

한약재 수처리에 관한 연구 (III) - 후박의 수치전·후 Magnolol의 함량분석 및 시험관내에서 최종당화산물 생성억제 효능 -

김진숙* · 김현정 · 고진희
한국한의학연구원, 한약제제연구부

Studies on the Processing of Herbal Medicines (III) - HPLC Analysis of Magnolol and Inhibitory Effects on the Formation of Advanced Glycation Endproducts(AGEs) *in Vitro* of Unprocessed- and Processed Magnolia Bark -

Jin Sook Kim, Hyeun Jeong Kim, and Jin Hee Ko

Department of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of Oriental Medicine, Seoul 135-100, Korea

Abstract – Advanced glycation end products(AGEs) are largely involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. It is obvious that inhibition of AGEs formation is important in preventing the occurrence and progression of diabetic nephropathy. In diabetes, this reaction is greatly accelerated and is important in the pathogenesis of diabetic complications, especially diabetic nephropathy. Therefore, to seek possible AGEs inhibitors in herbal medicines, unprocessed - and processed Magnolia Bark were examined *in vitro* as basic data for animal experiment. The content of magnolol in unprocessed Magnolia Bark was $0.796 \pm 0.072\%$, and after processing was decreased to $0.586 \pm 0.101\%$ ($p < 0.01$). The content of AGEs was measured by their intrinsic fluorescence. The $IC_{50}(\mu g/ml)$ values of aminoguanidine, unprocessed- and processed Magnolia Bark are $38.845 \pm 8.36 \mu g/ml$, $54.264 \pm 3.153 \mu g/ml$ and $27.882 \pm 1.836 \mu g/ml$, respectively. This result means that processed Magnolia Bark was more effective than aminoguanidine, as positive control.

Key words – processing, Magnolia Bark, magnolol, advanced glycation endproduct(AGEs), diabetic nephropathy.

최근 우리나라도 급속한 경제성장과 더불어 당뇨병 유병률이 7~8%에 달하며 이 수치는 서구의 유병률과 거의 비슷한 수준이다.¹⁾ 무엇보다도 10년 후에는 우리 국민 네 명 중 한 명인 천이백만 명이 직·간접적으로 당뇨병으로 인한 고통을 받게 될 것이라고 대한 당뇨병학회는 발표하였다. 특히 한국전쟁이후 태어난 세대가 당뇨에 잘 걸리는 연령대인 40, 50대에 진입한 점을 생각할 때 이들에게서 당뇨병으로 인한 합병증이 본격적으로 나타날 10년 후에는 당뇨병 대란이 일어날 것이라고 그 심각성을 지적하였다. 특히 당뇨병 합병증의 하나인 만성신염이 혈액 투석 치료를 해야 하는 주 원인이다. 이러한 당뇨병성 신염을 일으키는 중요한 인자 중의 하나로 최종당화산물(advanced glycation endpro-

ducts, AGEs)이 관여함이 보고되었다.^{2,3)} 단백질은 정상적인 상태에서 당과 반응하는 비효소적인 반응인 Millard 반응을 일으킨다. 즉 초기단계산물인 schiff base를 형성한 후 재배열되어 아마도리(amadori)형의 조기당화산물이 생성되는데 여기까지의 반응은 가역적으로 일어나 그 농도가 조절된다. 하지만 고혈당 상태에서는 조기당화산물인 아마도리 산물이 재분해되는 대신 재배열되어 단백질과 교차결합하여 비가역적인 최종당화산물이 생성되어 조직에 축적된다. 이 최종당화산물은 한번 생성되면 혈당이 정상으로 조절되어도 분해되지 않고 단백질 생존기간 동안 조직에 축적되어 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시킨다.^{4,5)} Vlassara 등은 정상적인 쥐에 최종당화산물을 장기적으로 투여하였을 때, 신장 무게의 증가, 사구체 이상발달, 사구체막의 이상증대와 지속적인 단백뇨 등의 병리적인 증상을 나타냄을

*교신저자(E-mail) : jskim@kiom.re.kr

보고하였다.⁶⁾ 현재 당뇨병 신염의 치료제는 당뇨병 치료제나 고용량의 스테로이드나 강력한 면역억제제가 쓰여지고 있으나, 혈청크레아티닌이 3 mg/dl이 넘는 경우는 효과가 없어 결국엔 투석용법이나 신장이식이 불가불하다. 그러므로 지속적인 고혈당 상태에서 최종당화산물의 생성을 억제함으로써 투석 또는 이식이란 치료까지 해야 되는 것을 방지 또는 지연시킬 때 환자나 그 가족 일원의 삶의 질을 높일 수 있으리라 여겨진다. 단백질당화 억제제로 유일한 합성제제인 aminoguanidine은 친핵성 히드라진(hydrazine)으로 아마도리 산물과 결합하여 단백질과의 교차결합을 방지함으로써 최종당화산물의 생성을 억제하여 만성신염으로 진전되는 것을 방지함을 보고되었고,^{7,8)} 또한 단백질현상도 지연시킴이 보고되었다.⁸⁾ 현재 대규모의 임상 III 단계까지 진행되고 있으나, 자세한 부작용 확인이 필요하다고 보고하였다.³⁾ 전세계적으로 현대의학을 보완하는 대체의학에 대한 관심이 높아감에 따라 부작용이 적은 의약대체품들이 주목받고 있다. Vinson 등은 ascorbic acid, tocopherol, pyridoxal, niacinamide, sodium selenite, sodium yeast, carnosine 등의 비타민과 영양제들을 연구한 결과 혈장 당단백의 농도가 저하되며, 최종당화산물의 생성이 억제됨을 보고하였다.⁴⁾ Yokozawa 등은 한약재 및 복방의 시험관내에서 최종당화산물 생성억제효과 탐색 결과를 기초로 동물실험을 한 결과 특히 대황추출물 및 진무탕 등이 당뇨병 신염에 효능이 있음을 발표하였다.^{2,3)} 그러므로 본 연구는 우리의 우수한 한약재로부터 만성신염 예방제 및 치료제 개발 목표로 동물실험을 위한 한약재의 선별을 위하여 시험관내의 실험을 실시하였으며, 또한 수치를 하였을 때 그 효능이 증강하는 한약재를 발굴하여 수치방법의 규격화 자료를 동시에 구축하고자 한다. 당뇨 및 신염 치료제로 쓰이는 처방 구성 약재들 중의 하나인 후박을 수치하여, 수치전·후 후박에 관한 효능을 시험관내에서 탐색하였다. 후박은 조습소담(燥濕消痰), 하기제만(下氣除滿)의 효능을 지니고 있어 습체상중(濕滯傷中), 완비토사(腕痞吐瀉), 식積氣滯(食積氣滯), 복창변비(腹脹便秘), 담음전해痰飲喘咳를 치료한다.⁹⁾ 또한 후박의 물추출물의 immediate hypersensitivity 반응에 대한 시험관내와 동물실험에서 항알러지 효능이 있음이 보고되었다.¹⁰⁾ Ikarashi 등은 후박의 메탄올 추출물이 물 추출물이나, 50% 수용성 메탄올 추출물과는 달리 rat의 mast cell에서 항히스타민 유리효과가 있으며, 특히 메탄올 추출물에서 분리된 magnolol과 honokiol의 IC₅₀은 각각 1.04 µg/ml, 2.77 µg/ml이며 실제 함량도 magnolol이 honokiol에 비해서 약 6 배 많음을 분석하여, magnolol을 후박의 유효물질로 제시하였다.¹¹⁾ 이외에도 후박추출물 및 주성분들이 세포사멸효과,¹²⁾ NO 합성과 TNF-α 발현 억제효과,¹³⁾ 항진균효과,¹⁴⁾ 정신안

정제¹⁵⁾ 및 피부암억제제¹⁶⁾ 등의 다양한 효능이 있음이 보고되었다. 후박(Magnolia Bark, Magnoliaceae)의 지표물질은 「생약·한약재 품질표준화 연구」를 토대로 magnolol로 결정하였으며,¹⁷⁾ 후박의 수치방법은 한의학의 고전 문헌 및 중국약전을 기초로 정리된 「한약재 수치법제의 규격화연구·보건의료기술연구개발사업」의 결과를 토대로 실시하였다.¹⁸⁾ 이에 수치 전·후 후박의 지표물질인 magnolol의 함량과 시험관내에서 최종당화산물 생성억제 효능에 대한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 후박은 중국산으로 한의유통사업단에서 구입하였으며, 경희대학교 약학대학 한약학과 이제현교수가 동정하였으며, 표본은 한국한의학연구원, 한약제제연구부(표본번호: Kiom-20-8)에 보관되어 있다.

시약 및 기기 - 지표물질인 magnolol은 Wako사(일본) 제품을, bovine serum albumin(BSA), aminoguanidine·HCl, sodium azide, glucose, fructose, NaH₂PO₄·H₂O, Na₂HPO₄·H₂O는 Sigma사(St. Louis, MO, 미국) 제품을 사용하였다. 유기용매는 HPLC용 Merck Co.(독일) 제품을, 그외 시료 추출과 분석을 위한 시약은 분석용 특급 또는 1급 시약을 사용하였다. HPLC는 Dionex사(미국), pump-P580, injector-ASI-100 automated sampler injector, UV/Vis Detector-UV D340S를, Spectrofluorometer는 Shimadzu RF-5301PC(일본) 제품을, 배양기는 Memmert BE500(독일) 제품을 사용하였다.

후박의 수치방법(강(薑)후박) - 후박 10 g에 절단한 건강 0.3 g을 가한 후 물 50 ml를 넣어 후박이 물에 잠기게 하였다. 60°C에서 이미 달궈진 용기에 약재를 삶기 시작하고 10 분 후 70°C로 높여서 50분간 더 삶으면서 물이 거의 없어질 때 후박을 꺼낸 후 자르고 건조하였다.¹⁸⁾

후박과 강(薑)후박의 검액과 표준액의 제조 - 후박과 강 후박 분말 100 mg에 에테르 30 ml를 가하고 30분 동안 환류추출 여과하였다. 잔사를 에테르 20 ml로 세척한 후 모든 여액을 감압농축 건조하였다. 이것을 메탄올에 녹여 정확히 10 ml로 하였다. 지표물질인 magnolol 5 mg을 메탄올 10 ml에 녹여 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.01 mg/ml의 표준용액을 조제하여 각각 10 µl씩 HPLC에 주입하였다. 최대한 오차를 줄이기 위하여 수치전·후의 한약재를 각각 5개씩 추출하였으며, 또한 각각 5번씩 반복하여 HPLC 분석하였다. HPLC상에서의 지표물질 피크는 높이로 환산하였다. 모든 시료는 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 HPLC 분석하였으며 표준물질의 검량곡선식 및 상관계수는 Sigmaplot[®] 프로그램(SPSS Inc. Chicago, IL,

U.S.A.)에 의해 작성되었으며, 수치 전·후의 분석결과를 Student *t*-test로 그 유의성을 검증하였다.

효소반응 - Vinson 방법에 의해서⁴⁾ 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)에 조제한 BSA(10 mg/ml)에 0.1 M fructose 와 glucose 혼합물을 가하였다. 이때 항박테리아제로 0.02% sodium azide를 첨가하였다. 여기에 25, 50, 100 mg/ml의 농도로 증류수에 신선하게 조제한 후박, 강후박을 첨가하여 37°C에서 30일간 배양하였다. 모든 배양액은 4개씩 하였으며, 배양 직전에 질소가스(순도: 99.999%)를 충전시켜 공기로부터 최대한의 오염을 방지하였다.

최종당화산물(AGEs)의 분석 - 배양하지 않은 단백질, 당 및 한약재의 혼합시료를 blank로 하여 각각의 시료를 spectrofluorometer(Excitation : 350 nm, Emission : 450 nm)로 형광정도를 측정하였다. 양성대조군은 0.1 M aminoguanidine·HCl을, 음성대조군은 한약재를 첨가하지 않고 단백질 과 당을 같은 조건에서 배양하였다. 검액의 효능을 이들과 비교분석하였다.

결과 및 고찰

지표성분인 magnolol의 회귀방정식은 직선상($Y=43.5361X + 0.6641$; $r^2=0.99988$)이며 R는 20.134분에서 나타났으며, 후박과 강후박 추출물의 magnolol 피크는 spike test로 확인하였다. 후박과 강후박 중의 magnolol의 함량은 각각 $0.796 \pm 0.072\%$, $0.586 \pm 0.101\%$ 로 수치를 통하여 유의성 있게 감소하였음이 나타났다($p<0.01$)(Fig. 1, Table I). 최종당화산물은 형광을 지니고, 갈색을 띠고 있으며 교차결합을 할 수 있는 물리화학적 특성을 지니고 있을 뿐 아니라 세포막 수용체가 인지할 수 있는 배위자를 지니고 있다.²⁾ 이러한 특성을 지닌 배양액 중의 최종당화산물의 양을 spectrofluorometer로 측정하여 그 생성 정도를 분석하였다. 30일간 배양하였을 경우, 후박은 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 최종당화산물 생성억제 효과가 $11.666 \pm 0.225\%$, 49.272

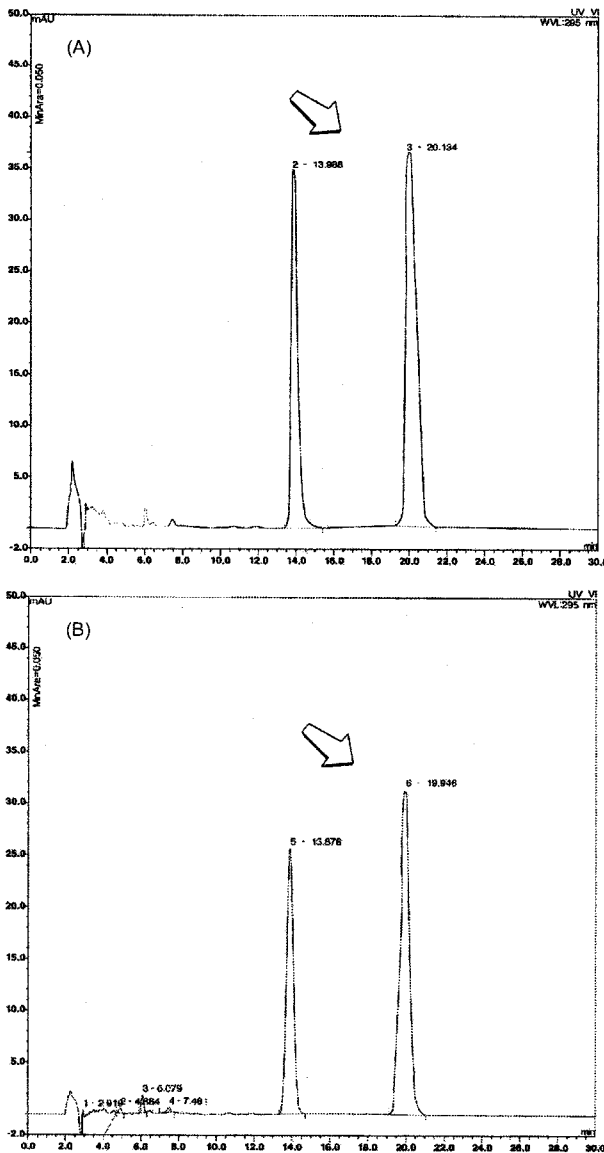


Fig. 1. HPLC Chromatogram of unprocessed(A)- and processed(B) Magnolia Bark extract. Stationary phase: Spherex 5 C₁₈(250×4.6 mm); mobile phase: CH₃CN : H₂O : Acetic acid= 50 : 50 : 1; detection: UV 295 nm; flow rate: 1.0 ml/min.

Table I. Content of magnolol in Magnolia Bark extract

Herbal medicine (std. comp.)	Magnolia Bark(Magnolol)	
	Before processing	After processing
Content (%)	0.796±0.072%	0.586±0.101%**

** : P<0.01

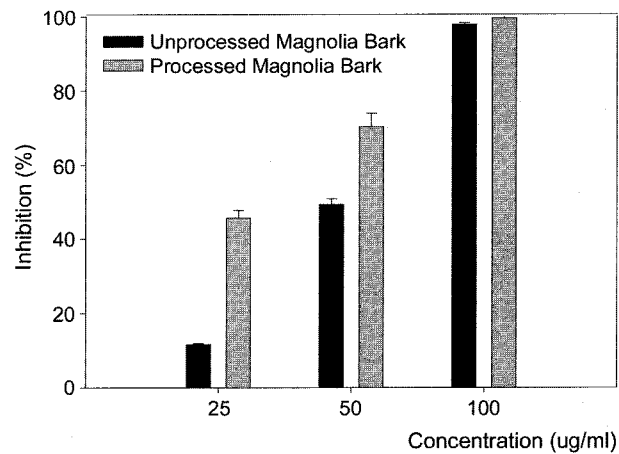


Fig. 2. Inhibitory effect on AGEs formation of unprocessed- and processed Magnolia Bark extracts.

Table II. Concentration for 50% inhibition(IC₅₀) aganist *in vitro* AGEs formation

Herbal medicine & Control	50% Inhibition (µg/ml)
Unprocessed Magnolia Bark	54.264±3.153
Processed Magnolia Bark	27.882±1.836
Aminoguanidine ·HCl	38.845±8.360

±1.539%, 97.837±0.409%이며, 강후박은 45.606±2.113%, 70.254±3.655%, 99.524±0.562%의 효능을 보였다(Fig. 2). 또한 양성대조군인 aminoguanidine은 27.5 µg/ml, 55 µg/ml, 110 µg/ml, 550 µg/ml에서 각각 최종당화산물 생성 억제효과가 45.775±2.398%, 55.432±3.993%, 73.523±1.752%, 96.410±2.202%의 효능을 보였다. 또한 aminoguanidine의 IC₅₀는 38.845±8.360 µg/ml, 후박은 54.264±3.153 µg/ml, 강후박은 27.882±1.836 µg/ml으로 각각 나타났다. 강후박의 경우 IC₅₀(µg/ml)가 양성대조군인 aminoguanidine보다 저농도이므로 일단 효능이 긍정적이며, 동물실험을 위한 좋은 후보 수치한약재가 될 수 있음을 알 수 있다. 또한 후박의 표준물질인 magnolol의 함량이 수치로 인해서 유의성 있게 감소되었으나, 효능이 고농도(100 µg/ml)에서는 차이가 없는 것을 통해 magnolol이 최종당화산물 생성억제에는 주도적으로 영향을 미치지 않음이 사료된다.

사 사

본 연구는 본 연구원 2002년 기관고유사업인「한약재 수치지에 관한 연구」이며 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

1. Park, Y., Lee, H., Koh, C.S., Min, H., Yoo, K., Kim, Y. and Shin, Y. (1995) Prevalence of diabetes and IGT in Yonchon County, South, Korea. *Diabetes care* **18**: 545-548.
2. Nakagawa, T., Yokozawa, T. and Terasawa, K. (2001) A study of Kampo medicines in a diabetic nephropathy model. *J. of Trad. Med.* **18**: 161-168.
3. Yokozawa, T., Nakagawa, T. and Terasawa, K. (2001) Effects of oriental medicines on the production of advanced glycation products. *J. of Trad. Med.* **18**: 107-112.
4. Vinson, J.A. and Howard, T.B. III (1996) Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *Nutritional Biochemistry* **7**: 659-663.
5. Smith, P.R. and Thornalley, P.J. (1992) Mechanism of the

degradation of non-enzymatically glycated proteins under physiological conditions. *Eur. J. Biochem.* **210**: 729-739.

6. Vlassara, H., Striker, L. J., Teichberg, S., Fuh, H., Li, Y.M. and Steffs, M. (1994) Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 2873-2877.
7. Edelstein, D. and Brownlee, M. (1992) Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. *Diabetes* **41**: 26-29.
8. Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P. and Cerami, A. (1986) Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Sciences* **232**: 1629-1632.
9. 국가약전위원회(2000) 중화민국공화국약전, I부, 204. 화학공업출판사, 북경.
10. Shin, T.Y., Kim, D.K., Chae, B.S. and Lee, E.J. (2001) Antiallergic action of Magnolia officinalis on immediate hypersensitivity reaction. *Arch. Pharm. Res.* **24**: 249-255.
11. Ikarashi, Y., Yuzurihara, M., Sakakibara, I., Nakai, Y., Hattori, N. and Maruyama, Y. (2001) Effects of extract of the bark of Magnolia obovata and its biphenolic constituents magnolol and honokiol on histamine release from peritoneal mast cells in rats. *Planta Med.* **67**: 709-713.
12. Park, H.J., Kwon, S.H., Han, Y.N., Choi, J.W., Miyamoto, K., Lee, S.H. and Lee, K.T. (2001) Apoptosis-inducing costunolide and a novel acyclic monoterpene from the stem bark of Magnolia sieboldii. *Arch. Pharm. Res.* **24**: 342-348.
13. Son, H.J., Lee, H.J., Yun-Choi, H.S. and Ryu, J.H. (2000) Inhibitors of nitric oxide synthesis and TNF-alpha expression from Magnolia obovata in activated macrophages. *Planta Med.* **66**: 467-471.
14. Bang, K.H., Kim, Y.K., Min, B.S., Na M.K., Rhee, Y.H., Lee, J.P. and Bae, K.H. (2000) Antifungal activity of magnolol and honokiol. *Arch. Pharm. Res.* **23**: 46-49.
15. Kuribara, H., Stavinoha, W.B. and Maruyama, Y. (1999) Honokiol, a putative anxiolytic agent extracted from magnolia bark, has no diazepam-like side-effects in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**: 97-103.
16. Konoshima, T., Kozuka, M., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A., Haruna, M., Ito, K. and Tanabe, M. (1991) Studies on inhibitors of skin tumor promotion, IX. Neolignans from Magnolia officinalis. *J. Nat. Prod.*, **54**: 816-822.
17. 생약·한약재 품질 표준화연구보고서(1996) 199. 식품의약품안전청, 서울.
18. 김호철, 김진숙(2001) 한약재 수치법제의 규격화연구, 보건 의료기술연구개발사업최종보고서(00-PJ6-PG5-00-0001), 서울.

(2002년 10월 21일 접수)