

遠志 뿌리 抽出物の 成分分離와 腦虛血 治療劑의 開發의 理解

박진서

(사) 향토지적재산본부

緒 言

現代 社會는 醫學의 발달로 인한 老齡人口의 증가로 腦虛血, 骨多孔症, 癡 및 高血壓 등의 老人性 疾患 또한 증가되어 社會的, 經濟的 問題로 대두되고 있다.

그 중 腦虛血 등의 腦疾患은 癌에 이어 우리 나라에서 두 번째의 死亡 原因이 되고 있고, 세계인구의 1/12은 腦虛血 등의 腦疾患으로 사망하는 것으로 집계되고 있으며 48), '人口의 노령화와 함께 그 發病率 및 有病率이 계속 증가할 것으로 예상되는 질환이다. 그러나 지금까지 老人性 疾患에 사용되는 合成 治療劑는 여러 가지 副作用 뿐만 아니라 長期服用할 때 문제점들을 야기 시키고 있는 실정이다^{47,48)}. 따라서 이런 合成 治療劑보다 相對的으로 副作用이 적은 것으로 알려진 生藥을 이용한 藥劑의 開發이나 豫防을 위한 健康食品開發에 대한 重要性이 증가하고 있다.

遠志는 예로부터 腦疾患 등 여러 가지 治療效果가 있다고 보고되고^{40, 52, 60, 61)}있으며, 醫療保險 對象藥材⁵⁷⁾로서 중요한 位置를 차지하는 藥材이다. 그러나 우리 나라에서는 栽培되지 않고 韓藥材 輸入 自由 品目으로 中國 등지에서 대부분이 輸入되고 있는 실정이다⁵⁷⁾. 그러므로 우리 나라에서 自生하는 遠志를 藥用作物화한다면 農民의 所得作物의 하나가 될 수 있을 것이다. 또한 機能性 物質의 探索을 통해 癡 豫防을 위한 機能性 食品開發을 위한 實驗⁴⁸⁾도 進行되고 있으며, 이런 研究 등을 통해 遠志의 藥用作物로서의 活用價値의 증가를 기대 할 수 있다.

본 實驗은 遠志뿌리의 에탄올 抽出物과 각 分割을 腦虛血 誘發 동물모델에 투여하여 腦虛血 保護效果의 확인을 통해 治療劑로서의 가능성을 확인하며, 效果가 확인된 부탄을 分割과 遠志의 대표적인 成分 중의 하나인 xanthone 化合物이 포함된 hexan 分割에서 단일물질을 分離하여 構造를 究明하고자 遂行되었다.

實驗 材料와 器機

실험재료인 遠志는 韓國에서 栽培되지 않기 때문에 購入이 불가능함에 따라 신우교 역을 통해 中國 山墅城産 遠志를 大量購入하여, 慶熙大學校 韓藥學科 教授의 鑑定 후

사용하였으며, 標本은 韓國韓醫學研究院에 보관중이다.

實驗에 사용된 mongolian gerbil(*Meriones unguiculatus*)은 모래쥐의 일종으로 장기간의 절수에도 생존이 가능하고, 선천적으로 불완전한 腦動脈을 가지고 있어서 온몸動脈(common carotid artery)을 結紮하면 쉽게 腦虛血을 유발할 수 있는 특징을 가지며, 試驗藥物은 虛血 誘發 2시간 전에 경구로 投與하였다.

化合物들은 컬럼 크로마토그래피용 실리카 겔(Kiesel gel 60 230-240 mesh ASTM, Merck Art. 9385, 7734, Germany), sephadex LH20 (Pharmacia biotech, Swiss), lobar[®] 컬럼 크로마토그래피(RP18) 그리고 얇은 막층 크로마토그래피(TLC: precoated Kieselgel 60 F254, layer thickness 0.25mm, 20 20cm, Merck Art. 5715, Germany), preparative 용 TLC (Kieselgel 60 F254, RP-18 F254S: layer thickness 0.25mm, 20 20cm, Merck Art. 5389, Germany)를 사용하여 分離하였고, 化合物의 構造確認을 위하여 NMR(AMX-500: Bruker, Karlsruhe, Germany, 500MHz), EI mass(JMS-AX505WA: JEOL Co. Japan), FAB mass (HP 5890 series II . U.S.A.), GC mass(Schimazu GCMS- QP5050A. Japan), UV(UVIKON 922: Kontron Instruments, Milan, Italy) 및 IR(Mattson Genesis Series FTIR Spectrometer: Nicolet InspecIR, U.S.A.)의 spectrum을 綜合 分析하였다.

實驗方法

腦虛血 誘發은 Gerbil을 ether 痲醉 후에 수술 판에 고정시키고 목의 중앙선을 切開한 후 兩側 頸動脈을 迷走神經으로부터 分離하여 動脈 clamp로 結紮하였다. 또한 神經學的 檢査는 수술 후 24시간이 경과한 다음 Bederson 등의 방법에 따라 그 缺損 정도를 4등급으로 점수화하였다. 腦시료를 평량한 후 0.25 % EDTA가 들어있는 0.1M HClO₄를 가하여 homogenizer로 30초간 均質化 시킨 후 10분간 固定시켜 蛋白質을 除去한 후 10000xg, 4℃에서 10분간 遠心分離한 다음 上分割液을 ATP, MDA 및 lactate 정량용 시료로 사용하였다.

腦의 ATP함량은 우선 0.3mg의 NADH가 함유된 바이알에 PGA buffered solution 1.0ml, 3차 증류수 1.5ml, 검체 0.5ml을 순서대로 가한 후 온화하여 cuvet에 옮기고 340nm에서 吸光度를 測定한 후 (initial A) 계속해서 GAPD/PGK enzyme mixture 0.04ml를 가하여 잘 섞어주고 340nm에서 最低吸光度를 測定하여 Final A) 이 두 吸光度의 차이로 檢體중의 ATP 함량을 計算하였다. lactate측정은 Gutmann와 Wahlefeld의 방법¹⁷⁾에 따라 NAD⁺ 존재하에서 lactate와 LDH(lactate dehydrogenase)에 의해 생성되는 NADH의 양을 340 nm에서 吸光度를 測定하여 nmol/mg protein의 단위로 나타내었다. 脂質過酸化

는 Masugi와 Nagamura의 방법에 준하여 thiobarbituric acid(TBA) assay를 사용하여 535nm에서 吸光度를 측정하였으며, 標準液으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane(MDA: malondialdehyde tetraethylacetal)을 사용하였다. Protein 함량은 Bradford 등의 방법에 따라 bovine serum albumin을 標準溶液으로 사용하였다.

遠志뿌리 50kg을 常溫에서 70% 에탄올로 1주 간격으로 4회 抽出하였으며, 이를 濾過, 減壓濃縮, 乾燥하여 70% 에탄올 抽出物 1.65kg을 얻었다. 70% 에탄올 抽出物을 蒸溜水에 녹인 후 hexan을 加하고 5차례 系統分離하여, hexan 分劃(65.58g)을 얻었으며, 이와 같은 方法으로 에틸아세테이트와 부탄올을 加하여 에틸아세테이트分劃(78.09g), 부탄올 分劃(953.46g) 그리고 물分劃(117.2g)을 얻었다.

이 중에서 腦虛血 保護效果를 보이는 부탄올 分劃과 遠志 뿌리의 대표적인 成分의 하나인 xanthone 化合物이 함유된 hexan 分劃으로부터 單一物質을 分離하였다

實驗結果

본 實驗은 腦虛血에 적용할 수 있는 新藥 또는 健康食品을 개발하기 위한 基礎研究의 일환으로 腦虛血을 誘發한 動物모델을 이용하여 遠志 뿌리의 에탄올 抽出物 및 각 分劃들의 腦虛血 保護效果를 探索하고, 腦虛血 保護效果가 確認된 부탄올 分劃과 遠志 뿌리의 대표적인 成分의 하나인 xanthone 化合物을 함유한 hexan 分劃에서 單一物質을 分離하여 構造를 究明하고자 遂行되어서 아래와 같은 結論을 導出하였다.

1. 20분 虛血 후 30분 再管流시의 腦虛血 動物모델은 腦內 lactate 및 MDA 處理에서 有意的 차이를 보이는 兩側 頸동맥 結찰군을 選擇하였다(표1,2).

Table 1. Change of lactate and MDA in brain following 20 minutes occlusion and recirculation of 30 minutes

	ATP (nmol/mg protein)	Lactate (nmol/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
Normal	0.157±0.013	105.4±6.0	0.6±0.1
Occlusion of bilateral carotid	0.142±0.004	152.8±6.2**	1.8±0.2**
Occlusion of unilateral carotid	0.151±0.009	106.8±4.0	0.8±0.3

Values are means S.E.M. for 5 to 6 gerbils per group. Normal treatment were

compared with occlusion of bilateral carotid and occlusion of unilateral carotid, respectively.

Table 2. Change of ATP and MDA by brain ischemia and reperfusion after occlusion of unilateral carotid

	ATP (nmol/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
Normal	0.157±0.013	0.60±0.11
Recirculation of 30 minutes after 20 minutes occlusion	0.151±0.009	0.80±0.29
Recirculation of 30 minutes after 25 minutes occlusion	0.153±0.008	0.80±0.15
Recirculation of 30 minutes after 30 minutes occlusion	0.136±0.010	0.93±0.23

Values are means S.E.M. for 5 gerbils per group.

2. 虛血 및 再管流로 인한 腦内の ATP 함량의 低下는 100mg/kg처리를 제외한 모든 처리에서의 부탄올 分割이 抑制시키는 結果를 얻었다(표3).

Table 3. Effect of extract and fractions of Polygalae radix on change of ATP after brain ischemia and reperfusion

	Dose(mg/kg)					
	0	30	100	300	600	900
Sham	0.63±0.02					
Is/Rp	0.54±0.02*					
Extract and fractions						
Ethanol		0.57±0.02	0.57±0.02	0.59±0.05	0.59±0.01	0.61±0.03
n-Hexane		0.59±0.01	0.63±0.02**	0.58±0.03	0.63±0.03	0.63±0.03*
EtOAc		0.60±0.01	0.62±0.01**	0.63±0.03*	0.60±0.02*	0.61±0.03
BuOH		0.64±0.02**	0.57±0.03	0.62±0.02*	0.70±0.04**	0.72±0.02**
H ₂ O		0.57±0.04	0.63±0.02**	0.60±0.04	0.60±0.03	0.59±0.02

Values are means S.E.M. for 6 to 8 gerbils per group. Unit is nmol/mg protein. *:

Significantly different from the sham group(P<0.05 in Student's t test). *, **: Significantly different from the Is/Rp group(P<0.05, P<0.01 in Student's t test), Is/Rp: Ischemia and reperfusion

3. 血管内の 腦內 젖산의 蓄積은 100mg/kg처리의 에탄올 抽出物이 현저히 減少시켰고, 腦血管의 脂質過酸化는 부탄올 分割의 모든 처리에서 현저히 抑制시키는 結果를

얻었다.

Table 4. Effect of extract and fractions of Polygalae radix on lactate change after brain ischemia and reperfusion

	Dose(mg/kg)				
	0	30	100	300	600
Sham	64.65 ± 3.61				
Is/Rp	104.68 ± 7.55**				
Extract and fractions					
Ethanol		69.20 ± 4.30**	80.09 ± 4.27**	65.15 ± 2.69**	72.04 ± 5.55**
n-Hexane		68.74 ± 3.01**	99.98 ± 7.78**	79.77 ± 4.31**	73.98 ± 7.20**
EtOAc		82.91 ± 6.34**	98.91 ± 8.93**	80.83 ± 6.17**	80.00 ± 9.59*
BuOH		87.93 ± 5.38**	117.91 ± 10.43**	61.99 ± 4.72**	103.93 ± 11.01**
H ₂ O		88.05 ± 5.49**	83.53 ± 5.66**	56.93 ± 4.57**	75.40 ± 5.31**

Values are means S.E.M. for 6 to 8 gerbils per group. Unit is nmol/mg protein. *, **: Significantly different from the sham group(P<0.05, P<0.01 in Student's *t* test). *, **: Significantly different from the Is/Rp group(P<0.05, P<0.01 in Student's *t* test). Is/Rp: Ischemia and reperfusion.

Table 5. Effect of extract and fractions of Polygalae radix on MDA change after brain ischemia and reperfusion

	Dose(mg/kg)					
	0	30	100	300	600	900
Sham	0.14 ± 0.00					
Is/Rp	0.18 ± 0.01**					
Extract and fractions						
Ethanol extract		0.17 ± 0.01**	0.18 ± 0.01**	0.14 ± 0.02*	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.02
n-Hexane		0.17 ± 0.00**	0.18 ± 0.01**	0.17 ± 0.01*	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01*
EtOAc		0.18 ± 0.00**	0.22 ± 0.02**	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.01*	0.17 ± 0.01*
BuOH		0.17 ± 0.01*	0.18 ± 0.01*	0.16 ± 0.01+	0.14 ± 0.01**	0.16 ± 0.01*
H ₂ O		0.18 ± 0.00**	0.20 ± 0.01**	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.01*

Values are means S.E.M. for 6 to 8 gerbils per group. Unit is nmol/mg protein. *, **: Significantly different from the sham group(P<0.05, P<0.01 in Student's *t* test). *, **: Significantly different from the Is/Rp group(P<0.05, P<0.01 in Student's *t* test). Is/Rp: Ischemia and reperfusion.

4. 虛血 및 再管流로 인한 腦組織의 損傷(神經괴사, 浮腫, 出血)은 遠志뿌리의 부탄

을 分割을 投與했을 때 抑制했다.

Table 15. Effect of extract and fractions of *Polygalae radix* on brain damage after brain ischemia and reperfusion

	No. of animal	Necrotic foci	Edema	Hemorrhage
Sham	5	-	-	-
Is/Rp	5	+++	+++	+++
Extract and fractions				
Ethanol extract	5	+	++	++
n-Hexane	5	++	++	+++
EtOAc	5	+	++	+++
BuOH	5	+	++	+
H ₂ O	5	+	++	++

-, none; +, mild; ++, moderate; +++, severe. Is/Rp: Ischemia and reperfusion

5. 부탄올 分割에서 P1[α -D-(6-O-sinapoyl)-glucopyranosyl-(1 2')- β -D-(3' -O- sinapoyl)-fructofuranoside], P2[α -D-{6-O-(p-hydroxybenzoyl)}-glucopyranosyl- (1 2')- β -D-{3' -O-(3' '' ,4' '' ,5' '' -trimethoxycinnamoyl)}-fructofuranoside], P3[α -D-{6-O-(p-methoxybenzoyl)}-glucopyranosyl-(1 2')- β -D-{3' -O-(3' '' ,4' '' ,5' '' -trimethoxycinnamoyl)}-fructofuranoside], P4[α -D-glucopyranosyl-(1 2')- β -D-(1' -O-sinapoyl) - fructofuranoside], P5(1,5-anhydro-D-glucitol), P6(ethyl- β -D-glucopyranoside)의 6개의 物質을 分離하여 構造를 同定하였으며, 化合物 P3, P4, P5, P6은 遠志屬 植物에서 최초로 報告한다.

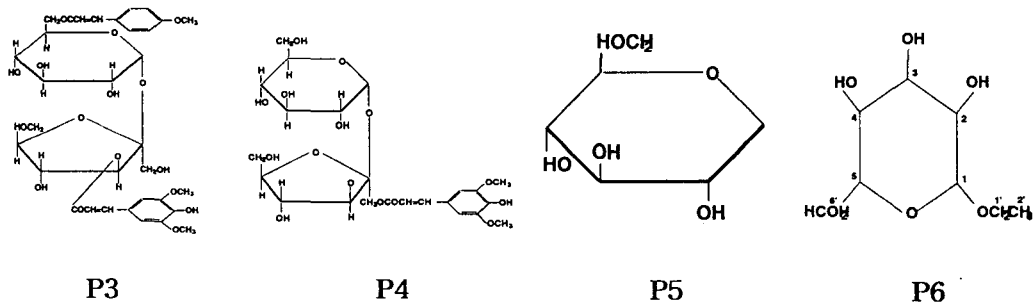


Fig 1. Structure of compound P3, P4, P5, P6

6. hexan 分割에서 P7(1,2,3,7-tetramethoxyxanthone), P8(1,7-dimethoxyxanthone), P9(1,2,3,6,7-pentamethoxyxanthone), P10(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzophenone), P11(3,4,5-trimethoxycinnamic

acid ethylester)의 5개의 化合物을 分離, 構造를 確認하였으며, 其中 P10와 P11는 遠志 屬에서 최초로 分離, 同定하였다. 또한 hexan 分割에서 分離된 모든 化合物의 HMBC 데이터는 처음으로 報告한다.

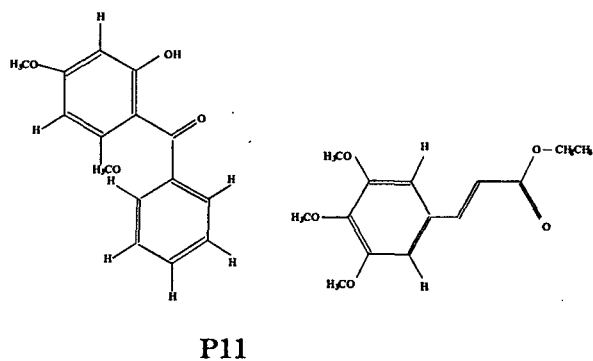


Fig 2. Structure of compound P10. P11