

한약재 수처에 관한 연구 (V)

- 갈근의 수처전 · 후 Puerarin의 함량분석 및 시험관내에서 최종당화산물 생성억제 효능 -

김현정 · 김진숙

한국한의학연구원

Abstract

Studies on the Processing of Herbal Medicines (V)

- Quantitative Analysis of Puerarin and Inhibitory Effects on the Formation of Advanced Glycation Endproducts(AGEs) in Vitro of Unprocessed- and Processed Puerariae Radix -

Kim Hyeunjeong, Kim Jinsook
Korea Institute of Oriental Medicine

Advanced glycation end products(AGEs) are largely involved in the pathogenesis of diabetic complications. It is obvious that inhibition of AGEs formation is important in preventing the occurrence and progression of diabetic complications. Therefore, to seek possible AGEs inhibitors in herbal medicines, unprocessed - und processed Puerariae Radix were tested. The inhibitory effect on AGEs formation was slightly increased through processing. Unprocessed-, processed Puerariae Radix and puerarin showed potential inhibitory action than that of positive control, aminoguanidine · HCl.

Key words : Processing, Puerariae Radix, Puerarin, Advanced Glycation Endproduct(AGEs), Diabetic complications.

최종당화산물(advanced glycation endproduct: AGEs)은 비효소적 당화반응에 의해 당이 단백질과 결합하여 schiff base와 아마도리 산물(amadori product)을 거쳐서 생성된다. 그러나 당뇨병이 심하게 진행된 고혈당 상태에서는 아마도리 산물이 가역적으로

분해되지 않고 최종당화산물을 생성하는 비가역적인 반응으로 가속화되어 조직과 혈청 중에 대량 생산되어 축적된다. 즉 만성 당뇨로 인하여 신사구체 기저막에 최종당화산물이 축적됨이 보고되었다.^{1,2)} 이와같이 비정상적인 반응에 의해서 여러 세포에서

필요한 세포분열을 억제됨과 동시에 필요이상으로 세포의 기질물질을 합성하여 심각한 합병증들을 병발시킨다. 이러한 최종당화산물에 의한 세포반응은 당뇨병성 합병증의 병인론과 직접적인 연관이 있음은 말할 나위가 없다. 또한 단백질당화 억제제인 Aminoguanidine · HCl(AG)이 최종당화산물의 생성을 억제함으로써 이러한 병인들을 개선하였음이 보고되었다. 이러한 결과를 통하여 당뇨병 환자에게서 신장손상을 방지하고, 투석, 실명, 장기이식 등의 치료단계까지 진행되는 것을 방지 또는 지연시키기 위해서 최종당화산물의 형성을 억제하는 것이 매우 중요함을 알 수 있다.¹⁾ 그러나 AG가 임상 III상까지 진행이 되었으나 부작용에 대한 연구가 필요한 상태이다. 이러한 상황에서 한약재로부터 당뇨병 합병증의 예방제 및 치료제 개발을 위한 한약재의 선별을 위하여 시험관내의 실험을 실시하였으며, 또한 수치를 하였을 때 그 효능이 증강하는 한약재를 발굴하여 수치방법의 규격화 자료를 동시에 구축하고자 한다.

갈근(Puerariae Radix, Leguminosae)의 藥性(약성)은 甘(감), 辛(신), 平(평)하며 脾(비), 胃經(위경)으로 들어가 解表(해표, releasing the exterior), 透疹(투진), 生津(생진, producing the body fluid), 止渴(지갈, quench thirst)의 효능을 나타낸다. 갈근은 한방에서 가장 많이 사용되는 한약재 중의 하나로 열다한소탕, 갈근황금황련탕, 전씨백출탕 등의 처방에 빈번하게 사용되고 있다. 갈근이 숙취해소 효능 이외 estrogen-양 효능³⁾, 난소제거 쥐에서 골손실방지 효과가 있음이 보고되었다.⁴⁾

Puerarin은 갈근의 지표물질이며, 갈근의 수치방법은 한의학의 고전 문헌 및 중국약전을 기초로 실시하였다. 이에 수치 전·후 갈근의 지표물질인 puerarin의 함량과 시험관내에서 최종당화산물 생성 억제 효능에 대한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 갈근은 중국산으로 한의유통사업단에서 구입하였으며, 표본은 한국한의학연구원, 한약제제연구부(표본번호: Kiom-20-10)에 보관되어 있다.

시약 및 기기 - 지표물질인 puerarin은 Wako사(일본) 제품을, bovine serum albumin(BSA), aminoguanidine · HCl, sodium azide, glucose, fructose, NaH₂PO₄ · H₂O, Na₂HPO₄ · H₂O는 Sigma사(St. Louis, MO, 미국) 제품을 사용하였다. 유기용매는 HPLC용 Merck Co.(독일) 제품을, 그외 시료 추출과 분석을 위한 시약은 분석용 특급 또는 1급 시약을 사용하였다. HPLC는 Dionex사(미국), pump-P580, injector-ASI-100 automated sampler injector, UV/Vis Detector-UV D340S를, spectro fluorometer는 Shimadzu RF-5301PC(일본) 제품을, 배양기는 memmert BE500(독일) 제품을 사용하였다.

炒(초)갈근의 수치방법 - 갈근 10g을 약한 불(110℃내외)에서 약 45분간 볶아 표면이 황색이 되고 갈색 반점이 나타났을 때 꺼내어 식혔다.

갈근 및炒(초)갈근의 HPLC 분석 - 갈근과 초갈근 분말 1g 내외를 정확히 칭량하고 메탄올 5ml를 가하고 소니케이터에서 30분 동안 추출, 여과한 후 메스플라스크에서 정확하게 5ml로 하였다. 지표물질인 puerarin 1.0mg을 메탄올 2ml에 녹여 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml, 0.0625mg/ml, 0.03125mg/ml의 표준용액을 조제하여 각각 20μl씩 HPLC에 주입하였다. 최대한 오차를 줄이기 위하여 수치전·후의 한약재를 각각 5개씩 추출하였으며, 또한 각각 5번씩 반복하여 HPLC 분석하였다. 모든 시료는 0.45μm membrane filter로 여과한 후 HPLC 분석하였다.

HPLC상에서의 지표물질 피이크는 높이로 환산하였으며, 표준물질의 검량곡선식 및 상관계수는 Sigmaplot @프로그램(SPSS Inc. Chicago, IL, U.S.A.)에 의해 작성되었으며, 수치 전·후의 분석결과는 Student t-test로 그 유의성을 검증하였다.

효소반응 - 갈근과 초갈근을 상온에서 80% 에탄올로 24시간 정치·추출하였으며, 이러한 과정을 3번 반복추출하여 감압농축 후 건조하였다. 전보⁵⁾에 보고한 조건에서 갈근과 초갈근 추출물 및 puerarin을 37°C에서 30일동안 배양하였다.

최종당화산물(AGEs)의 분석 - 전보⁵⁾에 보고한 조건대로 spectrofluorometer(Excitation: 350nm, Emission: 450nm)로 형광정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

지표성분인 puerarin의 회귀방정식은 직선상($Y=29.8666x+8.9134$; $r^2=0.99904$)이었으며 Rt는 19.8분대에서 나타났으며, 갈근과 초갈근 추출물의 puerarin 피이크는 spike test로 확인하였다. Puerarin의 함량은 각각 $5.95 \pm 0.28\%$, $5.42 \pm 0.88\%$ 로 변화되었다. 초갈근의 경우 수치 전과 비교할 때 유의성있는 변화는 보이지 않았다(Fig. 1, Tab. 1). 최종당화산물은 형광, 갈색을 띠고 있으며 교차결합을 할 수 있는 물리화학적인 특성을 지니고 있을 뿐 아니라 세포막 수용체가 인지할 수 있는 배위자를 지니고 있다.⁶⁾ 이러한 특성을 지닌 배양액 중의 최종

당화산물의 양을 spectrofluorometer로 측정하여 그 생성 억제정도를 분석하였다.

30일간 배양하였을 경우, 갈근은 $5\mu\text{g/ml}$, $10\mu\text{g/ml}$, $25\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 최종당화산물 생성억제 효과가 $20.83 \pm 3.54\%$, $43.49 \pm 1.03\%$, $97.19 \pm 3.46\%$ 로 나타났으며, 초갈근은 $37.79 \pm 5.97\%$, $56.10 \pm 6.40\%$, $95.85 \pm 1.13\%$ 로 나타내었다. Puerarin은 $2.63\mu\text{g/ml}$ 에서 $81.75 \pm 7.02\%$ 의 억제능력을 보였다(Fig. 2). 또한 양성대조군인 aminoguanidine·HCl(AG)이 $27.5\mu\text{g/ml}$, $55\mu\text{g/ml}$, $110\mu\text{g/ml}$, $550\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 최종당화산물 생성억제 효과가 $45.78 \pm 2.40\%$, $55.43 \pm 4.0\%$, $73.52 \pm 1.75\%$, $96.41 \pm 2.20\%$ 로 나타내었다. 이들의 IC50값은 갈근은 $12.31\mu\text{g/ml}$, 초갈근은 $8.68\mu\text{g/ml}$, puerarin은 $2.63\mu\text{g/ml}$ 이하이며, AG는 $34.90\mu\text{g/ml}$ 로 각각 나타났다(Tab. 2). 갈근, 초갈근과 puerarin의 경우 모두 IC50($\mu\text{g/ml}$)값이 양성대조군인 aminoguanidine·HCl보다 3 배 이상 낮은 저농도에서 나타났으며, 수치로 인하여 그 효능이 증가추세를 보였다. 이로써 갈근, 초갈근 및 puerarin은 최종당화산물 생성을 억제하는 효능이 매우 우수함을 알 수 있었다. 이로써 한방에서 갈근을 止渴劑로 사용하여 온 것이 합리적임을 알 수 있다.

사 사

본 연구는 본 연구원 기관고유사업인 「한약재 수치지 관한 연구」이며 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Brownlee, M., Cerami, A., and Vlassara, H.(1988) Advanced glycation end productions in tissue and the

biochemical basis of diabetic complications, *N. Engl. Med.* **318**: 1315-1321.

2. Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P. and Cerami, A.(1986) Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Sciences*. **232**: 1629-1632.
3. Zheng, G., Zhang, X., Zheng, J., Meng, Q, and Zheng, D(2002) Estrogen-like effects of puerarin and total isoflavones from *Pueraria lobata*. *Zhong Yao Cai*. Aug; **25**: 566-568.
4. Wang, X., Wu, J., Chiba, H., Umegaki, K., Yamada, K., and Ishimi, Y.(2003) Puerariae radix prevents bone loss in ovariectomized mice. *J. Bone Miner. Metab.* **21**: 268-275.
5. 김진숙, 고진희, 김현정(2002) 한약재 수치에 관한 연구(III)-후박의 수치전·후 magnolol의 함량분석 및 시험관내에서 최종당화산물 생성억제효능. *생약학회지*. **33**: 308-311.
6. Nakagawa, T., Yokozawa, T., and Terasawa, K.(2001) A Study of Kampo medicines in a diabetic nephropathy model. *J. Trad. Med.* **18**: 161-168.
7. Ren, P., Hu, H., and Zhang, R.(2000) Observation on efficacy of puerarin in treating diabetic retinopathy. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. Aug; **20**: 574-576.

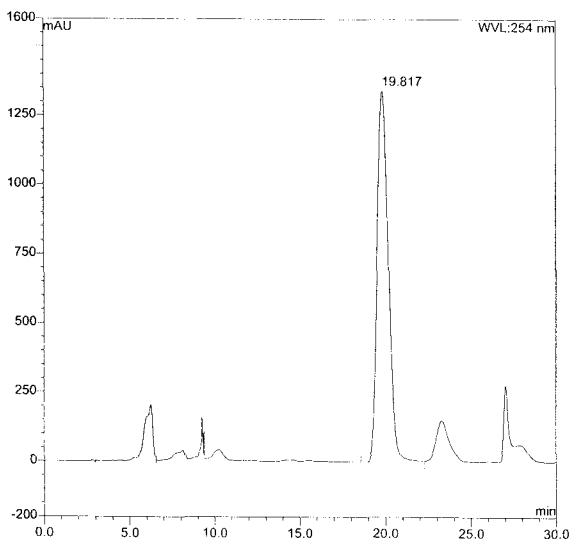
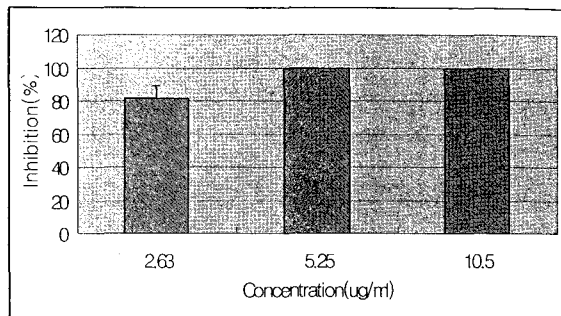


Fig 1. HPLC Chromatogram of Pueraria Radix extract. Stationary phase: Luna 5 μ C₁₈ (250 \times 4.6mm); mobile phase: MeOH:H₂O =25 : 75; detection: UV 254nm; flow rate: 1 ml/min.



(2)

Fig. 2. The inhibitory effect on the AGEs formation of unprocessed-, Processed Puerariae Radix(1) and puerarin(2)

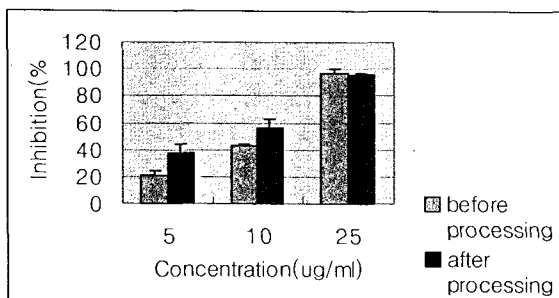
Table 1. Content of puerarin in Puerariae Radix extract

	Puerariae Radix	
	before processing	after processing
Content (%)	5.95 \pm 0.28%	5.42 \pm 0.88%

Table 2. IC₅₀ values(μ g/ml) of unprocessed- and processed Puerariae Radix and Puerarin

	IC ₅₀ (μ g/ml)
Puerariae Radix before processing	12.31
Puerariae Radix after processing	8.68
Puerarin	<2.63
Aminoguanidine · HCl*	34.90

*: Positive control



(1)