

榧子實의 驅虫成分에 관한 研究

趙 鏞 桂 · 宋 大 鎮

Studies on the Anthelmintic Component of *Torreya nucifera* Seed

Joh, Yon Goeg · Song, Dae Jin

Summary

The seed of *Torreya nucifera*, widely using as folk medicine in the treatment of tapeworm infestation, was examined on its general properties and pharmacologically examined to isolate the biologically active component.

The results were summarized as follows: The oil content, iodine value, saponification value, and unsaponifiables content of the total lipids from the seed, were 46.6%, 122, 189.3 and 0.3%, respectively.

A remarkable anthelmintic component biologically active on dogs infested with tapeworm, *Ancylostoma caninum*, was shown on the chloroforms-methanol (1:4, v/v) fraction eluted from a silicic acid column chromatography.

The biologically active matter contained at least one sterol ring moiety, one ketone radical, and one one-substituted benzene moiety in a molecule.

The sterol was found to be Δ^7 -avenasterol.

I. 緒 論

榧子(*Torreya nucifera* Siebold et Zuccarini)는 日本, 中國, 韓國 等に 널리 分布하며, 우리나라에서는 全南, 濟州道에 주로 自生하는 常綠樹喬木(陸1672)으로, 그 種子는 榧子羌釘이라 하여 民間에서 條虫驅除藥으로 널리 使用되어 왔다(陸, 1972)

榧子實의 脂質에 관한 研究로서는 高(1971)에 依한 報告가 있다. 또 襄(1959), 李(1961), 金(1966), 三輪等(1954, 1955)은 榧子實에 驅虫成分의 存在를 報告하고 있으나, 그 有効成分의 本質은 아직 究明되지 않고 있다.

著者는 榧子實의 驅虫有効成分의 本質을 究明하기 爲하여 條虫感染犬에 대한 약간의 實驗을 行했기에 그 結果를 報告한다.

II. 材料 및 實驗方法

1. 材 料

榧子實은 1978년 4월 2일에 濟州道 南郡 西歸邑 市

場에서 購入하여 外皮를 脱殼해서 內容物만 實驗에 使用했다. 또 實驗에 使用한 雜犬은 體重이 대략 3.2~6.8kg의 범위에 屬하는 것으로, 濟州道 全域에 걸쳐, 自然的으로 犬條虫(*Ancylostoma Caninum*)에 感染된 강아지만 購入하여 實驗室에서 飼育하면서 實驗에 使用했다.

2. 實驗方法

A. 感染된 강아지를 밥과 콩나물국 및 콩치통조림으로 飼育하면서 1個月間 榧子實의 여러 溶媒에 依한 抽出物을 投與하면서 分변속에 條虫體節의 排出有無를 觀察하여 驅虫與否를 判定하였다.

B. 有効成分抽出

그림 1에서 보는 바와 같이 榧子를 磨碎한 後 acetone을 가한다음 심하게 攪拌해서 可溶性性分을 抽出하고 그 殘渣에 다시 acetone을 가하여 24時間 冷藏庫에 放置하여 再抽出을 行했다. 이 acetone抽出物을 rotary vacuum evaporator에 옮겨서 acetone을 除去하고 油成分만 濃縮했다.

* 本 研究은 1978年度 文敎部 學術研究 助成費로 이루어진 것임.

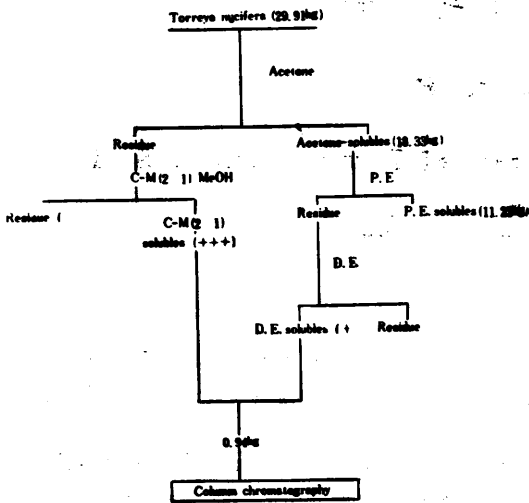


Fig 1. Purification procedure of the anthelmintic component from the oils of *Torreya nucifera*

- * C-M: Chloroform-methanol mixture,
- P.E.: Petroleum ether
- D.E.: Diethyl ether
- +++ : strong anthelmintic active
- ++ : not anthelmintic active

다음에 이 추출분에 석유에틸을 가하여 振盪하여 석유에틸 可溶性 성분을 除去하고, 그 殘渣에 다시 석유에틸을 가하여 上記操作을 反復했다. 다음은 석유에틸에 不溶性인 殘渣에 에칠에틸을 가하여 可溶性部分과 殘渣部分으로 分割하였으며, 이 操作도 2回 되풀이하였다.

한편, acetone에 不溶性인 分割을 chloroform-methanol(2:1, v/v) 混合液으로 抽出하고, 다음에 methanol로 2회 反復 抽出하여 可溶性인部分과 不溶性인部分으로 나누었다.

또 chloroform-methanol混合液 및 methanol抽出物을 濃縮하여 다시 column chromatography에 걸었다.

C. Column Chromatography 및 TLC

Mallinckrodt社製(美國, 80-100 mesh) silicic acid에 celite 545를 2:1(v/v)로 混合하여 130°C에서 3時間 活性化시켜서 放冷한 後, methanol로 slurry를 만들어 內徑 3.5cm의 glass column에 充塡시켰다. 이 column에 chloroform-methanol 1:4, 1:2, 1:1, 2:1의 混合液을 各 500ml씩 順次的으로 流出시켜 column을 活性化시켰다(De koning, 1966). 다음에

試料을 소량의 chloroform-methanol(2:1)에 녹인 다음 silicic acid에 loading한 後에, chloroform-methanol(2:1) 混合液 500ml를 流出시키고, 다음에 1:1, 1:2, 1:4 混合液 各 1000ml씩 流出시켰다.

TLC는 Wakogel B-5로 0.2mm로 coating한 20×20cm의 유리판을 110°C에서 5時間 活性化시킨 것을 放冷하여 使用했다. 展開溶劑는 石油에틸-에칠에틸-식초산(80:20:1, v/v/v) 混合液을 使用하였다.

D. Gas-liquid Chromatography, Mass-spectrometry 및 IR. 使用한 器機는 Shimadzu GC-4BM이며, 充塡劑는 Shimadzu Gas-Chrom Z에 1.5% OV-17를 coating한 것을 使用하였으며, 使用한 column은 3mm×2m의 Stainless column였고, detector는 FID였다. Column溫度는 264°C, detector의溫度는 280°C였고, carrier gas는 N₂로 그 流速은 60ml/min이었다. 한편 Mass-Spectrometer는 Hitach/RMU-7型이고, 測定條件은 chamber volt 80ev, total emission은 80μA, ion chamber temperature는 160°C, evaporation temperature는 80°C, vacuum은 5×10⁻⁷mmHg, maximum m/e는 900이었다.

IR分析은 日本分光工業株式會社製 S-5B로 KBr disc法으로 行했다.

II. 結果 및 考察

實驗에 使用한 榧子實의 脂質含量은 46.6%로 高(1971)의 結果보다 약간 낮으며 또 요-드價(I.V)와 비누화價(S.V)도 高(1971)의 結果보다 적었다. 또 이 脂質은 榧子實 特有的 香氣와 연한 褐色을 띠고 있었다. 水分含量과 不鹼化物含量을 各各 9.3%, 0.3%였다. 榧子實의 脂質의 現化學的 性質은 表 1과 같다.

Table 1. The Characteristics of the Total Lipids of *Torreya nucifera* Seed

Oil Content (%)	Moisture (%)	I. V. Saponifiables (%)	S. V. Saponifiables (%)	Saponifiables (%)
46.6	9.3	122	189.3	0.3

* Bligh & Dyer Method

** Wij's Method

다음에 脫殼한 榧子實에서 圖1에 例示한 바와 같은 方法으로 有機溶媒로 各成分을 抽出하여 各分割을 犬條虫(*Ancylostoma Caninum*)에 感染된 강아지에 投與한 結果는 表 2와 같다. 즉 acetone 可性成分中 石油

Table 2. Anthelmintic effects of various fractions from the seeds of *Torreya nucifera* on the dogs infected with *Ancylostoma caninum*

Dosed fractions	Dosage (mg/kg/day)	Dog Body Wt. (kg)	Dog ***	Experiment time in days						
				1	3	6	10	15	20	30
I **	5	male	3.5	8*	10	4	5	5	7	4
	5	male	4.1	3	8	4	3	8	5	4
	5	male	3.8	7	4	4	6	5	3	7
II	5	female	3.5	3	3	4	5	5	7	2
	5	female	3.7	4	3	1	4	2	7	7
III	7	male	5.0	3	3	5	4	7	10	8
	7	male	3.2	2	5	3	3	8	5	5
IV	4.8	male	5.0	7	4	3	0	0	0	0
	4.8	female	4.5	14	10	6	1	0	0	0
	4.8	female	4.5	9	7	2	0	0	0	0
V	6.2	male	3.7	10	10	5	5	1	0	0
	6.2	male	3.5	7	8	4	5	2	0	0

* Segment number of *Ancylostoma caninum* in dog's excrements
 ** I : Petroleum ether solubles II : Diethyl ether insolubles
 III : Chloroform-methanol(2:1) insolubles V : Chloroform-methanol(2:1) solubles
 V : Diethyl ether solubles
 *** Originally infested with *Ancylostoma caninum*, obtained from markets

에틸에 녹는 部分을 體重 3.5kg, 4.1kg, 3.8kg의 숫강아지에 每日 體重 1kg當 5mg씩 30日間 繼續 經口投與 했으나 犬條虫의 體節이 觀察되었으므로, 이 石油에틸에 可溶性成分은 本實驗에서는 驅虫效果가 없다고 判定했다. 또 acetone에 可溶性이나 石油에틸 및 에틸에 不溶性인 部分을 體重 3.5kg, 3.7kg의 犬條虫에 感染된 암강아지에 每日 體重 1kg當 5mg씩 投與했으나, 역시 驅虫效果는 認定되지 않았다.

다음에는 種子實의 脂質成分中, acetone에 不溶性이나 chloroform-methanol(2:1) 混合液 및 methanol에 可溶性인 部分을 每日 體重 1kg當 4.8mg씩 犬條虫에 感染된 강아지에 投與했더니 10日以後부터는 개의 便속에 體節이 發見되지 않아 完全히 驅虫된 것으로 生覺된다. 또 蛋白質과 같은 高分子로 구성된 殘渣를 體重 1kg當 7mg씩 30日間 投與했으나 驅虫效果가 認定되지 않았다.

또 acetone에 可溶性이고 에틸에틸에 可溶性인 部分을 投與했을 때 20日後부터 便속에 體節이 發見되지 않아 弱하나마 驅虫效果가 認定되었다. 三輪等(1955)은 種子實의 搾汁中 ether에 可溶性인 部分이 人體에 寄生하는 有鉤條虫을 完全히 驅虫할 수 있다고 報告하고 있으며 또 金(1966)은 種子實의 methanol抽出物이 쥐에 寄生하는 *Hymenolepis diminuta*(rat tapeworm)의 驅虫作用이 強하다고 報告하고 있으며

이 結果는 油成分中 驅虫成分으로 推測되는 部分의 極性이 大端히 높다는 것을 意味하며 本實驗의 結果와도 거의 一致하고 있다.

다음은 C-M(2:1) 抽出物 및 methanol 抽出物을 silicic acid column chromatography로 다시 分劃하여(表3), 그 各各을 犬條虫에 感染된 개에 經口投與하

Table 3. The Column Chromatography of the C-M(1:2) and Methanol Solubles from the Seeds of *Torreya nucifera*

Eluent (V/V)	Volume	Fraction
CHCl ₃ :MeOH (2:1)	500ml	Phosphatidic acid, neutral lipids
CHCl ₃ :MeOH (1:1)	1,000ml	Phosphatidyl serine, phosphatidyl ethanolamine
CHCl ₃ :MeOH (1:2)	1,000ml	Phosphatidyl choline, Sphingomyelin
CHCl ₃ :MeOH (1:4)	1,000ml	Sphingomyelin and unknown matter supposed to be anthelmintic active

Column dimension: 3.5cm(i.d) × 1.1m
 Adsorbent: Silicagel (Mallinckrodt, 80-100 mesh), activated at 130°C for 3 hrs.

였더니, 表 4에서 보는 바와 같이 C:M(1:4) 混合液의 流出物만이 驅虫效果가 認定되었다. 즉 C-M(1:

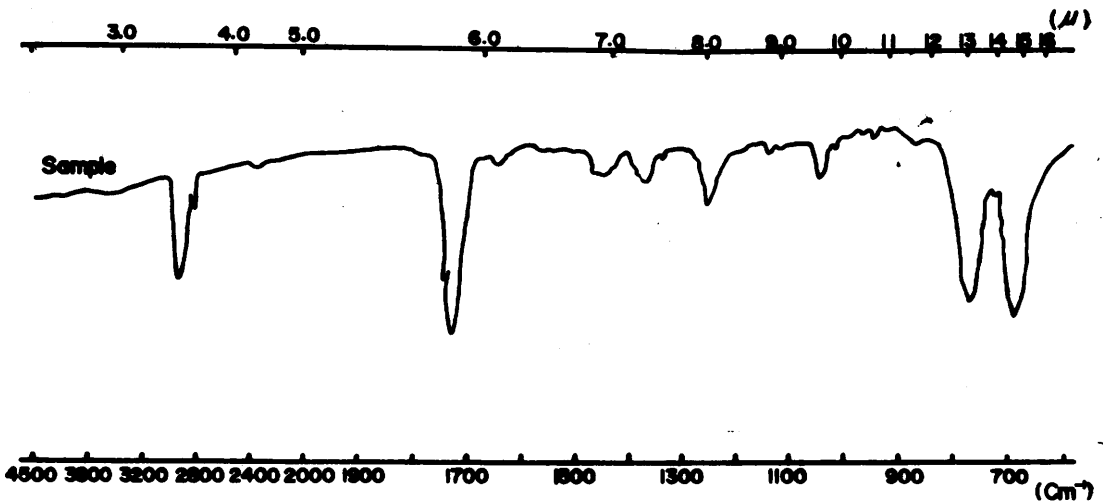
Table 4. Anthelmintic effects of various fractions of C-M solubles fractionated by column chromatography

Dosed fraction	Dosage (mg/kg/day)	Dog sex	Dog body wt. (kg)	Experiment time in days					
				1	4	10	15	20	30
C-M	8	male	6.8	12	14	10	7	9	8
(2:1)	8	male	6.1	8	7	9	4	6	6
C-M	4.9	male	6.8	10	9	4	7	8	7
(1:1)	5.1	male	6.1	6	4	3	5	8	8
C-M	8	male	6.8	—	—	6	7	6	5
(1:2)	8	male	6.1	7	3	4	5	5	4
C-M	4.2	male	6.8	7	4	0	0	0	0
(1:4)	4.2	male	6.1	5	2	1	0	0	0
	4.2	female	5.8	10	4	1	0	0	0

* C-M: Chloroform-methanol

4) 混合液의 流出物을 體重 6.8kg(♂), 6.1kg(♂) 및 5.8kg(♀)의 강아지에 一日 體重 1kg當 4.2mg씩 30日 間 經口投與하였더니 體重 6.8kg의 강아지에는 投與後 10日부터는 犬條虫의 體節이 發見되지 않았으며, 體重 6.1kg, 5.8kg, 강아지에는 15日부터 犬條虫 體節이 發見되지 않았다. 完全히 驅虫된 것으로 생각된다.

다음은 驅虫成分이 含有되어 있는 것으로 여겨지는 分割을 column chromatography(silicic acid)로 再精製하여 活性炭으로 다시 脫色하여, 또 column으로 rechromatography하여 赤外線分光分析器(IR)에 檢었다. IR Spectrum은 圖 2와 같다. 즉 1720cm^{-1} 附近의 強한 吸收 peak는 C=O基의 存在를 暗示하며 690



Fif 2. IR-gram of the Anthelmintic Component from the Seed Oils of *Torreya nucifera*.

cm^{-1} , 750cm^{-1} 附近의 強한 吸收 peak는 benzene核의 一置換體의 存在를 意味하고 있다.

또 이 物質을 0.1N KOH로 加水分解하여 에칠에틸로 3回 抽出하여 에칠에틸 層으로 移動한 不鹼化物을 數回 水洗한 다음 rotary vacuum evaporator로 濃縮하여 TLC에 展開하여, 50% H_2SO_4 로 분무하여 100°C

에서 1分間 加熱하였더니, pink色으로 發色치므로 sterol로 생각되며, 더욱이 ergosterol의 Rf值과 一致하므로(圖 3) 不鹼化物은 sterol로 斷定하였다(Joh 1976). 이 sterol을 適當量을 250ml 후라스크에 옮겨, 여기에 pyridine(NaOH tablet를 넣어서 完全히 脫水 하였다)一無水식초산 混合液을 넣어서 sterol을 아세

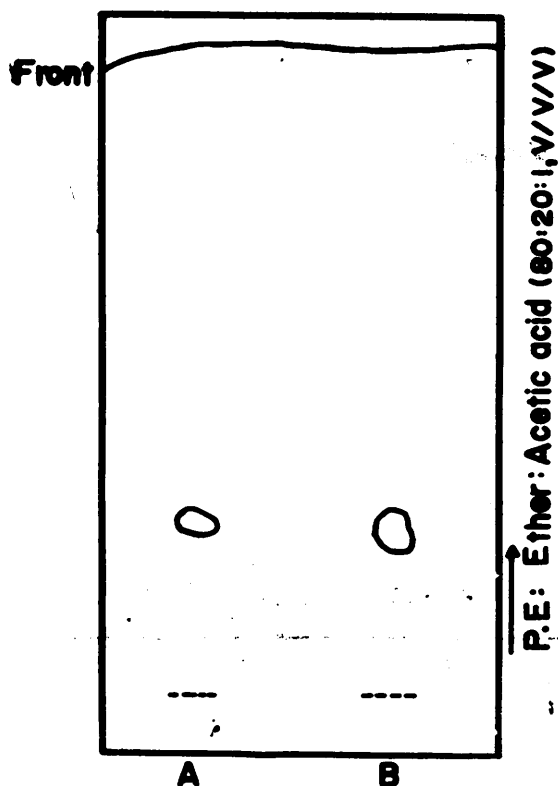


Fig 3. TLC-gram of the unsaponifiables of C-M(1:4) soluble fraction. Adsorbent : Wakogel B-5 (thickness, 0.2mm), activated at 100°C for 5 hours
A: Ergosterol B: Sample

질화하였다.

Sterol의 同定

Sterol acetate를 GLC에 걸어 본 結果 圖 4에서와 같이 retention time은 19.5min로 Δ^7 -avenasterol의 그것과 一致하였고(Jeong 1974), 또 圖5에서 보는 바와같이 mass spectrum에서 m/e 412는 Δ^7 -avenastroel의 分子量에 該當하는 parent peak(M^+)를 나타내며, m/e 397($M^+ - CH_3$)를 m/e 394는($M^+ - H_2O$)를 m/e 379 는 [$M^+ - (CH_3 + H_2O)$], m/e 314는 [$M^+ - \text{part of side chain}(C_7H_{14})$]를 m/e 299는 [$M^+ - (C_7H_{14} + CH_3)$], m/e 296은 [$M^+ - (C_7H_{14} + H_2O)$], m/e 281은 [$M^+ - (C_7H_{14} + CH_3 + H_2O)$] 나타내며, 特히 m/e 314는 $\Delta^{24}(28)$ 를 가진 sterol의 特異한 peak다(Gibbons 1968).

따라서 이 sterol은 GLC上的 retention time과 mass-spectrum에서 Δ^7 -avenasterol로 推測된다. 이 Δ^7 -avenasterol은 植物種子油에 약간 含有되어 있으나(Joh. 1978, Jeong 1974), 本 實驗에서와 같이 Δ^7 -avenasterol이 驅虫成分으로 여겨지는 chloroform-methanol(1:4) 流出物의 不飽和物에 唯一한 成分으로 存在한다는 事實은 特記할만하다.

IR spectrum에서 $C=O$ 基의 存在와 benzene 核一置換體의 存在를 알 수 있고, 또 Δ^7 -avenasterol의 存在가 확실함에 따라 sterol의 ether 結合 또는 아세테이트 結合이 推測된다. 0.1N KOH로 쉽게 sterol이

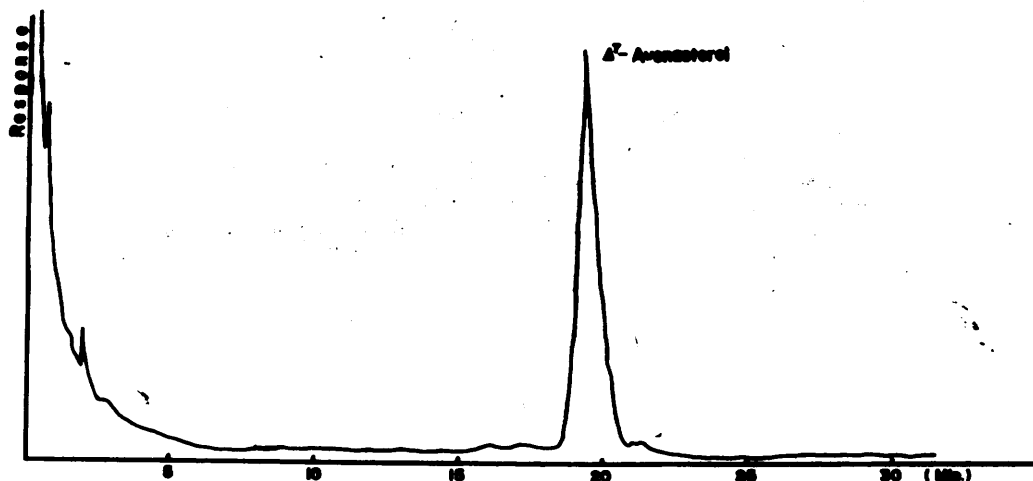


Fig 4. Gas Chromatogram of the Acetate of Sterol Isolated from C-M, (1:4) soluble Fraction
Condition; Shimadzu GC-4BM,
Column, Stainless Column 3mm×2m, filled with Shimadzu Gas-Chrom-Z(80-100 mesh),
coated with 1.5% OV-17
Temperature, Column 264°C, Detector 280°C, N₂, 60 mi/min.

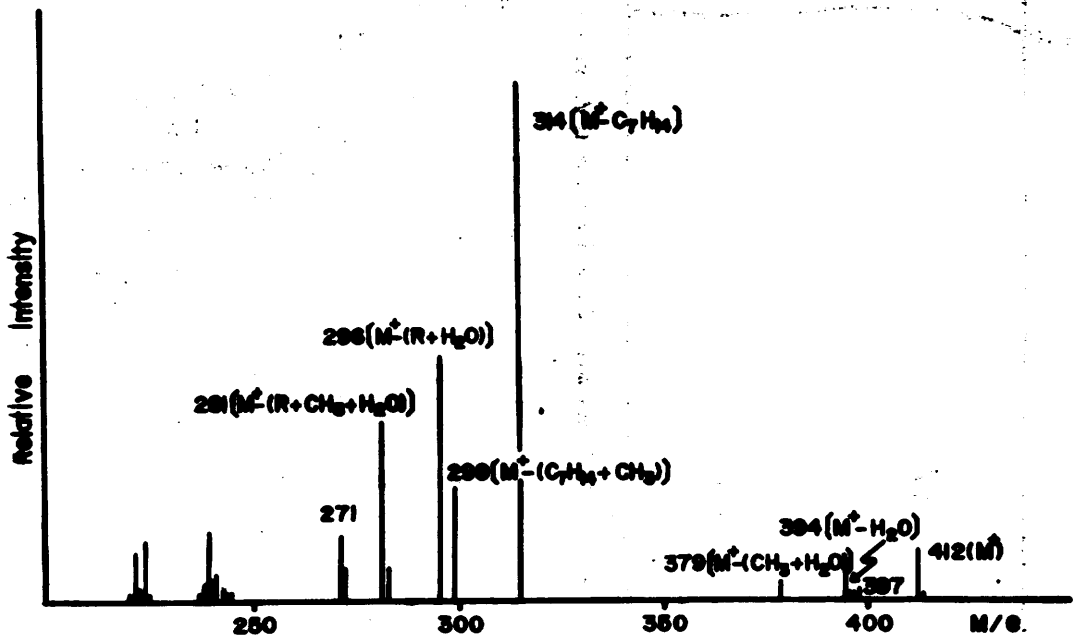


Fig 5. The Mass Spectru m of the Acetate of Sterol Isolated from C-M(1:4) soluble Fraction
 Condition: Hitachi RMU-7
 Evaporation temp. 80°C
 Chamber Voltage 80eV
 Vacuum 5×10^{-7} mmHg
 Total emission 80 μ A
 Maximum m/e 900
 Ion chamber temp. 160°C

遊離됨에 따라 sterol의 아세테이트 결합이 유력시 된다. 즉 IR上 $>C=O$ 의 존재는 sterol의 ester 결합에문으로 생각된다.

本實驗의 결과로서는 驅虫成分의 完全한 構造式決定은 어려우나 大端히 興味있는 일로 今後 계속적인 研究가 必要하다고 느껴진다.

또 C-M(1:4) 流出物의 加水分解物中, 어느 特定한 部分이 有効成分인지, 그렇지 않으면 加水分解하므로써 驅虫效果가 없어지는지에 對해서는 現在 檢討中이다

IV. 要 約

櫃子實의 條虫驅虫力 및 그 成分을 알고저, 犬條虫

에 感染된 강아지에 櫃子實의 各種 有機溶媒 抽出物을 經口投與하여 그 驅虫與否를 調査한 結果 chloroform-methanol(2:1) 및 methanol 抽出物에 強한 驅虫效果가 認定되었고, 에틸抽出物에도 弱하나, 驅虫效果가 認定되었다. 또 chloroform-methanol(2:1) 및 methanol 抽出物中, silicic acid column에서 chloroform-methanol(1:4) 流出物에만 驅虫效果가 認定되었다.

이 驅虫成分 中에는 Δ^7 -avenasterol, $>C=O$ 基, benzene核의 一置換體가 存在함을 알았다.

引 用 文 獻

- 裴鍾鎬, 徐大生, 朴英珠, 蔣萬淑伊, 1959. 櫃子實의 驅虫作用에 對한 再檢討 · 韓國醫藥, 2(1), 89.
 Dekoning, A. J. 1966. Phospholipids of marine origin V. the Abalone (*Haliotis midae*), J. Sci. Fd Agric., 17, 460.

- Gibbons, G. F., L. J. Goad and T. W. Goodwin. 1968. The identification of 28-isofucoesterol in the marine green algae *Euteromorpha intestinalis* and *Ulva lactuca*, phytochemistry, 7, 983.
 Jeong, T. M., T. Itoh, T. Tamura and T.

- Matsumoto. 1974. Analysis of sterol fractions from twenty vegetable oils, *Lipids*, 9(11), 921.
- Joh, Y.G. 1976. The origin of molluscs sterol (I). the sterol composition of Bivalves and snails, *Bull. Korean Fish. Soc.*, 9(3), 185.
- Kim, N.D. 1966. 櫃子의 驅虫成分에 관한 研究, *韓國藥學會誌*, 10, 30.
- Koh, Y. S. 1971. GLC에 의한 櫃子中の 脂肪酸 組成에 관한 研究, *韓國生活科學研究院 論叢 (梨花女大)*, 7.1.
- 李宗珍, 中村 功, 1961. 櫃子의 驅虫作用, *日本藥物學會誌*, 31(2), 117.
- 陸昌洙, 安德均, 1972. 現代本草學, 高文社(서울)
- 三輪清三, 長島豊晴, 1954. 櫃實に依る 條虫驅除の臨床的研究, 第2報, *寄生虫學雜誌*, 3(1), 89.
- 三輪清三, 長島豊晴, 1955. 櫃實による條虫驅除の臨床的研究, *寄生虫學雜誌*, 4(2), 213.