

목단피의 Hyaluronidase 저해물질

정세준, 안년형, 김윤철*

원광대학교 약학대학

Hyaluronidase Inhibitors from Moutan Cortex Radicis

Sei Joon Jeong, Nyeon Hyung Ahn and Youn Chul Kim*

College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract—From the 60% aqueous methanolic fraction of Moutan Cortex Radicis two hyaluronidase inhibitors were isolated and their structures were elucidated by spectroscopic methods. Their structures were identified as paeoniflorin (compound I) and oxypaeoniflorin (compound II). Compound I and II exhibited hyaluronidase inhibitory activities with IC_{50} of 1.71 and 1.73 mM, respectively.

Key words—Moutan Cortex Radicis; Ranunculaceae; hyaluronidase; paeoniflorin; oxypaeoniflorin.

모란(*Paeonia moutan* Aiton.)의 뿌리껍질인 목단피는 한방에서 진경, 진통, 소염, 지혈, 구어혈약으로 널리 사용되고 있다.¹⁾ 목단피에서 지금까지 밝혀진 성분으로는 phenolic compounds인 paeonol, paeonolide, paeonoside, apiopaeonoside,²⁻⁴⁾ monoterpene 배당체인 paeoniflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, benzoyloxy-paeoniflorin 등이 있다.⁵⁻⁷⁾ Paeonol은 항박테리아, 진정, 진통, 항염증, 항궤양작용이 있는 것으로 보고되어져 있으며,⁸⁻¹⁰⁾ monoterpene 배당체에 대해서는 진정, 근육경련 억제, 항염증, 항궤양 및 항알레르기 효과가 있는 것으로 밝혀졌다.¹¹⁻¹³⁾

Hyaluronidase는 mucopolysaccharide-splitting 효소 중의 하나로서 혈관계의 투과성과 염증 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾ 이 효소는 일반적으로 체내에서 불활성형으로 존재하고 금속이온 및 *N*-methyl-*p*-methoxyphenethylamine과 formaldehyde의 다중합체인 compound 48/80에 의해 활성화된다.¹⁵⁾ Compound 48/80은 비만세포

의 탈과립을 유발시켜 histamine 등의 chemical mediators를 방출시키는 염증 유발물질로 알려져 있다.¹⁶⁾ 저자 등은 천연물로부터 hyaluronidase 저해물질의 탐색을 목적으로 110종의 생약의 물 및 MeOH 추출물에 대하여 예비검색을 실시하였으며,¹⁷⁾ 본 연구에서는 활성을 나타낸 생약 중 목단피의 MeOH 추출물로부터 hyaluronidase 저해 활성을 나타내는 2종의 monoterpene 배당체인 paeoniflorin (I)과 oxypaeoniflorin (II)을 분리 동정하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기—본 실험에서 사용한 목단피는 익산시 소재 한약건재상에서 구입하여 감별한 후 세절하여 사용하였으며, 증거표본(WP No. 131)은 원광대학교 약학대학 생약표본실에 보관되어 있다. Hyaluronidase(Type VI-S:from bovine testis), compound 48/80, hyaluronic acid potassium salt(from human umbilical cord), cetylpyridinium chloride, agarose(Type I-A:low

*교신저자 : Fax 0653-52-8837

EEO), DSCG는 Sigma사의 제품을 사용하였다. 기타 시약은 1급시약을 사용하였다. 흡광도 측정을 위하여 ELISA Reader(Molecular Devices)를 사용하였다. column chromatography용 담체는 Kieselgel 60(Merck), Amberlite XAD-2(Sigma), Lipophilic Sephadex LH-20(Sigma)를 사용하였고, TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄(Merck), Silica gel with 100% octadecylsilanization and 254 nm fluorescent indicator on glass (Sigma)를 사용하였다. 또한, 사용한 기기는 다음과 같다. Melting point apparatus: Gallenkamp melting point apparatus, UV spectrophotometer: Jasco U-best 30, NMR: Varian Unity 500 spectrometer, MS: JEOL SX-102A.

Hyaluronidase 저해활성 측정 - hyaluronidase 저해활성의 측정은 전보¹⁷⁾의 방법에 준하여 실시하였다.

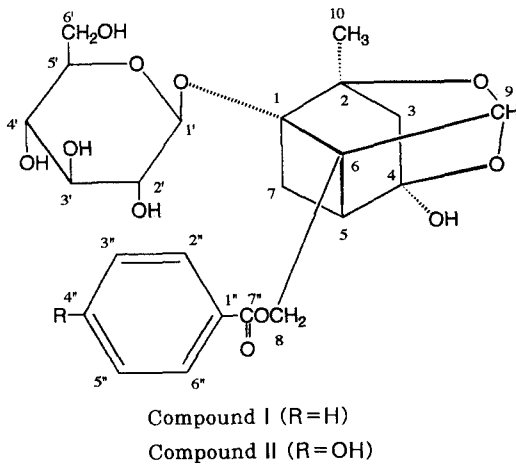
활성 물질의 분리 - 조말로 한 목단피 2 kg을 메탄올로 환류시키면서 3시간씩 2회 추출하여 여과하고 여액을 감압농축하여 메탄올 추출물(312 g)을 얻었다. 메탄올 추출물을 80% 수성 MeOH에 용해시킨 후 *n*-hexane으로 추출하여 *n*-hexane 가용부를 얻었다. 80% 수성 MeOH 분획은 증류수를 가하여 60% 수성 MeOH로 하고 여기에 CHCl₃을 가하여 용매분획을 행하여 CHCl₃과 60% 수성 MeOH 분획을 얻었다. 이들 각각의 용매분획물에 대하여 hyaluronidase 저해활성을 측정하고 활성을 나타낸 60% 수성 MeOH 분획(260.8 g)에 대하여 XAD-2 column chromatography(H₂O → MeOH)를 실시하여 3종의 소분획을 얻었다. 활성을 나타낸 소분획 2(5.46 g)는 다시 Sephadex LH-20 column chromatography(70% MeOH → MeOH)를 실시하고 TLC pattern에 따라 3종의 소분획으로 나누었다. 이들 중 활성을 나타낸 소분획 1(4.25 g)을 silica gel column chromatography(CHCl₃-MeOH-H₂O=7:3:1, lower phase)를 반복 시행하여 CHCl₃-MeOH-H₂O(7:3:1, lower phase)를 용매로 사용한 silica gel TLC에서 Rf 값이 각각 0.42와 0.30인 화합물 I(1.87 g)과 화합물 II(265 mg)을 얻었다.

결과 및 고찰

화합물 I - 화합물 I은 흰색 분말로 FeCl₃/MeOH 용액과 ferricyanide-ferric chloride시액에 의해 각각 갈색과 청색을 나타내 phenolic 화합물로 추정되었다. ¹H-NMR 측정 결과(C₅D₅N, 500 MHz) 5.90 ppm(1H, s)에서 acetal proton, 8.13 ppm(2H, d, *J*=7.8 Hz), 7.43(1H, dd, *J*=7.6, 7.3 Hz) 및 7.27(2H, dd, *J*=7.8, 7.6 Hz)에서 1치환 aromatic methine proton의 존재를 알 수 있었다. 5.13 ppm(1H, d, *J*=7.8 Hz)에서는 anomeric proton이 관찰되었고, 3.90-4.51 ppm에서 당의 proton에 유래하는 peaks가 나타났다. ¹³C-NMR(C₅D₅N, 125 MHz)과 DEPT spectra로부터 1개의 methyl기(19.86 ppm), 4개의 methylene기(62.92, 61.53, 44.83, 23.55 ppm), 10개의 methine기(133.26, 129.90, 128.76, 101.73, 100.50, 78.56, 78.44, 75.03, 71.81, 43.96 ppm) 및 6개의 quaternary carbon(166.61, 130.66, 105.99, 88.97, 86.05, 71.81 ppm)이 존재함을 알 수 있었다. aromatic carbon 중 각각 2개의 등가인 peak(129.90, 128.76 ppm), 1개의 ester carbon(166.61 ppm), 1개의 당에서 유래하는 anomeric carbon(100.50 ppm) 및 methine carbon이 관찰되었으며, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C COSY 및 HMBC spectra의 검토로부터 화합물 I은 각각 1개의 benzoyl기, hexose 및 monoterpene으로 구성됨을 알 수 있었고, 이는 목단피의 주요 성분계열 중의 하나인 monoterpene 배당체로 추정할 수 있었다. 이상의 기기분석 데이터를 종합한 결과와 ¹³C-NMR 데이터를 paeoniflorin의 문헌치^{6,16)}와 비교한 결과 일치하였으므로 화합물 I은 paeoniflorin으로 동정하였다.

화합물 II - 화합물 II는 흰색 분말로 positive FAB-MS에서 *m/z* 497(M+H)⁺의 분자이온 peak를 나타내 화합물 I에 비하여 분자량 16이 증가되었다. 화합물 I과 II의 ¹H-NMR 데이터(C₅D₅N, 500 MHz)를 비교한 결과 화합물 I에서 관찰되었던 7.43 ppm(1H, dd, *J*=7.6, 7.3 Hz)에서의 benzoyl기의 4'-H의 소실과 3'', 5''-H(7.04 ppm, 2H, dd, *J*=8.6 Hz)의 고자장으로의 shift외에는 두 화합물의 ¹H-NMR spectra가 일치하였다. ¹³C-NMR spectrum의 비교에서도 aromatic ring유래의 peak만이 변화됨을 알 수 있었다. 화합물 I에서 133.26 ppm에서 관찰되었던 C-4''의 methine carbon

signal이 저자장 shift한 163.58 ppm의 quaternary carbon signal과 132.43, 116.11 ppm에 각각 2개의 등가인 C-2'', 6'' 및 C-3'', 5''의 signal이 관찰되었다. 이상의 결과 및 ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C COSY 및 HMBC spectra의 검토로부터 화합물 II는 화합물 I의 benzoyl기의 para위치에 hydroxyl기가 도입된 구조로 추정하였다. 이상의 기기분석 데이터를 종합한 결과와 ^{13}C -NMR 데이터를 oxypaeoniflorin의 문헌치⁶⁾와 비교한 결과 일치하였으므로 화합물 II는 oxypaeoniflorin으로 동정하였다.



Hyaluronidase 저해활성 - 화합물 I, II의 hyaluronidase 저해활성을 disodium cromoglycate (DSCG)와 비교하여 조사한 결과, 화합물 I과 II는 각각 1.71, 1.73 mM에서 IC_{50} 을 나타내었으며 이는 양성대조약물인 DSCG($\text{IC}_{50}=1.78$ mM)와 동등한 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

결 론

목단피 MeOH 추출물의 60% 수성 MeOH 분획물에서 hyaluronidase 저해물질인 2종의 monoterpene 배당체를 분리하고 기기분석을 통하여 그 구조를 각각 paeoniflorin과 oxypaeoniflorin으로 동정하였다. paeoniflorin과 oxypaeoniflorin의 hyaluronidase 저해활성은 각각 1.71, 1.73 mM에서 IC_{50} 을 나타내었으며, 양성대조약물인 DSCG($\text{IC}_{50}=1.78$ mM)와 동등한 활성을 나타내었다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 지정 의약자원연구센터 1997년도 연구비에 의해 지원되었기에 이에 감사드리고 기기분석에 도움을 주신 일본 큐슈대학 약학부 Higuchi교수님께 감사드립니다.

인용문헌

1. 육창수, 이선주, 유승조, 김태희, 한영구, 이서윤, 문영희, 한만우, 이경순 (1981) 한국본초학, p. 184, 계축문화사, 서울.
2. Kariyone, T., Takahashi, M. and Takahashi, K. (1956) Glycosides VII. Components of *Paeonia suffruticosa*. 1. *Yakugaku Zasshi* 76: 917-919.
3. Kariyone, T., Takahashi, M. and Takahashi, K. (1956) Glycosides VIII. Components of *Paeonia suffruticosa*. 2. *Yakugaku Zasshi* 76: 920-921.
4. Yu, J., Lang, H. Y. and Xiao, P. G. (1986) A new compound, apiopaeonoside, isolated from the root of *Paeonia suffruticosa*. *Yaoyue Xuebao* 21: 191-197.
5. Kaneda, M., Iitaka, Y. and Shibata, S. (1972) Chemical studies on the oriental plant drugs. XXXIII. Absolute structure of paeoniflorin, albiflorin, oxypaeoniflorin and benzoylpaeoniflorin isolated from Chinese paeony root. *Tetrahedron* 28: 4309-4317.
6. Kitagawa, I., Yoshikawa, M., Tsunaga, K. and Tani, T. (1979) Studies on Moutan Cortex II. On the chemical constituents. *Shoyakugaku Zasshi* 33: 171-177.
7. Kang, S. S., Shim, K. H. and Chi, H. J. (1989) Galloyloxypaeoniflorin, a new monoterpene glycoside from paeony roots. *Kor. J. Pharmacogn.* 20: 48-49.
8. Ohta, T., Mihashi, S., Saheki, Y. and Wakabayashi, K. (1961) Bacteriostatic effect of paeonol, the main component of paeony root, on some bacteria causing appendicitis. *Tokyo Yakka Daigaku Kenkyu Nempo* 79-81.
9. Harada, M. and Yamashita, A. (1969) Pharmacological studies on the root bark of *Paeonia moutan* I. *Central effects of paeonol*. *Yakugaku Zasshi* 89: 1205-1211.
10. Harada, M., Yamashita, A. and Aburada, M. (1972) Pharmacological studies on the root bark of *Paeonia moutan* II. Antiinflammatory

- effects, preventive effect on stress-induced gastric erosion, inhibitory effect on gastric juice secretion and effects on paeonol. *Yakugaku Zasshi* 92: 750-756.
11. Takagi, K. and Harada, M. (1969) Pharmacological studies on herb paeony roots I. Central effects of paeoniflorin and combined effects with licorice component F_M 100. *Yakugaku Zasshi* 89: 879-886.
 12. Takagi, K. and Harada, M. (1969) Pharmacological studies on herb paeony roots II. Antiinflammatory effect, inhibitory effect on gastric juice secretion, preventive effect on stress ulcer, antidiuretic effect of paeoniflorin and combined effects with licorice component F_M 100. *Yakugaku Zasshi* 89: 887-892.
 13. Yamahara, J., Yamada, T., Kimura, H., Sawada, T. and Fujimara, H. (1982) Biologically active principles of crude drugs. II. Antiallergic principles in "Shoseiryu-To", antiinflammatory properties of paeoniflorin and its derivatives. *J. Pharmacobiodyn.* 5: 921-929.
 14. Meyer, K. (1947) The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol. Rev.* 27: 335-359.
 15. Kakegawa, H., Matsumoto, H. and Satoh, T. (1985) Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 642-646.
 16. Baltzly, R., Buck, J. S., de Beer, E. J. and Webb, F. J. (1949) A family of long acting depressors. *J. Am. Chem. Soc.* 71: 1301-1305.
 17. Jeong, S. J., Kim, N. Y., Ahn, N. H. and Kim, Y. C. (1997) Screening of hyaluronidase inhibitory activity using a microplate assay. *Kor. J. Pharmacogn.* 28: 131-137.
 18. Yamasaki, K., Kaneda, M. and Tanaka, O. (1976) Carbon-13 NMR spectral assignments of paeoniflorin homologues with the aid of spin-lattice relaxation time. *Tetrahedron Lett.* 44: 3965-3968.

(1998년 2월 24일 접수)