

## 백자인(栝子仁)으로 부터 항Herpes 바이러스 1형(HSV-1) 물질의 분리

김호경\*, 강은정, 강봉주, 박갑주, 고병섭

한국한의학연구원 연구부

### Isolation of Anti-Herpes Simplex Virus Type 1(HSV-1) Component from Thujae orientalis Semen

Ho Kyoung Kim\*, Eun Jung Kang, Bong Joo Kang,  
Kap Joo Park and Byoung Seob Ko

Department of Research, Korea Institute of Oriental Medicine, Seoul 135-100, Korea

**Abstract** - In order to search for anti-Herpes simplex virus type 1(HSV-1) agents, we screened 80 specimens of Korean traditional medicine by SRB assay. The methanol extracts of Thujae orientalis Semen (Cupressaceae) showed strong anti-HSV activity among samples tested. From the butanol fraction of Thujae orientalis Semen anti-HSV-1 agent was isolated by chromatographic separation using Amberlite XAD-4 and Sephadex LH-20. The structure was elucidated by spectroscopic methods, and was identified as  $\beta$ -sitosterol (compound I). Compound I exhibited anti-HSV-1 activity with  $EC_{50}$  of 0.6 mg/ml and  $CC_{50}$  of 5.99 mg/ml, respectively.

**Key words** - anti-Herpes simplex virus type 1(HSV-1); Cupressaceae; SRB assay; Thujae orientalis Semen;  $\beta$ -sitosterol.

측백나무(*Thuja orientalis* Linn)는 한방에서 양혈제(血劑), 지사약, 자궁출혈, 치출혈, 비혈(鼻血) 등의 지혈제로 쓰이고 음 등에 외용되기도 하며 급성 및 만성 세균성 대장염에 효과가 있고 진정작용(鎮靜作用), 통변작용(通便作用), 지한작용(止汗作用) 등이 있다.<sup>1-3)</sup> 측백나무의 종자를 백자인(栝子仁) *Thujae orientalis* Semen이라 한다.<sup>1)</sup> 측백나무에서 지금까지 밝혀진 성분으로는 sabinic acid, juniferic acid, hinokitiol, cedrolic acid, quercetin, kaempferol, saponin 등이 있다.<sup>3,4)</sup> Kawai 등<sup>5)</sup>은 동속식물인 *Thuja occidentalis*로부터 lignan인 (-)-4-O-demethylatein을 분리하였다.

바이러스감염증은 세균성 질환과 함께 사람에게 유발되는 감염성질환의 중요한 원인이 되고 있다. 여러 종류의 바이러스 가운데 특히, Herpes simplex virus(HSV)는 전세계에 퍼져있으며 사람에게만 자연감염한다. 직접적인 접촉으로 전파되지만 1형은 대부분이 구강분비물에 의하여 전파되고 2형은 대부분이 생식기 분비물에 의해서 전파된다. 사람 HSV는 감기, 구순염, 비노생식기 감염, 각막염, 뇌염(성인), 신생아감염, 자궁경부암, AIDS의 2차 기회감염 등의 원인이 되고 있어 선진국에서는 오래전부터 새로운 항바이러스제 개발에 많은 투자를 하고 있다.<sup>6,7)</sup> 이러한 연구결과 지금까지 몇몇 화학요법제 및 항생물질들이 개발되었으나 많은 경우 아직도 독성이 많거나 효능이 만족할 만한 수준에 이르지 못하고 있어 정상세포에 대한 독성은 적으며 바이러스

\*교신저자 : Fax 02-3442-0220

감염세포에 대한 독성은 상대적으로 큰 천연화합물의 탐색 및 개발에 연구의 초점이 맞춰지고 있다. Kemertelidze 등<sup>8)</sup>은 *Digitals purpurea*의 종자로부터 항 influenza 활성을 나타내는 lipid를 분리하였으며 lipid에는 sterol이 4.8% 함유되어 있는데 주성분은 sitosterol이라고 보고하였고 Khan 등<sup>9)</sup>은 *Artemisia annua*로부터 tobamovirus를 억제하는 sitosterol과 stigmasterol을 분리하였다. Kohda 등<sup>10)</sup>은 isoquercetin과  $\beta$ -sitosterol glucoside가 retrovirus의 역전사를 억제한다고 보고하였다. 기존의 항바이러스제가 가지는 부작용을 최소화하고 숙주세포에는 그 약리작용이 전혀 미치지 않는 이상적인 항Herpes 바이러스 1형(HSV-1) 활성물질을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 80종의 생약들을 대상으로 그들의 메탄올 추출물과 열수 추출물에 대하여 예비검색을 실시하였으며, 본 연구에서는 활성을 나타낸 생약 중 백자인(栝子仁)의 메탄올 추출물로부터 항Herpes 바이러스 1형(HSV-1)에 활성을 나타내는  $\beta$ -sitosterol을 분리, 동정하였기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

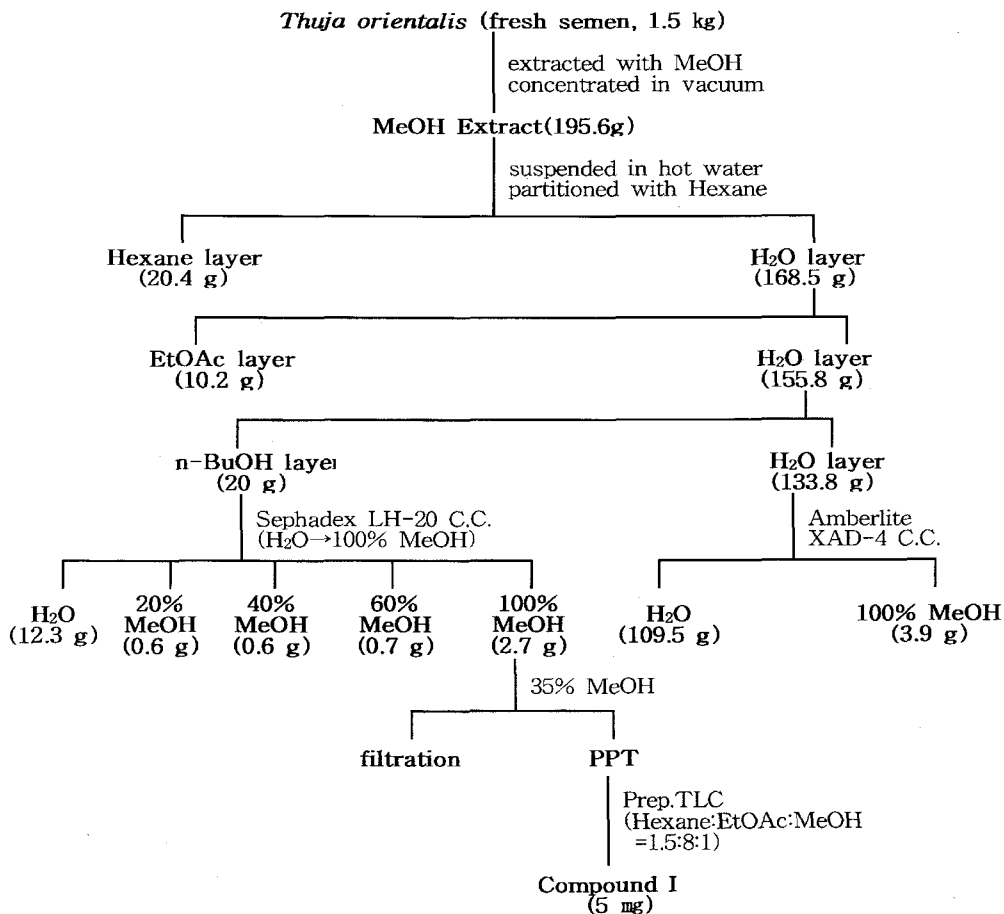
**실험재료** - 본 실험에 사용한 백자인(栝子仁)은 1997년 7월 서울 상계동 근처에서 채집하여 식물학적 감정을 거친 후 신선한 상태에서 실험재료로 사용하였고 이 생약의 표본은 한국한의학연구원 연구부에 보관되어 있다. Column chromatography 용 담체는 Kieselgel 60(70~230 mesh, Merck), Amberlite XAD-4(Sigma), Lipophilic Sephadex LH-20(Pharmacia)를 사용하였고, Preparative TLC plate는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>(Merck)를 사용하였다. 바이러스는 국립보건원 후천성 면역결핍과에서 분양받은 Herpes simplex virus type 1 strain F(American type culture collection, ATCC VR-733, Rockville, MD)를 사용하였고 숙주세포는 한국 세포주 은행으로부터 분양받은 Vero 세포주(African green monkey kidney cell, ATCC CCL81)를 사용하였다. 생리활성실험에 사용한 시약들은 Sigma의 특급시약을 사용하였으며, 배지는 GibcoBRL사의 제품을 사용하였다.

**기기** - M.P. apparatus는 Electrothermal

Engineering Ltd.의 Melting point 9100 (Canada), Polarimeter는 Jasco DIP-370 Digital Polarimeter(Japan), IR Spectrophotometer는 Bruker IFS 48(Germany), EI-Mass Spectrometer는 Shimadzu GCMS QP 1100 (Japan), <sup>1</sup>H-NMR Spectrometer는 Varian gemini 2000, 300 MHz(USA), <sup>13</sup>C-NMR Spectrometer는 Varian gemini 2000, 75 MHz(USA)를 사용하였고 Microplate reader(molecular devices)는 Spectra MAX 340(USA)를 사용하였다.

**활성물질의 분리** - 백자인(栝子仁) 1.5 kg을 천연물 약품화학적 실험방법에 따라 실온에서 MeOH 5 l로 3회 반복 추출한 후 저온에서 감압농축하여 메탄올 추출물(195.6 g)을 얻었다. MeOH 엑스를 물에 현탁시킨 후 Hexane으로 추출하여 비극성물질을 분획(20.4 g)한 다음 수용성분획을 용매의 극성에 따라 분배하여 순차적으로 EtOAc(10.2 g), n-BuOH(20 g) 및 H<sub>2</sub>O(133.8 g) 분획을 얻었다. 각각의 분획에 대하여 활성을 검색한 결과 n-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획들이 활성을 나타낸 반면, Hexane 분획 및 EtOAc 분획은 활성을 나타내지 않았다. 활성을 나타내는 H<sub>2</sub>O 분획을 Amberlite XAD-4 gel을 사용한 column chromatography를 실시하여 H<sub>2</sub>O(109.5 g)와 100% MeOH(3.9 g) 분획으로 나누어 활성을 검색한 결과 H<sub>2</sub>O층은 활성을 나타낸 반면, 100% MeOH층은 활성을 나타내지 않았다. 또한, 활성이 있는 n-BuOH 분획 20 g을 Sephadex LH-20 gel을 사용하여 용매 MeOH을 증량시켜 극성을 변화시키면서 column chromatography를 실시하여 H<sub>2</sub>O(12.3 g), 20% MeOH(0.6 g), 40% MeOH(0.6 g), 60% MeOH(0.7 g) 및 100% MeOH fraction(2.7 g) 등으로 분획하였다. 이들 중 활성이 있는 100% MeOH 분획 2.7 g을 35% MeOH에 녹인 다음 그 잔사를 Prep. TLC(Hexane:EtOAc:MeOH=1.5:8:1)를 시행하여 compound I(5 mg)을 분리한 후 항HSV-1 효과를 검색한 결과 활성이 나타났다(Scheme 1).

**Compound I** - MeOH로 재결정하여 백색침상결정을 얻었다. mp 138°; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>: -37°(c, 2 in CHCl<sub>3</sub>); EI-MS(*m/z*): 414[M]<sup>+</sup>, 396[M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 329[M-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>]<sup>+</sup>, 273[M-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>]<sup>+</sup>, 255[M-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>,



**Scheme 1.** Extraction and isolation of compound from *Thuja orientalis* Semen.

231[M-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, 213[M-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>:  
IR,  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  3431(OH), 2960, 2937(C-H), 1650(C=C), 1465, 1382(-CH<sub>3</sub>), 1063, 1054(C-O) cm<sup>-1</sup>:  
<sup>1</sup>H-NMR(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.68(3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 0.81(6H, d,  $J=6.9$  Hz, 26-CH<sub>3</sub> and 27-CH<sub>3</sub>), 0.84(3H, d,  $J=6.3$  Hz, 29-CH<sub>3</sub>), 0.92(3H, d,  $J=6.6$  Hz 21-CH<sub>3</sub>), 1.01(3H, s, 19-CH<sub>3</sub>), 3.52(1H, m, H-3), 5.36(1H, br, s, H-6); <sup>13</sup>C-NMR(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 37.4(C-1), 32.0(C-2), 72.0(C-3), 42.4(C-4), 141.1(C-5), 122.0(C-6), 31.8(C-7), 32.0(C-8), 50.3(C-9), 36.6(C-10), 21.2(C-11), 39.9(C-12), 42.4(C-13), 56.9(C-14), 24.4(C-15), 28.4(C-16), 56.2(C-17), 11.9(18-CH<sub>3</sub>), 19.5(19-CH<sub>3</sub>), 36.3(C-20), 18.9(21-CH<sub>3</sub>), 34.1(C-22), 26.2(C-23), 46.0(C-24), 29.2(C-25), 19.9(26-CH<sub>3</sub>), 19.1(27-CH<sub>3</sub>), 23.2(C-28), 12.1(29-

CH<sub>3</sub>).

**세포배양** - 실험에 사용된 Vero세포의 배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)이였으며, Fetal bovine serum(FBS), Gentamicin(100 units/ml) 등을 첨가하였다. Vero 세포는 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 씻어준 후 50 ml flask당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin-EDTA용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착시켜 계대배양하였다. 탈착된 세포는 5% FBS가 첨가된 DMEM배지 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기(25 cm<sup>2</sup> culture flask)에 옮겨 1:20의 split ratio로 CO<sub>2</sub> 배양기(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

**SRB법에 의한 세포증식능 측정** - SRB법에 의한

세포증식능 측정은 Alley 등과 Skehan 등<sup>11,12)</sup>의 방법을 응용하여 사용하였다. 5% FBS가 첨가된 DMEM배지에서 3일간 배양하고 배양배지를 제거한 후, PBS로 세포표면을 세척하고 0.25% trypsin-EDTA 1 ml를 첨가하여 1분간 반응시킨 후, 0.25% trypsin-EDTA를 제거하고, 5% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 5 ml를 첨가하여 피펫팅하고 세포 부유(cell suspension)에 trypan blue(1%)=1:1로 혼합하여 Haemocytometer로 세포수를 계산하여  $5 \times 10^4$  cells/ml로 부유시켰다. 세포부유액 100  $\mu$ l씩을 96 well plate의 각 well에 분주하여 well당 Vero 세포를  $2.0 \times 10^3$  cells로 조절한 다음 5% CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후, 0.1 moi(multiplicity of infection)의 HSV-1을 감염시키고 각 well에 각 농도별로 희석하여 검액시료를 첨가하였다. 이상과 같이 처리한 후, CO<sub>2</sub> incubator에서 4일간 배양하여 배양이 끝난 세포에 TCA를 최종 농도가 10%로 되게 첨가하고 4°C에서 1시간 배양하여 세포를 고정시킨후, 증류수로 5회 반복하여 세포를 세척하였다. 건조된 plate의 각 well에 1% acetic acid로 용해시킨 0.1% SRB용액 100  $\mu$ l씩 가하여 상온에서 30분동안 충분히 염색시킨 후 1% acetic acid로 5회 세척하여 공기중에서 건조시켰다. 완전히 건조되면 10 mM unbuffered Tris(pH 10.5) 용액을 각 well에 첨가하여 세포단백질에 부착된 SRB dye를 10분간 잘 용출시키고 균일하게 만든 후 microplate reader에서 564 nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 세포의 증식정도를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**Compound I** - 흰색 침상 결정이며 Libermann-

Burchard 반응에 양성이고, IR spectrum에서 3431(OH), 2960, 2937(C-H), 1650(C=C), 1465, 1382(CH<sub>3</sub>), 1063, 1054(C-O) cm<sup>-1</sup> 등의 강한 흡수대를 나타내어 sterol골격을 가진 화합물로 추정하였다. 또한, EI-MS spectrum에서는 m/z 414에서 molecular ion peak을 관찰할 수 있었고, m/z 273에서 sitosterol에 결합된 side chain이 확인되었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서  $\delta$ 0.68 ppm에서 18-CH<sub>3</sub>에 기인하는 signal이 singlet으로,  $\delta$ 0.81 ppm에서 26, 27-CH<sub>3</sub>에 기인하는 signal이 doublet(J=6.9 Hz)으로,  $\delta$ 0.84 ppm에서 29-CH<sub>3</sub>번에 기인하는 signal이 doublet(J=6.3 Hz)으로,  $\delta$ 0.92 ppm에서 21-CH<sub>3</sub>번에 기인하는 signal이 doublet(J=6.6 Hz)으로, 1.01 ppm에서 19-CH<sub>3</sub>번에 기인하는 signal이 singlet으로 나타난 것을 확인할 수 있었다. 또한,  $\delta$ 3.52 ppm에서 H-3에 기인하는 signal이 multiplet으로 나타나고  $\delta$ 5.36 ppm에서 H-6에 기인한 olefinic proton이 나타나며 18-CH<sub>3</sub>의 signal이  $\delta$ 0.68 ppm에서 나타나는 것으로 보아 이중결합이 5번 탄소에 있는 것으로 추정되었다.<sup>13,14)</sup> <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는  $\delta$ 11.9, 12.1, 18.9, 19.1, 19.5 ppm 및  $\delta$ 19.9 ppm에서 6개의 methyl기를 관찰할 수 있었으며  $\delta$ 72.0 ppm에서 C-3에 기인하는 signal을 관찰할 수 있었고  $\delta$ 141.1 ppm과  $\delta$ 122.0 ppm에서 olefinic carbon인 C-5, C-6을 확인할 수 있었다. 또한,  $\delta$ 46.0 ppm에서 C-24에 기인하는 signal을 관찰할 수 있어 diastereoisomer인 sitosterol의 C-24보다 저자장 shift된 것을 확인할 수 있었다.<sup>15)</sup> 이상의 기기분석 결과와 문헌<sup>16,17)</sup>과의 비교로 compound I은 분자식 C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O이고 mp 138°인  $\beta$ -sitosterol로 확인, 동정하였다.

**항HSV활성** - 백자인(栝子仁)의 MeOH엑스는 0.8

**Table I.** Inhibitory effects of Thujae orientalis Semen against HSV Type I by SRB method

Medicinal Herb	Fractions	Concentration (mg/ml)						
		0.015	0.045	0.137	0.411	0.800	1.230	3.300
Thujae orientalis Semen	fr. 1	-	-	-	-	++	-	-
	fr. 2	-	-	-	-	-	-	-
	fr. 3	-	-	-	-	-	-	-
	fr. 4	-	-	++	++	-	-	-
	fr. 5	-	-	-	++	++	++	-

+++ : 80% Cell Survival of HSV-1 infection *in vitro*, ++ : 50% " , + : 30% " , \*fractions: fr. 1 MeOH extract, fr. 2 Hexane layer, fr. 3 EtOAc layer, fr. 4 n-BuOH layer, fr. 5 H<sub>2</sub>O layer.

**Table II.** Inhibitory effects of butanol fractions from *Thujae orientalis* Semen against HSV Type I by SRB method

Medicinal Herb	Fractions	Concentration (mg/ml)						
		0.015	0.045	0.137	0.411	0.800	1.230	3.300
<i>Thujae orientalis</i> Semen	fr. 6	-	-	-	-	-	-	-
	fr. 7	-	-	-	-	-	-	-
	fr. 8	-	-	-	-	-	-	-
	fr. 9	-	-	-	-	-	-	-
	fr. 10	-	+++	-	-	-	-	-
	fr. 11	-	-	-	-	-	++	++

+++ : 80% Cell Survival of HSV-1 infection *in vitro*, ++ : 50% ", + : 30% ", \*fractions by Sephadex LH-20 C.C.: fr. 6 H<sub>2</sub>O layer, fr. 7 20% MeOH layer, fr. 8 40% MeOH layer, fr. 9 60% MeOH layer, fr. 10 100% MeOH layer, fr. 11 compound I.

**Table III.** Anti-HSV type I activity of compound I

Medicinal Herb	Family	Chemical name	EC <sub>50</sub> (mg/ml) <sup>a</sup>	CC <sub>50</sub> (mg/ml) <sup>b</sup>	SI <sup>c</sup>
<i>Thujae orientalis</i> Semen	Cupressaceae	$\beta$ -sitosterol	0.60	5.99	9.98

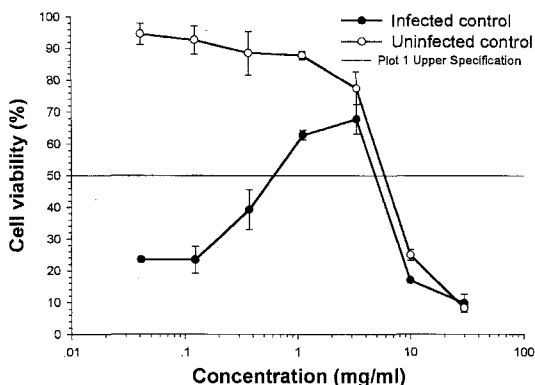
<sup>a</sup>50% Effective concentration means dose required to achieve 50% protection of the cells against the cytotoxic effect of HSV-1. <sup>b</sup>50% Cytotoxic concentration means dose required to reduce the number of viable uninfected cells by 50%. <sup>c</sup>Selective index means the ratio of CC<sub>50</sub> to EC<sub>50</sub>.

mg/ml에서 항HSV-1 활성을 나타냈고 Hexane, EtOAc, n-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 각각의 분획에 대하여 활성을 검색한 결과 n-BuOH 분획이 0.137~0.411 mg/ml 농도에서 활성을 나타내고 H<sub>2</sub>O 분획은 0.411~1.23 mg/ml 농도에서 활성을 나타낸 반면, Hexane 및 EtOAc 분획은 항바이러스 활성을 나타내지 않았다(Table I). 또한, 활성이 있는 BuOH 분획을 H<sub>2</sub>O, 20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH 및 100% MeOH 으로 분획하였다. 이들 중에서 100% MeOH 분획이 0.045 mg/ml 농도에서 활성이 나타났으나 나머지 분획들은 활성을 보이지 않았다(Table II). 이들 분획 중에서 활성이 있는

100% MeOH 분획에서 compound I을 단리하여 항HSV 효과를 검색한 결과 1.23~3.3 mg/ml 농도에서 항HSV-1 활성을 나타냈고(Table II), 0.6 mg/ml에서 EC<sub>50</sub>, 5.99 mg/ml에서 CC<sub>50</sub>를 나타냈다(Table II), (Fig. 1).

## 결론

본 연구는 항바이러스물질 연구개발의 일환으로서 Herpes simplex virus(HSV)가 구순염, 비노생식기 감염, 각막염, 뇌염(성인), 신생아 감염, 자궁경부암, AIDS의 2차 기회감염 등의 원인이 되고 있어 우수한 항바이러스물질을 천연물로부터 개발하기 위하여 80종의 sample들을 대상으로 그들의 메탄올 추출물과 열수 추출물에 대하여 HSV 1형에 대한 항바이러스 활성시험을 수행하였다. 강한 활성을 나타내는 생약 중에서 백자인(栝子仁)의 메탄올 추출물에 대한 각종 column chromatography를 실시하여 BuOH 분획물로부터 항HSV-1 활성물질인 compound I을 단리하고 IR, MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR의 spectral data를 이용하여  $\beta$ -sitosterol로 동정하였다. compound I은 0.6 mg/ml에서 EC<sub>50</sub>, 5.99 mg/ml에서 CC<sub>50</sub>를 나타냈고 1.23~3.3 mg/ml에서 항HSV-1활성을 나타냈다. 지금까지  $\beta$ -sitosterol의 항HSV 효과에 대한 연구가 전혀



**Fig. 1.** Quantitation of cell viability in *Thujae orientalis* Semen treated culture of Vero cells.

이루어지지 않았으며 백자인(栝子仁)에서 분리된  $\beta$ -sitosterol이 HSV-1에 대해 활성이 있다는 것이 본 연구에서 처음으로 밝혀졌다.

## 사 사

본 연구는 보건복지부 지원으로 수행된 보건의료 기술연구개발사업 (HMP-96-M-5-0044)의 연구결과와 일부이며 이에 감사드립니다.

## 인 용 문 헌

1. 陸昌洙 (1993) 原色韓國藥用植物圖鑑, 41. 아카데미서적, 서울.
2. 張相文, 崔炆, 金鍾完, 朴炳允, 朴宜東 (1996) 韓藥資源植物學, 362-363. 학문출판사, 서울.
3. 최옥자 (1994) 약초의 성분과 이용, 121. 일월서각, 서울.
4. 宋株澤, 鄭炫培, 金炳友, 秦熙成, 金桂英 (1990) 韓國植物寶典, 37. 동신출판사, 서울.
5. Kawai, S., Hasegawa, T., Gotoh, M. and Ohashi, H. (1994) 4-O-Demethylatein from the branch wood of *Thuja occidentalis*. *Phytochemistry* 37(6): 1699-1702.
6. Hill, T. J. (1985) Herpes simplex virus latency: *In* The Herpes viruses, Roizman, B., Vol. 3, 175-240. Pleum Press, New York.
7. Nelson, J. A., Ghazal, P. and Wiley, C. A. (1990) Role of opportunistic viral infections in AIDS. *AIDS* 4: 1-10.
8. Kemertelidze, E. P., Dalakishvili, Ts. M., Vichkanova, S. A. and Shipulina, L. D. (1990) Lipids from *Digitalis purpurea* L. seeds and their biological activity. *Khim-Farm. Zh.* 24: 57-59.
9. Khan, M. M., Abid, A., Jain, D. C., Bhakuni, R. S., Zaim, M. and Thakur, R. S. (1991) Occurrence of some antiviral sterols in *Artemisia annua*. *Plant Sci.* 75: 161-165.
10. Kohda H., Tanaka, S., Yamaoka, Y. Morinaga S. and Ohhara, Y. (1994) Constituents of *Corchorus olitorius* L. *Nat. Med.* 48: 213-214.
11. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R., (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48: 589.
12. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D. A., Monks, A., McMahan, J., Vistica, A. D., Warren, J. T., Bosesch, H., Kenny, S. and Boyd, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxic assay for anti-cancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1107.
13. Garg, V. K. and Nes, W. R. (1984) Codisterol and other 5-sterols in the seeds of *Cucurbita maxima*. *Phytochemistry* 23(12): 2925-2929.
14. Akihisa, T., Thakur, S., Rosenstein, F. and Matsumoto, T. (1986) Sterol of curbitaceae: the configurations at C-24 of 4-alkyl-5-, 7- and 8-sterols. *Lipids* 21: 39-47.
15. Adolfo, M. I. and Alicia, B. P. (1984) Sitosterol 3-O- $\beta$ -D-xylopyranoside from *Bauhinia candicans*. *Phytochemistry* 23(9): 2087-2088.
16. Nes, W. R., Norton, R. A. and Benson, M. (1992) Carbon-13 NMR studies on sitosterol biosynthesized from [ $^{13}$ C]mevalonates. *Phytochemistry* 31(3): 805-811.
17. Chang, I. M., Yun, H. S. and Yamasaki, K. (1981) Revision of  $^{13}$ C-NMR assignments of  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside isolated from *Plantago asiatica* seed. *Kor. J. Pharmacogn.* 12(1): 12-24.

(1998년 7월 20일 접수)