

백두옹의 혈당강하 성분연구 (I)

김현종 · 김현태 · 배춘일 · 오갑진 · 박시경* · 정순간 · 조의환

삼진제약(주) 중앙연구소

(Received August 18, 1997)

Studies on the Hypoglycemic Constituent of Pulsatillae Radix (I)

Hyun-Jong Kim, Hyun-Tae Kim, Choon-il Bae, Gab-Jin Oh,
Si-Kyung Park*, Sun-Gan Chung and Eui-Hwan Cho

Central Research Institute, Samjin pharmaceutical Co., LTD.,
Hwasung Gun, Kyunggi Do, 445-920 Korea

Abstract—For the investigation of bioactive natural products with hypoglycemic effect, we have evaluated various extracts of Pulsatillae Radix(Ranunculaceae), which has been used in traditional medicine for hemochezia due to intense evil heat, malaria, chills and fever, epistaxis and internal hemorrhoids. The ethylacetate extract of the radix of this plant was found to show a significant hypoglycemic effect on alloxan diabetogenic mice. Using bioactivity-guided chromatographic purification of the ethylacetate extract, hypoglycemic constituent : 2 β , 3 β , 14 α , 20, 22R, 25-hexahydroxy-cholest-7-en-6-one was isolated and structurally identified by physico-chemical properties and spectroscopic evidences.

Keywords □ *Pulsatilla chinensis*, Ranunculaceae, hypoglycemic effect, ecdysterone(2 β , 3 β , 14 α , 20, 22R, 25-hexahydroxy-cholest-7-en-6-one), ecdysteroid.

당뇨병(Diabetes Mellitus)은 만성대사성 질환으로써 병이 오랜시간 경과함에 따라 혈관장애와 신경, 신장 그리고 망막등의 기능 이상을 초래하는 치명적인 성인 병중의 하나이다.¹⁾ 성인 환자의 대부분은 인슐린 비 의존성 당뇨병(Type II)으로 분류되며 환자들은 이러한 질병의 치료와 합병증 예방을 위하여 약물 복용과 함께 식이, 운동 요법 등을 병행하고 있다. 현재 사용하고 있는 경구용 혈당 강하제들은 임상에서 그 효과와 안전성에 문제가 있고 특히 간기능 장애는 물론 저혈당, 유산혈증 등의 부작용을 수반하기도 한다.²⁾ 따라서 이와 같은 문제점과 부작용을 줄이고 대사이상 증세를 개선하며 장기복용에 따른 안전성이 높은 당뇨병 치료제 개발이 절실이 요구된다. 백두옹(Pulsatillae Radix)은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 다년생 초본

인 Pulsatilla속 식물의 뿌리를 건조한 것으로 민간에서는 양혈지리, 청열해독 등의 효능이 있고 세균성 이질, 비혈, 치창 출혈, 대하등에 쓰이는 것으로 알려져 있다.^{3,4)} 우리나라는 *P. koreana*를 주로 사용하고 일본은 *P. cernua* 그리고 중국에서는 *P. chinensis* 및 근연 식물의 뿌리를 각각 상기 생약으로 사용되고있다.⁵⁾ 본 저자들은 임상에서 이상적으로 사용 가능한 당뇨병 치료제를 개발하기 위하여 천연자원을 대상으로 약효검색을 실시하였으며 그 결과 세잎 할미꽃(*Pulsatilla chinensis*) 뿌리의 추출물이 혈당 강하작용이 있다는 사실을 발견하고 이 추출물을 계통적인 용매분획에 따라 hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH과 H₂O등 5개의 분획물을 제조하여 이것을 1차 약효 검색의 시료로 사용하였으며 이중에서 EtOAc분획물이 유의성있는 혈당 강하작용을 나타내었다. 따라서 EtOAc 가용부에 대하여 각종 컬럼 크로마토그래피를 이용해서 생리활성 물질인 compound 1을 추적 분리하였다.

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0339-353-1712 (팩스) 0339-353-8701

실험방법

실험 재료 - 본 실험에 사용된 백두옹은 서울 소재 경동시장 한약 건재상에서 구입하여 *Pulsatilla chinensis* (B_{GE}) R_{EG}로 감정 확인 후 사용하였다.

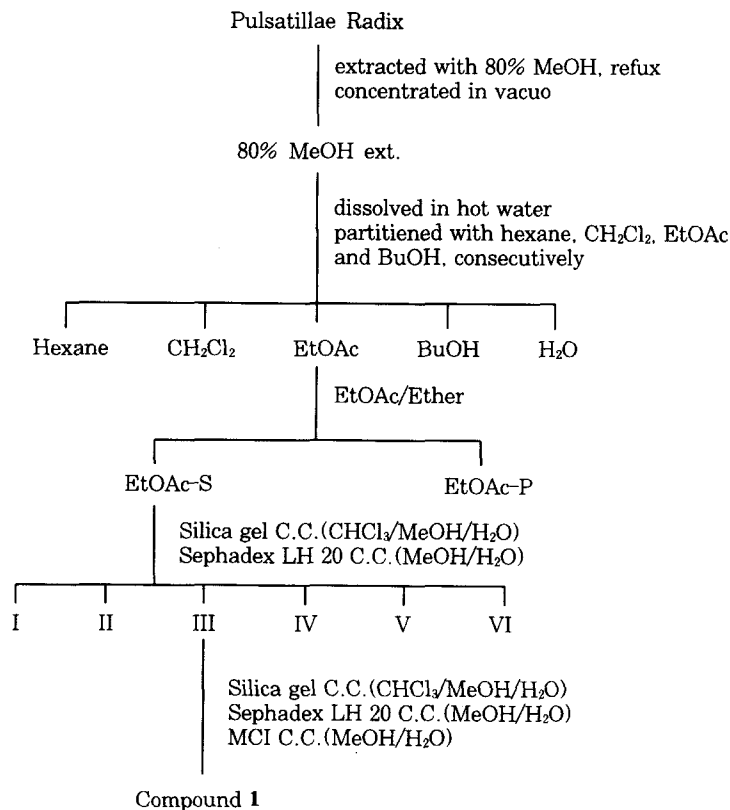
시약 및 기기 - 박층 크로마토그래피용 precoated TLC plate는 silica gel 60 F₂₅₄ (Merck Art. 5554)를 이용하였고 컬럼 크로마토그래피는 silica gel 60(70~230 mesh, Merck), Sephadex LH 20(20~100 μ, Pharmacia)과 MCI gel CHP 20P(75~150 μ, Mitsubishi Chem. Ind.)등을 사용하였다. Alloxan은 sigma제품을 사용하였고 glucose kit는 한일약품의 제품을 사용하였으며 그 외 시약들은 시판 특급 혹은 일급을 사용하였다. 사용기기로는 용점은 Electrothermal IA8100(uncorrected), IR spectrum은 Shimadzu IR-435, UV spectrum은 Hewlett Packard 8452A, ¹H과 ¹³C-NMR spectrum은 Bruker AMX-500 그리고 MS spectrum은 Hewlett Packard

5988를 사용하여 측정하였다.

실험 동물 - 삼진제약(주) 중앙연구소 동물사육실에서 자체 생산한 ICR계 수컷생쥐(체중23±2 g)를 실험에 사용하였으며 물과 사료를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 사료는 시판 고형사료(삼양유지 공업주식회사)를 사용하였으며 사육실의 내부온도는 23±1°C, 습도는 55±1%로 유지하였다.

급성 독성실험 - ICR계 수컷생쥐(체중23±2 g) 6마리를 한 군으로 compound 1을 경구와 비경구 투여한 후 7일까지의 행동의 이상 유무와 사망여부를 관찰하였다.

혈당강하 작용검색 - ICR계 수컷생쥐(체중23±2 g) 10마리를 한군으로 나누어 16시간 절식시킨 후 alloxan⁶⁾ 75 mg/kg을 꼬리 정맥에 주사하고 48~72시간 후 채혈하여 혈당치가 400 mg/dl 이상인 것을 고혈당쥐로 선택하여 실험에 사용하였다. Compound 1을 생리 식염수에 녹여 경구투여 하였고 240분 후 꼬리 미정맥으로 부터 채혈하여 glucose oxidase method⁷⁾에



Scheme 1— Extraction and Isolation of compound 1 from Pulsatillae Radix.

의해 혈당을 측정하였다.

추출 및 분리 - 건조된 백두옹 분말 7 kg을 80% MeOH 10L로 3시간씩 3회 환류 냉각 추출하고 추출액을 감압 건조하여 농축된 엑스(705 g)를 얻었다. 이 엑스에 증류수 1L를 넣고 수조에서 현탁시킨 후 상온에서 계통적인 용매 분획을 실시하여 hexane(19 g), CH₂-Cl₂(24 g), EtOAc(76 g), BuOH(154 g), H₂O(365 g) 등의 5개의 엑스를 조제하고 이것을 1차 약효검색의 시료로 사용하였다. 약효 검색 결과 유의성있는 활성이 관찰된 EtOAc엑스를 EtOAc/Et₂O로 침전을 시켜 상등액(EtOAc-S)와 침전(EtOAc-P)을 각각 얻었으며 이중 혈당 강하작용이 강한 EtOAc-S에 대하여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(EtOAc/MeOH/H₂O=100:13.5:10)와 Sephadex LH 20(MeOH), MCI(H₂O MeOH, gradient)칼럼 크로마토그래피를 실시하여 백색 침상 결정인 compound 1(900 mg)을 분리하였다(Scheme D).

Compound 1 - 백색침상결정, mp : 240~241°C, IRv $\frac{KBr}{cm^{-1}}$: 3400(-OH), 2900, 1650(C=O), 1400, 1350, 1050(C-O), UVλ $\frac{EtOH}{max}$ nm(log ε) : 243(4.04), MS (EI)m/z(relative intensity) : 480(M⁺,7), 444(15), 426(66), 345(93), 300(75), 267 (54), 161(37), 143(75), 125(59), 99(100), ¹H-NMR(500 MHz, C₃D₈N) δ : 1.06 (3H, s, H-19), 1.21(3H, s, H-18), 1.61(3H, s, H-21), 1.40 (6H, s, H-26, H-27) 3.01(2H, m, H-5, H-17), 3.61(1H, m, H-9), 3.89(1H, m, H-22), 4.22(1H, m, H-2), 4.26(1H, m, H-3), 6.26(1H, d, J=2.5 Hz, H-7), ¹³C-NMR(125 MHz, C₃D₈N) δ : 203.9(C-6), 166.4(C-8), 121.7(C-7), 84.4(C-14), 77.6(C-22), 77.0(C-20), 69.8(C-25), 68.2(C-3), 68.1(C-2), 51.4(C-5), 50.1(C-17), 48.1(C-13), 42.5(C-24) 38.7(C-10), 37.8(C-1), 34.4(C-9), 32.4(C-4), 32.0(C-12), 31.7(C-15), 30.1(C-27) 29.9(C-26), 27.4(C-23), 24.4(C-19), 21.6(C-21), 21.4(C-16), 21.1(C-11), 17.9(C-18)

결과 및 고찰

구조 확인 - Compound 1은 IR spectrum상에서 3400, 1650 그리고 1050 cm⁻¹의 band들로 부터 hydroxyl group, carbonyl group과 alcohol성 OH group을 갖고 있고 ¹H-NMR spectrum에서 5개의 methyl group(δ 1.06, 1.21, 1.61 그리고 δ 1.40×2)과

δ 6.26부근의 olefinic proton(1H, d, J=2.5 Hz)signal 그리고 여러 개의 hydroxy group이 치환된 polyhydroxysteroid compound의 pattern을 보여주었다. ¹³C-NMR spectrum에서 골격 구조의 탄소수가 27개이고 1개의 carbonyl carbon(δ 203.9)과 olefinic carbon(δ 121.7, 166.4) 그리고 δ 68.1, 68.2, 84.4, 77.0, 77.6, 69.8에서 6개의 carbinol carbon의 signal들을 확인 함으로서 compound 1이 hexahydroxy cholesterol의 구조임을 알 수 있었다. UV spectrum에서 흡수 극대 peak가 243 nm에서 관찰되어 cholesterol의 구조중에서 Δ⁷-6-one을 갖는 hexahydroxycholest-7-en-6-one의 구조로 예상하였고 MS spectrum에서 분자 ion peak(M⁺)가 480이고 side chain fragment ion peak가 161, 143, 125등에서 나타나는 양상으로 부터 compound 1의 구조는 2β, 3β, 14α, 20, 22R, 25-hexa-hydroxycholest-7-en-6-one의 구조로 추정할 수 있었다.^{8,9} 이 물질은 식물에서 분리된 곤충의 변태 활성을 갖는 탈피 호르몬의 대표적인 물질인 ecdysterone이며^{10,11} 이 물질에 대한 기존 문헌의 ¹³C-NMR data와 compound 1의 data를 비교 검토한 결과 완전히 일치함을 확인 할 수 있었다.¹²⁻¹⁴

약효검색 및 급성독성 - 혈당 강하작용의 약효검색은 정상 혹은 고혈당 유발 생쥐에 대한 혈액 내의 glucose 농도를 측정 검토하였다. Pulsatillae Radix의 5개의 용매 분획물을 각각 1000 mg/kg의 용량으로 경구투여하여 혈당강하 작용을 검토한 결과 EtOAc엑스가 34.4%의 혈당감소 효과를 나타내었다(Table I). 활성이 관찰된 EtOAc엑스를 2개의 분획물로 나누고 (EtOAc-S, EtOAc-P) 이것을 각각 500 mg/kg의 용량으로 경구투여하여 약효 검색을 실시한 결과 EtOAc-S가 EtOAc-P보다 강한 혈당강하 작용을 나타

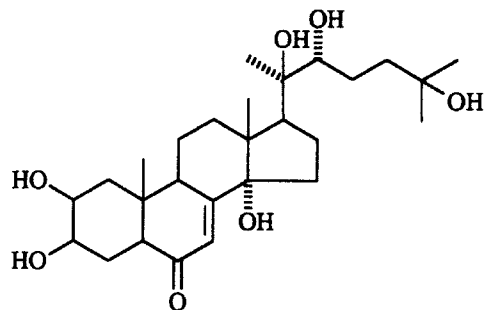


Fig. 1 - Structure of compound 1.

Table I—Hypoglycemic effect of extracts from Pulsatillae Radix in mice with diabetes

Group	Number of mouse	Dose (mg/kg, po)	Blood sugar level (mg/dl)		
			0 hr	4 hr	% decrease
Normal	10	—	121.8±5.1	119.6±5.7	1.8
Control	10	—	535.8±16.0	517.4±26.0	3.4
Hexane	10	1000	499.8±10.0	471.8±31.0	5.6
CH ₂ Cl ₂	10	1000	505.3±14.1	454.0±27.0	10.2
EtOAc	10	1000	476.2±16.0	312.4±16.0*	34.4
BuOH	10	1000	493.7±17.0	468.1±19.0*	5.2
H ₂ O	10	1000	506.4±20.0	471.0±28.0	7.0

* p<0.05; Significantly different from the control group. Mean values and S. E. from 3 experiments.

Table II—Hypoglycemic effect of fractions from EtOAc extract of Pulsatillae Radix in mice with diabetes

Group	Number of mouse	Dose (mg/kg, po)	Blood sugar level (mg/dl)		
			0 hr	4 hr	% decrease
Control	10	—	506.4±15.0	498.0±14.0	1.7
EtOAc-S	10	500	550.0±14.0	433.5±20.0*	21.2
EtOAc-P	10	500	520.0±13.0	462.3±33.0	11.1

* p<0.05; Significantly different from the control group. Mean values and S. E. from 3 experiments. S : supernatant, P : precipitate.

Table III—Hypoglycemic effect of compound 1 in mice with diabetes

Group	Number of mouse	Dose (mg/kg, po)	Blood sugar level (mg/dl)		
			0 hr	4 hr	% decrease
Control	10	—	534.5±41.0	511.7±10.0	4.3
Compound 1	10	100	540.1±16.0	459.4±22.0**	14.9
"	10	200	503.8±19.0	367.6±17.0*	27.0

* p<0.05, ** p<0.01 Significantly different from the control group. Mean values and S. E. from 3 experiments.

내었다(Table II). 따라서 EtOAc-S 분획물을 혈당 강하 활성을 지표로 한 각종 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 compound 1을 활성 물질로 분리하였다. 이 물질은 Table III에서 보는 바와 같이 100 mg/kg, 200 mg/kg 경구 투여군에서 각각 14.9, 27%의 용량 의존적으로 혈당 강하작용을 나타내었다. 또한 생쥐에 대한 급성독성 실험을 실시한 결과 경구투여는 2000 mg/kg 용량에서도 독성을 나타내지 않았고, 복강 주사와 정맥 주사에서도 각각 1000 mg/kg과 500 mg/kg 투여군 모두에서 독성을 나타내지 않았다.

결론

천연 자원으로부터 당뇨병 치료제 개발을 목적으로 백두옹의 추출물을 혈당 강하작용을 지표로 한 용매 분획과 각종 컬럼 크로마토그래피를 시행 한 결과 활성물질인 compound 1을 분리하였다. 이 화합물은 물리 화학적 성

질과 기기 분석 data를 종합하여 2 β , 3 β , 14 α , 20, 22R, 25-hexahydroxy-5-cholest-7-en-6-one(ecdysterone)으로 확인 동정하였다. 이 화합물은 혈당강하 실험결과 100, 200 mg/kg 용량에서 각각 14.9, 27.0%의 유의성있는 혈당 강하작용을 나타내었고 생쥐에 대한 급성독성 실험 결과 최소 사망 용량이 경구투여는 2000 mg/kg, 복강 및 정맥주사는 각각 1000 mg/kg, 500 mg/kg 이상으로 독성이 매우 낮은 것으로 평가되었다.

감사의 말씀

본 실험에 사용한 재료 생약을 감정해 주신 한국 의약품 시험연구소 한 대석 박사님께 깊은 감사를 드립니다.

문헌

- 1) 김선우 : 경구혈당강하제의 부작용 실태. 당뇨병

- 11(2), P.208 (1987).
- 2) 이종철 : 당뇨병의 치료, 신일상사, 서울 P.77 (1995).
 - 3) 김재길 : 원색 천연약물대사전, 상권, 남산당, 서울 P. 70 (1984).
 - 4) 김재길 : 동양 전통약물 원색도감, 영림사, 서울 P.61 (1995).
 - 5) Kikuchi, T., Arimoto, M. and Toyoda, T. : A study on the constituents of crude drug "Hakutooh". *Yakugaku Zasshi* **88**, 1078 (1968).
 - 6) Weaver, D. C. McDaniel, M. L. Naber, S. P. Barry, D. and Lacy, P. E. : Alloxan stimulation and inhibition of insulin release from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* **27**, 1205 (1978).
 - 7) Marks V. and Dawson A. : Rapid stick method for determining blood glucose concentration. *Brit. Med. J.* **1**, 293 (1965).
 - 8) Waller, G. R. and Dermer, O. C. : Biochemical applications of Mass spectrometry, John Willey & Sons Inc., New York, **9**, 639 (1980).
 - 9) Koreeda, M., Nakanishi, K., Imai, S., Tsuchiya, T. and Wasada, N. : Mass spectrometric studies of Ecdysones derivatives. *Shitsuryo Bunseki* **17**, 669 (1969).
 - 10) Girault, J. P. and Lafont, R. : The complete ¹H-NMR assignment of ecdysone and 20-hydroxyecdysone. *J. Insect Physiol.* **34**, 701 (1988).
 - 11) Rimpler, H. : Phytoecdysone und Iridoide aus *Vitex megapotamica*. *Arch. Pharmaz.* **305**, 746 (1972).
 - 12) Hikino, H., Okuyama, T., Konno, C. and Takemoto, T. : Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of phytoecdysones. *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 125 (1975).
 - 13) Bandara, B. M. R., Jayasinghe, L., Karunaratne, V., Percy, W. G., Bokel, M., Kraus, W. and Sotheeswaran, S. : Ecdysterone from stem of *Diploclisia glaucescens*. *Phytochemistry* **28**, 1073 (1989).
 - 14) Nishimoto, N., Shiobara, Y., Fujino, M., Inoue, S., Takemoto, T., Oliveira, F. D., Akisue, G., Akisue, M. K., Hashimoto, G., Tanaka, O., Kasai, R. and Matsuura, H. : Ecdysteroids from *Pfaffia irsinoides* and reassignment of source ¹³C-NMR chemical shifts. *Phytochemistry* **26**, 2505 (1987).