

영경귀 지상부의 심혈관 작용활성 및 후라본 배당체의 분리

임상선[†] · 이종호 · 박종철*

경상대학교 식품영양학과

*순천대학교 한약자원학과

Isolation of Flavone Glycoside from *Cirsium japonicum* var *ussuriense* and Biological Activity on the Cardiovascular System

Sang-Sun Lim[†], Jong-Ho Lee and Jong-Cheol Park*

Dept. of Food and Nutrition, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

*Dept. of Oriental Medicine Resources, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract

A flavone glycoside was separated from the aerial part of *Cirsium japonicum* var *ussuriense* Kitamura and the effect on cardiovascular system was investigated. The cardiovascular contractility of this compound was observed in the atria and aortae from normal rats. It increased the spontaneous beat in right atria and the contractile force in left atria, and caused the contraction of thoracic aortae. For the blood pressure, it had ascending effect. The effective component, which acted on stimulation and contraction in the atria and aortae of rats was fractionated with *n*-BuOH, separated and identified by column chromatography, UV, IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. The chemical structure for this component was determined to be hispidulin-7- α -rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside.

Key words: *Cirsium japonicum* var *ussuriense*, cardiovascular response, contractility, blood pressure, flavone glycoside

서 론

영경귀(*Cirsium japonicum* var *ussuriense* Kitamura)는 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본으로 민간이나 한방에서 뿌리나 전초(全草)는 주로 출혈성 질환에 지혈을 목적으로 사용되어 왔다. 그밖에 청혈(淸血), 이뇨해독(利尿解毒), 강압작용(降壓作用)이 있어 어혈(瘀血)을 제거하고 토혈, 비혈, 고혈압의 치료에 사용되어 왔다(1-3). 최근 Ishida 등(4)은 *Cirsium japonicum* DC.에서 혈액응고 작용을 하는 성분이 pectorinarin임을 확인하였으나 한국산 *Cirsium*속에 대한 연구로는 주로 flavonoids, phenol 화합물 등의 성분분석에 일관되어 있었고 여러가지 효능과 그 유효성분의 구명이 필요하다. 이에 본 연구에서는 혈액응고, 강압작용, 이뇨작용 등은 심장 및 혈관에 밀접하게 관련되어 있으므로 흰쥐의 적출심장 및 혈관실험, 혈압측정을 통해 그 활성작용을 관찰하였고 유효성분을 분리하였다.

재료 및 방법

재료

영경귀는 1991년 4월 경남 산청군 중산리에서 채취하여 3회 세척하고 이물질을 제거한 후 음건하고 분쇄하여 사용하였다.

시약 및 기기

용매는 특급 및 1급 시약을 column chromatography 용 silica gel은 Kiesel gel 60(70~230 mesh, Merck, Art 7734), Sephadex LH-20(Farumasia)을, precoated Kieselgel 60 F₂₅₄(Merck, No. 5735), 용접은 Perkin-Elmer Electrothermal Digital MP apparatus를 사용하였다. IR spectrum은 Hitachi 270-50을 사용하여 KBr disk법으로, UV spectrum은 Gilford response spectrophotometer, NMR spectrum은 Bruker AM 200 spectrometer로써, 용매는 DMSO-d₆, 내부 표준물질로는 TMS를 사용하

[†]To whom all correspondence should be addressed

여 측정하였다.

추출 및 분리

음건한 영경귀의 지상부의 분말을 80°C 수욕상에서 MeOH로써 3시간 동안 환류냉각하면서 3회 추출하였고, 회전식 진공농축기에서 감압농축하여 MeOH농축 엑스를 얻었다. 이 MeOH엑스를 용매의 극성을 증가시킨 계통분획법에 의해 CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O층으로 각각 분획하였으며 각 분획분들 중 심장과 혈관에 작용하여 활성을 나타내는 *n*-BuOH층을 silicagel column chromatography(CHCl₃/MeOH/H₂O; 65 : 35 : 10, lower layer)와 Sephadex LH-20 column chromatography(10% MeOH, MeOH)를 실시하여 화합물 1을 얻었다(Fig. 1).

심장 및 혈관표본의 준비

적출심장 및 혈관표본은 체중 300g 내외의 SD계 웅성 흰쥐를 두부에 강한 타격을 가하여 치사시킨 후 심장과 흉부대동맥을 적출하여 95% O₂, 5% CO₂의 혼합가스로 포화시킨 Krebs용액에 옮겼다. 심장은 95% O₂와 5% CO₂의 혼합가스가 연속적으로 공급되는 Krebs용액 속에서 좌심방근과 우심방근을 각각 분리하여 10ml 용량의 Krebs액이 담겨있는 37°C의 organ bath에 담고 자동성이 있는 우심방근의 하단은 근육고정기에 고정하고 상단은 등력성 근수축 변화기(force-displace-

ment transducer) F-60에 연결하여 수축력을 연속적으로 기록하였다. 좌심방근도 위의 방법으로 F-60수축력 변환기에 연결하고 근육 고정기에 부착되어 있는 백금 전극을 통하여 전기자극을 주며 빈도 1 Hz, 기간 5 msec의 square wave pulse으로 전기자극기(Type I-10)를 사용하고, 이러한 조건하에서 실험은 근수축이 평형상태를 유지하도록 1시간이 경과한 후부터 시작하였다.

혈관표본은 95% O₂와 5% CO₂의 혼합가스가 연속적으로 공급되는 가운데 혈관 주변의 조직과 지방 등을 제거하고 3mm 크기의 환상으로 잘라 실험에 사용하였다. 혼합가스가 공급되는 10ml용량의 37°C organ bath에 삼각형tungsten wire로 연결한 흉대동맥 고리를 한쪽 끝은 고정하고 다른쪽 끝은 transducer(FT-03, Grass)에 연결하여 polygraph(79E physiograph, grass)의 pen recorder에 기록되게 하였다. 기초장력을 1g으로 하고, 20 분간격으로 krebs용액을 갈아주면서 1시간 동안 평형을 유지시킨 후 실험을 실시하였다.

시료추출물 투입실험

영경귀의 좌, 우심방근에 대한 실험은 *n*-BuOH 분획 추출물을 0.1~100mg% 농도로 첨가하여 심방근의 민강도를 정량적으로 분석하였다.

혈관 수축작용 실험은 *n*-BuOH 분획 추출물 0.1~100mg% 농도를 누적적으로 투입하였을 때의 혈관 수축반응을 관찰하였다.

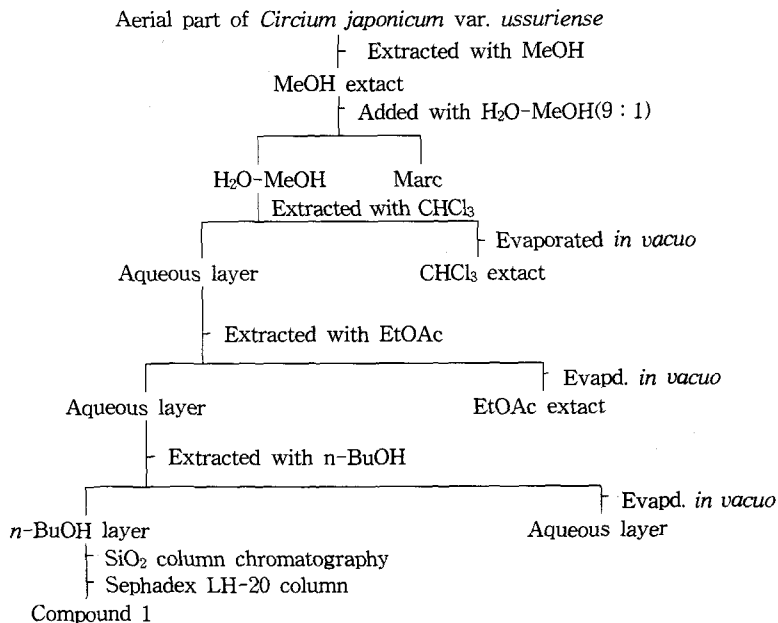


Fig. 1. Extraction and isolation of compound 1 from *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*.

혈압의 측정은 체중 3kg 내외의 가토에 pentobarbital sodium(35mg/kg)으로 마취시킨 후 우측 경동맥과 좌측 경정맥에 cannular를 삽입하여 이를 transducer에 연결시켜 physiograph에 연결한 뒤, 좌측 경정맥에 삽입된 cannular를 통하여 *n*-BuOH 분획 추출물을 주입하였다. 실험결과는 mean ± S.E.로 표시하였다.

결과 및 고찰

적출 심장에 대한 작용

Fig. 2은 심방근에 영경귀의 *n*-BuOH 추출물을 0.1 mg%에서 100mg%까지 적출 심방근에 누진적으로 투입을 하였을 때의 동력성 근수축 변화기에 연결된 physiograph상에 기록된 심방근의 수축력 변화를 나타낸 것으로 우심방근의 박동수는 점차 증가하였고 전기자극에 의한 좌심방근의 수축력도 현저하게 증대되는 것으로 나타났다.

Fig. 3은 흰쥐의 적출한 심방근에 0.1~100mg% 농도로 투입하였을 때의 효과를 시료 투입 전의 최대 수축력에 대한 백분률로 표시한 것으로서 심근의 수축력 변화는 1mg% 농도에서 우심방근의 박동수는 145.3%, 좌심방근의 수축력은 116.4%로 증가하여 저농도(0.1~1mg%)에서는 우심방근에서 더욱 민감한 반응을 보였다. 1mg% 이상의 농도에서는 좌심방근의 수축력이 급격히 증가하였는데 10mg% 농도를 투입하였을 때, 좌심방근의 수축력은 추출물 투입 전에 비하여 228.7%로 증대되었고, 우심방근의 박동수는 167.6%로 증가하였으며 100mg% 농도에서는 좌심방근은 277.7%로 심근수축력이 증대되었고, 우심방근의 박동수는 180% 정도로 증가하였다.

적출혈관에 대한 작용

적출한 흉부대동맥에 영경귀 BuOH 분획추출물을

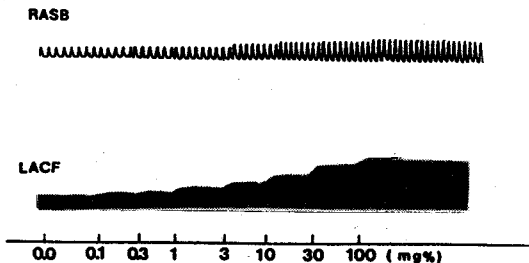


Fig. 2. The effect of BuOH-extract of Unggungqui(0.1~100mg%) on isolated rat heart. LACF indicates left atrial contractile force and RASB means right atrial spontaneous beat.

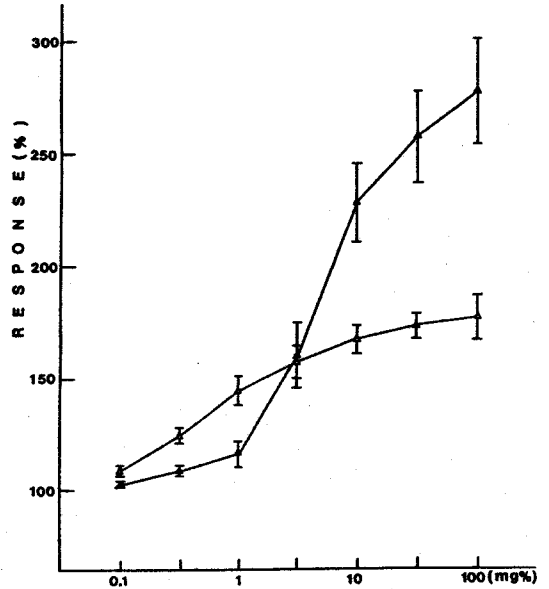


Fig. 3. Concentration response relation for BuOH-extract of Unggungqui(0.1~100mg%) induced relaxation in isolated left atria(▲) and right atria(△). Response values are percentage of peak contractile in control. Each point represents the mean ± S.E.

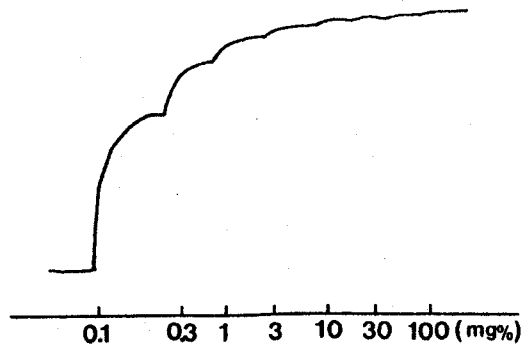


Fig. 4. Tracing of isometric tension recording of isolated rat thoracic aorta. The aorta was exposed to BuOH-extract of Unggungqui(0.1~100mg%). In intact endothelium the extracts produced endothelium the extract caused contraction.

0.1mg%에서 100mg%까지 누진적으로 투입하였을 때 polygraph 상의 pen recorder에 기록된 혈관반응은 Fig. 4와 같다. 10mg% 농도이내에서는 영경귀 추출물의 투입농도를 증가시킬수록 혈관수축이 증대하였다.

Fig. 5는 내피세포가 존재하는 흉부 대동맥에 추출물을 0.1mg%에서 100mg% 농도까지 누진적으로 투입을 하였을 때의 혈관반응을 나타낸 것으로서 0.1mg%의 농

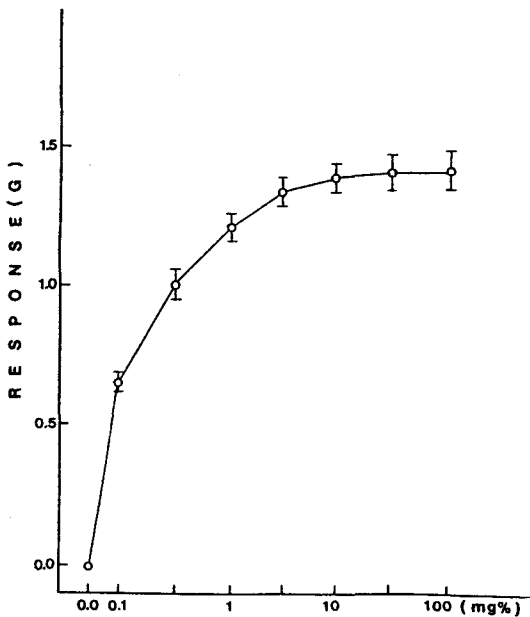


Fig. 5. Concentration response relation for BuOH-extract of Unggungqui(0.1~100mg%) induced contraction of thoracic aortae in intact endothelium. Each point represents the Mean \pm S.E.

도에서는 0.65g 수축하였고, 1mg% 농도에서는 1.21g 수축하였다.

혈압에 미치는 영향

Fig. 6는 가토를 pentobarbital sodium으로 마취시킨 후 영경귀 BuOH 분획추출물을 1~10mg/kg 농도로 경정맥에 주입하였을 때 physiograph로 기록된 혈압변화를 나타낸 것으로 주입용량을 증가시킬수록 혈압은 용량의존적으로 상승하였다. 추출물의 주입 후 가토의 혈압변화는 추출물 주입 전 혈압 90.5mmHg에서 1mg/kg, 3mg/kg 및 10mg/kg 용량으로 주입하였을 때 혈압이 현저히 상승하여 각각 13.9%, 60.2%, 112.7%의 상승율을 보였다(Table 1).

이와 같은 영경귀의 혈관 수축, 심장 수축력의 증가 및 혈압 상승작용 등은 교감신경 α 수용체에 작용하는 약물의 반응과 유사하며 주로 second messenger인 IP₃의 작용에 의해 세포내 칼슘량이 증가되어 일어나는 것으로 알려져 있다(5).

유효성분의 동정

n-BuOH층의 분획본이 심장 및 혈관에 대한 작용을 확인하고 column chromatography로 정제하여 얻은

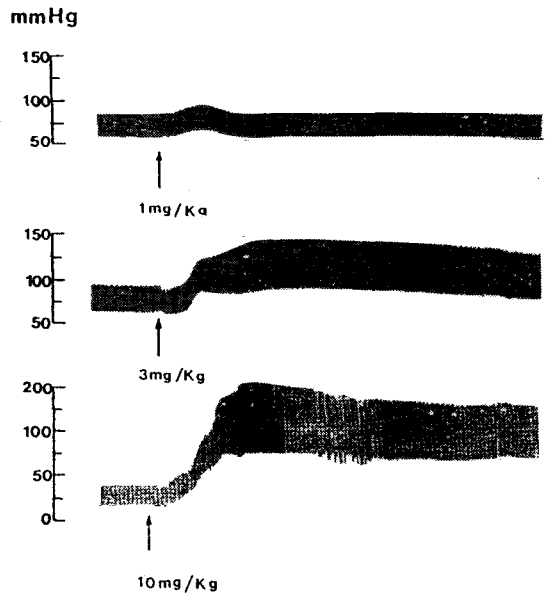


Fig. 6. The change of blood pressure recorded by physiograph, as injection of the BuOH-extract(1~10mg/kg) in pentobarbital sodium(35mg/kg) anesthetized rabbit.

Table 1. Effects of BuOH-extract of Unggungqui on blood pressure in rabbit

	Dose(mg/kg)	Blood pressure(mmHg)
	0.0	90.5 \pm 3.8 ¹⁾
Unggungqui extract	1.0	103.1 \pm 5.3
	3.0	145.0 \pm 7.1
	10.0	192.5 \pm 8.4

¹⁾Mean \pm S.E.

화합물 1의 화학구조를 밝히기 위하여 분석한 결과는 Table 2와 같다.

화합물 1은 FeCl₃, Mg/HCl test에서 양성을 보이고, IR spectrum의 3380cm⁻¹에서 hydroxyl 흡수대와 1659cm⁻¹ ketone 흡수대 그리고 1606, 1569cm⁻¹에서 aromatic double bond의 흡수대를 나타내므로써 aromatic ring에 hydroxyl기와 ketone기가 있는 flavonoid의 일반적 성상과 일치하며, Molisch test에서의 양성반응과 IR spectrum의 1073cm⁻¹의 흡수대는 이 화합물이 flavonoid 배당체임을 예측할 수 있게 하였다. 또한 UV spectrum의 MeOH용매에서 B-ring에 기인한 band I이 333nm로 flavonoid 골격의 C-3이 치환되지 않은 flavone 또는 C-3의 hydroxyl이 치환된 화합물임을 추정할 수 있었다. Shift reagent에 의한 흡수대의 변화를 보면 NaOMe 첨가시 band I이 MeOH용매에서와 비교하였을 때 60nm 장파장 이동하므로써 C-4위치에 free hydroxyl 존재를

Table 2. Physicochemical and spectroscopic data of compound 1

Physicochemical data	Spectroscopic data
mp : 190~192°C	IR(KBr cm^{-1}): 3380(OH), 1659(C=O), 1606, 1569(C=C), 1073(glycosidic C-O)
FeCl ₃ test(+)	UV λ max nm: MeOH; 275, 335, NaOMe; 270, 395, NaOAc; 276, 335, 390 AlCl ₃ ; 280, 305, 366, AlCl ₃ +HCl; 286, 300, 350
Mg/HCl test(+)	¹ H-NMR(DMSO- <i>d</i> ₆ ,200MHz) δ : 7.93(2H,d,J=8.75Hz, H-2'&6'), 7.02(1H,s,H-8), 6.93(2H,d,J=8.75Hz, H-3'&5'), 6.83(1H,s,H-3), 5.33(1H,d,J=7.25Hz, anomeric H of Glucose), 4.65(1H,bs,anomeric H of Rhamnose), 3.77(3H,s,-OCH ₃), 1.11(3H, d,J=6.03Hz,-CH ₃)
Molisch test(+)	¹³ C-NMR(DMSO- <i>d</i> ₆ ,50.3MHz) δ : 182.3(C-4),164.4(C-2), 161.5(C-7), 155.8(C-7), 152.5(C-9), 152.1(C-5), 132.8(C-4'&6'), 128.6(C-2'&6'), 121.1(C-1'), 116.1(C-3'&5'), 105.8(C-10), 102.7(C-3), 100.0(C-1''),98.0(C-1''), 94.5(C-8), 77.7(C-3''), 77.3(C-5''),75.9(C-2''), 72.0(C-4''), 70.6(C-3''), 70.4(C-2''), 69.8(C-4''), 68.6(C-5''), 60.6(C-6''), 60.3(OCH ₃), 18.2(C-6'')

관측할 수 있었다. 또한 AlCl₃ 첨가 후 산을 가하였을 때 AlCl₃ 용매에서와 비교에서 Band I이 30~40nm단파장 이동하지 않으므로 B-ring에 ortho dihydroxyl기가 없음을 확실하고, MeOH의 흡수대와 비교하였을 때 20nm장파장 이동하므로 C-5의 hydroxyl기와 C-6에 methoxyl기를 예측하였다. NaOAc 첨가시 MeOH와의 비교에서 A-ring에 기인한 band가 변화를 보이지 않으므로 C-7위치의 hydroxyl기가 치환되었을 것으로 추정하였다(6,7).

¹³C-NMR spectrum에서, 80ppm 이하의 고자장 영역을 살펴볼 때 당은 2mole이 존재함을, 그리고 18.2ppm 피크가 관측되어 하나의 당은 rhamnose임을 알 수 있었다. A ring의 data(C-5, 6, 7, 8, 9, 10) 및 C-2, 3 및 4의 signal은 pectolinarin의 spectrum(8)과 매우 유사하므로, 이 화합물은 C-7 위치에 당이 결합하며, C-6 위치에 methoxyl기가 결합하고 있는 flavone 배당체로 추정하였다. 또한 B-ring(C-1', 2', 3', 4', 5', 6')의 부분은 apigenin-7-O-glucoside의 data(6)와 거의 일치함으로써 화합물 1은 B-ring의 C-4' 위치에 hydroxyl기가 결합하고 있음을 나타내고 있다. 따라서 화합물 1은 aglycone이 hispidulin로서 이의 C-7위치에 2mole의 당이 결합하고 있는 화합물임을 추정할 수 있다. 이와 같은 사실은 ¹H-NMR spectrum에서 확실하게 알 수 있다. 즉 δ 7.93 및 δ 6.93의 coupling constant 8.75Hz의 피크에서 B-ring의 H-2', 6'와 H-3', 5'가 meta coupling 하므로써 C-4' 위치에 hydroxyl기가 존재하는 사실을 알 수 있다. 그리고 δ 7.02 및 6.83의 singlet들도 H-8, H-3'으로 assignment되므로써 위와 같은 사실을 뒷받침하고 있다. 당 부분은 ¹H-NMR spectrum에서 2개의 anomeric proton(δ 5.33, δ 4.65) 관측으로 2mole의 당이 존재함을 확인할 수 있으며, 당의 종류는 ¹³C-NMR spectrum을 살펴볼 때 glucose와 rhamnose의 피크와 유사하고, 또한 이미 잘 알려져 있는 rhamnose의 문헌

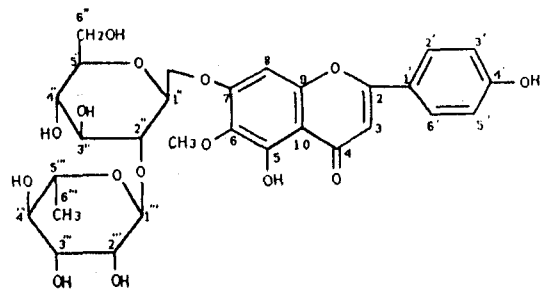


Fig. 7. Structure of hispidulin 7-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside.

치(6)와 비교하여 볼 때 glucose의 C-2와 C-6 위치만 서로 차이가 나고 있음을 알 수 있다. δ 5.33의 β -form임을 나타냄으로써 당은 β -D-glucose의 C-2 위치에 rhamnose가 결합하고 있는 neohesperidose로 확정하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 화합물 1의 구조는 hispidulin 7-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside로 결정하였다(Fig. 7).

요 약

영성취 지상부 중 심혈관계에 대한 영향과 활성성분을 구명하기 위하여 S.D.계 흰쥐의 적절한 심장과 혈관에 대한 작용과 혈압을 측정하였고 그 유효성분을 분리하였다. 영성취 지상부의 MeOH 추출엑스를 계통분획법에 의하여 분획하여 심장과 혈관에 작용하는 BuOH 층을 분리, 정제한 후 UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 분석방법으로 동정한 결과 flavonoid 배당체인 hispidulin 7-O- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside로 밝혀졌으며 흰쥐의 심박수 증가 및 심근과 흉부대동맥을 수축시켰고 혈압을 상승시키는 효과가 있었다.

문 헌

1. 朱榮丞 : 韓國產菊花科 植物에 對한 本草學的 研究. 圓光大學校 大學院(1987)
2. 小學館 : 中藥大辭典. 上海科學出版社, p.1646(1985)
3. 송주택 : 한국식물대보감(하권). 한국자원식품연구소, 제1권, p.284(1989)
4. Ishida, H., Umino, T., Tsuji, K. and Kosuge, T. : Studies on antihemorrhagic substance in Herbs classified as hemostatics in Chinese medicine. VII. On the antihemorrhagic principle in *Cirsium japonicum* DC. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 861(1987)
5. Hallam, T. J. and Rink, T. J. : Receptor-mediated Ca^{2+} entry : diversity of function and mechanism. *TIPS*, **10**, 8(1989)
6. Harbon, J. B. and Mabry, T. J. : The flavonoids. Advances in research. Champman and Hall, London, p.189 (1982)
7. Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. : The systematic indentification of flavonoids. Spinger, NY, p.28(1970)
8. 도재철, 정근영, 손건호 : 물영경귀의 성분에 관한 연구. 대한약학회 학술발표회요지집, p.152(1993)

(1997년 1월 13일 접수)