

한국 전통생약의 약리작용과 활성물질에 관한 연구(VI).

蛇莓의 Tannin계 물질

이 인 란·위 승 원·한 용 남*

이화여자대학교 약학대학·*서울대학교 생약연구소

Studies on the Pharmacological Actions and Biologically Active Components of Korean Traditional Medicine (VI). Tannins from *Duchesnea indica*

Ihn Rhan Lee, Seung Won Wee and Yong Nam Han*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, and *Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Abstract—This study was conducted to purify and characterize a polysaccharide fraction from whole parts of *Duchesnea indica* (Andr.) Focke, which was previously reported to show an antitumor activity by us. The plant was extracted with 5% ethanol for 3 days in the room temperature. The extract was dialyzed by 5% ethanol, and then concentrated by extraction with excess n-butanol, followed by gel filtration on Sephadex G-25 using 5% ethanol as an eluent solvent to give two peaks named Fr. a and b. Each was composed of gallic acid, hexose, pentose, uronic acid and protein, indicating that both fractions were tannic polysaccharide containing protein. Heat treatment of them yielded gallic acid less polysaccharides. They showed a colony stimulating factor activity.

Keywords—*Duchesnea indica* · tannin · polysaccharide · colony stimulating factor activity

뱀딸기(*Duchesnea indica* (Andr.) Focke, Rosaceae)의 전초를 蛇莓라하여 예로부터 한방 및 민간에서 淸熱, 解毒, 消炎, 止血, 痛月經작용이 있다고하여 胎熱, 白喉, 세균성이질, 急性穿孔性闌尾炎 및 腫瘍에 쓰여왔다. 생물활성으로는 항염증작용 및 황색포도상구균, 뇌막염구균 이질간균, Typus균에 대한 억제작용이 보고되어 있다.^{1~5)} 이에 연자는 1985년 이래 사매의 성분 및 생리활성에 관한 연구^{8~13)}를 계속하여 사매의 에틸분획에서 estrogen 및 histamine 효능작용이 있음을 확인하고 sterol 화합물을 분리하였으며 이 분획이 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus*

*niger*와 같은 세균 및 진균에 대한 항균력이 있음을 확인하였다. 1986년에는 ICR mouse를 사용하여 Sarcoma 180 cell에 대한 항암실험을 실시한 결과 사매의 수용성 분획에서 유의성있는 항암작용이 확인되었으며 이 분획에서 다당체와 단백질이 검출되었다. 1987년에는 사매의 메탄올가용부를 제거한 수용부를 아세트산, TCA(trichloroacetic acid)등으로 처리한 6개의 분획에서 4개의 분획이 *Streptococcus dysenteriae*, *S. aureus*, *S. paratyphy*에 강한 항균력이 확인되었고, 항암성이 있는 사매의 다당류 구성성분은 L-arabinose, D-xylose, D-glucuronic acid, D-fructose, D-galactose, D-glucose 이 밝혀졌다.

1988년에는 사매에서 ellagic acid를 분리하였고 이 물질이 함유된 분획이 *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *S. dysenteriae*에 대해 항균력이 있음이 또한 확인되었다.

그리하여 연자는 항암성과 항균성을 나타내는 고분자물질에 흥미가 있어 연구한 결과 이 물질들은 순수한 다당체나 단백질만이 아닌 tannin계 물질로, gallic acid와 결합되어 있어 이에 보고하고자 한다.

실 험

고분자 물질의 추출

사매는 1987년 8월 서울근교에서 채집건조한 것이다.

사매 1.4 kg에 증류수 8 l를 가하고 수욕상에서 환류냉각하면서 5~6시간 3회 가열추출한 뒤, 그의 여액을 70~80°에서 감압농축하였다. 잔사를 약 4배량의 증류수에 녹이고 4°에서 7,000 g로 30분간 원심분리하여 그의 상등액을 모아 70~80°에서 감압농축하고 이 농축액을 95%에 탄올로 4°에서 7일간 투석한 후 다시 증류수로 이틀간 투석하였다(Dialysis sack: pore size, MW 12,000이상, Sigma). 투석내액을 70~80°에서 감압농축하여 예기스 83.64 g을 얻었다(이하 DI-A라 한다).

한편 사매 60 g에 5%에탄올 600 ml을 넣어 실온에서 72시간 방치하여 추출한 후, 그의 여액을 5%에탄올로 실온에서 48시간 투석하고 투석내액의 1/6량을 취하여 50° 이하에서 20 ml가 되도록 감압농축하였다(이하 DI-B라 한다).

나머지 투석내액 5/6량을 부탄올로 추출하여 약 50 ml의 수층을 얻었다(이하 DI-C라 약한다).

Gel filtration에 의한 고분자 물질의 분리

Sephadex는 모두 5% 에탄올로 세척하고 탈기하였으며 용출용매도 같은 용매를 썼다.

i) DI-A 1.5 g을 증류수 45 ml에 녹인 후, 1/3량을 취한 것과 또 한편 DI-A 1 g은 증류수 15 ml에 녹인 후 48시간 투석한 내액을 각각 Sephadex G-75 column (3.8×138 cm)에 걸어 용출액 15 ml씩 취하여, 이 분획들에 대하여 UV 270 nm에서의 흡광도를 측정하고 anthrone 반응

을 실시하였다.

또한 이 물질들을 정제하기 위하여 이 물질의 void volume 부근에서 용출된 분획 1 (Fr. 1)을 모아 감압농축하여 Sephadex G-150 컬럼(3.6×85 cm)에 걸고 5%에탄올로 용출시켜 분획 10 ml씩 취하였고 이 분획들에 대하여 anthrone 시험과 Lowry법에 의한 단백질 정량을 하였다.

ii) DI-B를 Sephadex G-75 컬럼(3.8×138 cm)에 15 ml씩 분획하고, 각 분획에 대하여 UV 270 nm에서 흡광도를 측정하고 anthrone 반응을 실시하여 Fr. α , β 및 γ 를 얻었다. 그중 Fr. β 와 γ 를 각각 50°이하에서 감압농축하여 Sephadex G-25 컬럼(2.8×90 cm)에 걸었다.

iii) DI-C 40 ml를 Sephadex G-25 컬럼(3.8×124 cm)에 걸어, 15 ml씩 분획하고 이에 대해 UV 270 nm에서의 흡광도 측정, anthrone 시험, carbazol법에 의한 uronic acid 시험, Lowry법으로 단백질 정량을 자기 실시하였다.

당의 분석

i) Hexose : 검체 0.5 ml에 anthrone-H₂SO₄ 시액 3 ml를 넣고 빙수욕상에서 잘 섞은 후, anthrone-H₂SO₄법¹⁴⁾으로 hexose를 분석하고, 이때 표준품은 glucose를 사용하였다. ii) Pentose : 검체 3 ml에 0.1% FeCl₃/conc. HCl 3 ml와 1% orcinol/95% ethanol 0.3 ml를 넣어 섞은 후, orcinol법¹⁵⁾으로 분석하였고, 이 때 표준품은 xylose를 사용하였다. iii) Hexosamine : 검체를 산 가수 분해하여 그의 0.5 ml에 acetylacetone시액 1 ml, 96% ethanol 10 ml, *p*-dimethylaminobenzaldehyde시액 1 ml를 넣어 섞은 후 Elson-Morgan법¹⁶⁾으로 분석하였다. 이 때 표준품으로서 galactosamine·HCl, sodium chondroitin sulfate를 사용하였다. iv) Uronic acid : 검체 1 ml에 sodium borate, conc. H₂SO₄시액 5 ml, carbazol시액 0.2 ml를 써서 carbazol법¹⁷⁾으로 분석하였다. 이 때 표준품으로서 sodium chondroitin sulfate (uronic acid 34% 함유)를 사용하였다.

단백질의 분석

검체 1.2 ml에 alkaline copper시액 6 ml와 Folin Ciocalteu's시액 0.3 ml를 넣어 섞은 후 Lowry법에 의하여 단백질을 분석하였다. 이 때 표준품으로 bovine serum albumin (Sigma제품)

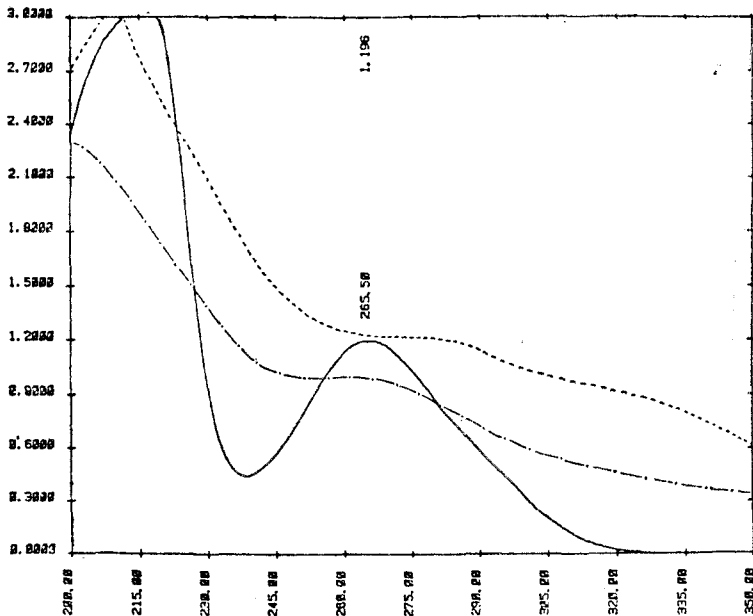


Fig. 1—UV spectra of DI-A, DI-C and gallic acid.
—, gallic acid; - - - - -, DI-A; ······ DI-C.

을 사용하였다.

Phenol성 물질의 분석

DI-A, C를 2 N-H₂SO₄에 녹히고 에탄올 같은 량을 넣어 수용상에서 1시간 가열가수분해하고 에탄올을 감압농축 후 증류수를 넣고 에틸을 넣어 두층을 분리하고 수층을 다시 butanol로 추출하여 butanol층을 분리하였다. 이 에틸층과 butanol층에 대하여 gallic acid와 ellagic acid를 표준품으로 하여 각각 CHCl₃/MeOH(3:1)과 butanol/CH₃COOH/H₂O(5:2:2)용매에서 TLC를 실시 하였다.

Colony stimulating factor (CSF)활성시험

CB-17/ICR strain의 생쥐는 서울대학교 동물사육실에서 구하였다. 생후 1~2개월된 쥐의 뒤대태부의 tibia와 femur를 무균적으로 적출하고 얼음에 채워둔 HBSS(Hank's balanced salt solution)로 씻어내었다. 분리해낸 세포들을 0.6% agar액과 10% FCS(fetal calf serum)을 동량 섞은 배지에 2×10⁶ cells/ml의 농도가 되도록 이식한 뒤 검체의 농도가 배지에 대하여 최종 10%가 되도록 분주하였다. 이 배지를 직경 35 mm의 culture media에서 37°, 5% CO₂, 95%의 습도를 유지시켜 주면서 1주일동안 배양한 후

현미경으로 관찰하였다. 이 때의 대조구는 임파구를 PHA로 자극 배양시킨 배양상등액을 1~3%가 되게 넣었다.

실험결과 및 고찰

고분자 물질의 이화학적 성상

전제로부터 투석분획된 DI-A는 흑갈색을, 냉침제로부터 투석분획된 DI-B와 C는 적갈색을 나타내고, 모두 pH 5의 약산성이며 에탄올과 아세톤에 침전을 형성하고 anthrone반응에 양성, I₂-전분반응에 음성을 나타내 전분이 아닌 다당류임을, 한편 FeCl₃에 청색, Pauly시액에 적색을 나타냈으므로 phenol성 물질의 존재를 확인할 수 있었다(Tab. I).

Gallic acid와 ellagic acid분석

DI-A와 C는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 260~290 nm에서 UV 흡수대를 관찰할 수 있고 이 흡수대는 phenol성 물질에 기인한 것으로 추정되어, 두가지 분획을 산가수분해하여 에틸과 부탄올로 순차적으로 추출한 후 각 분획에 대하여 gallic acid와 ellagic acid를 표준품으로하여 TLC한 결과 에틸분획에서 gallic acid, 부탄올분획에

Table I—Physicochemical properties of a polysaccharide fraction (DI-A) from *Duchesnea indica*

Test	Result
Anthrone	blue-green
Iodine	—*
FeCl ₃	dark blue
Pauly	red
Gelatin	—
Albumin	—

* Negative reaction

서 ellagic acid를 각각 확인하였다. 그러나 DI-A와 C는 gallic acid와 ellagic acid가 구성성분임에도 불구하고 Tab. I에서 보는 바와 같이 일반적인 tannin반응시액인 FeCl₃와 Pauly시액에는 양성이나 gelatin과 albumin시액에 음성을 나타내었다. 이상의 결과에 의해 사매 물추출물 DI-A, -B, -C는 gallic acid, ellagic acid에 당이 결합된 수용성 물질임을 추정할 수 있었다.

Gel filtration에 의해 분리한 성분조성 분석

i) DI-A에 대한 gel filtration—DI-A의 Sephadex G-75에 의한 gel filtration (Fig. 2)의 결과 void volum부근에서 용출된 UV 270 nm에서

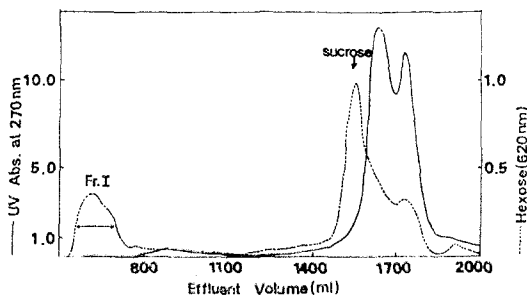


Fig. 2—Gel filtration of DI-A on Sephadex G-75.

DI-A was obtained after concentrating the dialysate of hot-water extract of *Duchesnea indica*. DI-A (0.5 g) was dissolved in 15 ml of 5% ethanol and applied to a column (3.8×138 cm). The sample was eluted with 5% ethanol and fractions of 15 ml per tube were collected. Each effluent was monitored with UV absorption at 270 nm and with hexose reaction by the anthrone/H₂SO₄ method. The fractions indicated by solid bar were collected and concentrated under vacuum to yield Fr. I.

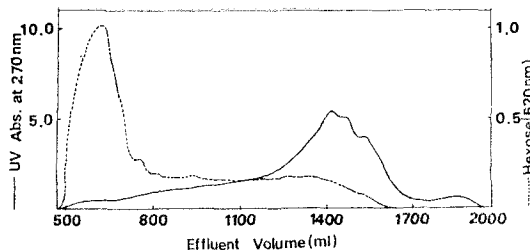


Fig. 3—Gel filtration of the redialysate of DI-A on Sephadex G-75.

The redialysate of DI-A (1g) was dissolved in 15 ml of 5% ethanol and applied to a column (3.8×138 cm). The gel filtration was carried out under the same procedure as that in Fig. 2.

흡수가 없는 다당류분획은 투석전과 후에 서로 변화가 없었으나 void volume의 3.3배 및 3.5배 부근에서 용출된 UV흡수가 있는 다당류 분획은 심한 변화를 보였으며 hexose와 UV흡수 peak가 일치하지 않았다(Fig. 3). 그러므로 투석후 재농축하는 과정에서 열에 의해 계속 분해되는 것을 알 수 있었다.

Void volume부근에서 용출된 Fr. I (Fig. 2) 을 모아 감압농축하고 성분분석을 실시한 결과 Table II에서 보는 바와 같이 hexose 37.8%, pentose 24.7%, uronic acid 29.7%, protein 7.9% 그밖에 hexosamine 0.1%로 구성되어 있

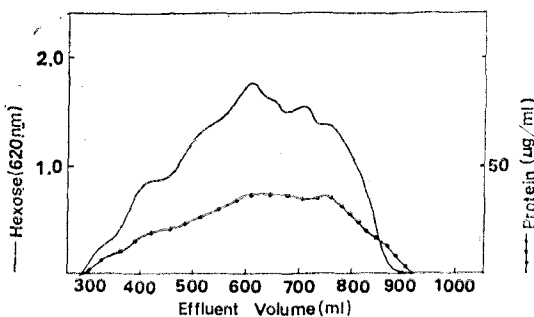


Fig. 4—Further purification of Fr. 1 by gel filtration on Sephadex G-150. Fr. I obtained from the Sephadex G-75 column (see Fig. 2) (10 mg) was dissolved in 10 ml of 5% ethanol and applied to a column (3.6×85 cm). The sample was eluted with 5% ethanol and fractions of 10 ml per tube were collected. Each effluent was monitored with hexose reaction by anthrone/H₂SO₄ method and with protein reaction by the Lowry method.

Table II—Components of polysaccharide fractions

Components	Methods	Contents(%)		
		Fr. I	Fr. a	Fr. b
Gallic acid	UV	—	18.4(6)	21.7(7)
Hexose	Anthrone	37.8(5*)	16.9(5)	20.1(6)
Pentose	Orcinol	24.7(4)	17.4(4)	18.1(4)
Uronic acid	Carbazole	29.7(3.7)	10.7(5)	11.2(5)
Hexosamine	Elson-Morgan	0.1	—	—
Protein	Lowry	7.8	36.6	28.9

* Relative mole ratios

었다. Fr. I을 Sephadex G-150으로 다시 gel filtration을 실시하여 Fig. 4에서 보는 바와 같이 Fr. I은 최소한 7종이상의 물질로 구성된 것으로 볼 수 있어 더 이상 Fr. I의 정제를 시도하지 않았다.

ii) DI-B에 대한 gel filtration—사매의 고분자 물질 (DI)는 열에 매우 불안정한 것을 확인하였으므로, 사매를 냉침한 침제 일부를 50° 이하에서 감압농축하여 얻은 DI-B를 DI-A와 같은 방법으로 Sephadex G-75로 gel filtration한 결과 (Fig. 5), void volume부근에서 UV흡수가 없는 다당류(Fr. I에 해당됨) 분획 Fr. α와, 또한 void volume의 약 3배 및 3.3배 부근에서 hexose peak와 UV흡수 peak가 일치하는 Fr. β 및 Fr. γ를 각각 얻었다.

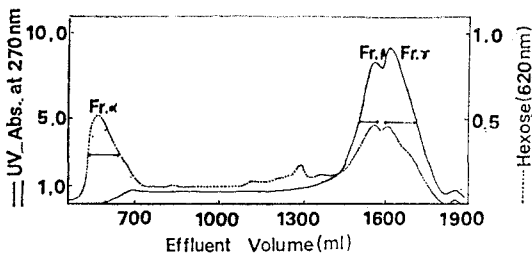


Fig. 5—Gel filtration of DI-B on Sephadex G-75. DI-B was obtained after concentrating below 50° the dialysate of the extract after extraction of *Duchesnea indica* with 5% ethanol in the room temperature. DI-B(20 ml) was applied to a column (3.8×138 cm). The gel filtration was carried out under the same procedure as that in Fig. 2. The fractions indicated by solid bar were collected and concentrated under vacuum to yield Fr. α, β, γ and tested the activity of colony stimulating factor.

Fr. β와 γ를 CHCl₃/MeOH/물 (15 : 10 : 2.5) 용매로 silica gel plate상에서 TLC하여 본 결과 유리당을 검출할 수 없었으므로 Fr. β와 γ의 당은 UV흡수물질과 서로 결합된 상태로 존재하는 물질로 추정하였다.

Fr. β와 γ를 더욱 정제하기 위하여 Sephadex G-25로 gel filtration한 결과(Fig. 6, 7), 예상과는 달리 여러 peak들로 분리되므로 이 물질도 50° 정도의 열에도 쉽게 분해하는 것을 알 수 있었다.

iii) DI-C에 대한 gel filtration—사매의 수용성 고분자물질이 매우 불안정하므로 추출 및 농축과정에서 열을 전혀 가하지 않은 DI-C를 Sephadex G-25로 gel filtration을 실시하였다(Fig. 8). Void volume에서 용출되리라고 생각했던

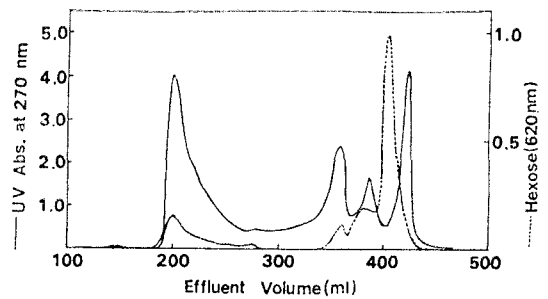


Fig. 6—Further purification of Fr. β by gel filtration on Sephadex G-25.

Fr. β obtained from the Sephadex G-75 column(see Fig. 5) was concentrated below 50° (about 5 ml) and applied to a column (2.8×90 cm). The sample was eluted with 5% ethanol and fractions of 3.5 ml per tube were collected. Each effluent was monitored, with the same procedure as that in Fig. 2, 3 and 5.

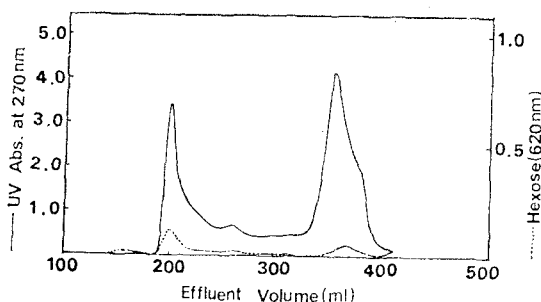


Fig. 7—Further purification of Fr. γ by gel filtration on Sephadex G-25.

Fr. γ obtained from the Sephadex G-75 column (see Fig. 5) was applied to a column (2.8×90 cm). The gel filtration was carried out under the same procedure as that in Fig. 6.

다당류분획(Fr. I 또는 Fr. α 에 해당되는 분획)의 peak가 전혀 관찰되지 않았으며, void volume의 1.4배 및 1.7배 되는 곳에서 두개의 peak가 나타났다. 이 두 peak는 각각 UV흡수, hexose, uronic acid, protein의 peak가 모두 일치하므로 균일한 분자로 구성된 화합물로 추정된다.

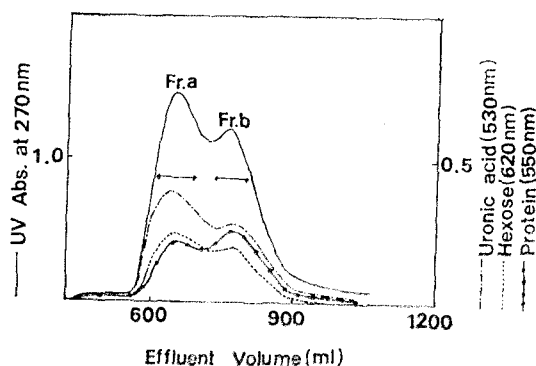


Fig. 8—Gel filtration of DI-C on Sephadex G-25.

DI-C was obtained after concentrating with *n*-butanol the dialysate of the extract after extraction of *Duchesnea indica* with 5% ethanol in the room temperature. DI-C (40 ml) was applied to a column (3.8×124 cm). The sample was eluted with 5% ethanol and fractions of 15 ml per tube were collected. Each effluent was monitored with UV absorption at 270 nm and with hexose reaction by the anthrone-H₂SO₄ method and with uronic acid reaction by the carbazole method and protein reaction by Lowry-method. The fractions indicated by solid bar was collected and lyophilized.

이 두 peak를 Fig. 8에서와 같이 Fr. a와 b로 분획한 후 동결건조하고 성분조성을 분석하여 Table II에 그 결과를 요약하였으며 Fr. I의 것 과도 비교하였다.

Fr. a와 b는 각각 gallic acid, hexose, pentose, uronic acid, protein으로 구성되어 있으며, gallic acid/hexose/pentose/uronic acid의 mole비는 6 : 5 : 4 : 5와 7 : 6 : 4 : 5이며 Fr. b가 Fr. a보다 gallic acid와 hexose의 함량이 약간 크며 protein이 적다. Fr. I은 Fr. a 또는 b와는 달리 gallic acid가 함유되어 있지 않으며 protein 함량이 매우 적고, uronic acid의 pentose에 대한 몰비가 낮다. 이러한 실험결과는 사매의 수용성 다당류 성분이 열에 의해 분해되어 gallic acid, uronic acid 및 protein이 떨어져 나가기 쉬운 물질임을 시사해 준다. 그 결과로 Fr. I은 phenol성 물질에 의한 retard 효과가 없어졌기 때문에 Sephadex G-75에서 void volume부근에 용출된 것으로 생각된다.

한편 Fr. a를 D₂O용매에서 ¹H-NMR를 측정하여 본 결과, δ 7.0 부근에서 aromatic proton으로 보이는 broad peak, δ 3.4~4.2에서 수산기가 결합된 탄소의 수소($\text{C}-\text{H}(\text{OD})$)의 peak, δ 5.3에서 당의 anomeric proton peak, δ 1.2에서 CH₃기 peak가 관찰되었으며, IR spectra에서 3400 cm⁻¹의 알콜성 OH, 1730 cm⁻¹에서 ester, 1600 cm⁻¹에서 peptide 또는 conjugated COOH의 흡수대가 관찰되었다. 이러한 성상은 Fr. a의 물질이 단순한 다당류가 아니며, gallic acid에 다당류와 단백질이 결합된 특유한 구조의 tannin으로 추정된다. 사매의 다당류 성분의 화학적 동정은 계속 연구 되어야 할 것이다.

Colony stimulating factor 활성

사매의 수용성 다당류분획이 항암작용을 나타내므로, ¹¹⁾ Fr. β 와 γ 에 대하여 CSF(일명 granulopoietin) 활성을 측정하여 보았다. CSF는 한천중에서 과립구, macrophage의 간세포를 자극하여 colony를 형성시키기 위해 필요한 인자로 알려져 있다. ¹⁸⁾ Table III에서 보는 바와 같이 Fr. β 와 γ 는 모두 CSF 활성을 나타내며, Fr. γ 가 더 강하였다. 그러므로 사매의 수용성 다당류 phenol 성분은 골수세포를 자극하여 분화시

Table III—Human colony stimulating factor activities of fractions β and γ

CSF-1 Sources	Dilution	# of Colonies mean \pm SEM	Unit/ml
Medium alone		n.d.	
Fraction β	1 : 1	47 \pm 7	186 \pm 30
Fraction β	1 : 3	27 \pm 4	108 \pm 17
Fraction γ	1 : 1	18 \pm 0	72 \pm 0
Fraction γ	1 : 3	27 \pm 8	108 \pm 37
rCSF-1		92 \pm 1	

김으로써 면역반응체계에 어떤 영향을 미칠 수 있다고 본다. Fr. a 및 b, Fr. I에 대해서도 CSF 활성을 측정 중에 있다.

<1989년 5월 19일 접수 : 6월 7일 수리>

文 獻

1. 문교부, 한국동식물도감, 삼화출판사, 서울, 5권, p.515, 1965.
2. 陳在仁, 圖說漢方醫藥大事典, 第四卷, 譜談社, 東京 p.232, 1981.
3. 赤松金芳, 新訂和漢藥, 醫齒藥出版, 東京, p.378, 1970.
4. Lee, S.J., Korean Folk Medicine, Monographs series, No.3, 동명사, 서울, p.68, 1970.
5. 中藥大辭典, 江蘇新醫學院, pp.2116-7, (1978).
6. Mitsuhashi, T., Shibuya, Y. and Endo, S.: *To-kyo Gakugei Daigaku Kiyo* 23, 77 (1971).
7. Mukjee, K.S. and Bhattacharya, M.K.: *J. Indian Chem. Soc.* LX., 507, (1985).
8. Lee, I.R.: *Kor. J. Pharmacognosy*, 15, 85(1984).
9. Lee, I.R.: *J. Kor. Research Institute for Better Living* 35, 129 (1985).
10. Lee, I.R. and Kim, Y.H.: *J. Kor. Reserch Institute for Better Living* 36, 143(1985).
11. Lee, I.R. and Kim, Y.H.: *Arch. Pharm. Res.* 9, 1(1986).
12. Lee, I.R., Kim, Y.H. and Jeong, G.J.: *Yakhak Hoeji* 31, 230 (1987).
13. Lee, I.R., Lee, Y.S. and Han, Y.N.: *Yakhak Hoeji* 32, 308 (1988).
14. Bial, M.: *Deut. Med. Woch.* 28, 253 (1902); 29, 447 (1903).
15. Morris, D.L.: *Science* 107, 254 (1948).
16. Bitter, T. and Muir, H.: *Anal. Biochem.* 4, 330 (1962).
17. Elson, L.A. and Morgan, W.T.J.: *Biochem. J.* 27, 1824 (1933).
18. Walker, F., Nicola, N.A., Metcalf, D. and Burgess, A.W.: *Cell* 43, 269 (1985).