

631.5
L293L

최 중
연구보고서

농가재배식물로부터 항알러지물질의 개발
Development of anti-allergic substances obtainable from
farmhouse-cultivating plants

항알러지물질의 구조분석연구
Studies on the structural determination of anti-allergic
substances

항알러지물질의 합성연구
Studies on the synthesis of anti-allergic substances

항알러지물질의 약리,독성연구
Studies on pharmacology and toxicity of anti-allergic
substances

항알러지물질의 추출,분리연구
Studies on the extraction and separation of anti-allergic
substances

연구기관

건국대학교

동덕여자대학교

군산대학교

영남대학교

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농가재배식물로부터 항알러지 물질의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998 . 12 . 20 .

주관연구기관명 : 건국대학교
총괄연구책임자 : 임 응 호
협동연구기관명 : 군산대학교
협동연구책임자 : 박 관 하
협동연구기관명 : 동덕여자대학교
협동연구책임자 : 고 동 수
협동연구기관명 : 영남대학교
협동연구책임자 : 이 승 호

요 약 문

I. 제 목

농가재배식물로부터 항알러지 물질의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

물질 특허의 도입이후 국내에서도 새로운 기능성 물질의 개발 및 고부가가치 물질의 개발에 관한 인식이 높아지고 있다. 특히 신의약품 부문은 일단 개발에 성공하는 경우 막대한 고부가가치가 보장되어 이 부문에 대한 투자가 가속되고 있으나, 그 투자가 소수 분야에 제한되어 있고 연구도 외국에서 개발된 기존 물질의 변형 쪽으로 진행되므로, 아직도 독자적 신약개발까지는 시간이 필요한 실정이다. 특히 항알러지 신약개발 부문은 이러한 기존물질의 변형 방법조차도 실행되지 않고 있다. 이미 외국에서는 수많은 종류의 신규 항알러지 약물이 개발되고 있는데 이를 모방한 변형물질을 개발하는 연구방법은 외국에 대한 기술격차를 줄일 수 없는 연구 방법일 뿐 아니라 특허 면에서도 위험 요소를 내포하고 있다. 또한 신의약품개발은 약효 못지 않게 독성, 안전성의 문제가 개발의 큰 관건이 되고 있다. 이러한 관점에서 약효가 알려져 있고 안전성이 뛰어난 천연물로부터 유효성분을 얻어 신약개발에 이용하는 것이 우리의 현실에 가장 적합하고 선진국과의 기술 경쟁에서 이길 수 있는 방법인 것이다.

본 연구에서는 한국 농촌에서 자생 또는 재배되는 천연물, 농작물 등으로부터 알러지 치료에 사용될 가능성이 있는 유효 성분을 취하려는 목표를 갖고 있으므로 외국에서 개발된 약물의 구조와는 전혀 다른 형태의 신규화합물을 도출할 가능성이 높고, 또한 특허 및 관련 기술의 저축 등에도 무관하리라 기대되었다.

WTO 출범과 UR로 인해 우리 나라 농가의 경쟁력이 없으면 외국의 수입산물로 농촌이 피폐해질 것은 분명한 사실이다. 기존의 농사 이외에 약용식물의 재배가 농가에서 볼 때 경제성을 갖게 된다면 우리 나라 농가에서도 고부가가치 산물을 생산하는 것이 되므로 농촌의 피폐와는 반대로 부유한 농촌 경제를 기대할 수 있게 될 뿐만 아니라, 알려지로 어려움을 겪는 환자를 병으로부터 해방시켜 줌으로써 인류 복지 사회 구현에도 기여하리라 기대되어 본 연구를 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

100종의 식물로부터 methylene chloride extracts, ethyl acetate extracts, water extracts를 각각 추출하여 총 300가지 fraction에 대한 1차 항알러지 PCA(수동피부 아나필락시스 반응) screening을 수행하였고, 효과가 있다고 판단되는 fraction들에 대한 재시험을 거쳐 분리, 정제를 수행하여 단일물질까지 얻어서 구조를 확인하였다. 구조가 확인된 물질은 그의 신규성을 우선 검토하였고 약으로의 개발 가능성도 검토 하였다. 이와 같이 얻은 물질들을 유기합성을 이용하여 변형하여 새로운 화합물을 얻어서 약효를 시험하였다. 또한 1차 screening에서 유효하다고 판단된 물질들에 대해서는 능동전신성 아나필락시스(active systemic anaphylaxis) 반응시험과 실험적 기관지 천식model에서의 약효를 측정하였고, 일부는 독성시험도 수행하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

100종의 농가재배 가능 식물의 methylene chloride, ethylacetate, water의 세분획씩 총 300가지의 분획을 얻어서 항알러지 효과를 시험한 결과 10종의 분획이 유효한 것으로 나타났다. 이 분획들은 모두 단일물질로 분리 정제되었고 그 물질들의 구조 역시 규명되었다. 시호의 methylene chloride 분획으로부터 얻은 약효물질은 saponin의 일종인 신물질로 밝혀졌고 현재까지의 실험에서 특이할 만한 독성이

나타나지 않아서 항알러지물질로의 개발 가능성을 충분히 보여주었다. 지유의 water 분획으로부터 얻은 약효물질은 이당류의 일종인 신물질로 밝혀졌고 특허도 출원하였다. 독성이 없는 물질이므로 향후 항알러지물질로의 개발 가능성이 크다고 할 수 있다. 이들 이외에 현초 methylene chloride 분획, 목단피 water 분획, 지모 water 분획, 육계 methylene chloride 분획, 인진 methylene chloride 분획, 뽕나무 ethyl acetate 분획, 전호 methylene chloride 분획, 소나무 ethyl acetate 분획으로부터 얻은 약효물질들의 구조도 밝혀졌으나 이들로부터 나온 약효물질들은 모두가 이미 알려진 물질일 뿐만 아니라 약효 또한 뛰어난 게 아니어서 항알러지물질로의 개발 가능성이 희박하다고 판단되었다. 그러나 지유로부터 분리한 약효물질이 당을 포함하고 있고 뽕나무로 분리한 약효물질이 stilbene 유도체를 함유하고 있으므로 이 둘을 하나로 합친 화합물을 합성으로 얻고자 하였다. 그 결과 약효가 우수한 유도체를 합성할 수 있었고 이 물질을 특허 출원하였다. 이상과 같이 시호와 지유에서 추출한 물질이 알러지치료를 위한 선도물질로 판단되므로 이들에 대한 재배가 필요하다고 할 수 있고, 다른 변형된 유도체의 합성이 계속 수행될 필요가 있다고 할 수 있다.

SUMMARY

I. Title

Development of anti-allergic substances obtainable from
farmhouse-cultivating plants

II. Purpose and Significance

The development of highly cost-effective bio-active substances has become the focus of intensive research subjects since the introduction of international patent system to Korea. With the recognition of the high value-added profit of pharmaceuticals once succeeded, the investment in this area has been gradually expanding. However most of the investment is rather restricted to a few selected areas such as modification of pre-existing pharmaceutical agents. Much more effort and time is needed to develop unique and pharmaceutically valuable drugs yet.

For anti-allergic agents, in particular, even the chemical modification of pre-existing pharmaceutical agents has not yet been widely tried. In view of the fact that several classes of anti-allergic agents have already been developed in foreign countries, an approach of simple chemical modification can not be a solution to narrow the technological gap to advanced countries. Furthermore this approach involves the risk of patent complication.

In clinically applied chemicals, safety concern is far more important than their efficacy. It is therefore a reasonable approach to screen out active principles from natural products and use them as a basis for new drug

development in order to survive in the international technology competition.

The present research aimed at obtaining anti-allergic agents from farmhouse-cultivable wild herbs and farm crops. Substances derived in this method will probably have different chemical structures from those developed by foreign countries and thus will be free from patent problems.

It is certain that rural economy will gradually become impoverished due to imported foreign farm products if our agricultural productivity is not greatly strengthened to a competitive position. Cultivation of pharmaceutically useful plants along with the traditional agriculture in farm-houses will clearly provide expectation of prosperous rural economy. In addition, alleviating the allergy patients from the distress can be a contribution to the realization of welfare country.

III. Research Contents and Scope

A total of 300 extract samples, extracted with methylene chloride, ethyl acetate and water from 100 plants, were screened for anti-allergic activity using rat passive cutaneous anaphylaxis test. When the extracts were found effective, single compounds were isolated and their structures were determined following separation and purification processes. The novelty and possibility as therapeutic agents of these compounds were examined, and new derivatives were synthesized followed by pharmacological testing. With selected primary extracts, additional biological efficacy was confirmed with active systemic anaphylaxis and experimental asthma model.

IV. Results and Proposed Applications

With the 300 extracts from 100 farm-house cultivatable plants, 10 samples proved efficacious. These 10 fractions were further purified to single compounds with structural analysis. A saponin isolated from *Buplerum falcatum* methylene chloride fraction is a noble promising compound without noted toxicity. A new disaccharide was also isolated from *Sanguisorba officinalis* and a patent application was completed for this substance. Since this new disaccharide does not show any notable toxicity, this compound seem to be a possible candidate as an anti-allergic. Eight single compounds were additionally identified one each from methylene chloride fractions of *Cinnamomum cassia*, *Artemisia capillaris*, *Anthriscus sylvestris*, *Geranium thunbergii*, water fractions of *Paenina suffruticosa* and *Anemarrhena asphodeloides*, and ethyl acetate fractions from *Pinus densiflora* and *Morus alba*, respectively. Some of these 8 compounds were not potent enough to be promising and some were previously known ones. A unique chemical synthesis approach was utilized: a saccharide, an active principle identified from *Sanguisorba officinalis*, was combined with a stilbene derivative, which was found from *Morus alba*. One of these chimeras was effective to be used for patent application. In summary, principles isolated from *Buplerum falcatum* and *Sanguisorba officinalis* are excellent lead compounds for anti-allergic agent development. Cultivation of these two plants should be promoted and further chemical synthesis is needed to discover better anti-allergic.

목 차

제 1 장	연구개발의 목적 및 중요성	10
제1절	연구의 배경	10
제2절	연구개발의 필요성	13
제 2 장	연구개발 내용 및 범위	16
제1절	연구개발 내용	16
제2절	연구개발 방법	22
제 3 장	연구개발 결과 및 활용에 관한 건의	30
제1절	1차 screening 결과	30
제2절	10개 분획에 대한 약효 및 독성시험 결과	43
제3절	약리기전에 대한 연구	101
제4절	약효물질의 유도체 합성 실험 결과	107

제 1 장 연구개발의 목적 및 중요성

제 1 절 연구의 배경

오래 전부터 많은 천연물들이 질병 치료를 위해 직접 사용되어 왔으나 현재는 과학과 기술의 발달로 생리활성을 가진 물질을 분리한 후 그의 화학구조를 알아내어 순물질을 사용하거나, 더 약효가 좋고 부작용 등의 독성이 적은 물질로 구조를 변형시켜 사용되어진다. 천연식물에서 약효가 있는 물질을 분리시켜 사용한 예는 1815년 분리된 모르핀이 최초라 할 수 있고, 그 후 strychnine, emetine, quinine, nicotine, hyoscyamine 등을 들 수 있다. 또한 aspirin은 salicin을 변형한 것이고 국소마취제 procaine은 cocaine의 구조를 약간 바꾸어서 사용하는 대표적인 예이다.

우리 나라 한의학에서 사용되거나 민간에 전승되어 오는 많은 천연식물이 우리 나라에서 자라나기는 하지만 농가 재배에 의해 얻어지는 것은 극소수이고 대부분은 야생식물에서 얻어진다. 그런데 약용식물은 분포지나 기후에 따라 그 약효의 차이가 큰 것으로 알려져 있기 때문에 농가 재배 생산된 것을 사용하는 것이 바람직하다. 그러나 양약 사용의 증가에 따른 약용식물의 수요 감소로 인해 경제성이 적어서 농가에서 재배를 기피하고 있는 것이 현실이다. 그러나 농가 재배 가능한 천연식물로부터 약효가 있는 물질을 분리해 낸다면 경제성이 상승하게되어 농가 생산물의 고부가가치화를 기대할 수 있게 된다.

1987년 도입된 물질특허제도로 인해 새로운 의약품이 우리 나라에서 개발되어지지 않는다면 비싼 기술료를 지불해야만 생산이 가능하고, 아니면 완제품을 수입할 수밖에 없게 되었다. 선진국과의 경쟁에서 이기기 위해서는 반드시 새로운 의약의 개발이 필수라 할 수 있겠으나 기존에 사용되어오는 의약품의 구조를 일부 바꾸는 방법에만 의존해서는 약효가 탁월한 새로운 물질을 쉽게 기대하기 어려워 특허 문제가 생길 뿐만 아니라 합성의약품이 갖고 있는 독성이나 안전성의 문제를 근본적으로 해결하기가 매우 힘들게 된다. 근자에는 전승되어오는 약용식물로부터의

새로운 의약 개발이 많이 연구되어지는데 그 이유는 천연식물이 갖고 있는 생리활성 물질을 따로 분리하는 기술과 약효를 screening하는 방법이나 분리된 순물질의 구조를 분석하는 기술이 발달되었다는 이유 뿐 만이 아니라, 약효가 알려져 있고 안전성이 뛰어난 천연물로부터 유효성분을 얻어 신약개발에 이용하면 합성의약품이 갖고 있는 독성 등의 문제가 크게 줄어들기 때문이고 신규 물질을 얻을 가능성도 높기 때문이다.

고령화, 현대화 사회로의 전환에 따라 과거의 질병 pattern에서 변화하여 새로운 질병분야로의 치료가 요구되고 있다. 즉 과거의 질병분포가 감염증, 소화기병, 영양성질병 등의 열악한 환경위생, 영양결핍 등에 기인한 고전적인 질병이었던 반면 최근의 양상은 순환기, 신경계, 알러지성, 비만 등 좋은 영양 섭취 및 환경오염의 결과에 기인하는 질병의 비율이 증가하고 있는 추세이다. 이 분야 중 순환기 분야의 질병은 끊임없는 연구, 개발의 결과 상당히 진보된 의약품들이 만들어져 그 수준이 고객의 needs에 상당히 부응하고 있는 현실이다. 그러나 알러지성 질환 치료 부분은 아직은 연구, 개발이 덜된 분야이다.

알러지 반응은 항원에 대하여 면역계가 과도하게 반응하여 생기는 제반 현상으로 크게 4가지 유형으로 나눌 수 있다. 이 중 통상 알러지 질환으로 일컬어지는 유형은 제1형으로 비만세포(mast cell)에서 분비되는 각종 화학매체(chemical mediators)들의 직간접적인 약리작용과 이로 인해 야기되는 염증 반응에 의한 것으로 기관지 천식이나 알러지성 비염 등이 주종을 이루는 증상이다. 알러지 발생의 작용기전에 근거한 약물 개발은 IgE 항체 생성 억제제, 화학매체 생성 효소 저해제, 그리고 화학매체(thromboxane A₂, PAF, prostaglandins, leukotrienes)의 길항제 개발 등으로 대별된다. 항알러지 분야에서 현재까지 출시된 의약품들은 항히스타민제, 스테로이드계 등이 주류를 이루고 있으나 이 두 분야의 의약품 모두 적지 않은 부작용을 수반하므로 환자의 compliance에 문제가 제기되고 있다. 즉 항히스타민제의 경우 졸음유발 등의 중추신경계 부작용, 스테로이드계의 경우 상위 조절 호르몬의 유리방해에 따른 정상 반응세포의 기능장애 등이 심각한 부작용으로 잘 알려져 있다. 항히스타민제의 경우 이런 부작용을 제거하기 위하여 노력한 결과 중추신경계로의 투과가 제한되는 약물의 개발로 어느 정도 중추신경계

부작용을 개선하였으나(예, terfenadine), 이 약물은 환자 치료율이 저조하고 심장에서의 부작용이 단점으로 지적되고 있다. 알러지 질환 중 가장 시장규모가 큰 분야인 천식(asthma)의 치료에는 β 2-agonist 들이 가장 많이 이용되고 있으나 이들 물질 역시 혈압의 하강으로 인한 무기력증 등의 문제점이 지적되고 있다.

알러지 현상의 발현은 그 기전이 복잡하고 관여하는 생체 유래 생리활성물질의 종류가 다양하기 때문에 가능한 치료방법도 다양한 반면, 어떤 한 개의 system에 작용하는 약물은 모든 환자에 유효할 가능성이 낮은 단점도 아울러 지니고 있다. 따라서 선진국의 제약사에서는 복합적인 기전을 가진 항알러지제의 발견에 박차를 가하고 있다. 알러지의 현상도 다양하여 호흡기 내과의 주요질환인 천식 이외에도, 피부과의 알러지성 피부염, 이비인후과의 알러지성 비염 및 안과의 결막염 등이 신약 발굴자들의 주요한 대상 질환이 되고 있다. 천식 한 개 분야에서 만도 market size는 환자의 약 80%밖에 충족시키지 못하고 있다고 평가되고 있는데, 그 이유 중 하나는 적절한 약물의 부재에 기인한다고 한다. 이에 선진 각국에서는 새로운 기전을 가진 항알러지제의 개발을 목표로, platele-activating factor(PAF) 길항제, thromboxane A2 길항제, leukotriene 길항제, neurokinin 길항제, adenosine 길항제, 5-lipoxygenase 길항제, phospholipase A2 저해제, prostaglandin 저해제 등의 다양한 물질을 알러지 치료의 목적으로 개발 중에 있다. 향후의 이상적인 항알러지 약으로서의 하나는 하나의 기전을 가진 약물보다는 두 개 이상의 복합적인 기전을 보유한 약물이 높은 치료율을 나타낼 것이라고 기대하고 있다. 특히 mast cell에서는 다양한 화학매체가 유리되기 때문에 mast cell에서의 화학매체 유리를 차단하는 방법은 유용한 치료수단으로 각광 받을 가능성이 매우 높다. 현재 이런 기전을 부분적으로 함유한 약물로는 cromolyn sodium이 사용되고 있으나 많은 수의 환자에서 전혀 약효가 발휘되지 않는 결정적인 결함이 있다. 또한 지금까지 알려져 있지 않은 기전을 가진 물질의 항알러지제로의 개발도 요구되고 있다.

이런 이유에서 농가 재배 가능 천연식물은 귀중한 탐색의 소재이나 대부분의 천연물 유래물질들은 그 자체로서는 약효, 독성 및 제제학적 문제점 등 임상적으로 유용한 물질이 되기까지는 극복해야 할 장벽이 많이 있다. 따라서 선도물질의 발견

이후에는 화학적인 구조변경을 통해서 실용성을 증가시키는 작업이 필요하다고 본다. 과거 일본의 Kissei약품에서 천연물에서 추출한 물질을 근간으로 화학적 구조변경에 의해 성공한 “리자벤”의 경우 과거 10년간 매해 70-80억엔의 매출을 올리고 있는 사실은 잘 알려진 예이다. 한편 국내에서도 천연물 추출을 이용한 항알러지제의 부분적인 연구를 하고 있으나 유기합성적인 방법이 연계된 연구는 진행되지 않고 있는 실정이다.

우리 나라 농가에서 재배되어온 천연식물은 90여 가지나 되기 때문에 이들 중 추출 방법을 다양하게 사용하여 추출한 물질을 약효 screening 할 경우 새로운 항알러지 물질의 개발이 충분히 가능하리라 기대되었고 또한 항알러지 물질은 그 개발 진도로 미루어 볼 때 선진국과도 경쟁이 가능할 것으로 보이므로 본 연구를 추진하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

물질 특허의 도입이후 국내에서도 새로운 기능성 물질의 개발 및 고부가가치 물질의 개발에 관한 인식이 높아지고 있다. 특히 신의약품 부문은 일단 개발에 성공하는 경우 막대한 고부가가치가 보장되어 이 부문에 대한 투자가 가속되고 있으나, 그 투자가 소수 분야에 제한되어 있고 연구도 외국에서 개발된 기존 물질의 변형 쪽으로 진행되므로, 아직도 독자적 신약개발까지는 시간이 필요한 실정이다. 특히 항알러지 신약개발 부문은 이러한 기존물질의 변형 방법조차도 실행되지 않고 있다. 이미 외국에서는 수많은 종류의 신규 항알러지 약물이 개발되고 있는데 이를 모방한 변형물질을 개발하는 연구방법은 외국에 대한 기술격차를 줄일 수 없는 연구 방법일 뿐 아니라 특허 면에서도 위험 요소를 내포하고 있다. 또한 신의약품개발은 약효 못지 않게 독성, 안전성의 문제가 개발의 큰 관건이 되고 있다. 이러한 관점에서 약효가 알려져 있고 안전성이 뛰어난 천연물로부터 유효성분을 얻어 신약개발에 이용하는 것이 우리의 현실에 가장 적합하고 선진국과의 기술 경쟁에서 이길 수 있는

방법인 것이다.

본 연구에서는 한국 농촌에서 자생 또는 재배되는 천연물, 농작물 등으로부터 알려지 치료에 사용될 가능성이 있는 유효 성분을 취하려는 목표를 갖고 있으므로 외국에서 개발된 약물의 구조와는 전혀 다른 형태의 신규화합물을 도출할 가능성이 높고, 또한 특허 및 관련 기술의 저축 등에도 무관하리라 기대되었다. 농가 재배 천연식물로부터 항알러지 물질을 개발해 내는데는 여러 가지 학문이 복합적으로 함께 일을 해야 만족할 만한 성과를 얻어 낼 수 있기 때문에 다음과 같은 여러 가지의 효과를 기대하였다.

(㉠) 100 여가지나 되는 농가 재배 천연식물의 효과적인 재배와 생산성을 높이기 위하여 생약학과 본초학의 연구가 필요하고 이의 결과로 이 분야의 수준 향상이 기대되었다.

(㉡) 농가 재배 천연식물에서 추출하는 방법에 따라 그의 추출물의 성분이 차이를 갖기 때문에 식물 성분 추출 방법의 진보가 있게되었다.

(㉢) 추출된 물질들은 여러 가지 화합물의 복합체이므로 분리해야만 한다. 따라서 분리 기술의 발달을 가져 왔다.

(㉣) 항알러지 물질을 찾기 위한 '항알러지 screening system'이 구축되었다.

(㉤) 분리된 물질의 구조를 분석해야 신규성이 입증되고 물질 특허를 획득할 수 있으므로 구조 분석 기술이 향상되었다.

(㉥) 천연물에서 찾아내는 약효물질의 약효를 더욱 향상시키기 위해, 찾아낸 물질을 lead compound로 출발하여 구조를 변형시키기 위한 유기합성 기술도 발전하였다.

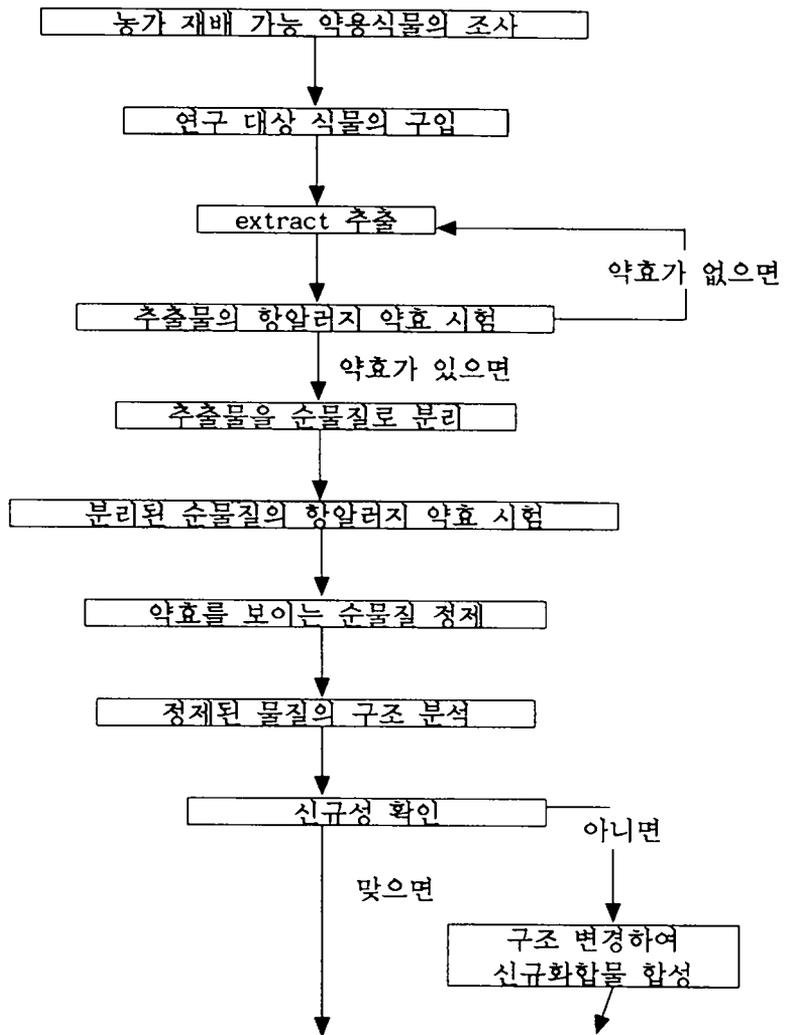
WTO 출범과 UR로 인해 우리 나라 농가의 경쟁력이 없으면 외국의 수입산물로 농촌이 피폐해질 것은 분명한 사실이다. 기존의 농사 이외에 약용식물의 재배가 농가에서 볼 때 경제성을 갖게 된다면 우리 나라 농가에서도 고부가가치 산물을 생산하는 것이 되므로 농촌의 피폐와는 반대로 부유한 농촌 경제를 기대할 수 있게 된다. 그리고 알러지로 어려움을 겪는 환자를 병으로부터 해방시켜 줌으로써 인류

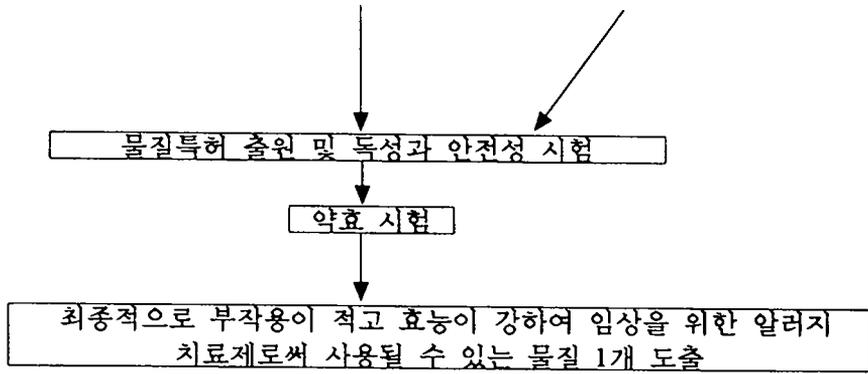
복지 사회 구현에도 기여하리라 기대되었다.

제 2 장 연구개발 내용 및 범위

제 1 절 연구개발 내용

1. 연구개발 추진체계





2. 연구 대상 식물

NO	일반명	학명	과명
95001	산거울	<i>Carex humilis</i>	Cyperaceae
95002	오수유	<i>Evodia officinalis</i>	Rutaceae
95003	싸리	<i>Lespedeza bicolor</i>	Leguminosae
95004	붉은 토끼풀	<i>Trifolium pratense</i>	Leguminosae
95005	산겨릅나무	<i>Acer tegmentosum</i>	Aceraceae
95006	사철쭉	<i>Artemisia scoparia</i>	Compositae
95007	칼잎용담	<i>Gentiana scabra</i>	Gentianaceae
95008	청가시덩굴	<i>Smilax sieboldii</i>	Liliaceae
95009	터리풀	<i>Filipendula glaberrima</i>	Rosaceae
95010	뽕나무	<i>Morus alba</i>	Moraceae
95011	왜개상아	<i>Aconogonum divaricanum</i>	Polygonaceae
95012	무계꽃나무	<i>Acer ukurunduense</i>	Aceraceae
95013	흑느릅나무	<i>Ulmus davidiana</i>	Ulmaceae
95014	소나무	<i>Pinus densiflora</i>	Pinaceae
95015	더위지기	<i>Artemisia iwayimogii</i>	Compositae
95016	영경취	<i>Cirsium maackii</i>	Compositae
95017	털계요등	<i>Paederia scandens</i>	Rubiaceae
95018	충충이꽃	<i>Clinopodium chinense</i>	Labiatae
95019	사람주나무열매	<i>Sapium japonicum</i>	Euphorbiaceae
95020	전호	<i>Anthriscus sylvestris</i>	Umbelliferae
95021	누리장나무	<i>Clerodendron trichotomum</i>	Veronicaeae
95022	천궁	<i>Cnidium officinale</i>	Umbelliferae
95023	신이	<i>Magnolia kobus</i>	Magnoliaceae
95024	지치	<i>Gardenia jasminoides</i>	Rubiaceae
95025	황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	Leguminosae
95026	백출	<i>Atractylodes japonica</i>	Compositae
95027	향부자	<i>Cyperus rotundus</i>	Cyperaceae
95028	맥문동	<i>Lilium platyphylla</i>	Liliaceae
95029	현초	<i>Geranium thunbergii</i>	Geraniaceae
95030	황백	<i>Phellodendron amurense</i>	Rutaceae
95031	현호색	<i>Corydalis ternata</i>	Papaveraceae
95032	목단피	<i>Paeonia suffruticosa</i>	Paeoniaceae
95033	황금	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Scrophulariaceae

95034	후박	<i>Magnolia officinalis</i>	Magnoliaceae
95035	음양곽	<i>Epimedium koreanum</i>	Berberidaceae
95036	지모	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	Liliaceae
95037	용담	<i>Gentiana scabra</i>	Gentianaceae
95038	천마	<i>Gastrodia elata</i>	Orchidaceae
95039	산사자	<i>Crataegus pinnatifida</i>	Rosaceae
95040	고삼	<i>Sophora flavescens</i>	Leguminosae
95041	목통	<i>Akebia quinata</i>	Leguminosae
95042	산수유	<i>Cornus officinalis</i>	Cornaceae
95043	진피	<i>Citrus unshiu</i>	Rutaceae
95044	승마	<i>Cimicifuga heracleifolia</i>	Ranunculaceae
95045	갈근	<i>Pueraria thunbergiana</i>	Leguminosae
95046	연교	<i>Forsythia viridissima</i>	Oleaceae
95047	오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	Schizandraceae
95048	당귀	<i>Angelica gigas</i>	Umbelliferae
95049	해동피	<i>Kalopanax pictus</i>	Araliaceae
95050	석창포	<i>Acorus gramineus</i>	Araceae
95051	시호	<i>Bupleurum falcatum</i>	Umbelliferae
95052	고련피	<i>Melia azedarach</i>	Meliaceae
95053	길경	<i>Platycodon grandiflorum</i>	Campanulaceae
95054	세신	<i>Asiasarum sieboldii</i>	Aristolochiaceae
95055	맥지	<i>Angelica dahurica</i>	Umbelliferae
95056	방기	<i>Sinomenium acutum</i>	Menispermaceae
95057	산조인	<i>Zizyphus jujuba</i>	Rhamnaceae
95058	토복령	<i>Smilax china</i>	Liliaceae
95059	천초	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Rutaceae
95060	우슬	<i>Achyranthes japonica</i>	Amaranthaceae
95061	구기자	<i>Lycium chinense</i>	Solanaceae
95062	천문동	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	Liliaceae
95063	차전자	<i>Plantago asiatica</i>	Plantaginaceae
95064	소엽	<i>Perilla sikokiana</i>	Labiatae
95065	산약	<i>Dioscorea japonica</i>	Dioscoreaceae
95066	흑측	<i>Pharbitis nil</i>	Convolvulaceae
95067	익모초	<i>Leonurus sibiricus</i>	Labiatae

95068	하고초	<i>Prunella vulgaris</i>	Labiatae
95069	금은화	<i>Lonicera japonica</i>	Caprifoliaceae
95070	감초	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Leguminosac
95071	백강잠	<i>Bombyx mori</i>	Bombycidae
95072	망초	<i>Erigcron canadensis</i>	Compositae
95073	적작약	<i>Paeonia obovata</i>	Paeoniaceae
95074	육계	<i>Cinnamomum cassia</i>	Lauraceae
95075	돼지풀	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Compositae
95076	다래	<i>Actinidia arguta</i>	Actinidiaceae
95077	괭리인	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Cucurbitaceae
95078	인진	<i>Artemisia capillaris</i>	Compositae
95079	푸로폴리스		
95080	백복령	<i>Poria cocos</i>	Polyporaceae
95081	황련	<i>Coptis japonica</i>	Ranunculaceae
95082	지실	<i>Poncirus trifoliata</i>	Rutaceae
95083	하수오	<i>Polygonum multiflorum</i>	Polygonaceae
95084	담쟁이	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	Vitaceae
95085	홀아비꽃대	<i>Chloranthus japonicus</i>	
95086	쪽동백	<i>Styrax obbassia</i>	Styracaceae
95087	결명자	<i>Cassia obtusifolis</i>	Leguminosae
95088	노란물봉선	<i>Lmpatiens textori</i>	Balsaminaceae
95089	딱총나무	<i>Sambucus williamsu</i>	Caprifoliaceae
95090	십사리	<i>Lycopus ramosissimus</i>	Labiatae
95091	생강나무	<i>Lindera obtusiloba</i>	Lauraceae
95092	지유	<i>Sanguisorba officinalis</i>	Rosaceae
95093	애기똥풀	<i>Chelidonium majus</i>	Papaveraceae
95094	해동피	<i>Kalopanax pictus</i>	Araliaceae
95095	갈매나무	<i>Rhamnus davurica</i>	Rhamnaceae
95096	칠향	<i>Pueraria thunbergiana</i>	Leguminosac
95097	개암나무	<i>Corylus sieboldiana</i>	Betulaceae
95098	굴피나무	<i>Platycarya strobilacea</i>	Juglandaceae
95099	오배자	<i>Galla rhois</i>	Anacardiaceae
95100	으름	<i>Akebia quinqta</i>	Lardizabalaceae

3. 연구내용

위에 열거한 100종의 식물로부터 methanol extracts, methylene chloride extracts, ethyl acetate extracts를 각각 추출하여 총 300가지 fraction에 대한 1차 항알러지 screening을 수행하였고, 효과가 있다고 판단되는 fraction들에 대한 재시험을 거쳐 분리, 정제를 수행하여 단일물질까지 얻어서 구조를 확인하고자 하였다. 구조가 확인된 물질은 그의 신규성을 우선 검토하였고 약으로의 개발 가능성도 검토 하였다. 이와 같이 얻은 물질들을 변형하여 새로운 화합물을 얻고자 하였다. 이들을 나열하면 아래와 같다.

- (1) 100종의 식물을 구입 및 채취, 분류
- (2) extracts 추출하여 300종의 fractions을 얻음
- (3) 1차 PCA(전신성 아나필락시스 반응) screening
- (4) 재시험을 거쳐 10종의 fractions을 선정
- (5) 10 fractions에 대한 분리 및 정제를 거쳐 단일물질을 얻음
- (6) 구조 규명
- (7) 신규성 확인
- (8) 약으로의 개발 가능성 검토
- (9) 유기합성을 이용하여 이와 같이 얻은 물질들을 변형하여 새로운 화합물을 얻어서 약효를 시험함
- (10) 능동전신성 아나필락시스(active systemic anaphylaxis) 반응
- (11) 실험적 기관지 천식 model에서의 약효
- (12) 독성시험
- (13) 독성이 적은 신물질의 특허 출원

제 2 절 연구개발 방법

1. 추출, 분리, 정제

시료식물을 MeOH로 1주일간 실온에서 2회 반복 추출하였다. 추출된 MeOH Ex는 MeOH을 증발 농축하고 증류수로 현탁시킨 후 CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH, H₂O로 solvent partition하였다. 얻어진 분획은 활성실험을 통하여 활성을 재차 확인한 후 활성이 인정되는 분획을 넓은 범위의 gradient mobile phase (n-Hexane-EtOAc -MeOH)로 column chromatography를 실시하여 일차적인 분획을 얻었다. 각 분획의 생물활성을 확인한 후 필요에 따라 Silica gel, reversed phase, ion exchange, Sephadex LH-20, Cellulose등의 Stationary phase를 이용하여 활성을 Monitoring하면서 activity-guided fractionation하여 active compound를 분리 정제 하였다.

2. 약효 시험 방법

가. 약효시험용 시료의 조제

동결건조되어 분말형태인 시료를 Water extract는 생리식염액에, methylene chloride 및 ethyl acetate 추출분획은 dimethylsulfoxide에 적절한 농도로 현탁하여 사용하였다. 2차 이상의 분획에서는 saline 또는 DMSO 중에서 용해성이 있는 용매를 사용하였다. 대조군에서는 각각의 용매만을 투여하였다.

나. 항체의 생산

PCA실험에 사용한 rat의 항체생산을 위한 감작은 웅성 Wistar rat(250-300g)에 Ovalbumin(chicken egg albumin, Grade VI, Sigma) 1 mg/rat과 Pertussis antigen(Gibco) 0.7 ml를 웅성 Wistar rat(250 g 정도)근육내와 복강으로 각각 투여하고 12일 째에 복대동맥으로 채혈하여 혈청을 분리하여 사용하였다. 이

혈청의 PCA역가를 측정하고 Evans blue의 확산 직경이 10-20 mm사이가 되는 농도로 희석하여 사용하였다. Guinea pig의 감각은 1주일 간격으로 총4회 ovalbumin 1 mg/animal 과 Freund's complete adjuvant을 병용 투여하여 5주째에 혈청을 분리, 새로운 guinea pig에 1 ml의 양으로 복강 투여(수동감작)하고 24시간 이후에 시험에 사용하였다.

다. Rat에서의 homologous passive cutaneous anaphylaxis(PCA)시험

위에서 생산한 혈청의 PCA역가를 측정하고 Evans blue의 확산 직경이 10-20 mm사이가 되는 농도로 희석하여 사용하였다. 제조된 혈청은 웅성 Wistar rat (180-230 g)의 등털을 깎고 4부위에 적절히 희석한 혈청 (인산완충 생리식염액에 희석, pH 7.4) 0.1 ml씩을 피내투여하고 48시간 후 ovalbumin 5 mg을 0.5 ml의 saline에 용해(1%)한 Evans blue와 혼합하여 꼬리정맥으로 투여하였다. Ovalbumin투여 30분후 피부를 박리하고 Evans blue의 확산직경을 측정하였다. PCA반응을 유발한 동일한 Wistar rat에서 Evans blue의 침출량을 측정함으로써 단순히 색소침출의 직경을 측정하는 이외에도 조직내에 존재하는 색소의 양을 측정하여 정량적으로 항알러지 효과를 검색하고자 실시하였다. Evans blue의 배부 피부혈관의 삼출 직경을 측정한 후 피부를 가위로 잘게 절개하여 plastic test tube에 넣고 1N-KOH 1 ml를 가하여 37 °C로 20시간 incubation함으로써 조직을 완전히 용해하였다. 1.2 N H₃PO₄ 0.7 ml를 가하여 용액을 중화시킨 후 3.3 ml의 acetone을 가하고 vortexing함으로써 조직을 침전시켰다. Refrigerated centrifuge(Megafuge Heraeus)로 2 °C에서 400 x g에서 25분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상층액을 620 nm에서 흡광도를 측정함으로써(UV-1601PC, Shimadzu) 조직내의 Evans blue의 양을 정량하였다. 따로 10-120 µg/tissue의 standard curve를 만들어서 Evana blue의 조직내 양을 계산하였다. 이 추출법에 의한 recovery는 94-97% 로 변화가 거의 없었기 때문에 계산시 recovery는 무시하였다.

라. 능동적 anaphylaxis model에서의 약효

수동 피부감작 아나필락시스에서 약효가 있다고 인정되는 시험물질에 대하여 약효를 재확인하기 위한 수단으로 능동 전신성 아나필락시스 반응model을 사용하였다. 웅성 Balb/C mouse에 ovalbumin을 100 μ g 및 Al(OH)₃ 1 mg을 복강내로 2주간격으로 3회 투여하고 마지막 투여 2주후 피검물질을 30분전 복강 내 투여하고 saline에 용해한 ovalbumin 1 mg을 정맥내로 투여 후 나타나는 호흡장애, 배뇨·배변 및 사망을 관찰하였다.

마. 적출기관지 수축에 대한 이완작용 시험

Guinea pig를 ether로 흡입 마취하고 복대동맥을 통해 방혈치사한 후 경부의 피부를 일직선으로 절개하였다. 기관지를 주의 깊게 절개하고 표본당 기관지의 4-5개 연골 ring이 포함되도록 잘라 ring 을 개환하여 silk로 2개의 표본을 연결였다. 양측을 cell pin으로 고정하고 Krebs-Henseleit 용액(pH 7.4, 37 $^{\circ}$ C)가 포함된 13 ml의 organ bath에 현수하였다. 기본장력을 1 g으로 유지하여 안정화 시킨 뒤 indomethacin을 5 μ M의 농도로 가하여 cyclooxygenase를 차단한 후 serotonin 10 μ M, histamine 10 μ M 또는 leukotriene D₄ 5 nM로 수축을 유도하였다. 수축작용이 안정화 된 후 시료를 누적적으로 가해 시험 물질이 수축력을 감소시키는 정도를 측정하였다. 장력의 변화를 isometric transducer로 측정하였다.

바. 분리 Mast cell로부터의 histamine유리에 대한 시험

Wistar rat(200-250 g)에 Tyrode용액(NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, CaCl₂ · 2H₂O 1 mM, NaH₂PO₄ 0.4 mM, NaHCO₃ 12 mM, glucose 5.5 mM, heparin 5 units, pH=7.4) 30 ml를 복강내로 투여하고 2분간 마사지 하였다. 복강액을 취해 가제로 거르고 150 x g로 4분간 실온에서 원심분리하였다. 세포액을 heparin이 없는 Tyrode용액으로 2번 씻어서 세포를 부유시켰다. 0.5 ml (세포수 5.4 x 10⁴ cell/ml 정도)씩 나누어서 37 $^{\circ}$ C로 가온하여 10분간 안정화 시켜서 histamine releaser인 Compound 48/80 및 A23187을 각각 0.5 μ g/ml와

0.1 μ M의 농도로 넣고 10분간 incubation 하였다. Histamine유리반응은 시험관을 얼음으로 냉각하여 중단하고 150 x g(4 $^{\circ}$ C)에서 5분간 원심분리하여 supernant와 pellet을 분리하였다. Pellet에 1.5 ml의 Tyrode용액을 넣고 perchloric acid를 0.4 N이 되도록 넣었다. Histamine은Shore법에 따라 유기층-수층의 추출을 통해 추출하고 0.005% o-phthaldehyde 0.6 ml를 가해 교반하고 빙수에서 40분간 방치하면서 반응을 진행하였다. 0.125 M의 인산액 1 ml 를 가해 반응을 정지한 후 실온에서 20분간 방치하였다. 반응생성물의 농도는 야기파장 360 nm, 측정파장 450 nm에서의 형광강도를 측정하였다. 표준액은 0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 및 1 μ g/ml를 사용하여 동일한 방법으로 반응하였다. 유리양은 약물을 가하지 않고 실험한 tube에서의 반응을 100%로 하고 상대적인 저해정도를 계산하였다.

사. 실험적 기관지 천식 model

웅성 Hartley guinea pig(300-320 g)를 수동적으로 감작하고 24시간 후 실험에 사용하였다. 동물을 pentobarbital 로 (60 mg/kg, ip)마취하고 기관 cannula를 삽입하였다. 기관 cannula에 삼지tube를 연결한 뒤 한쪽은 rodent respirator에, 또 한쪽은 bronchospasm transducer 에 연결하여 압력변화를 측정(Konzett and Rössler, 1946)하였다. 근육이완을 목적으로 gallamine triethiodide 를 10mg/kg (iv)용량으로 천식유발 직전 투여하고 인공호흡기로 실내공기를 60 stroke/min의 속도로 1 ml/100 g b.w.의 양으로 연속적으로 공급하였다. 천식유발을 위해 경정맥에 삽입된 cannula로 항원 (ovalbumin 5 mg/rat) 정맥내 투여하였다. 이 때 나타나는 기관지 압의 변화를 physiography로 기록하였다. 약물을 투여한 군과 투여하지 않은 군의 기관지압 상승의 정도를 비교하였다.

아. Rat 적출 대동맥에서의 수용체작용 연구

Sprague-Dawley male rat의 두부를 강타하여 희생시키고 흉강을 열어 흉대동맥을 적출하였다. 대동맥을 ring으로 약 3 mm의 길이로 잘라 Krebs-Henseleit

용액(pH 7.2, 37 °C)이 함유된 30 ml의 organ bath에 현수하였다. Resting tension을 1 g으로 유지하면서 Alpha-1 수용체에의 작용은 phenylephrine에 의한 수축작용에 미치는 영향을, 5-HT수용체는 5-HT에 의한 수축작용을 저해하는 능력을, angiotensin 수용체는 angiotensin II에 의한 수축작용에 미치는 영향을 각각 시험하였다.

자. 적출 guinea pig 심방에서의 수용체작용 연구

Hartley strain male guinea pig를 희생시키고 우측 atria를 적출하였다. 도살 16시간전에 reserpine(1 mg/kg)을 처치하여 NE을 고갈시켰다. 조직을 Krebs-Henseleit 용액이 든 30 ml의 organ bath에 넣고 resting tension 2 g으로 현수하였다. Phenoxybenzamine(50 μ M)을 30분간 조직에 가한 후 반복세척하여 α -수용체를 차단하고 β -수용체에의 작용을 보기위해 NE에 의해 유발되는 맥박수의 증가에 미치는 시험물질의 영향을 측정하였으며 histamine H₂ 수용체에 미치는 영향은 histamine에 의해 유발된 박동수 증가에 미치는 시험물질의 영향을 검토하였다.

차. Rat vas deferentia에서의 α_2 수용체에의 작용연구

Rat을 방혈치사시키고 vas deferentia를 적출하고 적출한 장기를 37°C로 가온한 Krebs-Henseleit용액에 0.5 g의 resting tension으로 현수하여 95% O₂/5% CO₂로 포화시켰다. 백금전극을 조직의 양쪽에 설치하고 0.5 Hz, 1 msec duration, 40 V로 연속적인 자극을 하여 수축을 유도할 때 이 수축작용을 α_2 -수용체 agonist인 clonidine이 억제하며 이 억제작용에 대한 시험물질의 영향을 검토하였다.

카. 적출 guinea pig 회장에서 수용체에의 작용에 대한 연구

Prostaglandin E₂에 의해 유발된 수축력에 미치는 시험물질의 영향을 검토하였다. Guinea pig에서 적출한 회장부를 1.5 cm 정도의 길이로 잘라 30 ml의 Tyrode 용액(32 °C)이 든 organ bath에 resting tension 2 g으로 현수하였다. 이때 용액에는 indomethacin 3 μ M을 함유시켜 cyclooxygenase 효소를 차단하였다. PGE₂에 의해 유발된 수축작용에 미치는 시험물질의 영향을 측정하였다.

타. Arthus 반응

Type III allergy반응의 실험적인 모델로 사용되고 있는 반응으로서 soluble 항원과 항체가 결합하여 항원-항체 결합체를 생성하게 된다. 이때에 mast cell에서 유리된 histamine에 의하여 조직의 상해를 유발하게 되며 환부에 혈소판 응집이 일어나기 때문에 환부에 수종, 발적, 혈류장애가 관찰된다. 이 model에서 약효를 검색하므로써 약물이 면역성관련 rheumatoid에 유효할 것인가를 검토할 수 있다. 6주령 Balb/C mouse에 4×10^8 개의 SRBC 0.2 ml를 복강내로 투여, 2주후 추가감작하였다. 2차 감작 5일 후 2×10^8 개의 SRBC 0.025 우측 뒷 발바닥에 피내주사하고 3시간 후의 발의 두께를 thickness gauge로 측정하였으며, 좌측발은 대조군으로 사용하였다. 시험물질은 SRBC 투여 직후 복강내로 투여하였다.

파. Delayed-type hypersensitivity 시험

소위 Type IV allergy반응에 해당하는 이 반응은 항원-항체의 작용이 아니고 감작된 T-lymphocyte 및 macrophage가 생산하는 lymphokine에 의해 홍반이 생성되는 현상이다. 접촉성피부염은 이런 기전에 의하여 일어나는 allergy이기 때문에 부수적으로 이 model에서의 약효를 검정하였다. 즉 mouse의 귀에 피크릴(2-chloro-1,3,5-trinitrobenzene)의 ethanol용액을 도포하고 일주일 후 재차 도포하면 발적이 생성되고 발적에 의한 귀두께 증가를 24시간 후 thickness gauge로 측정하여 allergy반응의 지표로 하였다. 마지막 측정 1시간간 및 12시간 전 총 2회 복강 투여 후 시험물질이 이 발적반응에 미치는 영향을 검토하였다.

하. 독성에 대한 관찰

시험물질의 양이 대부분의 경우에 제한되어 있기 때문에 독성에 대한 시험은 약효검정과 연계하여 수행하였다. 약물투여 후 도살시까지 나타나는 행동의 변화, 호흡, 자세, 보행, 체온 등 육안적으로 또는 측지에 의해 판단 가능한 모든 독성을 검출하고자 하였다.

3. 구조분석 방법

가. NMR

1) $^1\text{H-NMR}$: 400 MHz Bruker DPX 400 (9.4 T), 90° pulse = 9.7 usec

2) $^{13}\text{C-NMR}$: 100 MHz, 90° pulse = 9.6 usec

3) DEPT

4) COSY :

2K(t2) x 256(t1)

NS = 64, SW = 10 ppm

program = N-type magnitude COSY

① 사용한 pulse sequence는 다음과 같다.

90 - τ - t1 - 90 - τ - 90 - τ - FID

② Felix (msi) postprocessing program을 이용하여 process

③ phase correction과 zero-filling을 하였다.

④ cross-peaks로부터 residues를 assign하였다.

⑤ residues의 assignments를 위해 Felix-assign을 사용

⑥ spin system과 coupling constants를 결정

⑦ $^3J_{\text{H}\beta\text{-H}\alpha}$ 값으로부터 dihedral angle값의 결정

5) HOHAHA :

2K(t2) x 256(t1)

NS = 64, SW = 10 ppm

program = MLEV-17 with TPPI

mixing time = 100 msec

① 사용한 pulse sequence는 아래와 같다.

90 - t1 - slim pulse - MLEV17 - slim pulse - FID

② Felix (msi) postprocessing program을 이용하여 process

③ phase correction과 zero-filling을 하였다.

④ inter-residue의 long ranged coupling을 결정

6) HMQC :

2K(t2) x 256(t1)

NS = 96, SW = 10 ppm x 187 ppm

program = invb (BIRD pulse를 포함한 inverse proton-carbon correlation)

7) HMBC :

2K(t2) x 256(t1)

NS = 96, SW = 10 ppm x 187 ppm

program = inv4lplrnd (long ranged coupling을 측정하기 위한 inverse proton-carbon correlation)

delay for long-ranged coupling = 45 msec

나. MS

FAB/MS : VG

다. FT/IR

Perkin Elmer Paragon 2000, KBr pellet

라. database

Chapman & Hall CD Rom, the Dictionary of Natural Products

Chemical Abstracts supported by STN

제 3 장 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

제 1 절 1차 screening 결과

1. 농가재배식물의 1차 PCA screening에 의한 약효 시험결과 (복강 내 투여)

(W : water ; E : EtOAc ; C : MC)

일련번호	시험물질		투여량	시험 수	반응(대조군에 대한 %)	판정(무효 또는 재시험요)
	명칭	분획				
95001	산겨울	W	100 mg/kg	3	138, 76, 100	무효
		E	125 mg/kg	2	74, 61	재시험요
		C	80 mg/kg	2	83, 104	무효
95002	오수유	W	150 mg/kg	3	98, 61, 80	무효
		E	80 mg/kg	3	0, 0, 0	재시험요
		C	125 mg/kg	3	64, 0, 0	재시험요
95003	싸리	W	100 mg/kg	3	18, 108, 73	재시험요
		E	80 mg/kg	1	98	무효
		C	80 mg/kg	3	91, 80, 84	무효
95004	붉은 토끼풀	W	225 mg/kg	3	122, 122, 112	무효
		E	80 mg/kg	3	14, 87, 49	재시험요
		C	125 mg/kg	3	80, 84, 94	무효
95005	산겨름 나무	W	130 mg/kg	3	56, 100, 84	무효
		E	200 mg/kg	3	87, 87, 73	재시험요
		C	90 mg/kg	3	90, 110, 100	무효
95006	사철쪽	W	250 mg/kg	3	71, 26, 94	재시험요
		E	130 mg/kg	3	97, 107, 58	무효
		C	260 mg/kg	3	68, 10, 65	재시험요
95007	칼잎용 담	W	80 mg/kg	3	108, 104, 115	무효
		E	220 mg/kg	3	97, 90, 76	무효
		C	80 mg/kg	3	135, 83, 80	무효
95008	청가시 덩굴	W	120 mg/kg	3	111, 69, 108	무효
		E	70 mg/kg	2	70, 70	재시험요
		C	85 mg/kg	3	69, 111, 90	무효
95009	터리풀	W	125 mg/kg	2	97, 101	무효
		E	125 mg/kg	3	97, 63, 80	재시험요
		C	100 mg/kg	3	76, 97, 122	무효
95010	뽕나무	W	90 mg/kg	3	93, 110, 73	무효
		E	40 mg/kg	2	93, 113	재시험요
		C	100 mg/kg	3	83, 95, 90	무효

95011	왜개싱 아	W	80 mg/kg	3	105, 0, 100	무효
		E	100 mg/kg	2	88, 93	무효
		C	100 mg/kg	2	88, 103	무효
95012	무계 꽃나무	W	105 mg/kg	3	83, 101, 94	무효
		E	110 mg/kg	2	79, 77	재시험 요
		C	105 mg/kg	2	100, 94	무효
95013	흑느릅 나무	W	115 mg/kg	3	94, 58, 63	재시험 요
		E	145 mg/kg	3	63, 65, 60	재시험 요
		C	70 mg/kg	2	31, 108	재시험 요
95014	소나무	W	165 mg/kg	3	58, 19, 65	재시험 요
		E	115 mg/kg	3	84, 16, 0	재시험 요
		C	55 mg/kg	2	113, 123	재시험 요
95015	더위지 기	W	140 mg/kg	1	116	무효
		E	95 mg/kg	1	100	무효
		C	140 mg/kg	3	86, 42, 105	무효
95016	영경귀	W	115 mg/kg	3	45, 36, 119	재시험 요
		E	95 mg/kg	2	84, 87	재시험 요
		C	110 mg/kg	3	147, 75, 103	무효
95017	털개요 등	W	120 mg/kg	3	139, 162, 143	무효
		E	95 mg/kg	2	143, 71	무효
		C	225 mg/kg	3	113, 135, 132	무효
95018	충충이 꽃	W	165 mg/kg	3	167, 100, 124	무효
		E	60 mg/kg	1	150	무효
		C	150 mg/kg	3	102, 173, 150	무효
95019	사람주 나무열 매	W	215 mg/kg	3	119, 115, 147	무효
		E	110 mg/kg	2	133, 108	무효
		C	215 mg/kg	3	79, 98, 150	무효
95020	전호	W	90 mg/kg	3	108, 111, 117	무효
		E	85 mg/kg	2	147, 133	무효
		C	60 mg/kg	2	157, 122	재시험 요

95021	누리장 나무	W	100 mg/kg	3	133, 133, 157	무효
		E	90 mg/kg	2	97, 106, 92	무효
		C	95 mg/kg	3	0, 0, 186	재시험
95022	천궁	W	115 mg/kg	3	238, 214, 271	무효
		E	125 mg/kg	3	0, 67, 0	재시험 요
		C	160 mg/kg	3	195, 52, 252	무효
95023	신이	E	165 mg/kg	3	167, 195, 143	무효
		C	110 mg/kg	1	124	무효
95024	지치	W	135 mg/kg	3	133, 92, 76	무효
		E	70 mg/kg	3	122, 133, 125	무효
		C	170 mg/kg	3	96, 112, 112	무효
95025	황기	W	130 mg/kg	3	139, 125, 125	무효
		E	35 mg/kg	3	139, 167, 139	무효
		C	65 mg/kg	3	58, 133, 111	무효
95026	백출	W	250 mg/kg	2	74, 89	재시험 요
		E	115 mg/kg	3	103, 117, 0	무효
			190 mg/kg	3	148, 102, 121	무효
		C	230 mg/kg	3	93, 89, 111	무효
95027	향부자	W	150 mg/kg	3	0, 28, 28	재시험 요
		E	60 mg/kg	1	125	무효
		C	110 mg/kg	2	86, 78	재시험 요
95028	맥문동	W	135 mg/kg	2	86, 78	무효
		E	75 mg/kg	3	139, 111, 161	무효
		C	100 mg/kg	2	103, 106	무효
95029	현초	W	100 mg/kg	2	0, 137	무효
		E	85 mg/kg	3	118, 78, 95	무효
		C	85 mg/kg	3	46, 10, 88	재시험 요
95030	황백	W	90 mg/kg	3	0, 42, 100	재시험 요
		E	95 mg/kg	3	141, 0, 98	무효
		C	150 mg/kg	3	49, 0, 0	재시험 요

95031	현호색	W	150 mg/kg	3	146, 79, 118	무효
		E	140 mg/kg	3	15, 97, 0	재시험 요
		C	150 mg/kg	3	97, 0, 94	무효
95032	목단피	W	175 mg/kg	3	36, 7, 7	재시험 요
		E	115 mg/kg	3	136, 76, 0	무효
		C	110 mg/kg	3	121, 130, 112	무효
95033	황금	W	90 mg/kg	3	0, 91, 15	재시험 요
		E	100 mg/kg	1	105	무효
		C	60 mg/kg	2	72, 92	무효
95034	후박	W	165 mg/kg	3	122, 97, 111	무효
		E	100 mg/kg	3	117, 119, 122	무효
		C	90 mg/kg	2	92, 111	무효
95035	음양곽	W	115 mg/kg	3	139, 106, 108	무효
		E	115 mg/kg	3	97, 56, 119	무효
		C	120 mg/kg	3	164, 119, 103	무효
95036	지모	W	210 mg/kg	4	25, 0, 25, 115	재시험요
		E	300 mg/kg	2	109, 102	무효
		C	240 mg/kg	2	58, 69	재시험요
95037	용담	E	240 mg/kg	2	98, 98	무효
		C	250 mg/kg	2	82, 124	무효
		W	230 mg/kg	4	87, 112, 121, 96	무효
95038	천마	W	200 mg/kg	3	100, 97, 86	무효
95039	산사자	W	330 mg/kg	4	125, 120, 155, 110	무효
		E	170 mg/kg	3	98, 94, 130	무효
		C	180 mg/kg	2	105, 118	무효
95040	고삼	W	210 mg/kg	2	140, 130	무효
		E	260 mg/kg	2	60, 0	재시험 요
		C	180 mg/kg	3	80, 88, 98	무효

95041	목통	W	260 mg/kg	2	75, 135	무효
		E	105 mg/kg	2	134, 118	무효
		C	80 mg/kg	2	2필 모두강직성 경련 후망	독성 강함
95042	산수유	W	125 mg/kg	3	79, 86, 83	무효
		E	220 mg/kg	3	89, 93, 106	무효
		C	180 mg/kg	2	116, 104	무효
95043	진피	W	190 mg/kg	3	90, 150, 130	무효
		E	190 mg/kg	3	114, 118, 95	무효
		C	190 mg/kg	3	85, 152, 96	무효
95044	승마	W	220 mg/kg	4	69, 100, 83, 117	무효
		E	195 mg/kg	2	88, 78	재시험 요
		C	120 mg/kg	3	89, 112, 92	무효
95045	갈근	W	250 mg/kg	4	86, 47, 76, 81	재시험 요
		E	220 mg/kg	2	179, 73	무효
		C	190 mg/kg	3	120, 130, 98	무효
95046	연교	W	175 mg/kg	3	150, 125, 155	무효
		E	240 mg/kg	3	73, 102, 94	무효
		C	215 mg/kg	3	112, 94, 94	무효
95047	오미자	W	390 mg/kg	4	125, 155, 120, 140	무효
		E	270 mg/kg	4	94, 69, 73, 77	재시험 요
		C	230 mg/kg	4	82, 89, 111, 122	무효
95048	당귀	W	200 mg/kg	4	135, 88, 92, 130	무효
		E	250 mg/kg	2	121, 133	무효
		C	340 mg/kg	4	72, 92, 110, 101	무효
95049	해동피	W	130 mg/kg	3	0, 71, 89,-	재시험 요
		E	210 mg/kg	3	152, 137, 109	무효
		C	130 mg/kg	3	0, 126, 0	재시험 요
95050	석창포	W	190 mg/kg	3	101, 124, 114	무효
		E	290 mg/kg	2	0, 0	재시험 요
		C	200 mg/kg	4	39, 58, 0, 116	재시험 요

95051	시호	W	220 mg/kg	4	79, 34, 79, 55	재시험 요
		E	210 mg/kg	2	142 및 1필은 호흡마비 후 사망	무효 및 독성 강함
		C	210 mg/kg	3	92, 73, 46	재시험 요
95052	고련피	W	125 mg/kg	3	117, 121, 97	무효
		E	210 mg/kg	2	75, 108	무효
		C	230 mg/kg	3	91, 94, 83	무효
95053	길경	W	155 mg/kg	1	90	무효
		E	250 mg/kg	2	98, 83	무효
		C	200 mg/kg	2	77, 92	무효
95054	세신	W	260 mg/kg	4	86, 83, 117, 90	무효
		E	180 mg/kg	3	3필 모두 투여 2-3분 이내에 사망	독성 강함
		C	170 mg/kg	3	112, 109, 78	무효
95055	맥지	W	180 mg/kg	4	93, 83, 100, 86	무효
		E	215 mg/kg	3	85, 114, 94	무효
		C	220 mg/kg	4	91, 98, 76, 105	무효
95056	방기	C	230 mg/kg	3	130, 96, 93	무효
95057	산조인	W	135 mg/kg	4	117, 128, 96	무효
		E	160 mg/kg	4	110, 69	무효
		C	175 mg/kg	4	0, 44, 92, 116	재시험 요
95058	토복령	W	190 mg/kg	2	103, 124	무효
		E	160 mg/kg	2	65, 85	무효
		C	220 mg/kg	3	80, 105, 80	무효
95059	천초	W	180 mg/kg	4	89, 65, 97, 110	무효
		E	275 mg/kg	4	113, 90, 2필은 투여 2-3분내 경련 후 사망	무효 및 독성강함
		C	195 mg/kg	2	2필 모두 투여 2-3분내 사망	독성 강함
95060	우슬	W	200 mg/kg	4	100, 47, 92, 105	무효
		E	90 mg/kg	2	114, 98	무효
		C	210 mg/kg	2	120, 96	무효

95061	구기자	W	185 mg/kg	4	117, 78, 135, 117	무효
		E	275 mg/kg	2	109, 94	무효
		C	210 mg/kg	2	90, 114	무효
95062	천문동	W	220 mg/kg	2	60, 0	재시험 요
		E	165 mg/kg	3	131, 160, 126	무효
		C	195 mg/kg	2	115, 123	무효
95063	차전자	W	150 mg/kg	2	84, 0	재시험 요
		C	200 mg/kg	3	83, 112, 102	무효
		E	5 mg/kg, iv	2	191, 181	무효
95064	소엽	W	210 mg/kg	3	111, 84, 103	무효
		E	240 mg/kg	2	88, 106	무효
		C	255 mg/kg	2	0, 0	재시험 요
95065	산약	W	200 mg/kg	3	117, 100, 97	무효
		E	260 mg/kg	1	95	무효
		C	220 mg/kg	2	89, 85	재시험요
95066	흑측	W	255 mg/kg	2	90, 86	무효
		E	11 mg/kg, iv	1	119	무효
		C	37 mg/kg, iv	2	119, 114	무효
95067	익모초	W	165 mg/kg	3	141, 110, 131	무효
		E	200 mg/kg	2	0, 4	재시험 요
		C	200 mg/kg	2	87, 142	무효
95068	하고초	W	185 mg/kg	4	100, 124, 82, 113	무효
		E	240 mg/kg	2	97, 129	무효
		C	240 mg/kg	3	104, 111, 115	무효
95069	금은화	E	240 mg/kg	2	102, 0	재시험 요
		C	185 mg/kg	2	73, 0	재시험 요
		W	270 mg/kg	4	104, 93, 78, 165	무효
95070	감초	W	110 mg/kg	3	85, 135, 115	무효
		E	240 mg/kg	2	129, 137	무효
		C	260 mg/kg	2	96, 67	무효

95071	백강잠	W	200 mg/kg	4	81, 105, 100, 100	무효
		C	290 mg/kg	4	104, 100, 74, 112	무효
95072	망초	W	240 mg/kg	4	90, 93, 76, 124	무효
		E	200 mg/kg	3	122, 77, 0	재시험 요
		C	180 mg/kg	3	109, 102, 94	무효
95073	적작약	W	170 mg/kg	3	128, 104, 86	무효
		E	190 mg/kg	3	97, 102, 136	무효
		C	170 mg/kg	3	80, 89, 96	무효
95074	육계	W	140 mg/kg	4	79, 71	재시험 요
		E	225 mg/kg	2	0, 110	재시험 요
		C	220 mg/kg	3	89, 70	재시험 요
95075	돼지풀	W	170 mg/kg	3	0, 51, 100	재시험 요
		E	210 mg/kg	2	69, 75	재시험 요
		C	190 mg/kg	3	112, 84, 108	무효
95076	다래	W	150 mg/kg	3	87, 68, 0	재시험 요
		E	160 mg/kg	2	97, 63	무효
		C	230 mg/kg	2	105, 102	무효
95077	갈루인	W	240 mg/kg	2	110, 100	무효
		E	170 mg/kg	2	85, 99	무효
		C	210 mg/kg	3	88, 0, 0	재시험 요
95078	인진	W	180 mg/kg	3	47, 86, 57	재시험 요
		E	205 mg/kg	2	41, 0	재시험 요
		C	180 mg/kg	3	123, 77, 92	재시험 요
95079	푸로폴리스	E	16 mg/kg	3	94, 122, 126	무효
		C	21 mg/kg	3	93, 104, 93	무효
		W	14 mg/kg	3	92, 102, 125	무효
95080	백복령	E	200 mg/kg	3	101, 118, 105	무효
		C	165 mg/kg	3	73, 100, 119	무효
95081	황련	W	255 mg/kg	5	90, 90, 100, 90, 107	무효
		E	240 mg/kg	4	42, 102, 92, 88	재시험 요
		C	200 mg/kg	3	106, 84, 95	무효

95082	지실	W	150 mg/kg	4	107, 78, 156, 107	무효
		E	320 mg/kg	4	120, 102, 106, 139	무효
		C	270 mg/kg	4	95, 133, 91, 91	무효
95083	하수오	W	270 mg/kg	4	93, 82, 100, 89	무효
		E	220 mg/kg	3	97, 90, 76	무효
		C	25 mg/kg, iv	2	140, 119	무효
95084	담쟁이	W	180 mg/kg	3	174, 115, 144	무효
		E	250 mg/kg	4	88, 125, 79, 42	재시험 요
		C	255 mg/kg	3	84, 95, 84	재시험 요
95085	홀아비 꽃대	W	180 mg/kg	3	174, 115, 144	무효
		E	25 mg/kg, iv	2	129, 145	무효
		C	180 mg/kg	4	122, 95, 72, 122	무효
95086	쪽동백	W	330 mg/kg	4	100, 19, 96, 11	재시험요
		E	230 mg/kg	2	103, 133	무효
		C	240 mg/kg	4	87, 95, 72, 72	재시험요
95087	결명자	W	180 mg/kg	2	144, 100	무효
		E	170 mg/kg	3	80, 95, 95	무효
		C	270 mg/kg	4	87, 118, 27, 99	무효
95088	노란물 봉선	W	300 mg/kg	4	100, 96, 119, 115	무효
		E	미시험			
		C	60 mg/kg, iv	3	92, 96, 104	무효
95089	딱총나 무	W	450 mg/kg	4	115, 121, 109, 99	무효
		E	140 mg/kg	3	125, 125, 115	무효
		C	455 mg/kg	4	72, 84, 76, 95	재시험 요
95090	쉽사리	W	360 mg/kg	4	107, 119, 104, 107	무효
		E	75 mg/kg, iv	2	96, 113	무효
		C	200 mg/kg	2	103, 84	무효
95091	생강나 무	W	180 mg/kg	4	104, 119, 100, 119	무효
		E	230 mg/kg	4	103, 46, 106, 84	무효
		C	180 mg/kg	4	84, 106, 110, 126	무효

95092	지유	W	260 mg/kg	4	22, 111, 59, 48	재시험 요
		E	360 mg/kg	4	139, 148, 88, 79	무효
		C	45 mg/kg, iv	2	113, 104	무효
95093	애기똥 플	W	260 mg/kg	4	89, 89, 96, 100	무효
		E	15 mg/kg, iv	1	109	무효
		C	190 mg/kg	2	87, 103	무효
95094	해동피	W	200 mg/kg	3	111, 96, 122	무효
		E	300 mg/kg	4	87, 171, 106, 162	무효
		C	200 mg/kg	4	95, 110, 114, 87	무효
95095	갈매나 무	W	290 mg/kg	3	100, 100, 104	무효
		E	90 mg/kg, iv	2	117, 113	무효
		C	360 mg/kg	4	91, 134, 99, 99	무효
95096	침	W	160 mg/kg	3	107, 100, 100, 103	무효
		E	28 mg/kg	2	119, 202	무효
		C	75 mg/kg, iv	2	104, 96	무효
95097	개암나 무	W	310 mg/kg	4	130, 122, 122, 111	무효
		E	270 mg/kg	4	143, 120, 115, 88	무효
		C	180 mg/kg	4	103, 129, 125, 103	무효
95098	굴피나 무	W	14 mg/kg, iv	4	79, 106, 103, 106	무효
		E	11 mg/kg, iv	4	111, 0, 120, 34	판정불능(독성가 능성)
		C	17 mg/kg, iv	4	107, 146, 103, 124	무효
95099	오배자	속W	500 mg/kg	5	64, 64, 104, 119, 121	무효
		껍질 W	500 mg/kg	5	94, 94, 99, 79, 89	무효
		씨W	500 mg/kg	4	99, 104, 109, 106	무효
95100	으름	W	290 mg/kg	3	104, 104, 96	무효
		E	460 mg/kg	4	0, 28, 120, 9	무효
		C	250 mg/kg	3	102, 103, 99	무효

2. 능동전신성 아나필락시스(active systemic anaphylaxis) 반응

1차 screening 시험에 사용한 model인 수동 피부감작 아나필락시스에서 약효가 있다고 인정되는 시험물질에 대하여 약효를 재확인하기 위한 수단으로 능동 전신성 아나필락시스 반응model을 사용하였다. 피검물질을 30분전 복강 내 투여하고 saline에 용해한 ovalbumin 1 mg을 정맥 내로 투여 후 나타나는 호흡장애, 배뇨·배변 및 사망을 관찰하였다. 정량적인 비교는 사망을 제외하고는 주관적인 판단으로 등급을 정하였다. 시호의 W 및 C 분획, 육계 W분획, 지유 W분획이 유효한 것으로 확인되었다.

ASA에서의 추출물의 약효

시험물질	투여량(ip)	반응의 종류 및 등급 (괄호안은 빈도)		
		호흡장애	배뇨·배변	사망
Saline	0.1 ml/mouse	++~++++ (6/10)	+++~++++ (9/10)	9/10
DMSO	0.1 ml/mouse	+~++++ (4/8)	+++~++++ (8/8)	7/8
붉은 토끼풀 E 분획	240 mg/kg	+++~++++(7/7)	++~++++(6/7)	7/7
현초 C분획	255 mg/kg	+~+++ (6/7)	++~++++(7/7)	6/7
현호색 E분획	450 mg/kg	+~++++ (4/9)	++~+++ (9/9)	9/9
목단피 W분획	175 mg/kg	+~+++ (5/7)	+++~++++ (6/7)	7/7
지모 W분획	630 mg/kg	++~++++ (3/9)	++~++++ (9/9)	9/9
시호 W분획	660 mg/kg	+~+++ (3/10)	+++~++++ (2/10)	5/10(유효)
시호 C분획	630 mg/kg	+~+++ (3/10)	++~++++ (4/10)	6/10(유효)
육계 W분획	420 mg/kg	++~+++ (4/10)	+~++++ (10/10)	4/10(유효)
인진 W분획	180 mg/kg	++~+++ (6/8)	++~++++ (6/8)	8/8
지유 W분획	480 mg/kg	++~+++ (5/10)	+~+++ (7/10)	5/10 (유효)
닥종나무 C분획	340 mg/kg	+~++++ (5/9)	+++~++++ (9/9)	8/9
뽕나무 E분획	270 mg/kg	+~+++ (8/8)	++~+++ (6/8)	8/8

3. 실험적 기관지 천식 model에서의 약효

Guinea pig model을 사용하였다. Ovalbumin을 항원으로 사용하여 감작시킨 guinea pig에서 분리한 혈청을 0.5 ml 복강내 투여하여 수동적으로 감작시키고 18-24시간 후의 ovalbumin challenge에 의해 천식과 유사한 반응들이 관찰된다. 한편 1차 PCA 및 Mouse ASA에서 다소라도 약효가 있는 것으로 인정되는 육계 water분획, 시호 water분획 및 시호 CH₂Cl₂ 분획의 약효를 확인하였으며 그 중 시호의 2종 추출물과 지유 water추출물의 약효가 인정되어 집중적인 연구의 대상으로 정하였다.

Guinea pig 기관지천식 model에서의 약효

투여물질		최대 기관지 수축정도(overflow of air in ml)	동물수	판정
물질	용량(ip)			
saline	0.5 ml/guinea pig	19.3±4.2	4	대조군
DMSO	0.5 ml/guinea pig	17.8±3.4	5	대조군
시호 W	660 mg/kg, ip	12.8±3.3	4	유효
시호 C	630 mg/kg, ip	13.2±4.3	5	유효
육계 W	420 mg/kg, ip	21.3±4.5	5	무효
지유 W	560 mg/kg, ip	11.2±5.7	6	유효

4. 1차 screening시 발견된 독성

약효의 존재 유·무뿐 아니라 개략적인 독성의 존재도 검정하였으며 독성이 발현된 것으로 보이는 시료와 그 내용은 아래 표에 정리하였다. 1차

screening에서 약효가 발견된 분획과 부작용이 발견된 분획으로서 부작용도 발견된 것은 쪽동백 water층과 담쟁이 W 및 C 층이었다.

시험물질		투여용량	독성증상 및 발현빈도(괄호속은 빈도임)
명칭	분획		
흑측	E	11 mg/kg, iv	depression (1/2), dyspnea(1/2)
	C	37 mg/kg, iv	dyspnea (1/2), death (1/2)
쪽동백	W	330 mg/kg, ip	deprssion (1/4), diarrhea (2/4)
노란물봉선	C	60 mg/kg, iv	death (1/3), hemolysis (2/3)
십사리	E	75 mg/kg, iv	death (1/3)
지유	C	45 mg/kg, iv	lethargy/death (1/3)
애기똥풀	E	15 mg/kg, iv	tachypnea (1/2)
갈매나무	E	90 mg/kg, iv	death (1/3)
취	C	75 mg/kg, ip	hemolysis (2/3)
칼잎용담-2	E	17 mg/kg, iv	depression/lethargy (2/2)
	C	20 mg/kg, iv	dyspnea (2/2)
푸로폴리스	E	11 mg/kg, iv	fainting (1/4)
	C	17 mg/kg, iv	depression(1/4)
담쟁이	W	2510 mg/kg, ip	yellow urine (2/5) depression (1/5)
		240 mg/kg, ip	diarrhea (1/5)
	C	920 mg/kg, ip	diarrhea (2/5)

제 2 절 10개 분획에 대한 약효 및 독성시험 결과

1차 screening 결과 재시험이 필요한 분획에 대한 재시험 결과 아래와 같이 10개의 분획에서 약효가 관찰되어서 이들의 분리 및 정제, 구조분석 실험을 계속 수행하였다.

- (1) 시호 methylene chloride 분획
- (2) 지유 water 분획
- (3) 현초 methylene chloride 분획
- (4) 목단피 water 분획
- (5) 지모 water 분획
- (6) 옥계 methylene chloride 분획
- (7) 인진 methylene chloride 분획
- (8) 뽕나무 ethyl acetate 분획
- (9) 전호 methylene chloride 분획
- (10) 소나무 ethyl acetate 분획

1. 시호 methylene chloride 분획

시호는 학명이 *Bupleurum falcatum* L. (미나리과 Umbelliferae)로 산지는 한국, 중국, 일본이다. 단일 또는 갈라진 뿌리로서 윗부분은 굵으며 지름이 0.5~1.0cm이고 약 1.5cm에 이르는 것도 있으며 밑부분은 가늘고 길다. 근두부에는 줄기의 기부가 남아 있다. 바깥면은 황갈색~갈색으로 깊은 세로 주름이 있는 것이 많다. 꺾여지기 쉬우며 꺾인 면은 섬유성이고 특이한 냄새가 있으며 약간 쓰다.

아래의 신문 기사는 중국의 저가 공세로 인해 시호의 수출이 감소하게 되었다는 1997년 10월 약업신문 기사이다.

국산柴胡 수출막혀 재배중단 위기

91년 294톤서 작년 34톤으로 급감 高價 효자품목...日本과 계약 종료로

국산 시호의 수출이 급감하면서 재배농가들이 어려움을 겪고 있다. 시호는 91년 294톤에서 작년 34톤으로 급감했다. 이는 일본과의 계약 종료 때문으로 보인다. 시호는 91년 294톤에서 작년 34톤으로 급감했다. 이는 일본과의 계약 종료 때문으로 보인다.

시호는 91년 294톤에서 작년 34톤으로 급감했다. 이는 일본과의 계약 종료 때문으로 보인다. 시호는 91년 294톤에서 작년 34톤으로 급감했다. 이는 일본과의 계약 종료 때문으로 보인다.

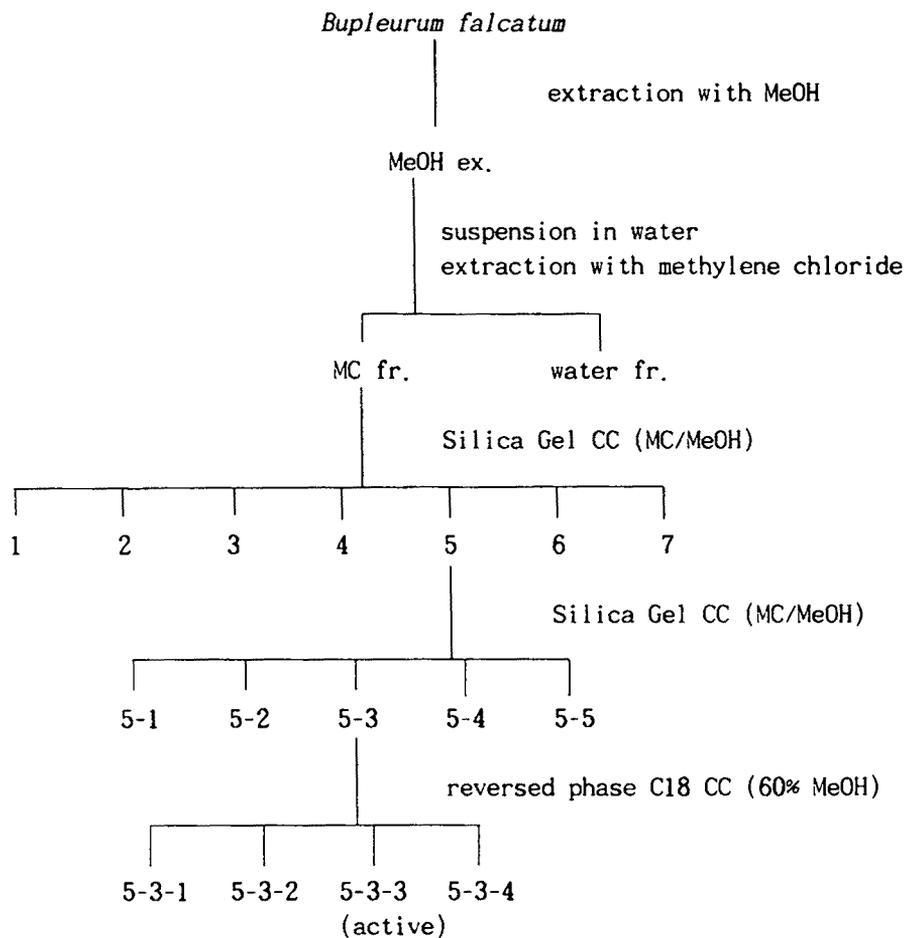
97년 10월 10일 약업신문 기사

구분	97년 10월	97년 9월	97년 8월	97년 7월	97년 6월	97년 5월	97년 4월	97년 3월	97년 2월	97년 1월
수출액	1,200	1,100	1,000	900	800	700	600	500	400	300
수출량	300	280	260	240	220	200	180	160	140	120



시호는 91년 294톤에서 작년 34톤으로 급감했다. 이는 일본과의 계약 종료 때문으로 보인다. 시호는 91년 294톤에서 작년 34톤으로 급감했다. 이는 일본과의 계약 종료 때문으로 보인다.

가. 시호로부터 활성 물질 (M533)의 분리 및 정제



나. 시호 분획 시료의 약효 시험

1) 시호의 1차 분획시료에 대한 PCA 약효 (재시험 결과)

시험군		투여량	시험수	반응(직경 mm) 또는 control에 대한 %	판정
분획군	투여물질				
대조군	Saline	1.0 ml/rat, ip	5	14.4±2.5 mm (100 %)	Water 층에 대한 대조군
	DMSO	0.5 ml/rat, ip	3	14.8±3.1 mm (100 %)	CH ₂ Cl ₂ , EtOAc에 대한 대조군
Water 층	총 water층	660 mg/kg, ip	5	0, 0, 83, 0, 0 (%)	유효
	Butanol층	300 mg/kg, ip	4	101, 0, 80, 0 (%)	유효
CH ₂ Cl ₂ 층		210 mg/kg, ip	4	21, 7, 21, 42 (%)	유효
EtOAc 층		43 mg/kg, iv	4	132, 76, 122, 87 (%)	무효

2) 시호 CH₂Cl₂의 분획시료에 대한 PCA약효

시험군		투여량	시험수	반응(직경 mm) 또는 control에 대한 %	판정
분획군	투여물질				
대조군	DMSO	0.1 ml/rat, iv	5	15.1±3.3 mm (100 %)	시료 용매 대조군
CH ₂ Cl ₂ 층	M ₁ 층	23 mg/kg, iv	4	99, 89, 83, 93 (%)	무효
	M ₂ 층	16 mg/kg, iv	3	99, 99, 119 (%)	무효
	M ₃ 층	13 mg/kg, iv	4	전 동물 사망	독성 강함
	M ₄ 층	11 mg/kg, iv	4	3마리 사망, 1마리 투여불능	독성강함
	M ₅ 층	26 mg/kg, iv	3	50, 30, 50 (%)	유효
	M ₆ 층	13 mg/kg, iv	4	135, 120, 124, 137 (%)	무효
	M ₇ 층	16 mg/kg, iv	3	129, 124, 129 (%)	무효

3) 시호 M5 층의 분획시료에 대한 PCA 약효

시험군		투여량	시험수	반응(직경 mm) 또는 control에 대한 %	판정
분획군	투여물질				
대조군	DMSO	0.1 ml/rat, iv	5	8.88±1.4 mm (100 %)	시료 용매 대조군
M5 층	C51 층	10 mg/kg, iv	3	45, 118, 124 (%)	무효
	C52 층	44 mg/kg, iv	4	전 동물 사망	독성 강함
	C53 층	34 mg/kg, iv	3	56, 84, 6	유효
	C54 층	9 mg/kg, iv	2	101, 118	무효

4) 시호 C53 층의 분획시료에 대한 PCA 약효

시험군		투여량	시험수	반응(직경 mm) 또는 control에 대한 %	판정
분획군	투여물질				
대조군	DMSO	0.1 ml/rat, iv	5	10.5±2.2 mm (100 %)	시료 용매 대조군
C53 층	M531 층	14 mg/kg, iv	4	105, 114, 110, 129 (%)	무효
	M532 층	15 mg/kg, iv	5	114, 129, 124, 110, 107	무효
	M533 층	9 mg/kg, iv	5	71, 19, 0, 110, 19	유효
	M534 층	9 mg/kg, iv	5	129, 62, 143, 148, 138	무효

5) ASA에서의 추출물의 약효

시험물질	투여량(ip)	반응의 종류 및 등급 (괄호안은 빈도)		
		호흡장애	배뇨·배변	사망
Saline	0.1 ml/mouse	++~++++ (6/10)	+++~++++ (9/10)	9/10
DMSO	0.1 ml/mouse	+~++++ (4/8)	+++~++++ (8/8)	7/8
시호 W분획	660 mg/kg	+~+++ (3/10)	+++~++++ (2/10)	5/10(유효)
시호 C분획	630 mg/kg	+~+++ (3/10)	++~++++ (4/10)	6/10(유효)

6) Guinea pig 기관지천식 model에서의 약효

투여물질		최대 기관지 수축정도 (overflow of air in ml)	동물수	판정
물질	용량(ip)			
saline	0.5 ml/guinea pig	19.3±4.2	4	대조군
DMSO	0.5 ml/guinea pig	17.8±3.4	5	대조군
시호 W	660 mg/kg, ip	12.8±3.3	4	유효
시호 C	630 mg/kg, ip	13.2±4.3	5	유효

7) 시호 분획물의 독성현상

표. 시호의 methylene chloride 분획물의 독성현상

시험물질		투여용량	독성증상 및 발현빈도 (괄호속은 빈도임)
유래	분획		
CH ₂ Cl ₂ 층	M3	13 mg/kg, iv	death (4/4)
	M4	11 mg/kg, iv	depression (1/4), death (3/4)
M5 층	C52	44 mg/kg, iv	tonic convulsion/death (4/4)
	C53	34 mg/kg, iv	dyspnea (3/4), lethargy (1/4)

시호분획물들은 비교적 강력한 물질이 함유되어 있는 관계로 독성도 비교적 강력하게 발현되는 경우가 많았으며 특히 유효성분 중의 하나인 C53에서 유발된 행동둔화현상이 약효를 발휘하는 성분과 동일한 물질에 의해서 유발되는 가는 주의해 보아야 할 듯하다. 그러나 다행히 C53의 재분획물인 C533에서는 현저한 독성이 발견되지 않았다.

시호의 water층에서 유래한 분획물인 butanol층의 정맥투여의 결과 이전의 복강투여에서는 관찰되지 않던 현저한 독성(경련, 사망)은 유효성분인 B4에서도 수반되고 있어서 우려할 만하다.

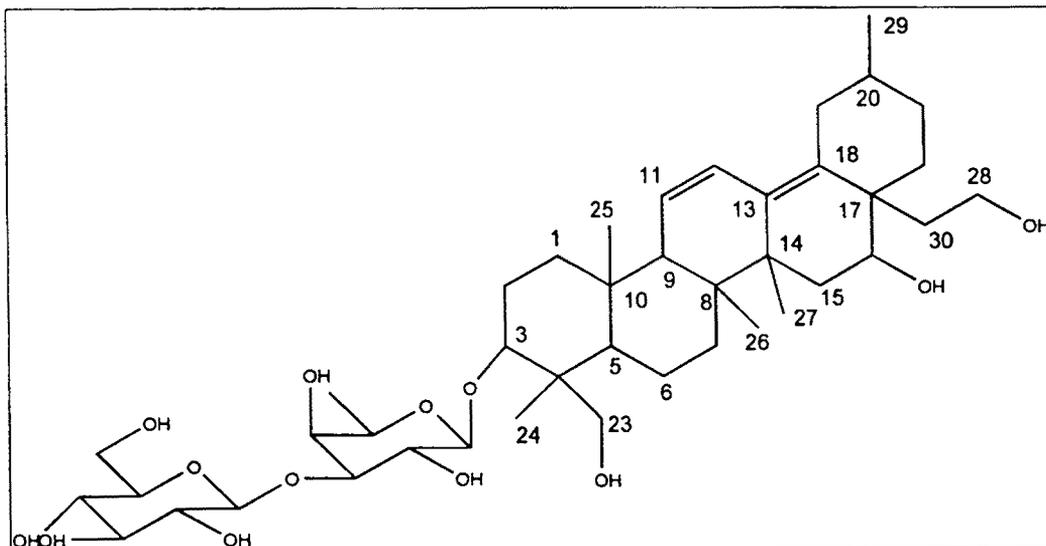
표. 시호의 water층을 분획한 butanol층 분획물에서의 독성현상

시험물질		투여용량	독성증상 및 발현빈도 (괄호속은 빈도임)
유래	분획		
Water	butanol 분획	110 mg/kg, iv	convulsion/death (4/5)
Butanol	B1-2	69 mg/kg, iv	convulsion/death (5/5)
	B2	17 mg/kg, iv	death (4/5)
	B3	17 mg/kg, iv	convulsion/deep breath/death (1/5)
		147 mg/kg, iv	convulsion/death (4/5)
	B4	20 mg/kg, iv	hematuria (2/5) lethargy (1/5)

다. 시호로부터 분리된 단일 물질 M533의 구조 분석 결과

M533의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 이 물질이 double bonds 2개와 당을 포함하고 있으며, methyl과 methylene groups을 갖고 있음을 알려주었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum은 M533이 42개의 탄소로 구성되어있음을 보여주었다. DEPT 45, 90, 135 실험으로부터 methyl groups이 6개, methylene groups이 12개, methine groups이 17개, quaternary groups이 7개임이 밝혀졌다. Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC)에 의한 proton의 assignments와 DEPT에 의한 multiplicities는 아래 표와 같다.

또한 M533에 포함된 당은 두가지로 판단되고 이들에 해당되는 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 peaks은 17.4, 71.7, 71.9, 72.9, 85.7, 106.1 ppm과 62.9, 72.4, 75.9, 78.2, 78.4, 106.2 ppm으로 assign되었는데, 전자는 β -D-Fucopyranose와 잘 일치하고 후자는 β -D-Glucopyranose와 잘 일치한다. 그리고 β -D-Fucopyranose의 1번 탄소가 아래 그림에서 보여주는 C3에 연결되어 있음이 HOHAHA 및 HMBC에 의해서 확인 되었고 β -D-Glucopyranose는 β -D-Fucopyranose의 3번 위치와 연결되어 있음이 확인되었다. M533의 부분 구조들은 Correlated Spectroscopy (COSY), Homonuclear Hartman Hann



(HOHAHA)와 Heteronuclear Multiple Bonded Connectivity (HMBC)에 의해서 결정하였다. M533의 구조는 위 그림과 같다.

M533은 $C_{42}H_{68}O_{13}$ 의 molecular formula를 가지고 780.98의 분자량을 갖는다. 이의 IUPAC name은 2-[(3,5-dihydroxy-2-[[8-hydroxy-8a-(2-hydroxyethyl)-4-(hydroxymethyl)-4,6,6b,11,14b-pentamethyl-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,14a,14b-octadecahydro-3-picenyl]oxy]-6-methyltetrahydro-2H-pyran-4-yl)oxy]-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol 이다. M533의 위와 같은 구조는 Chapman & Hall에서 발행한 The Dictionary of Natural Products의 1998년 CD-Rom에 현재까지 수록되어 있지 않고 이의 Chemical Abstracts에 의한 검색에서도 나타나지 않는 점으로 보아 현재까지는 신물질로 판단된다.

M533의 구조 분석을 위해 실험한 NMR spectra는 첨부한 $^1\text{H-NMR}$ (spectrum 1-1), $^{13}\text{C-NMR}$ (spectrum 1-2), DEPT 90 (spectrum 1-3), DEPT 135 (spectrum 1-4), COSY (spectrum 1-5), HOHAHA (spectrum 1-6), HMQC (spectrum 1-7), HMBC (spectrum 1-8)과 같다.

라. 시호로부터 분리한 단일물질의 항알러지 물질로서의 개발 가능성

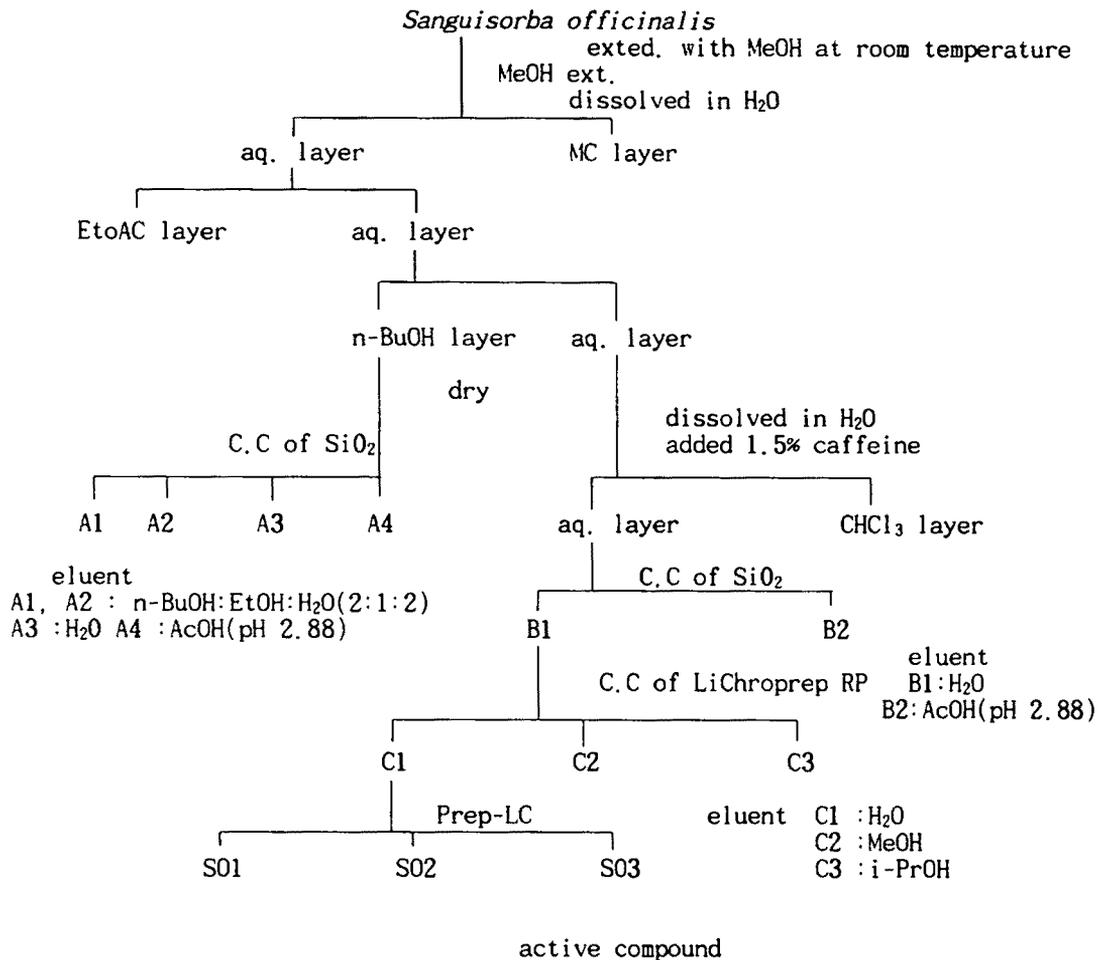
M533의 PCA 시험 결과 9 mg/Kg, iv 로서 약 10 $\mu\text{mole/kg}$ 에서 activity를 갖는 것으로 판단되는데 이러한 약효는 본 연구에서 비교약물로 사용한 Ketotifen의 10 μM 로 얻을 수 있는 약효에 필적한다고 보인다. 게다가 현재까지의 독성 실험 결과로는 특이할 만한 독성이 나타나질 않고 있어서 개발의 여지가 있는 것으로 판단된다. 또한 시호는 1994년까지 일본에 수출하다가 중국산에 밀려서 수출이 줄어들었기 때문에 본 실험 결과로 항알러지 물질의 개발이 이루어진다면 농가에서의 재배가 경제성을 지닐 것으로 판단된다.

no.	δ_c	CH _n DEPT	δ_H of directly attached protons HMQC	¹³ C assignments
1	13.3	q	0.62	24
2	17.4	q	1.20	F6'
3	18.1	q	1.18	25
4	19.4	t	0.65	6
5	19.6	q	0.87	26
6	22.6	q	1.17	27
7	25.0	t		30
8	25.8	q	0.77	29
9	26.7	t		2
10	32.5	t	1.16	7
11	33.3	d	1.34	20
12	33.4	t	0.89	21
13	33.6	t	1.25	19
14	36.3	t	1.51	15
15	37.8	s	0.77	10
16	39.5	t	1.61	1
17	39.9	t	2.40	22
18	42.4	s		8
19	42.9	s		4
20	44.5	s		14
21	45.9	s		17
22	48.7	d	1.19	5
23	55.3	d	1.96	9
24	62.9	t	3.75	G6"
25	65.5	t	3.20	23
26	67.1	t	4.21	28
27	69.5	d	3.96	16
28	71.7	d		F5'
29	71.9	d		F2'
30	72.4	d		G4"
31	72.9	d		F4'
32	75.9	d		G2"
33	78.2	d		G5"
34	78.4	d		G3"
35	83.9	d	3.57	3
36	85.7	d	3.53	F3'
37	106.1	d	4.30	F1'
38	106.2	d	4.45	G1"
39	127.2	d	6.35	12
40	127.5	d	5.50	11
41	133.2	s		13
42	137.7	s		18

2. 지유 water 분획

지유는 오이풀의 뿌리를 일컫는 약명으로 학명은 *Sanguisorba officinalis*이다. 오이풀은 우리나라 전도각지의 산야지 초원이나 산기슭에서 자생하는 다년생 초본이다. 높이는 30 -150 cm이고 근경이 옆으로 갈라져 있으며 방추형으로 굽어지고 원줄기는 곧게 자라며 윗부분에서 갈라지고 전체에 털이 없다. 잎은 옆병이 길며 긴 타원형, 난형이고 길이 2.5 - 5 cm, 너비 1 - 2.5 cm로서 세모진 톱니가 있다. 7 - 9월에 꽃이 피고 꽃은 검은홍자색이며 수상화서는 긴대가 있으며 10월에 열매가 성숙되며 수과는 사각형으로 꽃받침으로 싸여있다. 식용, 관상용으로도 쓰이며 뿌리는 한방과 민간에서 지혈, 도혈로 사용된다.

가. 지유로부터 활성 물질(S03)의 분리 및 정제



Prep-LC eluent H₂O : CH₃CN(9.5 : 1)
 column vydac protein & peptide C18
 flow rate 0.5mL/min until 30min
 0.5mL/min - 5.0mL/min (30min - 40min)
 5.0mL/min until 60min

나. 지유 분획 시료의 약효 시험

1) 1차 PCA screening 결과

시험물질			투여량	시험수	반응 (대조군에 대한 %)	판정(무효 또는 재시험요)
일련번호	명칭	분획				
95092	지유	W	260 mg/kg	4	22, 111, 59, 48	재시험요
		E	360 mg/kg	4	139, 148, 88, 79	무효
		C	45 mg/kg, iv	2	113, 104	무효

2) 지유 water 층의 PCA약효 (확인시험)

분획	투여량	시험수	결과	판정
Control	0.5 ml/rat	5	10.4 ± 2.2 mm (100%)	시료 용매 대조군
W	415 mg/kg, ip	6	79, 0, 109, 0, 0, 39 (%)	유효

3) 지유 water 분획의 butanol로의 재분획 물질의 PCA약효

분획	투여량	시험수	결과(대조군의 %)	판정
Butanol (재시험)	535 mg/kg, ip	5	88, 85, 74, 74, 77	유효
water층(tannin 제거 후)	57 mg/kg, ip (CHCl ₃ 층)	4	87, 90, 104, 104	무효
	105 mg/kg, ip (aq. 층)	5	64, 103, 67, 81, 78	유효
water 층-AA(tannin 제거 후)	108 mg/kg, ip	5	101, 87, 90, 111, 108	무효

4) 지유 butanol층의 재분획에 대한 약효

분획	투여량	시험수	결과(대조군의 %)	판정
A1	105 mg/kg, ip	3	108, 105, 102	무효
A2	100 mg/kg, ip	2	99, 88	무효
B1	195 mg/kg, ip	4	81, 78, 78, 48	유효
B2	526 mg/kg, ip	5	99, 0, 15, 18 (1마리 사망: 투여 오류로 추정)	유효
A3	450 mg/kg, ip	4	118, 99, 18, 20	유효

5) 지유 분획물의 약효

분획	투여량	시험수	결과(대조군의 %)	판정
C1	180 mg/kg, iv	5	71, 80, 65, 69, 66	유효
C2	110 mg/kg, iv	5	93, 92, 71, 95, 77	무효
C3	780 mg/kg, ip	5	125, 107, 129, 125, 111	무효
S0-1	3 mg/kg, iv	4	99, 112, 112, 104	무효
S0-2	22 mg/kg, iv	4	99, 99, 104, 99	무효
S0-3	11 mg/kg, iv	4	74, 65, 47, 57	유효

6) 지유 water 분획의 ASA에서의 추출물의 약효

시험물질	투여량(ip)	반응의 종류 및 등급 (괄호안은 빈도)		
		호흡장애	배뇨·배변	사망
Saline	0.1 ml/mouse	++~++++ (6/10)	+++~++++ (9/10)	9/10
DMSO	0.1 ml/mouse	+~++++ (4/8)	+++~++++ (8/8)	7/8
지유 W분획	480 mg/kg	++~+++ (5/10)	+~+++ (7/10)	5/10 (유효)

7) 지유 water 분획의 Guinea pig 기관지천식 model에서의 약효

투여물질		최대 기관지 수축정도 (overflow of air in ml)	동물수	판정
물질	용량(ip)			
saline	0.5 ml/guinea pig	19.3±4.2	4	대조군
DMSO	0.5 ml/guinea pig	17.8±3.4	5	대조군
지유 W	560 mg/kg, ip	11.2±5.7	6	유효

8) Arthus 반응 및 delayed-type hypersensitivity(DTH) model에서의 지유 butanol분획의 약효

지금까지 대부분의 약효측정은 Type I allergy인 anaphylaxis반응에 대한 시험물질의 약효를 주로 측정하였으나 다른 type의 allergy에도 효과가 있는지를 검토할 필요가 있다. Type III allergy에 대한 효과는 Arthus반응으로 Type IV에 대한 효과를 DTH에 미치는 효과를 각각 측정하였다. 그 결과 두 종의 model에서 모두 약효가 발견되지 않았다.

시험	시험수	반응(μm 증가)	
		대조군	Butanol 분획 50 mg/kg, ip
Arthus 반응	10	422±36	446±41
DTH 반응	10	2560±340	2150±280

9) 지유 water 분획의 독성 실험

가) 추출물의 1차 screening에서 발견된 독성현상

시험물질		투여용량	독성증상 및 발현빈도 (괄호속은 빈도임)
명칭	분획		
지유	C	45 mg/kg, iv	lethargy/death (1/3)

나) 지유의 water 및 butanol 분획물에서의 독성현상

시험물질		투여용량	독성증상 및 발현빈도 (괄호속은 빈도임)
유래	분획		
Water 분획	butanol 분획	535 mg/kg, ip	depression (1/5)
Butanol 분획	Butyl A-1	525 mg/kg, ip	death (1/5) * 약물 투여상의 실수에 의한 사망으로 추정됨

지유의 water 분획과 butanol 분획의 투여에 의해서는 일부의 동물에서 부작용이 발견되었으나 그 발생비율이 낮고 동물개인차나 실험상의 오류일 가능성이 부분적으로 있는 것으로 생각된다.

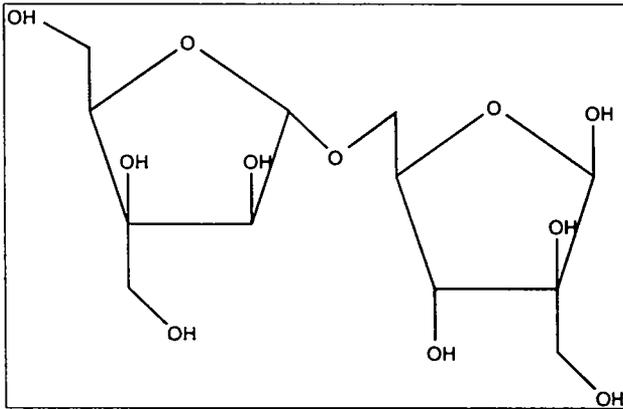
다. 지유로부터 분리된 단일 물질(S03)의 구조 분석 결과

지유로부터 분리된 약효물질 S03은 FAB/MS에 의한 질량 분석 시험 (spectrum 2-1)에서 360.3의 분자량을 보였다. 또한 ¹H-NMR spectrum (spectrum 2-2)에서 보듯이 당으로만 이루어진 화합물이라는 결과를 얻었다. ¹³C-NMR spectrum (spectrum 2-3)에서 24개의 peaks이 관찰되었는데 그 중 12개의 peaks은 다른 12개의 peaks과 intensity가 현저히 차이가 나는 것으로 미루어 두 가지 종류의 유사한 화합물이 섞인 것을 알 수

있었다. 그러나 MS data에서 오직 360.3의 peak만을 얻었기 때문에 이 들은 같은 질량을 가진 당으로만 이루어진 화합물이라는 결론을 얻었다. 이 들의 intensity는 2 : 1의 비를 보이므로 이러한 비율로 섞여 있다고 판단되었다.

Major에 속하는 화합물의 ^{13}C -NMR data는 60.5(t), 62.2(t), 62.3(t), 62.7(t), 69.6(d), 70.9(d), 77.7(s), 80.7(s), 81.0(d), 81.9(d), 97.1(d), 100.7(d)으로 CH가 6 개, CH_2 가 4 개, C가 2 개 존재하는 것으로 밝혀졌는데(DEPT 실험 spectrum 2-4) 당 중에서 이와 같은 조건을 갖는 6탄당은 프락토스(fructose), 프시코스(psicose), 소르보스(sorbose), 타가토스(tagatose)의 네가지가 알려져 있는데 이들은 모두 이당류를 구성할 때 1번 위치의 양성자가 관측이 안된다. 그러나 본 실험에서 얻은 양성자 핵자기공명 스펙트럼은 5.10 ppm과 5.17 ppm에서 1번 위치의 양성자가 관찰되었으므로 위의 네가지 종류에는 속하지 않음을 알 수 있었고 또한 고성능액체크로마토그래피를 이용한 당분석에서도 이들과 일치하는 머무름시간(retention time)에서는 첨두가 발견되지 않았다. 또한 탄소 핵자기공명 스펙트럼은 S03가 피라노스(pyranose) 형태가 아닌 퓨라노스(furanose) 형태의 당으로 구성되었음을 나타내었다. 탄소 핵자기공명 스펙트럼에서 62.2, 70.9, 77.7, 81.0 및 100.7 ppm의 다섯 첨두들은 기존에 알려진 α -D-릭소스(lyxose)와 일치하였다. 그러나 릭소스의 경우는 3번 탄소의 다중도가 d인데 반해 본 스펙트럼에서 그에 해당하는 77.7 ppm의 탄소는 다중도가 s이기 때문에 3번 위치의 양성자가 탄소를 치환되었다고 판단되었다. 2D-COSY 핵자기공명 스펙트럼 (spectrum 2-5)으로부터 하이드록시메틸기로 치환되었음이 밝혀졌고 이에 해당하는 탄소의 화학적 이동은 62.7 ppm이었다. 따라서 S03을 구성하고 있는 6탄당의 하나는 3-C-하이드록시메틸릭소스의 퓨라노스형태로 판명되었다. 나머지 여섯 개의 탄소 첨두들 중 60.5 ppm을 제외한 다섯 개는 β -D-아라비노스와 잘 일치하고 2D-COSY 핵자기공명 스펙트럼의 해석으로부터 2번 위치의 양성자가 하이드록시메틸기로 치환되었음이 밝혀졌다. 따라서 S03을 구성하는 다른 한 종류의 당은 2-C-하이드록시메틸아라비노스의 퓨라노스형태로 결정되었다. 3-C-하이드록시메틸릭소스의 1번 위치의 하이드록시기와 2-C-하이드록시메틸아라비노스의 5번 위치의 하이드록시기가 결합하면서 물이 빠져

나온 상태로 이들 두 가지 당은 결합되어 있음이 화학적 이동에 따라 결정되었다. 이 결과는 질량분석 실험과도 잘 일치한다. 즉, S03은 3-C-하이드록시메틸릭소의 퓨라노스형태의 1번과 2-C-하이드록시메틸아라비노스의 퓨라노스형태의 5번이 산소로 연결된 이당류로서 한분자의 물을 함께 포함하고 있는 화합물인데 이름은 5-O- α -D-(3-C-Hydroxymethyl)lyxofuranosyl- β -D-(2-C-hydroxymethyl) arabinofuranose이고, 그 구조는 아래 그림과 같다.



S03의 신규성 여부를 확인하기 위하여 STN에서 제공하는 Chemical Abstracts를 search한 결과, 이러한 구조를 가진 물질이 현재까지는 없는 것으로 밝혀져서 신물질로 확인되었다.

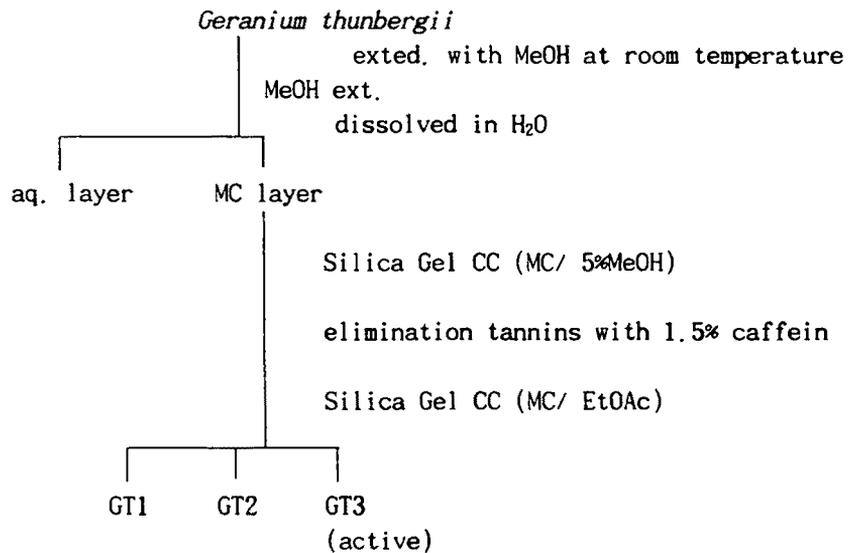
라. 지유로부터 분리한 단일물질의 항알러지 물질로서의 개발 가능성

위의 표에서 보듯이 S03의 약효는 10 $\mu\text{mole/kg}$ 이상에서 나타나는 것으로 보이므로 비교물질인 Ketotifen보다 조금 뒤떨어지나 독성이 없는 물질이므로 알러지 치료제의 개발 가능성이 대단히 높은 화합물이다. 또한 신물질이므로 물질특허를 출원하였다. S03은 지유로부터 추출하여 얻을 수 있으므로 농가에서 지유를 인공적으로 재배한다면 항알러지 치료물질로서 크게 유용한 경제작물이 될 것으로 판단된다.

3. 현초 methylene chloride 분획

이질풀 *Geranium thunbergii* Siebold et Zuccarini 및 동속 근연 식물 (쥐손이풀과 Geraniaceae) 의 꽃이 필 때의 지상부이다. 우리 나라에 자생하는 동속 근연 식물은 13종 6변종으로 약 19종 정도가 보고되었으며, 동일한 용도로 응용된다. 산지는 한국, 중국, 일본이다. 줄기와 이에 마주난 잎으로 되고 줄기는 가늘고 길며 녹색을 띠고 잎과 줄기에 연한 털이 있다. 잎은 긴 잎자루가 있고 회황록색~회갈색을 나타내며 손바닥 모양으로 3~5갈래로 되고, 길이 2~4cm, 열편은 긴 타원형 또는 도란형이며 둔한 거치가 있다. 냄새는 거의 없고 맛은 떫다.

가. 현초로부터 활성 물질의 분리 및 정제



나. 현초 분획 시료의 약효 시험

현초의 methylene chloride층과 재분획에 의해 얻어진 물질들의 약효를 rat PCA로 측정한 결과를 아래의 표에 보여주고 있다.

분획		투여량	시험수	결과(대조군의 %)	판정
methylene chloride 분획		90 mg/kg, ip (재시험)	5	24, 55, 35, 76, 43	유효
2차분획	GT1	20 mg/kg, iv	5	77, 140, 122, 90, 87	무효
	GT2	15 mg/kg, iv	5	106, 120, 111, 89, 92	무효
	GT3	15 mg/kg, iv	5	66, 71, 43, 22, 54	유효

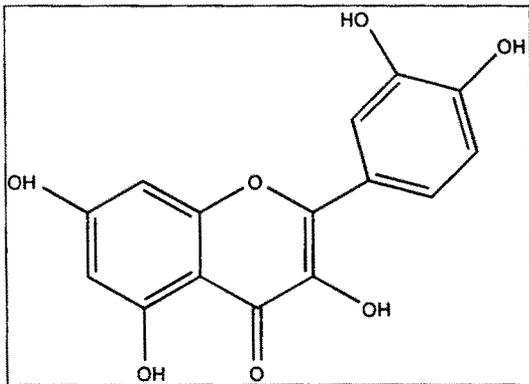
한편 이 실험과정에서 현초의 추출물이나 분리물질에서 독성으로 인정되는 현상은 발견되지 않았다.

다. 현초로부터 분리된 단일 물질(GT3)의 구조 분석 결과

GT3의 ^{13}C -NMR spectrum (spectrum 3-1)은 15개의 peaks을 보여주는데 모든 peaks이 90 - 180 ppm 사이에 위치하는 사실과, ^1H -NMR spectrum (spectrum 3-2)에서 6 - 8 ppm 사이에 모든 peaks이 위치한다는 사실들로부터 GT3이 flavonoid 유도체의 하나라고 판단하였다. Proton의 개수가 5개 밖에 안되고 176.7 ppm에 위치한 ^{13}C peak의 존재로부터 flavone의 일종으로 판단하였다. COSY (spectrum 3-3), HMQC (spectrum 3-4), DEPT (spectrum 3-5) 실험 결과는 아래 표와 같다.

no.	δ_c	CH_n DEPT	δ_H of directly attached protons HMQC	^{13}C assignments
1	94.2	d	6.5	8
2	99.1	d	6.3	6
3	103.9	s		10
4	115.9	d	7.8	2'
5	116.5	d	6.9	5'
6	120.9	d	7.6	6'
7	122.9	s		1'
8	136.6	s		3
9	145.9	s		3'
10	147.6	s		2
11	148.5	s		4'
12	157.0	s		9
13	161.6	s		5
14	164.7	s		7
15	176.7	s		4

Chapman & Hall database에 근거하여 GT3은 quercetin으로 밝혀졌고 그의 구조는 아래 그림과 같다.



이 물질에 대한 references는 아래와 같다.

- Schindler, O, *Helv. Chim. Acta*,1945, 28, 1157
- Briggs, LH et al.,*J.C.S.*,1949, 2162
- El Khadem, H et al.,*J.C.S.*,1958, 3320
- Popa, G et al.,*Fresenius' Z. Anal. Chem.*,1959, 165, 16
- Rahman, W et al.,*J.O.C.*,1962, 27, 153
- Jurd, L, *J.O.C.*,1962, 27, 1294
- Hamaguchi, H et al.,*Anal. Chim. Acta*,1963, 28, 61
- Wagner, J, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*,1964, 335, 232
- Chopin, J et al.,*C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. C*,1966, 236, 729
- Horhammer, L et al.,*Tet. Lett.*,1966, 2, 567
- Dominguez, XA et al.,*Planta Med.*,1968, 16, 182
- Williams, CA et al.,*Phytochemistry*,1971, 10, 1059
- Gaind, KN et al.,*Planta Med.*,1971, 20, 368
- Fraser, AW et al.,*Phytochemistry*,1973, 12, 1787
- Harborne, JB et al.,*Phytochemistry*,1975, 14, 1331
- Cabrera, JL et al.,*J. Nat. Prod.*,1976, 39, 253
- El Ansari, MA et al.,*Phytochemistry*,1976, 15, 231
- Wagner, H et al.,*Tet. Lett.*,1976, 1799
- Wenkert, E et al.,*Phytochemistry*,1977, 16, 1811
- Liu, Y-L et al.,*CA*,1978, 88, 85995
- Dubey, P et al.,*Phytochemistry*,1978, 17, 2138
- Malan, E et al.,*J.C.S. Perkin 1*,1979, 2696
- Mears, JA, *J. Nat. Prod.*,1980, 43, 708

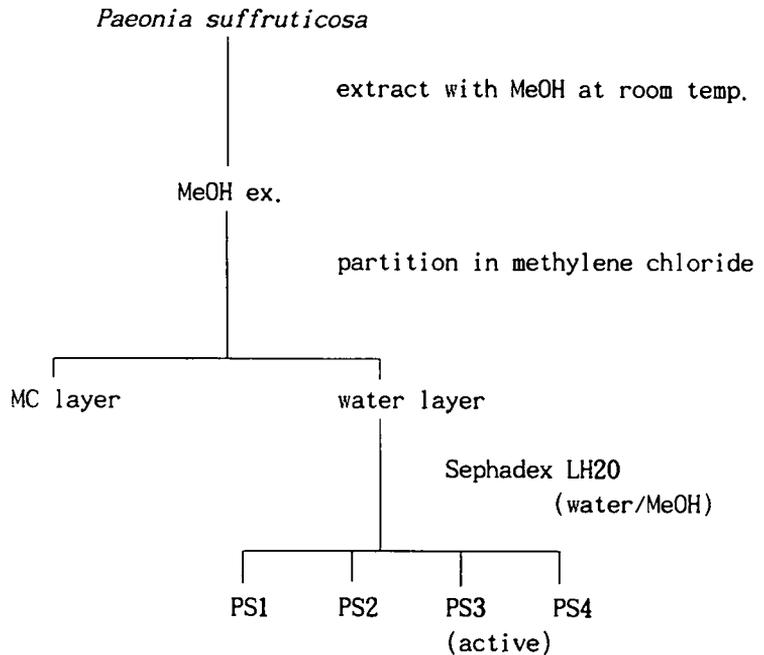
라. 현초로부터 분리한 단일물질의 항알러지 물질로서의 개발 가능성

이미 알려진 물질일 뿐만 아니라 약효가 뛰어난 것도 아니어서 개발할 필요성을 찾을 수 없었다.

4. 목단피 water 분획

모란 *Paeonia suffruticosa* Andrews (= *Paeonia moutan* Sims) (모란과 Paeoniaceae)의 뿌리껍질이다. 중국이 원산지로서 한국, 중국, 일본에서 재배된다. 반관상의 껍질 조각으로서 길이 5.0 - 8.0cm, 지름 1.0 - 1.5cm, 두께 0.2 - 0.6cm이다. 바깥면은 어두운 갈색 - 자색을 띤 갈색이며 가로로 길고 작은 타원형의 갈뿌리 자국과 세로 주름이 있다. 안쪽면은 짙은 회갈색 - 어두운 자색을 나타내고 편평하게 꺾인 면은 거칠다. 안쪽면 및 꺾인 면에 백색의 결정(paeonol)이 붙어 있고 신선한 향기(paeonol 냄새)가 강하게 나는 것일수록 신품이다. 이에 반하여 전체가 가늘고 목심이 붙어 있는 것은 불량품이다. 맛은 약간 쓰고 맵다.

가. 목단피로부터 활성 물질의 분리 및 정제



나. 목단피 분획 시료의 약효 시험

1차시험에서 나타난 목단피 water분획의 약효는 PCA 재시험에서도 관찰되었으며 분획물들의 약효는 아래와 같다.

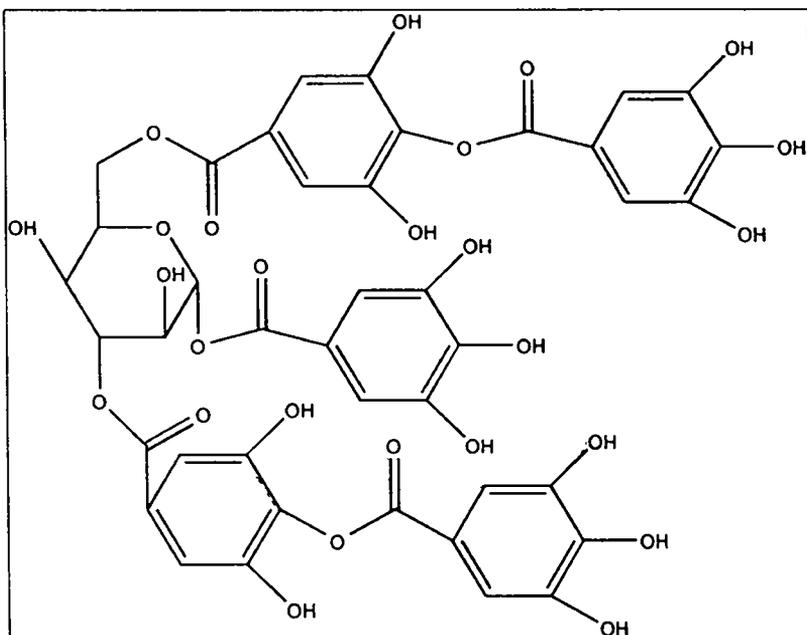
분획		투여량	시험수	결과(대조군의 %)	판정
Water 분획		150 mg/kg, ip (재시험)	5	11, 21, 8, 30, 14	유효
1차분획	PS1	20 mg/kg, iv	5	122, 88, 105, 140, 93	무효
	PS2	15 mg/kg, iv	5	67, 80, 85, 79, 102	미약
	PS3	15 mg/kg, iv	5	56, 31, 11, 63, 24	유효
	PS4	15 mg/kg, iv	5	55, 120, 91, 120, 92	무효

한편 목단피 분획물들은 대부분 동물의 행동에 현저한 이상현상을 유발하지는 않았다. 그러나 약효가 있는 PS3 투여군의 동물들은 혈뇨를 배설하는 현상이 3마리의 동물에서 관찰되었다.

다. 목단피로부터 분리된 단일 물질(PS3)의 구조 분석 결과

PS3의 ^{13}C -NMR spectrum (spectrum 4-1)은 모두 31개의 peaks을 보여 주었고 그 중 10개의 peaks은 double intensity를 보였기 때문에 41개의 탄소가 존재하는 것으로 판단되었다. 또한 62.6, 69.1, 72.0, 73.7, 74.2, 93.8 ppm의 6개의 peaks은 α -D-glucopyranose의 존재를 나타내 주었다. 그러나 원래의 α -D-glucopyranose의 peaks과는 chemical shifts가 일부 바뀐 것으로부터 hydroxyl group이 다른 화합물과 연결되어 있다고 판단되었다. 그런데 110.6 - 110.9 사이의 5개, 119.3 - 120.9 사이의 5개, 141.4 - 147.8 사이의 10개, 165.8 - 167.1 사이의 5개 peaks이 각각 존재하는 사실로부터 galic acid 들이 연결되었음을 알 수 있었다. FAB/MS spectrum은 PS3의 분자량이 940.2라고 지정해 주었다. ^{13}C -NMR data는 아래 표와 같다. Chapman &

Hall database에 근거하여 PS3은 pentagalloylglucopyranose로 밝혀졌고 그의 구조는 아래 그림과 같다. 구조분석을 위한 NMR data는 $^1\text{H-NMR}$ (spectrum 4-2), FAB-/MS (spectrum 4-3), HETCOR (spectrum 4-4), HMBC (spectrum 4-5), DEPT 135 (spectrum 4-6) 과 같다.



이 물질에 대한 references는 아래와 같다.

Haddock, EA et al., J.C.S. Perkin 1, 1982, 2515
 Nishizawa, M et al., J.C.S. Perkin 1, 1982, 2963; , 1983, 961
 Nishizawa, M et al., Chem. Pharm. Bull., 1983, 31, 2593
 Nishizawa, M et al., Phytochemistry, 1985, 24, 2411
 Nonaka, G et al., Chem. Pharm. Bull., 1987, 35, 3127

no.	δ_c	CH _n DEPT
1	62.6	t
2	69.1	d
3	72.0	d
4	73.7	d
5	74.2	d
6	93.8	d
7	110.6	d
8	110.7	d
9	110.73	d
10	110.9	d
11	110.9	d
12	119.3	s
13	120.0	s
14	120.1	s
15	120.2	s
16	120.9	s
17	141.4	s
18	141.6	s
19	141.8	s
20	141.9	s
21	142.3	s
22	147.6	s
23	147.7	s
24	147.74	s
25	147.78	s
26	147.8	s
27	165.8	s
28	166.3	s
29	166.6	s
30	166.9	s
31	167.1	s

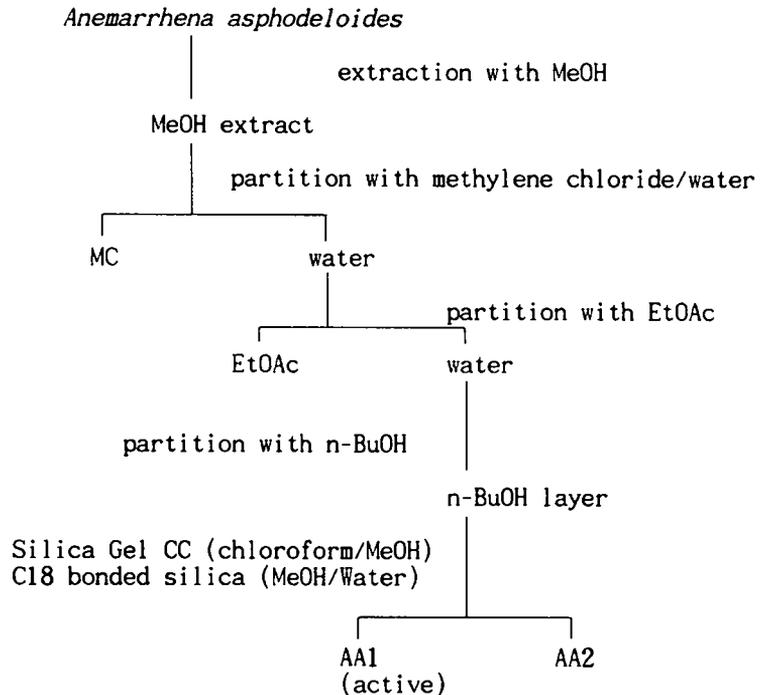
라. 목단피로부터 분리한 단일물질의 향알러지 물질로서의 개발 가능성

약효는 좋으나 이미 알려진 물질이고 독성이 본 실험에서 이미 나타났으므로 개발할 필요성을 찾을 수 없었다.

5. 지모 water 분획

지모 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge(나리과 Liliaceae)의 뿌리줄기이다. 산지는 중국(동북부, 화북에 자생 또는 재배), 한국(각지 재배), 일본(중국, 한국에서 수입, 소량 재배)이다. 조금 납작하고 굵은 노끈모양으로 길이 5~15cm, 지름 0.5~1.5cm이다. 약간 구부러져 있고 때로는 갈라져 있다. 바깥면은 황갈색~갈색, 윗면에는 한 줄의 세로로 된 홈과 잎집의 자국이 돌림마디가 되어 있고, 아래면에는 많은 뿌리자국이 둥근 점모양의 움푹 패인 자리로 되어 있다. 질은 가볍고 꺾여지기 쉽다. 횡단면은 옅은 황갈색이고 현미경으로 보면 피층은 아주 얇고, 넓은 중심주에는 많은 유관속이 불규칙하게 흩어져 있고, 점액세포 또는 그것이 모여서 다공성을 나타낸다. 약간 특이한 냄새가 있고 맛은 조금 달고 점액성이며 뒷맛은 쓰다.

가. 지모로부터 활성 물질의 분리 및 정제



나. 지모 분획 시료의 약효 시험

지모의 water분획이 PCA 재시험에서, 또 butanol층으로 분획하여도 계속하여 활성이 유지되었으며 2차분획에서는 AA1의 활성이 우수하였다. 그러나 AA1을 투여한 동물들은 투여 15분정도에 혈뇨, 30분 정도에는 설사를 유발하였으며 모든 동물의 활동성이 현저히 감소하여 상당한 독성이 있는 것으로 판단된다.

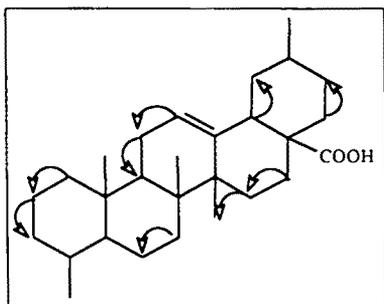
분획		투여량	시험수	결과(대조군의 %)	판정
Water 분획		150 mg/kg, ip (재시험)	5	43, 25, 38, 51, 56	유효
2차분획	Butanol층	80 mg/kg, ip	6	23, 12, 63, 44, 38, 29	유효
3차분획	AA1	20 mg/kg, iv	5	12, 23, 23, 41, 44	유효
	AA2	20 mg/kg, iv	4	32, 128, 117, 99	무효

다. 지모로부터 분리된 단일 물질(AA1)의 구조 분석 결과

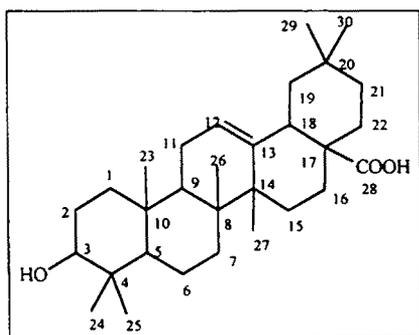
AA1의 ¹³C-NMR spectrum (spectrum 5-1)은 30개의 peaks을 보여 주는데 20 ppm에서 50 ppm 사이의 peaks이 주로인 점으로부터 saponin의 일종으로 추정되었다. 그러나 분리할 때는 water layer를 따라 왔으나 AA1이 water에 잘 안녹는 사실로부터 당이 분리 도중 사라진 것으로 판단되었다. DEPT 135 (spectrum 5-2), DEPT 45 (spectrum 5-3) 실험 결과 methyl group이 7개, methylene group이 10개, methine group이 5개, quaternary carbon이 8개임이 밝혀졌다. HMQC (spectrum 5-4) 에 의한 carbon-proton correlation과 carbon multiplicities는 아래 표와 같다.

no.	δ_c	CH _n DEPT	δ_H of directly attached protons HMQC	¹³ C assignments
1	15.4	q	0.9	23
2	16.8	q	0.8	26
3	17.5	t	1.2/1.4	6
4	22.6	t	1.8	11
5	22.9	t	1.45	16
6	23.3	q	1.8	24
7	23.3	q	1.8	25
8	25.5	q	1.1	27
9	26.5	t	1.45/1.9	2
10	27.2	t	1.7	15
11	30.3	s		20
12	32.0	t	1.6	7
13	32.1	t	1.5	22
14	32.8	q	1.3	29
15	32.8	q	1.3	30
16	33.3	t	0.8	21
17	36.3	s		10
18	37.9	t	1.5/0.9	1
19	38.8	s		4
20	40.8	d	2.8	18
21	41.3	s		8
22	41.8	s		14
23	45.4	s		17
24	45.6	t	1.6	19
25	47.1	d	1.5	9
26	54.8	d		5
27	70.4	d	3.4	3
28	121.5	d	5.1	12
29	143.8	s		13
30	178.5	s		28

COSY (spectrum 5-5)와 $^1\text{H-NMR}$ (spectrum 5-6)에 의한 AA1의 부분 구조는 아래와 같다.



Chapman & Hall database로부터 AA1은 이미 알려진 화합물로 밝혀졌는데 그의 이름은 2-hydroxy-1, 1, 4a, 8, 8, 12a, 12b-heptamethyl-1, 2, 3, 4, 4a, 4b, 5, 6, 6a, 8, 9, 10, 11, 12a, 12b, 13, 14, 14a-icosahydrobenzo[b]chrysene-10-carboxylic acid이고 AA1의 final 구조는 아래 그림과 같다.



이 물질에 대한 references는 아래와 같다.

Bischoff, B et al., *Helv. Chim. Acta*, 1949, 32, 1911

Huneck, S, *Tetrahedron*, 1963, 19, 479

Kochetkov, NK et al., *Tet. Lett.*, 1965, 2201

Yosioka, I et al., Tet. Lett., 1966, 6303
Renwick, JD et al., J.C.S. (C), 1969, 2544
Hariharan, V et al., Phytochemistry, 1970, 9, 409
Sanada, S et al., Chem. Pharm. Bull., 1974, 22, 421
Tori, K et al., Tet. Lett., 1974, 4227
Lin, TD et al., Chem. Pharm. Bull., 1976, 24, 253
Higuchi, R et al., Chem. Pharm. Bull., 1976, 24, 1021
Aoki, T et al., Phytochemistry, 1976, 15, 781
Aoki, T et al., Phytochemistry, 1978, 17, 771
Takabe, S et al., Carbohydr. Res., 1979, 76, 101
Masood, M et al., Phytochemistry, 1979, 18, 1539
Kizu, H et al., Chem. Pharm. Bull., 1980, 28, 2827
Tiwari, KP et al., Phytochemistry, 1980, 19, 1244
Tripathi, RD et al., Phytochemistry, 1980, 19, 2163
Seshadri, V et al., Indian J. Chem., Sect. B, 1981, 20, 773
Masood, M et al., Phytochemistry, 1981, 20, 1675
Forgacs, P et al., Phytochemistry, 1981, 20, 1689
Singh, J, Phytochemistry, 1982, 21, 1832
Matos, MEO et al., J. Nat. Prod., 1983, 46, 836
Wagner, H et al., Phytochemistry, 1984, 23, 2505
Nie, R et al., Planta Med., 1984, 50, 322
Mizutani, K et al., Planta Med., 1984, 50, 327
Tanaka, O et al., Chem. Pharm. Bull., 1985, 33, 2323
Akai, E et al., Chem. Pharm. Bull., 1985, 33, 3715
Adesina, SK et al., Phytochemistry, 1985, 24, 3003
Nakayama, K et al., Chem. Pharm. Bull., 1986, 34, 2209
Saluja, AK et al., Planta Med., 1986, 72

Dubois, MA et al., *Planta Med.*, 1986, 80

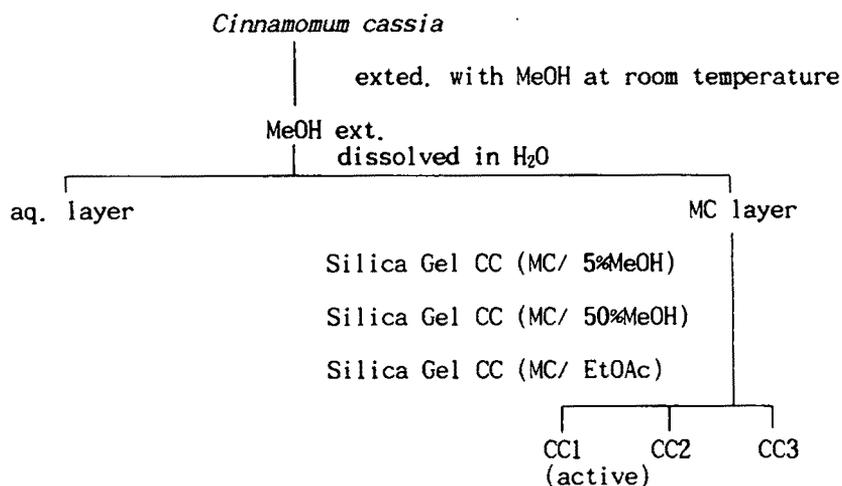
라. 지모로부터 분리한 단일물질의 항알러지 물질로서의 개발 가능성

이미 알려진 물질일 뿐만 아니라 본 실험에서 이미 독성이 관찰되어 개발할 가치가 없다고 판단된다.

6. 육계 methylene chloride 분획

계피나무 *Cinnamomum cassia* Blume 또는 그 밖의 동속 근연 식물(녹나무과 Lauraceae)의 수피를 그대로 또는 주피를 다소 제거한 것이다. 산지는 중국 남부, 베트남이다. 보통 반관상 또는 한쪽으로 말려 들어간 관상의 껍질 조각으로서 길이 5 - 50cm, 지름 1.5 - 5cm, 두께 0.1 - 0.5cm이다. 바깥면은 어두운 적갈색을, 안쪽면은 적갈색을 띠며 평활하다. 꺾어지기 쉬우며 꺾인 면은 적갈색이고 엷은 적갈색을 띤 얇은 층이 있으며 약간 섬유성이다. 특이한 냄새가 있고 맛은 맵고 달며 후에 약간 점액성이고 수렴성이다. 횡단면을 현미경으로 보면 1차 피부와 2차 피부는 거의 연속된 석세포 고리 (석세포환)로 구분되며 고리의 바깥 주위에는 거의 원형으로 모여 있는 섬유속이 있다. 고리를 이루고 있는 석세포의 벽은 U자형으로 비후되어 있는 경우가 많다. 2차 피부에서는 석세포를 볼 수 없고 락탐피움 소수의 후막 섬유를 볼 수 있다. 유조직 중에는 정유 세포, 점액 세포 및 전분립이 들어 있고 수선 중에는 미세한 침정이 들어 있기도 하다.

가. 육계로부터 활성 물질의 분리 및 정제



나. 육계 분획 시료의 약효 시험

PCA를 이용한 재시험에서도 육계의 methylene chloride층은 유효하였으나 그 약효가 강력하지는 못하였다. 한편 재분획을 통해서 얻어진 단일물질들 중 CC1가 주로 약효를 지니고 있었지만 그 정도도 강력하지는 못하였다. CC2의 경우는 매우 미약하지만 약효는 다소 있는 듯 하였다.

투여 후에 부작용으로 생각되는 현상은 관찰되지 않았다.

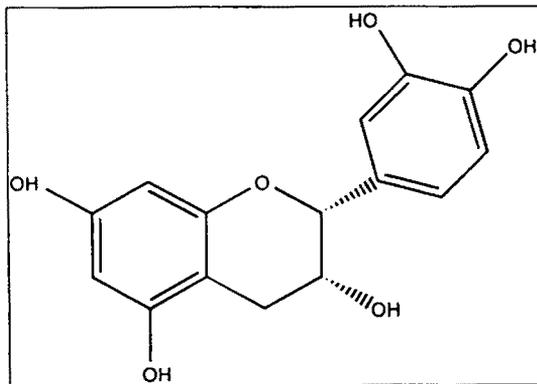
분획	투여량	시험수	결과(대조군의 %)	판정	
CH ₂ Cl ₂ 분획	150 mg/kg, ip (재시험)	5	67, 54, 55, 48, 27	유효	
2차분획	CC1	15 mg/kg, iv	5	74, 45, 65, 69, 52	유효
	CC2	30 mg/kg, iv	5	89, 81, 90, 79, 85	미약 또는 무효
	CC3	30 mg/kg, iv	4	102, 100, 88, 92	무효

다. 육계로부터 분리된 단일 물질(CC1)의 구조 분석 결과

CC1의 ¹³C-NMR spectrum (spectrum 6-1)은 15개의 peaks을 보여주는데 DEPT (spectrum 6-2) 실험으로부터 methylene group이 1개, methine group이 7개, quaternary group이 7개로 밝혀졌다. 또한 ¹H-NMR spectrum (spectrum 6-3)에서 proton의 개수가 9개라는 결과를 얻었다. COSY (spectrum 6-4), HMQC (spectrum 6-5) 실험 결과는 아래 표와 같다.

no.	δ_c	CH _n DEPT	δ_H of directly attached protons HMQC	¹³ C assignments
1	28.6	t	2.4/2.7	4
2	65.3	d	4.0	3
3	78.4	d	4.8	2
4	94.5	d	5.7	8
5	95.4	d	5.8	6
6	98.9	s		10
7	115.1	d	6.6	2'
8	115.2	d	6.9	8'
9	118.4	d	6.5	6'
10	131.0	s		1'
11	144.7	s		3'
12	144.8	s		4'
13	156.1	s		9
14	156.5	s		7
15	156.9	s		5

Chapman & Hall database에 근거하여 CCl은 epicatechin으로 밝혀졌고 그의 구조는 아래 그림과 같다.



이 물질에 대한 references는 아래와 같다.

- Coxon, DT et al., *Tetrahedron*, 1972, 28, 2819
Doskotch, RW et al., *Phytochemistry*, 1973, 12, 1153
Markham, KR et al., *Tetrahedron*, 1976, 32, 2607
Takani, M et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1977, 25, 3388
Tschesche, R et al., *Phytochemistry*, 1980, 19, 1825
Nonaka, GI et al., *Phytochemistry*, 1982, 21, 429; ,1983, 22, 237, 1659
Miyamura, M et al., *Phytochemistry*, 1983, 22, 215
Tanaka, T et al., *Phytochemistry*, 1983, 22, 2575
Delgado, G et al., *Phytochemistry*, 1984, 23, 675; ,1986, 34, 633, 643
Morimoto, S et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1985, 33, 2281
Foo, LY et al., *Phytochemistry*, 1985, 24, 1495; ,1987, 26, 2825; ,1989, 28, 1237
Hsu, FL et al., *Phytochemistry*, 1985, 24, 2089
Kashiwada, Y et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1986, 34, 3208
Bonefield, M et al., *Phytochemistry*, 1986, 25, 1205
Hashimoto, F et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1987, 35, 611
Ishimaru, K et al., *Phytochemistry*, 1987, 26, 1167
Malan, E et al., *Phytochemistry*, 1987, 26, 2049; ,1990, 29, 1334; ,1991, 30, 2737
Kiehlmann, E et al., *Magn. Reson. Chem.*, 1988, 26, 204
Nakane, H, *Biochemistry*, 1990, 29, 2841
Rossouw, W et al., *Tetrahedron*, 1990, 50, 12477
Cui, CB et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1992, 40, 2035
Lee, MW et al., *Phytochemistry*, 1992, 31, 2117
Shen, C-C et al., *Phytochemistry*, 1993, 34, 843
Bae, YS et al., *Phytochemistry*, 1994, 35, 473

Mukherjee, RK et al., Phytochemistry, 1994, 37, 1641

Pan, H et al., Phytochemistry, 1995, 39, 1423

Pan, H et al., Phytochemistry, 1996, 42, 1185

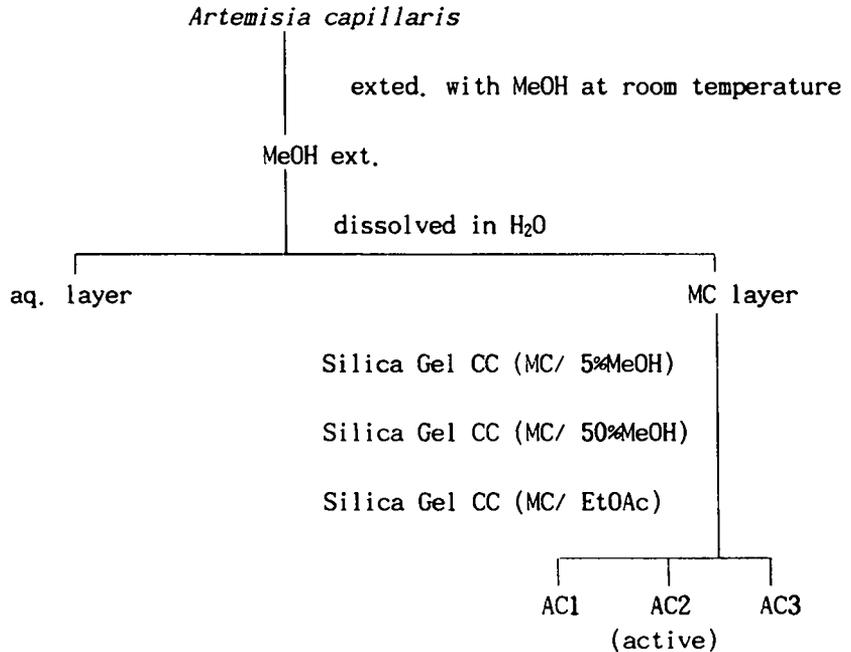
라. 옥계로부터 분리한 단일물질(CC1)의 항알러지 물질로서의 개발 가능성

이미 알려진 물질일 뿐만 아니라 약효가 뛰어난 것도 아니어서 개발할 필요성을 찾을 수 없었다.

7. 인진 methylene chloride 분획

사철쑥 *Artemisia capillaris* Thunberg(국화과 Compositae)의 과수를 단 지상부이다. 산지는 한국, 중국, 일본이다. 구형으로서 지름 약 2mm의 두장화를 주로하고 실모양의 잎과 화서축 및 가는 줄기의 절편으로 되어 있으며, 질은 가볍고 녹색~어두운 갈색이다. 두상화서를 현미경으로 보면 막질의 총포편과 통상화 또는 수과를 볼 수 있다. 특이한 냄새가 있고 맛은 조금 쓰다.

가. 인진으로부터 활성 물질의 분리 및 정제



나. 인진 분획 시료의 약효 시험

1차시험에서 인진의 methylene chloride층이 유효한 것이 확인되었기 때문에 분획물을 대상으로 rat PCA를 이용한 약효시험을 계속하였다. 그 중 단일물질 AC2만이 강력하지는 못하지만 유효하였다. 3종의 단일물질들은 동물의 행동에 뚜렷한 영향을 미치지 않는었다.

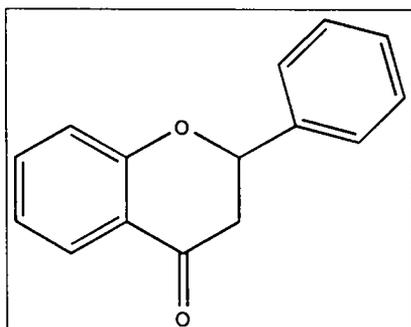
분획		투여량	시험수	결과(대조군의 %)	판정
MC 분획		150 mg/kg, ip (재시험)	4	65, 70, 46, 66	유효
2차분획	AC1	20 mg/kg, iv	4	88, 136, 81, 104	무효
	AC2	20 mg/kg, iv	4	52, 71, 64, 61	유효
	AC3	25 mg/kg, iv	5	152, 70, 121, 102, 96	무효

다. 인진으로부터 분리된 단일 물질의 구조 분석 결과

AC2의 ¹³C-NMR spectrum (spectrum 7-1)은 15개의 peaks을 보여주는데 모든 peaks이 100 - 180 ppm 사이에 위치하는 사실과, ¹H-NMR spectrum (spectrum 7-2)에서 6 - 8 ppm 사이에 모든 peaks이 위치한다는 사실들로부터 AC2가 flavonoid 유도체의 하나라고 판단하였다. 177.4 ppm에 위치한 13C peak의 존재로부터 flavone의 일종으로 판단하였다. 또한 126.6과 129.3 ppm의 double intensity를 갖는 peaks의 존재로부터 AC2가 phenyl ring을 포함하고 있음을 알 수 있었다. COSY (spectrum 7-3), HMQC (spectrum 7-4), DEPT (spectrum 7-5) 실험 결과는 아래 표와 같다.

no.	δ_c	CH _n DEPT	δ_H of directly attached protons HMQC	¹³ C assignments
1	107.2	d	7.1	3
2	118.8	d	7.3	8
3	123.6	s		10
4	125.1	d	8.1	6
5	125.7	d	7.6	5
6	126.6	d	8.15	2', 6'
7	129.3	d	7.6	3', 5'
8	131.4	s		4'
9	132.0	d	7.65	1'
10	134.5	d	7.8	7
11	155.9	s		9
12	162.8	s		2
13	177.4	s		4

Chapman & Hall database에 근거하여 AC2는 flavone으로 밝혀졌고 그의 구조는 아래 그림과 같다.



이 물질에 대한 references는 아래와 같다.

Joseph-Nathan, P et al., J. Magn. Reson., 1974, 16, 447

Wenkert, E et al., *Phytochemistry*, 1977, 16, 1811

Sequin, U, *Helv. Chim. Acta*, 1981, 64, 2654

Pelter, A et al., *J.C.S. Perkin 1*, 1981, 3182

Hirao, I et al., *Synthesis*, 1984, 1076

Baumstark, AL et al., *Tet. Lett.*, 1988, 29, 2143

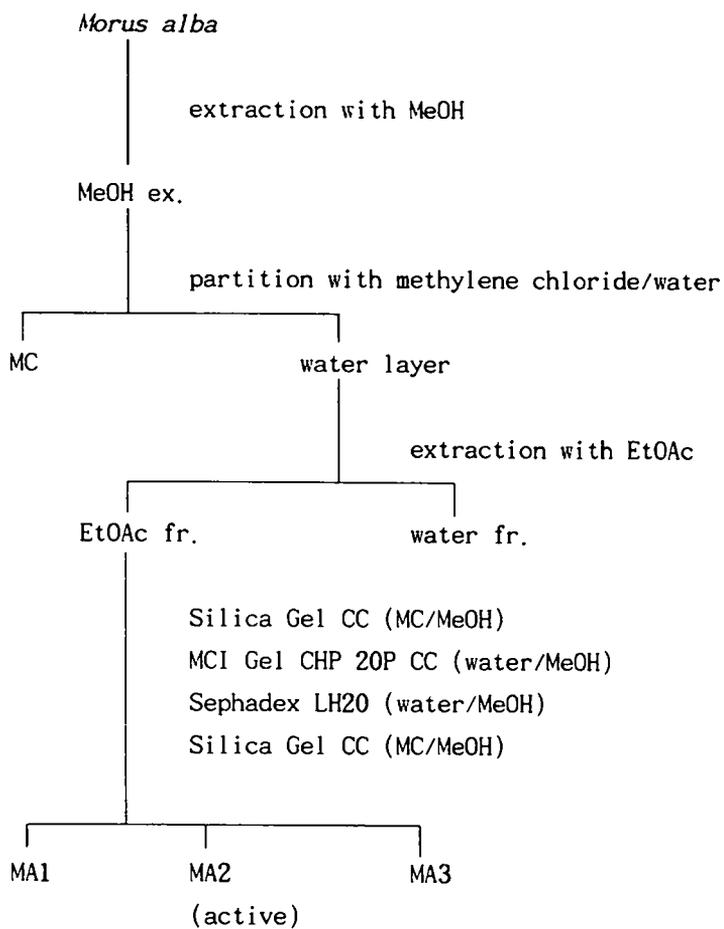
라. 인진으로부터 분리한 단일물질의 항알러지 물질로서의 개발 가능성

이미 알려진 물질일 뿐만 아니라 약효가 뛰어난 것도 아니어서 개발할 필요성을 찾을 수 없었다.

8. 뽕나무 ethyl acetate 분획

산뽕나무 *Morus bombycis* Koidzumi나 뽕나무 *M. alba* Linne 또는 그 밖의 동속 식물(뽕나무과 Moraceae)의 뿌리 껍질이다. 동속 식물에는 *M. alba* Linne 및 *M. multicaulis* Perrottet의 변종 외에 노상나무 *M. lhou* Koidzumi, 몽고 뽕나무 *M. mongolica* Schneid, 참털뽕나무 *M. tiliaefolia* Makino가 한국에서 재배 또는 자생되고 있다. 관상, 반관상 또는 띠모양의 껍질 조각으로서 두께 0.1~0.6cm이다. 가끔 가늘게 세로로 잘려져 있으며 바깥면은 흰색~황갈색을 띤다. 주피가 붙어 있는 것은 그 주피가 황갈색이고 벗겨지기 쉬우며 세로 주름이 많고 가로로 긴 피목을 많이 볼 수 있다. 안쪽면은 어두운 황갈색이고 편평하며 횡단면은 백색~옅은 갈색을 띠고 섬유성이다. 횡단면을 현미경으로 보면 주피가 붙어 있는 것은 바깥쪽에 5~12열로 된 콜크층이 있다. 피부에는 곳곳에 사부 섬유나 섬유속이 있고 사부 유조직과 교대로 배열되어 있다. 유관, 수산칼슘의 단정 및 전분립을 볼 수 있으며 이 중 전분립은 단립 또는 복립이고 지름은 1~7 μ m이다. 약간 특이한 냄새와 맛이 있다.

가. 뽕나무로부터 활성 물질의 분리 및 정제



나. 뽕나무 분획 시료의 약효 시험

뽕나무의 ethyl acetate분획은 40 mg/kg, ip의 용량에서 약효가 상당히 있음이 확인되었으며 분획시료 3종 중 MA2가 가장 가능성이 있는 물질로 인정된다. 한편 MA1은 미약한 약효가 있기는 하였지만 약물투여 후 외부자극에 대한 반응성이 떨어지고 졸리는 듯한 행동을 5마리의 동물 중 3마리에서 보였기 때문에 부작용이 다소 있는 것처럼 보였다. MA2나 MA3는 투여 용량에서 행동학상의 아무런 변화를 유발하지 않았다.

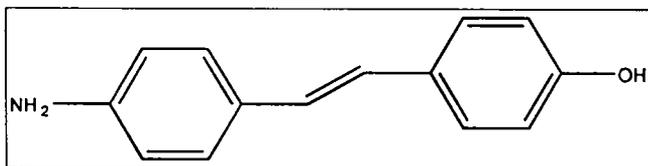
분획	투여량	시험수	결과(대조군의 %)	판정	
EtOAc분획	30 mg/kg, ip (재시험)	5	24, 11, 32, 44, 45	유효	
2차분획	MA1	30 mg/kg, iv	5	68, 87, 84, 95, 97	미약 또는 무효
	MA2	25 mg/kg, iv	5	24, 28, 45, 61, 34	유효
	MA3	25 mg/kg, iv	5	111, 121, 95, 88, 106	무효

다. 뽕나무로부터 분리된 단일 물질(MA2)의 구조 분석 결과

MA2의 ¹H-NMR spectrum (spectrum 8-1)은 이 화합물이 aromatic ring을 포함하고 있음을 알려주었다. 또한 ¹³C-NMR spectrum (spectrum 8-2)에서 관찰된 double intensity를 갖는 peaks의 존재는 para 위치가 치환되어 있음을 보여주었다. HMQC (spectrum 8-3), HMBC (spectrum 8-4) 실험 결과는 아래 표와 같다.

no.	δ_c	CH _n DEPT	δ_H of directly attached protons HMQC	¹³ C assignments
1	116.8	d	6.55/6.57	9, 9'
2	118.3	d	6.74/6.76	2, 2'
3	125.9	d	6.81	6
4	128.2	s		7
5	128.8	d	6.82	5
6	129.9	d	7.3/7.33	3, 3'
7	130.0	d	7.21/7.23	8, 8'
8	131.9	s		4
9	151.0	s		10
10	159.3	s		1

위의 실험들에 근거하여 MA2는 4-hydroxy-4'-aminostilbene으로 밝혀졌고 그의 구조는 아래 그림과 같다.



이 물질에 대한 references는 아래와 같다.

Batchelor, FW et al., Can. J. Chem., 1970, 48, 1554

Ruasse, M-F et al., J.O.C., 1972, 37, 1770

Ziegler, CB et al., J.O.C., 1978, 43, 2941

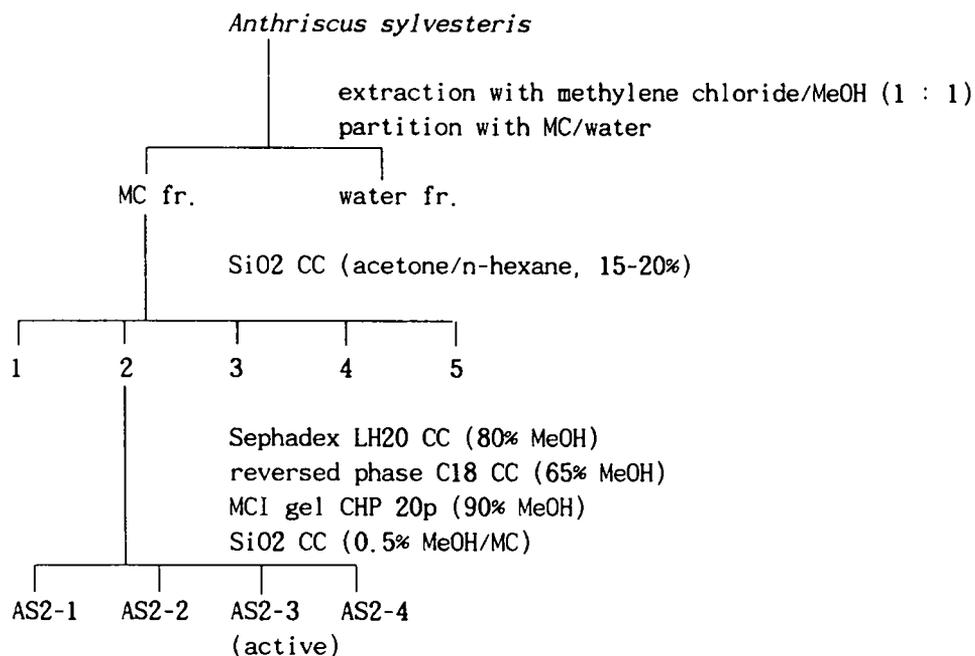
라. 뽕나무로부터 분리한 단일물질의 항알러지 물질로서의 개발 가능성

이 화합물은 이미 알려진 물질이기는 하나 약효가 좋고 유기합성에 의해서 그 유도체로 변형시키기 쉽기 때문에 더 많은 실험을 할 가치가 있다고 판단되었다.

9. 전호 methylene chloride 분획

전호(*Anthriscus sylvestris*)는 산이나 계곡 등에 자생하는 다년생 초본으로 지하부는 근경으로 약간 비대해져 있으며 줄기는 직립하고 분지하며 높이는 1m 내외이다. 근생엽은 3회 우상으로 가늘게 갈라져 있고 잎의 뒷면에는 털이 나 있다. 경엽은 줄기의 상부에 소형으로 붙어있고, 엽병은 줄기를 감싸는 모양을 하고 있다. 꽃은 백색으로 작으며 5-6월에 핀다. 과실은 6-8mm의 피침형으로 익으면 검게 되어 두 개의 분과로 나뉘어 진다. 한국, 일본, 사할린, 캄차카, 시베리아로부터 동유럽까지 광범위하게 분포하고 있다.

가. 전호로부터 활성 물질의 분리 및 정제



나. 전호 분획 시료의 약효 시험

전호로부터 methylene chloride추출물이 PCA시험에서 약효가 있음을 확인하였기 때문에 분획물을 분리하는 작업을 통해 만들어진 시료들을 대상으로 PCA를 이용한 약효추적을 수행하여 아래 표와 같이 가장 활성이 강한 분획 AS2-3을 확인하였다.

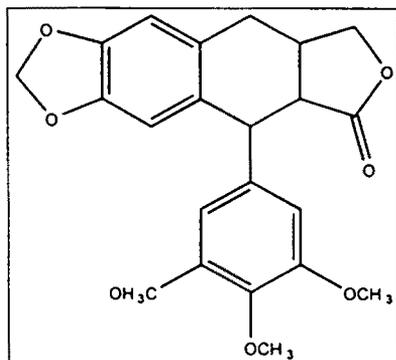
분획	투여량	시험수	결과(대조군의 %)	판정	
CH ₂ Cl ₂ fraction(재시험)	50 mg/kg, ip	5	54, 40, 65, 44, 73	유효	
CH ₂ Cl ₂	fr. 1	15 mg/kg, iv	5	98, 140, 87, 90, 102	무효
	fr. 2	20 mg/kg, iv	4	33, 41, 56, 54	유효
	fr. 3	30 mg/kg, iv	4	87, 64, 75, 87, 90	미약
	fr. 4	45 mg/kg, iv	5	123, 121, 108, 97, 102	무효
	fr. 5	40 mg/kg, iv	5	109, 122, 130, 90	무효
Fr. 2	AS2-1	15 mg/kg, iv	4	68, 81, 74, 60	미약
	AS2-2	15 mg/kg, iv	5	70, 73, 66, 89, 73	미약
	AS2-3	5 mg/kg, iv	5	64, 58, 45, 61, 71	유효
		15 mg/kg, iv	5	45, 28, 35, 42, 44	유효
	AS2-4	10 mg/kg, iv	4	134, 129, 83, 95	무효

다. 전호로부터 분리된 단일 물질 (AS2-3)의 구조 분석 결과

AS2-3의 ¹H-NMR (spectrum 9-1)과 ¹³C-NMR (spectrum 9-2)로부터 aromatic ring의 존재를 확인할 수 있었다. ¹³C-NMR에서 19개의 peaks이 관찰되었는데 double intensity를 갖는 peaks이 세 개 존재하므로 모두 22개의 탄소가 존재한다고 판단되었다. DEPT (spectrum 9-3)에 의한 carbon의 multiplicity는 singlet이 8, doublet이 6, triplet이 3, quartet이 2개였다. HMQC (spectrum 9-4)에 의한 attached protons과 위의 data는 아래 표와 같다.

no.	δ_c	CH _n DEPT	δ_H of directly attached protons HMQC	¹³ C assignments
1	174.5	s		13
2	153.8	s		19/21
3	147.6	s		4
4	147.3	s		5
5	139.1	s		20
6	136.9	s		17
7	131.5	s		7
8	129.1	s		15
9	111.0	d	6.59	6
10	109.8	d	6.7	22/18
11	108.7	d	6.54	14
12	101.3	t	5.44/5.41	2
13	71.5	t	3.75/3.15	16
14	60.5	q	3.89/3.92	27
15	56.3	q	3.50/3.60	25/29
16	47.4	d	2.06/2.07/2.09	9
17	44.3	d	4.53/4.54	8
18	32.9	t	2.00	11
19	32.7	d	2.28/2.30/2.32/2. 34	10

AS2-3의 부분구조들과 Chapman & Hall이 제공한 Dictionary of Natural products에 근거하여 결정한 구조는 아래 그림과 같고 그의 이름은 anthricin으로 알려져 있다



이 물질에 대한 references는 아래와 같다.

- Hartwell, JL et al., J.A.C.S., 1953, 75, 2138; , 1954, 76, 4034
von Wartburg, A et al., Helv. Chim. Acta, 1963, 46, 2127; , 1964, 47, 1203
Akahori, A et al., Chem. Pharm. Bull., 1972, 20, 1150
Gensler, WJ et al., J.O.C., 1972, 37, 1062
Murphy, ST et al., Aust. J. Chem., 1975, 28, 81
Russell, GB, Phytochemistry, 1975, 14, 2708
Yamaguchi, H et al., Chem. Pharm. Bull., 1982, 30, 3212
Pullockaran, AJ et al., J. Nat. Prod., 1989, 52, 1290
Brown, E et al., Tetrahedron, 1989, 45, 141
Morimoto, T et al., Tet. Lett., 1990, 31, 261
Kashima, T et al., Chem. Pharm. Bull., 1991, 39, 192
Feliciano, AS et al., Phytochemistry, 1992, 31, 267
Novelo, M et al., J. Nat. Prod., 1993, 56, 1728
Bogucki, DE et al., J.O.C., 1995, 60, 588

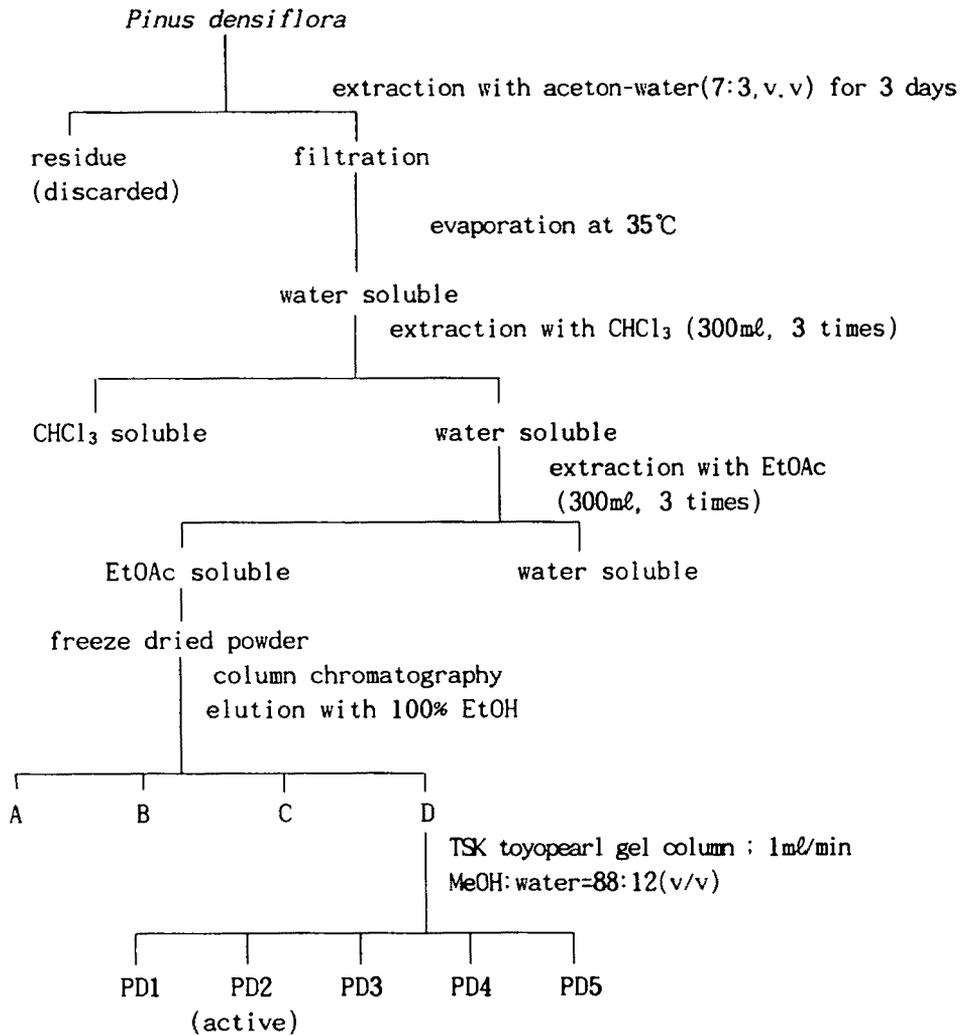
라. 전호로부터 분리한 단일물질의 항알러지 물질로서의 개발 가능성

비록 약효는 좋으나 이미 알려진 물질인데다 구조를 변형하기도 쉽지 않으므로 개발할 가치가 없다고 판단된다.

10. 소나무 ethyl acetate 분획

학명이 *Pinus densiflora*인 소나무는 우리나라, 중국, 일본에서 해발 1300 m 이하의 전지역에 고르게 분포되어 있는 나무이다. 상록교목으로 관목으로 사용한다.

가. 소나무로부터 활성 물질의 분리 및 정제



나. 소나무 분획 시료의 약효 시험

소나무 ethyl acetate 분획의 경우 2차 분획물 B와 C fraction에 약효가 함유되어 있었으며 그 중 더욱 안정적인 약효를 보이는 것으로 인정되는 C fraction을 계속하여 추적하였다. 이 rat PCA 시험에서 단일물질인 PD2가 약효를 보유하고 있었고 이 물질이 투여된 동물에서는 육안적으로 관찰할 수 있는 현저한 독성이 관찰되지는 않았다. 2차분획물 중에서는 D fraction이 체온의 하강을 유발하고 동물들이 졸리운 듯한 행동을 하였으며(4마리 중 2마리) 3차분획물에서는 PD1과 PD4가 혈뇨의 배설을 유발(각 2마리씩)하는 것으로 인정된다.

분획		투여량	시험수	결과(대조군의 %)	판정
Ethyl acetate분획		100 mg/kg, ip (재시험)	5	45, 61, 82, 25, 56	유효
2차분획	A fraction	60 mg/kg, ip	5	150, 78, 94, 68, 121	무효
	B fraction	85 mg/kg, ip	5	75, 67, 91, 88, 74	미약
	C fraction	85 mg/kg, ip	5	55, 39, 56, 31, 64	유효
	D fraction	50 mg/kg, ip	4	82, 132, 110, 90	무효
3차분획	PD1	15 mg/kg, iv	5	190, 90, 123, 114, 70	무효
	PD2	20 mg/kg, iv	5	40, 50, 38, 51, 68	유효
	PD3	15 mg/kg, iv	4	120, 94, 90, 92	무효
	PD4	20 mg/kg, iv	5	56, 90, 111, 89, 80	무효
	PD5	30 mg/kg, iv	5	80, 135, 95, 122, 84	무효

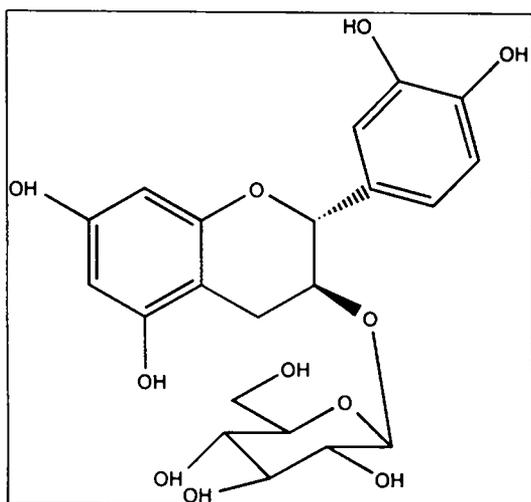
다. 소나무로부터 분리된 단일 물질(PD2)의 구조 분석 결과

PD2의 ^{13}C -NMR spectrum (spectrum 10-1)은 21개의 peaks을 보여주는데 DEPT (spectrum 10-2) 실험으로부터 methylene group이 2개, methine group이 12개, quaternary group이 7개로 밝혀졌다. 또한 ^1H -NMR spectrum (spectrum 10-3)에서 당이 존재하고 있음을 알았다. 당에 해당되는 6개의 탄소들은 β -D-glucose와 잘 일치하고 이들을 제외한 15개의 peaks은 catechin과 잘 일치한다. 또한 당의 1번 hydroxyl group은 catechin의 3번 위치와 연결되어 있음이 확인되었다. 탄소의 multiplicities 및 assignments는 아래 표와 같다.

no.	δc	CH_n DEPT	^{13}C assignments
1	27.4	t	4
2	61.5	t	G6
3	67.6	d	3
4	70.2	d	G4
5	73.8	d	G2
6	77.1	d	G5
7	77.2	d	G3
8	81.8	d	2
9	95.8	d	8
10	97.0	d	6
11	101.4	d	G1
12	102.3	s	10
13	114.1	d	2'
14	115.0	d	5'
15	118.9	d	6'
16	131.0	s	1'
17	145.2	s	3'
18	145.2	s	4'
19	155.6	s	7
20	156.9	s	5
21	157.0	s	9

Chapman & Hall database에 근거하여 PD2는 catechin-1-0- β -D-glucose로 밝혀졌고

그의 구조는 아래 그림과 같다.



이 물질에 대한 references는 아래와 같다.

- Coxon, DT et al., *Tetrahedron*, 1972, 28, 2819
Dostkotch, RW et al., *Phytochemistry*, 1973, 12, 1153
Markham, KR et al., *Tetrahedron*, 1976, 32, 2607
Takani, M et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1977, 25, 3388
Tschesche, R et al., *Phytochemistry*, 1980, 19, 1825
Nonaka, GI et al., *Phytochemistry*, 1982, 21, 429; , 1983, 22, 237, 1659
Miyamura, M et al., *Phytochemistry*, 1983, 22, 215
Tanaka, T et al., *Phytochemistry*, 1983, 22, 2575
Delgado, G et al., *Phytochemistry*, 1984, 23, 675; , 1986, 34, 633, 643
Morimoto, S et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 1985, 33, 2281
Foo, LY et al., *Phytochemistry*, 1985, 24, 1495; , 1987, 26, 2825; , 1989, 28, 1237
Hsu, FL et al., *Phytochemistry*, 1985, 24, 2089

- Kashiwada, Y et al., Chem. Pharm. Bull., 1986, 34, 3208
- Bonefield, M et al., Phytochemistry, 1986, 25, 1205
- Hashimoto, F et al., Chem. Pharm. Bull., 1987, 35, 611
- Ishimaru, K et al., Phytochemistry, 1987, 26, 1167
- Malan, E et al., Phytochemistry, 1987, 26, 2049; , 1990, 29, 1334; , 1991, 30
2737
- Kiehlmann, E et al., Magn. Reson. Chem., 1988, 26, 204
- Nakane, H, Biochemistry, 1990, 29, 2841
- Rossouw, W et al., Tetrahedron, 1990, 50, 12477
- Cui, CB et al., Chem. Pharm. Bull., 1992, 40, 2035
- Lee, MW et al., Phytochemistry, 1992, 31, 2117

라. 소나무로부터 분리한 단일물질(PD2)의 항알러지 물질로서의 개발 가능성

이미 알려진 물질일 뿐만 아니라 약효가 뛰어난 것도 아니어서 개발할 필요성을 찾을 수 없었다.

제 3 절 약리기전에 대한 연구

신약후보로서의 가능성이 높은 2종의 시료인 시호와 지유를 대상으로 시료가 확보된 범위에서 시험하였다. 특히 두 종의 시료 모두 최종분리물질의 양이 충분하지 않았기 때문에 각각 1차 및 2차 분획물로써 시험을 수행하였다 즉 시호에서는 water층 또는 methylene chloride층을, 또 지유에서는 butanol층을 각각 사용하여 약리작용 기전의 종류를 파악하기 위한 연구를 수행하였다.

1. 적출기관지에서의 약리기전 연구

약리기전의 in vitro상에서의 연구를 위해 기관지를 적출하고 allergy매개에 중요한 역할을 하는 mediator들이 유발한 수축반응에 시료가 저해작용이 있는가를 검정하기 위해 우선 시료가 확보되어 있고 약효가 있는 것으로 믿어지는 시호 water층과 지유 butanol층에 대한 연구를 수행하였다. 그 결과 시호 water층은 histamine에, 지유 butanol층은 2종의 agonist인 histamine과 leukotriene D4에 각각 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

가. 적출 guinea pig 기관지 평활근에서의 histamine수축작용에 미치는 histamine 길항제 및 시호 water 추출물의 영향

시험군		적용량	장력의 변화 (대조군의 %)	시험수	유의성
Control	Saline	100 μ l/bath	100	4	대조
	DMSO	100 μ l/bath	100 (Saline의 85%)	4	대조
Ketotifen		10 μ M	23.7 \pm 4.4	5	yes
Mepyramine		10 μ M	17.8 \pm 5.2	5	yes
시호 water 층		500 μ g/ml	95.6 \pm 12.1	4	no

나. Histamine(10 μ M)에 의해 유도된 적출기관지 수축에 대한 지유 butanol 분획의 영향

시험군	시험 수	반응 (대조군의 %)
대조군	4	100
지유 1 μ g/ml	5	91.3 \pm 8.6
지유 10 μ g/ml	5	94.4 \pm 6.2
지유 100 μ g/ml	5	81.3 \pm 6.7
지유 1 mg/ml	5	74.6 \pm 7.7
mepyramine 10 μ M	4	21.3 \pm 3.2

다. 지유 butanol분획의 적출기관지 LTD4 수축에 미치는 영향

아래의 표에서 보는 바와 같이 leukotriene D4에 의해 유도된 기관지 수축작용의 경우에도 Histamine의 경우처럼 가장 높은 농도인 1 mg/ml에서 다소 저해되는 현상이 발견되었다.

시험군	시험 수	반응 (대조군의 %)
대조군	4	100
지유 1 μ g/ml	3	123.2 \pm 7.3
지유 10 μ g/ml	4	90.2 \pm 11.6
지유 100 μ g/ml	4	91.6 \pm 8.8
지유 1 mg/ml	4	74.4 \pm 7.6
LY171883 1 μ M	4	35.5 \pm 6.5

이 시험의 결과 높은 농도의 지유 butanol층에 의해 histamine 및 LTD4에 의해 유발된 수축반응을 약 20%정도 저해하는 것으로 관찰되었으나 in vitro시험에서 자주 나타나는 비특이적 저해현상과, 높은 농도에서만 두 수축물질 모두에서 관찰된 저해결과로 미루어 볼 때 항알러지 효과가 histamine이나 leukotriene D4의 직접적 저해에 의한 작용으로 보기는 어렵다.

2. Rat mast cell에서의 histamine유리작용

기전연구의 일환으로 rat 복강에서 분리한 mast cell에서의 histamine유리작용에 미치는 영향을 검토하였다.

분리한 rat 복강 mast cell 에서의 비교물질 DSCG의 histamine 유리억제작용(시험법확립)

시험군		유리억제율 %	
Control (N=8)		Compound 48/80에 의한 유리	A-23187에 의한 유리
		100%	100%
DSCG (N=5)	0.1 μ M	-0.02 \pm 4.5	6.33 \pm 7.3
	1 μ M	26.0 \pm 8.1	17.4 \pm 9.9
	10 μ M	64.4 \pm 12.5	55.7 \pm 12.4

예상한 대로 양성대조물질인 DSCG는 현저한 histamine유리억제 현상을 발휘하였으며 이 시험계로 시험물질인 시호에서 분리한 methylene chloride층과 지유에서 분리한 butanol분획에 대한 시험을 수행하였다.

시험군		유리억제율 %	
Control (N=8)		Compound 48/80에 의한 유리	A-23187에 의한 유리
		100%	100%
시호 methylene chloride층 1 mg/ml		96.2 \pm 10.4	115.2 \pm 13.6
지유 Butanol층 1mg/ml		66.1 \pm 8.3	54.3 \pm 9.1

이 결과를 보면 시호의 유효분획은 mast cell로 부터의 Histamine유리에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 보이지만 지유의 경우는 histamine유리억제 작용이 최소한 하나의 작용기전으로 인정된다. 아직 정제되지 않은 단계의 시료이기 때문에 약하기는

하지만 저해정도가 비교물질의 수준인 50-60%에 도달하였다.

3. Rat 대동맥에서의 지유 butanol분획이 혈관수축물질에 미치는 영향

이 시험에서는 대표적인 혈관 수축물질들의 혈관 수축작용에 지유 butanol분획이 영향을 미치는가를 검토함으로써 3종의 수용체에 대한 직접적 길항작용의 유무를 판단하기 위해서 수행하였다.

혈관수축물질	실험수	반응 (%)	
		대조군	Butanol 분획 1 mg/ml
phenylephrine 1 μ M	5	100	102 \pm 2
5-HT 10 μ M	5	100	103 \pm 1
angiotensin II 100 ng/ml	5	100	99 \pm 2

이 결과에서 보면 지유의 유효분획이 시험농도인 1 mg/ml 농도에서 혈관의 adrenergic α 1 수용체, serotonin의 5-HT₂ 수용체 및 angiotensin II 수용체에 대해서 길항작용이 없는 것으로 인정된다.

4. Guinea pig 심방에서 지유 butanol 분획의 영향

Guinea pig 적출 심방은 Adrenergic β 수용체 및 histamine H₂ 수용체에 대한 약물의 작용을 검토하는 시험계이며 아래에서 지유 butanol분획으로 시험한 결과를 보여주고 있다.

빈맥유도물질	실험수	반응 (%)	
		대조군	Butanol 분획 1 mg/ml
NE 1 μ M	4	100	87.8 \pm 11.5
histamine 10 μ M	5	100	108.8 \pm 21.2

이 결과에서 보는 바와 같이 지유의 butanol분획이 guinea pig 적출심방에서 맥박수의 증가를 일으키는 NE 이나 histamine의 작용을 저해하지 않는 것으로 보아 adrenergic β 1 수용체나 histamine H2 수용체에 직접적인 길항작용이 없음을 의미한다.

5. 적출 Rat vas deferens에서의 지유 butanol분획의 작용

Rat vas deferens의 adrenergic α 2 수용체를 흥분시키게 되면 전기적자극하에서 유도된 평활근 수축작용이 저해받는 현상이 나타난다. 이 시험계에서의 지유 butanol 층은 clonidine에 의해 생성된 저해작용에 아무런 영향을 미치지 않았다. 따라서 지유 butanol층은 adrenergic α 2수용체에의 길항작용이 없음을 시사한다.

수축저해 유도	실험수	저해율 (%)	
		대조군	Butanol 분획 1 mg/ml
clonidine 100 nM	4	43.4 \pm 8.1	52.8 \pm 19.2

6. 적출 guinea pig 회장에서의 지유 butanol층의 영향

Guinea pig ileum은 수종의 신경전달물질이나 autacoid들에 의해서 수축이

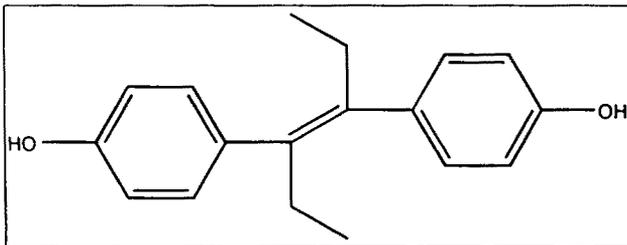
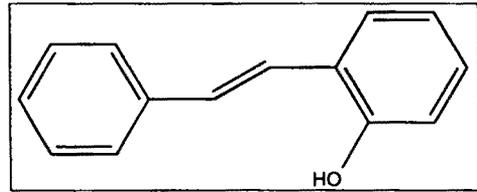
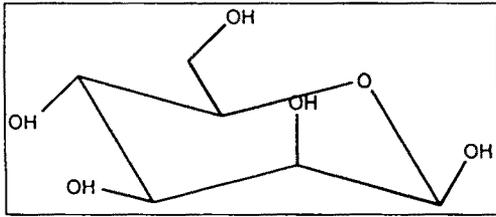
일어난다. 이 시험에서는 이들 물질 중 중요한 2종의 물질인 acetylcholine (ACh)과 prostaglandin E2에 의해 일어난 수축작용에 지유 butanol 층이 영향을 미치는 가를 시험하였다.

수축물질	실험수	반응 (%)	
		대조군	Butanol 분획 1 mg/ml
acetylcholine 1 μ M	5	100	91.3 \pm 10.0
PGE2 50 nM	4	100	98.5 \pm 7.7

이 결과에서 보면 항 알러지 활성이 있는 지유 butanol층은 직접적인 muscarine수용체나 EPI수용체를 길항하는 작용이 없는 것으로 확인되었다.

제 4 절 약효물질의 유도체 합성 실험 결과

농가재배 식물로부터 항알러지 물질의 유효성분 추출 결과 지유로부터 분리한 활성물질이 당을 포함하고 있고 뽕나무로 분리한 활성물질이 stilbene 유도체를 함유하고 있으므로 이 둘을 하나로 합친 화합물을 합성으로 얻고자 하였다. 사용한 당은 D-mannose였고 stilbene 유도체는 trans Ortho-hydroxy stilbene과 diethylstilbestrol로서 이들을 결합한 이유는 이들이 결합된 화합물이 신규물질이므로 합성 후 약효가 있을 때 물질특허를 획득하기 위함이다. 이들의 구조는 각각 아래 그림과 같다.



1. 합성방법

당의 anomeric 위치에 alcohol성분을 결합시켜 glycosidic bond를 만드는 방법은 많이 알려져 있으나, 가장 널리 사용되는 방법은 첫째 glycosyl halide와

alcohol을 은(Ag) 촉매나 상전이 촉매등을 사용하여 결합시키는 방법, 둘째 acetyl sugar를 루이스산을 사용하여 alcohol과 사용하는 방법등이다. 본 합성에서는 두 번째 방법을 사용하여 SnCl₄ 촉매하에서 Stilbenes와 pentaacetyl mannose와의 반응을 통하여 목적화합물을 합성하였다. Glycosidation에 사용할 stilbenes은 ylide와 상응하는 치환된 benzaldehyde와의 반응을 통하여 합성하였다.

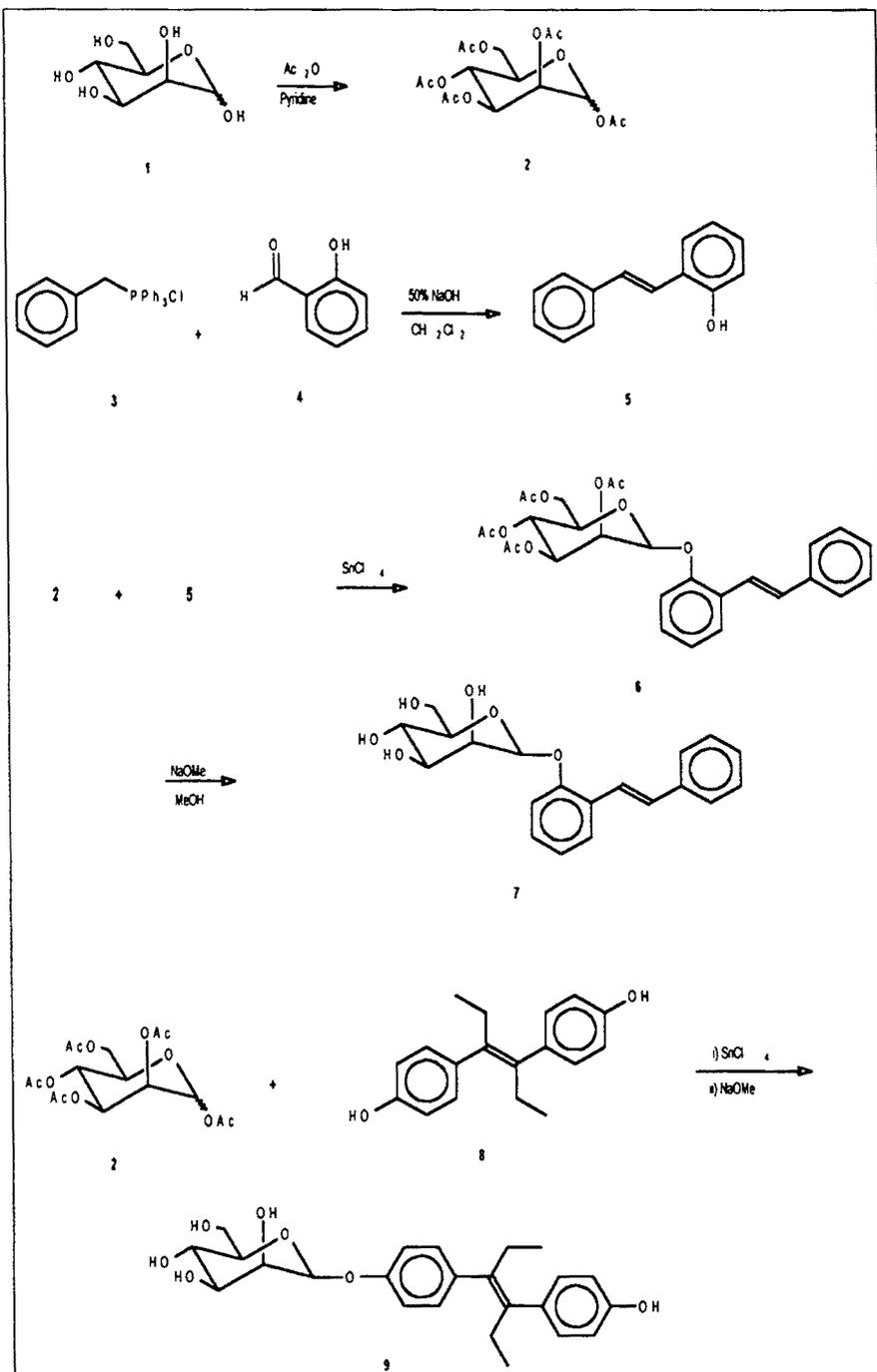
2. 합성결과

가. trans Ortho-hydroxy stilbene (5)의 합성

Benzyltriphenylphosphonium chloride (3, 9.33 g, 24 mmol)와 salicylaldehyde (4, 2.44 g, 20 mmol)를 150 ml의 CH₂Cl₂에 녹인다. 이 용액에 15 ml의 50% NaOH 용액을 가한후 상온에서 12시간 교반한다. 반응종료후 반응 혼합물에 150 ml의 물을 가하고 유기층을 분리한다. 물층을 다시 CH₂Cl₂ 150 ml로 추출한후, 유기층을 합쳐서 MgSO₄하에서 건조한다. MgSO₄를 여과하고 여액을 감압건조한다. 잔여물에 ether를 가하여 부산물인 PPh₃=O를 침전, 여과시키고, 여액을 다시 감압증류한다. 잔여물을 관크로마토그래피로 정제하여 목적화합물 5를 3.17 g (81 %)을 얻는다. : m. p 122-124 °C; IR (KBr disk) ν_{\max} 3531, 1584, 1455, 1332, 1248, 1195, 1089, 977, 755, 692 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.09 (s, 1H), 6.67 (d, 1H), 6.86 (t, 1H), 7.01-7.17 (m, 3H), 7.23-7.30 (m, 3H), 7.42-7.44 (m, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 116.21, 121.59, 123.43, 125.14, 126.99 (double intensity), 127.63, 128.04, 128.53, 128.89 (double intensity), 130.53, 138.02, 153.42.

나. trans Ortho-stilbenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-mannoside (6)의 합성

trans Ortho-hydroxy stilbene (5, 174 mg, 0.887 mmol) 과



1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-D-mannoside (2, 517 mg, 1.33 mmol)를 5 ml의 CH₂Cl₂에 녹인후, 얼음을 사용하여 약 4 °C로 온도를 낮춘다. 위의 용액에 SnCl₄ (1.0M in CH₂Cl₂, 0.88 ml)를 천천히 가하고 상온에서 24시간 교반한다. 반응 혼합물을 얼음물에 녹이고 ethylacetate로 추출한다. 유기층을 물, 포화 NaHCO₃ 용액으로 닦고, MgSO₄로 건조 시킨후, 감압증류한다. 잔여물을 관 크로마토그래피로 정제하여 250 mg의 목적화합물 6을 얻는다. : ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 2.05 (2s, 6H), 2.11 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 4.06-4.13 (m, 2H), 3.31 (dd, 1H), 5.44 (1H, t), 5.50 (s, 2H), 5.68 (d, 1H), 7.18 (t, 1H), 7.20-7.28 (m, 5H), 7.10 (t, 2H), 7.52 (d, 1H), 7.65 (d, 2H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 21.06, 21.12, 21.26, 21.42, 62.52, 66.09, 69.43, 69.82, 70.1, 96.59, 15.49, 122.58, 123.65, 127.06, 127.18, (double intensity), 127.74, 128.17, 128.97, 129.15(double intensity), 130.65, 137.82, 153.31, 170.14, 170.17, 170.35, 170.89.

다. trans Ortho-stilbenyl-D-mannoside (7)의 합성

240 mg (0.57 mmol)의 6을 10 ml의 MeOH에 녹인후 0.2 M NaOMe 용액을 1 ml 가하고 상온에서 2시간 교반한다. 반응혼합물을 Amberlite IR-120 resin을 사용하여 중화 시킨후, resin을 여과한다. 여액을 감압증류한 후, 잔여물을 관 크로마토그래피로 정제하여 150 mg의 목적화합물 7을 얻는다. : m.p 140-142 °C; IR (KBr disk) ν_{max} 3332, 2929, 1454, 1455, 1223, 1099, 1066, 1018, 973, 757, 690 cm⁻¹; ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 3.65 (ddd, 1H), 3.66-3.69 (m, 3H), 3.93 (dd, 1H), 4.03 (dd, 1H) 5.43 (s, 1H), 6.93 (t, 1H), 6.99 (d, 1H), 7.02-7.24 (m, 5H), 7.33 (d, 1H), 7.42 (d, 1H), 7.52 (d, 1H); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 61.61, 66.26, 71.11, 71.77, 74.59, 99.29, 115.63, 122.56, 122.90, 126.48, 126.55, 126.38 (double intensity), 128.73, 128.78 (double intensity), 129.67, 138.13, 154.10. Spectrum (7)-1, (7)-2, (7)-3은 각각 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR spectrum이다.

라. Diethylstilbestrol mono-D-mannoside (9)의 합성

Diethylstilbestrol (8)과 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-D-mannoside (2)로부터 위의 나, 다의 실험법과 동일한 방법으로 목적화합물 9를 α, β 의 anomeric mixture로 합성하였다. ; m.p 105-109 °C; IR (KBr disk) ν_{max} 3384, 2961, 2931, 1609, 1510, 1227, 1066, 1019, 834 cm^{-1} ; For major isomer, 1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 0.77 (t, 6H), 2.14 (q, 4H), 3.72-3.98 (m, 6H), 5.50 (s, 1H), 6.76-6.86 (m, 4H), 7.01 (d, 2H), 7.13 (s, 2H) ; ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ 14.13 (double intensity), 30.01 (double intensity), 62.98, 68.76, 72.50, 73.03, 75.70, 100.80, 115.57, 116.21 (double intensity), 117.29, 130.82, 131.61(double intensity), 132.39, 132.45, 136.07, 140.14, 140.94, 157.03, 157.32. Spectrum (9)-1, (9)-2, (9)-3은 각각 1H -NMR, ^{13}C -NMR, IR spectrum이다.

3. 약효 및 독성시험 결과

유기화학적 방법에 의해 합성된 화합물들을 이용하여 rat에서의 PCA 방법을 통한 약효의 검정을 수행하였다. 그 결과 아래와 같은 결과를 얻었다.

가. 합성 화합물의 약효

화합물	투여량	시험수	결과(대조군의 %)	판정
7	20 mg/kg, iv	5	113, 113, 82, 110, 104	무효
9	20 mg/kg, iv	5	28, 35, 57, 54, 69	유효

이 결과에서 보는 바와 같이 지유 및 뽕나무의 유효성분에 기초하여 합성한 2종의 화합물 중 9는 PCA 시험에서 유효하였다.

나. 합성 화합물의 독성

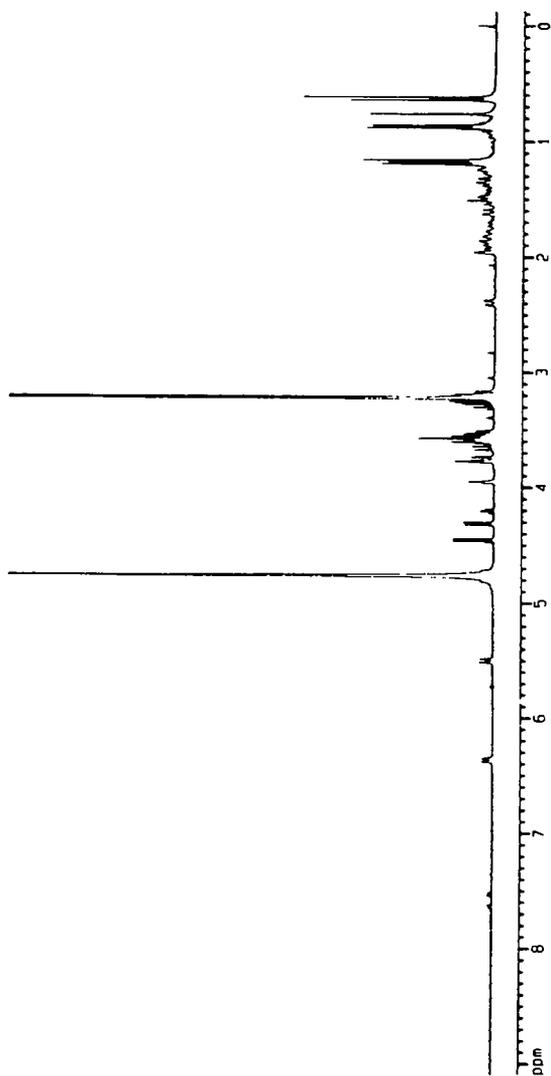
시험물질	투여용량	독성증상 및 발현빈도(괄호속은 빈도임)
7	20 mg/kg, iv	hematuria (3/5)
9	20 mg/kg, iv	hematuria (4/5)

2종의 화합물 모두에서 혈뇨(hematuria)현상이 약물 투여 20분정도에서 관찰되었다.

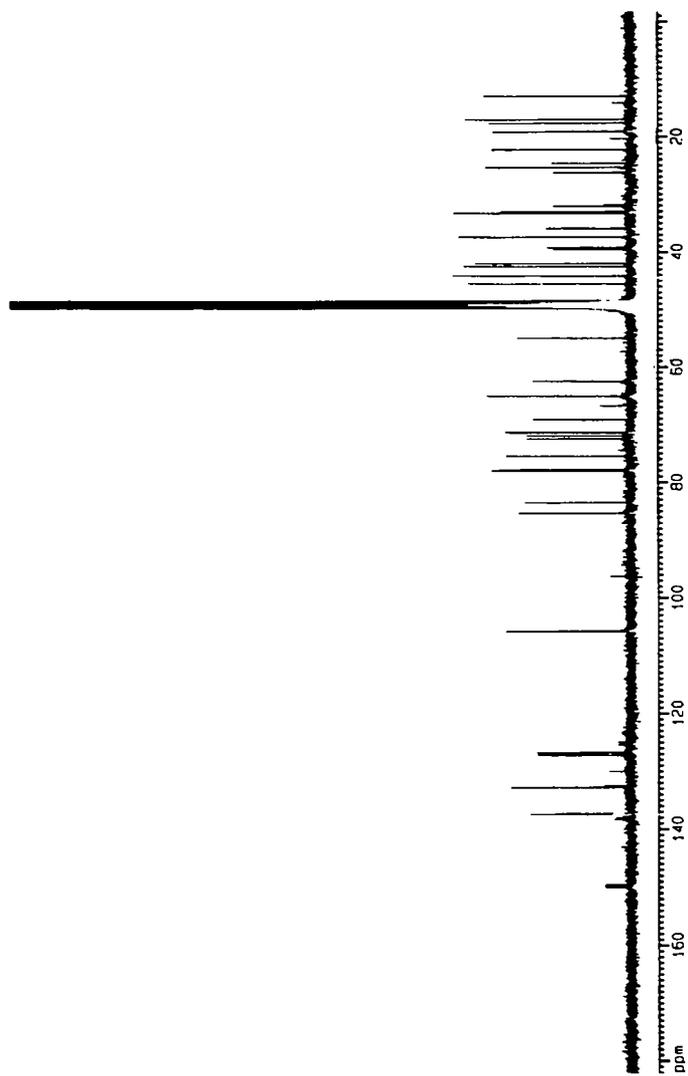
4. 항알러지 물질로서의 개발 가능성

지유 및 뽕나무의 유효성분을 기초로 하여 합성한 화합물 9는 rat을 이용한 PCA시험에서 유효한 것이 확인되었으나 투여 20 여분부터 혈뇨가 발생하였다. 따라서 시험 약물이 아마 용혈작용을 지니고 있는 않는가 생각하기 때문에 더 많은 유도체들에 대한 연구가 필요한 것으로 보인다. 그러나 항알러지 약효를 갖는 신규물질이므로 물질특허를 출원하였다.

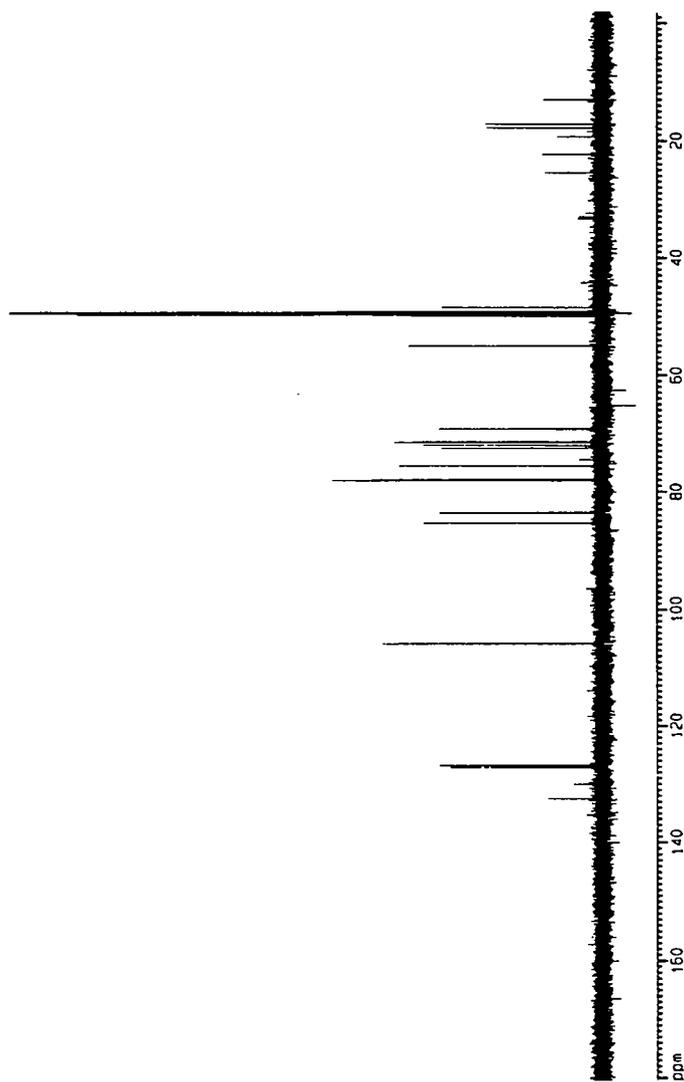
Spectrum 1-1. ^1H -NMR spectrum of M533.



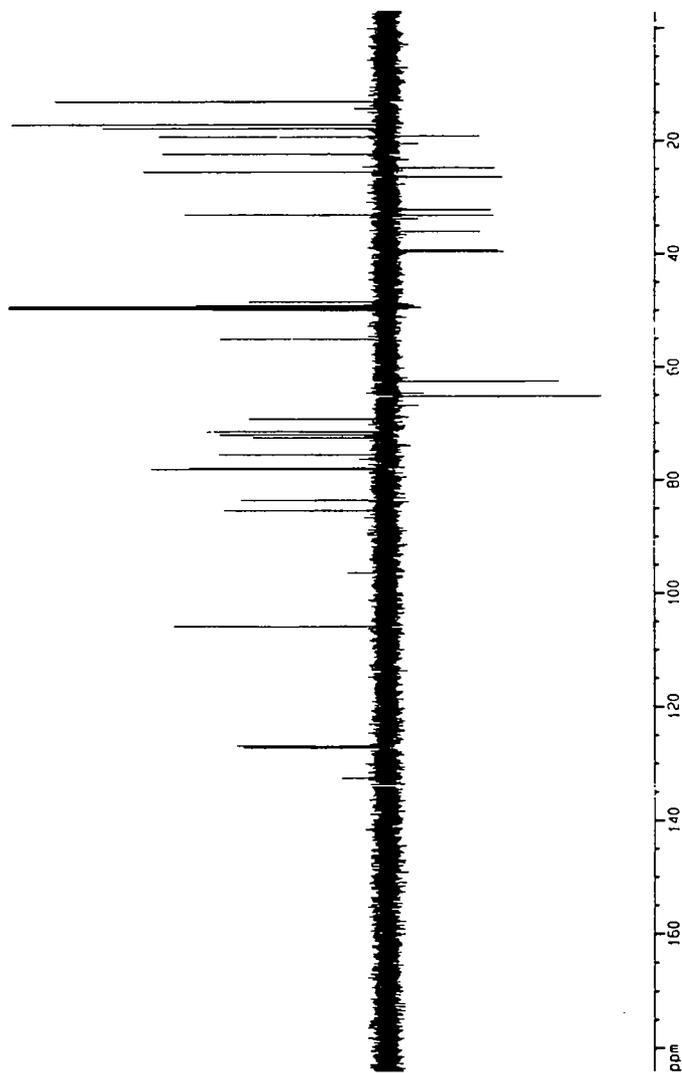
Spectrum 1-2. ^{13}C -NMR spectrum of M533.



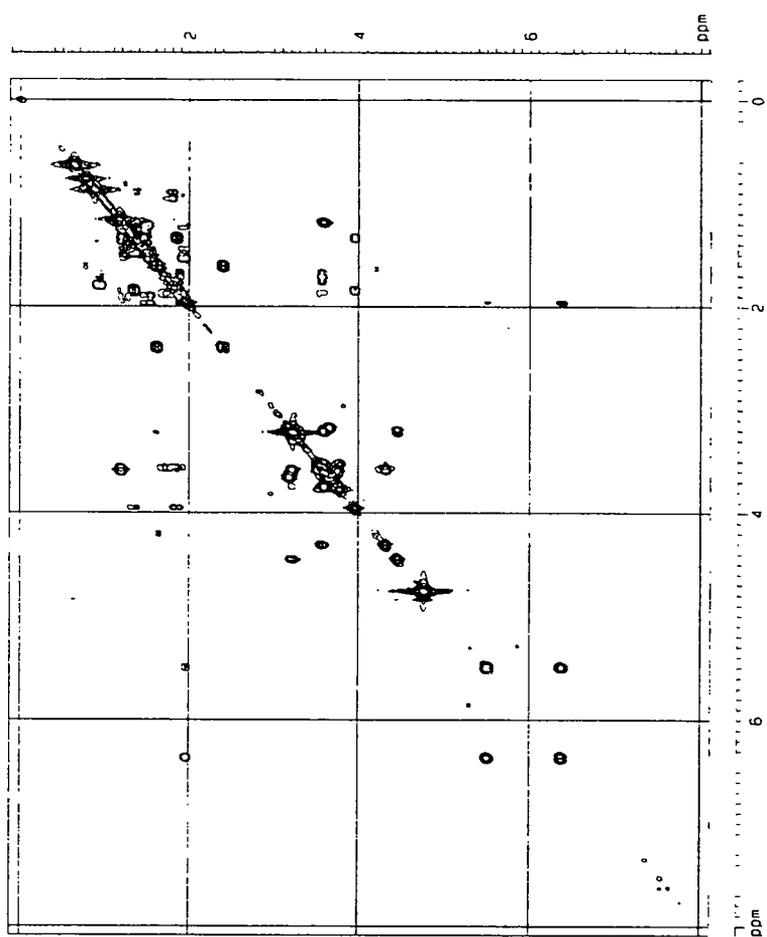
Spectrum 1-3. DEPT 90 spectrum of M533.



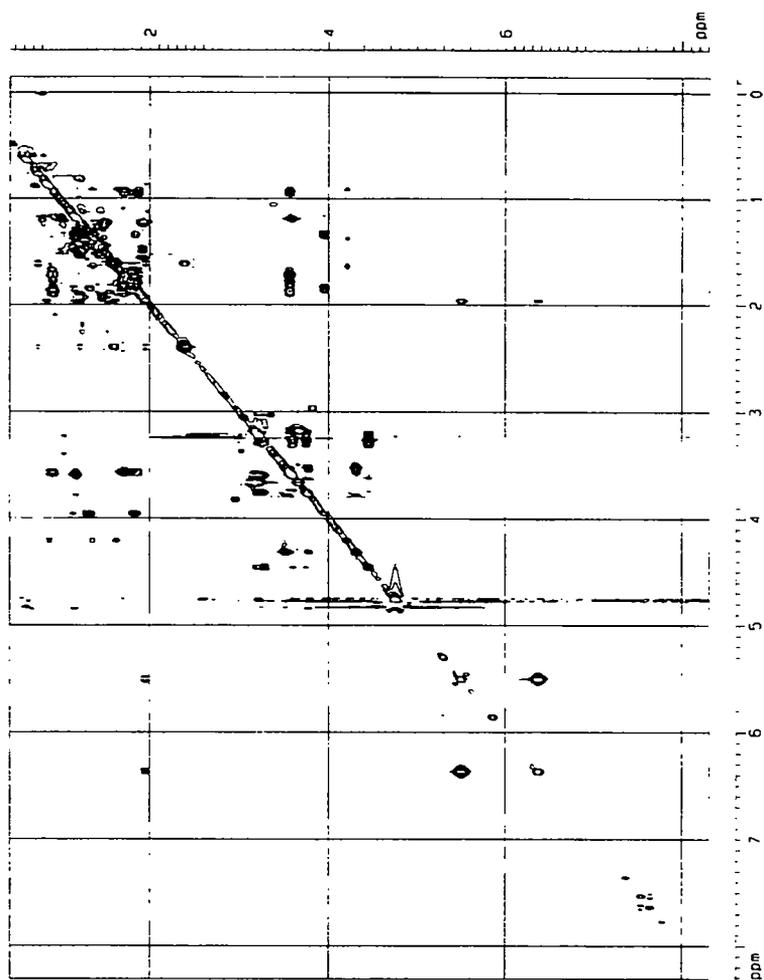
Spectrum 1-4. DEPT 135 spectrum of M533.



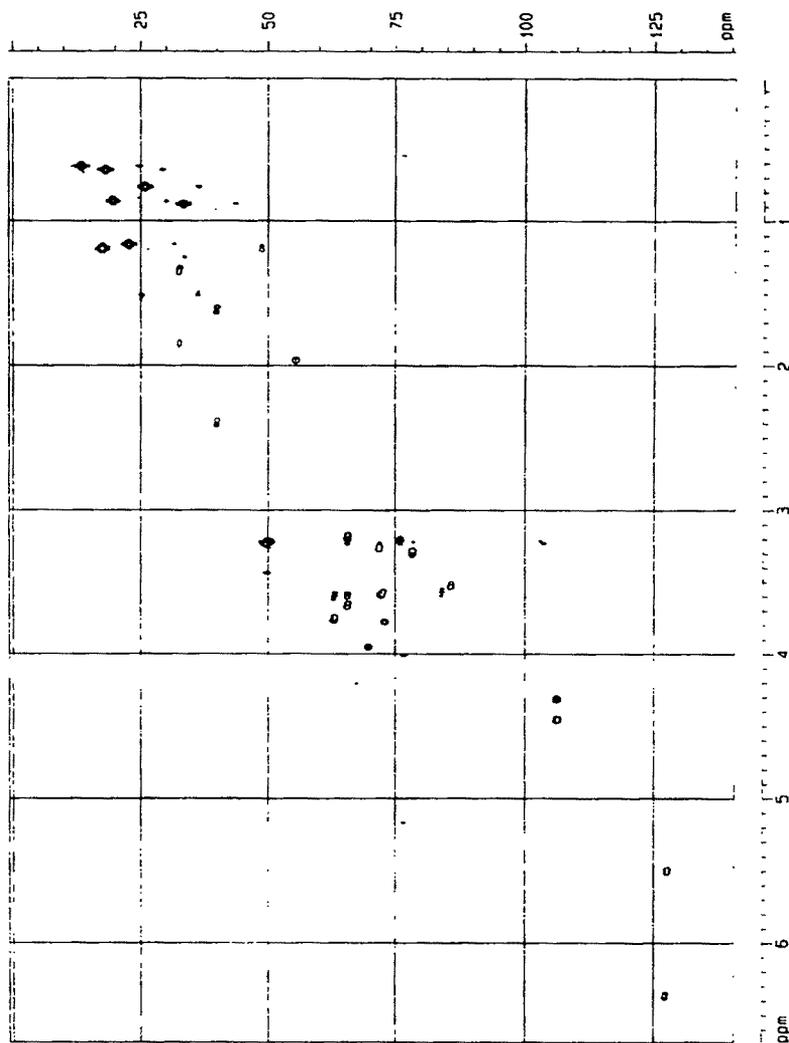
Spectrum 1-5. COSY spectrum of M533.



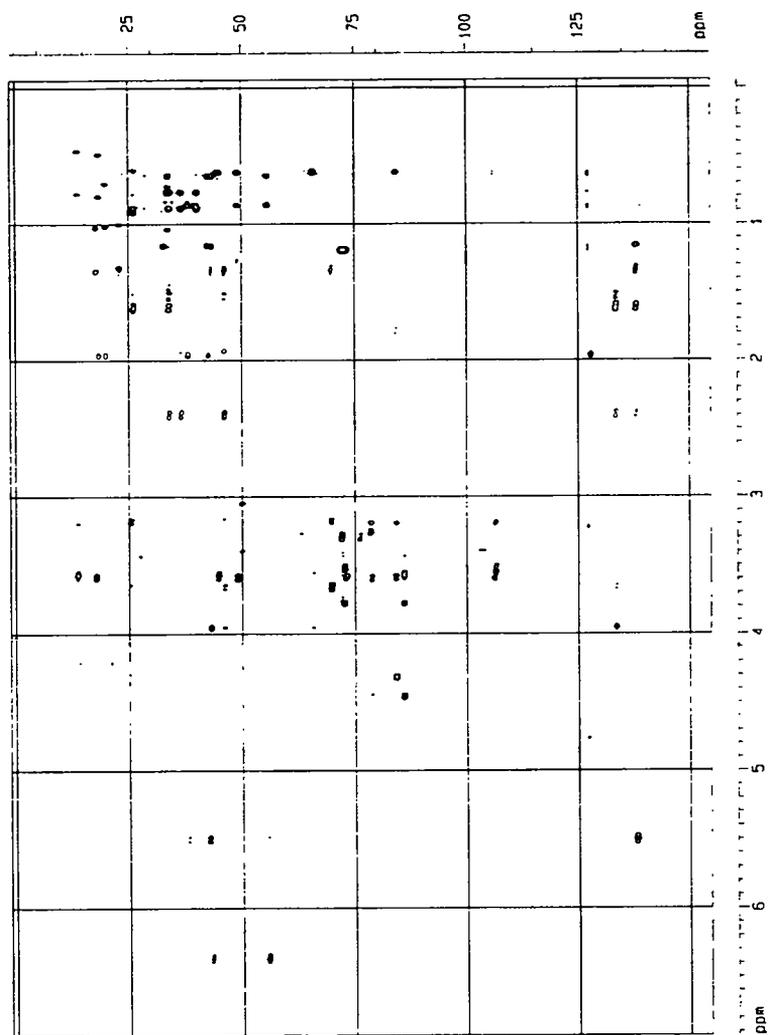
Spectrum 1-6. HOHAHA spectrum of M533.



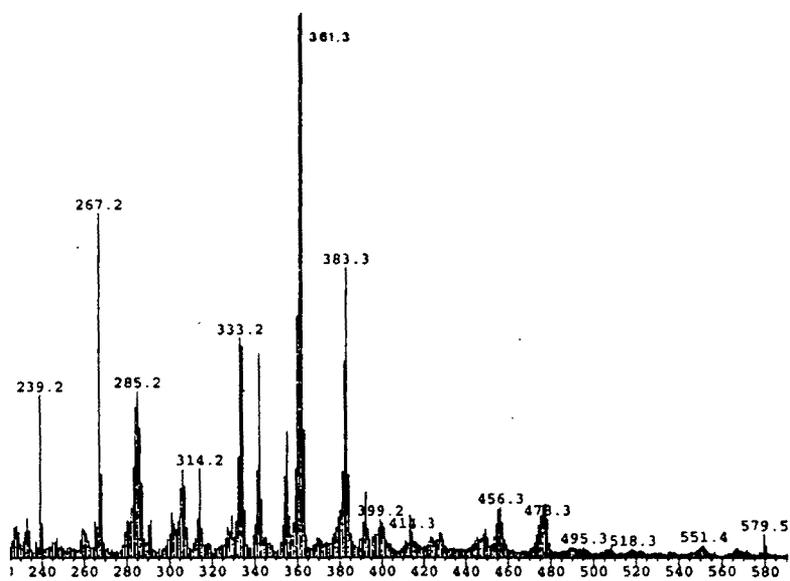
Spectrum 1-7. HMQC spectrum of M533.



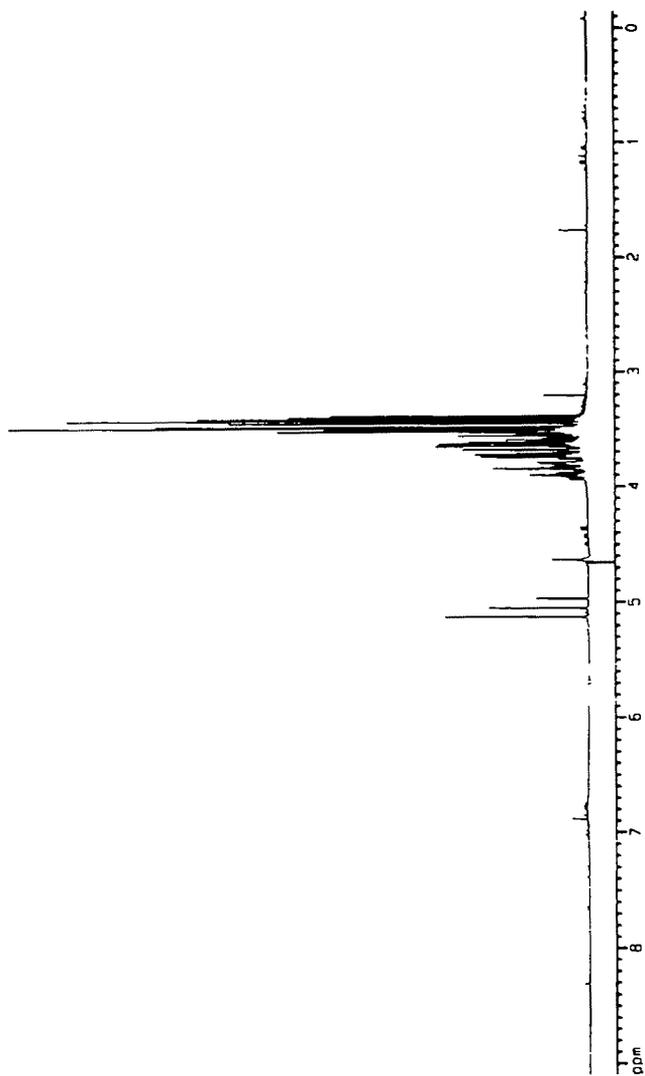
Spectrum 1-8. HMBC spectrum of M533.



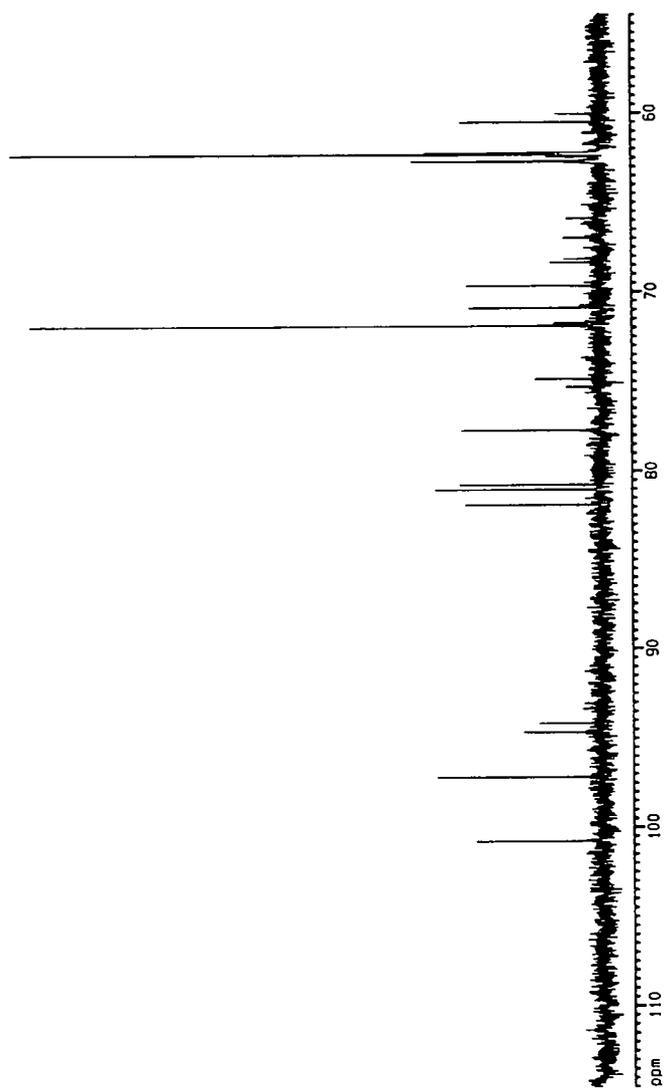
Spectrum 2-1. FAB/MS spectrum of SO3.



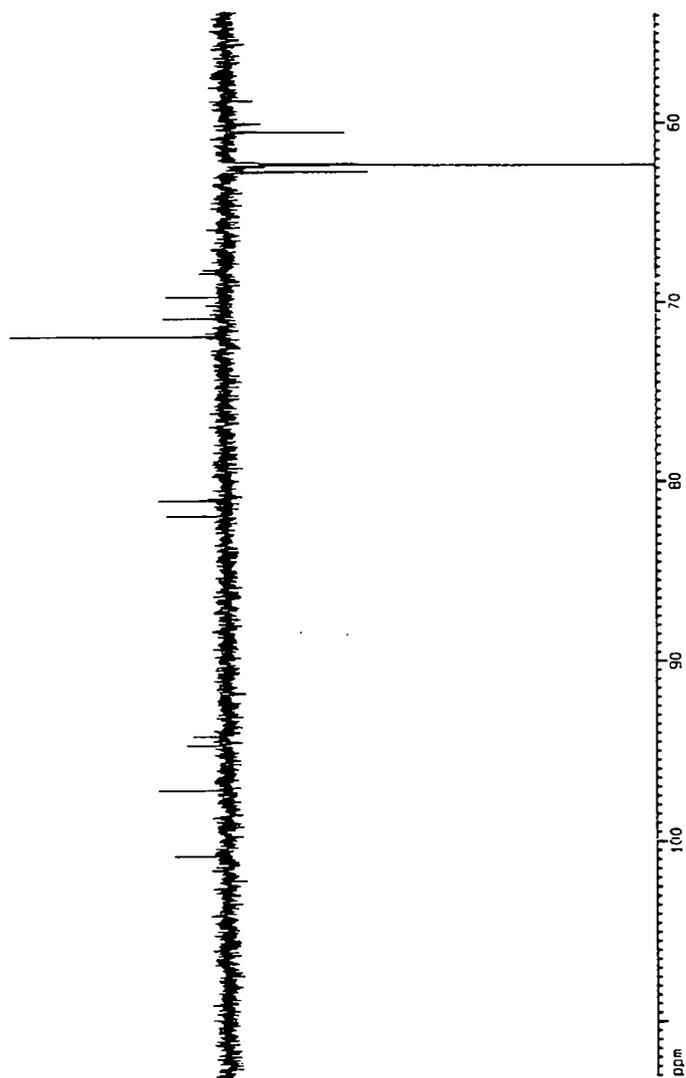
Spectrum 2-2. ^1H -NMR spectrum of SO_3 .



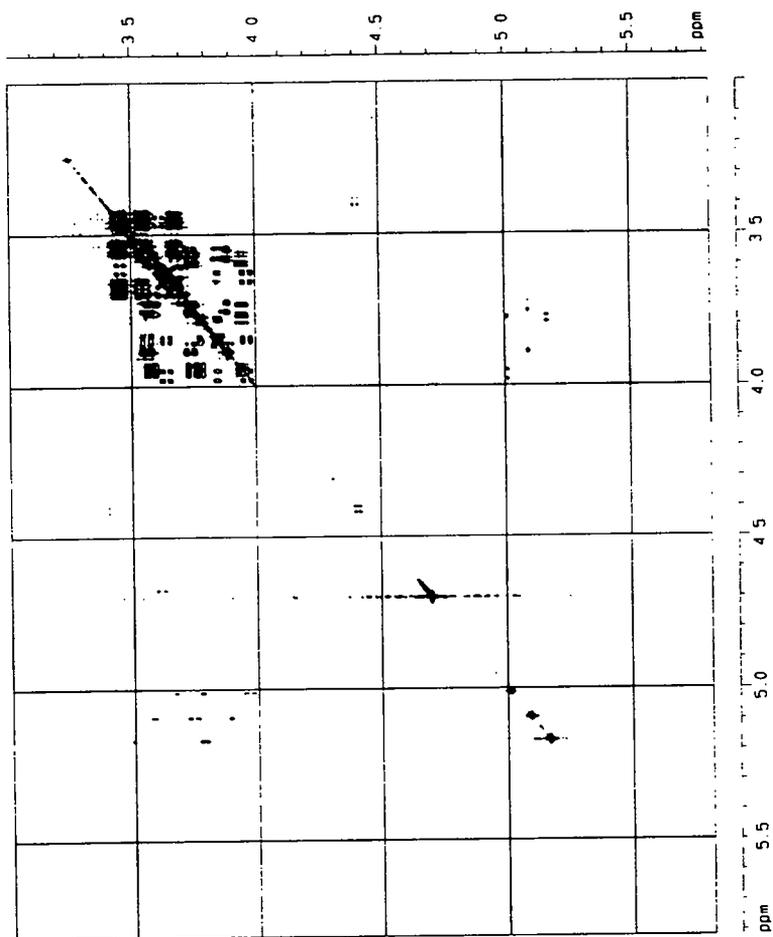
Spectrum 2-3. ^{13}C -NMR spectrum of SO_3 .



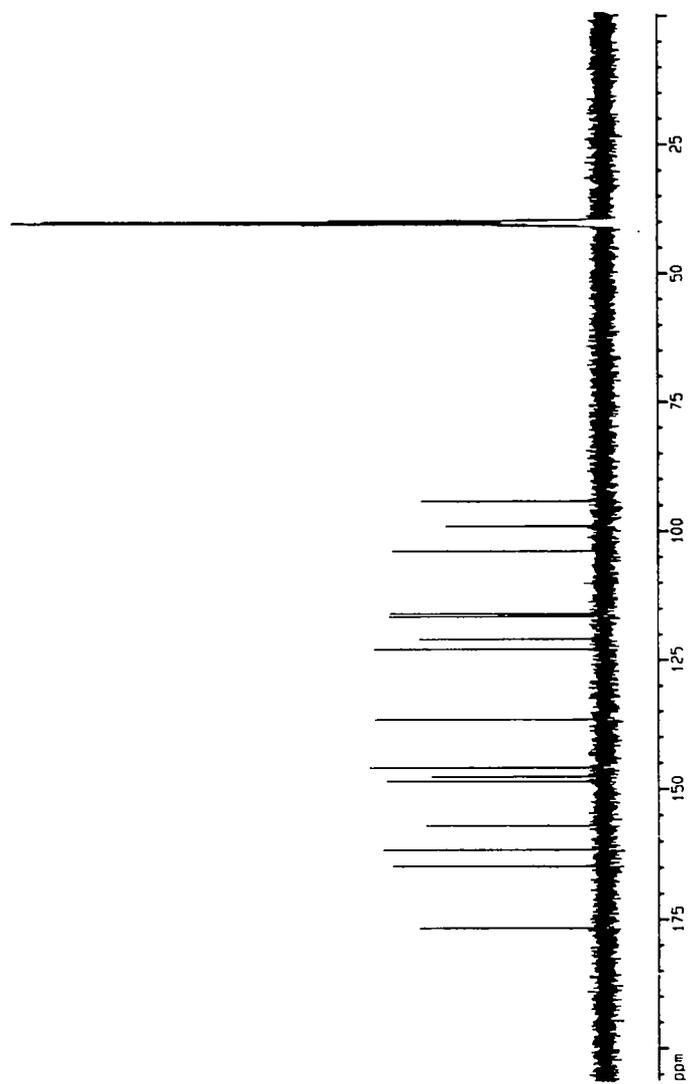
Spectrum 2-4. DEPT 135 spectrum of SO3.



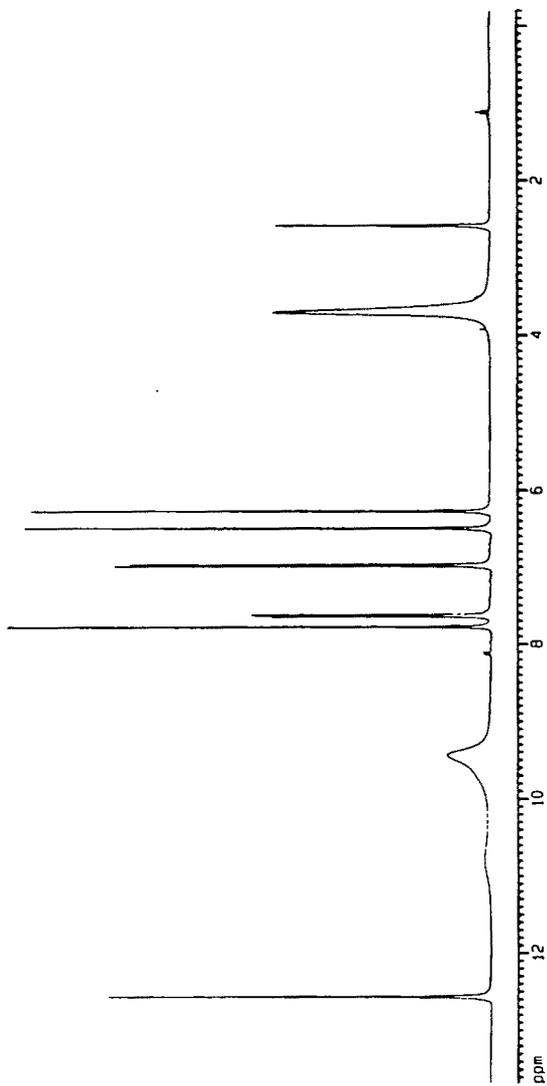
Spectrum 2-5. COSY spectrum of SO3.



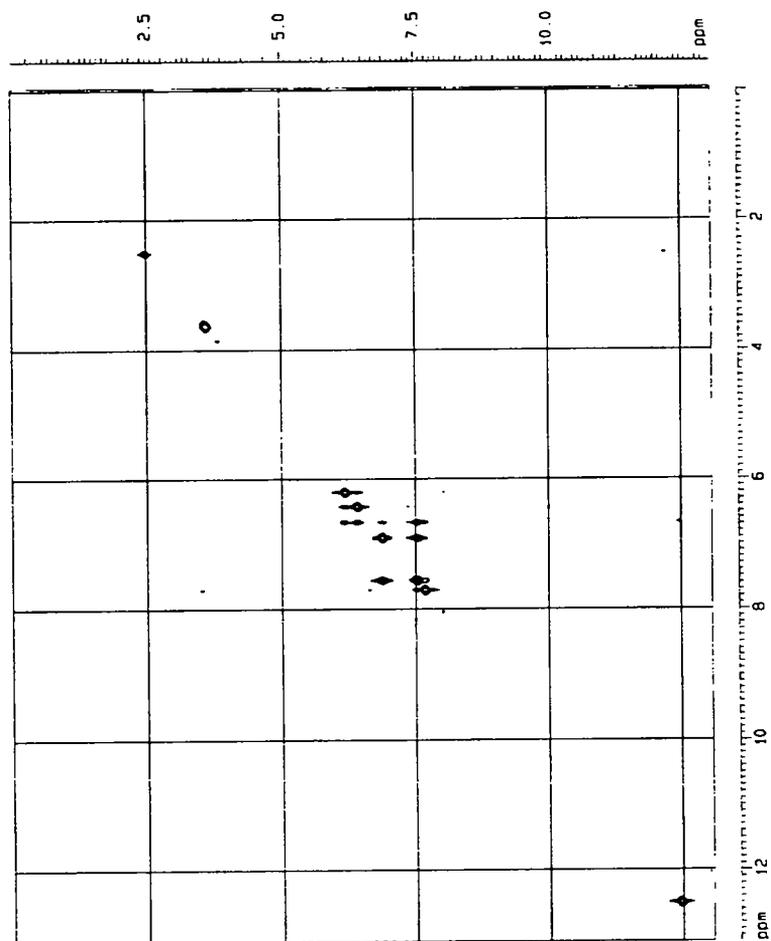
Spectrum 3-1. ^{13}C -NMR spectrum of GT3.



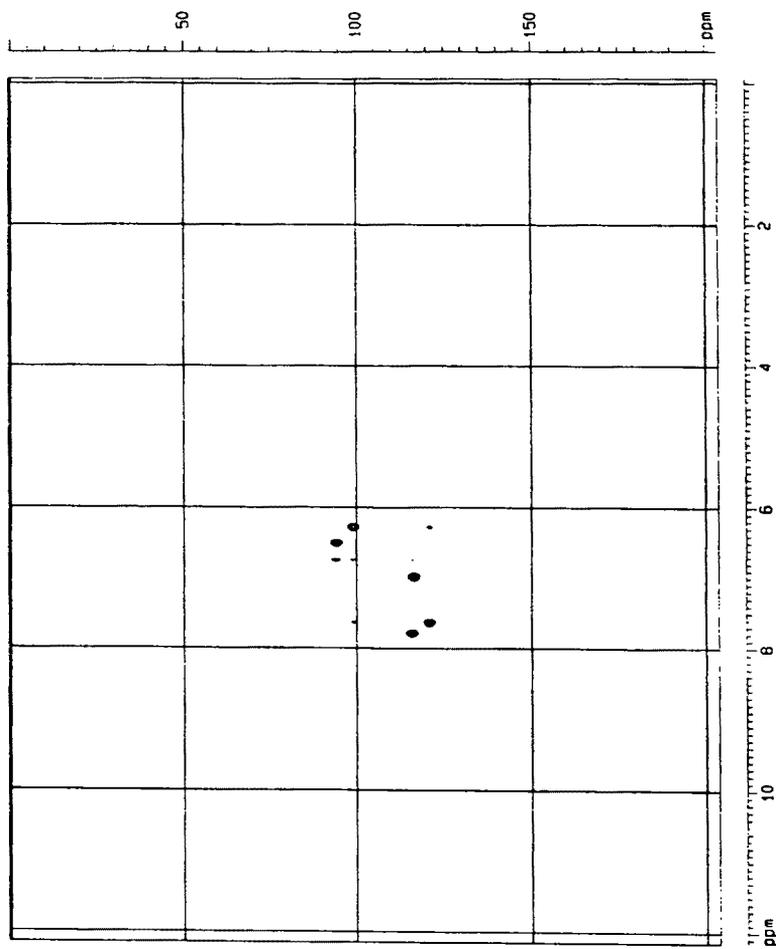
Spectrum 3-2. ^1H -NMR spectrum of GT3.



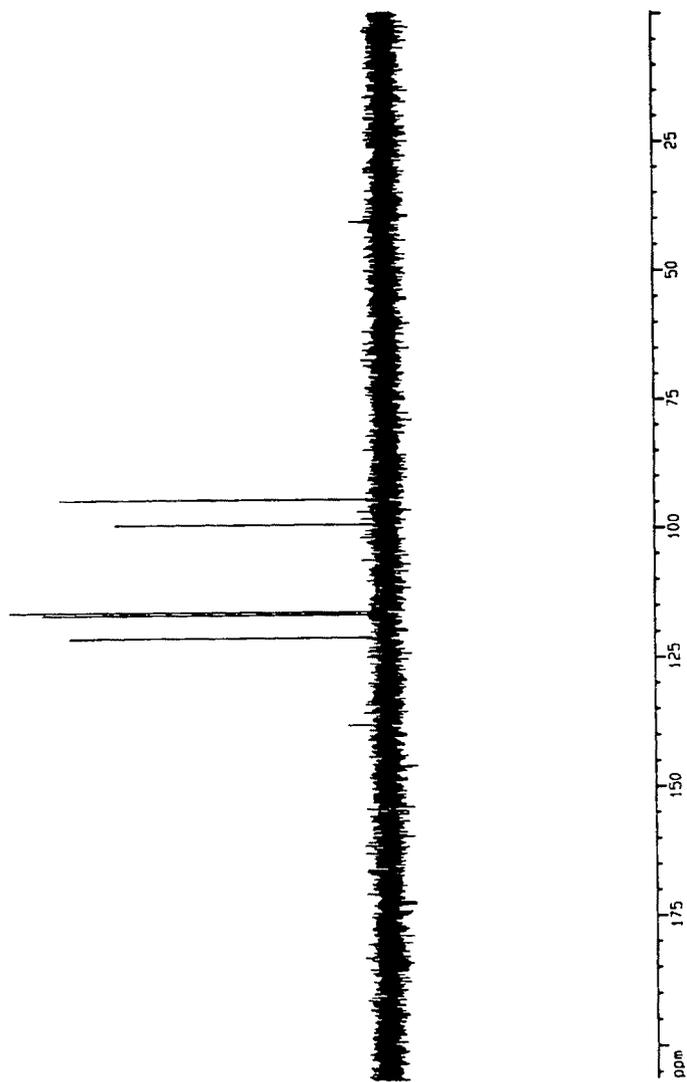
Spectrum 3-3. COSY spectrum of GT3.



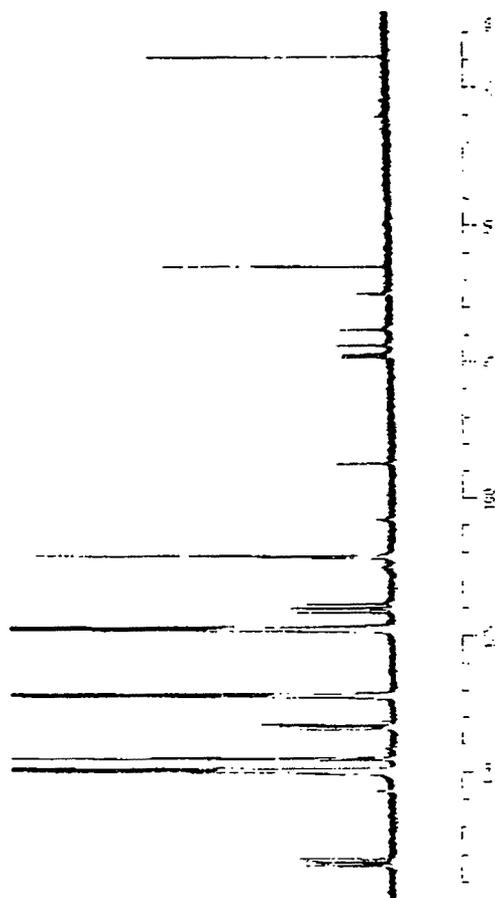
Spectrum 3-4. HMQC spectrum of GT3.



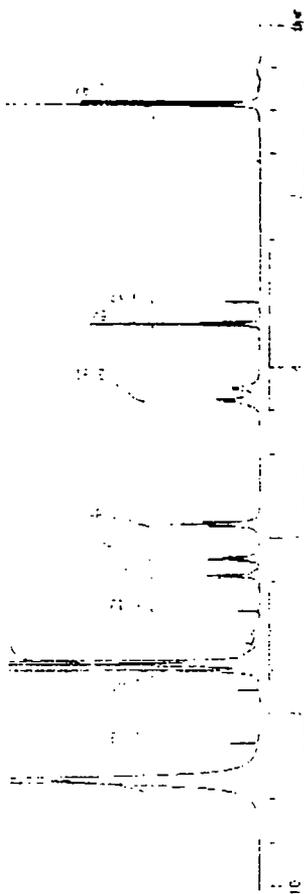
Spectrum 3-5. DEPT 135 spectrum of GT3.



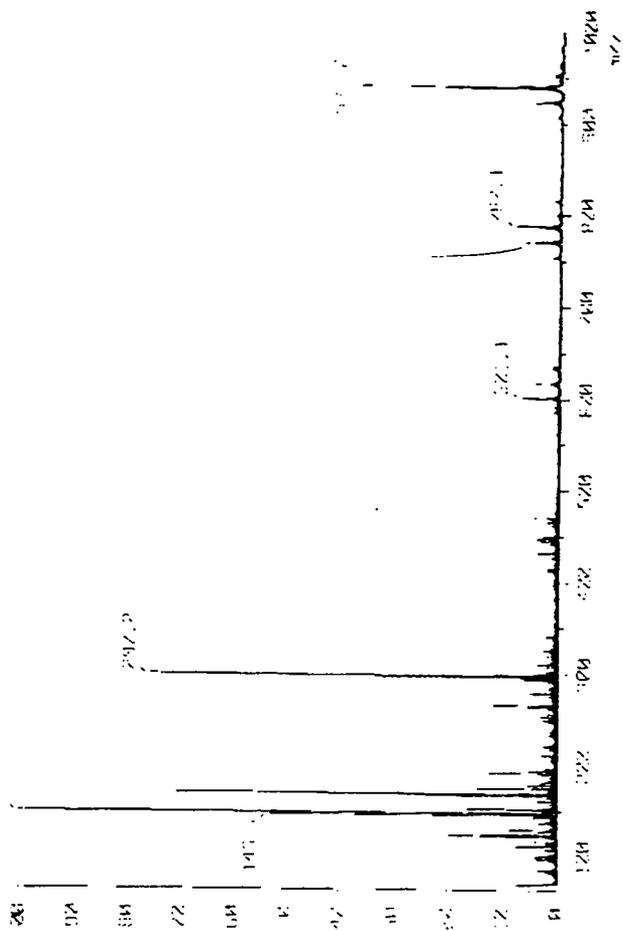
Spectrum 4-1. ^{13}C -NMR spectrum of PS3.



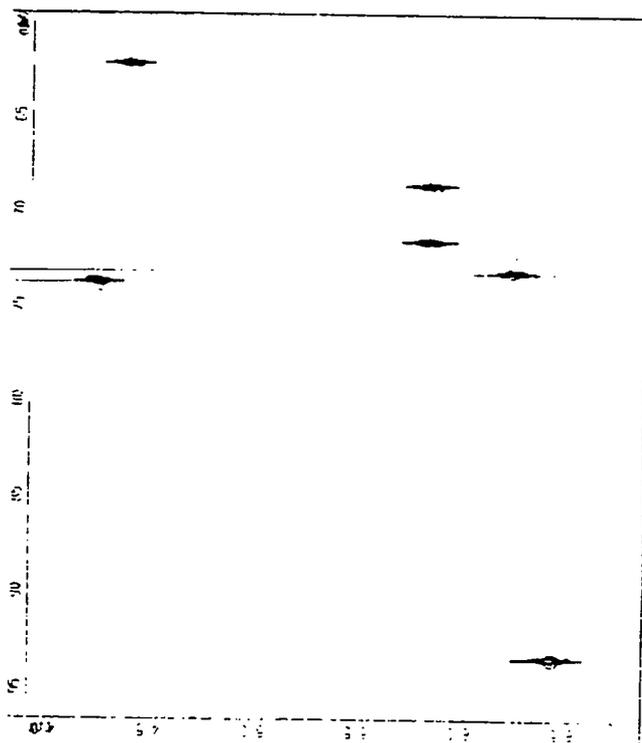
Spectrum 4-2. ^1H -NMR spectrum of PS3.



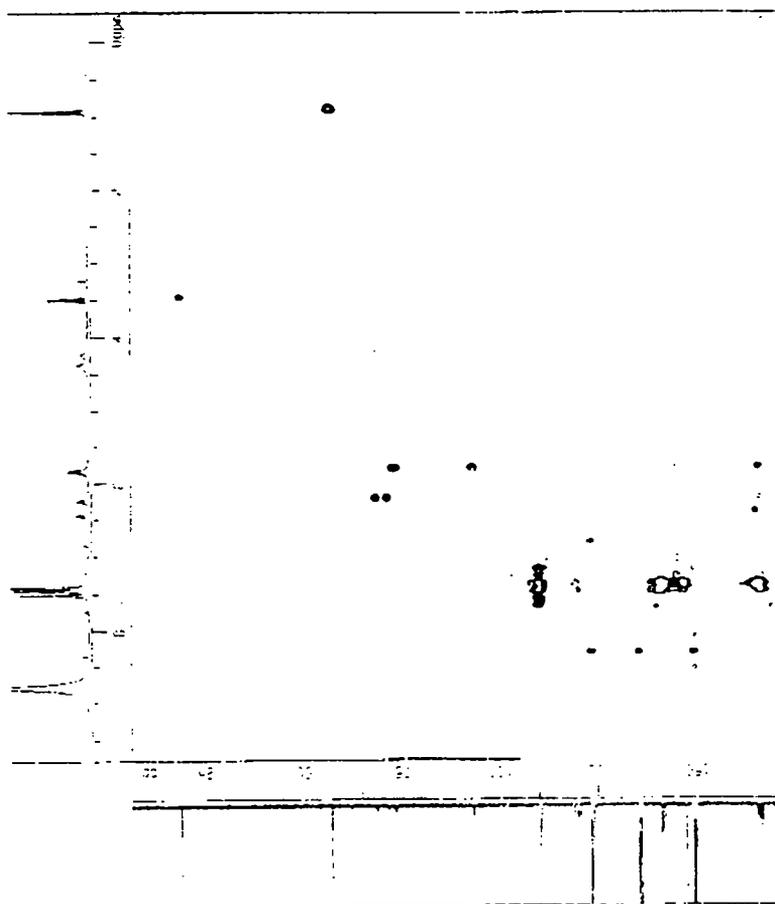
Spectrum 4-3. FAB⁻/MS spectrum of PS3.



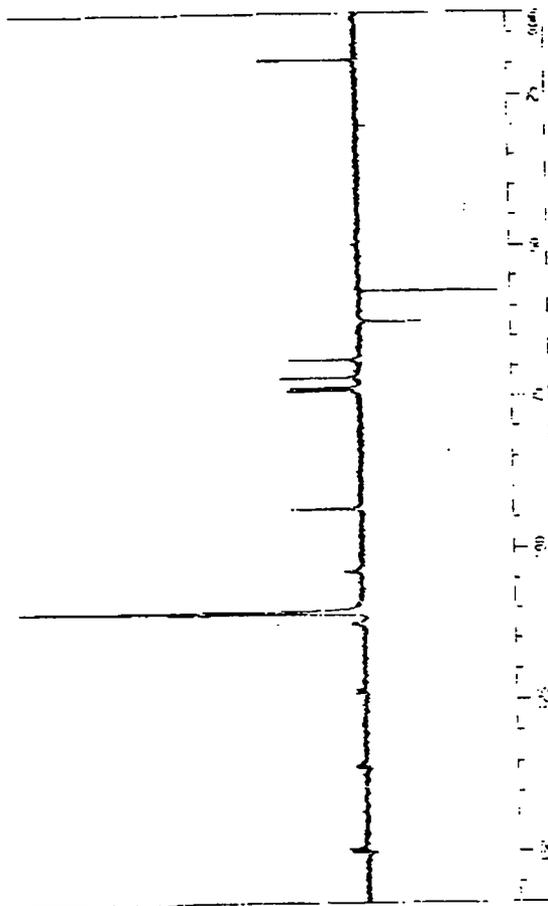
Spectrum 4-4. HETCOR spectrum of PS3.



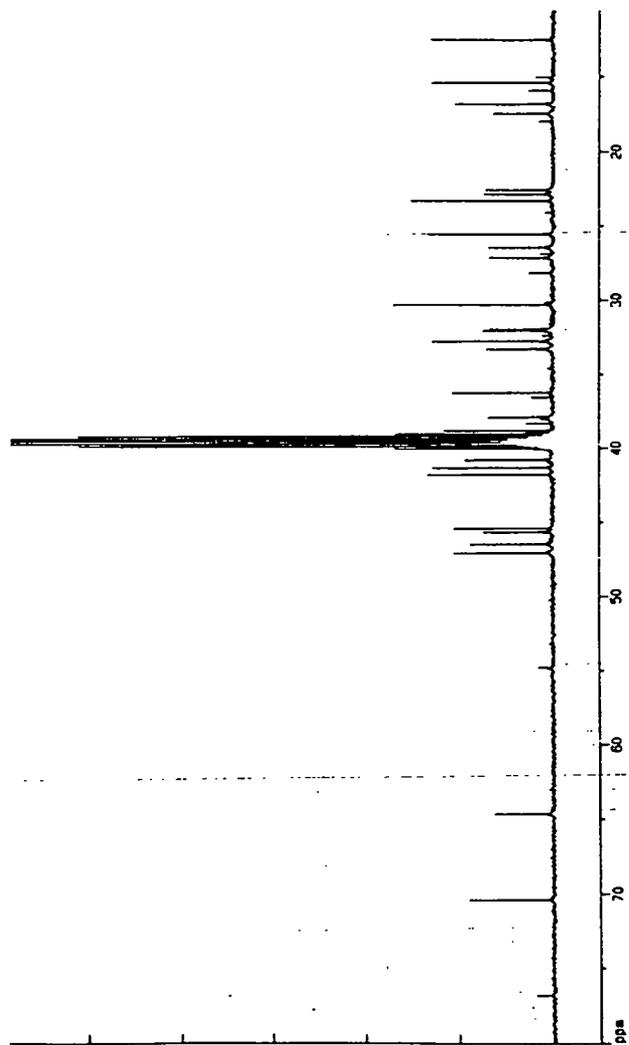
Spectrum 4-5. HMBC spectrum of PS3.



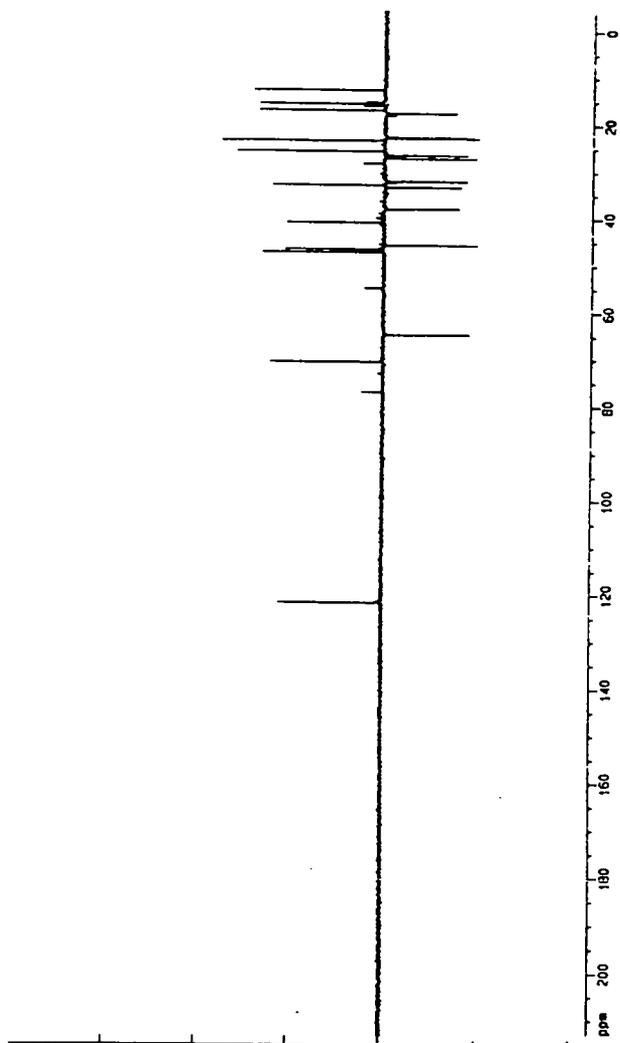
Spectrum 4-6. DEPT 135 spectrum of PS3.



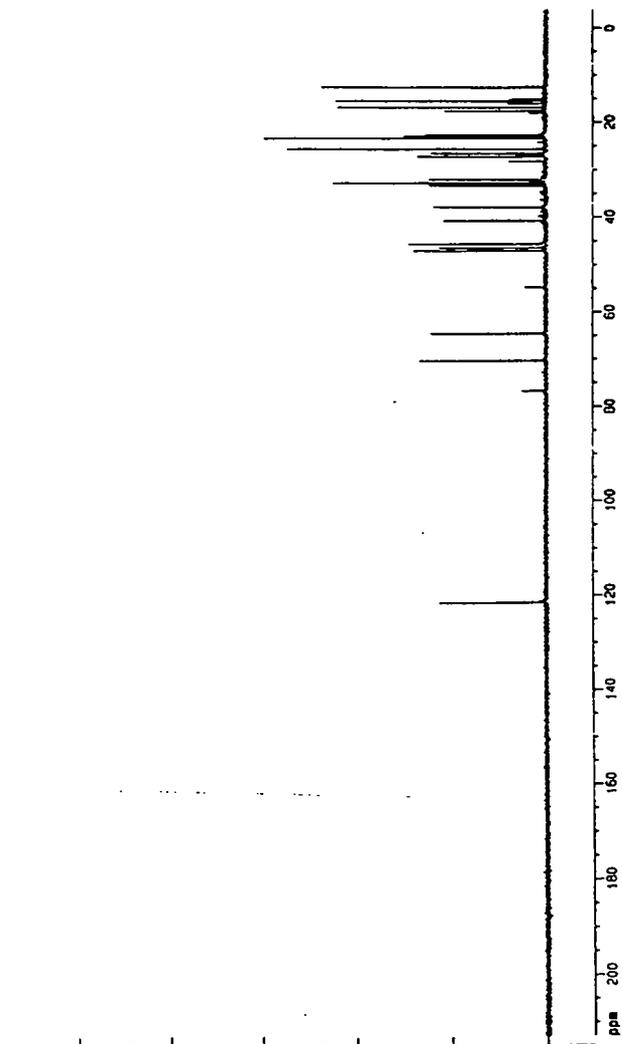
Spectrum 5-1. ^{13}C -NMR spectrum of AA1.



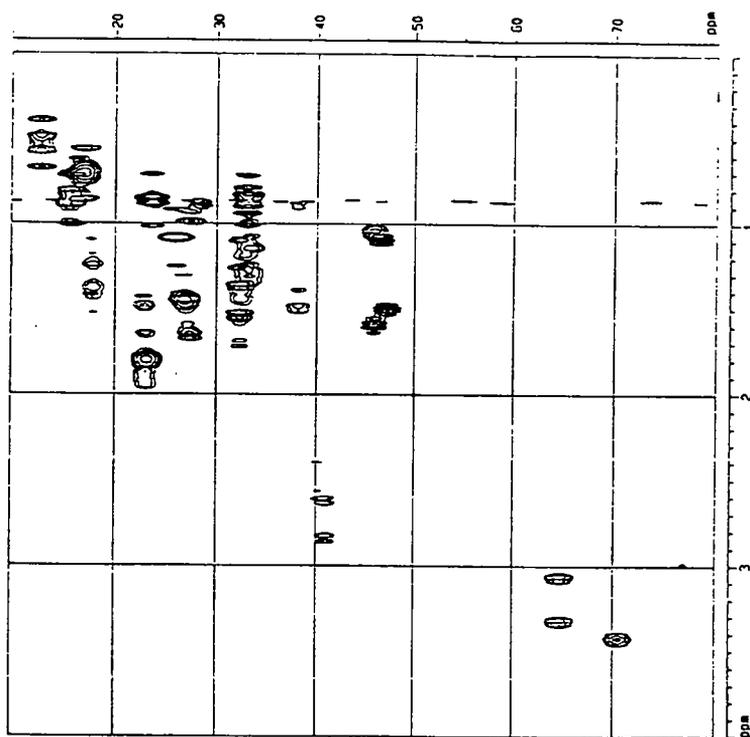
Spectrum 5-2. DEPT 135 spectrum of AA1.



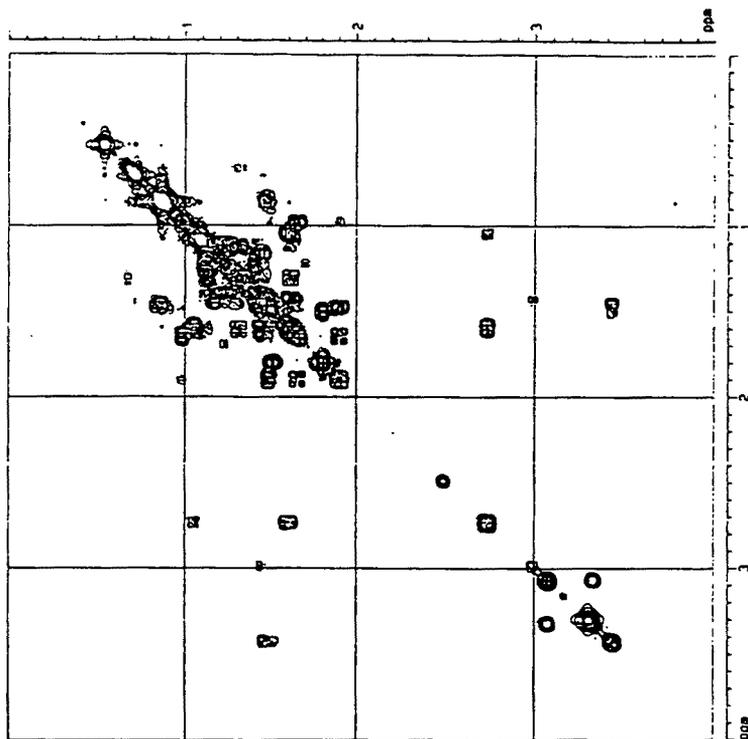
Spectrum 5-3. DEPT 45 spectrum of AA1.



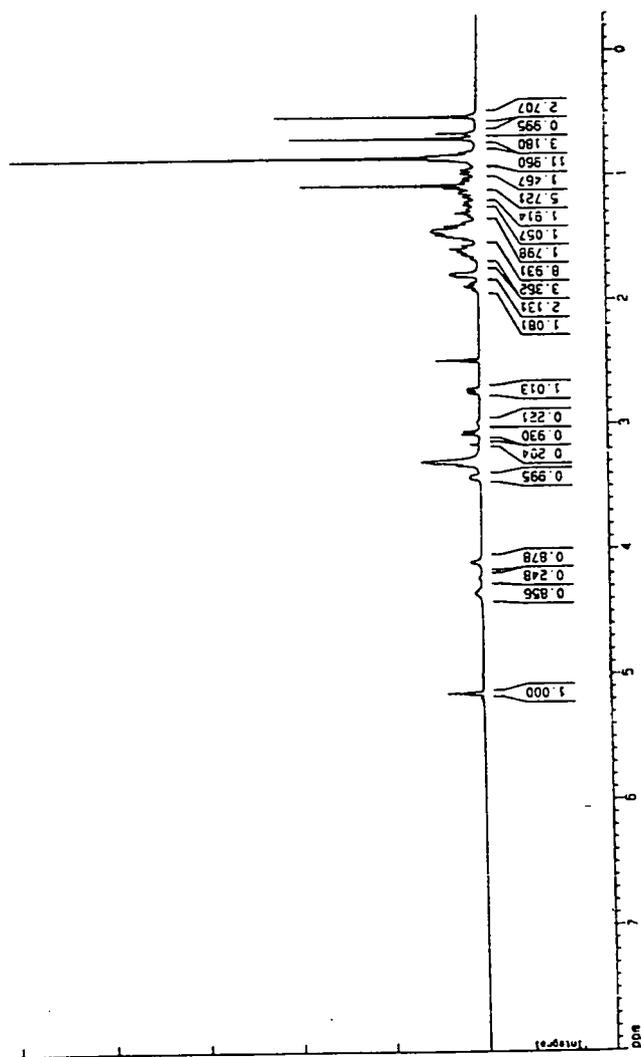
Spectrum 5-4. HMQC spectrum of AA1.



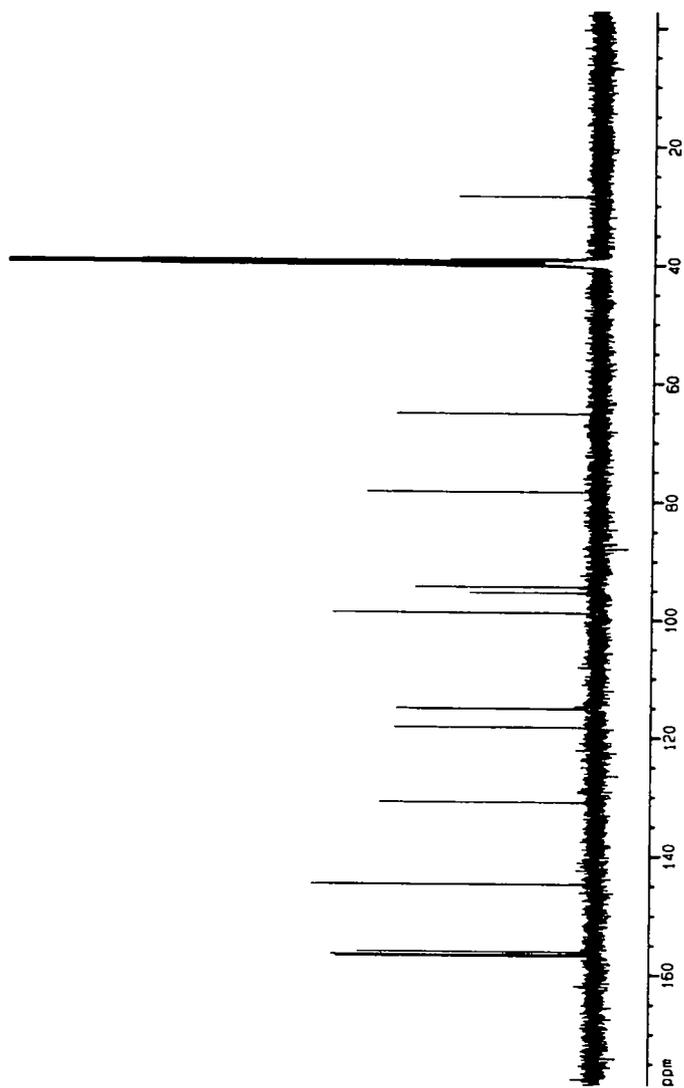
Spectrum 5-5. COSY spectrum of AA1.



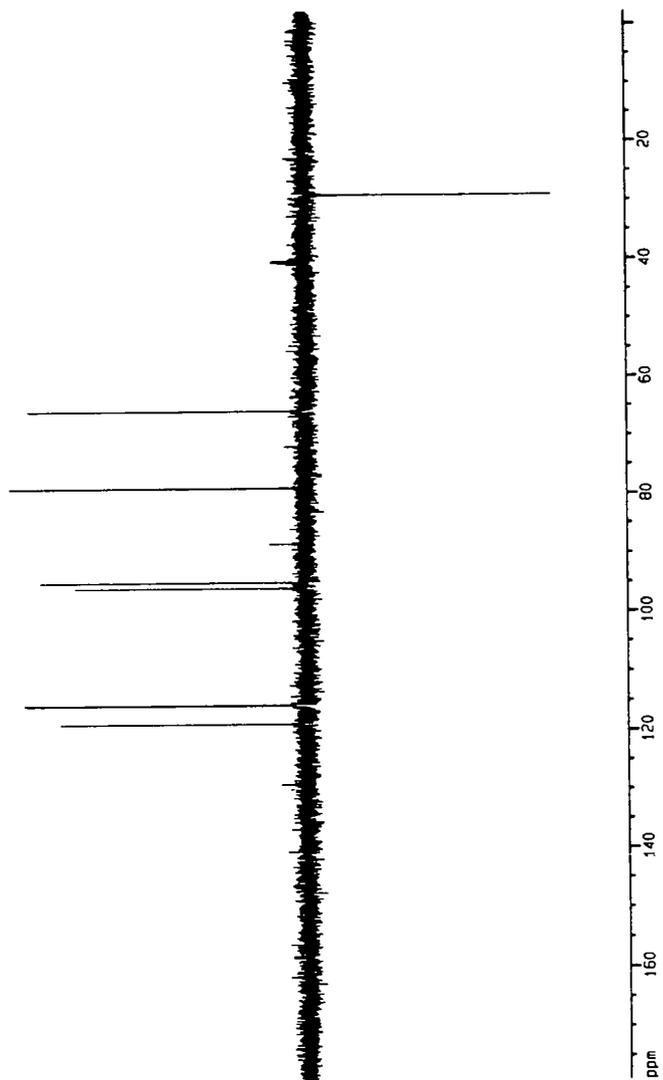
Spectrum 5-6. ^1H -NMR spectrum of AA1.



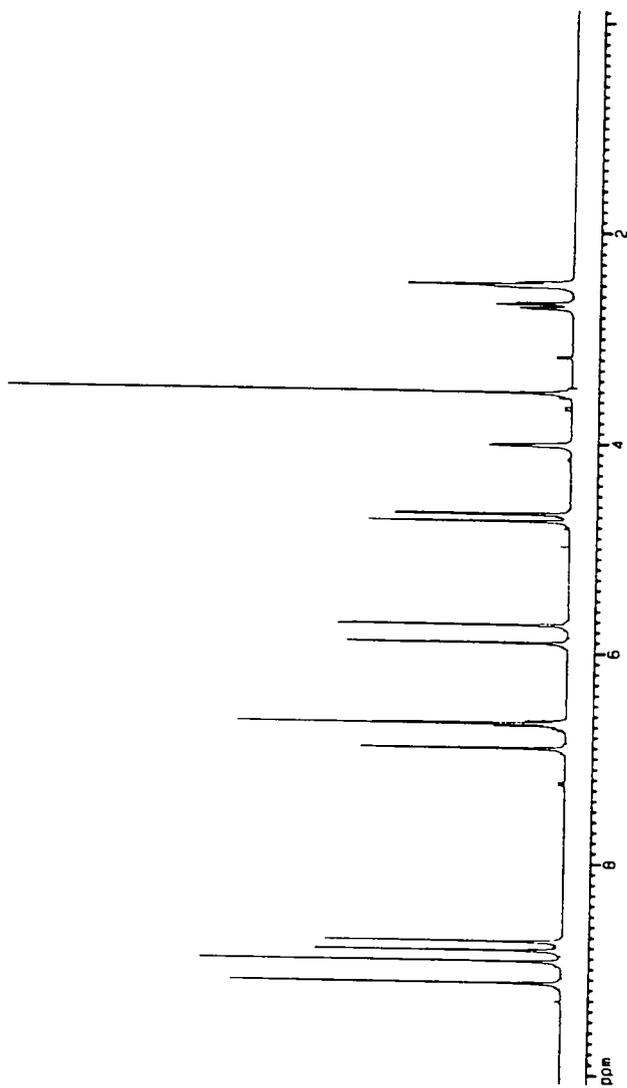
Spectrum 6-1. ^{13}C -NMR spectrum of CCl_4 .



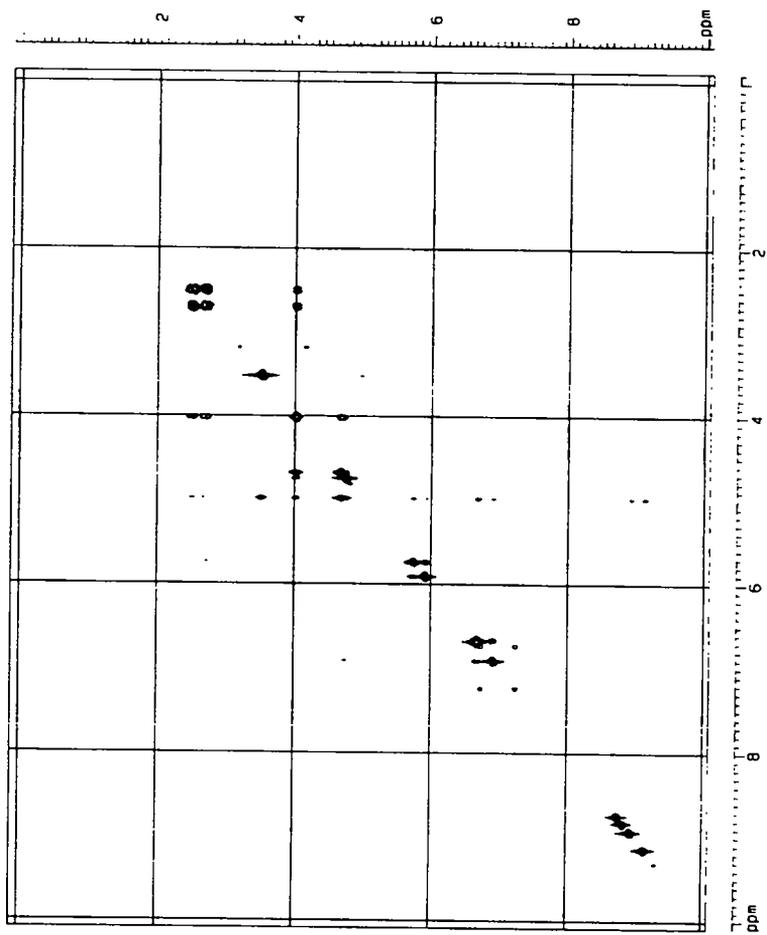
Spectrum 6-2. DEPT 135 spectrum of CCl.



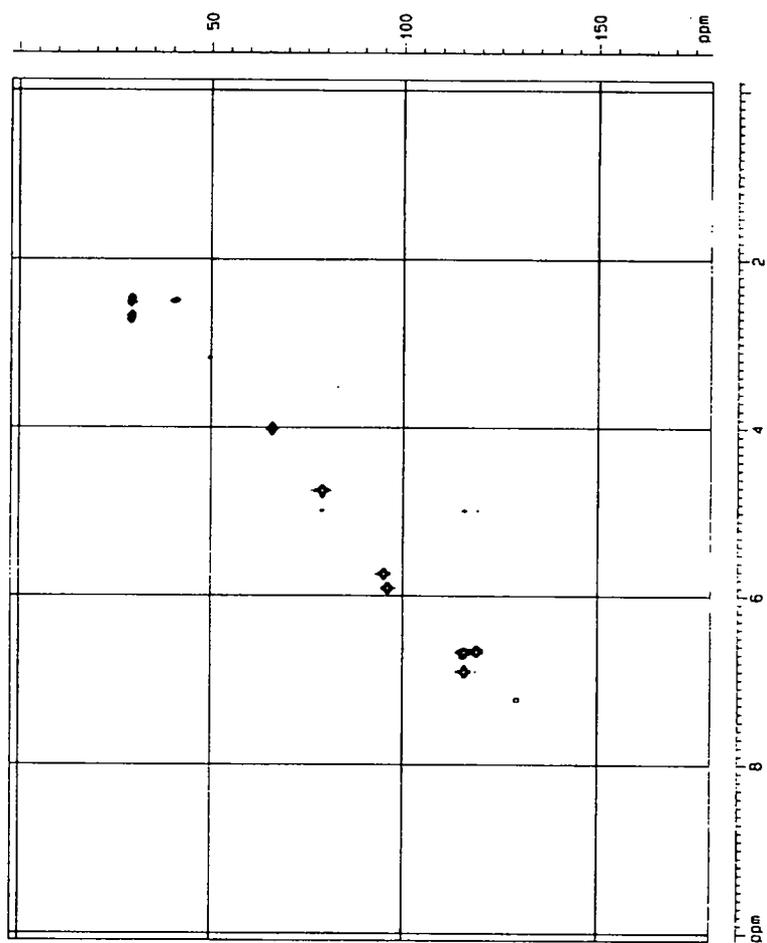
Spectrum 6-3. ^1H -NMR spectrum of CCl_4 .



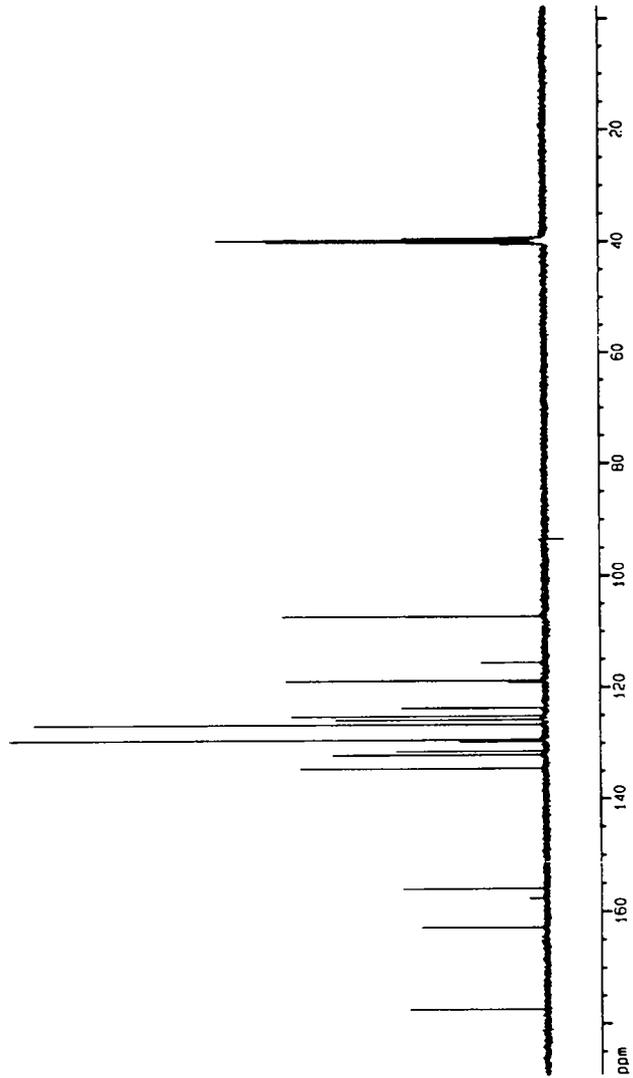
Spectrum 6-4. COSY spectrum of CCl.



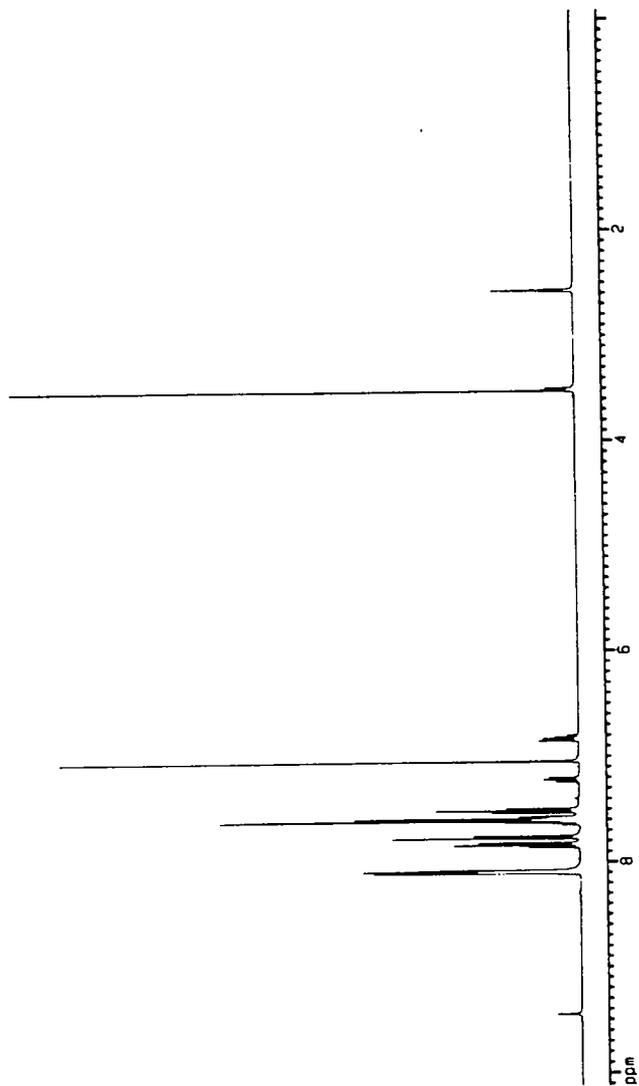
Spectrum 6-5. HMQC spectrum of CCl.



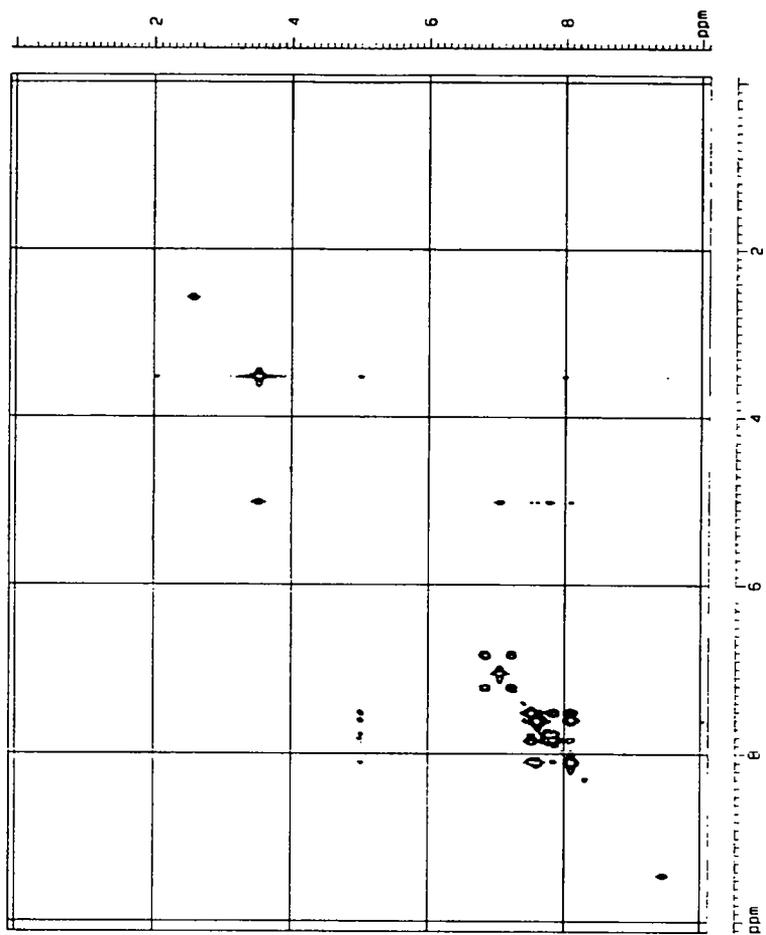
Spectrum 7-1. ^{13}C -NMR spectrum of AC2.



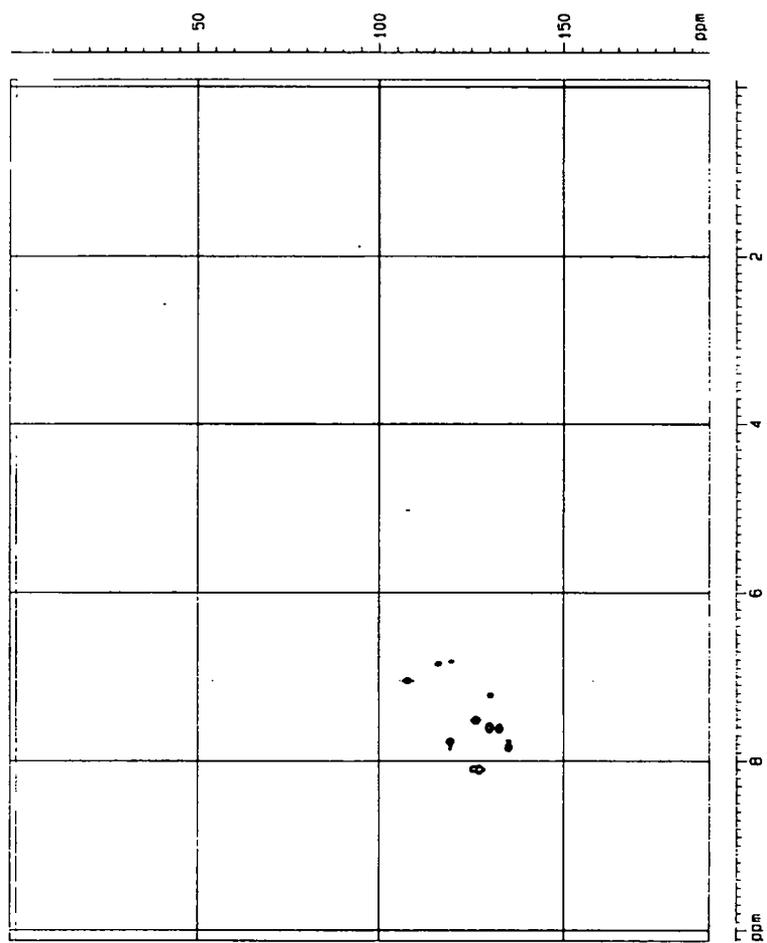
Spectrum 7-2. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of AC2.



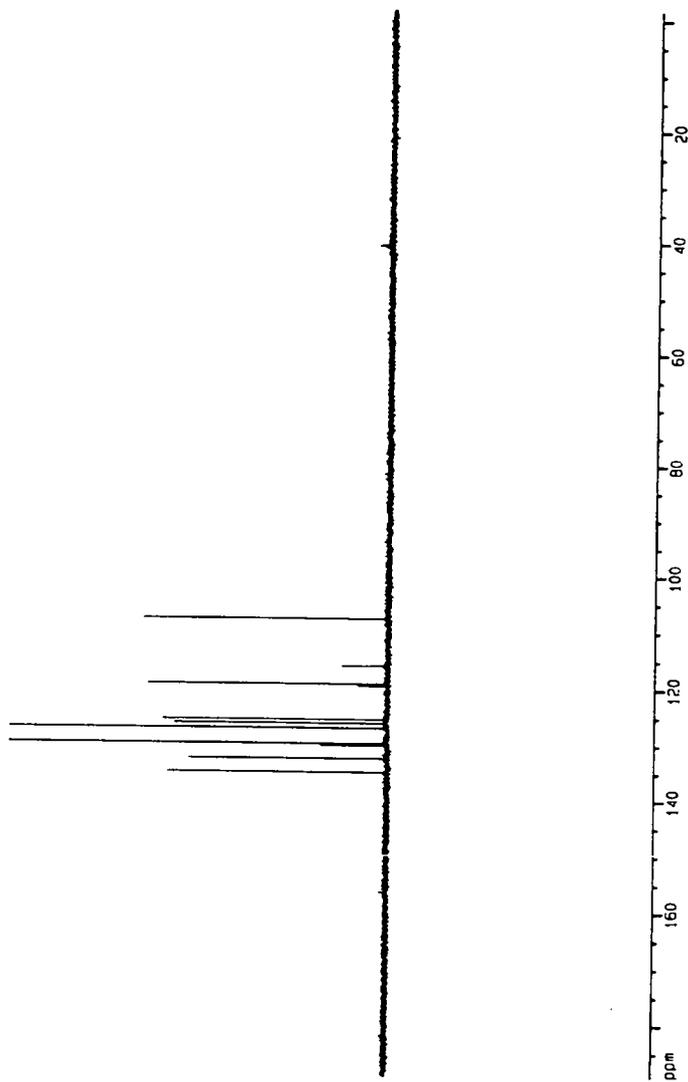
Spectrum 7-3. COSY spectrum of AC2.



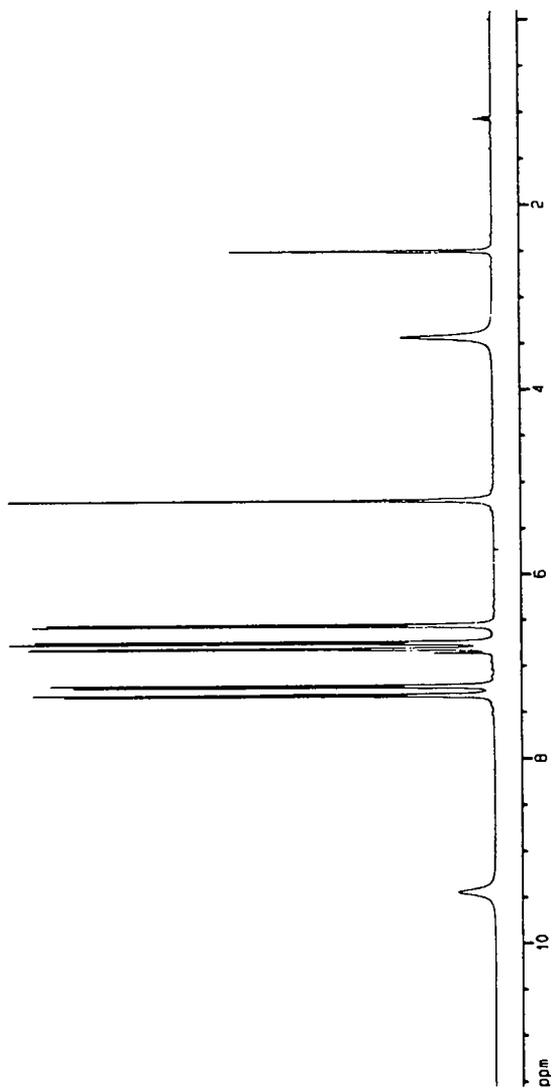
Spectrum 7-4. HMQC spectrum of AC2.



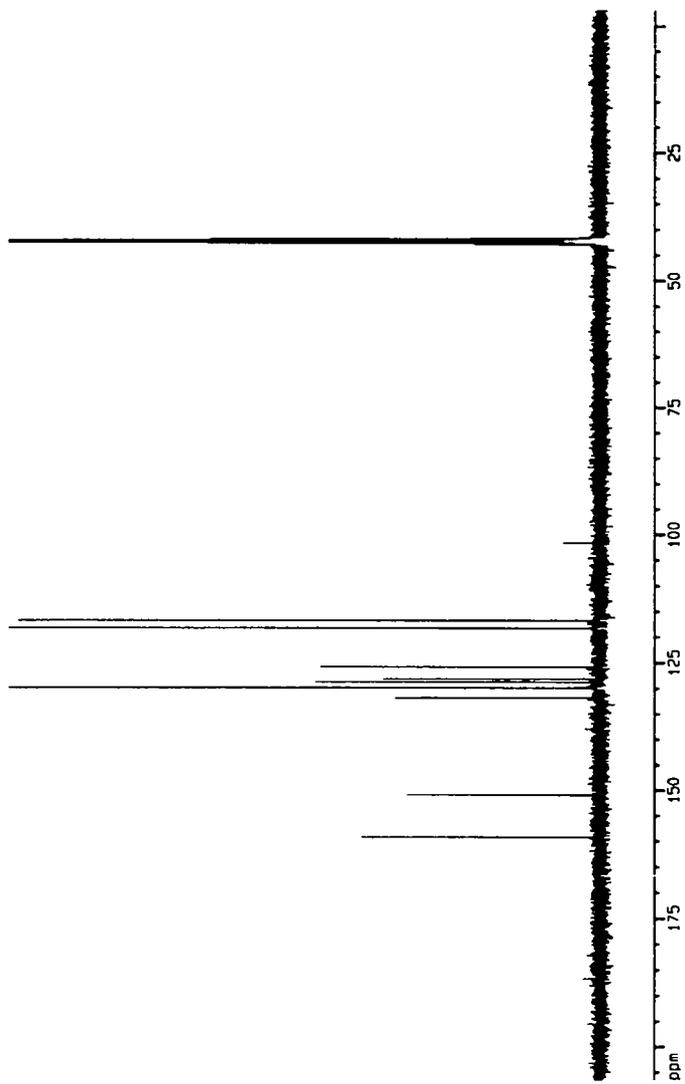
Spectrum 7-5. DEPT 135 spectrum of AC2.



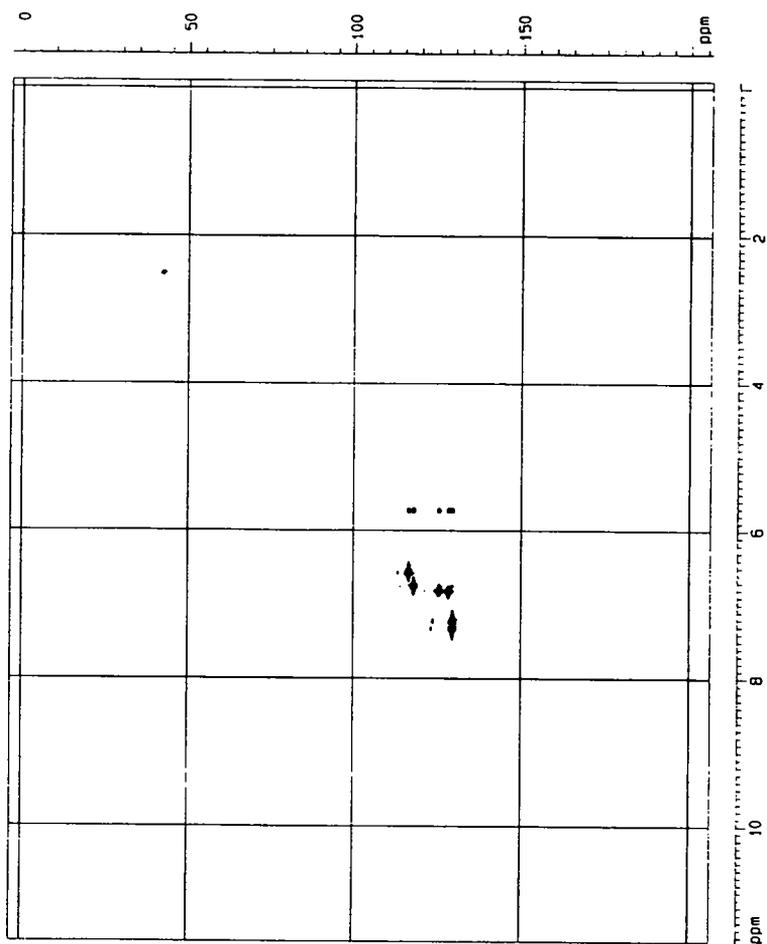
Spectrum 8-1. ¹H-NMR spectrum of MA2.



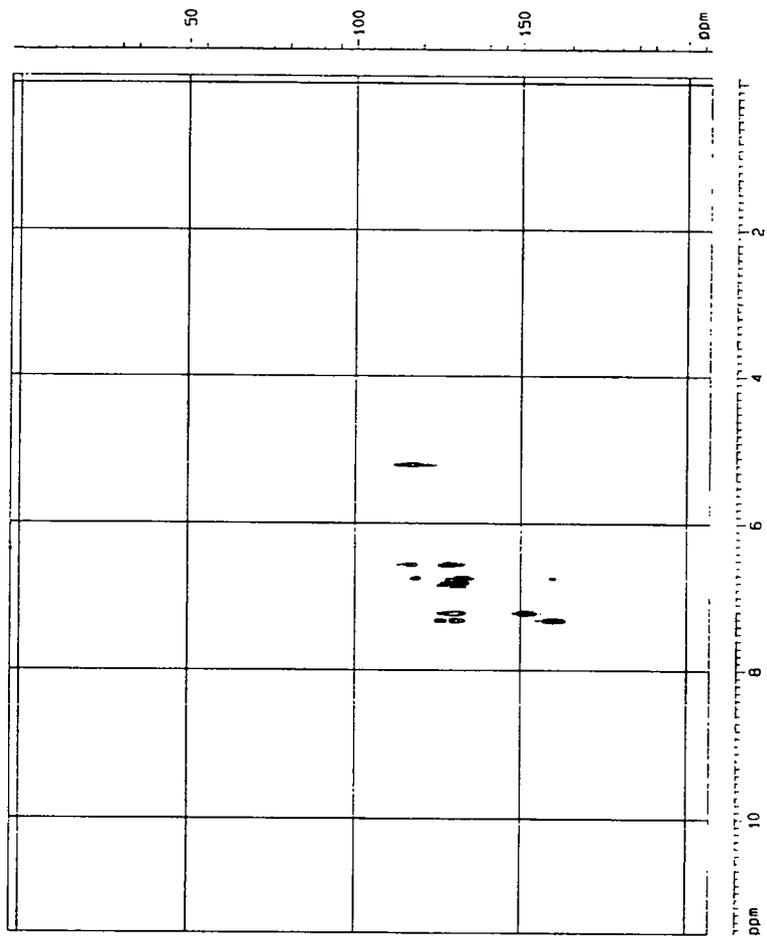
Spectrum 8-2. ^{13}C -NMR spectrum of MA2.



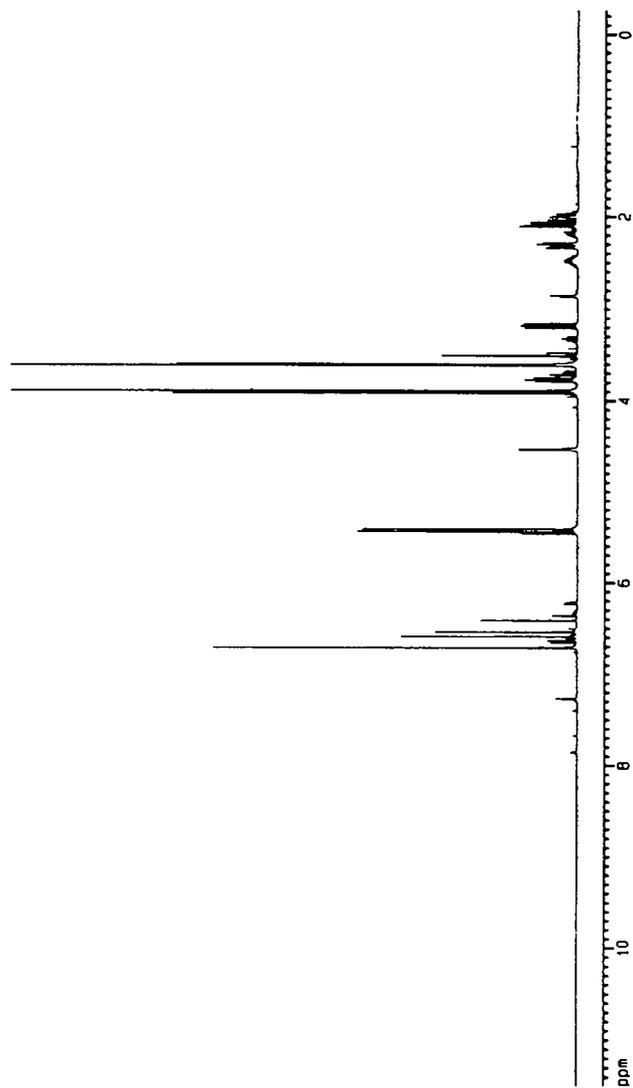
Spectrum 8-3. HMQC spectrum of MA2.



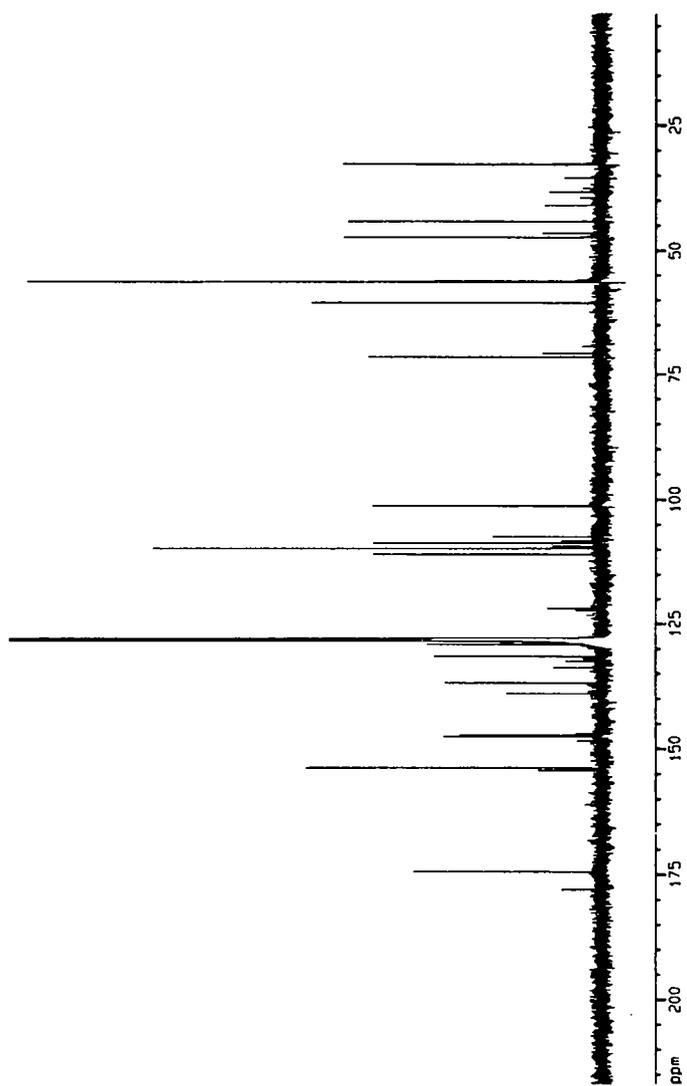
Spectrum 8-4. HMBC spectrum of MA2.



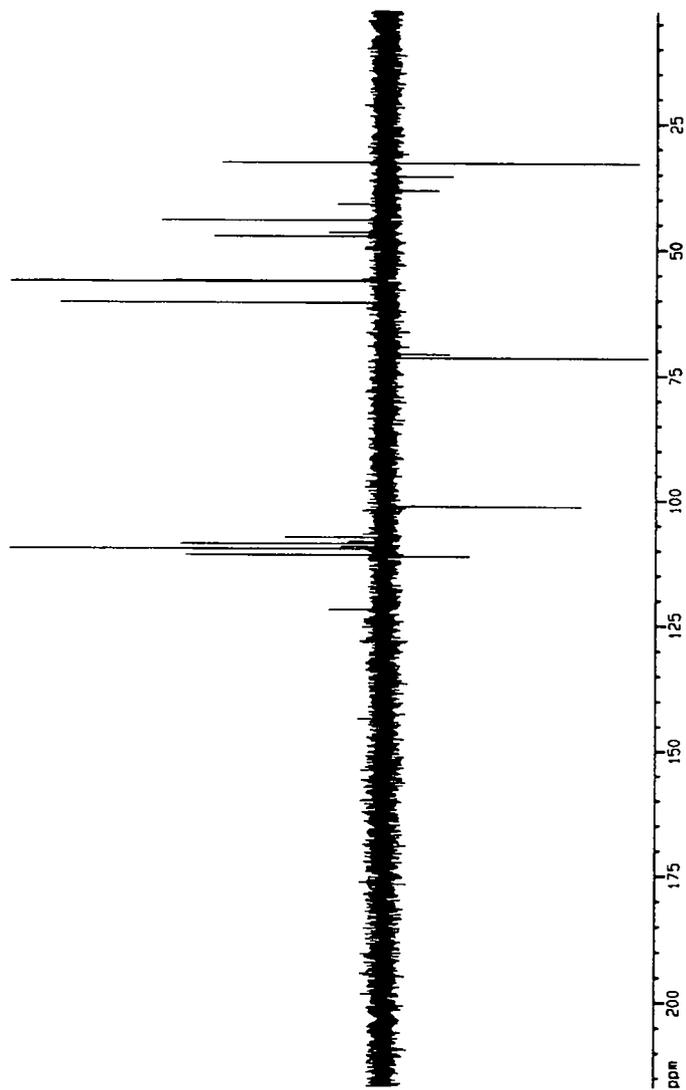
Spectrum 9-1. ^1H -NMR spectrum of AS2-3.



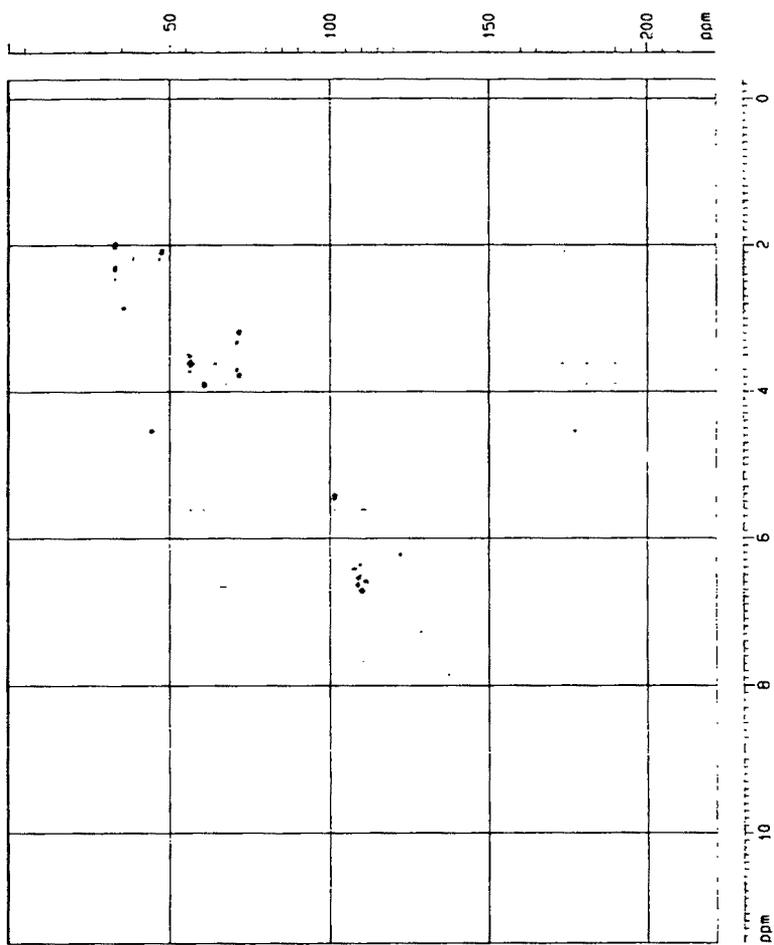
Spectrum 9-2. ^{13}C -NMR spectrum of AS2-3.



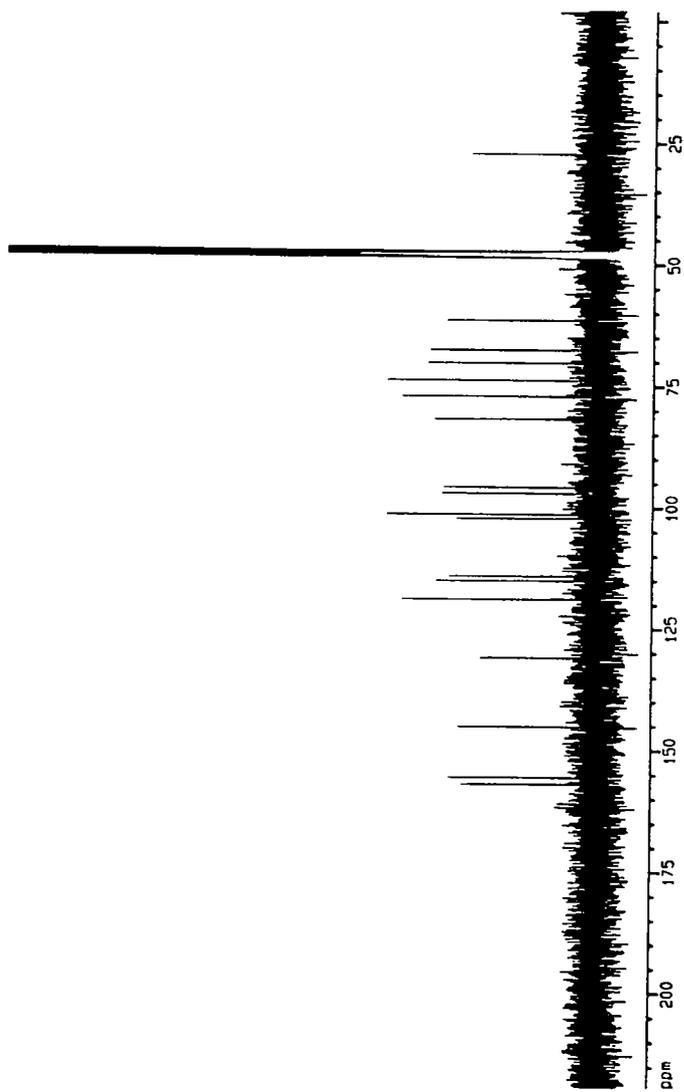
Spectrum 9-3. DEPT 135 spectrum of AS2-3.



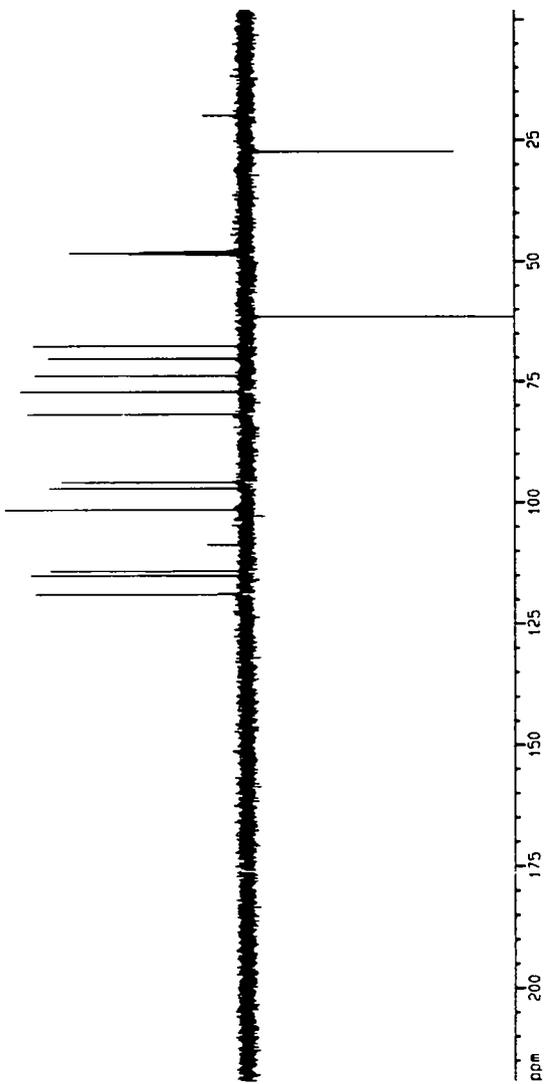
Spectrum 9-4. HMQC spectrum of AS2-3.



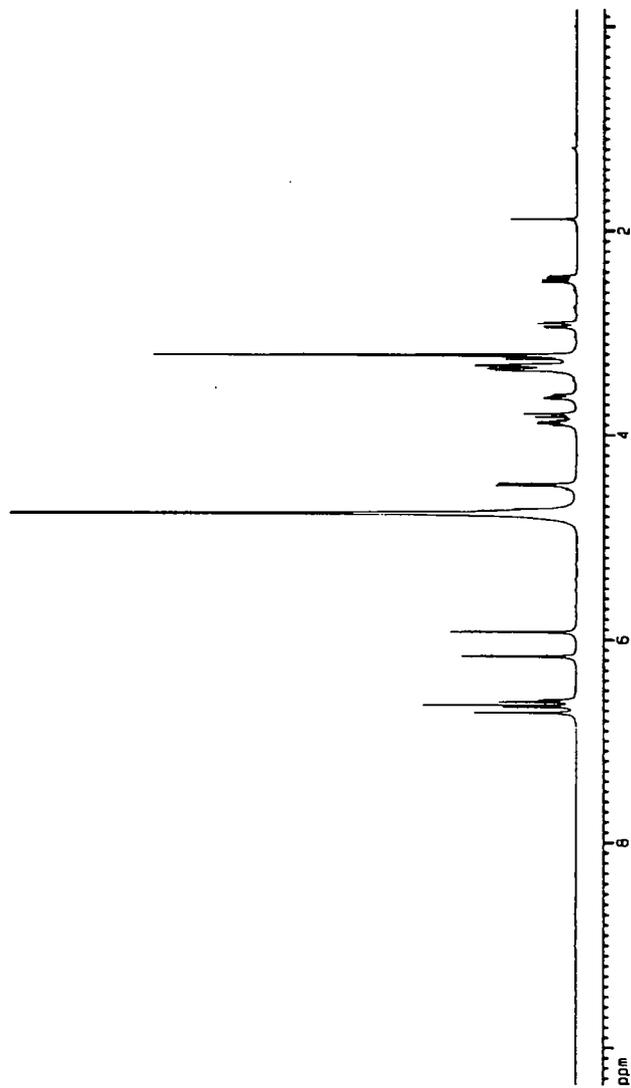
Spectrum 10-1. ^{13}C -NMR spectrum of PD2.



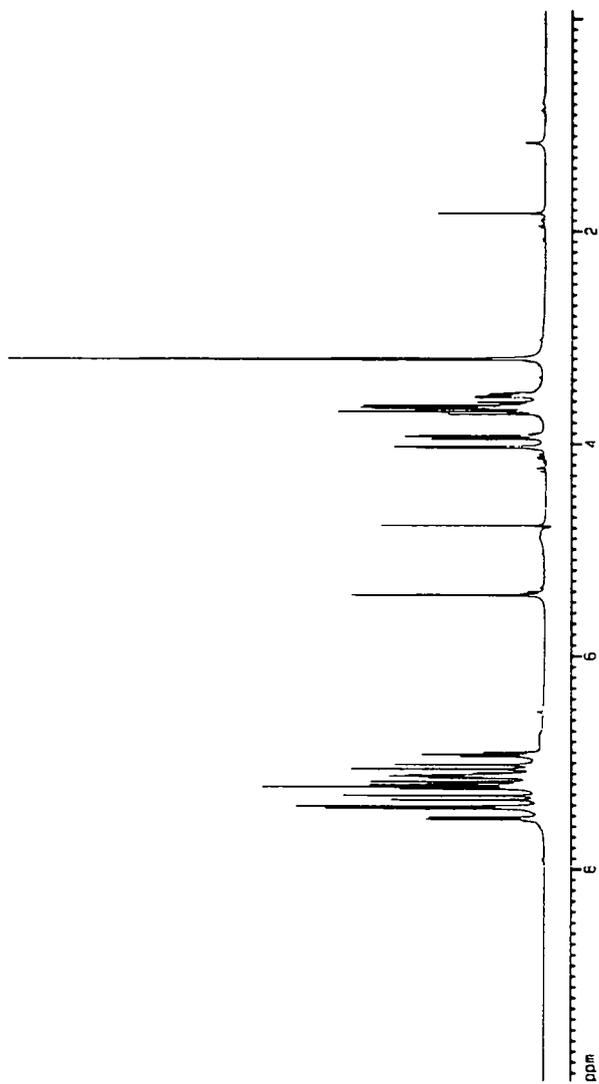
Spectrum 10-2. DEPT 135 spectrum of PD2.



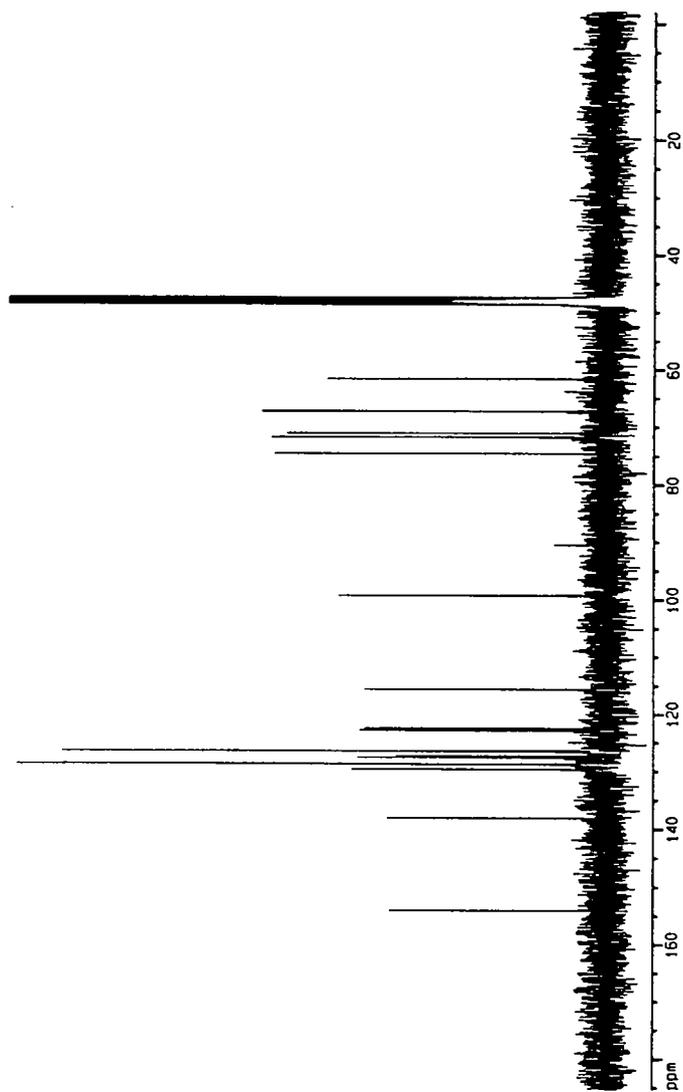
Spectrum 10-3. ^1H -NMR spectrum of PD2.



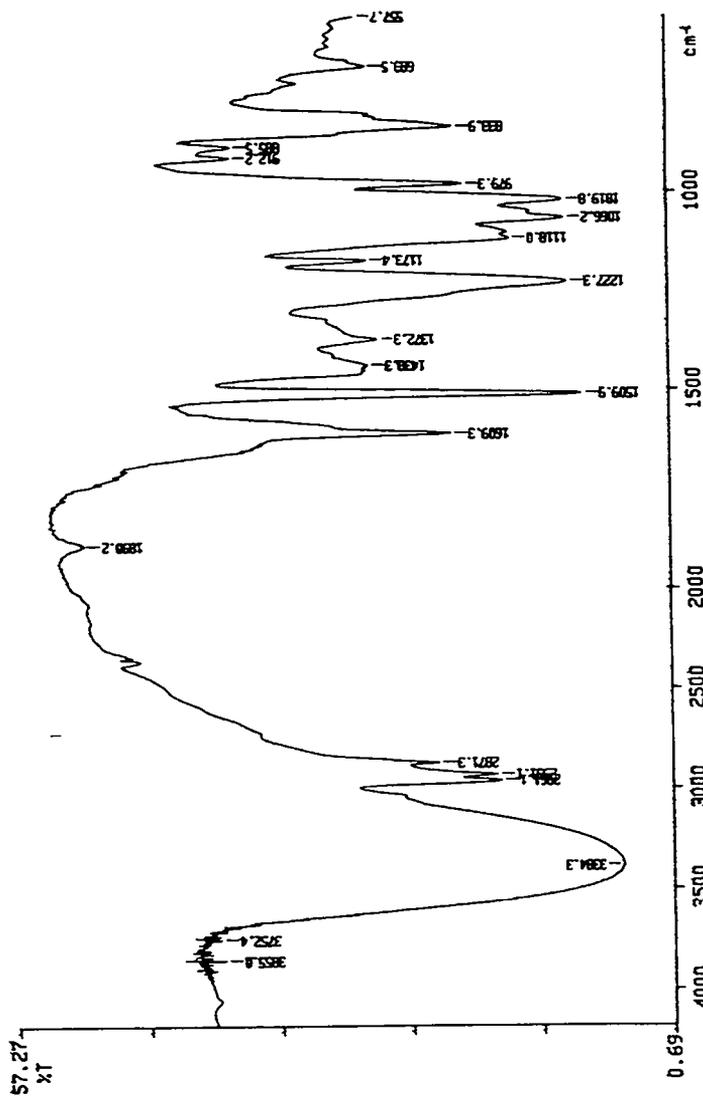
Spectrum (7)-1. ^1H -NMR spectrum of compound 7.



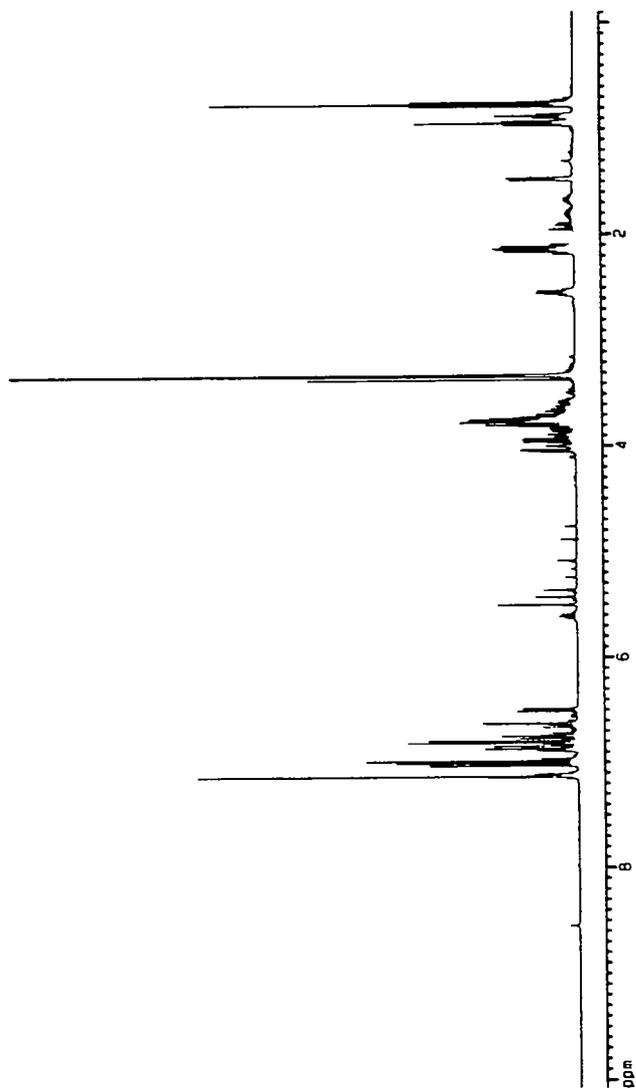
Spectrum (7)-2. ^{13}C -NMR spectrum of compound 7.



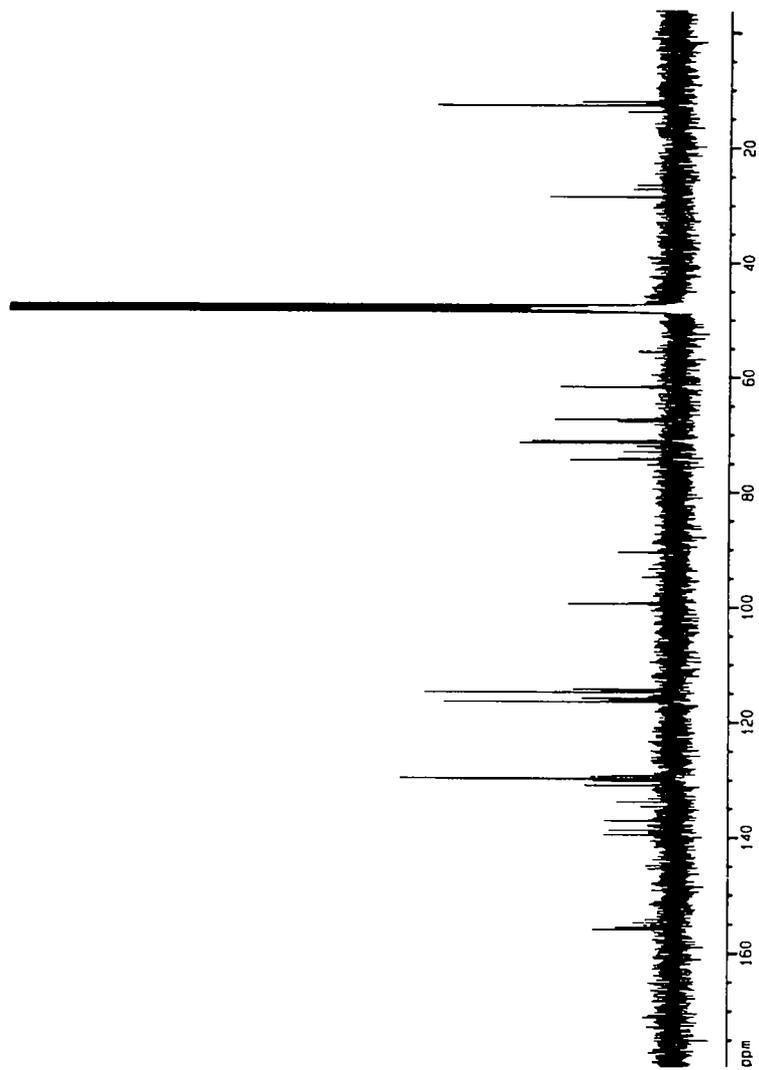
Spectrum (7)-3. FT/IR spectrum of compound 7.



Spectrum (9)-1. ^1H -NMR spectrum of compound 9.



Spectrum (9)-2. ^{13}C -NMR spectrum of compound 9.



Spectrum (9)-3. FT/IR spectrum of compound 9.

