J. Fd Hyg. Safety 15(2), 167–172 (2000)

자근으로부터 혈소판에 작용하는 천연색소물질에 관한 연구

박영현† · 장성근

순천향대학교 자연과학대학 식품영양학과 · 화학과

Effects of Shikonin Pigments from the Roots of *Lithospermum erythrorhizon* on Rabbit Platelets

Young-Hyun Park† and Sung-Keun Chang

Department of Food Science and Nutrition, Department of Chemistry, Soonchunhyang University, Asan, 336-745, Korea

ABSTRACT – *Lithospermum erythrorhyzon* has been used as a red fooddye and traditional Chinese medicine to treat wounds, skin diseases and burns. Platelet activation plays an important role in thrombosis and haemostasis. Here, we studied the inhibition of platelet activation and its active compound from the root of *Lithospermum erythrorhyzon*. Its ethyl acetate extract inhibited the aggregation of washed rabbit platelets induced by collagen or thrombin. Five naphthoquinone pigments, shikonin, acetylshikonin, isobutylshikonin, α-methyl-n-butylshikonin and β,β-dimethylacrylshikonin were isolated by means of high pressure liquid chromatography. The structures were determined by comparison of their proton nuclear magnetic resonance spectra. The potency of their inhibition was in the following order : β,β-dimethylacrylshikonin≥α-methyl-n-butylshikonin>isobutylshikonin>acetylshikonin>shikonin. It is suggested that the size of the aliphatic hydroxy group of shikonin is important for the enhancement of potency.

Key words □ Rabbit platelet, Shikonin, Pigment, *Lithospermum erythrorhyzon*

생활수준의 향상으로 동물성 식품 및 지방의 섭취 빈도가 증가됨에 따라 건강에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다.[1] 특히 현대 도시 생활자들은 40대 중반부터 찾아오는 성인병의 예방과 치료에 대한 관심이 대단히 높다. 성인병중에서 고혈압, 동맥경화, 심장병, 뇌졸중 등은 대표적인 순환기계 질병으로 여러 노력에도 불구하고 개선되지 않고 있다. 최근 선진국의 조사에 의하면 혈관 순환기계 질환이 현대인 사망원인 중 1위를 차지하고 있으며, 우리나라 통계 보고에서도 선진국에서와 마찬가지로 사망자수 및 원인에 있어서 악성종양보다는 뇌혈관 질환과 심장질환이 큰 비중을 차지하는 것으로 조사되고 있다.[2] 이러한 뇌 · 심혈관 질환의 직접적인 원인은 혈소판의 응집력 항진에 기인한다. 따라서 혈소판은 뇌심혈관계 질환이나 혈전증을 연구하는데 유용하다고 할 수 있다.

최근 이러한 혈소판 활성화를 억제하는 천연식품 중에서 생리활성물질의 효과를 검색 및 동정하여 질병의 예방, 회복, 생체 조절 기능 등을 갖는 기능성 식품 개발은 식생활과 관련된 성인병의 가장 좋은 대처방안으로 인식되고 있다.[3-9]

자근(*Lithospermum erythrorhizon*)은 지치과에 속하는 宿根草로 紫草, 紫芝, 芝草 혹은 紫丹이라고도 한다. 뿌리 외피 부위의 붉은색은 화장품, 의복 등을 착색할 뿐만 아니라 식품을 자색으로 착색하는데 사용되어져 왔다. 한방에서는 항균, 해독, 피임, 동상, 화상 등에 사용되며 생리활성 성분으로는 shikonin 유도체로 알려져 있다.[10-11]

본 연구는 천연색소로 이용되는 자근으로부터 혈소판 활성화 억제작용을 통해서 기능성 식품으로 개발하고자 추출, 분리, 정제한 분획물로부터 혈소판 작용을 검색하여 유효성분을 동정하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 및 시약

혈소판 활성화에 사용되는 시약 중 collagen, thrombin은 Chrono Co.에서 구입하였다. 분석용 시약으로는 HPLC용 methanol (Fisher chemical, HPLC Grade)을 사용하였고,

†Author to whom correspondence should be addressed.

Column chromatography용 silical gel은 kieselgel 60 (70-230mesh, Merck 7734) 및 kieselgel 60 (230-400mesh, Merck 9385)를 사용하였으며 TLC plate는 Kieselgel 60F254 (Merclc art 5554)를 사용하였다. 본 실험에 사용한 모든 용매는 증류하여 사용하였고, 그 외의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

혈소판 현탁액의 조제

토끼 혈액을 citrate-dextrose용액(혈액량의 1/6 : 65 mM citric acid, 85 mM trisodium citrate, 2% dextrose, pH 4.5)에 채혈한 후, 250 xg로 10분간 원심분리한다. 상등액(platelet-rich plasma)을 분리한 후 침전물(platelet- rich pellet)을 Tyrode HEPES buffer pH 6.35용액으로 두 번 세척한 후, 마지막으로 Tyrode buffer pH 7.35 용액으로 부유하여 washed platelet를 조제하였다. 혈소판 수를 광학현미경으로 계측하여 , 혈소판 수가 5×10^8/ml가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다. Tyrode HEPES용액의 조성은 138.3 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.048 mM $MgCl_2$ $6H_2O$, 4.0 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 0.35% Albumin(BAS), 0.1% glucose이다.[12]

혈소판 활성화 작용 측정

혈소판 형태의 변형과 응집작용은 광투과도 변화를 이용한 흡광도 측정장치(Whole-Blood Aggregometer, Chrono-Log Co.)를 사용하였다.[13] 혈소판 부유액(platelet-rich plasma) 250 μl를 취하여 $CaCl_2$ 1 mM을 첨가한다. 1,200 rpm에서 교반하면서 37°C로 incubation시킨 후 3분이 경과된 후에 collagen 또는 thrombin을 투여하여 혈소판 응집을 유도하였다. 혈소판 활성화 억제작용은 collagen 또는 thrombin으로 유도된 aggregation (%)을 대조군(A)으로 자근 분획물을 전처리한 후 유도된 aggregation (%)을 시료군(B)으로 계산한 결과는 inhibition (%)로 나타내었다.

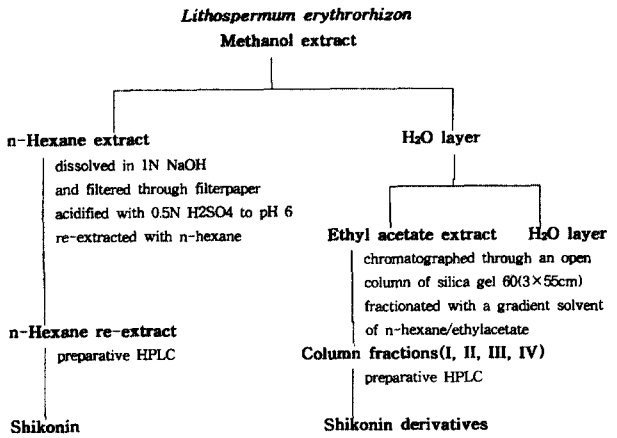
$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A-B}{A}\times 100$$

A : control aggregation (%)

B : sample aggregation (%)

자근의 혈소판 활성화에 작용하는 생리활성물질 분리

세절한 자근(600g)을 3 l의 methanol(MeOH)로 24시간 동안 3회 반복 추출하였다. MeOH추출물은 다시 n-hexane과 H_2O로 추출한 후, n-hexane추출물은 1N NaOH로 용해시키고 0.5N H_2SO_4로 pH 6에 이르도록 한 후 n-hexane으로 재추출한다. H_2O층은 다시 ethyl acetate(EtOAc)로



Scheme 1. Procedure for extraction of *Lithospermum erythrorhizon*

추출한 후 Silicagel 컬럼에서 용출하여 4개의 분획을 얻었다. (Scheme 1)

EtOAc추출물에서 얻은 분획물에서 최종적으로 활성을 나타내는 물질을 Thin layer chromatography(Hexane : EtOAc = 5 : 1의 전개용매)로 확인하고 High performence liquid chromatography(intersil ODS prep 10×250 mm)로 유효성분을 분리 정제하였다. 정제된 각 화합물의 구조는 ^{1}H-과 ^{13}C-핵자기공명(NMR, Bruker) 스펙트라에 의해 결정하였다.

실험결과 및 고찰

혈소판의 collagen 및 thrombin 활성화 및 응집작용에

Table 1. Effects of solvent extracts from *Lithospermum erythrorhizon* on the platelet aggregation induced by collagen and thrombin

Samples	Concentration(μg/ml)	Collagen aggregation inhibition(%)	Thrombin aggregation inhibition(%)
MeOH extract	100	0	16
n-Hexane extract	100	100	100
	50	100	100
	10	16	20
EtOAc extract	100	100	100
	50	100	100
	10	0	100
n-Hexane re-extract	100	100	100
	50	100	72
	10	100	21

Washed rabbit platelets were preincubated with sample at 37°C for 3 min before the addition of collagen(10 μg/ml) or thrombin (0.1unit/ml).

자근의 methanol, n-hexane, ethyl acetate 추출물과 alkali로 처리한 n-hexane 재추출물에 대한 혈소판 억제 작용은 Table 1과 같이 collagen의 응집작용에 대하여 각 추출물 100 μg/ml 농도에서 methanol을 제외한 n-hexane, ethyl acetate, n-hexane 재추출물은 100% 억제되었고, 10 μg/ml 농도에서는 n-hexane 재추출물만이 100% 억제작용을 나타났다. Thrombin의 응집작용에 대하여 각 추출물 100 μg/ml에서 methanol을 제외한 n-hexane, ethyl acetate, n-hexane 재추출물은 100% 억제되었고, 10 μg/ml에서 ethylacetate 추출물만이 100% 억제작용을 나타났다. 이러한 자근색소의 n-hexane 재추출물과 ethylacetate 추출물에서 혈소판 응집작용이 강하게 억제되었지만 collagen 및 thrombin의 응집작용에 대하여 각각 다른 억제율을 나타났다.

Table 2. Effect of ethyl acetate fractions from *Lithospermum erythrorhizon* on the platelet aggregation induced by collagen and thrombin

Fraction	Concentration (μg/ml)	Collagen	thrombin
		aggregation inhibition(%)	
I	10	0	58
II	10	100	96
III	10	91	84
IV	10	0	17

Washed rabbit platelets were preincubated with sample at 37°Cfor 3 min before the addition of collagen(10 μg/ml) or thrombin (0.1unit/ml).

자근색소 추출물중 비교적 강한 활성을 갖는 n-hexane 재추출물과 ethyl acetate 추출물에서 유효성분을 분리하고자 silicagel 컬럼으로 4개 분획물로 분획하였다. 각 분획물의 혈소판 억제작용은 Table 2와 같이 collagen의 응집작용에 대하여 II과 III 분획물이 각각 100%와 91% 억제율을 나타났지만 I과 IV 분획물은 나타나지 않았다. Thrombin의 응집작용에 대하여 II, III, I, IV 분획물 순으로 각각 96%, 84%, 58%, 17% 억제율을 나타났다.

자근에서 비교적 혈소판 응집 억제작용이 강한 ethyl acetate 추출물의 II와 III 분획물에서 TLC 전개용매 (Hexane : EtOAc = 5 : 1)로 3개 Rf값은 0.44, 0.35, 0.24로 나타났고 n-hexane 재추출물에서는 0.24로 나타났다. 이러한 II과 III 분획물 및 n-hexane 재추출물을 분리·정제하고자 HPLC으로 Figure 1에서와 같이 8.6분, 9.6분, 11.4분, 12.5분, 14.0분의 5개 peak를 분리하여 Table 3에서 ^{1}H-과 ^{13}C-NMR ($CDCl_3$) 스펙트라로 구조를 확인하였다.

8.6분의 peak는 ^{1}H-NMR 분석에서 C3의 H는 δ 7.2 (1H, s, aromatic H), C5와 C8의 OH는 δ 12.49, 12.60 (2×1H, each s, aromatic OH), C6과 C7의 H는 7.17, 7.20(2H, d, aromatic H), C11의 H는 δ 4.91(1H, dd, 4.4, 7.3, methine), C12의 2H는 δ 2.35, 2.64(2×1H, qut, 7.3, 14.3, methylene), C13의 H는 δ 5.20(1H, td, 6.8, 1.2,

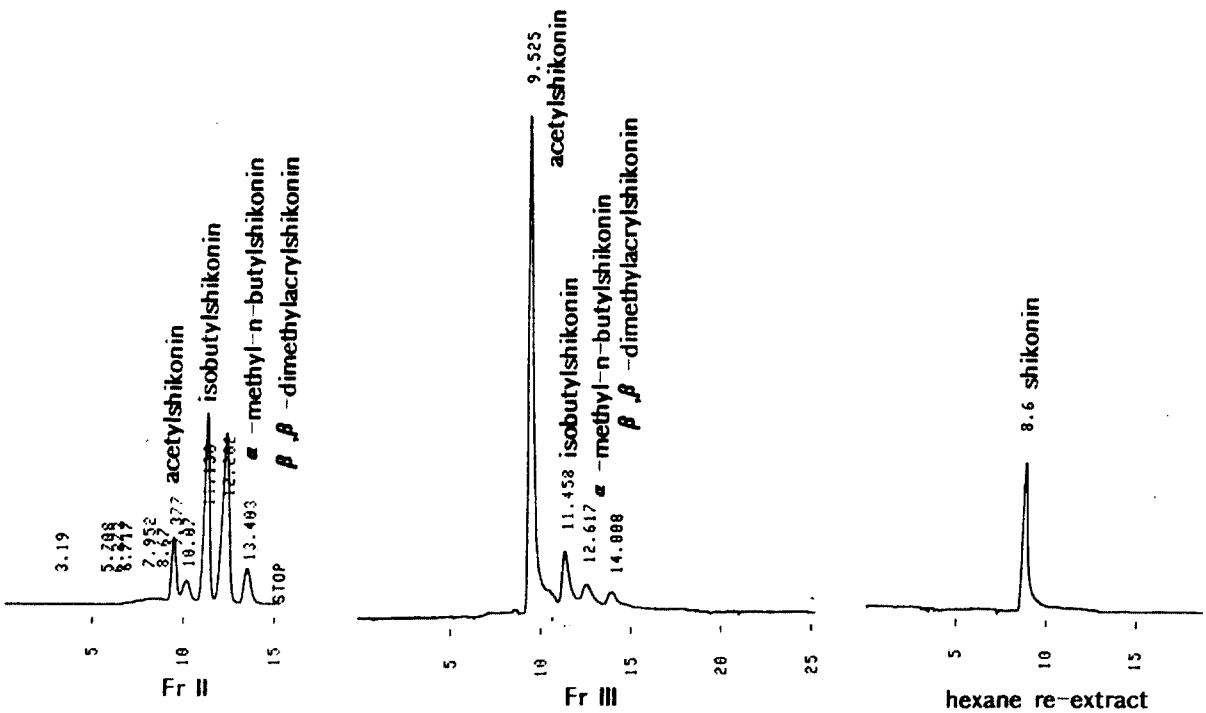


Fig. 1. HPLC chromatogram of ethyl acetate fractions and hexane re-extract

Table 3. 1H and 13C-NMR of shikonin derivatives isolated *Lithospermum erythrorhizon*

Carbon No.	shikonin		cetyl-	isobutyl-	α-methyl-n-butyl-	β,β-dimethyl-acryl-
	δ C(ppm)	δH(ppm)	δH(ppm)	δH(ppm)	δH(ppm)	δH(ppm)
1	179.80					
2	151.42					
3	131.86	7.2 s	6.99	6.97	6.98	6.98
4	180.59					
5	165.53	12.49 s	12.43	12.44	12.69	12.69
6	132.29	7.17 d 1.0	7.19	7.19	7.18	7.18
7	132.39	7.20 d 1.0	7.19	7.19	7.18	7.18
8	164.91	12.60 s	12.59	12.59	12.95	12.95
9	112.54					
10	111.54					
11	68.36	4.91 dd 4.4, 7.3	6.02	6.02	6.00	6.00
12	35.68	2.35 qt 7.3, 14.3	2.53	2.53	2.49	2.49
		2.64 qt 5.3, 14.0				
13	118.44	5.20 td 6.8, 1.2	5.11	5.12	5.12	5.12
14	137.39					
15	18.06	1.65 s	1.58	1.58	1.58	1.58
16	25.92	1.76 s	1.69	1.69	1.68	1.68
R			CH_3CO-	$(CH_3)_2CHCO$-	CH_3CH_2CHCO-	$(CH_3)_2C=CHCO$-
			2.14	1.20	0.96 CH_3 -	1.93 5.77
				1.23	1.16	2.15

Table 4. Effect of shikonin derivatives isolated from *Lithospermum erythrorhizon* on the platelet aggregation induced by collagen and thrombin

Shikonin derivatives	Concentration(μg/ml)	Collagen aggregation inhibition(%)	Thrombin inhibition(%)
Shikonin	10	58	55
	1	0	0
Acetyl-	10	100	100
	1	0	20
Isobutyl-	10	100	100
	1	0	17
α-methyl-n-butyl- or β,β-dimethylacryl-	10	100	100
	1	83	19
Aspirin	5	12	54

Washed rabbit platelets were preincubated with sample at 37°C for 3 min before the addition of collagen(10 μg/ml) or thrombin (0.1unit/ml).

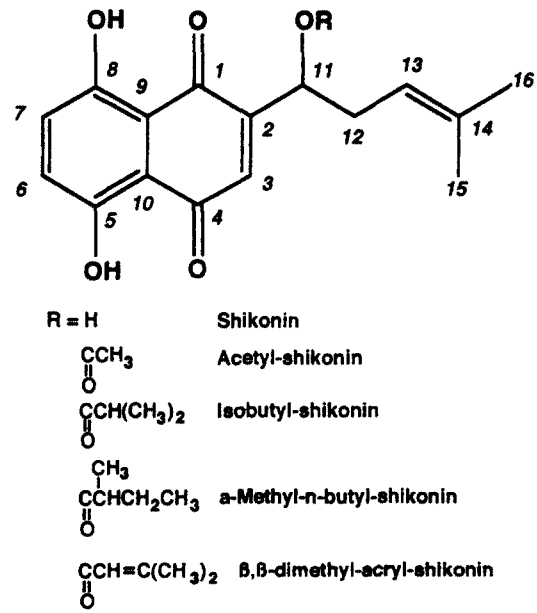


Fig. 2. The chemical structure of shikonin derivatives isolated from *Lithospermum erythrorhizon*

methine), C15의 3H는 δ 1.65(3H, s, methyl), C16의 3H는 δ 1.76(3H, s, methyl)으로 shikonin의 기본골격을 나타났다.

9.6분의 peak는 1H-NMR 분석에서 C11의 H는 δ 6.0 (1H, dd, 4.4, 7.3, methine), 2.14(3H, s, methyl), C11의 OH에 acethyl-shikonin 유도체로, 11.4분의 peak는 1H-NMR 분석에서 C11의 H는 δ 6.0(1H, dd, 4.4, 7.3, methine), 2.5(1H, m, methine), 1.23, 1.25(3H×2, s, methyl), C11의 OH에 isobutyl- shikonin 유도체로, 12.5분의 peak는 1H-NMR 분석에서 C11의 H는 δ 6.0(1H, dd,

4.4, 7.3, methine), 2.5(1H, m, methine), 1.23, 1.25(3H ×2, s, methyl), C11의 OH에 α-methyl-n-butyl- shikonin 유도체로 확인하였으며 12.5분의 peak는 α-methyl-n-butyl-과 β,β-dimethylacryl- shikonin 유도체가 2 : 1비율로 혼합되어 있음을 확인하였다. 이와 같이 자근색소의 화학구조는 shikonin을 기본골격으로 하여 C11에 위치한 R기에 따라서 acethyl-, isobutyl-, α-methyl-n-butyl-, β,β-dimethylacryl-shikonin 유도체들로 확인되었다(Figure 2).[14-15]

자근에서 분리·정제하여 화학구조를 확인한 shikonin 유도체의 혈소판 억제작용은 collagen의 응집작용에 대하여 10 μg/ml 농도에서 β,β-dimethylacryl- = α-methyl- n-butyl- = isobutyl- = acetyl->>>shikonin 유도체 순으로 나타났고, 1 μg/ml 농도에서 β,β-dimethylacryl- = α-methyl-n-butyl- >>> isobutyl- = acetyl- = shikonin 유도체 순으로 나타났다. Thrombin의 응집작용에 대하여 10 μg/ml에서 β,β-dimethylacryl- = α-methyl-n-butyl- = isobutyl- = acetyl->shikonin 유도체 순으로 나타났고 1 μg/ml에서 acetyl-≥ β,β-dimethylacryl- = α-methyl-n-butyl- ≥ isobutyl->shikonin 유도체 순으로 나타났다. 이러한 혈소판 응집 억제작용은 shikonin을 기본골격으로 하여 C11에 위치한 R기에 따라서 활성이 다르게 나타내며 aliphatic hydroxy 기의 탄소수가 증가할수록 작용도 증대되었다. 작용 증대는 11번 탄소에 치환된 탄소수가 화학구조 활성 상관성에 크게 관여한다고 사료된다.[16] 그러므로, 혈소판 작용에 대한 자근색소 shikonin 유도체의 이러한 활성 상관성은 세포내에서 어떠한 작용 기전을 갖는지를 앞으로 연구하고자 한다.[17-19]

감사의 말씀

이 논문은 1998년 학술진흥재단의 기초과학연구소과제 학술연구비(1998-015-D00197)에 의하여 지원되었음.

국문 요약

최근 동물성 식품 및 지방 섭취 증가로 인한 현대인의 식생활 변화로 혈소판 활성화가 직접적 원인인 뇌·심혈관 질환의 사망률이 증가되고, 성인병 예방과 치료의 대처방안으로 식품의 기능성에 대한 관심이 높아짐에 따라서 천연착색료이며 항균, 항암 작용이 있는 자근(Lithospermum erythrorhizon)으로부터 추출, 분리·정제한 분획물에서 혈소판 활성화 억제작용이 있는 생리활성물질을 분리·동정하였다. 자근에서 methanol, n-hexane, ethyl acetate 등의 용매추출물과 methanol 추출물에 NaOH로 처리한 n-hexane 추출물에 대한 혈소판 응집 억제작용은 collagen의 응집작용에 대하여 n-hexane 재추출물이, thrombin의 응집작용에 대하여 ethyl acetate추출물이 큰 억제작용을 보였고, 이러한 추출물에서 컬럼 및 HPLC로 분리·정제한 5개 물질의 화학구조를 1H-과 13C-NMR 스펙트라 분석한 결과 shikonin, acethylshikonin, isobutylshikonin, α-methyl-n-butylshikonin, β,β-dimethylacrylshikonin을 확인하였고, 혈소판 응집 억제작용은 β,β-dimethylacrylshikonin≥α-methyl-n-butylshikonin>isobutylshikonin>acetylshikonin>shikonin 순으로 나타났다. 이상의 결과로부터 자근색소의 생리활성은 shikonin 유도체이며 11번 탄소에 치환된 aliphatic 기의 탄소수가 많을수록 억제작용이 강하게 나타난다고 사료된다.

참고문헌

1. 1995년도 국민영양조사보고서. 국민영양 97-10, 48-51, 1997
2. 경제기획원 통계청. 1990년 사망원인 통계연보, 1991
3. Ishii H., Umeda F., Kunisaki M., Tamauchi T. and Nawata H.: Modification of prostagrandin synthesis in washed human platelets and cultured bovine aortic endothelial cells by glycosylated low density lipoprotein. *Diabetes Res.*, **12**, 177-181 (1989).
4. GomezCalvino C., SimonCarballo R., Coma Alfonso C., Sanchez de Leon T., Montero Dacheco E. and Rodriguez Piloto R.: The relationship between lipid peroxidation and platelet aggregation in atherosclerotic patients. *Angiologia.*, **43**, 241-249 (1991).
5. Ryu, K. H., Lee, J. Y., Cho, Y. S., Kim, M. I. and Chung, J. H.: Assay for screening antiplatelet aggregating cappacity of natural food. *J. Fd. Hyg. Safety*, **9**, 23-30 (1994).
6. Ahn, H. Y., Lee, M. Y. and Yun, Y. P.: The effects of greentea catechins on vascular smooth muscle tension and Ca2+ uptake *J. Fd. Hyg. Safety*, **11**, 83-87 (1996).
7. Matano, Y., Okuyama, T., Shibata, S., Hoson, M., Osada, H. and Noguchi, T.: Studies on coumarins of a chinese drug "Qian-Hu"; .Structures of new coumarin-glycosides of Zi-Hua Qian-Hu and effect of coumarin-

glycosides on human platelet aggregation. *Planta Med.*. **50**, 135-138 (1996).

8. Tuominen, M., Bohlin, L. and Rolfsen, W.: Effects of calaguala and an active principle, adenosine, on platelet activating factor. *Planta Med.* **58**, 306-310 (1992).
9. Chen, Ih-Sheng: New p-Quinoid aporphine alkaloids and antiplatelet aggregation constituents of *Hrnandia sonora. Planta Med.* **61**, 537-539 (1995).
10. Chung, M. S. and Lee, M. S.: Stability and sensory evaluation of naphthoquinone pigments from the roots of Lithospermum erythrorhizon. Korean *J. Food Sci. Technol.*. **26**, 152-156 (1994).
11. Chung, M. S. and Lee, M. S.: Stability of naphthoquinone pigments isolated from the roots of *Lithospermum erythrorhizon* by various sugars and acids. *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**, 157-161 (1994).
12. Park, Y. H.: Effect of marine toxins on the rabbit Platelet *J. Fd Hyg. Safety* **10**, 73-79 (1995).
13. Rho, M., Nakahata, N., Nakamura, H., Murai, A. and Ohizumi, Y.: Activation of rabbit platelets by Ca^{2+} influx and thromboxane A_2 release in an external Ca^{2+}-dependent manner by zooxanthellatoxin-A, a novel polyol. Br. *J. Pharmacol* **115**, 433-440 (1995).
14. Inoue, K., Akaji, M. and Inoue, H.: Quinones and related compounds in higher plants. XXI. New findings on the proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of shikonin. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 3993-3997 (1985).
15. Cheng, Hui-Wen., Chen, Fu-An., Hsu, Hsing-Chu and Chen, Chau-Yang: Photochemical decomposition of alkannin/shikonin enantiomers. *International Journal of Pharmaceutics*, **120**, 137-144 (1995).
16. Chang, Yuan-shiun., Kuo, Sheng-Chu., Weng, Szu-Hsin., Ko, Feng-Nien and Teng, Che-Ming: Inhibition of platelet aggregation by shikonin derivatives isolated from Arnebia euchroma. *Planta Med.* **69**, 401-404 (1993).
17. Watanabe, A., Ishida, Y., Honda, H., Kobayashi, M. and Ohizumi, Y.: Ca^{2+}-dependent aggregation of rabbit platelets induced by maitotoxin, a potent marine toxin, isolated from a dinoflagellate. *Br. J. Pharmacol.*, **109**, 29-36 (1993).
18. Capasso, A., Di Giannuario, A., Pieretti, S. and Nicoletti, M.: Platelet aggregation induced by calceolarioside A in vitro : role of platelet intracellular calcium. *Planta Med.* **59**, 337-342 (1993).
19. Franklin, R. A.: Platelet activating factor activates mapk and increases in intracellular calcium via independent pathways in B lymphocytes. Biochemical and *Biophysical Research Communications*, **209**, 1111-1118 (1995).