

## 한련초로부터 정제한 다당체의 혈당강하 효과

문영희\* · 우은란 · 이동행  
조선대학교 약학대학 약학과

### Hypoglycemic Effect of Polysaccharide Isolated from *Eclipta alba* L.

Young-Hee Moon\*, Eun-Rhan Woo, and Dong-Haeng Lee  
College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

**Abstract** – The major polysaccharide, named EAP, was purified from the aerial parts of *Eclipta alba* by Sepharose CL-2B ion exchange chromatography and recycling HPLC. The molecular weight of EAP was estimated to be 20911.9 D by MALDI-TOF MS. In addition, the sugar composition was determined to be arabinose (23.6%), mannose (24.8%), galactose (12.3%), and glucose (41.3%), respectively, by GC analysis. The EAP decreased the blood sugar level, which was induced by alloxan in rats, dose dependently.

**Key words** – *Eclipta alba*, polysaccharide, hypoglycemic activity

최근 들어 천연물에 함유된 다당류에 관한 다양한 생물활성이 보고되고 있다.<sup>1)</sup> 그 중 식물체에 함유된 다당류의 활성으로는 혈당강하,<sup>2,3)</sup> 항암,<sup>4)</sup> 면역증강<sup>5)</sup> 및 항바이러스 작용<sup>6)</sup> 등이 보고되고 있으며 항암치료의 면역요법제로서 임상에 응용되고 있다.

한련초(*Eclipta alba* L.)는 습지에 자라는 일년초로서 줄기는 유연하고 직립하거나 포복하며 높이 30~60 cm로 전초에 강모가 있으며, 잎은 대생하고 엽병이 거의 없거나 극히 짧은 엽병이 있고 피침형으로 기부 가까이 굵은 3맥이 있고 가장자리에 잔톱니가 있다. 두상화서는 액생 또는 정생하고 8~9월에 핀다.<sup>7,8)</sup> 이 식물은 한방에서 한련초(旱蓮草) 또는 풍장(鱧腸)으로 불리우며 지혈(止血), 배농(排膿)과 머리카락이 희어지는데 약용하고 있다.<sup>9,10)</sup>

성분으로는 잎으로부터 desmethylwedelolactone과 wedelolactone가 분리 보고<sup>11,12)</sup>되었고, 전초로부터 thiophene 유도체로 2-[butadiin-(1,3)-yl]-5-[buten-(3)-in-(1)-yl]-thiophen 등<sup>13-15)</sup>이 분리 보고되었다. 생리활성으로는 Singh등<sup>16)</sup>은 EtOH 엑기스가 사염화탄소로 증류시킨 간기능 회복작용이 있다고 하였으며, Farouk등<sup>17)</sup>은 잎의 MeOH 엑기스에 bacteria 억제작용이 있다고 보고하였다.

저자들은 국내 자생식물의 다당체 연구의 일환으로 한련

초의 다당체를 분리 동정하고 혈당강하에 미치는 영향을 실험하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

#### 실험재료 및 방법

**실험재료** – 한련초는 1998년 9월에 채집하여 완전 건조한 지상부를 실험재료로 사용하였다.

**시약 및 기기** – 표준 단당류는 Aldrich의 The Aldrich Library of Chemical Standards 중 Carbohydrate I을 사용하였고, 분자량 측정용 Pullulan kit는 Waters Co.에서 구입하였다. Open column chromatography용 resin은 DEAE Sepharose CL-2B, Sephacryl HR S-300 및 Sephadex G Series로서 Pharmacia사 제품을 사용하였다. 그외 시약은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. LC는 Recycling preparative HPLC (LC-908), UV는 JAIGEL UV detector 310, RI는 JAIGEL RI detector RI-5를 사용하였고 GC는 HP-5890을 사용하였다. MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) MS는 Perseptive Analytical Elite (USA)를 사용하였으며, Photometer 5010은 녹십자사 제품을, Accutrend<sup>®</sup> GC는 Boehringer Mannheim 제품을 사용하였다.

**실험동물** – 실험에 사용한 흰쥐는 Sprague-Dawley계로서 체중 200~250 g의 건강한 암컷을 조선대학교 실험동물센터에서 분양받아 사용하였다. 실험기간 중에는 사육과 동일

\*교신저자(E-mail) : yhmoon@chosun.ac.kr  
(FAX) : 062-222-5414

조건하에서 (주)천하제일의 실험동물용 고형사료와 물을 자유롭게 먹을 수 있도록 공급하였다.

**다당류의 추출** - 지상부를 세절한 후 상온에서 에탄올로 2회 추출하여 유기층 분획으로 하였으며 잔사를 건조시킨 후 증류수로 수욕상에서 2회 추출하여 수층 분획으로 하였다. 수층 분획을 1/3 정도로 농축하여 2배량의 에탄올을 가하고 0°C에서 방치하여 생성된 침전물을 분리한 후 얻어진 침전물을 증류수에 용해한 후 다시 2배량의 에탄올을 가하여 0°C에서 방치하여 생성된 침전물을 분리하는 방법을 2회 반복 실시하여 얻은 침전물을 다당류 조분획으로 하였다.

**다당류의 정제** - Sepharose CL-2B (pharmacia)에 loading하고 0.5 M NaCl로 흘려서 세부분획후 membrane으로 탈염시킨 후에 비슷한 크기의 분자량을 모아서 recycling LC로 재정제하였다. 1차 정제된 비슷한 크기의 분자량을 모아서 HPLC용 물에 녹인 후 LC에 loading하여 RI와 UV detector로서 peak 양상을 계속 관찰하면서 sharp한 peak가 나올 때까지 recycling하여 다당체(이하 EAP)를 얻었다.

**분자량 분석** - HPLC를 이용하여 standard pullulan (5.9 KD~112 KD)으로 검량곡선을 작성하여 분리한 다당류의 개략적인 분자량을 측정후 MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) MS를 이용하여 정제된 다당류의 분자량을<sup>17,18)</sup> 확인하였다.

EAP를 30°C 진공하에서 24시간 방치하여 수분을 제거한 후 시료로 하였으며 matrix는 DHE (dihydrobenzoic acid, sigma)를 사용하였다.

Matrix solution의 제조는 5 mM의 물:에탄올(2:1, v/v)과 29 mM의 formic acid:water:2-propanol(1:3:2, v/v/v)을 병행하여 사용하였으며, matrix solution을 조제 시 녹지 않은 DHB를 제거하기 위하여 700 g의 원심력으로 원심분리시키고, 상등액을 matrix solution으로 하였다. 또한 당 샘플의 solution에도 5 mM의 물:에탄올(2:1, v/v)과 29 mM의 formic acid:water:2-propanol(1:3:2, v/v/v)을 병행하여 사용하였으며, sample solution 조제시 미량의 녹지 않은 당을 제거하기 위하여 700 g의 원심력으로 원심분리시키고, 상등액을 sample solution으로 하였다. Sample-matrix solution의 제조 시에는 sample:matrix solution(1:5)의 비율로 혼합하였으며, 앞의 방법으로 혼합한 sample:matrix solution을 Maldi-Tof-Mass의 sample plate에 dried drop 방법으로 결정화시킨 후 분자량을 확인하였다. 이때 가장 chromatogram이 우수한 조합은 matrix solution을 물:에탄올(2:1, v/v)로 하고, sample solution을 29 mM의 formic acid:water:2-propanol (1:3:2, v/v/v)으로 나타냈다. Maldi-Tof-Mass로서 분자량 측정시 분자량 확인에 사용된 프로그램은 Maldi-Tof-Mass에 내장된 grams program을 이용하였다.

**조성당 분석<sup>19)</sup>** - 정제된 주다당류 5 mg에 trifluoroacetic acid (TFA) 100 µl를 가하고 밀봉하여 sand bath상에서 100°C로 3시간 동안 가열 후 물을 가하여 반응을 완결한 뒤 동결건조하였다. 반응물에 1 M NH<sub>3</sub> (ammonia solution) 0.1 ml를 넣어 녹인 후 NaBH<sub>4</sub> 용액(Sodium borohydride 0.2 g을 DMSO 10 ml에 녹임)을 1 ml 넣고 40°C에서 90분간 방치하여 환원시킨 후 0.1 ml acetic acid를 넣어 과잉의 NaBH<sub>4</sub>를 제거하고 2 ml acetic anhydride와 촉매로 0.2 ml 1-methylimidazole을 넣고 혼합한 후 실온에서 10분간 방치한다. 5 ml의 물을 넣어 과잉의 acetic anhydride를 분해시키고 냉각 후 dichloromethane 1 ml를 넣고 혼합한 후 분리된 아래층의 용액만을 취하여 40°C에서 용매를 휘산건조시킨 후 다시 dichloromethane에 녹여 GC로 분석하였다.

**Alloxan에 의한 당뇨유발 및 혈당강화 작용 실험** - SD계 흰쥐 7~8 주령(몸무게 200~250 g)된 것을 사용하여 실험 전 15시간 절식시킨 후 꼬리의 끝을 절단하여 혈액 1적을 취하여 ACCUTREND Glucose Test Strips(Accurend GC, Boehringer Mannheim)를 이용하여 혈당을 측정후 alloxan monohydrate를 체중 kg당 100 mg을 복강내 주사하여 인위적으로 당뇨병을 유발시켜 비슷한 혈당치를 나타내는 6 마리를 각 실험군으로 사용하였다.<sup>21,22)</sup> 그리고 실험군에는 EAP의 생리식염수 희석액을 대조군에는 생리식염수를 각각 1 ml씩 3일간 1일 1회 경구투여하였으며 혈당은 시료투여 후 30분에 상기의 방법으로 4일간 측정하였다.

혈당증가 억제율 (%)

$$= \frac{\text{대조군의 증가도} - \text{각 실험군의 증가도}}{\text{대조군의 증가도}} \times 100$$

**통계처리** - 모든 실험치는 평균치와 표준오차를 계산하였으며 각 군의 차이에 의한 통계적 유의성을 student's t-test에 의하여 평가하였다.

## 실험 결과 및 고찰

**다당체의 분자량 및 조성당** - 한편초로부터 조제한 다당체 분획을 DEAE-sepharose CL-2B를 사용하여 0.5 M NaCl로 elution시켜 세분획한 후 membrane으로 탈염시킨 후 비슷한 크기의 분자량을 모아서 recycling LC로 재정제하여 주다당체(이하 EAP)를 얻었다.

EAP에 대하여 HPLC를 이용한 분자량 분석결과 21,000 D로 추정되었으며 MALDI-TOF MS 분석으로 EAP는 20,911.9 D로 확인하였다.

EAP를 trifluoroacetic acid로 가수분해시킨 후 acetic

**Table I.** The Phytochemical properties of the EAP isolated from *Eclipta alba*

Molecular weight*	20,911.9
Component sugars	(mol %)
Arabinose	23.6
Mannose	24.8
Galactose	12.3
Glucose	41.3

\*Molecular weight was measured by MALDI-TOF MS (Voyager<sup>TM</sup>-DESystem).

EPA : The major polysaccharide isolated from *Eclipta alba*.

**Table II.** Hypoglycemic effect of EAP on the blood glucose level in rats treated with alloxan

Times	Experimental groups	
	EAP 50 mg/kg	EAP 100 mg/kg
	(blood glucose level (mg/dl))	
30 min. before injection of alloxan	89.0±4.60	102.2±5.63
After injection of alloxan		
1 day (control)	287.6±11.60	319.0±13.30
2 days	250.0±10.42** (18.6%)	296.6±9.56* (10.1%)
3 days	222.8±11.25** (32.4%)	227.4±15.07** (42.3%)
4 days	178.2±5.18** (45.0%)	172.8±9.51** (71.4%)

Alloxan was given *i.p.* at a dose of 100 mg/kg.

Values are mean ± S.E. from 6 animals.

EPA : The major polysaccharide isolated from *Eclipta alba*.

Remarks (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ ) significantly different from the control mean ± S.E.

Number in parenthesis is percentage of decrease.

anhydride를 1-methylimidazole을 촉매로 alditol acetate 유도체를 제조하여 GC로 당조성을 분석한 결과 arabinose 23.6%, mannose 24.8%, galactose 12.3%, glucose 41.3%로 확인하였다(Table I).

**다당체(EAP)가 alloxan유발 당뇨쥐의 혈당에 미치는 영향** - 한편초에서 정제한 주다당체(EAP)를 alloxan유발 당뇨쥐에게 투여한 후 혈당에 미치는 효과를 경시적으로 측정된 결과는 Table II와 같다.

EAP 50 mg/kg 투여군에서는 alloxan 투여 30분전의 혈당치는 89.0±4.60 mg/dl이었으나 투여 후 1일째에는 287.6±11.60 mg/dl로 혈당이 증가되어 대조군으로 하고, 시료를 투여한 후 1일째에 250.0±10.42 mg/dl로 대조군에 비하여 18.6% 감소하였으며, 2일째는 222.8±11.25 mg/dl로 1일째보다 감소되었다. 3일째에는 178.2±5.18 mg/dl로 대조군에 비하

여 45.0%의 감소로 유의성 있게 혈당강하가 나타났다. 또한 EAP 100 mg/kg 투여군에서는 alloxan 투여 30분전의 혈당치는 102.2±5.63 mg/dl이었으나 투여 후 1일째에는 319.0±13.30 mg/dl로 증가되어 대조군으로 하고 시료투여 후 1일째 296.6±9.56 mg/dl로 대조군에 비하여 10.1% 감소로 유의성이 있었으며, 2일째는 227.4±15.07 mg/dl로 42.3%의 감소를 나타내었다. 그리고 3일째는 172.8±9.51 mg/dl로 대조군에 비하여 71.4%의 감소를 나타내었다. 이 결과로 보아 EAP 50 mg/kg 및 100 mg/kg 투여군 모두 투여 1일째부터 혈당의 감소가 나타났으며 투여 일수의 증가로 혈당의 감소도 강화되었을 뿐더러 50 mg/kg 투여군보다 100 mg/kg 투여군에서 보다 강화된 혈당치의 감소가 나타남으로 보아 EAP는 혈당강하 작용이 있는 것으로 사료된다. 한편 alloxan 투여 후 시간의 경과로 혈당치가 감소된 것으로 생각할 수 있으나 Lekens<sup>20)</sup>는 alloxan에 의한 당뇨유발은 24시간내에 확실하게 나타나며 또한 영원하다고 하였으며, Lee<sup>21)</sup> 등의 보고에서도 alloxan 투여 후 3일째도 증가된 혈당치가 변화가 없는 것으로 보아 alloxan으로 유발된 당뇨는 시간의 경과에 의하여 자연감소는 없는 것으로 본다.

## 결론

한편초에서 주다당체(EAP)를 분리하여 분자량, 당조성 및 함량비율을 측정하고 혈당에 미치는 영향을 측정하였다.

주다당체의 분자량은 20,911.9 D였으며, 당 조성 및 함량비율은 arabinose 23.6%, mannose 24.8%, galactose 12.3%, glucose 41.3%로 확인되었다.

Alloxan으로 유발시킨 흰쥐의 고혈당에 대하여 EAP 50 mg/kg과 100 mg/kg 투여군에서 혈당감소 효과가 있었으며, 투여량의 증가에 따라 혈당감소 효과도 강화되었다.

## 감사의 글

본 연구는 2001년도 조선대학교 학술연구비에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. Srivastava, R. and Kulshreshtha, K.K. (1989) Bioactive polysaccharides from plants. *Phytochemistry* **28**: 2877-2902.
2. Hikino, H., Takahashi, M., Otake, K., and Konno, C. (1986) Isolation and hypoglycemic activity of eleutherans A, B, C, D, E, F, and G: Glycans of *Eleutherococcus senticosus* roots. *J. Nat. Prod.* **49**: 293-297.
3. Kato, A. and Miura, T. (1994) Hypoglycemic action of the

- rhizomes of *Polygonatum officinale* in normal and diabetic mice. *Planta Med.* **60**: 201-206.
4. Medina, F.S., Gamez, M.J., Jimenez, J., Osuna, J.I., and Zarzuelo, A. (1994) Hypoglycemic activity of *Juniper Berries*. *Planta Med.* **60**: 197-203.
  5. Ohno, N., Suzuki, I., Sato, K., Oikawa, S., Miyazaki, T., and Yadomae, T. (1985) Purification and structural characterization of an antitumor  $\beta$ -1,3-glucan isolated from hot water extract of the fruit body of cultured *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 4522-4527.
  6. Zhang, Z., Kiyohara, H., Matsumoto, T., and Yamada, H. (1997) Fractionation and chemical properties of immunomodulating polysaccharides from roots of *Dipsacus asperoides*. *Planta Med.* **63**: 393-398.
  7. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Artai, Y., and Fukuoka, F. (1970) Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes*, an edible mushroom. *Cancer Res.* **30**: 2776-2781.
  8. 李昌福(1982) 大韓植物圖鑑, 鄉文社, 서울 p.763.
  9. 배기환(2000) 한국의 약용식물, 교학사, 서울 p.502.
  10. 李時珍(1975) 圖解 本草綱目, 高文社, 서울 p.630.
  11. Zhu, Y.P. (1998) Chinese Materia Medica, Harwood academic publishers, The Netherlands, p.646.
  12. Bhargava, K.K., Krishnaswamy, N.R., and Seshadri, T.R. (1970) Isolation of desmethylwevelolactone & its glucoside from *Eclipta alba*, *Indian J. Chem.* **8**: 664-665.
  13. Bhargava, K.K., Krishnaswamy, N.R., and Seshadri, T.R. (1972) Desmethylwevelolactone glucoside from *Eclipta alba* leaves, *Indian J. Chem.* **10**: 810-811.
  14. Bohlmann, F. and Zdero, C. (1970) Über die Inhaltsstoffe aus *Eclipta erecta* L. *Chem. Ber.* **103**: 834-841.
  15. Krishnaswamy, N.R., Seshadri, T.R., and Sharma, B.R. (1966) The structure of a new polythienyl from *Eclipta alba*. *Tetrahedron. Lett.* **35**: 4227-4231.
  16. Singh, B., Saxena, K., Chandan, B., Agarwal, S., Bhatia, M., and Anand, K. (1993) Hepatoprotective effect of ethanol extract of *Eclipta alba* on experimental liver damage in rats and mice, *Phytother. Res.* **7**: 154-158.
  17. Redier, D.D., Brown, R.S., Weingerger, S., Kenny, J., and Bailey, J. (1998) Unknown peptide sequencing using matrix-assisted laser desorption/ionization and in source decay. *Anal. Chem.* **70**: 1214-1222.
  18. Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, *Anal. Chem.* **60**: 2299-2307.
  19. Chaplin, M.F. (1994) In carbohydrate analysis, Oxford University Press, p. 6, 32.
  20. Lukens, F.D.W. (1948) Alloxan diabetes, *Physiol. Rev.* **28**: 304-330.
  21. Lee, E.B. and Kim, O.K. (1993) Antihyperglycemic constituents of *Aralia elata* root Bark (I), *Kor. J. Pharmacogn.* **24**: 213-218.

(2003년 7월 8일 접수)