

# 청나래고사리와 고비 지상부의 효율적인 phytoecdysteroids 추출조건

신소림, 이철희\*

충북대학교 응용생명환경학부 원예과학과

## Effective Extraction of Phytoecdysteroids from Fronds of *Matteuccia struthiopteris* and *Osmunda japonica*

So Lim Shin and Cheol Hee Lee\*

Department of Horticultural Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**Abstract** - This study was carried out to investigate the effective extraction condition for increase of phytoecdysteroids from fronds of *Matteuccia struthiopteris* (FMS) and *Osmunda japonica* (FOJ). Lyophilized fronds were mixed with three different solvents (MeOH, 80% EtOH or water) and then extraction was carried out by using six different methods, such as, immersion (room temp.), heating (60°C), stirring (200 rpm) for 6 h, or sonication in 42 kHz ultrasonic bath for 15, 30 and 45 minutes. Contents of 20-hydroxyecdysone (20E) and ponasterone A (PonA) were measured by using HPLC after purification of the extracts by C<sub>18</sub> cartridge. Altogether, our results indicate that the extraction using sonication with MeOH as a solvent (for 30 minutes) was the most effective condition for 20E and PonA from both MFS and FOJ. Resulting contents of 20E from FMS and FOJ were 66.76 and 104.48  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  and PonA were 53.43 and 43.82  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectively.

**Key words** - 20-hydroxyecdysone, Ponasterone A,  $\beta$ -ecdysone, Ultrasonic Extraction

### 서 언

Ecdysteroid는 곤충의 탈피호르몬이며 기원에 따라 절지동물과 갑각류에서 생산되는 zooecdysteroid와 식물에서 생산되는 phytoecdysteroid로 구분되는데, Phytoecdysteroid는 triterpenoid, triterpene saponin을 포함하는 화합물의 일종으로 phytosterol과 phytoecdysteroid로 구분되며, acetyl-CoA를 선구물질로 하여 식물 세포 내 mevalonate 경로에서 mevalonic acid에 의하여 합성된다(Dinan, 2001).

소수의 식물만 phytoecdysteroid를 생산할 수 있는 것으로 알려져 있는데, 특히 관다발식물 중 진화론적으로 오래된 식물에서 phytoecdysteroid가 자주 발견되며(Adler and Grebenok, 1999), 그 중 양치식물은 ecdysteroid 함량이 높은 식물군으로 알려져 있다(Dinan and Lafont, 2007).

Ecdysteroid를 산업적으로 적용했던 초기에는 ecdysteroid를 이용하여 곤충, 특히 해충의 탈피를 인위적으로 촉진하여 살충제로 이용하거나, 누에의 속도를 인위적으로 조절하여 상족촉진제로써 사용하고자 하였으나 살충작용이 종 특이적으로 작용하지 않아 생태계 교란의 위험성이 있어 상업적 살충제로는 개발되지 못했으며(Kim, 1996), 잠사업의 쇠퇴로 인하여 상족촉진제의 판매도 감소하여 산업적 가치가 낮게 평가되었다. 그러나 ecdysteroid가 포유류에 독성이 없으며, 다양한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 동화작용, 생육촉진, 근육증가, 항무기력증, 항쇠약, 항당뇨 및 세포 증식 및 분화 촉진으로 인한 상처치료 등의 효과를 보이는 것이 알려지면서 기능성 천연물로서 중요성이 높아지고 있다(Lafont and Dinnan, 2003). 본 연구에서 사용한 20-hydroxyecdysone(20E)는 LD<sub>50</sub>가 낮아 독성이 적으며(Matsuda *et al*, 1970), 세포 증식 및 분화(Syrov and Khushbaktova, 1996), 인체 제대정맥 내피세포 분열증식 촉진(Lin *et al*, 1997), 항비만 및 항당뇨(Kizelsztejn *et*

\*교신저자(E-mail) : leech@chungbuk.ac.kr

al, 2009), 대뇌피질 뉴런 수용기의 GABA 신경조절 활성 영향(Okada *et al*, 1998), 항간질(Hanaya *et al*, 1997), 조골세포의 ALP 활성과 gelatinase 활성 증가와 M-CSF와 RANKL에 의해 유도된 파골세포 생성 감소 효과(Ko, 2007) 등 다양한 약리활성을 보인다. 그러나 배자독성이 있으므로 산모에게는 신중히 투여해야 한다(Kosar *et al*, 1997). Ponasterone A(PonA)는 생육증가 효과는 거의 없는 것으로 보고되었으나(Matsuda *et al*, 1970), 여성 자궁경부암 유래의 암세포주인 HeLa cell 사멸(Wang *et al*, 2004), 유선 혈청조직의 신속한 제거(Albanese *et al*, 2000) 등의 효과가 보고되어 있다.

본 연구에서는 우리나라 전역에 자생하며 예로부터 식·약용 소재로 사용되어온 양치식물인 청나래고사리와 고비의 열상체에 함유되어 있는 20E와 PonA의 함량을 분석하였으며, 추출용매와 추출방법이 phytoecdysteroids의 추출에 미치는 영향을 구명하여 양치식물의 효율적인 phytoecdysteroids 추출방법에 관한 기초자료를 제시하고자 하였다. 특히 초음파를 이용한 빠르고 쉬운 phytoecdysteroid의 추출법을 개발하고자 하였으며, 범용적으로 사용할 수 있는 초음파수조를 이용하여 경제적인 추출방법을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 추출 및 정제

충북 청주시에 소재한 무가온 플라스틱 온실에서 재배하던 청나래고사리와 고비의 성엽은 각 2007년 7월과 6월에 수확하였으며, 수세하여 동결건조한 다음 분쇄하여 사용하였다. 추출용매는 물(deionized water; nano pure grade), 80% 에탄올(Ethanol, Jin chemical pharmaceut., Korea), 100% 메탄올(Methanol, Merck, Germany)로 하여 각 용

매와 분쇄시료를 혼합한 다음 6시간동안 상온침지, 60°C 환류냉각, 상온교반(200 rpm) 추출하거나 15, 30, 45분 동안 초음파수조에서 추출하였다. 추출물은 여과지(Advantec No. 2, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Japan)와 vacuum pump (GAST)로 감압여과하였으며, 물 추출물을 제외한 유기용매 추출물은 rotary vacuum evaporator로 용매를 증발시킨 후, 3차 증류수로 용해하여 사용하였다.

각 추출물은 solid phase extraction법으로 정제하였다. Solid phase extraction은 C<sub>18</sub> cartridge(Empore™ High performance extraction disk cartridge C<sub>18</sub>-SD, 3M, Mexico)를 이용하였으며, Reixach *et al*.(1996)의 방법을 변형하여 다음과 같이 시행하였다. C<sub>18</sub> cartridge에 250 µl의 메탄올과 500 µl의 3차 증류수를 첨가하여 활성화 시킨 후 준비된 추출물 1 mL를 주입하였다. 그 후, 0.1 N의 NaCl 500 µl를 첨가하여 ecdysteroid를 제외한 기타 추출물을 제거시킨 후, 500 µl의 3차 증류수로 세척하였다. 용출용매로 1 mL의 메탄올을 첨가한 후, 용출된 용매를 HPLC 분석에 사용하였다. Solid phase extraction를 수행할 때에는 용매를 빠르게 용출시키기 위하여 SPE vacuum manifold (57030-U, Supelco, U.S.A)와 vacuum pump(DOA-P704-A4, GAST, China)를 이용하여 -80~-40 kPa에서 가압 용출하였다.

### HPLC 분석 조건

HPLC 분석은 Ecdybase(Lafont *et al*, 2009)에 제시된 방법을 변형하여 시행하였으며, 분석조건은 Table 1과 같다. 추출물의 주입은 auto-sampler(Basic Marathon, Spark Holland, Netherlands)를 이용하였으며, 1회에 20 µl씩 주입하여 분석하였다. 총 분석시간은 30분이었으며, 이 중 마지막 10분은 연속적인 분석을 위한 컬럼 안정화에 소요

Table 1. Analytical conditions of HPLC for analysis of phytoecdysone contents used in this study

Column	Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6×150 mm, 5 µm)			
Column Temp.	Ambient			
	Time (min.)	H <sub>2</sub> O (%)	MeOH (%)	Flow rate (mL/min.)
Mobile phase	0.0	60	40	1.0
	20.0	20	80	1.0
	21.0	60	40	1.0
	30.0	60	40	1.0
Wavelength	UV 242 nm			

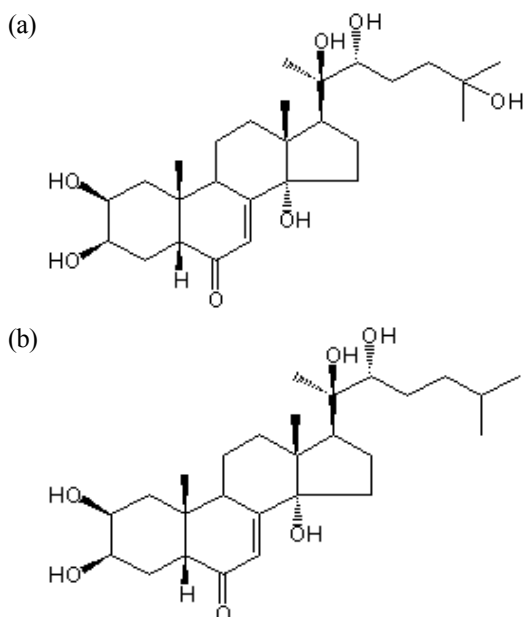


Fig. 1. Chemical structure of phytoecdysteroids. (a) 20E; (b) PonA. (Lafont *et al*, 2009)

되는 시간이었다.

분석 기기의 안정성을 검증하기 위하여 추출물을 1회 5 반복으로 각기 다른 시간에 3회 분석하여 phytoecdysteroid 가 분석되는 retention time과 peak area의 재현성을 통하여 확인하였다. 재현성은 상대표준편차(relative standard deviation)로 확인하였으며, 다음의 식과 같이 계산하였다. 수집된 데이터는 Autochro-2000(Autochro-2000 ver 1.0, YoungLin co. Ltd., Korea)를 이용하여 분석하였다.

$$RSD (\%) = \frac{100}{\bar{x}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

$\bar{x}$  = N개 측정치의 평균,  $x_i$  = 개개의 측정치

### 표준 검량선 작성 및 회수율 분석

20E(H5142, Sigma)와 PonA(P3490, Sigma)를 표준물질로 하여 검량선을 작성하였다(Fig. 1). 20E와 PonA를 각 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.005, 0.001 ppm의 농도로 혼합하여 제조한 표준용액을 HPLC로 분석하여 peak를 인식할 수 있는 범위를 최소검출한계로 하였으며, 표준검량선은 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 ppm의 농도로 혼합한 20E와 PonA의 표준용액을 이용하여 작성하였다.

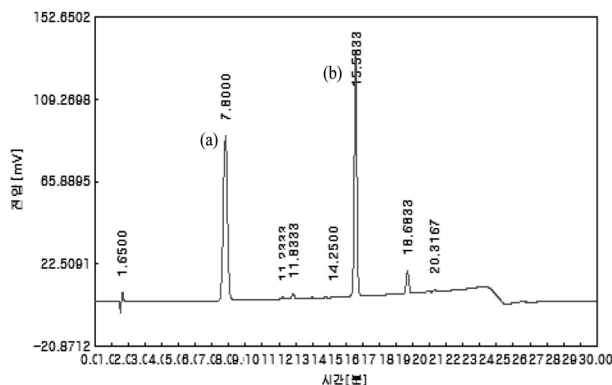


Fig. 2. HPLC Chromatogram of phytoecdysteroids used in this study. (a) 20E; (b) PonA.

두 물질의 chromatogram은 Fig. 2와 같다.

정제과정에서 추출물의 phytoecdysteroid 손실 정도를 파악하기 위하여 20E와 PonA를 혼합한 표준용액을 5 mL의 메탄올에 100 ppm으로 희석한 후 바로 HPLC를 이용하여 분석하거나, 250 mL의 둥근 농축수기에 담아 rotary vacuum evaporator를 이용하여 메탄올을 증발시킨 후 3차 증류수를 첨가하여 100 ppm으로 조절한 용액을 C<sub>18</sub> cartridge를 이용하여 상기의 방법으로 정제한 후 분석하여 비교하였다.

### 통계분석

실험은 5반복으로 수행하였으며, SAS version 9.1(SAS institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 평균을 구하고,  $p < 0.05$ 의 유의수준에서 Tukey's studentized range test를 이용하여 통계분석 하였다.

## 결과 및 고찰

### HPLC 재현성, 최소검출한계 및 회수율

100 ppm의 20E와 PonA의 혼합 표준용액 20  $\mu$ l을 HPLC에 주입하여 1회 3반복, 각기 다른 시간에 3회 반복 분석한 결과에 대한 재현성은 2.0% 이내로 양호한 재현성을 보였다(Table 2). 미국약전(USP)에서는 따로 규정이 없는 한 RSD가 2.0% 또는 그 이하일 경우에는 5회 주입한 chromatogram, 2.0% 초과일 경우에는 6회 주입한 chromatogram으로부터 얻은 자료를 이용하도록 되어있으므로(USP XXII/NF, 1990), 본 연구에서는 이를 참고하여 5반복으로 실험하였다.

20E와 PonA의 최소검출량은 각 0.1 ppm, 0.5 ppm으로

Table 2. Reproducibility of peak area and retention time in the chromatogram of each ecdysteroids

Ecdysteroids	20-hydroxyecdysone	Ponasterone A
Means	1494.73	1380.60
Peak area	SD <sup>z</sup>	26.69
	RSD <sup>y</sup> (%)	1.79
Retention time	Means	7.65
	SD <sup>z</sup>	0.11
	RSD <sup>y</sup> (%)	1.40

<sup>z</sup>SD: Standard deviation.

<sup>y</sup>RSD: Relative standard deviation.

Table 3. Phytoecdysteroid recoveries of selected steps in the extraction and purification procedure using C<sub>18</sub> cartridge

Ecdysteroids	20-hydroxyecdysone	Ponasterone A
Non Purification	Peak area <sup>z</sup>	117.13
	SD <sup>y</sup>	1.29
	SE <sup>x</sup>	0.75
Purification	Peak area <sup>z</sup>	118.96
	SD <sup>y</sup>	0.93
	SE <sup>x</sup>	0.54
Recovery (%)	101.56	103.17

<sup>z</sup>Peak area: Peak area means of 10 ppm ecdysteroids solution.

<sup>y</sup>SD: Standard deviation.

<sup>x</sup>SE: Standard error.

나타났으며, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 ppm의 20E와 PonA의 혼합 표준용액으로 퍼준 검량선을 작성한 결과, 상관관계수(R<sup>2</sup>)가 각 0.9999 또는 0.9975로 0.1~200 ppm의 농도에서 매우 높은 직선성(linearity)을 보였다(data not shown).

10 ppm의 20E와 PonA 혼합 표준물질을 정제하지 않거나 C<sub>18</sub> cartridge로 정제하여 분석한 후 peak area를 비교하여 회수율을 측정된 결과, 101.56과 103.17%의 높은 회수율을 보였으므로 정제과정에서 phytoecdysteroid가 거의 손실되지 않는 것으로 나타났다(Table 3). 한국 식품의약품안전청의 의약품 평가부에서 출판한 의약품등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인에 의하면 용출시험에서 설정된 용출 시험기준 범위의 ± 20% 이내로 회수율이 나타나야 타당성이 인정되는데, 본 연구에서 사용된 정제방법으로 용출된 용액에 포함된 시료의 양이 용출시험기준

범위 내에 속하였으므로 타당한 정제방법으로 생각된다.

식물체에는 다양한 천연물질이 혼재되어 있으므로 식물로부터 특정 물질의 함량을 분석할 때에는 분석 전 추출물의 정제가 매우 중요한데, phytoecdysteroids의 분석을 위한 정제방법에는 millipore 여과, phenyl boronic acid 또는 methyl boronic acid 등으로 유도체화, alkaline buffer로 용해시킨 후 PBA고정상으로 여과(Yang, 1998), boronic acid로 ester화 및 SFC 추출(Kim, 1998), SPE(solid phase extraction)법(Báthori and Pongrácz, 2005) 등이 있다. 본 연구에서는 비교적 상용화되어 있는 HPLC를 이용하여 저렴한 비용으로 빠르고 간편하게 phytoecdysteroid의 함량을 분석하기 위하여 화학적 필터와 물리적 필터가 결합된 cartridge를 이용하여 SPE법으로 추출물을 정제하였는데, 간편하고 빠른 정제과정과 안정적인 회수율을 보여 식물체에서 phytoecdysteroids를 추출하기 위한 정제 방법으로 적합한 것으로 생각되었다.

### 추출조건에 따른 phytoecdysteroid 함량 변화

청나래고사리의 성엽은 메탄올을 용매로 추출했을 때 phytoecdysteroid가 가장 많이 추출되었다(Table 4). 20E는 메탄올을 용매로 30분 동안 초음파추출 했을 때 수율이 가장 높았다. PonA는 45분 동안 추출했을 때 가장 많이 추출되었으나, 30분 초음파추출했을 때와 통계적 유의차는 없었다. 또한 PonA는 용매에 관계없이 초음파 추출했을 때에만 추출되는 특징을 보였다.

고비 성엽의 건조시료 또한 메탄올을 용매로 30분 동안 초음파 추출했을 때 가장 많은 양의 20E와 PonA이 용출되었다(Table 5). 20E는 용매에 관계없이 환류냉각추출물에서 함량이 가장 낮았으며, 물을 용매로 환류냉각추출 했을 때에는 추출되지 않았다. PonA 또한 환류냉각추출물에서는 추출되지 않아 phytoecdysteroid는 열에 의하여 일부 성분이 파괴되는 것으로 생각되었다.

연구의 결과 phytoecdysteroid는 메탄올 용매에서 가장 잘 용출되며, 추출수율을 증가시키기 위해서는 초음파추출하는 것이 가장 좋은 것으로 나타났다. 초음파추출법은 추출시간을 줄일 수 있으며, 본 연구에서와 같이 연구실에서 범용적으로 사용 가능한 초음파 수조로도 충분한 효과를 볼 수 있는 것으로 나타났다. 또한 PonA는 추출용매와 추출방법에 따라 용출 정도가 크게 달라지므로, 교반 또는 초음파 등과 같은 기계적 방법을 이용하여 추출효율을 증가

Table 4. Change of phytoecdysteroid contents in extracts obtained from *Matteuccia struthiopteris* depending on extraction solvent and methods

Solvent	Method	Conditions	Time (min)	20E <sup>z</sup> (μg·g <sup>-1</sup> db)	PonA <sup>y</sup> (μg·g <sup>-1</sup> db)	
MeOH	Immersion	25 ± 2°C	360	48.42 ef <sup>x</sup>	0.00 c	
	Heating	60°C	360	49.41 def	0.00 c	
	Stirring	200 RPM	360	49.35 def	0.00 c	
	Sonication	42 kHz		15	48.44 ef	0.00 c
				30	66.76 a	53.43 a
				45	61.73 ab	56.30 a
80% EtOH	Immersion	25 ± 2°C	360	47.95 f	0.00 c	
	Heating	60°C	360	0.00 g	0.00 c	
	Stirring	200 RPM	360	57.52 bc	0.00 c	
	Sonication	42 kHz		15	55.41 bcd	43.06 b
				30	55.13 b-e	44.24 b
				45	59.71 b	42.39 b
Deionized water	Immersion	25 ± 2°C	360	0.00 g	0.00 c	
	Heating	60°C	360	0.00 g	0.00 c	
	Stirring	200 RPM	360	0.00 g	0.00 c	
	Sonication	42 kHz		15	51.83 c-f	41.71 b
				30	49.01 def	41.84 b
				45	49.18 def	43.88 b

<sup>z</sup>Micrograms of 20-hydroxyecdysone contents per gram of dried samples, <sup>y</sup>Micrograms of ponasterone A contents per gram of dried samples, <sup>x</sup>Mean separation within columns by Tukey's studentized range test at  $p < 0.05$ .

Table 5. Change of phytoecdysteroid contents in extracts obtained from *Osmunda japonica* depending on extraction solvent and methods

Solvent	Method	Conditions	Time (min)	20E <sup>z</sup> (μg·g <sup>-1</sup> db)	PonA <sup>y</sup> (μg·g <sup>-1</sup> db)	
MeOH	Immersion	25 ± 2°C	360	93.36 bc <sup>x</sup>	0.00 c	
	Heating	60°C	360	62.13 efg	0.00 c	
	Stirring	200 RPM	360	91.46 bcd	0.00 c	
	Sonication	42 kHz		15	71.54 e	0.00 c
				30	104.48 a	43.82 a
				45	97.34 ab	42.65 ab
80% EtOH	Immersion	25 ± 2°C	360	83.37 d	0.00 c	
	Heating	60°C	360	65.23 ef	0.00 c	
	Stirring	200 RPM	360	86.00 cd	40.96 b	
	Sonication	42 kHz		15	83.21 d	0.00 c
				30	94.17 bc	42.75 ab
				45	91.95 bcd	43.20 ab
Deionized water	Immersion	25 ± 2°C	360	52.80 gh	0.00 c	
	Heating	60°C	360	0.00 i	0.00 c	
	Stirring	200 RPM	360	55.11 fg	0.00 c	
	Sonication	42 kHz		15	60.22 fg	0.00 c
				30	47.34 gh	0.00 c
				45	46.81 h	41.82 ab

<sup>z</sup>Micrograms of 20-hydroxyecdysone contents per gram of dried samples, <sup>y</sup>Micrograms of ponasterone A contents per gram of dried samples, <sup>x</sup>Mean separation within columns by Tukey's studentized range test at  $p < 0.05$ .

시킬 필요가 있는 것으로 생각되었다. 한편 phytoecdysteroid는 열에 민감하므로 추출공정 및 추출 후 보관하는 과정에서 열에 노출되지 않도록 주의해야 할 것으로 생각되었다.

각 최적의 추출조건에서 건체중의 20E와 PonA의 함량은 청나래고사리에서 각 0.0067%, 0.0056%, 고비에서 각 0.0104, 0.0044%였으며, 생체중에서는 청나래고사리에서 각 0.0010, 0.008%, 고비에서 각 0.0024, 0.0010%였다. Yang(1997)은 생체중 기준 나사미역고사리와 미역고사리의 근경은 각 0.0325, 0.047% 쇠무릎의 줄기와 뿌리는 0.0311%와 0.0150% 시금치 잎은 0.0033%의 20E가 함유되어 있다고 보고하였는데, 본 연구의 결과와 비교한 결과, 청나래고사리와 고비는 20E의 함량이 다소 낮은 것으로 나타났다. 그러나 청나래고사리와 고비의 지상부는 연중 다회 수확이 가능하며, 좁은 공간에서도 1회 수확량이 많으므로 나사미역고사리와 미역고사리와 같이 재배 기간이 길고 동일 면적대비 수확량이 적은 식물보다는 phytoecdysteroids 추출용 식물로서 경제적 가치가 우수할 것으로 생각된다. 따라서 차후 청나래고사리와 고비를 phytoecdysteroids 추출용 천연소재로 개발하기 위하여 이들의 적정 재배법 및 일정 공간에서의 수확량과 phytoecdysteroids 추출량에 관한 연구가 필요한 것으로 생각된다.

## 적 요

본 연구는 양치식물로부터 phytoecdysteroids의 추출 효율을 향상시키기 위하여 시행하였다. 청나래고사리와 고비의 잎(엽상체)을 동결건조 한 후 곱게 분쇄하여 MeOH, 80% EtOH, H<sub>2</sub>O(nano pure grade)를 용매로 하여 50배 추출하였으며, 각 용매별로 6시간 동안 침지, 교반(200 RPM), 60°C 환류냉각추출하거나 42 kHz의 초음파수조에서 15, 30, 45분 동안 추출하였다. 추출물은 C<sub>18</sub> cartridge로 정제하여 분석하였으며, HPLC를 이용하여 각 추출물의 20-hydroxyecdysone(20E)과 ponasterone A(PonA)의 함량을 조사하였다. 3종류의 용매를 6가지 방법으로 추출한 결과, 청나래고사리와 고비의 추출물 모두 MeOH를 용매로 30분 동안 초음파 추출했을 때 20E와 PonA의 용출량이 증가하였으며, 엽상체 건물중 1 g당 청나래고사리와 고비의 20E 함량은 66.76과 104.48 µg, PonA의 함량은 53.43와 43.82 µg이었다.

## 인용문헌

- Adler, J.H. and R.J. Grebenok. 1999. Occurrence, biosynthesis, and putative role of ecdysteroids in plant. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 34:253-264.
- Albanese, C., A.T. Reutens, B. Bouzahzah, M. Fu, M. D'mico, T. Link, R. Nicholson, R.A. Depinho and R.G. Pestell. 2000. Sustained mammary gland-directed, ponasterone-A inducible expression in transgenic mice. *FASEB J.* 14: 877-844.
- Báthori, M and Z. Pongrácz. Phytoecdysteroids- From isolation to their effects on humans. *Curr. Med. Chem.* 12:153-172.
- Dinan, L. 2001. Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* 57:325-339.
- Dinan, L. and R. Lafont 2007. Compilation of the literature reports for the screening of vascular plants, algae, fungi and non-arthropod invertebrates for the presence of ecdysteroids. *Ecdybase*, Cybersales, Prague, online <http://ecdybase.org>
- Hanaya, R., M. Sasa, K. Ishihara, T. Akimitsu, K. Iida, T. Amano, T. Serikawa, K. Arita and K. Kurisu. 1997. Antiepileptic effects of 20-hydroxyecdysone on convulsive seizures in spontaneously epileptic rats. *Japanese J. Pharmacol.* 74:331-335.
- Kim, J.G. 1996. Usage and action mechanism on ecdysteroid. *Kor. Seric. Sci.* 38:202-205 (in Korean).
- Kim, M.R. 1998. Analysis for the ecdysteroids by SFE-SFC system in *Achyranthis radix*. MS Thesis, Chonnam Nat. Univ. pp. 12-15 (in Korean).
- Kizelsztejn, P., D. Govorko, S. Komarnytsky, A. Evans, Z. Wang, W.T. Cefalu and I. Raskin. 2009. 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. *American J. Physiol, Endocrinol. Metab.* 296:E433-E439.
- Ko, S.Y. 2007. Effects of phytoecdysteroid on the proliferation and activity of bone cells. *Korean J. Oral Med.* 32:129-135 (in Korean).
- Kosar, K., L. Opletal, K. Vokac, J. Harmatha, M. Sovova, J. Cerovsky, F. Kratky and J. Dvorak. 1997. Embryotoxicity of 20-hydroxyecdysone and polypodine B from *Leuzea carthamoides* DC. *Pharmazie* 52:406-407.
- Lafont, R. and L. Dinan. 2003. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J. Insect Sci.* 7:1-30.
- Lafont, R., J. Harmatha, F. Marion-Poll, L. Dinan and I. Wilson. 2009. The ecdysone handbook, online <http://ecdybase.org>

- Lin, S., Y. Yang and S. Feng. 1997. Effects of ecdysterone on proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Chin. Pharmacol. Bull.* 13:176-179.
- Matsuda, H., T. Kawaba and Y. Yamamoto. 1970. Pharmacological studies of insect metamorphosing steroids from *Achyranthis radix*. *Folia Pharmacol. Japon.* 66:551-563.
- Okada, M., K. Ishihara, M. Sasa, R. Izumi, K. Yajin and Y. Harada. 1998. Enhancement of GABA-mediated inhibition of rat medial vestibular nucleus neurons by the neurosteroid 20-hydroxyecdysone. *Acta Otol.* 118:11-16.
- Reixach, N., J. Irurre-Snatilari, J. Casas, E. Melé, J. Messeguer and F. Camps. 1996. Biosynthesis of ecdysteroids in *in vitro* prothalli cultures of *Polypodium vulgare*. *Phytochemistry* 43:597-602.
- Syrov, V.N. and Z.A. Khushbaktova. 1996. Wound-healing effects of ecdysteroids. *Dokl. Akad. Nauk Resp. Uzb.* 12:47-50.
- Wang, Z., J. Zhao, L. Zhang, C.J. Yu, C.J. Wang and A.G. Yang. 2004. Establishment of Hela cell line inducibly expressing human active granzyme B. *Chin. Cell. Mol. Immunol.* 20:621-624.
- USP XXII. 1990. NF XVII - US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Yang, C.S. 1998. Analysis of ecdysteroids in plant tissues by HPLC. MS. Thesis. Cheju Nat. Univ. pp. 5-6 (in Korean).
- (접수일 2010.8.24; 수정일 2011.2.14; 채택일 2011.3.31)