

목단피 정유에서 분리된 Paeonol과 그 유도체 Methylpaeonol의 *in vitro* 항염효과

박희준* · 최무영¹

상지대학교 자원식물학과, ¹상지대학교 식품영양학과

In vitro Antiinflammatory Activity of Paeonol from the Essential Oil and Its Derivative Methylpaeonol

Hee-Juhn Park* and Moo-Young Choi¹

Department of Botanical Resources, ¹Department of Food Science and Nutrition, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Abstract – Paeonol (2-hydroxy-5-methoxyacetophenone) obtained by silica gel column chromatography of the essential oil extracted from *Paeonia moutan* (Paeoniaceae) was methylated by dimethylsulfate to yield methylpaeonol (2,5-di-O-methylacetophenone). Both compounds inhibited nitric oxide (NO) formation in lipopolysaccharide-induced macrophage RAW 264.7 cells in nitrite assay. In the western blotting assay, it was shown that both compounds also decreased inducible nitric oxide synthase (iNOS)- and cyclooxygenase-2 (COX-2) formation. Methylpaeonol produced more potently inhibited NO-, iNOS and COX-2 formations in the assays than paeonol. These results suggest that paeonol is in part responsible for anti-inflammatory activity of *Paeonia moutan*, and that synthesis of paeonol derivatives may produce a promising candidate for antiinflammatory agent.

Key words – *Paeonia moutan*, Paeoniaceae, paeonol, methylpaeonol, antiinflammatory, nitric oxide, iNOS, COX-2

목단피는 중요한 한약의 하나로서 모란의 뿌리껍질을 말한다. 모란(*Paeonia moutan*)은 모란과(Paeoniaceae)에 속하는 식물이며 또한 다년생 초본식물이다. 목단피는 한방에서 소염성 구어혈, 통경, 진통, 진경 및 배농의 목적으로 자주 처방되고 있는 한약에 속한다.¹⁾

목단피의 성분으로는 paeoniflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, albiflorin 등과 같은 monoterpene glucoside, 당과 결합하지 않은 paeoiflorigenone과 수종의 gallotannin을 함유하고 있다.¹⁾ 목단피의 탄닌은 LPS로 유도된 macrophage의 NO 산생을 저해한다고 한 바 있다.²⁾ 목단피의 paeoniflorin은 혈액응고 저해,³⁾ apoptosis 유도작용,⁴⁾ 항고지혈 작용 등⁵⁾이 보고되고 있다.

목단피의 중요성분의 하나인 paeonol의 약리효과에 관한 보고로는 실험적 동맥경화 억제효과,⁶⁾ 혈소판 응집억제효과,⁷⁾ antiseptic activity,⁸⁾ carrageenan 유발 염증에 대한 억제효과 및 진통효과,⁹⁾ 비만세포로부터 히스타민 유리억제효과 및 TNF- α 생성저해효과¹⁰⁾ 등이 보고되어 있다.

저자는 목단피의 paeonol이 *in vitro* 항염효과를 macrophage RAW 264.7 cell이 생성하는 NO 생성에 대한 효과를 nitrite assay로, inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2에 대한 활성을 western blotting으로 측정하였다. 한편 paeonol이 2-hydroxy-5-methoxyacetophenone의 구조를 가짐에 따라 수산기를 메틸화하여 기능기를 차단한 화합물인 2,5-dimethoxyacetophenone (methylpaeonol)을 제조하여 그 활성을 비교하였을 때 지견을 얻었으므로 보고한다.

재료 및 방법

기기 및 시약 – 용점은 Electrothermal digital melting point apparatus를 사용하여 측정하였으며 보정하지 않았다. 선광도 측정은 JASCO DIP-360 digital polarimeter로 25°C에서 측정하였다. IR spectrum은 Bomem MB-100 FT-IR spectrometer로 KBr disk법으로 측정하였으며, 질량 스펙트럼은 Finnigan Mat TSQ-700으로 70 eV의 에너지로 이온화하였다. ¹H- 및 ¹³C-NMR spectrum은 내부표준물질 tetramethylsilane (TMS)를 첨가하여 Bruker AM-300 spectrometer

*교신저자(E-mail) : hjpark@sangji.ac.kr
(FAX) : 031-941-0153

로 측정하였다.

RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 Life Technologie에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tertazo-lium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), sulfanilamide, aprotinin, leupeptin, phenylmethylsulfonylfluride, dithiothreitol, N^G-mono-methyl-arginine (NMA), *E. coli* lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma Chemical Co. (MO, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였고 COX-2와 iNOS monoclonal antibodies 및 peroxidase conjugated secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology (CA, U.S.A.)에서 구입하였다.

식물재료 - 강원도 원주시 천일약업사에서 판매하는 목단피를 구입하여 상지대학교 자원식물학과 임상철 교수에 의뢰하여 동정한 후 사용하였다.

추출 및 분리 - 목단피 1000 g을 수증기증류장치에서 8시간씩 증류하였고 증류물을 동량의 diethyl ether로 3회 분획 추출하였으며 분획물을 무수황산나트륨으로 탈수하였다. 그 후 에테르 가용부를 40°C에서 증발시키고 잔류물을 수거하여 목단피 정유 16 g을 얻었다. 이 목단피 정유 10 g을 silica gel column에서 *n*-hexane-EtOAc (10 : 1)로 전개하여 paeonol을 함유한 분획을 얻은 다음 농축하고 *n*-hexane에서 재결정하여 무색침상정을 얻었다. Paeonol의 구조는 Fig. 1에 나타내었다.

Paeonol - Colorless needles, mp 46.8°C, IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3229 (OH), 2974 (C-H), 1643 (aroyl C=O), 1585, 1500, 1462 (aromatic C=C), 1258 (C-O); ¹H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 2.46 (3H, s, COCH₃), 3.69 (3H, s, OCH₃), 6.51 (1H, dd, *J*=2.49 & 8.90 Hz, H-5), 6.61 (1H, d, *J*=2.49 Hz, H-3), 7.66 (1H, d, *J*=8.90 Hz, H-6); ¹³C-NMR (125 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 26.5 (COCH₃), 56.0 (OCH₃), 101.9 (C-3), 108.0 (C-5), 114.9 (C-2), 133.6 (C-6), 166.1^a (C-4), 167.0^a (C-1), 203.6 (C=O), ^aValues may be interconvertible.

목단피 정유의 GC-MS 분석 - 한편 목단피 정유에 대한 GC-MS 분석은 다음과 같은 조건에서 시행하였으며 그 결

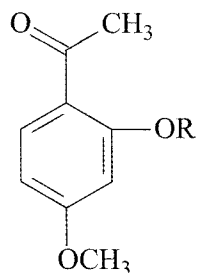


Fig. 1. Structure of paeonol (R=H) and methylpaeonol (R = CH₃).

과 얻은 GC chromatogram과 mass spectrum은 Fig. 1에 나타내었다.: Column {DB-1 (length 30 meters, i.d. 0.25 mm, film thickness 0.25 mm, J&W Scientific, USA)}, Column temp. program {init. temp. 50°C (3 min), temp. increase velocity (8°C/min), final temp. 250°C (10 min)}; solvent cut (3 min); temp. program {injector (250°C), transfer line (250°C), ion source (150°C), manifold (70°C)}, detector {Electron Impact-Quadrupole 1 (EI energy 70 eV); carrier gas {He (99.99%), flow rate (1.5 ml/min)}.

Paeonol의 메틸화 - 3 g의 paeonol을 150 ml의 acetone에 녹이고 dimethylsulfate로 8시간 환류하면서 가열하였다. 냉각된 반응물을 식힌 다음 반량으로 농축하였으며 증류수와 EtOAc로 분배하였으며 EtOAc 가용부를 소량의 증류수로 2회 세척하였다 EtOAc 가용부를 농축시키고 silica gel column에서 *n*-hexane-EtOAc(1 : 1)로 정제하여 1.3 g의 methylpaeonol을 얻었으며 구조화인을 위한 각종 기기를 측정하였다.

Methylpaeonol - amorphous powder, mp. 38.3°C, IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 2992 (C-H), 1655 (aroyl C=O), 1606, 1503, 1464 (aromatic C=C), 1258 (C-O); ¹H-NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 2.58 (3H, s, COCH₃), 3.71 (3H×2, s, OCH₃), 6.57 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H-3), 6.60 (1H, dd, *J*=8.6 & 2.2 Hz, H-5), 8.05 (1H, d, 8.6 Hz, H-6); ¹³C-NMR (125 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 32.0 (COCH₃), 55.5 (OCH₃), 98.8 (C-3), 106.0 (C-5), 121.6 (C-2), 132.8 (C-5), 161.5 (C-1), 165.0 (C-4), 196.6 (C=O).

세포의 배양 - Murine macrophage RAW 264.7 세포는 10% FBS (fetal bovine serum) 및 penicillin (100 µg/ml), streptomycin이 (100 U/ml) 포함된 RPMI 배지에서 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양했다. Raw 264.7 세포를 5 × 10⁵/ml 농도로 24 well plate에 각각 분주한 후 다음날 여러 농도의 시료용액 10 µl를 넣고 30분 후 1 µg/ml LPS를 처리하고 24시간 배양하였다.

세포독성 시험 - 세포배양 접시에 세포가 충분히 자란 경우 scrapper로 분리한 뒤 96 well plate에 5 × 10⁵/well로 세포를 분주하고 하루 배양한 후 여러 농도의 시료용액을 배지에 희석하여 첨가 하였다. 24시간이 지난 후 MTT시약을 넣고 4시간 동안 배양한 후 상등액을 제거하고 형성된 formazan을 DMSO 100 µl를 첨가하여 녹였다. 30분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitrite 양의 측정 - Macrophage로부터 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로써 측정하였다. 즉 세포배양 상등액 100 µl와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) phosphoric acid와 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine-HCl] 100 µl를 혼합하여 96 well plates에서 10분동안 반응시킨 후 550 nm에서

흡광도를 측정하였다.

Western blot 시험 - 정유 성분을 처리한 세포 및 대조군을 PBS로 씻어낸 후 lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.0, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM dithiothreitol, 5 mM NaF, 0.5 mM Na orthovanadate)로 단백질을 추출한 후 원심분리하여 상등액을 취하여 세포의 파편들을 제거하였다. 상등액을 Bio-Rad 시약으로 정량하여 50 µg의 단백질을 취했다. 추출된 단백질은 8%의 SDS-polyarylamide gel에 전기영동시킨 후 Nitro cellulose membrane으로 gel의 단백질을 blot 시켰다. 5% skim milk로 하루 밤 동안 blocking 한 후 1 : 500의 비율로 iNOS와 COX-2 antibody를 3시간 동안 상온에서 배양한 후 TTBS로 2회 15분 간격으로 세척하였다. 1 : 1000의 비율 희석한 rabbit와 goat secondary antibody를 1시간 동안 상온에서 배양 시켰다. 다시 TTBS로 3회 15분 간격으로 씻어낸 후 chemiluminescence로 현상하였다.

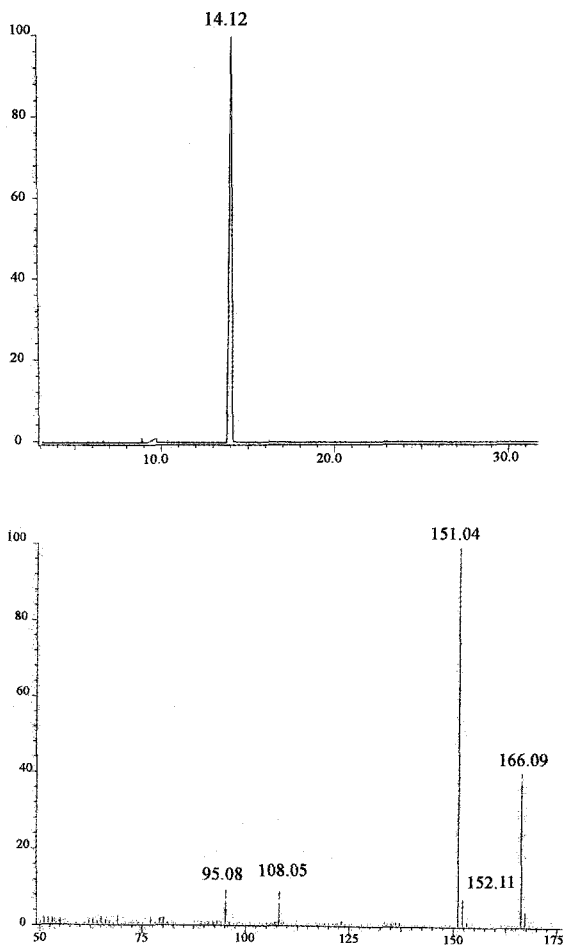


Fig. 2. Gas chromatogram of essential oil extracted from *P. moutan* (upper) and mass fragmentation of paeonol (down).

결과 및 고찰

목단피를 수증기증류하여 얻은 휘발성 물질의 수득량은 1.6% 정도로 높은 수율로 나타났으며, 이 추출물을 Fig. 1에서 보는 바와 같이 높은 순도의 paeonol 함유량을 보였으므로 paeonol 수득법으로 좋은 방법이 되리라 생각된다. Fig. 2에서 제시된 gas chromatogram의 profile은 목단피 수증기증류물이 paeonol 이외의 불순물을 극소량 함유하고 있는 것으로 제시되었다. Paeonol 피크에 해당하는 mass spectrum을 역시 제시하였는데 분자이온에 의한 m/z 166.09와 $[M-CH_3]^+$ 에 의한 base peak의 m/z 151.04, $[M-CH_3-COCH_3]^+$ 에 의한 m/z 108.05의 피크가 나타난 것으로 그 화합물이 동정되었다.

높은 수율로 얻어진 paeonol이 phenolic OH를 가지고 있음에 착안하여 이를 dimethylsulfate로 메틸화하였다. 얻어진 화합물은 IR spectrum에서 수산기에 의한 피크가 나타나지 않았으며, ^1H-NMR spectrum에서 두개의 OCH_3 에 의한 피크가 δ_H 3.71와 δ_C 55.5 ppm에서 관찰되었다. 이상의 사실로부터 2-hydroxy-5-methoxyacetophenone 구조의 paeonol이 2,5-methoxyacetophenone(Methyl-O-paeonol) 구조의 methylpaeonol 화합물이 생성된 사실의 확인이 가능하였다.

LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포의 배양액 중에 생성된 nitrite 양을 Griess 시약을 사용하여 paeonol 성분과 methylpaeonol의 NO 생성저해를 조사하였다. Paeonol이 nitrite를 형성을 억제하는 IC_{50} 는 90.7 µg/ml로 나타나 상대적으로 높은 값을 나타낸 반면 methylpaeonol은 50.3 µg/ml로 나타나 methylpaeonol 화합물이 더욱 큰 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 이러한 사실은 paeonol의 phenolic OH가 NO 생성 저해효과를 나타내는 데에 기여하지 않고 acetophenone 구조의 carbonyl이 세포내 친전자성 부분구조와 관련성이 있을 것으로 제시되었다. 이러한 것은 천연물의 sesquiterpene 등 친전자성 물질이 이러한 효과를 일으키는 것과 연관성이 있을 것으로 추측된다.^{11,12)} 한편, 두 화합물의 세포독성이 100 µg/ml 이상에서 관찰되어 세포독성에 의한 NO 억제효과가 아님이 증명되었다.

또한 두 성분이 NO 및 PGE_2 와 같은 염증인자의 생성과

Table I. IC_{50} value of paeonol and methylpaeonol on nitrite accumulation and in 1 µg/ml LPS-induced macrophage 264.7 cells and on cytotoxicity

Compound	IC_{50} (µg/ml)	
	NO	Cytotoxicity
Paeonol	90.67	111.69
Methylpaeonol	50.3	138.53

The values are means of three independent experiments.

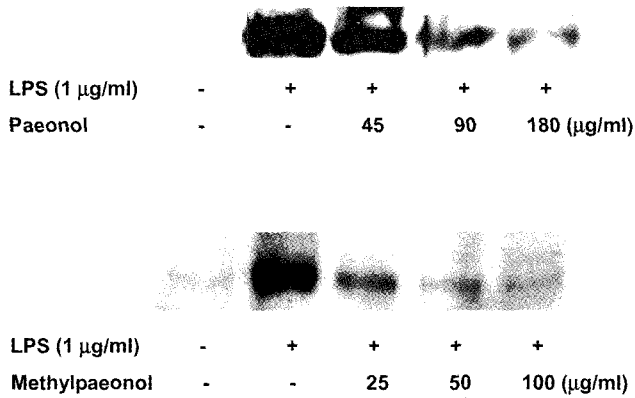


Fig. 3. Effect of paeonol and methylpaeonol on LPS-induced iNOS protein in RAW 264.7 cells.

Lysates were prepared from control or 24 h-LPS (1 µg/ml) stimulated cells alone or in combination with increasing concentrations of paeonol and methylpaeonol. All lanes contained 50 µg of total proteins. A representative immunoblot from three separate experiments is shown.

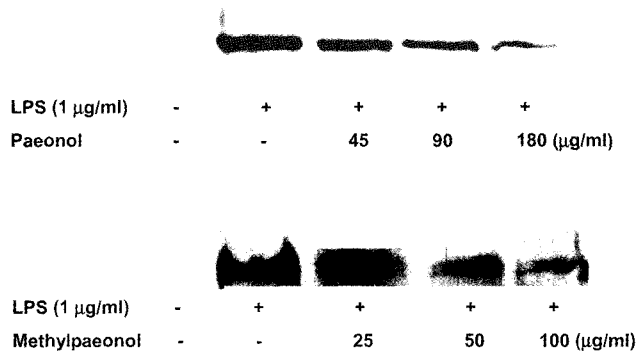


Fig. 4. Effect of paeonol and methylpaeonol on LPS-induced COX-2 expression in RAW 264.7.

Lysates were prepared from control or 24 h-LPS (1 µg/ml) stimulated cells alone or in combination with increasing concentrations of paeonol and methylpaeonol. All lanes contained 50 µg of total proteins. A representative immunoblot from three separate experiments is shown.

관련된 iNOS 및 COX-2의 단백질 유전자 발현을 억제하는 지를 실험하였다. LPS에 의해 iNOS 단백질은 뚜렷하게 증가하였으며 paeonol과 methylpaeonol은 농도의존적으로 발현을 저해하였다(Fig. 4). COX-2의 단백질에 대해서도 두 화합물은 LPS에 의해 유도된 이 단백질의 발현과정을 농도의존적으로 억제하는 것으로 조사되었다. 이 실험에 있어서도 methylpaeonol은 paeonol보다도 훨씬 강한 효과를 보임이 나타났다. 또한 두 화합물은 iNOS 및 COX-2의 발현을 저해함으로써 결과적으로 NO 및 PGE₂의 생성을 저해하여 염증과정을 차단할 것으로 추측된다.

목단피의 monoterpene glucoside을 중심으로 항염증 작용,¹³⁾

항고지혈작용,¹⁴⁾ 진통작용 등¹⁵⁾에 관해서 많이 보고되었을 뿐 아니라 paeonol에 관해서도 유사한 보고가 있어 왔으므로 목단피의 항염작용에서 monoterpene glucoside와 paeonol이 기여하고 있는 것으로 간주될 수 있다. 목단피에서 paeonol의 고함유량 및 천연화합물로서는 구조적으로 안정한 점 등에 미루어 paeonol이 monoterpene glucoside와는 경쟁적이 아닌 상가적인 효과를 일으킬 것으로 예측되는 바 paeonol이 염증억제에 관한 목단피의 중요한 생리활성 물질로 간주된다. 그리고, LPS로 유도한 macrophage 세포의 NO, iNOS, COX-2에 대한 paeonol의 저해효과는 본 연구가 처음이다.

한편 paeonol은 수증기 증류법으로 비교적 순도가 높은 paeonol을 제조할 수 있음이 나타났으며, 이로부터 methylpaeonol의 제조에 의한 효능 테스트를 한 바 paeonol 유도체가 한층 발전성이 있는 항염증제의 개발이 가능함을 제시하였다.

사 사

본 연구는 2005년도 상지대학교 교내연구비에 의해 수행되었습니다. 또한, 본 연구중 생리활성의 측정을 위해 도움을 주신 경희대학교 약대 이경태 교수님께 깊은 사의를 표합니다.

인용문헌

1. 한대석(2001) 생약학, 116-118, 동명사, 서울.
2. Lee, S. J., Lee, I. S., and Mar, W. (2003) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 activity by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose in murine macrophage cells, *Arch. Pharm. Res.*, **26**: 832-839 (2003).
3. Ye, J., Duan, H., Yang, X., Yan, W., and Zheng, X. (2001) Anti-thrombosis effect of paeoniflorin: evaluated in a photochemical reaction thrombosis model in vivo, *Planta Med.* **67**: 766-767.
4. Tsuboi, H., Hossain, K., Akhand, A. A., Takeda, K., Du, J., Rifai, M., Dai, Hayakawa, A., and Suzuki, H. (2004) and Nakayama, I.: Paeoniflorin induces apoptosis of lymphocytes through a redox-linked mechanism, *J. Cell. Biochem.* **93**: 162-172.
5. Yang, H. O., Ko, W. K., Kim, J. Y., and Ro, H. S. (2004) Paeoniflorin: and antihyperlipidemic agent from *Paeonia lactiflora*, *Fitoterapia*, 45-49.
6. Dai, M., Zhi, X., Peng, D., and Liu, Q. (1999) Inhibitory effect of paeonol on experimental atherosclerosis in quails, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **24**: 488-490.
7. Lin, H. C., Ding, H. Y., Ko, F. N., Teng, C. M., and Wu, Y. C. (1999) Aggregation inhibitory activity of minor acetophenones from *Paeonia* species, *Planta Med.* **65**: 595-599.
8. Li, G., Seo, C. S., Lee, K. S., Kim, H. J., Chang, H. W., Jung,

- J. S., Song, D. K., and Son, J. K. (2004) Protective constituents against sepsis in mice from the root cortex of *Paeonia Suffruticosa*, *Arch. Pharm. Res.*, **27**: 1123-1126.
9. Chou, T. C. (2003) Antiinflammatory and analgesic effects of paeonol in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia, *Brit. J. Pharmacol.* **139**: 1146-1152.
10. Kim, S. H., Kim, S. A., Park, M. K., Park, Y. D., Na, H. J., Kim, H. M., Shin, M. K., and Ahn, K. S. (2004) Paeonol inhibits anaphylactic reaction by regulating histamine and TNF- α , *International Immunopharmacol.* **4**: 279-287.
11. Choi, J. H., Ha, J. H., Park, J. H., Lee, J. S., Park, H. J., Choi, J. W., Masuda, Y., Nakaya, K., and Lee, K. T. (2002) Costunolide triggers apoptosis in human leukemia U937 cells by depleting intracellular thiols, *Jpn. J. Cancer Res.* **93**: 1327-1333.
12. Ka, H., Park, H. J., Jung, H. J., Choi, J. W., Cho, K. S., Ha, J., and Lee, K. T. (2003) Cinnamaldehyde induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia leukemia HL-60 cells, *Cancer Lett.*, **196**: 143-152.
13. Takai, K. and Harada, M. (1969) Pharmacological studies on herb paeony root. II. Antiinflammatory effect, inhibitory effect on gastric juice secretion preventive effect on stress ulcer, antidiuretic effect of paeoniflorin and combined effects with licorice components, *Yakugaku Zasshi* **89**: 887-892.
14. Yang, H. O., Ko, W. K., Kim, J. Y., and Ro, H. S. (2004) Paeoniflorin: an antihyperlipidemic agent from *Paeonia lactiflora*, *Fitoterapia* **75**: 45-49.
15. Tsai, H. Y., Lin, Y. T., Tsai, C. H., and Chen, Y. F. (2001) Effects of paeoniflorin on the formalin-induced nociceptive behaviour in mice, *Journal of Ethnopharmacology, J. Ethnopharmacol.*, **75**: 267-271.

(2005년 3월 30일 접수)