

단풍취로부터 분리한 Apigenin 7-O-β-D-glucoside가 알콜대사효소에 미치는 영향

문형인* · 지옥표 · 신말식¹

성균관대학교 약학대학 생약학연구실, ¹전남대학교 식품영양학과

초 록 : Sprague-Dawley계 수컷랫트에 단풍취로부터 분리한 화합물을 경구투여하고 혈청 ethanol농도와 간의 ADH 활성에 미치는 효과를 검토한 결과 알코올대사를 촉진시키는 성분은 apigenin 7-O-β-D-glucoside로 확인되었다.(1999년 1월 15일 접수, 1999년 2월 11일 수리)

서 론

단풍취(*Ainsliaea acerifolia*)는 산야에서 흔히 자라는 국화과의 다년초로서 취나물류에 해당되고 있으며 어린순을 식용으로 한다.¹⁾ 정상적인 상태에서 소량의 알코올을 섭취할 경우 간장세포내로 들어온 에탄올은 cytosol내의 알콜탈수소효소(alcohol dehydrogenase, ADH)와 알데히드탈수소효소(aldehyde dehydrogenase, ALDH)의 작용에 의하여 acetic acid, 이산화탄소 또는 물로 되어 순환계를 통해 간세포밖으로 배설된다.²⁾ 건강한 성인의 경우에 하루의 알콜대사량은 최대 160~180 g 인데 장기적으로 알콜을 섭취할 경우와 다량 음주시에는 알콜성 간장장애를 일으킨다.^{3,4)} 현재까지 알콜대사에 영향을 미치는 성분으로 몇몇 합성의약품의 효과가 보고되어 있으나,^{5,6)} 합성화학물질 자체가 독성 및 부작용을 나타내므로 건강식품으로서 이용이 불가능하여 부작용이 적은 성분을 찾고자 하는 추세에 있다. 그러므로 저자들은 이용 가능한 유효성분을 추적하고자 국내에서 쉽게 얻을 수 있는 산야초 에탄올 추출물의 알코올대사작용을 검색하여 단풍취가 알콜대사작용에 강한 영향을 미치는 연구결과를 보고한 바 있다.⁷⁾ 본 연구에서는 단풍취 활성분획의 성분을 분리하여 알콜대사작용을 측정하였으므로 그 결과를 보고 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 단풍취는 오대산에서 1996년도 6~8월 사이에 채집하였으며, 한국식물자원연구소 식물분류연구실에서 감정하여, 표본(KPRI-96-0731-021)이 보관되어 있으며, 시료는 동결건조한 후, 분말로 만들어 실험재료로 하였다.

기기 및 시약

융점은 Gallenkamp melting point apparatus를 사용하여

찾는 말 : 단풍취, 알코올대사, ethanol농도, ADH활성, apigenin 7-O-β-D-glucoside

*연락처

측정하였으며 UV는 Shimadzu spectrophotometer, IR은 JASCO FT/IR-5300 (KBr disc법)를 사용하였다. ¹H- 및 ¹³C-NMR은 Bruker AMX-400 spectrometer, FAB-MS spectrum은 VG70-VSEQ (VG ANALITICAL, UK)으로 측정하였다. 추출 및 column chromatography용 용매는 1급시약을, 기타 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60 (70~230 and 230~400 mesh, ASTM Art. 7734 and 9385, Merck)을 사용하였고, molecular sieve column chromatography용 packing 물질은 Sephadex LH-20 (Pharmacia)을 사용하였으며, TLC plate는 Kiesel gel 60F₂₅₄ precoated plate (Art. 5715, Merck)를 사용하였다.

추출 및 분리

동결건조한 단풍취의 추출 및 분획은 전보의 방법⁷⁾에 따라 행하였고, 이중 활성분획(AA-E-3) 40 g을 EtOAc-MeOH-H₂O (9:2:0.5)부터 EtOAc-MeOH-H₂O (6:4:5)까지의 혼합용매로 silica gel column chromatography (70~230 Art. 7734, Merck)하여 4개의 소분획 E1-E4를 얻었다. 소분획 E1을 EtOAc-MeOH-H₂O (9:1:0.5)용매로 다시 silica gel column chromatography (70~230 Art. 7734, Merck) 및 Sephadex LH-20 column (MeOH)으로 정제하여 미황색침상결정성 화합물-1 (530 mg)을 얻었고, E3분획을 EtOAc-MeOH-H₂O (9:2:1)용매로 silica gel column chromatography (70~230 Art. 7734, Merck) 및 MeOH용매로 Sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 황색 무정형의 화합물-2 (603 mg)을 분리하였다.

화합물-1

mp 310~313°C; Shinoda test: positive. IR ν_{\max}^{KBr} 3380 (OH), 1676 (C=O), 1608, 1516, 1235 (aromatic C-O)cm⁻¹; UV λ_{\max} (MeOH) 260, 272 303, 376 nm, (+AlCl₃) 274, 353, 462 nm (+AlCl₃/HCl) 272, 302, 360, 426 nm, (+NaOAc) 270, 324, 390 nm, (+NaOAc/H₃BO₃) 264, 336, 396 nm; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 6.25 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 6.50 (1H,

d, $J=2.0$ Hz, H-8), 6.93 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-5'), 7.54 (1H, dd, $J=2.0$ Hz, 8.2 Hz, H- 6'), 7.65 (1H, brs, H-2'), 12.53 (1H, brs, 5-OH). MS m/z (rel. int. %) 302 (M^+ ,100), 153 (A_1+H), 137 (B_2)

화합물-2

mp 310~313°C; shinoda test: positive; molisch test: positive; IR ν_{max}^{KBr} 3407 (OH), 1657 (C=O), 1610, 1516, 1074 (glycosidic C-O) cm^{-1} ; UV λ_{max} (MeOH) 268, 335 nm, (+NaOMe) 250, 268, 300 nm (+AlCl₃) 275, 300, 345, 385 nm (+AlCl₃/HCl) 276, 299, 343, 348 nm, (+NaOAc) 258, 268, 390 nm, (+NaOAc/H₃BO₃) 269, 340 nm; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5.06 (1H, d, $J=7.0$ Hz, anomeric-H), 6.45 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-6), 6.8 (1H, s, H-3), 6.81 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-8), 6.94 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-3',5'), 7.93 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-2', 6'), 12.91(1H, brs, 5-OH). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), 164.2 (C-2), 103.0 (C-3), 181.8 (C-4), 161.0 (C-5), 99.5 (C-6), 162.8 (C-7), 94.8 (C-8), 156.8 (C-9), 105.3 (C-10), 121.0 (C-1'), 128.4 (C-2'), 115.8 (C-3'), 161.0 (C-4'), 115.8 (C-5'), 128.4 (C-6'), 101.8 (C1-Glc), 73.6 (C2-Glc), 76.1 (C3-Glc), 70.8 (C4-Glc), 77.4 (C5-Glc), 61.7 (C6-Glc). MS (FAB), m/z 433[M+H]⁺.

동물실험

대한실험동물센터로부터 구입한 체중 250~300 g의 Sprague-Dawley(CD strain)계 수컷흰쥐 8마리를 한 군(3반복)으로 실험 24시간전에 절식시키고 신선한 물만 공급하였다. 실험을 실시하기 전에는 urethane (Aldrich Co. USA) 300 mg/Kg씩 복강내에 투여하여 마취시키고, 시료는 0.1% carboxyl methyl cellulose (Sigma Co. USA)에 현탁시켜서 경구투여 하였으며, 30분후에 에탄올을 3 g/Kg의 농도로 경구투여하였다.

알코올 및 간의 ADH 활성의 측정

Ethanol투여 후 1시간대 채혈은 경정맥채혈을 하였으며 1시간 또는 4시간대 채혈은 안와정맥과 경정맥으로부터 채혈하고 4°C에서 3000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈청을 분리한 다음 혈청내 에탄올 함량을 ethanol assay kit (Sigma Co. USA)로 측정하였다. 마지막 채혈이 끝나면 즉시 간을 적출하고 4°C에서 7배액의 0.25 M Sucrose액으로 homogenization하였다. Homogenate는 600×g에서 10분간 원심분리후 상등액을 10,000×g에서 10분간 및 105,000×g에서 1시간 원심분리하여 liver cytosol fraction을 얻고 이를 효소원으로하여 alcohol dehydrogenase (ADH)활성을 측정하였다. 혈청 에탄올함량⁹⁾은 혈청 0.2 ml를 1.8 ml의 trichloroacetic acid로 침전시키고 600×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액의 일정량을 assay kit에 가하여 측정하였다. 에탄올함량은 에탄올 표준품에 대한 분석치를 대조로하여 산출하였다. ADH활성의 측정은 Lebsack 등의 방법⁹⁾에 준하여 0.2 M 에탄올 0.1 ml, 0.5 M semicarbazide 0.02ml, 0.1 M NAD의

0.01 M HCl용액 0.02 ml 및 0.1 M Tris buffer (pH 8.5) 2.0 ml를 혼합 30°C에서 10분간 preincubation한 후 cytosolic enzyme source 0.1 ml를 반응액에 가하여 8분간 340 nm에서의 흡광도 변화를 기록하여 대조군의 측정치와의 비로부터 ADH활성을 산출하였다. 이때 기질인 에탄올을 제외한 공시험군의 값을 제하여 주었으며 Lowry법에¹⁰⁾ 의하여 단백질함량을 측정하였다.

통계처리

실험결과는 각 실험군에서 최고치와 최저치를 제외한 데이터를 $mean \pm S.E.M$ 로 표시하였으며, 각 평균치의 차이는 Student t-test에 의하여 유의성검정을 하였다.

결과 및 고찰

분리된 성분의 구조 결정

화합물-1은 Shinoda test에 양성반응을 나타내었으며, 272, 376 nm의 UV흡수극대화로부터 flavone골격을 가졌음을 예측하였고, shift reagent에 의한 UV 흡수 spectrum의 이동으로부터 flavonoid골격의 3, 5, 7, 3', 4'에 유리상태의 OH기가 있음을 알았다.¹¹⁾ ¹H-NMR spectrum의 δ 6.93, 7.54, 7.65 ppm에서 각각 flavonoid B ring의 'H에 해당하는 signal이 나타나는 것으로 보아 3', 4'위치에 OH기가 치환되어 있음을 확인할 수 있었다. MS spectrum에서도 m/z 302의 분자량과 (A_1+H)이온이 153, (B_2)이온이 137에서 강하게 나타나 본 화합물을 quercetin¹²⁾으로 확정하였다.

화합물-2는 녹는점이 310~313°C이고, Shinoda test와 Molisch test에서 양성이며, IR spectrum에서 3407 cm^{-1} 에서 OH, 1657 cm^{-1} 에서 C=O, 1610 cm^{-1} 에서 aromatic C=C, 1074 cm^{-1} 에서 glycosidic C-O가 나타나므로 flavonoid glycoside로 추정하였으며, UV spectrum에서 NaOMe, AlCl₃의 shift

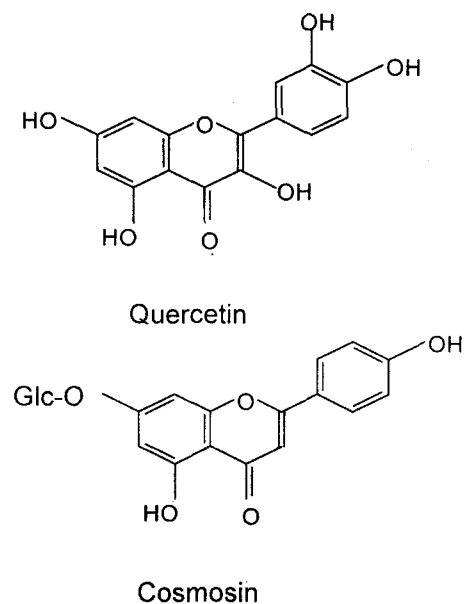


Fig. 1. Structures of compound-1 (upper) and compound-2 (lower).

reagent 첨가시 band 1과 band 2가 bathochromic shift하는 양상으로 보아 aglycon은 flavone 구조로 추정되었으며, NaOAc첨가시 band 2의 변화가 없으므로 7번 위치에는 free OH가 없는 것으로 추정되었다. ¹H-NMR spectrum에서 A ring의 H-6, H-8에 기인하는 meta coupling ($J=1.8$ Hz)을 하고 있는 2개의 doublet가 각각 δ 6.45과 6.81 ppm에서 나타나고 있으며, δ 6.94, 7.93 ppm에서 각각 flavonoid B ring의 ortho coupling ($J=8.7$ Hz)을 하고 있는 2개의 doublet가 나타나고, δ 6.80 ppm에서 H-3의 singlet이 12.91 ppm에서 5-OH의 signal이 나타나며, 5.06 ppm에서 하나의 anomeric proton peak가 나타나는데 coupling constant 치가 $J=7.0$ Hz로 β -configuration하고 있음을 알 수 있었다. FAB-MS spectrum에서도 m/z 433에서 $[M+H]^+$ 의 peak가 나타났으며, ¹³C-NMR spectrum에서도 101.8 (C1-Glc), 73.6 (C2-Glc), 76.1 (C3-Glc), 70.8 (C4-Glc), 77.4 (C5-Glc), 61.7 (C6-Glc)의 peak는 β -D-glucopyranoside의 문헌치¹⁰⁾와 잘 일치하였으며, 이상의 결과와 기존 문헌의 비교로부터 화합물-2는 apigenin 7-O- β -D-glucoside인 cosmosin¹¹⁾으로 동정 하였다.

화합물 투여 랫트의 혈청 에탄올농도와 간의 ADH활성에 미치는 효과

약 270 g전후의 Sprague-Dawley계 수컷랫트에 생리식염수와 분리된 성분을 경구투여하고 혈청 에탄올농도와 간에서 분리한 ADH활성에 미치는 효과를 검색 추적하여 Table 1에 표시하였다. 랫트에 단풍취의 에탄올 가용부(AA-E-3), 화합물-1과 -2를 경구투여하고 30분후에 에탄올을 투여한 다음, 1시간만에 경정맥에서 채혈하여 에탄올함량과 cytosol의 ADH활성을 측정된 결과, 단풍취의 에탄올 가용부(AA-E-3)는 대조군에 비해 각각 44.0%의 혈청 에탄올함량의 감소를 보였으며, 에탄올 투여로 감소된 간의 ADH활성이 각각 158%로 회복됨을 관찰하였다. 화합물-1의 경우에는 농도에 상관없이 활성에 영향을 주지않았으며, 화합물-2의 경우에는 100, 50, 25 mg 투여의 경우 대조군에 비해 65.6, 58.3, 5.3%의 혈청 에탄올함량의 감소를 보였고, 에탄올 투여로 감소된 간의 ADH활성도 각각 220, 200, 105%로 회복됨을 관찰하였다. 또한 투여량에 있어서 50 mg에서 25 mg으로 양을 줄일 경우 활성이 거의 없어지는

Table 1. Effects of compounds isolated from *Ainsliaea acerifolia* on the ethanol concentration of rat serum and on the activity of hepatic alcohol dehydrogenase (ADH)

Treatment	Dose (mg/Kg, P.O)	Ethanol (mM)	ADH activity (nmol/min/mg prot)
Control	0.1% CMC	14.8±3.4	9.8±1.3
Fr. AA-E-3	300 ¹⁾	8.3±1.4* (44.0%)	15.5±2.1** (158%) ²⁾
Control	0.1% CMC	16.4±2.3	10.0±1.1
compound-1	100	14.3±1.2* (12.9%)	11.3±1.4* (113%)
	50	14.6±1.5 (11.0%)	10.9±1.9* (109%)
	25	16.5±1.8 (-1.0%)	10.3±2.1 (103%)
Control	0.1% CMC	15.1±1.3	9.7±1.5
compound-2	100	5.2±1.8* (65.6%)	21.4±0.8** (220%)
	50	6.3±1.2* (58.3%)	19.4±1.5* (200%)
	25	14.3±1.5 (5.3%)	10.2±1.3 (105%)

Rats were orally administered with extracts (suspended in 0.1% CMC) at 30 min before ethanol treatment (3 g/Kg, P.O). Ethanol concentration in serum and ADH activity in liver cytosol fraction at 1hr after ethanol administration were estimated.

¹⁾The dose of the test extracts: mg/Kg of plant dry wt. equivalent.

²⁾Percent of the control, significantly different from the control: *P<0.1, **P<0.05.

Table 2. Effects of isolated compounds from *Ainsliaea acerifolia* on rat serum ethanol concentration and on hepatic alcohol dehydrogenase (ADH) activity

Treatment	Dose (mg/Kg, P.O)	Ethanol		ADH activity (nmol/min/mg prot)
		1 hr	4 hr	
Control	0.1% CMC	100	100	10.4±1.3
Fr. AA-E-3	300 ¹⁾	43.7**	23.5*	16.8±1.9* (161%) ²⁾
Control	0.1% CMC	100	100	9.4±0.8
compound-1	100	92.4*	93.5*	10.2±1.6* (108%)
	50	92.8	92.6*	10.8±1.8* (114%)
	25	98.5**	98.8**	10.5±1.9* (111%)
Control	0.1% CMC	100	100	10.3±2.8
compound-2	100	30.4**	17.9**	21.4±1.5** (207%)
	50	37.6*	21.9*	19.7±1.7* (191%)
	25	95.6	93.9*	11.3±1.5* (109%)

Rats were orally administered with extracts (suspended in 0.1% CMC) at 30 min before ethanol treatment (3 g/Kg, P.O). Ethanol concentration in serum and ADH activity in liver cytosol fraction at 1hr and/ or 4hr after ethanol administration were estimated.

¹⁾The dose of the test extracts: mg/Kg of plant dry wt. equivalent.

²⁾Percent of the control, significantly different from the control: *P<0.1, **P<0.05.

결과를 나타내었다.

화합물 처리분획 투여 랫트의 시간적인 혈청 Ethanol농도와 간의 ADH활성 미치는 효과

동일한 랫트의 혈청 에탄올 농도의 시간적인 변화를 관찰하기 위하여 에탄올투여 후 1시간과 4시간에 안와정맥으로부터 채혈하여 에탄올함량을 대조군의 에탄올함량과 비교하고, 4시간에 랫트를 희생하여 간의 cytosol ADH의 활성을 측정된 결과 Table 2에서 보는바와 같이 AA-E-3분획의 경우 1시간후에 56.3%, 4시간후에 76.5%의 혈중 에탄올함량의 감소를 보이며, 간의 cytosol ADH 활성 또한 161%의 효소활성증가를 나타내어 혈중 에탄올함량의 감소효과와 부합하였다. 화합물-1의 경우에는 시간적인 변화에도 농도에 상관없이 활성에 영향을 주지 않았으며, 화합물-2의 경우에는 100, 50, 25 mg 투여의 경우 대조군에 비해 1시간후에 각각 69.6, 62.4, 4.4%, 4시간후에 각각 82.1, 78.1, 6.1%의 혈청 에탄올함량의 감소를 보였으며, 이와 부합되게 에탄올투여로 감소된 간의 ADH활성이 각각 207, 191, 109%로 회복됨을 관찰하였다.

참고문헌

- Lee, T. B (1983) Illustrated Flora of Korea. 733, Hyang Mun sa, Seoul, Korea.
- Lieber, C. S. (1984) Alcohol and the liver. *Hepatology*. **4**, 1243-1260.
- Nicholls, R., Jersey, J., Worall, S. and Wilce, P. (1992) Modification of protein and other biological molecules by acetaldehyde; Adduct structure and functional signification. *Int. J. Biochem.* **24**, 1899-1906.
- Von burg, R. and Stoul, T. (1991) Toxicology update; Acetaldehyde. *J. Appl. Toxicol.* **11**, 373.
- Gabuzda, G. J. (1958) Fatty liver in man and the role of lipotropic factors. *Am. J. Clin. Nutr.* **6**, 280-297.
- Rubin, E. and Lieben, C. S. (1968) Hepatic microsomal enzymes in man and rats: Induction and inhibition by ethanol. *Science* **162**, 690-691.
- Moon, H. I., Zee, O. P., Mun, S. H. and Shin, M. S. (1998) Effect of *Ainsliaea acerifolia* fraction extraction alcohol dehydrogenase activity. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**(6), 447-450.
- Sigma. (1997). Diagnostic kits and reagents., p. 2405, USA.
- Lebsack, M. E., Peterson, D. R. and Collus, A. C. (1977) Preferential inhibition of the low km aldehyde dehydrogenase activity by pargyline. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 1151-1154.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. L. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Marby, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1970) The Systematic identification of Flavonoids, pp. 33-61. Springer-Verlag, New York.
- Kim, J. S. (1995). Antioxidant compound from *Aralia continentalis*. Seoul Women's University, Ph.D Thesis, Seoul.
- Agrawal, P. K. (1989) Carbon-13-nmr of flavonoid. pp 318-319. Elsevier, New York.

Effects of Compounds Isolated from *Ainsliaea acerifolia* on the Hepatic Alcohol Dehydrogenase Activity

Hyung-In Moon*, Ok-Pyo Zee and Mal-Shick Shin¹(*Pharmacognocny Lab, Department of Phramacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746; ¹Department of Food and Nutrient, Chonnam National University, Kwangju 550-757, Korea*)

Abstract : Effects of compounds isolated from *Ainsliaea acerifolia* on alcohol metabolism in rats were examined and the results were as follows: Apigenin 7-O-β-D-glucoside, after a single oral administration to rats, was found to cause a significant decrease in the serum ethanol concentration as well as enhancement of liver cytosolic alcohol dehydrogenase(ADH) activity.

Key words : *Ainsliaea acerifolia*, liver cytosolic ADH activity, alcohol metabolism, blood ethanol concentration, apigenin 7-O-β-D-glucoside

*Corresponding author