

## 두충(*Eucommia ulmoides* Oliv.)잎으로부터 Monoamine Oxidase B 억제활성물질의 분리

백남인\* · 안은미 · 한재택 · 이동욱<sup>1</sup> · 손형욱<sup>1</sup> · 권병목<sup>2</sup>

경희대학교 생명과학부 및 생명과학연구원,  
<sup>1</sup>한국인삼연구소, <sup>2</sup>한국과학기술연구원 생명공학연구소

**초 록** : 두충잎으로부터 얻은 MeOH 추출물의 *n*-BuOH 분획으로부터 silica gel column chromatography를 반복하여 monoamine oxidase B (MAO-B) 억제 활성을 갖는 flavonoid 배당체를 분리하였다. 화합물의 화학구조를 스펙트럼 데이터의 해석과 산 가수분해반응을 이용하여 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D-xylopyranosyl] quercetin으로 결정하였다. 이 화합물의 MAO-B 억제활성에 있어서의 IC<sub>50</sub> 값은 8.05  $\mu$ mol/l로 측정되었다. (1999년 2월 26일 접수, 1999년 4월 7일 수리)

### 서 론

식물자원으로부터 활성물질을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 국내산 식물의 MeOH 추출물에 대하여 여러 가지 활성을 검색한 결과 두충잎의 추출물에서 monoamine oxidase B (MAO-B) 억제 활성이 있는 것을 확인하였다.

Monoamine계 신경전달물질은 신경생물학 및 신경정신적 기능에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이들을 분해하는 효소인 monoamine oxidase (MAO)는 주로 미토콘드리아 막에 결합되어 있고, 아미노산 서열이 다른 MAO-A와 MAO-B 두가지 형태로 존재한다. 사람에 있어서 MAO-A는 주로 noradrenaline과 5-hydroxytyramine을 대사시키는 반면 MAO-B는 dopamine을 산화시킨다. MAO-B는 사람의 뇌에서 MAO 활성의 약 80%를 차지하며 이들 효소의 역할은 중추신경계의 전도, 혈압조절 및 dietary amine을 무독화시키는 작용을 한다.<sup>1)</sup>

뇌 MAO-B의 활성도는 노화에 따라 증가하며 반응시 활성산소를 생성하기 때문에 Alzheimer 질환이나 파킨슨씨병과 같은 퇴행성 신경질환을 촉진시킨다.<sup>2)</sup> 특히 파킨슨씨병의 주된 병리학적, 신경화학적 특성은 도파민 생성 신경세포가 파괴되는 것이기 때문에 MAO-B의 억제제들은 신경독성기작에 의해 유발되는 퇴행과정을 길항하는 작용을 한다.<sup>3)</sup> 실제로 파킨슨씨병 초기에 MAO-B 억제제의 복용은 운동장애 과정을 지연시키는 동시에 치매 개시를 줄일 수 있으며,<sup>4)</sup> *l*-deprenyl을 파킨슨씨병에 걸린 환자에게 장기복용시켰을 때 수명이 연장되었다.<sup>5)</sup> 몇몇 MAO-B 억제제가 파킨슨씨병에 걸린 환자들 및 실험동물 모델에 적용되어 왔으나 아직까지 *l*-deprenyl(*selegiline*)이나 *pargyline* 외에 효과적인 약제가 없는 실정이다.<sup>1,6)</sup> 그러므로 MAO-B에 대

해 선택성이 높고 *in vivo*에서 부작용이 없는 MAO-B 억제제들을 찾는 연구가 계속 중이다.

두충(*Eucommia ulmoides* Oliv.)은 낙엽성 교목으로, 우리나라 전역에서 재배되고 있다. 약재로 사용되는 부분은 수피인데, 강장,<sup>7)</sup> 강압<sup>8)</sup> 및 이뇨작용<sup>9)</sup>이 있는 것으로 알려져 있으며, 다수의 lignan<sup>10)</sup>과 iridoid<sup>11)</sup> 화합물이 분리되어 있다. 잎은 고가인 수피의 대용품으로의 가능성이 검토되고 있으며, 현재는 차와 같은 기능성 식품의 형태로 소비가 증가하고 있는 추세이다. 잎에도 자양강장,<sup>12)</sup> 강압,<sup>13)</sup> 이뇨작용<sup>13)</sup> 및 항변이원성<sup>14)</sup>의 효능이 있는 것으로 보고되어 있으며, iridoid<sup>15)</sup> 화합물 등이 분리되었으나, 이들 성분들의 활성과 관련된 연구는 아직 없다.

두충잎의 활성본체를 규명하기 위하여 MeOH 추출물을 극성에 따라 EtOAc, *n*-BuOH 및 물로 분배 추출하였고, 각 분획은 다시 활성을 추적해가며 column chromatography를 반복하여 MAO-B 억제활성을 갖는 플라보놀 배당체를 분리하였다. NMR 등의 스펙트럼 데이터의 해석과 가수분해반응을 이용하여 화학구조를 구명하였으며, MAO-B 억제 활성물질로 잘 알려진 *pargyline*과 활성을 비교하였다.

### 재료 및 방법

#### 기기 및 시약

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz), DEPT 및 HMBC spectra는 Bruker ARX 400으로 측정하였고, IR spectrum은 Perkin-Elmer Model 599B 로 측정하였다. UV 흡수는 Shimadzu UV-1601 UV-spectrophotometer로, FAB/MS는 VG ZAB-SE4F로 측정하였다. Column chromatography 용 silica gel은 Kiesel gel 60 (70~230 mesh, Merck)을, TLC는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>를 사용하였고, benzylamine 등 MAO-B 활성검정용 시약은 Sigma Chemicals Co.에서 구입하여 사용하였다.

찾는말 : 두충, 플라보노이드 배당체, quercetin, monoamine oxidase B 억제 활성

\*연락처

**식물시료**

경동시장에서 전남산 두충잎을 구입한 후, 생명공학연구소 이형규 박사에게 의뢰하여 동정하였으며, 표본시료는 경희대학교 (수원) 천연물화학실 시료실에 보관되어 있다.

**MAO-B 억제활성의 측정**

흰쥐(Sprague Dawley, 체중 200 g) 뇌에서 미토콘드리아를 분리하여 MAO-B의 활성을 측정하였다. 기질은 benzylamine을 사용하였으며 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 양을 비색법으로 측정하여 MAO-B의 활성도를 측정하였다.<sup>16)</sup> 또한 MAO-B의 활성 억제 정도를 측정하기 위하여 반응액에 일정량의 시험물질을 넣고 37°C에서 5분 동안 전처리한 후 MAO-B의 활성도를 측정하였다.

**활성물질의 분리**

두충엽 165 g을 분쇄한 후, 80% MeOH(700 ml×2)로 실온에서 15시간 추출하고, 여과한 후, 감압농축하였다. H<sub>2</sub>O(300 ml)와 EtOAc(400 ml×3)로 분배, 추출하였고, 물층은 다시 n-BuOH(300 ml×2)로 추출하였다.

n-BuOH층을 감압, 농축한 후 silica gel column chromatography {225 g, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O=9:3:1(1500 ml)→65:35:10(1500 ml)→6:4:1(1500 ml)→MeOH(700 ml)} 하여 12개의 분획을 얻었다. 그 중에서 8번째 분획을 다시 silica gel column chromatography (40 g, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O=65:35:10)하여 황색물질 (1) 66.5 mg을 분리, 정제하였다.

화합물 1 {3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl(1→2)  $\beta$ -D-xylopyranosyl] quercetin}: White powder(EtOH-H<sub>2</sub>O), IR(KBr disk)  $\nu_{max}$  3325, 3020, 2965, 1690, 1625 cm<sup>-1</sup>; pos. FAB/MS *m/z* 597 [M+1]; HR pos. FAB/MS *m/z* 596.138; Calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>28</sub>O<sub>16</sub>, 596.138; <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 7.55(1H, s, H-2'), 7.50(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-6'), 6.78(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5'), 6.19(1H, s, H-8), 6.01(1H, s, H-6), 5.30(1H, d, *J*=7.6 Hz, H-glc-1; indicating H-1 of glucopyranosyl), 4.70(1H, d, *J*=6.6 Hz, H-xyl-1; indicating H-1 of xylopyranosyl), 3.90~3.16 (sugar moieties); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 179.32(C-4), 165.48(C-7), 162.65(C-5), 158.43(C-2), 158.07(C-9), 149.48(C-4'), 145.72(C-3'), 135.03(C-3), 123.39(C-6'), 123.01(C-1'), 117.33(C-5'), 115.99(C-2'), 105.59(C-10), 105.24(C-xyl-1), 101.00(C-glc-1), 99.68(C-6), 94.60(C-8), 82.07(C-glc-2), 78.14(C-xyl-3) 78.07(C-glc-3), 76.87(C-glc-5), 74.74(C-xyl-2) 70.77(C-glc-4), 70.77(C-xyl-4), 66.57(C-xyl-5), 62.04(C-glc-6).

**화합물 1의 산가수분해**

화합물 1(40 mg)을 MeOH(7 ml)에 녹이고 5% HCl 수용액 2 ml를 가한 후 환류하였다. 반응액에 Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 적당량 가하여 중화시키고, 여지로 여과하였다. 소량의 여액을 취하여 silica gel TLC(CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O=6:4:1) 하였다. TLC용 표준당으로 D-glucose와 D-xylose를 동일하게 처리하여 비교하였다(Rf value: D-glucose=0.38, D-xylose=0.49).

위에서 얻어진 여액을 감압농축한 후 silica gel column

chromatography를(45 g, n-hexane-EtOAc=1:4) 수행하여 aglycone (2, quercetin)을 12 mg 정제하였다.

**결과 및 고찰**

MAO-B 억제활성을 보인 두충잎의 MeOH 추출물을 극성에 따라 EtOAc, n-BuOH 및 물로 분배 추출하였고, 각 추출물에 대하여 활성을 측정한 결과 n-BuOH 층에 활성이 집중되었다. n-BuOH 추출물에 대하여 용매를 변화시켜가며 silica gel column chromatography를 반복하여 소분획을 얻고, 각 분획에 대하여 활성을 측정해가며 물질을 추적하여, TLC 상에서 황산 발색시 황색으로 발색하는 화합물 1을 분리, 정제하였다.

화합물 1은 EtOH-H<sub>2</sub>O로 재결정하여 백색분말로 얻어졌고, 자외선 조사시의 흡수특성과 발색시약에 의한 정색반응으로부터 flavonoid 화합물로 추정되었다. IR spectrum에서도 수산기(3325 cm<sup>-1</sup>)와 벤젠환(1690, 1625 cm<sup>-1</sup>)의 존재가 확인되었다. <sup>1</sup>H-NMR(400 MHz) 및 <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) spectra로부터 anomer 수소( $\delta$  5.30, 4.70) 및 anomer 탄소( $\delta$  105.24, 101.00)가 각각 관측되어 2개의 당으로 이루어진 배당체로 판명되었다.

화합물 1을 산가수분해하여 얻어진 당은 TLC로 표준당과 비교하였을 때 glucose와 xylose가 대략 동일한 비율로 조성되어 있음을 알 수가 있었다. Aglycone은 silica gel column chromatography로 정제하였는데, 여러 가지 data를 표준물질과 직접 비교하여 quercetin으로 동정하였다. 따라서 화합물 1은 quercetin에 glucose와 xylose가 각각 1분자씩 결합한 것으로 밝혀졌다.

당의 결합양식은 화합물 1의 <sup>13</sup>C-NMR에서 D-xylopyranose로 귀속되는 6개의 signal이 모두 관측되어, 말단당은 D-xylose임을 알 수 있었고, 나머지 6개의 당부 signal 중에서 D-glucopyranose의 2번 탄소만이  $\delta$  82.07와 같이 8 ppm 정도 저자장으로 shift되어 관측되었으므로, quercetin에 D-glucopyranose가 결합하고 있고, D-glucopyranose의 2번 수산기에 D-xylopyranose가 결합하고 있음이 판명되었다. D-glucose와 D-xylose는 <sup>1</sup>H-NMR에 있어서의 anomer proton signal의 coupling constant가 각각 7.6 Hz와 6.6 Hz인 점으로부터 모두  $\beta$ -결합하고 있음을 알 수 있었다.

한편 quercetin에는 O-glycoside 결합을 할 수 있는 수산기가 C-3, 5, 7, 2', 3'에 존재하는데, 화합물 1의 <sup>13</sup>C-NMR

**Table 1. Monoamine oxidase B inhibitory activity of compound 1 and pargyline**

compound 1		pargyline	
concentration ( $\mu$ mol/l)	inhibition (%)	concentration ( $\mu$ mol/l)	inhibition (%)
40	95	1.0	97
20	88	0.50	91
10	62	0.25	70
5.0	35	0.13	39

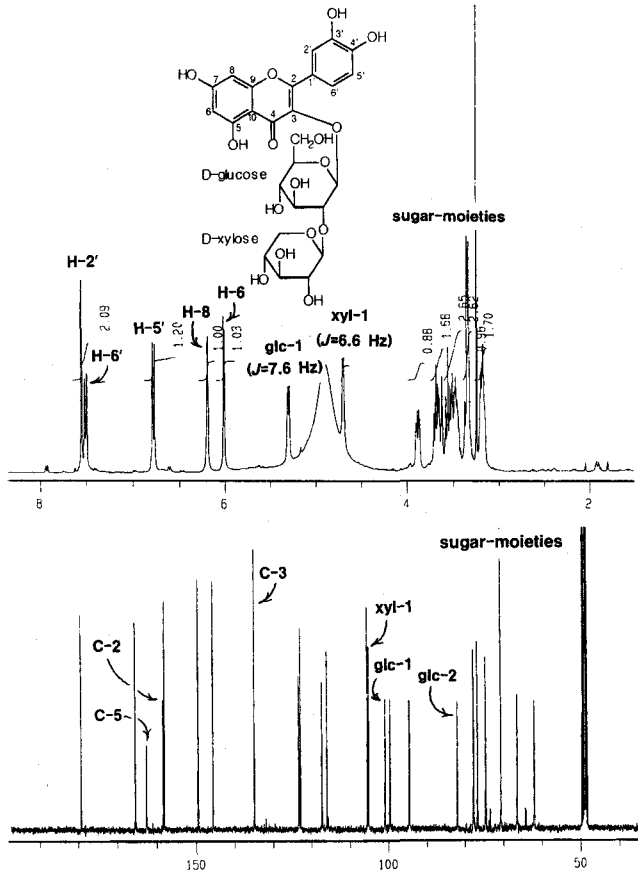


Fig. 1. <sup>1</sup>H-NMR & <sup>13</sup>C-NMR spectra (400 & 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) of a MAO-B inhibitory compound from the leaves of *Eucommia ulmoides*.

data에서 C-2 signal이 δ<sub>c</sub> 158.43에서 관측되어 quercetin의 C-2의 signal보다 약 10 ppm 정도 저자장으로 shift 된 점으로부터 3번 수산기에 배당체 결합이 형성되어 있음<sup>17)</sup>이 확인되었다.

이상의 결과로부터 화합물 1의 화학구조는 3-O-[β-D-glucopyranosyl(1→2) β-D-xylopyranosyl] quercetin으로 결정되었으며, 이 물질은 두층으로부터는 처음 분리되었다.

화합물 1의 MAO-B 억제활성을 측정된 결과, IC<sub>50</sub> 값이 8.05 μmol/l로 MAO-B의 선택적인 억제제로 잘 알려져 있는 pargyline(IC<sub>50</sub>=0.14 μmol/l)이나 l-deprenyl의 효과에 비하면 적지만 MAO-B의 활성을 억제하는 효과를 지녔다 (Table 1). l-Deprenyl의 경우 흰쥐 뇌 MAO-B에 대한 IC<sub>50</sub>이 11.25 nmol/l로<sup>18)</sup> 선택성이 높은 비가역적 MAO-B 억제제이나 암페타민과 유사한 부작용이 나타나며 또한 고혈압 및 우울증 치료를 위해 pargyline을 복용한 환자가 조병(manic psychosis, 躁病)에 걸린 사례가 있다<sup>19)</sup>. 그러므로 이와같은 부작용이 없는 MAO-B에 대해 선택성이 높은 화합물을 찾으려는 연구가 계속되고 있다. 비록 화합물 1이 l-deprenyl이나 pargyline에 비해 억제효과가 다소 낮지만 파킨슨씨병에 대한 효과적인 치료제로 사용될 수 있을 것으로 기대되며 이에 대한 연구가 필요하다. 두층은 민간요법에서 뇌졸중에 걸린 사람들의 치료를 위해 종종 이용되는 식물자원

이다. 이러한 효과는 두층잎에 존재하는 MAO-B 활성 억제 물질에 기인되었는지도 모른다.

참고문헌

- Singer, T. P. and Ramsay, R. R. (1995) Monoamine oxidase; Old friends hold many surprises. *FASEB J.* **9**, 605-610.
- Jossan, S. S., Gillberg, P. G., Gottfries, C. G., Karlsson, I. and Oreland, L. (1991) Monoamine oxidase B in brains from patients with Alzheimer's disease : A biochemical and autoradiographical study. *Neuro Sci.* **45**, 1-12.
- Gerlach, M., Riederer, P. and Yondim, M. B. H. (1992) The molecular pharmacology of L-deprenyl. *Eur. Pharmac. Mol. Pharmacol. Sect.* **226**, 97-108.
- Finali, G., Piccirilli, M. and Piccinin, G. L. (1994) Neuropsychological correlates of l-deprenyl therapy in idiopathic parkinsonism. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* **18**, 115-128.
- Yondim, M. B. H. and Finberg, J. P. M. (1994) Pharmacological actions of l-deprenyl and other selective monoamine oxidase B inhibitors. *Clin. Pharmacol. Ther.* **56**, 725-733.
- Chiba, K., Trever, A. and Castagnoli, N. (1984) Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 574-578.
- Soka, T. (1985) Encyclopedia of Chinese Drugs, Vol. 3, 1964-1966, Shanghai Science & Technology Press, Shogakukan, Tokyo, Japan.
- Chien, T.-H. (1957) Action of the combined administration of *Panax ginseng* var. *notoginseng* Burkill and *Eucommia ulmoides* Oliv. on the blood pressure and respiration of rabbits. *Acta. Scb. Med. Gifu.* **5**, 480-484.
- Hong, N. D., Rho, Y. S., Kim, J. W., Won, D. H., Kim, N. J. and Cho, B. S. (1987) Studies on the general pharmacological activities of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Kor. J. Pharmacogn.* **19**, 101-110.
- Deyama, T., Ikawa, T., Kitagawa, S. and Nishibe, S. (1987) The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. VI. Isolation of a new sesquignan and neolignan glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 1803-1807.
- Bianco, A., Iavarone, C. and Trogolo, C. (1974) Structure of eucommiol, a new cyclopentenoid-tetrol from *Eucommia ulmoides*. *Tetrahedron* **30**, 4117-4121.
- Ma, Y.-H., Yie, J.-N., Hattori, M., Kaneko, S., Nomura, Y., Wakaki, K., Kurashige, Y. and Namba, T. (1987) Studies on Tu-Chung leaves (II)-Effects of long-term administration of the Tu-Chung leaves water extract on rats. *J. Med. Pharm. Soc. Wakan-Yaku* **4**, 26-34.
- Namba, T., Hattori, M., Yie, J.-N., Ma, Y.-H., Nomura, Y., Kaneko, S., Kitamura, Y., Koizumi, T., Katajyama, K. and Lu, W. (1986) Studies on Tu-Chung leaves (I)-Pharmacological effects of the water extracts. *J. Med. Pharm. Soc. Wakan-Yaku* **3**, 89-97.
- Nakamura, T., Nakazawa, Y., Onizuka, S., Satoh, S., Chiba, A., Sekihashi, K., Miura, A., Yasugahira, N. and Sasaki, Y. F. (1997) Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extracts of *Eucommia ulmoides* leaves): 1. The clastogen-suppressing

- effects of Tochu tea in CHO cells and mice. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **388**, 7-20.
15. Bianco, A., Bonini, C., Guiso, M., Iavarone, C. and Trogolo, C. (1978) Iridoids. XXVI. Ulmoside (Aucubigenin-1- $\beta$ -isomaltoside), a new iridoid from *Eucommia ulmoides*. *Gazzetta Chimica Italiana* **108**, 17-20.
16. Kalaria, R. N., Mitchell, M. J. and Harik, S. (1987) Correlation of MPTP neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3521-3525.
17. Agrawal, P. K. (1989) Studies in organic chemistry : 39. <sup>13</sup>C-NMR of flavonoids. Elsevier Science Publishing Com. Inc. NY, U.S.A. p155.
18. Borbe, H. O., Niebch, G. and Nickel, B. (1990) Kinetic evaluation of MAO-B-activity following oral administration of selegiline and desmethyl-selegiline in the rat. *J. Neural Transm. Suppl.* **32**, 131-137.
19. Folks, D. and Arnold, E. S. (1983) Pargyline-induced mania in primary affective disorder: case report. *J. Clin. Psychiatry* **44**, 25-26.

---

#### Isolation of Monoamine Oxidase B Inhibitory Compound from the Leaves of *Eucommia ulmoides* Oliv.

Nam-In Baek\*, Eun-Mi Ahn, Jae-Taek Hahn, Dong Wook Lee<sup>1</sup>, Hyung Ok Sohn<sup>1</sup> and Byoung-Mog Kwon<sup>2</sup>. (Department of Life Sciences & Institute of Life Sciences, Kyung Hee University, College of Industry, Suwon; <sup>1</sup>Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon; <sup>2</sup>Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejon, Korea)

**Abstract** : The repeated silica gel column chromatographies of *n*-BuOH fraction obtained from MeOH extracts of *Eucommia ulmoides* leaves led to isolation of a flavonoid-glycoside inhibiting monoamine oxidase B activity. Its chemical structure was determined to be 3-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)  $\beta$ -D-xylopyranosyl] quercetin through interpretation of spectral data and adaptation of acid hydrolysis. The IC<sub>50</sub> value of this compound in rat brain mitochondrial MAO-B inhibitory activity was evaluated to be 8.05  $\mu$ mol/l.

---

Key words : *Eucommia ulmoides*, flavonoid glycoside, quercetin, monoamine oxidase B inhibitory activity

\*Corresponding author