

## 백지 BuOH 가용분획의 항혈전 활성에 관한 연구

김창민 · 권용수 · 윤혜숙\*

강원대학교 약학대학 · 서울대학교 천연물과학 연구소\*

### Antithrombotic Effect of the BuOH Soluble Fraction of *Angelica daburica* Root

Chang Min Kim, Yong Soo Kwon and Hye Sook Yun-Choi\*

College of Pharmacy, Kwang Won National University, Chun Cheon 200-701, and

\*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

**Abstract**—Several coumarins isolated from *Angelica* sp. were described to show inhibitory effects against human platelet aggregation. The anti-thrombotic and anti-platelet potential was evaluated, in this paper, with the BuOH soluble fraction of *Angelica daburica* root. The BuOH fraction was divided into five subfractions fr. A - E and tested in the mouse model of thrombosis. Survival was enhanced to 35 % with fr. A or fr. E treated (500 mg/Kg, *p.o.*) group of mice compared with 5 % survival of the control group. However, none of the 8 coumarin glycosides obtained from fr. A, at the conc. of 0.5 mg/ml, showed inhibitory effects against rat platelet aggregation induced by ADP or collagen.

**Keywords**—*Angelica daburica* · Umbelliferae · antithrombotic effect

구릿대 *Angelica daburica* Bentham et Hooker 는 Umbelliferae에 속하는 다년생 초본으로 그 뿌리는 백지(白芷)라 하고 發散止痛, 解毒排膿 祛風燥濕, 利尿, 解熱 등의 효과가 있어 風邪, 頭痛, 關節痛, 齒痛, 鼻腔炎, 蛇毒의 解毒, 白帶下 등에 널리 사용하고 있다.<sup>1,3)</sup> 백지의 기원을 보면 우리나라, 중국, 일본에서도 대부분 구릿대의 뿌리를 정품으로 쓰고 있지만 중국의 일부지역에서는 川白芷 *Angelica anomala*, 杭白芷 *A. formosa*, 雲南牛防風 *Heracleum scabrium*의 뿌리를 같은 용도로 쓰는 사례가 있어<sup>1,3)</sup> 그 활성성분의 분리 구명은 물론 활성이 인정되는 분획에 대한 성분 조성도 구명하여 대체 생약과의 관계도 밝힐 필요가 있다. 저자 등은 백지의 물추출물에서 유의성 있는 항균효과, 혈액상 및 혈류 개선 효과, 간장 보호효과 및 스테로이드약물 장기투여에 의한 부작용 감소 효과가

있음을 보고 하였으며<sup>4)</sup> 백지의 성분물질로서 BuOH 가용부로부터 coumarin glycoside인 nodakenin, 3'-hydroxymarmesinin, tert.-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-byakangelicin, sec.-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-byakangelicin, scopolin, adenosin, skimmin 및 8-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-xanthotoxol과 tert.-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-heracleol을 분리 보고한 바 있다.<sup>5,6)</sup>

Okuyama 등은 *Angelica*속 식물로부터 분리한 nodakenin, nodakenetin 등의 coumarin 성분들이 혈소판응집 억제작용을 가짐을 보고한 바 있어<sup>7)</sup>, coumarin 계열물질들이 혈소판 응집 억제작용을 가짐으로서 항혈전작용을 가질 가능성을 제시하였다. 이에 저자 등이 전보에서<sup>5,6)</sup> nodakenin 등 8종의 coumarin 성분들을 분리 보고한 바 있는 백지의 BuOH 가용분획에 대하여 mouse 혈전모델에서 항혈전활성을 갖는가를

확인하고 각 성분들의 혈소판 응집 억제활성을 검색함으로써 백지의 작용성분을 구명하고자 하였다.

### 실험방법

**실험재료** - 강원도 진부일대에서 채배한 백지를 구입하여 사용하였다.

**실험기기 및 시약** - Centrifuge는 Sorvall RT-6000, Whole blood platelet analyzer는 Texas International Lab. PLT-4, Whole blood platelet aggregometer는 Chrono-Log 500VS Whole Blood Lumi-aggregometer를 사용하였다.

**백지의 추출, 분획 및 성분의 분리** - 백지는 MeOH로 추출하여 MeOH 엑스를 얻고, MeOH 엑스를 물에 녹인 후, Benzene, EtOAc 및 BuOH의 순서로 추출하여 BuOH 가용분획을 얻었다. BuOH 분획은 CHCl<sub>3</sub>-MeOH (5:1)을 용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 fr. A, fr. B, fr. C, fr. D, fr. E의 5개 세분획으로 나누어 항혈전작용 검색의 시료로 사용하였으며, 그중 fr. A를 MeOH-H<sub>2</sub>O (4:6)의 용매로 Lobar column (RP-18B)을 사용하여 reversed column chromatography를 실시하고, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (30:10:1), EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (10:1:0.5)를 용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 4개의 coumarin glycosides를 분리하였고, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O

(30:10:1), EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (9:2:1)의 용매로 silica gel column chromatography를 반복 실시하여 4개의 coumarin glycosides를 분리하여 앞에서 언급한 바와 같이 모두 8개의 coumarin glycosides를 분리하여 표품과의 비교 확인후 혈소판 응집 억제 작용 실험의 시료로 사용하였다.

**마우스를 이용한 항 혈전작용검색<sup>8)</sup>** - 미리 약 3시간 절식시킨 마우스(ICR계, 20±2 g)에 시료용액을 경구 투여하고 1시간후 collagen과 epinephrine 혼합용액(650 µg collagen + 65 µg epinephrine/10 ml/kg)을 꼬리정맥에 주사한 후 15분간 폐동맥 경색에 의한 마비의 지속, 사망 또는 마비로부터의 회복여부를 관찰하여 시료의 항혈전 효과를 판정하였다.

**혈소판 응집 억제 작용 검색<sup>9)</sup>** - Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐(200±20 g)를 CHCl<sub>3</sub>로 마취시킨 후 2.2% trisodium citrate(1 volume)를 넣은 plastic 주사기를 이용하여 심장으로 부터 혈액(9 volume)을 채취하고 200 × g에서 10분간 원심 분리하여 상층액 혈소판 혈장(PRP. Platelet Rich Plasma)를 얻고 Platelet Analyzer를 이용하여 PRP의 혈소판 수를 세고 생리식염수로 희석하여 혈소판 수를 400~450×10<sup>6</sup>/ml로 맞추어 사용하였다. 혈소판 응집 측정기를 이용하여 PRP(0.45 ml)를 0.05 ml sample의 생리식염수 용액(5 mg/ml)과 1분간 37°C에서 배양한 후 혈소판 응집유도 물질로서 ADP 또는 collagen 용액을 넣고 1000 rpm으로 stirring하면서

**Table I.** Protection of mice from thrombotic challenge with the oral administration of sub-fractions of BuOH soluble fraction of *Angelica daburica* root.

	total no. of mice tested	recovered within 15 min		killed within 5 min	
		no.	%	no.	%
control	20	1	5	17	85
Aspirin	20	9	45	10	50
fr. A	20	7	35	12	60
fr. B	10	1	10	9	90
fr. C	20	6	30	14	70
fr. D	10	2	20	8	80
fr. E	20	7	35	13	65

\*Aspirin(50 mg/Kg, p.o.) or Sample(500 mg/Kg, p.o.) was given 1 hr prior to the thrombotic challenge(650 µg collagen plus 65 µg epinephrine/Kg, i.v.)

37°C에서 배양을 계속하여, 혼탁도의 변화로서 혈소판 응집 정도를 판정하였다. ADP 및 collagen의 최종농도는 각각  $2\sim 3 \times 10^{-6}$  g/ml 및  $6\sim 10 \times 10^{-6}$  g/ml로서 각 PRP가 최고응집을 일으키는 농도에서 실험 하였으며 각 시료의 응집 억제도를 %로서 구하였다.

### 결과 및 고찰

백지의 BuOH가용부는 Silica gel column chromatography를 실시하여 fr.A, fr.B, fr.C, fr.D, fr.E의 다섯개의 세분획으로 분리하여 실험하였다. 마우스에 collagen과 epinephrine의 혼합용액을 주사하면 혈전형성에 의하여 급성 폐경색이 발생하며 전신마비를 거쳐 대부분이 2 - 3분에 사망하거나 15분 이상 마비가 지속됨을 관찰하게 된다. Table I에서 정리한 바와 같이 대조군에서는 5분 이내 사망율이 85%이며 15분 이내에 5%만이 마비로부터 회복된 반면, 양성대조군인 aspirin투여군에서는 5분 이내 사망율 50%, 15분 이내 회복율 45%로서 증상의 경감이 뚜렷하였다. 각 fr.들의 투여군의 경우 fr. A와 fr. E투여군에서 5분 이내 사망율 각각 60%, 65%로서 aspirin투여군 보다는 약하나 증상의 개선을 관찰할 수 있었고 15분 이내 회복율 또한 각각 35%로서 역시 aspirin보다는 약하나 대조군에 비하여는 확실한 회복 증강효과를 보였다. fr. B는 대조군에 비하여 효과를 관찰할 수 없었으며 fr. C 또는 fr. D투여군은 매우 미약하나 5분 이내 사망율 및 15분 이내 회복율 모두에서 대조군에 비하여는 혈전증상의 개선효과를 보였다. 이에 약하기는 하나 5종의 sub-fraction 중 가장 강력한 항혈전작용을 보인 fr. A로부터 성분을 분리하였으며 본연구자들이 BuOH 가용부로부터 이미 분리하여 보고한 바 있는 8종의 coumarin 성분들 즉 nodakenin, 3'-hydroxymarmesinin, tert.-O-β-D-glucopyranosyl-byakangelicin, sec.-O-β-D-glucopyranosyl-byakangelicin, scopolin, skimmin, 8-O-β-D-glucopyranosyl-xanthotoxol 및 tert.-O-β-D-glucopyranosyl-heraclenol 등 8개의 성분을 얻어 각성분들이 랫트의 혈소판 혈장을 이용한 실험에서 혈소판응집에 대하여 억제작용을 갖는가를 검색하였다. 그 결과 실험한 8개의 화합물 모두가 최종농도 0.5 mg/ml에서 ADP 또는 collagen에 의하여 유도되는 혈소판응집에는 억제작용이 없음을 관찰하였다. Okuyama 등은 본 실험에서와는 달리 ADP에 의한 혈소판응집능이 정상혈액에 비하여 상승되어 있는 사람혈액을 사용하여 실험하여 nodakenin 및 nodakenetin 등의 furocoumarin들이 혈소판응집 억제작용을 갖는다고 보고한 바 있으나 랫트혈액에서는 별도로 관찰할 수 없는 1차응집(primary aggregation)에 대하여 억제작용을 관찰한 것으로 보인다. 마우스혈액에서도 랫트혈액과 유사하게 ADP에 의하여 1차응집을 별도로 관찰할 수 없으며, 따라서 Okuyama 등이 관찰한 nodakenin의 항혈소판작용과 백지 BuOH 가용분획의 마우스혈전모델에서의 항혈전작용을 직접 연결지어 설명하기는 어려울 것으로 사료된다. 위와 같은 결과로서 앞으로 백지의 항혈전작용에 대한 폭넓은 규명과 활성성분의 분리가 기대된다 하겠다.

용을 갖는가를 검색하였다. 그 결과 실험한 8개의 화합물 모두가 최종농도 0.5 mg/ml에서 ADP 또는 collagen에 의하여 유도되는 혈소판응집에는 억제작용이 없음을 관찰하였다. Okuyama 등은 본 실험에서와는 달리 ADP에 의한 혈소판응집능이 정상혈액에 비하여 상승되어 있는 사람혈액을 사용하여 실험하여 nodakenin 및 nodakenetin 등의 furocoumarin들이 혈소판응집 억제작용을 갖는다고 보고한 바 있으나 랫트혈액에서는 별도로 관찰할 수 없는 1차응집(primary aggregation)에 대하여 억제작용을 관찰한 것으로 보인다. 마우스혈액에서도 랫트혈액과 유사하게 ADP에 의하여 1차응집을 별도로 관찰할 수 없으며, 따라서 Okuyama 등이 관찰한 nodakenin의 항혈소판작용과 백지 BuOH 가용분획의 마우스혈전모델에서의 항혈전작용을 직접 연결지어 설명하기는 어려울 것으로 사료된다. 위와 같은 결과로서 앞으로 백지의 항혈전작용에 대한 폭넓은 규명과 활성성분의 분리가 기대된다 하겠다.

감사의 글 - 이 연구는 한국학술진흥재단의 지원(1993. 9-1994. 8)에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드린다.

<1995년 1월 16일 접수>

### 참고문헌

1. 陳在仁: 圖說漢方 醫學大事典 (中國漢藥大典), 94, 譚談社 (1982).
2. 上海科學技術出版社: 中藥大事典, 小學館, pp. 2243 (1975).
3. 江蘇新醫學院: 編中藥大事典, 上海科學技術出版社, pp. 675 (1977).
4. Kim, C.M., Heo, M.Y., Kim, H.P., Sin, K.S. and Pachaly, P.: *Arch. Pharm. Res.* 14, 87 (1991).
5. Kim, S.H., Kang, S.S. and Kim, C.M.: *Arch. Pharm. Res.* 15, 73 (1992).
6. Kwon, Y.S. and Kim, C.M.: *Kor. J. Pharmacogn.* 23, 221 (1992).
7. Okuyama, T., Kawasaki, C., Shibata, S., Hoson, M., Kwada, T., Osada, H. and Noguchi, T.: *Planta Med.* 132 (1986).

8. Dimino, G. and Silver, M.J.: *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **225**, 57 (1983).      9. Born, G.V.R.: *Nature*, **194**, 927 (1962).