

식방풍의 성분분리 및 생리활성

김도훈 · 한지수 · 김기은 · 김진효 · 김성건 · 김호경* · 오오진** · 황완균[#]

중앙대학교 약학대학, *한국한의학연구원, **가톨릭상지대학 전통약재관리과
(Received March 4, 2009; Revised April 1, 2009; Accepted April 10, 2009)

Biological Activities of Isolated Compounds from Peucedani Radix

Do Hoon Kim, Chi Su Han, Gi Eun Kim, Jin Hyo Kim, Sung Gun Kim,
Ho Kyoung Kim*, O Jin Oh** and Wan Kyunn Whang[#]

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

*Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

**Department of Herbal Medicines Management, Catholic Sangji College, Andong 760-711, Korea

Abstract — In this study, isolation of antioxidative compounds was performed for development of anti-oxidizing agent. CHCl₃, H₂O, 30%, 60% MeOH, MeOH fractions were examined antioxidative activity by DPPH, test of inhibition on NO production. It was revealed that 30%, 60% MeOH and CHCl₃ fractions had significant antioxidative activity. In 30% MeOH and 60% MeOH, CHCl₃ fraction, six compounds were isolated and elucidated as adenosine(I), guanosine(II), peucedanol 7-O-β-D-apiofuranosyl(1→6)-β-glucopyranoside(III), peucedanol 7-O-β-D-glucopyranoside(IV), peucedanol(V) and scopoletin(VI) by physicochemical data and spectroscopic methods. (Negative FAB-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR). The results from antioxidative activity screening for the each compound showed that compound IV was relatively superior antioxidant ability. In anti-inflammatory activation assay, compound III, IV, VI had concentration-dependent-activity and compound IV had superior anti-inflammatory ability. These results suggest that Peucedani Radix might be developed as a potent anti-oxidative, anti-inflammatory agents and ingredients for related functional foods.

Keywords □ Peucedani Radix, antioxidative effect, *Peucedanum japonicum*

식방풍은 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 갯기름나물(*Peucedanum japonicum* Thunberg)의 뿌리를 말한다. 갯기름나물을 미역방풍, 목단방풍, 산방풍, 목방풍, 식방풍 이라고 부르기도 하며, 잎은 나물로 먹고 뿌리는 약으로 쓰인다. 갯기름나물은 다년생 초본으로 줄기는 곧게 자라고 끝부분에 짧은 털이 있으나, 그 밖의 부분은 평활하며, 뿌리는 굵으나 목부분에 섬유가 있다. 잎은 어긋나고 잎자루가 길지만 회록색으로서 백분을 칠 한 것 같으며, 질은 두텁고 2-3회 깃모양의 겹잎이다. 작은 잎은 도란형으로서 두꺼우나 흔히 3개로써 갈라지고 불규칙하나 깊은 치아상의 톱니가 있으며 윗부분의 잎은 퇴화되나 엽초가 커지지 않는다. 꽃은 6~8월 가지 끝과 줄기 끝에 접산형화서로 10~20개의 작은 꽃자루 끝에 백색꽃이 달린다. 열매는 타원형의 분과로써 잔털이 있으나, 뒷면의 능선이 실처럼 가늘며 합생면에 8개의 유관이 있다.¹⁻³⁾ 한

방에서 식방풍은 방풍의 대용으로 많이 사용되어 지며, 중풍과 가래, 기침, 두통, 전신마비, 해열, 신경통등에 사용된다고 알려져 있다.⁴⁾

*Peucedanum japonicum*의 성분 연구로는 Hata 등⁵⁾이 1968년에 peucedanol, hamaudol, bergapten을 분리한 바 있고, cytotoxic pyranocoumarin류에 대한 보고로는 1991년에 Chang 등⁶⁾의 (+)-trans-khellactone와 (+)-trans-4'-acetyl-3'-tigloylkhellactone에 대한 분리 보고와 Chang 등⁷⁾의 (-)-cis-khellactone에 대한 보고 등이 있다. 그 후, angular 타입의 dihydropyranocoumarins 류로는 peujaponisin과 (-)-visnadin 등이 1992년에 Yasumasa 등⁸⁾에 의하여 분리 되었고, 1993년에 Yasumasa 등⁹⁾이 이와 같은 타입의 peujaponisinol A and B를 분리하였다. 1994년에 들어서는, Ikeshiro 등¹⁰⁾이 coumarin glycoside인 peujaponiside 를 분리 보고하였 으며 이 후 1999년에 Choi 등¹¹⁾이 praeruptorin A, xanthotoxin, psoralen, isopimpinellin을 분리 보고하였다. 그 후 2005년 Zheng 등¹²⁾이 coumarin 타입의 scopoletin과 sterol인 daucosterol 그리고 aliphatic alcohol인 galactitol을 분리동정하였다.

*Peucedanum japonicum*의 활성 연구로는 1991년 Takeuchi 등¹³⁾

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5611 (팩스) 02-825-5611
(E-mail) whang-wk@cau.ac.kr

이 phenylcoumarin 성분의 Ca²⁺ blocker 작용과 papaverine 유사 활성에 대해 보고하였고, 1992년 Jong 등¹⁴⁾이 cis-khellactone-diester의 혈액응고억제 활성을, 1998년 Aida 등¹⁵⁾이 khellactone의 항경련 작용 및 기관지 천식에 효과가 있음을 발표하였고, 1999년 Huong 등¹⁶⁾이 coumarin 성분의 monoamine oxidase의 억제 활성을, 2002년 Lee 등¹⁷⁾이 pyrocoumarin 성분의 nitric oxide와 cyclic GMP pathway에 의해 매개되는 혈압강하 작용에 대해서 보고하였다. 그 외 2004년 Lee 등¹⁸⁾이 coumarin 성분의 항당뇨 활성을, 같은 해에 Moorioka 등¹⁹⁾이 colon carcinogenesis의 예방 효과를, 2005년 Zheng 등¹²⁾이 scopoletin의 항염 활성에 대한 연구를 발표하였다.

본 연구는 *Peucedanum japonicum*의 민간적 음용을 비롯한 중풍, 해열 및 진통 등의 생리활성 보고가 있지만, 항산화 및 항염에 대한 연구가 체계적으로 알려진 바가 없음에 착안, 식방풍의 성분 분리 및 DPPH radical에 대한 scavenging activity 측정을 통해 항산화 활성을,²⁰⁾ 그리고 LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포주에서의 NO 생성 저해활성을 통한 항염 활성을 측정하여²¹⁻²³⁾의약품 자원으로서의 개발 가능성을 평가하고자 하였다.

실험방법

실험재료

본 실험에 사용한 식방풍(*Peucedani Radix*)은 우리나라에서 유통되는 것을 지역별로 총 30점(경동시장, 대구약령시장, 제천약재시장, 영천약재시장, 한약재 인터넷 쇼핑몰 유통품)을 수집하여 중앙대학교 약품자원식물학교실에서 식물학적 감정을 거친 후 사용하였으며 성분 분리와 활성 연구에 사용된 것은 기원이 가장 확실하며 품질이 우수한 것으로 사료되는 영천산 식방풍 4.8 kg을 재료로 사용하였다.

기기 및 시약

UV/VIS 분석기기로는 Human TU-1800PC(Korea)를 사용하였고, centrifuge는 Centrikon T-1180(Italy)를 사용하였다. FAB-MS spectrometer 측정에 사용된 것은 VG 70-VSEQ(England)이고 source는 ionized by 35 keV Cs⁺ ion beam을 matrix는 glycerol을 사용하였다. ¹H-NMR spectrometer는 Bruker Avance-500, 500 MHz(Germany)를 사용하였다. TLC 확인시험에는 Kieselgel 60 F₂₅₄(Merck, Germany)를 사용하였고 column chromatography에 사용한 gel은 Diaion HP-20(Nippon Rensui Co., Japan).

Sephadex LH-20(25~100 µm, Pharmacia, Sweden) ODS gel(400~500 mesh, Waters, USA) Silica gel(70~230 mesh, Merck, Germany)를 사용하였다. 항산화능 측정을 위한 시약으로는 L-ascorbic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DMSO(dimethyl sulfoxide), MTT, DMEM medium, RPMI 1640 medium, N^G-

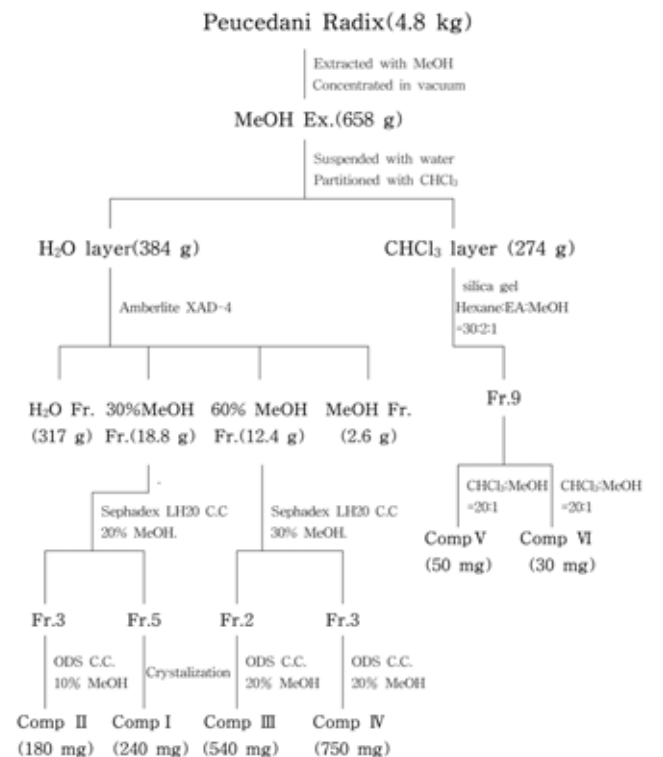
monomethyl-L-arginine(L-NMMA), lipopolysaccharide(*E. coli* 055:B5), murine recombinant INF-γ, Griess reagent, sodium diethyldithiocarbamate hydrate(Sigma Chemical Co., USA), RAW 264.7 cell: 한국세포주은행(Korea), FBS, penicillin-streptomycin, antibiotics(Gibco BRL, USA)를 사용하였다.

시약의 제조

0.1 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)은 DPPH 39.4 mg을 ethanol에 용해시켜 1000 ml이 되도록 용시 조제한다. MTT solution은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 0.5 mg/ml 농도의 PBS 용액을 제조한 후 4°C에서 차광용기에 보관하였다. LPS는 LPS(Lipopolysaccharide) 1 µg/ml 농도의 PBS 용액을 제조한 후 4°C에서 보관하였으며 INF-γ의 경우 INF-γ(Interferon-γ) 1 µg/ml 농도의 PBS 용액을 제조한 후 4°C에서 보관하였다. Griess reagent는 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride 수용액과 1% Sulfanilamide의 2.5% 인산용액을 각각 A액과 B액으로 만들어 4°C에서 보관하고 사용 직전에 동량의 부피를 혼합하여 사용하였다.

추출 및 분리

식방풍 4.8 kg에 MeOH을 가하여 상온에서 2주일간 3회 추출한 다음 감압 농축하여 엑스를 얻었으며 이 MeOH 추출물(658 g)



Scheme 1 – Extraction and isolation of the constituents from *Peucedani Radix*.

을 증류수에 현탁시킨 후 CHCl_3 을 가하여 진탕 반복추출하고, 분액깔때기에서 분획하여 CHCl_3 층과 수층을 분취한 후 이를 감압 농축하여 CHCl_3 엑스 274 g을 얻었으며 남은 물층(384 g)을 Amberlite XAD-4를 이용하여 column chromatography를 실시하여 물 분획물 317 g, 30% MeOH 분획 18.8 g, 60% MeOH 분획 12.4 g, MeOH 분획 2.6 g을 각각 얻었다(Scheme 1).

항산화능 실험

DPPH를 이용한 항산화능 측정 - 본 실험에 사용된 DPPH (Diphenylpicryl hydrazyl)의 hydrazyl은 질소원자가 불안정한 상태에 있으므로 쉽게 수소원자를 받아들이는 성질을 가지고 있어 항산화성 물질과 반응하여 수소원자를 받아들임으로써 자체의 정색성을 잃는 것을 이용하였다.

Hatano 등의 방법에 의하여⁶⁾ 각 fraction 및 단일 물질별 농축 건조물을 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000 ppm (99.5% ethanol)의 6가지 농도로 조제한 용액 0.1 ml(control: 99.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH용액(99.5% ethanol) 1.9 ml를 가하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 incubation시켰다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

양성 대조 약물로는 L-ascorbic acid를 25, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm(99.5% ethanol)의 6가지 농도로 용시 조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 DPPH에 대한 전자공여능(Electron donating ability, EDA%)과 IC_{50} 치(DPPH radical 형성을 50% 억제하는데 필요한 μl 농도)로 나타내었다. 이후 효과가 좋은 fraction과 단일물질 등은 농도를 낮게(25, 50, 100, 200, 500 ppm) 하여 같은 방법으로 측정하였다.

$$\text{EDA}(\%) = \frac{\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}}{\text{Control O.D.}} \times 100$$

Sample O.D. : 시료를 가한 시험액의 흡광도

Control O.D. : 시료 대신 ethanol을 가한 시험액의 흡광도

Radical scavenging activity 검색 - Hatano 등²⁰⁾의 방법에 의하여 각 fraction을 3000, 2000, 1000, 500, 250 ppm(99.5% ethanol)의 5가지 농도로 조제한 용액 0.05 ml (control: 99.5% ethanol)에 0.15 mM DPPH용액(99.5% ethanol) 0.95 ml를 가하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분 동안 incubation시켰다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조 약물로는 L-ascorbic acid를 62.5, 125, 250, 500, 1000 ppm(99.5% ethanol)의 5가지 농도로 조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 DPPH에 대한 전자공여능(Electron donating ability, EDA%)과 IC_{50} 치(DPPH radical 형성을 50% 억제하는데 필요한 농도)로 나타내

었다.

$$\text{EDA}\% = \frac{\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}}{\text{Control O.D.}} \times 100$$

Sample O.D. = 시료를 가한 시험액의 흡광도

Control O.D. = EtOH 0.05 ml + 0.1 mM DPPH 0.95 ml

항염증 실험

MTT시험법을 이용한 세포의 독성 측정 - 본 실험에서 RAW 264.7 cells에 대한 각 용매 분획물 및 분리 성분의 세포독성 및 실험 시 처리 농도를 결정하기 위해 MTT assay를 사용하였다. 이 정량법은 Mosmann의 방법²¹⁾을 변형하여 실시한 것으로 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase(NADH와 NADPH)에 의해서 노란색의 수용성 기질인 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide)가 진청색의 비수용성인 formazan으로 환원되는 것을 이용한 방법이다. RAW 264.7 cell을 RPMI1640 medium(10% fetal bovine serum, 5% antibiotics)으로 medium 1 ml 당 5×10^4 개 만큼 배양시킨 다음, 96 well에 1.5×10^4 cell/ml 씩 분주한 후 2시간 동안 배양하여 cell이 부착되도록 하고, 부착된 cell 배양액에 각각의 시료를 20 μl 씩 넣은 후 24시간 동안 배양한다. 24시간 배양 후, 새로운 medium으로 교체하고 미리 조제한 MTT를 최종 농도가 0.5 mg/ml가 되게 첨가한 후, 보라색으로 생성된 formazan의 양을 정량한다. 37°C, 5% CO_2 incubator에서 4시간 배양한 후 solubilization 용액을 20 μl 씩 넣어 밤새 실온에 놓아 용해한다. formazan crystal이 완전히 용해되면 다음날 측정 파장을 540 nm로 하여 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정한다.

생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례하므로 세포의 생존율을 측정할 수 있다.

LPS에 의해 유도된 iNOS에 의한 NO 생성 억제 활성 측정 - 본 실험은 LPS(lipopolysaccharide)와 $\text{INF-}\gamma$ 를 이용, RAW 264.7 cell에서 nitric oxide synthase enzyme을 발현시키고 생성된 NO의 양을 Griess의 방법^{22,23)}으로 측정하는 것이다. Griess reagent (1% sulfanilamine, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride, 2.5% H_3PO_4)는 NO를 산화시켜 NO_2 로 변화시키며 생성된 NO_2 는 540 nm에서 흡광도를 측정하여 그 농도를 NaNO_2 의 검량선을 이용하여 구하였다.

즉, RAW 264.7 cell을 DMEM으로 medium 1 ml 당 5×10^4 개 만큼 배양시킨 다음, 1 ml 당 1.5×10^4 개로 희석하여 96 well에 분주하고 2시간 동안 배양해서 cell이 부착되도록 한 다음, LPS(1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) 10 μl , $\text{INF-}\gamma$ (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) 10 μl 및 (+) control인 L-NMMA(NO synthesis inhibitory agent)를 포함한 각각의 시료를 20 μl 씩 넣고 24시간 배양시킨 후, 배양액에 생성되어 있는 NO의 양을 Griess reagent를 이용하여 정량하였다.

성분의 분리 및 구조 확인 -

Compound I: (-)FAB-MS(*m/z*): 266[M-H]⁻, ¹H-NMR: 500 MHz-DMSO-*d*₆, 8.34(1H, s, H-8), 8.14(1H, s, H-2), 5.87(1H, d, *J*=6.2 Hz, H-1'), 4.61(1H, dd, *J*=5.8 Hz, *J*=11.2 Hz, H-2'), 4.14(1H, dd, *J*=4.2 Hz, *J*=7.2 Hz, H-3'), 3.97(1H, dd, *J*=3.1 Hz, *J*=6.2 Hz, H-4'), 3.68(1H, dd, *J*=4.5 Hz, *J*=9 Hz, H-5'), 3.56(1H, dd, *J*=4.5 Hz, *J*=9 Hz, H-5'), DMSO-*d*₆.

Compound II: (-)FAB-MS(*m/z*): 282[M-H]⁻, ¹H-NMR: 500 MHz-DMSO-*d*₆, 7.94(1H, s, H-8), 5.70(1H, d, *J*=6.0 Hz, H-1'), 5.041(1H, dd, *J*=5.4 Hz, *J*=10.9 Hz, H-2'), 4.40(1H, dd, *J*=5.4 Hz, *J*=7.8 Hz, H-3'), 3.87(1H, dd, *J*=3.8 Hz, *J*=7.4 Hz, H-4'), 3.62(1H, dd, *J*=6 Hz, *J*=9 Hz, H-5'), 3.53(1H, dd, *J*=6.5 Hz, *J*=9 Hz, H-5'), DMSO-*d*₆.

Compound III: (-)FAB-MS(*m/z*): 557[M-H]⁻, 425[(M-H)-Api]⁻, 263[{(M-H)-Api}-Glc]⁻, ¹H-NMR: 500 MHz-DMSO-*d*₆, δppm, 7.99(1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4), 7.50(1H, s, H-8, 7.09(1H, s, H-5), 6.30(1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 4.92(1H, d, *J*=7.2 Hz, glucose anomeric H), 4.83(1H, d, *J*=3.0 Hz, apiose anomeric H), 3.91(1H, dd, *J*=10 Hz, *J*=14.8 Hz, H-2'), 3.62(1H, dd, *J*=13.3 Hz, *J*=14.8 Hz, H-1'), 2.20(1H, dd, *J*=10, 13.3 Hz, H-1'), 1.12, 1.11 (each 3H, s, germinal methyl), DMSO-*d*₆, δppm.

Compound IV: (-)FAB-MS(*m/z*): 425[M-H]⁻, 263[(M-H)-Glc]⁻, ¹H-NMR: 500 MHz-CD₃OD, δppm, 7.87(1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4), 7.45(1H, s, H-8) 7.16(1H, s, H-5), 6.26(1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 4.97(1H, d, *J*=7.2 Hz, glucose anomeric H), 3.94(1H, dd,

J=2.1 Hz, *J*=10 Hz, H-2') 3.64(1H, dd, *J*=2.1 Hz, *J*=13.5 Hz, H-1'), 2.92(1H, dd, *J*=10 Hz, *J*=13.5 Hz, H-1'), 1.25, 1.24(each 3H, s, germinal methyl), CD₃OD, δppm.

Compound V: (-)FAB-MS(*m/z*): 263[M-H]⁻, ¹H-NMR: 500 MHz-DMSO-*d*₆, δppm 7.82(1H, d, *J*=9.4 Hz, H-4), 7.38(1H, s, H-8), 6.71(1H, s, H-5), 6.16(1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 3.62(1H, dd, *J*=1.5 Hz, *J*=10.4 Hz, H-2'), 3.07(1H, dd, *J*=1.5 Hz, *J*=14.1 Hz, H-1'), 2.54(1H, dd, *J*=10.4 Hz, *J*=14.1 Hz, H-1'), 1.26, 1.25(each 3H, s, germinal methyl), DMSO-*d*₆, δppm.

Compound VI: (-)FAB-MS(*m/z*): 191[M-H]⁻, ¹H-NMR: 300 MHz-CD₃OD, δppm, 7.90(1H, d, *J*=9.4 Hz, H-4), 7.20(1H, s, H-8), 6.78(1H, s, H-5), 6.21(1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 3.81(3H, s, OCH₃), CD₃OD, δppm.

실험결과

분획별 활성 실험의 결과

DPPH를 이용한 항산화능 측정 - 식방풍 H₂O 분획물, 30% MeOH 분획물, 60% MeOH 분획물, MeOH 분획물, CHCl₃ 분획물을 농도별로(250~3000 ppm)조제하여 실험한 결과 30% MeOH 분획과 60% MeOH 분획, MeOH 분획의 radical scavenging activity가 우수하였으며, 60% MeOH 분획 > 30% MeOH 분획 > MeOH 분획 >> CHCl₃ 분획 > H₂O 분획 순으로 농도 의존적으로 radical scavenging activity가 증가하였다. 그 중에서 60% MeOH 분획은 IC₅₀ 27.21 µg/ml(ascorbic acid의 IC₅₀ 5.30 µg/ml)로 가장 우수한 항산화 활성을 나타내었다(Fig. 2, 3).

MTT assay를 통한 세포독성 실험 - 식방풍의 H₂O, 30% MeOH, 60% MeOH, MeOH, CHCl₃ 분획의 RAW 264.7 cell에 대한 세포독성을 평가하기 위한 MTT assay 결과 H₂O, 30% MeOH, 60% MeOH, MeOH 분획의 12.5~100 mg/ml 농도에서 유의성 있는 세포독성을 나타내지 않아, NO 생성 억제 실험 결과에서 나타난 NO 생성량의 변화가 세포독성에 의한 영향과는 무관함을 증명하

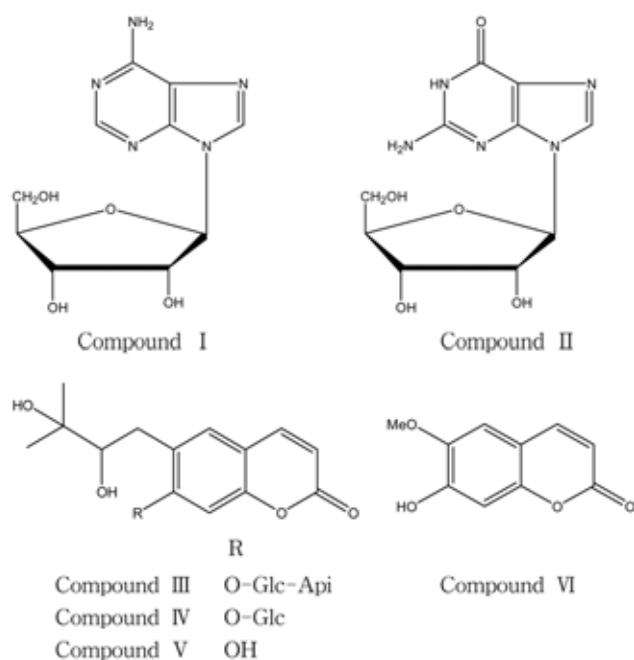


Fig. 1 - Structure of compound I~VI.

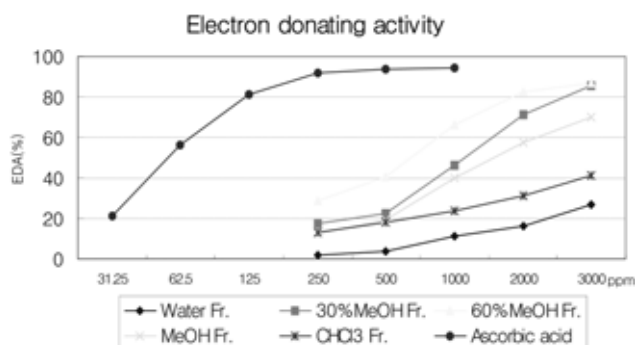


Fig. 2 - The radical scavenging activities of fractions from Peucedanum radix on DPPH.

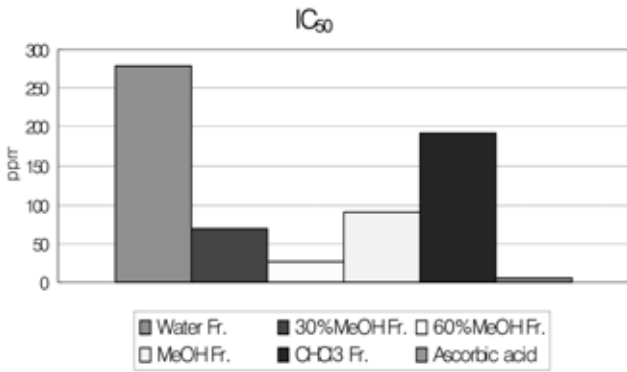


Fig. 3 - IC₅₀ values of fractions from Peucedani radix on DPPH radical.

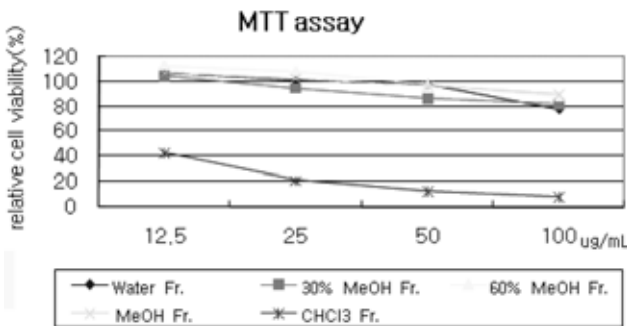


Fig. 4 - Effect of fractions from Peucedani radix on the relative viability of RAW 264.7 cells. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control absorbance.

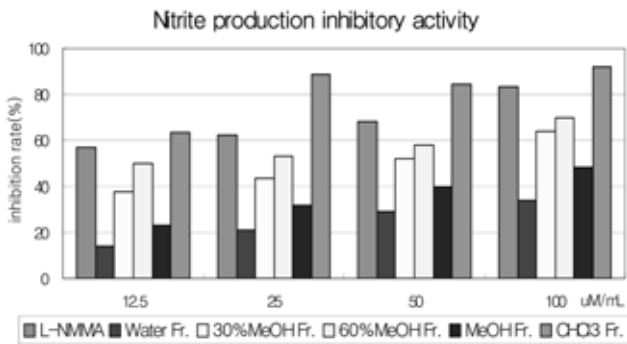


Fig. 5 - Inhibitory effects of fractions on NO production from Peucedani radix on nitrite production activity in LPS activated RAW 264.7 cell. Nitrite content were measured at 540 nm. Results were expressed as inhibition (%) of Nitrite.

였다(Fig. 4). 그러나 CHCl₃ 분획의 경우 모든 농도에서 세포독성을 나타내었다.

NO 생성 억제 작용 - 식방풍의 H₂O, 30% MeOH, 60% MeOH, MeOH, CHCl₃ 분획들의 NO 생성 억제 작용을 평가한 결과, 60% MeOH 분획에서 유의성 있는 효과를 보였고, 30% MeOH 분획

에서도 완화된 효과를 보였다(Fig. 5). 그러나 CHCl₃ 분획의 경우 NO 생성량의 변화가 세포 독성에 의해 나타난 것으로 판단된다.

활성분획에서 분리된 물질의 확인 동정

Compound I - Compound I은 흰색의 결정으로 silica gel TLC에서 전개하고 UV lamp(254 nm)로 쬐었을 때 검은색의 흡수 패턴을 보였으며, 10% 황산 분무 가열시 진보라색으로 발색되었고 Negative FAB-MS spectrum에서 m/z 266에서 [M-H]의 molecular ion peak를 관찰할 수 있어 분자량이 흡수인 질소화합물로 추정할 수 있었다.

¹H-NMR spectrum에서 δ8.34 ppm와 δ8.14 ppm에서 발견되는 singlet의 proton peak는 8번과 2번에 붙어 있는 proton으로 확인하였고, δ5.87 ppm에서 J값 6.2 Hz를 가지는 doublet peak를 1'의 proton으로, δ4.61 ppm에서 dd(J=5.8 Hz, J=11.2 Hz)으로 관찰되는 proton peak를 2'의 proton peak로 확인 하였다. δ4.14 ppm의 위치에서는 dd(J=4.2 Hz, J=7.2 Hz)으로 관찰되었는데 이는 3'의 proton으로 δ3.97 ppm은 dd, J=3.1 Hz, J=6.2 Hz를 나타내었으며 이는 4'의 proton으로 확인하였으며, δ3.68 ppm과 δ3.56 ppm은 5'에 붙은 proton으로 확인 동정하였다.

이상의 기기분석 결과 및 표준품과 직접 비교에 의해 adenosine²⁴으로 확인 동정 하였다.

Compound II - Compound I은 흰색의 결정으로 silica gel TLC에서 전개하고 UV lamp(254 nm)로 쬐었을 때 검은색의 흡수 패턴을 보였으며, 10% 황산 분무 가열시 검은색으로 발색되었고 Negative FAB-MS spectrum에서 m/z 282에서 [M-H]의 molecular ion peak를 관찰할 수 있어 분자량이 흡수인 질소화합물로 추정할 수 있었다.

¹H-NMR spectrum에서 δ7.94 ppm에서 발견되는 singlet의 proton peak는 8에 붙어 있는 proton으로 확인 하였고, δ5.70 ppm에서 J값 6.0 Hz를 가지는 doublet peak를 1'의 proton 으로, δ5.04 ppm에서 dd(J=5.4 Hz, J=10.9 Hz)으로 관찰되는 proton peak를 2'의 proton peak로 확인 하였다. δ4.40 ppm의 위치에서는 dd(J=5.4 Hz, J=7.8 Hz)으로 관찰되었는데 이는 3'의 proton으로 δ3.87 ppm은 dd, J=3.8 Hz, J=7.4 Hz를 나타내었으며 이는 4'의 proton으로 확인하였으며, δ3.62 ppm과 δ3.53 ppm은 5'에 붙은 proton으로 확인 동정하였다.

이상의 기기분석 결과 및 표준품과 직접 비교에 의해 guanosine²⁵으로 확인 동정 하였다.

Compound III - Compound III 화합물은 황색의 분말상의 물질로서 silica gel TLC에서 전개하고 UV lamp(254, 365 nm)로 쬐었을 때 강한 청색 형광을 나타내었고, 10% 황산 분무 가열 시 황색으로 발색되었다.

Negative FAB-MS spectrum에서 m/z 557에서 [M-H]의 molecular ion peak를 관찰할 수 있었으며, m/z 425에서 apiose가

탈락한 fragment ion peak를 관찰할 수 있었고, m/z 263에서 glucose와 apiose가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 86.03과 87.99 ppm의 signal은 각각 doublet($J=9.6$ Hz)로서 coumarin 핵의 olefinic proton인 H-3와 H-4로, 87.39와 86.08 ppm의 singlet signal은 benzene ring의 H-5와 H-8로 추정되어 coumarin 골격의 C-8 위치는 치환되지 않고 C-6, C-7위치가 치환 형태임을 예측할 수 있었다.

Glucose의 anomeric proton이 84.92 ppm($d, J=7.2$ Hz, Glc H-1)으로 apiose의 anomeric proton이 84.83 ppm($d, J=3.0$ Hz, Api H-1)으로 나타내므로 각각 β 결합을 하고 있음을 보여주고 있으며 각각의 chemical shift 값을 보았을 때 glucose가 peucedanol의 7-OH에 직접 결합되어 있음을 알 수 있으며 apiose가 이 glucose에 결합되어 있음을 알 수 있었다.

이상의 기기분석과 각종 기기분석 및 문헌과의 비교를 통하여 compound III는 peucedanol 7-O- β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside 즉 peujaponiside²⁶⁾임을 증명 할 수 있었다.

Compound IV – Compound 화합물은 황색의 분말상의 물질로서 silica gel TLC에서 전개하고 UV lamp(254, 365 nm)로 쬐었을 때 강한 청색 형광을 나타내었고, 10% 황산 분무 가열 시 황색으로 발색되었다.

Negative FAB-MS spectrum에서 m/z 425에서 [M-H]⁻의 molecular ion peak를 관찰할 수 있었으며, m/z 263에서 glucose가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 86.03과 87.99 ppm의 signal은 각각 doublet($J=9.6$ Hz)로서 coumarin 핵의 olefinic proton인 H-3와 H-4로, 87.39와 86.08 ppm의 singlet signal은 benzene ring의 H-5와 H-8로 추정되어 coumarin 골격의 C-8 위치는 치환되지 않고 C-6, C-7위치가 치환 형태임을 예측할 수 있었다.

Glucose의 anomeric proton이 84.97 ppm($d, J=7.2$ Hz, Glc H-1)으로 나타내므로 β 결합을 하고 있음을 보여주고 있으며 각각의 chemical shift 값을 보았을 때 glucose가 peucedanol의 7-OH에 직접 결합되어 있음을 알 수 있었다.

Compound V – Compound V는 백색 침상으로써 silica gel TLC에서 전개하고 UV lamp(254, 365 nm)로 쬐었을 때 강한 청색 형광을 나타내었고, 10% 황산 분무 가열 시 황색으로 발색되었다.

Negative FAB-MS spectrum에서 m/z 263에서 [M-H]⁻의 molecular ion peak를 관찰할 수 있었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 86.26과 87.82 ppm의 doublet($J=9.4$ Hz)는 coumarin 핵의 olefinic proton인 H-3와 H-4에 기인하는 것이고, 87.38와 86.71 ppm의 singlet은 benzene ring의 H-5와 H-8이고, 81.25와 81.26 ppm의 singlet은 germinal methyl의 proton으로 예측되어 6, 7 위치가 치환된 terpenoid coumarin임을 추정할 수 있었다.

이상의 기기분석과 각종 기기분석 및 문헌과의 비교를 통하여

compound IV는 peucedanol²⁷⁾임을 증명 할 수 있었다.

Compound VI – Compound VI는 황색 분말로써 silica gel TLC에서 전개하고 UV lamp(254, 365 nm)로 쬐었을 때 강한 청색 형광을 나타내었고, 10% 황산 분무 가열 시 황색으로 발색되었다. Negative FAB-MS spectrum에서 m/z 191에서 [M-H]⁻의 molecular ion peak를 관찰할 수 있었다.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 86.21과 87.90 ppm의 doublet($J=9.6$ Hz)는 coumarin 핵의 olefinic proton인 H-3와 H-4에 기인하는 것이고, 87.20와 86.78 ppm의 singlet은 benzene ring의 H-5와 H-8이고, 86.08 ppm의 singlet은 OMe의 proton으로 예측되어 6, 7 위치가 치환된 coumarin임을 추정할 수 있었다.

이상의 기기분석과 각종 기기분석 및 문헌과의 비교를 통하여 compound VI는 scopoletin¹²⁾임을 증명 할 수 있었다.

화합물의 활성 실험 결과

분리된 성분의 항산화 활성 – 식방풍의 각각의 분획에 대한 항산화 및 항염 활성 실험 결과 우수한 활성을 보인 30% MeOH, 60% MeOH, CHCl_3 분획에서 분리한 6개의 compounds의 활성을 측정하였다. 항산화 활성으로는 DPPH법에 의한 각각의 radical scavenging activity를 확인하였고, 항염 활성으로는 RAW 264.7 cell을 이용한 NO 생성 억제 작용을 확인하였다.

DPPH를 이용한 항산화능 측정 – 활성 분획인 30%와 60% MeOH, CHCl_3 분획에서 분리된 각 compounds를 농도별(125~1000 ppm)로 조제하여 각각의 compounds의 DPPH radical에 대한 radical scavenging activity를 실험한 결과 일부 compounds에서 활성을 나타내었으며, compound IV($\text{IC}_{50}=13.53\pm 2.11$ $\mu\text{g}/\text{ml}$) > compound III($\text{IC}_{50}=35.37\pm 3.78$ $\mu\text{g}/\text{ml}$) > compound VI($\text{IC}_{50}=50.94\pm 5.85$ $\mu\text{g}/\text{ml}$) > compound V($\text{IC}_{50}=62.24\pm 6.47$ $\mu\text{g}/\text{ml}$) > compound I($\text{IC}_{50}=183.86\pm 23.03$ $\mu\text{g}/\text{ml}$) > compound II($\text{IC}_{50}=201.63\pm 19.84$ $\mu\text{g}/\text{ml}$) 순으로 활성을 나타내었다. 양성 대조군인 ascorbic acid($\text{IC}_{50}=6.171\pm 0.85$ $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 비교했을 때 분획별 DPPH를 이용한 항산화능 측정에서 가장 좋은 결과를 보였던 60%

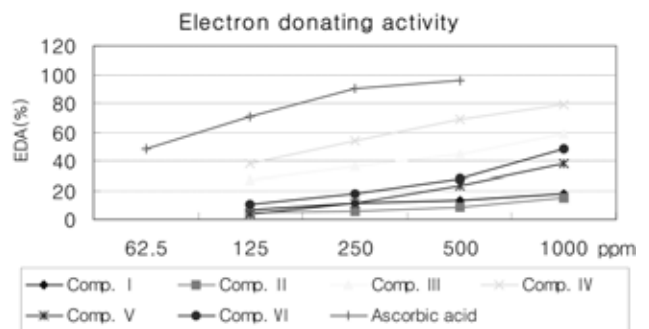


Fig. 6 – The radical scavenging activities of compounds from active fractions of Peucedani radix on DPPH radical.

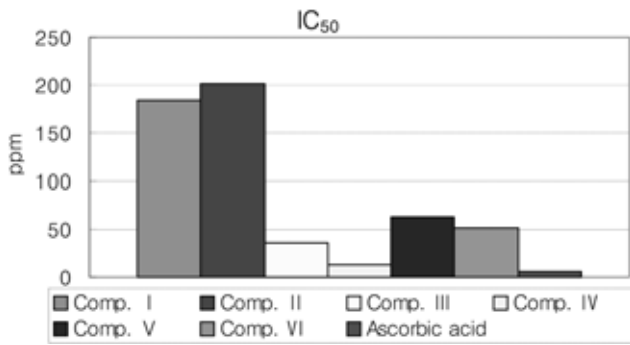


Fig. 7 – IC₅₀ values of compounds from active fractions of Peucedani radix on DPPH radical.

MeOH 분획에서 분리된 compound IV(IC₅₀=13.53±2.11 µg/ml)에서 완화된 활성을 나타내었다(Fig. 6, 7).

MTT assay를 이용한 세포독성 측정 – 활성분획인 30%, 60% MeOH, CHCl₃ 분획에서 분리한 각 compounds의 농도별로 세포독성을 평가하기 위한 MTT assay결과 2, 4, 8, 16 µg/ml 농도에

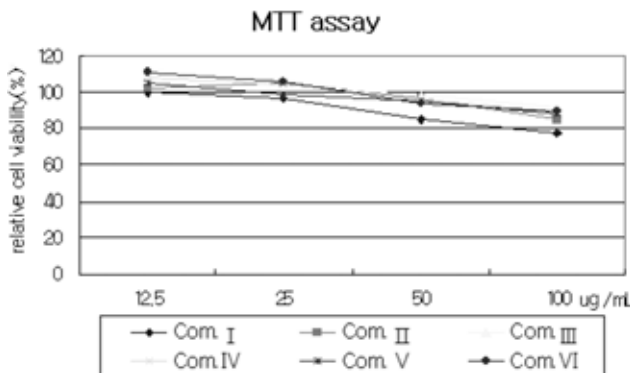


Fig. 8 – Effect of compounds from active fractions of Peucedani radix on the relativeviability of RAW 264.7 cells. The relative viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expresse as % of control absorbance.

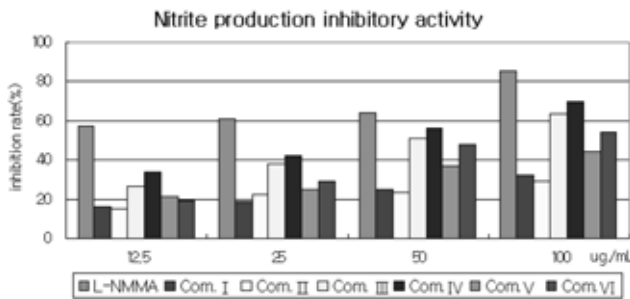


Fig. 9 – Inhibitory effects of compounds on NO production from active fractions of Peucedani radix on nitrite production activity in LPS activated RAW 264.7 cell. Nitrite content were measured at 540nm. Results were expressed as inhibition (%) of Nitrite.

서 compound I-VI에서는 유의성 있는 세포독성을 나타내지 않아 실험결과에서 나타난 NO 생성량의 변화가 세포독성에 의한 영향과는 무관함을 증명하였다(Fig. 8).

NO 생성 억제 작용 – 활성분획인 30%, 60% MeOH 분획에서 분리한 각 compounds의 농도별로 NO 생성억제작용을 평가한 결과 compound I, II에서는 NO 생성억제 작용을 찾아볼 수 없었고, compound III, IV, VI에서 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 compound IV에서는 실험 최고농도인 100 µg/ml에서 70% 이상의 NO 생성 억제능을 갖는 것을 확인할 수 있어서 항염 작용이 우수함을 알 수 있었다(Fig. 9).

결론

본 연구는 식방풍의 민간적 음용을 비롯한 증풍, 해열 및 진통 등의 생리활성 보고가 있지만, 항산화 및 항염에 대한 구체적인 실험 data가 없다는 점과 식방풍이 방풍, 해방풍과 혼용 또는 오용되어 유통되고 있는데 그 뚜렷한 품질 기준이나 품질 표준화 지침이 부족하다는 점에 착안하여 본 연구에 착수 하였다.

식방풍을 Methanol로 추출 후 농축하고 탈지한 후 CHCl₃ 분획을 얻었고 나머지 물가용부를 amberlite XAD-4 column chromatography를 실시하여 당을 제거한 H₂O, 30% MeOH, 60% MeOH 및 MeOH 분획물을 얻었다. 이들 5가지 분획물에 대해서 DPPH를 이용하여 항산화 활성을 측정하였고, RAW 264.7 cell을 이용한 NO 생성 억제 실험을 통한 항염증 활성을 측정 하였다. 그 결과 60% MeOH 분획, 30% MeOH 분획, CHCl₃ 분획이 농도 의존적으로 활성이 증가하였으며, activity guided fractionation 방법에 따라 물질분리를 시도하여 세 분획에서 6개의 화합물을 분리하였다.

각종 기기분석을 통하여 그 구조를 compound I은 adenosine으로, compound II는 guanosine으로, compound III는 peucedanol 7-O-β-D-apiofuranosyl(1→6)-β-glucopyranoside(peujaponiside)로, compound IV는 peucedanol 7-O-β-D-glucopyranoside로, compound V는 peucedanol로, compound VI는 scopoletin으로 확인, 동정하였으며 분리된 각 성분에 대해서 DPPH를 이용한 항산화 활성 실험과 RAW 264.7 cell을 이용한 NO 생성 억제 실험을 통한 항염증 활성을 측정하였다. 그 결과 항산화 실험인 DPPH를 이용한 radical scavenging activity의 경우에는 활성 정도가 Compound IV>compound III>Compound VI>Compound V>Compound I>Compound II 순으로 나타났다. 항염 활성 실험인 RAW 267.4 cell을 이용한 NO생성 억제 활성 실험에서는 compound III, IV, VI 이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였고, compound I, II는 다른 성분들에 비하여 상대적으로 낮은 활성을 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 식방풍은 앞으로 항산화제, 항염제 및 이와 관련한 기능성 식품 소재로 개발될 가능성이 있다고

판단된다. 또한 식방풍의 표준화를 위한 함량 기준의 설정은 식방풍이 방풍 및 해방풍으로 오용되는 것을 막고 올바른 유통체계를 확립하는데 기여를 할 것이다.

참고문헌

- 1) 대한 약전 제 8개정 대한 약전의 한약(생약) 규격집.
- 2) 생약학교재편찬위원회 : 생약학, 동명사, p 137 (2006).
- 3) 한국한의약연구원, 한약재 관능검사기준 연구(한약제도감편), 보건복지부, 서울, p 88-89 (1999).
- 4) 김호철 : 한약약리학, 집문당, p 75 (2004).
- 5) Hata, Y. and Katsumi, N. : 일본약학잡지 **88**, 513 (1968).
- 6) Chang, Y. D., Shang, K. W. and Yang, C. W. : Cytotoxic pyranocoumarins from the aerial parts of *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry* **30**(8), 2812 (1991).
- 7) Chang, Y. D., Shang, K. W. and Yang, C. W. : Cytotoxic pyranocoumarins from roots of *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry* **31**(5), 1829 (1992).
- 8) Yasumasa, I., Izumi, M. and Yutaka, T. : Dihydropyranocoumarins from roots of *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry* **31**(12), 4303 (1992).
- 9) Yasumasa, I., Izumi, M. and Yutaka, T. : Dihydropyranocoumarins from *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry* **33**(6), 1543 (1993).
- 10) Ikeshiro, Y., Mase, I. and Tomita, Y. : Coumarins glycosides from *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry* **35**(5), 1339 (1994).
- 11) Choi, H. C., Rho, T. C., Kim, B. Y., Ko, H. R., Oh, W. K., Seong, C. K., Mheen, T. I., Ahn, J. S. and Lee, H. S. : Inhibition of nitric oxide production by coumarins from *Peucedanum Japonicum* in LPS-Activated RAW 264.7 cells. *Kor. J. Pharmacogn* **30**(2), 99 (1999).
- 12) Zheng, M. S., Jin, W. Y., Son, K. H., Chang, H. W., Kim, H. P., Bae, K. H. and Kang, S. S. : The constituents isolated from *Peucedanum japonicum* thunb. and their cyclooxygenase (COX) inhibitory activity. *Kor. J. Medicinal Crop. Sci.* **13**(2), 75 (2005).
- 13) Takeuchi, N., Kasama, T., Aida, Y., Oki, J., Maruyama, I., Watanabe, K. and Tobinaga, S. : Pharmacological activities of the prenylcoumarins, developed from folk usage as a medicine of *Peucedanum japonicum* thunb. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) **39**(6), 1415 (1991).
- 14) Jong, T. T., Hwang, H. C., Jean, M. Y., Wu, T. S., Teng, C. M. : An antiplatelet aggregation principle and X-ray structural analysis of cis-khellactone diester from *Peucedanum japonicum*. *J. Nat. Prod.* **55**(10), 1396 (1992).
- 15) Aida, Y., Kasama, T., Takeuchi, N., Chiba, M. and Tobinaga, S. : Pharmacological activities of khellactones, compounds isolated from *Peucedanum japonicum* thunb. and *Peucedanum praeruptorium* DUNN. *Exp. Clin. Pharmacol.* **20**(4), 343 (1998).
- 16) Huong, D. T., Choi, H. C., Rho, T. C., Lee, H. S., Lee, M. K. and Kim, Y. H. : Inhibitory activity of monoamine oxidase by coumarins from *Peucedanum japonicum*. *Arch. Pharm. Res.* **22**(3), 324 (1999).
- 17) Lee, J. W., Roh, T. C., Rho, M. C., Kim, Y. K. and Lee, H. S. : Mechanisms of relaxant action of a pyranocoumarin from *Peucedanum japonicum* in isolated rat thoracic aorta. *Planta. Med.* **68**(10), 891 (2002).
- 18) Lee, S. O., Choi, S. Z., Lee, J. H., Chung, S. H., Park, S. H., Kang, H. C., Yang, E. Y., Cho, H. J. and Lee, K. R. : Antidiabetic coumarin and cyclitol compounds from *Peucedanum japonicum*. *Arch. Pharm. Res.* **27**(12), 1207 (2004).
- 19) Morioka, T., Suzui, M., Nabandith, V., Inamine, M., Aniya, Y., Nakayama, T., Ichiba, T., Mori, H. and Yoshimi, N. : The modifying effect of *Peucedanum japonicum*, a herb in the Ryukyu Islands, on azoxymethane-induced colon preneoplastic lesions in male F344 rats. *Cancer Lett.* **205**(2), 133 (2004).
- 20) Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatus, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, T., Yoshida, T. and Okuda, T. : Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. IV. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2016 (1989).
- 21) Mosmann, T. : Rapid colormetric assay for the cellular growth and survival. *J. Immune. Methods* **65**, 55 (1983).
- 22) Feelisch, M. and Stamler, J. : Methods in nitric oxide research. *John Wiley & Sons*, 492-297 (1983).
- 23) Park, S. Y., Hong, S. S., Han, X. H., Ro, J. S. and Whang, B. Y. : Inhibitory constituents of LPS-induced nitric oxide production from arctium lappa. *Nat. Prod. Sci.* **11**(2), 85 (2005).
- 24) Denisa, D., Weidong, H., Norbert, D. K., Monica, H. and Joseph, P. : β -Adenosine, a bioactive compound in grass chaff stimulating mushroom production. *Phytochemistry* **65**, 181 (2004).
- 25) Teixeira, M., Santana, L. and Uriarte, E. : Assignment of the ¹³C NMR spectra of some adenine, hypoxanthine and guanine carbonucleosides. *Magn. Reson. Chem.* **35**, 806 (1997).
- 26) Whang, W. K., Lee, S. J., Kim, H. H., Cho, H. K., Lee, K. S. and Ham, I. H. : Standardization of Peucedani Radix. *Kor. J. Pharmacogn* **32**(4), 292 (2001).
- 27) Shin, K. H., Kang, S. S. and Chi, H. H. : Quantitative analysis of peucedanol in *Peucedanum japonicum*. *Kor. J. Pharmacogn* **23**(1), (1992).