

더위지기 정유로부터 아세틸콜린에스테라제 억제활성 성분의 동정

최재수¹, 송병민², 박희준^{3*}

¹부경대학교 식품영양학과, ²상지대학교 산림과학과, ³상지대학교 제약공학과

Identification of the Component with Anti-acetylcholinesterase Activity from the Essential Oil of *Artemisia iwayomogi*

Jae Sue Choi¹, Byong-Min Song² and Hee-Juhn Park^{3*}

¹Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

²Department of Forest Science and ³Department of Pharmaceutical Engineering, Sangji University, Wonju 26339, Korea

Abstract - Since the acetylcholinesterase (AChE) inhibitor is used to treat Alzheimer's disease, the present study aimed to analyze the component with anti-AChE activity from the essential oil of *Artemisia iwayomogi* (Compositae). The four major components of the essential oil were identified to be camphor (29.8%), borneol (28.0%), eucalyptol (5.81%) and coumarin (5.49%) from a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The essential oil and its three components, camphor, borneol, and coumarin, were subjected to anti-AChE assay. The IC₅₀ values of the essential oil and coumarin were shown to be 0.298 mg/Mℓ and 0.236 mg/Mℓ, though those of other two components, camphor and borneol, were more than 0.250 mg/Mℓ. These results suggest that coumarin is an active substance of this essential oil with anti-AChE activity.

Key words - *Artemisia iwayomogi*, Compositae, Essential oil, Coumarin, Acetylcholinesterase, Alzheimer's disease

서 언

알츠하이머(Alzheimer) 질환은 치매 질환의 대부분을 차지하는 뇌 질환의 하나로서 인지기능 장애, 기억력 장애, 행동이상 등을 나타내는 질환이다(Syad and Devi, 2014). 이 질환자의 뇌에서는 acetylcholinesterase(AChE)의 활성이 높아져 있는 것으로 알려져 있다. 이 효소의 활성화는 시냅스에서 활성 acetylcholine(ACh)의 가수분해를 초래하므로 기억에 중요하게 관계하고 있는 ACh의 농도가 감소하게 되는 것이 알츠하이머 질환의 병리과정이라고 할 수 있다(López *et al.*, 2015).

그러므로, 이 AChE 활성 억제제를 검출하여 알츠하이머 질환 치료제를 개발하려는 연구자들이 있다. 그러한 노력에 따라 AChE 억제제로서 donepezil, galantamine, rivastigmine 등과 같은 약물이 개발되어 있다(Lai *et al.*, 2016) 그러나, 이러한 약물은 부작용이 많아 더욱 안전한 약물을 식물 유래 물질 중에서

찾으려는 연구가 진행되어 왔다.

정유는 식물 유래의 향기성분을 총칭하여 향산화(Salleh *et al.*, 2015), 항알러지(Passos *et al.*, 2007), 항염(Ehrnhöfer-Ressler *et al.*, 2013), 항박테리아(Wang *et al.*, 2011) 활성을 갖는 정유가 많이 보고되어 왔다. 그러나 근래에는 정유로부터 AChE 억제효과에 관해서 많은 연구가 진행되고 있다(Chaiyana and Okonogi, 2016). 그리고, 정유 성분은 휘발성이기 때문에 저분자량의 지용성 물질로서 뇌-혈관 장벽을 잘 통과할 것으로 예상되고 있다.

한편, 더위지기는 한국의 *Artemisia*속 식물 중에서 약용의 목적으로 중요하게 사용되고 있는 생약의 하나이다. 중국에서는 인진호를 사철쭉(*Artemisia capillaris*)이라고 지칭하고 있으나(Nugroho *et al.*, 2012), 한국에서는 이것 대신에 더위지기(*A. iwayomogi*)를 한국인진호라 하여 널리 사용되고 있다(Nugroho *et al.*, 2015). 한국에서는 사철쭉이 아주 흔하게 자생하고 있음에도 불구하고 더위지기를 이것 대신에 간보호 목적으로 사용하고 있는 것 때문에 특히 더위지기에 그 약리적 중요

*교신저자: hjpark@sangji.ac.kr

Tel. +82-33-730-0564

성이 있을 것으로 예상되고 있다(Seo *et al.*, 2008). 저자들도 더위지기로부터 2"-O-caffeoylrutin 성분을 비롯한 과산화아질산 억제효능을 갖는 화합물을 동정할 뿐 아니라 HPLC 정량한 바 있다(Nugroho *et al.*, 2015). 본 연구에서는 이렇게 한국의 소중한 생약의 하나인 더위지기의 정유로부터 그 유용성을 모색하기 위해 AChE 억제효과를 실험하였으며, 그 활성물질을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

한국산 인진호(*Artemisia iwayomogi*, Compositae)를 강원도 원주시 천일약업사에서 한국산의 것임을 확인하고 구입하여 실험에 사용하였다. 이 생약은 강원도에 자생하는 더위지기 전초인 것으로 상지대학교 산림과학과 송병민 교수에 의해 동정되었다. 이 식물의 표본은 상지대학교 제약공학과 천연물화학 실험실에 현재 보관 중이다.

정유의 추출

식물 재료 300g을 이용하여 수증기추출장치에서 3시간동안 수증기증류법으로 증류하였다. 이 증류물을 diethyl ether로 3회 분획한 후 무수망초(anhydrous sodium sulfate)로 탈수하였다. 탈수 후에 감압없이 충분히 건조하여 7.76g의 더위지기 정유를 얻었다.

GC-MS 분석

정유의 분석에 사용한 gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS)는 GC/MSD 7890A-5975C (Agilent Tech., USA)였다. 컬럼은 HP-5MS (30m × 250 μm i. d., 0.25m thickness)를 사용하였으며, 컬럼 온도를 승온법으로 분석하였다. 온도 프로그래밍으로서 35°C에서 1분간 유지한 후 15°C/min 속도로 승온하였으며, 280°C가 되었을 때 이 온도에서 17분간 유지하였다. 이 이후 20°C/min 속도로 승온하여 300°C에 도달한 후 이 온도로 1분간 유지함으로써 분석을 끝냈다. Carrier gas로서 He 기체를 사용하였고 흐름속도는 1 mL/min로 하였다. GC 분석 중 injector temperature는 250°C였다.

Detector로서 MSD scan mode를 사용하였으며, MS의 source temperature는 230°C이었고, quadrapole temperature는 150°C였다. 화합물의 동정을 위한 mass spectrum의 비교를 위해 사용한 라이브러리는 Wiley W9NO8이었다.

AChE 활성 측정

AChE와 활성 측정은 Ellman 등의 방법을 약간 변형하여 측정하였다(Ellman *et al.*, 1961). 즉, ACh를 기질로 이용하는 AChE의 억제활성을 측정하였다. 정유 중 테스트에 사용될 화합물 시료인 coumarin (Sigma, USA, lot # 65H3488, >98.0% purity), borneol (Sigma-Aldrich, USA, lot # BOBB9812V, >97%), camphor (Sigma-Aldrich, USA, lot # STBD8824V, >96%)는 구입하여 사용하였다. 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) 140 μl, 시료 20 μl와 AChE (0.36 U) 20 μl를 각각 96 well microplate에 넣고 실온에서 15분간 배양한 후에 10 μl의 DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)]와 기질인 ACh 10 μl를 넣어 최종적으로 반응액이 200 μl이 되도록 96 well plate에 넣었다. 이 때, DTNB와 기질인 ACh를 넣어야 효소반응이 시작되고, ACh이 효소적 가수분해에 의해 생성되는 thiocholine과 DTNB가 반응하여 생성되는 노란색의 5-thio-2-nitrobenzoate anion을 microplate reader VERSA max (Molecular Devices, CA, USA)로 412 nm에서 15분 후 측정하였다. 각각의 측정시료의 AChE 억제활성을 IC₅₀ value로 나타내었으며, 이는 기질인 ACh과 BCh의 가수분해를 50% 억제하는 농도를 μg/Ml로 나타낸 값이다. 이들 cholinesterase 억제 %는 다음의 방정식으로 구하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (A_{\text{samp}}/A_{\text{con}})/A_{\text{std}}] \times 100$$

여기서, A_{samp}는 측정시료를 넣었을 때의 흡광도, A_{con}은 측정시료를 넣고 효소를 넣지 않았을 때의 흡광도, A_{std}는 측정시료를 넣지 않았을 때의 흡광도이다.

결과 및 고찰

더위지기 정유를 GC-MS로 분석하여 얻은 크로마토그램을 Fig. 1에, 그리고 Wiley W9NO8 라이브러리로 매칭하여 각 화합물을 동정한 결과를 Table 1에 나타내었다. 본 분석에서 동정된 13종의 전 화합물은 matching quality ratio가 95% 이상이었으며, 동일한 화합물로 인정하였다. 모노테르펜 화합물로 eucalyptol, thujone, 1-terpineol, camphor, borneol, verbenone, 2β-hydroxy-1,4-cineole, piperitone 등의 8종 화합물이 동정되었다. 세스퀴테르펜 화합물로는 β-selinene과 clovane diol 화합물이 t_R 12.553 min과 14.305 min에 각각 나타났다. 그리고 coumarin, butylated hydroxytoluene, ethyl citrate의 화합물이 각각 t_R

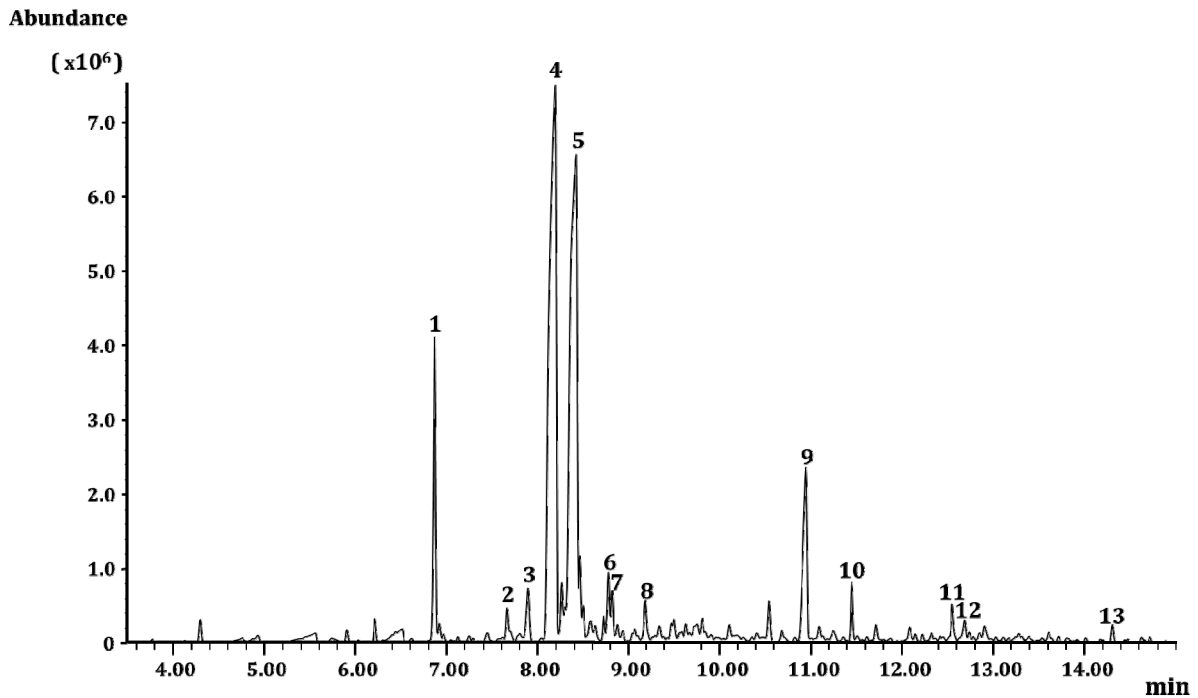


Fig. 1. GC chromatogram of the essential oil of *A. iwayomogi*.

Table 1. Identification of the components of the essential oil extracted from *A. iwayomogi*

Peak No.	t_R (min)	M^+ m/z (%)	Fragment ion m/z (%)	Peak area (%)
Eucalyptol (1)	6.868	154.1 (46.9) $[C_{10}H_{18}O]^+$	139.1 (40.6), 109.1 (62.5), 43.1 (100)	5.81
Thujone (2)	7.665	152.1 (8.8) $[C_{10}H_{16}O]^+$	110.1 (73.5), 95.1 (35.3), 81.1 (100)	0.96
1-terpineol (3)	7.907	154.1 (6.1) $[C_{10}H_{18}O]^+$	139.1 (39.4) $[M-CH_3]^+$, 111.1 (30.3), 43.1 (100)	1.54
Camphor (4)	8.167	152.1 (35.3) $[C_{10}H_{16}O]^+$	137.1 (5.9) $[M-CH_3]^+$, 108.1 (47.1), 95.1 (100)	28.5
Borneol (5)	8.402	154.1 (3.0) $[C_{10}H_{18}O]^+$	139.1 (9.1) $[M-CH_3]^+$, 110.2 (21.2), 95.2 (100)	28.0
Verbenone (6)	8.795	150.1 (47.2) $[C_{10}H_{14}O]^+$	135.1 (75.0) $[M-CH_3]^+$, 107.1, (100), 80.1 (55.6)	3.06
2 β -hydroxy-1,4-cineole (7)	8.831	170.1 (8.3) $[C_{10}H_{18}O_2]^+$	152.1 (5.6) $[M-H_2O]^+$, 109.1 (52.8), 43.1 (100)	2.89
Piperitone (8)	9.194	152.1 (19.4) $[C_{10}H_{16}O]^+$	137.1 (27.0) $[M-CH_3]^+$, 110.1 (89.2), 82.1 (100)	0.85
Coumarin (9)	10.952	146.1 (87.2) $[C_9H_6O_2]^+$	118.1 (100) $[M-CO]^+$, 90.1 (48.7), 63.1 (30.8)	5.49
Butylated hydroxytoluene (10)	11.453	220.1 (25.7) $[C_{15}H_{24}O]^+$	205.2 (100) $[M-CH_3]^+$, 127.1 (48.7), 105.1 (100)	1.05
Ethyl citrate (11)	12.553	276.1 (2.9) $[C_{12}H_{20}O_7]^+$	203.1 (23.5) $[M-COOC_2H_5]^+$, 157.1(100), 115.1 (44.1)	0.77
β -Selinene (12)	12.680	204.1 (74.4) $[C_{15}H_{24}]^+$	189.1 (46.2) $[M-CH_3]^+$, 121.1 (48.7), 105.1 (100)	0.76
Clovane diol (13)	14.305	238.1 (25.0) $[C_{15}H_{26}O_2]^+$	220.1 (38.9) $[M-H_2O]^+$, 202.1 $[M-2H_2O]^+$, 164.1 (100)	0.31

10.952min, 11.453min, 12.553min에서 각각 동정되었다.

Peak area(%)로 그 상대적 함량을 비교했을 때 더위지기는 camphor와 borneol이 각각 28.5%, 28.0%였다. 이러한 결과는 Yu *et al.* (2003)이 보고한 더위지기 정유의 주요 성분의 분석결

과와 잘 일치하였다. 이 중 camphor는 monoterpene ketone 화합물로서 이것이 환원되어 알코올 화합물로 바뀔 때 borneol이라는 monoterpene alcohol이 된다. 그러므로, 더위지기 정유는 이 두 성분이 대표적 성분이라 할 수 있다. 또 세스퀴테르펜 중

Table 2. The IC₅₀ value of the essential oil of *A. iwayomogi* and its constituents on AChE activity

Treatment	IC ₅₀ (mg/Ml)
Essential oil of <i>A. iwayomogi</i>	0.298
Camphor	>0.250
Borneol	>0.250
Coumarin	0.236

clovane diol은 Tsui와 Brown 등이 1996년 처음으로 *Baeckea frutescens* 식물에서 분리하여 구조결정된 바 있으며(Tsui and Brown, 1996), 이 화합물이 더위지기 정유 중에서 확인된 사실은 흥미롭다.

이러한 더위지기 정유를 알츠하이머 질환에 대한 응용성을 모색하기 위하여 Ellman의 방법(Ellman *et al.*, 1961)을 이용하여 AChE에 대한 활성을 측정된 결과 그 IC₅₀ 값이 0.298 mg/ml로 나타났다. 그러므로 더위지기 정유의 분석결과를 참조하여 camphor, borneol, coumarin 3종으로 테스트하였을 때 camphor와 borneol은 0.300 mg/ml 이하에서는 그 IC₅₀가 확인되지 않았다. 그러나 coumarin은 0.236 mg/ml에서 IC₅₀가 낮으므로 AChE 억제활성이 있는 것으로 간주할 수 있다. 이러한 IC₅₀ 값을 Table 2에 나타내었다.

더위지기에 함유된 coumarin 화합물은 scopoletin, scopolin 등이 알려져 있다(Nugroho *et al.*, 2015). Scopoletin은 7-hydroxy-6-methoxy- α -pyrone의 구조를 가지고 있는 화합물이며, scopolin은 7-O- β -D-glucosylscopoletin의 구조를 가지고 있다. 더위지기에서 치환기가 없는 모핵의 coumarin 구조를 가진 화합물이 알려진 바 없으나, 이 화합물이 더위지기의 정유 성분 중에서 확인된 것은 흥미롭다. 결론적으로, 더위지기 정유의 AChE 억제하는 주요 활성성분은 coumarin이었으며, 이 화합물은 정유의 크로마토그램상의 피크면적이 5.49%이었으므로 인지기능 증가에 영향을 미칠 것으로 간주할 수 있었다.

적 요

AChE 억제제는 알츠하이머 질환 치료에 이용될 수 있으므로, 본 연구는 더위지기 정유로부터 AChE 활성성분을 탐색하기 위하여 수행한 것이다. 더위지기로부터 얻은 정유를 GC-MS로 분석했을 때 camphor가 29.8%, borneol이 28.0%, eucalyptol이 5.81%, coumarin이 5.49%의 피크 면적 비율을 보였다. 이 중 camphor, borneol, coumarin을 사용하여 Anti-AChE 활성 검

색을 수행하였다. 그 결과, 0.298 mg/Ml, coumarin은 0.236 mg/Ml의 IC₅₀ 값을 나타내었다. 이러한 결과는 coumarin이 anti-AChE 활성을 나타내는 활성물질임을 나타내는 것이다.

References

- Chaiyana, W. and S. Okonogi. 2012. Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. *Phytomedicine* 19:836-839.
- Ehrnhöfer-Ressler, M.M., K. Fricke, M. Pignitter, J.M. Walker, J. Walker, M. Rychlik and V. Somoza. 2013. Identification of 1,8-cineole, borneol, camphor, and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. *J. Agric. Food Chem.* 61:3451-3459.
- Ellman, G. L., K.D. Courtney, V.J. Andres and R.M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88-95.
- Lai, T.S., W.F. Wang, B.S. Yip, Y.W. Yang, G.S. Peng, S.J. Tsai, Y.C. Liao and M.C. Pai. 2016. Real-world evaluation of compliance and preference in Alzheimer's disease treatment: an observational study in Taiwan. *Patient Pref. Adherence* 10:383-390.
- López, M.D., F.J. Campoy, M.J. Pascual-Villalobos, E. Munoz-Delgado and C.J. Vidal. 2015. Acetylcholinesterase activity of electric eel is increased or decreased by selected monoterpenoids and phenylpropanoids in a concentration dependent manner. *Chem. Biol. Interac.* 229:36-43.
- Nugroho, A., S.C. Lim and H.J. Park. 2012. Qualitative analysis of phenolic substances in *Artemisia capillaris* by LC-MS. *Kor. J. Pharmacogn.* 43:302-307.
- Nugroho, A., S.C. Lim, S. Karki, J.S. Choi and H.J. Park. 2015. Simultaneous quantification and validation of new peroxynitrite scavengers from *Artemisia iwayomogi*. *Pharmaceut. Biol.* 52:653 - 661.
- Salleh, W.M., F. Ahmad and K.H. Yen. 2015. Antioxidant and anticholinesterase activities of essential oils of *Cinnamomum griffithii* and *C. macrocarpum*. *Nat. Prod. Commun.* 10:1465-1468.
- Seo, K.S. and K.W. Yun. 2008. Antioxidant activities of extracts from *Artemisia capillaris* THUNB. and

- Artemisia iwayomogi* KITAM. used as Injin. Korean J. Plant Res. 21:292-298.
- Syad, A.N. and K.P. Devi. 2014. Botanicals: a potential source of new therapies for Alzheimer's disease? Bot. Targ. Ther. 4:11-26.
- Passos, G.F., E.S. Fernandes, F.M. da Cunha, J. Ferreira, L.F. Pianowski, M.M. Campos and J.B. Calixto. 2007. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. J. Ethnopharmacol. 110:323-33.
- Tsui, W.Y. and G.D. Brown. 1996. Sesquiterpenes from *Baeckea frutescens*, J. Nat. Prod. 59:1084-1086.
- Wang, J.H., L. Xu, L. Yang, Z.L. Liu and L. Zhou. 2011. Composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils from *Ligusticum sinense* and *L. jeholense* (Umbelliferae) from China. Rec. Nat. Prod. 5:314-318.
- Yu, H.H., Y.H. Kim, B.S. Kil, K.J. Kim, S.I. Jeong and Y.O. You. 2003. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Artemisia iwayomogi*. Planta Med. 69:1159-1162.

(Received 2 September 2016 ; Revised 15 October 2016 ; Accepted 9 November 2016)