

작약의 혈소판 응집억제작용에 관한 연구

박관혁 · 서범석 · 손동주 · 박영현 · 장성근*

Study on Inhibition of Platelet Aggregation of Bioactive Constituents from *Paeonia lactiflora*

Gwan-Hyuck Park, Beom-Seok Seo, Dong-Ju Son, Young-Hyun Park and Sung-Keun Chang*

요약 작약의 methanol 추출물은 혈소판 활성화 실험에서 혈소판 응집에 대해 강한 억제제를 보였다. 활성성분은 chromatography방법을 사용하여 정제하였고 NMR과 기존의 Data로 분석하였다. Compound 1b는 benzoyloxypaeoniflorin과 동일한 구조임을 확인하였으며, compound 2e는 작약의 주성분인 paeoniflorin과 동일한 화학구조를 가졌으며, compound 3a의 분석결과 구조적 유사성은 있으나 동일한 구조식은 확인할 수 없었지만 collagen에서 응집억제활성이 90%이상의 뛰어난 활성을 나타내어 benzoyloxypaeoniflorin과 유사하게 benzoyl기가 다른 작용기로 치환되었거나 R1 group이 다른 작용기로 치환된 형태로 추측하였다. Paeoniflorin이 collagen보다 thrombin에서 강한 억제제를 보이는 것은 Ca^{2+} chelate를 형성함으로써 calcium 대사산물이 파괴된 것으로 추측했다. Compound 3a는 paeoniflorin의 benzoyl기에 있는 OH기나 paeoniflorin의 glycoside 5-carbon 위치의 OH기 대신에 다른 작용기가 대사산물의 역할을 수행했을 것으로 추정했다.

Abstract Methanol extracts from *Paeonia lactiflora* showed a strong inhibition against platelet aggregation on platelet activation test. Therefore, the bioactive constituents from *Paeonia lactiflora* were prepared using chromatography methods and were analyzed by NMR and reference data. Compound 1b was confirmed a same structure with benzoyloxypaeoniflorin, compound 2e was a same structure with paeoniflorin; main product of *Paeonia lactiflora*. Analytical data of compound 3a were not consistent with any known paeoniflorin structure, but showed the structural similarity with it. And also the aggregation inhibition activity of compound 3a showed a strong inhibition($\geq 90\%$) induced by collagen. Therefore it suggested that the structure of compound 3a may be the similar structure of benzoyloxypaeoflorin with a functional group in place of benzoyl group and/or a different functional group in stead of R1. We suggested that benzoyl group of benzoyloxypaeoniflorin substituted instead of 5-carbon OH group on glycoside moiety paeoniflorin played role of the metabolite in case of a platelet aggregation inhibition activity. Paeoniflorin showed more strong inhibition by thrombin than collagen. Therefore, it may be destructed a calcium metabolite as a forming Ca^{2+} chelate. Compound 3a may be that other functional group instead of OH group of 5-carbon on glycoside moiety of paeoniflorin and/or OH group of benzoyl moiety of paeoniflorin played role of the metabolite in a platelet aggregation inhibition.

Key Words : 작약, *Paeonia lactiflora*, Paeoniflorin, Benzoyloxypaeoniflorin

1. 서 론

최근 천연물을 중심으로 한 학문이 발전하면서 천연물이 가지는 2차 대사산물인 생리활성 물질에 대한 관심이 증대되고 있다. 또한 인공합성품의 일부가 안정성의 문제가 제기되면서 천연물의 이용분야가 더욱 확대

되고 있다.

급속한 경제 발전과 생활수준의 향상으로 식생활을 포함한 생활방식의 다양화로 인하여 과거 감염위주의 질병이 감소하고 선진국형의 만성퇴행성 질환이 증가하고 있는 추세이다[1-5].

혈소판은 혈전증(thrombosis)과 지혈증(haemostasis)에서 중요한 역할을 담당하고 있는 인자로서 혈관내 병적 이상으로 인한 과도한 혈전생성은 뇌심혈관계질환이

* 순천향대학교 응용과학부 교수
Tel : 041-530-1240

나 항고지혈증을 연구하는데 유용하게 이용되고 있다 [1, 5-9]. 작약은 미나리제비과 및 작약과, 작약속에 속한 다년생 초본식물로 현재 한방에서는 적작약과 백작약을 구분하여 사용한다. 적작약은 해독과 정혈작용인 진정, 진통, 항균, 관상동맥확장 등이 보고되었고, 백작약은 자양, 보혈 및 진경작용인 진경, 진통 항균, 항진균 작용이 보고되었다[10, 11]. 국내에서는 인삼, 당귀와 더불어 가장 널리 사용되는 생약재로서 쌍화탕, 사물탕, 당귀작약탕, 우황청심원 등의 원료로서 많은 양이 소비되며, 최근 가공식품의 제조에 주원료로 인정됨으로서 기능성 식품의 소재로서 식품공업에서 활용이 확대되었다. 작약의 화학적 연구는 Shimata[15] 등이 일본산 작약에서 분리하여 구조를 결정하였으며, 이 중 paeoniflorin은 작약의 주 약리효과와 약리실험 결과가 일치하여 작약을 대표하는 유효성분으로서 품질을 평가하는 중요한 지표물질로 이용된다[10-20].

본 연구에서는 예로부터 한방에서 해독과 정혈작용으로 처방되어온 작약에서 생리활성물질을 분리하고 이 물질들의 혈소판 활성화 및 응집 억제작용에 관하여 연구하였다.

2. 재료 및 실험방법

Paeonia lactiflora의 분리 및 정제 - *Paeonia lactiflora*를 methanol로 추출하여 62g을 획득한 후, H₂O로 현탁하여 butanol로 3회 추출하여 butanol fraction 36.2 g을 얻었다. 용매 분획한 butanol layer를 column chromatography로 분리하였다. 유리관 컬럼(30×400 mm)을 시료의 양에 따라 선택하여 사용하였으며, silica gel(Kiesigel 60, 70-240mesh)을 이용하였다. 전개용매는 chloroform과 methanol의 혼합비율을 달리하여 chloroform 100%에서부터 methanol을 10%씩 첨가하여 용출시켰다. TLC에 의해 methanol, chloroform, water(25 : 14 : 5)로 전개하여 동일한 R_f를 가지는 분획을 감압 농축하여 12개의 소분획을 얻었다. 12개의 분획중 silica gel(kiesegel 60, 240-400mesh)를 이용하여 위와 같은 방법으로 다시 8개의 소분획을 분획하였다. 소분획은 Table 1에서와 같은 조건으로 HPLC를 이용하여 정제하였다.

Preparation of Washed Rabbit Platelets - 토끼 귀동맥을 확장시킨 후, 20G의 주사바늘로 1% EDTA(anhydrous)용액(혈액량의1/10)이 들어있는 tube에 채혈한 후, 5 ml씩 분주하여 1,600 rpm에서 10분간 원심분리한다. 상등액을 분리하여 1,400 rpm으로 5분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후, PRP(Plasma Rich Platelet)가 들어있는 tube를 37°C water bath에서 15분

Table 1. Operating conditions for analysis of reversed phase HPLC

Instrument	Shimadzu LC-10AD
Column	Cosmosil μ C ₁₈ -MS(4.6×250 mm) Cosmosil μ C ₁₈ -AR-300(20×300 mm)
Detector	Shimadzu SPD-10A
Mobile phase system	MeOH : Water = 30 : 70, pH 2.6
Flow rate	1.0 ml/min, 0.8 ml/min
UV range	254 nm

간 incubation하고 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상등액은 버리고 1st buffer(Table 2)로 조심스럽게 부유시킨 후 15분간 incubation하고 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 침전물에 2nd buffer로 부유시킨 후, 15분간 incubation하고 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상등액을 버리고 2 ml의 3rd buffer로 부유시킨 후 40배 희석하여 흡광도를 측정하고 혈소판 수가 4×10^8 cells/ml이 되도록 3rd buffer를 첨가하여 희석한다.

Table 2. Compositions of Buffers

	1st	2nd	3rd
Buffer	10	10	10
NaH ₂ PO ₄	2.5	2.5	2.5
Glucose	2.5	2.5	2.5
HEPES	2.5	2.5	2.5
BSA	2.5	2.5	2.5
EGTA	5	-	-
H ₂ O	-	5	5
pH	6.5	6.5	7.35

Buffer solution : NaCl 40g, KCl 1g, MgCl₂ · 6H₂O 1g/2L

Glucose solution : 5g/500ml

BSA(Bovine Serum Albumin) solution : 0.35g/10ml

NaH₂PO₄ solution : 2.25g/500ml

HEPES solution : 4.5g/500ml

EGTA solution : 0.152g/200ml

Platelet Aggregation 측정 - Washed platelets

(4×10^8 cells/ml) 250 μ l를 취하여 1000 rpm으로 교반하면서 3분이 경과된 후, 최종농도가 1 mM이 되게 CaCl₂를 첨가한다. 다시 3분간 incubation 후에 각 시료를 농도별로 투여한 다음 3분간 incubation후에 agonist를 최적농도 투여하여 혈소판 응집 억제 작용을 측정하였다. Agonist의 최적농도는 collagen 2 μ g/ml, thrombin 0.01unit/ml, arachidonic acid 100 μ M, PAF 10nM, U46619 1 μ M이었고 모든 실험은 3회 반복하여 통계 처리하였다. 대조군으로는 시료대신 DMSO(Dimethylsulfoxide)를 사용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

표준물질을 이용한 HPLC 분석과 ¹H-NMR 관련 자료의 검색을 통하여 최종적으로 compound 1b가 benzoyl oxy paeoniflorin(2.6%), compound 1d가 paeonol(1.3%), compound 2c가 albiflorin(3.2%), compound 2e가 paeoniflorin(33.6%)임을 확인할 수 있었다. Compound 3a의 분석결과 benzoyloxypaeoniflorin과 구조적 유사성은 있으나 동일한 구조식으로 확인할 수 없었다. 그러나 collagen에서 응집억제활성이 90%이상으로 뛰어난 활성을 나타내므로 benzoyloxypaeoniflorin과 유사한 구조에서 benzoyl group이 다른 작용기로 치환되었거나 R1 group이 다른 작용기로 치환된 형태로 추측하였다.

Benzoyloxypaeoniflorin은 Fig 1에서처럼 collagen >thrombin>U46619>A.A(arachidonic acid)>PAF의 순으로 활성을 보였다. 이는 paeoniflorin의 glycoside 5-carbon 위치에 있는 OH기 대신에 benzoyl기로 치환되어 혈소판 억제 산물로 작용한 것으로 추측했다. Paeoniflorin은 Fig 2에서처럼 U46619 >thrombin>collagen>A.A>PAF의 순으로 억제를 보였다. Paeoniflorin이 collagen보다

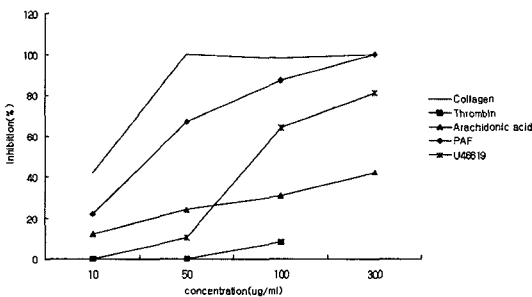


Fig. 1. Effect of isolated benzoyloxypaeoniflorin from *paeonia lactiflora* on platelet activation induced by each agonist

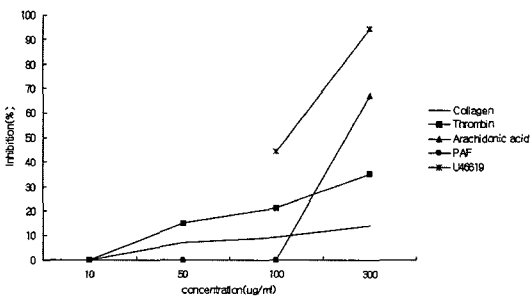


Fig. 2. Effect of isolated paeoniflorin from *paeonia lactiflora* on platelet activation induced by each agonist

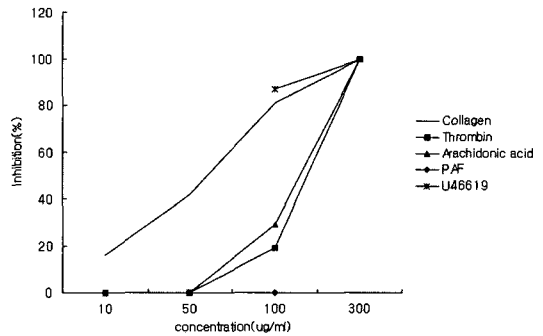


Fig. 3. Effect of isolated Compound 3a from *paeonia lactiflora* on platelet activation induced by each agonist

thrombin에서 강한 억제를 보이는 것은 Ca²⁺ chelate를 형성함으로 인해 calcium 대사를 저해하는 것으로 추측했다. Compound 3a는 Fig 3에서와 같이 U46619 >collagen>A.A>thrombin>PAF의 순으로 억제율을 보이므로 이 화합물은 paeoniflorin의 benzoyl에 있는 OH기가 다른 치환기로 바뀌거나 paeoniflorin의 glycoside 5-carbon 위치의 OH기 대신에 다른 작용기로 치환된 것으로 추정하였다.

이러한 결과로 약의 주성분인 paeoniflorin과 유사한 구조를 가진 다른 monoterpene glycoside 계열의 화합물들과 비교 분석하고 구조를 확인하고 이들 성분이 혈소판 응집억제 활성에 작용하는지를 연구하였다.

4. 결 론

약의 methanol추출물은 혈소판 활성 실험에서 혈소판 응집에 대해 강한 억제 작용을 보였다. 크로마토그래피 방법으로 분리 정제한 활성성분 중에서 compound 1b는 benzoyloxypaeoniflorin, compound 2e는 paeoniflorin, compound 3a는 benzoyloxypaeoniflorin과 유사한 구조를 보였으나 동일한 구조는 아니었다.

Compound 1b(benzoyloxypaeoniflorin)는 collagen >thrombin>U46619>A.A(arachidonic acid)>PAF 순으로 활성을 보였고, compound 2e(paeoniflorin)은U46619 >thrombin>collagen>A.A(arachidonic acid)>PAF 순으로 억제 활성을 보였다.

Compound 2e에서 collagen 보다 thrombin에서 강한 억제활성을 보이는 것은 Ca²⁺ chelate형성으로 인한 calcium 대사산물의 파괴를 초래하는 것으로 생각되었다. Compound 3a는 benzoyloxypaeoniflorin과 유사한 혈소판 응집억제활성을 보이나 구조적인 면에서 차이를 보였다.

약성분 중 분리한 3개의 화합물들은 monoterpene glycoside 계열 화합물로서 혈소판응집억제활성을 보였다.

5. 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 순천향대학교 차세대 BIT무선부품연구센터(R12-2002-007-0100-0)의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- [1] 손동주, "Studies on Platelet Activation of Constituents Isolated from Several Plants", 석사학위 논문, 순천향대학교 대학원, 2000.
- [2] 박병수, "Studies on the Biological Active Components of Piper retrofractum Vahl. Fruits", 박사학위논문, 순천향대학교 대학원, 1999.
- [3] 송민주, "Effect of Extracellular Ca^{2+} , Bupleuri radix and Lithospermi radix on Platelet Activation in the Rabbit", 석사학위논문, 순천향대학교, 대학원, 1997.
- [4] 방명호, 송정춘, 이상양, 박남규, 백남인, 작약 뿌리로부터 항산화 활성물질의 분리, 한국농화학회지, Vol. 42, No. 2, pp. 170-175, 1999.
- [5] Jaw-Sun Hwang, Hui-Jung Chun, Young-Sil Han, "Isolation and Identification of Antimicrobial Compound from Jakyak (*Paenonia japonica* var. *pilosa* NAKAI)", Korea J. Soc. Food Sci, Vol. 16 No. 5, pp. 445-452, 1997.
- [6] Young-Eon Kim, Young-Chul Lee, Hyun-Ku Kim, Chul-Jin Kim, "Antioxidative Effect of Ethanol Fraction for Several Korean Medicinal Plant Hot Extracts", Korea J. Food&Nutr Vol. 10, No. 2, pp. 141-144, 1997.
- [7] 노환성, 고우경, 박건구, 조영환, 박형성 : "고지혈증 레트를 이용한 시호, 작약, 조구 등의 항고지혈 효과", 응용약물학회지 vol15, pp43-47, 1997.
- [8] 노환성, 고우경, 박건구, 조영환, 이용언, 박형섭, "작약 매탄올 추출물로부터 항고지혈 활성성분의 분리", 약제학회지, Vol. 29, No. 1, pp. 55-60, 1999.
- [9] 노환성, 고우경, 양현욱, 박건구, 조영환, 박형섭, "고지혈증 레트를 이용한 작약의 수종 용매 추출물로부터 항고지혈 효과", 약제학회지, Vol. 27, No. 2, pp. 145-151, 1997.
- [10] 임종필, "백작약과 적작약의 해부학적특성", 약학 회지, Vol. 8, No. 4, pp. 297-303, 2000.
- [11] Young-Jin Park, Ho-Young, Hyung-Soo Shu, Jae-Wook Shin and Soo-Kwan Lee, "Distribution of Medicinal Constituents and Content Variation in Paeont Root", Korean J. Bread, Vol. 25, No. 2, pp. 146-150, 1993.
- [12] 김상식, 김주선, 윤혜숙, 한병훈, "작약의 성분 에 관한 연구", 생약학회지, Vol. 24, No. 3, pp. 247-250, 1993.
- [13] 송보완, "한국산 작약종의 Benzoic acid 및 Pa-eoniflorin 의 함량", 경희약대논문집, No. 8, pp. 21-26, 1980.
- [14] Norihiro Ikeda, Tomomi Fkuda, Hisanobu Jyo, Yasuo Shimada, Nobutoshi Murakami, Saka and Masayuki Yoshikawa, "Quality Evaluation on Paeonia Radix I. Quantitative Analysis of Monoterpene Glycosides Constituents of Paeoniae Radix by Means of High PerformanceLiquid Chromatography." "Comparative-Characterization of the External Figures, Processing Method and the Cultivated Areas", Yakugaku Zasshi, Vol. 116, No. 2, pp.138-147, 1996.
- [15] Makoto Nishizawa, Takashi Yamagishi, Tsukasa Horikoshi and Naojiro Homma, "Chemical Studies on Paeoniae Radix(part I), Quantitative Determination of Glucoside in Paeoniae Radix", Shoyakugaku Zasshi, Vol. 33, No. 2, pp. 65-71, 1979.
- [16] Lang Huiying, Li Shouzhen, Terrence McCabe and Jon Clardy, "A New Monoterpene Glycocide of Paeonia lactiflora, Planta Medica", pp. 501-504, 1984.
- [17] Feng-lin Hsu, Chih-Wei and Juei Thnh Cheng, "Antihyperglycemic Effects of Paeoniflorin and 8-Debenzoylpaeoniflorin, Glycosides from the Root of Paeonia lactiflora", Plant Med, No. 63, pp. 323-325, 1997.
- [18] Hitoshi Ishida, Miki Takamatsu, Juniro Tsuji and Takuo Kosuge, "Studies on Active Substances in Herbs Used Oketsu("Stagnant Blood") in Chinese Medicine. VI. On the Anticoagulative Principle in Paeoniae Radix", Chem. Pharm. Bull, Vol. 35, No. 2, pp. 849-852, 1987.
- [19] Masao Hattori, Yue-Zhong Shu, Minero Shimizu, oshimitse Hayashi, Naokata, Kyoichi Kobashi, Guo-Jun Xu and Tsuneo Namba, "Metabolism of Paeoniflorin and Related Compounds by Human Intestinal Bacteria", Chem. Pharm. Bull., Vol. 33, No.9, pp. 3838-3846, 1985.
- [20] Naoki Asakawa, Teiichi Hattori, Masaaki Ueyama, Aishin Shinoda and Yasuo Miyake, "Determination of Paeoniflorin in Paeony Extract Butanol High Performance Liquid Chromatography", Yakugaku Zasshi, Vol. 99, No. 6, pp. 598-601, 1979.