



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

병개암나무 가지로부터 항산화 및
항염 활성 성분 규명

濟州大學校 大學院

化 學 科

金 成 天

2014年 2月



병개암나무 가지로부터 항산화 및 항염 활성 성분 규명

指導教授 李 南 昊

金 成 天

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2014年 2月

金成天의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ ①

委 員 _____ ①

委 員 _____ ①

濟州大學校 大學院

2014年 2月

Identification of Anti-oxidative and
Anti-inflammatory Constituents from the
Branches of *Corylus hallaisanensis*

Sung Chun Kim
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Master of Science

2014. 2.

This thesis has been examined and approved.

Committee Chairman,

Dissertation Committee,

Dissertation Committee,

.....
Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Schemes	iii
List of Tables	iii
List of Figures	iii
List of Abbreviations	vi
Abstract	vii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	7
1. 시약 및 기기	7
2. 재료	8
3. 추출, 분획 및 분리	9
3-1. 병개암나무 가지의 추출 및 분획	9
3-2. Ethyl acetate layer의 활성 성분 분리	10
4. 활성실험	13
4-1. 항산화 활성 실험	13
4-1-1. 총 polyphenolic compounds 함량 측정	13
4-1-2. DPPH radical 소거 활성 실험	13
4-1-3. ABTS radical cation 소거 활성 실험	15
4-2. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험	17
4-2-1. 세포배양	17
4-2-2. Nitric oxide 생성 억제 평가	17
4-2-3. 세포독성 평가	18
III. 결과 및 고찰	19
1. 화합물의 구조 결정	19

1-1. Compound 1의 구조해석	19
1-2. Compound 2의 구조해석	22
1-3. Compound 3의 구조해석	25
1-4. Compound 4의 구조해석	31
2. 항산화 활성 실험 결과	34
2-1. 총 polyphenolic compounds 함량 측정	34
2-2. DPPH radical 소거 활성	35
2-2-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성	35
2-3. ABTS radical cation 소거 활성	36
2-3-1. 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성	36
2-3-2. 분리된 화합물의 ABTS radical cation 소거 활성	38
3. 항염 활성 실험 결과	39
3-1. 추출물 및 분획물의 nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성 평가	39
3-2. HaCaT, CCD-986sk cell 에서의 세포독성 평가 결과	42
3-3. Compound 2, 3, 4의 nitric oxide(NO) 생성 억제 및 세포 독성 평가	43
3-4. 염증성 cytokine IL-6, TNF- α 생성 억제 평가	46
IV. 요약 및 결론	48
V. 참고문헌	50

List of Schemes

Scheme 1. Procedure of extraction and solvent fractionation from <i>C. hallaisanensis</i>	9
Scheme 2. Procedure of isolation of compound 1 from <i>C. hallaisanensis</i>	10
Scheme 3. Procedure of isolation of compounds 2, 3 from <i>C. hallaisanensis</i> ..	11
Scheme 4. Procedure of isolation of compound 4 from <i>C. hallaisanensis</i>	12

List of Tables

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 1 (100 and 400 MHz, CDCl_3) ..	20
Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 2 (100 and 400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	23
Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 3 (100 and 400 MHz, CD_3OD)	27
Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of compound 4 (100 and 400 MHz, CD_3OD)	32
Table 5. SC_{50} value of ABTS^+ radical scavenging activities of isolated compounds	38

List of Figures

Figure 1. Chemical structures of anti-oxidants.	2
Figure 2. Oxidative damage pathway	3
Figure 3. Major production pathways of NO and PGE_2	5

Figure 4. Pictures of <i>Corylus hallaisanensis</i>	8
Figure 5. Scavenging of the DPPH radical by an anti-oxidant	14
Figure 6. Scavenging of ABTS ⁺ radical by an anti-oxidant	16
Figure 7. Principle of MTT assay	18
Figure 8. Chemical structure of compound 1	21
Figure 9. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 in CDCl ₃	21
Figure 10. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1 in CDCl ₃	21
Figure 11. Chemical structure of compound 2	22
Figure 12. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 in DMSO- <i>d</i> ₆	24
Figure 13. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 in DMSO- <i>d</i> ₆	24
Figure 14. Chemical structure of compound 3	26
Figure 15. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	28
Figure 16. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	28
Figure 17. HMQC spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	29
Figure 18. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	29
Figure 19. HMBC spectrum of compound 3 in CD ₃ OD	30
Figure 20. Chemical structure of compound 4	31
Figure 21. ¹ H-NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	33
Figure 22. ¹³ C-NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD	33
Figure 23. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers	34
Figure 24. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers	35
Figure 25. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers	36
Figure 26. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers	37
Figure 27. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers	37

Figure 28. ABTS ⁺ radical scavenging activities of compounds and vitamin C	38
Figure 29. NO production inhibitory activities of extract and solvent layers ·	40
Figure 30. Cytotoxicities of extract and solvent layers	40
Figure 31. NO production inhibitory activities of EtOAc layer	41
Figure 32. Cytotoxicities of EtOAc layer	41
Figure 33. Cytotoxicities of extract and solvent layers in HaCaT cell	42
Figure 34. Cytotoxicities of extract and solvent layers in CCD-986sk cell ···	42
Figure 35. NO production inhibitory activities of compound 2	43
Figure 36. Cytotoxicities of compound 2	43
Figure 37. NO production inhibitory activities of compound 3	44
Figure 38. Cytotoxicities of compound 3	44
Figure 39. NO production inhibitory activities of compound 4	45
Figure 40. Cytotoxicities of compound 4	45
Figure 41. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine IL-6 by EtOAc layer	46
Figure 42. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine IL-6, TNF- α by Compound 3	47
Figure 43. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine IL-6, TNF- α by Compound 4	47

List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
<i>C. hallaisanensis</i>	<i>Carpinus hallaisanensis</i>
CC	Column chromatography
CD ₃ OD	Methanol- <i>d</i> ₄
CHCl ₃	Chloroform
COSY	Correlation spectroscopy
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimethylsulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
Fr.	Fraction
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
int	Integration
IL-6	interleukin-6
<i>J</i>	Coupling constant (Hz)
LPS	Lipopolysaccharide
m	Multiplet
MeOH	Methanol
MTT	Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt
NMR	Nuclear magnetic resonance
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -hexane
s	Singlet
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
se	Sephadex LH-20 CC subfraction
TLC	Thin layer chromatography
TNF-α	tumor necrosis factor-α
V, v	VLC subfraction
Vit.C	Vitamin C
VLC	Vacuum liquid chromatography

Abstract

Identification of Anti-oxidative and Anti-inflammatory Constituents from the Branches of *Corylus hallaisanensis*

Sung Chun Kim

Department of Chemistry, Graduate School

Jeju National University, Korea

Supervised by Professor Nam Ho Lee

Corylus hallaisanensis Nakai, a deciduous shrub growing in Jeju island, was investigated for anti-oxidative and anti-inflammatory activities. The dried *C. hallaisanensis* branches was extracted for 24 hour with 70% ethanol. The obtained extract was successively partitioned into *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH) and water (H₂O) fractions. For the anti-oxidation tests, the ethanol extract, EtOAc, BuOH and H₂O fractions showed good DPPH and ABTS⁺ radical scavenging activities. The total phenolic contents for the extract and solvent layers (Hex, EtOAc, BuOH, water) were estimated as 289, 50, 367, 421 and 249 mg (GAE/1 mg) respectively. In anti-inflammatory screenings, EtOAc fraction showed good nitric oxide production inhibitory activity in LPS-induced RAW 264.7 cell.

Therefore, futher phytochemical studies were conducted for the ethyl acetate fraction, which led to isolation of four constituents such as β -sitosterol (1), 3,3',4'-tri-*O*-methylellagic acid (2), carpinontriol A (3) and carpinontriol B (4). All of the compounds were isolated for the first time

from this plant.

On the studies of anti-oxidative activities for the isolated compounds, compounds **3** and **4** showed strong ABTS⁺ radical scavenging activities with SC₅₀ of 19.3 and 12.9 μM respectively, whose activities were comparable to a positive control vitamin C (SC₅₀ 45.4 μM).

On screening of anti-inflammatory activities, the compounds **2**, **3**, **4** showed considerable inhibition on the production of nitric oxide for the RAW 264.7 cell without showing cell toxicities.

Based on these results, it is suggested that *C. hallaisanensis* branch extract could be potentially applicable in the cosmetical and/or pharmaceutical industries, especially as anti-oxidant and anti-inflammatory ingredient.

I. 서론

국민소득의 향상으로 노령인구가 증가하고 이에 따라 건강에 대한 관심이 높아지면서 성인병, 강장 및 노화의 지연과 관련된 식품들의 수요가 꾸준히 늘고 있다. 이러한 추세에 따라 최근에는 약용식물에 대한 연구, 특히 노화방지와 관련된 연구가 매우 활발하게 진행되고 있는 실정이다.^{1),2)}

노화현상은 매우 복잡하여 한 가지 기전으로 설명하기는 어렵다. 하지만 그 중에서도 현재 노화연구 분야에서 가장 주목을 받고 있는 것은 free radical 이론이다. Free radical 이론에 따르면 생물은 나이에 따라 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 손상이 증가하는데, 이들 활성산소종은 생체가 외부로부터의 방사선, 자외선 등의 노출, 대기오염 물질, 항생제의 남용과 더불어 체내의 생화학적 반응에 의해 생성되며, 여러 가지 문제를 야기한다고 알려져 있다.^{3),4)}

유해산소(toxic oxygen species)로 알려진 활성산소종은 호흡 등과 같은 생리작용에 의해 세포에서 생성된 물질로 끊임없이 생성과 소멸을 반복하며, 정상적인 상태에서는 3~5% 정도 존재한다. 이러한 활성산소종은 superoxide anion ($O_2^- \cdot$), hydroxyl radical ($\cdot OH$)과 같은 자유라디칼(free radical)의 형태로 존재하거나 혹은, hydrogen peroxide(H_2O_2), single oxygen(1O_2)과 같은 쌍을 이룬 전자쌍을 가진 화합물의 형태로 존재한다.

이 활성산소종은 NADPH oxidase에 의한 매개대사반응이나 외인성물질의 cytochrome P-450 의존성 대사반응, xanthine oxidase 등에 의한 효소반응, 오존, 자외선, 방사선, 흡연 등에 의해 생성되는데, 정상적인 대사과정에서는 생체 내 자기 방어체제인 항산화효소 (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase 등), 생물학적 항산화제 (transferrin, ceruloplasmin, urate 등) 그리고 항산화물질 (ascorbic acid, α -tocopherol, BHT 등) 등에 의해 제거된다(Figure 1). 하지만 항산화 시스템의 기능저하, 항산화제 결핍 등의 생체방어기구 이상과 각종 물리적, 화학적 요인들에 의한 생체 내 활성산소들의 과도한 생성이 생체 방어기구의 용량을 초과하게 될 경우 산화적 스트레스(oxidative stress)를 야기할

수 있다. 그 결과 효소의 불안정화, 세포막과 조직 훼손, DNA 변성 및 세포노화 등을 초래하여 암을 비롯한 뇌질환, 심장질환, 동맥경화, 염증, 자가면역질환 등의 심각한 장애를 일으키는 원인으로 지목되고 있다.^{5),6)}

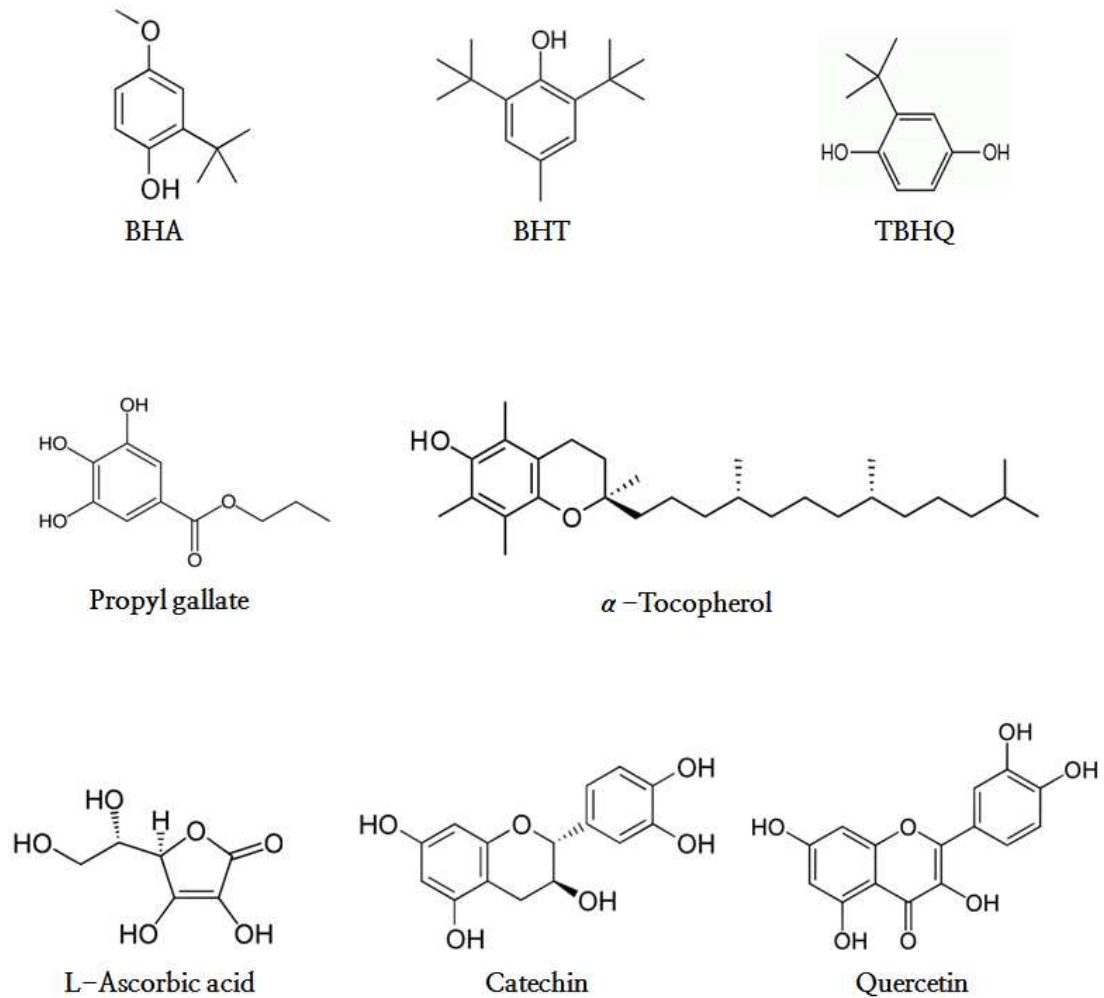


Figure 1. Chemical Structures of Anti-oxidants.

1956년 Harman이 최초로 발표한 생체 내 분자 상 산소가 산화효소의 촉매작용에 의해 자유라디칼이 생성되어 노화가 진행된다고 하는 자유라디칼 이론에 의하면^{7),8)}, 일반적으로 산소를 호흡할 때 활성산소인 singlet oxygen(1O_2)이나 superoxide(O_2^-)라는 자유 라디칼이 생성되어 생체내의 단백질, 세포막, 지방, 효소 등을 산화시킴으로써 암, 관절염, 당뇨병, 동맥경화 등 각종 질병을 일으킬 뿐만 아니라 노화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 생체 내 자유라디칼의 생성을 억제하는 것이 각종 질병의 예방을 위하여 매우 중요한 문제로 대두되면서 이에 대한 연구가 활발해지고 있다⁹⁾.

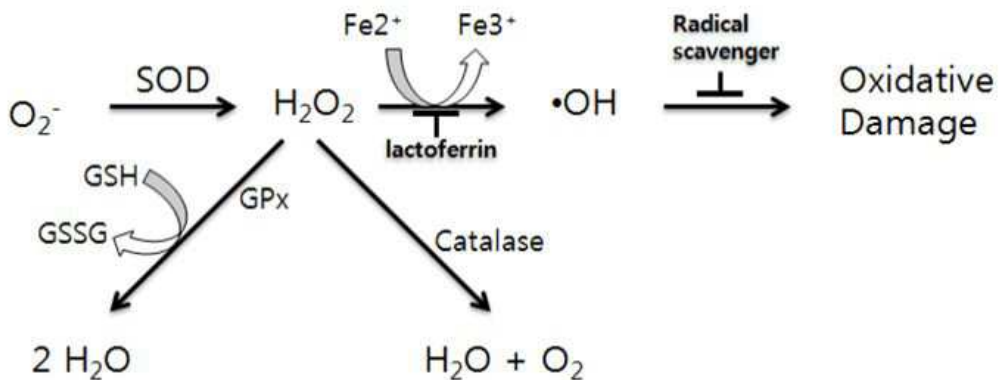


Figure 2. Oxidative damage pathway

염증반응은 상처나 감염, 또는 자가면역 기전 등에 의해 나타나는 생체반응으로서, 조직의 혈관 확장에 의한 부종, 발열, 조직손상, 세포증식 등을 특징으로 하는 생체반응이다.¹⁰⁾

피부에서의 염증은 매우 다양한 의미를 가진다. 아토피성 피부질환, 여드름성 피부질환, 광 민감성 피부질환 그리고 민감성 피부질환의 생리학적 기본 기전은 염증 반응의 과정을 거치며, 다양한 염증현상에 의해 진피층을 파괴하는 효소인 hyaluronidase, lipoxygenase 등의 발현이 증가하여 피부의 노화 및 주름형성에 직접적으로 영향을 준다. 다양한 원인에 의하여 일어나는 염증반응은 조직과 원인에 상관없이 거의 비슷한 변화를 보인다. 따라서 공통적인 물질요인의 존재가 있을 것으로 추정하고 있으며, 그 매개체로는 활성산소, 산화질소, PG (prostaglandin), 여러 사이토카인 등이 알려져 있다. 면역과 염증에 관련된 여러 사이토카인 중 IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-10 및 IL-2는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 사이토카인으로 각종 염증질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되었다.¹¹⁾

염증반응에서 활성화된 대식세포는 nitric oxide(NO), prostaglandin(PGE₂), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL-1, IL-6) 등 여러 염증성 매개체들을 방출한다. 이런 염증성 매개체들은 조직 손상의 복구와 보호의 역할도 하지만, 과량 생산되면 정상조직에도 과도한 면역반응과 염증반응을 일으키게 된다.^{12),13)}

여기서 NO는 혈관확장 및 조직 손상에 주로 관여하고, PGE₂는 통증과 발열을 매개한다. 이들 중 NO는 여러 조직과 세포들에서 L-arginine으로부터 NOS (nitric oxide synthase)에 의해 합성되며, 혈관확장, 신경전달, 혈액응고, 면역기능 조절 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NOS는 크게 cNOS와 iNOS의 두 가지 그룹으로 나눌 수 있다. 즉, neuronal, endothelial NOS는 cNOS에 속하며 이는 Ca²⁺-calmodulin 의존성이며 평상시에도 지속적으로 NO를 분비하고 있어 항상성을 조절한다. 이와 반면에 inducible NO(iNOS)는 INF- γ , IL-1, TNF- α 등의 cytokine이나 박테리아의 LPS(lipopolysaccharide)에 의해서 활성화되며 연계반응을 통해 장시간동안 대량의 NO를 생성하게 된다. 이러한 NO는 macrophage의 cytotoxic activity에 큰 영향을 미치므로 미생물이나 종양세포로

부터 숙주를 방어하는 중요한 역할을 하고 있다. 하지만 과생된 NO에 의해서 류마티스 관절염 같은 염증 반응을 악화시키므로 유해한 작용을 나타나게 된다. 위와 같이 자극된 iNOS는 macrophage와 hepatocytes에 존재하게 되며, 염증이 다른 병원균들과 관여하는 동안 NO생성은 현저하게 증가하고 세포독성을 나타나게 된다. 그러므로 염증성 자극의 반응에 의한 NO생성의 저해는 염증성 질병에서 치료적 방법으로 사용될 수 있다.¹⁴⁾

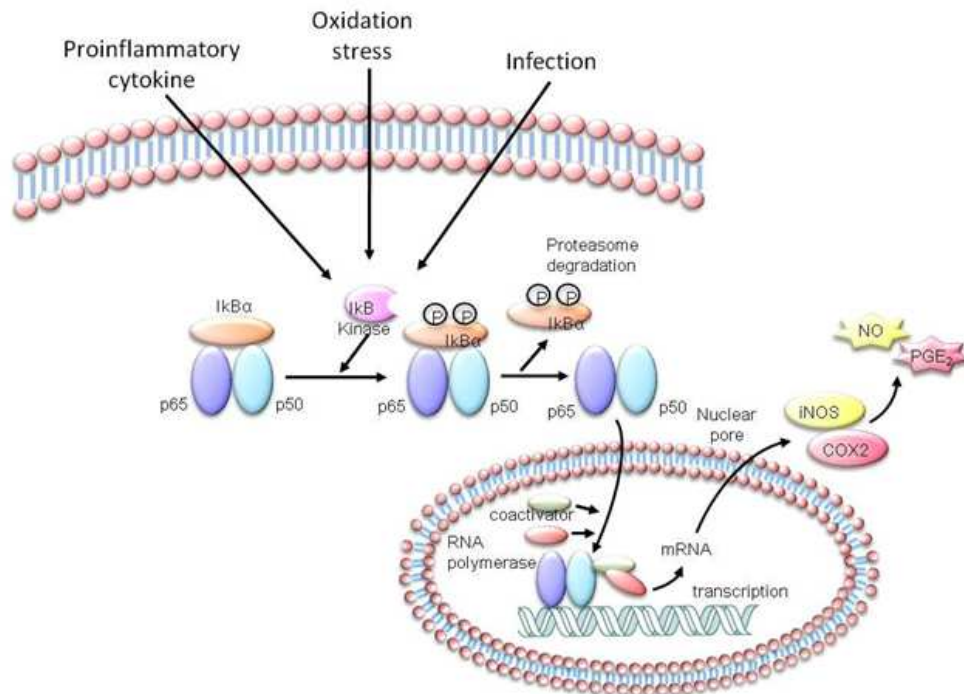


Figure 3. Major production pathways of NO and PGE₂

병개암나무(*Corylus hallaisanensis*)는 자작나무과(*Betulaceae*)의 낙엽활엽 관목으로 높이 3 m에 달하고 어린 가지에 잔털이 있다. 잎은 호생하고 넓은 도란형 또는 난상 타원형으로 길이 4 ~ 9.7 cm, 너비 2 ~ 5.3 cm이며 끝이 뾰족하고 겹 톱니가 있으며 측맥은 8 ~ 13쌍이고 맥 사이에 잔털이 있으며 뒷면 맥 위와 엽병에도 잔털이 있다. 꽃은 자웅일가로 암꽃이삭은 두상이며 포는 서로 겹쳐지고 각각 2개의 암꽃이 달리며 봄에 핀다. 과실은 견과로 난형이며 숙존성인 총포로 싸여 도토리 모양을 하고 10월에 성숙한다. 본종은 참개암나무에 비해 총포는 열매 전체를 싸나 끝이 길어지지 않는다. 과실은 식용 또는 약용한다. 한국특산종으로 제주도 한라산 1,300 ~ 1,800 m의 산지 양지바른 곳에 난다.¹⁵⁾

현재까지 병개암나무에서 분리 보고된 활성성분은 없으며, 이에 본 연구에서는 병개암나무 가지 추출물 및 분획물의 다양한 생리활성을 검색하고 병개암나무 가지로부터 분리된 화합물들이 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물들의 항산화 및 항염 활성에 대한 연구를 진행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 용매분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merk, Junsei의 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography(VLC)에는 silica gel(2-25 μm , Sigma Co.), normal-phase column chromatography(CC)에는 silica gel(95-110 μm , Merk Co.)이 사용되었고, 겔 여과 크로마토그래피에는 Sephadex LH-20(0.1-0.025 mm)이 사용되었다. 분리 과정에 사용된 thin-layer chromatography(TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merk Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하여 위하여 UV lamp(254 nm)를 사용하거나, visualizing agent에 침적시킨 후 heat-gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 KMnO₄ 수용액(3% KMnO₄, 20% K₂CO₃, 0.25% NaOH) 및 1% anisaldehyde-MeOH를 필요에 따라 사용하였다.

분리된 화합물의 생리활성 연구를 위한 흡광도 측정에는 SunriseTM(Tecan Co.)을 이용하였다.

구조분석에 이용된 NMR(nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM-ECX 400(FT-NMR system, JEOL)을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 Merk의 NMR 전용용매로 CD₃OD, CDCl₃, DMSO-*d*₆를 사용하였다.

2. 재료

실험에 사용된 병개암나무(*Corylus hallaisanensis*) 가지(시료번호 : 322)는 2011년 6월에 제주 한라수목원에서 채집하였다. 채집한 병개암나무 가지는 실온 및 음지에서 완전히 자연 건조 하였으며 분쇄하여 사용하였다(Figure 4).

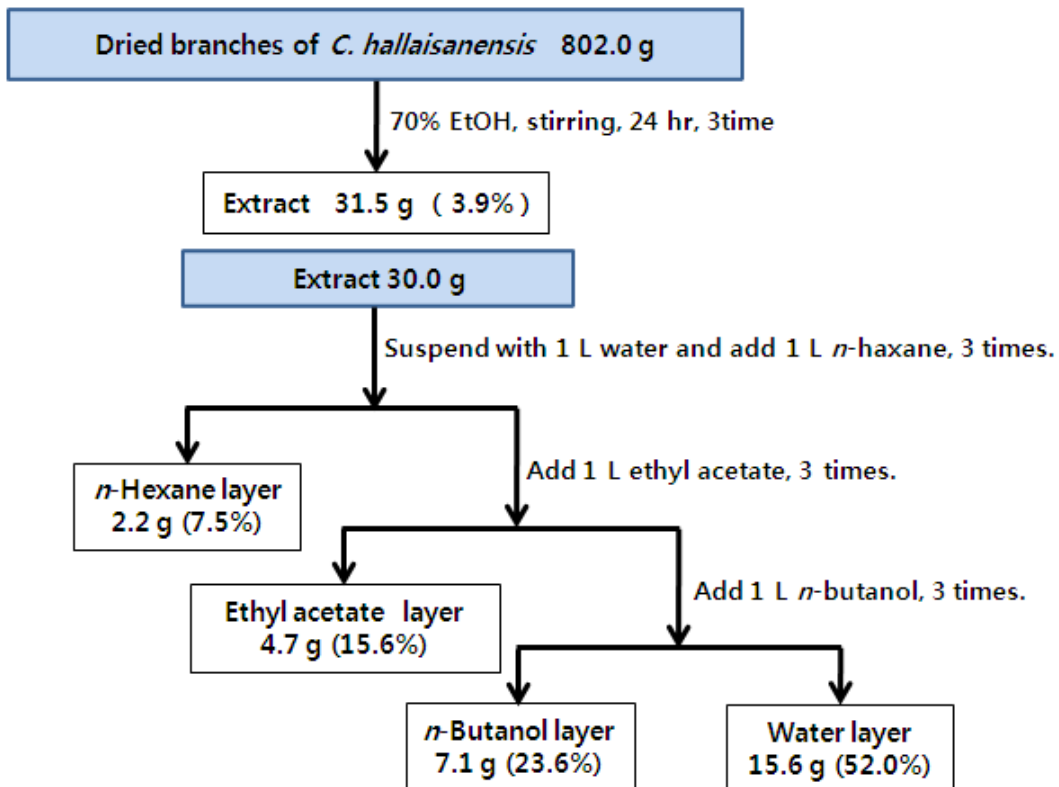


Figure 4. Pictures of *Corylus hallaisanensis*

3. 추출, 분획 및 분리

3-1. 병개암나무 가지의 추출 및 분획

건조된 병개암나무 가지 802.0 g을 분쇄한 후, 이를 70% 에탄올 16 L에 넣고 실온에서 24시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40°C 이하의 수욕 상에서 진공농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% 에탄올 추출물 31.5 g을 얻었다. 이 중 추출물 30.0 g을 증류수 2 L에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane layer, ethyl acetate layer, *n*-butanol layer, water layer 등 총 4개의 용매 분획 층을 얻었다 (Scheme 1).

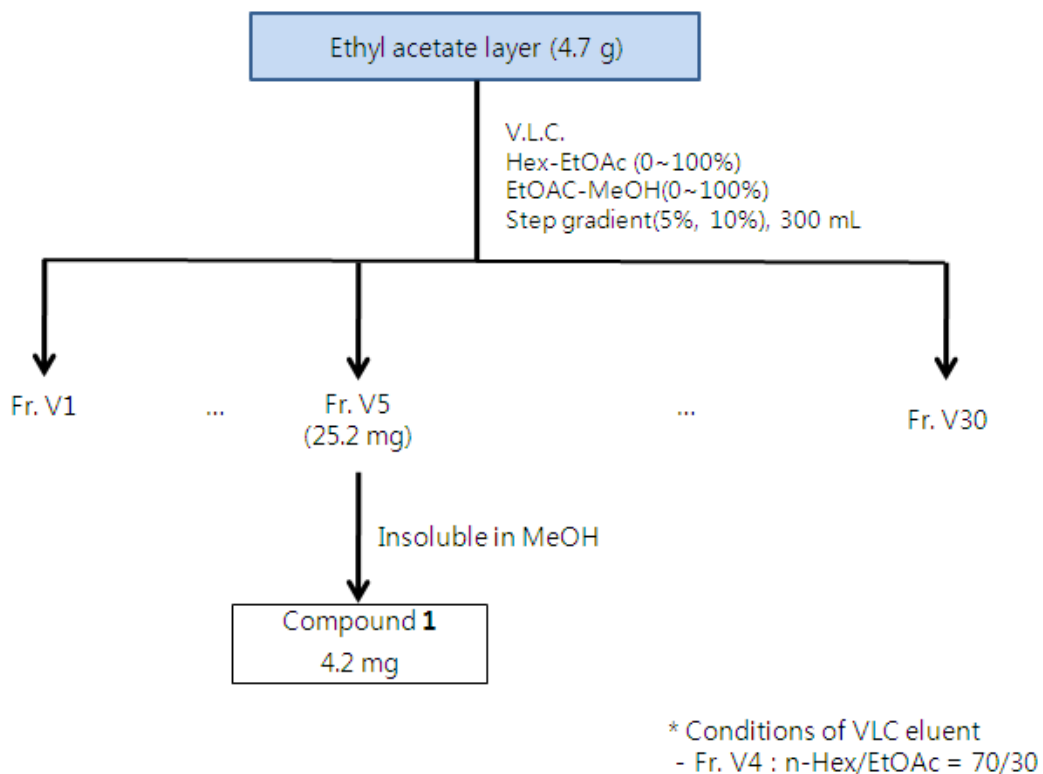


Scheme 1. Procedure of extraction and solvent fraction from *C. hallaisanensis*

3-2. Ethyl acetate layer의 활성 성분 분리

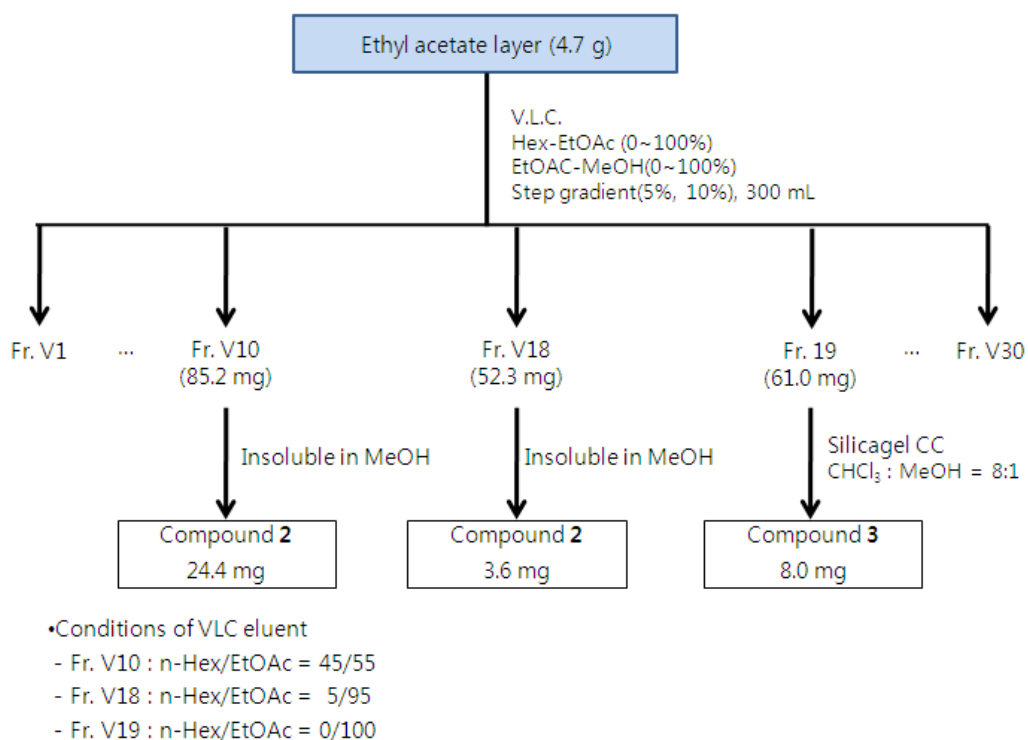
용매분획 후 얻어진 각 분획 층들 중 ethyl acetate layer 4.7 g을 분획하기 위하여 순상 silica gel로 충전한 glass column을 이용하여 vacuum liquid chromatography(VLC)를 수행하였다. Hex/EtOAc(0 ~ 100%), EtOAc/MeOH (0 ~ 100%)로 용매 극성을 5, 10%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하여 총 30개의 fraction을 얻었다(Fr. V1 ~ V30)

VLC fraction들 중 Fr. V5(30% EtOAc in Hex) 25.2 mg을 감압농축한 후 MeOH을 첨가하였을 때 녹지 않고 vial에 가라앉는 powder가 생성되었다. 이를 MeOH을 이용해 재결정하여 compound 1(4.2 mg)을 분리하였다(Scheme 2).



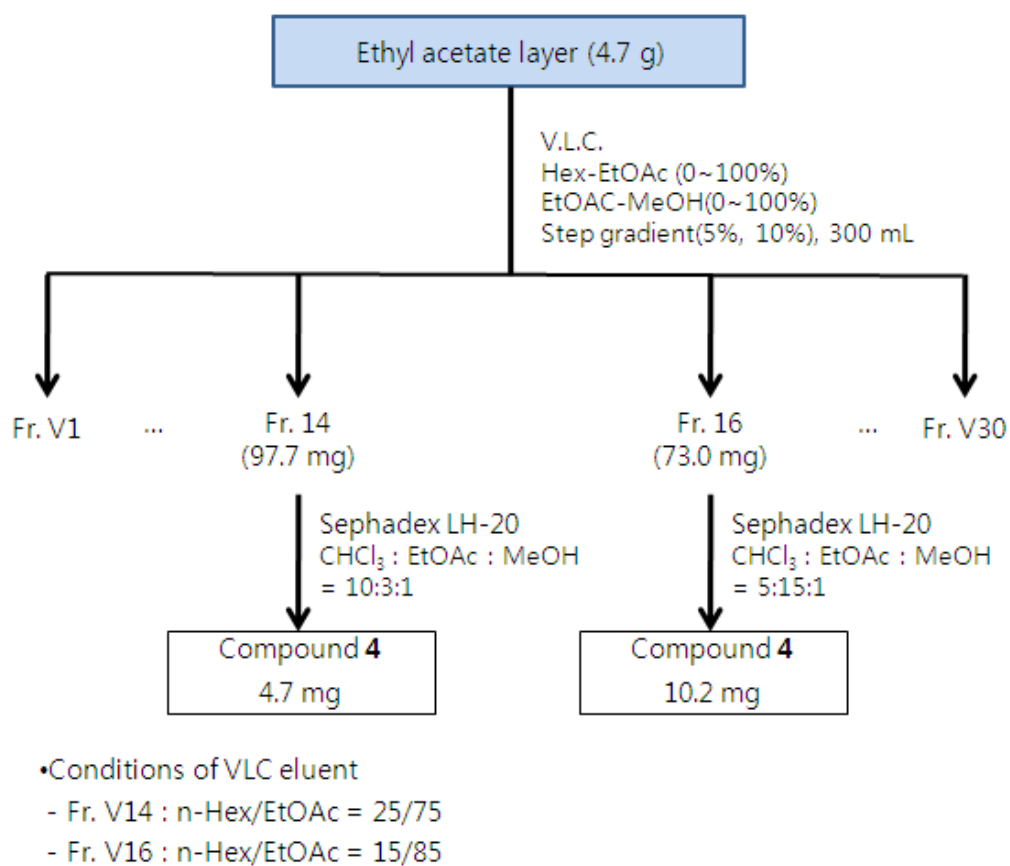
Scheme 2. Procedure of isolation of compound 1 from *C. hallaisanensis*

Fr. V10(55% EtOAc in Hex) 85.2 mg과 V18(95% EtOAc in Hex) 52.3 mg에 감압농축한 후 MeOH을 첨가하였을 때 녹지 않고 vial에 가라앉는 powder가 생성되었고, 이를 MeOH을 이용해 재결정하여 compound 2(3.6 mg)를 얻었다. 또한 Fr. V19(100% EtOAc) 61.0 mg을 CHCl₃:MeOH=8:1의 용매조건으로 순상 silica gel CC를 수행하여 compound 3(8.0 mg)을 분리하였다(Scheme 3).



Scheme 3. Procedure of isolation of compounds **2**, **3** from *C. hallaisanensis*

Fr. V14(75% EtOAc in Hex) 97.7 mg에서는 $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH} = 10:3:1$ 의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound 4(4.7 mg)을 분리하였고, Fr. V16(85% EtOAc in Hex) 73.0 mg은 $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}=5:15:1$ 의 용매조건으로 Sephadex LH-20 CC를 수행하여 compound 4(10.2 mg)를 분리하였다 (Scheme 4).



Scheme 4. Procedure of isolation of compound 4 from *C. hallaisanensis*

4. 활성실험

4-1. 항산화 활성 실험

4-1-1. 총 polyphenolic compounds 함량 측정

폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법¹⁶⁾을 약간 변형하여 실시하였다. 먼저 gallic acid 표준용액을 사용하여 폴리페놀 화합물의 정량을 위한 표준곡선으로 이용하였다. 표준곡선을 작성하기 위해 gallic acid 1 mg을 DMSO:EtOH =1:1 용액 1 mL에 녹여 stock solution을 제조하고, 이를 0, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 µg/mL이 되도록 묽혀 UV-Visible spectrophotometer로 700 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 각 시료들을 1 mg/mL 농도로 용매에 녹인 다음, 이 용액 100 µL를 micro tube에 취하고 증류수 900 µL를 가하여 total volume이 1 mL이 되도록 희석하였다. 여기에 100 µL Folin-ciocalteu's phenol reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에 3분간 방치하였다. 이 용액에 7% Na₂CO₃ 용액 200 µL를 가하여 혼합하고, 증류수 700 µL를 가하여 total volume이 2 mL이 되도록 희석하여 실온에서 1시간 방치한 뒤, 상등액을 취하여 위와 동일한 방법으로 700 nm에서 흡광도를 측정하고, 폴리페놀 화합물 함량을 환산하였다.

4-1-2. DPPH radical 소거 활성 실험

DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl,) radical 소거 활성 실험은 시료의 free radical 소거 능력이나 수소 공여 능력을 평가하는 방법 중에 하나이다. 대부분의 radicals는 반응성이 커서 매우 불안정하지만, DPPH radical은 안정한 free radical을 가진 물질로써 515 nm에서 강한 흡수를 나타내는 보라색의 화합물이다. 하지만 free radical을 소거할 수 있는 항산화제로부터 수소를 공여 받아 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine(DPPH-H)이 되면 노란색으로 변화되어 515 nm에서의 흡광도가 감소되므로, 이러한 원리를 이용하여 시료의 항산화 활성을 측

정할 수 있다(Figure 5).

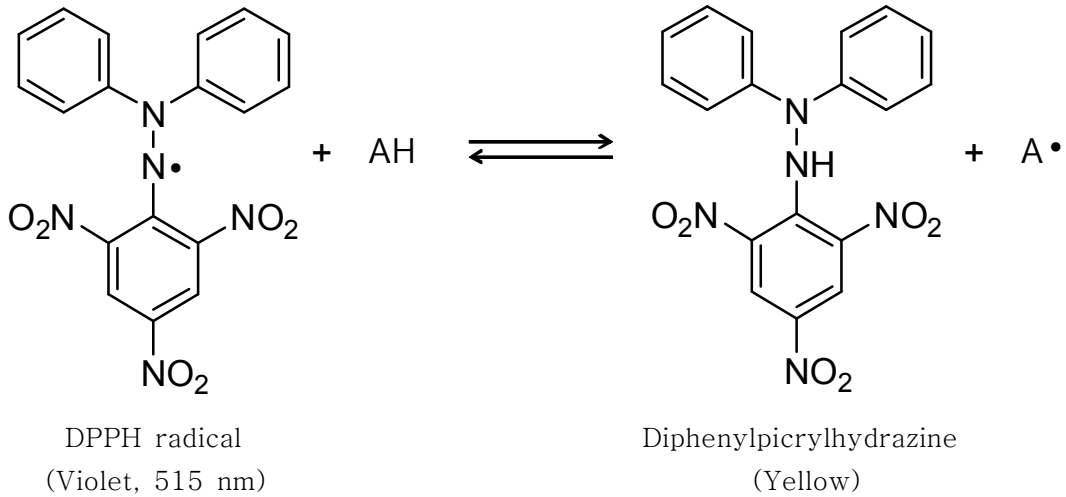


Figure 5. Scavenging of the DPPH radical by an anti-oxidant.

DPPH radical 소거 활성 실험은 Blois 방법¹⁷⁾을 응용하였고, 실험방법은 다음과 같다.

96 well plate에 농도별로 희석한 sample 용액 20 μ L(in EtOH)와 0.2 mM DPPH(in EtOH) 용액 180 μ L를 혼합하여 상온에서 25분간 반응시킨 후, ELISA Reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라디칼 소거율(%)은 다음의 식에 의해 계산되었으며, 각 시료의 소거활성 백분율이 50% 일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다. 대조군(positive control)으로는 vitamin C를 사용하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

A_{control} : 515 nm에서 DPPH의 흡광도

A_{sample} : 515 nm에서 sample과 DPPH 반응액의 흡광도

A_{blank} : 515 nm에서 sample 자체의 흡광도

4-1-3. ABTS radical cation 소거 활성 실험

ABTS[2,2'-Azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid)] radical 소거 활성 실험은 total antioxidant activity(TAC)의 측정방법 중의 한 가지로 무색의 환원된 ABTS가 산화되면 특징적인 청록색을 띠는 $ABTS^{\cdot+}$ (ABTS radical cation)이 형성되는 것을 이용한 방법이다. 이 청록색의 $ABTS^{\cdot+}$ 은 산화될 수 있는 물질과 반응하면 본래의 무색 ABTS로 환원되고 그와 반응한 물질의 산화가 일어나게 되어 흡광도의 감소가 일어나게 되면 항산화 능력을 측정할 수 있다.

ABTS radical cation 소거 활성은 Re, Pellegrin 등의 방법¹⁸⁾을 응용하였고, 실험방법은 다음과 같다.

ABTS radical cation을 만들기 위하여 7.0 mM ABTS(in D.W) 용액과 2.45 mM potassium persulfate(in D.W)용액을 1:1로 혼합하여 16시간동안 암소에서 반응시킨다. 반응 시킨 ABTS 용액과 ethanol을 1:60으로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78 ± 0.002 가 되도록 조절하여 실험에 사용하였다.

96 well plate에 농도별로 희석한 sample 용액 20 μ L(in EtOH)와 ABTS 용액 180 μ L를 혼합하여 15분간 암소에서 반응시킨 후, ELISA Reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라디칼 소거율(%)은 다음의 식에 의해 계산되었으며, 각 시료의 소거활성 백분율이 50% 일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다. 대조군(positive control)으로는 vitamin C를 사용하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

A_{control} : 700 nm에서 ABTS의 흡광도

A_{sample} : 700 nm에서 sample과 ABTS 반응액의 흡광도

A_{blank} : 700 nm에서 sample 자체의 흡광도

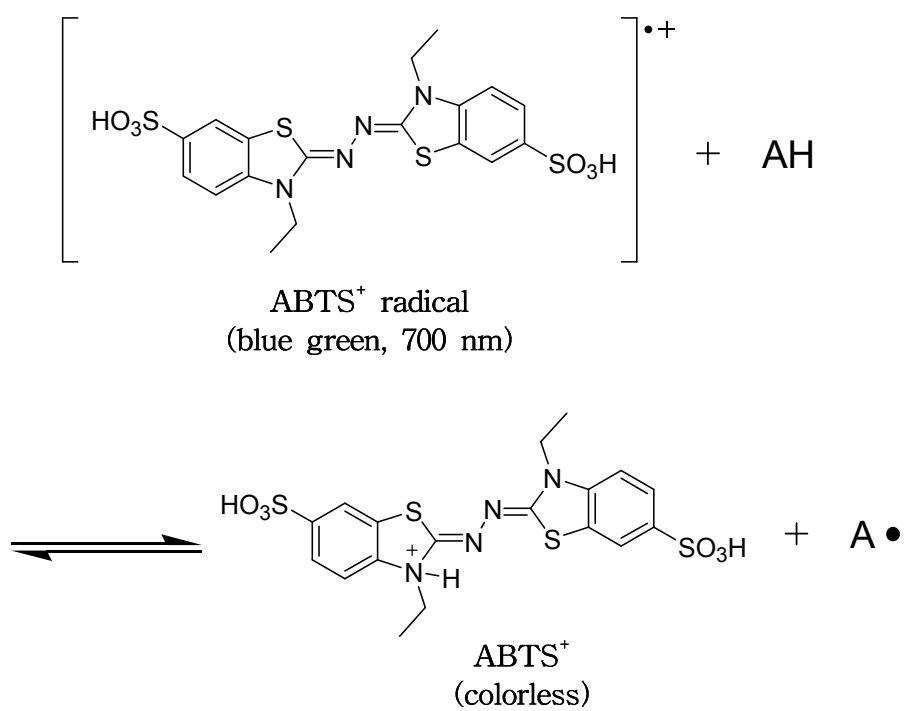


Figure 6. Scavenging of $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical by an anti-oxidant.

4-2. RAW 264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험

4-2-1. 세포배양

마우스 대식세포 계열(Murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 1% penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GIBCO, Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건에서 배양하였으며, 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

4-2-2. Nitric oxide 생성 억제 평가

24 well plate에 RAW 264.7 cells를 2×10^5 cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator 조건하에서 18시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 전 배양시킨 cells을 1 µg/mL LPS가 포함된 배지로 교환 후, sample을 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid)을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 µL와 Griess 시약 100 µL를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite(NaNO₂)를 이용하여 검정곡선을 작성하여 비교하였다.

4-2-3. 세포독성 평가

MTT[3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay는 RAW 264.7 cell을 24 well plate에 2×10^5 cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18시간 배양 후, 1 µg/mL LPS와 sample을 농도별로 각각 첨가하여 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후, 500 µg/mL 농도로 (MTT)를 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후, 상층액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시킨 다음, 이를 96 well plate에 옮긴 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음의 식에 의해 계산되었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{control} : 570 nm에서 용매와 LPS를 처리한 control의 흡광도

A_{sample} : 570 nm에서 시료와 LPS를 처리한 sample의 흡광도

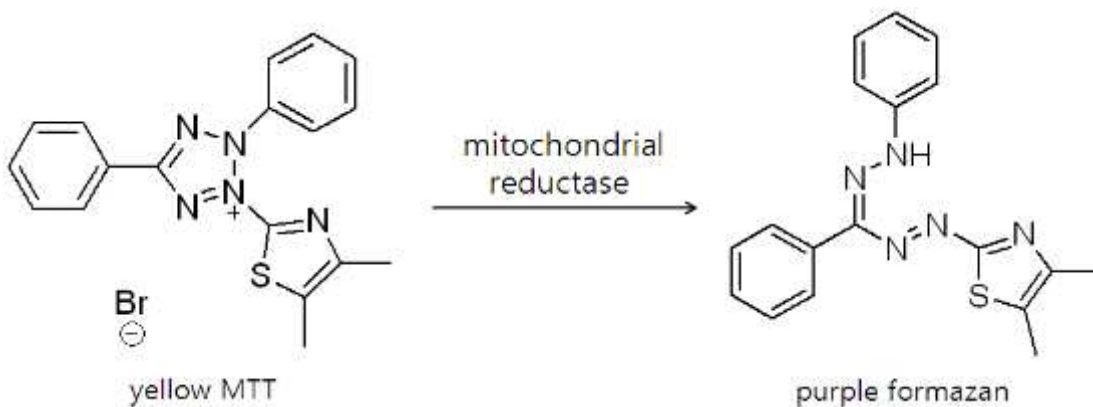


Figure 7. Principle of MTT assay.

III. 결과 및 고찰

1. 화합물의 구조 결정

1-1. Compound 1의 구조해석

Compound 1은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 분석 결과 δ 5.36(1H, d, $J = 5.3$ Hz)의 signal로부터 sp^2 혼성을 갖는 olefin 구조의 proton을 예상하였고, δ 3.55(1H, m)의 signal로부터 산소에 인접한 위치의 methine으로 예상하였다. δ 2.30 ~ 1.00에서 다수의 methylene과 methine proton signal을 확인하였고, δ 0.69(3H, s), δ 1.01(3H, s)에서 2개의 singlet, δ 0.82(3H, d, $J = 6.9$ Hz), δ 0.85(3H, d, $J = 7.1$ Hz), δ 0.93(3H, d, $J = 6.6$ Hz)에서 3개의 doublet, δ 0.87(3H, t, $J = 7.8$ Hz)에서 1개의 triplet으로 총 6개의 methyl proton signal을 확인하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석결과 탄소수가 29개이고 δ 20.0, 19.6, 19.2, 19.0, 12.2, 12.0에서 6개의 methyl carbon이 있는 것을 통해 sterol계통의 화합물임을 예상하였다. δ 141.0, δ 121.6을 통하여 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 예상한 olefin carbon과, δ 72.0에서 산소에 인접한 methine carbon을 확인하였다. 이를 바탕으로 compound 1은 문헌¹⁹⁾과 비교하여 대부분의 식물에 함유되어 있는 sterol인 β -sitosterol로 동정하였다(Figure 8).

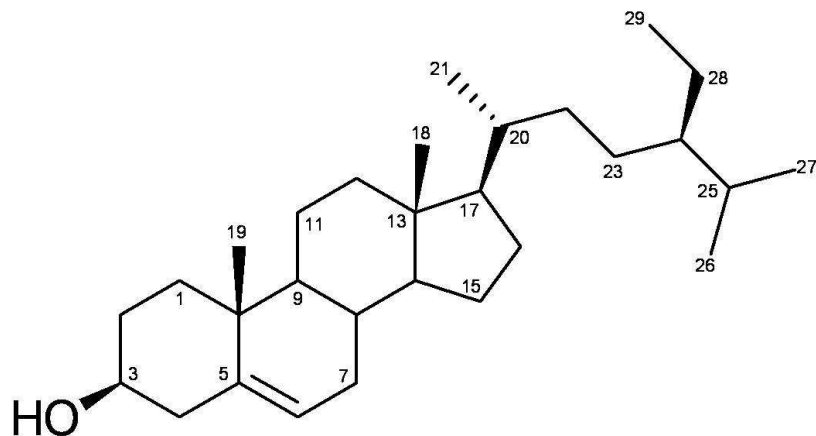


Figure 8. Chemical structure of compound 1

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **1** (100 and 400 MHz, CDCl_3)

No.	Compound 1	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	37.4	
2	29.9	
3	72.0	3.55(1H, m)
4	42.5	
5	141.0	
6	121.6	5.36(1H, d, 5.3)
7	32.1	
8	31.9	
9	50.3	
10	36.7	
11	21.3	
12	40.0	
13	42.5	
14	57.0	
15	24.5	
16	28.4	
17	56.2	
18	12.0	0.69(3H, s)
19	20.0	1.01(3H, s)
20	36.4	
21	19.0	0.93(3H, d, 6.6)
22	34.1	
23	26.2	
24	46.0	
25	29.3	
26	19.6	0.85(3H, d, 7.1)
27	19.2	0.82(3H, d, 6.9)
28	23.3	
29	12.2	0.87(3H, t, 7.8)

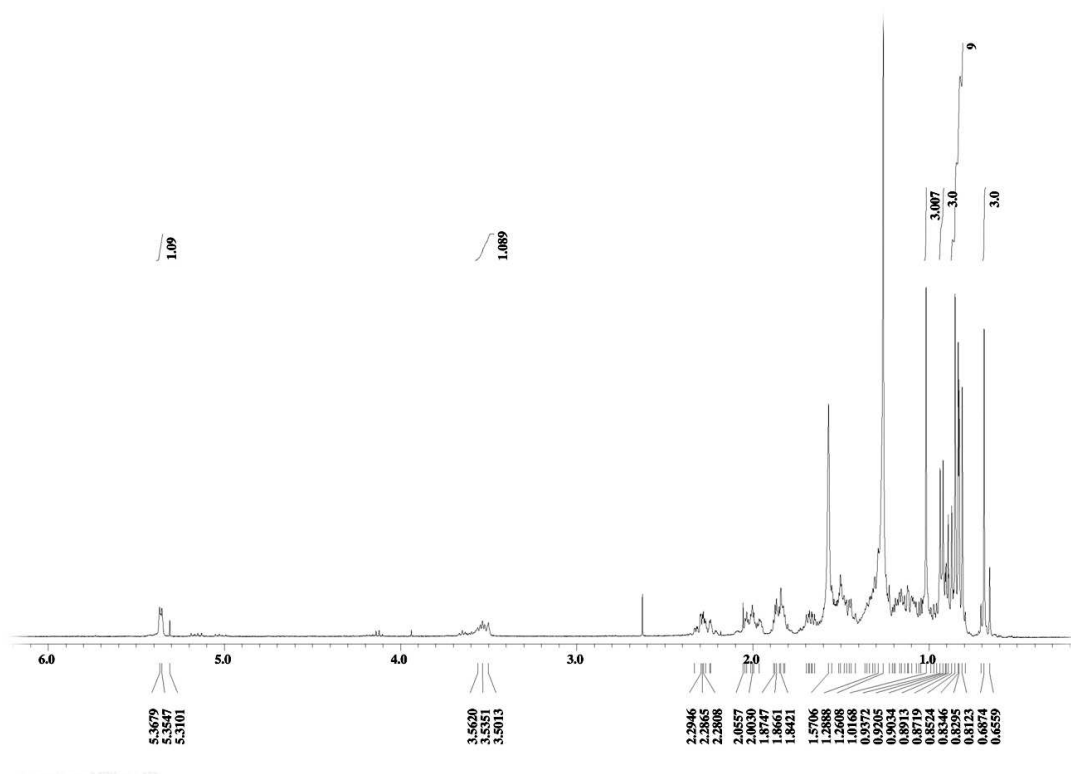


Figure 9. ^1H -NMR spectrum of compound **1** in CDCl_3

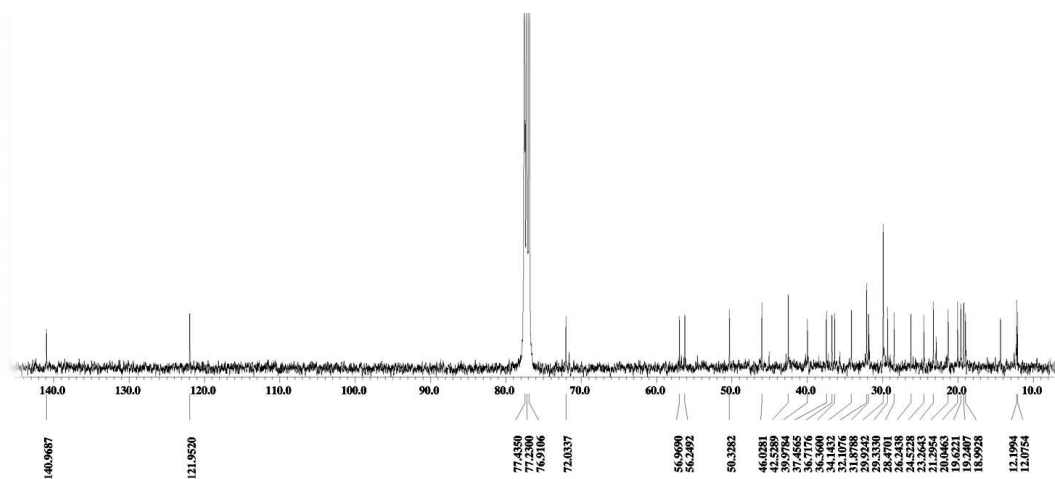


Figure 10. ^{13}C -NMR spectrum of compound **1** in CDCl_3

1-2. Compound 2의 구조해석

Compound 2는 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 분석 결과 δ 3.98(1H, s), 4.03 (3H, s), 4.04(3H, s)의 signal로부터 전기음성도가 큰 산소와 결합한 sp^3 혼성을 갖는 methoxy기가 3개 있음을 예상하였다. 또한 7.57(1H, s), 7.49(1H, s)의 signal에서는 aromatic ring에 결합해 있는 proton으로 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석결과 탄소 수는 17개 이상으로 예측되며, 56.7, 61.0, 61.3의 signal로 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 예상하였던 3개의 methoxy기를 확인하였다. 158.5와 158.3의 signal은 carbonyl값에 shielding된 값으로 보아 ester기임을 예상하였고, 107.4 ~ 153.8의 12개의 signal들은 aromatic ring의 signal임을 확인하였다. 이를 바탕으로 문헌²⁰⁾과 비교하여 gallic acid 두 개가 결합하여 형성된 ellagic acid의 한 종류인 3,3',4'-tri-*O*-methylellagic acid로 동정하였다(Figure 11).

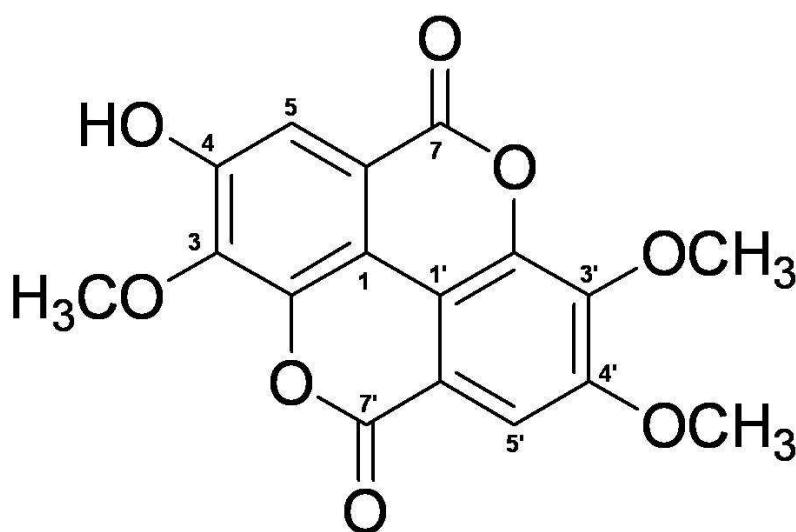


Figure 11. Chemical structure of compound 2

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **2** (100 and 400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

No.	Compound 2	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	113.3	
2	141.6	
3	140.8	
4	153.8	
5	111.8	7.57(1H, s)
6	111.6	
7	158.5	
1'	112.4	
2'	140.9	
3'	140.1	
4'	152.7	
5'	107.4	7.49(1H, s)
6'	111.1	
7'	158.3	
OCH_3-3	61.3	4.04(3H, s)
OCH_3-3'	61.0	4.03(3H, s)
OCH_3-4'	56.7	3.98(3H, s)

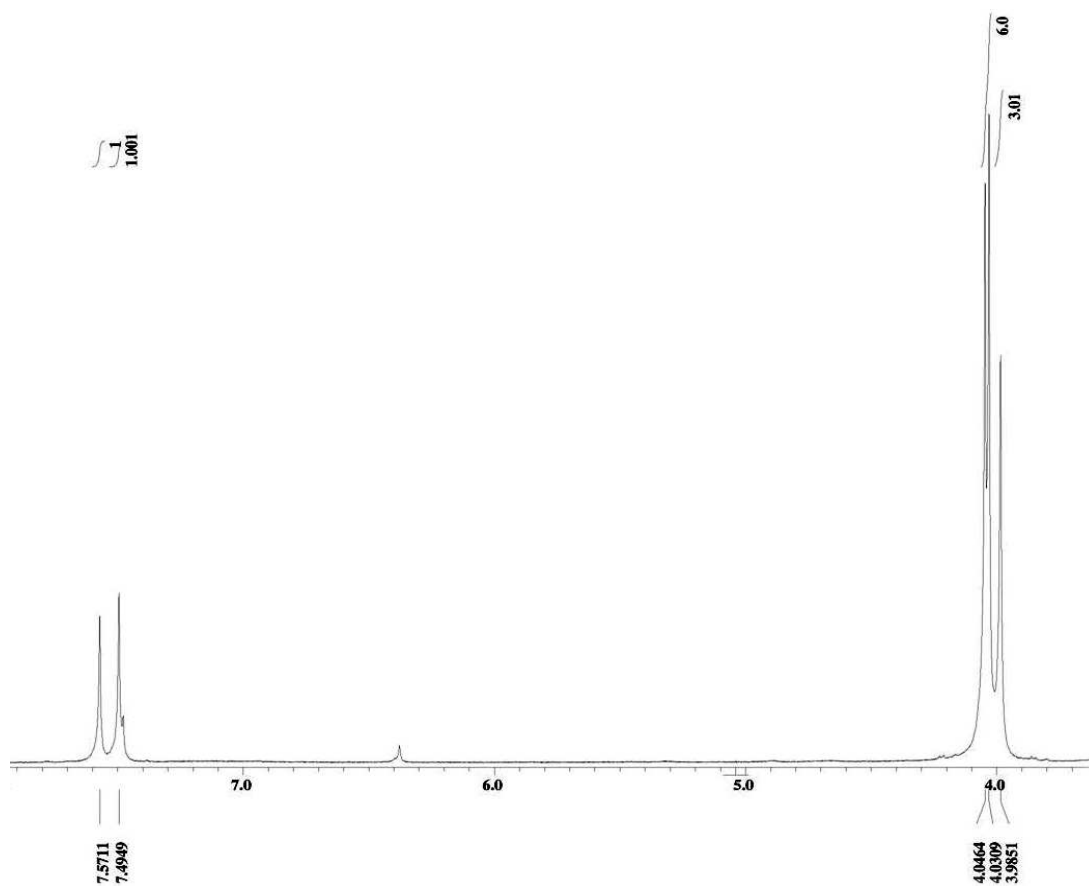


Figure 12. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **2** in $\text{DMSO-}d_6$

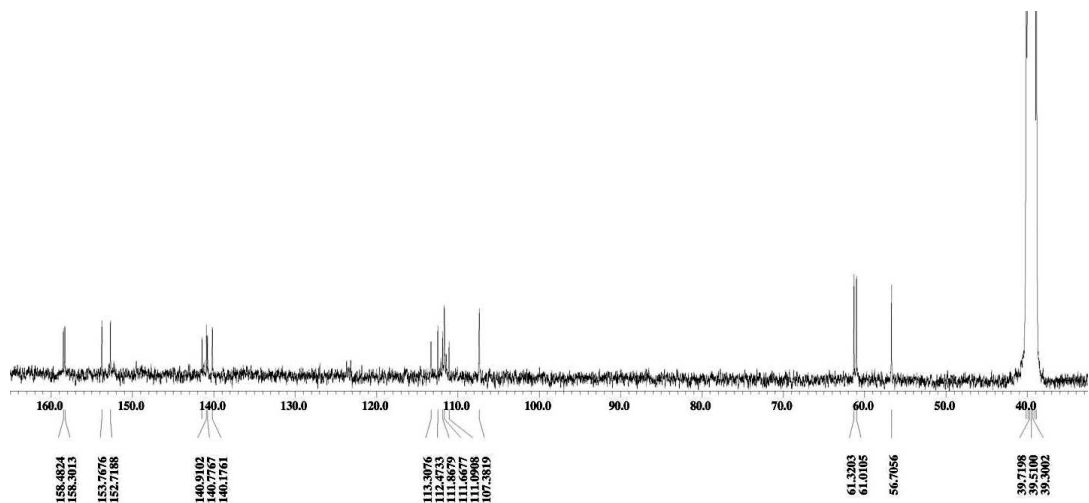


Figure 13. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **2** in $\text{DMSO-}d_6$

1-3. Compound 3의 구조해석

Compound 3은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 분석 결과 δ 6.79(1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.05(1H, dd, $J = 8.2, 2.4$ Hz), 6.77(1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.00(1H, dd, $J = 8.0, 2.4$ Hz)의 signal들은 sp^2 혼성을 갖는 proton들로 이 signal들의 coupling constant값을 통해서 proton들 간의 *ortho*-, *meta*- coupling을 하고 있는 2개의 aromatic ring이 있음을 예상하였다. 또한, 4.00(2H, m), 4.44(1H, dd, $J = 6.4, 2.2$ Hz)의 signal을 통하여 전기음성도가 큰 산소가 결합에 있는 proton으로 예상 할 수 있었다. 2.88(1H, dd, $J = 15.9, 9.2$ Hz)과 2.98(1H, dd, $J = 16.0, 3.0$ Hz), 2.87(1H, d, $J = 15.6, 6.6$ Hz)과 3.53(1H, d, $J = 15.6$ Hz), 2.75(1H, dd, $J = 18.8, 8.6$ Hz)와 3.74(1H, d, $J = 19.6$ Hz) signal들은 각각 15.6 ~ 19.6 Hz의 큰 coupling constant 값으로 보아 각각 같은 탄소에 결합한 geminal proton임을 예상하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석 결과, 탄소수가 19개이고, δ_{C} 218.8의 deshielding된 값으로 보아 carboxyl carbon에서도 ketone류 임을 예상 하였다. δ_{C} 69.3, 73.8, 78.2의 signal은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 예상하였던 전기음성도가 큰 산소가 결합에 있는 methine carbon임을 확인하였다. δ_{C} 117.4 ~ 153.7의 12개의 signal은 2개의 aromatic ring signal임을 확인하였고, 이 중 δ_{C} 153.5, 153.7의 signal은 전기음성도가 큰 hydroxyl group이 결합되어 있을 것으로 예상 하였다.

^1H 과 ^{13}C NMR data외에 2D-NMR인 HMQC, COSY, HMBC spectrum의 data를 비교한 결과, 두 개의 aromatic ring에 aliphatic chain이 결합되어 있는 구조인 diarylheptanoid 계열의 화합물로서, HMBC spectrum에서 aromatic ring의 δ_{H} 6.56(1H, s)의 proton signal이 또 다른 aromatic ring의 carbon인 δ_{C} 135.1과 연결 관계가 나타나는 것으로 보아 고리 형태의 diaryl heptanoid 화합물로 예상되었다. 이러한 결과를 바탕으로 문헌²¹⁾과 비교한 결과 compound 5는 carpinontriol B로 동정하였다(Figure 14).

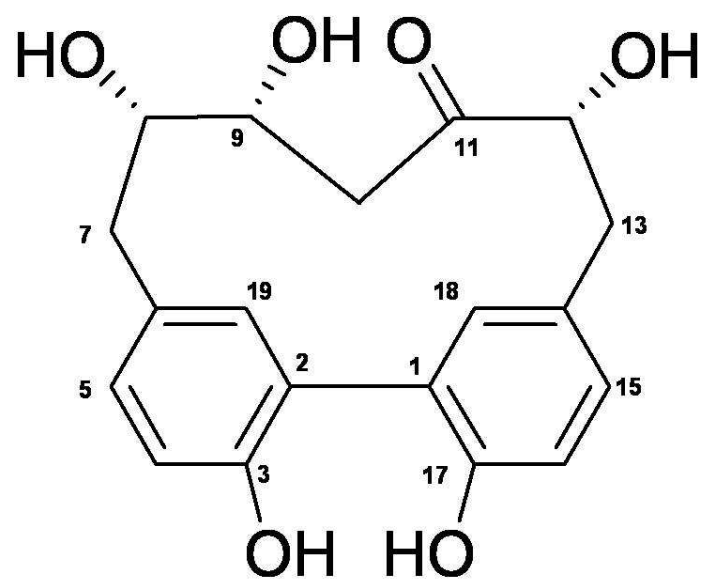


Figure 14. Chemical structure of compound 3

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **3** (100 and 400 MHz, CD_3OD)

No.	Compound 3	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	128.2	
2	127.5	
3	153.5	
4	117.4	6.79(1H, d, 8.0)
5	130.9	7.05(1H, dd, 8.0, 2.4)
6	130.3	
7	39.6	2.88(1H, dd, 15.9, 9.2) 2.98(1H, dd, 16.0, 3.0)
8	69.3	4.07 ~ 4.00(m)
9	73.8	4.07 ~ 4.00(m)
10	47.0	2.75(1H, dd, 18.8, 8.6) 3.74(1H, d, 19.6)
11	218.8	
12	78.2	4.44(1H, dd, 6.4, 2.2)
13	39.5	2.87(1H, d, 15.6, 6.6) 3.53(1H, d, 15.6)
14	129.7	
15	131.6	7.00(1H, dd, 8.0, 2.4)
16	117.1	6.77(1H, d, 8.0)
17	153.7	
18	135.1	6.56(1H, d, 2.0)
19	135.6	6.65(1H, d, 2.0)

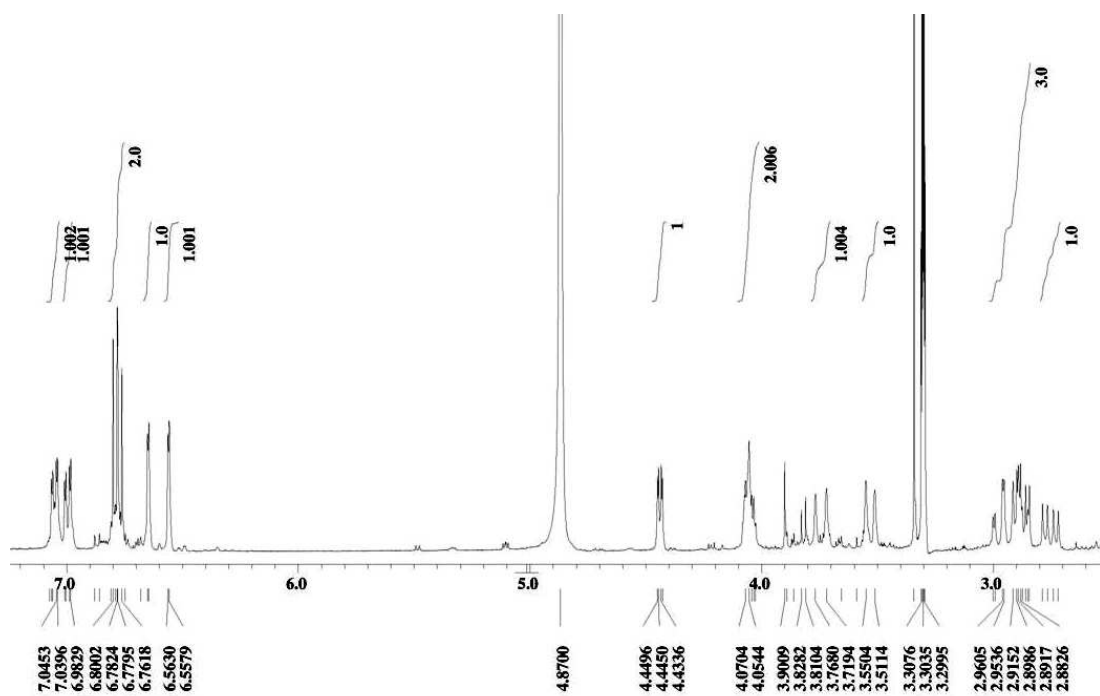


Figure 15. ^1H -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD

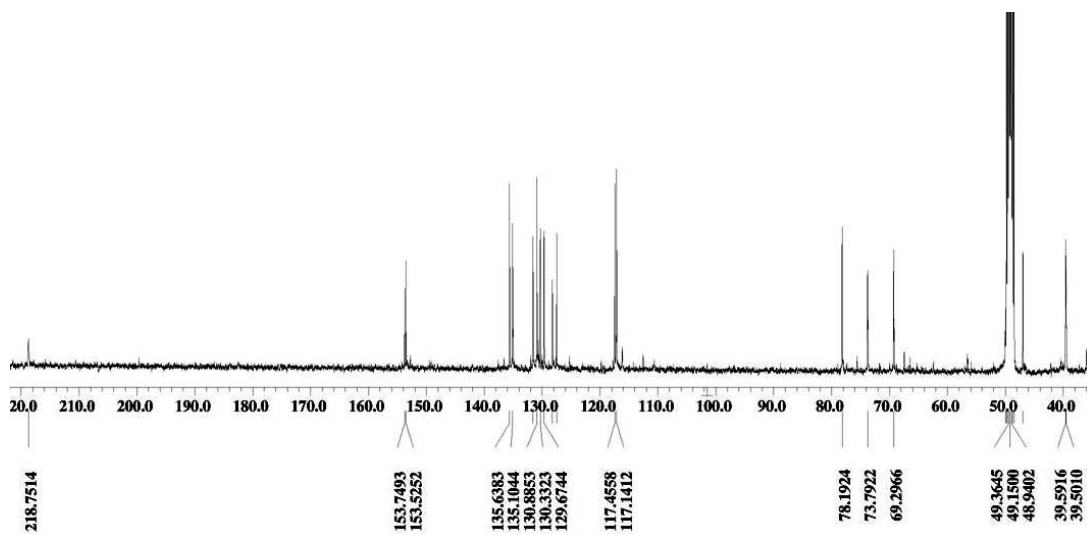


Figure 16. ^{13}C -NMR spectrum of compound **3** in CD_3OD

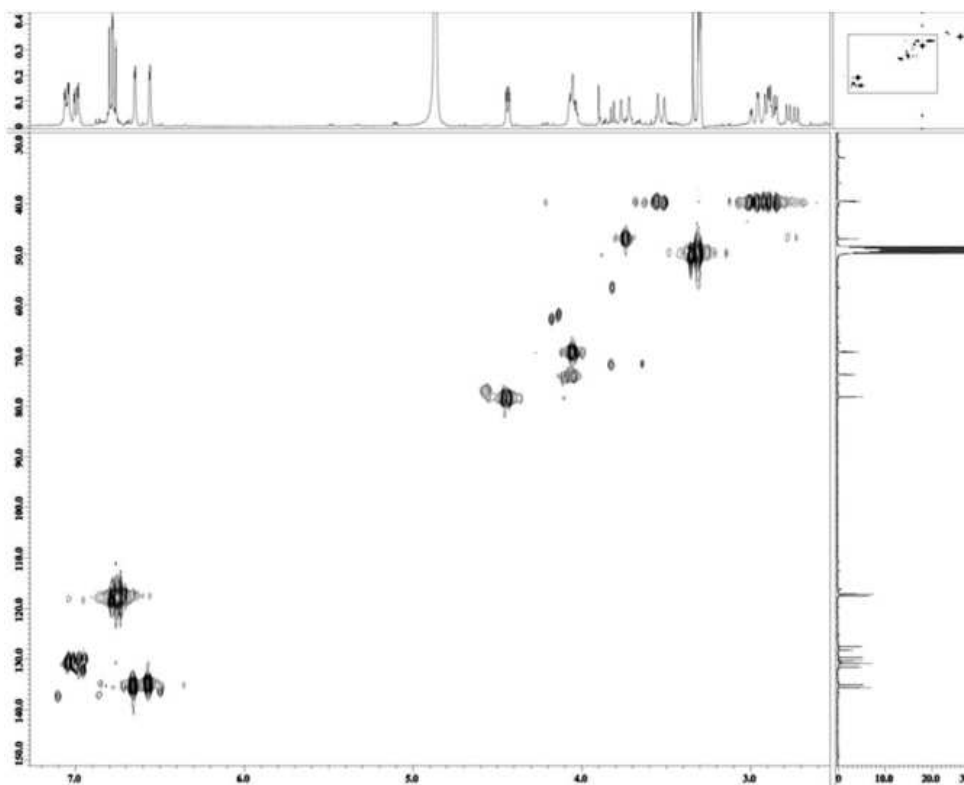


Figure 17. HMQC spectrum of compound **3** in CD₃OD

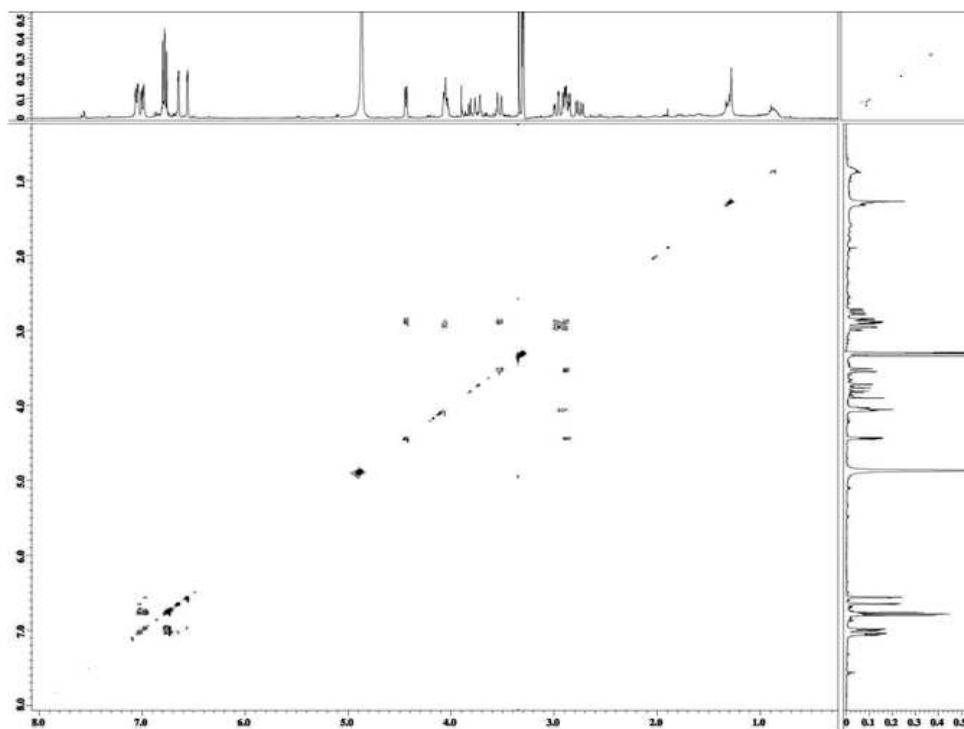


Figure 18. ¹H-¹H COSY spectrum of compound **3** in CD₃OD

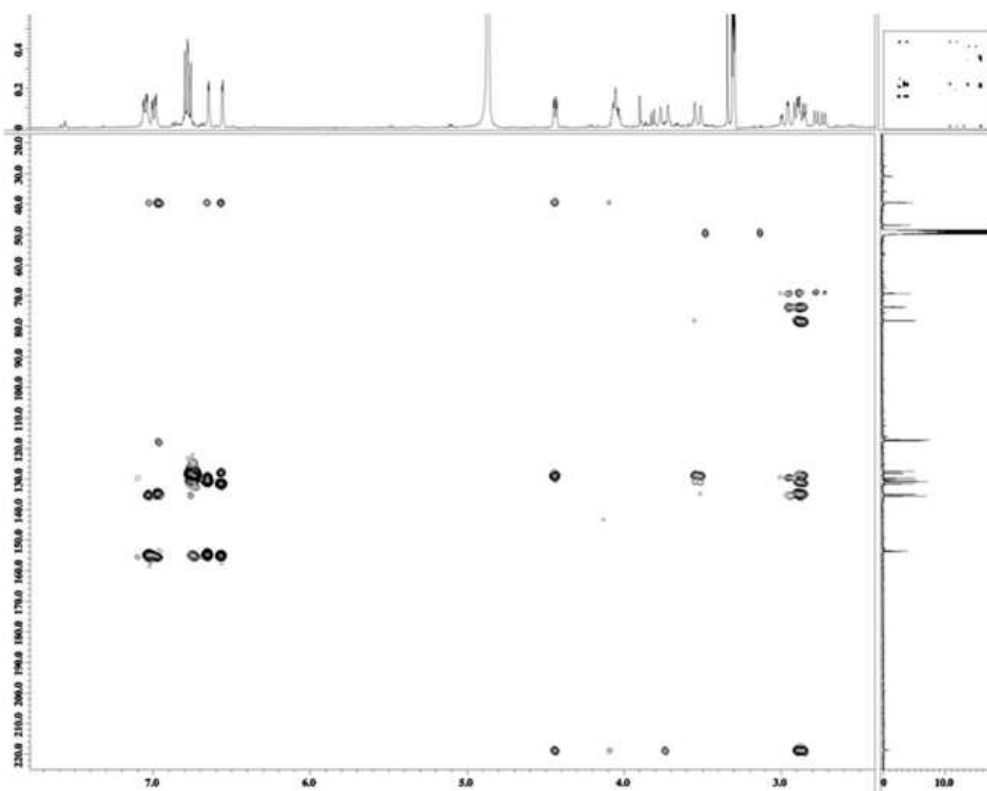


Figure 19. HMBC spectrum of compound 3 in CD₃OD

1-4. Compound 4의 구조해석

Compound 4는 $^1\text{H-NMR}$ spectrum 분석 결과, δ 7.05(1H, dd, $J = 8.2, 2.5$ Hz), 6.79(1H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.76(1H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.99(1H, dd, $J = 8.1, 2.2$ Hz)의 sp^2 혼성을 갖는 proton들로부터 coupling constant값을 통하여 proton들 간의 *ortho*-, *meta*- coupling을 하고 있는 2개의 aromatic ring이 있음을 예상하였다. 또한, 4.73(1H, dd, $J = 11.8, 4.5$ Hz), 3.91(1H, d, $J = 10.1$ Hz), 4.23(1H, d, $J = 10.1$ Hz)의 signal을 통하여 전기음성도가 큰 산소가 결합해 있는 proton으로 예상 할 수 있었다. 3.54(1H, ddd, $J = 20.0, 12.7, 2.1$ Hz), 3.05(1H, dd, $J = 15.9, 4.5$ Hz) signal의 20.0과 15.9의 큰 coupling constant 값으로 보아 같은 탄소에 결합한 geminal proton이 2개 이상 있음을 예상하였다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 분석 결과, 탄소수가 19개이고, 215.7의 deshielding된 값으로 보아 carboxyl carbon에서도 ketone류 임을 예상 하였다. 68.7, 69.9, 78.8의 signal은 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 예상하였던 전기음성도가 큰 산소가 결합에 있는 methine carbon임을 확인하였다. δ_c 117.2 ~ 153.6의 12개의 signal은 2개의 aromatic ring signal임을 확인하였고, 이 중 152.8, 153.6의 signal은 전기음성도가 큰 hydroxyl group이 결합되어 있을 것으로 예상 하였다. 이러한 결과를 바탕으로 문헌²¹⁾과 비교하여 compound 4는 carpinontriol B로 동정하였다.(Figure 20)

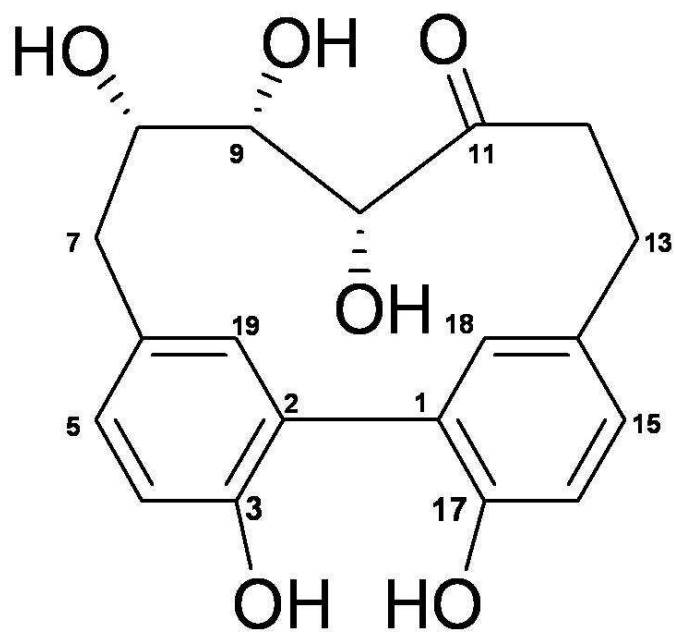


Figure 20. Chemical structure of compound 4

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **4** (100 and 400 MHz, CD_3OD)

No.	Compound 4	
	δ_{C}	δ_{H} (int, multi, J Hz)
1	127.0	
2	127.9	
3	153.6	
4	117.3	6.76(1H, d, 8.2)
5	130.6	6.99(1H, dd, 8.1, 2.2)
6	130.3	
7	37.1	3.05(1H, dd, 15.9, 4.5) 2.85(1H, m)
8	68.7	4.73(1H, dd, 11.8, 4.5)
9	69.9	3.91(1H, d, 10.1)
10	78.8	4.23(1H, d, 10.1)
11	215.7	
12	37.7	3.54(1H, ddd, 20.0, 12.7, 2.1) 2.93(1H, m)
13	25.3	3.14(1H, m) 2.82(1H, m)
14	130.9	
15	129.4	7.05(1H, dd, 8.2, 2.5)
16	117.2	6.79(1H, d, 8.2)
17	152.8	
18	135.0	6.36(1H, s)
19	134.8	6.66(1H, s)

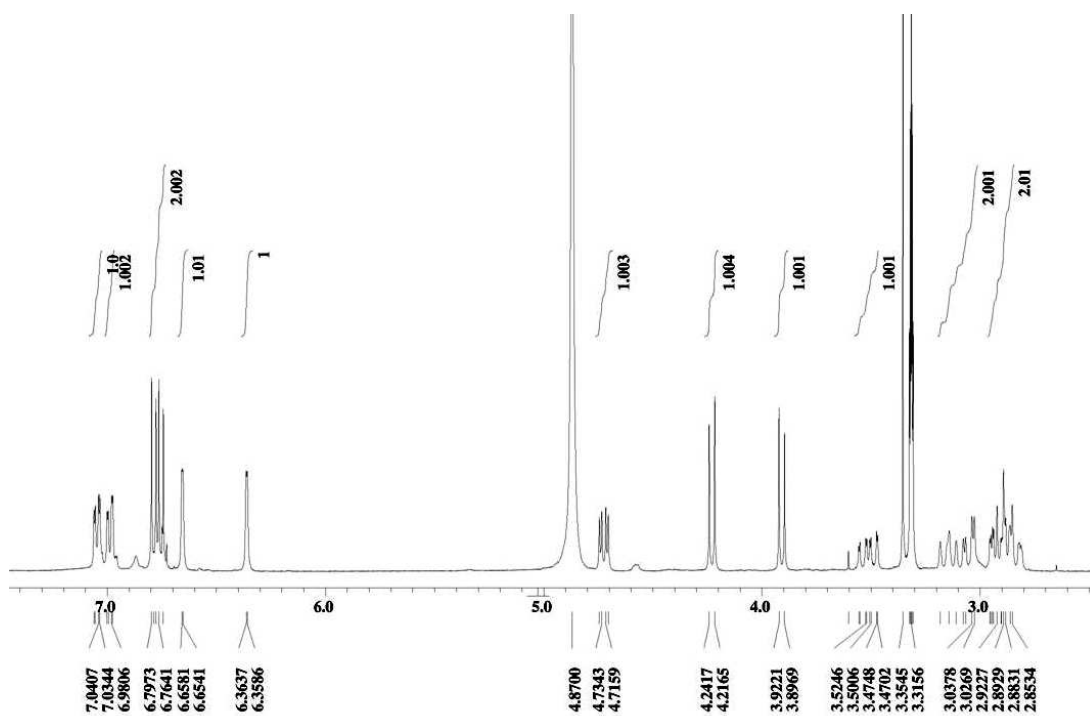


Figure 21. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **4** in CD_3OD

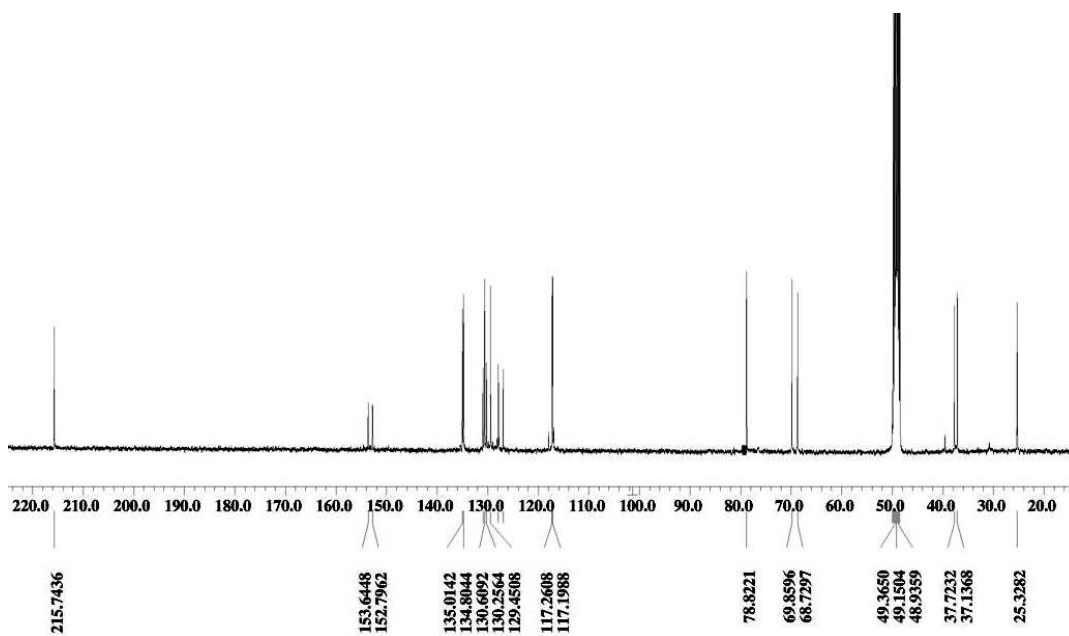


Figure 22. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **4** in CD_3OD

2. 항산화 활성 실험 결과

2-1. 총 polyphenolic compounds 함량 측정

Polyphenolic compounds는 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사물의 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 가지며 항암 및 항산화 효과와 같은 다양한 생리활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있다.²²⁾

Gallic acid 표준용액을 사용한 검정곡선을 작성하여 병개암나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 총 polyphenolic compounds 함량을 측정하였으며, 추출물 및 분획물의 중량 1 mg 당 함유하고 있는 gallic acid 의 양(GAE)으로 환산하여 나타내었다. 실험 결과, 추출물에서 289 μg GAE/1 mg, 분획물 중 EtOAc 및 *n*-BuOH layer에서 각각 367, 421 μg GAE/1 mg으로 비교적 높은 polyphenolic compounds 함량을 나타내었다.(Figure 19). 이는 다른 항산화 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상되었다.

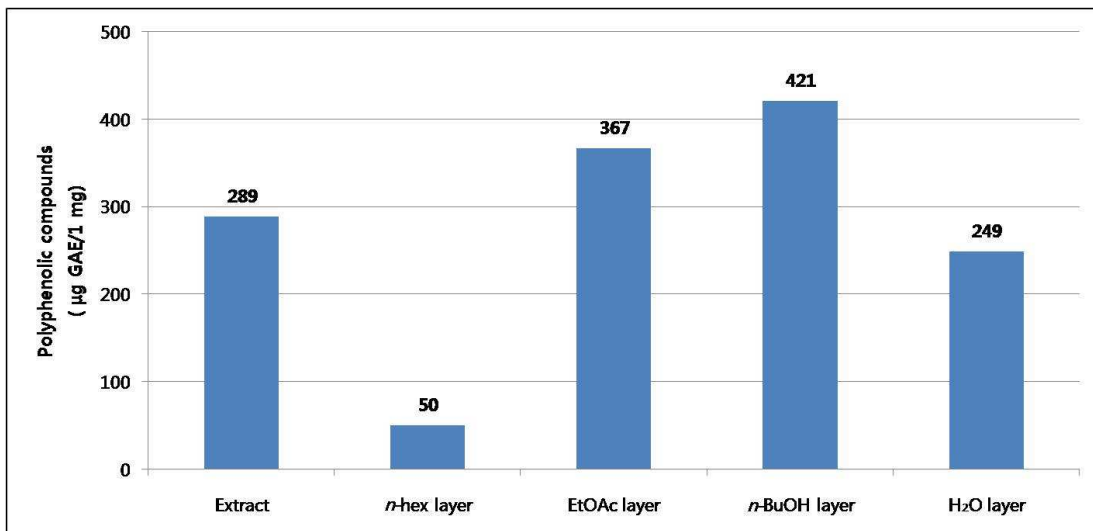


Figure 23. Total polyphenolic compounds of extract and solvent layers.

2-2. DPPH radical 소거 활성

2-2-1. 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성

병개암나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 추출물과 각각의 분획물에 대하여 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 실험을 실시하여 SC₅₀ 값을 계산하였다(Figure 24, 25).

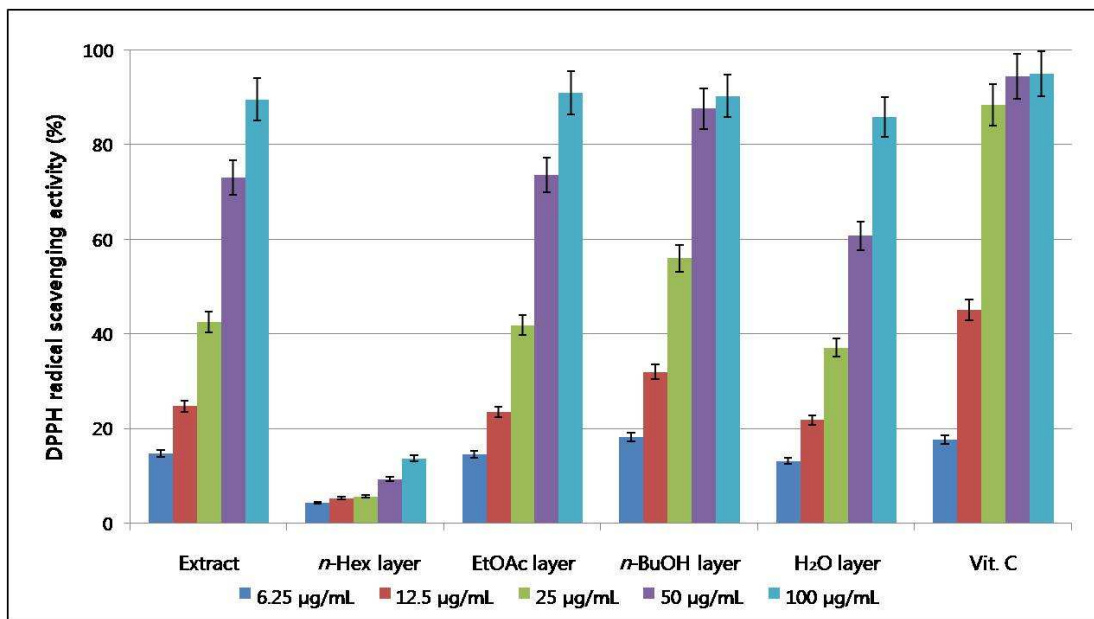


Figure 24. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers

그 결과, *n*-Hex layer를 제외하고, 추출물 31.7 µg/mL, EtOAc layer 31.9 µg/mL, *n*-BuOH layer 23.3 µg/mL, H₂O layer 39.1 µg/mL로 대조군인 vitamin C(14.5 µg/mL) 만큼의 좋은 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다.

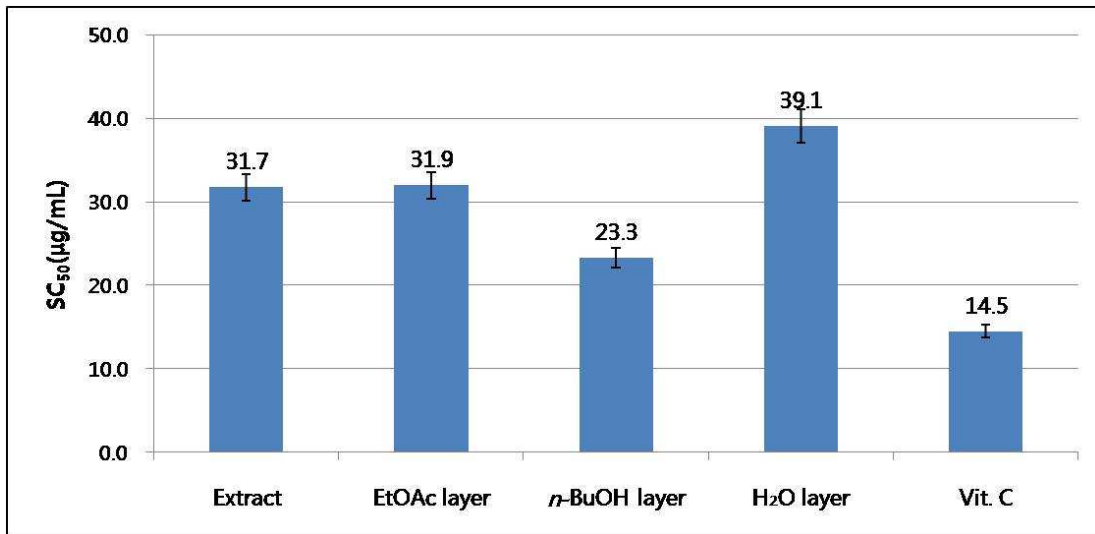


Figure 25. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers.

2-3. ABTS radical cation 소거 활성

2-3-1. 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성

병개암나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성을 측정하였다. 추출물과 나머지 분획물에 대하여 6.26, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 실험을 실시하여 SC₅₀ 값을 계산하였다. 그 결과, 추출물에서 12.3 µg/mL, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O layer에서 각각 9.1, 8.3, 16.5 µg/mL로 대조군인 vitamin C(5.9 µg/mL)만큼 좋은 ABTS radical cation 소거 활성을 나타내었다(Figure 26, 27).

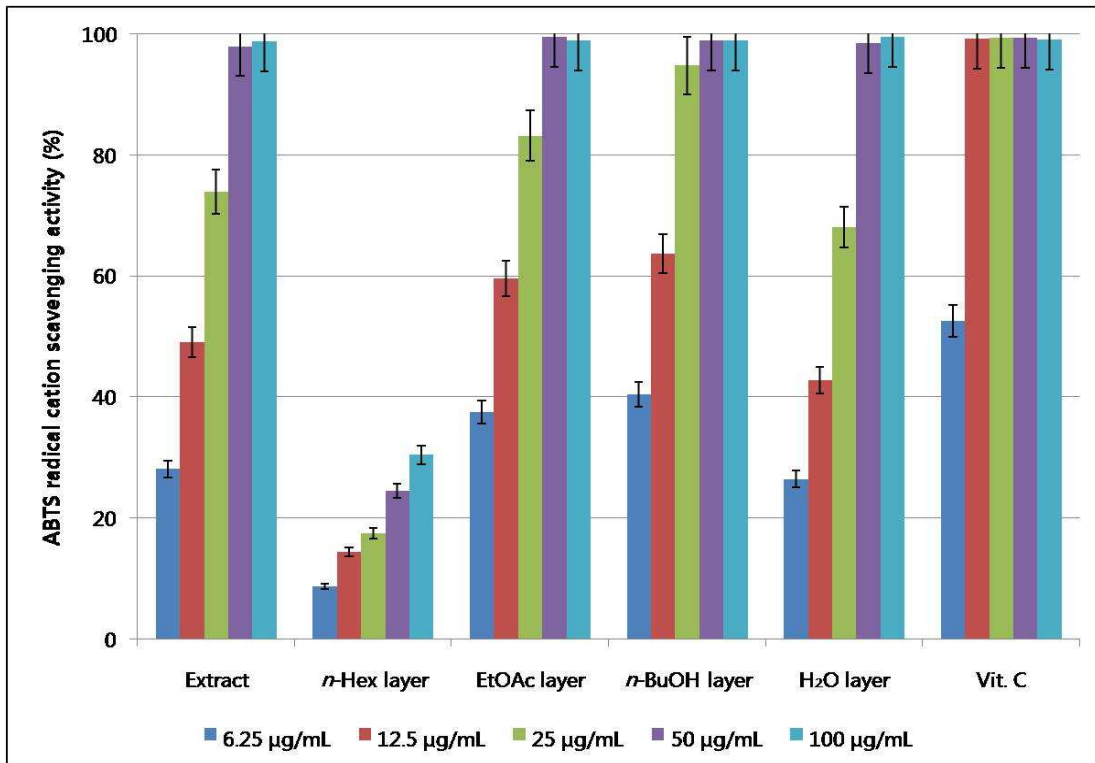


Figure 26. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers

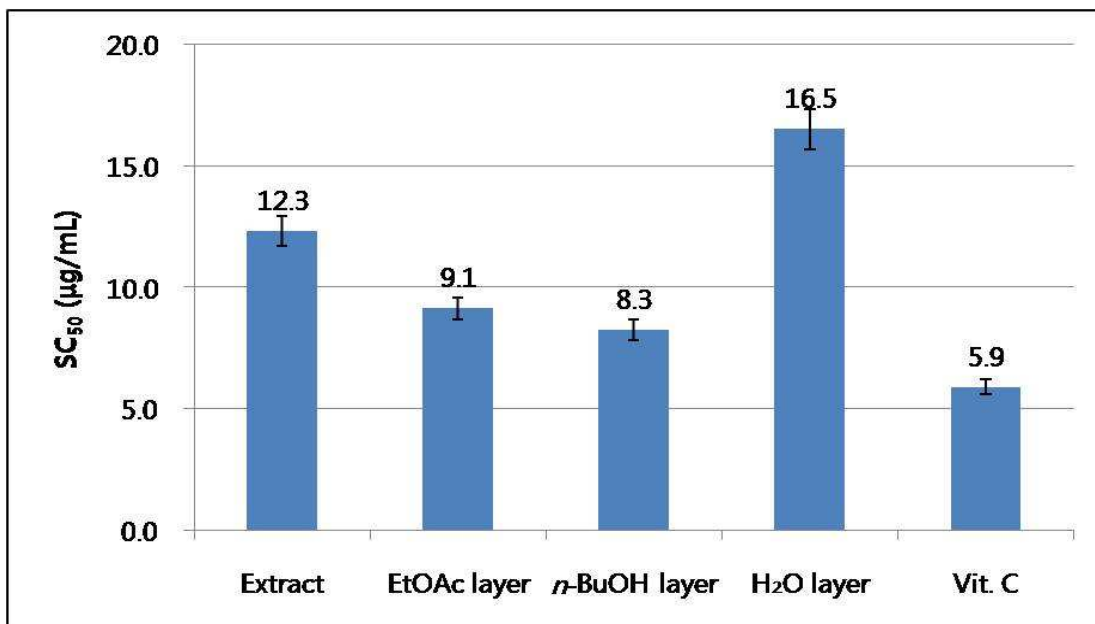


Figure 27. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers

2-3-2. 분리된 화합물의 ABTS radical cation 소거 활성

병개암나무 가지로부터 분리된 화합물의 ABTS radical cation 소거활성을 측정하였다. 각각의 화합물에 대하여 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 300 μ M의 농도로 실험을 진행하여 SC₅₀ 값을 계산하였다(Table 5, Figure 28).

Table 5. SC₅₀ value of ABTS⁺ radical scavenging activities of isolated compounds.

Compound NO.	Compound name	SC ₅₀ (μ M)
1	β -sitosterol	> 300
2	3,3',4'-tri- <i>O</i> -methylellagic acid	226.3
3	carpinontriol A	19.3
4	carpinontriol B	12.9
positive control	vitamin C	45.4

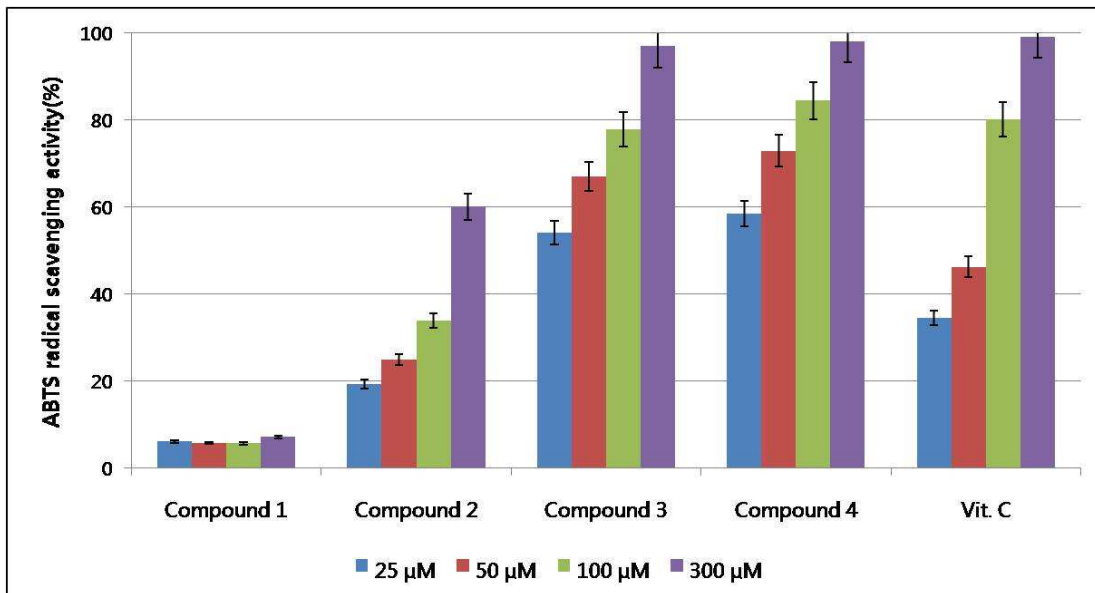


Figure 28. ABTS⁺ radical scavenging activities of compounds and vitamin C

그 결과 compound **2**, **3**, **4**의 SC₅₀값이 각각 226.3, 19.3, 12.9 μ M로 나왔고, compound **3**과 **4**는 대조군인 vitamin C(45.4 μ M)보다 좋은 값을 갖는 것으로 확인되어 이들 화합물들이 우수한 radical 소거 활성 능력을 가짐을 확인 할 수 있었다.

3. 항염 활성 실험 결과

3-1. 추출물 및 분획물의 Nitric oxide 생성 억제 및 세포 독성 평가

RAW264.7 cell을 이용하여 병개암나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물에 대한 nitric oxide(NO) 생성 억제 및 세포독성을 측정하였다. 우선 sample 100 μ g /mL의 농도로 실험을 진행하여 활성이 있는지 확인하였다. 그 결과 LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 NO 생성량을 비교하였을 때, 70% 에탄올 추출물에서는 13.0 μ M로 52.8%가 감소하였으며 EtOAc 및 *n*-BuOH layer에서 각각 0.13 μ M, 21.7 μ M로 99.5%, 21.4%가 감소하는 것을 확인하였다. *n*-Hex layer의 경우에는 cell에 대한 독성이 약간 나타났다(Figure 29-32).

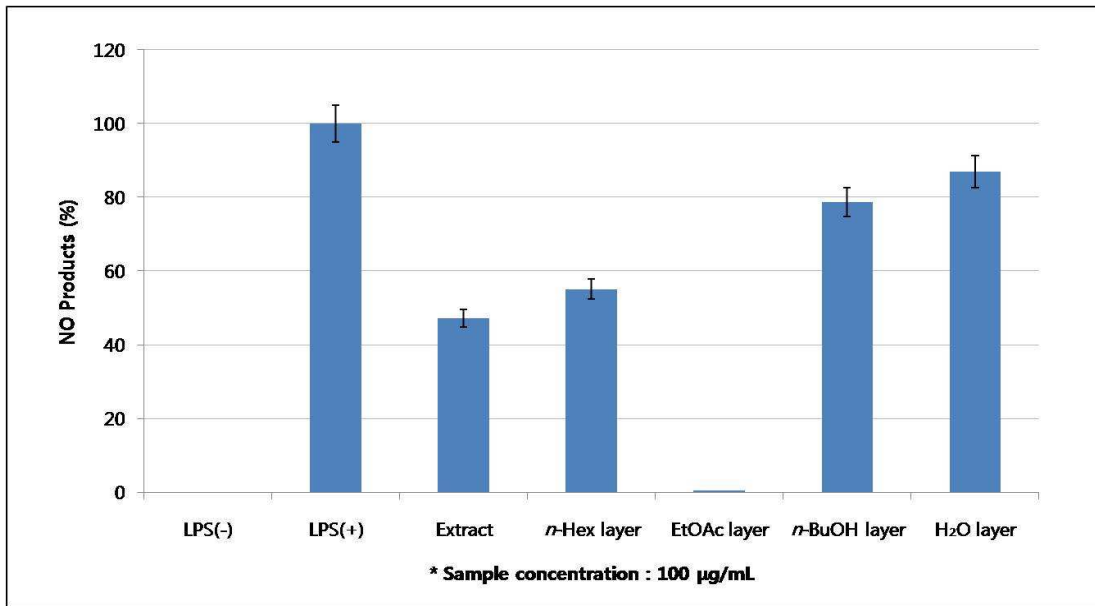


Figure 29. NO production inhibitory activities of extract and solvent layers.

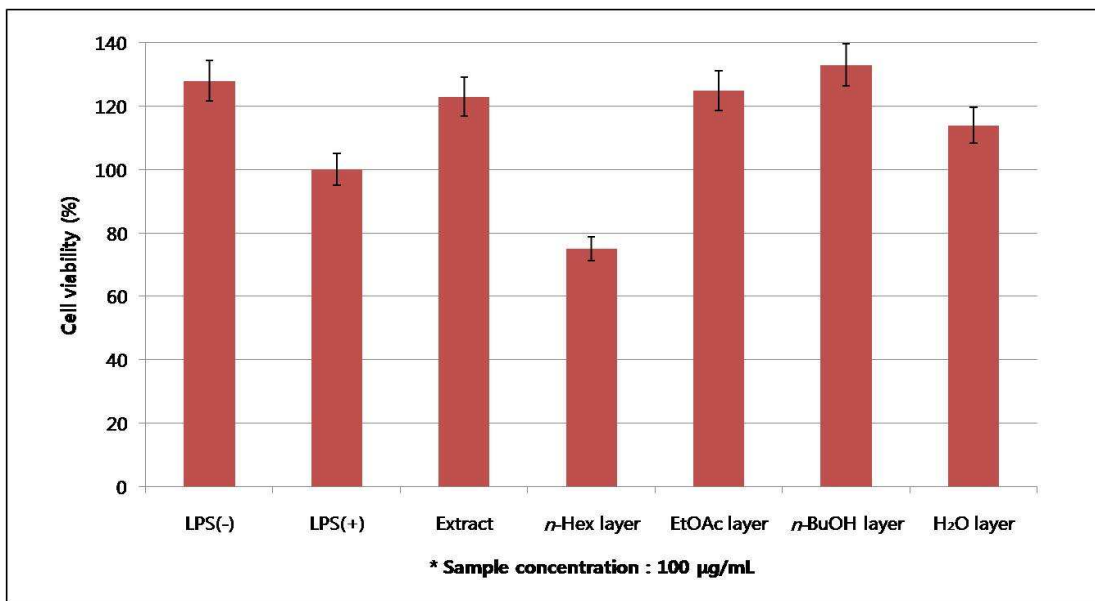


Figure 30. Cytotoxicities of extract and solvent layers.

위 결과를 바탕으로 100 µg/mL 농도에서 세포독성은 없으며 좋은 활성을 보였던 EtOAc layer에 대해 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 실험을 더 진행하였다.

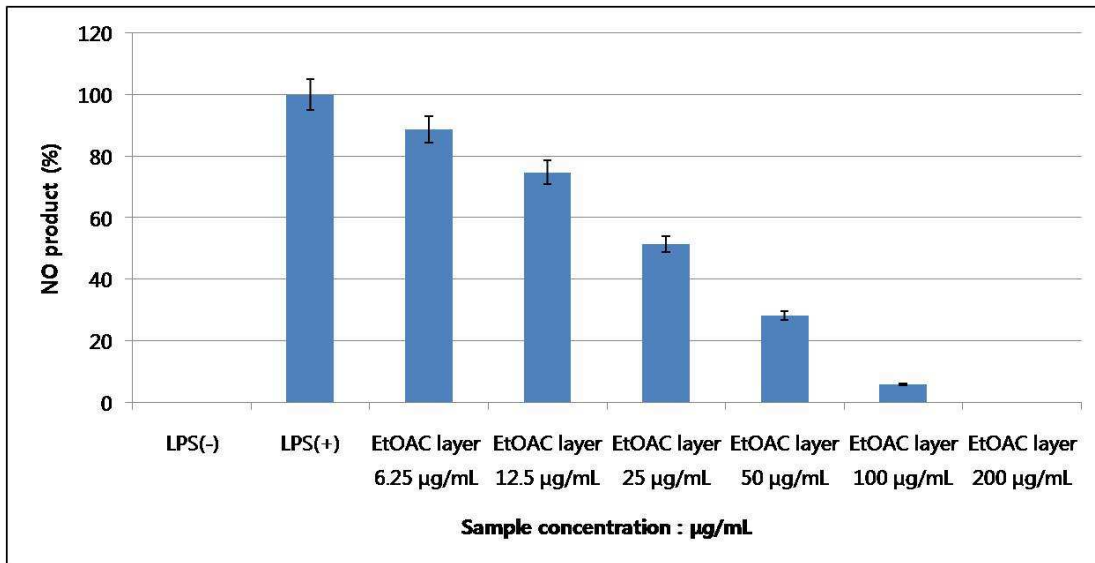


Figure 31. NO production inhibitory activities of EtOAc layer.

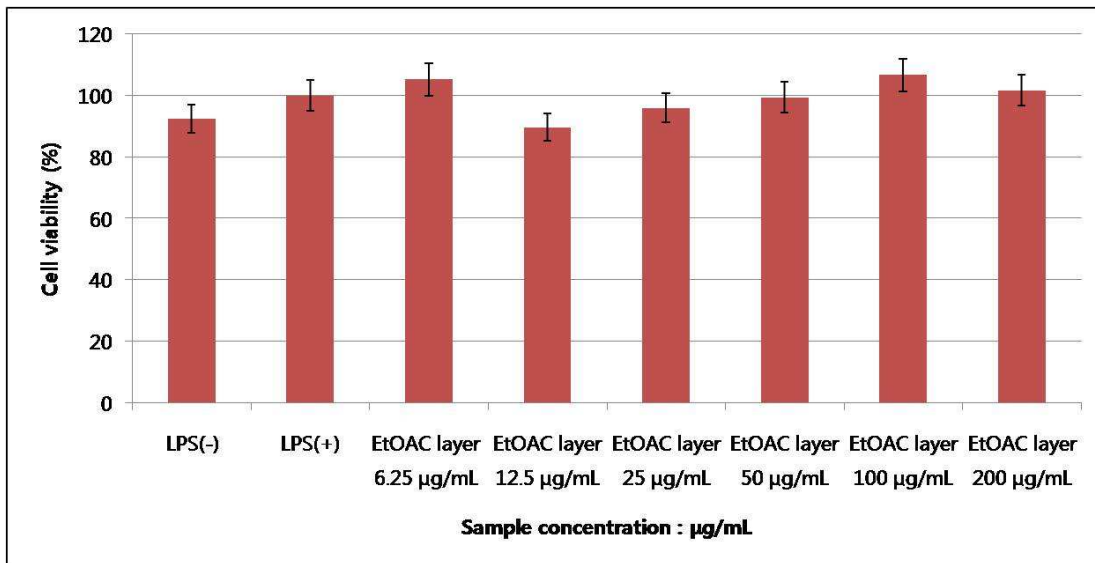


Figure 32. Cytotoxicities of EtOAc layer.

그 결과 EtOAc layer에서 세포독성 없이 농도 의존적으로 매우 좋은 NO 생성 억제 활성을 보이는 것을 확인하였다(Figure 31, 32).

3-2. HaCaT, CCD-986sk cell 에서의 세포독성 평가 결과

병개암나무 가지 70% 에탄올 추출물 및 분획물들의 RAW 264.7 cell외에 사람의 각질형성세포와 섬유아세포의 세포 독성을 확인하기 위해 각각 HaCaT cell(human keratinocyte cell)과 CCD-986sk cell(human normal fibroblast cell)에 실험을 진행하였다. 그 결과 추출물과 *n*-Hex layer에서만 약간의 독성을 나타내었고, 나머지 분획물들에서는 세포독성이 나타나지 않았다(Figure 33-34).

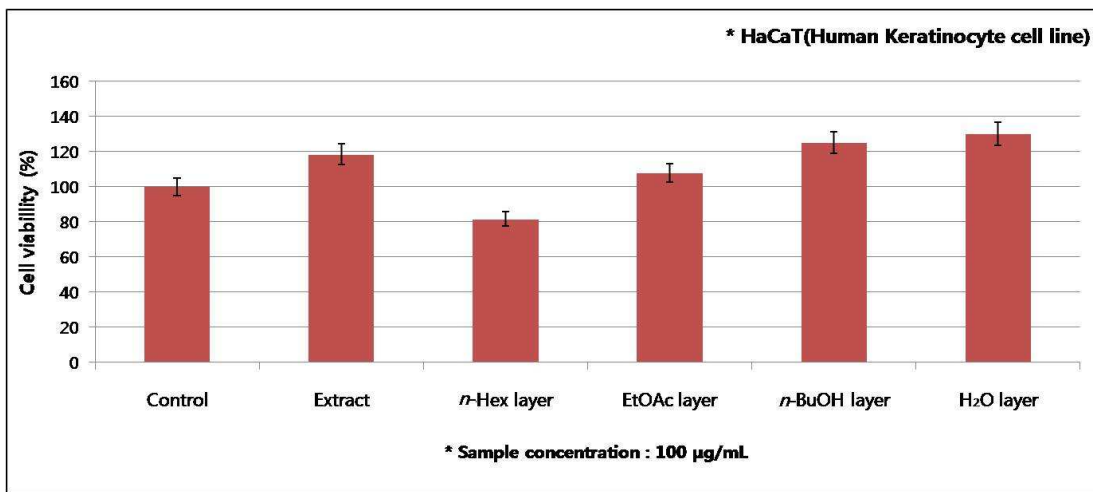


Figure 33. Cytotoxicities of extract and solvent layers in HaCaT cell

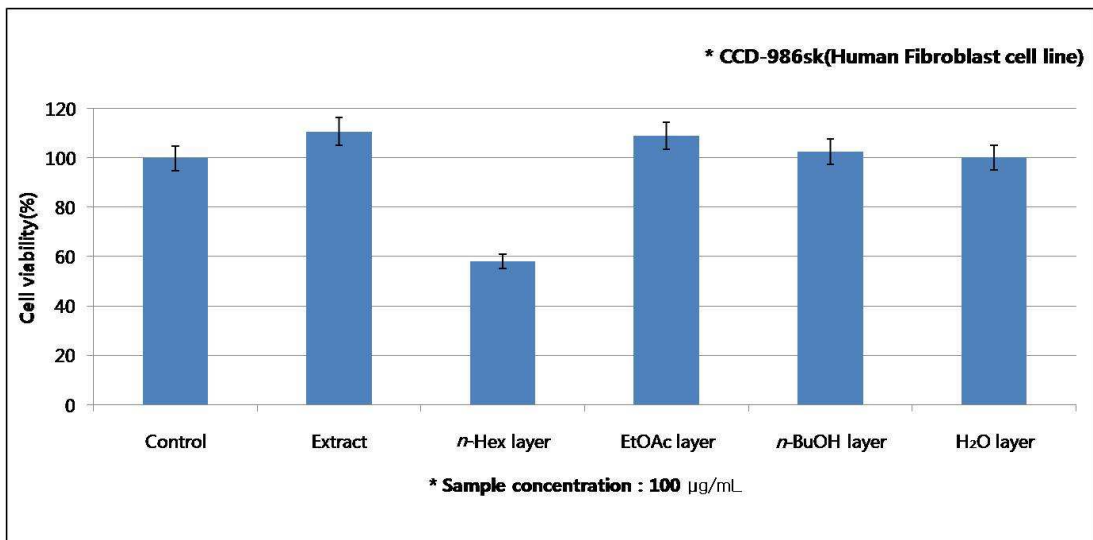


Figure 34. Cytotoxicities of extract and solvent layers in CCD-986sk cell

3-3. Compound 2, 3, 4의 Nitric oxide(NO) 생성 억제 및 세포 독성 평가

분리된 화합물들을 우선 sample 농도 100 μM 로 실험을 진행하여 활성이 있는지 확인하였다. 실험 결과, NO 생성 저해 활성이 나타난 compound 2, 3, 4에 대해 농도를 변화시키며 실험을 진행하였다(Figure 35-40).

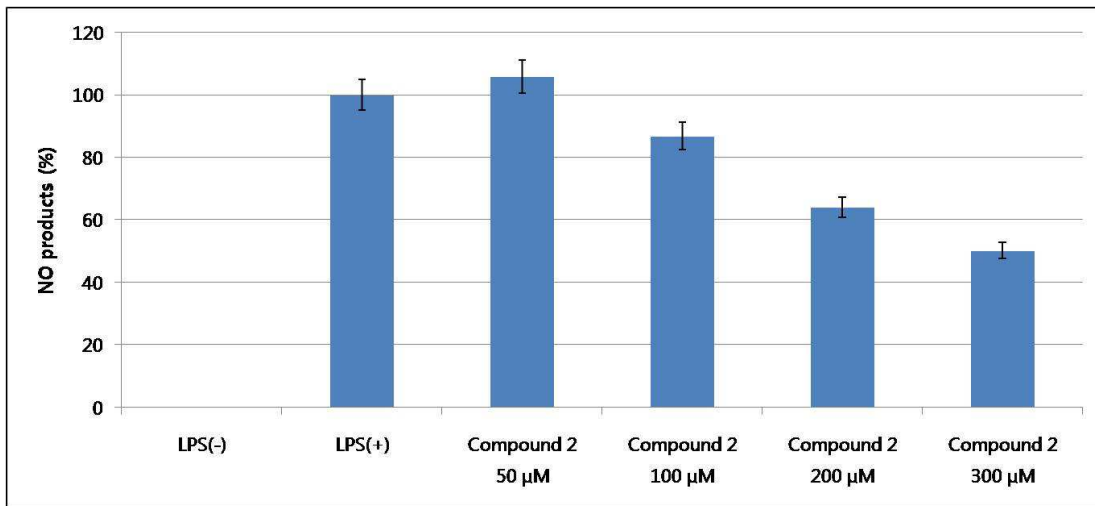


Figure 35. NO production inhibitory activities of compound 2

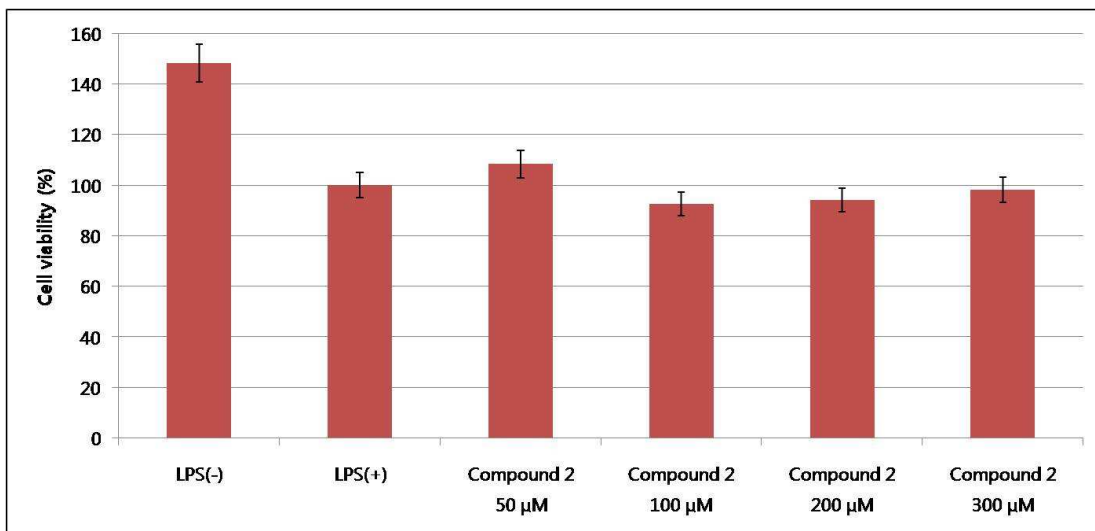


Figure 36. Cytotoxicities of compound 2

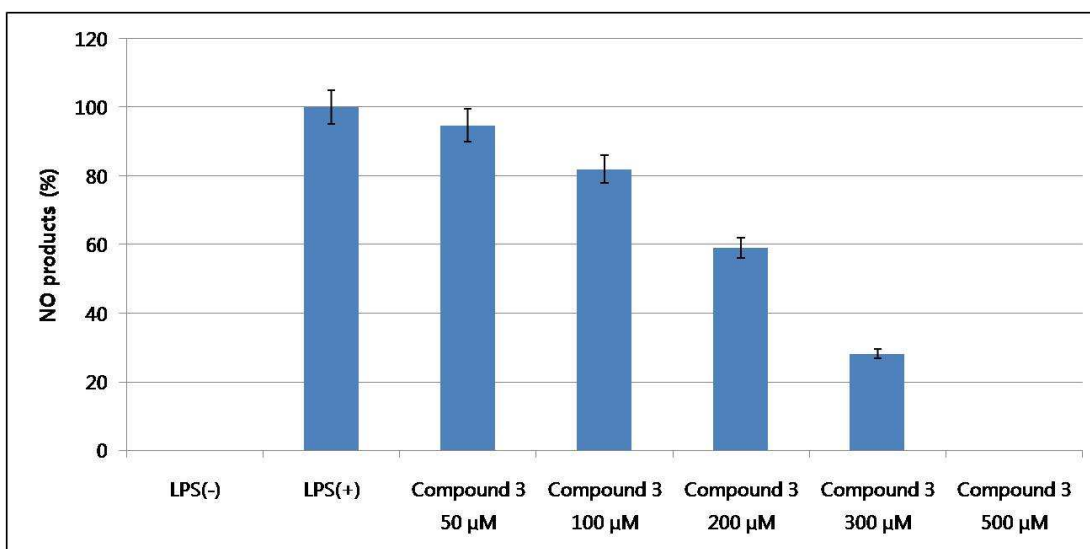


Figure 37. NO production inhibitory activities of compound 3

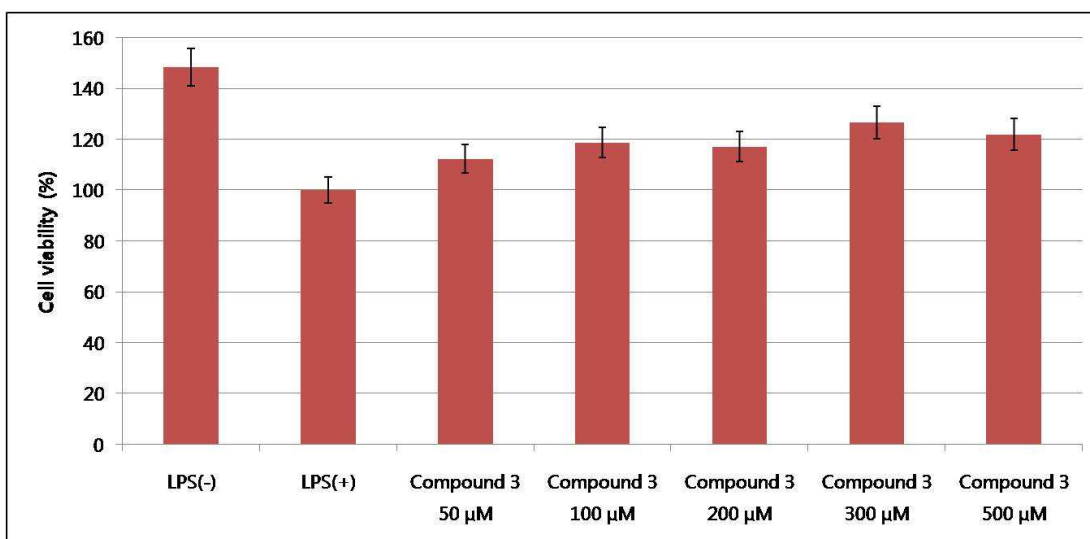


Figure 38. Cytotoxicities of compound 3

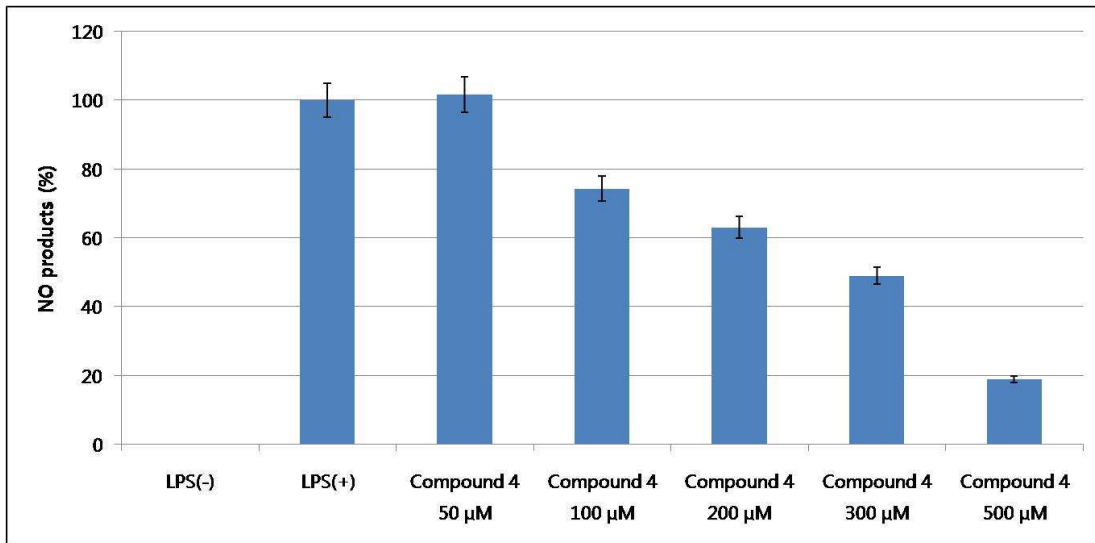


Figure 39. NO production inhibitory activities of compound 4

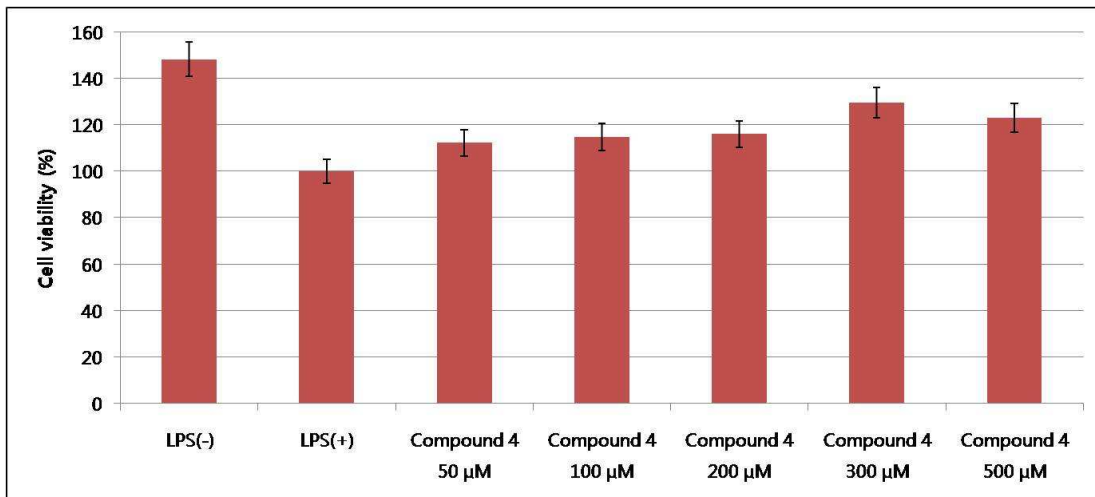


Figure 40. Cytotoxicities of compound 4

실험 결과, LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 NO 생성량을 비교하였을 때, compound 2, 3, 4 모두 세포 독성독성이 없었으며 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

3-4. 염증성 cytokine IL-6, TNF- α 생성 억제 평가

초기 염증 반응 진행에 중요하게 작용하는 염증성 cytokine으로 알려진 IL-6와 TNF- α 의 생성량 측정 실험을 진행하였다. 먼저 병개암나무 가지 분획물 중에 NO 저해 활성이 좋았던 EtOAc layer에 대하여 IL-6 양을 측정한 결과, LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 비교하였을 때 농도 의존적으로 IL-6 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 41).

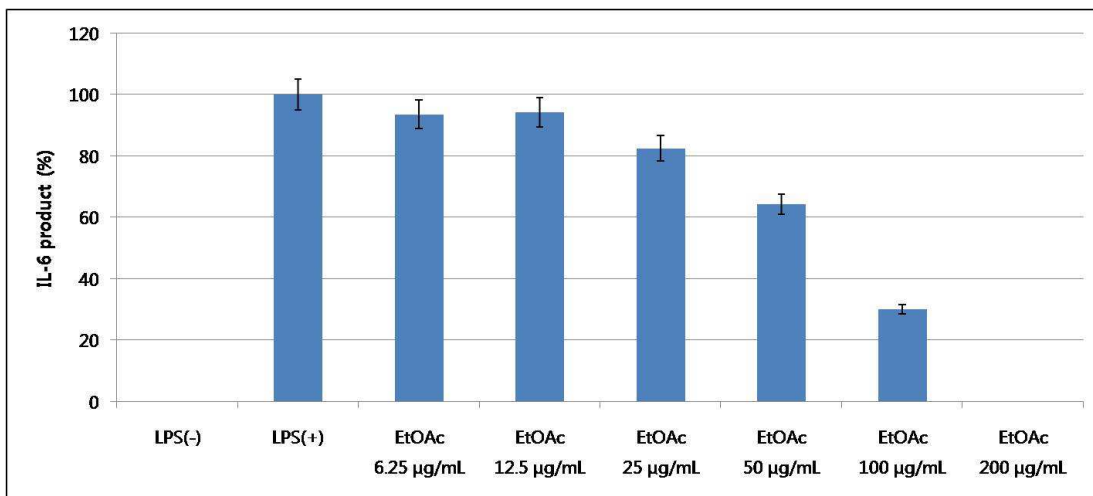


Figure 41. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine IL-6 by EtOAc layer

마찬가지로, 농도 의존적으로 NO 생성 억제 활성을 나타내었던 compound 2, 3, 4에 대해서도 초기 염증 반응 진행에 중요하게 작용하는 염증성 cytokine으로 알려진 IL-6, TNF- α 의 생성량을 측정 실험을 더 진행하였다. 그 결과, LPS와 용매만을 처리한 LPS(+)와 비교하였을 때 compound 3, 4에서 IL-6의 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 42, 43).

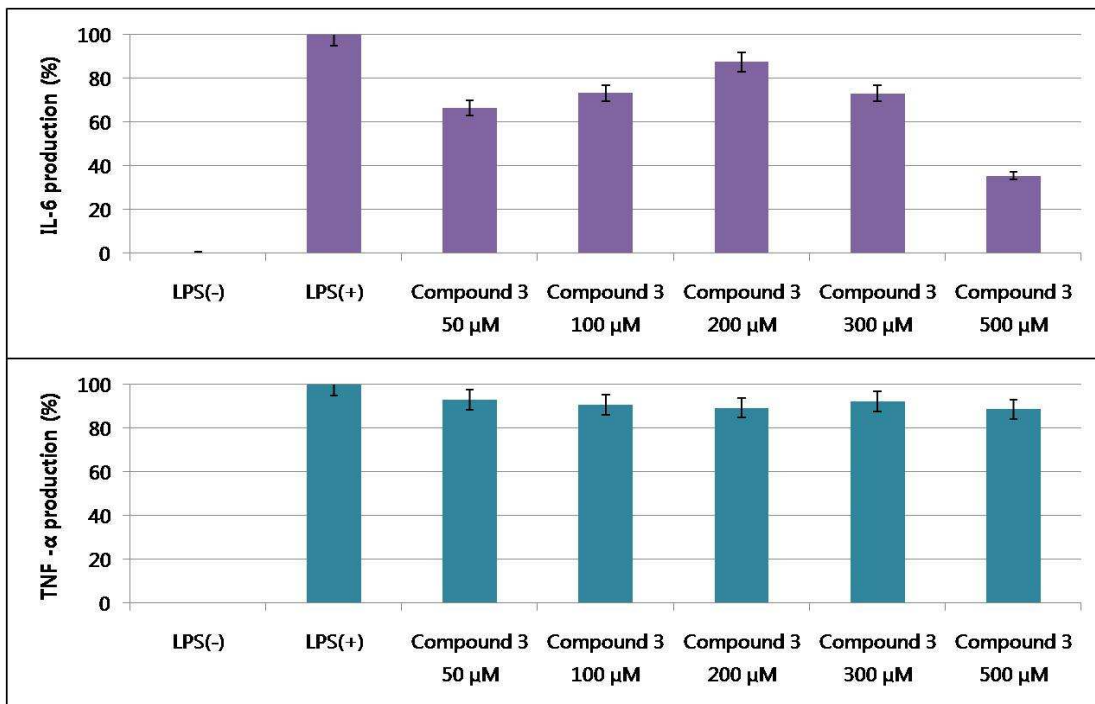


Figure 42. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine IL-6, TNF- α by Compound 3

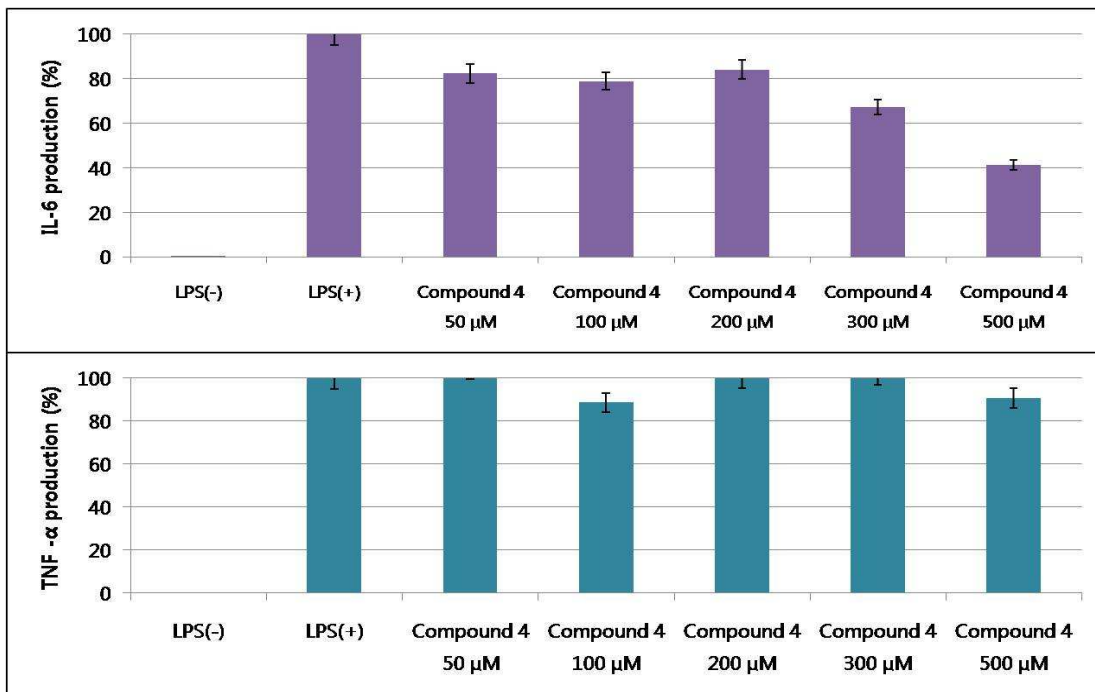


Figure 43. Inhibition of LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokine IL-6, TNF- α by Compound 4

IV. 요약 및 결론

본 논문은 제주도 한라산에 서식하는 제주 특산종인 병개암나무(*Corylus hallaisanensis*) 가지를 추출하여 그 추출물로부터 화합물들을 분리하고, 분리된 화합물에 대해 항산화 및 항염 활성에 대해 천연 소재로 활용 가능성을 알아보 고자 연구를 진행하였다.

병개암나무 70% 에탄올 추출물을 용매의 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water layer를 얻었다. 이 추출물과 분획물들에 대해 항산화 및 항염활성을 진행하였다.

추출물 및 분획물들의 항산화 활성실험 결과, 총 폴리페놀 함량 측정에서는 EtOAc층과 *n*-BuOH layer에서 367 μ g, 421 μ g GAE/1mg 가장 높게 나왔다. DPPH 라디칼 소거능 실험에서는 Hex 층을 제외한 나머지 추출물, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O layer에서 positive control인 vitamin C(SC₅₀ 14.5 μ g/mL)와 비교했을 때 각각 31.7, 31.9, 23.3, 39.1 μ g/mL로 좋은 라디칼 소거활성을 보였다. 또한, 추출물 및 분획물의 ABTS radical cation 소거 활성결과, 추출물에서 12.3 μ g/mL, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O layer에서 각각 9.1, 8.3, 16.5 μ g/mL로 대조군인 vitamin C(5.9 μ g/mL)만큼 좋은 ABTS radical cation 소거 활성을 나타내었다.

추출물 및 분획물들의 항염 활성실험 결과는 NO 생성량을 비교하여 측정하였는데, EtOAc layer에서 용매만을 처리한 LPS(+)와 비교하였을 때 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO의 생성량을 저해시키는 것을 확인 할 수 있었다. Cytokine 측정 실험에서도 EtOAc layer에서 IL-6의 양을 농도 의존적으로 저해시켰다.

이 같은 결과를 바탕으로 EtOAc층에서 화합물 분리를 진행하였고, vacuum liquid chromatography(VLC), 순상 silica gel chromatography, sephadex LH-20 chromatography를 수행하여 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 NMR을 이용하여 확인하였고, 문헌과 비교하여 총 4개의 화합물을 분리·동정하였다. 분리된 화합물은 β -sitosterol (1), 3,3',4'-tri-O-methylelagic acid

(2), carpinontriol A (3), carpinontriol B (4)로 확인되었다.

이렇게 분리된 화합물들에 대해 항산화 활성실험 결과, ABTS radical 소거 활성 실험에서 compound 2, 3, 4의 SC₅₀값이 각각 226.3, 19.3, 12.9 μM로 나왔고, compound 3과 4는 대조군인 vitamin C(SC₅₀ 45.4 μM)보다 좋은 값을 갖는 것을 확인하였다.

또한, 항염 활성실험에서도 compound 3, 4가 세포 독성 없이 NO 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었으며 염증성 cytokine인 IL-6 역시 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구의 실험결과를 바탕으로 병개암나무 가지를 이용한 천연 항산화 성분 및 항염 소재로서의 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

V. 참고문헌

- 1) Leibovitz, B. E. ; Siegel, B. V. "Aspects of Free Radical Reactions in Biological Systems : Aging" *J. Gerontology*, **1980**, *35*(1), 45-56.
- 2) 김석창 "Isolation and Antioxidant Activities of Flavonoids from the Root of *Scutellaria baicalensis* G." 건국대학교 대학원 박사학위논문, **1994**, 1-9.
- 3) Lee, H. J.; Park, S. N. "Antioxidative Effect and Active Component Analysis of *Quercus salicina* Blume Extracts" *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **2011**, *37*(2), 143-152.
- 4) Ahn, Y. J.; Kim, S. Y.; Ok, J. H.; Wang, H.; Park, C. H.; Kim, S. H.; Heo, Y. S.; Jeon, Y. H.; Park, S. S. "Antioxidant Activity of *Persicaria perfoliata* Extracts" *J. Soc. Cosmet. scientists Korea*, **2009**, *35*(3), 235-241.
- 5) Cha, B. C.; Lee, S. K.; Lee, H. W.; Lee, E.; Choi, M. Y.; Rhim T. J.; Park, H. J. "Antioxidative effect of domestic plants" *Kor. J. Pharmacogn.*, **1997**, *28*, 15-20.
- 6) Kim, S. K. "Evaluation of antioxidant activity" *Safe Food*, **2008**, *3*(4), 35-39.
- 7) Harman, D. "Aging : A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry" *J. Gerontology*, **1956**, *11*, 298-300.
- 8) Harman, D. "Role of Free Radicals in Mutation, Cancer, Aging and the Maintenance of Life" *Radiation Res.*, **1962**, *16*, 753-763.

- 9) Kandutsch, A. A. "Biological effects of some products of cholesterol autooxidation" *Autooxidation in food and biological systems*, **1980**, 589-597
- 10) Yoon, W. J.; Lee, J. A.; Kim, K. N.; Kim, J. Y.; Park, S. Y. "In vitro anti-inflammatory activity of the *Artemisia flkudo* extracts in murine macrophage RAW 264.7 cells" *Korean J. Food Sci. Technol.*, **2007**, *39* 464-469.
- 11) Van, S. J.; Interleukin-6: an overview. *Annu Rev. Immunol*, **1998**, *8*: 253-278.
- 12) Fenton, M. J.; Golenbock, D. T. "LPS-binding proteins and receptors" *J. Leuko Biol.*, **1998**, *64*, 25-32.
- 13) Glauser, M. P. "The imflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock" *Drugs*, **1996**, *52*, 9-17.
- 14) Lefkowitz, J. B. "Cyclooxygenase-2 specificity and its clinical implications" *American Journal of Medicine*, **1999**, *106*, 43S-50S.
- 15) 한국기준식물도감 "<http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=772214&cid=2694&categoryId=2699>"
- 16) Folin, O.; Denis, W. "A colorimetric method for determination of phenols(phenol dericatives) in urine" *J. Biol. Chem.*, **1915**, *22*, 305-308.
- 17) Blois, M. S. "Antioxidant determination by the use of a stable free

radical" *Nature*, **1958**, *181*, 1199-1200.

18) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A. Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay" *Free Radical Biology and Medicine*, **1999**, *26*, 1231-1237.

19) Sohn, B. H.; Park, J. H.; Lee, D. Y.; Cho, J. G.; Kim, Y. S.; Jung, I. S.; Kang, P. D.; Baek, N. I. "Isolation and Identification of Lipids from the Silkworm (*Bombyx mori*) Droppings" *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **2009**, *52*(4), 336-341.

20) Fan Z.; Tie-jun F. shu-Lin P. ; Zhong-Rong L. Li-Sheng D., "Two New Triterpenoids from the Roots of *Sanguisorba officinalis* L." *Journal of Intergrative Plant Biology*, **2005**, *47*(2), 251-256.

21) Lee, J. S.; Kim, H. J.; Park, H. K.; Lee, Y. S. "New Diarylheptanoids from the Stems of *Carpinus cordata*" *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 1367-1370.

22) Lee, K. I.; Kim, S. M. "Antioxidative and antimicrobial activities of *Eriobotrya japonica* Lindl. leaf extracts" *J. Kor. Soc.*, **2009**, *38*(3), 264-27