

목단피의 세포독성 물질

주보연* · 김문일* · 최수라* · 명평근* · 성연희** · 송경식*** · 배기환*†

*충남대학교 약학대학, **충북대학교 수의과대학, ***경북대학교 농업생명과학대학

A Cytotoxic Compound from Moutan Cortex Radicis

Bo Yeun Chu*, Wen Yi Jin*, Su La Choi*, Pyung Keun Myung*, Yeon Hee Seong**,
Kyung Sik Song***, and Ki Hwan Bae*†

*College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea.

**College of Veterinary Medicine & Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk Natl. Univ.,
Cheongju 361-763, Korea.

***College of Agriculture & Life Sci., Kyungpook Natl. Univ., Daegu 702-701, Korea.

ABSTRACT : The MeOH extracts from 21 species were tested for their cytotoxicity against SK-MEL-28 melanoma cell line and HaCat normal cell line in 5 g/ml by sulforrhodamine-B (SRB) method. Among them, the MeOH extract from Moutan Cortex Radicis showed the moderate activity with the growth rate of 74.3% in SK-MEL-28 cells and the high activity with the growth rate of 207.8% in HaCat cells. Activity-guided fractionation was performed and five compounds, paeonol (1), benzoylpaeoniflorin (2), benzoic acid (3), 2,5-dihydroxy-4-methoxy-acetophenone (4), paeoniflorin (5) were isolated from hexane and EtOAc fraction. The structures were established by physicochemical and spectrometric methods (mp, UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectram). All compounds were evaluated for their cytotoxicity, compound 4 showed the significant cytotoxic activity with ED₅₀ value of 5.92 µg/ml, but the other compounds no activity. These results suggest that compound 4 is a novel anticancer candidate against SK-MEL-28 melanoma cells.

Key words : Moutan Cortex Radicis, cytotoxic compound, cytotoxicity, SK-MEL-28 melanoma cell, HaCat normal cell, sulforrhodamine-B

서 언

최근 각종 천연자원으로부터 새로운 항암 성분을 탐색하고 이를 이용하여 항암제를 개발하려는 연구가 많이 진행되고 있다. 본 연구실에서도 골무꽃 (Bae *et al.*, 1994), 담배풀 (Lee *et al.*, 2002), 산사나무 (Min *et al.*, 2000), 도독놈의지팡이 (Kim *et al.*, 1997), 노루발 (Bae *et al.*, 1996), 백선 (Jung *et al.*, 2000), 구상나무 (Kim *et al.*, 2001) 등 여러가지 한국 자원식물로부터 세포독성 물질을 분리하여 보고 한 바가 있다. 본 연구에서는 인체 피부

암세포인 SK-MEL-28 세포주에 대하여 5 g/ml의 농도에서 74.3%의 성장률을 보인 목단피를 연구대상으로 선정하였다 (Table 1).

목단피 (Moutan Cortex Radicis)는 목단 (*Paeonia suffruticosa*)의 뿌리껍질로서 한방에서는 解熱, 涼血, 活血, 消癥의 효능이 있고, 구어혈제라 하여 월경불순, 산후의 각종 병, 요통, 타박상 등의 외상성 염증 등 복부 화농성 및 염증성 질환 등에 사용하고 있는 중요한 생약이다 (Bae, 2000; Kwon *et al.*, 1999; Tsuyoshi, 1997; Aizan *et al.*, 1985; Aizan *et al.*, 1984; Kubo *et al.*, 1984; Song &

† Corresponding author: (Phone) +82-42-821-5925 (E-mail) baekh@cnu.ac.kr

Received March 27, 2004 / Accepted April 19, 2004

Wang, 1994). 목단피의 화학성분으로는 paeonol과 그의 배당체인 paeonoside (Asahina & Shirabe, 1915), suffrutiside E (Yoshikawa *et al.*, 1992), apiopaeonoside (Yu *et al.*, 1986) 등이 알려져 있고, monoterpene 배당체로서 paeoniflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin (Kitagawa *et al.*, 1979), 항산화작용이 있는 monoterpene 배당체로서 galloyloxypaeoniflorin과 suffrutiside A, B, C, D가 보고되었으며 (Yoshigawa *et al.*, 1992), gallic acid 역시 항산화작용이 있는 것으로 보고되었다 (Boo & Jeon, 1993).

또한 monoterpene 류로서 paeonisuffrone, paeonisuffral, paeonisothujone, deoxypaeonisuffrone, isopaeonisuffral 이 보고되었다 (Masayukim *et al.*, 1994; Masayukim *et al.*, 1993). 최근의 연구에서 galloylpaeoniflorin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranoside (PGG) 는 oxidative DNA cleavage를 억제하는 효과가 밝혀졌다 (Okubo *et al.*, 2000). PGG는 Na^+ - K^+ ATP-ase를 억제하는 작용도 있다 (Sato *et al.*, 1997). 그리고 paeonol, paeoniflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, benzoyloxypaeoniflorin은 blood platelet aggregation을 억제하고 antifibrinolytic activity를 가진 것으로 알려졌다 (Hirai *et al.*, 1983; Kubo *et al.*, 1982; Kubo *et al.*, 1984; Aizan, 1994; Li *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 1999). Methyl gallate를 포함한 phenol 유도체는 항균작용을 나타내는 것으로 알려졌으며 (Kwon *et al.*, 1999), paeoniflorin과 oxypaeoniflorin은 hyaluronidase 억제효과가 있는 것으로 밝혀졌다 (Jeong *et al.*, 1988). 그리고 주성분중의 하나인 paeonol의 활성에 관한 연구로는 항염증 작용과 충수염 감염균에 대한 항균작용 (Archi *et al.*, 1979) 및 항 돌연변이원성에 관한 연구 (Fukuhara & Yoshida, 1987)가 보고 되었고 쥐에게 paeonol을 주사하면 진정, 최면, 진통 작용이 나타나며 다리에 일으킨 부종을 억제하는 작용이 발견되었으며 (Bae, 2000) 지질과산화 억제작용도 보고 되었다 (Dai *et al.*, 2000). 이밖에도 paeonol은 delayed outward K^+ current (IK) 와 Na^+ current, two Ca^{2+} currents (T and L type)을 억제하고 (Hu & Shi, 1994) rat heart의 ischemia reperfusion damage을 개선시키는 효과가 있으며 (Zhang & Zhang, 1994) rat에서 ischemia reperfusion으로 유도된 arrhythmias을 개선시키는 효과가 있을 뿐만 아니라 이것을 억제함도 밝혀졌다 (Zhang *et al.*, 1997). Paeonol이 human colon tumor cell NAT activity와 AF-DNA adduct formation을 촉진시킨다는 보고가 있는 한편 (Chung, 1999), paeonol과 그의 유도체들이 항암활성이 있다는 보고도 있다 (Pan & Yang, 2000).

본 연구는 목단피의 메탄올 추출물을 silica gel column chromatography를 반복하여 물질을 분리하였고 각종 물리, 화학적 data로 그 구조를 동정하였으며 분리한 물질들의 피부암 세포독성을 조사하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본실험에 사용한 목단피는 회춘당 한약방 (대전 유성)에서 2001년 3월에 국내산을 구입한 것으로 음건, 세절하여 사용하였다. 증거표본 (CNU 753)은 충남대학교 약학대학 생약학 실험실에 보관하였다.

2. 추출 및 분리 방법

건조한 목단피 2 kg을 분말로 세절한 후, 70°C 메탄올로 3회 추출하였다. 여과하여 얻은 추출액은 감압 농축하여 메탄올 엑스 500 g을 얻었다. 이 추출물을 증류수로 현탁하여 hexane, EtOAc, BuOH로 각각 3회 추출 및 감압 농축하여 hexane 분획물 67 g, EtOAc 분획물 140 g, BuOH 분획물 123 g을 얻었다. hexane 분획물 67 g을 hexane : acetone (60 : 1~1 : 1)의 용매 조건으로 silica gel column chromatography를 실시하여 소분획 7개를 얻었다 (Fr. 1-7). Fr. 2에서 얻은 침전을 다시 에탄올로 재결정하여 백색의 침상결정 compound 1 (2100 mg)을 얻었다. Fr. 6을 다시 CHCl_3 : MeOH (10 : 1)로 silica gel column chromatography를 실시하여 얻은 물질을 MeOH로 재결정하여 compound 2 (47 mg)를 얻었다. EtOAc 분획물 140 g도 CHCl_3 : MeOH (60 : 1~1 : 1)의 용매 조건으로 silica gel column chromatography를 실시하여 소분획 7개를 얻었다 (Fr. 1-7). Fr. 1, 4, 6, 7을 각각 CHCl_3 : MeOH (60 : 1, 30 : 1, 10 : 1, 5 : 1)의 용매 조건으로 재차 silica gel column chromatography를 실시하여 compound 3 (4.2 mg), 4 (2.3 mg), 5 (10 mg)을 얻었다.

Paeonol (1)

White needle crystal, mp 48~50°C, IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3400, 2940, 1725, 1625, 1570, 1500, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.55 (3H, s, CH_3), 3.83 (3H, s, OCH_3), 6.40~6.50 (2H, m, H-3, H-5), 7.60 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-6), 12.60 (1H, s, OH), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 114.1 (C-1), 165.2 (C-2), 100.8 (C-3), 166.1 (C-4), 107.6 (C-5), 132.6 (C-6), 202.5 (C=O), 55.4 (OCH_3), 26.1 (CH_3).

Benzoylpaeoniflorin (2)

White powder, UV λ_{max} nm: 230, 267, 274, 281, IR

(KBr) ν_{\max} cm^{-1} : 3425, 2940, 1752, 1605, 1586, 1456, 1280, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5) δ : 1.68 (3H, CH_3), 2.21 (1H, d , $J = 10.8$ Hz, H-7 α), 2.30 (1H, d , $J = 12.6$ Hz, H-3 α), 2.42 (1H, d , $J = 12.0$ Hz, H-3 β), 2.87 (1H, d , $J = 10.4$ Hz, H-7 β), 3.06 (1H, d , $J = 5.2$ Hz, H-5), 4.05, 4.07, 4.10, 4.20 (4H, m, H- CH_2), 4.90 (1H, d , $J = 7.5$ Hz, H-anomeric), 5.90 (1H, s, H-acetal), 7.20~7.60 (3H, m, H-aromatic), 8.00~8.06 (2H, m, H-aromatic), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- d_5) δ : 89.1 (C-1), 86.1 (C-2), 44.9 (C-3), 106.1 (C-4), 44.0 (C-5), 71.9 (C-6), 23.0 (C-7), 61.5 (C-8), 101.8 (C-9), 19.9 (C-10), 100.5 (C-1'), 75.0 (C-2'), 78.4 (C-3'), 71.5 (C-4'), 75.2 (C-5'), 65.3 (C-6'), 130.7 (C-1''), 130.1 (C-2''), 130.0 (C-3''), 133.5 (C-4''), 129.0 (C-5''), 130.0 (C-6''), 166.7 (C-7''), 131.0 (C-1'''), 130.1 (C-2'''), 128.9 (C-3'''), 133.4 (C-4'''), 128.9 (C-5'''), 130.0 (C-6'''), 166.6 (C-7''').

Benzoic acid (3)

White needle crystal, mp 120~122°C, UV λ_{\max} nm: 272, 228, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.45 (2H, m, H-3, H-5), 7.58 (1H, m, H-4), 8.01 (2H, dd , $J = 1.5, 8.7$ Hz, H-2, H-6), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 131.9 (C-1), 130.7 (C-2, C-6), 129.5 (C-3, C-5), 134.0 (C-4), 169.9 (C-7).

2,5-Dihydroxy-4-methoxy-acetophenone (4)

Yellow powder, mp 165~166°C, UV λ_{\max} nm: 348, 278, 240, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.49 (3H, s, CH_3), 3.89 (3H, s, OCH_3), 6.45 (1H, s, H-3), 7.18 (1H, s, H-6), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 116.0 (C-1), 159.8 (C-2), 100.8 (C-3), 157.0 (C-4), 140.2 (C-5), 113.3 (C-6), 204.2 (C-7), 26.9 (C-8), 56.5 (C-9).

Paeoniflorin (5)

White Powder, mp 158~159°C, IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} : 3400, 1604, 1585, 1270, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ : 1.36 (3H, CH_3), 1.80 (1H, d , $J = 11.6$ Hz, H-7 α), 1.95 (1H, d , $J = 10.8$ Hz, H-3 α), 2.19 (1H, d , $J = 12.0$ Hz, H-3 β), 2.48 (1H, d , $J = 10.4$ Hz, H-7 β), 2.73 (1H, d , $J = 5.6$ Hz, H-5), 4.74 (1H, d , $J = 7.5$ Hz, H-anomeric), 5.40 (1H, s, H-acetal), 7.48 (2H, m, H-3'', H-5''), 7.61 (1H, m, H-4''), 8.44 (2H, dd , $J = 1.6, 8.2$ Hz, H-2'', H-6''), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz,

CD_3OD) δ : 89.4 (C-1), 87.3 (C-2), 44.6 (C-3), 106.4 (C-4), 44.0 (C-5), 71.8 (C-6), 23.4 (C-7), 61.7 (C-8), 102.3 (C-9), 19.6 (C-10), 100.2 (C-1'), 75.0 (C-2'), 78.0 (C-3'), 72.3 (C-4'), 78.1 (C-5'), 62.9 (C-6'), 131.2 (C-1''), 130.7 (C-2''), C-6''), 129.7 (C-3''), C-5''), 131.2 (C-4''), 168.0 (C-7'').

3. 암세포 (SK-MEL-28)에 대한 세포독성 실험

실험에 사용한 세포주는 인체 정상 세포주인 HaCat cell 과 인체 피부암세포인 SK-MEL-28 cell로서 한국세포주은행에서 분양 받아 사용하였다. 세포배양액은 멸균 증류수에 L-glutamine이 포함된 RPMI-1640 배지에, NaHCO_3 2 g, penicillin과 streptomycin 100 unit/ml을 넣어 용해시킨후 0.1 N 염산으로 pH 7.2를 조절하고 50°C 수조에서 30분간 가열하여 불활성화시킨 fetal bovine serum (FBS) 100 ml를 넣어 전체를 1 L가 되게 하고 세균여과하여 제조하였으며 4°C에서 보관하여 사용하였다. 세포는 3일에 한번씩 incubator (37°C, 5% CO_2 , 98% humidity)에서 계대하여 유지하였으며 세포를 부착면으로부터 분리하기 위하여 phosphate buffered saline용액에 0.5% trypsin과 2% EDTA를 녹인 용액을 사용하였다. 실험에 사용한 세포의 초기농도는 4×10^4 cells/ml의 농도로 조절하여 96 well plate에 180 μl /well씩 접종하여 사용하였다. 24 시간 배양후 0.2% 이하의 DMSO에 녹인 시료를 넣고 다시 48 시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 10%의 Trichloroacetic acid (TCA) 50 μl 로 한 시간 방치하여 세포를 고정시키고 0.4%의 SRB 50 μl 로 30분간 세포를 염색하였다. 1%의 초산용액으로 세척한후 건조하고 여기에 10 mM Tris 용액 100 μl 를 가해 염료를 녹여 520 nm에서 optical density (O. D.) 값을 측정하였다. 이 방법은 미국 국립암연구소에서 개발한 sulforrhodamine-B (SRB) 법이다 (Dool & Peto, 1981; Doyle *et al.*, 1993).

결과 및 고찰

1. 생약 추출물의 정상세포와 암세포에 대한 세포독성

21종의 생약 추출물을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 정상세포 (HaCat cell)와 암세포 (SK-MEL-28)에 대한 세포독성을 screening한 결과는 Table 1과 같다. 그중 뽕단지, 마가목, 목단피, 영경귀, 이고들빼기, 쪽동백 등의 추출물은 암세포에 대한 growth rate 값이 74.3%~92.1%로서 가장 좋은 억제 효과를 보였고 개대황, 마타리, 생강나무, 영경귀, 팔손이나무 등의 추출물은 중간 정도의 억제 효과 (108.9%~176.6%)를 보였으며 기타 생약들은 억제 효과가 없었다. 또한 정상세포에서는 뽕단지, 마타리, 생강나

Table 1. Cell growth rate of plant extracts on HaCat cell line and SK-MEL-28 cell line.

No.	Korean names	Scientific names	Using parts	HaCat cell (%)	SK-MEL-28 cell (%)
1	개대황	<i>Rumex longifolius</i>	뿌리	289.3	176.6
2	관중	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	뿌리줄기	331.4	268.2
3	나도하수오	<i>Pleuropterus cillinervis</i>	뿌리	266.4	243.2
4	노루발	<i>Pyrola japonica</i>	전초	265.4	201.8
5	똥판지	<i>Helianthus tuberosus</i>	지상부	6.5	90.9
6	마가목	<i>Surbus commixta</i>	줄기, 껍질	120.3	90.3
7	마타리	<i>Patrinia scabiosaefolia</i>	뿌리	76.0	112.8
8	박새	<i>Veratrum patulum</i>	뿌리	188.3	205.2
9	목단	<i>Paeonia suffruticosa</i>	뿌리껍질	207.8	74.3
10	비수리	<i>Lespedeza cuneata</i>	전초	294.3	223.5
11	사철나무	<i>Euonymus japonica</i>	열매	268.3	246.8
12	사철쑥	<i>Artemisia capillaries</i>	전초	206.5	228.0
13	생강나무	<i>Lindera obtusiloba</i>	잎, 줄기	48.8	108.9
14	생이가래	<i>Salvinia natans</i>	전초	48.2	214.6
15	솔장다리	<i>Salsola natans</i>	전초	426.4	240.0
16	애기똥풀	<i>Chelidonium majus</i>	지상부	192.2	249.3
17	양지꽃	<i>Potentilla fragarioides</i>	전초	239.6	205.4
18	영경귀	<i>Crisium japonicum</i>	지상부	112.4	92.1
19	이고들빼기	<i>Youngia denticulate</i>	전초	32.3	78.0
20	쪽동백	<i>Styrax obassia</i>	잎, 줄기	202.9	78.6
21	팔손이나무	<i>Fatsia japonica</i>	가지	301.5	120.7

무, 생이가래, 이고들빼기 등의 추출물은 세포독성을 나타내었으나 (6.5%~76.0%) 기타 생약들은 세포독성을 나타내지 않았다. 그중 목단피추출물은 암세포에 대해 가장 좋은 억제효과 (74.3%)를 보이는 한편, 정상세포에는 거의 독성 (207.8%)을 나타내지 않았다. 이 사실은 독성이 작은 목단피를 안심하고 부인병에 많이 사용해 왔다는 사실과도 일치되고 또 암세포에 좋은 억제 효과를 보였다는 것은 새로운 세포독성 물질을 찾는 데도 중요한 의의가 있을 것으로 생각된다.

2. 분리한 물질의 구조 분석

Compound 1은 백색의 침상결정으로서 melting point는 48~50°C이고 FeCl₃ 반응에서 양성을 나타내었다. IR spectrum에서는 O-H (3400), C-H (2940), C=O (1725), C=C (1625) 등 function group를 관찰할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum에서는 δ 7.60 ppm에서 ortho coupling하는 하나의 proton, δ 2.55 ppm에서 methyl기에 해당하는 proton, δ 3.83 ppm에서 methoxyl에 해당하는 proton이 관찰되었다. 그리고 ¹³C-NMR spectrum에서는 δ 202.5 ppm에서 carbonyl에 해당하는 peak, δ

165.2 ppm과 δ 166.1 ppm에서 산소와 결합한 benzene ring의 carbon, δ 55.4 ppm에서 methoxyl에 해당되는 carbone, δ 26.1 ppm에서 methyl기에 해당하는 carbon이 각각 관찰되었다. 이상의 data와 문헌의 data가 일치하였으므로 (Kwon *et al.*, 1999) compound 1을 paeonol로 동정하였다. compound 2은 melting point가 48~50°C인 백색의 분말로서 IR spectrum에서 O-H (3425), C-H (2940), C=O (1752), C=C (1605) 등 function group를 관찰할 수 있었다. ¹H-NMR spectrum에서는 δ 1.68 ppm에서 methyl기, δ 4.90 ppm에서 anomeric proton, δ 5.90 ppm에서 acetal proton을 확인할 수 있었다. δ 4.05, 4.07, 4.10, 4.20 ppm에서 두개의 aromatic proton이 겹침을 볼 수 있었고 δ 7.20~7.60 ppm과 δ 8.00~8.06 ppm에서 두개의 benzoyl 기를 관찰할 수 있었다. δ 2.21 ppm과 δ 2.87 ppm에서 coupling constant가 각각 10.8 Hz와 10.4 Hz인 CH₂에 기인하는 두개의 proton, δ 2.30 ppm과 δ 2.42 ppm에서도 coupling constant가 12.6 Hz와 12.0 Hz이므로 CH₂에 기인하는 두개의 proton이 각각 관찰되었고 δ 3.06 ppm에서 한 개의 doublet peak를 관찰할 수 있었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 δ 166.6 ppm

과 δ 166.7 ppm에서 두개의 carbonyl에 해당하는 peak, δ 19.9 ppm에서 methyl기, δ 100.5 ppm에서 anomeric carbon과 6개의 monosaccharide에 해당하는 peak들을 관찰할 수 있었다. 그리고 δ 128.9~133.5 ppm에서 12개의 aromatic peak 들이 관찰되었다. 이상의 data와 기존 문헌data가 일치하였으므로 (Kitagawa *et al.*, 1979) compound 2를 benzoylpaeoniflorin으로 동정하였다. Compound 3은 많이 알려져 있는 물질로서 표준품과의 TLC의 비교와 각종 data의 문헌치 (Kwon *et al.*, 1999)와의 비교로서 benzoic acid로 동정하였다. Compound 4는 노란색 가루로서 FeCl_3 test에서 양성 반응을 보였고 ^1H 과 ^{13}C -NMR data는 Compound 1과 비슷한 양상을 보였다. ^1H -NMR spectrum에서 δ 6.45 ppm과 7.18 ppm의 singlet peak로부터 para 위치에 두개의 proton이 존재함을 알 수 있었고 ^{13}C -NMR spectrum δ 159.8, 157.0, 140.2 ppm에서 3개의 산소와 결합한 benzene ring의 carbon을 관찰할 수 있었다. 이것들은 기존 문헌의 data (Kwon *et al.*, 1999)와 잘 일치하였으므로 Compound 4를 2,5-dihydroxy-4-methoxy-acetophenone으로 동정하였다. Compound 5은 백색의 가루로서 또한 compound 2과 비슷한 NMR 양상을 보였다. ^1H 과 ^{13}C -NMR data로부터 하나의 benzoic acid가 떨어져 나간 것을 알 수가 있어 문헌치와 비교하여 (Kwon *et al.*, 1999; Kitagawa *et al.*, 1979) 잘 일치되므로 Compound 5는 paeoniflorin으로 동정하였다. Compound 1~5의 구조는 Fig. 1과 같다.

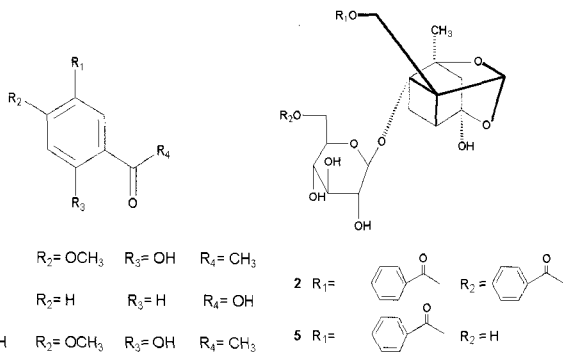


Fig. 1. Structure of compounds 1-5 from Moutan Cortex Radicis.

3. 암세포에 대한 세포독성

각 분획과 화합물들의 SK-MEL-28 cell에 대한 세포독성을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 시료를 처리한후 48시간 후의 음성 대조군에 대한 상대적인 저해율 (growth rate)을 5단계 (-: <20%, +: 20~40%, ++: 40~60%, +++: 60~80%, ++++: > 80%)로 나누어 표기하였다.

실험에 사용한 화합물의 농도는 10 $\mu\text{g/ml}$ 이고 EtOAc 분획에서 분리한 compound 4가 80%이상의 저해율을 보였으므로 다시 희석하여 농도별 (10, 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{g/ml}$) 실험을 진행하였다. 그 결과 ED_{50} 값은 5.92 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다 (Table 2). 그러므로 EtOAc 분획의 SK-MEL-28 cell에 대하여 세포독성을 나타내는 주성분은 compound 4로 확인할 수 있었다. Hexane 분획도 약한 활성을 보였지만 분리한 물질들은 활성이 없었다. 이것은 분리하지 못한 미량의 물질들의 복합작용일 것으로 추정된다. 목단피로부터 기타 물질의 분리와 분리한 물질들의 여러가지 암 세포들에 대한 세포독성 연구는 진행중에 있다.

Table 2. Cytotoxicity of compounds 1~5 from Moutan Cortex Radicis.

Samples [†]	Inhibition rate (%)	ED_{50} [‡] ($\mu\text{g/ml}$)
MeOH ex.	+++	
Hexane fr.	++	
EtOAc fr.	+++	
BuOH fr.	+	
H ₂ O fr.	-	
Compound 1	-	
Compound 2	-	
Compound 3	-	
Compound 4	++++	5.92
Compound 5	-	

[†]The samples were from Moutan Cortex Radicis.

[‡] ED_{50} value was the 50% inhibition concentration and calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

적 요

21종의 생약 추출물을 선정하여 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 SK-MEL-28 cell에 대한 세포독성을 조사한 결과 목단피의 메탄올 추출물이 74.3%의 성장율을 보였다. 활성 물질을 찾기 위하여 목단피로부터 silica gel column chromatography를 실시하여 hexane 분획과 EtOAc 분획에서 총 5개의 화합물을 분리하였고 mp, UV, IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR 등 각종 물리, 화학적 data로부터 그 구조를 paeonol (1), benzoylpaeoniflorin (2), benzoic acid (3), 2,5-dihydroxy-4-methoxyacetophenone (4), paeoniflorin (5)으로 동정하였다. 분리한 물질을 human 피부 암세포인 SK-MEL-28 세포주에 대하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 SRB방법으로 세포독성을 측정된 결과 compound 4가 ED_{50} 값이 5.92 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 좋은 세포독

성을 나타내었다. 이결과는 compound 4가 SK-MEL-28 melanoma 세포주에 대한 새로운 항암 후보 물질임을 제시한다.

사 사

본 연구는 BioGreen 21 Program (2004), Rural Development Administration, Republic of Korea의 지원에 의해 이루어 졌다.

LITERATURE CITED

- Aizan H (1994) Study on the mechanisms of antiplatelet and antiatherosclerotic effects of Sino - Japanese traditional medicines: focusing arachidonic acid cascade. *Wakan Iyakugaku Zasshi* 11:16-28.
- Aizan H, Yasushi T, Hisashi Y (1985) Mechanism of antithrombotic and anti-inflammatory actions of Moutan Cortex. Studies on arachidonic acid cascade. *Wakan Iyaku Gakkaishi* 2:63-65.
- Aizan H, Yasushi T, Sho Y (1984) Moutan Cortex and prostaglandin metabolism. *Gendai Toyo Igaku* 5:62-68.
- Archi S, Kubo M, Matsuda H, Tani T, Tsunagn K, Yoshiwaka M, Kitaga I (1979) Study on Moutan Cortex (III), on antiinflammatory activities. *Shoyakugugaku Zasshi* 33:178-184.
- Asahina Y, Shirabe G (1915) Synthesis of peonolglucoside. *Yakugaku Zasshi* 35:1293.
- Bae, K (2000) *The Medicinal Plants of Korea*, Kyo-Hak Publishing Co., Seoul, p. 170.
- Bae K, Kim HM, Lee SM (1996) Isolation and evaluation of an antitumor constituent from *Pyrolae Herba*. *Yakhak Hoechi* 40:225-229.
- Bae K, Min BS, Park KL, Ahn BZ (1994) Cytotoxic flavonoids from *Scutellaria indica*. *Planta Med*, 60:280-281.
- Boo YC, Jeon CO (1993) Antioxidants of green tea leaves and Moutan Cortex. *Han'guk Nonghwa Hakhoechi* 36:326-331.
- Chung JG (1999) Paeonol promotion of DNA adduct formation and arylamines N-acetyltransferase activity in human colon tumor cells. *Food Chem. Toxicol.* 37:327-334.
- Dai M, Liu Q, Gu C, Zhang H (2000) Inhibitory effect of paeonol on lipid peroxidation reaction and oxidation decoration of low density lipoprotein. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 25:625-627.
- Dai M, Zhi X, Peng D, Liu Q (1999) Inhibitory effect of paeonol on experimental atherosclerosis in quail. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 24:488-490.
- Dool R, Peto R (1981) The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66:1192.
- Doyle A, Griffiths JB, Newell DG (1993) *Cell & Tissue culture: Laboratory procedures*. Wiley.
- Fukuhara Y, Yoshida D (1987) Paeonol; A bio-antimutagen isolated from a crude drug, Moutan Cortex. *Agric. Chem. Biol. Chem.* 51:1441-1446.
- Hirai A, Teranto T, Hamazaki T, Sajiki J, Saito H, Tahara K, Tamura Y, Kumagai A (1983) Studies on the mechanism of antiaggregatory effect of Moutan Cortex. *Thromb. Res.* 31:29-40.
- Hu Q, Shi Y L (1994) Inhibition of voltage-gated K⁺, Na⁺ and Ca²⁺ currents in neuroblastoma X glioma hybrid cells by paeonol. *Sheng Li Hsueh Pao* 46:575-580.
- Jeong SJ, Ahn NH, Kim YC (1988) Hyaluronidase inhibitors from Moutan Cortex Radicis. *Saengyak Hakhoechi* 29:44-47.
- Jung HJ, Sok DE, Kim YH, Min BS, Lee JP, Bae K (2000) Potentiating effect of obacunone from *Dictamnus dasycarpus* on cytotoxicity of microtubule inhibitors, vincristine, vinblastine and taxol. *Planta Med.* 66:74-76.
- Kim HJ, Le QK, Lee MH, Tae S, Lee HK, Kim YH, Bae K, Lee IS (2001) A cytotoxic secocycloartenoid from *Abies koreana*. *Arch. Pharm. Res.* 24:527-531.
- Kim YH, Min BS, Bae K (1997) A cytotoxic constituent from *Sophora flavescens*. *Arch. Pharm. Res.* 20:342-345.
- Kitagawa I, Yoshikawa M, Tsunaga K, Tani T (1979) Studies on Moutan cortex. II. On the chemical constituents. *Shoyakugaku Zasshi* 33:171.
- Kubo M, Matsuda H, Izumi S, Tani T, Arichi S, Yoshikawa M, Kitagaw I (1982) Studies on Moutan Cortex (VI) Inhibitory effects on the intravascular coagulation. *Shotakugaku Zasshi* 36:70-77.
- Kubo M, Matsuda H, Tani T, Arichi S, Kitagaw I (1984) Studies on Moutan Cortex (VII) Inhibitory effects on histamin release from rat peritoneal mast cells *in vitro*. *Shoyakugaku Zasshi* 38:276-278.
- Kwon OG, Kim SH, Chun BY, Park CK, Son KH (1999) Isolation of antimicrobial components from Moutan Cortex. *Korean J. Pharmacogn.* 30:340-344.
- Lee JS, Min BS, Lee SM, Na MK, Kwon BM, Lee CO, Kim YH, Bae K (2002) Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Carpesium abrotanoides*. *Planta Med.* 68:745-747.
- Li W, Wang Y, Cai S, Zhang H, Shi H, Hung F, Cao X (2000) Effects of paeonol in comparison with those of aspirin on the rheological parameters of blood in rats. *Zhongcaoyao* 31:29-31.
- Masayukim Y, Emiko H, Atsuhiko K, Johji Y, Nobutoshi M, Isao K (1993) Absolute stereostructures of paeonisuffrone and paeonisuffral, two new labile monoterpenes, from Chinese Moutan Cortex. *Chem. Pharm. Bull.* 41:630-632.
- Masayukim Y, Emiko H, Toshie M, Osamu M, Johji Y, Nobutoshi M, Isao K (1994) Absolute stereostructures of paeonisothujone, a novel skeletal monoterpene ketone, and deoxypaeonisuffron, and isopaeonisuffral, two new monoterpenes, from Moutan Cortex. *Chem. Pharm. Bull.* 42:736-738.
- Min BS, Kim YH, Lee SM, Jung HJ, Lee JS, Na M, Lee CO, Lee JP, Bae K (2000) Cytotoxic triperpenes from *Crataegus pinnatifida*. *Arch. Pharm. Res.* 23:155-158.
- Okubo T, Nagai F, Seto T, Satoh K, Ushiyama K, Kano I (2000)

- The inhibition of phenylhydroquinone-induced oxidative DNA cleavage by constituents of Moutan Cortex and *Paeoniae Radix*. *Biol. Pharm. Bull.* 23:199-203.
- Pan X, Yang LX** (2000) Synthesis of five new paeonol derivatives with potential applications. Book of Abstracts, 219th ACS National Meeting, San Francisco, CA, March 26-30.
- Satoh K, Nagai F, Ushiyama K, Yasuda I, Seto T, Kano I** (1997) Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose, a major constituent of both Moutan Cortex and *Paeoniae Radix*. *Biochemical Pharmacology* 53:611-614.
- Song TS, Wang BL** (1994) Natural anti-acne creams. *Riyong Huaxue Gongye* 6:283-285.
- Tsuyoshi O** (1997) Pharmacognostic composition for the treatment of atopic dermatitis. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*. p. 7.
- Yoshikawa M, Uchida E, Kawaguchi A, Kitagawa I, Yamahara J** (1992) Galloyl-oxypaeoniflorin, suffruticoside, A, B, C and D, five new antioxidative glucosides and suffruticoside E, a paeonol glycoside, from Chinese Moutan Cortex. *Chem. Pharm. Bull.* 40:2248-2250.
- Yu J, Lang HY, Xiao PG** (1986) A new compound, apiopaeonoside, solated from the root of *Paeonia suffruticosa*. *Acta Pharmaceutica Sinica* 21:191-197.
- Zhang G, Yu Z, Zaho H** (1997) Inhibition of paeonol on arrhythmias induced by ischemia-reperfusion in rats. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 28:225-227.
- Zhang WG, Zhang ZS** (1994) Anti-ischemia reperfusion damage and antilipid peroxidation effects of paeonol in rat heart. *Yao Hsueh Hsueh Pao* 29:145-148.