

## 산수유의 반응성 산소종 생성 증진 성분

김대근, 곽종환, 류정희, 권학철, 송기원, 강삼식<sup>1</sup>, 이성행<sup>2</sup>, 이은아<sup>2</sup>,  
권년수<sup>2</sup>, 이강노, 지옥표\*

성균관대학교 약학대학, <sup>1</sup>서울대학교 천연물과학연구소, <sup>2</sup>중앙대학교 의과대학 생화학교실

## A Component from *Cornus officinalis* Enhances Hydrogen Peroxide Generation from Macrophages

Dae Keun Kim, Jong Hwan Kwak, Jung Hee Ryu, Hak Chul Kwon, Ki Won Song,  
Sam Sik Kang<sup>1</sup>, Sung Haeng Lee<sup>2</sup>, Eun Ah Lee<sup>2</sup>, Nyoun Soo Kwon<sup>2</sup>,  
Kang Ro Lee and Ok Pyo Zee\*

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea;

<sup>1</sup>Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea; and

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** - Hydrogen peroxide is one of major chemicals mediating antitumor and antimicrobial activities of macrophages. We searched natural products enhancing hydrogen peroxide generation from murine macrophage-like cell line J774. Among 21 methanol extracts of Korean medicinal plants, the extract from *Cornus officinalis* was the most effective. The active component from the fractions was searched by activity guided fractionation, and identified as ursolic acid by spectral data.

**Key words** - Cornaceae: *Cornus officinalis*: ursolic acid: enhancement of hydrogen peroxide generation.

우리나라의 중부이남에 흔히 자라는 산수유나무 (*Cornus officinalis*)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 낙엽소교목으로서 주로 과육을 중약, 한약 또는 민간에서 자양강장, 수렴약으로 사용하고 있으며 꽃은 관상자원으로 이용하기도 한다.<sup>1-3)</sup> 자원적으로도 풍부하고, 또한 민간에서 빈번히 약용하고 있는 산수유에 대해서는 주로 tannin 화합물,<sup>4-6)</sup> iridoid 화합물<sup>7)</sup> 및 정유성분<sup>8)</sup> 등의 연구 보고가 있다. 그러나 아직 어떤 성분이 산수유의 약효성분인지는 연구된 바가 없으며, 단지 성분중 ursolic acid가 항당뇨 효과가 있다는 보고가 있다.<sup>9)</sup>

본 연구에서는 거식세포에서 반응성 산소종의 생

성을 증진시키는 물질을 천연물로부터 찾기위하여 21종의 약재를 methanol로 추출분획한 후 이를 다시 methylene chloride(MC) 및 톨로 분획하여 검색한 결과 산수유의 물분획이 반응성 산소종의 생성을 우수하게 증가시키는 것으로 관찰되었으므로, 이 활성분획을 정제하여 활성물질을 규명하고자 하였다.

### 재료 및 방법

**시약 및 기기** - column chromatography는 silica gel 60(230-400 mesh, Merck)을 사용하였고, 박층 chromatography는 precoated TLC plate silicagel 60 F<sub>254</sub>를 이용하였다. LPLC

\*교신저자 : Fax 0331-292-8800

(low pressure liquid chromatography)용 pump는 Duramat-Dosier pump (Chemie und Filter GmbH, Germany), 컬럼은 Lobar (R)-Lichroprep Si 60A (Merck)를 사용하였다. Scopoletin, horseradish peroxidase, phorbol myristate acetate, dimethylsulfoxide 는 Sigma(St. Louis, MO)에서, J774는 American Type Culture Collection(Rockville, MD)에서 구입하여 사용하였다. 화합물의 발색 및 확인은 anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 이용하였고 기타 시약은 일급 시약을 정제 없이 추출 및 컬럼 크로마토그래피에 사용하였다. 융점은 Gallenkamp melting point apparatus(uncorrected), IR은 6160FT-IR(Analect Instrument, U.S.A.), NMR은 Bruker AM-300 spectrometer, GC/MS는 Hewlett-Packard Model 5890/5987X 를 사용하였다.

**실험 재료** - 본 실험에 사용된 산수유 열매 (*Cornus officinalis*)는 경동시장에서 구입하여 감정한 후 사용하였다.

**세포배양과 hydrogen peroxide 생성측정** - Fetal bovine serum (10%) 을 포함하는 RPMI 1640에서 배양한 J774를 원심분리에 의해 수확하여 96-well plate에 각 well 당 100,000 세포 (0.1 ml)를 분주하였다. 실험대상이 되는 천연물 추출액이나 분획을 가하고 24-30시간 동안 배양하였다. 그 후 phorbol myristate acetate에 의해 유발되는 반응성 산소종의 생성을 관찰하였다. 반응성 산소종의 생성량은 De la Harpe와 Nathan의 방법으로 hydrogen peroxide의 발생량을 관찰하여 측정하였다<sup>10)</sup>.

**추출 및 화합물 1의 분리** - 산수유 4 kg을 80% methanol로 환류 교반하에 4시간씩 3회 추출하여 얻은 엑스 1.5 kg을 증류수를 가하여 현탁시키고 MC를 가하였다. MC와 water로 분획하였을 때 water 분획의 반응성 산소종 생성 증진효과가 우수하였으므로, water 분획을 용매극성에 따라 EtOAc, n-BuOH, water로 소분획하였다. EtOAc엑스 54 g을 EtOAc, EtOAc-MeOH-water(25:5:4), MeOH 순으로 유출용매를 바꾸며 silica gel column chromatography를 실시하여 7개의 subfraction(KCM1~KCM7)으로 나누고,

BuOH ext. 60 g을 취하여 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-water (20:10:1)의 유출용매로 column chromatography를 실시하여 6개의 subfraction (HCB1~HCB6)으로 나누어, water ext. (KCM 8)과 함께 14개 소분획에 대하여 반응성 산소종 생성증진 검색을 실시하였다. 검색결과에 따르면, KCM1만이 반응성 산소종 생성증가 효과가 현저하였으므로(Figs. 1, 2) KCM1분획을 n-hexane-EtOAc-MeOH(10:10:1)의 유출용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 분리하였다. 분리한 흰색 침전물을 n-hexane, EtOAc, MeOH 순으로 세척하여 흰색 분말상 물질 400 mg을 얻었다.

**화합물 1** - Liebermann-Burchard reaction : positive ; mp 286~288 °C; IR  $\nu$  max(KBr) cm<sup>-1</sup> : 3400(OH), 2930(aliphatic CH), 1700(C=O), 1450, <sup>1</sup>H-NMR(300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 0.68(3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.70(3H, d, J=5.7Hz, CH<sub>3</sub>), 0.75 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 0.91(3H, d, J=6.8 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.92(6H, s, CH<sub>3</sub>), 1.04(3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.10(1H, brd, J=11.2Hz, H-18), 3.26(1H, t-like, H-3), 4.29(1H, brd, OH), 5.13(1H, brs, H-12), <sup>13</sup>C-NMR(75MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 30.2(C-1), 27.5(C-2), 76.8(C-3), 39.1(C-4)<sup>a</sup>, 52.4(C-5), 18.0(C-6), 36.3(C-7)<sup>b</sup>, 38.2(C-8)<sup>a</sup>, 47.0(C-9), 38.3(C-10)<sup>a</sup>, 22.8(C-11), 124.7(C-12), 138.2(C-13), 41.6(C-14), 32.7(C-15), 23.8(C-16), 46.8(C-17), 54.8(C-18), 38.7(C-19)<sup>a</sup>, 38.5(C-20)<sup>a</sup>, 26.9(C-21), 36.5(C-22)<sup>b</sup>, 28.2(C-23), 16.9(C-24), 17.0(C-25), 15.2(C-26), 23.2(C-27), 178.2(C-28), 21.0(C-29), 16.0(C-30).

<sup>a,b</sup> Assignments may be exchanged each other.

## 결과 및 고찰

산수유를 80% methanol로 추출하여 얻은 엑스를 MC와 water로 분획하였을 때 water 분획의 반응성 산소종 생성증진효과는 29시간동안 처리하였을 때 대조군에 비하여 10 ug/ml 처리시 27%의 증가를, 100 ug/ml 처리하였을 때는 54%의 상승을 보였다. 반면, MC 분획에서는 동일농도에서 별 영

양이 없었다. Water 분획을 용매극성에 따라 EtOAc, n-BuOH, water로 소분획한 후 EtOAc 엑스 54 g을 EtOAc, EtOAc-MeOH-water(25:5:

4), MeOH 순으로 유출용매를 바꾸며 silica gel column chromatography를 실시하여 7개의 subfraction(KCM1~KCM7)으로 나누고, BuOH ext. 60 g을 취하여 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-water (20:10:1)의 유출용매로 column chromatography를 실시하여 6개의 subfraction(HCB1~HCB6)으로 나누어, water ext. (KCM8)과 함께 14개 소분획에 대하여 반응성 산소종 생성 증진 검사를 실시한 결과에 따르면, KCM1만이 반응성 산소종 생성증가 효과가 현저하였으며, 반면 KCM3 및 4는 반응성 산소종 억제 효과가 현저하였다(Figs. 1, 2).

반응성 산소종생성이 가장 현저한 KCM1을 정제하여 화합물 1을 얻었다. 정제된 KCM1은 0.1 mg/ml 농도에서는 효과가 인정되었으나, 0.01 mg/ml 농도에서는 대조군에 비하여 큰 효과는 없었다(Fig. 3). 화합물 1은 LB반응에서 양성을 나타내고 IR spectrum에서 OH기와 COOH기를 볼 수 있었으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum의 δ 0.68~1.04 ppm사이에서 5개의 angular methyl signal을 관찰할 수 있었다. 또한 5.13 ppm에서 H-12의 olefinic proton, 3.26ppm에서 H-3 proton이 보여지며,

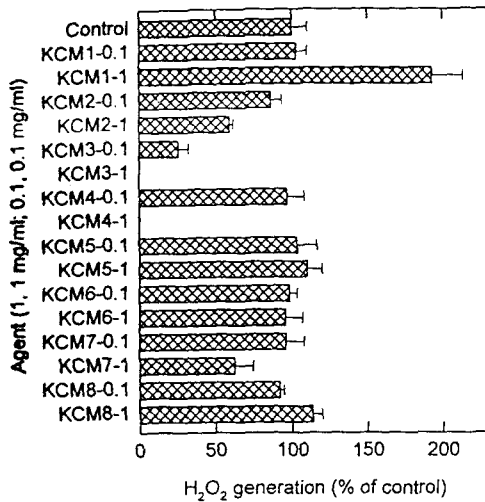


Fig. 1. Effects of KCM from *Cornus officinalis* on hydrogen peroxide generation from murine macrophages. KCM 1-7 were dissolved in dimethylsulfoxide, and added to the J774 cell culture media at concentrations of 1 mg/ml or 0.1 mg/ml. After 24 hours, hydrogen peroxide generation for 2 hours was measured.

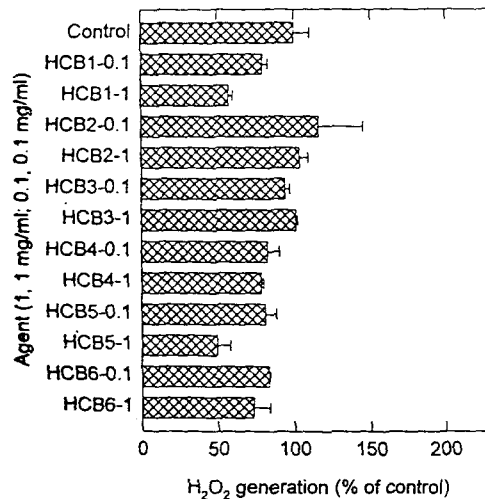


Fig. 2. Effects of HCB from *Cornus officinalis* on hydrogen peroxide generation from murine macrophages. HCB 1-7 were dissolved in dimethylsulfoxide, and added to the J774 cell culture media at concentrations of 1 mg/ml or 0.1 mg/ml. After 24 hours, hydrogen peroxide generation for 2 hours was measured.

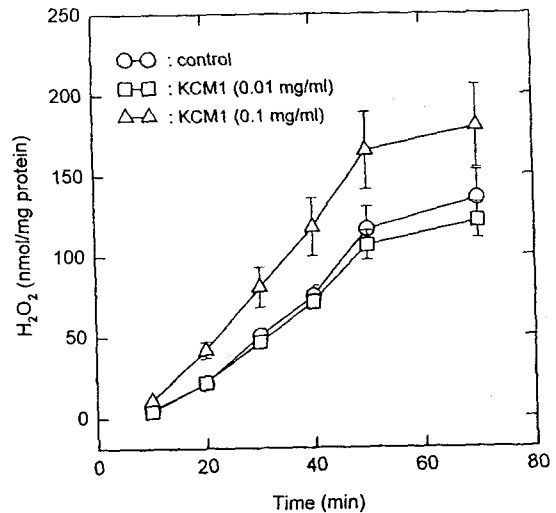


Fig. 3. Effects of purified KCM 1 from *Cornus officinalis* on hydrogen peroxide generation from murine macrophages. KCM 1 was dissolved in dimethylsulfoxide, and added to the J774 cell culture media at concentrations of 0.1mg/ml or 0.01 mg/ml. After 24 hours, hydrogen peroxide generation was measured.

$^{13}\text{C}$ -NMR 에서는 178.2 ppm에서 C-28 C=O group과 124.7, 138.2 ppm에서 C-12, C-13의 이중결합에 의한 chemical shift가 나타나므로 이 합물은 urs-12-ene type의 triterpenoic acid인 ursolic acid임을 알 수 있었으며<sup>11,12)</sup> 이는 표품과의 직접 비교로부터 확인할 수 있었다. 이물질은 산수유로부터 이미 분리된 바가 있으며,<sup>13)</sup> 항당뇨 효과가 연구된 바도 있다.<sup>9)</sup> 또한 *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens* 및 *Hyptis capitata*의 세포독성 주원인물질 로서도 연구된 바가 있다.<sup>14)</sup> Betulinic acid를 비롯한 triterpenoic acid 유도체들에 대한 관심이 항암효과, 항바이러스효과 측면에서 새로이 고조되고 있음을 고려하여 볼 때, 향후 ursolic acid에 대하여서도 계속적인 연구의 가치가 충분히 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 과학기술처의 선도기술 개발과제로 수행되었음.

## 참 고 문 헌

1. Lee, T. B. (1989) Illustrated Flora of Korea. 594. Hyang Moon Sa, Seoul.
2. Namba, T. (1994) The Encyclopedia of Wakan-Yaku (Traditional Sino-Japanese Medicines) with color pictures. Vol. I. 195-196. Hoikusha, Osaka.
3. Lee, S. J. (1966) Korean Folk Medicine. 108-109. Seoul National University Press, Seoul.
4. Okuda, T., Hatano, T., Ogawa, N., Kira, R. and Matsuda, M. (1984) Cornusiin A, A dimeric elagitanin forming four tautomers, and accompanying new tannins in *Cornus officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.* 32: 4662-4665.
5. Hatano, T., Ogawa, N., Kira, R., Yasuhara, T. and Okuda, T. (1989) Tannins of Cornaceous Plants. I. Cornusiins A, B and C, Dimeric, monomeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Cornus officinalis*, and orientation of valoneoyl group in related tannins. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 2083-2090.
6. Lee, S.H., Tanaka, T., Nonaka, G.I. and Nishio-ka, I. (1989) Sedoheptulose digallate from *Cornus officinalis*. *Phytochem.* 28:3469-3472.
7. Endo, T. and Taguchi, H. (1973) Study on the constituents of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. *Yakugaku Zasshi* 93: 30-32.
8. Miyazawa, M. and Kameoka, H. (1989) Volatile flavor components of Corni Fructus (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.). *Agric. Biol. Chem.* 53: 3337-3340.
9. Yamahara, J., Mibu, H., Sawada, T., Fujimura, H., Takino, S., Yoshikawa, M. and Kitagawa, I. (1981) Biologically active principles of crude drugs. Antidiabetic principles of Corni Fructus in experimental diabetes induced by streptozotocin. *Yakugaku Zasshi* 101: 86.
10. De la Harpe, J. and Nathan, C. F. (1985) A semi-automated micro-assay for  $\text{H}_2\text{O}_2$  release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol. Methods* 78: 323.
11. Houghton, P.J. and Lian, L.M. (1986) Triterpenoids from *Desfontainia spinosa*. *Phytochem.* 25: 1939.
12. Kang, S.S. (1987)  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectroscopy of amyrins. *Kor. J. Pharmacogn.* 18: 151-167.
13. Yang, T.H., Liu, S.C., Sn, M.N. (1971). Constituents of the fruits of *Cornus officinalis*. *Tae-Wan Yao Hsueh Tsa Chih* 22: 1.
14. Lee, K.H., Lin, Y.M., Wu, T.S., Zhang, D. C., Yamagishi, T., Hayashi, T., Hall, I.H., Chang, J.J., Wu, R.Y. and Yang, T.H. (1988) The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: Ursolic acid and related derivatives. *Planta Medica* 54: 308-311.

(1996년 3월 27일 접수)