

## 감국의 Monoamine Oxidase 저해활성

장은주 · 최동국 · 박태규 · 황금희\*

건국대학교 바이오식약연구센터

### Inhibitory Activity on Monoamine Oxidase of *Chrysanthemum indicum* L.

Eun Ju Chang, Dong Kug Choi, Tae Kyu Park, and Keum Hee Hwang\*

Bio-Food and Drug Research Center, Konkuk University, Chungju-city, Chungbuk 380-701, Korea

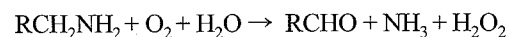
**Abstract** – We examined the inhibitory activities against monoamine oxidase (MAO) of *Chrysanthemum indicum* L. *in vitro* and *in vivo* methods. Methanolic extract of *C. indicum* showed significant inhibitory activities on MAO-A that were prepared from rat brain *in vitro*. The inhibitory activities were measured by serotonin as a substrate. The IC<sub>50</sub> value of methanolic extract of *C. indicum* was 0.24 mg/ml for the inhibition of MAO-A. The ethylacetate fraction of methanolic extract of *C. indicum* exhibited the best activity toward MAO-A with IC<sub>50</sub> value of 0.05 mg/ml *in vitro*. It was observed that those activities *in vivo* tests have different tendency each other. Ethanolic extract of *C. indicum* was have no effect on rat MAO by the oral administration ( $p < 0.05$ ). However, MAO inhibitory activities of ethanolic extract of *C. indicum* by the oral administration have similar tendency to those of iproniazid. Consequently, we suggest that *C. indicum* may have the effects on the inhibitory activities against MAO both *in vitro* and *in vivo*. These results indicates that the *C. indicum* extract has properties indicative of potential neuroprotective ability.

**Key words** – monoamine oxidase (MAO), serotonin (5-HT), *Chrysanthemum indicum*

감국(*Chrysanthemum indicum* Linné)은 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본으로 차로 음용해 왔고, 한방에서는 그 꽃을 현기증, 해열, 염증, 고혈압 및 호흡계질환에 사용해 왔다.<sup>1)</sup> 감국의 생리활성연구로는 항균활성 및 항바이러스활성,<sup>2,4)</sup> 항산화활성,<sup>5,6)</sup> 항염활성 및 면역조절활성<sup>7)</sup>이 있는 것으로 보고되고 있다. 감국의 주성분으로는 flavonoid 화합물,<sup>8,9)</sup> terpenoid 화합물<sup>5,8)</sup> 및 phenol성 화합물<sup>8)</sup> 등 다양한 성분에 대한 보고가 있다. 그러나 감국의 고혈압 치료의 목적을 설명할 수 있는 혈압조절 기전에 대한 연구 보고와 monoamine oxidase(MAO) 저해 활성 성분에 대한 연구 보고는 아직 없다.

Monoamine oxidase(amine: oxygen oxidoreductase (deaminating) EC1.4.3.4.)는 중추신경계나 말초조직 등 동물 조직 중의 미토콘드리아에 널리 존재하면서 신경 전달물질이나 호르몬성 아민 화합물의 대사를 관장하는 효소로서 다음과 같은 반응으로 아민 화합물의 산화적 탈아민 반응을 촉매하여 신경전달물질과 식사와 장내 박테리아에 의해 유

래되는 호르몬성 아민을 분해한다.<sup>10)</sup>



MAO는 내인성 기질로서 카테콜아민과 인돌알킬아민 또는 그 유도체를 주로 이용하며 기질 특이성에 따라 세로토닌, 노르에피네프린, 에피네프린을 산화적으로 탈아민화시키는 A형과 벤질아민, 페네틸아민의 산화를 촉매하는 B형의 두 가지 형으로 나눌 수 있다.<sup>11)</sup> 전보<sup>12)</sup>에서 한방의 치료이론인 기미론에 근거하여 분류한 한성약물들이 시험관 내 실험에서 MAO 저해활성을 나타내는 것을 확인하여 보고한 바 있으며, 본 연구는 MAO 활성 저해작용을 가진 새로운 화합물을 개발하고 이를 항우울 등의 중추신경계 질환의 치료제로 응용하기 위하여 감국의 MAO 활성을 확인하고자 하였다. 본 연구에서는 MAO 저해 활성을 나타내는 감국을 이용하여 항우울 및 파킨슨병 등의 중추신경계와 관련된 질환에 대한 치료제 개발 및 건강기능식품 소재를 개발하기 위한 연구의 일환으로 감국 메탄올 추출물의 각 용매분획이 MAO 저해 활성을 확인하고자 하였으며, 또한 경구투여를 통한 *in vivo* 실험을 통해 체내 MAO 활성에 미

\*교신저자(E-mail): hwang-kh@hanmail.net  
(FAX): 043-840-3891

치는 영향을 확인하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료 및 시약** - 실험에 사용한 감국은 서울시 소재 경동시장 대덕한의원에서 건조시킨 한약재를 구입하여 사용하였고, 시료의 일부는 표준품(NP20-062)으로 보관하고 있다. 효소활성 측정에 사용한 세로토닌, 벤질아민, 이온교환수지 Amberlite CG-50 등은 Sigma사 제품을 사용하였고 기타 컬럼 크로마토그래피용 용매 및 시료 추출용 용매는 국산 특급 시약을 사용하였다.

**실험동물** - 5주령의 Sprague Dawley계 웅성 흰쥐를 (주) 오리엔트바이오사에서 공급받아 온도  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 10\%$ , 12시간 주기로 조명을 조절하는 동물 사육실에서 일반 고형 사료와 물을 자유롭게 공급하면서 1주간 적응시킨 후 실험에 이용하였다.

### 감국의 시험관내 MAO 저해활성

**시료의 추출 및 검액 조제** - 분쇄한 약재용 건조 감국 10 kg에 80% 메탄올 28 L를 가하여 실온에서 일주일간 추출하였다. 이 과정을 3회 반복 추출하여 그 여과액을  $45^\circ\text{C}$  수욕 상에서 감압 농축하여 메탄올 추출물로 얻었다. 이 추출물을 상법에 따라 분획하여 헥산 분획, 에틸아세테이트 분획, 부탄올 분획, 물 분획을 각각 얻었다. 각 분획을 1 mg/mL 용액이 되도록 증류수로 녹이고, 이 액을 원액으로 1/2(0.5 mg/ml) 및 1/20(0.05 mg/ml) 희석액을 검액으로 사용하였다.

### Brain MAO-A의 효소활성 측정

**효소원의 조제** - 흰쥐의 뇌 조직을 이용하여 전보<sup>13)</sup>에 보고한 방법대로 조제한 단백질을 희석하여 효소원으로 사용하였다.

**효소활성 측정** - 조제한 효소원을 사용하여 문헌의 방법<sup>12,13)</sup>에 준하여 효소활성을 측정하고 각 실험군의 대조군을 기준으로 하여 효소 활성의 변화를 정해진 수식에 따라 계산하였다.

### Liver MAO-B의 효소활성 측정

**효소원의 조제** - 흰쥐의 간 미토콘드리아 분획을 상법에 따라 분리하여 효소원으로 사용하였다.

**효소활성 측정** - McEwen 등의 방법<sup>14)</sup>에 준하여 효소활성을 측정하고 각 실험군의 대조군을 기준으로 하여 효소 활성의 변화를 정해진 수식에 따라 계산하였다.

### 감국 경구투여에 의한 rat MAO의 활성 변화 측정

**경구투여용 시료의 조제** - 분쇄한 건조 감국 20 g에 약 200 mL의 70% 에탄올 용액을 가하여 환류냉각하면서  $100^\circ\text{C}$ 에서 6시간 동안 가열 추출하였다. NO.2 여과지로 여과하고 여액을  $40^\circ\text{C}$  수욕 상에서 감압 농축하여 에탄올 추출물 5.82 g을 얻었다. 이 추출물을 실험 시 증류수에 녹여 사용

하였다.

**시료의 경구투여** - 감국 추출물 10 mg을 증류수 1 mL에 녹이고 이 액을 실험 하루 전에 절식시킨 동물에게 6일 동안 하루 1회, 3 mL씩 경구 투여하였다. 대조군에는 같은 조건으로 증류수 3 mL씩을 경구투여 하였다. 이 양은 시료 건조 중량으로 동물 체중 당 0.15 g/kg되는 양으로 사람 하루 용량에 대한 문헌치<sup>15)</sup> 12-20 g/60 kg에 해당하는 양이다.

**MAO의 활성 변화 측정** - SD계 흰쥐 꼬리를 한 군으로 하여 6일동안 경구투여한 동물은 해부하여 좌심실에서 채혈하여 실험시킨 후 뇌와 간을 적출하여 MAO-A와 MAO-B의 활성 변화를 측정하였다. 한편 시료 대신 증류수를 투여한 동물의 효소활성을 따로 측정하여 시료에 의한 효소활성의 변화에 대한 대조군으로 하였으며 MAO-A 및 MAO-B의 효소원 조제 및 효소활성 측정은 앞에서 서술한 방법에 준하였다.

**통계처리** - 실험 결과는 SAS 통계프로그램을 이용하였으며<sup>16)</sup> Student t-test를 사용하여 유의차 검정을 하였다. 모든 통계는 5% 수준에서 유의성을 검정하였다.

**단백질 정량** - 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하고 Bradford's 방법<sup>17)</sup>을 이용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

**감국 추출 및 용매 분획** - 건조한 감국 10 kg을 정량하여 80% 메탄올을 가하여 실온에서 추출하였다. 이 추출 과정을 3회 반복하여 얻은 추출액을 여과하고  $45^\circ\text{C}$  수욕 상에서 감압 농축하여 메탄올 추출물 2.17 kg을 얻었다. 메탄올 추출물 25 g을 상법에 따라 분획하여 헥산 분획 0.87 g, 에틸아세테이트 분획 3.14 g, 부탄올 분획 1.68 g 및 물 분획 19.31 g을 각각 얻었으며, 이들의 MAO 저해활성을 측정하여 표로 정리하였다 (Table I).

### 감국의 각 용매분획이 시험관내 MAO 활성에 미치는 영향

**용매분획의 시험관내 MAO-A 저해 활성** - 감국의 메탄올 추출물은 시험관내에서 MAO-A의 효소 활성을 현저히 저해하는 것으로 나타났다. 메탄올 추출물의 MAO-A에 대한  $\text{IC}_{50}$  값은 0.24 mg/mL이었다. 용매 분획물 중에서 에틸아세테이트 분획이 가장 강한 MAO-A에 대한 저해활성이 확인되었으며 에틸아세테이트 분획의 MAO-A에 대한  $\text{IC}_{50}$  값은 0.05 mg/mL이었다. 헥산 분획의 경우도 MAO-A에 대한 저해활성을 나타내  $\text{IC}_{50}$  값이 0.26 mg/mL으로 나타났으며, 부탄올 분획은 MAO-A에 대해 약하게 저해활성을 나타내  $\text{IC}_{50}$  값은 0.98 mg/mL이었다. 물 분획물의 경우는 MAO-A에 대해 저해활성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다 (Table I). MAO-A 저해제는 주로 정신과 질병 특히 우울증 치료 약물로 널리 이용되고 있다.<sup>18)</sup> 감국의 경우

**Table I.** MAO inhibitory activities of the methanolic extract and its fractions of *Chrysanthemum indicum* L.

Fraction	Amount of extract (g)	MAO A			MAO B		
		IC <sub>50</sub> (mg/mL)	Total activity (unit)*	Specific activity (unit/g)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/g)
80% MeOH	25	0.24	0.10×10 <sup>6</sup>	0.40×10 <sup>4</sup>	9.50	0.26×10 <sup>4</sup>	0.10×10 <sup>3</sup>
Hexane	0.87	0.26	0.33×10 <sup>4</sup>	0.38×10 <sup>4</sup>	4.00	0.22×10 <sup>3</sup>	0.25×10 <sup>3</sup>
EtOAc	3.14	0.05	0.63×10 <sup>5</sup>	0.20×10 <sup>4</sup>	0.75	0.42×10 <sup>4</sup>	0.13×10 <sup>4</sup>
BuOH	1.68	0.98	0.17×10 <sup>4</sup>	0.10×10 <sup>4</sup>	3.00	0.56×10 <sup>3</sup>	0.57×10 <sup>3</sup>
H <sub>2</sub> O	19.31	-	-	-	-	-	-

\*One unit is defined as a sample amount to give 50% inhibition against MAO activities.

MAO-A에 대한 저해활성이 특징적으로 나타나며 식품공전에 식용으로 사용할 수 있는 식물로 등재되어 있는 독성이 없는 식물로 강한 생리활성을 나타내므로 훌륭한 건강기능 식품 소재로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

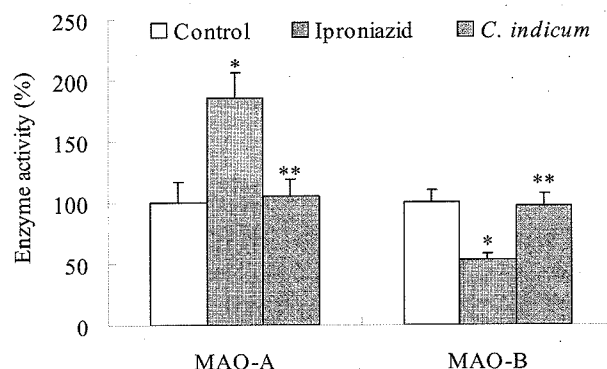
**용매분획의 시험관내 MAO-B 저해 활성** - 감국 추출물은 MAO-B에 대한 저해활성이 MAO-A에 대한 저해활성에 비해 약하게 나타나는 특징을 나타냈다. 메탄올 추출물의 MAO-B에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 9.5 mg/mL이었다. 에틸아세테이트 분획에서 가장 강한 MAO-B에 대한 저해활성이 확인되었으며, 에틸아세테이트 분획의 MAO-B에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 0.75 mg/mL이었다. hexan 분획 및 부탄올 분획의 MAO-B에 대해 IC<sub>50</sub> 값은 각각 4.0 mg/mL과 3.0 mg/mL으로 MAO-B에 대한 저해활성이 약하게 나타났고, 물 분획은 MAO-B에 대한 저해활성이 나타나지 않는 것으로 확인되었다 (Table I).

**감국 메탄올 추출물이 체내 MAO 활성에 미치는 영향** - 동물 체내의 MAO 활성에 미치는 감국의 효과를 조사하기 위해 감국 추출물을 경구 투여한 흰쥐의 뇌와 간에서 MAO-A 및 MAO-B의 활성 변화를 측정하였다.

**MAO-A와 MAO-B의 효소활성 변화** - 증류수를 투여한 대조군의 효소활성을 기준으로 positive control인 iproniazid의 효소활성은 MAO-A는 186%로 증가하였고, MAO-B는 53%로 감소하였다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1). 감국 추출물에 의한 MAO 효소 활성은 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이는 없었지만 MAO-A의 효소 활성은 105%로 약간 증가하는 경향을 나타냈고, MAO-B의 효소활성은 97%로 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 positive control인 iproniazid의 MAO 저해활성과 유사한 경향을 나타내는 것이다.

## 결론

감국 추출물의 용매 분획물들이 시험관 내에서 효소활성에 미치는 영향을 비교 관찰하였다. 아울러 실험동물에게 감국 메탄올 추출물을 경구투여한 후 동물의 체내에서 일어나는 MAO의 활성변화를 관찰하였다. 위의 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 감국 메탄올 추출물은 시험



**Fig. 1.** Changes of MAO activities on rat oral administration of the ethanolic extract of *Chrysanthemum indicum* L. The reaction mixture for MAO-A assay (final volume 1 mL) contained appropriate amount of the crude enzyme, and substrate (serotonin). This incubation mixture was incubated for 90 min at 37°C in air. The reaction mixture for MAO-B assay (final volume 1 mL) contained appropriate amount of the crude enzyme, and substrate (benzylamine). The enzymatic activity was measured according to the spectrophotometric procedure as described in the experimental method. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. ( $n=7$ ). \* $p < 0.05$ , statistically significant as compared to control group. \*\* $p < 0.05$ , statistically significant as compared to iproniazid group.

관내에서 MAO-A의 효소활성을 현저히 저해하는 것으로 나타났으나, MAO-B에 대한 저해활성은 미미하였다. 메탄올 추출물의 MAO-A에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 0.24 mg/mL이었다. 감국 용매분획을 대상으로 MAO 효소활성에 대한 저해효과를 측정한 결과 에틸아세테이트 분획에서 가장 강력한 MAO-A에 대한 저해활성이 확인되었으며, 에틸아세테이트 분획의 MAO-A에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 0.05 mg/mL이었다. MAO-B에 대한 저해활성은 비교적 낮았으며, MAO-B에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 0.75 mg/mL이었다. hexan 분획의 경우도 MAO-A에 대해서만 저해활성을 나타냈고, IC<sub>50</sub> 값이 0.26 mg/mL이었다. 부탄올 분획의 MAO 저해활성은 약하게 나타났으며, 물 분획의 경우에는 MAO에 대한 저해활성이 나타나지 않았다. 동물에게 감국 추출물을 경구 투여했을 때 MAO의 활성 변

화에 크게 영향을 나타내지 않으며, MAO-A는 활성이 감소되고 MAO-B는 활성이 증가하는 경향이 관찰되었다.

이상의 결론으로부터 *in vitro* 실험에서 감국이 MAO 저해활성을 나타내는 식물로 확인되어 우울증 및 정신분열증과 같은 정신장애를 개선시킬 수 있는 건강기능식품 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다.

## 사 사

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업, 산업자원부 지원 지역혁신센터사업(건국대학교 바이오 식·의학 연구센터) 및 2005년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2005-050-F00010)을 받아 수행된 결과입니다. 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. 정보섭, 신민교 (1989) 향약대사전, 1038-1039 영림사, 서울.
2. Ren, A.N., Wang, Z.G., Lu, Z.C., Wang, L.W. and Wu, Y.L. (1999) Study on bacteriostasis and antiviral activity of flowers *Chrysanthemum indicum*. *Pharm. Biotechnol.* **6**: 241-244.
3. Shungying, Z., Yang, Y., Huaidong, Y., Yue, Y. and Guolin, Z. (2005) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J. Ethnopharmacol.* **96**: 151-158.
4. Aridogan, B.C., Baydar, H., Kaya, S., Demirci, M., Ozbasar, D. and Mumcu, E. (2002) Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Arch. Pharm. Res.* **25**: 860-864.
5. Yoshikawa, M., Morikawa, T., Toguchida, I., Harima, S. and Matsuda, H. (2000) Medicinal flowers. II. Inhibitors of nitric oxide production and absolute stereostructures of five new germacrane-type sesquiterpenes, kikkanol D, D monoacetate, E, F, and F monoacetate from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. *Chem. Pharm. Bull.* **48**: 651-656.
6. Kong, L.D., Cai, Y., Huang, W.W., Cheng, C.H.K. and Tan, R.X. (2000) Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *J. Ethnopharmacol.* **73**: 199-207.
7. Cheng, W., Li, J., Yuo, T. and Hu, C. (2005) Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of the extracts from the inflorescence of *Chrysanthemum indicum* Linné. *J. Ethnopharmacol.* **101**: 334-337.
8. Yoshikawa, M., Morikawa, T., Murakami, T., Toguchida, I., Harima, S. and Matsuda, H. (1999) Medicinal flowers. I. Aldose reductase inhibitors and three new eudesmane-type sesquiterpenes, kikkanol A, B, and C, from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. *Chem. Pharm. Bull.* **47**: 340-345.
9. Matsuda, H., Morikawa, T., Toguchida, I., Harima, S. and Yoshikawa, M. (2002) Medicinal flowers. VI. Absolute stereostructures of two new flavanone glycosides and a phenylbutanoid glycoside from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L.: their inhibitory activities for rat lens aldose reductase. *Chem. Pharm. Bull.* **50**: 972-975.
10. Cooper, J. R., Bloom, F. E. and Roth, R. H. (1996) The Biochemical Basis of Neuropharmacology. Oxford university press. NY.
11. Felner, A.E. and Waldmeier, P. C. (1979) Cumulative effects of irreversible MAO inhibitors in vivo. *Biochem. Pharmacol.* **28**: 995-1002.
12. Hwang, K.H., Kim, I.R. and Han, Y.N. (1999) Effects of cold and hot drugs on the activity of monoamine oxidase. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**: 145-150.
13. Hwang, K.H. and Lim, S.H. (2003) Monoamine oxidase inhibitory activities of Korean medicinal plants classified to cold drugs by the theory of KIMI. *Food Sci. Biotechnol.* **12**: 238-241.
14. McEwen, C.M., Cohen, J.R. and Cohen, J.D. (1963) An amine oxidase in normal human serum. *J. Lab. Clin. Med.* **62**: 766-776.
15. 이창복 (1979) 대한식물도감. 향문사, 서울
16. SAS: SAS User's Guide, Statistics (1988) SAS Institute Inc., Cary, NC.
17. Daniel, M.B. and Stuart, J.E. (1990) Protein Methods. Wiley-Liss, NY.
18. Quitkin, F., Rifkin, A. and Klein, D.F. (1979) Monoamine oxidase inhibitors: a review of antidepressant effectiveness. *Arch. Gen. Psychiat.* **36**: 749-760.

(2006년 12월 20일 접수)