), SK-MEL-2(피부암), XF498(중추신경암), HCT15(직장암)의 세포주에 가하여 4일간 배양하면서 암세포의 성장을 측정된 결과는 Table 4에 나타내었다. 복령에서 분리한

**Table 2. Antimicrobial activity of each fraction of *Poria cocos* Wolf**

Sample	Strain	Clear zone (mm)								
		<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
Et <sub>2</sub> O Fr.	- <sup>1)</sup>	12	11	-	-	-	9	11	9	
Fr. I	11	12	11	-	11	9	10	13	12	
Fr. II	13	11	13	13	12	13	10	13	10	
Fr. III	-	12	11	-	-	-	13	15	11	
Fr. IV	10	10	11	10	10	9	10	14	10	
Fr. V	9	10	-	-	9	9	10	10	9	
Fr. VI	10	12	11	-	10	12	10	12	13	
Fr. VII	-	-	13	-	-	-	10	12	10	
Benzoic acid	22	20	16	17	18	18	22	21	22	

Each values represented the means of triplications; Dose, 0.8mg/disc;

<sup>1)</sup>No inhibition zone was formed.

**Table 3. Antimicrobial activity of each fraction of *Poria cocos* Wolf**

Sample	Strains	Clear zone (mm)							
		<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>S. enteritidis</i>
Fr. II-1	12	19	15	15	-	14	-	-	
Fr. II-2	14	17	15	-	-	16	-	-	
Fr. II-3	13	12	13	12	16	14	-	14	
Fr. II-3-1	13	15	12	13	12	13	11	16	
Fr. II-3-2	12	13	11	13	10	11	9	14	
Fr. IV-1	- <sup>1)</sup>	-	-	-	12	17	-	-	
Fr. IV-2	13	-	-	-	-	13	-	-	
Fr. IV-3	13	12	-	13	13	14	-	13	
Fr. IV-3-1	13	12	10	11	12	13	9	12	
Fr. IV-3-2	12	10	10	11	10	10	-	11	
Fr. V-1	-	13	-	-	-	-	-	-	
Fr. V-2	15	-	-	-	-	-	-	-	
Benzoic acid	13	18	14	13	15	16	-	14	

Each values represented the means of triplications; Dose, 0.4mg/disc;

<sup>1)</sup>No inhibition zone was formed.

Table 4. Cytotoxic activity of triterpenoids of *Poria cocos* Wolf against human tumor cell lines

Sample	Cell	ED <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/ml)				
		A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
Fr. II-3		16.70	15.83	29.24	27.81	15.86
Fr. II-3-1		11.02	10.25	33.53	26.72	11.84
Fr. II-3-2		10.94	11.32	19.63	17.06	9.22
Fr. IV-3		13.14	13.69	31.27	28.70	12.36
Fr. IV-3-1		28.71	32.81	43.28	34.64	24.74
Fr. IV-3-2		64.72	60.87	61.49	58.84	43.75

<sup>1)</sup>The 50% inhibition activity of adriamycin in 0.1μg/ml; The values are means of triplications.

triterpenoids 분획물은 조사된 모든 암세포에 대하여 높은 성장 저해활성을 보였다. 이는 Kwon 등(13)이 보고한 복령의 열수 추출물과 에탄올 추출물에 비해 높은 성장 저해 활성을 보였다. 특히 Fr. II-3-1과 Fr. II-3-2는 조사된 5개의 암세포주에 대해 높은 성장 저해 활성을 나타내었다. Nukaya 등(9)은 복령 메탄올 추출물에서 분리한 triterpene carboxylic acid가 TPA(12-*o*-tetradecanoylphorbol 13-acetate)의 주입으로 유도된 쥐 귀의 부종 (swelling)을 억제한다고 보고하였다. 그러나 국내에서는 복령의 triterpenoids 분획물의 항암 활성에 대한 연구는 보고된 바 없어 향후 분리된 triterpenoid 성분의 기기분석을 통한 화학적 구조 동정 및 관련 생리활성에 대한 연구가 요망된다.

## 요 약

복령의 메탄올 조추출물로 silica gel column chromatography를 실시하여 7개의 분획물을 얻었다. Fr. II와 Fr. IV를 다시 silica gel column chromatography를 실시하여 각각 3개의 분획물로 분리하였다. Fr. II-3과 Fr. IV-3은 preparative HPLC로 각각 2개, 4개의 획분을 분리하였다. 복령에서 분리, 정제한 triterpenoids 분획물의 항균활성을 측정할 결과 식육보존제로 이용되는 benzoic acid보다는 조금 약한 활성은 나타내지만, 비교적 우수한 활성을 나타내었으며 특히 Fr. II에서 분리한 분획물들의 항균력이 높았다. 복령에서 분리한 triterpenoids 분획물은 조사된 폐암, 난소암, 피부암, 중추신경암, 직장암에 대하여 높은 성장 저해 활성을 나타내었으며, 특히 Fr. II-3-1과 Fr. II-3-2에서 암세포에 대한 성장저해 활성이 가장 높았다.

## 감사의 글

본 연구는 경상북도 농촌진흥원의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. 李相仁 : 本草學. 學林社, p.281(1986)
2. Saito, H., Misaki, A. and Harada, T. : A comparison of

- the structure of curdan and pachyman. *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 1261-1269(1968)
3. 韓國成人病研究會 : 東醫寶鑑. 三星文化社, p.276, 362(1991)
4. Tai, T., Shingu, T., Kikuchi, T., Tezuka, Y. and Akahori, A. : Triterpenes from the surface layer of *Poria cocos*. *Phytochemistry*, **39**, 1165-1169(1995)
5. Chihara, G., Hamuro, J., Yamashita, Y., Ohsaka, Y. and Maeda, Y. : Carboxymethylpachymaran, a new water soluble polysaccharide with marked antitumour activity. *Nature*, **233**, 486-488(1971)
6. Takao, N., Takahashi, N., Kobayashi, M. and Shoji, S. : A polysaccharide by laboratory cultivation of *Poria cocos* Wolf. *Carbohydrate Research*, **87**, 161-163(1980)
7. Kanayama, H., Adachi, N. and Togami, M. : A new anti-tumor polysaccharide from the mycelia of *Poria cocos* Wolf. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1115-1118(1983)
8. Tai, T., Akita, Y., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K. and Watanabe, K. : Anti-emetic principles of *Poria cocos*. *Plant Medica*, **61**, 527-530(1995)
9. Nukaya, H., Yamashiro, H., Fukazawa, H., Ishida, H. and Tsuji, K. : Isolation of inhibitors of TPA-induced mouse ear edema from hoelen, *Poria cocos*. *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 847-849(1996)
10. Tai, T., Mikage, M., Tsuda, Y. and Akahori, A. : Analytical studies on *Poria cocos* II. The relationship between the triterpene contents and the color for the sclerotium. *Nature Medicines*, **48**, 219-222(1994)
11. Tai, T., Akahori, A. and Shingu, T. : A lanostane triterpenoid from *Poria cocos*. *Phytochemistry*, **31**, 2548-2549(1992)
12. Tai, T., Akahori, A. and Shingu, T. : Triterpenes of *Poria cocos*. *Phytochemistry*, **32**, 1239-1244(1993)
13. Kwon, M. S., Chung, S. K., Choi, J. U., Song, K. S. and Kang, W. W. : Quality and functional characteristics of cultivated hoelen(*Poria cocos* Wolf) under the picking date. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 1034-1040(1998)
14. 우원식 : 천연물 화학 연구법. 민음사, p.151(1993)
15. Davidson, P. M. and Parish M. E. : Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.*, **1**, 148(1989)
16. Skehan, P., Storeng, R. and Scudiero, D. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat. Can. Ins.*, **82**, 1107-1112(1990)
17. Tai, T., Akahori, A. and Shingu, T. : Triterpenes from *Poria cocos*. *Phytochemistry*, **30**, 2796-2797(1991)
18. Tai, T., Shingu, T., Kikuchi, T., Tezuka, Y. and Akahori, A. : Isolation of lanostane-type triterpene acids having an acetoxyl group from sclerotia of *Poria cocos*. *Phytochemistry*, **40**, 225-231(1995)

(1999년 7월 10일 접수)