

빈랑자 (Arecae Semen)로부터 Urease 억제 활성 물질의 분리

임문정* · 류제만 · 장환봉 · 노양국 · 오성준 · 이현용
(주) 동화약품 중앙연구소 천연물 연구실

Isolation of Urease Inhibitory Compounds from Arecae Semen

Moon-Jeong Leem*, Jei-Man Ryu, Hwan-Bong Jang, Yang-Kook Rho,
Seong-Jun Oh, and Hyun-Yong Lee

Central Research Institute, Dong-Wha Pharm. Ind., Anyang 440-320, Korea

Abstract – Urease plays an important role in the urea metabolism and the effect of urease activity on human and environment is enormous. For instance, urease acts as a virulence factor of the urinary and gastrointestinal tracts infections in human and animal, being involved in kidney stone formation, catheter encrustation, pyelonephritis, ammonia encephalopathy, hepatic coma, and urinary tract infections. Widespread urease activity in soil induces a plant damage due to ammonia toxicity and pH increase. Therefore, urease activity regulation through urease inhibitors would lead to an enhanced efficiency of urea nitrogen uptake in plants and to the improved therapeutic strategies for ureolytic bacterial infections. To search for new inhibitory compounds on urease activity from herbs, MeOH extracts of herbs were screened. Among of them, the MeOH extracts of *Areca catechu* exhibited an excellent inhibitory effect on urease activity. Two compounds were isolated from the ethyl acetate fraction by the activity guided fractionation. Their chemical structures were identified as (+)-catechin(compound I) and allantoin(compound II) by spectroscopic evidence, respectively. Compound I showed a stronger inhibitory effect on urease activity than compound II.

Key words – *Areca catechu*, Arecae Semen, urease, urease inhibitory activity, (+)-catechin, allantoin

자연계에서 요소는 urease 효소에 의해서 가수분해 되어 중간 대사체인 carbamate를 거쳐 암모니아와 이산화탄소로 분해된다. 또한 이런 carbamate가 생성되는 과정은 효소가 관여하지 않는 경우보다 10^{14} 배나 더 빠르게 진행된다.¹⁾ 요소 분해 과정 중에 생긴 암모니아는 체내의 급격한 pH의 상승 일으켜 사람이나 동물의 위·장관 및 요도관 등의 미생물 감염 시 독성 인자로 작용하여 신장결석, 신우신염 및 암모니아성 뇌장애 등을 유발 시킨다.^{2,3)} 또한 농업에 있어서도 암모니아는 토양의 pH를 증가시켜 심각한 환경적, 경제적 손실을 가져온다.⁴⁾ 그러므로 urease 억제제의 개발은 요소 분해속도 조절을 통한 식물의 효율적인 질소 이용과 ureolytic bacteria에 의해 야기되는 감염의 치료에 응용될 수 있다. 이러한 목적으로 수행된 여러 생약 메탄을 추출물을 대상으로 한 예비 실험에서, 본 연구자 등은 빈랑자가 urease 억제 효능이 뛰어남을 확인할 수 있었다.

*교신저자(E-mail) : natl@iris.dwcrc.co.kr
(FAX) : 031-446-9556

빈랑자(檳榔子)는 인도네시아, 필리핀, 중국 남부, 대만, 동아프리카, 말레이반도에 널리 재배되고 있는 빈랑나무 (*Areca catechu* LINNE, Palmae, 야자나무과)의 종자를 건조한 것으로 길이 15~35 mm, 지름 15~30 mm의 둔한 원추형 또는 편평한 구형의 모양을 가진다. 이 열매의 바깥 면은 회적갈색-회황갈색이고 짚은 색의 그물 모양 무늬가 있으며, 질은 단단하다. 절단 면은 질이 치밀하고 회갈색의 종피가 백색의 배유 속에 들어가서 대리석과 같은 무늬를 나타내며 씨의 속이 비어 있는 경우도 있다.⁵⁾ 함유된 성분으로는 pyridine계 알칼로이드로 arecoline, arecaidine, guvacine, guvacoline 및 isohuvaccine 등을 0.3~0.7% 함유하며, 그 밖에 tannin 약 15% 및 지방유를 14~18% 포함한다.⁶⁾ 보통 조충 구제약으로 사용하지만 복통 등의 부작용이 강하므로 가축용으로만 사용된다.⁵⁾ 또한 피부 진균에 대해서도 억제작용이 있는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ Arecoline은 pilocarpine보다 강력한 부교감신경 흥분 작용 및 중추 억제 작용이 있다고 보고되어 있다.^{8,9)} 본 연구에서는 빈랑자의 메탄을 추출물로부터 urease 활성을 억제시키는 물질을 분리하여 그 구

조를 확인하고 분리된 성분의 활성을 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용한 빈랑자는 생약 감별법에 의해 검정된 재료를 2004년 4월 경동시장에서 구입한 후 세척하여 실험에 사용하였고 표본은 동화약품 천연물 연구실내 생약 보관실에 보관하였다.

시약 및 기기 – 용점은 Perkin-Elmer DSC7 apparatus (uncorrected)를 사용하여 측정하였으며 $^1\text{H-NMR}$ 은 JEOL Lambda-400 spectrometer (400 MHz)를 $^{13}\text{C-NMR}$ 은 JEOL Lambda-400 spectrometer (100 MHz)를 사용하였다. ESI-MS는 HP-1100LC-MSD를 사용하였다. Chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60 (70 – 230 mesh, Merck, Art, 7734), Kiesel gel 60 (230 – 400mesh, Merck, Art, 9385)을 사용하였고, molecular sieve column chromatography용 packing 물질은 Sephadex LH-20 (Bead size, 25 – 100 um, Merck)을 사용하였으며, thin layer chromatography용 plate는 Kiesel gel 60F₂₅₄ (precoated plate, Art. 5715, Merck)를 사용하였다. 추출 및 분획용 용매는 EP급 용매를 사용하였으며, TLC 및 column용 용매는 EP급 용매를 재증류하여 사용하였다. 발색 시약으로 iodine vapor, 5% sulfuric acid 시액, 5% FeCl₃ in ethanol 용액을 사용하였다. Urease 저해 활성 시험에 사용된 시약은 urease(from Jack beans type),³⁾ urea, sodium nitroferricyanide, sodium hypochlorite 등은 Sigma사(USA)에서 구입 사용하였고 기타 시약은 특급 또는 1급 시약을 구입 사용하였다.

Urease 억제 활성의 측정 – Urease 억제 활성은 Berthelot reaction법을 응용하여 측정하였다.¹⁰⁾ 즉, 3차 증류수에 녹여 만든 urea 용액(100 mM)을 각 well에 100 ul씩 넣은 뒤, 50% glycerol로 약 1 unit¹⁰⁾ 되게 희석한 urease용액 50 ul 와 농도별(0.5 및 0.25 mg/ml)로 희석된 검체를 각 well에 첨가하였다. 배양기에서 37°C로 10분간 반응시킨 후, phenol-sodium nitropruside(0.106 M phenol; 0.17 mM sodium nirtopruside) 용액과 hypochlorite(11 mM NaClO; 0.125 N NaOH) 용액을 첨가한 뒤 다시 30분 배양시킨 후 ELISA reader로 560 nm에서 흡광도를 대조군과 함께 비교 측정하였다. 억제 효과는 다음과 같은 계산식으로 결정하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \frac{\text{Control의 } A_{560} - \text{검체의 } A_{560}}{\text{Control의 } A_{560}} \times 100$$

추출 및 분리 – 빈랑자 2 kg을 냉각기가 달린 추출기를 사용하여 메탄올을 추출용매로 수록 상 (70°C 이하)에서 3시간씩 5회 반복 추출하고 그 추출액을 온시 여과한 후 수록 상에서 김암 농축하여 MeOH 추출물 226 g을 얻었으며,

이 MeOH 추출물에 증류수 3 l를 가하여 혼탁시키고 동량의 *n*-hexane, methylene chloride(CH_2Cl_2), ethyl acetate (EtOAc) 및 수포화 butanol(BuOH)를 순차적으로 용매 분획 하여 각각 8 g, 2.5 g, 50 g, 100 g을 얻었다. 이 중 urease 억제 활성이 있는 EtOAc 분획을 *n*-hexane : EtOAc : MeOH (5:5:5 → gradient)를 유출 용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 5개 분획으로 나누었다. 이 중 활성이 있는 소분획 F1 (600 mg)을 *n*-hexane : EtOAc : MeOH (10:10:1 → gradient)를 유출 용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 3개의 분획 F11 (155 mg), F12 (300 mg) 및 F13 (30 mg)으로 분획화한 후 F12를 *n*-hexane : EtOAc : MeOH (3:3:1 → gradient)를 유출 용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 compound I (100 mg)을 분리하였다. 또한 EtOAc 소분획 F2 (450 mg)를 *n*-hexane : EtOAc : MeOH (5:5:1 → gradient)를 유출 용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 3개 분획 F21 (12 mg), F22 (300 mg) 및 F23 (32 mg)로 분획화한 후, 소분획 F22를 Sephadex LH-20 (MeOH 100%) column chromatography를 4회 반복 수행하여 compound II (110 mg)를 분리하였다.

Compound I – colorless needles (Aqueous MeOH), mp: 177°C, MS (ESI, positive) : 291[M+H]⁺, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD₃OD) δ : 2.40 (1 H, dd, *J*=8.3, 16.1 Hz, H-4), 2.73 (1 H, dd, *J*=5.3, 16.1 Hz, H-4), 3.87 (1 H, m, H-3), 4.46 (1 H, d, *J*=7.6 Hz, H-2), 6.62 (1 H, dd, *J*=2.1, 8.3 Hz, H-6'), 6.65 (1 H, d, *J*=2.1 Hz, H-2'), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD₃OD) δ : 28.5 (C-4), 68.8 (C-3), 82.9 (C-2), 95.5 (C-8), 96.3 (C-6), 108.8 (C-10), 115.3 (C-2'), 116.1 (C-5'), 120.0 (C-6'), 132.2 (C-1'), 146.2 (C-4'), 146.3 (C-3'), 156.9 (C-9), 157.6 (C-5), 157.8 (C-7).

Compound II – monoclinic prism (H₂O), mp: 228°C, MS (ESI, negative): 157[M-H]⁻, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 5.23 (1 H, d, *J*=8.1 Hz, H-4'), 5.78 (2H, s, urea NH₂), 6.87 (1 H, d, *J*=8.1 Hz, H-3'), 8.05 (1 H, s, N-H), 10.53 (1 H, s, H-1'), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 62.3 (C-4'), 156.6 (urea C=O), 157.2 (C-2'), 173.5 (C-5').

결과 및 고찰

빈랑자로부터 얻어진 메탄올 추출물 및 용매 분획의 urease 저해활성은 EtOAc 및 BuOH 분획에서 높게 측정 되었다. EtOAc 및 BuOH 분획을 column chromatography를 이용하여 얻은 소분획의 urease 억제 활성을 측정한 결과 EtOAc 소분획 F1, F2에서 높은 저해 활성을 보였다(Table I). 또한 EtOAc 분획 F1 및 F2를 각각 다시 소분획한 결과 EA F12 및 F22에서 높은 저해 활성을 보였다(Table II).

Table I. Inhibitory effects of solvent fraction from Arecae semen on urease activity

Fraction	Urease inhibition rate (%)	
	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml
MeOH fraction	53.7	18.68
Hex fraction	14.82	10.78
MC fraction	2.6	1.9
EtOAc fraction	61.3	36.96
BuOH fraction	46.5	38
EA F1	48.3	37.40
EA F2	45.8	20.24
EA F3	11.8	2.34
EA F4	24.0	7.28
EA F5	29.3	5.92
BuOH F1	34.8	35.6
BuOH F2	35.4	13.8
BuOH F3	20.4	10.1
BuOH F4	14.8	12.3

*abbreviation; Hex = *n*-hexane, MC = methylene chloride, EtOAc (EA) = Ethyl acetate

Table II. Inhibitory effects of ethyl acetate fraction from Arecae semen on urease activity

Fraction	Urease inhibition rate (%)	
	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml
EA F11	20.0	18.4
EA F12	44.7	40.2
EA F13	23.0	17.6
EA F21	18.1	12.6
EA F22	38.3	36.7
EA F23	25.4	18.9

*abbreviation; EA = Ethyl acetate

Compound I은 mp가 177°C인 무색 침상 결정으로 질량 분석기를 이용하여 얻은 ESI-MS spectrum에서 molecular ion peak는 *m/z* 291[M+H]⁺로 분자량이 290임을 알 수 있었다. ¹³C-NMR spectrum으로부터 aromatic ring으로 판단되는 탄소가 12개이고, 산소가 결합되어 있는 aliphatic 탄소가 2개 있는 flavonoid 구조임을 알 수 있었다. ¹H-NMR spectrum에서 δ 2.40와 2.73에서 서로 geminal coupling하는 methylene peak를 통해 4번 위치에 CH₂ 구조를 갖는 flavan 계열의 구조임을 확인할 수 있었다. HMBC spectrum을 살펴보면 C-1'와 H-2의 신호가 나타났고, C-2(δ 82.9)에 H-2'(δ 6.62) 및 H-6'(δ 6.65)의 신호가 관찰되므로 benzene ring이 C-2에 결합되어 있음을 알 수 있었다. Aromatic ring 영

역인 δ 5.75에서 나타나는 수소 peak와 δ 5.83에서 나타나는 수소 peak의 *J* 값이 2.2 Hz로 A ring에 존재하는 서로 *meta* 관계인 H-6 및 H-8임을 알 수 있었다. 또한 δ 6.62의 peak와 δ 6.65에서 나타나는 peak의 *J* 값이 8.3 Hz로 B ring에서 *ortho* 위치인 H-6' 및 H-5'임을 알 수 있었다. 또한 δ 6.62인 H-6의 peak와 δ 6.65는 *J* 값이 2.1 Hz으로 *meta* 위치에 있는 H-2'로 확인할 수 있었다. 또한 COSY spectrum에서 δ 3.87의 H-3의 peak와 δ 4.46에서 나타나는 H-2의 peak가 서로 연관됨을 확인할 수 있었다. 이상과 같은 결과들로부터 compound I은 (2R, 3S) 3,3',4,5,7-pentahydroxyflavan 구조를 갖는 (+)-catechin으로 확인하였다.

Compound II는 mp가 228°C인 무색 침상형 결정으로, 질량 분석기를 이용하여 얻은 ESI-MS spectrum에서 molecular ion peak는 *m/z* 157[M-H]⁻로 분자량이 158임을 확인할 수 있었으며, ¹³C-NMR spectrum으로부터 3개의 carbonyl group을 확인할 수 있었고, HMQC spectrum으로부터 4개의 수소들이 탄소와 결합되어 있지 않음을 확인하였다. HMBC spectrum으로부터 C-2'과 H-4' 및 H-3'의 수소들과 신호가 나타남을 확인하였고, C-4'와 H-2, H-3'의 수소들과 신호가 나타남을 확인하였다. 또한 HMBC spectrum 상에서 H-2과 C-4' 및 C-5'와 신호가 나타남을 확인하여 urea기가 C-4'에 결합되어 있음을 알 수 있었다. 이상과 같은 결과들로부터 compound II은 2,5-Dioxo-4-imidazolidinylurea 구조를 갖는 allantoin임을 확인하였다.

Urease 활성 억제 효과

빈 냉각剂로부터 분리한 compound I 및 compound II의 urease 저해 활성정도를 측정하였다. 두 물질은 모두 urease 저해 활성을 나타내었으며, 특히 compound I의 compound

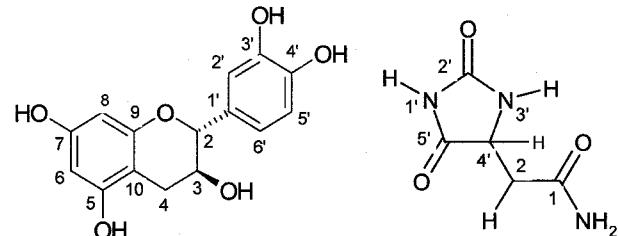


Fig. 1. structure of compounds I and II.

Table III. Inhibitory effects of compounds I and II from Arecae semen on urease activity

Compound	Urease inhibition rate(%)	
	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml
Compound I	65.2	56.3
Compound II	31.3	30.96

II 보다 더욱 우수한 활성을 나타내었다(Table III).

분리된 compound I은 (+)-catechin으로 녹차의 유효활성 성분으로 잘 알려져 있는 물질로 histidine decarboxylase, glyoxalase 및 platelet lipooxygenase 등의 효소 활성을 저해하는 것으로 보고되어 있다.¹¹⁻¹³⁾ Compound I이 다른 효소에 대한 억제효과를 나타내는 것처럼 urease에 대해서도 직접 효소 작용을 억제할 수 있다는 가능성을 보여주고 있다. 그러나 이러한 억제 효과가 urease 효소의 반응 산물로 인한 false effect의 가능성도 있으므로 추가 실험이 필요하리라 사료된다. Compound II는 allantoin으로 화장품의 주요 성분으로 많이 사용되며 의학적으로도 상처나 종기의 치료 및 조직의 재생을 촉진하는 것으로 알려진 물질이다.¹⁴⁾ Compound II는 구조 중에 urea기가 존재하므로 이 urea기가 urease의 active site에 결합하여 효소의 활성을 억제할 가능성이 높은 것으로 판단되나, 보다 명확한 증거는 추가 실험을 통해 확인될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 allantoin으로 확인된 compound II는 빈랑자에서 처음 분리되어 보고 되는 물질이다.

상기의 compound I과 compound II는 urease의 활성을 유의성 있게 억제하는 것으로 판단되며, 따라서 이들 화합물은 urease-매개성 질병들의 치료제 개발에도 유용할 것으로 사료된다.

결 론

Urease 저해제 개발을 위한 예비 검색 결과에서 선택된 빈랑자(檳榔子)를 추출하여 칼럼 크로마토그래피를 반복 수행한 결과 2종의 urease 저해제 compound I과 compound II를 분리하였다. 이들 화합물은 물리·화학적 성질 및 분광학적 분석 연구를 통하여 compound I은 (+)-catechin으로, compound II는 allantoin으로 구조를 확인하였다. Compound I과 compound II은 urease 억제활성을 측정한 결과 두 화합물 모두 유의성있는 활성을 나타내었으며, 이 중 compound I인 (+)-catechin이 더욱 우수한 활성을 나타내었다. 따라서 compound I과 compound II는 urease-매개성 질환의 치료제 개발에 유용한 화합물이 될 것으로 기대된다.

인용문헌

- Hausinger, R. P. (1993) Biochemistry of Nickel, 23-57. Plenum. New York, NY.
- Mobley, H. L. T. and Hausinger R. P. (1989) Microbial urease: significance, regulation, and characterization. *Microbiol. Rev.* **53**: 85-108.
- Collins, C. M. and D'Orazio, S. E. (1993) Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **9**: 907-913.
- Bremner, J. M., Mulvaney, R. L., and Burns(Ed) R. G., (1978), *Soil Enzymes*, 149-196. Academic Press. New York, NY.
- 박종희(2002) 한약백과 도감, 363-365. 신일상사, 서울.
- Inokuchi, I., Okabe, H., Yamauchi, T., Nagamatsu, A., Nonaka, G and Nishioka, I. (1986) Antihypertensive substance in seeds of *Areca catechu*. *Life Sci.* **38**: 1375-1382.
- Lalithakumari, H. and Sirsi, M. (1965) Antibacterial and antifungal activities of *Areca catechu* Linn. *Indian J. Exp Biol.* **31**: 66-67
- Bensky, L. (1992) Chinese Herbal Medicine, 197. Eastland Press, Seattle.
- Inokuchi, I., Okabe, H., Yamauchi, T. Nagamatsu, A., Nonaka, and G. Nishioka, I. (1985) Inhibitors of Angiotensin-converting enzyme in crude drugs II. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 264-269 .
- Hans Ulrich Bergmeyer (1974) Methods of Enzymatic Analysis Vol 4, 1791-1798, Verlag Chemie Weinheim Academic Press, New York and London.
- Reimann, H. J., Lorenz, W., Fischer, M., Frolich, R., Meyer, H. J. and Schmal, A. (1977) Histamine and acute haemorrhagic lesions in rat gastric mucosa: prevention of stress ulcer formation by (+)-catechin, an inhibitor of specific histidine decarboxylase in vitro. *Agents Actions.* **7**: 69-73.
- Klopman, G and DiMayuga, M. L. (1988) Computer-automated structure evaluation of flavonoids and other structurally related compounds as glyoxalase I enzyme inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **34**: 218-222.
- Gryglewski, R. J., Korbut, R., Robak, J. and Swies, J. (1987) On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **36**: 317-322.
- Fisher, A. A. (1981) Allantoin: a non-sensitizing topical medicament. Therapeutic effects of the addition of 5 percent allantoin to vaseline. *Cutis.* **27**: 230-231, 234, 329.

(2005년 1월 27일 접수)