

동충하초에서 분리된 신규 항암물질의 효율적 합성법 개발

차해연* · 트루응 녀 투엔***** · 윤덕효** · 김태웅** · 성기호*** · 박해일**[#]

*강원대학교 약학대학, **강원대학교 자연과학대학, ***농촌진흥청, ****호치민 시립의약대학

(Received February 20 2012; Revised March 2, 2012; Accepted March 7, 2012)

Development of an Efficient Synthetic Method for a Novel Anticancer Substance Isolated from Insect-flower

Haiyan Che*, Ngoc Tuyen Truong*****, Deok Hyo Yoon**, Tae Woong Kim**,
Gi-Ho Sung*** and Haeil Park**[#]

*College of Pharmacy, **College of Natural Sciences of Kangwon National University, Chunchon 200-701 Korea

³Rural Development Administration, Suwon 441-701, Korea

⁴Ho Chi Minh City University of Medicine & Pharmacy, Ho Chi Minh, Vietnam

Abstract — *Cordyceps militaris*, a caterpillar-grown traditional medicinal mushroom, produces important bioactive compounds, cordycepin (3'-deoxyadenosine) and militarin. Militarin is reported to possess anticancer activities against several tumor cells. An efficient synthetic method of militarin was developed to prepare multi-gram scale sample for bioassay. Militarin was successfully synthesized from commercial starting materials in 5 steps and 29.3% overall yields.

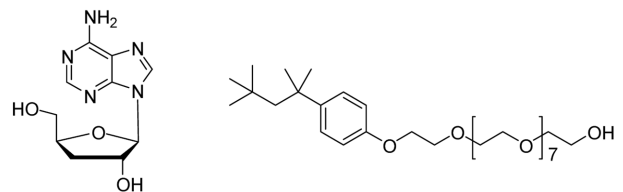
Keywords □ *Cordyceps militaris*, militarin, anticancer activity, multi-gram scale

동충하초(insect-flower or medicinal mushroom)는 보편적으로 곤충에 기생하여 자라나는 버섯의 일반적인 명칭이며, 곰팡이의 일종인 동충하초 균이 주로 온도, 습도가 높아지는 시기에 살아있는 곤충의 몸속으로 들어가 발육증식하면서 기생 곤충을 죽이고 자실체를 곤충의 표피에 형성하는 약용버섯의 일종이다. 원래 동충하초는 박쥐나방(Hepialidae)의 유충에 기생하여 자실체를 형성한 *Cordyceps sinensis*를 지칭하는 것이었지만 오늘날에는 곤충뿐만 아니라 거미, 균류 등에서 나오는 것을 모두 총칭하여 동충하초라 부른다. 동충하초에 대한 이미 발표된 연구결과에 따르면 다양한 생리활성을 갖는 것으로 보고되어 있다.¹⁻⁴⁾

본 연구팀에서는 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 생리활성 성분에 대한 연구를 통하여 기지물질인 코디세핀(cordycepin, Fig. 1)을 분리하여 이 물질의 생리활성에 대한 보고를 하였다.⁵⁾ 최근에는 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 생리활성 성분에 대한 지속적인 연구를 통하여 신규 항암물질인 밀리타린(militarin)을 분리하여 이미 발표된 항암물질인 코

디세핀과 다양한 종류의 암세포(흑색종, 전립선암, 자궁경부암)에 대한 항암작용을 비교한 결과 코디세핀 보다 강한 억제력을 갖는 사실을 발견하였다.⁶⁾ 발표된 문헌에 의하면 밀리타린의 구조는 9개의 에틸렌글리콜 단위가 폴리머 형태로 4-(*tert*-octyl)phenol과 에테르로 연결된 구조인데(Fig. 1), 계면활성제로 사용되는 트리톤 엑스-100과 매우 유사한 물질로 밝혀졌다.

본 논문에서는 기존에 알려진 코디세핀 보다도 강력한 항암성 물질로 보고된 밀리타린의 다양한 생리활성 검색에 필요한 시료를 간편하며 효율적으로 대량합성이 가능한 제조경로의 탐색을 위한 연구를 수행하였다.



코디세핀

밀리타린

Fig. 1 – Structures of Cordycepin and militarin isolated from *Cordyceps militaris*.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 033-250-6920 (팩스) 033-255-7865
(E-mail) haeilp@kangwon.ac.kr

재료 및 방법

본 실험에 사용한 시약은 시판품을 사용하였고, 추출 및 컬럼 용-용매는 국내 시약사로부터 구매한 특급용매를 별도의 정제과정을 거치지 않고 그대로 사용하였으며, 무수용매는 HPLC 등급의 해당 용매를 구입 후 별도의 건조 및 증류과정을 거쳐 얻어진 순수한 물질을 반응에 이용하였다. $^1\text{H-NMR}$ 은 Bruker Avance 300(300 MHz) 혹은 Bruker DPX 400(400 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ 은 Bruker DPX 400(100 MHz)를 사용하여 측정하였으며 내부표준 물질로 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였다. 분석용 박층 크로마토그래피(TLC)는 Merck 제품인 실리카 젤 60F₂₅₄를 사용하였고, 일반 컬럼 크로마토그래피는 Merck 제품인 Kieselgel 60(70~200 Mesh)를, 플래시 컬럼 크로마토그래피는 Merck 제품인 Kieselgel 60(230~400 Mesh)를 사용하였다.

밀리타린의 합성

시약으로 구매한 테트라에틸렌글리콜, *p*-톨루엔설포닉산의 염화물(2.2 당량)과 트리에틸아민(5 당량)을 에테르에 녹여 실온에서 5시간 교반 후 추출하여 조화합물 상태로 디토실화물(1)을 정량적으로 얻었다. 얻어진 조화합물을 *tert*-옥틸페놀(0.9 당량), 탄산칼륨(1.4 당량), 오오드 카륨(0.03 당량) 아세트니트릴에 용해 후 철야 가열 환류하여 얻어지는 조화합물을 컬럼 크로마토그래피(핵산 : 초산 에틸=10 : 1)를 통하여 56% 수율로 중간체 2를 얻었다.

무수 THF에 녹인 테트라에틸렌글리콜(1.5 당량)에 1.55 당량의 NaH를 가한 현탁액을 차게 냉각시키고, 이 용액에 중간체 2를 무수 THF에 녹인 용액을 서서히 가하고 실온에서 철야교반 후 3% 염산 수용액을 가하여 반응을 종료하였다. 얻어진 조생성물을 컬럼 크로마토그래피(핵산 : 아세톤=3 : 1)를 통하여 78% 수율로 무색 오일상의 중간체 3을 얻었다.

중간체 3을 무수 THF에 용해시키고 NaH(1.5 당량)을 가하고 실온에서 1시간 교반 후, ice-bath에서 냉각하면서 allyl bromide(1.4 당량)를 가하고 반응액을 실온에서 5시간 교반하였다. 반응 종료 후 3% 염산 수용액을 가하여 과량의 염기를 분해하고 후 처리하여 조화합물의 무색 오일 상의 중간체 4를 얻었다. 중간체 4, NaIO₄(1.5 당량), OsO₄(0.02 당량)을 메탄올에 용해하고

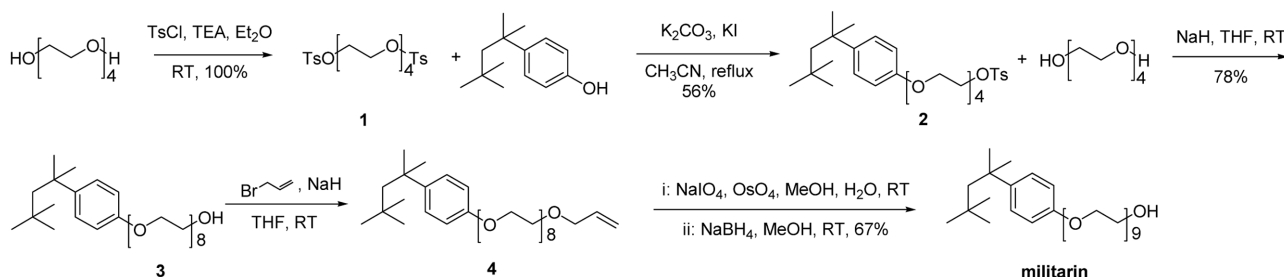
실온에서 철야교반 시킨 후, 후처리 과정을 통하여 얻어진 조생성물을 메탄올에 녹여 NaBH₄와 반응시키고 얻어진 조생성물을 컬럼 크로마토그래피(핵산 : 아세톤=5 : 1)를 통하여 정제하여 67% 수율로 무색 오일상의 밀리타린을 얻었다(Scheme 1).

Tetraethylene glycol ditosylate (1) – $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl₃) δ 7.77~7.80(d, 4H, $J=8.3$ Hz, Ph), 7.33~7.36(d, 4H, $J=8.3$ Hz, Ph), 4.14~4.17(dd, 4H, $J=4.9$ Hz, 4.7Hz, 2*-CH₂-OTs), 3.66~3.69(dd, 4H, $J=4.9$ Hz, 4.7 Hz, 2*-CH₂-CH₂-OTs), 3.55~3.57(m, 8H, 4*-CH₂-), 2.44(s, 6H, 2*Me).

Tetraethyleneglycol mono(4-*tert*-octyl)phenyl ether tosylate (2) – $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl₃) δ 7.78~7.81(d, 2H, $J=8.3$ Hz, tosyl-H), 7.32~7.35(d, 2H, $J=8.3$ Hz, tosyl-H), 7.23~7.28(ddd, 2H, $J=8.9$ Hz, 3.2 Hz, 2.1 Hz, Ph), 6.79~6.84(ddd, 2H, $J=8.9$ Hz, 3.2 Hz, 2.1 Hz, Ph), 4.13~4.17(dd, 2H, $J=4.9$ Hz, 4.7 Hz, -CH₂-OTs), 4.09~4.12(dd, 2H, $J=5.1$ Hz, 4.7 Hz, -CH₂-OPh), 3.82~3.85(dd, 2H, $J=5.1$ Hz, 4.7 Hz, -CH₂-CH₂-OPh), 3.58~3.72(m, 10H, 5*-CH₂-), 2.44(s, 3H, Me in tosyl), 1.69(s, 2H, Me in tosyl), 1.33(s, 6H, 2*Me), 0.70(s, 9H, 3*Me).

Octaethyleneglycol mono(4-*tert*-octyl)phenyl ether (3) – $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ 7.23~7.28(ddd, 2H, $J=8.8$ Hz, 3.1 Hz, 1.8 Hz, Ph), 6.80~6.84(ddd, 2H, $J=8.8$ Hz, 3.1 Hz, 1.8 Hz, Ph), 4.09~4.12(dd, 2H, $J=5.2$ Hz, 4.7 Hz, -CH₂-OPh), 3.83~3.85(dd, 2H, $J=5.2$ Hz, 4.7 Hz, -CH₂-CH₂-OPh), 3.65~3.73(m, 26H, 13*-CH₂-), 3.58~3.61(dd, 2H, $J=4.9$ Hz, 4.2 Hz, CH₂OH), 3.06(br, 1H, OH), 1.69(s, 2H, CH₂ in octyl), 1.33(s, 6H, 2*Me), 0.70(s, 9H, 3*Me); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl₃) δ 156.74, 142.65, 127.37, 114.13, 72.98, 71.54, 70.97, 70.93, 70.91, 70.67, 70.18, 67.64, 62.01, 57.35, 38.29, 32.69, 32.15, 32.08.

Octaethylene glycol allyl (4-*tert*-octyl)phenyl ether (4) – $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ 7.23~7.28(ddd, 2H, $J=8.9$ Hz, 3.2 Hz, 2.1 Hz, Ph), 6.80~6.85(ddd, 2H, $J=8.9$ Hz, 3.2 Hz, 2.1 Hz, Ph), 5.85~5.98(m, 1H, -CH=CH₂), 5.23~5.31(m, 1H, -CH=CH₂), 5.15~5.20(m, 1H, -CH=CH₂), 4.09~4.12(dd, 2H, $J=5.2$ Hz, 4.7 Hz, -CH₂-OPh), 4.01~4.04(ddd, 2H, $J=5.7$ Hz,



Scheme 1 – A concise synthesis of militarin.

1.4 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.83~3.86(dd, 2H, $J=5.2$ Hz, 4.7 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OPh}$), 3.58~3.74(m, 28H, 14^*-CH_2-), 1.69(s, 2H, CH_2 in octyl), 1.33(s, 6H, 2^*Me), 0.71(s, 9H, 3^*Me).

Nonaethylene glycol mono(4-*tert*-octyl)phenyl ether (militarin) – ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ 7.24~7.27(ddd, 2H, $J=10.0$ Hz, 3.1 Hz, 2.0 Hz, Ph), 6.80~6.84(ddd, 2H, $J=10.0$ Hz, 3.1 Hz, 2.0 Hz, Ph), 4.09~4.12(dd, 2H, $J=5.2$ Hz, 4.7 Hz, $-\text{CH}_2-\text{OPh}$), 3.83~3.86(dd, 2H, $J=5.2$ Hz, 4.7 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OPh}$), 3.65~3.73(m, 30H, 15^*-CH_2-), 3.59~3.62(dd, 2H, $J=4.9$ Hz, 4.2 Hz, CH_2OH), 1.69(s, 2H, CH_2 in octyl), 1.33(s, 6H, 2^*Me), 0.71(s, 9H, 3^*Me); ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3) δ 156.77, 142.74, 127.40, 114.15, 72.95, 71.19, 71.02, 70.96, 70.93, 70.72, 70.23, 67.68, 62.10, 57.38, 38.32, 32.71, 32.16, 32.08; IR(cm^{-1}) 3742, 2864, 1512, 1248, 1099, 944, 827.

실험결과 및 고찰

동충하초 *Cordyceps militaris*에서 분리된 신규 항암물질인 밀리타린을 상용의 테트라에틸렌 글리콜을 이용하여 5단계의 과정을 거쳐 성공적으로 합성하였다. 9개의 에틸렌글리콜 unit을 간편하게 도입하기 위하여 시약으로 구입한 테트라에틸렌 글리콜의 2개의 알콜기를 모두 토실화 시킨 후, 4-(*tert*-octyl)phenol과 반응시켜 4개의 에틸렌글리콜 unit을 도입하였다.^{7,8)} 이때 부산물로서 4-(*tert*-octyl)phenol이 2개 도입된 bis체의 생성이 관찰되었다(27%). 얻어진 중간체 2를 연속하여 테트라에틸렌 글리콜과 축합시켜 얻어지는 중간체 3을 allylation 시킨 후,^{9,10)} 생성된 조화합물 상태의 중간체를 산화적 분해 및 환원을 거쳐 밀리타린을 간편하게 대량제조 가능한 합성경로를 확립하였다. 동충하초에서 분리된 시료와 합성된 시료의 분석자료($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR, IR)를 비교하여 두 물질이 동일한 것을 확인하였다.

결 론

동충하초 *Cordyceps militaris*에서 발견된 밀리타린의 분리정제는 다 단계의 컬럼 크로마토그램 과정 및 HPLC를 이용하여 분리/정제되기 때문에 다양한 생리활성을 검색하기 위한 충분한 양의 시료를 확보하기에 매우 어려움이 있었다. 본 연구를 통하여 확립된 연구결과는 간편하며 짧은 단계의 합성경로로서 생리활성 검색에 필요한 대량(1~10 g)의 시료를 제공 가능할 수 있는 효율적 제조방법으로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 말씀

이 실험에 필요한 물질구조 분석에 사용된 기기 및 시설은 강

원대학교의 공동실습관 및 강원대학교 종합약학연구소의 도움을 받아 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Cho, M. A., Lee, D. S., Kim, M. J., Sung, J. M. and Ham, S. S. : Antimutagenicity and cytotoxicity of cordycepin isolated from *Cordyceps militaris*. *Food Sci. Biotechnol.* **12**, 472 (2003).
- 2) Choi, S. B., Park, C. H., Choi, M. K., Jun, D. W. and Park, S. M. : Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces tenuipes* in 90% pancreatectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 2257 (2004).
- 3) Yoo, H. S., Shin, J. W., Cho, J. H., Son, C. G., Lee, Y. W., Park, S. Y. and Cho, C. K. : Effect of *Cordyceps militaris* extract on angiogenesis and tumor growth. *Acta Pharmacol. Sin.* **25**, 657 (2004).
- 4) Yun, Y. H., Han, S. H., Lee, S. J., Ko, S. K., Lee, C. K., Ha, N. J. and Kim, K. J. : Anti-diabetic effects of CCCA, CMES and cordycepin from *Cordyceps militaris* and the immune responses in streptozotocin-induced diabetic mice. *Nat. Prod. Sci.* **9**, 291 (2003).
- 5) Chang, W., Lim, S., Song, H., Song, B. W., Kim, H. J., Cha, M. J., Sung, J. M., Kim, T. W. and Hwang, K. C. : Cordycepin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur. J. Pharmacol.* **597**, 64 (2008).
- 6) 김태웅, 주식회사머쉬텍, 성재모 : 밀리타린스동충하초로부터 분리된 항암활성이 있는 신물질과 그 제조방법 및 용도. 대한민국 등록특허 10-0538311 (2005).
- 7) Busch, B. B., Staiger, C. L., Stoddard, J. M. and Kenneth, J. : Living polymerization of sulfur ylides. Synthesis of terminally functionalized and telechelic polymethylene shea. *Macromolecules* **35**, 8330 (2002).
- 8) Delamarche, E., Donzel, C., Kamounah, F. S., Wolf, H., Geissler, M., Stutz, R., Schmidt-Winkel, P., Michel, B., Mathieu, H. J. and Schaumburg, K. : Microcontact printing using poly(dimethylsiloxane) stamps hydrophilized by poly(ethylene oxide) silanes. *Langmuir* **19**, 8749 (2003).
- 9) Gutierrez-Rodriguez, M., Garcia-Lopez, M. T. and Herranz, R. : Improved synthesis of a [4.4]-spiro lactam β -turn mimetic as surrogate of the didemnin side chain dipeptide Pro-*N*-Me-D-Leu. *Tetrahedron* **60**, 5177 (2004).
- 10) Alesso, S. M., Yu, Z., Pears, D., Worthington, P. A., Luke, R. W. A. and Bradley, M. : Improving resins for solid phase synthesis: incorporation of 1-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]-4-vinylbenzene. *Tetrahedron* **59**, 7163 (2003).