

백출 추출물의 암세포증식 저해 효과

이성옥 · 서지희 · 이정원 · 유미영 · 권지웅 · 최상운 · 강종성¹ · 권대영² · 김영균³ · 김영섭 · 유시용*
한국화학연구원, ¹충남대학교 약학대학, ²한국식품연구원, ³국민대학교 삼림과학대학

Inhibitory Effects of the Rhizome Extract of *Atractylodes japonica* on the Proliferation of Human Tumor Cell Lines

Sung Ok Lee, Jee Hee Seo, Jung Won Lee, Mi Young Yoo, Jee Woong Kwon,
Sang Un Choi, Jong Seong Kang¹, Dae Young Kwon², Young-Kyoon Kim³,
Young Sup Kim and Shi Yong Ryu*

Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-606, Korea
¹College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
²Korea Food Research Institute, Gyeonggi-do 463-746, Korea
³College of Forest Science, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

Abstract – The rhizome extract of *Atractylodes japonica* Koidzumi(Compositae) exhibited a particular inhibition on the proliferation of cultured human tumor cell lines, *in vitro*. Thus, the intensive phytochemical investigation of the MeOH extract of *Atractylodes japonica* have been conducted by the way of activity-guided purification. The repeated column chromatographic separation of the *n*-hexane soluble part of extract resulted in the isolation of four sesquiterpenes (1-4) and a polyacetylene component (5). Chemical structures of them were identified as atractylon (1), atractylenolide I (2), atractylenolide III (3), eudesma-4(15),7(11)-dien-8-one (4) and 1,3-diacetyl-atractylodiol (5) by spectroscopic means. Among the isolates, compound 2-4 were shown to give moderate inhibitory effect in a dose dependent manner on the proliferation of cultured human tumor cell lines such as A549 (non small cell lung), SK-OV-3 (ovary), SK-MEL-2 (melanoma), XF498 (central nerve system) and HCT 15(colon), respectively.

Key words – *Atractylodes japonica*, Compositae, atractylon, atractylenolide I, atractylenolide III, eudesma-4(15),7(11)-dien-8-one, 1,3-diacetyl-atractylodiol, cytotoxicity

백출(*Atractylodes japonica*)은 국화과 (Compositae)에 속하는 다년생 식물 삼주의 근경을 일컬으며 흔히 주피를 제거한 불규칙한 덩어리 모양으로 바깥면이 황색을 띠며 근데근데 갈색의 주피 흔적이 남아 있다.¹⁾ 백출은 방향성건위제로 한방에서는 비장을 보강하는 건비, 보비 처방에 빈용되며 진정, 이뇨, 지한, 자양, 안태효과, 진통작용, 항염증작용, 혈당치저해효능, 혈압강하, 이뇨작용 등이 보고되고 있다.^{2,3)} 함유성분으로는 acetaldehyde, furfural, atractylon, diacetyl-atractylodiol 등이 보고되고 있다.^{4,5)} 한편, 본 연구진은 A549 (인체유래 비소세포암주) 등 5종의 인체유래 암세포주를 대상으로 하여 시험관 내 (*in vitro*) 세포증식저해효과를 지표로 하여 300 여종의 생약재 추출물들의 항암효능

을 검색하여 본 결과 생약재 백출의 MeOH 추출물이 농도 의존적으로 양호한 종양세포증식 저해효과를 보여주고 있음을 알 수 있었다. 이에 본 연구진은 백출의 메탄올 추출물로부터 항암활성성분을 분리하고자 용매 분획과 반복적인 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 추출물을 정제한 결과 최종적으로 4종의 sesquiterpene (1-4) 화합물 및 1종의 acetylene 화합물 (5)을 얻었으며 이들의 이화학적 성상 및 기기분석 자료로부터 그 구조를 확인 동정하였다. 아울러 이들 화합물들의 암세포에 대한 *in vitro* 세포증식 저해효과를 연구하였기에 보고하고자 한다.

실험 방법

실험재료 – 본 실험에 사용된 백출은 (*Atractylodes japonica*)

*교신저자(E-mail) : syryu@kricr.re.kr
(FAX) : 042-860-7160

Koidzumi)은 2002년 9월에 시중 건재상에서 구입하여 국민대학교 김영균 교수의 감정 후 실험에 사용하였으며 표품은 한국화학연구원 (표본번호 KR0071-2002)에 보관되어 있다.

기기 및 시약 - NMR은 Bruker의 AM-300과 AMX 500을 사용하였다. 선광도는 JASCO DIP-4 digital polarimeter를 사용하였고, low resolution MS (70 eV)는 JEOL사의 JMS-DX 303 mass spectrometer를 사용하였으며, column packing 용 silica gel은 Kiesel gel 60 (Merck)를 사용하였고, TLC plate는 Kiesel gel 60F₂₅₄ (Merck)을 사용하였다. 발색 시약은 10% H₂SO₄을 사용하였으며 UV 254 nm, 365 nm에서 검출하였다. 추출, 분획 및 column chromatography용 시약은 1급 시약을 정제 없이 사용하였고 나머지 시약은 1급 시약을 정제해서 사용하거나 특급 시약을 사용하였다. 세포독성 실험은 sulforhodamin B(SRB) bioassay방법을 응용하여 수행하였다.⁶⁾ 실험에 사용한 암세포주들은 A549 (non small cell lung carcinoma), SK-OV-3 (ademoncarcinoma, ovary malignant ascites), SK-MEL-2 (malignant melanoma, metastasis to skin of thigh), XF-498 (central nerve system tumor) 및 HCT-15 (colon adenocarcinoma)이며 모두 human origin tumor cell line들로서, 미국의 국립암연구소(NCI)로부터 분양받아 한국화학연구원에서 계대배양 중인 것을 사용하였다.

추출 및 용매분획 - 건조중량 6 kg의 세절한 백출을 상온에서 methanol 60 L로 1주일간 냉침(3회 반복)한 후 여액을 모아 수욕상에서 감압 농축하여 MeOH 엑기스 940 g을 얻었으며, 이를 증류수 20 L에 현탁시킨 후 *n*-hexane, ethyl acetate (EtOAc) 및 butanol (BuOH)의 순으로 단계적으로 추출한 결과 *n*-hexane 분획 180 g, EtOAc 분획 110 g 및 BuOH 분획 20 g을 얻었다.

분리 및 정제 - *n*-hexane 분획 (180 g)을 SiO₂ column chromatography (hexane : ethylacetate=10:1~1:1) 실시하여 7개의 분획 (H1~H7)으로 나눈 후, 그 중 H3 (59 g) 분획을 *n*-hexane:EtOAc (1:1)를 유출 용매로 재차 SiO₂ column chromatography를 수행하여 다섯개의 소분획 (H31~H35)으로 나누었다. 이 중 소분획 H31 (42 g)을 SiO₂ column chromatography (*n*-hexane:EtOAc=1:1)를 시행하여 무색 침상 화합물 **1** (12 g)을 얻었으며, H35 (2 g)을 RP-18 column chromatography (90% MeOH)를 시행하여 무색 침상 화합물 **2** (270 mg)을 얻었다. 한편 H7 (16 g) 분획은 70% MeOH를 유출용매로 RP column chromatography를 실시하여 6개의 소분획 (H71~H76)으로 나누고, 소분획 H71 (2.7 g) 과 H73 (6 g)을 SiO₂ column chromatography (*n*-hexane:ethylacetate =15:1)로 정제한 결과, 화합물 **3** (180 mg)과 화합물 **5** (3.8 g)을 얻었다. H5 (3.6 g)분획을 *n*-hexane:ethylacetate (3:1)를 유출용매로 SiO₂ column chromatography를 수행하여 3개의 소분획 (H51~H53)을 얻은 후, 소분획 H52 (1.5 g) 분획을

SiO₂ column chromatography (*n*-hexane:ethylacetate=3:1)로 정제하여 무색 오일상 화합물 **4** (900 mg)를 얻었다.

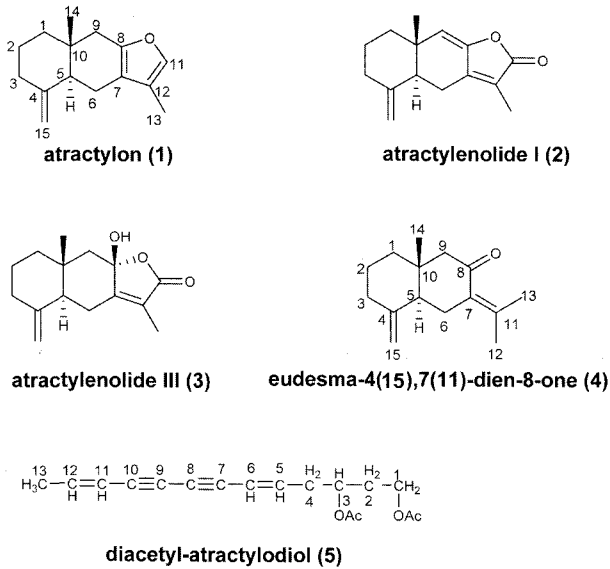
화합물 1 - colorless needles, mp. 38°C, [α]_D : + 42° (c 0.1, CHCl₃), EI-MS *m/z* : 216 [M]⁺, ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 0.78 (3H, s, H-14), 1.97 (3H, s, H-13), 4.73 (1H, br. s, H-15), 4.89 (1H, br. s, H-15), 7.07 (1H, s, H-11), ¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 8.2 (C-13), 17.5 (C-14), 20.8 (C-6), 23.2 (C-2), 36.5 (C-3), 37.2 (C-10), 39.1 (C-1), 41.8 (C-9), 45.6 (C-5), 107.2 (C-15), 116.0 (C-8), 119.5 (C-11), 136.8 (C-12), 149.3 (C-4), 149.7 (C-7).

화합물 2 - colorless needles, mp. 103°C, [α]_D : + 230° (c 0.2, MeOH), EI-MS *m/z* : 230 [M]⁺, ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 0.94 (3H, s, H-14), 1.91 (3H, s, H-13), 2.40 (1H, m, H-6'), 2.54 (1H, m, H-6), 2.68 (1H, dd, *J*=4.2, 16.8 Hz, H-5), 4.64 (1H, br. s, H-15), 4.92 (1H, br. s, H-15'), 5.61 (1H, s, H-9), ¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃) : 8.4 (C-13), 18.5 (C-14), 22.6 (C-6), 22.9 (C-2), 36.1 (C-3), 38.0 (C-10), 39.0 (C-1), 48.3 (C-5), 107.4 (C-15), 119.1 (C-9), 120.3 (C-11), 147.9 (C-4), 147.9 (C-8), 148.3 (C-7), 171.3 (C-12).

화합물 3 - colorless needles, mp. 192°C, [α]_D : + 185° (c 0.1, CHCl₃), EI-MS *m/z* : 248 [M]⁺, ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 1.03 (3H, s, H-14), 1.82 (1H, H-13), 2.00 (1H, m, H-5), 4.60 (1H, br. s, H-15), 4.86 (1H, br. s, H-15), ¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 8.1 (C-13), 16.5 (C-14), 22.2 (C-6), 24.6 (C-2), 36.0 (C-3), 36.9 (C-10), 41.2 (C-1), 51.1 (C-5), 51.6 (C-9), 103.8 (C-8), 106.9 (C-15), 121.9 (C-11), 148.5 (C-4), 161.2 (C-7), 175.1 (C-12).

화합물 4 - colorless oil, [α]_D : +98° (c. 0.04, CHCl₃), EI-MS *m/z* : 218 [M]⁺, ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 0.78 (3H, s, H-14), 1.82 (3H, s, H-13), 1.99 (3H, s, H-12), 4.61 (1H, br. s, H-15), 4.85 (1H, br. s, H-15), ¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃) : 17.2 (C-12), 17.2 (C-13), 22.2 (C-14), 23.1 (C-6), 29.1 (C-2), 36.6 (C-10), 38.1 (C-3), 41.1 (C-1), 46.9 (C-9), 57.5 (C-5), 106.8 (C-15), 131.4 (C-7), 142.4 (C-11), 148.9 (C-4), 203.5 (C-8).

화합물 5 - amorphous powder, [α]_D : -8.7° (c. 0.04, CHCl₃), EI-MS *m/z* : 288 [M]⁺, ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 1.65 (2H, m, H-4), 1.85 (3H, dd, *J*=1.5, 6.9 Hz, H-13), 2.03 (6H, s, acetyls), 2.13 (2H, m, H-2), 4.05 (2H, t, *J*=6.3 Hz, H-1), 4.97 (1H, m, H-3), 5.52 (2H, d, *J*=15.0 Hz, H-6, 11), 6.22 (2H, m, H-5, 12), ¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃) : δ 18.8 (C-13), 20.7, 20.9, (acetyls), 30.0 (C-2), 32.9 (C-4), 60.4 (C-1), 70.1 (C-3), 72.2 (C-9), 72.9 (C-8), 77.4 (C-10), 79.1 (C-7), 109.3 (C-11), 109.7 (C-6), 143.3 (C-12), 146.4 (C-5), 170.7, 170.8 (acetyls).



결과 및 고찰

화합물 1은 무색 침상 물질로서 EI-MS ($[M]^+$, 216) 및 1H -NMR, ^{13}C -NMR data를 통해 이 화합물의 분자식은 $C_{15}H_{20}O$ 임을 알 수 있었으며 mp, $[\alpha]_D$, 1H -NMR, ^{13}C -NMR data를 기존 문헌^{5,7)}과 비교한 결과 furano-sesquiterpenoid type의 atractylon으로 동정하였다.

화합물 2는 무색 침상 화합물로서, EI-MS ($[M]^+$, 230) 및 1H -NMR, ^{13}C -NMR data를 통해 이 화합물의 분자식은 $C_{15}H_{18}O_2$ 으로 추정하였다. 1H -NMR spectrum에서는 δ 0.94 ppm에서 tertiary 및 δ 1.91 ppm에서 olefinic methyl group을 관찰할 수 있었고, δ 4.64 ppm 및 4.92 ppm에서 exocyclic methylene proton signal 및 하나의 olefinic proton signal을 δ 5.61 ppm에서 관찰할 수 있었다. ^{13}C -NMR에서는 8.4 및 18.5 ppm에서 두개의 methyl carbon signal과 107.4 ppm에서 exocyclic methylene group인 C-15의 signal을 관찰할 수 있었다. 아울러 119.1~148.3 ppm에서 네 개의 olefinic signal

및 171.3 ppm에서 carbonyl carbon signal을 관찰할 수 있었다. 기타 mp, $[\alpha]_D$ 등 물리화학적 data 및 1H -NMR, ^{13}C -NMR data을 기존 문헌⁸⁾과 비교한 결과 furano-sesquiterpenoid type의 atractylenolide I으로 확인하였다.

화합물 3은 무색 침상 화합물로서 EI-MS, 1H -NMR 및 ^{13}C -NMR data를 화합물 2의 그것들과 비교하여 본 결과 화합물 3은 화합물 2의 olefin 구조가 hydration이 된 화학구조로 이루어져 있음을 유추할 수 있었으며 문헌⁹⁾ 검색 결과 화합물 3은 atractylenolide I (2)의 $\Delta^{8,9}$ olefin 구조에 hydration이 일어난 atractylenolide III으로 동정할 수 있었다.

화합물 4는 무색 오일상의 화합물로서, EI-MS (M^+ , 218), 1H -NMR, ^{13}C -NMR data를 통해 이 화합물의 분자식은 $C_{15}H_{22}O$ 으로 추정하였다. 1H -NMR data에서 δ 0.78, 1.82 및 1.99 ppm에서 3개의 methyl group을 각각 관찰할 수 있었으며, δ 4.61 및 4.85 ppm에서 각각 exocyclic methylene proton signal들을 관찰할 수 있었다. ^{13}C -NMR에서는 세 개의 methyl signal (δ 17.2, 17.2, 22.2 ppm) 및 4개의 olefinic signal (δ 106~148.9 ppm), 하나의 carbonyl carbon signal (δ 203.5 ppm)을 관찰되었다. 따라서 화합물 4는 eudesmane type의 eudesma-4(15),7(11)-dien-8-one [selina-4(15),7(11)-dien-8-one]로서 추정할 수 있었고 기존 문헌¹⁰⁾과 비교한 결과 일치함을 확인하였다.

화합물 5는 무정형 화합물로서, EI-MS (M^+ , 288), ^{13}C -NMR spectrum에서 두 개의 carbonyl carbon (δ 170.7, 170.8), 4개의 olefinic carbon (δ 109.3, 109.7, 143.3, 146.4) 및 4개의 삼중결합 signal (δ 72.2, 72.9, 77.4, 79.1)이 관찰되었으며 기타 H-NMR, ^{13}C -NMR data를 종합한 결과 화합물 5는 acetylene type의 화합물인 diacetyl-atractylodiol로 최종 확인, 동정하였다.⁵⁾

한편, 분리정제된 각 화합물(1-5)를 각각 SRB 방법으로 A549 (비소세포암주), SK-OV-3 (난소암주), SK-MEL-2 (피부종양주), XF-498 (중추신경계종양주) 및 HCT-15 (직장종양주) 등 5종의 인체유래 종양세포주에 대한 시험관내 세

Table I. Inhibition of tumor cell proliferation by components isolated from the rhizome extract of *Atractylodes japonica*.

Compound	IC ₅₀ ($\mu g \cdot ml$) ^a				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
I	>30	>30	>30	>30	>30
II	7.6 ± 0.22 ^b	13.6 ± 0.25	8.7 ± 0.12	13.0 ± 0.21	9.9 ± 0.17
III	21.3 ± 0.13	29.2 ± 0.22	24.6 ± 0.21	>30	18.4 ± 0.14
IV	20.4 ± 0.23	22.3 ± 0.45	14.1 ± 0.25	>30	>30
V	14.6 ± 0.21	15.4.1 ± 0.28	11.1 ± 0.35	18.9 ± 0.26	15.6 ± 0.28
Doxorubicin	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.02	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.02	1.8 ± 0.05

^aIC₅₀ value of compound against each cancer cell line, which was defined as a concentration ($\mu g \cdot ml$) that caused 50% inhibition of cell proliferation *in vitro*.

^bData are mean ± S.E.M. of three distinct experiments.

포증식저해 효과를 검색하여 본 결과 atractylenolide I (2)의 경우 각각의 암세포주에 대한 IC₅₀ (50% 세포증식저해 효과를 나타내는 농도) 치가 각각 7.6 µg/ml (A549), 13.6 µg/ml (SK-OV-3), 8.7 µg/ml (SK-MEL-2), 13.0 µg/ml (XF498) 및 9.9 µg/ml (HCT15) 등으로 관찰되어 우수한 중앙세포증식 저해효과를 나타내었으며 atractylenolide III (3), eudesma-4(15),7(11)-dien-8-one (4), diacetyl-atractylodiol (5) 등 화합물도 양호한 항암 효과를 나타내었다 (Table I).

결 론

생약재 백출의 MeOH 추출물은 A549 (인체유래 비소세포암주) 등 5종의 인체유래 암세포주에 대하여 농도 의존적으로 양호한 세포증식저해효과를 나타내었다. 백출의 뿌리 MeOH 추출물을 활성유도 분획법(Bioactivity-directed fractionation)에 따라 chromatography로 정제한 결과 4종의 sesquiterpenoid 화합물과 1종의 polyacetylene 화합물을 활성성분으로 분리 정제하였다. 분리된 화합물들은 각각 물리화학적 성상과 기기 분석 (¹H-NMR, ¹³C-NMR) 소견을 종합한 결과, atractylon (1), atractylenolide I (2), atractylenolide III (3), eudesma-4(15),7(11)-dien-8-one (4) 및 diacetyl-atractylodiol (5)로 확인 동정되었다. 분리된 화합물 (1-5)들을 각각 SRB 방법으로 5종의 인체유래 중앙세포주에 대하여 시험관내 암세포성장저해효과를 검색하여 본 결과 atractylenolide I (2)이 가장 우수한 항암 효과를 나타내었으며 화합물 3-5 등의 경우 역시 양호한 효능을 나타내었다.

사 사

본 연구는 과학기술부 나노바이오 연구사업 및 농촌진흥

청 바이오그린 21 연구사업의 연구비지원에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

1. 이창복(1999) 대한식물도감, 766 향문사.
2. Namba, T, (1980) The Encyclopedia of Wakan-Yaku, 47 Hoikusha.
3. 배기환(2001) 한국의 약용식물, 493-494 교학사.
4. Yim, D.S., Yu, S.C. and Chi, H.J. (1988) Phytochemical study on the Rhizome of *Atractylodes japonica* from Korea. *Kor. J. Pharmacogn.* **19**: 228-232.
5. Yosioka, I., Tani, T., Hirose, M. and Kitagawa, I. (1974) Diacetyl-atractylodiol, a new acetylenic compound from *Atractylodes japonica* KOIDZUMI. *Chem. Pharm. Bull.* **22**: 1943-1945.
6. Skehan, P., Streng, R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D. et al. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* **82**: 1107-1112.
7. Minato, H. and Nagasaki, T. (1966) Studies on sesquiterpenoids. part XIV. Total synthesis of (±)-atractylon. *J. Chem. Soc.* : 1866-1872.
8. Yu, S.M., Kim, H.J., Woo, E.R. and Park, H.K. (1994) Some sesquiterpenoids and 5α,8β-epidioxysterols from *Solanum lyratum*. *Arch. Pharm. Res.* **17**: 1-4.
9. Bohlmann, F., Dutta, L.N., Knauf, W., Robinson, H. and King, R.M. (1980) Neue sesquiterpenpenlacone aus *Aster umbellatus*. *Phytochemisry* **19**: 433-436.
10. Endo, K. and Hikino, H. (1979) Sesquiterpenoids. LIV. Absolute configuration of eudesma 4(14),7(11)-dien-8-one. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **52**: 2439-2440.

(2005년 6월 21일 접수)