

山楂 분획의 혈관이완 활성과 성분분석에 관한 연구

최호정 · 신동훈 · 김길현 · 신흥묵*

동국대학교 한의과대학 생리학교실

Vasodilatory Effect of the Fractions from *Crataegus pinnatifida* and Isolation of the Active Component

Ho Jeong Choi, Dong Hoon Shin, Gil Whon Kim, Heung Mook Shin*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

This study was performed for the investigation of vasodilatory effects of *Crataegus pinnatifida* Bunge and for isolation and structure determination of the constituent from the active fraction. The fruits of this herbal drug were extracted with 80% methanol, then fractioned successively with methylene chloride, ethylacetate and n-butanol. Among the fractions, ethylacetate fraction exhibited the most effective vascular relaxation against phenylephrine-induced arterial contraction. In order to isolate the active constituent by activity-guided fractionation, this fraction was chromatographed on silica gel to yield seven subfractions. Among the subfractions, the active one showing the most potent vascular relaxation activity was further separated by prep. HPLC with reversed phase Microsorb C-18 column using 1% acetic acid and methanol gradient solvent system to afford one pure compound, which revealed a potent vasodilatory effect. Instrumental analyses (NMR and mass spectrometry) of the isolated constituent indicated this compound to be (-)-epicatechin. The vasodilatory action mechanism of this compound should be further investigated.

Key words : *Crataegi pinnatifida* Bung, vascular relaxation, HPLC, (-)-epicatechin

서 론

고혈압은 유병률이 성인 인구의 약 30%에서 발생하는 흔한 질환으로 뇌졸중, 관상동맥질환, 심부전, 말기 신장질환, 급사 등의 가장 중요한 원인이 된다. 의학통계가 잘 되어 있는 미국의 경우 병원을 찾는 이유 중에서 제1위를 차지하고 있으며 국내에서도 경제 및 사회적으로 서구화, 선진화되면서 유병률이 증가하고 있다. 지금까지 많은 고혈압 치료제들이 개발되어 있지만, 최근 보고서에 의하면 고혈압 환자 중의 약 40-50% 정도가 관상동맥경화(coronary atherosclerosis), 울혈성 심부전 (congestive heart failure), 두통, 머리기침 등과 같은 부작용으로 인해, 약물 요법을 시작한지 6개월 이내에 약물 복용을 그만 둔다고 한다. 따라서 오늘날 합성의약품 보다는 상대적으로 부작용이 적고 장기간 사용이 가능하며 개발에 따르는 비용과 시간이 적게 드는 한약재를 이용한 고혈압의 치료에 주목하고 있다. 이러한 시점에

서 오랜 사용경험을 바탕으로 축적된 임상효과에 근거하여 항 고혈압 효능이 알려진 한약재의 혈관이완 효과와 기전의 연구 및 그 활성성분의 분석은 천연물 한약제제 개발을 위한 기반을 구축하는데 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

山楂 (*Crataegus pinnatifida* Bunge)는 장미과 (rosaceae)에 속하는 산사나무의 성숙한 과실로서 味는 酸甘하고 性은 微溫하며 脾·胃·肝經에 작용한다. 그 消食化積의 효능은 食積停滯, 脘腹脹痛, 泄瀉을 치료하며 活血化瘀의 효능은 產後瘀血腹痛, 惡露不盡을 치료한다^{1,2}. 임상적으로 혈압과 혈청 총 콜레스테롤의 저하에 효과적이며³, 초기 울혈성 심부전^{4,5}, 협심증⁶에 사용되어 왔다. 그 성분은 구연산, 능금산, 비타민 C, 탄수화물, 단백질, crataegolic acid, tannin 및 saponin 등을 함유한 것으로 알려져 있다.山楂의 혈압강하와 관련된 실험적 연구로는 phenylephrine-유도 수축혈관에 대한 혈관이완효능⁷, 내피세포 nitric oxide 유리를 통한 혈관이완작용⁸ 및 이완효능의 신호전달에 PKCa의 활성과 LC20 인산화의 억제에 관여함이 보고되었다^{9,10}. 그러나 혈관이완 작용에 관여하는 활성물질의 분석과 규명에 대한 연구는 찾아 볼 수 없다. 이에 저자는山楂의 혈관이완 효능에 대한 그

* 교신저자 : 신흥묵, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학
· E-mail : heungmuk@donguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2372
· 접수 : 2003/07/14 · 수정 : 2003/08/06 · 채택 : 2003/10/06

동안의 연구를 바탕으로 혈관이완 활성을 나타내는 유효성분을 규명하기 위하여 methanol, methylene chloride, ethylacetate, n-butanol로 순차적으로 추출하여 각 분획에 대한 혈관이완 효과를 검색하였다. 실험결과를 바탕으로 활성이 가장 강하게 나타난 ethylacetate 분획으로부터 활성성분을 분리하고, 기기분석법으로 구조를 규명하였으며 이 물질의 우수한 혈관이완 활성을 확인하였으므로 보고하고자 한다.

재료 및 방법

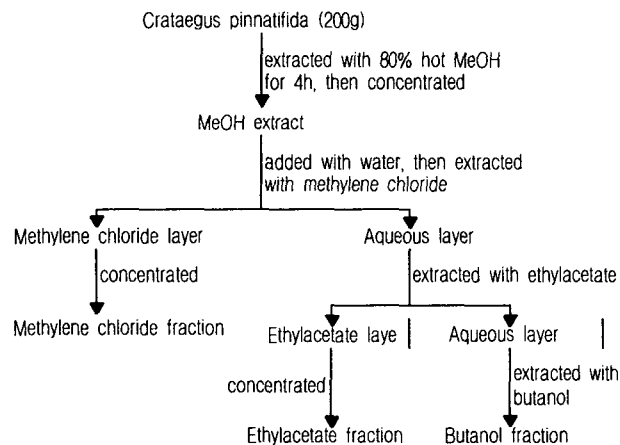
1. 재료

실험동물은 체중 300-350g의 雌性 Sprague-Dawley계 흰쥐를 恒溫恒濕 장치가 부착된 사육장에서 고형사료를 충분히 공급하면서 2주일 이상 실험실 환경(온도, 21±2℃; 습도, 50~60%)에 적응시킨 후 사용하였다. 본 실험에 사용한 山槿는 동국대학교 부속한방병원에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 山槿의 추출 및 분획

건조한 山槿 (*Crataegus pinnatifida*) 200g을 세절하여 round flask에 넣고, 증류수 1000ml을 가하여 가열 추출한 후 추출액을 여과지로 여과하고, 이 여액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결 건조하여 물 추출물 분말 32.95g를 얻었다. 분획물의 제조는 세절한 山槿 200g에 80% methanol 1ℓ을 가하고 80℃에서 4시간 추출하였다. 소량의 추출액을 취하여 감압증류기로 물과 methanol을 완전 제거하고 냉동건조기로 건조하여 총 추출물의 시료로 하였다. 한편, 나머지 추출액은 methanol을 증류하고 물을 더 가한 다음, 비극성 용매에서 극성용매 순으로 순차 추출하여 용매 분획을 제조하였다(Scheme 1). 각 분획의 수득량은 methanol 32.7g, methylene chloride 분획 5.52g, ethylacetate 분획 11.65g, butanol 분획 29.2g이었다. 활성성분의 분리는 혈관이완 활성이 가장 높았던 ethylacetate 분획을 선정하여 다음과 같은 실험을 행하였다.



Scheme 1. Preparation of the methanol extract and the fractions of *Crataegus pinnatifida* using methylene chloride, ethylacetate and n-butanol.

2) 혈관절편의 제작

흰쥐를 마취하여 희생시킨 다음, 즉시 복강을 열고 흉부 대동맥을 적출하였다. 이들 조직을 혼합기체(95%O₂+5%CO₂)로 포화시킨 Krebs-Ringer bicarbonate 용액(NaCl 119.8, KCl 4.6, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucose 10 mM, pH 7.4)에 넣고 실온에서 혈관주위의 결합조직과 지방을 제거하고 약 2mm 정도로 잘라 고리형태의 대동맥환(aortic ring)을 제작하였다. 이렇게 만든 표본을 physiograph 장치에 연결하여 실험에 사용하였다.

3) 혈관수축의 측정

95%의 O₂와 5%의 CO₂를 혼합한 가스가 연속적으로 공급되고 37±0.5℃로 유지되는 Krebs-Ringer bicarbonate 용액(NaCl 119.8, KCl 4.6, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucose 10mM, pH 7.4)이 peristaltic pump를 통하여 4 ml/min의 속도로 흐르고 있는 organ bath(용량 1.5 ml)에 혈관절편을 현수하여 한쪽 끝은 organ bath의 저부에 고정시키고 다른쪽 끝은 근 수축변환기에 연결하여 등척성 장력을 기록하였다. 미세장력 조절장치(Grass FT-03)를 이용하여 초기 장력을 1g 부하하고 1시간 이상 회복시킨 후 실험에 이용하였다. 혈관절편을 3×10⁻⁶M의 phenylephrine (PE)을 사용하여 최고 수축기에 이르렀을 때, 山槿의 물 추출물 및 각 분획을 용량별로 투여하여 나타나는 반응을 physiograph(Grass 7, USA)로 연속 기록하였다.

4) TLC를 이용한 분획물의 성분확인

TLC aluminium sheets (Kieselgel 60F254)를 이용하였고, 전개 용매는 chloroform-methanol-물 30:7:3의 비율로 하여 이완 활성이 가장 높은 ethylacetate 층에 함유되어있는 성분들을 확인하였다.

5) Column chromatography를 이용한 이차 분획물 분리

분리를 위한 고정상은 Merck사의 silica gel 60 (230-400 mesh)을 사용하였다. 이 silica gel을 chloroform에 현탁하여 glass column에 충전시키고 10g의 ethylacetate분획을 loading하였다. 이동상은 용매 gradient를 주어 처음은 chloroform만 흘러 보내고 다음은 chloroform-methanol 10:1, 7:1, 4:1, 2:1, 1:1의 비율로 순차적으로 흘러보내고 마지막에는 methanol만 사용하여 7개의 분획을 얻었다.

6) HPLC 분석

Analytical HPLC는 Gilson사의 306 펌프와 UV detector를 사용하였고, column은 Tosoh사의 TSKgel ODS-80TM column (4.6mmID x 150mm), flow-rate는 1ml/min로 하여 분석하였다. 용매 gradient 조건은 초기 0% B, 10분간 20% B, 10분간 50% B, 10분간 70% B, 10분간 100% B로 총 40분간 측정하였다. 이 때, 용매 A는 1% acetic acid가 함유된 물이고 용매 B는 100% methanol이다. Peak의 검출은 UV 280nm에서 실시하였다.

Preparative HPLC의 분석조건은 analytical HPLC와 동일하고, column은 reverse phase (역상)의 Microsorb C-18 (21.4mmID x 250mm)을 사용하였다.

7) 질량분석

분자량 및 구조 분석을 위해 mass spectrometer (HPLC/MS/MS: Perkin Elmer API2000)를 사용하였다. Injection mode

는 DIP mode이고, 분석 voltage는 45eV로 분석하였다. DIP injection 후 voltage를 변환시키며 분석하여 주 target 물질의 분자량이 291임을 확인하고, 291 peak를 target으로 scanning하여 이온화된 peak를 얻은 후 대상물질의 구조를 확인하였다.

8) NMR 분석

모든 NMR (nuclear magnetic resonance; 핵자기공명분광분석) 측정은 Bruker Avance 400 spectrometer system (9.4T)에서 실행되었다. 1H-NMR 실험은 32K data points를 이용 1s의 relaxation delay를 사용하여 32회의 transients가 실행되었고 90pulse는 9.7s가 적용되었으며, spectral width는 5708Hz를 지정하여 실험을 실시하였다. 13C-NMR 실험에 대하여 64K data points와 2s의 relaxation delay를 적용하여 1024transients가 실행되었고, 90pulse는 9.8s, spectral width는 23474Hz를 지정하여 분석을 실시하였다. Carbon의 종류를 구분하기 위해 DEPT($\theta = 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$) 시험을 수행하였다.

실험성적

1. Phenylephrine 유도 수축혈관에 대한 山槲의 이완효과

내피세포 존재 하에서 $3 \times 10^{-6}M$ 의 phenylephrine에 의한 수축혈관에 대하여 山槲 물 추출물의 농도별 이완효과를 관찰하였다. 추출물은 0.1mg/ml에서 $77.23 \pm 5.20\%$, 0.3mg/ml에서 $95.45 \pm 1.88\%$, 0.5mg/ml 이상에서 100%의 용량의존적 이완효과를 나타내었다 (Fig. 1).

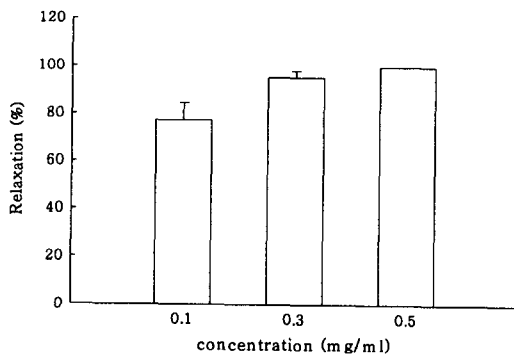


Fig. 1. Relaxation effects of the water extract of *Crataegus pinnatifida* on the phenylephrine-induced contraction at different concentrations in rat thoracic aorta. Values are mean±S.D.(n=7).

2. 山槲 분획물의 혈관이완 활성

山槲 분획의 혈관이완 활성을 농도별로 측정하였다. Fig. 2에서 보는바와 같이 methylene chloride 분획은 오히려 농도의존적으로 PE-유도 혈관수축을 증가시켰으며, methanol 분획은 유의한 영향을 미치지 않았다. Ethylacetate 분획과 butanol 분획은 농도 의존적으로 수축혈관을 이완시켰으며, 그 이완의 정도는 ethylacetate 분획이 0.01mg/ml에서 $43.3 \pm \%$, 0.05mg/ml에서 $68.7 \pm \%$, 0.1mg/ml에서 $87.6 \pm \%$ 의 이완율을 보였고, butanol 분획이 각각 $6.36 \pm 11.29\%$, $52.24 \pm 7.26\%$, $78.29 \pm 16.88\%$ 의 이완율을 나타내어 ethylacetate 분획이 수축혈관에 대한 이완효과가 가장 우수하였다.

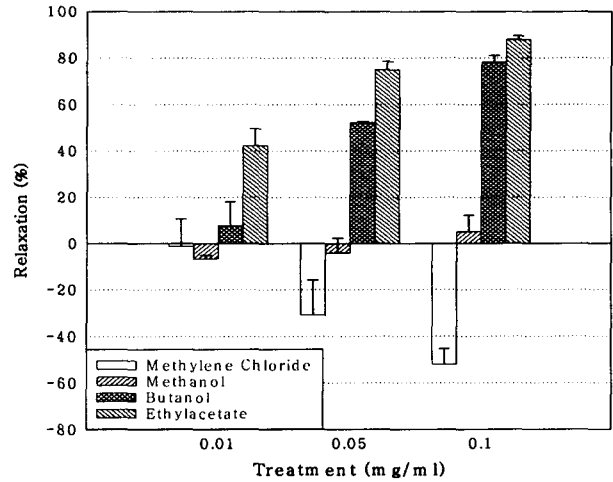


Fig. 2. Relaxation effects of the fractions of *Crataegus pinnatifida* on the phenylephrine-induced contraction at different concentrations in rat thoracic aorta. Values are mean±S.D.(n=4).

3. TLC 분석결과

가장 활성이 뛰어난 ethylacetate 분획 중에 함유된 성분을 조사하기 위하여 먼저 TLC (thin layer chromatography)를 실시하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 분획(A)에는 6-7종의 성분이 함유되어 있음을 알 수 있었으며 이 중에 혈관이완활성을 나타내는 성분이 있을 것으로 추정된다. 단일성분(B)은 분리한 활성 성분을 나타낸다.

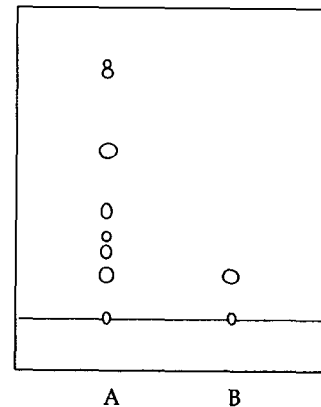


Fig. 3. TLC of the ethylacetate fraction of *Crataegus pinnatifida* using the solvent system chloroform-methanol-water 30:7:3 on Kieselgel 60F254 aluminium sheets. A: ethylacetate fraction, B: pure component (epicatechin)

3. 山槲 ethylacetate 이차 분획의 혈관이완 활성

山槲의 분획 중 혈관이완 활성이 가장 뛰어난 ethylacetate 분획을 column chromatography를 이용하여 용매 gradient를 주어 처음은 chloroform만 흘러보내고 다음은 chloroform-methanol 10:1, 7:1, 4:1, 2:1, 1:1의 비율로 순차적으로 흘러보내고 마지막에는 methanol만 사용하여 7개의 이차분획(subfraction)을 만든 다음, 이들의 혈관이완 효과를 비교하였다.

그 결과, 0.05mg/ml 및 0.1mg/ml의 두 농도에서 chloroform-methanol 2:1의 분획이 가장 강한 혈관이완 활성을 나타내었다(Fig. 4, Fig. 5).

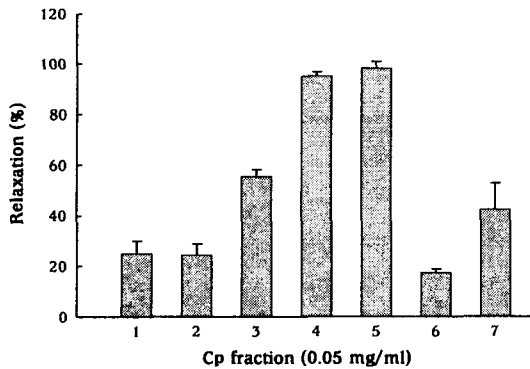


Fig. 4. Vascular relaxation effects of the subfractions of ethylacetate fraction of *Crataegus pinnatifida*(Cp) on the phenylephrine-induced contraction at a concentration of 0.05mg/ml in rat thoracic aorta. Values are mean±S.D (n=3). 1: chloroform, 2: chloroform-methanol 10:1, 3: chloroform- methanol 7:1, 4: chloroform-methanol 4:1, 5: chloroform-methanol 2:1, 6: chloroform-methanol 1:1, 7: methanol

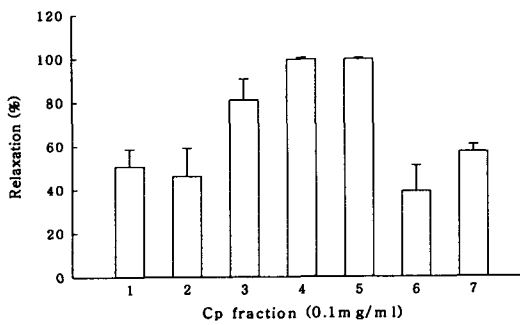


Fig. 5. Vascular relaxation effects of the subfractions of ethylacetate fraction of *Crataegus pinnatifida*(Cp) on the phenylephrine-induced contraction at a concentration of 0.1mg/ml in rat thoracic aorta. Values are mean±S.D (n=3). 1: chloroform, 2: chloroform-methanol 10:1, 3: chloroform-methanol 7:1, 4: chloroform-methanol 4:1, 5: chloroform-methanol 2:1, 6: chloroform-methanol 1:1, 7: methanol

5. HPLC 분석 결과

1) Analytical HPLC

Open column chromatography를 통해 분리한 subfraction 중에서 혈관이완 효과가 가장 높게 나타난 fraction을 methanol 과 물의 용매 gradient를 주어 analytical HPLC로 측정하였다. 4 개의 major peak가 chromatogram 상에 나타나 이 분획에는 적어도 4개 이상의 성분이 함유되어 있는 것으로 분석되었다(Fig. 6).

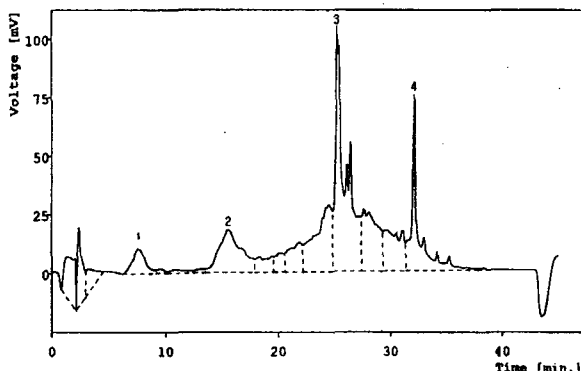


Fig. 6. Analytical HPLC chromatogram of the most active subfraction prepared from the ethylacetate fraction of *Crataegus pinnatifida*.

2) Preparative HPLC

분석용 HPLC를 통해 확인한 4개의 major peak를 각각 분리 하기 위하여 먼저 분취용 (preparative) HPLC로 분석하였다. 측정 조건은 analytical HPLC과 동일한 조건을 사용하였다. Fig. 7 에서 보는 바와 같이 4개의 major peak를 chromatogram상에서 볼 수 있다.

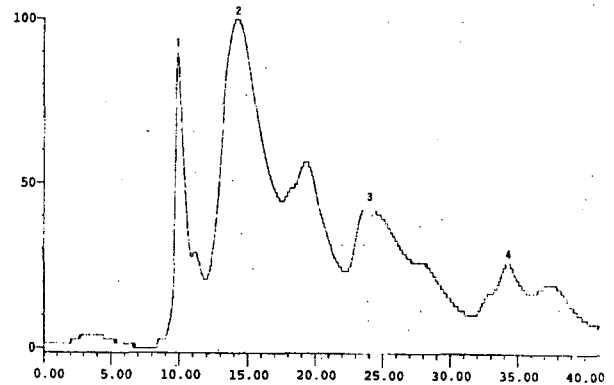


Fig. 7. Preparative HPLC chromatogram of the most active subfraction prepared from the ethylacetate fraction of *Crataegus pinnatifida*.

6. 분리한 성분의 혈관수축 억제활성

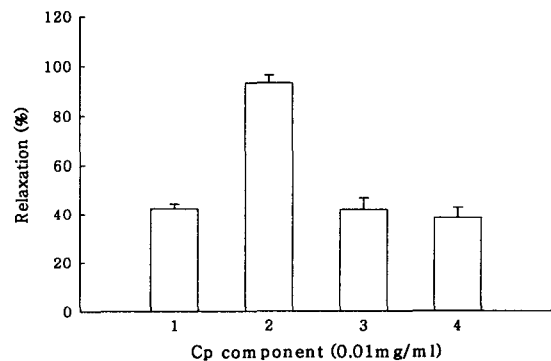


Fig. 8. Vascular relaxation effects of the components isolated by preparative HPLC from ethylacetate fraction of *Crataegus pinnatifida* (Cp) on the phenylephrine-induced contraction at a concentration of 0.01mg/ml in rat thoracic aorta. Values are mean±S.D (n=5).

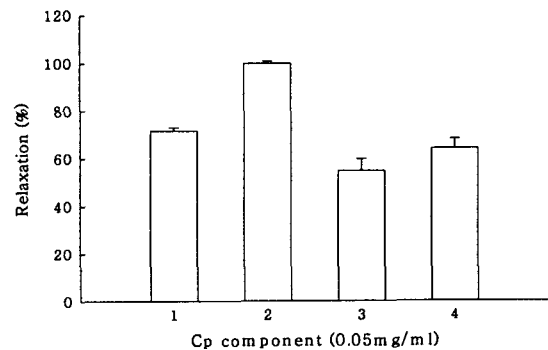


Fig. 9. Vascular relaxation effects of the components isolated by preparative HPLC from ethylacetate fraction of *Crataegus pinnatifida* (Cp) on the phenylephrine-induced contraction at a concentration of 0.05mg/ml in rat thoracic aorta. Values are mean±S.D (n=5).

Preparative HPLC로 분리하여 얻은 4개 성분의 혈관이완 효과를 측정하였다. 이들 성분중에서 성분 2가 0.01mg/ml과 0.05mg/ml의 두가지 농도에서 각각 90.67±3.06%와 93±5.29%의 혈관이완 효과를 보였으며 나머지는 모두 약하였다(Fig. 8, Fig. 9). 특히, 이 성분은 낮은 농도에서 다른 성분에 비해 보다 높은 활성을 나타내었다.

7. 질량분석 (Mass spectrometry)

DIP injection 후, voltage를 변환시키며 분석하여 total ion chromatogram 및 mass spectrum (Fig. 10)을 얻었으며 이 이온들중에서 주 target 물질 (성분 2)의 분자량이 291임을 확인하고, peak 291을 target으로 scanning하여 이온화된 peak를 얻은 후, fragmentation pattern과 분자량을 측정하였다. Target 물질의 MCA scan spectrum은 Fig. 11과 같다.

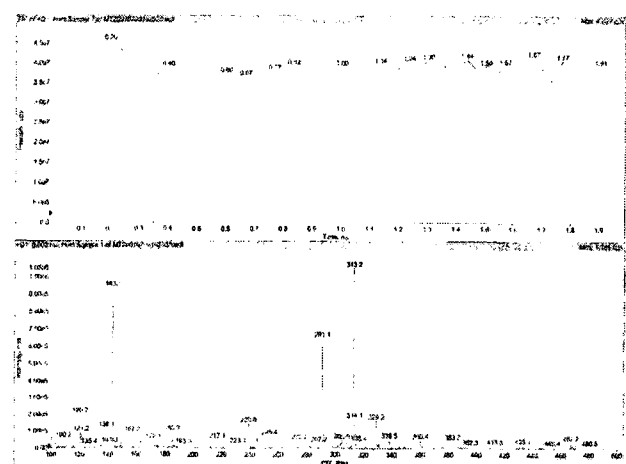


Fig. 10. Total ion chromatogram (upper) and mass spectrum (lower) of compound 2

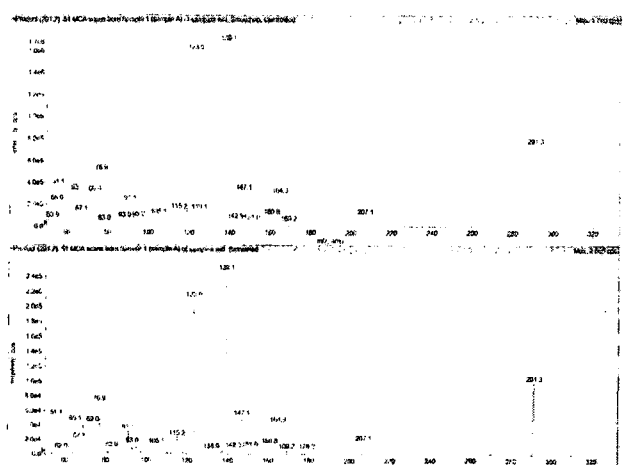


Fig. 11. MCA scan spectrum of compound 2

8. 핵자기공명 분광분석 (NMR spectroscopy)

1) 1H-NMR spectrum 해석

山楢로부터 분리, 정제한 물질들 중 혈관이완 효과가 가장 높게 나타난 성분 2의 구조를 분석하였다. 먼저, 구조중의 수소

의 종류, 수, 위치등을 확인하기 위하여 1H-NMR spectrum을 측정하였다. Spectrum(Fig. 12)을 해석해 보면, H-4의 methylene proton들이 δ=2.49ppm과 2.69ppm에 각각 두 개의 double doublet (dd)으로 나타났으며 H-2와 H-3의 methine proton들은 δ=4.74ppm과 4.02ppm에 각각 나타났고 5개의 aromatic proton peak들은 δ=5.74~6.89ppm사이에 위치하였다. 그리고 5개의 OH는 δ=8.7~9.3ppm사이에서 broad multiplet 형태로 나타났다. 가장 큰 peak (δ=3.7ppm)는 측정 용매중에 함유된 물에서 유래된 것이다.

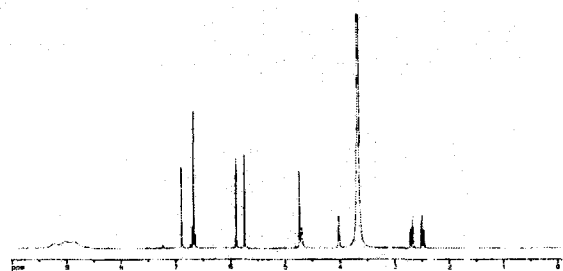


Fig. 12. 1H-NMR spectrum of the compound 2. The greatest peak at δ=3.7ppm is resulted from water contained in the solvent. The broad multiplet peaks at δ=8.7~9.3 correspond five OH protons.

2) 13C-NMR spectrum 해석

성분 2의 구조중의 탄소의 위치, 수, 종류를 확인하기 위하여 13C-NMR spectrum을 측정하였다. Spectrum(Fig. 13)상에서 모두 15개의 탄소수를 확인하였는데 C-12와 C-15는 δ=115.14와 115.17ppm에서 나타나 한 개의 peak로 보이며 C-13과 C-14는 δ=144.79와 144.72ppm에서 나타나 한 개의 peak로 보여 spectrum 상에는 peak가 13개이나 expand spectrum을 보면 탄소수가 15개임을 알 수 있다.

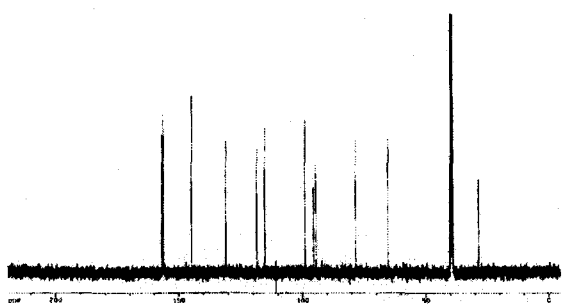


Fig. 13. 13C-NMR spectrum of compound 2.

DEPT spectrum (pulse width θ=135°, Fig. 14)에서는 1개의 CH2 carbon (down peak)과 7개의 CH carbon (up peak; C-12와 C-15는 δ=115.14와 115.17ppm에서 나타나 한 개의 peak로 보임)이 나타났다. Table 1에 data를 종합하여 표시하였다. 성분 2의 구조에 관한 이상의 NMR 정보를 종합하여 이 물질을 (-)-epicatechin으로 同定하였고 구조는 Fig. 14에 나타내었다.

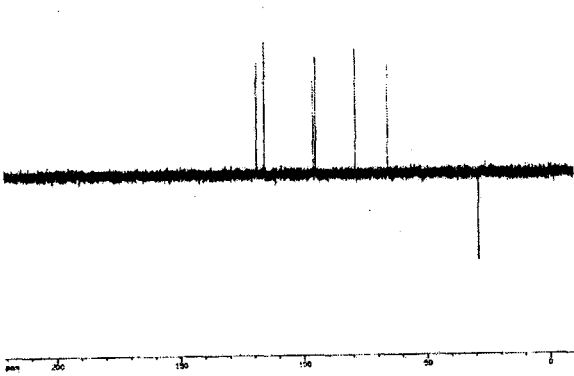


Fig. 14. DEPT spectrum of the compound 2.

Table 1. ¹H- and ¹³C-NMR data for compound 2

atom No.	¹³ C chemical shifts (multiplicity)	¹ H chemical shifts (multiplicity, coupling constant)
2	78.37 (d)	4.74 (s)
3	62.24 (d)	4.02 (s)
4	28.52 (t)	2.49 (dd, 3.3 and 16.5Hz) 2.69 (dd, 4.3 and 16.2Hz)
4a	98.92 (s)	-
5	156.85 (d)	-
6	94.48 (d)	5.74 (d, 2.2Hz)
7	156.50 (d)	-
8	95.46 (d)	5.90 (d, 2.2Hz)
8a	156.08 (d)	-
1'	130.97 (s)	-
2'	115.14 (s)	6.89 (d, 1.3Hz)
3'	144.79 (s)	-
4'	144.72 (s)	-
5'	115.17 (s)	6.67 (m)
6'	118.35 (s)	6.68 (s)
OH	-	8.7-9.3 (broad m)

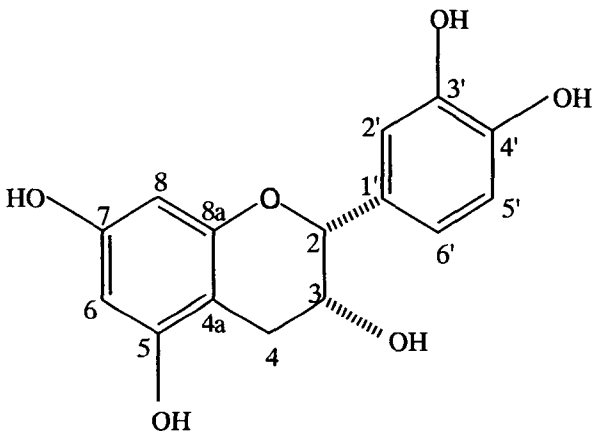


Fig. 15. Chemical structure of (-)-epicatechin

9. (-)-epicatechin 성분의 혈관 수축 억제활성

분리한 성분인 (-)-epicatechin의 혈관이완 효과를 관찰하였다. Phenylephrine 0.1 μM에 의한 수축혈관에 대하여 본 유효물질의 농도를 달리하면서 수축억제효과를 측정할 결과, 10 μM 이상의 농도에서 90%이상의 강한 이완활성을 나타내었으며 그 효과는 거의 용량 의존적 이었다 (Fig. 16).

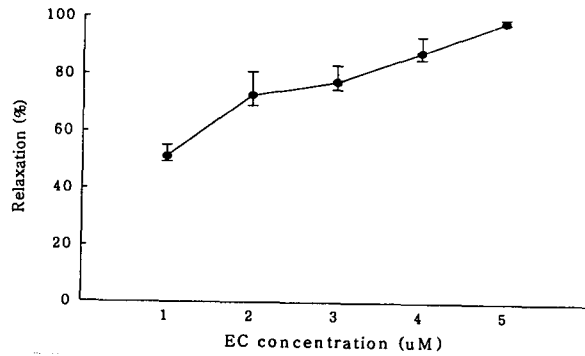


Fig. 16. Vascular relaxation effects of (-)-epicatechin(EC) on the phenylephrine-induced contraction at different concentrations in rat thoracic aorta. Values are mean±S.D.(n=5). 1:0.01μM, 2:0.1μM, 3:1μM, 4:10μM, 5:100μM

고찰

고혈압은 뇌출혈과 심부전증의 원인으로 작용하며 동맥경화를 일으켜 협심증과 심근경색의 원인이 되기도 한다. 그러므로 고혈압을 치료하는 것은 심뇌혈관 질환의 위험인자를 제거하고 뇌동맥질환과 심장병으로 인한 사망률을 감소시킬 수 있다. 한의학에서 고혈압의 치료는 단순한 혈압의 강하에 있지 않고 변증논치를 통한 음양평형을 조절하므로써 근본적으로 고혈압의 발생과 진행의 내재적 원인을 제거하는데 있다. 그러나 지금까지 개발된 항고혈압제들은 대부분 혈압의 강하효과 외에 부작용으로 인해 지속적인 투여가 필요함에도 불구하고 많은 환자들이 치료를 포기하고 있는 실정이다. 최근 오랜 사용경험을 바탕으로 축적된 한약재로부터 부작용이 적고 장기간 사용이 가능한 치료 약제를 개발하기 위해 한의학의 원리를 바탕으로 처방의 효능을 객관적으로 분석하기 위한 시도가 많이 이루어지고 있다. 따라서 경험적으로 안정성이 입증된 한약재로부터 활성성분을 규명하고 그에 따른 생리활성을 연구하는 것은 중요한 천연물신약 한방제제 개발의 한 방법이라 할 수 있다.

山楂 (Crataegus pinnatifida Bunge)는 장미과 (rosaceae)에 속하는 산사나무의 성숙한 과실로서 일반적으로 消食化積의 효능으로 식체를 소화하고 비위의 기능을 촉진할 목적으로 사용되지만, 최근 혈압강하작용이 알려지면서 고혈압의 치료에 처방하고 있다.山楂의 많은 약리학적 연구는 심혈관 보호효과에 집중되어 왔으며¹¹⁻¹³⁾, 그 심혈관 보호 활성은 活血化痰의 효능에 기인한 行血과 瘀血의 제거 작용과 연계하여 설명할 수 있다. 즉 活血化痰의 효능은 심혈관계의 생리에 유익하게 작용하여 혈류장애의 개선과 혈압강하의 치료에 일정한 효과를 나타내는 것으로 볼 수 있다. 이외山楂의 심혈관계와 관련한 실험적 연구로는 혈관이완 효능과 기전의 연구⁷⁻¹⁰⁾, 산화된 LDL(low density lipoprotein)에 의해 유도된 손상으로부터 혈관 내피세포의 보호 작용이 항산화작용에 기인함이 보고 되었으며¹⁴⁾ 심혈관계의 여러 장애와 병리적 상태에 대한 보호와 치료적 효과¹⁵⁾가 연구되었다. 또한 항산화 성분에 관한 연구가 주로 연구 보고되고 있다^{16,17)}. 그러나山楂dmi 이완 활성성분의 분리와 구조규명에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다. 따라서山楂로부터 어떤 단일 성분이 혈관이완 활성을 나타내고 있는지 규명하기 위하여山楂를

methanol, methylene chloride, ethylacetate, n-butanol과 증류수로 추출, 분획 화하였다. 山楡의 여러 분획물 중 가장 강한 활성을 나타낸 ethylacetate 분획을 silica gel에 의해 분획 화하여 모두 7개의 이차분획물 (subfraction)을 얻었다. 이들 분획 중 강한 혈관이완 활성을 나타낸 분획을 reverse phase Microsorb C-18 column을 사용한 preparative HPLC로 4개의 주요 peak를 분리하였다. 4개의 주요 peak중 가장 강한 혈관이완 활성을 나타낸 peak의 구조를 밝히기 위하여 NMR spectrum과 mass spectrum을 측정한 결과, 이 성분의 구조는 (-)-epicatechin으로 규명되었다. 山楡로부터 밝혀진 (-)-epicatechin은 phenylephrine에 의하여 유도된 수축혈관에 대하여 강한 이완작용을 나타내었다. 한편, 山楡에 존재하는 항산화 성분들은 유리기의 제거, 유리기에 의한 심장조직 손상완화, 동맥내 콜레스테롤 침착의 감소에 관련이 있는 것으로 생각되지만 완전히 밝혀지지 않는 것이다. 그러나 山楡의 ethylacetate 추출물에서 분리된 polyphenol 성분들은 LDL (low-density lipoprotein)의 산화를 억제하였다¹⁷⁾. 최근 polyphenol 성분은 강한 약리 치료 활성을 가지고 있기 때문에 주요 연구 관심분야이다. 이러한 성분들의 항산화활성은 동맥경화증, 암 그리고 당뇨병과 같은 주요 질환 발생에 대하여 유효적인 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이번 연구에서 polyphenol 성분인 (-)-epicatechin이 phenylephrine에 의하여 유도된 혈관수축을 이완시켰는데, 이는 일반적으로 구조에서 보듯이 benzene고리에 hydroxyl(OH)기가 있는 페놀성화합물이기 때문에 강한 항산화활성과 밀접한 관계가 있는 것으로 추정된다. 또 山楡는 풍부한 flavonoids의 자원으로서¹⁸⁾ flavonoid의 섭취는 심장 관상동맥 질환으로 인한 사망률을 감소시키는 것으로도 보고된 바 있다¹⁹⁾. (-)-Epicatechin은 flavonoid는 아니지만 flavonoid와 유사하게 benzene 고리에 OH기가 있어 radical scavenging 효과를 나타내는 것으로 볼 수 있다. 결과적으로 (-)-epicatechin의 혈관이완효과는 혈관내에 생성되는 free radical을 소거에 기인하는 것으로 생각되며, 이는 山楡의 항산화작용⁷⁾과 내피세포 nitric oxide 유리를 통한 혈관이완 효능⁸⁾의 보고와도 일치하는 결과이다.

이상의 실험적 결과는 천연물-한약 신약개발의 가능성을 제시하는 것으로서 (-)-epicatechin의 항산화작용에 의한 혈관보호 효과와 혈관이완 및 그 기전에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

결 론

山楡 분획의 혈관이완 효능을 검색하고, 가장 강한 이완효능을 보인 ethylacetate 분획에 대하여 실리카겔 칼럼 크로마토 그래프를 시행한 결과, 7개의 이차분획을 얻었다. 이들 분획 중 혈관이완 활성이 가장 강한 분획을 선별하여 reverse phase column을 사용한 preparative HPLC로 4개의 주요 peak를 분리하였다. 이들 peak 중 강한 혈관이완 활성을 나타낸 성분의 구조를 밝히기 위하여 NMR spectrum과 mass spectrum을 측정된 결과, 山楡의 (-)-epicatechin이 혈관 이완활성에 직접 관여

하는 성분으로 결론지었다.

앞으로 (-)-epicatechin의 혈관이완 작용의 기전을 규명하기 위한 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

참고문헌

1. 康秉秀, 金永坂, 臨床配合本草. 서울: 永林社, 477-478, 1994.
2. 李時珍. 本草綱目. 서울 : 고문사, p. 1014, 1980.
3. M. von Eiff. Hawthorn/Passionflower extract and improvement in physical capacity of patients with dyspnoea Class II of the NYHM functional classification, Acta Ther. 20:47-46, 1994.
4. Weihmayr, T. and Emst, E. Therapeutic effectiveness of crataegus, Fortschritte der medizin 114:27-29, 1996.
5. Schussler M., Holz J., Fricke U. Myocardial effects of flavonoids from crataegus species, Arzneim-Forsch Drug Res. 45:842-845, 1995.
6. Hanack T., Bruckel M.H. The treatment of mild stable forms of angina pectoris using Crataegutt novo, Therapiewoche 33:4331-4333, 1983.
7. 손창우, 채종구, 김길원, 신흥득, 山楡의 혈관이완 효능과 항산화작용. 동의생리병리학회지, 16(1): 67-71, 2002.
8. 채종구, 김길원, 신흥득, 내피세포 Nitric Oxide 유리를 통한 山楡의 혈관이완 작용. 동의생리병리학회지 17(1):146-150, 2003.
9. 유가람, 최호정, 김길원, 신흥득, 山楡 Butanol 분획이 PGF2a-유도 혈관평활근 수축의 억제에 미치는 신호전달 연구. 동의생리병리학회지, 17(2): 461-466, 2003.
10. 이헌제, Effect of Butanol Fraction of Crataegi Fructus on the translocation of PKCa and myosin phosphotase subunits and LC20 phosphorylation in vascular smooth muscle. 동국대학교 대학원 한의학과 석사학위논문, 2002.
11. Ammon H. P. T., Handel M. Crataegus, toxicology and pharmacology. I. Toxicity, Plant medica 43:105-120, 1981.
12. Ammon H. P. T., Handel M. Crataegus, toxicology and pharmacology. II. Pharmacodynamics, Plant medica 43:209-239, 1981.
13. Ammon H. P. T., Handel M. Crataegus, toxicology and pharmacology. III. Pharmacodynamics and Pharmacokinetics, Plant medica 4:312-322, 1981.
14. Chang C., Chen J. Effect of hawthorn human vascular endothelial cell. Yingyang Xuebao, 23(1):58-61, 2001.
15. Cavazza C. Cardioactive composition comprising L-carnitine and its derivatives and crataegus extracts. PCt int. Appl. p.10, 2001.
16. Kim J.S., Lee G.D., Kwon J.H., Yoon H.S. Identification of phenolic antioxidative components in crataegus pinnatifida bunge. Han'guk Nonghwa Hakhoechi, 36(3):154-157, 1993.
17. Zhang Z., Chang Q., Zhu M., huang Y., Walter K.K. Ho,

- Chen Z.-Y. Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits. *Journal of Nutritional Biochemistry* 12:144-152, 2001.
18. Cao G.Y., Feng Y.X., Qin X.Q. Analysis of the chemical constituents of hawthorn fruits and their quality evaluation, *Acta. Pharm. Sin.*30:138-143, 1995.
19. Hertog M.G.L., Feskens E.J.M., Hollman P.C.H., Katan M.B., Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study, *Lancet* 342:1007-1011, 1993.