

두충잎의 항암성분 분리 및 동정

김종배[†] · 박정룡* · 전정례* · 차명화*

대구광역시 보건환경연구원

*영남대학교 식품영양학과

Isolation and Identification of Anticancer Compounds from *Eucommia ulmoides* Leaves

Jong-Bae Kim[†], Jyung-Rewng Park*, Jeong-Ryae Jeon* and Myung-Haw Cha*

Institute of Health and Environment, Taegu 706-090, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyungsan 712-749, Korea

Abstract

This study was attempted to isolate and identify the anticancer compounds from *Eucommia ulmoides* leaves using a human colon cancer cell line, HCT-116. The petroleum ether extracts with anticancer activity was chromatographed on silica gel, TLC and finally anticancer compounds was purified by HPLC. Their chemical structures were roughly elucidate by UV-VIS absorption spectral data, HPLC elution pattern and FAB/MS spectroscopy. From this study, these compounds were suspected to be pheophytin a formed by the removal of Mg²⁺ from chlorophyll a and pyropheophytin a formed by the removal of acetate group from pheophytin a, respectively. To confirm the anticancer effects against HCT-116 cancer cell, petroleum ether extract, fractions of column chromatography and fractions separated on TLC were tested. All samples tested including the extract of petroleum ether, fractions of column chromatograph and three bands (0.13, 0.19, 0.25) of TLC, appeared to inhibit the growth of HCT-116 cancer cell, however, especially 0.19 and 0.25 fractions separated on TLC plate revealed the strongest effect. These results suggest that chlorophyll derivatives in *Eucommia ulmoides* may be potential anticancer agents against a human colon cancer cell, HCT-116.

Key words: *Eucommia ulmoides*, anticancer compounds, chlorophyll derivatives

서 론

인간의 질병 중 암은 현대의학의 발달에도 불구하고 아직까지 치료에 어려움이 있는 질병으로 그 발생 요인의 80~90%는 환경적 요인에 기인하고 이 중 30~60%가 식이 및 영양과 연관되어 있으며, 기타 다른 요인으로는 흡연, UV, X-ray와 같은 방사선 조사, 직업적 요인, 음주 및 내인성 호르몬 등에 의해 유발된다고 알려져 있다(1).

많은 연구자들이 암을 정복하기 위해 여러 방향으로 다양한 연구를 진행하고 있으며 이러한 연구의 한 부분으로 식품이나 천연약제 중에서 암의 증식을 차단하거나 억제하는 성분을 생물체에서 찾으려는 노력이 이루어지고 있다. 식품 중에서 대표적인 발암 저해작용을 갖는 성분들로 phenol, indole, aromatic isothiocyanate, methylated flavone, coumarin, plant sterol, selenium salt, protease inhibitor, ascorbic acid, tocopherol, carotene 등이 알려져 있다(2). 이러한 화합물들은 발암형성 초기단계에서 initiator agent에 영향을 주거나 발암물질이 목표부위에 도달하는 것을 막는 blocking agent로

작용하고 또는 최종 단계에 작용하여 암 발생을 방지한다(3).

두충(*Eucommia ulmoides*)은 두충과(Eucommiaceae)에 속하는 낙엽교목으로 수피와 잎을 자르면 가는 섬유와 고무질이 함유되어 있는 것이 특징인데, 원산지는 중국으로 현재는 한국, 일본, 미얀마 등에서도 재배되고 있다. 한방에서 두충은 간(肝)과 신(腎)을 보하고 근골을 강하게 하며 태(胎)를 안정시키고, 혈압저하작용, 강장(強壯), 강정(強精), 진통, 유산 예방 등에 광범위하게 사용되고 있다(4).

두충나무의 생리작용과 연관된 많은 연구 중에서 Choi(5)는 두충수피와 잎 추출물에 대한 L1210 암세포의 증식억제에 미치는 영향을 조사하였는데, 잎 추출물의 억제활성은 chloroform획분이 가장 높았고, 수피추출물보다 약 3배 정도 강하게 나타났으며, 잎추출물은 안정하고 암세포에 저항성이 없는 반면 수피추출물은 비활성화되면서 암세포내 저항성이 생성하였다고 보고하였다. Lee(6)는 Choi(5)의 연구와 연계하여 항암활성성분을 규명하고자 인체직장암 세포를 대상으로 하여 silicic acid column chromatography(silicic acid CC)를 사용하여 분리한 추출물의 분획별 증식억제 활성을 조사한

[†]Corresponding author. E-mail: bea3772@hanmail.net

Phone: 82-53-760-1221. Fax: 82-53-760-1333

결과 petroleum ether 추출물에서 암세포에 대한 증식억제 효과가 현저하게 나타났고 추출물을 정제하였을 경우 그 효과는 6~7배 정도 강하였으며, 유효성분은 지용성 물질로 중성 지방 계열의 비교적 극성이 강한 화합물로 추정하였다.

따라서, 본 연구에서는 위의 연구에서 항암성분으로 추정된 물질을 분리 및 확인 동정하고 *in vitro*에서 이들 화합물들의 인간 대장암세포에 대한 증식 억제작용을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 두충나무 잎은 경상남도 합천에서 생육되고 있는 10년생 두충나무잎을 7월에 채취하여 음지에서 건조한 후 사용하였다.

Silicic acid CC와 TLC

Lee(6)의 방법에 의해 시료의 조제 및 분리를 행하였다. 즉, 음건한 두충잎 시료 6 g을 Soxhlet 장치에서 petroleum ether 150 mL로 70°C에서 16시간 추출한 후 진공농축기(Buchi RE 121 rotary evaporator)로 감압농축하고 N₂ 가스로 잔류물을 건조시켜 조추출물을 조제하였다. 다음에 silicic acid 40 g을 120°C의 건조기에서 2시간 동안 활성화하고 충전한 유리칼럼(2.6×50cm) 상단에 일정량의 chloroform으로 녹인 조추출물을 넣고, 이어 chloroform 100 mL로 용출시킨 분획을 Fr. 1으로, 이어서 chloroform 60 mL로 용출한 분획을 Fr. 2로, 마지막으로 chloroform : acetone(1 : 1) 60 mL를 사용하여 용출한 분획을 Fr. 3으로 하였다.

Fr. 3의 TLC 분리 전개용매로 petroleum ether : ethyl ether : acetic acid(70 : 30 : 1)와 hexane : ethyl ether : 1% formic acid(80 : 20 : 2) 두 종류를 사용하였으며, 발색제로는 25% 황산 그리고 Rf치 확인대조물질로 triglyceride와 cholesterol을 사용하여 추정성분의 Rf치와 발색특성을 조사하였다.

UV-vis absorption spectrum 및 HPLC 분리

항암성분으로 추정된 성분, compound 1(Rf 0.25), compound 2(Rf 0.19) 부위를 끊어내어 acetone에 용해하고 여과한 뒤 acetone을 N₂ 가스를 이용하여 건조시켰다. Chloroform으로 잔류물을 용해하여 일정량으로 만든 다음 분광광도계(Unicon 930, Kontron Co.)를 이용하여 400~700 nm사이의 흡수스펙트럼을 조사하였다. HPLC를 이용한 retention time의 분리특성을 조사하기 위해 표준품으로 carotenoid는 lutein,

cryptoxanthin, lycopene, β-carotene을, chlorophyll a는 Sigma사 제품을 사용하였다. Chlorophyll b와 chlorophyll 관련 유도체의 표준화합물은 신선한 상치로부터 제조한 Chlorophyll을 산과 열을 이용해 만든 시료를 사용하였으며 HPLC 분석 조건은 Table 1과 같다.

HPLC C₁₈ column을 이용한 분리 및 정제

Rf치별 HPLC 성분분석에서 분리되어진 retention time별 성분을 조사하기 위해 HPLC에 RP C₁₈ 칼럼(4×150 mm Inertsil ODS-2)이 연결된 HPLC에 시료수집기를 부착시켜 각 화합물의 피크에 해당하는 시간대에 분리되는 이동상 용액을 알미늄 호일로 차광한 수집관내에 자동으로 회수하였다. 수집된 용액은 실온에서 감압농축기를 이용하여 차광 하에 증발 건조시키고 잔류물은 N₂ 가스로 완전히 건조시킨 다음 항암성분 확인과 동정에 사용하였다.

FAB/MS 측정

항암추정 성분에 대한 분자량 동정은 HPLC로 정제한 물질을 Fast atom bombardment/Mass(Micromass사 Auto-spec)를 사용하여 해당화합물의 mass spectrum을 조사하고 분자량을 측정하였다.

Cancer cell의 배양

Cancer cell은 서울대학교 암 세포주 은행에서 분양 받은 인체 대장암세포인 HCT-116을 사용하였으며, cancer cell의 배양은 Hwang 등의 방법(7)에 준하였다. 즉 5% fetal bovine serum, penicillin 100 units/mL, streptomycin 10 µg/mL가 함유된 Dulbecco's modified essential medium 배지를 사용하여 T-75 플라스크에 이식시킨 후 5% CO₂가 공급되는 37°C incubator에서 monolayer로 배양하였으며, 플라스크에 암세포가 약 4×10⁵ cell/mL로 증식되면 phosphate buffers saline으로 세척하고 0.05% trypsin-EDTA로 분리시켜 계대 배양하였다.

Cancer cell의 증식 억제 효과 측정

Stock line의 암세포에 trypsin-EDTA를 처리하여 배양액에 혼합한 후 petri dish에 5 mL씩 접종하여 배양하였다. 암세포가 petri dish내 부착·증식되어 세포수가 약 5×10⁴ 또는 5×10⁵ cell/dish로 되었을 때, 두충잎에서 분리한 화합물을 일정농도별로 조제한 시험용액이 함유된 새로운 배양액으로 교체하였다. 이 배양액을 24, 48, 72시간 간격으로 배양하면서 생성된 암세포를 trypsin-EDTA로 처리하여 분리하고 0.9%

Table 1. HPLC condition for analysis chlorophyll derivatives in the leaves of *Eucommia ulmoides*

Instrument	Spectra Physics Co. SP 8800, Spectra 200
Column	Lichrosphere 100RP-18 (4×250 mm, 5 µ)
Guard column	Lichrospher 100RP-18 (4×4 mm, 5 µ)
Mobile phase	methanol : chloroform (95 : 5, v/v)
Flow rate	2.0 mL/min
Detector wavelength	440 nm, 454 nm, 645 nm, 663 nm
Attenuation, chart speed	32, 0.25 (cm/min)

NaCl로 희석한 다음 hemocytometer를 이용 invert microscope로 각 시험군의 세포수를 측정 비교하였으며 대조군은 ethyl alcohol을 첨가하여 동일한 방법으로 시험하였다.

결과 및 고찰

TLC에 의한 성분 분리 및 확인

TLC 전개용매로 petroleum ether : ethyl ether : acetic acid (70 : 30 : 1)를 사용하여 분리한 TLC chromatogram은 Fig. 1과 같다. 즉, Lee(6)가 항암물질을 동정하기 위해 분리한 3개의 발색부위는 본 실험에서와 동일한 Rf치를 나타내었다. 즉 Rf치가 0.25(진초록), 0.19(초록), 0.13(연한 초록) 등 항암성분으로 추정되는 3개의 주요 발색 band와 Rf 0.09(노랑), 0.05(주황), 출발점에서의 주황색 band 등 3개 band를 합쳐 총 6개의 band가 분리되었다. 분리된 band들이 중성 지질 그룹의 화합물인지를 확인하기 위해 전개용매로 petroleum ether : ethyl ether : acetic acid(70 : 30 : 1)를 사용하여 전개시켰다. 이어 TLC 판을 100°C에서 건조 후 황산으로 분무하고 230°C에서 가열하여 발색시킨 결과 Rf치 0.25 이상에서 시료에서 분리된 지질들의 특이적인 발색 band들이 나타났으며, 표준물질로 사용한 triglyceride와 cholesterol은 모두 Rf치 0.25 이상에서 발색 band가 형성되었다. 그리고, 20% 황산 분무 전 Rf 0.25 band를 포함해 그 이하에서 나타났던 발색 band는 탈색되어지거나 검은색으로 변하였다.

또 다른 전개용매로, fatty acid, monoglyceride, diglyceride, triglyceride, sterol 등의 분리에 주로 이용되는 hexane : ethyl ether : 1% formic acid(80 : 20 : 2)를 사용하여 전개한 다음 위와 동일한 방법으로 가열하였을 때 TLC 상에서 분리된 지질류들은 모두 특이적으로 발색하였으며, 대조물질로 사용한 triglyceride와 cholesterol도 Hamilton과 Rossell이 보고한

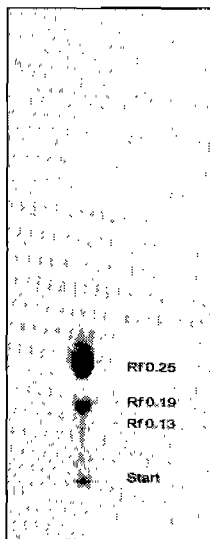


Fig. 1. TLC chromatogram of fraction 3 isolated from petroleum ether extract on silicic acid column chromatography.

결과(8)와 동일한 Rf치를 가지는 반면에 항암물질로 추정된 물질은 탈색되어지고 통상 지질류가 가지는 Rf치 값에서 벗어나는 것으로 미루어 보아 항암성분 추정물질은 지질류가 아닌 노란색을 띄는 carotenoid계 색소나 초록색을 가지는 chlorophyll 계통의 화합물로 판단되었다.

HPLC에 의한 carotenoid와 chlorophyll의 분리 특성

HPLC를 이용한 carotenoid와 chlorophyll 화합물들의 정성 및 정량 분석의 대부분 연구들에서 이동상용매 조성은 극성용매와 비극성용매를 일정농도로 혼합하며 칼럼으로는 reverse phase C18 칼럼을 사용한다(9-11). 이들 연구결과를 종합해 보면 carotenoid 색소인 xanthophyll류는 앞부분에 나타나며, chlorophyll류는 중간부분에, hydrocarbon carotenoid인 β -carotene류는 끝부분에 분리되는데(12-16), 이중 chlorophyll 및 관련 유도체들의 분리양상은 chlorophyllide b, chlorophyllide a, chlorophyllide a', pheophorbide b, pheophorbide b', pheophorbide a, pheophorbide a', chlorophyll b, chlorophyll b', chlorophyll a, chlorophyll a', pheophytin b, pheophytin b', pheophytin a, pheophytin a', pyropheophytin b와 pyropheophytin a, pyropheophytin a' 및 미확인 chlorophyll 산화물들의 순서로 이루어지고, pyropheophytin류는 β -carotene보다 조금 늦게 분리되는 것이 특징이다.

본 실험에서는 carotenoid와 chlorophyll의 분리순서의 실질적인 검정을 위해 chlorophyll이 풍부한 신선한 상치를 시료로 하여 총 chlorophyll 분석방법(17)으로 조제한 시험용액을 HPLC 조건에서 분석한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 440 nm 파장에서 분석한 상치의 chromatogram에서 retention time 2분대에는 xanthophyll류, 5분대에 chlorophyll b, 8분대의 chlorophyll a가 분리되었고, 645nm와 663nm의 파장에서는 carotenoid류는 나타나지 않았으며, chlorophyll b와 chlorophyll a만 분리되었다. 또한, chlorophyll b의 최대 흡수파장인 454 nm 파장에서 분석하였을 때, chlorophyll b의 peak가 chlorophyll a보다 상대적으로 증가한 결과로 보아 상치에서 분리된 5분과 8분대의 peak들이 chlorophyll a,

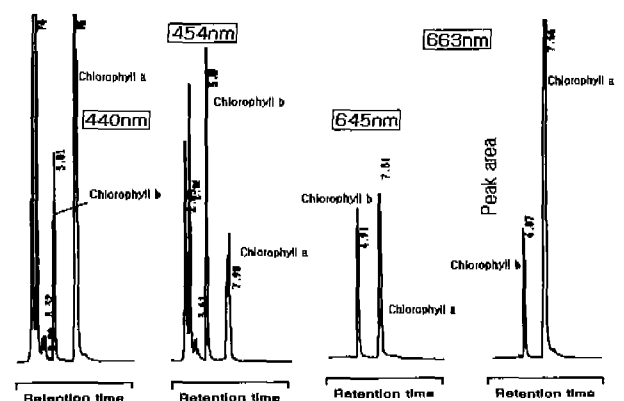


Fig. 2. HPLC chromatograms of chlorophyll a and b isolated from lettuce.

b임을 확인할 수 있었고, 신선한 상치에서 chlorophyll의 분해산물인 pheophytin과 pyropheophytin류는 나타나지 않았다.

Fig. 3은 chlorophyll a와 b를 pheophytin a와 b 그리고 그들의 대사산물로 전환시켜 지연시간(t_R)을 조사하기 위해 30% 염산으로 처리했을 때와 100°C에서 10분간 가열했을 때의 HPLC chromatogram이다. 원시료(chromatogram A)와 염산이나 열을 처리한 시료(chromatogram B, C)의 chromatogram을 비교해 볼 때 chlorophyll a와 b의 소실 정도에 비례하여 pheophytin a와 b 그리고 pyropheophytin a가 생성되었다. 이러한 분리순서는 앞에서 문헌 고찰을 통해서 제시된 chlorophyll 관련화합물들의 HPLC 분리순서가 타당함을 확인할 수 있었다.

또한, carotenoid 계통의 화합물을 분석할 때 시료 중에 함유되어 있는 chlorophyll, pheophytin, lipid 등을 제거하기 위하여 20% KOH 용액을 사용하여 실온에서 2시간 정도의 검화 과정을 거친 후 분석한다. 본 실험에서 TLC 분석시료에 20% KOH를 사용하여 동일한 검화 과정을 거치고 440 nm의 분석 파장에서 분석하였을 때 Fig. 4에서 보는 바와 같이 HPLC chromatogram 상에 chlorophyll 및 그 유도체들의 peak는 나타나지 않고 carotenoid 색소인 lutein과 β -carotene만이 분

리되어졌다. 이 결과로 추정해 볼 때 검화 후 사라진 peak들의 t_R 대에 분리된 화합물은 chlorophyll 또는 그들의 유도체 peak임을 확인할 수 있었다.

Rf 0.19 band의 흡수스펙트럼과 HPLC 분리 특성

Rf 0.19 band에서 분리한 화합물을 chloroform에 녹여 분광광도계를 이용하여 400~700 nm 사이의 흡광도를 측정 한 결과(Fig. 5), Rf 0.19 band의 최대 흡수 스펙트럼은 410 nm와 670 nm에서 나타났고 이러한 패턴은 pheophytin a의 흡광도와 유사한 경향을 나타낸다(12-16).

HPLC를 이용하여 440 nm와 663 nm 파장에서 각각 분석한 Rf 0.19 band의 chromatogram은 Fig. 6과 같다. 그림에서 보는 바와 같이 440 nm와 663 nm 두 파장에서 Rf 0.19 band는 t_R 18분대와 이들의 산화물로 추정되는 t_R 19분대의 단지 2개의 peak만이 분리되었고, 663 nm 파장에서는 440 nm 파장에서 분석한 것보다 10배 이상의 peak 면적을 나타내었다.

이러한 결과들은 종합해 볼 때 Rf 0.19 band에서 분리된 t_R 18분대의 major peak는 pheophytin a로 그 뒤의 minor peak는 pheophytin a'로 추정되어진다(12-16). 또한, Rf 0.19 band에서 분리된 화합물을 실온에서 장기간 보존하였을 경우,

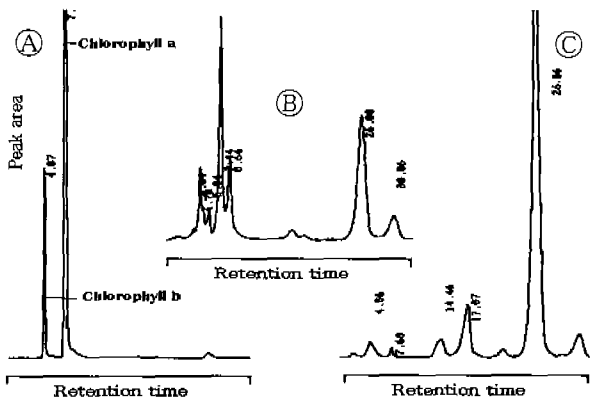


Fig. 3. HPLC chromatograms of chlorophyll a and b (A) treated 13% HCl (B) and heated at 100°C for 30 min (C).

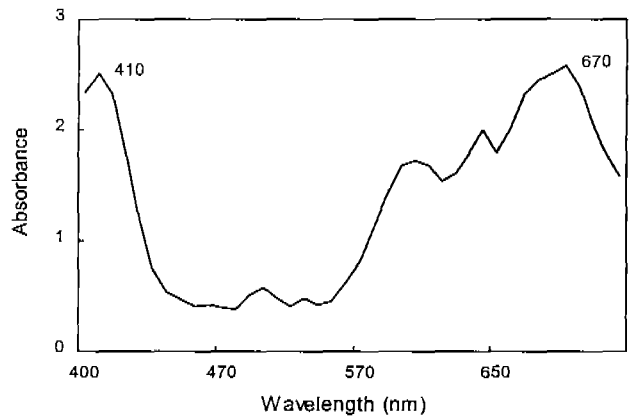


Fig. 5. Absorbance spectrum of compound 2 separated on TLC plate.

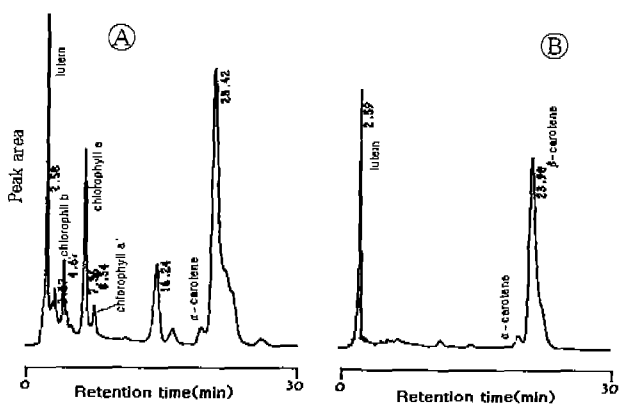


Fig. 4. HPLC chromatograms of petroleum extract (A) and the extract (B) treated with 20% KOH at 440 nm.

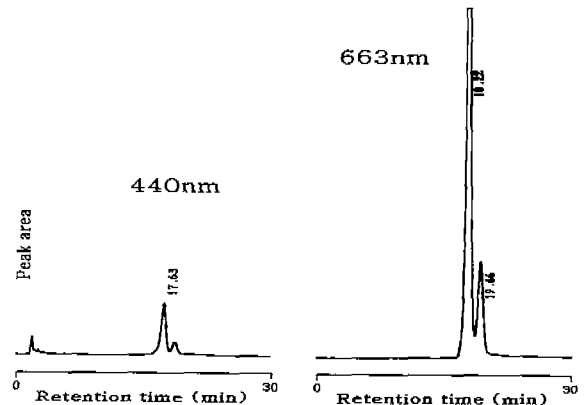


Fig. 6. HPLC chromatogram of compound 2 separated on TLC plate.

minor peak가 점점 커지고 상대적으로 major peak가 작아졌으며, -26°C 에서 보존하였을 때 반대 현상을 나타냄으로써 이르는 pheophytin 구조 중 V환이 이성화되어지는 것으로 판단된다.

Rf 0.25 band의 흡수스펙트럼과 HPLC 분리 특성

TLC에서 분리한 Rf 0.25 band를 chloroform으로 재 용해한 후 400~700 nm에서 흡광도를 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. 0.25 band의 흡수스펙트럼은 414 nm와 667 nm에서 각각 최대 흡수 스펙트럼을 나타내었으며, 이러한 흡수스펙트럼의 특성은 pyropheophytin a의 분리 양상과 동일함을 나타내었다(12-16).

Fig. 8은 Rf 0.25 band를 HPLC로 분석한 chromatogram 으로서 440 nm와 663 nm에서 서로 동일한 peak 패턴을 나타내었으나, 면적은 663 nm에서 약 8배 정도로 크게 나타났다. HPLC 분석에서 t_R 26분대의 major peak와 t_R 30분대의 minor peak가 분리되었는데, t_R 에 의한 분리패턴으로 보아 major peak는 pyropheophytin a로 minor peak는 pheophytin a'로 추정된다. 또한 이 시험용액을 실온에서 일정기간 보존하였을 때, Rf 0.19 band의 peak 분리패턴과 유사한 경향을 나타

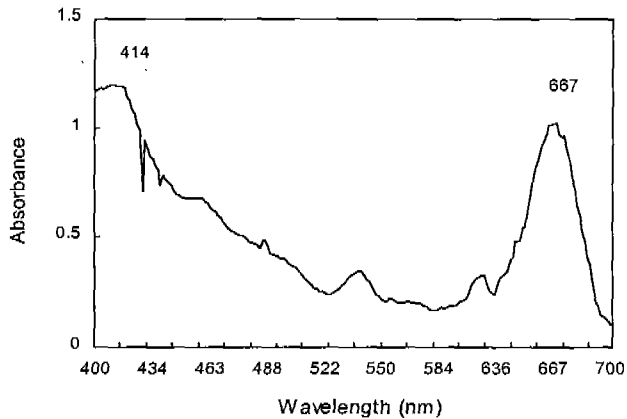


Fig. 7. Absorbance spectrum of compound 1 separated on TLC plate.

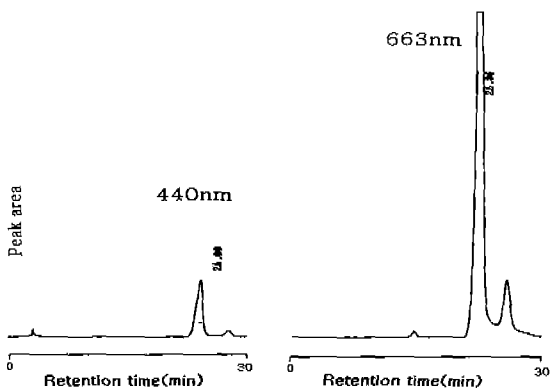


Fig. 8. HPLC chromatogram compound 1 separated on TLC plate.

내었다. 즉 major peak의 면적이 작아진 반면 상대적으로 minor peak가 커졌고 -26°C 에서 보존한 경우 반대현상을 나타내었다. 이 결과는 pyropheophytin a의 구조 중 V환이 이성화되는 것으로 추정된다.

FAB/MS에 의한 분자량 동정

TLC 전개 후 분리된 Rf 0.19와 Rf 0.25 band의 silica gel을 회수하여 acetone에 용해하고 여과한 다음 건조시킨 잔류물을 acetone에 재용해하였다. 이 용액을 시료수집기가 연결된 HPLC에 주입하고 retention time별로 수집한 Rf 0.19 band의 FAB/MS spectra는 $[M]^+$ ion은 m/z 871 ion을 나타내었고, Rf 0.25 band의 $[M]^+$ ion은 m/z 813 ion을 나타내었다. 이는 chlorophyll 유도체의 mass spectrum을 분석한 Bremen 등(18)의 결과와 동일하게 나타나 이들 화합물들이 pheophytin a와 pyropheophytin a의 molecular ion임을 확인할 수 있었다.

앞에서 행한 이들 실험결과들을 종합적으로 판단할 때 Choi (5)와 Lee(6)가 추정된 두층질 중의 Rf 0.19 band의 항암성분은 chlorophyll에서 Mg^{2+} 이 제거된 pheophytin a(major peak)와 pheophytin a의 V환이 이성화된 pheophytin a'(minor peak)로, Rf 0.25 band는 pheophytin a에서 V환의 acetate기가 가수분해되어 제거된 pyropheophytin a(major peak)와 pyropheophytin a'(minor peak)로 잠정적으로 동정하였다. TLC plate 상에 나타난 이러한 화합물들의 생성은 silicic acid column chromatography에서 분리한 fraction 3이 TLC 상에서 전개되는 과정에서 분획 중에 존재하는 chlorophyll 또는 chlorophyll 유도체들이 그대로 전개 및 분리되거나, 전개되는 과정에서 자연 분해로 인해 그 분해산물들이 최종적으로 Rf 0.19와 0.25 band를 형성하는 것으로 판단되어진다.

Chlorophyll 및 그 유도체들의 항암 및 항돌연변이 작용에 관해서는 최근 들어 많은 연구가 이루어지고 있으며(19,20), pheophytin a도 *Salmonella typhimurium*(TA 1535/pSK 1002) 내에서 genotoxin 유도성 *umu C* 유전자의 발현에 potent suppressor로 작용하는 것으로 보고되고 있다(21). Park 등(22)은 chlorophyll 유도체가 murine tumor model에서 새로운 photosensitizer로 이용될 수 있다고 보고하고 있다. 그리고, Evrard 등(23)도 pheophorbide a가 pancreatic cancer에 대해 photosensitizer로 작용하며, Aprahamian 등(24) 역시 pancreatic cancer에서 pheophorbide a가 hematoporphyrin 유도체들 보다 더욱 효과적인 potent photosensitizer로 사용될 수 있음을 보고하였고, Ebermann 등(24)은 chlorophyll 화합물이 종양세포의 photodynamic destruction을 위한 potential drug로 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

암세포 증식억제 효과

본 실험에서 항암물질로 잠정적으로 동정된 pheophytin a와 pyropheophytin a가 암세포 증식억제 효과가 있는가를 검정하기 위해 인간 대장암 세포의 하나인 HCT-116 cancer

cell에 두충잎의 petroleum ether extract(Sa 1.), column chromatography(CC)의 fraction 1(Sa 2), fraction 3(Sa 3), silica gel thin layer chromatography(TLC)의 Rf 0.19(Sa 4)와 Rf 0.25(Sa 5) 발색 부위 band의 성분을 추출하여 암세포 증식 억제 실험을 한 결과는 Fig. 9 및 10과 같다.

먼저, 처음 세포 수가 6.2×10^5 cell일 때 배지 1 mL 당 100 μg 의 농도를 사용하여 증식억제 실험을 한 결과, 모든 시료에서 대조군과 비교하여 증식억제가 일어났으며, 억제 효과가 가장 우수한 것은 pyropheophytin a가 주성분으로 잠정적으로

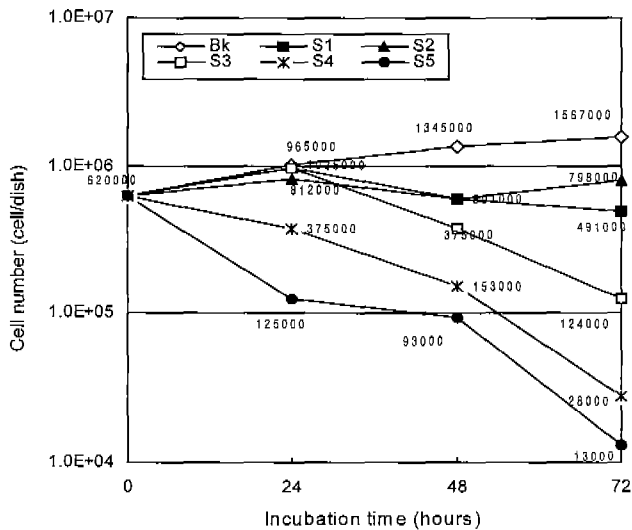


Fig. 9. Growth curves of HCT-116 cell in the culture medium containing 100 $\mu\text{g/mL}$ of test samples.

Bk : Anhydrous ethyl alcohol.
 S1 : Extract of petroleum ether.
 S2 : Fraction 1 (column chromatography).
 S3 : Fraction 3 (column chromatography).
 S4 : Rf 0.19 band (silicic acid TLC plate).
 S5 : Rf 0.25 band (silicic acid TLC plate).

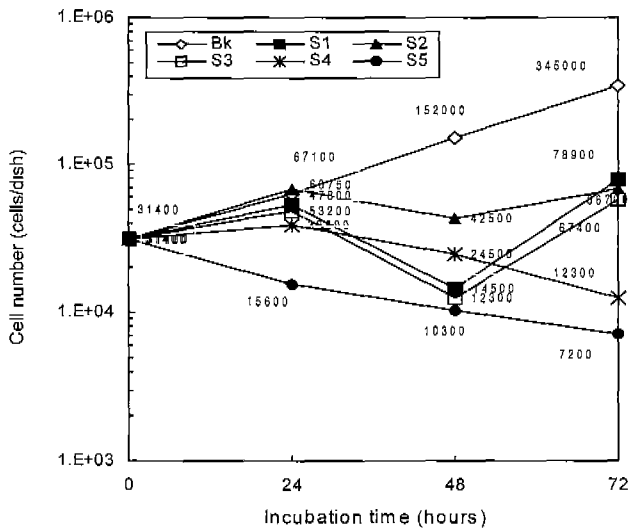


Fig. 10. Growth curves of HCT-116 cell in the culture medium containing 50 $\mu\text{g/mL}$ of test samples.

동정된 Sa. 5였으며 그 다음으로 pheophytin a가 주성분인 것으로 동정된 Sa. 4로 나타났다. 그리고, Fr. 3에서 정제된 Rf 0.19와 0.25 band 화합물의 증식억제 활성은 추출물에서 보다 각각 4.4배와 9.5배 증진되었음을 보여주었다.

Fig. 10은 처음 세포수가 3.14×10^4 cell일 때 배지 1 mL 당 50 μg 의 농도로 억제활성을 측정된 그림이다. 이 실험에서도 앞의 실험과 같이 모든 시료에서 다소 약하였지만 세포 증식 억제효과가 나타났고 다소 약하였지만, Rf 0.19와 0.25 band 화합물은 다른 시료에 비해 상대적으로 강한 억제활성을 나타내었다. Fig. 11은 실험에 사용된 각 시료 50 $\mu\text{g/mL}$ 를 암세포에 처리하여 72시간이 지난 후 invert microscopy를 이용하여 찍은 사진으로 암세포의 증식 억제현상을 볼 수 있다.

한편, Lee(6)는 HRT-18, HT-29, HCT-48 cancer cell을 이용한 실험에서, Rf 0.19 band의 증식 억제제가 가장 높아 주로 이 화합물을 이용하여 억제활성을 측정하였다. 본 실험의 결과와 비교해 볼 때 HT-29 cancer cell을 이용하여 배지당 50 $\mu\text{g/mL}$ 를 첨가한 실험과는 유사하게 나타내었지만 다른 세포에서의 증식억제 정도는 다소 다르게 나타났다. 이것은 그들의 실험에서도 지정한 바와 같이 HT-29와 HT-48 cell은 동종의 결장암세포인데도 불구하고 HT-29 cell에서 2배 정도의 억제 활성을 나타내는 것으로 보고하고 있어 Rf 0.25와 Rf 0.19 band 화합물이 기타 다른 암세포에 어떻게 작용하는가 하는 것은 차후에 보다 자세한 연구가 필요한 것으로 생각된다.

아울러, 본실험에서 chlorophyll을 pheophytin으로 전환시키기 위한 실험에서 chlorophyll에서 pyropheophytin으로의 전환이 너무 빨라 암세포 증식 억제실험에 필요한 양의 순수한 pheophytin과 관련화합물을 얻지 못하였다. 따라서, TLC에서 분리된 Rf치의 발색 band 화합물들을 분리하여 실험에 사용하였기 때문에 순수한 pheophytin과 pyropheophytin의 암세포 증식 억제 정도는 본 실험의 결과와 다소 차이가 있

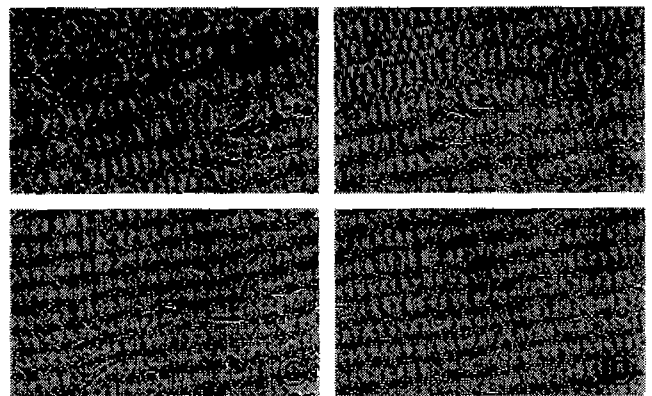


Fig. 11. Invert microscopical photography of HCT-116 cancer cell for test samples treated with 50 $\mu\text{g/mL}$ medium after 72 hr.

A : Extract of petroleum ether.
 B : Fraction 3 obtained from column chromatograph.
 C : Rf 0.19 band obtained from silica gel TLC.
 D : Rf 0.25 band obtained from silica gel TLC.

을 수 있다고 생각된다.

마지막으로, chlorophyll과 그들 분해산물인 pheophytin, pyropheophytin, pheophorbide, chlorophyllin 등의 화합물들이 각종 암세포에 대한 항암작용의 정도는 차후 계속적인 연구가 필요할 것이라고 생각되고, 이러한 연구들은 녹황색 채소류의 섭취와 위암, 대장암, 결장암, 직장암 등의 유발 감소에 대한 상관관계를 밝히는 데 상당한 도움을 줄 수 있을 것이라고 판단된다.

요 약

두충잎에서 인간대장암세포 HCT-116에 세포증식 억제 효과를 나타내는 성분을 silica gel column chromatography, TLC로 분리하고 HPLC로 정제한 다음 UV-visual spectrophotometer에 의한 흡수 spectra 특성, HPLC에 의한 retention time과 분리패턴 및 FAB/MS로 분자량을 잠정적으로 동정한 결과, TLC 상에서 분리된 Rf 0.19 band의 화합물은 chlorophyll a에서 Mg^{2+} 이 제거된 pheophytin a로, Rf 0.25 band의 화합물은 pyropheophytin a로 확인되었다. 동정된 화합물들의 암세포 억제작용을 확인하기 위해, 두충잎의 petroleum ether extract, column chromatography로 분리한 분획물 및 TLC에서 분리된 각 band들의 cytotoxic activity를 *in vitro*에서 HCT-116 cancer cell을 사용하여 측정된 결과, 모든 시료에서 암세포 증식억제 현상을 보였으며, 특히 Rf 0.19와 Rf 0.25 band에서 분리된 화합물들에서 강하게 나타났다. 이 결과로 볼 때 두충잎에서 분리한 클로로필 유도체는 인간 대장암세포인 HCT-116 cell에 대해 강한 항암작용이 있는 것으로 생각된다.

문 헌

- Doll, R. and Peto, R. : The cause of cancer ; Quantitative estimate of available risks of cancer in the United States today. *J Natl. Cancer Inst.*, **66**, 1191-1192 (1981)
- Ames, B.N. : Dietary carcinogens and anticarcinogens : Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, **221**, 1256-1264 (1983)
- Wattenberg, L.W. : Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.*, **45**, 1-8 (1985)
- 이상인 : 본초학. 수서원, 서울, p.85-86 (1981)
- Choi, J.A. : Effects of eucommial cortex extracts on the inhibition of growth rate in the animal leukemic cells L1210. *Ph.D. Dissertation*, Korea University (1994)
- Lee, M.H. : Extraction and purification of anticancer compounds in eucommial leaf. *M.S. Thesis*, Korea University (1998)
- Hwang, W.I., Cha, S.M. and Lee, S.Y. : A study on the extraction of anticancer components from Korean medicinal plants and the determination of their cytotoxicities on the cancer cell. *J. Korean Biochem.*, **15**, 205-219 (1982)
- Hamilton, R.H. and Rossell, J.B. : *Analysis of oils and fat*. Elsevier Applied Science, New York, p.254 (1986)
- Khachik, F., Beecher, G.R. and Whittaker, N.F. : Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 603-616 (1986)
- Daoud, H.G., Czinkotai, B., Hoschke, A. and Biacs, P. : High performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from vegetables. *J. Chromatogr.*, **472**, 296-303 (1989)
- Schoefs, B., Bertrand, M. and Lemoine, Y. : Separation of photosynthetic pigments and their precursors by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a photodiode-array detector. *J. Chromatogr. A*, **692**, 239-245 (1995)
- Bailey, C.A. and Chen, B.H. : Simultaneous separation and identification of carotenoids and chlorophylls in turf bermudagrass by HPLC. *J. Chromatogr.*, **455**, 396-400 (1988)
- Almela, L., Fernandez-Lopez, J.A. and Lopez-Roca, J.M. : HPLC diode-array detection of photosynthetic pigments. *J. Chromatogr.*, **607**, 215-219 (1992)
- Minguez-Mosquera, M.I. and Gandul-Rojas, B. : High performance liquid chromatographic study of alkaline treatment of chlorophyll. *J. Chromatogr. A*, **690**, 161-176 (1995)
- Saitoh, K., Awaka, I. and Suzuki, N. : Determination of chlorophylls by reverse phase high performance liquid chromatography with isocratic elution and the column-switching technique. *J. Chromatogr. A*, **693**, 176-180 (1995)
- Kuronen, P., Hyvarinen, K. and Hymminen, P.H. : High performance liquid chromatographic separation and isolation of the metabolic allomerization products of chlorophyll a. *J. Chromatogr. A*, **654**, 93-104 (1993)
- 식품공전 : 보건복지부. 서울, p.428 (1997)
- Breemen, R.B., Canjura, F.L. and Schwartz, S.J. : Identification of chlorophyll derivatives by mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1452-1456 (1991)
- Okai, Y., Higashi-Okai, K., Yano, Y. and Otani, S. : Identification of antimutagenic substances in an extract of edible red algae. *Cancer Lett.*, **100**, 235-240 (1996a)
- Okai, Y., Higashi-Okai, K., Yano, Y. and Otani, S. : Suppressive effects of chlorophyllin on mutagen-induced *umu C* gene expression in *Salmonella typhimurium* and tumor promoter-dependent ornithine decarboxylase induction in BALB/c 3T3 fibroblast cells. *Mutat. Res.*, **318**, 239-247 (1996b)
- Sarker, D., Sharma, A. and Talukder, G. : Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. *Mutat Res.*, **318**, 239-247 (1994)
- Park, Y.J., Lee, W.Y., Hahn, B.S., Han, M.J., Yang, W.I. and Kim, B.S. : Chlorophyll derivatives a new photosensitizer for photodynamic therapy of cancer in mice. *Yonsei Med. J.*, **30**, 212-218 (1989)
- Evrard, S., Keller, P., Hajri, A.B., Alboni, G., Mendoza-Burgos, L., Damgi, C., Marescaux, J. and Aprahamian, M. : Experimental pancreatic cancer in the rat treated by photodynamic therapy. *British J. Surgery*, **81**, 1185-1189 (1994)
- Aprahamian, M., Evrard, S., Kella, P., Tsuji, M., Balboni, C., Damae, C. and Marescaux, J. : Distribution of pheophorbide A in normal tissues and in an experimental pancreatic cancer in rat. *Anticancer Drug Design*, **8**, 101-114 (1993)