

백강잠(*Bombycis corpus*)으로부터 유용물질 분리

정이연* · 남성희 · 홍인표 · 유승현¹ · 권학철² · 이강노²
농업과학기술원 잠사곤충부, ¹충남대학 농과대학 ²성균관대학교 약학대학

A useful material isolation from the *Bombycis corpus* (*Beauveria bassiana*) growing of the silkworm, *Bombyx mori* L.

I-Yeon Jung, Sung-Hee Nam, In-Pyo Hong, Seung-Hun Yu¹, Hak-Cheol Kwon² and Kang-Ro Lee²

Department of Sericulture and Entomology, NIAST,RDA, Suwon, 441-100, Korea

¹Department of Agricultural Biology, Chungnam National University, Yuseung 305-764, Korea

²College of Pharmacy, SungKyunKwan University, Suwon 440-746, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to investigate active constituents of *Bombycis corpus* on the neurite outgrowth from PC12 cells led to isolate three new and a known sphingolipids from the *n*-hexane soluble portion and five amines from the butanol soluble portion of its methanol extract. On the basis of spectroscopic data, their structures have been elucidated as (4E,6E,2S,3R)-2-*N*-eicosanoyl-4,6-tetradecasphingadienine, (4E,2S,3R)-2-*N*-eicosanoyl-4-tetradecasphingenine, (4E,6E,2S,3R)-2-*N*-docosanoyl-4,6-tetradecasphingadienine, (4E,6E,2S,3R)-2-*N*-docosanoyl-4,6-tetradecasphingadienine, (4E,2S,3R)-2-*N*-octadecanoyl-4-tetradecasphingenine, 1,7-dimethyl-xanthine, uracil, urea, betaine and tyrosine, respectively. The neurite outgrowth activities of these compounds were examined in PC12 cells by measuring the length of neurites. These compounds promoted neurite outgrowth in PC12 cells significantly.

Key words : *Bombycis corpus*, PC12 cells, Silkworm, *Beauveria bassiana*

서 론

누에 피부에 백강균(*Beauveria bassiana*)을 접종한 후 적당한 온도와 습도조건하에서 일정기간 사육하면 누에몸에 균사체가 형성되며 강직현상을 나타내고 결국에는 죽게되는데 이 죽은 누에를 백강잠(*Bombycis corpus*)이라고 한다. 백강잠은 고문헌 처방에로 보면 중풍으로 인하여 구안와사, 소아의 경기치료, 두통 치료, 폐결핵의 치료 등에 이용되어 왔고(김 등, 1997) 임상적 보고로는 당뇨병 및 급성유선염 등에 이용된 예가 있다. 신경성장인자(nerve growth factor, NGF)는 신경세포에서 neurites의 outgrowth를 자극하고 중추신경계의 신경의 생존과 유지에 중요한 역할을 하기 때문에 퇴행성 뇌질환의 치료에 좋은 효능을 가질 것으로 추측되고 있다. 또한 최근에는 NGF가 alzheimer병(알츠하이머 병)과 관련된 콜린성 전뇌의 퇴화의 진전을 정지시키거나 혹은 지연시킬 수 있다는 실험 동물 결과들이 나오고 있다(Fischer *et al.*, 1987; Hefti *et*

al., 1994). NGF를 포함하여 trophic factors들은 신경분화와 세포의 사멸과 같은 과정에 관여함으로써 신경퇴화성 질병을 치료하는 가장 강력한 접근 방법으로 알려져 있다. 동시에 alzheimer병(알츠하이머 병)이 진행되는 동안 사멸하는 것으로 알려진 콜린성신경을 NGF가 자극함으로써 인지·행동 능력을 개선하고 신경계의 퇴화를 억제한다. 임상연구로는 NGF의 두개골을 통한 주입으로 환자의 언어담당 기억을 증진시킨다는 보고도 있다(Jonhagen *et al.*, 1998; Lindavall *et al.*, 1994). 그러므로 alzheimer병(알츠하이머 병)를 치료하는 수단으로 NGF나 신경활성 효과를 갖는 화합물을 선정하는 것은 합리적인 접근이라 할 수 있기 때문에 이러한 유사화합물에 의한 새로운 치료 가능성과 응용성도 점점 확대된다 할 수 있다. 그러나 내인성 NGF는 분자량이 매우 큰 polypeptide이기 때문에 BBB (Blood brain barrier, 혈액뇌 장벽)를 통과하지 못한다. 그러므로 NGF부족으로 인하여 뇌에 생기는 질병을 치료하기 위해서는 일차적으로 뇌에 직접 주사를 해야만 치료

*Corresponding author. E-mail: iyjung@rda.go.kr

효과를 최대화할 수 있는데, 이는 이용하기 쉽지 않은 방법이다. 또한 복강주사 등의 방법으로 투여할 경우 단백질 분해효소에 의하여 쉽게 대사되기 때문에 그 효능을 기대할 수 없게 된다. 그러므로 천연물로부터 neurite outgrowth 증강작용과 더불어 신경활성을 갖는 저분자량 화합물의 도출은 퇴행성뇌질환 치료제의 탐색방법으로 의미있다고 할 수 있겠다. 본 연구는 백강잠의 유용물질을 분리하여 그 구조를 규명하고 뇌신경세포성장 촉진효과를 검색코자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 추출물의 제조

백강잠 건조분말 1.5 kg을 메탄올(MeOH)로 상온에서 5회 반복추출하고 60°C에서 3회 추출하여 얻어진 추출액을 감압농축하여 120 g의 메탄올 추출물을 얻었다.

2. 백강잠 101A 현탁액의 분획물 제조

감압농축된 메탄올 추출물을 H₂O에 현탁시킨 후 헥산(800 ml×3), 클로로포름(800 ml×2) 및 부탄올(800 ml×2)로 분획하여 각각 55 g, 6 g 및 30 g을 얻었다. 각 분획으로부터 활성 성분 분리를 수행하였다.

3. 단일화합물의 기기분석

¹H- 및 ¹³C-NMR spectrum은 Bruker AMX 500 spectrometer (VG Analytical, UK)로, MS spectrum은 VG70-VSEQ (VG Analytical, UK)으로 측정하였다. 추출 및 column chromatography 용 용매는 1급시약을, 기타 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(70-230 and 230-400mesh, ASTM Art. 7734 and 9385, Merck)을 사용하였고, reverse phase column chromatography용 충전제는 LiChroprep RP-18(40-63 μm, Art. 13900, Merck)를 사용하였다. TLC plate는 Kiesel gel 60 F254 precoated plate(Art. 5554, Merck)를 사용하였다.

4. 세포 배양

100 mm culture dish(TPP, Switzerland)에 3×10⁴ PC12 cells를 접종한 후, 2 g/L sodium bicarbonate, 5% horse serum, 10% fetal bovine serum(FBS) 및 penicillin-streptomycin (10000U/ml) 1%가 포함된 RPMI1640 배지 하에서 배양하였다. 이때 사용한 FBS는 사용하기 전 56°C에서 30분간 heat-inactivation시켜 사용하였다. 또한 5% CO₂와 O₂ 95% 배양기에서 70% 습도와 37°C 온도 조건이 유지되게 한 후 배양하였다. 배지는 10 ml씩 매일 새로운 배지로 교체하였고, 세포 배양에 사용한 모든 시약은 GIBCO BRL 제

품을 사용하였다.

5. 시료의 처리

100 mm 배양용기에서 세포들이 1×10⁷ cells/well이 되면 0.25% trypsin-EDTA(Gibco BRL, USA)용액을 500 μl 처리함으로써 세포들을 배양용기로부터 이탈시킨 후 10 ml의 신선한 배지로 trypsin-EDTA용액을 중화시키고 세포 현탁액을 얻었다. 세포현탁액 20 μl에 0.4% trypan blue (in PBS bufer) 10 μl을 가하여 염색한 후 hemocytometer를 이용하여 살아있는 세포수를 계산하였다. poly-D-lysine (Sigma, USA, 50 ug/ml)을 DPBS로 희석한 다음, 6well plate에 2 ml씩 가하여 37°C에서 1시간 이상 방치하였다. 1시간 후 DPBS(pH.4)로 washing한 다음 건조된 6well에 1×10⁵ cells/well의 농도로 배양용기에 접종하여 배양하였다. 시료는 DMSO(Dimethylsulfoxide, Sigma, USA)에 녹여 이의 최종농도가 0.1% 이하가 되도록 한 후 0.22 μM 멸균용 필터를 이용하여 여과하였다. 접종한 지 24시간 후에 화합물의 최종농도는 각각 10 μM, NGF는 50 ng/ml의 농도로 처리하였다. 5% CO₂와 95% O₂ 혼합공기 하에서 온도와 습도가 일정하게 유지되는 배양기에서 6일동안 배양하면서 neurite outgrowth정도를 관찰하였고 2일에 한번씩 새로운 배지로 가해주었다.

6. Neurite outgrowth 측정

접종한지 24시간 후에 1% FBS, 2% HS이 첨가된 신선한 배지로 교체하였다. 24시간이 지난 후부터 매일 일정한 시간에 위상차 현미경을 이용하여 cell body로부터 성장한 neurite의 정도를 관찰하였고 위상차 현미경을 이용하여 현미경 사진을 찍은 후에 인화된 사진을 이용하여 그 길이를 측정하였다. neurite outgrowth에 미치는 효과는, neurite길이가 보이지 않으면 0으로, cell body의 직경과 그 길이가 같으면+로, cell body 직경의 2배길이로 성장하였으면 ++로 정하고, 그 이상의 길이가 되면 +++으로 수치화 하였다. 각 well당 10개의 세포를 선정하여 cell의 neurite outgrowth정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 백강잠 101A로부터 단일 화합물 분리

헥산분획 55 g에 대하여 헥산-초산에틸-메탄올 혼합용매로 메탄올 함량을 높여가며 실리카겔 크로마토그래피를 수행하여 4개의 소분획으로(H-1~H-4) 나눈 다음, H-1 분획(30 g)을 헥산-초산에틸(3:1)을 유출용매로 한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에 적용하여 3개의 소분획을(H-11~H-13) 얻었다. H-13 분획(4.6 g)에 대하여 디클로로메탄-메

나올(1:1)을 유출용매로 한 세파덱스 LH-20 크로마토그래피를 수행한 후 역상 Lobar® A 컬럼 크로마토그래피(90% MeOH)를 수행하여 화합물 1(3 mg), 2(5 mg), 3(15 mg) 및 4(17 mg)를 얻었다. 부탄올 분획 30g을 헥산-초산에틸-증류수(8:5:2)에서 메탄올까지 순차적으로 용매극성을 높여 가며 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 수행하여 4개의 소분획 B1-B4을 얻었다. B2 분획에(1 g) 대하여 80% 메탄올을 유출용매로 하여 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피를 수행한 후 초산에틸-메탄올-증류수(9:3:1)을 유출용매로 한 아민 Sep-Pak으로 정제하여 화합물 5(100 mg)을 얻었다. B3 분획을(7 g) 초산에틸-메탄올-증류수(9:5:2)을 유출용매로 한 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 이용하여 4개의 소분획 B31-B34으로 나누었다. B31 분획에 대하여 80% 메탄올을 유출용매로 하여 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피를 수행한 후 초산에틸-메탄올-증류수(9:3:1)을 유출용매로 한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 6(40 mg)를 얻었다. B32 분획에 대하여 80% 메탄올을 유출용매로 하여 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피를 수행한 후 초산에틸-메탄올-증류수(9:3:1)을 유출용매로 한 아민 Sep-Pak으로 정제하여 화합물 7(300 mg)을 얻었다. B34 분획에 대하여 80% 메탄올을 유출용매로 하여 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피를 수행한 후 초산에틸-메탄올-증류수(9:5:2)을 유출용매로 한 아민 Sep-Pak으로 정제하여 화합물 8(120 mg)을 얻었다. B4 분획에(700 mg)에 대하여 80% 메탄올을 유출용매로 하여 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻은 백색결정을 메탄올로 세척하여 화합물 9(150 mg)를 얻었다.

2. 화합물의 구조구명

기반분석을 통하여 구조는 다음과 같이 결정하였다.

가. (4E, 2S, 3R)-2-N-Octadecanoyl-4-tetradecasphingenine (1)

화합물 1은 무정형 백색분말상으로서 EI-MS 스펙트럼에서 분자이온피크가 m/z 509에서 관찰되었다. IR 스펙트럼에서는 1650 cm^{-1} 의 아마이드 흡수대를 관찰할 수 있었다. 화합물 1에 염산 및 메탄올을 처리하여 얻어진 지방산 에스테르를 GC-MS로 분석한결과 octadecanoic acid methyl ester로 확인되었다. 이상의 자료를 통하여 화합물 1의 구조는(4E, 2S, 3R)-2-N-octadecanoyl-4-tetradecasphingenine으로 확정하였다.

나. (4E, 6E, 2S, 3R)-2-N-Eicosanoyl-4,6-tetradecasphingadienine (2)

화합물 2는 무정형 백색분말상으로서 HR-FAB-MS 스펙트럼을($[M+Na]^+$ m/z 558.4874) 통하여 분자량이 $C_{34}H_{65}NO_3$ 임을 확인하였다. IR 스펙트럼에서는 3340 cm^{-1} 에서 수산

기의 흡수대 및 1648 cm^{-1} 에서 아마이드기의 흡수대를 관찰할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 $\delta 3.70(1\text{H, br.d, } J=10.5\text{ Hz})$, $3.89\sim 3.96(2\text{H, m})$ 및 $4.39(1\text{H, br.s})$ 의 피크들과 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 $\delta 55.16$, 63.21 및 75.26 의 피크들은 hydrocarbon chain에서 2-amino-1,3-diol group의 전형적인 피크로서 이를 통하여 화합물 2는 sphingosine 유도체와 유사한 구조를 가지는 것으로 추정할 수 있었다.¹⁰⁾ 상기한 피크를 제외하고 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서는 $\delta 0.88(6\text{H, t, } J=7.0\text{ Hz})$, $1.20\sim 1.39(42\text{H, m})$, $1.61(2\text{H, br. sep, } J=7.5\text{ Hz})$, $2.06(2\text{H, m})$ 및 $2.22(2\text{H, t, } J=7.5\text{ Hz})$ 에서 aliphatic hydrocarbons chain의 피크를, $\delta 5.61(1\text{H, dd, } J=15.0, 6.0\text{ Hz})$, $5.73(1\text{H, dt, } J=15.0, 7.5\text{ Hz})$, $6.03(1\text{H, dd, } J=15.0, 10.5\text{ Hz})$, $6.29(1\text{H, dd, } J=15.0, 10.5\text{ Hz})$ 에서 서로 conjugation된 4개의 불포화 수소들의 피크를 관찰할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 $\delta 14.78$ 및 14.81 에서 두 개의 말단 메틸피크를, $\delta 129.62$, 129.64 , 133.46 및 137.50 에서 이중결합탄소 피크를, 174.60 에서 아마이드탄소 피크를 관찰할 수 있었다. 이중결합의 위치 및 geometry는 짝지음상수 및 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 자료를 통하여 확정할 수 있었다. 화합물 2의 acid methanolysis를 통하여 얻어진 지방산 에스테르는 GC-MS 분석결과 eicosanoyl methyl ester로 확인되었다. FAB-MS에서 화합물 2의 $[M+Na]^+$ 이온의 CID(collision-induced dissociation) 스펙트럼은 m/z 318($296+Na-H$)에서 주이온 피크를 나타내었다. 이를 통하여 화합물 2가 C_{14} 아마노 알코올의 지방산 아마이드 유도체임을 추정할 수 있었다.¹¹⁾ 화합물 2의 optical rotation을($+3.2^\circ$) sphingosine 유도체들과^{12,13)} 비교한 결과 화합물 2의 입체구조는 2S, 3R임을 확인할 수 있었다. 이상의 자료를 통하여 화합물 2의 구조는(4E, 6E, 2S, 3R)-2-N-eicosanoyl-4,6-tetradecasphingadienine으로 결정하였으며 이 물질은 천연에서 처음 분리 보고되는 물질이다.

다. (4E, 2S, 3R)-2-N-Eicosanoyl-4-tetradecasphingenine (3)

화합물 3은 무정형의 백색분말로서 HR-FAB-MS 스펙트럼을($[M+Na]^+$ m/z 558.4874) 통하여 분자량이 $C_{34}H_{67}NO_3$ 임을 확인하였다. ^1H 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 자료는 화합물 3에는 단지 하나의 이중결합만이 존재하는 것을 제외하면 화합물 2과 매우 유사하였다. 화합물 3의 methanolysis를 통하여 얻어진 지방산 에스테르를 GC-MS로 분석한 결과 eicosanoyl methyl ester임을 확인할 수 있었다. 화합물 3의 FAB-MS에서 $[M+Na]^+$ 이온의 CID 스펙트럼은 m/z 320($298+Na-H$)의 주이온피크를 나타내었다. 이를 통하여 화합물 3 또한 C_{14} 아마노 알코올의 지방산 아마이드 유도체임을 추정할 수 있었다.¹¹⁾ 따라서 화합물 3의 구조는(4E, 2S, 3R)-2-N-eicosanoyl-4-tetradecasphingenine으로 확정하였다. C_{18} sphingosine의 eicosanoyl amide 치환형 물질은 GC-MS

를 통하여 Krivit와 Hammarstrom가 이미 규명된 바 있으나 C₁₄-2-amino-1,3-diol 측쇄형인 화합물 3은 천연에서 처음 보고되는 바이다.

라. (4E, 6E, 2S, 3R)-2-N-Docosanoyl-4,6-tetradecaspngingadienine (4)

화합물 4는 무정형 백색분말상으로서 HR-FAB-MS 스펙트럼을 통하여 분자량이 C₄₀H₇₇NO₃임을 확인하였다. IR 스펙트럼에서는 3340 cm⁻¹에서 수산기의 흡수대 및 1648cm⁻¹에서 아마이드기의 흡수대를 관찰할 수 있었다. 역시 ¹H-NMR 스펙트럼에서 δ 3.70(1H, br.d, J=10.5 Hz), 3.89~3.96 (2H, m) 및 4.39(1H, br.s)와 ¹³C-NMR 스펙트럼에서 δ55.16, 63.21 및 75.26에서 sphingosine의 전형적인 피크들을 관찰할 수 있었다. ¹H 및 ¹³C-NMR 자료는 화합물 2과 매우 유사하여 화합물 4는 화합물 2과 같은 구조를 가지며 단지 지방산 chain의 길이만이 차이가 있음을 추정할 수 있었다. 화합물 4의 methanolysis를 통하여 얻어진 지방산 에스테르를 GC-MS로 분석한 결과 docosanoyl methyl ester임을 확인할 수 있었다. 화합물 4의 FAB-CID MS 스펙트럼에서는 화합물 2에서와 같이 m/z 318의 이온피크가 관찰되었다. 화합물 4의 optical rotation값은 +3.6°로서 이는 화합물 2(+3.2°)의 입체구조와 동일함을 입증하였다. 따라서 화합물 4의 구조는(4E, 6E, 2S, 3R)-2-N-docosanoyl4,6-tetradecaspngingadienine으로 결정하였으며 이 물질은 천연에서 처음 분리 보고되는 물질이다.

마. 1,7-Dimethyl-xanthine (5)

화합물 5은 녹는점 290°C의 백색분말상 물질로서 FAB-MS에서 분자이온피크가 m/z 180에서 관찰되었다. ¹H-NMR 스펙트럼에서는 δ3.30(3H, s) 및 3.51(3H, s)에서 2개의 NCH₃ 피크와 δ7.62(1H, s)에서 이중결합수소 피크를 관찰할 수 있었고, ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 δ29.17 및 30.23에서 2개의 NCH₃ 피크와 δ116.72, 139.39, 150.76, 155.30 및 157.66에서 이중결합탄소의 피크들을 관찰할 수 있었다. 화합물 5의 ¹H- 및 ¹³C-NMR 스펙트럼은 dimethyl xanthine 유도체의 형태로서 화합물 5의 구조는 1,7-dimethylxanthine으로 추정하였고 표품 1,7-dimethylxanthine 의(Aldrich, 27,151-9) 녹는점 및 NMR 자료와 비교하여 완전히 일치함을 확인하였다.

바. Uracil (6)

화합물 6는 무색검상 물질로서 ¹H-NMR 스펙트럼에서는 δ5.43 (1H, dd, J=7.6, 2.4 Hz) 및 7.37(1H, dd, J=7.6, 2.7 Hz)에서 cis-이중결합 수소 피크와 δ10.81(1H, br.s) 및 10.97(1H, br.s)에서 아마이드의 NH 피크를 관찰할 수 있었다. ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 δ101.37 및 143.32에서 α,β-불포화 케톤의 이중결합 수소피크와 152.66 및 165.48에서 아마이드의 탄소 피크를 관찰할 수 있었다. 이상의 자료를

통하여 화합물 6의 구조는 uracil로 추정하였으며 표품과의(Aldrich, 13,078-8) 비교를 통하여 그 구조를 확정하였다.

사. Urea (7)

화합물 7은 녹는점 131°C의 무색결정상 물질이다. 원소 분석자료(C 20.4%, H 6.76%, N45.6%, O 27.24%)와 ESI-MS 스펙트럼을 ([M+Na]⁺ m/z 83) 통하여 분자식을 CH₄N₂O로 결정하였다. 화합물 7의 ¹H-NMR 스펙트럼에서는 δ5.71 (4H, br.s)에서 NH₂ 피크와 ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 δ162.90에서 아마이드 탄소만이 관찰되었다. 분자식과 NMR 자료를 기초로 하여 화합물 7의 구조는 Urea로 추정하였으며, 표품과의(Aldrich, 20,888-4) 비교를 통하여 그 구조를 확정하였다.

아. Betaine (8)

화합물 8는 백색분말상 물질로서 드라켄돌프 시약에서 적색으로 발색되었다. IR 스펙트럼에서 1622 cm⁻¹에서 카르복실 음이온기와 2135 cm⁻¹에서 암모늄 양이온기에 의한 흡수대를 관찰할 수 있었고¹⁴⁾, m/z 118.0869의 유사분자이온 피크([M+H]⁺)가 관찰된 HR-FAB-MS 스펙트럼과 원소분석 자료(C 50.49% H 9.81% N 11.70% O 30.60%)를 통해서 화합물 8의 분자식은 C₅H₁₁NO₂임을 확인할 수 있었다. ¹H-NMR 스펙트럼에서는 δ3.19(9H, br.s) 및 δ4.14 (2H, br.s)에서 2개의 broad singlet 피크만이 관찰되었다. ¹³C-NMR 및 DEPT 스펙트럼에서는 δ53.8에서 아미노메틸 탄소, δ64.67에서 아미노메틸렌 탄소 및 δ167.35에서 카르보닐 탄소에 의한 피크를 관찰할 수 있었다. 이상의 자료를 통하여 화합물 8은 3개의 아미노 메틸기가 같은 자장환경에 존재하며 한분자내에 암모늄 이온과 카르복실 이온을 모두 가지는 양쪽성 이온(zwitterion)으로서 즉 N,N,N-trimethyl-amino acid 유도체임을 추정할 수 있었다. DEPT 자료에서 아미노메틸탄소와 카르보닐 탄소에 의한 피크를 제외하면 아미노산의 α-탄소로서 CH₂(δ64.67, t)만이 관찰되었다. 따라서 화합물 8는 N,N,N-trimethyl-glycine 구조로서 betaine임을 확인할 수 있었고 기존 문헌 자료^{15,16)} 통하여 그 구조를 확정하였다.

자. Tyrosine (9)

화합물 9는 백색분말상 물질로서 닌히드린(ninhydrin) 시약에 적색으로 발색되어 아미노산 유도체임을 추정할 수 있었다. 화합물 9의 EI-MS 스펙트럼에서는 분자이온 피크가 m/z 181에서 관찰되었다. ¹H- 및 ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 페닐기의 존재를 확인할 수 있었다 [¹H : δ6.71 (2H, d, J=8.0 Hz) 및 7.04(2H, d, J=8.0 Hz); ¹³C : δ116.54, 125.72, 131.64, 157.80]. 따라서 화합물 9의 구조는 tyrosine으로 추정하였고, 화합물 9의 NMR 자료와 표품 DL-tyrosine 의(Aldrich, 14,572-6) 자료를 비교하여 완전히 일치함을 확인하였다.

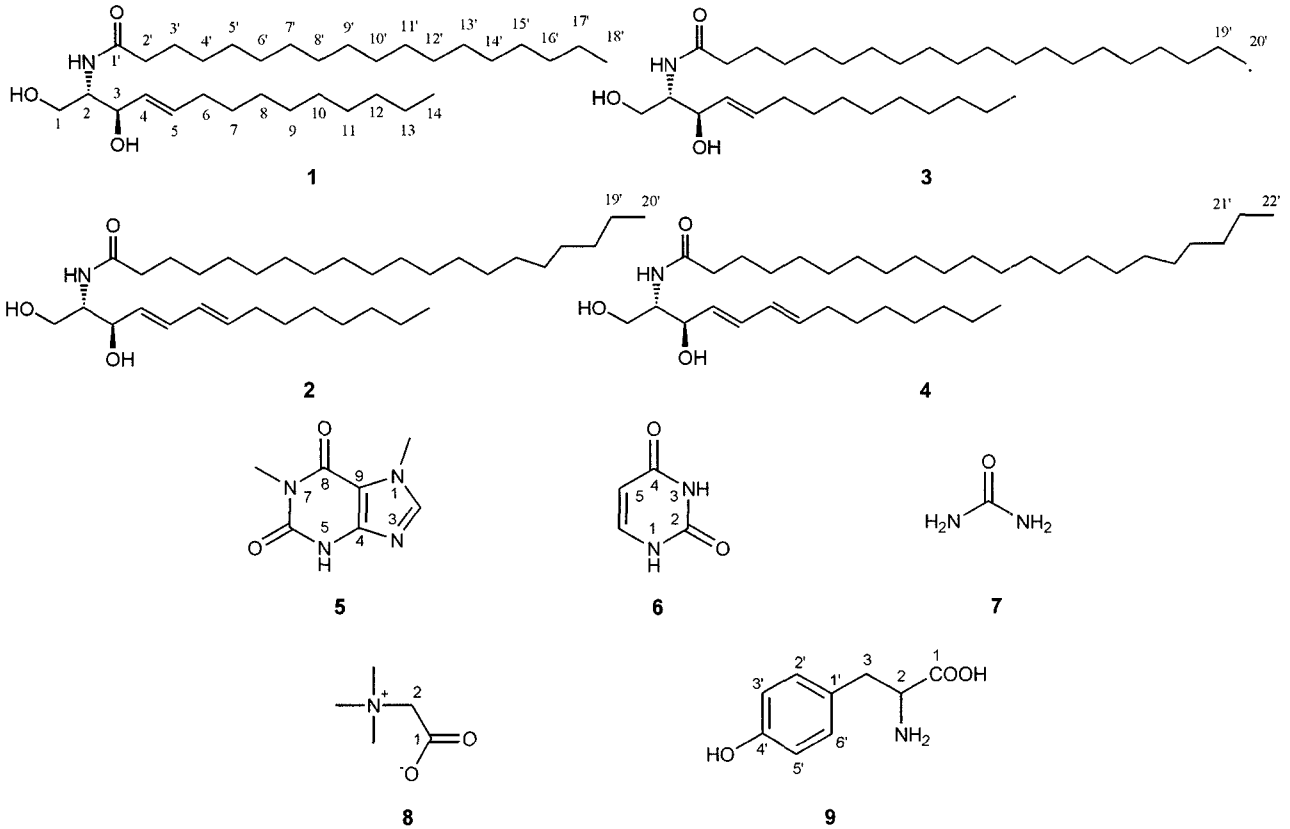


Fig. 1. Structure of Isolated compound.

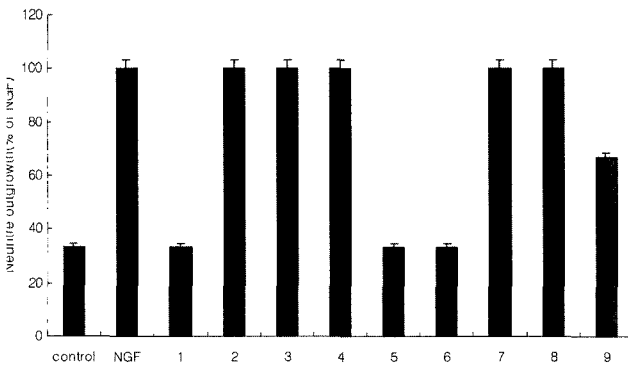


Fig. 2. PC 12cells in 6-well plates were treated with compound 1-9 and NGF, and neurite outgrowth was measured under a microscope at 6d-post treatment.

3. 급성독성 실험

가. 경구투여

ICR 마우스와 SD rat을 각각 10마리씩 나누어 백강잠 추출물을 100, 250, 500 및 1000 mg/kg의 용량으로 경구 투여하였다. 경구투여 후 2주간 독성 여부를 관찰한 결과 모든 군에서 한 마리도 사망하지 않았으며 외견상 대조군과 별다른 증상을 찾아볼 수 없었다.

나. 복강투여

경구투여 ICR 마우스와 SD rat을 각각 10마리씩 나누어 백강잠 추출물을 25, 100, 250 및 500 mg/kg의 용량으로 복강투여하였다. 복강투여 후 24시간 독성 여부를 관찰한 결과 500 mg/kg에서 2마리가 사망하였고 살아남은 동물의 경우 외견상 대조군과 별다른 증상을 찾아볼 수 없었다.

적 요

뇌신경세포주(PC12)에 백강잠의 분획물(조추출물)을 10 µg/ml의 농도로 처리한 결과 헥산분획층과 부탄올분획층에서 뇌신경세포성장을 촉진하는 활성을 나타내어 헥산분획물로부터 화합물 4종(Fig.2: compound 1-4)과 부탄올분획물로부터 화합물 5종(Fig.2: compound 5-9)을 분리하여 각각의 화합물에 대하여도 검색한 결과 모두 뇌신경세포주(PC12)에 뇌신경세포 성장 촉진효과를 나타냈으며 특히 이들중 3종(4E, 6E, 2S, 3R)-2-N-Eicosanoyl-4,6-tetradecasphingadienine, (4E, 6E, 2S, 3R)-2-N-Docosanoyl-4,6-tetradecasphingadienine, Urea의 화합물은 NGF보다 우수한 활성을 나타냈다. 또한 헥산분획물로부터 분리한 4종

의 스프링고신 유도체는 천연에서 처음 보고되는 물질이다.

이러한 결과로부터 백강잠 유래의 유효성분을 함유하는 추출물은 뇌졸중, 뇌허혈, 파킨슨, 노인성치매 및 헌팅턴 질환을 포함하는 뇌질환 예방 및 치료를 위한 약학적 제제로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

인용문헌

- Edsall, J. T. (1943) Raman spectra of amino acids and related compounds. VI. Sarcosine, ethanolamine, choline, betaine and betaine derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1767.
- Fischer, W., Wictorin, K. and Gage, F. H. (1987) Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factors, *Nature*, **329**, 65.
- Hefti, F. (1994) Neurotrophic factor therapy for nerve system degenerative diseases, *J. Neurobiol.*, **25**, 1418 .
- Higuchi R., Harano, Y., Mitsuyuki, M., Isobe, R., Yamada, K., Miyamoto, T., Komori, T. (1996) Isolation and structure of cerebrosides from the starfish *Stellaster equestris*. *Liebigs Annalen*, 593-599.
- Isobe R., Inagaki M., Harano, Y., Sakiyama H., Higuchi R. (1997) Structural elucidation of glycosphingolipids by collision-induced dissociation of sodium ion complex. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **45**, 1611-1614.
- Jiang, H., Huang, X., Nakanishi, K., Berova, N. (1999) Nanogram scale absolute configurational assignment of ceramides by circular dichroism. *Tetrahedron Letters* **40**, 7645-7649.
- Jonhagen, M. E., Nordberg, A., Amberla, K. (1998) Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease. *Dementia Geriatr. Cognit. Disord.*, **9**, 246.
- Krivit, W., Hammarstrom, S. (1972) Identification and quantitation of free ceramides in human platelets. *Journal of Lipid Research* **13**, 525-530.
- Kwon, H. C., Moon, H. I., Choi, S. H., Lee, J. O., Cho, S. Y., Jung, I. Y., Kim, S. Y. and Lee, K. R. (1999) Cytotoxic constituents of *Bombycis corpus*. *Yakhak Hoeji*, **43**, 169.
- Kwon, H. C., Bang, E. J., Choi, S. U., Lee, W. C., Cho, S. Y., Jung, I. Y., Kim, S. Y. and Lee, K.R. (2000) Cytotoxic cyclodepsipeptides of *Bombycis corpus* 101A. *Yakhak Hoeji*, **44**, 115.
- 김창민 · 신민교 · 안덕균 · 이경순 (1997) *중약대사전*, 완역판, 도서출판 정담. 2015.
- Leifer, A. and Lippincott, E. R. (1957) The infrared spectra of some amino acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5098.
- Li P, Matsunaga K, Ohizumi Y. (1999) Enhancement of the nerve growth factor-mediated neurite outgrowth from PC12D cells by Chinese and Paraguayan medicinal plants. *Biol Pharm Bull.* **22**, 752.
- Lindavall, O., Kokaia, Z., Bengzon, J., Elmer, E., Kokaia, M. (1994) :Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci.*, **17**, 490.
- Mori, K., Fumaki, Y. (1985) Synthesis of (4E, 8E, 2S, 3R, 2'R)-N-2'-hydroxyhexadecanoyl-9- methyl-4,8-sphingadienine. The ceramide portion of the fruiting-inducing cerebroside in a basidiomycete *Schizophyllum commune* and its (2R, 3S)-isomer. *Tetrahedron* **41**, 2369-2377.
- Motohashi, N., Mori, I. and Sugiura, Y. (1976) ¹³C-Nuclear magnetic resonance and raman spectroscopic studies on ionization and mercury complex of ergothioneine. *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 1737.
- Mizuta, I., Ohta, M., Ohta, K., Nishimura, M., Mizuta, E., Hayashi, K. and Kuno, S. (2000) Selegiline and Desmethylselegiline Stimulate NGF, BDNF, and GDNF Synthesis in Cultured Mouse Astrocytes. *Biochemi Biophys Res Commu.*, **751**, 279.