

제비쑥 및 갯제비쑥의 다당류 분획 연구

송기원, 권학철, 김기탁, 김대근, 박종환, 이강노, 지옥표

성균관대학교 약학대학

The polysaccharide fractions of *Artemisia japonica* and *A. japonica* var. *macrocephala*

Ki Won Song, Hak Cheol Kwon, Ki Tack Kim, Dae Keun Kim,
Jong Hwan Kwak, Kang Ro Lee, Ok Pyo Zee

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746

ABSTRACT: Polysaccharide fractions from the leaves of *Artemisia japonica* (JJP) and *Artemisia japonica* var. *macrocephala*(SIP) were extracted and purified by DEAE Sepharose CL-6B ion exchange chromatography and Sephadex gel filtration (Sephadex HR S-300). The molecular weights of 8 fractions were determined by HPLC using standard dextrans, and the quantitative compositions by TLC and GC.

서론

최근들어서 천연물 기원의 다당체가 bioactive natural product의 중요한 군으로서 많은 관심을 갖고 연구하고 있다.¹⁾ 그 중 식물체에서 유래되는 다당류의 활성으로는 antitumor¹⁻⁵⁾, immunological⁶⁻⁹⁾, anticomplementary¹⁰⁾, anticoagulant, anti-inflammatory, hypoglycemic, antiviral activity¹¹⁾ 등이 연구되어 있다. 또한 본연구실에서 인진쑥 및 물쑥의 다당체분획은 면역활성작용이 우수하다고 보고한바 있다.¹²⁾

제비쑥(*Artemisia japonica*)은 산지에서 흔히 자라는 다년초로서 높이 30~90cm이다. 꽃은 7~9월에 피며 길이 2mm, 지름 1.5mm로서 난상 구형 또는 타원형으로 황록색이고 원줄기 끝의 원추화서에 달리며 화경은 길이 0.5~3mm이다.¹³⁾ 갯제비쑥(*Artemisia japonica* var. *macrocephala*)은 바닷가에서 자라는 다년초로서 높이 30~70cm 정도로 자란다. 두화는 약 2mm 넓이로 제비쑥에 비해 대형이고 잎은 호생하며 우상 또는 2회 우상으로 갈라지고 윤기가 있으며 두껍다. 민간에서 해열, 풍습, 이뇨, 황달, 종창 등의 치료로 진초를 약용하고 있다.¹⁴⁾

본 연구는 국내에 자생되는 *Artemisia*속 생약으로부터 간장치료제를 개발하고자하는 연구의 일환으로 물쑥 및 인진쑥의 다당류 연구에 계속하여¹⁵⁾ 국내에 흔히 자생되는 제비쑥 및 갯제비쑥으로부터 8종의 다당류를 분리 정제하여 분자량 및 당 조성을 연구하였기에 보고하고자 한다.

실험방법

시약 및 기기-column chromatography의 유출용매는 3차 증류수를 사용하였다. Size exclusion chromatography resin은 sepharose CL-2B 및 sephacryl HR S-300을 사용하였고, ion exchange chromatography resin은 DEAE-sepharose CL-6B(Pharmacia)를 사용하였다. 분자량 측정용 pullulan kit 와 당조성측정시 유도체 제조에 사용한 시약 및 그 외 시약은 sigma사로부터 구입하여 사용하였다. Ultrafiltration kit 는 Amicon사(USA), UV는 Novaspec II(Pharmacia), Gas Chromatograph 는 Varian 3400, HPLC pumps는 Gilson 306 pump(France), HPLC system controller 는 Gilson 506C interface(France), RI detector 는 Shodex RI-71를 각각 사용하였다.

실험재료-본 실험에 사용된 제비쭉은 1993년 경기도 수원 근교에서 약 1kg 채취하였으며, 갯제비쭉은 1995년 울릉도에서 약 1kg 채취하여 신선한 상태에서 잎 부위만을 세절하여 사용하였다.

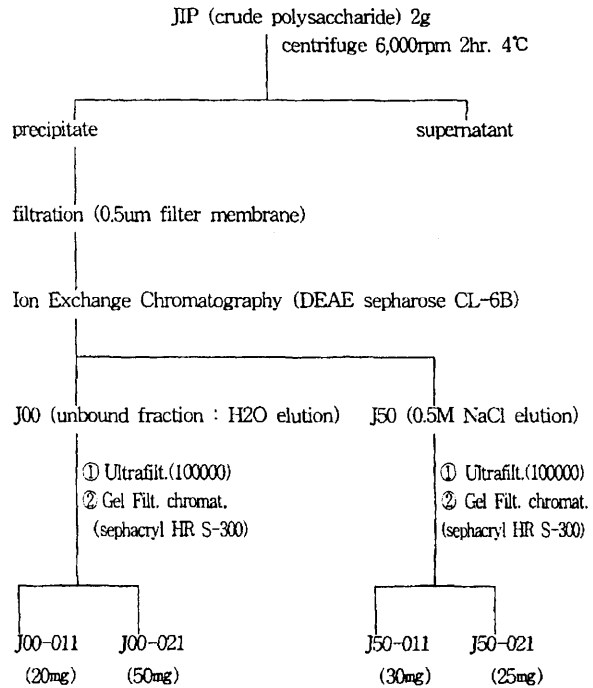
다당체 추출-잎을 세절한 후, 상온에서 에탄올로 2회 추출하여 유기층 분획으로 하였으며, 잔사를 건조시킨후 열탕의 증류수로 2회 추출하여 수층 분획으로 하였다. 수층 분획을 evaporator로 60℃로 감압상태에서 반 정도로 농축하여 2배량의 에탄올을 가하여 0℃에서 다당체를 침전시켜 다당체 분획으로 하였다.

다당체 정제-추출한 제비쭉 및 갯제비쭉 다당체 분획 각 2g을 6,000 rpm, 4℃에서 2시간 동안 원심분리하여 물에 불용성 물질을 제거하고 상등액을 취하여 0.5µm filter membrane으로 filtration하였으며 상등액을 농축하여 정제를 하였다(Scheme 1, 2). Carbohydrate assay는 phenol-sulfuric acid method를 이용하였고, Protein assay는 Bradford method를 사용하였다.

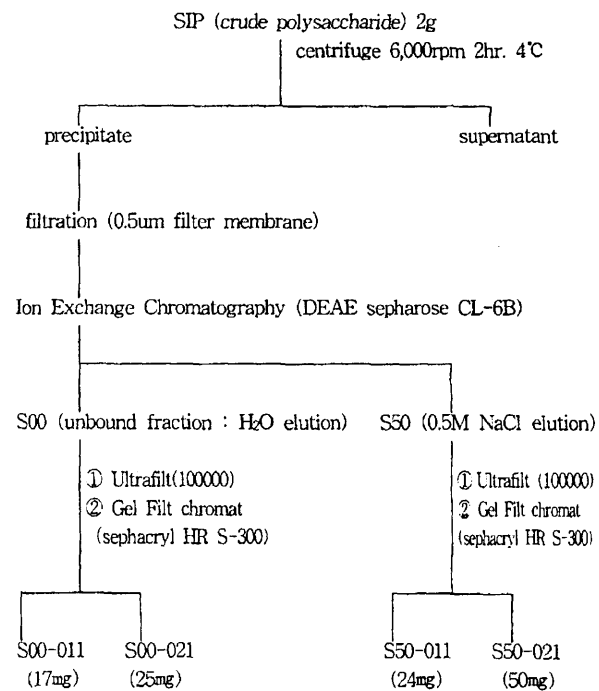
Ion-Exchange chromatography-제비쭉 및 갯제비쭉 다당체 분획 각 1g을 3차 증류수에 완전히 용해시킨 후 DEAE sepharose CL-6B(2.5 × 25cm) column에 loading하고, 0.5ml/min의 유속으로 stepwise salt elution하여 각각 unbound fraction인 J00, S00과 0.5M NaCl elution시 분리되는 bound fraction인 J50, S50으로 분획하였다. 당의 확인은 280nm 및 490nm(carbohydrate assay)에서 absorbance를 측정하여 확인하였다.

Gel-filtration on Sephacryl HR S-300 -Ion exchange chromatography로 분획한 제비쭉의 J00과 J50을 각각 분자량 cut-off 100,000 membrane으로 ultrafiltration하여 J00을 J00-01과 J00-02로, J50을 J50-01과 J50-02로 분획하였다. 네개의 fraction을 각각 gel filtration chromatography로 정제하였다. 네 개의 fraction을 각각 증류수에 녹여 sephacryl HR S-300(1.1 × 90 cm)에 loading하여, 0.1ml/min의 유속으로 3차 증류수로 elution하였다. 당의 확인은 490nm에서 absorbance를 측정하여 확인하였다. J00-01, J00-02, J50-01, J50-02에서 main fraction으로 각각 J00-011(Fig.1), J00-021(Fig.2), J50-011(Fig.3), J50-021(Fig.4)의 네개의 분획으로 나누어 진행하였다. 갯제비쭉의 경우도 제비쭉과 같은 방법으로 처리하여 S00을 S00-01과 S00-02로, S50을 S50-01과 S50-02로 분획하였으며 동일하게 정제하였다. S00-01, S00-02, S50-01, S50-02에서 main fraction으로 각각 S00-011(Fig.5), S00-021(Fig.6), S50-011(Fig.7),

S50-021(Fig.8)의 네개의 분획을 분리하여 실험을 진행하였다.



Scheme 1. Fractionation of *A. japonica*



Scheme 2. Fractionation of *Artemisia japonica* var. *macrocephala*

분자량 측정-HPLC를 이용하여 표준 Pullulan standard curve를 작성하고 다음의 조건에서 시료의 분자량을 측정하였다.

pump : Gilson 306 pump
column : Ultrahydrogel-Linear
flow rate : 0.5ml/min
mobile phase : 20mM Phosphate Buffer, pH 7.3
detector : Shodex RI-71
column temp : 35°C
standard pullulan : 788000, 404000, 212000, 112000, 47300, 11800, 5900

당 조성- 1)TLC :각분획을 각각 trifluoroacetic acid로 가수분해시켜 동결건조한 다음 95% ethyl alcohol에 녹여 D-Arabinose, D-Fructose, D-Galactose, α -D-Glucose, D-Mannose, D-Ribose, D-Xylose를 standard로 pyridine : ethyl acetate : acetic acid : H₂O = 36 : 36 : 7 : 21 의 전개 용매로 precoated cellulose F plate(layer thickness 0.1mm, Art. 5718, 20×20cm, Merck)에서 전개하여 당 조성을 확인하였다. spray solution : Aniline-Phthalic Acid reagent(Aniline phthalate reagent)

2)gas chromatography:확인된 당 조성을 정량적으로 분석하기위하여 각 분획 4mg을 trifluoroacetic acid(TFA)로 가수분해시킨 후 acetic anhydride를 1-methylimidazole을 촉매로 alditol acetate 유도체를 제조하여 dichloromethane에 녹여 GC로 그 조성을 분석하였다.

Gas chromatograph : Varian 3400
Injector temp. \ : 260°C
Detector temp. : 280°C
Column temp. : 200°C (1 min), 10°C/min, 220°C (25 min), 5 °C/min, 250°C
Column : SP-2330, Supelco.

결과 및 고찰

제비속 다당체 분획(JIP)을 DEAE-sepharose CL-6B를 사용하여 unbounded fraction인 J00과 0.5M NaCl elution시 유출되는 J50 fraction으로 분획하였다. J00과 J50을 각각 ultrafiltration kit를 사용하여, 분자량 cut-off 100,000과 1,000의 membrane으로 여과하였다. J00을 J00-01과 J00-02로 J50을 J50-01과 J50-02로 분획하였다. 4개의 분획에 대하여 sephacryl HR S-300을 사용하여 gel filtration chromatography를 하였다. 각각

에서 주 분획인 J00-011(Fig. 1), J00-021(Fig. 2), J50-011(Fig. 3), J00-021(Fig. 4)을 얻었고, 각 분획에 대하여 pullulan standard를 사용하여 HPLC에서 calibration curve를 작성하고 각각의 retention time을 기록하여 분자량을 측정하였다. J00-011은 36,000, J00-021은 1,000이하, J50-011은 96,000, J50-021 24,000으로 결정하였다.당 조성은 TLC와 gas chromatography를 사용하여 확인하였다. 즉, 4개 분획을 각각 trifluoroacetic acid를 이용하여 hydrolysis시킨 후, 95% ethyl alcohol에 녹여 arabinose, mannose, galactose, glucose, rhamnose, xylose의 단당류와 함께 TLC로 그 조성을 확인하였다. 확인된 조성의 정량을 위해 alditol acetate 유도체화 한 후 각각의 조성을 분석한 결과 J00-011은 arabinose, xylose, galactose가 각각 38.4, 33.8, 27.8%로, J00-021은 arabinose, galactose, mannose, glucose가 각각 24.5, 10.7, 24.1, 37.6%로, J50-011은 galactose, mannose, glucose가 각각 13.6, 53.6, 32.9%로, J50-021은 arabinose, xylose, galactose, rhamnose가 각각 24.4, 24.5, 33.8, 17.4%로 결정하였다.

갯제비속 다당체 분획(SIP)은 제비속과 동일하게 처리하여 S00-01, S00-02, S50-01과 S50-02로 분획하여 sephacryl HR S-300을 사용하여 gel filtration chromatography를 하였다. 각각에서 주 분획인 S00-011(Fig. 5), S00-021(Fig. 6), S50-011(Fig. 7), S00-021(Fig. 8)을 얻었고, 각 분획의 분자량은 J00-011 36,000, J00-021 1,000이하, J50-011 96,000, J50-021 24,000으로 결정하였다. 각분획의 당조성은 S00-011은 arabinose, galactose, mannose, glucose가 각각 14.1, 7.5, 34.1, 53.2%로, S00-021은 arabinose, xylose, galactose, mannose, glucose가 각각 14.8, 1.0, 5.2, 37.6, 41.4%로, S50-011은 Arabinose, Xylose, Galactose가 각각 38.6, 31.1, 30.3%로, S50-021은 arabinose, xylose, galactose, rhamnose가 각각 34.6, 27.1, 26.7, 11.6%로 결정하였다.

결론

제비속 다당체(JIP)와 갯제비속 다당체(SIP)를 각각 4개의 분획으로 나누어 분자량, 당 조성 및 함량비율을 측정하였다. 제비속에서 분리된 4개 분획에 대하여 분자량을 측정 한 결과 J00-011이 36,000, J00-021이 1,000이하, J50-011이 96,000, J50-021이 24,000으로 결정되었다.당 조성을 분석한 결과 J00-011이 arabinose,

xylose, galactose가 각각 38.4, 33.8, 27.8%로, J00-021이 arabinose, galactose, mannose, glucose가 각각 24.5, 10.7, 24.1, 37.6%로, J50-011이 galactose, mannose, glucose가 각각 13.6, 53.6, 32.9%로, J50-021이 arabinose, xylose, galactose, rhamnose가 각각 24.4, 24.5, 33.8, 17.4%로 확인하였다. 갯제비썩에서 분리된 4개 분획에 대하여 분자량을 측정 한 결과 S00-011과 S00-021이 5,000이하, S50-011이 80,000, S50-021이 31,000으로 결정하였다. 당 조성은 S00-011이 arabinose, galactose, mannose, glucose가 각각 14.1, 7.5, 34.1, 53.2%로, S00-021이 arabinose, xylose, galactose, mannose, Glucose가 각각 14.8, 1.0, 5.2, 37.6, 41.4%로, S50-011이 arabinose, xylose, galactose가 각각 38.6, 31.1, 30.3%로, S50-021이 arabinose, xylose, galactose, rhamnose가 각각 34.6, 27.1, 26.7, 11.6%로 확인하였다. 각분획에 대한 당의 결합양식 및 간활성연구는 더욱 수행되어야 하겠다.

감사의 말씀

본연구는 95년도 보건의료기술연구개발사업의 지원 및 일부 성균관대학교 약학연구소의 지원에 의하여 이루어진 것이며, 연구비지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Srivastava,R. and Kulshreshtha,D.K., *Phytochemistry*, 28(11), 2877 (1989)
2. Tsukagoe. S., *Hakko Tokogyo* 36, 184 (1978), *Chem. Abs.* 88. 150253r.
3. Yang. Shih-Yung and Yu, Li-Chien, *Shan-hsi Hsin I Yao* 8, 37 (1980) *Chem. Abs.* 93, 60643s.
4. Miyazaki, T., *Gendai Toyo Igaku* 4, 61 (1983), *Chem. Abs.* 99, 15927a.
5. Lee, Kuo Hsiung, Kao hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih. 3, 234 (1987), *Chem. Abs.* 107, 51203d.
6. Jacques, Pierre, J., *Dev. Immunol.* 17, 429 (1982), *Chem. Abs.* 97, 207510q.
7. Ovodov, Yu. S. Ovodova, R. G. and Loenko, Yu, N., *Khim. Prir. Soedin* 6, 675 (1983)
8. Li, Zhaolan, *Wesheng wuxue Tongbao* 10, 222 (1984), *Chem. Abs.* 100, 131861n.
9. Yamada, H., *Gendai Toyo Igaku* 7, 89 (1987),

- Chem. Abs.* 106, 148818a.
10. Yamada, H., *Kagaku to Seibutsu* 24, 701 (1987), *Chem. Abs.* 106, 125749q.
11. Ehresmann, D. W., Deig, E. F. and Hatch, M. T., *Mar. Algae Pharm. Sci.* 293 (1979)
12. Koo,K.A., Kwak,J.H.,Lee,K.R., Zee,O.P., Woo,E.R., Park,H.K. and Youn,H.J., *Arch.Pharm.Res.*, 17(5),371(1994)
13. 이창복 ; *대한식물도감*, 향문사, 758 (1982)
14. 이창복 ; *대한식물도감*, 향문사, 756 (1982)
15. 이강노,지옥표,곽종환,김영식,박호군,구경아,윤현주.,*생약학회지*, 24(4),289(1993)

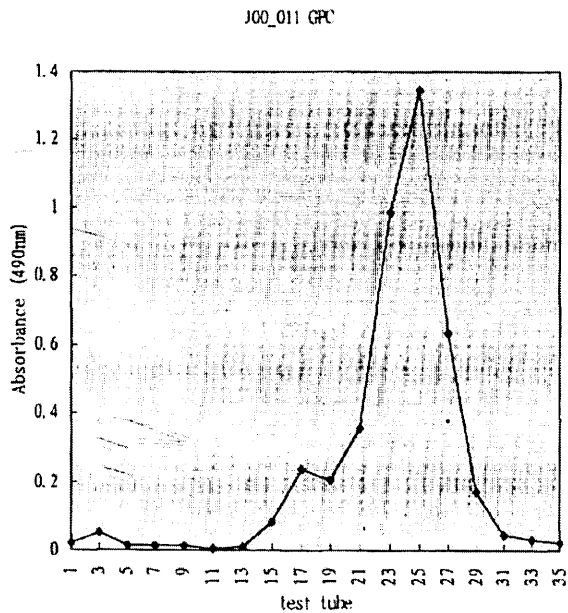


Fig. 1. J00-011 Gel filtration chromatogram.

Gel filtration of J00-01/DEAE unbound fraction on Sephacrl HR S-300. The Sephacryl HR S-300 column(1.1×90cm) was equilibrated with H₂O and elution was performed with H₂O. Carbohydrate, 490nm(●)

J00_021 GPC

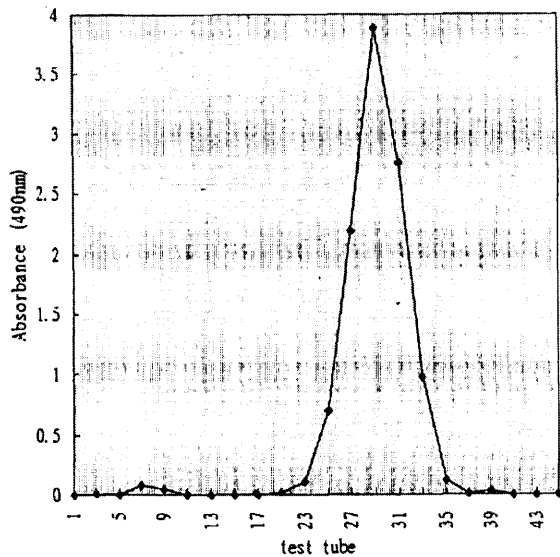


Fig. 2. J00-021 Gel filtration chromatogram.

Gel filtration of J00-01/DEAE unbound fraction on Sephacrl HR S-300. The Sephacryl HR S-300 column(1.1×90cm) was equilibrated with H₂O and elution was performed with H₂O. Carbohydrate, 490nm(●)

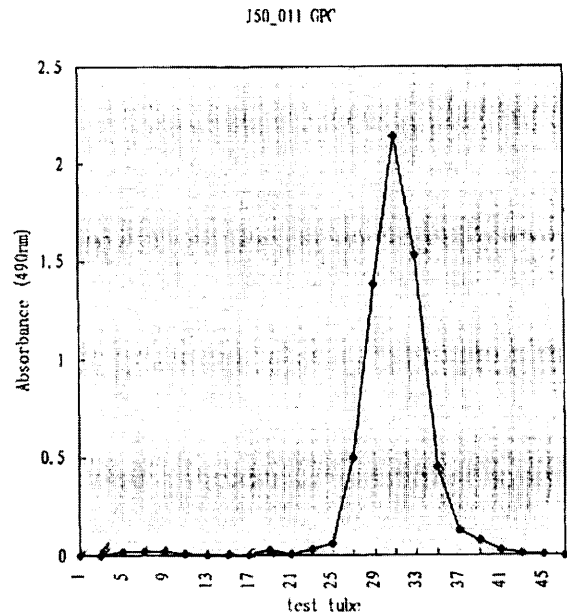


Fig. 3. J50-011 Gel filtration chromatogram.

Gel filtration of J50-01/DEAE unbound fraction on Sephacrl HR S-300. The Sephacryl HR S-300 column(1.1×90cm) was equilibrated with H₂O and elution was performed with H₂O. Carbohydrate, 490nm(●)

J50_021 GPC

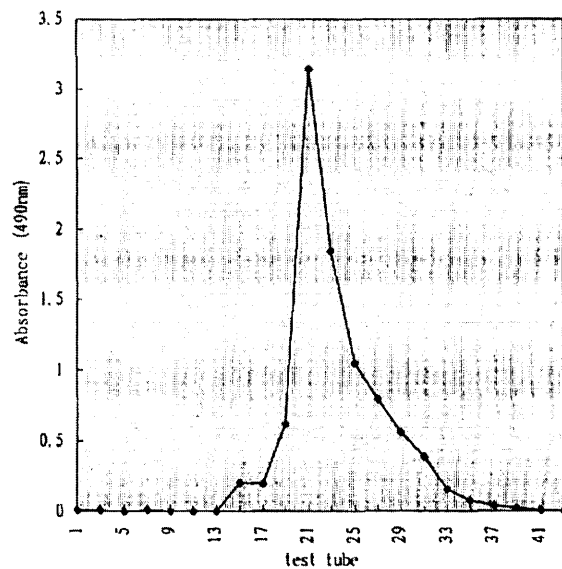


Fig. 4. J50-021 Gel filtration chromatogram.

Gel filtration of J50-02/DEAE unbound fraction on Sephacrl HR S-300. The Sephacryl HR S-300 column(1.1×90cm) was equilibrated with H₂O and elution was performed with H₂O. Carbohydrate, 490nm(●)

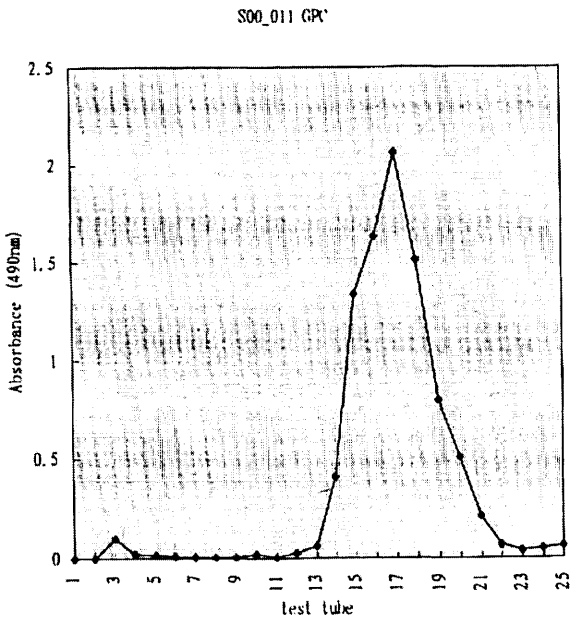


Fig. 5. S00-011 Gel filtration chromatogram. Gel filtration of S00-01/DEAE unbound fraction on Sephacrl HR S-300. The Sephacryl HR S-300 column(1.1×90cm) was equilibrated with H₂O and elution was performed with H₂O. Carbohydrate, 490nm(●)

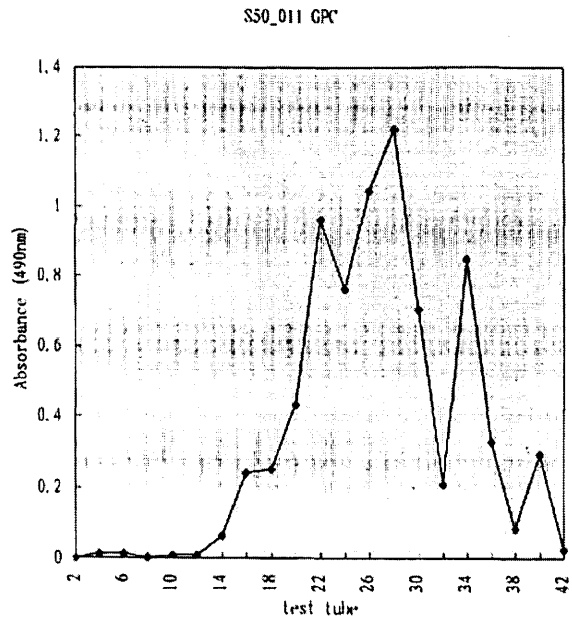


Fig. 7. S50-011 Gel filtration chromatogram. Gel filtration of S50-01/DEAE unbound fraction on Sephacrl HR S-300. The Sephacryl HR S-300 column(1.1×90cm) was equilibrated with H₂O and elution was performed with H₂O. Carbohydrate, 490nm(●)

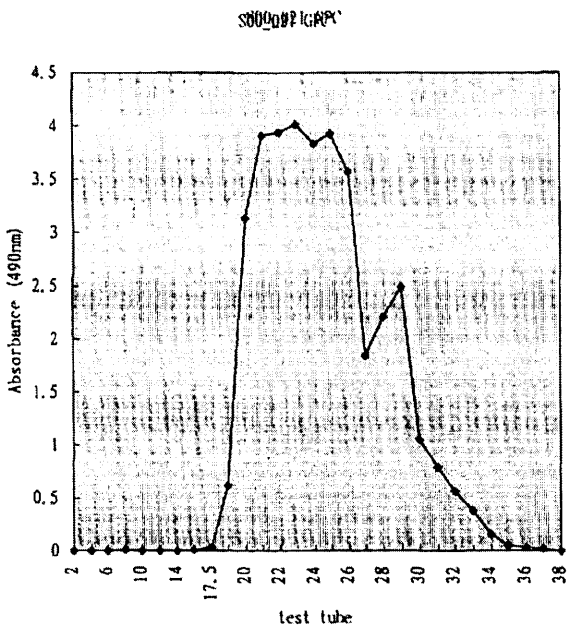


Fig. 6. S00-021 Gel filtration chromatogram. Gel filtration of S00-02/DEAE unbound fraction on Sephacrl HR S-300. The Sephacryl HR S-300 column(1.1×90cm) was equilibrated with H₂O and elution was performed with H₂O. Carbohydrate, 490nm(●)

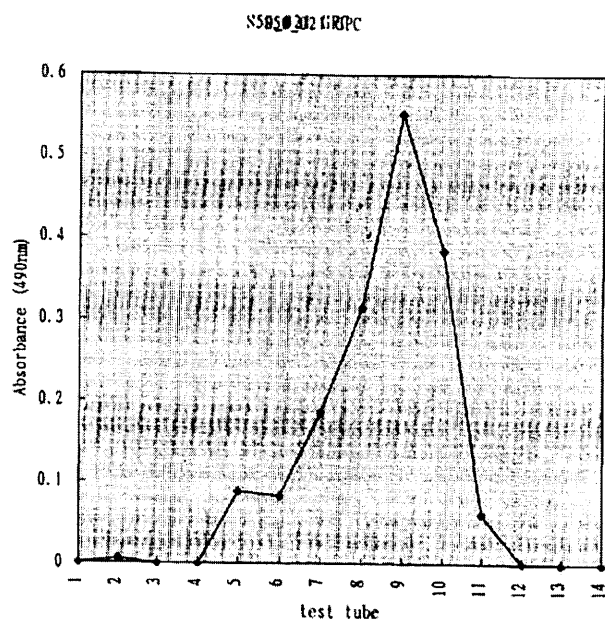


Fig. 8. S50-021 Gel filtration chromatogram. Gel filtration of S50-02/DEAE unbound fraction on Sephacrl HR S-300. The Sephacryl HR S-300 column(1.1×90cm) was equilibrated with H₂O and elution was performed with H₂O. Carbohydrate, 490nm(●)