

석이로부터 분리한 페놀성 화합물의 phospholipase A₂ 저해활성

김진우 · 송경식 · 유익동* · 장현욱¹ · 유승현² · 배강규³ · 민태진³

한국과학기술연구원 생명공학연구소, ¹영남대학교 약학대학,

²충남대학교 농생물학과, ³동국대학교 화학과

Two Phenolic Compounds Isolated from *Umbilicaria esculenta* as Phospholipase A₂ Inhibitors

Jin-Woo Kim, Kyung-Sik Song, Ick-Dong Yoo*, Hyeun-Wook Chang¹,

Seung-Hun Yu², Kang-Gyu Bae³ and Tae-Jin Min³

Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology,

KIST, P.O. Box 115, Taejeon, 305-600 Korea

¹College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

²Department of Agricultural Biology, Chungnam National University,
Taejeon, 305-764, Korea

³Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

ABSTRACT: Two depsides, medicinal herb products isolated from the methanol extract of *Umbilicaria esculenta*, inhibited human synovial fluid Phospholipase A₂ (PLA₂) (IC₅₀ of 0.22 and 0.26 mM, respectively). In the course of screening for antiinflammatory compounds from natural products, we successfully isolated two depsides PLA₂ inhibitory compounds, Orcinol and methyl orsellinic acid. The compounds were identified as orcinol and methyl orsellinic acid on the basis of various NMR studies including ¹H, ¹³C and DEPT experiments.

KEYWORDS: Methyl orsellinic acid, Orcinol, Phospholipase A₂ (PLA₂), *Umbilicaria esculenta*, lichen

지의류(lichens)는 균류(mycobiont)와 조류(photobiont)의 공생체로 전세계적으로 400속 2만 종이상이 존재하는 것으로 알려져 있으며(山田常雄 등, 1983) 약 550종 이상의 생리활성물질이 보고되었다(Bates *et al*, 1992). 특히 지의류는 다른 식물체에서 발견되지 않는 lichenic acid 등 독특한 2차 대사산물을 생산하기도 하며 그밖에 evermic acid, usnic acid, atranorin, vulpinic acid 등 식물 성장 저해물질, protolichesterinic acid와 nephrosterinic acid 등 세포 분열 억제물질 등이 보고되었다. 또한 lecanoric acid는 histidine-decarboxylase 저해물질로, vulpinic acid는 항염증물질로, parietin, emodin은 그람 양성세균에 대한 항균활성물질로 알려져 있다(Hawksorth *et al*, 1984).

한편 Phospholipase A₂(PLA₂ EC 3.1.1.4)는 세포막의 주요성분인 인지질의 sn-2 위치의 acyl ester 결합을 가수분해하는 효소이다(Dennis, 1983). PLA₂는 저분자의 효소(세포외형, 14 KDa)와 고분자(세포질형 PLA₂, 85 KDa)의 효소가 알려져 있다. 저분자의 효소는 그들의 일차아미노산 배열에 따라 group I PLA₂와 group II PLA₂로 분류되며, 특히 group II PLA₂는 혈소판, 호중구, 상피세포, 연골세포등과 같은 염증성 세포들에 분포하며, 또한 류마티스성 관절염환자의 관절액, 결핵환자의 흉막액등과 같은 염증조직에서 높은 활성이 보고되어 염증과 관련된 질병에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(Baek *et al*, 1991; Tanaka *et al*, 1993, Vadas *et al*, 1986; Mitsuhashi, 1992).

본 연구는 항염증 치료제의 개발을 목표로 천연

*Corresponding author

물로부터 염증성 효소인 group II PLA₂를 효소원으로 하여 저해물질을 탐색하던 중 지의류의 일종인 석이(*Umbilicaria esculenta*)로부터 폐놀성 화합물의 PLA₂ 저해물질을 분리 동정하였기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

실험 재료

실험 재료는 1993년 8월 강원도 오대산 해발 700 m 이상의 암반지대에서 수집하고 Yoshimura의 방법(Yoshimura, 1987)에 의하여 석이(石耳; *Umbilicaria esculenta*)로 동정한 후 실험재료로 사용하였다.

활성물질의 추출 정제

공시재료를 세절 건조한 후 추출 정제에 제공하였다. 즉 건조중량 100 g의 공시재료를 메탄올로 추출한 후 에칠아세테이트로 재차 추출하고 silica gel column chromatography, 클로로포름 추출 및 preparative TLC등을 거쳐 순수한 화합물로 정제하였다.

활성물질의 물리화학적 특성

정제된 물질의 특성을 조사하기 위하여 ninhydrin, dragendorff's reagent, vanillin, I₂ vapor, 10% sulfuric acid, phosphorimolybdic acid 등의 발색 반응을 조사하였다. 또한, 분리된 물질의 순도 검정 및 R_f 값의 조사는 CHCl₃-MeOH(20:1), hexane-EtOAc(2:1) 조건에서 silica gel TLC를 실시하였다. 이때 발색시약으로는 10% sulfuric acid 및 ferric chloride를 사용하였다. UV spectrum은 정제물질을 100% MeOH에 6.29×10⁻⁶ M의 농도로 녹인 다음 Shimadzu UV-260 spectrophotometer를 이용하여 400 nm에서 190 nm까지의 UV spectrum을 측정하였다.

Phospholipase A₂ 저해활성

효소는 류마티스성 관절염 환자의 관절액에서 Hara등(Hara *et al.*, 1991)의 방법으로 정제한 효소를 사용하였으며, 기질인 1-acyl-2-[1-¹⁴C]

linoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanol-amine은 Arai등(Arai *et al.*, 1985)등의 방법으로 조제하여 egg yolk PE로 희석하여 1000 cpm/n mole로 제조하여 사용하였다. 효소활성 측정은 100 mM Tris-HCl(pH 9.0), 6 mM CaCl₂, 10 nmole의 기질 및 20 ng의 PLA₂를 함유한 전체용적 200 μl의 반응용액을 37°C 항온수조에서 진탕하면서 20분 동안 반응시킨 후 생성된 유리지방산을 Dole의 방법(Dole *et al.*, 1960)으로 추출하였다. 즉 반응액에 Dole's 용액을 넣어 반응을 정지시킨 다음 *n*-헵탄과 증류수를 가하여 혼합한 후 원심분리하여 *n*-헵탄층을 분리하였다. 여기에 적당량의 silica gel을 넣어 미반응 기질을 흡착시킨 후 *n*-헵탄층을 취하고 Liquid scintillation counter로 유리된 [¹⁴C] 지방산의 양을 측정하였다. 저해활성은 기질만 처리한 대조군에서 유리되는 방사능 표식 유리지방산의 양을 100%로 했을 때, 동일한 조건에서 검체를 처리한 후 유리되는 방사능 표식 지방산의 양을 측정하여 백분율로 나타내었다.

기기분석

NMR용 DMSO-*d*₆ 0.6 ml에 정제된 물질을 녹인 다음 pasteur pipette을 이용하여 filtering 하면서 NMR tube에 넣고 표준물질로 TMS

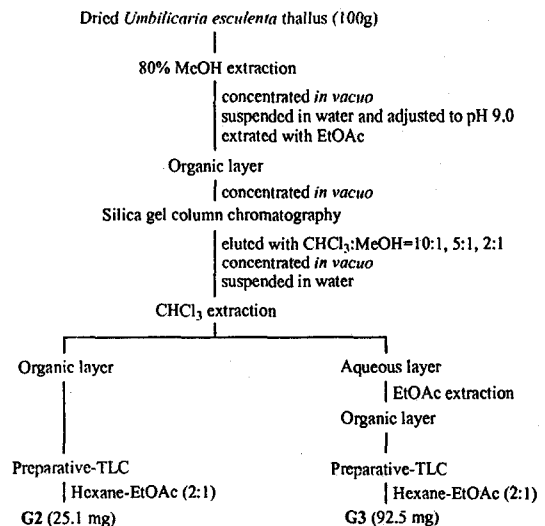


Fig. 1. Purification procedure of compounds G2 and G3.

(tetramethylsilane)를 극미량 첨가하였다. Varian UNITY 300(300 MHz)을 이용하여 NMR spectrum을 조사하였다. EI-MS 측정은 Hewlett Packard사의 HP5989A EI-MS system으로 측정하였으며 HPLC는 Tosho사의 CCPM 펌프와 8010-UV detector를 사용하였다.

결과 및 고찰

활성물질의 분리 및 정제

활성물질 G2, G3 화합물의 분리, 정제 과정을 Fig. 1에 나타내었다. 풍건한 100 g의 시료를 세절하여 80% 메탄올 1l에 침적하고 초음파처리하면서 6시간 추출 여과하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻은 메탄올 추출물을 감압농축하여 메탄올을 제거한 후 물을 가하고, pH를 9.0으로 조절한 후 에틸아세테이트로 재차 추출하였다. 용매층을 Na₂SO₄로 탈수한 후 감압농축하여 1.7 g의 조활성 분획을 얻었다. 클로로포름, 메탄올을 용매로 하여 silica gel column chromatography(3.5×50 cm)를 실시하였고, 활성분획을 모아 감압농축 한 후 물에 현탁하

고 클로로포름으로 추출하여 용매층과 물층으로 나누었다. 용매층은 농축 후 preparative TLC(헥산:에틸아세테이트=2:1)를 실시하여 Rf치 0.46에서 단일 밴드를 보이는 순수한 물질 25.1 mg을 얻은 후 G2 화합물이라 명명하였다. 한편, 물층은 다시 에틸아세테이트로 추출하고 에틸아세테이트층을 농축 후 헥산, 에틸아세테이트 2:1의 조건에서 preparative TLC를 실시하여 Rf치 0.12에서 단일 밴드를 보이는 순수한 물질 92.5 mg을 얻은 후 G3 화합물로 명명하였다.

활성물질의 물리화학적 특성 및 구조분석

G2 화합물의 융점은 106~108°C이었으며, 메탄올을 용매로 하여 UV 스펙트럼을 조사한 결과 274, 223 nm에서 흡수극대피크를 나타내었다. TLC상에서의 다양한 발색시약에 대한 반응성을 조사한 결과 vanillin, I₂ vapor, sulfuric acid, 4-dimethylaminocinnamaldehyde 및 ferric chloride에는 양성이었으나, ninhydrin, Dragendorff's reagent, bromocresol green에는 음성으로 나타나 본 활성물질이 페놀성 구조를 지녔음을

Table 1. Physico-chemical properties of compounds G2 and G3.

	G2	G3
Appearance	red	pale yellow
Molecular weight	124	182
Molecular formula	C ₇ H ₆ O ₂	C ₉ H ₁₀ O ₄
Melting point (°C)	106~108	137~139
UV (nm) λ _{Max} ^{MeOH}	274, 223	301, 264, 229
TLC ^a Rf		
CHCl ₃ -MeOH (20:1)	0.51	0.32
Hexane-EtOAc (2:1)	0.46	0.12
TLC color reactions		
vanillin	+	+
I ₂ vapor	+	+
sulfuric acid	+	+
ferric chloride	+	+
4-dimethylaminocinnamaldehyde	+	+
bromocresol green	-	-
ninhydrin	-	-
Dragendorff's reagent	-	-
	25.9 ^b	17.4 ^c

^aSilica gel TLC plate 60 F₂₅₄ (Merck)

^bSenshu pak, ODS-H-2251, (6×250) 50%MeOH, 1.2 ml/min, UV210 nm

^cSenshu pak, ODS-H-2251, (6×250) 30%MeOH, 1.0 ml/min, UV210 nm

추측할 수 있었다(Table 1).

EI-MS 측정 결과 분자량이 124(M⁺)로 결정되었고, 구조분석을 위하여 G2 화합물 23.8 mg을 DMSO-d₆ 0.6 ml에 용해시킨 후 ¹H 및 ¹³C-NMR을 측정하였다. 그 결과 ¹H-NMR에서는 2.10 ppm에서 methyl proton으로 보이는 signal이, 6.01 ppm에서 방향족 methine proton으로 보이

Table 2. ¹³C and ¹H NMR spectral data of compound G2 in DMSO-d₆. (300 MHz)

Position	δ _c		δ _H
1	158.2	C	
1-OH			9.08
2	99.6	CH	6.01
3	158.2	C	
3-OH			9.08
4	106.9	CH	6.01
5	139.0	C	
5-CH ₃	21.1	CH ₃	2.10
6	106.9	CH	6.01

Table 3. ¹³C and ¹H NMR spectral data of compound G3 in DMSO-d₆. (300 MHz)

Position	δ _c		δ _H
1	140.9	C	
1-COOCH ₃	170.4	COO	
	51.6	CH ₃	3.81
2	161.7	C	
2-OH			
3	110.5	CH	6.18
4	161.5	C	
4-OH			
5	100.5	CH	6.18
6	106.8	C	
6-CH ₃	22.2	CH ₃	2.30

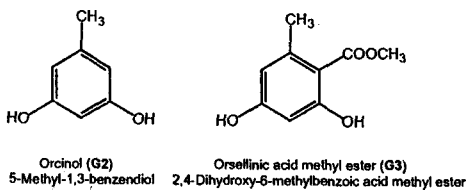


Fig. 2. Structures of compounds G2 and G3.

는 signal들이 관측되었으며, 또한 9.08 ppm에서 -OH 혹은 -NH에서 유래하는 exchangeable proton들이 관측되었다.

¹³C-NMR 스펙트럼을 측정한 결과 총 5개의 signal들이 관측되었다. 그 중 21.1 ppm은 methyl 탄소로, 99.6, 106.9 ppm은 methine 탄소로, 139.0, 158.2 ppm은 sp² 4급 탄소임을 예상할 수 있었으며, 158.2 ppm의 탄소는 chemical shift가 저자장한 것으로 보아 산소와 결합하고 있음을 알 수 있었다. 분자량에 비하여 탄소수가 적어 본 화합물이 symmetrical dimer를 이루고 있음을 추측할 수 있었다(Table 2).

이상의 결과들을 근거로 MS library 및 Aldrich Co.의 ¹H-, ¹³C-NMR spectra library (Pouchert *et al.*, 1993) 와 비교 검토한 결과 페놀성 화합물인 orcinol(5-methyl-1,3-benzendiol) 과 NMR spectrum 및 분자량이 일치함을 알 수 있었고 따라서 G2 화합물을 orcinol로 동정하였다.

G3 화합물의 자외선 흡수 스펙트럼을 측정한 결과 301, 264, 229 nm에서 최대 흡수 피크를 나타내었고, 융점은 137~139°C였다. TLC상에서의 발색반응을 조사한 결과 vanillin, I₂ vapor, sulfuric acid, 및 ferric chloride에는 양성이었으나,

Table 4. Inhibitory effect of Orcinol and Methyl orsellinic acid on phospholipase A₂ activity

Conc. (μg/ml)	G2 (Orcinol)	G3 (Methyl orsellinic acid)
0.5	9.5*	10.7
1.0	14.1	16.7
5.0	30.9	18.9
10.0	34.8	25.6
50.0	71.2	51.2
100.0	86.8	64.8
IC ₅₀ (mM)	0.22	0.26

*inhibition rate (%)

Concentration-dependent inactivation of human synovial fluid PLA₂ by Orcinol and Methyl orsellinic acid. PLA₂ (20 ng) was incubated for 20 min. at 37°C in 100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 6 mM CaCl₂, 20 nmole substrate in the presence of inhibitors. Each value is the mean of duplicate determinations.

ninhydrin, 4-dimethylaminocinnamaldehyde, Dragendorff's reagent에는 음성으로 나타나 상기 G2 화합물과 동일한 페놀성 화합물일 것으로 추정되었다.

G3 화합물의 분자량은 EI-MS 측정에 의하여 182로 추정되었으며 구조 해석은 NMR 스펙트럼 분석에 의해서 수행되었다. G3 화합물 61 mg을 DMSO-*d*₆ 0.6 ml에 녹인 후 ¹H 및 ¹³C-NMR 스펙트럼을 조사하였다. ¹H-NMR 측정 결과 2.30 ppm에서 methyl proton, 3.81 ppm에서 methoxy proton이 관찰되었다. 6.18 ppm에서 meta-coupling한 2개의 방향족 methine proton signal이 관찰되었다.

¹³C-NMR에서는 모두 9개의 carbon signal이 관측되었으며, DEPT 스펙트럼 분석 결과 22.2 ppm에서 methyl 탄소, 51.6 ppm에서 methoxy 탄소, 100.5, 110.5 ppm에서 *sp*² methine 탄소, 106.8, 140.9¹ ppm에서 *sp*² 4급 탄소, 161.5, 161.7¹ ppm에서 산소와 결합한 *sp*² 4급 탄소, 170.4¹ ppm에서 ester group의 carbonyl 탄소가 관측되었다 (Table 3).

이상의 결과를 database에 의하여 검색한 결과 G3 화합물은 methyl orsellinic acid(2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoic acid methyl ester)와 동일화합물임을 알 수 있었다(Fig. 2).

화합물의 PLA₂ 저해활성

*Umbilicaria esculenta*로부터 분리한 orcinol과 methyl orsellinic acid를 류마티스성 관절염 환자의 관절액에서 정제한 group II PLA₂에 처리하여 저해활성을 조사한 결과는 Table 4와 같다. Orcinol의 PLA₂에 대한 IC₅₀값은 0.22 mM이었으며, methyl orsellinic acid의 PLA₂에 대한 IC₅₀값은 0.26 mM이었다. Orcinol 및 methyl orsellinic acid가 PLA₂ 저해활성을 갖는 것은 본 연구에 의하여 처음으로 밝혀졌다.

요 약

Phospholipase A₂(PLA₂)는 생체막의 주요 구성 성분인 인지질의 sn-2위치에서 지방산 ester 결합

을 가수분해하는 효소로 염증과 관련된 질병에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 본 연구에서는 항염증 치료제의 개발을 목표로 PLA₂의 특이적 저해물질을 탐색하던 중 *Umbilicaria esculenta*(石耳)의 메탄올 추출물로부터 PLA₂ 저해활성을 갖는 두 화합물 G2, G3를 분리하였다. 활성물질의 분리는 *U. esculenta*의 메탄올 추출물을 에틸아세테이트로 추출하고 실리카 젤 컬럼, 크로마토름 추출, preparative TLC 등에 의하여 정제하였다. 각종 스펙트럼 분석 및 ¹H, ¹³C, DEPT 등의 NMR 실험에 의하여 G2 화합물은 분자량 124, 분자식 C₉H₈O₂의 5-methyl-1,3-benzendiol(orcinol), G3 화합물은 분자량 182, 분자식 C₉H₁₀O₄의 2,4-dihydroxy-6-methyl-benzoic acid methyl ester(methyl orsellinic acid) 페놀성 화합물로 동정하였다. 본 화합물의 PLA₂ 저해활성은 IC₅₀값이 G2의 경우 0.22 mM, G3의 경우 0.26 mM이었다. 그 후 이 두 화합물의 *in vivo* 염증모델에서 그 효능을 검토할 예정이다.

참고문헌

- 山田常雄, 前川文夫, 江上不二夫, 1992. 生物學辭典, 岩波書店, 東京.
- Arai, H., Inoue, K., Natori, Y., Nozawa, Y. and Nojima, S. 1985. *J. Biochem.* **97**: 1525-1532.
- Baek, S.H., Takayama, K., Kudo, I., Inoue, K., Lee, H.W., Do, J.Y. and Chang, H.W. 1991. *Life Sci.* **49**: 1991.
- Bates, J.W. and Farmer, A.M. 1992. Ecological classifications of bryophytes and lichens. in *Bryophytes and lichens in a changing environment*. Oxford Univ. Press, pp. 1-31.
- Dennis, E.A. 1983. Phospholipases, pp. 307-353, In: P.D. Boyer (Eds.), *The Enzymes*, Vol. 16, Academic Press, New York.
- Dole, V.P. and Meinertz, H. 1960. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.* **235**: 2595-2599.
- Hara, S., Kudo, I., Chang, H.W., Matsuda, K.,

- Miyamoto, T. and Inoue, K. 1989. *J. Biochem.* **105**: 395-399.
- Hawksorth, D.L. and Hill, D.J. 1984. Chap. 8 Secondary metabolites. in *The lichen-forming fungi*, Blackie, pp. 116-129.
- Mitsuhashi H., Tanaka, O. Nozoe, S. and Nagai, M. 1992. *Chemistry of organic natural products*, 4th ed. Tokyo. pp. 51-65.
- Pouchert, C.J. and Behnke, J. 1993. *The Aldrich library of ¹³C and ¹H FT NMR spectra*. Aldrich chemical company.
- Tanaka, K., Arita, H. and Inoue, K. 1993. Phospholipase A₂ Inhibitors. *Prot. nucl. acid enzym.* **38**: 1988-1999.
- Vadas, P. and Pruzanski, W. 1986. Biology of disease-Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of disease. *Lab. Invest.* **55**: 391-404.
- Yoshimura, I. 1987. *Lichen flora of Japan in color*, 5th ed. Hoikusha publishing Co., Osaka. pp. 116-123.