

작약의 성분에 관한 연구

강삼식 · 김주선 · 윤혜숙 · 한병훈
서울대학교 천연물과학연구소

Phytochemical Studies on *Paeoniae Radix*

Sam Sik Kang, Ju Sun Kim, Hye Sook Yun-Choi and Byung Hoon Han
Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Abstract—From the *Paeoniae Radix*, gallic acid methyl ester, (+)-catechin, paeoniflorin, albiflorin, paeonol, β -sitosterol and campesterol, benzoic acid, oleanolic acid, hederagenin and β -sitosterol 3-O-glucoside were isolated and characterized by means of spectral data. Oleanolic acid and hederagenin have been isolated for the first time from the genus *Paeonia*.

Keywords—*Paeoniae Radix* · Ranunculaceae · oleanolic acid · hederagenin

작약은 참작약 및 同屬 近緣植物의 뿌리로서 매우 중요한 생약종의 하나이다. 漢方에서는 收斂緩和, 鎮痙, 鎮痛劑로서 사용되어 왔으며 桂枝加芍藥湯, 芍藥甘草湯, 四物湯, 當歸芍藥散 등에 處方 되어지고 있다.¹⁾ 작약의 주성분은 monoterpene glucoside로서 특이한 화학구조를 가진 paeoniflorin으로 밝혀졌으며 이와 유사한 구조인 albiflorin이 소량 함유되어 있고 미량성분으로 benzoylpaeoniflorin, oxypaeoniflorin 등도 함유되어 있다.^{2,3)} 저자 등도 최근에 새로운 paeoniflorin유도체인 galloylpaeoniflorin을 분리하여 그 화학구조를 밝힌 바 있다.⁴⁾ 이들 성분들 이외에도 32종의 정유성분이 밝혀졌으며 이 정유성분중에는 benzoic acid 및 paeonol이 주성분으로 보고되었다.⁵⁾ Benzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid⁶⁾, *d*-catechin, gallic acid, methyl gallate, pentagalloylglucose, gallotannin⁷⁾, sitosterol 및 그의 glucoside와 paeonolide⁸⁾ 등도 보고되었으며 최근에는 (*Z*)-(1*S*, 5*R*)- β -pinen-10-yl-vicianoside⁹⁾, paeoniflorigenone⁶⁾, paeonilactone A, B, C¹⁰⁾와 lactiflorin^{11,12)} 및 palbinone^{13,14)} 등

의 화합물이 분리되어 그 화학구조가 밝혀졌다. 이들 화합물에 관한 다양한 생물활성이 보고되었다.¹³⁻¹⁷⁾ 또한 작약엑스의 활성 및 약리작용에 대하여서도 많은 연구가 수행되었다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 저자 등은 작약의 EtOAc 분획이 강한 혈소판응집 억제작용이 있음을 보고한 바 있으며²⁰⁾ 이의 유효성분을 구명하고자 본 실험에 착수하여 수종의 화합물을 분리하여 확인하였기에 보고하고자 한다.

실 험

실험재료—1990년 서울시내 순흥약방에서 구입하여 감정 후 사용하였다.

기기 및 시약—용접: Mitamura-Riken apparatus(미보정); NMR: Varian FT-80A (80MHz); Mass: Hewlett-Pachard 5985B GC/MS system; IR: Perkin-Elmer 283B; UV: Gilford 2600.

추출 및 분획—작약 3 kg을 MeOH로 4시간씩 3회 추출해서 약 365 g의 MeOH 엑스를 얻었다. 이 MeOH 엑스에 CHCl₃과 H₂O를 거의 동량 가

해서 분액여두를 사용해서 진탕 방치하여 CHCl_3 과 수층으로 분획하였다. CHCl_3 을 농축한 후 여기에 MeOH, 풀 및 hexane을 9:1:10의 비로 혼합하여 가한 후, 다시 진탕 방치하여 hexane 분획(F001) 20.9g을 얻었다. 90% MeOH층은 농축해서 MeOH 분획(F002) 13.5g을 얻었다. 처음에 얻은 수층은 EtOAc을 가해서 진탕시켜 EtOAc분획(F003) 55.8g을 얻고 수층은 계속해서 BuOH로 진탕시켜 BuOH 분획(F004) 65.7g 과 물 분획(F005) 200g을 얻었다.

F003분획의 column chromatography—활성 검색결과 가장 강한 분획인 F003에 함유된 성분을 분리하기 위해서 이 분획을 취하여 column chromatography을 실시 하였다. 즉 F003 약 50g을 silica gel (No. 9385) column에 충전 시키고 5% CHCl_3 -MeOH로 용출시켜 5개의 subfraction (F301~F305)으로 분리하였다. 이들 subfraction 중 그 함량이 많은 F302, 303 및 304에 대해서 각각 column chromatography을 다시 실시해서 화합물 1~4를 분리 하였다.

화합물 1(gallic acid methyl ester)—F302 분획 2g을 SiO_2 column에 걸고 hexane-EtOAc (8:5)로 용출시켜 얻은 분획을 acetone으로 재결정해서 미황색 결정인 gallic acid methyl ester를 분리 하였다.

mp 196~8°, IR, ν_{\max} (KBr) 3360(OH), 1695 (ester), 1620, 1536(aromatic C=C), 1440, 1374, 1329, 1261, 1210, 1200, 1055, 1004, 865, 765, 746 cm^{-1} ; UV, λ_{\max} (log ϵ) 276(4.09) nm; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 3.74(3H, s, COOCH_3), 6.93(2H, s, H-2, 6); MS, m/z (rel. int., %) 184[M^+](59.3), 153(100), 125(20.7), 107(4.5), 79(8.5).

화합물 2[(+)-catechin]—F303 분획 13g을 SiO_2 column에 걸고 EtOAc로 용출시켜 얻은 분획을 MeOH로 재결정을 반복하여 백색 무정형 분말인 (+)-catechin을 얻었다.

mp 172~4°, [α] $_D^{25}$ +15.1° ($c=0.27$, pyridine); UV, λ_{\max} (log ϵ) 237.5(3.49), 280(3.43) nm; IR, ν_{\max} (KBr) 3340, 1620, 1520, 1457, 1180, 1140, 1103, 1028, 810 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 2.47(1H, dd, $J=8.0, 16.2$ Hz, H-

4a), 2.86(1H, dd, $J=5.5, 16.2$ Hz, H-4e), 3.96(1H, ddd, $J=2.3, 7.7, 15.4$ Hz, H-3), 4.57(1H, d, $J=7.5$ Hz, H-2), 5.86(1H, d, $J=2.3$ Hz, H-6), 5.93(1H, d, $J=2.3$ Hz, H-8), 6.74(1H, br s, H-2'), 6.79(2H, br d, $J=7.0$ Hz, H-5', 6'); MS, m/z (rel. int., %) 290 [M^+](18.7), 167(19.4), 152(87.3), 149(54.2), 139(100), 123(96.2), 105(24.6), 95(15.6), 81(19.0), 78(17.6), 77(42.6), 67(46.9).

화합물 3(paeoniflorin)—상기 column을 계속해서 EtOAc-물포화 EtOAc(1:1)로 용출시켜 백색 무정형 분말인 paeoniflorin를 분리 하였다.

[α] $_D^{20}$ -11.8° ($c=0.3$, MeOH); UV, λ_{\max} (log ϵ) 231(3.97), 274(2.88), 281(2.80) nm; IR, ν_{\max} 3430(OH), 1715(ester), 1605, 1590, 1280, 1100~1000 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 1.36(3H, s, CH_3), 5.45(1H, s, H-9), 7.5~7.7(3H, m, H-2'', 3'', 4''), 8.03(2H, dd, $J=1.9, 7.9$ Hz, H-1'', 6'').

화합물 4(albiflorin)—F304 4g을 SiO_2 column에 걸고 EtOAc-물 포화 EtOAc(1:1)로 용출시켜 F303에서 얻은 paeoniflorin 및 이보다 극성이 강한 백색의 화합물인 albiflorin을 분리 하였다.

[α] $_D^{20}$ -20.1° ($c=0.2$, MeOH); UV, λ_{\max} (log ϵ) 231(4.03), 274(3.03), 281(2.92) nm; IR, ν_{\max} (KBr) 3400(OH), 1755(lactone), 1715 (ester), 1450, 1280, 1075, 1030, 1025(glycosidic C-O), 940, 713 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 1.52(3H, s, CH_3), 7.47~7.63(3H, m, H-2'', 3'', 4''), 8.01~8.14(2H, m, H-1'', 6'').

F002의 column chromatography—F002 분획도 작용이 나타났으므로 이 분획 13g을 SiO_2 column에 걸고 EtOAc-hexane으로 gradient elution(10→50%, 1:2, 100%)한 후 TLC pattern에 의해 정리하여 8개의 subfraction(F201~208)으로 분획하였다.

화합물 5(paeonol)—Subfraction F201을 다시 SiO_2 column에 걸고 hexane으로 용출시켜 얻은 화합물 5를 50% EtOH로 재결정을 반복하여 침상결정을 얻었다.

mp 49~50°, IR, ν_{\max} (KBr) 2960, 1625, 1575, 1510, 1430, 1370, 1255, 830 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$

NMR(CDCl₃) δ : 2.52(3H, s, COCH₃), 3.81(3H, s, OCH₃), 6.39(1H, d, $J=2.6$ Hz, H-3), 6.42(1H, dd, $J=2.6, 9.5$ Hz, H-5), 7.60(1H, d, $J=9.5$ Hz, H-6); MS, m/z (rel. int., %) 166[M⁺](30.4), 151[M-CH₃]⁺(100), 123(2.4), 108(8.8), 95(10.9), 79(2.9), 77(2.4), 69(2.8).

화합물 6(sterols)—Subfraction F202을 MeOH로 재결정을 반복하여 백색 판상의 sterol을 얻었다.

mp 138~9°, IR, ν_{\max} (KBr) 3420, 1046, 835, 795 cm⁻¹; GC/MS, m/z (rel. int., %), peak 1: 400[M⁺](100), 385(25.0), 382(40.4), 273(19.2), 261(19.2), 255(28.8), 231(23.1), 213(36.5), 163(42.3); peak 2: 414[M⁺](100), 396(52.6), 381(30.0), 273(17.4), 255(31.6), 231(26.8), 213(31.1).

화합물 7(benzoic acid)—Subfraction F203을 농축한 후 증류수를 가하여 수용상에서 가운 하였다. 이를 여과하여 얻은 여액을 방치하여 백색침상 결정을 얻었다.

mp 121~2°, IR, ν_{\max} (KBr) 2530~3070, 1690, 1455, 1424, 1325, 1290, 931, 806, 705, 663 cm⁻¹; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 7.28~7.62(3H, m, H-3, 4, 5), 8.12(2H, dd, $J=1.8, 7.8$ Hz, H-2, 6); MS, m/z (rel. int., %) 122[M⁺](91.4), 105(100), 77(68.8), 51(28.3).

화합물 8(oleanolic acid)—Subfraction F203에 물을 가하여 얻은 침전을 SiO₂ column에 걸고 5% hexane-EtOAc로 용출시켜 얻은 분획을 MeOH로 재결정을 반복하여 침상결정을 얻었다.

mp 300~303°, [α]_D¹⁶ +81.7° ($c=0.2$, CHCl₃); IR, ν_{\max} (KBr) 3400(OH), 1680(COOH), 825 (trisubstituted double bond)cm⁻¹; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 0.76(6H, s, 2×CH₃), 0.90(9H, s, 3×CH₃), 0.97(3H, s, CH₃), 1.13(3H, s, CH₃), 2.83(1H, dd, $J=3.8, 13.6$ Hz, H-18), 3.22(1H, t, $J=8.2$ Hz, H-3), 5.28(1H, br s, H-12); MS, m/z (rel. int., %) 456[M⁺](0.7), 438[M-H₂O]⁺(0.2), 441[M-CH₃]⁺(0.2), 423[M-(H₂O+CH₃)]⁺(0.2), 410[M-(COOH+H)]⁺(0.2), 248[a]⁺(100), 233[a-CH₃]⁺(8.7), 207[b]⁺(21.8), 203[a-COOH]⁺(81.0), 189(15.9),

175(12.6), 133(32.1).

화합물 9(hederagenin)—Subfraction F204를 MeOH로 재결정을 반복하여 백색침상의 화합물 9를 얻었다.

mp 325~30°, [α]_D¹⁶ +82.3° ($c=0.1$, pyridine); IR, ν_{\max} (KBr) 3440, 1703, 1039, 1025, 824, 811 cm⁻¹; ¹H-NMR(pyridine-d₅) δ : 0.93(3H, s, CH₃), 0.99(6H, s, 2×CH₃), 1.04(6H, s, 2×CH₃), 1.23(3H, s, CH₃), 3.31(1H, br dd, $J=4.7, 13.5$ Hz, H-18), 3.70, 4.17(1H each, d, $J=10.5$ Hz, H-23), 4.18(1H, t, $J=7.1$ Hz, H-3), 5.49(1H, br s, H-12); MS, m/z (rel. int., %) 472[M⁺](0.8), 454[M-H₂O]⁺(1.0), 426[M-(COOH+H)]⁺(0.5), 396[M-(CH₂OH+COOH)]⁺(1.2), 395[M-(CH₂OH+COOH+H)]⁺(1.4), 248[a]⁺(59.9), 233[a-CH₃]⁺(10.3), 206(13.5), 204[a-CO₂]⁺(15.5), 203[a-COOH]⁺(55.4), 187(30.0), 175(15.9), 173(10.2), 149(16.3), 133(23.8), 121(18.5), 119(25.1).

화합물 10(β -sitosterol 3-O-glucoside)—Subfraction F205을 MeOH-CHCl₃로 재결정을 반복하여 백색 무정형 분말을 얻었다.

mp 274~6°, [α]_D¹⁶ -41.5° ($c=0.15$, pyridine); IR, ν_{\max} (KBr) 3420, 1640, 1070, 1025, 840, 800 cm⁻¹; MS, m/z (rel. int., %) 414(29.6), 396(100.0), 382(16.1), 255(22.3), 231(12.3), 213(26.7), 163(23.2), 161(31.3).

결과 및 고찰

헥소판응집 억제작용 검색에서 양성을 나타낸 분획을 column chromatography를 실시하여 10종의 화합물을 각각 단리한 후 분광학적 방법 및 표준품과 직접적으로 대조실험을 실시하여 gallic acid methyl ester(1), (+)-catechin(2), paeoniflorin(3), albiflorin(4), paeonol(5), sterol(6) [β -sitosterol 및 campesterol], benzoic acid(7) 및 β -sitosterol 3-O-glucoside(10)로 각각 확인하였다. 화합물 8 및 9는 Liebermann-Burchard 반응에서 각각 양성을 나타내며 IR spectrum에서 triterpene계의 전형적인 band들이 나타나고

있었다. Mass spectrum에서도 분자이온 peak가 각각 m/z 456 및 472에서 나타나고 있었으며 *retro*-Diels Alder 분해에 의한 특징적인 이온들이 m/z 248 및 203에서 나타나고 있었다. 따라서 D/E ring 부분은 동일하고 단지 A/B ring 부분만 16 amu 만큼 차이가 있으므로 화합물 9는 8보다 하나의 alcohol이 더 존재함을 추정할 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum을 비교하여 화합물 9는 8의 23- CH_3 기가 일급 alcohol로 치환되었음을 알았다. 따라서 화합물 8은 oleanolic acid이며, 9는 hederagenin임을 알았다. 이와같은 결과는 표준품과 직접적으로 대조하여 확인할 수 있었다. 이 두 성분들은 *Paeonia japonica*의 줄기를 조직배양하여 얻은 callus로부터 분리 보고된 바 있으나²¹⁾ *Paeonia*속 식물로부터는 지금까지 보고되지 않은 성분들이다. 한편 Yu 등⁸⁾의 보고에 의하면 paeonol(5) 및 그의 배당체는 *P. suffruticosa*에만 존재하므로 *P. lactiflora*와 구별된다고 발표한 바 있으나 Miyazawa 등⁵⁾에 의하면 이 물질은 작약 정유성분중의 주성분임을 밝혀 보고한 바 있다. 본 연구에서도 paeonol의 존재를 확인하였다.

이들 분리한 성분 가운데 혈소판응집 억제작용을 나타내는 유효성분은 methyl gallate(1)와 paeonol(5)임을 확인하였다.²²⁾

감사의 말씀—이 연구는 보건사회부가 지원하는 1991~1992년도 신약개발지원 연구비로 수행하였으며 이에 감사하는 바이다.

〈1993년 7월 1일 접수 : 7월 15일 수리〉

문 헌

1. 지형준, 이상인 : 대한 약전의 한약(생약) 규격집 주해서, 한국메디칼인덱스사, 서울, pp. 596-597 (1988).
2. Aimi, N., Inaba, M., Watanabe, M. and Shibata, S.: *Tetrahedron* 25, 1825 (1969).
3. Kaneda, M., Iitaka, Y. and Shibata, S.: *Tetrahedron* 28, 4309 (1972).
4. Kang, S.S., Shin, K.H. and Chi, H.J.: *Arch. Pharm. Res.* 14, 52 (1991).
5. Miyazawa, M., Maruyama, H. and Kameoka, H.: *Agric. Biol. Chem.* 48, 2847 (1984).
6. Shimizu, M., Hayashi, T., Morita, N., Kikuchi, F., Noguchi, H., Iitaka, Y. and Sankawa, U.: *Chem. Pharm. Bull.* 31, 577 (1983).
7. Nishizawa, M., Yamagishi, T., Nonaka, G.-I. and Nishioka, I.: *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2850 (1980).
8. Yu, J., Lang, H.-Y. and Xiao, P.-G.: *Acta Pharmaceutica Sinica* 20, 229 (1985).
9. Lang, H.-Y., Li, S.-Z., McCabe, T. and Clardy, J.: *Planta Med.* 50, 501 (1984).
10. Hayashi, T., Shinbo, T., Shimizu, M., Arisawa, M., Morita, N., Kimura, M., Matsuda, S. and Kikuchi, T.: *Tetrahedron Lett.* 26, 3699 (1985).
11. Lang, H.-Y., Li, S.-Z., Wang, H.B., Yu, D.Q. and Liang, X.T.: *Tetrahedron* 46, 3123 (1990).
12. Yu, J., Elix, J.A. and Iskander, M.N.: *Phytochem.* 29, 3859 (1990).
13. Kadota, S., Terashima, S., Kikuchi, T. and Namba, T.: *Tetrahedron Lett.* 33, 255 (1992).
14. Kadota, S., Terashima, S., Basnet, P., Kikuchi, T. and Namba, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 41, 487 (1993).
15. Yesilada, E., Mutlugil, A. and Sener, B.: *Int. J. Pharmacog.* 30, 66 (1992).
16. Ishida, H., Takamatsu, M., Tsuji, K. and Kosuge, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 35, 849 (1987).
17. Kobayashi, M., Ueda, C., Aoki, S., Tajima, K., Tanaka, N. and Yamadara, J.: *Yakugaku Zasshi* 110, 964 (1990).
18. Hayashi, M., Baba, K. and Maeda, T.: *Yakugaku Zasshi* 110, 139 (1990).
19. 한국제약협회 : Paeony Root Glycosides의 약리학 적 효과, 제약기술정보, No. 193, pp. 50~55 (1992).
20. Yun-Choi, H.S., Kim, J.H. and Lee, J.R.: *Kor. J. Pharmacogn.* 17, 19 (1986).
21. Ikuda, A. and Itokawa, H.: *Phytochem.* 27, 2813 (1988).
22. 천연물로부터 성인병 치료 및 예방약물의 개발에 관한 보고서, 서울대학교 천연물과학연구소, pp. 15~19; 70~73(1992).