

가상 검색 및 시험관 시험을 이용한 총명탕 중 주성분들에 대한 약물작용 및 대사 예측

권 영 이*

우석대학교 약학대학

(Received September 18, 2007; Revised November 12, 2007)

In silico Prediction and *In vitro* Screening of Biological Activities and Pharmacokinetics for the Major Compounds in Chong Myung Tang

Young-Ee Kwon*

College of Pharmacy, Woosuk University, Samnye-eup, Wanju-gun, Jeonbuk 565-701, Korea

Abstract — Chong Myung Tang is consisted of three medicinal herbs (*Acori Graminei Rhizoma*, *Polygalae Radix* and *Hoelen cum Radix*). It has been used as a medicine for the purpose of learning and memory improvement. In this paper, Chong Myung Tang was screened the biological activities for Alzheimer's disease. The extract (70% ethanol) of *Acori Graminei Rhizoma* (1 mg/ml) showed that acetylcholinesterase (AChE) and amyloid beta ($A\beta$) peptide aggregation inhibitory potency are 43.1% and 76.5%, respectively. The extract of *Polygalae Radix* showed inhibitory activity against $A\beta_{1-42}$ peptide aggregation (51.5%). To predict the drug-likeness, oral absorption ability, blood-brain barrier (BBB) penetration rate, mutagenicity and carcinogenicity, *in silico* screening was performed against 16 compounds in the three medicinal herbs. According to the results, all compounds have appropriate chemical structures as medicines. The six compounds in *Acori Graminei Rhizoma* and the five compounds in *Hoelen cum Radix* showed excellent oral absorption rate and BBB penetration rate. The four compounds in *Polygalae Radix* showed excellent oral absorption rate, but their BBB penetration was presented low rate. And, the extract of *Hoelen cum Radix* didn't show AChE and $A\beta_{1-42}$ peptide aggregation inhibitory activities *in vitro*. Therefore, their activity in brain may be other mechanism. According to all of the results, *in silico* prediction technology is convenient and effective to determine biological active compounds in medicinal herbs.

Keywords □ Chong Myung Tang, *Acori Graminei Rhizoma*, Alzheimer's disease, *in silico* screening, ADME, toxicity, AChE, $A\beta_{1-42}$

총명탕(聰明湯)은 동의보감(東醫寶鑑) 내경(內景)편과 의부전록(醫部全錄)에 多忘(건망증)을 치료하는 것으로 기재된 처방으로, 고래로부터 이를 이용하여 기억력감퇴, 건망증 등을 치료하는데 활용되어 왔다.¹⁻³⁾ 총명탕의 처방은 동의보감에 석창포(*Acori Graminei Rhizoma*), 원지(*Polygalae Radix*), 백복신(*Hoelen*)을 각각 동일한 분량으로 섞어 한번에 12g씩 물에 달여 먹거나, 가루를 내어 8g씩 물에 타서 하루 세 번 먹는 것으로 되어있다. 총명탕 처방 중의 백복신은 심(心)을 보(補)함으로써 놀람·황홀함·성냄 등을 진정시켜 마음을 아주 평온하게 해주고, 석창포는 마음으로 통하는 구멍 즉 심구(心竅) 혹은 심공(心孔)을 활짝

열어주며, 원지는 마음 구멍에 쌓인 담연(痰涎)을 말끔히 없애주는 역할을 한다고 한다. 총명탕의 효능에 대해 오랫동안 먹을 경우 하루에 천 마디 말을 암송할 수 있다(久服能日誦千言)고 풀이해 놓았을 정도로 고대문헌은 이의 효능을 높이 평가하였다. 현대 사회에서도 수험생이나 노인층의 총명탕에 대한 관심은 매우 커져 총명탕제제가 시중에 유통되고 있는 실정이다. 총명탕이 기억력감퇴를 유발시킨 환경에 대하여 학습과 기억력을 유의성 있게 회복시킨다는 보고가 있으며,⁴⁾ 학자들은 총명탕이 알츠하이머병에 대한 효능이 있을 것으로 예상하고, 유의성 있는 연구 결과들을 보고하였다.⁵⁻⁷⁾ 일반적으로 다른 한약 방제들은 다양한 생약들로 처방되어있고, 그 효능 또한 다양하나, 총명탕은 다른 방제에 비하여 처방이 비교적 간단하고, 뇌의 기능을 활성화한다는 단일 효능을 말하고 있어, 본 연구자는 이에 대하여 흥미를 가지게 되었다.

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 063-290-1566 (팩스) 063-290-1567
(E-mail) yekwon@ws.ac.kr

신약개발에 사용되고 있는 컴퓨터 프로그램을 이용한 화합물들에 대한 다양한 생리활성 예측은 시간과 비용이 많이 들어가는 실험대신 컴퓨터를 활용하여 단 시간 내에 저 비용으로 검색할 수 있다는 장점이 있다. 화학구조로부터 약물적합성 여부를 구별하기 위한 연구는 유전자 알고리즘(Genetic algorithm)과 인공 신경망 알고리즘(Artificial neural network) 등을 이용하여 화합물 데이터베이스로부터 선별하는 방법이 있는데, 이 가운데에서 Lipinski가 고안한 "Rule-of-five"는 쉽게 구현할 수 있으므로 가장 많이 알려져 있으며, 또한 널리 사용되고 있다.⁸⁾ 최근 화이자 중앙연구소(Groton, NJ, USA)에서 Lipinski는 WDI(World Drug Index) 데이터베이스로부터 2,245개의 신약 화합물을 선택한 후 이들의 공통적인 성질을 분석 후 "Rule of five"라는 조건을 제시하였다. 이 조건은 1) 수소결합 공여기가 5 개 이하, 2) 수소결합 수용기가 10개 이하, 3) 분자량(molecular weight)이 500 이하, 4) 계산된 Log P값이 5 이하를 만족해야 한다는 것이다.^{9,10)} 최근 급속도로 컴퓨터가 발전하면서 약물적합성 이외에도 체내흡수 및 독성과 관련된 예측 연구도 컴퓨터프로그램을 이용하여 가능해졌다.¹¹⁾ 화합물의 여러 표현자(descriptors)로부터 인공지능(artificial neural network) 알고리즘을 이용한 인체 장내 흡수 여부^{12,13)}와 Caco-2 cell^{14,15)} 및 MDCK cell¹⁶⁾에 대한 흡수 여부 그리고 blood-brain barrier에 대한 투과성(permeability), 혈장단백질 결합정도 등의 예측이 가능해졌다.^{17,18)} 독성예측은 NTP protocol에 의하여 실험된 결과를 수집하여 독성이 나타나는 화합물과 나타나지 않는 화합물을 분류 후, 독성을 나타내는 화합물들의 공통된 표현자를 독성작용기로 판단하고, 돌연변이성 여부는 AMES mutagenicity test 결과를 모델로 예측이 가능해졌다.^{19,20)}

저자는 총명탕의 치매효능에 관심을 가지고, 총명탕 중의 주성분인 석창포, 원지, 백복신 각각의 추출물에 대하여 알츠하이머병 약물표적인 아세틸콜린에스테라제 저해능과 베타아밀로이드 펩티드저해능을 시험하여 그 효능을 알고자 하였다. 또한, 본 연구에서는 이들 각각의 생약 주성분들에 대한 생체효능을 확인하기 위하여 알려진 주성분들의 화학구조로부터 표현자를 계산하고, 약물적합성 여부, 생체 내 흡수·분포 및 대사, 돌연변이성 및 발암성 여부에 대하여 컴퓨터 프로그램을 이용하여 예측하였다.

실험 방법

시약 및 기기

아세틸콜린에스테라제 저해활성을 측정하기 위하여 사용된 acetylcholinesterase(Type V-S), acetylcholine iodide, 5,5-dithio-bis(2-nitro-benzoic acid), neostigmine bromide는 Sigma Chemical Co.의 제품을 사용하였고, 베타아밀로이드의 응집 정도

를 측정하는데 사용한 베타아밀로이드(Aβ1-42)는 미국의 아메리칸 펩티드사(American Peptide Co. USA)의 제품을, thioflavinT, phosphate buffered saline tablet, DMSO는 미국의 시그마 화학 회사의 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 덕산 과학의 특급내지는 일급 시약을 사용하였다. UV-VIS 흡광광도계는 BioRad사의 SmartSpec3000을 사용하였으며, 형광 분광분석기는 일본의 시마즈사(RF-5300PC, Shimadzu Corp.)의 기기를 사용하였다.

생약의 추출

실험에 사용된 석창포(石菖蒲, *Acori Graminei Rhizoma*), 원지(遠志, *Polygalae Radix*) 및 백복신(白茯神, *Hoelen cum Radix*)은 모두 경동시장에서 구입하였으며, 각각 300 g씩 잘게 쪼개어 70% 에탄올 500 ml에 넣고 3시간 동안 환류하며 가열하여 추출 후 감압증류하고, 동결 건조하여 생약추출물을 얻었다.

아세틸콜린에스테라제 저해능 시험

활성 측정은 Ellman법을 변형하여 행하였다. 효소는 일정량식분주하여, -80°C 하에서 보관하였으며, 최종농도는 0.03 unit의 농도로 사용하였으며, 기질은 0.1 M의 sodium phosphate buffer (pH 8.0)에 녹인 1000 μM의 acetylcholine iodide를 사용하였으며, 발색 시약은 39.6 mg의 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)와 15 mg의 NaHCO₃를 0.1 M의 sodium phosphate buffer(pH 7.0) 10 ml에 녹여 제조하였다. 효소 반응은 다음과 같이 전개하였다. 2 ml의 sodium phosphate buffer(pH 8.0)에 200 μl의 DTNB 용액과 100 μl의 효소(0.03 U)를 가한 뒤 37°C에서 10분간 preincubation하고, 기질 200 μl를 가해 3분간 반응 후 흡광도(412 nm)를 측정하였다.

베타아밀로이드(Aβ1-42) 응집 저해능 측정 실험

베타아밀로이드의 응집 정도 측정은 형광 분석법을 이용하였다. 베타아밀로이드(Aβ1-42) 펩티드는 영하 80°C에서 보관하였으며, 측정 시 사용한 최종농도는 5 μM의 농도로 사용하였다. 합성된 화합물은 실험직전 99.5%의 DMSO에 녹여 완충용액으로 농도별로 희석하여 사용하였으며, 형광물질로 사용하는 5 μM의 thioflavinT는 0.01 M 인산소다완충용액에 녹여 제조하였다. Aβ1-42 응집억제 정도를 측정하기 위하여 0.01 M 인산소다완충용액 92.5 μl에 0.1, 1, 10, 100, 200 μM 농도로 각각 조제한 합성 화합물 5 μl씩 가하고, 5 μM Aβ1-42 2.5 μl를 가한 뒤, 37°C에서 26시간 배양하여 응집시키고, 5 μM thioflavinT 2,000 μl를 가하여 형광 분광 분석기로 측정하였다. 동일한 실험을 적어도 3회 이상 반복하였다. 이때 사용한 형광 분광분석기의 파장 값은 Ex=446 nm (slit width=5 nm), Em=490 nm (slit width=10 nm) 이었으며, 응집 저해에 대한 IC₅₀ 값은 quantal-dose response 방법으로 계산하였다.

컴퓨터를 이용한 가상 검색(in silico screening)

총명탕의 주요 생약인 석창포, 원지, 백복신 중 알려진 주성분들의 화학 구조는²¹⁾ ChemDraw(ver. 8.0, ChembridgeSoft Corporation, USA)를 이용하여 MDL mol file로 변환 후 각각의 mol file들은 PreADMET(ver. 1.0, 분자설계연구소, 대한민국)²²⁾를 이용하여 계산을 수행하였다. 약물적합성 여부, 생체 내 흡수·분포 및 대사, 돌연변이성 및 발암성 여부 등 각각의 항목을 예측하기 위하여 실시되었고, 약물대사와 관련된 결과는 각 분자들의 표현자를 사용하여 인공신경망에 근거된 예측 알고리즘을 이용하여 계산하였으며, 돌연변이성 여부는 미국 NTP(National Toxicology Program)의 data set과 비교하여 계산되었고, 발암성 여부는 미국 NTP와 FDA(Food and Drug Administration)의 data set과 비교하여 계산되었다.

결과 및 고찰

석창포, 원지 및 백복신의 70% 에탄올 추출 동결건조물의 수득률은 각각 22.1%, 10.4%, 15.3%이며, 각각의 생약 1 mg/ml 농도에 대하여 아세틸콜린 저해효능과 베타아밀로이드 저해능을 시험하였다. Table I에 나타난 바와 같이 석창포의 경우 추출물 1 mg/ml의 농도에서 아세틸콜린에스테라제 저해능 43.1%, 베타아밀로이드 응집 억제능 76.5%를 보여주었다. 원지는 아세틸콜린에스테라제 저해능은 낮게 나타났으나 베타아밀로이드 응집 억제능이 51.5%로 나타났으며, 복신의 경우 두 가지 모두 저해능이 낮게 나타났다. 따라서, 총명탕이 기억력 감퇴에 효능을 나타내는 주 생약은 석창포, 두 번째는 원지로 생각된다. 각 생약의 주성분 중 실제로 알츠하이머병에 효능을 나타낼 수 있는 성분이 어느 것인지 예측하기 위하여 컴퓨터 프로그램을 이용하여 각 성분들에 대한 표현자를 이용하여 계산하였다.

이 논문에서는 거대 분자나 펩티드는 계산 대상에서 제외하고, 저분자량의 유기화합성분을 다루었다. 석창포의 6개 주요 성분 (E)-asarone, (Z)-asarone, sekshon, caryophyllene, humulene

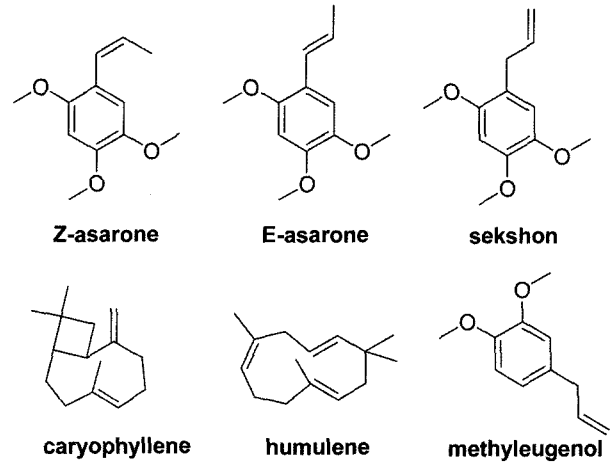


Fig. 1 - Major chemical structures in *Acori Graminei Rhizoma*.

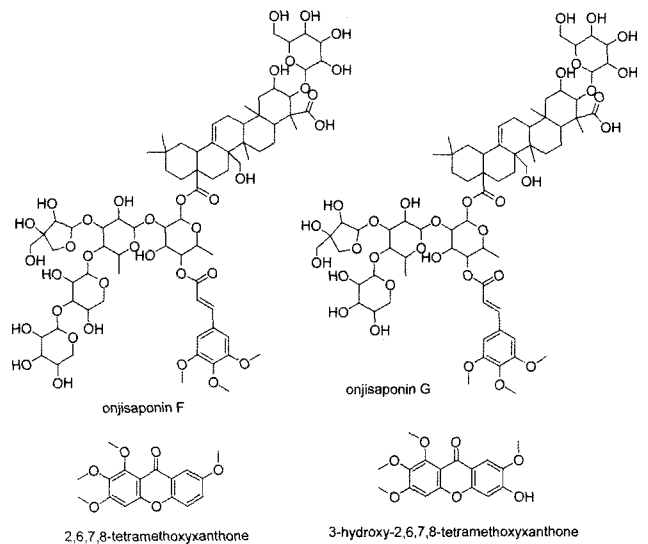


Fig. 2 - Major chemical structures in *Polygalae Radix*.

및 methyleugenol(Fig. 1), 원지의 4개 주요 성분 onjisaponin F, onjisaponin G, 2,6,7,8-tetramethoxyxanthone 및 3-hydroxy-2,6,7,8-tetramethoxyxanthone(Fig. 2), 백복신의 6개 주요성분 eburicoic acid, tumulosic acid, dehydroeburicoic acid, pachymic acid, egosterol 및 histidine(Fig. 3)을 사용하여 모두 16개 성분 에 대하여 각각의 계산을 수행하였으며, 계산 시 다당체인 원지 중의 onjisaponin F(7) 및 G(8)는 당 성분을 제거하였다. 각 Table에서는 1부터 6까지가 석창포, 7부터 10까지가 원지, 11부터 16까지 복신 중에 들어있는 성분을 정리하여 나타내었다. Table II에는 약물적합성 여부를 예측하기 위하여 각각의 성분 에 대하여 Lipinski's rule, CMC-like rule, MDDRF-like rule 및 WDI-like rule에 따라 각 구조가 포함하고 있는 표현자로 계산한 결과, 각 법칙에 따라 약간의 차이는 있었으나 세 가지 생약 중의 16개 주성분들은 모두 약물구조로 적합한 것으로 나타났다.

Table I - Screening data of Acetylcholinesterase and Aβ₁₋₄₂ aggregation inhibitory potency of each herbal extracts in Chong Myung Tang

Pharmacognogy Latin name	AChE Inhibition (% , 1 mg/ml)	Aβ aggregation Inhibition (% , 1 mg/ml)
<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	43.10	76.5
<i>Polygalae Radix</i>	8.28	51.5
<i>Hoelen cum Radix</i>	13.67	0
Tacrine	99.5	
Congo-red		99.8

Each natural product was extracted with 70% ethanol. The detection of acetylcholinesterase inhibition was tested by Ellman's method. The each value of Aβ aggregation inhibition was obtained from thioflavin T assay.

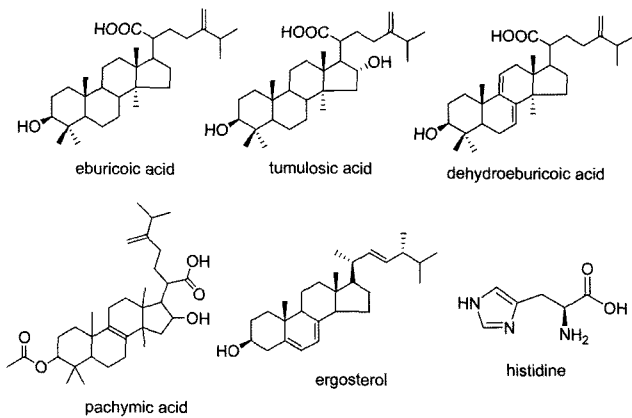


Fig. 3 - Major chemical structures in *Hoelen cum Radix*.

Table III에는 화합물의 경구투여 시 Caco-2 cell 및 MDCK-cell 을 모델로 한 장관벽 세포 투과 여부와 인체 위장관 흡수에 대한 결과, 혈액뇌관문(BBB) 통과 예측 및 혈장단백질과의 결합에 대한 계산결과를 나타내었다. 복신 중의 histidine을 제외한 15개 화합물 모두 경구투여 시 인체 위장관 흡수율이 뛰어난 것으로 예측되었고, BBB 통과가 가능한 물질은 석창포 중의 6개 성분 모두, 복신 중 histidine을 제외한 5개 성분 등 11개 성분으로 예측되었다. 따라서, 아세틸콜린에스테라제 및 베타아밀로이드펩티드 저해능 시험결과와 가상검색 결과를 종합하면, 석창포의 6개 성분 모두 기억력 증진에 관여가 가능하다고 생각된다. 이들 중 (E)-asarone과 (Z)-asarone은 기하이성질체이고 sekshon(1-allyl-

2,4,5-trimethoxybenzene)은 이들의 구조이성질체로 비슷한 구조를 가지고 있으며, methyleugenol(4-allyl-1,2-dimethoxybenzene)은 sekshon의 2번 위치의 methoxy 기만 없는 구조로 유사하다. 최근 논문에 따르면 (Z)-asarone과 (E)-asarone은 *in vitro*에서 아세틸콜린에스테라제 억제 IC₅₀ 값이 각각 3.33±0.02 μM, 46.38±2.69 μM으로 보고되어있다.²³⁾ 또한, (Z)-asarone과 eugenol이 Aβ₁₋₄₀ 펩티드에 의하여 독성이 유발된 PC-12 cell의 세포보호능이 있는 것으로 보고되어있다.²⁴⁾ 석창포의 중의 caryophyllene과 humulene은 sesquiterpene계 화합물로 이들이 포함된 생약의 항산화, 항균 및 항염작용이 보고되었다.²⁵⁻²⁷⁾ 따라서, 컴퓨터를 이용한 가상검색으로 생리활성을 나타내는 성분을 예측하는 것은 시간과 비용을 절감할 뿐만 아니라 우수한 생리활성물질 후보군을 선별함에 있어서도 매우 효과적인 것으로 나타났다. 원지 중의 4개 성분에 대한 계산결과는 모두 BBB 통과가 어려울 것으로 예측되었으나, 최근 연구논문에서 기억력 증진과 매우 관계가 깊은 약물로 보고되어²⁸⁾ 있는 것으로 미루어 볼 때, 성분 중 onjisaponin F와 onjisaponin G는 구조 중 (E)-asarone을 포함하고 있어, 생체내에서 대사시 가수분해에 의하여 당이 분해후 흡수되어 효능을 나타내는 prodrug의 형태로 작용할 가능성이 높다. 복신 중의 5개 성분의 경우 우수한 BBB 투과율이 예측되어 아세틸콜린이나 베타아밀로이드 약물표적이 아닌 다른 작용기전으로 뇌에 작용할 것으로 예상된다. Table IV에는 독성에 대한 예측결과를 나타내었다. 석창포 중의 6개 성분 중 humulene만이 3종의 AMES 모델 모두에서 돌연변이성을 나타내지 않았고,

Table II - *In silico* prediction for Drug-likeness of each compounds in Chong Myung Tang

No.	Compounds	MW	Lipinski's Rule	CMC-like Rule	MDDRF-like Rule	WDI-like Rule
1	(E)-asarone	208.3	Suitable	qualified	Mid-structure	out of 90% cutoff
2	(Z)-asarone	208.3	Suitable	qualified	Mid-structure	out of 90% cutoff
3	sekshon	208.3	Suitable	qualified	Mid-structure	out of 90% cutoff
4	caryophyllene	204.4	Suitable	qualified	Mid-structure	In 90% cutoff
5	humulene	204.4	Suitable	qualified	Mid-structure	out of 90% cutoff
6	methyleugenol	178.2	Suitable	qualified	Mid-structure	out of 90% cutoff
7	onjisaponin F	518.7	Suitable	Not qualified	Mid-structure	out of 90% cutoff
8	onjisaponin G	518.7	Suitable	Not qualified	Mid-structure	out of 90% cutoff
9	2,6,7,8-tetramethoxyxanthone	316.3	Suitable	qualified	Mid-structure	In 90% cutoff
10	3-hydroxy-2,6,7,8-tetramethoxyxanthone	332.3	Suitable	qualified	Mid-structure	In 90% cutoff
11	eburicoic acid	472.8	Suitable	Not qualifying	Mid-structure	out of 90% cutoff
12	tumulosic acid	488.7	Suitable	Not qualifying	Mid-structure	out of 90% cutoff
13	dehydroeburicoic acid	468.7	Suitable	Not qualifying	Mid-structure	out of 90% cutoff
14	pachymic acid	528.8	Violated	Not qualifying	Drug-like	out of 90% cutoff
15	ergosterol	396.7	Suitable	Not qualifying	Mid-structure	out of 90% cutoff
16	histidine	155.2	Suitable	Not qualifying	Mid-structure	In 90% cutoff

Lipinski's Rule, so called Rule of Five, is published by Christopher A. Lipinski *et al.* in Pfizer Central Research (Groton, NJ, USA). They selected a subset of 2245 compounds from WDI(World Drug Index) database and defined drug-like character through this subset. CMC-like rule is similar to rule of five and defined drug like character for the CMC database, which is removed several classes of compounds such as diagnostic imaging agents, solvents, and pharmaceutical aids. MDDRF-like rule is five test produced similar results when applied to the ACDF and MDDRF subset, which 80% of ACDF and MDDRF pass the rule of five test. ACD database is non-drug database and MDDR database is drug database. WDI-like rule is based on compounds that have molecular properties within the 90% upper bound found in the WDI (World Drug Index). *In silico* drug-likeness prediction was performed by calculation using preADMET (ver. 1.0).

Table III – *In silico* prediction for oral absorption and BBB-penetration of each compounds in Chong Myung Tang

No.	Compounds	Caco-2 cell ($\times 10^6$ cm/sec)	MDCK ($\times 10^6$ cm/sec)	HIA (% Abs)	BBB ($C_{\text{brain}}/C_{\text{blood}}$)
1	(E)-asarone	58.10	324.93	100.0	1.230
2	(Z)-asarone	58.10	324.93	100.0	1.230
3	sekshon	58.10	321.94	100.0	1.206
4	caryophyllene	23.63	56.2164*	100.0	13.319
5	humulene	23.63	60.6852*	100.0	14.222
6	methyleugenol	58.09	294.74	100.0	1.109
7	onjisaponin F	20.88	0.04	80.5	0.122
8	onjisaponin G	20.88	0.04	80.5	0.122
9	2,6,7,8-tetramethoxyxanthone	54.66	104.89	98.6	0.012
10	3-hydroxy-2,6,7,8-tetramethoxyxanthone	41.72	112.20	96.0	0.013
11	eburicoic acid	22.51	0.0464683*	96.1	10.388
12	tumulosic acid	21.55	0.04	94.4	5.583
13	dehydroeburicoic acid	22.44	0.0452863*	96.2	9.146
14	pachymic acid	22.56	0.0434737*	97.0	3.644
15	ergosterol	51.27	1.59028*	100.0	19.493
16	histidine	18.37	0.87	59.7	0.287

Caco-2 cell and MDCK cell are screening models for intestinal absorption of oral administered drugs. HIA means human intestinal absorption rate (%) and the human intestinal absorption data were evaluated from bioavailability, excretion in urine and feces following oral administration, the ratio of cumulative urinary excretion of drug-related material following oral and intravenous administration. If the HIA rate is calculated over 70%, the compound is classified well absorbed compound. BBB is penetration ratio of blood-brain barrier from non-linear fitting using the artificial neural network algorithm and calculating descriptors of the compounds. Compounds with calculated log BB > -0.4 (about BBB=0.398) were classified as compounds with good BBB penetration and those with log BB < -0.4 were regarded to correspond to bad BBB penetration. The mark "*" at the right of the resulting value means that the descriptor values of the structure exceed the range of descriptor values in training set used to predict absorption data and prediction results contain some uncertainty. *In silico* prediction was performed by calculation using preADMET (ver. 1.0).

Table IV – *In silico* prediction for toxicity of each components in Chong Myung Tang

No.	Compounds	AMES Mutagenicity test						Rodent Carcinogenicity	
		TA98		TA100		TA1535		Mouse	Rat
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9		
1	(E)-asarone	-	+	-	-	-	-	+	+
2	(Z)-asarone	-	+	-	-	-	-	+	+
3	sekshon	-	+	-	-	+	-	+	+
4	caryophyllene	+	-	-	-	-	-	-	+
5	humulene	-	-	-	-	-	-	+	+
6	methyleugenol	-	+	-	+	+	-	+	+
7	onjisaponin F	-	-	-	-	-	-	+	+
8	onjisaponin G	-	-	-	-	-	-	+	+
9	2,6,7,8-tetramethoxyxanthone	-	+	+	+	-	-	-	+
10	3-hydroxy-2,6,7,8-tetramethoxyxanthone	-	+	-	-	-	-	-	+
11	eburicoic acid	+	-	-	-	-	-	-	+
12	tumulosic acid	+	-	-	-	-	-	-	+
13	dehydroeburicoic acid	+	-	-	-	-	-	+	+
14	pachymic acid	+	-	-	-	-	-	+	+
15	ergosterol	-	-	-	-	-	-	+	+
16	histidine	-	-	-	-	+	+	-	+

Model of AMES test was analyzed according to the dataset of NTP (National Toxicology Program, USA). AMES test included three kinds of strains of *Salmonella enterica* sv *Typhimurium*, TA98, 100 and 1535 without (-S9) or with (+S9) rat liver tissue 10%. The symbol (-) means non-mutagen as negative reaction and (+) means mutagen. The computational models for carcinogenicity prediction was built with the data set of both NTP and FDA. The symbol (-) means non-carcinogen and (+) means carcinogen in rodent. *In silico* prediction was performed by calculation using preADMET (ver. 1.0).

asarone과 caryophyllene은 한 종류의 균종에서, sekshon은 두 종에서, methyleugenol은 세 종에서 돌연변이성이 예측되었으며, 설치류의 발암모델에서 모두 발암성이 있는 것으로 예측되었다.

발암모델은 NTP(미국 National Toxicology Program)의 공인된 시험방법에 의하여 실시된 것으로 설치류에게 2년간 경구투여 시 암이 유발된 것을 의미한다. 따라서, 석창포 중의 성분들은 장

기간 복용시 암을 유발할 수도 있을 것으로 예측된다. 결론적으로, 총명탕의 주효능인 기억력 증진과 가장 밀접한 관계에 있는 생약은 *in vitro*에서 AChE 억제능 및 A β_{1-42} 펩티드 응집 저해능을 함께 나타낸 석창포로 볼 수 있고, 석창포 중의 주요 성분 중에서도 asarone, caryophyllene, humulene, methyleugenol이 가장 검색된 약물동력학적 요소를 토대로 볼때 생리활성을 나타낼 가능성이 가장 큰 것으로 예측되었다.

문 헌

- 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂 (1987).
- 陳羅電等 : 古今圖書集成醫部全錄 (第7冊), 北京, 人民衛生出版社, 2150 (1983).
- 彭杯仁 : 中華名醫方濟大全, 北京, 金盾出版社, 748 (1990).
- 김영옥 외 : 聰明湯이 健忘誘導白鼠의 學習과 記憶에 미치는 影響. 韓方再活醫學科學會誌 8, 464 (1998).
- 박지운, 정인철, 이상룡 : 聰明湯과 木槿皮聰明湯이 CT105와 β A로 유도된 Alzheimer's disease 病態 모델에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지 17, 37 (2006).
- 하수영, 정인철, 이상룡 : 聰明湯과 山査聰明湯이 Alzheimer's disease 病態 모델에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지 17, 59 (2006).
- 오영진, 김보경 : 聰明湯과 香附子聰明湯의 추출물, 나노분말 제형을 이용한 치매에 관한 연구. 동의신경정신과학회지 17, 79 (2006).
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. and Feeney, P. J. : Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23, 3 (1997).
- Clark, D. E. and Pickett, S. D. : Computational methods for the prediction of drug-likeness. *DDT* 5, 49 (2000).
- Hann, M. M., Leach, A. R. and Harper, G. : Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery. *J. Chem. Inform. Comp. Sci.* 41, 856 (2001).
- Li, A. P. : Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *DDT* 6, 357 (2001).
- Curatolo, W. : Physical chemical properties of oral drug candidates in the discovery and exploratory development settings. *PSTT* 1, 387 (1998).
- Navia, M. A. and Chaturvedi, P. R. : Design principles for orally bioavailable drugs. *DDT* 1, 179 (1996).
- Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H. and Tokuda, H. : Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 10, 195 (2000).
- Krishna, G., Chen, K., Lin, C. and Nomeir, A. A. : Permeability of lipophilic compounds in drug discovery using in-vitro human absorption model, Caco-2. *Int. J. Pharm.* 222, 77 (2001).
- Irvine, J. D., Takahashi, L. and Lockhart, K. : MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J. Pharm. Sci.* 88, 28 (1999).
- Eddy, E. P., Maleef, B. E., Hart, T. K. and Smith, P. L. : *In vitro* models to predict blood-brain barrier permeability. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23, 185 (1997).
- Pardridge, W. M. : Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 15, 5 (1995).
- Agatonovic-Kustrin, S. and Beresford, R. : Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22, 717 (2000).
- Basheer, I. A. and Hajmeer, M. : Artificial neural networks: fundamentals, computing, design and application. *J. Microbiol. Methods* 43, 3 (2000).
- 생약학교재편찬위원회 : 생약학, 동명사 (2006).
- PreADMET (ver. 1.0) is a web-based application for predicting ADMET data. <http://preadmet.bmdrc.org>, Bioinformatics & Molecular Design Research Center, Seoul, Republic of Korea.
- Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M. and Houghton, P. J. : *In vitro* acetylcholinesterase inhibitory activity of the essential oil from *Acorus calamus* and its main constituents. *Planta Med.* 73, 283 (2007).
- Irie, Y. and Keung, W. M. : *Rhizoma acori graminei* and its active principles protect PC-12 cells from the toxic effect of amyloid- β peptide. *Brain Research* 963, 282 (2003).
- Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K. and Lekphrom, R. : Bioactive Constituents of the Roots of *Polyalthia cerasoides*. *J. Nat. Prod.* in press (2007).
- Chaieb, K., Zmantar, T., Ksouri, R., Hajlaoui, H., Mahdouani, K., Abdely, C. and Bakhrouf, A. : Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. *Mycoses.* 50, 403 (2007).
- Fernandes, E. S., Passos, G. F., Medeiros, R., da Cunha, F. M., Ferreira, J., Campos, M. M., Pianowski, L. F. and Calixto, J. B. : Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur. J. Pharmacol.* 569, 228 (2007).
- Karakida, F., Ikeya, Y., Tsunakawa, M., Yamaguchi, T., Ikarashi, Y., Takeda, S. and Aburada, M. : Cerebral protective and cognition-improving effects of sinapic acid in rodents. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 514 (2007).