

烏梅의 肝디스토마 殺蟲性 물질에 관한 연구

곽영실 · 류성호 · 백병걸* · 이재구* · 안병준

충남대학교 약학과 · *전북대학교 수의학과

(Received December 13, 1984)

The Anthelmintic Principle of "O-Mae", the Roasted Fruits of *Prunus mume*, Against *Clonorchis sinensis*

Young-Sil Kwack, Sung-Ho Ryu, *Byeung-Kirl Baek, *Jae-Ku Lee
and Byung-Zun Ahn

Department of Pharmacy, Chungnam National University, Tae-Jon, 300-31 and

*Department of Veterinary, Cheonbuk National University, Cheonju 520, Korea

Abstract—The anthelmintic substance of the roasted fruits of *Prunus mume* against *Clonorchis sinensis* was isolated and its structure was identified by chemical and physical methods. The results obtained from the experiments are as follows: 1) The methanol extract of the roasted fruits of *P. mume* was fractionated into four parts: petroleum ether, ethyl ether, ethyl acetate and water soluble part. Among these, ethereal fraction was found to have strong wormicidal effect on liberated metacercaria of *Clonorchis sinensis*. 2) From the ethereal fraction, the wormicidal substance was isolated by silica gel, polyamide and sephadex column chromatography and identified to be 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) by chemical and spectral data. 3) 5-HMF was synthesized and administered to the rabbits infected with *C. sinensis*. On the 2nd day after administration, the EPG (eggs per gram in feces) reached to the maximal value. Among the adult worms isolated from the bile duct of the treated animal, 84% of worms were damaged morphologically. 4) The content of 5-HMF in the fruits of *P. mume* which were roasted in an oven at 90-110°C for 52 hours and that in the fresh fruits was evaluated by HPLC. The content of 5-HMF was 0.8% in the roasted fruits and 0.02% in the fresh ones.

생약으로부터 살충성 물질을 분리하여 구충제로 사용한 역사는 오래되었으나 간흡충(*Clonorchis sinensis*)에 작용하는 천연물에 대한 관심은 최근에 와서야 일게되었다. 전¹⁾등은 제 2 중간숙주로서의 역할이 미흡하다고 여겨져 왔던 잉어, 붕어, 금붕어등으로부터 얻어진 포피 점액의 간흡충 유미 유충에 대한 살충성을 보고하였다. 이²⁾ 등은 이 점액으로부터 크로마토그래프상에서 살충성 분획을 얻은 바 있으나 극미한 함량과 불안정한 물성때문에 순수 분리에 어려운 점이 많다고 하였다. 이³⁾ 등은 또한 국내한방에서 사용되고 있는 한약제 223종을 사용, 간흡충에 대한 살충성을 관찰하였던 바, 이 중 31종의 생약이 확실한 살충 작용을 보인다고 보고하였다. 안⁴⁾ 등은 위의 31종 중 후박(*Machilus thunbergii*)으로부터 살충성 물질을 단리, 구조결정을 한 결과 meso-dihydroguaiaretic acid임을 밝혀냈다.

본 연구는 이 들 31종의 생약으로부터 간흡충에 대한 살충 성분을 분리하는 연구 사업의 일환인 바, 한방에서 회충 구제의 목적으로 사용해 오고있는 오매(烏梅, the roasted fruits of *Prunus mume*)를 연구 대상으로 하였다. 오매는 꽃대실을 따서 향아리에 넣고 뚜껑을 덮은 다음 진흙으로 봉합, 장작분위에서 김세 될 때까지 가열한 것이다.

가열 처리하지 않은 성숙 매실로부터 분리된 성분은 citric acid⁵⁾와 flavonoid로서 mumenin, naringenin⁶⁾등과 alcohol로서 amyl alcohol⁷⁾등이 있고 glucose, trehalose⁸⁾와 같은 당류도 보고된 바 있다. 또한 과실중의 citric acid 및 malic acid가 항 결핵작용에 관련이 있다는 보고도 있다.⁹⁾

본 연구에서는 오매가 함유하고 있는 간흡충 살충성 물질을 분리하고 그 구조를 동정하였으며, 또한 합성하여 구조 및 작용을 확인하였으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

실 험 방 법

재료 및 기기—본 실험에서는 시중 건재 약방에서 구입한 오매의 과육을 사용하였고 HPLC에 의한 살충성 물질의 정량 실험에서 표준 물질과의 비교 실험에 사용한 매실(青梅)은 성수기인 6월, 시중에서 구입한 매실중 한 개의 평균 무게 10g, 지름 2~3mm되는 것을 사용하였다.

물질의 분리과정에는 silica gel(Kieselgel 60, 70~230mesh, Merck회사제품), Polyamide(Polyamide C-200, Wako회사제품) 및 Sephadex G-10 (0~700 dalton, Sigma회사제품)을 사용하였고 기타시약 및 용매는 1급제품을 사용하였다. 최종적으로 단리해낸 물질의 구조 확인에는 NMR Spectrometer(Varian FT-80A), UV/Visible spectrophotometer(Beckman model 35), IR spectrophotometer(Perkin-Elmer 780)을 사용하였다.

살충성 물질의 추출 및 분리—오매 1.2kg에 증류수 2l를 가하여 24시간 침윤시킨 후 과육으로부터 씨를 분리 제거후, 과육의 물 침윤액에 메탄올 4l를 가하여 40~50°C에서 환류하며 24시간 추출 후 여과하였다. 여과한 잔사에 메칠알콜 3l를 가하여 동일 조건으로 4시간 재추출 후 여과하였다. 여액은 합하여 감압하에서 용매를 제거하여 흑적색의 타아르상 물질을 얻었다. 용매를 제거한 타아르상 물질과 증류수 400ml를 혼합, 현탁시킨 후 percolator에 가하여 석유에틸, 에틸, 초산에틸 1l씩으로 차례로 24시간, 72시간, 48시간 추출하였다.

이들 용매 추출물중 가장 강한 살충성을 보이고 있는 에틸 추출물(약 13g)을 처리하여 물질을 단리하였다. 에틸 추출물 1g을 CHCl₃/CH₃OH(19:1) 5ml에 용해시킨 후 이를 silica gel column(3×20cm)에 가하고 같은 용매계로써 계속 용출시켰다. 용출액은 2ml씩 시험관에 모으고 각 시험관의 액을 TLC하여 동일 Rf치를 갖는 물질끼리 모아서 분획으로 하였다. 이 조작은 에틸 추출물 전량이 소모될 때까지 반복하여 활성물질을 함유한 Fa-3는 용매 제거 후 chloroform에 녹이고 다시 같은 크기의 silica gel column에 가하고 chloroform을 용매로 용출하여 살충성 분획 Fb-3를 얻었다. 이를 다시 수용액으로 하여 polyamide column(1.5×30cm)에 가하고 물로써 용출시킨 바 살충성 분획 Fc-2를 얻었다. Fc-2를 Sephadex G-10 Column(1.5×25cm)에 가하고 물로써 용출시켜 정제된 물질을 얻었다(80mg, TLC 및 HPLC상 단일 물질).

물질 분리 과정의 추적에는 silica gel, polyamide 및 cellulose TLC를 사용하였고 발색시약으로는 2,4-dinitrophenylhydrazine(2,4-DNPH), I₂, K₃Fe(CN)₆/FeCl₃와 자외선(254nm)을 사용하였다.

in vitro에서의 살충실험—실험에 사용한 탈낭 유충은 1983년 2월, 경남 김해 호수로부터 채집한 참붕어(*Pseudorasbora parva*)를 이등¹⁰⁾의 방법으로 처리하여 피낭 유충을 얻은 후 탈낭시킨 것을 사용하였다. 성충은 김해 호수로부터 채집한 참붕어로부터 얻은 간흡충의 피낭유충을 체중 2kg내외의 가토에게 500개씩 경구투여 하여 감염시킨 후 1년 후에 도살하여 담관으로부터 적출한 것을 사용하였다. 살충실험은 각 피검물질을 메칠알콜에 용해시켜 시계접시에 가하고 메칠알콜을 증발시킨 후 1ml의 생리 식염수와 각각 20마리씩의 탈낭 유충 및 성충을 직접 접촉시켜 사멸되는 네 소요되는 시간과 총체의 변화를 관찰하였다.

산란수 측정 및 충체의 변화 관찰—간흡충에 감염시킨 평균 체중 2kg의 가토 4마리에게 각각 polyethyleneglycol 400에 현탁시킨 살충성 물질 100mg/kg을 매일 2회, 7일간 근육주사 후 10일간 formalin-ether sedimentation법으로 산란수(EPG, eggs per gram in feces)를 측정하여 물질투여 3일전의 평균산란수와 비교하고 10일 후에 그 중 한마리를 도살하여 Semichon's acetocarmin으로 염색하여 충체의 변화를 관찰하였다.

오매와 청매(青梅)에 있어서 5-Hydroxymethylfurfural(5-HMF)의 정량—성수기에 시중에서 구입한 매실 600g을 취하여 메탄올로 추출하고 동량의 다른 한 군은 90~110°C에서 52시간 가열하여 메탄올로 추출, 여과한 후 용매를 제거하고 남은 흑적색 고형물중 일부를 취하여 5-HMF 표준액과 HPLC법으로 그 함량을 비교하였다. HPLC에서 column은 μ -Bondapak C-18을 사용하였고 용매는 50% 메탄올을 사용하였다.

실험 결과 및 고찰

이³⁾ 등은 오매 75g으로부터 얻은 진탕 20ml중 1ml을 취하여 살충 실험을 하였을 때 탈낭 유충은 5분내에 사멸하였다고 보고하였다. 본 실험자들은 오매로부터 용매 분획을 만들고 살충실험으로 작용 분획을 확인한 후 이것으로부터 작용 물질을 단리하였다. 각 용매 분획을 간흡충의 탈낭유충에 대해 살충실험한 결과 석유 에틸 분획은 유의한 살충 작용을 나타내지 않았다. 에틸분획에서는 강한 살충 효과를 보여 탈낭 유충이 에틸 용분과 접촉하면 처음에 격렬한 반응을 보이다가 10초가 경과되면 운동이 정지되고 1분 후부터 충체가 붕괴되어 갔다. 초산에칠용분에서도 강한 살충효과가 있어 2분 이내에 충이 사멸하였다. 이들 용매로 차례로 추출하고 남은 물층을 간흡충의 탈낭 유충에 접촉시킨 결과 충체의 심한 뒤틀림을 볼 수 있었고 4분만에 사멸하였다(Table I).

에틸 추출액과 초산 에칠 용분에서 강한 살충작용이 나타나고 또, 물층에서도 상당한 작용을 보이는 것을 보아 이 작용 물질은 매우 큰 극성을 갖고 있음을 알 수 있으며 에틸과

Table I—Wormicidal effect of the solvent fractions on the liberated metacercaria of *Clonorchis sinensis* in vitro.

Fractions	First disappearance of oral sucker movement	Death of all the worms
*Control	—	>72hr.
Petroleum ether fraction	—	>10min.
Ethyl ether fraction	10sec.	1min.
Ethyl acetate fraction	1min.	2min.
Water fraction	2min.	4min.

*Control: Physiological saline was used for control.

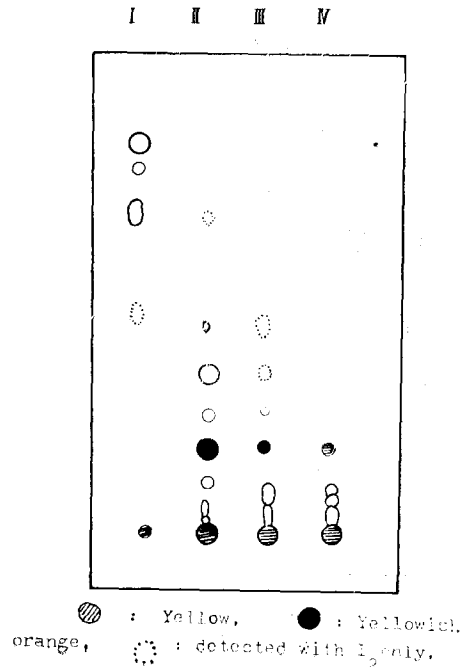


Fig. 1—Thinlayer chromatogram of the solvent fractions of the fruits of *Prunus mume*. Adsorbent: silica gel G, solvent: CHCl_3 -MeOH(19:1), visualized with 2,4-Dinitrophenylhydrazin, I : Petroleum ether fraction, II : ethyl ether fraction, III : ethyl acetate fraction, IV : water fraction.

Table II—Wormicidal effect of the column chromatographic fractions from ether extract on the metacercaria of *Clonorchis sinensis* *in vitro*.

Fract-ions	Status of metacercaria	First disappearance of oral sucker movement	Death of all the worms
F _a	1	—	>15min.
	*2	<10sec.	—
	*3	<10sec.	9min.
	4	—	>15min.
	5	—	>15min.
F _b	1	—	>30min.
	2	—	>30min.
	*3	<10sec.	40sec.
	4	—	>30min.
	5	—	>30min.
F _c	1	—	>5min.
	*2	<10sec.	20sec.
	3	—	>5min.
	4	—	>5min.
Control (physiological saline)		—	>72hr.

* indicates the fraction which has the strong wormicidal activity.

성 물질을 단리하였다. 각 분획에 대한 살충 실험 결과는 Table II에 나타난 바와 같다.

column에서 단리해 낸 순수 작용 물질을 간흡충의 성충에 직접 접촉시켰을 때 시험액 1mg/ml 농도에서는 접촉 후 2분에 충체가 경련을 일으키고 10분에 사멸하였다. 반면 시험액을 접촉시키지 않은 대조군의 성충은 72시간 이상 생존하였다(Table III).

이 물질은 에틸, 클로로포름, ethyl acetate, 알콜, 물에 잘 녹고 2,4-DNPH에 진한 등색으로 정색되며 I₂에서 발색되고 FeCl₃/K₃Fe(CN)₆에는 반응하지 않았다. 이 물질이 물에 잘 용해되지 않던 또한 클로로포름, 벤젠 등의 비 양자성 용매에까지도 잘 용해되는 것으로 보아 매질중에 흔하게 함유되어 있는 유기산이나 염형태의 물질은 아니라고 판정되었다.

한편, 이 물질이 -C=O 확인 시약인 2,4-DNPH와 반응하여 진한등색을 나타내는 것을 보아 알데히드기 또는 반응성이 높은 케톤기를 함유하고 있는 것으로 사료되었다.

이 물질의 적외선 스펙트럼에서 3440cm⁻¹에서 히드록시기, 1680cm⁻¹에서 공액상태에 있는 carbonyl기가 있음을 알 수 있고 이 히드록시기는 3가 철시약과 페놀반응을 하지 않으므로 알콜기라고 사료된다. 또한 2940cm⁻¹에서의 흡수는 지방족 수소를, 1030cm⁻¹의 흡수는 1차 알콜의 -C-O에 해당하므로 이 물질은 -CH₂OH의 부분 구조를 갖고 있다고 할 수 있다. 자외선 스펙

Table III—Wormicidal effect of the active substance on the adult of *Clonorchis sinensis* *in vitro*.

Status of adult worm	Active substance (1mg/ml)	*Control
First appearance of convulsion	2min.	—
Death of all the worms	10min.	72hr.
Body relaxation after death	Yes	No

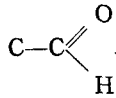
*Control: physiological saline was used for control.

초산 에칠에 각각 용해되는 2가지 이상의 물질로 구성되어 있을 가능성도 있었다. 물층을 포함한 위 4가지 용매 분획의 박층크로마토그램을 Fig. 1에 표시하였다. 에틸층에 용출된 작용 물질과 초산 에칠에 용출된 작용물질이 동일한 것인지의 여부를 알기 위하여 두 분획물질들의 Rf치를 비교하였다. 에틸층에는 2,4-DNPH에 등색을 정하며 각각의 Rf치 0.42 및 0.29를 갖는 물질이 관찰되었으며 초산 에칠 층에는 0.29의 Rf치를 갖는 물질과 그 밖의 물질들이 관찰되었다. 따라서 양 용매층에 공통으로 함유 되어 있는 Rf치 0.29의 물질에 살충성이 있을 것으로 사료되었다.

에틸 용분을 silica gel, polyamide 및 sephadex column chromatography로 분획하여 환

트럼에서는 222nm와 278nm에 흡수가 있으며 후자의 흡수대가 훨씬 큰 흡광도를 갖는다. 이 두 흡수대 사이의 차이는 벤젠 유도체에는 해당되지 않으므로 이 물질의 구조에 벤젠핵이 함유되어 있지 않음을 알 수 있다.

NMR 스펙트럼에서는 3.2ppm에서 히드록시기의 흡수가 있으며, 4.85ppm의 흡수는 산소가 직접 결합한 메치렌기에 해당한다. 메톡시기의 흡수 빈도가 많은 3.5~4.0ppm 구역보다 낮은 에너지에 나타나는 것은 이 메치렌기가 알릴 알코올형인 것을 시사해준다. 또한 9.80ppm의 예리한 peak는 알데히드의 수소를 시사해준다. 이 물질이 2.4-DNPH와 반응하여 등색이 되었음을 생각하면 이 물질은 알데히드기를 함유하고 있다고 말할 수 있다. 6.8ppm과 7.6ppm에 각각 doublet가 나타나는데 coupling constant ($J=3.6\text{Hz}$)로 보아 vicinal coupling임을 알 수 있다. 7.6ppm의 것은 acryl aldehyde의 경우처럼 알데히드 탄소로부터 β -위치에 있는 수소에 해당한다. 이는 $\text{CH}_2=$



의 존재를 말해준다. 또한 $\text{UV}\lambda_{\text{max}}=278\text{nm}$ 가 이 사실을 증명해 준다. 위의 해석을 종합해 보면 이 물질은 $-\text{CH}=\text{CH}-\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \diagup \text{H} \end{array}$, $\text{HOCH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ 기를 갖고 있으며 벤젠핵은 함유

하고 있지 않다. 결국 이 물질은 5-HMF일 것이라고 추정하게 되었으며 이 물질의 각 스펙트럼은 5-HMF의 표준스펙트럼 (Sadler, 757K, IR., Sadler, 8361, UV., Aldrich, H4, 080-7, NMR)과 일치하였다. 그러므로 오매의 간흡충 살충 성분은 5-HMF이라고 단정하게 되었다. 이 물질은 혼련한 치커리 (*Cichorium intybus*)에도 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾

가열 처리하지 않은 청매(青梅)와 90~110°C에서 52시간 가열 처리한 청매중에 함유되어 있는 본 물질의 정량 실험을 오매에서 분리한 5-HMF를 표준물질로 하여 HPLC법으로 행한 결과 청매의 메탄올 추출물 중에도 표준물질과 동일 t_R 에 나타나는 peak가 있었으며 그 양은 0.02%였다. 한편 가열 처리한 청매의 추출물 중에는 0.8%의 본물질이 함유되어 있어 가열 처리한 청매중에 더

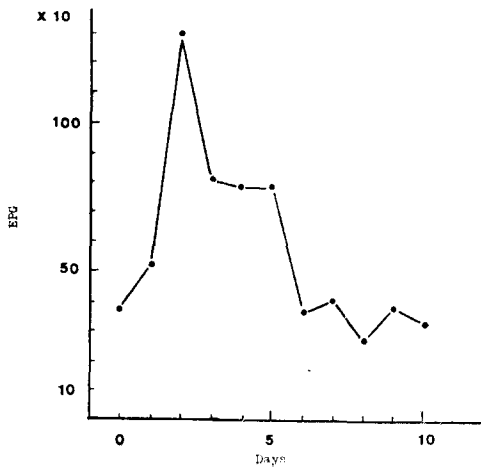


Fig. 2—EPG change in the rabbit infected with *Clonorchis sinensis* by administration of 5-Hydroxymethylfurfural.

많이 함유되었는 것을 알았다. 이 실험결과로 미루어 볼 때 오매중의 5-HMF는 그 대다수가 청매를 혼증하는 과정에서 생성된 것이라고 할 수 있다.

Table IV—Morphological changes in the adult of *Clonorchis sinensis* by 5-HMF in vivo.

Status of changed worm body	No. of worm	%
Irregularity in intestinal wall	2	9
Degenerative change of ovary	5	23
Degeneration of testis	2	9
Regurgitation of intestinal contents	4	18
Swelling of oviduct	6	27
No change	3	14
Total	22	100

본 물질의 集量을 위해 Haworth와 Jones¹¹⁾의 방법으로 합성하였고 16%의 수율로 물질을 얻어 생체실험을 하였다. 합성한 물질 100mg/kg을 일 2회, 간흡충에 감염된 체중 2kg내외의 가토 4마리에 근육 주사하고 10일간 각각의 총란 산란수를 측정하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 총란의 산란수는 물질을 주사한 후 2일에 최대치를 나타내었고 그 후에 점점 감소하는 경향이었으며 이는 일반 기생충약과 같은 양상이었다. 총란의 산란수 측정이 끝난 후 실험 동물중 한 마리를 도살하여 담도로부터 간흡충의 성충 22마리를 적출하여 그 형태학적 변화를 관찰하여 Table IV와 같은 결과를 얻었다. 이 것으로부터 오매의 살충 물질인 5-HMF는 간흡충의 성충에 대해 1차적으로 생식기에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다.

결 론

한방에서 회충(*Ascaris lumbricoides*)의 구제 목적으로 사용해 오던 烏梅 (the roasted fruits of *Prunus mume*)에 함유되어 있는 간흡충(肝吸蟲, *Clonorchis sinensis*)의 살충성분에 관한 연구를 행하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 오매의 메탄올 추출물을 석유에틸, 에틸에텐, 초산에틸로 용매 분획하고 그 분획물을 간흡충의 탈낭유충에 직접 접촉시킨 결과 석유에틸 추출물에서는 유의한 살충 효과가 나타나지 않았으며 에틸 및 초산에틸추출물에서는 강한 살충 효과가 있었다.

2. 에틸에틸층을 CHCl_3 -MeOH(19:1)을 용매로 silica gel column chromatography하여 얻은 분획중 분획 3이 강한 살충효과를 보였다. 분획 3으로부터 polyamide 및 sephadex G-10 column chromatography하여 간흡충에 살충 효과를 갖는 순수 물질을 단리, 그 구조를 동정한 결과 5-hydroxymethylfurfural(5-HMF)임을 알아냈다. *in vitro* 실험에서 이 물질은 시험액 1mg/ml에서 간흡충의 성충을 10분에 사멸시켰다.

3. 5-HMF를 합성하여 간흡충에 감염된 가토에 주사하여 EPG를 측정한 결과 주사 후 2일에 최대의 총란 산란수를 기록하였으며 그 후 점점 감소하였고 이는 일반 기생충약과 같은 양상을 나타내었다. 또한 EPG측정이 끝난 후 실험가토로부터 적출한 성충을 관찰하였는데 86%가 총체의 형태학적 변화를 일으켰음을 알아냈다.

4. 오매의 작용물질인 5-HMF의 청매와, 90~110°C에서 가열 처리한 청매중의 함량을 HPLC법으로 정량한 결과 청매에 0.02%, 가열처리한 청매에 0.8%의 함량을 보여 가열 처리한 청매에 더 많이 함유되어 있음을 알았다. 따라서 본 물질은 청매(青梅)의 훈증과정에서 다량 생성된다고 할 수 있다.

본 연구의 일부는 문교부의 학술진흥재단의 연구비 지원으로 수행되었다.

문 헌

1. 田世圭, 肝吸蟲의 感染經路에 관한 實驗的 研究. 第三篇. 各種 魚類 體表面 粘液物質의 肝吸蟲에 대한 殺蟲效力. 기생충학 잡지 2, 12 (1964).
2. 李宰求, 白秉杰, 安丙浚: 肝吸蟲에 대한 殺蟲性 物質에 관한 연구 I. 붕어 粘液으로부터 殺蟲性 物質 추출 시험. 기생충학 잡지 18, 98 (1979).
3. J.K. Rhee, K.J. Woo, B.K. Baek and B.Z. Ahn, Screening of the wormicidal chinese raw drugs on *Clonorchis sinensis*. *Am. J. Chinese Med.*, 10, 277 (1981).
4. B.Z. Ahn, S.H. Ryu, B.K. Baek and J.K. Rhee, Das anthelminthische Wirkprinzip von *Machilus thunbergii* gegen *Clonorchis sinensis*. *Arch. Pharm.* 315, 894 (1982).

5. K. Nakauchi, Citric acid from aqueous extract of *Prunus mume* fruits. *Japan.* 1665(1950).
6. M. Hasegawa, Flavonoids of various prunus species. *J. Org. Chem.* 24, 408 (1959).
7. H. Kameoka and C. Kitagawa, Constituents of the fruits of *Prunus mume* Sieb et Zucc. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 50, 389 (1976).
8. Y. Takizawa, M. Saito, K. Okuhara and T. Mitsushi, Studies on the constituents of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. form *purpurea* Mak; Phenolic compounds and sugars. *Tokyo Gakugei Daigaku Kiyo*, 31, 137 (1979).
9. Y.S. Ma and R. Roper, Microchemical investigation of medicinal plants. I. The antituberculous principle in *Prunus mume* and *Shizandra chinensis*. *Microchim. Acta.* 1, 167 (1968).
10. E. Steinegger and R. Hansel, "Lehrbuch der Pharmakognosie" 3, Auflage, Springer Verlag. (1972) 88p.
11. W.N. Haworth and W.G. Jones, The conversion of sucrose into furan compounds. Part I. 5-Hydroxymethylfuraldehyde and some derivatives. *J. Chem. Soc.* 1944. 667.