

오수유의 Cholinesterase 저해활성 성분

이지영^{1,2} · 차미란¹ · 최춘환¹ · 김영섭¹ · 이봉호³ · 유시용^{1*}
¹한국화학연구원, ²충남대학교 신약전문대학원, ³한밭대학교 공업화학과

Cholinesterase Inhibitors Isolated from the Fruits Extract of *Evodia officinalis*

Ji Young Lee^{1,2}, Mi-Ran Cha¹, Chun Whan Choi¹, Young Sup Kim¹,
Bong Ho Lee³ and Shi Yong Ryu^{1*}

¹Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-343

²Graduate School of New Drug Discovery and Development, Chungnam National University, Daejeon 305-764

³Department of Chemical Technology, Hanbat National University, Daejeon 305-719

Abstract – The MeOH extract of *Evodiae Fructus* exhibited a significant inhibition on the acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE), in a dose dependent manner, respectively. The extensive bioactivity-guided fractionation process with the MeOH extract finally isolated four compounds, as rutaecarpine (1), evodiamine (2), limonin (3) and dehydroevodiamine (4). Among them, compound 2 exhibited specific inhibitory activity on BChE with the IC₅₀ values 1.7 µg/ml, whereas compound 4 showed the potent inhibition upon both AChE and BChE.

Key words – *Evodia officinalis*, Rutaceae, inhibition, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase

흔히 Alzheimer's disease (AD)라고 일컫는 노인성치매 (senile dementia)는 정상적으로 성장한 뇌가 후천적인 대뇌 피질의 기능 저하에 따라 지적 능력, 인지 기능, 정서 기능이 쇠퇴하고 인격 및 정서의 변화로까지 발전하는 대표적인 퇴행성 뇌질환이다. 평균수명의 연장으로 노년 인구가 증가됨에 따라 AD 환자가 급격하게 증가하고 있으며, 현재 우리나라 65세 이상 노인의 유병률은 약 8%로 추정된다.¹⁾ AD에 대한 수 많은 연구 노력에도 불구하고 원인과 발병기전은 아직도 완전히 밝혀지지 않고 있으며, 현재까지 근본적인 치료약물 역시 보고된 바 없다. 다만 치매의 주요 증상인 인지 기능의 장애가 주로 대뇌 기저부의 콜린성 신경의 손상에 기인된 것이라는 가설과 함께 cholinergic function을 증가시키는 약물들이 개발되어 왔다.²⁾ Cholinergic function을 증가시키는 약물은 주로 cholinesterase 저해제들이 잘 알려져 있으며, 현재 FDA의 정식허가를 받아 시판되고 있는 tacrine (Cognex), rivastigmine (Exelon), donepezil (Aricept), galantamine (Reminil) 등 노인성치매 개선약제들은 모두 cholinesterase 저해효과를 약효의 근간으로 하고 있

다. 즉 acetylcholinesterase (AChE) 또는 butyrylcholinesterase (BChE) 등 cholinesterase에 대한 가역성 효소억제(reversible cholinesterase inhibition) 기전을 통하여, 기억과 학습에 중요한 신경전달물질인 acetylcholine (ACh)의 농도를 일시적으로 상승시킴으로써 치료 효과를 나타낸다.^{3,4)}

본 연구실에서는 우리나라 등 동북아시아 지방에서 널리 사용되어 온 340여 생약재의 추출물을 대상으로 AChE의 저해 활성을 검색한 결과 오수유(吳茱萸, *Evodiae Fructus*)의 MeOH 추출물이 우수한 AChE의 저해 활성을 나타냄을 보고한 바 있다.⁵⁾

오수유(*Evodia officinalis*)는 운향과(Rutaceae)에 속하는 낙엽관목이며 이 식물의 건조 미숙과실은 예부터 한국, 일본, 중국 등 동북아시아지방에서 널리 사용되었다. 또한 evodiamine, rutaecarpine, evocarpine, isoevodiamine, higenamine 등의 alkaloids와 ocimene, limonin, evodin, evodol 등의 성분들이 분리, 보고되어 있으며 이 성분들에 대한 약리 작용에 관한 연구도 활발하게 이루어지고 있다. 지금까지 알려진 약리 작용으로는 말초혈관 확장을 통해 혈압을 강하시키며, 자궁수축 효과, 항암작용, 면역억제효과, 지사작용, 항알러지 효과, 항산화 효능 등이 보고되어 있다.^{6,7)}

*교신저자(E-mail): syryu@kricr.re.kr
(Tel): +82-42-860-7163

한편 본보에서는 전술한 바와 같이 AChE의 저해 활성을 검색 결과 우수한 활성을 나타낸 오수유의 MeOH 추출물로부터 활성유도 분획법(bioactivity-guided fractionation)에 따라 AChE와 BChE의 저해 효과를 나타내는 활성물질을 분리하고, 분리된 각 화합물들의 cholinesterase 저해작용에 대한 특이성에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 생약재 오수유는 경동시장에서 구입하여 한국화학연구원 홍경식 박사의 정확한 감정을 거친 후 실험에 사용하였으며, 표준 (KR0102)은 한국화학연구원에 보관되어있다.

기기 및 시약 - 본 실험에 사용된 시약은 모두 EP급 시약을 사용하였으며, NMR spectra는 Bruker사의 DMX-500을 이용하여 측정하였고, column chromatography는 silica-gel (230~400 mesh, Merck)을 사용하였다. 효소저해 실험에 사용한 효소원으로는 전기뱀장어로부터 추출 정제된 AChE (E.C. 3.1.1.7. Sigma C2627) 및 말혈청으로부터 얻은 BChE (E.C. 3.1.1.8. Sigma C1057)를 사용하였다. 효소 반응의 기질로 사용한 acetylthiocholine (ATCh), butyrylthiocholine (BuTCh), 효소 저해 활성의 대조약물로 사용한 THA (tetrahydroaminoacridine; tacrine) 및 coupling agent로 사용한 DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid))는 Aldrich Chemical Co.에서 구입하여 사용하였고, 흡광도 측정은 HP8452 diode array UV-visible spectrophotometer (Hewlett-Packard)를 이용하였다.

Cholinesterase 효소활성 및 효소저해 활성 - 효소활성은 Ellman's coupled enzyme assay 방법을 사용하여 측정하였다.⁸⁾ 효소 반응은 25.0 ± 0.1°C 항온조내에서 실행하였으며 1 ml cuvette을 반응조로 사용하였다. 즉, 기질 (substrate), coupling agent (DTNB) 및 검액을 함유한 반응조를 항온조내에서 4 분간 배양한 후 즉시 효소액 (AChE 10 U/10 µl)을 첨가하고 60초 동안 배양한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응액 (1 ml) 중 기질 ATCh의 농도는 0.1 mM, DTNB의 농도는 0.2 mM로 하고 시료검액은 0.1 mg (0.1 ml)으로 하였다. 모든 실험군은 triplicate로 실행하여 흡광도의 평균치를 산출하였다. 시료검액의 효소활성 저해효과는 시료검액 대신 동량의 완충액을 넣은 대조군의 흡광도치 (control test, C.T.)와 시료검액을 넣어준 검액군의 흡광도치 (sample test, S.T.)를 이용하여 아래 수식에 따라 산출하였다. 한편 BChE의 활성 측정은 효소액 (BChE 10 U/10 µl) 및 기질로 BuTCh를 동일한 protocol에 따라 측정하였다.

$$\text{enzyme inhibition (\%)} = 100 - \left(\frac{S.T.}{C.T.} \times 100 \right)$$

추출 및 분리 - 건조한 시료 1.2 kg을 MeOH에 7일간 침적시킨 후 여과하고 여액을 감압 농축하여 MeOH 추출물 194 g을 얻었다. 이를 증류수 2 L에 현탁시킨 후 동량의 dichloromethane (MC)로 추출한 결과 MC 분획 60 g, MC 층과 물층의 경계면에 형성된 고형 interphase 분획 33 g 및 물층으로 나누었다. 물층은 다시 동량의 ethylacetate (EtOAc)로 추출하여 EtOAc 분획물 4.3 g 및 잔류 물층 89 g을 각각 얻었다. 각 용매 분획 층의 AChE 및 BChE 저해활성을 실험하여 본 결과 MC 분획은 강력한 BChE 저해활성만을 보여준 반면, interphase 분획은 BChE 및 AChE 모두에 대하여 강한 저해활성을 나타내었다. 따라서 MC 분획 및 interphase 분획층을 대상으로 활성유도 정제방법에 따라 활성물질의 정제를 실시하였다. 먼저, MC 분획물 10 g을 silica-gel column chromatography (MC : MeOH = 100 : 1, 50 : 1)를 실시하여 Fr. 1 (2.3 g) 및 Fr. 2 (4.1 g) 2개의 분획으로 나누었다. Fr. 1을 MeOH로 침전시킨 후 여과하고 모액(Fr. 11, 2.1 g)과 침전물(Fr. 12, 0.5 g)로 나누었으며 Fr. 11을 다시 silica-gel column chromatography (Hexane: EtOAc = 10 : 1, 5 : 1, 1 : 1)를 실시하여 3개의 소분획(Fr. 11-a, Fr. 11-b, Fr. 11-c)으로 나누었다. 이 중 Fr. 11-a와 Fr. 11-c를 각각 MeOH에서 재결정하여 화합물 1 (92 mg), 2 (150 mg)를 얻었다. 다음으로, Fr. 12를 MeOH로 재결정시킨 후 여과하여 화합물 3 (793 mg)을 얻었다. 또, interphase 분획물 5g을 silica-gel column chromatography (MC: MeOH = 5 : 1) 및 SiO₂-NH₂ column chromatography를 실시한 후, MeOH로 재결정하여 화합물 4 (120 mg)를 얻었다(Fig. 1).

화합물 1 (rutaecarpine) - colorless crystal; ESI-MS *m/z* 287 [M]⁺ (C₁₈H₁₃N₃O). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 9.31 (1H, br s), 8.32 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.62-7.74 (3H, m), 7.40-7.45 (2H, m), 7.33 (1H, dt, *J* = 6.9 Hz), 7.18 (1H, t, *J* = 7.7 Hz), 4.59 (2H, t, *J* = 6.9 Hz), 3.24 (2H, t, *J* = 6.9 Hz); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 160.8, 147.3, 145.2, 139.0, 134.9 (2C), 127.4, 126.7, 126.5, 125.2, 125.1, 121.4, 120.9, 120.2, 118.4, 112.5, 41.3, 19.6.

화합물 2 (evodiamine) - colorless crystal; ESI-MS *m/z* 303 [M]⁺ (C₁₉H₁₇N₃O). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.06 (1H, s), 7.79 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.46 (2H, m), 7.35 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.10 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 7.04 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.99 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.95 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 6.11 (1H, s), 4.62 (1H, dd, *J* = 12.8, 5.2 Hz), 3.18 (1H, m), 2.90 (1H, m), 2.87 (3H, s), 2.77 (1H, dd, *J* = 15.3, 3.7 Hz); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.3, 148.8, 136.5, 133.5, 130.6, 128.0, 125.9, 121.9, 120.3, 119.3, 118.9, 118.2, 117.5, 111.7, 111.5, 69.8, 40.9,

36.5, 19.5.

화합물 3 (limonin) – colorless crystal; ESI-MS m/z 470 $[M]^+$ ($C_{26}H_{30}O_8$). 1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 7.71 (1H, s), 7.65 (1H, d, $J = 1.2$ Hz), 6.49 (1H, s), 5.46 (1H, s), 4.90 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 4.46 (1H, d, $J = 13.0$ Hz), 4.10 (2H, s), 3.10 (1H, d, $J = 15.0$ Hz), 2.76 (1H, d, $J = 16.5$ Hz), 2.60 (1H, dd, $J = 16.5, 3.9$ Hz), 2.56 (1H, dd, $J = 15.5, 2.9$ Hz), 2.45 (1H, dd, $J = 15.5, 2.9$ Hz), 2.28 (1H, dd, $J = 15.0, 3.0$ Hz), 1.81 (1H, m), 1.71 (2H, m), 1.24 (1H, m), 1.17 (3H, s), 1.09 (3H, s), 1.01 (3H, s), 0.99 (3H, s); ^{13}C -NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 208.0, 170.2, 167.3, 143.3, 141.7, 120.2, 110.2, 79.5, 78.4, 77.4, 66.7, 64.8, 57.9, 53.7, 50.3, 46.5, 45.3, 37.6, 36.2, 35.7, 29.7, 29.2, 21.4, 19.7, 17.5, 17.0.

화합물 4 (dehydroevodiamine) – colorless crystal; ESI-MS m/z 301 $[M]^+$ ($C_{19}H_{15}N_3O$).

결과 및 고찰

전기뱀장어 유래 AChE 및 말혈청 유래 BChE를 사용한 *in vitro* cholinesterase 효소활성 저해실험 결과, 생약재 오수유 MeOH 추출물 및 MeOH 추출물을 상법에 따라 처리하여 얻은 MC 용매분획분, EAOAc 용매분획분 및 MC층/물층의 경계면에 생성된 interphase 분획물 등은 모두 100 $\mu g/ml$ 농도에서 AChE 및 BChE의 효소활성을 유의성 있게 저해하였다 (Table I). 또 AChE 및 BChE의 저해 활성을 지표로 하여 생약재 오수유 MeOH 추출물로부터 활성유도 분리정제법(acitivity-guided purification)에 따라 효소 활성 저해 성분들을 추적 단리한 결과, AChE 및 BChE에 대하여 우수한 저해활성을 보여주는 활성성분으로 화합물 2 및 화합물 4를 분리 정제하였으며 관련화합물 1, 3을 추가로 분리하였다. 각 화합물 1-4의 1H -NMR 및 ^{13}C -NMR 등 각종 분광학적 data를 문헌과 비교해 본 결과,⁹⁻¹² 각각 1 (rutaecarpine), 2 (evodiamine), 3 (limonin) 및 4 (dehydroevodiamine)으로 동정되었다 (Fig. 1).

이 중 화합물 4는 AChE 및 BChE 모두에 대하여 농도 의존적으로 강한 저해 활성을 나타내는 dual inhibition pattern을 보여주었다 (Table II). 화합물 4의 AChE에 대한 50% 효소활성 저해농도 (IC_{50})는 4.0 $\mu g/ml$ (13.2 μM), BChE에 대한 IC_{50} 값은 35.0 $\mu g/ml$ (118 μM)로 각각 산출되었다 (Fig. 2, Fig. 3). 한편 대조약물로 사용한 THA (tetrahydroaminoacridine; tacrine)의 경우 AChE 및 BChE에 대한 50% 효소활성 저해농도 (IC_{50})는 각각 0.2 μM 및 0.3 μM 로 환산되었다.

이와 같이 화합물 4가 AChE 및 BChE 모두에 대하여 저해효과를 나타낸 반면 화합물 2는 BChE에 대하여만 농도

Table I. Inhibitory effect of the *E. officinalis* extract on AChE and BChE

Fraction	AChE (100 $\mu g/ml$)	BChE (100 $\mu g/ml$)
MeOH extract	53%	79%
Methylenechloride	28%	83%
Interphase	80%	75%
Ethylacetate	50%	52%
H ₂ O	41%	23%

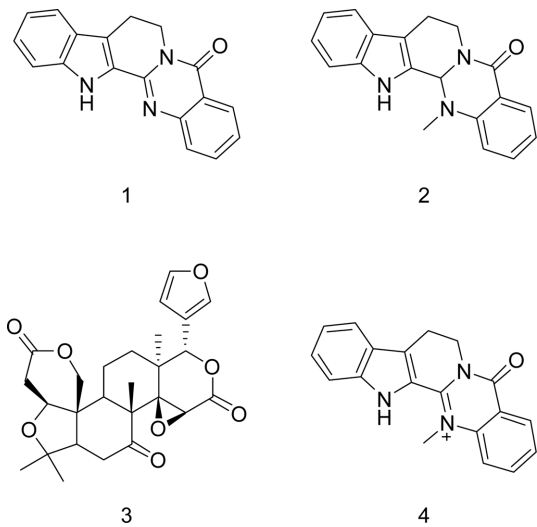


Fig. 1. Structures of isolated components from *E. officinalis*.

의존적으로 강한 효소활성 저해효과를 보여주었으며, 50% 효소활성 저해농도 (IC_{50})는 1.7 $\mu g/ml$ (5.6 μM)로 환산되었다 (Fig. 3). 반면, 화합물 2는 100 $\mu g/ml$ 이하의 농도에서는 유의성 있는 AChE 저해 효과를 나타내지 않았다. 따라서 화합물 2는 cholinesterase 중 BChE에만 선택적으로 저해활성을 나타내는 화합물이라는 결론을 얻을 수 있었다.

한편 화합물 2 및 4와 더불어 오수유의 대표적인 성분으로 알려진 화합물 1과 3의 경우 AChE 및 BChE 중 어느 쪽 효소에도 100 $\mu g/ml$ 이하의 농도에서 저해활성을 나타내지 않았다. 화합물 1의 경우, 활성 성분인 화합물 2 및 화합물 4와 아주 유사한 화학구조를 가지고 있음에도 불구하고 효소저해 효과가 관찰되지 않았다.

최근의 연구보고에 따르면 오수유의 추출물로부터 분리된 화합물 4의 경우 랫트를 이용한 동물실험을 통하여 scopolamine으로 유발한 단기 기억력 손상을 효과적으로 회복시키는 가능성이 시사되고 있다.^{13,14}

지금까지의 연구결과를 바탕으로 하여 본 연구팀에서는 현재 화합물 2 및 화합물 4의 *in vivo* 효소활성 저해효과 및 수동회피실험 등 각종 동물실험을 통하여 인지 기능 개선효과 등의 노인성치매 예방효능을 다각적으로 검토하고 있다.

Table II. Inhibitory effect of isolated compounds from *E. officinalis* on AChE and BChE

Compound	AChE (100 µg/ml)		BChE (100 µg/ml)	
	Inhibition(%)	IC ₅₀ (µg/ml)	Inhibition(%)	IC ₅₀ (µg/ml)
retaecarpine (1)	13%		5%	
evodiamine (2)	14%		95%	1.7 µg/ml
limonin (3)	6%		20%	
dehydroevodiamine (4)	92%	4.0 µg/ml	75%	35.0 µg/ml

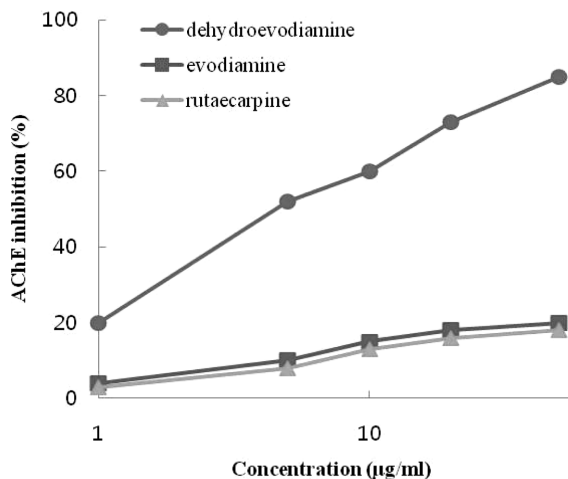


Fig. 2. Inhibitory effect of isolated compounds from *E. officinalis* on AChE.

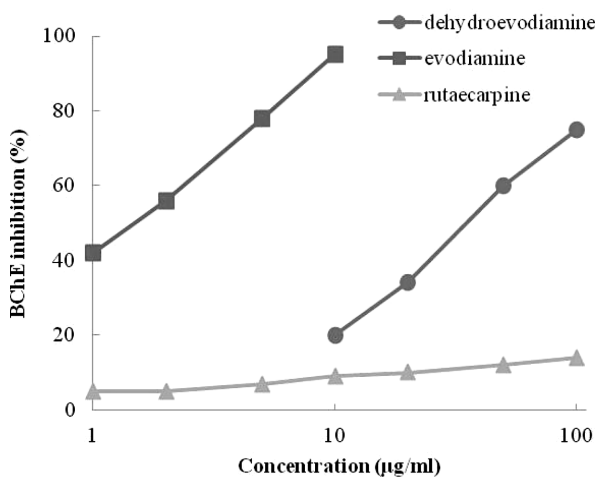


Fig. 3. Inhibitory effect of isolated compounds from *E. officinalis* on BChE.

사 사

이 연구는 한국화학연구원(KRICT) 기본연구사업(KK-1203-C0)의 연구비 지원을 받아 수행한 연구 결과로 이에 감사드립니다. 아울러 NMR 연구를 지원해주신 한국기초과학연구원(KBSI)에 감사드립니다.

인용문헌

- Lee, D. W., Huh, Y. S. and Kim, K. W. (2009) Evidence-based treatment of Alzheimer's disease. *J. Korean Med. Assoc.* **52**: 417-425.
- Polinsky, R. J. (1998) Clinical pharmacology of rivastigmine: a new generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin. Ther.* **20**: 634-647.
- De Ferrari, G. V., Canales, M. A., Shin, I., Weiner, L. M., Silman, I. and Inestrosa, N. C. (2001) A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid β -peptide fibril formation. *Biochemistry* **40**: 10447-10457.
- Hung, T. M., Thuong, P. T., Nhan, N. T., Mai, N. T. T., Quan, T. L., Choi, J. S., Woo, M. H., Min, B. S. and Bae, K. H. (2011) Cholinesterase inhibitory activities of alkaloids from *Corydalis Tuber*. *Nat. Prod. Sci.* **17**: 108-112.
- Kim, J. S., Kim, Y. S., Kim, S. K., Heor, J. H., Lee, B. H., Choi, B. W., Ryu, G. S., Park, E. K., Zee, O. P. and Ryu, S. Y. (2002) Inhibitory effects of some herbal extracts on the acetylcholinesterase (AChE) *in vitro*. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**: 211-218.
- Lee, S. W., Hwang, B. Y., Kim, S. E. and Kim, H. M. (1995) Isolation of modulators for multidrug resistance from the fruits of *Evodia officinalis*. *Kor. J. Pharmacogn.* **26**: 344-348.
- Yun, H. J., Heo, S. K., Lee, Y. T., Park, W. H. and Park, S. D. (2008) Anti-inflammatory effect of *Evodia officinalis* Dode in mouse macrophage and human vascular endothelial cells. *Kor. J. Herbology.* **23**: 29-38.
- Ellman, G. L., Coutney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95.
- Lee, C. S., Liu, C. K., Chiang, Y. L. and Cheng, Y. Y. (2008) One-pot reductive-cyclization as key step for the synthesis of rutaecarpine alkaloids. *Tetrahedron Lett.* **49**: 481-484.
- Hwang, S. Y., Hwang, B. Y., Ju, H. K., Park, J. H., Son, K. H., Lee, S. H., Chang, S. Y., Kang, S. J., Ro, J. S. and Lee, K. S. (2001) Isolation and quantitative analysis of evodiamine from *Evodiae Fructus*. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**: 98-102.
- Cho, E. J., Piao, X., Piao, L., Piao, H., Park, M. K., Kim, B. K. and Park, J. H. (2000) Chemical constituents of the fruit of *Citrus junos*. *Nat. Prod. Sci.* **6**: 179-182.
- Kang, S. S., Kim, J. S., Son, K. H., Kim, H. P. and Chang,

- H. W. (1999) Cyclooxygenase-2 inhibitor from *Evodia rutaecarpa*. *Nat. Prod. Sci.* **5**: 65-69.
13. Park, C. H., Kim, S. H., Choi, W., Lee, Y. J., Kim, J. S., Kang, S. S. and Sun, Y. H. (1996) Novel anticholinesterase and anti-amnesic activities of dehydroevodiamine, a constituent of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med.* **62**: 405-409.
14. Park, C. H., Lee, Y. J., Lee, S. H., Choi, S. H., Kim, H. S., Jeong, S. J., Kim, S. S. and Suh, Y. H. (2000) Dehydroevodiamine HCl prevents impairment of learning and memory and neuronal loss in rat models of cognitive disturbance. *J. Neurochem.* **74**: 244-253.
- (2012. 5. 4 접수; 2012. 6. 5 심사; 2012. 6. 9 게재확정)