

천련자(川棟子) 成分이 肝機能에 미치는 影響에 관한 研究 III. Melianone과 28-deacetyl sendanin의 약물 대사효소계 및 담즙분비에 미치는 영향

김부생 · 김혜경 · 최종원 · 이정규

경성대학교 약학대학

The Effects of Meliae toosendan Fructus on Liver Function. III. Effects of Melianone and 28-Deacetyl Sendanin on Drug Metabolism and Bile Juice Secretion

Busaeng Kim, Hyekyung Kim, Jong Won Choi and Chung Kyu Lee*

College of Pharmacy, Kyungshung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract - A triterpenoid(melianone) and a limonoid(28-deacetyl sendanin) were isolated from the chloroform fraction of Meliae toosendan Fructus, the rippen fruits of *Melia toosendan* SIEB. et ZUCC.(Meliaceae) and were applied to serial experiments to clarify the liver protective activities. We found that the compounds promoted slightly the drug metabolizing enzyme activities and decreased serum transaminase activities which was elevated by carbon tetrachloride intoxication. And also they slightly increased the secretion of bile juice in rat.

Key words - *Melia toosendan*: Meliaceae: melianone: 28-deacetyl sendanin: liver protective activity

천련자(川棟子 *Meliae toosendan Fructus*)는 천련나무 *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. (*M. azedarach* var. *toosendan*, 멸구슬나무과 Meliaceae)의 果實로서 韓方의 효능은 肝機能 혹은 肝과 胃의 기능부조로 인한 腹痛 및 疝痛 등에 玄胡素과 함께 사용되며^{1,2)} 현대 中國의 藥典에서는 胸痛, 肋痛, 胃痛, 疝痛, 痛經, 蟲積腹痛의 要藥 및 驅蟲藥으로서 '川棟子 *Fructus Meliae Toosendan*'이라는 이름으로 수재되어 있다.

본연구자 등³⁾은 한방에서 간기능 보호약으로 사용되는 천련자의 함유 성분을 구명하고 효능을 검증하기 위해 메탄올 추출물 및 6종의 분획을 얻어 사염화탄소로 손상된 생쥐 및 흰쥐의 간기능 회복정도

와 정상 흰쥐의 담즙 분비에 미치는 영향을 검토한 결과, 메탄올 추출물과 클로로포름 분획은 hexobarbital 수면시간 및 strychnine 사망율을 지표로 실시한 실험에 의해서 간약물 대사효소계의 활성화와 담즙의 분비를 유의적으로 증가시키며 사염화탄소 증독으로 증가된 혈중 transaminase의 활성을 정상치에 가깝도록 저하시킨다는 것을 밝힌 바 있다. 이에 본연구자들은 천련자 성분의 간기능 활성화 작용의 본질을 구명하고 그 유효성분을 밝히고자 수행한 지속적인 연구 과정에서 클로로포름 분획 구성 성분인 1종의 triterpene계 및 1종의 limonoid계 물질을 분리 확인하고, 간기능 보호작용을 관찰하고자 정상동물에 있어서의 약물 대사효소계와 담즙 분비에 미치는 영향 및 사염화탄소에 의해 간독성이 유발된 동물에 있어서 혈중 transaminase 활성화에

*교신저자 : Fax 051-628-6540

미치는 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

재료 · 실험동물 - 본 실험에 사용된 천련자는 시중 한약재 전문점을 통하여 구입한 중국산으로 감별, 확인 후 사용하였다.

실험동물은 약물 대사효소계에 미치는 영향의 검토를 위해서 ICR계 혹은 dd계 웅성 생쥐(18~22 g)를, 담즙 분비량 혹은 담즙산 함량 측정과 사염화탄소 중독 관련 실험을 위해서는 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐(170~210 g)를 각각 사용하였으며 모두 실험을 시작하기 전 일주일 이상 실험실의 환경에 적응시켰다.

추출, 분획의 제조 및 성분분리 - 앞의 보고³⁾에서 설명한 바와 같은 방법으로 얻은 클로로포름 분획(122 g)을 칼럼 크로마토그래피법(Kiesel gel, 400 mesh 이하, 용매: 클로로포름-메탄올, 10-0→1-1)에 의하여 구성성분 분리과정을 거쳤다.

시료투여 및 사염화탄소 중독 - 경구 투여용 사염화탄소액은 CCl_4 를 식물유에 용해하여 0.2 ml CCl_4 /kg의 용량으로 투여되게 조제하였으며 시료액은 5% CMC-Na 용액에 현탁하여 경구투여하였다. 사염화탄소 중독에 의한 간손상 모델은 장 등⁴⁾의 방법을 수정하여 사용하였다. 즉, 각군 4~6마리의 흰쥐에 2일간(2회) 사염화탄소액을 경구 투여하였다.

약물 대사효소계 활성 측정 - 약물 대사효소계에 미치는 효과는 hexobarbital 수면시간을 지표로 한 효소 유도현상을 우 등⁵⁾의 방법에 따라 검토하였다. 즉 각군 7~10 마리의 생쥐에 하루 한번 씩 사흘간 시료를 투여하고 최종 시료투여 24시간 후에 70 mg/kg의 hexobarbital-Na을 복강 주사하여 수면시간을 측정하였다. 수면시간은 hexobarbital을 주사한 시간부터 정향반사의 회복시간까지로 하였다.

Strychnine 사망율 측정 - Strychnine 사망율은 우 등⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 앞의 방법과 같이 사흘간 시료를 투여하고 최종 시료투여 24시간 후에 각군 7~10 마리의 생쥐에 50%의 사망율을 보이는 strychnine용액(20마리 중 10마리의 생쥐가 사망하는 용량, 이 실험에서는 strychnine nitrate 1.2 mg/kg, i.p.)을 투여하고 30분이내 사망하는 동물의 수를 세었다.

담즙 분비량 측정 - 담즙 분비량은 Sudoh 등⁶⁾의 방법을 약간 변경하여 실시하였다. 즉, 4시간 절식하고 물만 공급한 흰쥐(각군 4~6 마리)에 20% 우레탄 용액(ml/kg)을 피하 주사하여 마취시키고 30분 후 복부를 절개하여 십이지장을 통하여 담관에 가는 테플론 튜브(외경 1.5 mm)를 삽입한 후 결찰하고 복부도 봉합한다. 봉합 후 1시간 안정시킨 다음 feeding needle(catheter)로 시료와 비교약물 phenobarbital을 경구 투여하고 이후 1시간 단위로 5시간 동안 유출되는 담즙을 받아 용량(mg)을 재고 체중 100 g당의 양으로 환산하여 비교하였다.

혈액중 Aminotransferase 활성측정 - 각군 다섯 마리의 흰쥐에 시료를 앞의 방법⁴⁾과 같이 투여하고 얻은 혈청으로 Reitman과 Frankel⁷⁾의 방법에 따라 GOT 및 GPT-Kit 시약(AM 101-K, Asan)으로 처리한 다음 555nm에서 비색정량하고 활성도의 표시는 activity unit/dl serum으로 하였다.

결과 및 고찰

분리된 성분의 구조확인 - 천련자 클로로포름 분획의 TLC (용매: 클로로포름-메탄올, 10-1 및 1-1) 패턴을 보면 20개 이상의 spot을 확인할 수 있다. 계속적인 칼럼 크로마토그래프로 물질분리에 들어가 TLC 상에서 서로 다른 pattern(발색: 365 nm 형광 및 50% 황산)을 가진 45종의 elute를 얻고 각 elute를 적당한 재결정 용매(메탄올, 클로로포름, 에틸 아세테이트 및 혼합액)를 처리하여 elute 10~12로 부터 limonoid계 화합물 1(2.7 g)을, 그리고 elute 27~31로 부터 테르페노이드계 화합물 2(3.4 g)를 각각 분리하였다.

화합물 1은 작은 침상결정 혹은 백색분말(클로로포름-메탄올, mp 260~263°C, decomposed)로 TLC(클로로포름-메탄올=5-1) 상에서 2개의 spot ($R_f=0.5$ 및 0.4)로 나타난다. IR 스펙트럼 1712 cm^{-1} 에서 carbonyl(-CO) peak가 나타나며, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, pyridine- d_5) 스펙트럼은 δ : 1.16(3H), 1.34(3H) 및 1.85(3H)에서 3개의 quaternary methyl에 의한 peak가, 1.91(3H) 및 2.02(3H)에서 acetyl기가, 3.93(1H, m)에서 H-7, 4.04(1H, s)에서 H-15, 4.65(1H, d, $J=12.6$) 및 4.83(1H, d, $J=12.6$)에서 H-19, 5.15(1H, m)

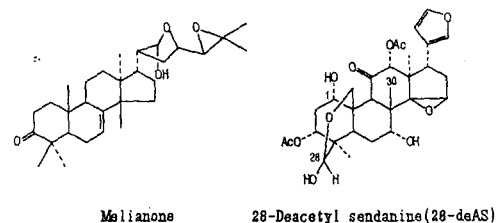
Table I. Chemical shift in ^{13}C -NMR spectrum of 28-deacetyl-sendanin(28-deAS) isolated from *Melieae toosendan Fructus* and reference data

Carbon	28-deAS	Reported ¹¹⁾	Carbon	28-deAS	Reported ¹¹⁾
1	70.9	70.7	16	34.9	34.7
2	38.0	37.9	17	39.7	39.6
3	75.0	74.8	19	65.4	65.4
4	41.3	41.2	20	124.9	124.5
5	29.7	29.6	21	143.7	143.4
6	26.9	26.8	22	113.5	113.1
7	70.3	70.3	23	141.9	141.8
8	43.3	43.1	28	97.7(97.0)	97.8
9	50.3	50.2	COCH ₃	171.4	171.2
10	43.8	43.7		171.2	171.0
11	209.3	208.9	COCH ₃	23.8	23.6
12	79.7	79.5		21.8	21.8
13	47.0	46.8	CCH ₃	21.6	21.4
14	73.8	73.8		20.9	20.8
15	59.8	59.7		16.4	16.2

Table II. Chemical shifts in ^{13}C -NMR spectrum of Melianone Isolated from *Melieae toosendan Fructus* and reference data

Carbon	Melianone	Reported ¹⁰⁾	Carbon	Melianone	Reported ¹⁰⁾
1	38.50	38.52	16	27.41	27.41: 27.32
2	35.08	35.12	17	47.05	47.05: 45.23
3	216.73	216.79: 216.73	18	12.70	12.70
4	47.82	47.88	19	24.50	24.50
5	52.43	52.46: 52.40	20	33.75	33.75: 31.69
6	23.23	23.25	21	101.77	101.77: 97.78
7	118.10	118.18: 118.09	22	31.47	31.47: 31.33
8	145.73	145.78: 145.63	23	78.35	78.35: 77.05
9	49.57	49.64: 48.42	24	67.72	67.72: 65.39
10	34.90	34.91	25	57.92	57.92: 57.23
11	17.71	17.76	26	24.95	24.95: 24.92
12	35.14	35.19	27	19.42	19.42: 19.22
13	43.77	43.81: 43.59	28	24.36	24.36
14	50.76	50.82: 50.46	29	21.53	21.53
15	34.27	34.31	30	22.57	22.57

에서 H-1, 5.42(1H, d, $J=3.9$)에서 H-3, 5.48 (1H, s)에서 H-12, 5.70(1H, s)에서 H-9, 6.03 (1H, s)에서 H-28, 6.16(1H, d, $J=4.2$)에서 C1-OH, 6.33(1H, s), 7.40(1H, s) 및 7.55(1H, s)에서 3개의 aromatic proton(H-22,H-21 및 H-23), 6.76(1H, d, $J=3.0$)에서 C7-OH 등의 peak가 나타났다. FAB-MS 스펙트럼은 m/z 574에서 molecular ion peak가 나타났으며 그의 556(M^+-18), 538(M^+-36), 514(M^+-60), 496($M^+-60-18$) 및 454($M^+-60-60$) 등의 peak가

**Fig. 1.** Structures of isolated compounds from *Melieae toosendan Fructus*.

나타났다. 또한 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서는 총 30개의 carbonyl signal이 나타났으며 각 peak의

Table III. Effects of the components of *Melieae toosendan Fructus* and phenobarbital on hexobarbital hypnosis and strychnine mortality in mice

Treatments ^a (Dose in mg/kg, p.o.)	HB hypnosis ^b Mean±S.E.	% of Control	Strychnine ^c Mortality
Control	68.5± 6.1	100.0	5/10
CCl ₄ intoxicated	153.3±21.6	223.8	10/10
Chloroform fr. (200)	92.0± 9.8*	134.3	6/10 ^d
28-deAS(50)	98.7±11.4*	144.1	7/10 ^d
Melianone(50)	102.3± 9.4*	149.3	8/10 ^d
Phenobarbital(50)	84.6± 7.3*	123.5	6/10 ^d

^a Five (for isolated compounds) or seven mice of each group were administered with sample orally for three days. HB-Na(70 mg/kg, i.p.) or strychnine · NO₃(1.2 mg/kg, i.p.) were administered 24 hrs after the final treatment of sample.

Control group was given vehicle only.

^b Expressed as mean sleeping time in minutes±S.E.

^c No. died/No. used.

^d Significantly different from CCl₄ intoxicated group by student-*t* test as P<0.05.

chemical shift를 이미 보고된 김 등⁸⁾의 보고와 비교해 보면 Table I과 같다. 따라서 이 물질은 limonoid계 화합물로서 hemiacetal ring, β-substituted furan ring 및 aromatic carbonyl을 각각 1개씩 가지고 있으며 2개의 acetate와 3개씩의 secondary hydroxyl group과 tertiary methyl을 가지고 있다. 또한 TLC 상에서 2개의 spot로 나타나는 것은 12-hydroxyamorastaton 및 sendanin⁹⁾ 처럼 C-28의 peak가 97.7에서 major로, 97.0에서 minor로 나타나 endo isomer임을 추정할 수 있다. 따라서 이 화합물은 sendanin의 C-28에 acetyl이 hydroxyl로 치환된 28-deacetyl sendanin(28-deAS)으로 확인하였다.

화합물 2는 elute 27~31로 부터 얻은 무색 침상 결정(mp. 214~6°C, 에탄올)로, IR 스펙트럼을 보면 1700 cm⁻¹에서 carbonyl의 뚜렷한 peak가 보인다. 또한 ¹H-NMR 스펙트럼은 0.85, 0.90, 1.01, 1.03, 1.05, 1.12, 1.30 및 1.34에서 총 21H의 singlet이 나타나서 7개의 tertiary methyl기를 알 수 있고, 2.71(d, *J*=7.7Hz)과 2.86(d, *J*=7.7Hz)에서 1H의 H-24가, 3.85(m)와 3.95(m)에서 1H의 H-23이, 5.30(m)에서 1H의 H-7이, 그리고 5.30(m)과 5.38(t)에서 1H의 H-21이 나타났다.

또 mass 스펙트럼은 *m/z*(%): 470(41)에서 molecular ion peak가 나타나며, 437(72), 399(12), 383(100), 365(64), 297(45), 271(30),

166(27), 95(32) 등이었다. ¹³C-NMR 스펙트럼은 이미 보고된 데이터와 비교하여 Table II에 표시하였다.

이상과 같은 스펙트럼 상의 특징을 종합하면 Nakanishi 등¹⁰⁾이 천연자로부터 분리 확인한 바와 같이 화합물 2는 melianone으로 동정하였다.

약물 대사효소계에 미치는 영향 - 분리된 물질의 간기능에 미치는 영향을 검토하기 위한 첫 번째 실험으로 여러가지 간기능 중 약물 대사효소계에 미치는 효과를 측정된 결과는 Table III와 같다. Hexobarbital 수면시간을 보면, 사염화탄소 중독군은 대조군의 223.8%로 증가되어 간손상 현상을 확실하게 알 수 있으며 이러한 조건에서 클로로포름 분획 투여군은 134.3%로 대조군의 정상치에 가깝게 회복시키는 효과가 있거나 혹은 효소유도현상이 있음을 추측할 수 있다. 대표적인 효소유도제인 phenobarbital 투여군의 경우 123.5%로 나타난 것을 보면, 이러한 효과는 간기능의 회복으로 생각할 수 있다. 그러나 클로로포름 분획에서 분리된 시료물질들은 대조군의 140% 이상을 나타내어 효과가 덜함을 알 수 있었다. 이러한 경향은 strychnine 사망율에서도 비슷하게 나타났다. 즉 대조군이 50%의 사망율을, 그리고 사염화탄소 중독군이 100%의 사망율을 보이는 조건에서 phenobarbital 투여군의 사망율은 60%로 크게 개선됨을 알 수 있었음에 비하여 분리물질 투여군은 70~80%의 사망율을 보인 점에서 역시 간보호 효과가

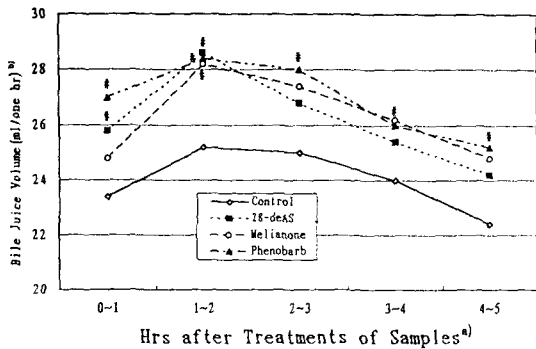


Fig. 2 Effects of the Components of Meliae toosendan Fructus and Phenobarbital on Bile Juice Secretion in Rats. Four (for isolated compounds) or six rats of each group were administered with sample orally one hour after insertion of teflon tube through bile duct. Control group was given vehicle only. Bile juice volume is total collection that of every one hr's secretion. #: Significantly different from control by student-t test as $P < 0.05$.

크지 않음을 알 수 있다. 이상의 결과는 분리된 물질들은 간약물 대사효소계에 대한 유도작용은 크지 않음을 짐작케 한다.

담즙분비량에 미치는 영향 - 앞의 실험결과와 같이 분리된 화합물이 약물 대사효소계에 미치는 작용이 미약한 것인지, 아니면 다른 간기능 보호작용이 있는 것인지를 알아보기 위해 담즙분비에 미치는 효능을 검토하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 천련자 성분 투여 후 2시간 이내에 나타난 효능은 이전에 보고³⁾와 거의 비슷한 효과(대조군의 123.8%)를 나타내었으나 비교약물인 phenobarbital의 효과에는 미치지 못했다.

혈중 aminotransferase 활성에 미치는 영향 - 간기능의 정상여부를 확인하는 가장 간편하며 확실한 요소가 되는 혈중 aminotransferase 활성 측정실험에서는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 정상군의 경우 GOT 및 GPT가 각각 25 내지 27 IU/dl인데 반해 사염화탄소 처치군은 각각 70 내지 100 IU/dl로 나타나서 사염화탄소 처리에 의한 간손상 상태가 확실하게 나타났다. 이런 상태의 실험동물에 비교약물인 silymarin을 투여할 경우 GOT치는 37.3, 그리고 GPT치는 40.1로 확실한 감소(정상치에 근접)를 나타내어 사염화탄소에 의한 간손상을 상당히 회복시켰음을 알 수 있다. 그러나 천련자로부터 분리된 두

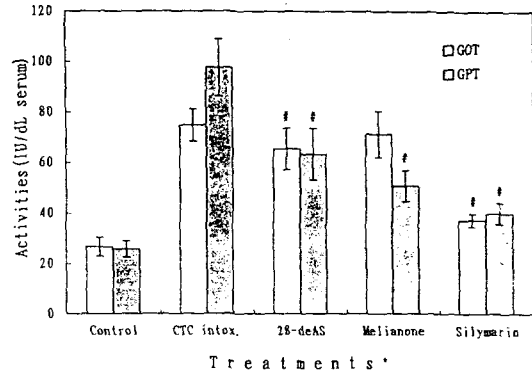


Fig. 3. Effects of the Components of Meliae toosendan Fructus and Silymarin on the Variation of Aminotransferase Activities in the Serum of Rats. Four (for isolated compounds) or six rats of each group were administered with sample orally for three days. Control group was given vehicle only. #: Significantly different from CCl_4 (CTC) intoxicated group by student-t test as $P < 0.05$.

화합물의 경우, GOT 및 GPT치가 각각 65~70 및 50~65 IU로써, 통계적 유의성은 있으나 감소현상이 미약하였다.

결론

천련자는 한방에서 간기능 보호약으로 사용되고 있어 그 작용양식과 유효성분을 구명하고 효능을 검증하기 위하여 클로로포름 분획에서 1종의 테르페노이드계 물질(melianone)과 1종의 limonoid계 물질(28-deacetylSENDANIN)을 분리하고 일련의 실험을 진행한 결과, 간약물 대사계에 미치는 영향으로는 hexobarbital 수면시간 및 strychnine 사망을 시험에서 사염화탄소 중독군에 비해 증강작용은 있었으나 정상상태 까지 이르지 못하는 못했으며, 담즙분비 촉진작용도 어느 정도 인정되었으나(대조군의 123.8%), 비교약물인 phenobarbital의 효과에는 미치지 못했다. 또한 혈중 aminotransferase 활성 측정실험에서는 분리된 화합물의 경우, GOT 및 GPT치가 각각 70 IU 내외 및 60 IU 내외로 사염화탄소 중독으로 인해 증가된 활성의 감소현상 역시 클로로포름 분획에서 예상된 것 만큼 현저하지는 않음을 알 수 있었다. 따라서 클로로포름 분획에서 나타난 현저한 효과를 확인하기 위해서는 계속 분리

중인 성분의 효능을 비교 검토할 필요가 있는 것으로 판단된다.

인용문헌

1. 中國醫學科學院藥物研究所等編(1962) 中約誌. 第3冊, 第2版, 162-167. 人民衛生出版社, 北京
2. 江蘇新醫學院編(1977) 中約大辭典, 上冊, 第1版, 232-234. 上海科學技術出版社, 上海.
3. 김부생 · 최종원 · 이정규(1993) 천련자 추출물이 간기능에 미치는 영향 (I)-천련자의 분획이 약물대사효소계 및 담즙분비에 미치는 영향. 생약학회지 24: 63-68
4. Chang, I-M., Ryu, J.C., Park, Y.C., Yun(Choi), H.S. and Yang, K.H. (1983) Protective activities of aucubin against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Drug and Chem. Tox.* 6: 443-453.
5. Woo, W.S., Shin, K.H., Kim, I.C. and Lee, C.K. (1978) A survey of the response of Korean medicinal plants on drug metabolism. *Arch. Pharmac. Res.* 1: 13-19.
6. Sudoh A., Yusana. S., Umezu, K. and Saitoh, T. (1986) *Folia Pharmacol. Japon* 87: 265-27.
7. Reitman, S. and Frankel, S. (1986) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *A. J. Clin. Pathol.* 28: 56-60.
8. Kim, Y.H., Hwang, B.Y., Kim, S.E., Kim, H.M., Oh, G.T., Ro, J.S., Lee, K.S. and Lee, J.J. (1994) The cytotoxic limonoid from the fruits of *Melia toosendan*. *Yakhak-Hoeji* 38: 6-11.
9. Polonsky, J., Varon, Z., Marazano, C., Arnoux, B., Pettit, G.R., Schmid, J.M., Ochi, M. and Kotsuki, H. (1979) The structure of amorastaton and the cytotoxic limonoid 12-hydroxyamoorastaton. *Experientia* 35: 987-989.
10. Nakanishi, T., Inada, A., Nishi, M., Miki, T., Hino, R. and Fujihara, T. (1986) The structure of a new natural apoticallane-type triterpene and the stereochemistry of the related terpenes. *Chem. Lett.* 69, cited from Ref. 8.

(1996. 3. 5. 접수)