

## 쉬땅나무 (*Sorbaria sorbifolia*) 성분으로서 cucurbitacin D, F의 독성평가 및 정량

이상명·이철규\*

청주대학교 이공대학 환경공학과

(2000. 12. 5 접수)

### Toxic Evaluation and Chromatographic Analysis of Cucurbitacin D and F from *Sorbaria sorbifolia*

Sang-Myung Lee and Cheal-Gyu Lee\*

Department of Environmental Engineering, Chongju Univ., Chongju 360-764, Korea

(Received December 5, 2000)

**요약:** *Sorbaria sorbifolia*의 다양한 추출 및 정제방법에 의하여 protostane 계 triterpenoid인 cucurbitacin D, F를 분리하여 그를 표준품으로 하여 *S. sorbifolia*에 함유된 cucurbitacin D, F를 정량하였다. 표준품으로서 cucurbitacin D, F는  $^1\text{H-NMR}$ , FAB-MS, UV 등 각종 물리화학적자료에 의하여 구조 동정하였으며 그들은 YMC-Pack ODS-AQ (303) [250 × 4.6 mm I.D., S-5 μm, 120A]을 칼럼으로 사용한 고속액체 크로마토그래피에 의하여 분리하였다. Cucurbitacin D, F의 액체크로마토그래피에 의한 정량 분석 결과 cucurbitacin F의 경우 *S. sorbifolia* 시료에 10.73 mg/kg으로 존재하였으나 cucurbitacin D는 검출되지 않았다. 또한 각종 암세포주에서 평균  $\text{ED}_{50}$ 값이 0.1 μg/mL 이하로서 강한 세포독성을 보였으며 이 두 화합물을 생쥐의 복강에 투여하였을 때  $\text{LD}_{50}$ 값은 각각 4.7, 2.5 mg/kg/day로서 심한 급성독성을 나타내었다.

**Abstract:** Cucurbitacin D and F, the protostane type triterpenoid of *S. sorbifolia*, were isolated with chromatographic methods and used as the standard substances for quantitative analysis. The compounds were identified with  $^1\text{H-NMR}$ , FAB-MS and UV spectrophotometer. They were separated on YMC-Pack ODS-AQ (303) [250 × 4.6 mm I.D., S-5 μm, 120A] column by HPLC. Cucurbitacin F was detected at 10.73 mg/kg in cortex of *S. sorbifolia*, but cucurbitacin D was not. The compounds were shown to exhibit significant cytotoxicity ( $\text{ED}_{50} < 0.1 \mu\text{g/mL}$ ) against several tumor cell lines and acute toxicity (cucurbitacin D: 4.7 mg/kg/day, cucurbitacin F: 2.5 mg/kg/day) against BDF-1 mouse.

**Key words:** *Sorbaria sorbifolia*, cucurbitacin D, cucurbitacin F, toxicity

### 1. 서 론

쉬땅나무(*Sorbaria sorbifolia* var. *stellipila*)는 높이

2 m에 달하는 낙엽관목으로서 동북상용중초약수책(東北常用中草藥手冊)에 진주매(珍珠梅)라는 생약명으로 수록되어있다. 이는 쉬땅나무 및 동속근연식물의 경피를 가을 겨울에 채취하여 해열에 말린것으로서 0.6-1.2 g을 분말하여 복용하며 효능으로는 혈액의 흐름을 원활하게 하고 종기를 치료하며 통증을 멎게하고 골절, 타박상 등에 사용하는 것으로 알려져 있다.

\* Corresponding author

Phone : +82-(0)43-229-8572 Fax : +82-(0)43-229-8572

E-mail : cglee@chongju.ac.kr

이 식물의 잎에는 sorbifolin, flavosorbin 등 여러종의 flavonoid 화합물을 함유하고 있으며<sup>1,2</sup> 박과(cucurbitaceae)식물에 널리 함유되어있는 cucurbitacin 화합물의 일종인 cucurbitacin D, F가 분리 보고되어진 바 있다.<sup>3</sup> Cucurbitacin 계열의 화합물은 참외 등 박과식물의 열매에서 쓴맛을 내는 성분으로서 11종의 화합물들이 존재하는 것으로 알려져 있다.<sup>4,6</sup> 그들 성분 중 cucurbitacin B는 생쥐의 급성독성 실험에 있어서 경구 투여했을 경우 LD<sub>10</sub>값은 5 mg/kg로서 치명적인 독성을 나타내며<sup>7</sup> 대부분의 cucurbitacin 계 화합물들은 강한 세포독성과 급성독성을 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>8</sup> 김 등<sup>3</sup>에 의해 쉬땅나무에서도 분리 보고되어진 cucurbitacin D, F를 함유한 쉬땅나무의 생약명중 하나는 마가목으로서<sup>9</sup> 민간에서 기침, 가래 등을 치료하기 위하여 흔히 채취, 복용되어지는 정공피(Sorbus Cortex, 마가목)와 같은 이름을 사용하므로 자칫 민간에서의 오용을 일으키기 쉽다. 특히, 형태적으로 볼 때 정공피와 극히 유사하며 식생 역시 정공피 보다 넓게 분포되어 있어서 쉬땅나무의 인체에 대한 정확한 독성학적 고찰이 따라야 할 것이다. 이러한 목적으로 쉬땅나무 수피에 함유되어진 cucurbitacin D, F의 함량을 액체크로마토그래피법으로 정량하고 급성독성을 평가하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 실험재료, 시약 및 기기

본 실험에 사용한 쉬땅나무는 2000년 7월에 계룡산 인근에 식재된 것을 채취하였다. 위 식물은 정확히 감정한 후에 음건, 세척하여 실험에 사용하였다. 이 식물에서 시료물질을 분리하기 위하여 column packing 용 silica gel은 Kiesel gel 60(230-400 mesh)과 Sephadex LH20 gel (Sigma)을 사용하였다. 또한 물질정제를 위하여 YMC-Pack (ODS-AQ, 300 × 10 mm, S-5 μm) column을 사용하였다. 또한 분리정제시 순도확인을 위하여 사용한 TLC plate는 Kiesel gel 60 F<sub>254</sub> precoated plate이었다. 물질확인을 위하여 사용되어진 기기는 UV spectrophotometer (UV-260, Shimadzu), NMR spectrometer (Unity Inova 400 & JEOL JNM-EX90)을 사용하였다. 정량분석에 사용한 기기는 HPLC로서 L-6000 (Hitachi)을 사용하였고 L-4000 UV detector (Hitachi), D-2500 chromato-integrator로서 결과를 검

출, 기록하였다. 물질정제에 사용한 용매는 공업용 용매를 종류하여 사용하였고 정량실험에 사용한 용매류는 methanol (Merck), water (Merck)를 사용하였다.

### 2.2. 표준품의 분리 및 정제

세척한 쉬땅나무 수피 1 kg를 MeOH (3L)로 2주간 실온에서 추출하여 여과한 후 감압 농축한 후 그의 농축액을 다시 1L의 중류수에 혼탁시켜 hexane으로서 지용성 물질을 제거하였다. 분액여두에 남은 중류수 혼탁액은 다시 methylene chloride로 용매 분획하고 감압농축하여 얻어진 추출물 15 g을 다음과 같은 방법으로 표준품을 분리 정제하였다. Methylene chloride 추출물은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (50/1 → 10/1)을 용출액으로 하여 silica gel column chromatography로 단리하고 각 분획부의 암세포주에 대한 세포독성을 조사하여 활성부를 YMC-Pack (ODS-AQ, 300 × 10 mm, S-5 μm) 칼럼을 사용하여 상온에서 75% MeOH를 3 mL/min의 유속으로 하여 분획하여 분리 정제하였으며 검출부는 UV 210 nm로 고정하여 사용하였다. 이렇게 하여 얻어진 화합물 1 (20 mg), 2 (15 mg)의 <sup>1</sup>H-NMR, UV, mass spectrum은 김 등<sup>3</sup>이 동일 식물에서 분리한 cucurbitacin D, F와 일치하였다.

**Compound 1 (cucurbitacin D):** white needle in hexane/ethyl acetate, mp. 153-159°C, UV ( $\lambda_{\text{max}}$ ): 229 nm (MeOH), positive FABMS:  $m/z$  539 [M + Na<sup>+</sup>], <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 7.14 (1H, d,  $J$  = 15.2 Hz, 24-H), 6.57 (1H, d,  $J$  = 15.2 Hz, 23-H), 5.78 (1H, m, 6-H), 4.32 (1H, m, 2-H), 4.13 (1H, m, 16-H), 3.33 (1H, d,  $J$  = 14.7 Hz, 12α-H), 2.78 (1H, m, 10-H), 2.62 (1H, d,  $J$  = 14.7 Hz, 12β-H), 2.48 (1H, d,  $J$  = 6.8 Hz, 17-H), 1.31, 1.31, 1.15, 0.98 (each 3H, s, -CH<sub>3</sub>).

**Compound 2 (cucurbitacin F):** white needle in hexane /ethyl acetate, mp. 247-249°C, UV ( $\lambda_{\text{max}}$ ): 230 nm (MeOH), positive FABMS:  $m/z$  541 [M + Na<sup>+</sup>], <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 6.98 (1H, d,  $J$  = 15.4 Hz, 24-H), 6.85 (1H, d,  $J$  = 15.2 Hz, 23-H), 5.74 (1H, m, 6-H), 4.45 (1H, m, 2-H), 3.53 (1H, m, 16-H), 3.32 (1H, d,  $J$  = 14.7 Hz, 12α-H), 2.58 (1H, m, 10-H), 2.47 (1H, d,  $J$  = 14.6 Hz, 12β-H), 2.35 (1H, d,  $J$  = 6.8 Hz, 17-H), 1.38, 1.32, 1.29, 1.19, 1.19, 1.10, 0.95, 0.94 (each 3H, s, -CH<sub>3</sub>).

### 2.3. Cucurbitacin D, F의 세포독성

이 두 화합물에 대하여 NCI의 방법에 따라서 수종의 암세포주에 대한 세포독성검사를 실시하였다. 세포주는 미국의 NCI에서 제공한 것을 사용하였으며 모든 세포주는 10 passage내에서 사용하였다. 배양액은 RPMI 1640과 10%의 송아지 혈청을 함유한 것을 제조하여 사용하였다. 세포독성 평가는 역시 NCI 방법에 따랐으며 SRB (sulforhodamin B)로 염색하여 그의 흡광도를 측정하였다.

### 2.4. Cucurbitacin D, F의 BDF-1 생쥐에 대한

#### 급성독성

이 화합물로서 BDF-1 생쥐(약 20 g, 평균 4주령, 수컷)에 대한 in vivo 독성 실험을 행하였다. 독성측정은 생쥐 각 마리당 5, 2.5, 1.25 mg/kg/day의 시료를 생리식염수(1% Tween 80)에 용해시켜 복강투여 하였다. 그리고 독성측정은 시료투여 24시간 후 치사한 개체 수로서 판단하였다. LD<sub>50</sub> 값은 Behrens-Korbar법으로서 환산하였다.

### 2.5. 함량분석을 위한 시료의 전처리

채취한 쉬땅나무 수피는 세밀한 후 항량으로 만들고 그 중 5 g을 정밀히 달아 메탄올 80 mL을 가하여 50°C 수육상에서 6시간 동안 추출하였다. 실온에서 식힌 다음 100 mL 용량플라스틱에 옮긴 후 메탄올을 가하여 표선을 채웠다. 이 액을 0.2 μm 막여과기로 여과하여 검액으로 하였다. 표준시료로서 cucurbitacin D, F는 각각 0.2500, 0.1250, 0.0625 mg/mL로 배수회석하여 검량선을 작성하기 위한 표준액으로 하였다.

### 2.6. 액체크로마토그래피에 의한 함량분석

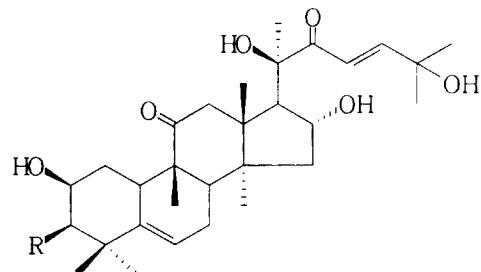
YMC-Pack ODS-AQ (303) [250 × 4.6 mm I.D., S-5 μm, 120A]를 칼럼으로 사용하였고, 칼럼의 온도는 상

온으로서 이동상은 57% MeOH를 0.8 mL/min의 유속으로 하였다. 시료의 주입은 10 μL이며 검출부는 UV 210 nm로 고정하여 검출하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. In vivo 및 in vitro 독성 평가

Cucurbitacin D, F는 Table 1에서 표시된 바와 같이 비교적 강한 세포독성을 보이고 있다. 즉 대부분의 인체암 세포에서 대조군인 adriamycin보다 강한 독성을 보이고 있다. 그러나 B16(F10)과 같은 생쥐 유래 암세포주에는 대조군 보다 약한 독성을 나타내고 있다. In vivo 실험에 있어서의 생쥐치사율은 이들 화합물 5 mg/kg을 복강 투여했을 때 두 화합물 공히 투여 24시간 후 100%의 치사율을 보이고 있다. 이러한 결과는 이 화합물들의 인체내에서의 독성이 강하게 나타날 수 있음을 추측하게 한다. 특히, 대부분의 steroid 계 세포독성물질들이 인체내에 유입되면 심각한 심장독성을 유발하거나 생체대사에 필수적인 호르몬 작용을 방해하는 것이 일반적인 사실이다. 따라서 이 화합



R : =O, cucurbitacin D

; OH, cucurbitacin F

Fig. 1. Chemical structure of cucurbitacin D and F.

Table 1. In vitro cytotoxicity and in vivo acute toxicity of cucurbitacin D and F

	HT1080	HT 29	B16 (F-10)	3LL	MCF7	PC-3	LOX-IMVI	A549	BDF-1 (mouse)
	ED <sub>50</sub> (μg/mL)								LD <sub>50</sub> (mg/kg)
Cucurbitacin D	0.031	0.034	0.609	0.466	0.386	0.64	0.025	0.034	4.7
Cucurbitacin F	0.023	0.082	0.932	0.245	0.237	0.747	0.033	0.098	2.5
Adriamycin	0.049	0.616	0.038	0.051	0.215	0.482	0.219	0.388	

HT1080: human acetabulum fibrosarcoma, HT-26: colon adenocarcinoma, B16 (F-10): mouse melanoma, 3LL: human lung sarcoma, MCF7: human mammary gland adenocarcinoma, PC-3: human prostate adenocarcinoma, LOX-IMVI: human skin cancer, A 549: human lung carcinoma

물을 함유하고 있는 쉬땅나무의 수피를 민간에서 무분별하게 복용하게 된다면 심각한 부작용이 유발될 수도 있다.

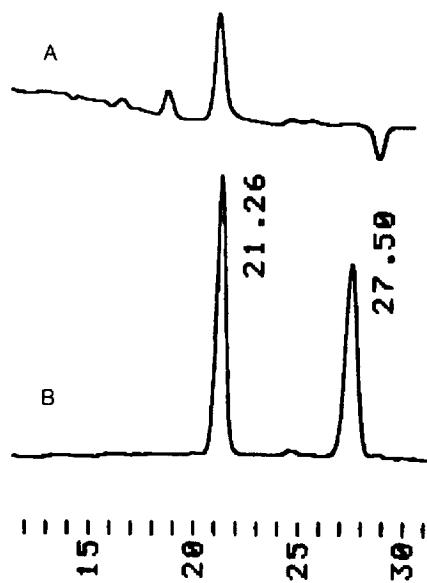


Fig. 2. Chromatogram of preparative sample (A) and standard sample (B). Curcurbitacin F (0.25 mg/mL) appears at 21.26 min and curcurbitacin D (0.25 mg/mL) appears at 27.50 min in standard sample chromatogram.

### 3.2. Cucurbitacin D, F의 함량분석

실험방법의 조건으로 시료로부터 다른 물질의 방해를 받지 않고 cucurbitacin D와 cucurbitacin F를 완전히 분리할 수 있었다. Fig. 2는 액체크로마토그래피에 의한 표준물질과 시료의 크로마토그램이고 Fig. 3은 피크의 면적으로부터 얻어진 cucurbitacin F의 검량선으로서 양호한 직선성을 보였다. 직선의 식은  $y = 0.15 \times 10^7 x - 0.47 \times 10^4$  ( $r = 0.99846$ )이었다. Curcurbitacin D 역시 직선의 검량선을 보였다. 액체크로마토그래피에 의한 쉬땅나무의 cucurbitacin F와 D함량은 cucurbitacin F의 경우 10.73 mg/kg이었으며 cucurbitacin D의 경우 피크가 관찰되지 않았다. 따라서 cucurbitacin D는 식물체에서 본 실험방법에 의한 검출한계 이하의 농도로 존재하거나 분리 및 정제 과정 중 자연산화에 의한 cucurbitacin F의 변성물질인 것으로 판단된다.

### 4. 결 론

쉬땅나무의 methylene chrolide 분획물 중 proto-stane계 triterpenoid 성분인 cucurbitacin D, F를 분리하여 그의 구조를 동정하였다. 이 성분들의 독성실험에 있어서 *in vitro*에서 ED<sub>50</sub> 0.1 µg/mL 이하의 세포독성이 발견되었으며 *in vivo* 급성독성실험에서는 5 mg/kg의 농도로 복강투여 하였을 때 24시간 후 100% 치

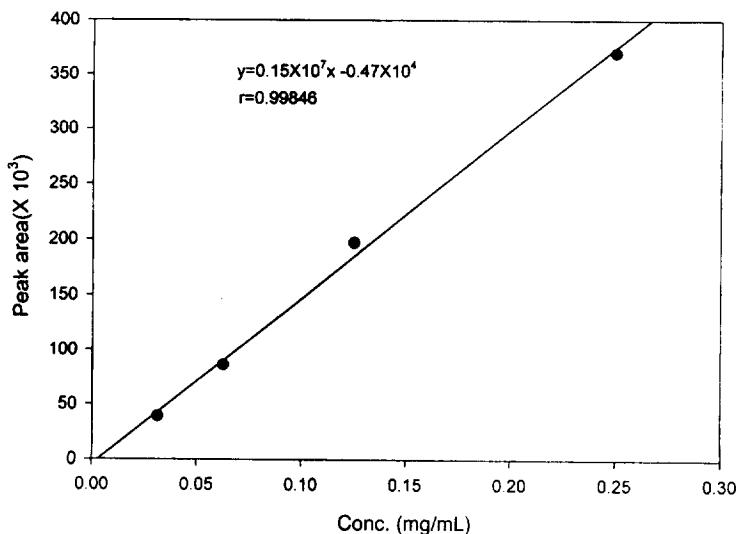


Fig. 3. Calibration curve of cucurbitacin F by HPLC.

사하는 심각한 독성이 확인되었다. 따라서 이와 유사한 cucurbitacin 유도체들이 함유되어 있는 각종 박과 식물의 독성도 아울러 조사되어야 할 것이다. 특히, 이 실험의 결과에 의하면 쉬땅나무의 함유성분으로 알려진 cucurbitacin D의 경우 이의 함량이 아주 적거나 분리과정 중 cucurbitacin F의 각종 산화작용에 의하여 만들어진 화합물일 가능성이 큰 것으로 판단되어 진다.

### 참고문헌

1. Zaitsev, V. G. and Makarova, G. V., *Farm. Zh.*, **24**, 63-67(1969).
2. Zaitsev, V. G. et al., *Khim. Prir. Sordin.*, **10**, 92 (1974).
3. Kim Dae Keun, et al., *Arch. Pharmacal Res.*, **20**(1), 85-87 (1997).
4. Enslin, *J. Sci. Food Agr.*, **5**, 410 (1954).
5. Enslin, *J. Sci. Food Agr.*, **8**, 673 (1957).
6. Lavie, S. J. Szinai, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 707 (1958).
7. J. LeMen et al., *Chim. Ther.*, **4**, 459 (1969).
8. O. Albert et al., *Chim. Ther.*, **5**, 205 (1970).
9. 신민교, 정보섭, 도해향약대사전, 1st ED, p.656, 영림사, Kor. 1990.