

Melilotus officinalis 엑기스의 藥理學的 研究

洪 南 斗 · 元 道 喜* · 金 南 宰

慶熙醫療院 · 國立保健院*

Pharmacological Studies on *Melilotus officinalis* Extract

N.D. HONG, D.H. WON* and N.J. KIM

Kyung-Hee Medical Center and National Institute of Health*

Experimental studies were made with *Melilotus officinalis* extract which was extracted from flowers and leaves of *Melilotus officinalis* Dsr. (Leguminosae).

In this paper, acute toxicity, analgesic action, prolongation of hypnosis time by induced pentobarbital-Nain mice, antiinflammatory effect in rats and effects on isolated intestines of mice and rats were studied,

The result was as follows;

1. Very low toxicity in mice.
2. Analgesic action was recognized markedly in mice.
3. Prolongation of hypnosis time induced by pentobarbital-Na in mice was shown.
4. Relaxing action was shown on the isolated ileum in mice and antagonistic action was seen on BaCl₂-induced contraction of the ileum that the relaxing effect of the intestinal smooth muscle was recognized.
5. Antiinflammatory effect was shown markedly in mice.
6. Hypotensive and vaso-dilating actions due to the vascular smooth muscle relaxation were noted in rabbits.

結 論

“*Melilotus* Extract”는 콩과 (Leguminosae)에 屬하는 *Melilotus officinalis* Desr.의 꽃과 잎으로부터 얻은 엑기스이다.

이 植物은 中央유럽과 中央아시아에 分布되었으며 유럽에서는 民間藥으로 利尿, 류마치증, 氣管支炎등에 應用되어지고 있다.¹⁾

*Melilotus*屬 植物의 成分에 關한 研究는 Schwarz²⁾, Ziegler³⁾, Weygand⁴⁾ 및 Past⁵⁾에 依해서 coumarin, coumaric acid, melilotic acid,

melilotol, flavonoids등을 分離 報告한 바 있으며 coumarin 自體의 抗凝血效果는 알려져 있지 않지만, bis-hydroxy coumarin誘導體인 dicoumarol cyclocoumarol등은 肝臟에서 prothrombin의 生成에 拮抗하여 血液凝固機轉을 抑制하고,⁶⁾

또한 flavonoid類가 Vitamine P樣作用을 發揮하는 것으로 알려져 있어 毛細血管壁의 抵抗성을 減弱시킨다고 報告하고 있다.^{7,8)}

“*Melilotus* Extract”에 Vitamine B 또는 rutin을 첨가한 製劑에 對하여는 Kovach⁹⁾, Shimomura¹⁰⁾, Shimamoto¹¹⁾의 여러 研究者에 依하여 研究報告되었으며, 實際로 獨逸과 日本에서는 醫藥品으

로開發되어臨床에서靜脈炎, 血栓症, 靜脈瘤, 皮膚潰瘍治療藥으로頻用되고 있으나 *Melilotus*의單獨 엑기스에對한藥理作用은 Lenfeld 등¹²⁾이抗血液凝固作用을 Kovach 등¹³⁾은循環系에對한效果를報告하였을 뿐이다.

따라서著者등은藥用植物이價値있는藥物로開發되고있음을감안하여 *Melilotus officinalis*에서얻은單一 엑기스에對하여鎮痛, 鎮靜作用, 腸管에對한作用, 抗炎症作用 및 血壓 및 呼吸에對한作用등을各種實驗動物을使用하여實驗한結果若干의知見을얻었기에報告한다.

實 驗

1. 實驗材料 및 實驗方法

1) 實驗材料: 本實驗에서使用한材料는 Schaper & Brümer (West Germany)에서提供받은 *Melilotus officinalis*의花葉에서抽出하여얻은엑기스粉末을使用하였다.

2) 檢液의同定: 實驗에使用한檢液을常法에따라 Silicagel 60 F₂₅₄ (E. Merck, Co.)를吸着劑로하고展開溶媒로 EtOH: *n*-Hexane: AcOEt (15:9:3)를使用하여 TLC를行하고 dual wavelength TLC scanner CS-910 (Shimadzu, Japan)으로波長 λ_S 250nm, λ_R 350nm와 λ_S 350nm, λ_R 700nm에서 scanning한檢液의固有曲線은 Fig. 1과같다.

3) 實驗動物: 實驗動物은中央動物 ICR系 생쥐(♂) 體重16~20g, 흰쥐(♂) 體重 120~150g, 모르모트(古) 體重 350~450g 및 家兔(♂) 體重 2.5~3.5kg을使用하였으며, 飼料는第一飼料(株)의固型飼料로사육하였고, 물을充分히供給하면서實驗室環境에順應시킨後에使用하였다. 實驗은特別히明示하지않은限常溫에서實施하였다.

2. 實驗方法

1) 急性毒性試驗: 檢液을생쥐의腹腔 및 經口的으로投與하고 48~72時間後生死判定에依해서 LD₅₀을算出하며計算은 Litchfield-Wilcoxon法¹⁴⁾을適用하였다.

2) 鎮痛作用: Whittle의方法¹⁵⁾에따라생쥐1群을5마리로하여檢液 2.5, 0.5, 2.5mg/10g씩經口投與하고, 30分後에 0.7%醋酸生理食鹽水液 0.1ml/10g을腹腔注射하고 10分後 10分間의 writhing syndrome의頻度を調査하여 aminopyrine 1mg/10g 投與群과比較觀察하였다.¹⁶⁻¹⁸⁾

3) Pentobarbital 睡眠時間에 미치는作用: ^{19,20)} 생쥐 1群을 10마리로하여 pentobarbital sodium 20mg/kg을腹腔內注射하고正向反射의消失로부터正向反射出現까지의時間을睡眠時間으로하였다. 檢液 2.5, 0.5, 0.25mg/10g씩各各經口投與하고 60分後에 pentobarbital sodium 20mg/kg을腹腔內投與하여睡眠持續時

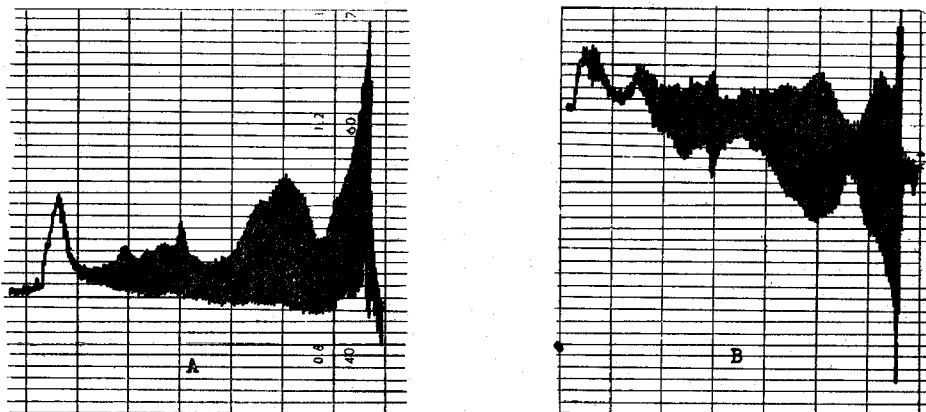


Fig. 1. Zig-zag TLC Scanning profile of *Melilotus* extract. Adsorbent: Silicagel 60F₂₅₄ (E. Merck., Co.), Solvent: EtOH:*n*-Hexane:AcOEt (15:9:3). Time; 2hrs Temp.; 24C, Wave length; A:λ_S; 350nm, λ_R; 700nm B:λ_S; 250nm, λ_R; 350nm

間을 測定하였다.

4) 腸管에 對한 作用 : Magnus 方法²¹⁾에 따라 생쥐 및 흰쥐의 回腸管을 使用하여 抽出腸管의 運動을 Kymography 煤煙紙上에 描記시켜 檢液의 作用과 拮抗藥에 對한 作用을 觀察하였다.

5) 氣管에 對한 作用 : 모르모트의 氣管을 Takagi 方法²²⁾에 準하여 氣管連鎖標本을 만들어 Magnus 裝置로 37°C, Tyrode 液中에서 氣管平滑筋에 對한 檢液의 作用 및 拮抗藥에 對한 作用을 觀察하였다.

6) 抗炎症作用 : 高木等²³⁾의 方法에 準하여 흰쥐 1群을 5마리로 하여 檢液 25.0, 5.0, 2.5mg/100g씩 各各 經口投與하고, 檢液投與 30分 後에 5% 醋酸生理食鹽水液 0.1ml/rat을 흰쥐의 後肢足趾에 皮下注射하고 volume difference meter (Ugo Basile Co., Italy)로 5時間동안 經時的으로 後肢足의 容積을 測定하였다. 比較藥物로 aspirin 20mg/100g 投與群과 浮腫增加率을 算出하고 比較觀察하였다.

$$\text{浮腫增加率} = \frac{Et - Es}{Es} \times 100$$

Et : 起炎物質投與後의 後肢의 容積

Es : 起炎物質投與前의 後肢의 容積

7) 家兔 耳殼血管灌流試驗 : 家兔을 使用하여 Krawkow-Pissemski法에^{21,24)} 따라 家兔의 귀가 좋은 것을 選別하여 動脈周圍의 털을 깎고 耳殼動脈을 露出시켜 Ringer液이 들어있는 Mariot瓶에 連結된 cannula를 插入하였다. 귀를 잘라내어 耳殼動脈에서 靜脈으로 流出하는 Ringer液의 滴數를 測定하였다. 灌流液의 落下滴數가 一定하게 된 後에 檢液을 cannula에 接續된 tube內에 0.2 ml씩 注射하고, 滴數의 變化를 觀察하였다.

8) 血壓 및 呼吸에 對한 作用^{21,25)} : 家兔를 使用하여 urethane 1.5g/kg을 腹腔內 注射하여 麻醉시킨 後 常法에 따라 左側 頸動脈에 水銀 manometer에 連結된 動脈 cannula를 插入하고, 氣管에는 呼吸 tambour에 連結된 氣管 cannula를 插入하여 血壓과 呼吸運動을 同時에 描記시켰다. 이 때 血壓과 呼吸運動이 一定하게 되었을 때에 檢液을 耳靜脈에 注射하여 血壓과 呼吸에 對한 作用과 vogotomy後의 變化를 觀察하였다.^{26,27)}

3. 實驗成績

1) 急性毒性試驗 : *Melilotus* 엑기스의 LD₅₀은 腹腔 및 經口投與에서 投與可能한 最大用量 1.25 g/kg, 2.5g/kg의 各用量에서도 死亡動物이 없으므로 LD₅₀을 算出할 수 없어 毒性은 대단히 적다는 것을 알 수 있다.

2) 鎮痛效果 : 醋酸法에 依한 鎮痛效果는 생쥐에 0.7% 醋酸生理食鹽 0.1ml/10g 單獨投與群에서는 41.4회의 writhing syndrome의 頻度가 있었으나 檢液 0.25, 0.50, 2.50mg/10g 各各 投與群에서는 15.2회, 12.4회, 11.2회로 各 p<0.001의 有意성이 있는 抑制效果를 觀察할 수가 있었다(Table I).

3) Pentobarbital 睡眠時間에 미치는 影響 : Pentobarbital sodium 20mg/kg 單獨投與群에서는 25.5±0.85分の 睡眠時間을 나타냈으며 檢液 0.25, 0.50, 2.50mg/10g 各各 投與群에서는 31.3±2.06分, 41.1±1.18分, 51.7±0.79分으로

Table I. Effect of *Melilotus* extract on the writhing syndrome in mice.

Groups	Dose (mg/10g, P.O.)	Number of animals	Writhing syndrome (Counts/10min.)
Control	—	5	41.4±93 ^{a)}
Sample	0.25	5	15.2±1.67***
	0.50	5	12.4±1.93***
	2.50	5	11.2±1.45***
Aminopyrine	1.00	5	1.8±0.50***

a) ; Mean±Standard error. Statistical significance; ***; p<0.001.

Table II. Effect of *Melilotus* extract on the duration of hypnosis induced by pentobarbital sodium in mice.

Groups	Dose (mg/10g, P.O.)	Number of animals	Hypnotic duration (Min.)
Control	—	10	25.5±0.85 ^{a)}
Sample	0.25	10	31.3±2.06*
	0.50	10	41.1±1.18***
	2.50	10	51.7±0.79***

a) ; Mean±Standard error. Statistical significance; *; p<0.05, ***; p<0.001.

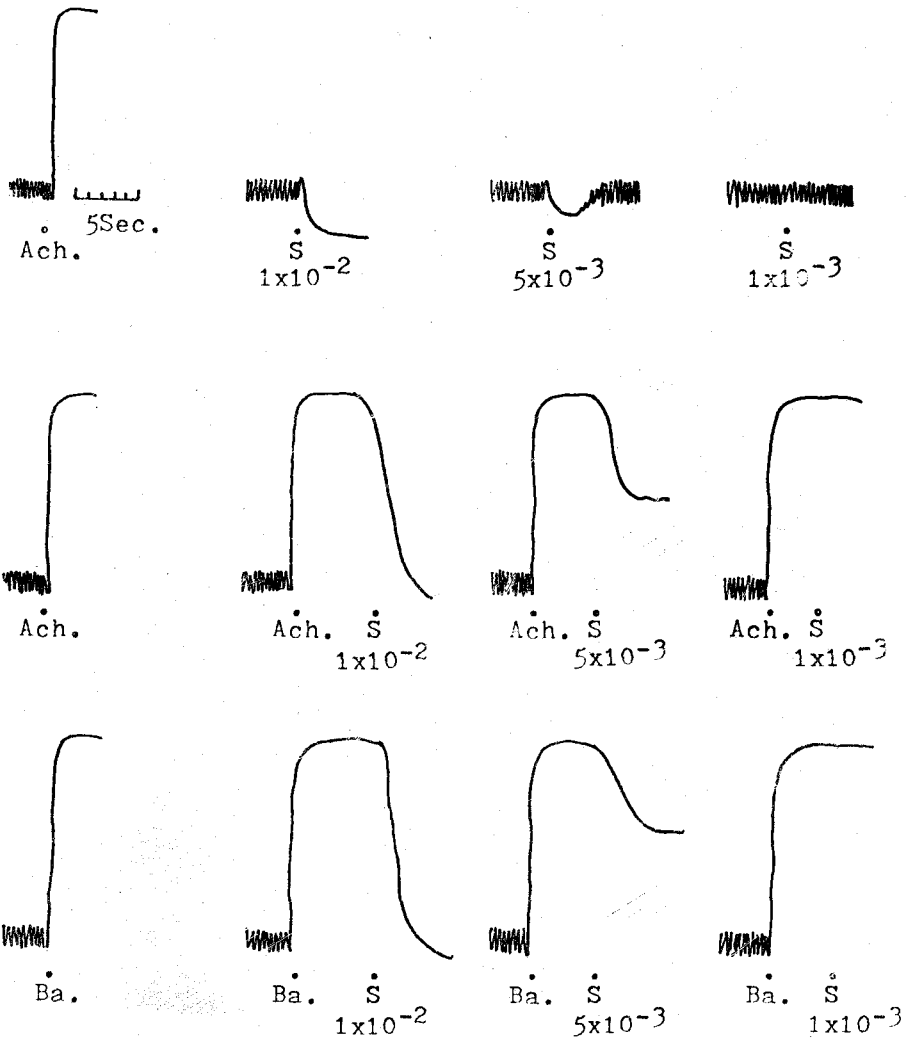


Fig. 2. Effect of *Melilotus* extract on the ileum of mice. (Magnus method)

Ach.: Acetylcholine chloride 1×10^{-7} g/ml.

Ba. : Barium chloride 3×10^{-4} g/ml.

有意性이 있는 睡眠時間 延長效果를 認定하였다 (Table II).

4) 腸管에 對한 效果: Fig. 2에 나타난 바와 같이 생쥐 摘出回腸管에 對하여 1×10^{-2} g/ml 投與로 강한 弛緩作用을 나타내었고, acetylcholine 1×10^{-7} g/ml 및 BaCl_2 3×10^{-4} g/ml에 依한 收縮에 對해서도 抑制作用을 나타내었으며 檢液의 濃度增加에 따라 抑制作用이 增加됨을 나타내었다. 또한 흰쥐의 摘出回腸管에서 acetylcholine 및 BaCl_2 에 依한 收縮에 對하여 檢液投與로 濃

度依存的으로 拮抗作用을 觀察할 수 있었다 (Fig. 3).

5) 氣管에 對한 效果: 모르모트 氣管連鎖標本은 檢液 1×10^{-2} g/ml 投與로 弛緩效果를 나타내었고, histamine 1×10^{-5} g/ml에 依하여 收縮된 氣管平滑筋에 對하여 檢液 1×10^{-2} g/ml 投與로 강한 拮抗作用을 나타내었으며, 濃度依存的으로 拮抗作用이 增大됨을 알 수 있었다 (Fig. 4).

6) 抗炎症效果: 5% acetic acid를 흰쥐의 後肢에 皮下注射하였을 때에 浮腫增加率은 60%前後

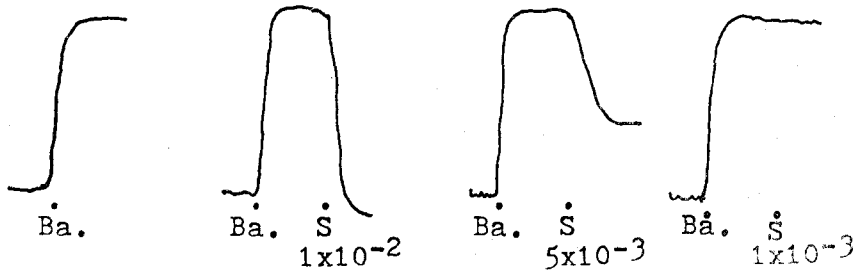
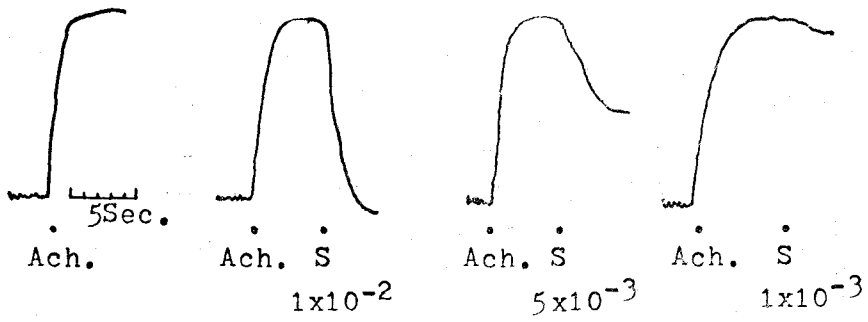


Fig. 3. Effect of *Melilotus* extract on the ileum of rats. (Magnus method)
 Ach.: Acetylcholine chloride 1×10^{-7} g/ml.
 Ba. : Barium chloride 3×10^{-4} g/ml.

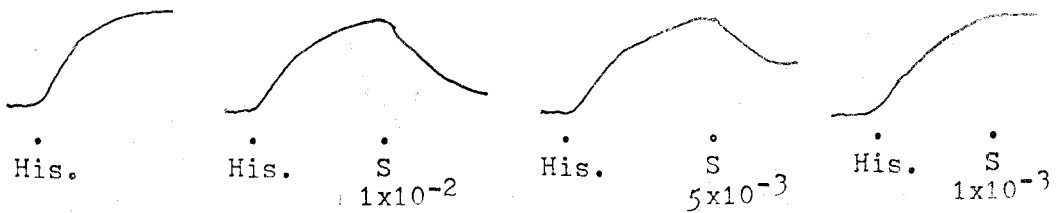
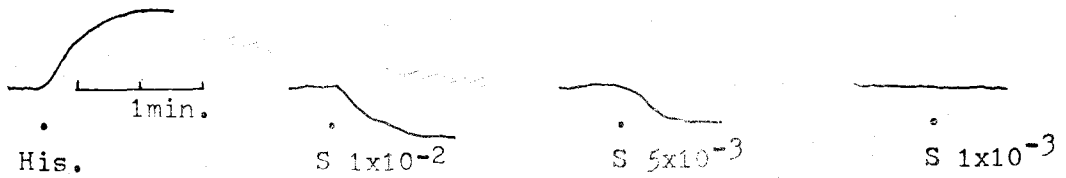


Fig. 4. Effect of *Melilotus* extract on the tracheal strip-chain of Guinea-pigs.
 His.: Histamine HCl 1×10^{-5} g/ml.

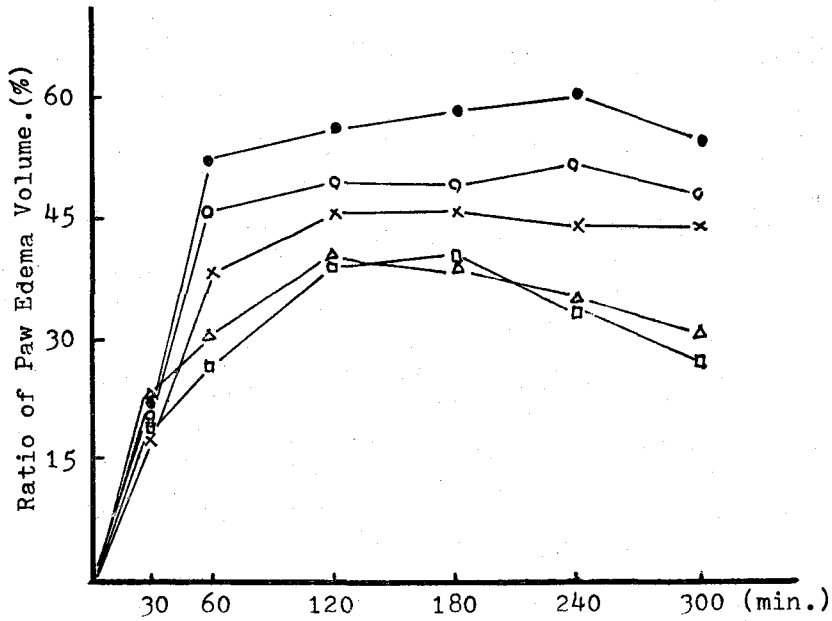


Fig. 5. Effect of *Melilotus* extract on the edema of rat hind paws caused by 5% acetic acid.
 —●—: Control (Normal saline) —○—: Sample 2.5mg/100g. —×—: Sample 5.0mg/100g
 —△—: Sample 25mg/100g. —□—: Aspirin 20mg/100g.

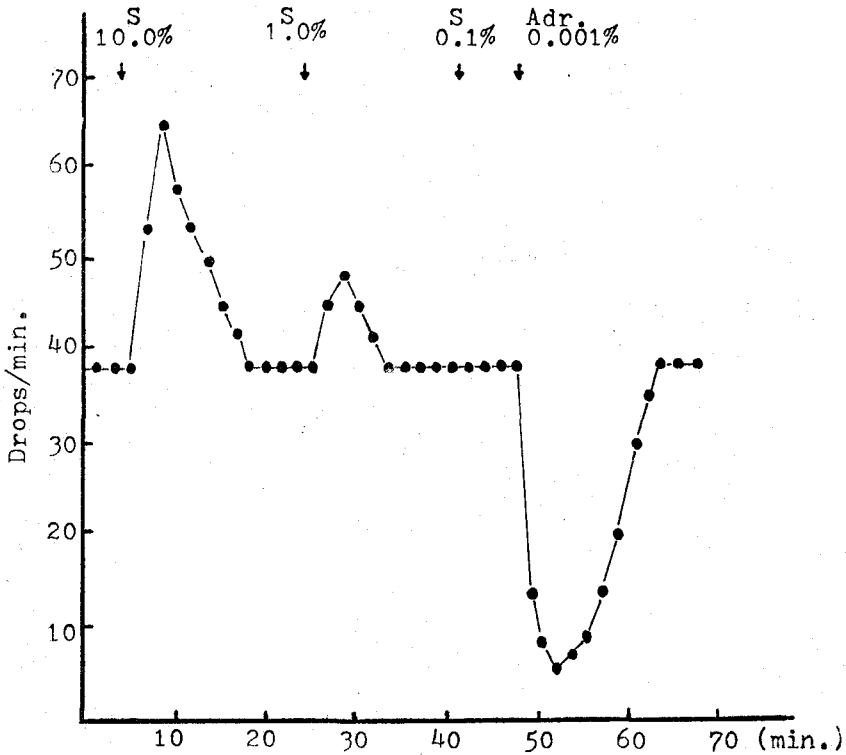


Fig. 6. Effect of *Melilotus* extract on the flow rate in the blood vessels of rabbits.
 (Krawkow-Pissemiski method) Adr.: Adrenaline.

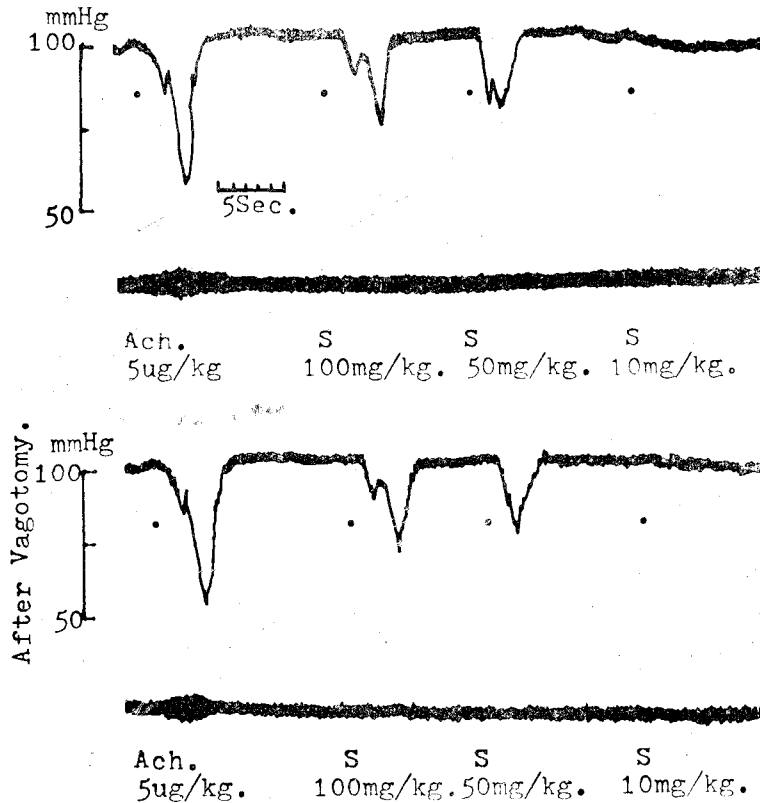


Fig. 7. Effect of *Melilotus* extract on the blood pressure and respiration in anesthetized rabbits. Ach.: Acetylcholine chloride.

로 5~6時間 持續되었다. 이것에 對하여 檢液 25mg/100g 投與로 현저한 抑制效果를 나타내었으며, 比較藥物인 aspirin 20mg/100g 投與와 類似한 效果를 나타냄을 觀察할 수 있었다(Fig. 5).

7) 家兎 耳殼血管灌流에 對한 效果: 家兎의 耳殼動脈으로 Ringer液을 灌流시켜 靜脈으로 流出하는 速度를 每分當 38滴으로 調節한 後 檢液을 投與하였다. 檢液(0.1%, 1.0%, 10.0%)의 濃度增加에 따라 流出되는 ringer液의 滴數가 增加됨을 觀察할 수 있었다(Fig. 6)

8) 血壓 및 呼吸에 對한 效果: Fig. 7에 나타낸 바와 같이 家兎의 頸動脈 및 氣管에 對한 檢液의 效果는 檢液 50mg/kg, 100mg/kg 投與에 依해서 血壓降下作用이 나타났으며 10mg/kg 投與에 依해서는 別다른 變化를 觀察할 수 없었으며, 또한 呼吸에는 別다른 影響을 주지 못하였다. 兩側頸部 迷走神經을 切斷하였을 때에도 血

壓降下效果를 나타냈으며 呼吸에는 別다른 變化를 觀察하지 못하였다.

考察 및 結論

Melilotus officinalis Dsr. (Legumionosae)의 花 및 葉에서 抽出하여 얻은 엑기스에 對하여 實驗한 成績을 綜合考察하면 다음과 같다.

생쥐를 使用하여 急性毒性을 檢討한 結果 1.25g/kg을 腹腔內 2.5g/kg을 經口로 投與할 수 있는 最大量을 投與하였으나 48時間 後에도 別다른 行動上의 異狀을 認定할 수 없었으며 技術的으로 LD₅₀을 算出하는 것이 不可能하였고 島本¹¹⁾에 依해 *Melilotus* 엑기스의 主成分이라고 할 수 있는 coumarin의 LD₅₀을 檢討한 경우 腹腔內 投與 220mg/kg, 經口投與 470mg/kg으로 報告한 바 있어, 檢液 中の coumarin含量이

0.1% 含有하고 있으므로 急性毒性은 대단히 微弱하며 安全性이 높은 것으로 생각되어진다.

醋酸法에 의한 鎮痛效果試驗에서 對照群에 비하여 檢液 0.25mg/10g은 63.2%, 0.50mg/10g은 63.2%, 0.50mg/10g은 70.1% 및 2.5mg/10g은 72.9%의 writhing syndrome을 抑制하였으며, 比較藥物 aminopyrine 1.0mg/10g의 95.6% 보다 若干 떨어지는 效果를 나타내었다.

Pentobarbital sodium 20mg/kg投與로 睡眠(25.5±0.85)을 誘發시킨데 對하여 檢液投與로 현저한 睡眠時間 延長效果를 나타내었다.

Acetic acid에 의한 흰쥐의 後肢浮腫에 對하여 5% acetic acid를 흰쥐의 後肢足趾皮下에 注射하였을 때 60%의 浮腫增加率이 5~6時間 동안 持續되었고, 檢液 25mg/100g投與로 현저한 抑制效果를 나타내었다. 따라서 writhing syndrome의 억제효과와 pentobarbital-Na 수면 延長효과와 항염증효과 등으로 미루어 檢액은 鎮痛·鎮靜 작용이 있는 것으로 思料된다.

생쥐의 回腸管에 對하여 檢液 1×10^{-2} g/ml投與로 弛緩效果를 나타내었고, acetylcholine 및 BaCl₂에 의한 收縮에 對하여 濃度依存的으로 강한 拮抗作用을 나타내었다. 또한 흰쥐의 摘出回腸管의 acetylcholine 및 BaCl₂ 收縮에 對해서도 역시 濃度增加에 따라 拮抗效果가 增大됨을 알 수 있었다. 鶴見等은²⁸⁾ acetylcholine, histamine, serotonin 및 BaCl₂에 의한 腸管收縮作用에 對하여 全部 拮抗作用을 나타내는 경우에는 自律神經系에 관한 것이 아니고 平滑筋에 對한 直接作用임을 밝힌 바 있다. Melilotus 엑기스의 弛緩作用은 BaCl₂와 acetylcholine에 모두 拮抗作用을 일으키므로 腸管平滑筋 筋原性 弛緩作用으로 생각되어진다.

모르모트의 氣管連鎖標本에 對하여 檢液 1×10^{-2} g/ml投與로 弛緩作用을 나타내었고, histamine 1×10^{-5} g/ml에 의해서 收縮된 氣管平滑筋에 檢液의 濃度依存的으로 拮抗效果를 나타냄을 알 수 있었다.

Krawkow-Pissemski法에 의한 家兎耳殼血管灌流試驗에서 檢液에 依하여 灌流液의 현저한 增加로 血管이 擴張됨을 알 수 있었으며 血管擴張

機轉은 생쥐, 흰쥐 回腸管 平滑筋 筋原性 弛緩作用 등으로 미루어 보아 血管平滑筋에 對한 直接的인 弛緩作用에 기인하는 것으로 思料되어진다.

血壓은 家兎頸動脈血壓試驗에서 檢液投與로 血壓降下作用이 나타났으며, 呼吸에는 별다른 影響을 주지 못하였다.

以上과 같은 實驗成績을 綜合考察하면 Melilotus 엑기스는 急性毒性이 認定되지 않았으며, 鎮痛鎮靜效果, 腸平滑筋弛緩效果, 抗炎症效果, 血管擴張作用 및 血壓降下效果가 있음을 알았다. 本 實驗에 必要한 實驗材料를 알선해 준 三進製藥(株)와 安進製藥(株)에 깊은 感謝를 드리는 바이다.

<1983년 6월 8일 접수>

參考文獻

1. Funai Pharma. Ind., Ltd.: 에스バリ펜 文獻集 1.
2. Schwarz, Hoffschmidt: *Naturwiss.*, 45, 519 (1958)
3. Ziegler, Nolken, Fuchs: *Monatsh. Chem.*, 91, 1124 (1960)
4. Weygand, Simon, Floss: *Z. Naturforsch.*, 15 B, 765(1960)
5. Pabst, Klemm: *Med. Monatsch.*, 14, 589 (1960)
6. Collentine, G.E. et al.: *Am. J. Med. Soc.*, 222, 7 (1951)
7. Shiller, A.A.: *Am. J. Physiol.*, 165, 293 (1951)
8. Bohr, D.F. et al.: *J. Pharmacol.*, 97, 243 (1949)
9. Kovách, A.G.B. et al.: *Ärztl. Forsch.*, 19, 610 (1965)
10. Shimomura, Y. et al.: *Acta. Med. Univ. Kioto.*, 39, 170 (1965)
11. Shimamoto, T. et al.: *Arzneim-Forsch Drug. Res.*, 15, 897 (1965)
12. Lenfeld, G. et al.: *Lék. Listy.*, 9(20), 459 (1954)
13. Kovách, A.G.B. et al.: *Ärztl. Forsch.*, 14(9), 469 (1960)
14. J.T. Litchfield and Jr. F. Wilcoxon: *J. Pharmacol.*, 22, 246 (1949)
15. Siegmund, E. et al.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 95, 729 (1959)

17. 洪南斗：慶熙藥大論文集, 5, 27 (1977)
18. Koster, R. *et al.*: *Fed. Proc.*, 18, 412 (1959)
19. 高木敬次郎, 原田正敏：日藥誌, 89, 819 (1969)
20. 山原條二：日藥理誌., 72, 899 (1976)
21. 高木敬次郎, 小澤光：藥物學實驗., p-96, 南山堂 (1970)
22. Takagi, K. *et al.*: *Chem. Pharm. Bull.*, 6, 716 (1958)
23. 高木敬次郎, 萱岡節子：日藥誌., 88(1), 14 (1968)
24. 加藤正秀 等：日應用藥理, 5, 631 (1971)
25. 田村豊幸：藥理學實驗法., p-194, 協同醫書出版社, 1972
29. 洪承喆：釜山大學論文集, 18(自然科學編), 97 (174)
27. 古家敏夫：日藥理誌., 55, 1192 (1959)
28. 鶴見介登 等：日藥理誌., 72, 41 (1976)