

백강잠의 세포독성성분

권학철* · 문형인* · 최상훈** · 이정옥** · 조세연*** · 정이연*** · 김선여*** · 이강노**

*성균관대학교 약학대학, **한국화학연구소, ***농촌진흥청 농업과학원

(Received February 10, 1999)

Cytotoxic Constituents of *Bombycis corpus*

Hak Cheol Kwon*, Hyung In Moon**, Sang Hoon Choi**, Jung Ock Lee**,
Sae Yun Cho***, I-Yeon Jung***, Sun Yeou Kim*** and Kang Ro Lee**

*College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea,

**Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 136-702, Korea, and

***Department of Sericulture & Entomology, National Institute Agricultural Science and
Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea

Abstract—The activity-guided fractionation on the MeOH extract of *Bombycis corpus* inoculated by *Beauveria bassiana* 101A led to the isolation of two steroids, 24-ethylcholest-4-ene-3,6-dione (1) and ergosterol peroxide (2), as active principles. Compounds 1 and 2 exhibited cytotoxicity against cultured human tumor cell lines, A-549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF-498 and HCT-15 with ED₅₀ values ranging from 3.42 to 11.37 µg/ml.

Keywords □ *Bombycis corpus*, *Beauveria bassiana* 101A, 24-ethylcholest-4-ene-3,6-dione, ergosterol peroxide, cytotoxicity.

누에(*Bombix mori*, 누에과 Bombycidae) 유충의 피부에 백강균(*Beauveria bassiana*) 포자를 접종한후 적당한 온도와 습도조건하에서 일정기간 사육하면 누에충체에 균사체가 형성됨으로서 강직현상을 나타내고 결국에는 죽게되는데 이 죽은 충체를 백강잠(*Bombycis corpus*) 이라고한다. 백강잠은 옛부터 중국등지에서 증풍, 두통, 간질, 결핵등 아주 다양하게 응용되어 왔다.¹⁾ 그러나 백강잠의 약리효과에대한 연구는 거의 수행되지 않았으며, 성분연구로는 환상 peptide인 beaubericin, ergosterol peroxide 및 7β-hydroxycholesterol 등이 보고되어 있을뿐이다.²⁾ 본연구의 시료인 백강잠은 농촌진흥청 잠사곤충부에서 백강균의 아종인 *Beauveria bassiana* 101A을 새로이 개발하여 유충의 피부에 접종하여 일정 조건하에서 사육하여 얻은것으로서, 농업과학기술원 및 생명공학연구소에서 기존의 백강균인 *Beauveria bassiana*

와 새로운 균주인 *Beauveria bassiana* 101A의 DNA sequence 연구결과 염기서열이 동일하다고 입증하였다(자료 미제시). 또한 *Beauveria bassiana* 101A는 누에에 대한 감염력이 뛰어나고 균사체형성이 *Beauveria bassiana* 보다 우수하여 백강잠생산력이 뛰어난 것이 특징이라고 할 수있다. 본연구는 이균주에의하여 형성된 백강잠에대한 체계적인 연구의 일환으로 일차적으로 본 백강잠의 알콜추출물에대하여 표준용매분획을 실시하여 얻은 각분획물에대한 세포독성을 측정하였고, 유의성있는 활성을 나타낸 hexane 과 chloroform분획으로부터 세포독성 성분인 2종의 steroid 물질 즉, 24-ethylcholest-4-ene-3,6-dione (1) 및 ergosterol peroxide (2)를 분리하여 구조를 동정하였다.

실험방법

실험재료 - 백강잠(*Bombycis corpus*, 1.5 kg)은 농촌진흥청 잠사곤충부에서 공급받아 감정한후 사용하였다.

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0331-290-7710 (팩스) 0331-290-7730

기기 및 시약 - 용점은 Gallenkamp melting point apparatus를 사용하여 측정하였고 UV는 Shimadzu UV₂₄₀ UV-Visible recording spectrophotometer를 사용하였다. ¹H-및 ¹³C-NMR spectrum은 Bruker AMX-500과 Varian INOVA-500 spectrometer, EI-MS spectrum은 VG70-VSEQ(VG ANALITICAL, UK)으로 측정하였다. 추출 및 column chromatography용 용매는 1급시약을, 기타 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(70~230 and 230~400 mesh, ASTM Art. 7734 and 9385, Merck)을 사용하였고, molecular sieve column chromatography용 충전제는 sephadex LH-20(Pharmacia), TLC plate는 Kiesel gel 60F₂₅₄ precoated plate(Art. 5554, Merck)를 사용하였다.

추출 및 분리 - 백강잠 1.5 kg을 50°C이하에서 MeOH용매 (2 L)로 3회 반복 추출하고 얻어진 추출액을 감압농축하여 80g의 MeOH 추출물을 얻었다. 이를 H₂O에 현탁시킨후 *n*-hexane(800 ml×2), chloroform (800 ml×2) 및 butanol(800 ml×2)로 분획하여 각각 40 g, 5 g 및 10 g을 얻었다. 각각의 용매분획에 대하여 세포독성을 측정하여 유의성있는 활성을 나타낸 hexane 및 chloroform 분획에 대하여 활성성분 분리를 시도하였다. 즉, hexane분획 40 g을 hexane-EtOAc(5:0-5:5) 혼합용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 7개의 소분획 SDH1-SDH7로 나누었다. 또한 chloroform 분획 5 g을 CHCl₃-MeOH(9:1~4:6) 혼합용매로 silica gel column chromatography를 수행하여 5개의 소분획 SDC1-SDC5를 얻었다. 각각의 소분획물에 대하여 세포독성을 측정후, 세포독성에 대한 활성 소분획물인 SDH4 및 SDC2를 정제하였다. 즉, 소분획 SDH4를 hexane-EtOAc(7:2)용매로 silica gel column chromatography로 정제하여 무색의 화합물 **1**(13 mg)을 얻었다. 또한, 활성 소분획 SDC2 EtOAc-MeOH(9:1)용매로 silica gel column chromatography 및 sephadex LH-20 column chromatography(MeOH:CHCl₃=7:3)로 정제하여 무색의 화합물 **2**(15 mg)을 얻었다.

화합물 1 - mp 160~162°C; Liebermann-Burchard 반응: 양성; UV λ_{max} (CHCl₃): 251 nm; EI-MS (m/z): 426 [M]⁺, 285; ¹H-NMR(500MHz, CDCl₃) δ : 0.78(3H, d, *J*=7.0Hz, 18-CH₃), 0.79(3H, d, *J*=

7.2Hz, 26-CH₃), 0.82(3H, d, *J*=7.2Hz, 27-CH₃), 0.92(3H, d, *J*=6.5Hz, 21-CH₃), 1.15(3H, s, 19-CH₃), 6.17(1H, s, H-4); ¹³C-NMR(125MHz, CDCl₃) δ 12.58(C-18), 12.67(C-28), 18.20(C-19), 18.95(C-21), 19.71(C-26), 20.89(C-11), 23.76(C-27), 24.67(C-15), 26.72(C-23), 28.71(C-16), 29.82(C-12), 29.83(C-25), 33.11(C-2), 34.28(C-22), 34.52(C-8), 36.23(C-20), 36.46(C-1), 39.49(C-10), 43.23(C-13), 46.49(C-7), 47.52(C-24), 51.67(C-9), 56.54(C-17), 56.60(C-14), 126.13(C-4), 161.77(C-5), 200.19(C-3), 203.04(C-6).

화합물 2 - mp: 182~184°C; IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3342, 2955, 1458, 1377, 1045; EI-MS(m/z): 428 [M]⁺, 410 [M-H₂O]⁺, 396 [M-O₂]⁺, 377 [M-O₂-H₂O]⁺; ¹H-NMR(CDCl₃, 500MHz) δ : 0.81~0.84(9H, m, H-18, H-27, H-28), 0.89(3H, s, H-19), 0.91(3H, d, *J*=7.0Hz, H-28), 1.00(3H, d, *J*=6.5Hz, H-21), 3.97(1H, m, H-3), 5.13(1H, dd, *J*=15.0, 8.5Hz, H-22), 5.22(1H, dd, *J*=15.0, 8.0Hz, H-23), 6.24(1H, d, *J*=8.5Hz, H-7), 6.50(1H, d, *J*=8.5Hz, H-6); ¹³C-NMR(CDCl₃, 125MHz) δ : 12.98(C-18), 17.55(C-28), 18.16(C-19), 19.63(C-26), 19.93(C-27), 20.63(C-15), 20.88(C-21), 23.41(C-11), 28.62(C-16), 30.16(C-2), 33.07(C-25), 34.72(C-1), 36.97(C-4, C-10), 39.37(C-12), 39.69(C-20), 42.78(C-24), 44.57(C-13), 51.14(C-9), 51.71(C-14), 56.25(C-17), 66.47(C-3), 79.41(C-8), 82.14(C-5), 130.76(C-7), 132.34(C-23), 135.20(C-22), 135.41(C-6).

세포독성실험 - 세포독성 실험은 Sulforhodamin B Bioassay(SRB) 방법을³⁾ 응용하여 한국화학연구소에서 수행하였다. 실험에 사용한 암세포주들은 A549 (non small cell lungcarcinoma), SK-OV-3 (adenocarcinoma, ovary malignant ascites), SK-MEL-2 (malignant melanoma, metastasis to skin of thigh), XF-498 (central nerve system tumor) 및 HCT-15 (colon adenocarcinoma) 등이다.

결과 및 고찰

화합물 **1**은 녹는점이 160~162°C인 무색 결정상물질로서 Liebermann-Burchard(LB) 반응에서 양성을 나타냈다. EI-MS에서 나타난 m/z 426의 분자이온 피

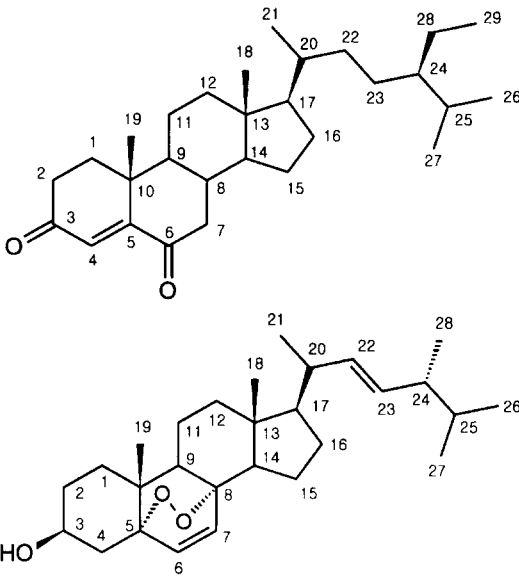


Fig. 1. Structures of compounds 1 and 2

크(M^+)와 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 통해서 화합물 1의 분자식은 $C_{29}H_{46}O_2$ 로 추정하였다. 1H -NMR에서 $\delta 0.78$ 과 1.15 ppm사이에서 4개의 methyl기와 $\delta 6.17$ ppm에서 한개의 olefinic proton 이 단일 피크로 나타났다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 29개의 피크중, $\delta 200.19$, 203.04 ppm에서 2개의 carbonyl group과 $\delta 126.13$, 161.77 ppm에서 2개의 olefinic carbon 피크를 관찰할 수 있었다. UV 스펙트럼으로부터(λ_{max} : 251 nm) 한 개의 이중결합과 2개의 carbonyl group이 conjugation되어 있음을 예측할수 있다. 1H -NMR 스펙트럼에서 하나의 olefinic proton이 저자장으로 shift되어 singlet로 나타난 점과 2개의 carbonyl carbon이 존재하는 점을 기초로 하여 화합물 1은 24-ethylcholest-4-ene-3,6-dione으로 추정하였으며 기존문헌^{4,5)}의 자료와 비교하여 그 구조를 확인 동정하였다.

화합물 2는 녹는점이 $182\sim 184^\circ C$ 인 백색분말로서 peroxide 발색시약⁶⁾에 파란색으로 발색되었다. 분자이온(M^+) peak가 m/z 428에서 나타난 EI-MS 자료와 ^{13}C -NMR 자료로부터 분자식이 $C_{28}H_{44}O_3$ 임을 추정하였다. EI-MS 스펙트럼에서 분자이온 $428(M^+)$ 에서 O_2 가 빠진 m/z 396(M^+-O_2) peak가 현저하게 나타났다. 1H -NMR상에서 $\delta 0.81$ 에서 $\delta 0.83$ 사이에서 세개의 methyl signal을, $\delta 0.89$ (3H, s, H-19)에서 singlet methyl signal, $\delta 0.91$ (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-28)과 $\delta 1.00$ (3H, d, 6.5Hz, H-21)에서 2개의 doublet me-

Table I—The cytotoxic activities of compounds from *Bombycis corpus* on five cancer cell lines

Com-pounds	ED ₅₀ ($\mu g/ml$)*				
	A-549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF-498	HCT-15
1	11.37	7.94	7.74	7.32	4.26
2	5.16	3.68	3.42	4.40	4.63

* ED₅₀ value of compound against each cancer cell line, which was defined as a concentration ($\mu g/ml$) that caused 50% inhibition of cell growth *in vitro*.

thyl signal이 나타났다. $\delta 3.97$ (1H, m, H-3)의 carbinol proton signal, $\delta 5.13$ (1H, dd, $J=15.0$, 8.5 Hz, H-22), $\delta 5.22$ (1H, dd, $J=15.0$, 8.0Hz, H-23)에서 서로 trans-coupling하는 2개의 olefinic proton signal, $\delta 6.24$ (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-7), $\delta 6.50$ (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-6)에서 서로 cis-coupling하는 2개의 olefinic proton들이 관찰되었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 28개의 carbon peak가 나타났다. $\delta 135.20$, $\delta 132.34$, $\delta 135.41$ 및 $\delta 130.76$ ppm에서 네개의 olefinic carbon signal이 관찰되었고, $\delta 66.5$ 에서 OH기가 β 위치에 결합된 C-3 peak와 $\delta 82.14$, $\delta 79.41$ 에서 oxygen과 결합한 C-5와 C-8 피크가 관찰되었다. 이상의 결과와 기존 문헌⁷⁾을 비교하여 화합물 2의 구조는 ergosterol peroxide로 확인 동정하였다. Steroid유도체인 화합물 1과 2의 세포독성을 5종의 암세포주를 이용하여 측정된 결과 ED₅₀($\mu g/ml$) 값이 3.42~11.37로 비교적 강한 세포독성을 나타냈다(Table I).

감사의 말씀

NMR 측정에 도움을 주신 기초과학연구소 방은정, 서정주님께 감사드립니다.

문헌

- 1) 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 : 중약대사전, 완역판, 도서출판 정담, p. 2015 (1997).
- 2) Cheng, K. P., Nagano, H., Bang, L., Ourisson, G. and Beck, J. P. : Chemistry and Biochemistry of Chinese Drugs. Part I. Sterol Derivatives Cytotoxic to Hepatoma Cells Isolated from the Drug Bombyx cum Botryte. *J. Chem. Research*(S) 217 (1977).
- 3) Ryu, S. Y., Lee, C. K., Lee, C. O., Kim, H. S.

- and Zee, O. P. : Antiviral triterpenes from *Prunella vulgaris*. *Arch. Pharm. Res.* **15**, 242 (1992).
- 4) Tunmann, P. and Grimm, H. J. : Ueber ein Steroidketon in der Wurzel von *Sambucus ebulus*. L., *Arch. Pharm.* **307**, 891 (1974).
- 5) Aiello, A., Fattorusso, E., Magno, S. and Menna, M. : Steroids of the marine sponge *Cinachyra tarentina*: Isolation of cholest-4-ene-3,6-dione and (24R)-24-ethylcholest-4-ene-3,6-dione. *J. Nat. Prod.* **54**, 281 (1991).
- 6) Lee, K. R. : Peroxide Constituents in the Natural Product Research, *Kor. J. Pharmacogn.*, **22**(3), 145 (1991).
- 7) Kim, D. S., Baek, N. I., Oh, S. R., Jung, K. Y., Lee, I. S., Kim, J. H. and Lee, H. K. : Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and rearrangement of NMR data. *Arch. Pharm. Res.* **20**(3), 201 (1997).