

무릇에서 분리한 nortriterpenoid glycoside의 암세포에 대한 세포독성 및 함량 분석

이상명 · 전효곤 · 이충환 · 이호재 · 강신정¹ · 맹학영¹ · 고영희*

한국생명공학연구원, ¹충부대학교 생명자원학부

Cytotoxicity and Quantitative Analysis of Nortriterpenoid glycoside from *Scilla scilloides*

Sang-Myung Lee, Ho-Jae Lee, Hyo-Kon Chun, Choong-Hwan Lee,
Shin-Jyung Kang¹, Hack-Young Maeng¹ and Yung-Hee Kho*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600,

¹Department of Life Science, Joongbu University, Keumsan, Chungnam 312-702, Korea

Abstract – Scillascilloside E-3 (**1**) and E-1 (**2**) were isolated from the bulbs of *Scilla scilloides*. The cytotoxic activities of these compounds were tested against murine (B16/F-10, 3LL) and human cancer cell lines (MCF7, PC-3, HT29, LOX-IMVI, A549 and HT1080). These compounds exhibited a significant cytotoxic activities against all tested cancer cells. Furthermore, the contents of **1** and **2** in *S. scilloides* are 43.2 and 27.9 mg/kg, respectively.

Key words – *Scilla scilloides*, Scillascilloside E-3, Scillascilloside E-1

백합과에 속하는 무릇(*Scilla scilloides*)의 전초 또는 인경을 건조한 것을 면조아(綿囊兒)라고 하며 이는 혈행개선, 해독, 종기치료 및 지통의 효능과 아울러 항암작용이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 민간에서는 이 식물을 채취하여 식용하기도 한다. 신선한 무릇 인경의 ethyl acetate 가용부에서 다양한 spirocyclic nortriterpenoid가 보고되어 있으며²⁾ 이 식물의 butanol 가용부에서 분리된 nortriterpenoid oligosaccharide는 HeLa cell의 phospholipid에 개입하는 phosphorus와 12-O-tetradecanoylphobol 13-acetate(TPA) 간의 상호작용을 방해하여 세포의 증식을 억제하는 작용을 가지는 것으로 알려져 있다.³⁾ 본 연구자 등은 이미 국내 자생식물 273종에서 항종양 활성 탐색실험을 행하여 무릇의 methanol 추출물에서 강한 세포독성이 있음을 보고한 바 있다.⁴⁾ 이러한 연구의 일환으로 무릇

에서 MCF 등 6종의 carcinoma 종양세포 및 1종의 melanoma 암세포의 증식을 억제하는 물질인 nortriterpenoid oligosaccharide인 scillascilloside E-3 (**1**), E-1 (**2**)을 분리하였다. 또한 이 화합물들의 식물시료에서의 함량과 열에 대한 화학적 안정성을 HPLC에 의한 분석법으로서 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기 – 추출 및 분리에 사용한 무릇은 10월경에 대전 인근 야산에서 채집하여 감별한 후 세절하고 음건하여 사용하였으며, 증거표본(CNU 0321)은 충남대학교 약학대학 생약표본실에 보관되어 있다.

기기 및 시약 - IR spectrm은 IR Spectrophotometer Jasco Report-100을 사용하여 KBr disk법으로 측정하였으며, ¹H-, ¹³C-NMR spectrm은 Bruker AC

*교신저자 : Fax : 042-860-4595

300을 사용하였으며, 화학적 이동(δ)은 solvent signal을 기준으로 하였다. Mass spectrum은 Nermag R10-10 Spectrometer(direct insertion)를 사용하여 측정하였다. Column chromatography에 사용한 고정상은 YMC Gel ODS-A(S-50 μ m)를 사용하였으며 TLC는 aluminium backed kieselgel 60 GF254 plates(Merck)를 사용하였으며 이동상은 BuOH : MeOH : H₂O (4:1:1)로 전개하였다. 또한 발색은 10% sulfuric acid (in H₂O)를 분무한 후 10분간 110°C로 가열하였다.

추출 및 분리 - 음건하여 세절한 무릇의 전초(3 kg)에 MeOH를 가하고 12시간씩 3회 냉침하여 추출한 후 감압농축하여 MeOH ex. 35 g을 얻었으며, 이를 물에 현탁시키고 ethyl acetate로 추출한 후 BuOH로 추출하고 농축하여 ethyl acetate 분획 (1.2 g) 및 BuOH 분획(15 g)을 얻었다. 얻어진 BuOH 분획을 Sephadex LH 20을 고정상으로 하여 MeOH로 용출하였으며, 분획은 각 500 mL로 하였다. 이렇게 하여 얻어진 3번째 분획을 다시 ODS(YMC-pak)를 고정상으로 한 칼럼에서 MeOH(75%)로 용출하였으며, 이 방법을 반복하여 실시하여 scillascillose E-3(1, 98 mg), E-1 (2, 21 mg)를 얻었다.

Scillascillose E-3 (1) - white powder (aq. MeOH); mp 218-221°C; IR ν_{\max} (KBr)cm⁻¹: 3400, 1735; [α]_D: -51.9°(MeOH; c 0.3); ESI-MS (*m/z*): 1303.6 (M+Na)⁺, 1279.7 (M-H)⁻; ¹H-NMR: 1.94 (3H, s, OAc), 0.84 (3H, s, H-18), 0.89 (3H, s, H-19), 1.03 (2H, overlap, H-21); ¹³C-NMR (Table 1).

Scillascillose E-1 (2) - white powder (aq. MeOH); mp 221-223°C; IR ν_{\max} (KBr)cm⁻¹: 3350, 1720; [α]_D: -62.3 (MeOH; c 0.3); ESI-MS (*m/z*): 1245.6 (M+Na)⁺, 1221.7 (M-H)⁻; ¹H-NMR: 0.89 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 1.54 (3H, s, H-30), 1.52 (3H, s, H-32); ¹³C-NMR (Table 1).

함량분석을 위한 시료의 전처리 (검액 A) - 채취한 무릇은 신선한 상태에서 세절한 후 20 g을 정밀히 달고 500 mL 플라스크에 넣은 후 메탄올 80 mL을 가하여 상온에서 24시간동안 진탕 추출하였다. 이렇게 추출한 시료용액은 100 mL 용량플라스크에 여과하여 옮긴 후 메탄올을 가하여 표선을 채웠다. 이 액을 0.2 μ m 막여과기로 여과하여 검액 A로 하였다.

열안정성확인을 위한 시료의 전처리 (검액 B) - 신선한 무릇을 세절한 후 20 g을 정밀히 달아 500 mL 용 등근플라스크에 넣은 후 메탄올 80 mL을 가하여

Table 1. ¹³C-NMR Data^a of scillascillose E-3 (1) and E-1 (2)

C No.	1	2	C No.	1	2
1	35.7	35.7	19	19.5	19.5
2	27.4	27.4	20	49.5	43.7
3	88.9	89.0	21	15.4	17.3
4	44.3	44.4	22	82.0	36.8
5	51.8	51.8	23	85.0	81.6
6	18.7	18.7	24	208.8	212.6
7	27.0	26.9	25	33.3	32.4
8	135.0	135.3	26	7.6	7.7
9	135.9	135.9	30	23.1	23.2
10	36.7	36.8	31	63.1	63.2
11	21.1	21.1	32	26.4	26.4
12	25.2	25.4	OAc	20.8	
13	49.8	48.8		169.8	
14	50.4	50.8	L-rha.p ^b	102.0	102.0
15	32.5	32.4	L-ara.f ^b	101.1	101.1
16	40.1	39.7	L-glc.p ^b	106.0	106.0
17	97.4	97.1	L-glc.p ^b	102.5	102.4
18	19.3	19.3	L-glc.p ^b	104.3	104.3

^aSpectra were measured in pyridine-*d*₅

^bData of anomeric carbons

24 시간 동안 환류 추출하였다. 100 mL 용량플라스크에 여과하여 옮긴 후 메탄올을 가하여 표선을 채웠다. 이 액을 0.2 μ m 막여과기로 여과하여 검액 B로 하였다.

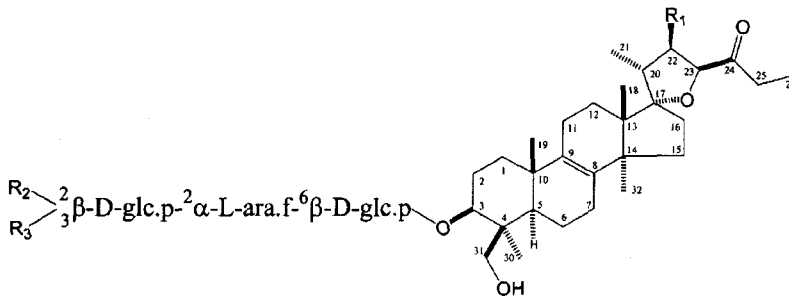
표준검량선 작성 - 무릇으로부터 분리한 화합물 1, 2는 각각 250.0, 125.0, 62.5, 31.3 mg/mL로 배수희석하여 검량선을 작성하기 위한 표준액으로 하였다. 각각의 표준용액 10 μ L씩을 취하여 3회 반복하여 HPLC chromatogram을 얻고 이로부터 농도와 peak 사이의 검량선을 작성하였다.

세포독성의 측정 - 세포독성의 측정은 NCI의 방법에 따라서 시행하였다.⁵⁾ 세포주의 loading하는 농도는 세포주의 성장속도에 따라서 다르게 하였다. 각각의 세포주는 0 day에 loading을 한 후에 약물을 처리하는 날에 time zero plate를 만들어 계산시에 영점으로 계산하였다. 시료는 30.0, 10.0, 3.0, 1.0, 0.3 mg/mL의 농도로 희석하여 용매의 최종농도가 0.1%가 되도록 처리하였다. 고정판 plate는 4°C에서 60분간 방치한 뒤 상수로 4-5번 정도 세척하였다. 세척한 plate는 건조한 후 SRB(sulforhodamine B) 정량법⁵⁾으로 세포독성을 측정하였다.

Table 2. Cytotoxicities of scillascoside E-3 (1) and E-1 (2)

compound	ED ₅₀ (µg/mL)							
	MCF7	PC-3	HT-29	LOX-IMVI	A549	HT1080	B16(F-10)	3LL
1	5.2	2.8	5.9	3.2	3.7	2.0	4.5	3.1
2	3.7	1.8	3.6	2.9	2.4	2.0	3.2	2.8

MCF7: human mammary gland adenocarcinoma, PC-3: human prostate adenocarcinoma, HT29: colon adenocarcinoma, LOX-IMVI: human skin carcinoma, A549: human lung carcinoma, HT1080: human acetalbulum fibrocarcinoma, B16 (F-10): mouse melanoma, 3LL: mouse lung carcinoma



	R ₁	R ₂	R ₃
1	OAc	-L-rha.p	-D-glc.p
2	H	-L-rha.p	-D-glc.p

Fig. 1. Chemical structure of scillascoside E-3 (1) and E-1 (2).

결과 및 고찰

무릇의 butanol 가용부에서 분리한 화합물 1, 2의 IR, Mass 그리고 NMR spectrum과 그 외의 물리화학적 자료를 조사하여 본 바 이 화합물들은 M. Sholichin 등이 무릇에서 분리 보고한⁶⁾ scillascoside E-3 (1), E-1 (2)과 동일하였으므로 이를 표준품으로 함량분석 및 암세포 증식억제실험을 행하였다.

무릇의 1, 2의 함량분석은 검체 A의 방법으로 제조된 것을 사용하였으며 열안정성 확인을 위한 시료의 전처리과정은 검체 B의 제조과정으로 만들어진 것을 사용하였다. 표준품 분리를 위한 식물시료는 검체 A와 검체 B에 사용된 식물시료와 동일한 것을 사용하였다.

먼저 1의 암세포 증식억제능은 human cancer cell line에서 ED₅₀ 값이 평균 3.8 µg/mL이며 mouse cancer cell line의 수치와 동일하였다. 또한 2의 경우 human cancer cell line에서 2.7 µg/mL이었으며 mouse cancer cell line에 있어서 3.0 µg/mL로서 두 화합물의 암세포 증식억제능은 비슷한 정도를 나타내고 있었다(Table 2).

분리과정에 있어서 위의 두 화합물들은 가운하여 추출할 때에는 수득율이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 1, 2의 수득율 감소의 원인을 밝히기 위하여 열 안정성확인을 위한 시료의 전처리 과정에 따라 제조한 시료들을 HPLC로 정량하여 검체 A와 검체 B에 있어서 위 화합물의 함량변화를 관찰하였다. 이들 화합물의 함량분석을 위한 검량선은 1의 경우 $y = 10625.56x + 388001.13 (r^2 = 0.995611)$ 이며 2의 경우 $y = 18326.58x + 40411.04 (r^2 = 0.994332)$ 로서 유의성 있는 직선의 식을 나타내었다. 이렇게 하여 작성된 표준검량선에 의하여 신선한 무릇을 MeOH에 냉침하여 추출한 MeOH 추출물(검체 A)의 경우 1(43.2 mg/kg), 2(27.9 mg/kg)로 각각 나타났다. 그러나 MeOH에 24시간 환류추출한 MeOH 추출물(검체 B)의 경우 본 정량분석방법의 검출한계 이하로 나타났다. 따라서 무릇이 함유하고 있는 1, 2는 환류추출시 열에 의하여 변성되는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로서 1, 2와 같은 eucosterol계 nortriterpenoid 화합물을 분리할 경우 수득율을 높이기 위해서는 환류추출 보다는 냉침하여 추출하는 것이 보다 유리할 것임이 확인되었다.

결 론

무릇의 암세포 증식억제에 관여하는 화합물은 scilascilloside E-1(1), E-3(2)와 같은 nortriterpenoid oligosaccharide계 화합물이다. 아울러 이 화합물들은 열에 대하여 불안정하여 추출, 정제시 환류추출 등의 열이 가해지는 방법을 사용하면 수율이 떨어질 것으로 판단된다.

인용문헌

1. Namba, T. (1993) The Encyclopedia of Wakan-Yaku. **165**, Hoikusha, Osaka.
2. Adinolfi, M., Barone, G., Corsaro, M., M., Lanzetta, R., Mangoni, L. (1987) Glycoside from *Muscari comosum*. 7. structure of three novel muscarosides. *Canadian Journal of chemistry* **65**: 2317-2326.
3. Mimaki, Y., Nishino, H., Kuroda, M., Matsui, T., Sashida, Y. (1994) Lanosterol oligosaccharides from the plants of the subfamily Scilloideae and their antitumor-promoter activity. *Chem. Pharm. Bull.* **42**: 327-332.
4. Lee, S., M., Lee, H., J., Lee, C., H., An, R., B., Na, M., G., Bae, K., H., and Kho, Y., H. (2000) Inhibitory activity of plant extracts on Cell-ECM adhesion, *Kor. J. Pharmacogn.* **31**: 394-400.
5. Skehan, P., Storeng, S., Studiero, D., Monke, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bodesh, H., Kenny, S. and Boyd, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Natl. Cancer Inst.* **82**: 1107-1112.
6. Sholichin, M., Miyahara, K., Kawasaki, T., (1985) Oligoglycosides of spirocyclic nortriterpenoides related to eucosterol. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 1756-1759.

(2001년 7월 12일 접수)