

개느삼의 성분 및 생물활성에 관한 연구

金 昌 玟 · 李 景 福

江原大學校 藥學大學

A Study on Chemical Constituents and Biological Activity of *Echinosophora koreensis* Nakai

Chang Min Kim and Kyeong Bok Lee

College of Pharmacy, Kang Weon National University, Chun Chun 200, Korea.

Abstract—The effects of various fractions from the aerial parts of *Echinosophora koreensis* Nakai on the antimutagenic and the immuno-regulating activities were evaluated by *in vivo* bone-marrow micronucleus test and HA titer reaction. No significant suppressive effects of these extracts and echinoisosophoranone were shown on cyclophosphamide-induced micronuclei, but HA titers were significantly enhanced in ether and BuOH extract treated-group. Tetracosanol and docosanol were isolated from the ether extract of this plant.

Keywords—*Echinosophora koreensis* · antimutagenic activity · haemagglutinating assay · HA titer · docosanol · tetracosanol · echinoisosophoranone

세계적으로 1속 1종인, 개느삼 *Echinosophora koreensis* Nakai(Leguminosae)은 우리나라 특산 식물의 하나로, 함북 북청, 평남 맹산 및 신흥 그리고 강원 양구에 분포되어 있다.¹⁾

본 식물은 Nakai^{2,3)}가 1919년에 *Sophora koreensis* Nakai로 발표하였던 것인데, 1923년에 *Sophora* 속과는 달리 지하경에 의해 퍼져나가고 꽃이 황금색이며 꼬투리에 돌기가 있다는 이유를 들어 한국 특산속 식물로 동정하였으며 Hutchinson⁴⁾도 같은 이유로 Sophoreae족에 본 속을 독립된 속으로 분류하고 있다.

본 식물의 성분에 관하여는 Murakoshi⁵⁻⁸⁾가 수종의 lupine계 alkaloid를 분리보고 하였으며 저자 등이 campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, acetyloleanolic acid, oleanolic acid, scopoletin⁹⁾, hexacosanol, 1-icosanol cafferate¹⁰⁾, 그리고 flavonoid계 성분으로 sophoronol, echinoisosopho-

ranone, echinoisoflavanone 등¹¹⁾을 분리보고한 바 있다.

유연속인 *Sophora* 속에서는 산두근 *Sophora subprostra*의 칩제가 mouse에 접종된 자궁경암을 억제하는 효과가 있고, *Sarcoma* 180에 대한 억제효과도 있음이 알려졌으며, 고삼 *S. fravescens*, 고두자 *S. alopculoides*, 백극화 *S. viciifolis*, 오두근 *S. maried* 및 사생근 *S. moodroftiana* 등도 널리 약용되어 왔으나, 본 식물에 관하여는 약용된 예를 찾아보지 못하였다.¹²⁾

한편 Monroe 등¹³⁾은 식물성 항돌연변이활성물질에 관한 연구를 통하여 본 식물에서도 분리한 바 있는 대부분의 prenylated flavonoids에 높은 antimutagenic activity가 있음을 지적한 바 있다.

이에 저자 등은 본 식물에 함유된 prenylated flavonoids가 구조적으로 특이하고, 그 함량도 높다는 점에 착안하여 항돌연변이원성과 적혈구

응집활성을 검색하고 그 활성성분을 분리규명함으로써 본 식물의 약용적 가치를 규명코자 하였다.

그 결과 본 식물의 용매추출 분획에서는 항돌연변이 활성은 인정되지 않았고 적혈구응집활성 시험에서는 ether분획, EtOAc분획 및 buthanol 분획에서 그 유의성 있는 증가가 인정되었으며, 또한 ether분획에서는 전보에서 보고한 성분 이외로 tetracosanol, docosanol을 추가 분리 규명하였다.

실험 방법

기 기

용점은 Mitamura-Riken의 미량용점측정기를 사용하였으며 보정하지 않았다. H-및 ^{13}C -NMR spectrum은 TMS를 내부표준물질로 하여 Varian FT-80A spectrometer를 사용하여 측정하였고, 질량 spectrum은 Hewlett Packard 5985B GC/MS system을 사용하였다. column chromatography는 RP-8A 및 8B type(Merck사)을 사용하였고 TLC plate는 Kieselgel 60G F₂₅₄ 및 RP-8 F₂₅₄(precoated, Merck사)를 사용하였다.

실험동물

체중 20~25 g의 ICR male mouse를 사용하였다.

검체의 채취, 추출 및 분획

1989년 6월 중 강원도 양구군 일대에서 채집하여 음건한 개느삼의 지상부를 검체로 사용하였다. 검체 약 1 kg을 MeOH로 추출하여 얻은 MeOH ext.를 ether과 물로 분획하여 ether ext.를 얻고, 수층은 다시 EtOAc 및 BuOH로 계속 분획하여 EtOAc ext., BuOH ext. 및 water ext.를 얻었다.

In vivo mouse bone-marrow micronucleus 시험

Schmid 방법¹⁴⁾에 따라 ICR male mouse를 각 시험조당 3마리씩으로 하여 양성대조군으로 cyclophosphamide를 kg당 25 mg씩을 복강내 투여하였고, 검체는 분획별로 kg당 각 200 mg을 cyclophosphamide 25 mg과 함께 경구투여하였다. 또한 순수물질로 분리된 echinoisosphorane¹¹⁾

은 kg당 50 mg을 cyclophosphamide 25 mg과 함께 경구투여하였다. 30 hr. 후에 mouse의 대퇴골로부터 0.2 ml fetal calf serum(GIBCO)을 이용하여 골수세포를 microcentrifuge tube에 채취하고, 1000 rpm으로 5 min.간 원심분리후 serum은 버렸다. pellet을 소량의 serum으로 현탁시킨 후 cell 현탁액 소량을 slide상에 포말하고 24시간 풍건했다. 그 후 slide는 absolute MeOH로 5 min간 고정하고 5% giemsa 염색액(Gurr®66, Sörensens buffer, pH 6.8)으로 20 min.간 염색했다. 증류수로 세척한 후 현미경(1000×)으로 관찰했다.

적혈구 응집소(Haemagglutination Titer, HA titer)의 측정

검체의 조제 및 투여—ICR male mouse를 각 시험조당 5~8마리로 하여 상기 검체를 corn oil에 현탁시켜 kg당 200 mg씩을 5일간 1일 1회 경구투여 하였다.

항원의 조제 및 면역—항원으로서는 면양 적혈구(sheep red blood cell: 이하 S-RBC)를 사용하였다. 음성면양의 경동맥으로부터 채혈한 후 동량의 Alserver's 시액(pH 6.2)을 가하여 14°에 보존하고 2주일 이내에 사용하였다. 보존중인 S-RBC를 사용할 때에는 사용직전 Hank balanced salt solution(이하 HBSS, Gibco)으로 3회 원심세척한 후 적절한 농도로 HBSS에 부유하여 사용하였다. 원심세척한 S-RBC를 HBSS에 2×10^8 S-RBC/ml의 농도로 부유하고 부유액 0.5 ml (1×10^8 S-RBC)를 mouse의 복강에 주사하여 면역하였다.

혈청의 분리 및 비동화—Mouse의 심방으로부터 혈액을 채취 응고시킨 후 원심분리하여 혈청을 분리하고 56°에서 30분간 비동화시킨 후 4°에 보존하여 사용하였다.

적혈구 응집소(HA)의 측정—S-RBC의 응집소가를 microtitration tray(Nuclon microtest tray)를 사용하여 각 실험동물로부터 얻은 개개의 비동화혈청을 각 Well에 HBSS로 2배 비율로 희석한 후 HBSS에 부유한 0.5% S-RBC 0.05 ml를 잘 혼합한 다음 37°에서 18시간 방치하여 적혈구의 응집유형을 판독하였으며 응집을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 그 혈청의 응집소가로 하였다.

Ether 분획의 성분 분리

개느삼의 지상부 약 1 kg을 취하여 MeOH로 추출하고 MeOH 가용부를 감압농축하여 MeOH ext를 얻었다. MeOH ext를 물에 녹여 *n*-hexane으로 추출하고 물층을 다시 ether로 추출하여 ether층을 중화 농축하여 중성분획 58 g을 얻었다.

이를 CHCl₃-MeOH(4:1)로 silicagel column chromatography를 행하고 34~47분획(분획당 20 ml)을 취하여 다시 CHCl₃-MeOH(49:1)로 분획하였다. 이를 분획별로 농축하고 4분획을 MeOH-H₂O계 용매로 Lobar column을 반복하고 acetone으로 재결정하여 물질 1을 얻었다. 상기 ether ext를 물에 녹이고 EtOAc로 추출하여 얻은 EtOAc ext를 *n*-hexane:EtOAc(5:1)로 silicagel column chromatography를 행하고, 그 75~90분획(분획당 20 ml)을 얻어 감압농축후에 acetone을 가하여 생성되는 백색분말을 얻었다. 이를 acetone으로 수회 세척후 PTLC(C₆H₆-MeOH=19:1, *n*-hexane-EtOAc=5:1, 정색:UV-ray, H₂SO₄)를 행하여 단일 spot로 보이는 부분을 분리 정제하였다.

실험 결과 및 고찰

In vivo mouse bone-marrow micronucleus에 미치는 효과—개느삼의 용매 분획과 echinoisosphoranone이 소핵 생성빈도는 Table I과 같았다. 이 cyclophosphamide를 양성대조군으로 하여 투여한 결과가 1.33±0.09인데 비하여 water

Table II. Effect of the extracts of *Echinosophora* plants on the antibody production by HA titer in mice.

Group	HA titer [#]
Control(5)	2.20±0.40
MeOH ext.(5)	2.60±0.49*
Control(5)	2.00±0.00
EtOAc ext.(5)	2.60±0.49**
Control(8)	4.00±0.50
Ether ext.(8)	6.00±1.12***
BuOH ext.(8)	6.38±0.86***

Mice were administered with the plant extracts orally at a dose of 200 mg/kg for 5 days.

[#]: Mean±SD (log₂)

*: p<0.1, **: p<0.05, ***: p<0.01.

ext.가 1.27±0.17, MeOH ext.가 1.17±0.09, BuOH ext.가 1.03±0.05, ether ext.가 1.33±0.05 그리고 EtOAc ext.가 1.23±0.17 및 echinoisosphoranone이 1.10±0.08로 나타났으며 통계적으로 유의차가 없었다.

적혈구 응집소가에 미치는 효과—적혈구 응집소가(HA titer)는 Table II와 같이 MeOH ext.와 EtOAc ext.는 정상군과 비교할 때 유의차가 적었는데 반하여 ether ext.와 BuOH ext.는 정상군과 비교할 때 유의차가 높은 것으로 나타났다.

물질 1

Mp. 76.5-77.5; ¹H-NMR(CDCl₃, TMS) δ:

Table I. Effect of some extracts from *Echinosophora koreensis* and echinoisosphoranone on cyclophosphamide-induced micronucleated polychromatic erythrocyte (MNPCEs)

Compound	Dose(mg/kg)	Exposure time(hr)	MNPCE % (mean±S.D.)
Positive control*	25	3	1.33±0.99
KI+CPA**	50+25	30	1.10±0.08
<i>Echinosophora koreensis</i>			
Water ext. + CPA	200+25	30	1.27±0.17
MeOH ext. + CPA	200+25	30	1.17±0.09
BuOH ext. + CPA	200+25	30	1.03±0.05
Ether ext. + CPA	200+25	30	1.33±0.05
EtOAc ext. + CPA	200+25	30	1.23±0.17

* Positive control: Cyclophosphamide (CPA) in distilled water.

** KI: echinoisosphoranone isolated from aerial parts of *Echinosophora koreensis*.

0.97(3H, t, $J=6, 3$ Hz, $-\text{CH}_3$), 1.25(s, $-(\text{CH}_2)_n-$), 1.50(s, $-\text{OH}$), 3.64(2H, t, CH_2-OH); MS m/z (rel. int.) 336($\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$, 1.8), 308(2.4), 280(2.1), 266(1.8), 252(1.9), 238(2.1), 224(2.1), 210(2.7), 196(2.7), 167(11.2), 139(18.7), 111(55.7), 97(84.5), 96(23.8), 85(36.2), 83(88.7), 82(55.0), 71(48.5), 69(75.3), 57(1100.0), 55(46.1), 43(58.1).

이상의 결과 물질 1은 δ : 0.97(3H, t, $J=6.3$ Hz)의 methyl proton, δ : 1.25(4.2H, s)의 장쇄의 methylene protone, $\delta=3.64$ (2H, t)에서 hydroxyl기에 인접한 methylene protone, 그리고 δ : 1.50에서의 hydroxyl기의 proton에서 hydrocarbon alcohol임을 인지할 수 있었다.

Mass spectrum에서 m/z 336에서의 peak는 tetracosanol($\text{C}_{24}\text{H}_{49}\text{OH}$, m.w. 354)의 molecular ion에서 H_2O 1 mol이 떨어진 것으로 물질 1은 tetracosanol임이 인정되었다.

표품과 직접 비교하여 물질 1이 tetracosanol임을 동정하였다.

Docosanol

EtOAc ext.에서 얻은 백색분말은 $^1\text{H-NMR}$ 을 행한 결과 물질 1과 같은 hydrocarbon alcohol 계통의 물질임을 추정할 수 있었고 이를 OV-1 column(15 m), flow rate: 12 ml/min, init. temp.: 180°/min, rate: 5°/min, isotherm. temp.: 280°의 조건하에서 GC/MS를 행한 결과 Fig. 1과 같이 약 6개의 물질 a~f가 혼합된 것임을 알 수

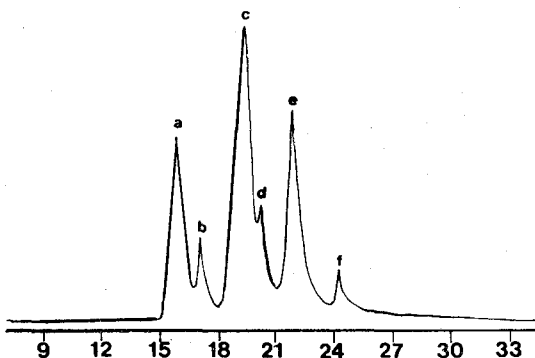


Fig. 1. GC chromatograph of hydrocarbon alcohols from EtOAc fraction.

Column: OV-1(25 m), Temp; init.: 180°/2 min, rate: 5°/min, isotherm.: 280°, flow rate: 12 ml/min.

있었다. 이들은 문헌치와 비교할 때 물질 c는 $\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$: 382인 hexacosanol($\text{C}_{26}\text{H}_{53}\text{OH}$)¹⁰⁾이었음을 동정할 수 있었다.

또한 물질 a는 MS m/z (rel. int.), 308($\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$, 0.6), 280(0.8), 252(0.5), 97(40.7), 83(50.6), 71(26.3), 57(66.2), 55(76.3), 43(100.0), 41(72.6)이었다.

이중 m/z 308은 docosanol($\text{C}_{22}\text{H}_{45}\text{OH}$)의 molecular ion에서 H_2O 1 mol이 떨어진 것으로, 물질 1은 docosanol의 문헌치¹⁵⁾와 일치하였다.

그리고 물질 b, d, f는 계속 규명 중에 있다.

결 론

1. 개느삼의 각 용매분획은 *in vivo* mouse bone-marrow micronucleus에 대한 억제효과는 없었다.

2. 개느삼의 각 용매분획은 적혈구응집소가 측정시험에서 유의성있는 응집활성을 보였으며 그 결과는 MeOH 분획에서 보다 ether ext.와 BuOH ext.에서 높은 경향이 있음이 주목되었다.

3. 개느삼의 ether ext.와 EtOAc ext.에서 각각 tetracosanol과 docosanol을 분리 확인하였다.

감사의 말씀—본 연구는 1989년도 강원대학교 기성회지원에 의한 것임을 밝히며 이에 심심한 감사의 뜻을 표한다.

<1990년 4월 2일 접수: 5월 12일 수리>

문 헌

1. Lee, W.C.: *J. Kor. Pl. Tax.*, 1, 14 (1969).
2. Nakai, T.: *Bot. Mag. (Tokyo)*, 37, 1 (1919).
3. Nakai, T.: *Bot. Mag. (Tokyo)*, 37, 29 (1923).
4. Hutchison, J.: *The Genera of Flowering Plants*, Oxford Univ. Press(London) pp.320 (1964).
5. Murakoshi, I., Fukuchi, K., Haginiwa, J., Ohmiya, S. and Otomasu, H. *Phytochem.* 16, 1460 (1977).
6. Murakoshi, I., Watanabe, M., Haginiwa, J., Ohmiya, S. and Otomasu, H. *Phytochem.* 21, 1470 (1982).
7. Murakoshi, I., Watanabe, M., Okuda, T., Kidoguchi, E., Haginiwa, J., Omiya, S., and

- Otomasu, H.: *Phytochem.* **24**, 2707 (1985).
8. Kim, C.M. and Kang, S.S.: *Yakhak Hoeji* **30**, 139 (1986).
 9. Kang, S.S. and Kim, C.M.: *Arch. Pharm. Res.* **10**, 67 (1987).
 10. Kim, C.M., Ebizuka, Y. and Sankawa, U.: *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2879 (1989).
 11. Fukushima, S.: 抗癌中薬の臨床應用, 醫齒藥出版, Tokyo (Japan), pp.39 (1988).
 12. Monroe, E., Mansukh, C., Govindarajan, H., Philip, A., Harold, T., Thomas, T., Janet, W., and Robert, M.: *J. Nat. Prod.* **51**, 1084 (1988).
 13. Schmid, W.: *Mutation Res.* **31**, 9 (1975).
 14. Grasselli, J.G. and Ritchey, W.H.: Spectral Data and Physical Constants for Organic Compound, CRC Press Inc.(U.S.A.), Vol. III, p.213 (1975).