

## 작약 추출물의 혈소판 작용에 관한 연구

손동주·박영현<sup>†</sup>

순천향대학교 식품영양학과

### Effect of Extract from *Paeoniae radix* on Rabbit Platelets

Dong-Ju Son and Young-Hyun Park<sup>†</sup>

Dept. of Food Science and Nutrition, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

#### Abstract

*Paeoniae radix* has been considered as one of the most important crude drugs used in traditional oriental medicine and has been employed as a circulatory tonic in care of weakness, night sweats, and lumbar pain, etc. Platelet activation plays an important role in thrombosis and haemostasis. Active compounds for the inhibition of platelet activation from *Paeoniae radix* were extracted and fractionated into five fractions. Its fraction two and three of ethyl acetate extract inhibited the aggregation of washed rabbit platelets induced by collagen. Two active compounds, bezoyloxypaeoniflorin and paeoniflorin, were isolated from fraction two and three by silica gel column and high performance liquid chromatography. The chemical structures were determined by comparison of their proton and carbon nuclear magnetic resonance spectra. Benzoyloxypaeoniflorin showed strong inhibition at the concentration of 100 µg/mL against collagen-induced washed rabbit platelets aggregation. It is suggested that *Paeoniae radix* has become food material to prevent a cardiovascular disease.

**Key words:** *Paeoniae radix*, platelet aggregation, benzoyloxypaeoniflorin, paeoniflorin

#### 서 론

생활수준의 향상으로 동물성 식품 및 지방의 섭취 빈도가 증가됨에 따라 성인병과 관련한 현대인의 건강에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다(1). 특히 성인병 중에서 뇌혈관 및 심장질환은 현대인의 가장 높은 사망원인을 나타내고 있으며 여러 노력에도 불구하고 개선되지 않고 있다(2). 이러한 질환은 혈관 장애로 혈액과 매우 긴밀한 관계에 있으며 현재 뇌심혈관계 질환의 직접적인 원인으로 혈액 중에서도 혈소판의 응집력 향진에 기인한다고 한다. 혈소판은 물리, 화학적 자극에 의해 혈관이 손상되면 활성화되어 방출, 점착, 변형, 응집함으로써 혈액유실을 방지한다. 그러나 어떤 병적인 증상에 의해 과도하게 활성화될 경우 뇌심혈관에서 협심증, 동맥경화, 혈전 등을 유발한다. 따라서 혈소판은 뇌심혈관계 질환이나 혈전증의 연구뿐만 아니라 혈소판 세포막  $Ca^{2+}$  투과도의 정보전달 연구에 생체 모델로서 새롭게 인식되고 있다. 최근 혈소판 활성화를 억제하는 천연식품 중에서 생리활성 물질의 효과를 검색 및 동정하여 질병의 예방, 회복, 생체 조절 기능 등을 갖는 기능성 식품 개발은 식생활과 관련된 성인병의 가장 좋은 대처방안으로 인식되고 있다(3,4).

작약(*Paeoniae radix*)은 미나리아재비과에 속하는 다년

생 초본으로 뿌리는 비대하며 원주 및 원추상으로 길이 7~20 cm 내외이고 줄기는 곧게 서고 60 cm 안팎의 높이로 한방에서 진경, 향균, 진통, 해열, 이뇨, 지한, 진정 등의 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며(5-7) 최근의 연구에서 항혈전 작용(8), 항고지혈 작용(9-11), 항산화 작용(12,13), 혈관 확장작용(14), 관상동맥 질환을 가진 환자에서 arachidonic acid 등에 대한 대사작용(15) 등이 보고되어 있다. 본 연구에서는 작약으로부터 혈소판 활성화 억제작용을 통한 기능성 식품을 개발하고자 추출, 분리, 정제한 분획물로부터 혈소판 응집 억제작용을 검색하여 유효성분을 동정하였다.

#### 재료 및 방법

##### 실험동물 및 시약

실험에 사용한 토끼는 2.5~3 kg되는 수컷을 연암축산대학에서 구입하였고 작약은 경북농업기술원 의성약초시험장에서 분양 받아 사용하였다. 혈소판 활성화에 사용되는 시약 중 collagen은 Chrono-log Co.(Havertown, PA, USA)에서 구입하였다. 분석용 시약으로는 HPLC용 methanol(Tedia Co. Inc., Ohio, USA)을 사용하였고, Column chromatography용 silicagel은 230~400 mesh의 Kieselgel 60(Merck, Darmstadt,

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: pyh012@sch.ac.kr  
Phone: 82-41-530-1259, Fax: 82-41-530-1264

Germany)을 사용하였으며 TLC plate는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였다. 본 실험에 사용한 모든 용매는 증류하여 사용하였고 그 외 시약은 특급 시약을 사용하였다.

#### 혈소판 현탁액의 조제

토끼 혈액을 1% EDTA용액(혈액량의 1/10)에 채혈한 후 230×g로 10분간 원심분리하였다. 상등액(platelet rich plasma)을 분리하여 800×g로 10분간 원심분리한 후 침전물(platelet rich pellet)을 Tyrode HEPES buffer pH 6.35 용액으로 두 번 세척한 후 마지막으로 Tyrode HEPES buffer pH 7.35 용액으로 부유하여 세정 혈소판(washed platelet)을 조제하였다. 혈소판 수를 광학 현미경으로 계측하여 혈소판 수가 4~5×10<sup>8</sup> cells/mL가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다. Tyrode HEPES 용액의 조성은 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5.6 mM glucose, 3.8 mM HEPES, 0.35% Albumin(BSA), 0.4 mM EGTA이다.

#### 혈소판 활성화 작용 측정

혈소판 형태의 변형과 응집작용은 광투과도 변화를 이용한 흡광도측정장치(Aggregometer 470-VS, Chrono-Log Co., USA)를 사용하였다. 토끼 세정 혈소판 부유액 250 μL를 취하여 CaCl<sub>2</sub> 1 mM을 첨가하고 1,000 rpm에서 교반하면서 37°C로 incubation시킨 후 3분이 경과된 후에 collagen(10 μg/mL)을 투여하여 혈소판 응집을 유도하였다. 혈소판 활성화 억제 작용은 collagen으로 유도된 aggregation(%)을 대조군(A)으로, 약액 분획물을 전처리한 후 유도된 aggregation(%)을 시료군(B)으로 하여 다음 계산식에 따라 inhibition(%)로 나타내었다.

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

A: control aggregation (%), B: sample aggregation (%)

약액의 혈소판 활성화에 작용하는 생리활성물질의 분리 세정한 약액(600 g)을 3 L의 methanol(MeOH)로 실온에

서 24시간 동안 3회 반복 추출하였다. MeOH추출물을 다시 ethyl acetate(EtOAc)로 추출한 후 silicagel 컬럼에서 용출하여 5개의 분획을 얻었다(Fig. 1). EtOAc추출물에서 얻은 분획물에서 최종적으로 활성을 나타내는 물질을 TLC(CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 7:3:1, v/v/v)로 확인하고 HPLC(LC-10AD, Shimadzu, Japan)로 Cosmosil ODS 컬럼(4.6×150 mm), 이동상(30% MeOH), 검출파장 254 nm, 유속 1 mL/min의 조건에서 유효성분을 분리 정제하였다. 정제된 각 화합물의 구조는 <sup>1</sup>H-과 <sup>13</sup>C-핵자기공명(AVANCE 200, Bruker, Germany) 스펙트라에 의해 결정하였다.

#### 결과 및 고찰

약액추출물 중 비교적 강한 활성을 갖는 EtOAc추출물에서 유효성분을 분리하고자 silicagel 컬럼으로 5개의 분획물을 분획하였다. 각 분획물의 혈소판 억제작용은 collagen의 응집작용에 대하여 II 분획물이 100%의 강한 억제율을 나타내었으나 다른 분획물에서는 약한 억제율을 나타내었다. 비교적 혈소판 응집 억제작용이 강한 EtOAc추출물의 II 분획물을 silicagel 컬럼으로 분획하여 compound A를 얻었고 III 분획물에서 compound B를 얻었으며 혈소판 응집 억제작용은 collagen(10 μg/mL)의 응집작용에 대하여 compound A가 100 μg/mL의 농도에서 91%로 강한 혈소판 응집 억제작용을 나타내었으나 동일한 농도에서 compound B는 13%로 약한 혈소판 응집 억제작용을 나타내었다(Table 1).

Compound A, B의 TLC(CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 7:3:1)의 R<sub>f</sub> 값은 각각 0.48, 0.25로 나타났다. 이러한 compound A, B의 HPLC분석에서 Fig. 2에서와 같이 각각 5.0분, 9.1분에서 peak를 분리하여 <sup>1</sup>H-과 <sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>) 스펙트라로 구조를 확인하였다(Table 2, 3).

<sup>1</sup>H-NMR 분석에서 compound A는 C3의 2H는 δ 1.7, 1.85(Aβ, J=18.2), C5와 C7β의 H는 δ 2.51(m), C7 α의 H는 δ 1.68(d, J=10.4), C8의 2H는 δ 4.68(s), C9의 H는 δ 5.40(s),

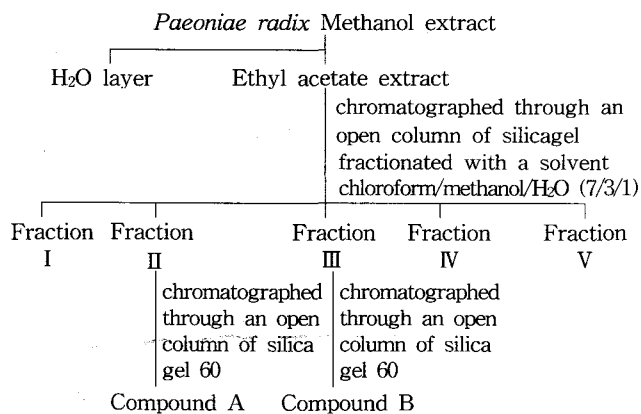


Fig. 1. Fractionation procedure of the methanol extract from *Paeoniae radix*.

Table 1. Effects of solvent extracts and ethylacetate fractions from *Paeoniae radix* on the platelet aggregation induced by collagen

Samples	Collagen	
	Aggregation (%)	Inhibition (%)
Control	78	
MeOH extract	79	0
EtOAc extract	70	10
Fraction I	72	8
Fraction II	0	100
Fraction III	70	10
Fraction IV	75	4
Fraction V	75	4
Benzoyloxypaeoniflorin	7	91
Paeoniflorin	68	13

Washed rabbit platelets were preincubated with sample (100 μg/mL) at 37°C for 3 min before the addition of collagen (10 μg/mL).

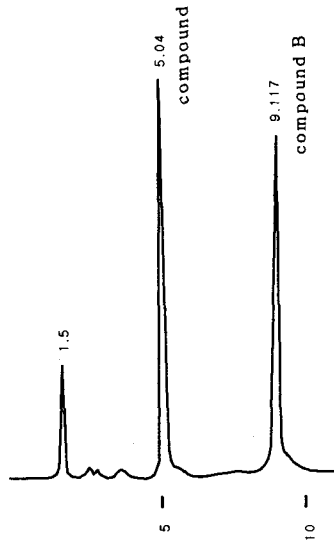


Fig. 2. HPLC chromatogram of compounds from *Paeoniae radix*.

Table 2. <sup>1</sup>H-NMR spectral data of compound A and B from *Paeoniae radix* (in CDCl<sub>3</sub>)

Proton	Compound A	Compound B
3	1.7 and 1.85 (ABq, J=18.2)	1.91 and 2.00 (ABq, J=12.0)
5	2.51 (m) 1.68 (d, J=10.4)	2.6 (m) 1.47 (d, J=10.0)
7	2.51 (m)	2.5 (m)
8	4.68 (s)	4.7 (s)
9	5.40 (s)	5.46 (s)
10	1.25 (s)	1.39 (s)
1'	4.56 (d, J=6.4)	4.52 (d, J=6.0)
2'	3.32 (m)	3.26 (m)
3'	3.42 (m)	3.32 (m)
4'	3.36 (m)	3.28 (m)
5'	3.40 (m)	3.29 (m)
6'	3.81 (m)	3.83 (m)
2'', 6''	8.05 (d, J=6.9)	8.08 (d, J=7.8)
3'', 5''	7.48 (dd, J=6.9, 7.2)	7.51 (t=8.0)
4''	7.57 (d, J=7.2)	7.47 (t=8.0)
2''', 6'''	8.00 (d, J=8.9)	-
3''', 5'''	7.06 (s)	-

C10의 3H(methanol)는 δ 1.25(s)를 통해 monoterpene 구조의 pinene type인 것을 알 수 있으며 glucose 구조는 C1'의 H는 δ 4.56(d, J=6.4), δ 3.32, 3.42, 3.36, 3.40, 3.81(m)로 알 수 있으며 C2''와 C6''의 H는 δ 8.05(d, J=6.9), C3''과 C5''의 H는 δ 7.48(dd, J=6.9, 7.2)이고 C4''의 H는 δ 7.57(d, J=7.2)로 oxy type의 benzoic acid의 구조를 갖고 있는 것을 알 수 있으며 C2'''와 C6'''의 H는 δ 8.00(d, J=8.9), C3'''과 C5''' 7.06(s)으로 benzoic acid 구조를 갖고 있는 것을 확인하였다.

Compound B는 C3의 2H는 δ 1.91, 2.0(ABq, J=12.0), C5와 C7β의 H는 δ 2.6(m), C7α의 H는 δ 1.47(d, J=10.0), C8의 2H는 δ 4.7(s), C9의 H는 δ 5.46(s), C10의 3H(methanol)는 δ 1.39(s)를 통해 monoterpene 구조의 pinene type인 것을 알 수 있으며 glucose 구조는 C1'의 H는 δ 4.52(d, J=6.0), δ

Table 3. <sup>13</sup>C-NMR spectral data of compound A and B from *Paeoniae radix* (in CDCl<sub>3</sub>)

Carbon	Compound A	Compound B
1	89.2	89.4
2	87.2	87.0
3	44.4	44.6
4	106.1	106.5
5	43.7	44.0
6	23.0	23.5
7	71.8	71.7
8	61.5	61.8
9	102.1	102.4
10	19.4	19.7
1'	99.9	100.2
2'	74.9	75.1
3'	77.7	77.9
4'	71.8	71.7
5'	75.1	78.0
6'	65.1	62.9
1''	121.4	131.2
2'', 6''	134.4	130.8
3'', 5''	110.1	129.8
4''	168.0	134.6
7''	160.0	168.1
1'''	133.8	-
2''', 6'''	131.1	-
3''', 5'''	130.6	-
4'''	134.4	-
7'''	167.7	-

3.26, 3.32, 3.28, 3.29, 3.83(m)으로 알 수 있으며 C2''와 C6''의 H는 δ 8.08(d, J=7.8), C3''과 C5''의 H는 δ 7.51(t=8.0)이고 C4''의 H는 δ 7.47(t=8.0)로 benzoic acid의 구조를 갖고 있는 것을 알 수 있으며 compound A와는 다르게 benzoic acid 구조가 1개이므로 수소 비율이 1:1:1로 흡수가 일어나는 것을 확인하였다.

<sup>13</sup>C-NMR 분석에서 compound A는 monoterpene의 pinene type 구조는 δ 89.2, 87.2, 44.4, 106.1, 43.7, 23.0, 71.8, 61.5, 102.1, 19.4를 통해 알 수 있으며 C1에 위치한 glucose 구조는 δ 99.9, 74.9, 77.7, 71.8, 75.1, 65.1을 통해 알 수 있으며, C8에 위치한 benzoic acid 구조에서 C1''은 δ 121.4, C2''와 C6''은 δ 134.4, C3''과 C7''은 δ 110.1이고 C4''는 δ 168로 oxy type인 것을 알 수 있으며 monoterpene의 pinene type 구조와 oxy type의 benzoic acid가 결합하고 있는 C7''(COPh)은 δ 160.0으로 나타났다. Glucose의 C6' 위치에 C1'''은 δ 133.8, C2'''와 C6'''은 131.1, C3'''와 C5'''는 δ 130.6, C4'''는 134.4로 이중결합을 이루는 π 전자에서 6개의 carbon이 고르게 분포되어 있는 benzoic acid의 구조인 것을 알 수 있다. glucose 구조와 benzoic acid가 결합하고 있는 C7'''(COPh)은 δ 167.7로 나타났다.

Compound B는 monoterpene의 pinene type 구조는 δ 89.4, 87.0, 44.6, 106.5, 44.0, 23.5, 71.7, 61.8, 102.4를 통해 알 수 있으며 C1에 위치한 glucose 구조는 δ 100.2, 75.1, 77.9, 71.7, 78.0을 통해 알 수 있으며 C8에 위치한 benzoic acid 구조에서 C1''은 δ 131.2, C2''와 C6''은 δ 130.8, C3''과

C7''은  $\delta$  129.8이, C4''는  $\delta$  134.6을 통해 알 수 있으며 mono-terpene의 pinene type 구조와 benzoic acid가 결합하고 있는 C7''(COPh)은  $\delta$  168.1로 나타났다.

따라서 compound A는 monoterpene의 pinene 구조에서 C1 위치에 glucose 구조를 가지며 glucose 구조의 C6' 위치에 benzoic acid 구조를 가지고 C8 위치에 oxy type의 benzoic acid 구조를 갖는 benzoyloxypaeoniflorin인 것으로 확인되었다. Compound B는 compound A에서 C8 위치에 benzoic acid 구조이며 glucose 구조의 C6' 위치에 benzoic acid 구조가 없는 paeoniflorin인 것으로 확인되었다(Fig. 3).

작약의 유효성분으로는 paeoniflorin, albiflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, benzoic acid, tannin 등을 비롯한 여러 성분이 알려져 있다(16-23). 그 중 paeoniflorin이 가장 지표가 되는 물질이며 다양한 작용이 보고되어져 있으나 본 연구결과에서 혈소판 응집 억제작용은 미약한 것으로 사료되어진다. Benzoyloxypaeoniflorin은 Ikeda 등(16)이 작약의 미량 유효성분으로 보고한 바 있으나 이에 대한 생리작용에 관한 보고는 미비한 실정이며 Kang 등(8,23)이 작약의 유효성분 중 methyl gallate와 paeonol이 혈소판 응집 억제작용을 나타내는 것으로 연구 보고하였으나 benzoyloxypaeoniflorin의 혈소판 응집 억제작용에 대한 보고는 없었다. 그러므로 혈소판 작용에 대한 benzoyloxypaeoniflorin의 응집 억제작용은 세포 내에서 어떠한 작용 기전을 갖는지에 대한 연구가 진행되어야 한다.

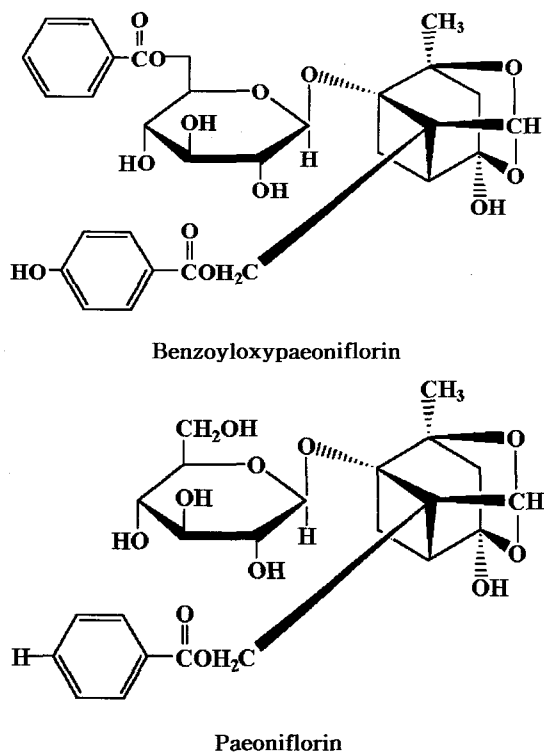


Fig. 3. The chemical structure of compounds isolated from *Paeonia radix*.

## 요 약

최근 동물성 식품 및 지방 섭취 증가로 인한 현대인의 식생활 변화로 혈소판 활성화가 직접적 원인인 뇌심혈관질환의 사망률이 증가되고 성인병 예방과 치료의 대처방안으로 식품의 기능성에 대한 관심이 높아짐에 따라 진경, 향균, 진통, 해열, 이뇨, 지한, 진정 등의 작용을 갖는 작약(*Peoniae radix*) 으로부터 추출, 분리·정제한 분획물에서 혈소판 응집 억제 작용이 있는 생리활성물질을 분리·동정하였다. 작약에서 methanol, ethyl acetate의 용매추출과 이러한 추출물에서 컬럼 및 HPLC로 분리·정제한 2개 물질의 화학구조를  $^1\text{H}$ -과  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트라 분석한 결과 benzoyloxypaeoniflorin과 paeoniflorin을 확인하였고 혈소판 응집 억제작용은 benzoyloxypaeoniflorin이 비교적 강하게 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 2000년도 한국과학재단 지역대학우수과학자지원연구사업으로 수행된 연구의 일부로서 지원하여 주신 한국과학재단에 감사드립니다.

## 문 헌

1. 보건복지부. 1997. 1995년도 국민영양조사보고서. 국민영양 97-10, p 48-51.
2. 경제기획원 통계청. 1991. 1990년 사망원인 통계연보.
3. Matano Y, Okuyama T, Shibata S, Hoson M, Osada H, Noguchi T. 1996. Studies on coumarins of a Chinese drug "Qian-Hu"; VII. Structures of new coumarin-glycosides of Zi-Hua Qian-Hu and effect of coumarin-glycosides on human platelet aggregation. *Planta Med* 50: 135-138.
4. Tuminen M, Bohlin L, Rolfsen W. 1991. Effects of calaguala and an active principle, adenosine, on platelet activating factor. *Planta Med* 58: 306-310.
5. 강병수. 1992. 본초학. 도서출판 수립사, 서울. p 581-583.
6. 김태정. 1994. 원색도감: 약이 되는 한국의 산야초. 국일문화사, 서울. p 684-685.
7. 지형준, 이상인. 1988. 대한 약전의 한약(생약) 규격집 주해서. 한국메디칼인쇄사, 서울. p 596-597.
8. Kang SS, Kim JS, Kim EM, Yun-Choi HS. 1991. Platelet anti-aggregation of *Paeony* root. *Kor J Pharmacogn* 22: 215-218.
9. Ro HS, Ko WK, Park KK, Cho YH, Park HS. 1997. Anti-hyperlipidemic effects of *Bupleuri radix*, *Paeoniae radix* and *Uncariae ramulus et Uncus* on experimental hyperlipidemia in rats. *J Applied Pharm* 5: 43-47.
10. Ro HS, Ko WK, Yang HO, Park KK, Cho YH, Park HS. 1997. Effect of several solvent extracts from *Paeoniae radix* on experimental hyperlipidemia in rats. *J Kor Pharm Sci* 27: 145-151.
11. Ro HS, Ko WK, Yang HO, Park KK, Cho YH, Lee YE, Park HS. 1999. Isolation of hyperlipidemic substances from methanol extract of *Paeoniae radix*. *J Kor Pharm Sci* 29: 55-60.
12. Kim YE, Lee YC, Kim HK, Kim CJ. 1997. Antioxidative effect of ethanol fraction for several Korean medicinal plant hot water extracts. *Korean J Food & Nutr* 10: 141-144.

13. Bang MH, Song JC, Lee SY, Park NK, Baek NI. 1999. Isolation and structure determination of antioxidants from the root of *Paeonia lactiflora*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 42: 170-175.
14. Goto H, Shimada Y, Akechi Y, Kohta K, Hattori M, Terasawa K. 1996. Endothelium-dependent vasodilator effect of extract prepared from the root of *Paeonia lactiflora* on isolated rat aorta. *Planta Med* 62: 436-439.
15. Liu J. 1983. Effect of *Paeonia ovovata* 801 on metabolism of thromboxane B2 and arachidonic acid and platelet aggregation in patients with coronary heart disease and cerebral thrombosis. *Chung-Huai Chih* 63: 477-481.
16. Ikeda N, Fukuda T, Jyo H, Shimada Y, Murakami N, Saka M, Yoshikawa M. 1996. Quality evaluation on *Paeoniae radix*; I. Quantitative analysis of monoterpene glycosides constituents of *Paeoniae radix* by means of high performance liquid chromatography; Comparative characterization of the external figures, processing method and the cultivated areas. *Yakugku Zasshi* 116: 138-147.
17. Aimi N, Hattori T, Ueyama M, Shinoda S, Miyake Y. 1979. Determination of paeoniflorin in *Paeony* extract by high performance liquid chromatography. *Yakugaku Zasshi* 99: 598-601.
18. Shibata S, Nakahara M. 1963. Studies on the constituents of Japanese and Chinese *Paeony* crude drugs; VIII. Paeoniflorin, a glucoside of Chinese *Paeony* root (1). *Chem Pharm Bull* 11: 372-378.
19. Shibata S, Nakahara M, Aimi N. 1963. Studies on the constituents of Japanese and Chinese *Paeony* crude drugs; IX. paeoniflorin, a glucoside of Chinese *Paeony* root (2). *Chem Pharm Bull* 11: 379-381.
20. Shibata S, Nakahara M, Aimi N. 1966. The occurrence of paeoniflorin in the plant of *Paeonia* spp. *Shoyakugaku Zasshi* 20: 37-39.
21. Kaneda M, Iitakawa Y, Shibata S. 1972. Chemical studies on the oriental plant drugs.; X. The absolute structures of paeoniflorin, albiflorin, oxypaeoniflorin and benzoylpaeoniflorin isolated from Chinese *Paeony* root. *Tetrahedron* 28: 4309-4317.
22. Shimizu M, Hayashi T, Morita N, Kimura I, Kimura M. 1981. Paeoniflorigenone, a new monoterpene from *Paeony* root. *Tetrahedron Lett* 22: 3069-3070.
23. Kang, SS, Kim JS, Yun-Choi HS, Han BH. 1993. Phytochemical studies on *Paeoniae radix*. *Kor J Pharmacogn* 24: 247-250.

(2002년 2월 22일 접수; 2002년 5월 7일 채택)