

석이종 오르시놀 정량 및 급성독성

최혁재 · 김남재[#] · 김동현*

경희대학교 동서의학연구소, *약학대학

(Received January 5, 2001; Revised April 16, 2001)

Quantitative Analysis of Orcinol and Acute Toxicity of *Gyrophora esculenta*

Hyuck-Jai Choi, Nam Jae Kim[#] and Dong-Hyun Kim*

East-West Medical Research Institute and

*College of Pharmacy, Kyung-Hee University, Seoul 130-702, Korea

Abstract – In previous study, *Gyrophora esculenta* showed significant inhibitory effect on α -glucosidases *in vitro* and blood glucose elevation *in vivo*. In the isolating process of active substance, orcinol was separated from *Gyrophora esculenta*. Orcinol is known to be toxic, therefore, in this study, it was analyzed by the TLC densitometry method for quantitative determination from *Gyrophora esculenta*. The average amount of orcinol of *Gyrophora esculenta* was 0.2%. For the purpose of removing orcinol, the water extract of *Gyrophora esculenta* was sequentially fractionated by organic solvents, and the acute toxicity of each fraction was assessed in mice. Among them, the LD50 of butanol fraction was 1.19 g/kg(p.o.) and the weight increase of mice in that group was somewhat retarded.

Keywords □ *Gyrophora esculenta*, orcinol, TLC densitometry, acute toxicity

석이(*Gyrophora esculenta*)를 비롯한 지의류(lichen)는 dibenzofuran 골격을 지닌 usnic acid, isousnic acid 등과 phenol carbonic acid 골격을 지닌 depside, depsidone 등과 같은 특이한 대사산물을 산생하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 특히 석이에는 gyrophoric acid, lecanoic acid, orsellinic acid, orcinol, orsellinic acid methyl ester 등이 분리보고되어 있다.²⁻⁷⁾

석이는 식용은 물론 한약재로 사용되고 있으며,^{3,8)} 석이의 수용성 고분자 물질의 항암작용,⁹⁾ orcinol, lecanoic acid 등의 phospholipase A₂ 저해활성,^{6,7)} 석이 물추출물의 항돌연변이원성 효과¹⁰⁾가 보고되어 있다. 그리고, 저자 등은 천연물로부터 항당뇨활성물질을 추구하고자 하는 일련의 연구를 통하여 석이 물추출물

이 α -glucosidase 저해활성과 항당뇨효과가 있음을 보고한 바 있다.^{11,12)}

반면에 석이를 식용으로 사용하는 경우 물에 충분히 담갔다가 사용하도록 하고 있으며, 이러한 것은 석이 중에는 비교적 독성이 강한 orcinol을 비롯한 phenol 성 화합물이 함유되어 있어 이를 제거하기 위한 것으로 보인다. 그러므로, 석이를 안전하게 사용하고 유용성을 확보하기 위해서는 orcinol 등 독성물질을 제거하는 것이 필요하다고 생각된다.

따라서, 석이로부터 항당뇨활성을 추구하고 보다 안전하고 유효하게 이용하기 위한 연구의 일환으로 석이 물추출물의 경구투여시 급성독성을 검토하였다. 그리고, 석이 중에 비교적 다량으로 함유되어 있고 독성이 있는 것으로 알려진 orcinol의 정량법을 설정하고, 또한 항당뇨활성을 지닌 수용성 분획에서 orcinol의 제거법을 설정하여 그 결과를 보고한다.

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-958-9530 (팩스) 02-966-2801

실험방법

실험재료 및 검액의 조제 - 본 실험에 사용된 석이는 서울특별시 경동시장내 반도상회로부터 구입하여 조말로 하여 사용하였으며, voucher sample은 본 연구소에 보관하고 있다.

검액의 조제는 전보¹¹⁾에 준하였다. 즉, 석이를 물로 가열추출하여 여과하여 얻은 여액을 감압농축하고 이를 동결건조하여 갈색의 건조물(이하 Sample-I)을 얻었다. 동결건조한 석이 물추출물을 아세톤이 70%가 되게 하여 침전시킨 뒤 여과한 여액을 감압농축하고 이를 동결건조하여 얻은 것을 70% 아세톤 가용부(이하 Sample-II)로 하였다. 이를 다시 물에 녹이고 물포화 부탄올로 분획하고 부탄올층 및 물층으로 각각 분획하고 농축한 다음 동결건조하여 부탄올 분획물(Sample-III)와 물층(Sample-IV)를 얻어 검체로 하였다.

시약 및 기기 - 본 실험에 사용한 주요 시약은 orcinol(Sigma Co. U.S.A.), 에텔(Showa, Japan), 메탄올(Kanto Chemical Co. Japan), 아세톤(Yakuri Pure Chemicals Co. Japan), 에칠 아세테이트(Yakuri Pure Chemicals Co. Japan), TLC plate(Merck. Germany) 등이며, 기타 분리 및 분석용 시약은 1급 시약을 사용하였다. 실험에 사용한 기기로는 waterbath(Lab-line Instruments Inc. Equatherm[®], U.S.A.), sonicator(Eyela Co., XL 2020, Japan), rotary vacuum evaporator(Eyela Co., NE-1, Japan), TLC scanner(Shimadzu, CS-9000, Japan) 등이 있다.

실험동물 - 본 실험에서 사용한 실험 동물은 중앙동물에서 구입한 ICR계의 체중 20 g 전후의 웅성 및 자성 생쥐와 200 g 전후의 Spargue-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였고, 사료는 삼양유지(주)의 소동물용 고형사료를 사용하였고, 물은 상수를 사용하여 충분히 공급하면서 실험실 환경에서 2주간 순응시킨 후 사용하였다. 특별히 명시하지 않는 한 실험은 24±2°C, 습도 60%의 온도, 항습 장치가 되어 있는 실험실내에서 실시하였다.

TLC densitometry 법에 의한 orcinol의 정량

TLC 분석 조건 - 시료 각 5 µl씩을 pre-coated TLC plate에 spot하여 전개용매 CHCl₃:메탄올(10:1)를 사용하여 상법에 따라 TLC를 행한 후, 황산바닐린 시약을 분무하여 105°C에서 2분간 가열하여 발색시켰

다. 발색된 plate를 530 nm에서 zig-zag TLC scanning을 행하여 peak area를 구하였다.

정량조건의 검토

추출 용매의 선정 - 분쇄한 시료 3 g을 정밀히 취하여 에텔, 에칠아세테이트, 아세톤, 메탄올 각각 60 ml씩을 가하여 2시간 동안 환류 추출한 다음, 온시에 여과하였다. 이와 같은 조작을 1회 반복하여 얻은 여액을 감압농축하여 정확하게 50 ml가 되도록 하여 검액으로 하였다.

추출 시간 및 추출횟수의 검토 - Orcinol 추출률이 양호한 용매인 메탄올을 선정하여 분쇄한 시료 3 g을 정밀히 취하여 메탄올을 60 ml씩 가한 다음 각각 1시간, 2시간, 3시간 동안 각각 환류 추출하였다. 온시에 여과한 여액을 감압농축하고 메탄올을 가하여 정확하게 50 ml가 되도록 하여 orcinol 측정용 검액으로 하였다. 그리고, 가장 효율이 좋은 추출횟수의 검토를 위해 위의 1시간, 2시간, 3시간 동안의 각 시간대마다 각각 1회, 2회 및 3회 추출하고 각 추출횟수에서 얻은 여액을 감압농축하고 메탄올을 가하여 정확하게 50 ml가 되도록 하여 orcinol 측정용 검액으로 하였다.

표준액의 조제 및 검량선 작성 - Orcinol 5 mg을 정밀히 취하고 메탄올을 가하여 녹이고 정확하게 10 ml로 하여 orcinol 스톡 용액으로 하였으며, 이를 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mg/ml 농도가 되도록 희석하여 사용하였다. 각 농도의 표준용액 5 µl씩을 취하여 TLC를 행한 후, zig-zag scanning을 실시하여 얻은 chromatogram으로부터 면적을 구한 후 이들 면적과 표준용액의 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하였다.

회수율 시험 - 석이 시료 3 g에 orcinol 15 mg 및 30 mg을 각각 가하고 이하 석이 중 orcinol의 정량조작과 동일하게 실시하여 orcinol 함량을 구하여 회수율을 산출하였다.

석이 중 orcinol의 함량 - 위에서 조제한 각 검액을 TLC densitometry법에 따라 얻은 chromatogram으로부터 orcinol peak 면적을 구하여 회귀직선 방정식으로부터 각각의 orcinol함량을 구하였다.

석이 물추출물 중 orcinol의 정량 - 석이 물추출물의 각 분획물 100 mg을 정밀하게 취하여 메탄올에 녹여 정확하게 50 ml가 되도록 한 다음 이하 석이 중 orcinol의 정량조작과 동일하게 실시하여 orcinol 함량을 구하였다.

Orcinol 제거에 따른 maltase 저해 활성

석이 물추출물의 70% 아세톤 가용부 동결건조물을 물에 녹이고 각각 에틸 및 부탄올로 3회 추출하여 유기용매 층(orcinol 함유층)을 제거한 후의 물분획물을 동결건조하고 maltase 저해 활성을 전보¹¹⁾에 준하여 측정하여 비교관찰하였다.

급성독성 시험¹³⁾

군분리 및 투여용량 설정 - 순화기간 중 건강하다고 판정되는 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중이 비슷한 개체를 선택하여 1군당 암수 각각 5마리로 무작위법을 이용하여 군분리를 실시하였다. 투여용량의 설정은 예비시험결과를 토대로 하여 경구투여할 수 있는 최대용량을 5 g/kg으로 하여 이것을 최고용량군으로 설정하고 일정 공비 0.6으로 5개의 용량군과 대조군을 설정하였다. 그리고, 부탄올분획 투여군은 예비시험에서 2.5 g/kg의 투여 용량을 전후로 하여 100% 사망하였으므로 한단계 고농도인 4.17 g/kg의 용량을 최고 용량군으로 하여 역시 공비 0.6으로 6개의 용량군을 설정하였다.

검액의 투여 - 모든 실험 동물을 5시간 동안 절식시킨 뒤, 경구용 존데를 이용하여 각 검액을 경구로 투여하였다. 투여 용량은 투여 직전 체중에 따라 산출하였다.

임상증상관찰 - 모든 시험동물에 대한 임상증상관찰 및 사망동물수는 약물투여직후부터 6시간 동안은 매 시간 마다 관찰하였으며, 투여 익일부터 2주간은 1일 1회씩 동물의 일반상태의 변화, 중독증상 및 사망유무를 관찰하였다.

체중측정 - 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여 직전과 투여 6일 및 14일에 체중을 측정하였다.

부검 - 시험종료 후 동물의 체중을 측정한 후 모든 생존 동물을 에틸로 마취하고 탈골시켜 치사 시킨 후 육안적으로 외관 및 내부장기의 이상 유무를 관찰하였다. 도중 폐사 동물에 대해서도 같은 방법으로 검사하였다.

LD₅₀ 산출 - LD₅₀치의 산출에는 Behrens-Karber법¹⁴⁾을 이용하였다.

실험결과 및 고찰

석이중 orcinol의 정량 - 석이로부터 분리된 독성을

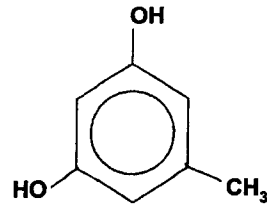


Fig. 1 - Structure of orcinol.

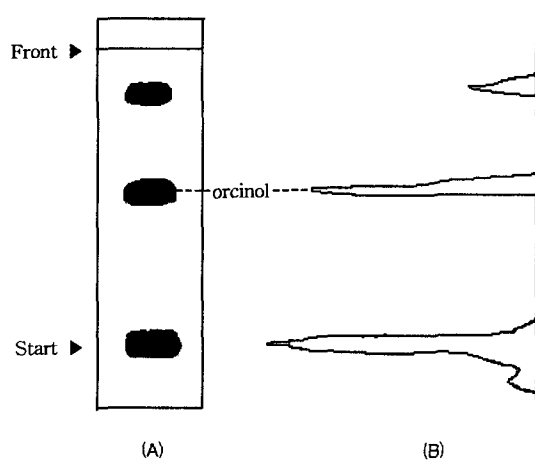


Fig. 2 - TLC pattern(A) and Zig-zag TLC profile of orcinol(B) of MeOH extract of *Gyrophora esculenta*. TLC condition was as follows; developing solvents; CHCl₃ : MeOH(10:1), coloring reagent; H₂SO₄-vanillin reagent (105°C, 3 min.), IR; 530 nm.

나타내는 물질의 하나로 생각되는 orcinol(Fig. 1)의 함량을 구하기 위하여 우선 다양한 시료를 용이하게 처리할 수 있고 비교적 간단하게 정량이 가능한 TLC densitometry법을 이용하였다. 표준품 orcinol을 지표 물질로 하여 CHCl₃ : 메탄올(10:1)을 전개용매로 하여 상법에 따라 TLC를 행하고 발색제로 황산바닐린 시액을 분무하여 105°C에서 3분간 가열시켜 발색시켰다. 발색된 silica gel plate를 530 nm에서 zig-zag TLC scanning한 결과 Fig. 2와 같은 chromatogram을 얻을 수 있었으며, spike test 결과 Rf치가 0.43에서 나타나는 peak가 orcinol과 일치함을 알 수 있었다.

표준물질 orcinol을 사용하여 peak 면적과 농도와의 관계로부터 검량선을 작성하여 Fig. 3에 제시하였으며, 검량선과 같이 0.1~0.5 mg/ml의 농도범위내에서 orcinol의 분석이 가능하였으며 이때 회귀직선 방정식은 $y=880189x+7862.9(r=0.9985)$ 로 매우 양호한 직선성이 인정되었다.

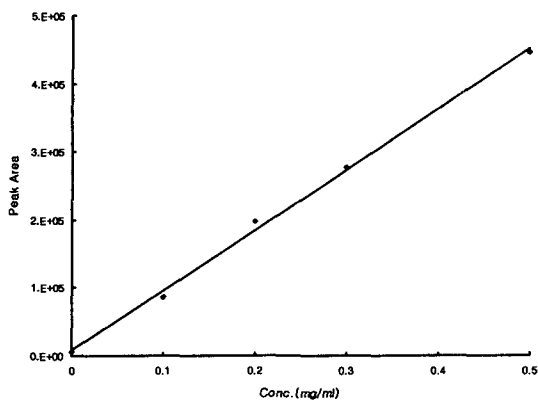


Fig. 3 - Calibration curve for orcinol by TLC densitometry ($y=880189x+7862.9$, $r=0.9985$). TLC condition was as follows; developing solvents; CHCl_3 : MeOH (10:1), coloring reagent; H_2SO_4 -vanillin reagent (105°C , 2 min.), λR ; 530 nm

Table I - Orcinol contents from *Gyrophora esculenta* by several organic solvents

Solvents	Orcinol content(%)
Ether	$0.019 \pm 1.5\text{E}^{-3}$
EtOAc	$0.018 \pm 2.6\text{E}^{-3}$
Acetone	$0.022 \pm 7.5\text{E}^{-3}$
MeOH	$0.201 \pm 3.6\text{E}^{-3}$

Orcinol content was analysed by the TLC densitometry as seen as in Fig. 2

Each number expressed as mean \pm SD of triplicates.

석이로부터 orcinol 정량법을 설정하고자 우선 추출 용매를 선정하기 위하여 에틸, 에칠아세테이트, 아세톤 및 메탄올을 사용하여 추출하여 정량한 바 에틸, 에칠아세테이트 및 아세톤 추출시 orcinol의 함량은 0.018~0.022%에 불과하였으나 메탄올을 추출용매로 사용한 경우에는 0.2%로 약 10배 이상 높은 추출률이 인정되었다(Table I). 따라서, 다음의 추출용매의 량, 추출시간 및 추출횟수 등의 검토에서는 추출용매로 메탄올을 사용하였다.

추출용매의 량 검토에서는 시료 채취량의 10배, 20배 및 30배량의 메탄올을 가하고 2시간 동안 환류추출한 바 각각 0.19%, 0.22%, 0.22%로 20배와 30배량을 가한 경우 거의 유사한 orcinol 함량을 나타내었다(Table II). 그리고, 석이의 메탄올 추출시 추출시간을 검토하기 위하여 1, 2 및 3시간 동안 추출하여 orcinol을 정량한 바 2시간과 3시간 추출한 경우 별다른 차이가 인정되지 않아 추출시간은 2시간이 타당한

Table II - Effects of volume ratio of MeOH in orcinol quantification from *Gyrophora esculenta*

Volume ratio	Orcinol content(%)
1:10	$0.19 \pm 2.7\text{E}^{-2}$
1:20	$0.22 \pm 1.0\text{E}^{-2}$
1:30	$0.22 \pm 1.7\text{E}^{-2}$

Orcinol content was obtained by the TLC densitometry as seen as in Fig. 2.

Each result was expressed as mean \pm SD of triplicates.

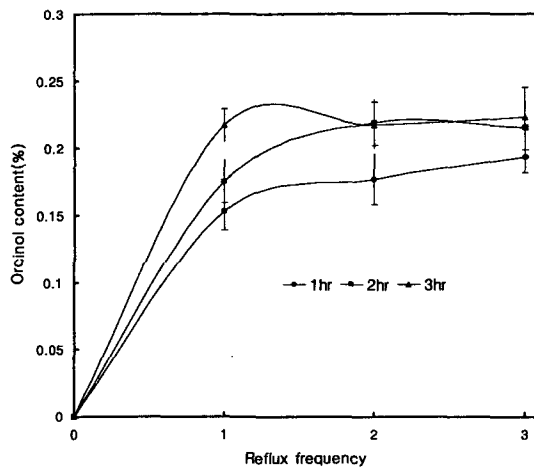


Fig. 4 - Effects of reflux time and reflux frequency in orcinol quantification from *Gyrophora esculenta*. Ratio of *Gyrophora esculenta*: MeOH=1:20. Orcinol content was obtained by the TLC densitometry as seen as in Fig. 2. Each result was expressed as mean \pm SD of triplicates.

것으로 생각된다. 또한 추출횟수를 검토하기 위하여 각 시간별로 1회, 2회 및 3회 추출하였을 경우 2회와 3회 추출시 추출된 orcinol의 함량은 거의 일치하여 이하의 실험에서는 2회 추출하도록 하였다(Fig. 4). 이상의 결과로부터 석이에 함유된 orcinol을 정량하기 위한 조건으로는 용매로 메탄올, 용매량은 약 20배, 추출시간은 2시간, 추출횟수는 2회로 설정하여 이하의 실험을 실시하였다.

Orcinol의 회수율을 검토하기 위하여 석이 3g에 orcinol 표준품 15mg 및 30mg을 각각 가하고 TLC densitometry법에 따라 orcinol을 정량하였을 때 회수율이 96.6%로 양호한 회수율을 보여 석이 중의 orcinol 정량법으로 하였다(Table III). 따라서, 석이 중에 함유된 orcinol의 함량을 정량한 바 약 0.2% 이었다.

전보¹¹⁾에서 석이로부터 α -glucosidase 저해활성을

Table III – Recovery rate of orcinol from *Gyrophora esculenta*

Groups	Orcinol content of <i>Gyrophora esculenta</i> (mg/3 g)	Added orcinol (mg)	Theoretical content of orcinol (mg)	Actual content of orcinol (mg)	Recovery rate of orcinol (%)
1	6.6	15	21.6	22.2 ± 2.7	97.3 ± 12.2
2	6.6	30	36.6	35.1 ± 2.4	95.9 ± 6.8
Average					96.6

Orcinol standard material was added into the MeOH extract of *Gyrophora esculenta*. Each value of actual recovery was expressed as mean ± SD of triplicates.

Table IV – Orcinol contents in subfractions of water extract of *Gyrophora esculenta*

Fractions	Extract yield (%) [*]	Orcinol (%)
<i>Gyrophora esculenta</i>	-	0.2 ± 0.01
Water extract	35.3 ± 4.7	0.6 ± 0.07
70% Acetone supernatant	2.0 ± 0.2	11.1 ± 1.03
70% Acetone precipitate	31.1 ± 1.9	nd
Butanol fraction	0.3 ± 0.1	43.9 ± 2.30
Water fraction	1.5 ± 0.2	nd

^{*}Each number represents extract yield from total weight of *Gyrophora esculenta* and all values were expressed as mean ± SD of triplicates.
nd : not detected

지표로 석이의 물추출물을 분획하여 유효분획 및 유효성분을 분리하여 보고한 바 있다. 따라서, 각각 분획물 중의 orcinol을 정량하고 그 함량과 안전성을 비교 평가하고자 하였다. 우선 석이 물추출액을 동결건조한 것을 모액으로 하고 이를 물을 가하여 녹이고 70%의 농도가 되도록 아세톤을 가하여 아세톤 가용부와 불용부로 분획하였고, 아세톤 가용부를 동결건조하고 이를 다시 부탄올로 분획하여 얻은 부탄올 분획물과 물 분획물을 각각 동결건조하여 검체로 하여 각각의 분획물의 엑스함량과 orcinol의 함량을 구하였다. 그 결과 물추출물, 아세톤 가용부 및 부탄올 분획물과 물층 각각의 엑스함량은 석이를 기준으로 35%, 2.0%, 0.33% 및 1.5%이었고 orcinol의 함량은 각각 0.6%, 11.1% 및 43.9%이었으며, 항당뇨활성이 인정되는 최종 물층에는 orcinol이 검출되지 않았다(Table IV). 따라서, orcinol은 대부분이 부탄올 층으로 이행됨을 알 수 있었다.

이어서, *in vivo* 및 *in vitro*에서 α-glucosidase 및 항당뇨활성을 보인 분획물을 얻고 이를 안전하게 사용하기 위해서는 비교적 독성이 강한 orcinol을 제거할

Table V – Inhibitory effect on maltase by orcinol-removed water fractions of *Gyrophora esculenta*

Fractions	IC ₅₀ (µg/ml)
Water fraction	36.0
Removed by Ether [*]	32.0
Removed by Butanol [*]	20.0
Acarbose	0.61

^{*}Water fraction removed orcinol by organic solvents

필요가 있다. 이에 활성을 나타내는 아세톤 가용부의 동결건조물 중에서 orcinol을 비교적 용이하게 제거하는 방법을 추구하고자 에텔 또는 부탄올을 이용하여 분획하여 각 유기용매 층으로 이행되는 orcinol 함량을 구하였다. 그 결과 에텔 또는 부탄올로 이행하는 orcinol의 함량은 유사하였으며(data not shown), 물층에서는 orcinol이 검출되지 않았다. 따라서, 용매의 유거가 용이한 에텔을 사용하는 것이 비점이 높은 부탄올을 사용하는 것에 비하여 비교적 편리하고 간편한 방법이라고 생각된다.

Orcinol 제거 분획물 maltase 저해 활성

비교적 독성이 있는 orcinol을 제거하기 위하여 아세톤 가용부를 에텔과 부탄올로 분획하여 유기용매 층을 제거한 물층을 동결건조하여 maltase 저해활성을 평가한 바 각각 maltase에 대한 IC₅₀는 에텔 제거시는 32 µg/ml였고, 부탄올로 제거시는 20 µg/ml였으므로, 에텔로 제거시 다소 활성이 감소하였다(Table V). 이는 에텔로 분획추출시 α-glucosidase를 저해하는 물질의 일부가 orcinol과 함께 제거되는 것으로 생각된다.

석이의 급성독성 시험

사망률 및 LD₅₀ - 석이의 활성분획물 및 유효성분을 추구하기 위한 과정에서 얻은 각각의 분획물의 생쥐에서 경구투여시 급성독성을 검토하였다. 그 결과 석이

Table VI – Mortality of ICR mouse orally treated with single dose of each fractions of *Gyrophora esculenta*

Group	Dose (g/kg)	Sex	Days after treatment														Final Mortality	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
Control	-	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Sample-I	0.648	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1.08	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1.8	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	3	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	5	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Sample-II	0.648	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1.08	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1.8	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	3	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	5	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7/5
Sample-III	0.324	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	0.54	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	0.9	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1.5	M	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5
		F	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2/5
	2.5	M	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4/5
		F	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3/5
4.17	M	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5	
	F	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5	
Sample-IV	0.648	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1.08	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1.8	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	3	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	5	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
		F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

All group has five male mice(M) and five female mice(F) and each number represents sacrificed animal.

Sample-I; Water extract of *Gyrophora esculenta*, Sample-II; 70% Acetone supernatant of water extract of *Gyrophora esculenta*
Sample-III; Butanol fraction of 70% acetone supernatant in water extract of *Gyrophora esculenta*, Sample-IV; Water fraction
of 70% acetone supernatant in water extract of *Gyrophora esculenta*

의 물추출액(Sample-I) 및 70% 아세톤 가용부의 부탄을 분획시 물층의 동결건조물(Sample-IV) 각각 경구투여군에서는 각각 관찰기간 내내 검역 투여에 기인한 것으로 보여지는 폐사가 관찰되지 않았다. 70% 아세톤 가용부(Sample-II) 경구투여군에서도 역시 시료에서 원인하는 것으로 보여지는 폐사한 동물은 관찰되지 않았다. 반면에 석이의 물추출물의 70% 아세톤 가용부의 부탄을 분획물(Sample-III) 1.5 g/kg의 경구투여군에서는 투여후 2일 이내에 70%의 사망률을 보였으며, 2.5 g/kg 경구투여군에서도 다음날까지 70%의 사망률을 나타냈고, 4.17 g/kg 경구투여군에서는 투여 당일 모두 사망하였다. 따라서, 생쥐에서 부탄을 분획물의 경구투여시 LD₅₀는 1.19 g/kg이었다(Table VI). 이량을 부탄을 분획에 함유된 orcinol으로 환산하면 orcinol로서 522 mg/kg에 해당하며, 문헌¹⁵⁾에 의하면 흰쥐에서 경구투여시 LD₅₀ 844 mg/kg에 비하여 강한 독성을 보이며, 이는 공존하는 다른 성분이나 또는

중차에 기인하는 것으로 사료된다.

임상 증상 - 석이 물추출액(Sample-I) 및 아세톤 가용부의 물분획(Sample-IV) 각각 투여군에서는 5 g/kg의 최대 경구투여 용량에서도 전체 시험기간을 통해 특이한 임상 증상이 보여지지 않았다. 70% 아세톤 가용부(Sample-II) 투여군에서는 5 g/kg의 용량군에서 활동성이 저하되며, 불안정한 행동을 보이다 30분 후부터 회복되었다. 실험결과는 제시하지 않았지만, 2.5 g/kg의 용량을 복강 투여했을 경우, 5 g/kg의 경구 투여시와 유사한 증상을 나타냈고, 4 g/kg의 용량을 복강 투여했을 시, 상당한 경련 증상을 보이며, 활동성을 상실했다가 약 50분 후부터 회복되기 시작하였다. 부탄을 분획물(Sample-III)을 경구투여하였을 경우에는 5분 이내에 활동력 감소 및 비정상적 보행 등의 이상이 관찰되었으며, 그 발현 시간 및 정도는 용량에 비례하였고, 특히 암컷에서 더 민감한 편이었다. 고농도 투여군 일수록 그 증세가 심해지면서 사망하는 동물이 증가하

Table VII - Clinical signs of ICR mouse orally treated with single dose of each fractions of *Gyrophora esculenta*

Group	Dose (g/kg)	Sex	Severity of symptoms			
			Passivity	Abnormal gait	Palpebral closure	Convulsion
Control	-	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
Sample-I	0.648	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
	1.08	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
	1.8	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
	3	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
	5	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
Sample-II	0.648	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
	1.08	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
	1.8	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
	3	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
	5	M	++	+	-	-
		F	++	+	+	-

Each group has five male mice(M) and five female mice(F) and each mark represents as follows; - : not detected, + : moderate, ++ : severe, +++ : very severe
Sample-I; Water extract of *Gyrophora esculenta*, Sample-II; 70% Acetone supernatant of water extract of *Gyrophora esculenta*

Table VII - Continued

Group	Dose (g/kg)	Sex	Severity of symptoms			
			Passivity	Abnormal gait	Palpebral closure	Convulsion
Sample-III	0.324	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
	0.54	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
	0.9	M	+	+	+	-
		F	+	++	+	-
	1.5	M	++	+	++	++
		F	++	++	++	++
	2.5	M	++	++	++	++
		F	++	++	+++	+++
4.17	M	+++	+++	+++	+++	
	F	+++	+++	+++	+++	
Sample-IV	0.648	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
	1.08	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
	1.8	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
	3	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-
	5	M	-	-	-	-
		F	-	-	-	-

Sample-III; Butanol fraction of 70% acetone supernatant in water extract of *Gyrophora esculenta*, Sample-IV; Water fraction of 70% acetone supernatant in water extract of *Gyrophora esculenta*

였으며, 사망의 빈도는 역으로 수컷에서 더 크게 나타났다. 부탄올 분획물(Sample-III) 2.5 g/kg 이상 경구 투여하였을 경우는 2-3 분내에 급격한 경련성 증상을 보이면서 사망하는 동물이 증가하였으며, 1.5 g/kg의 용량군에서도 심한 경련성 증상을 보였다. 0.9 g/kg의 용량군에서는 경련을 나타내지는 않았으나, 활동성 저하와 비정상적 보행의 증상을 보였으며, 1시간 후에는 거의 회복되었다(Table VII).

체중 변화 - Table VIII에 제시한 바와 같이 석이 물추출액(Sample-I) 및 아세톤 가용부의 물분획(Sample-IV) 각각 경구투여군에서는 시험기간 내내 대조군에 비하여 유의성 있는 체중 변화가 관찰되지 않았으나, 아세톤 가용부(Sample-II) 경구투여군에서는 대조군에 비하여 체중증가억제를 다소 보이다가 14일째에는 정상적인 체중 증가의 회복된 경향을 나타내었다. Orcinol이 이행된 부탄올 분획물(Sample-III) 경구투여군에서는 투여후, 3일 및 6일 후까지도 두드러진 체중 증가 억제 효과를 보이다가 11일 이후 다소 회복되기는 했

으나, 실험기간 내내 전반적인 체중증가억제를 나타냈으며, 특히 2.5 g/kg 경구 투여군에서는 관찰 종료 시점인 투여후 14일째까지도 정상적인 체중 증가를 나타내지 못하였다.

육안적 해부소견 - 실험도중 폐사 동물 및 시험 종료 후 생존 동물 모두의 내부 장기의 이상 유무를 관찰한 결과, 별다른 내부 장기의 이상 소견은 관찰되지 않았고, 부탄올 분획물(Sample-III)의 2.5 g/kg 경구투여군에서 간의 출혈성 반점이 1례 관찰된 것으로 보아 석이의 급성 독성에 의한 장기의 병리적 변화는 거의 없는 것으로 추정할 수 있었다(data not shown).

결 론

본 실험에서는 α -glucosidase저해활성에 의한 항당뇨활성이 인정된 석이의 급성독성과 석이 중에 함유된 orcinol 정량법의 설정 및 석이로부터 orcinol의 제거법을 확립하여 석이의 유용성을 높이고자 하였다.

Table VIII – Body weight changes of ICR mouse orally treated with single dose of each fractions of *Gyrophora esculenta*

Group	Dose (g/kg)	Sex	Days after treatment		
			0	6	14
Control	-	M	20.7 ± 2.3	26.8 ± 3.2	30.7 ± 2.5
		F	22.1 ± 2.4	27.6 ± 3.0	29.1 ± 2.1
Sample-I	0.648	M	20.3 ± 1.5	26.9 ± 2.4	31.5 ± 2.0
		F	18.5 ± 0.9	23.9 ± 1.1	28.3 ± 1.7
	1.08	M	19.9 ± 1.4	25.9 ± 2.1	29.8 ± 3.3
		F	21.3 ± 2.2	28.3 ± 3.5	32.6 ± 3.0
	1.8	M	19.0 ± 1.3	23.4 ± 1.7	27.3 ± 1.8
		F	19.4 ± 2.0	25.2 ± 2.7	29.1 ± 2.2
	3	M	18.9 ± 1.9	22.4 ± 1.8	27.2 ± 1.4
		F	19.7 ± 2.4	24.6 ± 2.4	29.2 ± 3.4
	5	M	21.4 ± 1.7	26.1 ± 2.4	29.3 ± 1.9
		F	20.0 ± 1.3	25.3 ± 1.9	25.1 ± 2.9
Sample-II	0.648	M	20.5 ± 2.1	26.1 ± 2.2	32.4 ± 3.1
		F	21.1 ± 1.1	27.3 ± 2.3	35.8 ± 4.2
	1.08	M	22.0 ± 1.9	27.1 ± 1.1	30.4 ± 2.5
		F	20.8 ± 1.0	25.7 ± 0.7	27.8 ± 2.8
	1.8	M	20.4 ± 2.2	26.4 ± 3.0	30.7 ± 3.2
		F	19.2 ± 1.8	24.8 ± 2.5	27.7 ± 1.2
	3	M	19.7 ± 2.1	24.8 ± 1.5	27.7 ± 2.1
		F	21.1 ± 3.5	27.2 ± 3.3	29.1 ± 2.6
	5	M	22.5 ± 2.7	26.3 ± 2.6	30.1 ± 2.9
		F	21.1 ± 1.1	25.3 ± 1.6	27.1 ± 1.6
Sample-III	0.324	M	23.7 ± 1.0	26.5 ± 1.4	29.7 ± 1.9
		F	23.1 ± 1.3	25.9 ± 1.9	28.9 ± 2.0
	0.54	M	22.2 ± 2.2	25.1 ± 2.3	28.6 ± 1.9
		F	22.8 ± 1.7	26.1 ± 1.3	29.2 ± 2.2
	0.9	M	20.8 ± 1.0	24.8 ± 2.1	29.2 ± 3.5
		F	21.4 ± 1.4	25.6 ± 1.7	30.0 ± 2.8
	1.5	M	20.1 ± 2.2	-	-
		F	19.1 ± 2.1	23.7 ± 1.3 (n=3)*	28.4 ± 2.6
	2.5	M	20.8 ± 1.3	23.5 (n=1)*	25.7
		F	20.4 ± 1.8	22.5 ± 1.7 (n=2)*	25.5 ± 2.6
4.17	M	20.0 ± 1.3	-	-	
	F	19.8 ± 3.1	-	-	

Each result was expressed as meanSD of 5 mice.

Sample-I; Water extract of *Gyrophora esculenta*, Sample-II; 70% Acetone supernatant of water extract of *Gyrophora esculenta*

그 결과 TLC densitometry법을 이용하여 용이하게 석이 중에 함유된 orcinol을 정량할 수 있었으며 석이 중에는 약 0.2%의 orcinol이 함유되었다. 그리고, 석이의 유효성분을 추구하고 위하여 α-glucosidase 저해활성을 지표로 하여 유기용매 분획을 시도하였으며 그

과정에서 orcinol의 이행은 아세톤 가용부의 부탄을 분획에서 43.9%의 orcinol 함량이 검출되어 대부분 부탄 올층으로 이행됨이 인정되었고 효소저해활성이 강한 물 분획에서는 orcinol이 검출되지 않았다. 독성을 나타내는 orcinol을 제거하기 위해서는 에틸, 부탄을 등

Table VIII – Continued

Group	Dose (g/kg)	Sex	Days after treatment		
			0	6	14
Sample-IV	0.648	M	18.2 ± 2.0	23.6 ± 1.5	27.9 ± 2.2
		F	21.2 ± 2.5	26.4 ± 2.0	30.3 ± 3.1
	1.08	M	22.6 ± 2.5	28.3 ± 2.1	31.7 ± 1.4
		F	21.8 ± 1.1	27.3 ± 2.1	30.5 ± 2.7
	1.8	M	20.7 ± 1.8	26.9 ± 2.2	30.9 ± 1.3
		F	22.1 ± 1.4	27.7 ± 1.9	32.1 ± 2.0
	3	M	20.1 ± 2.3	26.7 ± 1.7	29.9 ± 2.1
		F	20.5 ± 2.7	27.1 ± 3.0	30.3 ± 2.7
	5	M	20.4 ± 2.9	27.4 ± 2.5	32.6 ± 2.4
		F	18.6 ± 1.4	25.8 ± 1.1	30.0 ± 2.0

*Number in parenthesis is the number of survived animal at that time.

Sample-III; Butanol fraction of 70% acetone supernatant in water extract of *Gyrophora esculenta*, Sample-IV; Water fraction of 70% acetone supernatant in water extract of *Gyrophora esculenta*

으로 분획하거나 추출하는 것이 가능하였으며, 부탄올로 orcinol을 제거한 물층과 에틸로 제거한 물층의 *in vitro*에서 α -glucosidase 억제활성을 비교하면 에틸을 사용한 경우에 다소 저해활성이 저하됨이 인정되었으나 유기용매의 유거나 사용의 편리성 등을 고려할 때 에틸이 유용한 것으로 생각된다.

석이 물추출물의 안전성을 평가하기 위하여 생쥐에 대한 각 분획물의 경구투여시 급성독성을 검토한 결과 orcinol이 대부분 이행된 부탄올 분획물에서 강한 독성 증상이 인정되었고, LD₅₀는 1.19 g/kg이었다. 이는 부탄올 분획에 함유된 orcinol 양으로 환산하면 522 mg/kg에 해당하며, 따라서 석이 각 분획물의 orcinol 함량과 급성독성과는 상관성이 있음이 인정되었고, 특히 orcinol의 함유량에 비례하여 경련, 비정상적 보행 및 비활동성 등의 독성이 증가하였고, 또한 체중증가 억제가 인정되었다.

감사의 말씀

본 연구의 일부는 경희의료원 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 깊은 감사드립니다.

문헌

- 1) 柴田承二, 糸川秀治, 三川 潮, 庄司順三 編集 : 藥用天然物質. 南山堂. 東京. p. 292 (1982).
- 2) Hong-Yen Hse : *Oriental Materia Medica*. Oriental

Healing Arts Institute. California. p.218 (1986).

- 3) Yamazaki M. and Shibata S. : Biosynthesis of lichen substances. II. Participation of C₁-unit to the formation of β -orcinol type lichen depside. *Chem. Pharm. Bull.* **14**. 96 (1966).
- 4) Monde K., Satoh H., Nakamura M., Tamura M. and Takasugi M. : Organochlorine compounds from a terrestrial higher plant : structures and origin of chlorinated orcinol derivatives from diseased bulbs of *Lilium maximowiczii*. *J. Nat. Prod.* **61**. 913 (1998).
- 5) Endo T., Takahagi T., Kinoshita Y., Yamamoto Y. and Sato F. : Inhibition of photosystem II of spinach by lichen-derived depsides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 2023 (1998).
- 6) 김진우, 송경식, 장현욱, 유승현, 유익동 : *Umbilicaria esculenta*가 생산하는 Depside계 화합물의 구조 및 Phospholipase A₂ 저해활성. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 526 (1995).
- 7) 김진우, 송경식, 유익동, 장현욱, 유승현, 배강규, 민태진 : 석이로부터 분리한 페놀성 화합물이 phospholipase A₂ 저해활성. *The Korean Journal of Mycology* **24**. 237 (1996).
- 8) 上海科學出版社·(株)小學館 編 : 中藥大辭典. 東京. p. 1426 (1985).
- 9) Nishikawa, Y., Tanaka, M., Shibata, S. and Fukuoka, F. : Polysaccharides of lichens and fungi. IV. Antitumour active *O*-acetylated Pustulan-type glucans from the lichens of *Umbilicaria* species. *Chem. Pharm. Bull.* **18**, 1431 (1970).

- 10) 함승시, 김득하, 이득식 : 목이 및 석이 메틸 알콜 추출물의 항돌연변이원성. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 1281 (1997).
- 11) 최혁재, 김남재, 김동현 : 석이에서 분리한 GE974의 α -glucosidase 저해효과. *생약학회지* **31**, 196 (2000).
- 12) 최혁재, 김남재, 김동현 : 석이에서 분리한 GE974의 혈당상승억제효과. *생약학회지* **31**, 268 (2000).
- 13) 채동규 편 : 약사관련법령집(1998년판) -의약품등의 독성시험 기준(식품의약품안전청 고시 제 1998-56호)-. 보건법규사. 서울. p. 1126 (1998).
- 14) 高木敬次郎, 小澤光 編 : 藥物學實驗. 南山堂. 東京. p. 197 (1970).
- 15) Susan, B. : The Merck Index (17th). Merck & Co., Inc.. New Jersey. p. 984 (1989).