



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

물사과 가지, 풍란 켈러스 추출물의
항산화 및 항염 활성 성분 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

廉 賢 淑

2018年 2月

물사과 가지, 풍란 켈러스 추출물의 항산화 및 항염 활성 성분 연구

指導教授 李 南 昊

廉 賢 淑

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2017年 12月

廉賢淑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

2017年 12月

Anti-oxidative and Anti-inflammatory
Constituents from *Syzygium aqueum*
Branches and *Neofinetia falcata* Callus

Hyun Sook Yeom
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

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

2017. 12.

This thesis has been examined and approved.

.....
.....
.....

.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Tables	v
List of Figures	vii
List of Abbreviations	xi
Abstract	xiii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 시약 및 기기	6
2. 생리 활성 평가	7
1) 항산화	7
가. 총 폴리페놀 함량 측정	7
나. 총 플라보노이드 함량 측정	8
다. DPPH radical 소거 활성 측정	9
라. ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	9
마. 세포 보호 효과	10
(1) HaCaT cell 배양	10
(2) 과산화수소(H ₂ O ₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과	10
2) 항염	11
가. RAW264.7 cell 배양	11
나. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	11
다. PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정	12
라. Western blot analysis	13
3) 세포 독성 평가(MTT assay)	14
3. HPLC 함량 분석	15

Ⅲ. 연구 1 : 물사과 가지 추출물의 항산화 및 항염 활성 성분 연구	17
1. 재료	17
2. 물사과 가지의 추출, 분획 및 활성 성분 분리	18
1) 물사과 가지의 추출 및 용매 분획	18
2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리	19
3. 분리된 화합물의 구조 분석	20
1) Compound 1, 2의 구조 동정	20
2) Compound 3, 4의 구조 동정	27
4. 물사과 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과	32
1) 항산화	32
가. 총 폴리페놀 함량 측정	32
나. 총 플라보노이드 함량 측정	33
다. DPPH radical 소거 활성 측정	34
라. ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	35
마. 세포 보호 효과	36
(1) 세포 독성 평가(MTT assay)	36
(2) 과산화수소(H ₂ O ₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과	37
2) 항염	39
가. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	39
나. PGE ₂ 생성 억제 활성 측정	42
다. iNOS 및 COX-2 단백질 발현 측정	43
라. 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정	44
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과	46
1) 항산화	46
가. DPPH radical 소거 활성 측정	46
나. ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	47
다. 세포 보호 효과	48
(1) 세포 독성 평가(MTT assay)	48

(2) 과산화수소(H ₂ O ₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과	49
2) 항염	51
가. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	51
6. 요약 및 결론	53
IV. 연구 2 : 풍란 켈러스 추출물의 항산화 및 항염 활성 성분 연구	55
1. 재료	55
2. 풍란 켈러스의 추출, 분획 및 활성 성분 분리	57
1) 풍란 켈러스의 추출 및 용매 분획	57
2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리	58
3) <i>n</i> -butanol 분획물의 활성 성분 분리	59
3. 분리된 화합물의 구조 분석	60
1) Compound 5의 구조 동정	60
2) Compound 6, 7의 구조 동정	63
4. 풍란 켈러스 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과	68
1) 항산화	68
가. 총 폴리페놀 함량 측정	68
나. 총 플라보노이드 함량 측정	69
다. DPPH radical 소거 활성 측정	70
라. ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	71
2) 항염	72
가. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	72
나. PGE ₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정	75
5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과	78
1) 항산화	78
가. DPPH radical 소거 활성 측정	78
나. ABTS ⁺ radical 소거 활성 측정	79
2) 항염	80

가. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정	80
6. 분리된 화합물의 함량 분석	82
1) Compound 5의 함량 분석	82
7. 요약 및 결론	84
V. 종합 결론 및 고찰	86
VI. 참고문헌	89

List of Tables

Table 1. HPLC chromatographic conditions of the control factors	16
Table 2. Gradient elution condition for HPLC analysis	16
Table 3. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 1 and 2	22
Table 4. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 3 and 4	29
Table 5. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent layers from <i>S. aqueum</i> branches	34
Table 6. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities for extract and solvent layers from <i>S. aqueum</i> branches	35
Table 7. IC ₅₀ values of EtOAc layer from <i>S. aqueum</i> branches on pro-inflammatory cytokines production in LPS-induced RAW264.7 cells	45
Table 8. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for isolated compounds 1 , 3 and 4	46
Table 9. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities for isolated compounds 1 , 3 and 4	47
Table 10. IC ₅₀ values of isolated compounds 1 , 3 and 4 on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells	52
Table 11. ¹ H and ¹³ C NMR data of compound 5	61
Table 12. ¹ H and ¹³ C NMR data of compounds 6 and 7	65
Table 13. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent layers from <i>N. falcata</i> callus	70
Table 14. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activities for extract and solvent layers from <i>N. falcata</i> callus	71
Table 15. IC ₅₀ values of EtOAc layer from <i>N. falcata</i> callus on PGE ₂ and pro-inflammatory cytokines production in LPS-induced RAW264.7 cells	77

Table 16. SC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activity for the compound 5	78
Table 17. SC ₅₀ values of ABTS ⁺ radical scavenging activity for the compound 5	79
Table 18. The contents of compound 5 isolated from <i>N. falcata</i> callus	82

List of Figures

Figure 1. Calibration curve of standard gallic acid for quantification of total polyphenol contents	7
Figure 2. Calibration curve of standard quercetin for quantification of total flavonoid contents	8
Figure 3. Calibration curve for quantification of kaempferol 3- <i>O</i> -robinobioside	15
Figure 4. Picture of <i>Syzygium aqueum</i> tree	17
Figure 5. Extraction and solvent fractionation of <i>S. aqueum</i> branches	18
Figure 6. Isolation of compounds from <i>S. aqueum</i> branches	19
Figure 7. Chemical structures of compounds 1 and 2	21
Figure 8. ¹ H NMR spectrum of compound 1	23
Figure 9. ¹³ C NMR spectrum of compound 1	23
Figure 10. HMQC NMR spectrum of compound 1	24
Figure 11. HMBC NMR spectrum of compound 1	24
Figure 12. The key HMBC NMR spectrum of compound 1	25
Figure 13. ¹ H NMR spectrum of compound 2	26
Figure 14. ¹³ C NMR spectrum of compound 2	26
Figure 15. Chemical structures of compounds 3 and 4	28
Figure 16. ¹ H NMR spectrum of compound 3	30
Figure 17. ¹³ C NMR spectrum of compound 3	30
Figure 18. ¹ H NMR spectrum of compound 4	31
Figure 19. ¹³ C NMR spectrum of compound 4	31
Figure 20. Total polyphenol contents of extract and solvent layers from <i>S. aqueum</i> branches	32
Figure 21. Total flavonoid contents of extract and solvent layers from <i>S. aqueum</i> branches	33

Figure 22. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers from <i>S. aqueum</i> branches	34
Figure 23. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers from <i>S. aqueum</i> branches	35
Figure 24. Effects of extract and solvent layers from <i>S. aqueum</i> branches on HaCaT cells viability	36
Figure 25. Cell protective effects of extract and solvent layers from <i>S. aqueum</i> branches on H ₂ O ₂ -induced HaCaT cell	38
Figure 26. Effects of extract and solvent layers from <i>S. aqueum</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	40
Figure 27. Effects of EtOAc layer from <i>S. aqueum</i> branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	41
Figure 28. Effects of EtOAc layer from <i>S. aqueum</i> branches on PGE ₂ production in LPS-induced RAW264.7 cells	42
Figure 29. Effects of EtOAc layer from <i>S. aqueum</i> branches on the levels of iNOS and COX-2 protein	43
Figure 30. Effects of EtOAc layer from <i>S. aqueum</i> branches on TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells	44
Figure 31. Effects of EtOAc layer from <i>S. aqueum</i> branches on IL-6 and IL-1 β production in LPS-induced RAW264.7 cells	45
Figure 32. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds 1 , 3 and 4	46
Figure 33. ABTS ⁺ radical scavenging activities of isolated compounds 1 , 3 and 4	47
Figure 34. Effects of isolated compounds 1 , 3 and 4 on HaCaT cells viability	48
Figure 35. Cell protective effects of isolated compounds 3 and 4 on H ₂ O ₂ -induced HaCaT cell	50

Figure 36. Effects of isolated compounds 1 , 3 and 4 on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	52
Figure 37. Picture of <i>Neofinetia falcata</i> callus	56
Figure 38. Extraction and solvent fractionation of <i>N. falcata</i> callus	57
Figure 39. Isolation of compounds 5 and 6 from <i>N. falcata</i> callus	58
Figure 40. Isolation of compounds 5 and 7 from <i>N. falcata</i> callus	59
Figure 41. Chemical structure of compound 5	60
Figure 42. ¹ H NMR spectrum of compound 5	62
Figure 43. ¹³ C NMR spectrum of compound 5	62
Figure 44. Chemical structures of compounds 6 and 7	64
Figure 45. ¹ H NMR spectrum of compound 6	66
Figure 46. ¹³ C NMR spectrum of compound 6	66
Figure 47. ¹ H NMR spectrum of compound 7	67
Figure 48. ¹³ C NMR spectrum of compound 7	67
Figure 49. Total polyphenol contents of extract and solvent layers from <i>N. falcata</i> callus	68
Figure 50. Total flavonoid contents of extract and solvent layers from <i>N. falcata</i> callus	69
Figure 51. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers from <i>N. falcata</i> callus	70
Figure 52. ABTS ⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers from <i>N. falcata</i> callus	71
Figure 53. Effects of extract and solvent layers from <i>N. falcata</i> callus on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	73
Figure 54. Effects of EtOAc layer from <i>N. falcata</i> callus on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells	74
Figure 55. Effects of EtOAc layer from <i>N. falcata</i> callus on PGE ₂ and TNF-α production in LPS-induced RAW264.7 cells	76

Figure 56. Effects of EtOAc layer from *N. falcata* callus on IL-6 and IL-1 β production in LPS-induced RAW264.7 cells 77

Figure 57. DPPH radical scavenging activity of the compound **5** 78

Figure 58. ABTS⁺ radical scavenging activity of the compound **5** 79

Figure 59. Effects of the compound **5** on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells 81

Figure 60. HPLC chromatogram of extract and layers from *N. falcata* callus at 265 nm 83

List of Abbreviations

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid)
BHA	Butylhydroxyanisole
BHT	<i>tert</i> -Butylhydroxytoluene
brs	Broad singlet
CC	Column chromatography
CDCl ₃	Chloroform- <i>d</i>
CD ₃ OD	Methanol- <i>d</i> ₄
CHCl ₃	Chloroform
COX-2	Cyclooxygenase-2
C ₅ D ₅ N	Pyridine- <i>d</i> ₅
d	Doublet
dd	Doublet of doublet
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
Fr.	Fraction
GAE	Gallic acid equivalent
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
IC ₅₀	Inhibition concentration of 50%
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
int.	Integration

<i>J</i>	Coupling constant (Hz)
LPS	Lipopolysaccharide
MeOH	Methanol
MP	MPLC subfraction
MPLC	Medium pressure liquid chromatography
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
multi.	Multiplet
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
NMR	Nuclear magnetic resonance
NO	Nitric oxide
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
QE	Quercetin equivalent
ROS	Reactive oxygen species
s	Singlet
SC ₅₀	Scavenging concentration of 50%
TLC	Thin layer chromatography
TNF-α	Tumor necrosis factor-α

Abstract

In this study, we investigated identification of anti-oxidative and anti-inflammatory constituents from *Syzygium aqueum* Burm.f. Alston branches and *Neofinetia falcata* Thunb. Hu callus. The chemical structures of the isolated compounds were elucidated based on the spectroscopic data including NMR spectra, as well as comparison of the data to the literature values.

Four constituents were isolated from the extract of *S. aqueum* branches; 3-*O*-methylelagic acid 3'-*O*- α -L-rhamnopyranoside (**1**), 3-*O*-methylelagic acid 3'-*O*- α -L-3''-*O*-acetylhrhamnopyranoside (**2**), pinocembrin (**3**) and desmethoxymatteucinol (**4**). As far as we know, compounds **1**, **2** and **4** were isolated for the first time from this plant. For the anti-oxidative activities, the EtOAc and *n*-BuOH layers showed potent DPPH, ABTS⁺ radical scavenging activities. Also, among the isolated compounds, compound **1** exhibited stronger ABTS⁺ radical scavenging activity than ascorbic acid (positive control). In an anti-oxidative activity assay using HaCaT keratinocyte, the compounds **3** and **4** protected the cell against oxidative stress by H₂O₂. For the anti-inflammation studies using RAW264.7 macrophage, the EtOAc layer reduced expression of iNOS and inhibited the production of NO, PGE₂ and pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6). Moreover, compounds **1**, **3** and **4** inhibited the production of NO, effectively.

Three phytochemicals were isolated from the extract of *N. falcata* callus; kaempferol 3-*O*-robinobioside (**5**), β -sitosterol (**6**) and daucosterol (**7**). As far as we know, all of the compounds were isolated for the first time from this plant callus. The EtOAc layer and compound **5** was examined for their anti-oxidation activities by DPPH and ABTS⁺ radical assays. As a result, EtOAc layer and compound **5** showed anti-oxidative activities.

For the anti-inflammation studies, the EtOAc layer inhibited the production of NO, PGE₂ and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6), effectively.

Based on these results, it was suggested that extract and isolated compounds from *S. aqueum* branches and *N. falcata* callus could be potentially applicable as anti-oxidative and/or anti-inflammatory ingredients.

I. 서론

□ 천연물

현대 사회에서는 생활환경 및 식생활의 변화로 암, 당뇨, 비만 및 혈관성 질환 등 각종 질병 발생이 늘어나고 있으며, 급격한 산업 발달과 환경변화에 따른 스트레스 증가로 피부의 노화 및 염증반응의 발생률이 높아지고 있다. 이와 같은 문제를 해결하기 위해 합성 항산화제가 사용되고 있으며, 대표적으로 butylated hydroxy toluene (BHT) 및 butylated hydroxy anisole (BHA) 등이 있다. 그러나 이 같은 합성 항산화제는 항산화 활성이 매우 우수하지만 장기간 섭취 할 경우, 발암, 돌연변이 및 독성 등의 안전성이 문제되면서 최근 사용 제한에 대한 논의가 계속되고 있다. 따라서 독성과 부작용이 적은 천연물 내 생리 활성 성분 등을 이용한 항산화제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.¹

생물체는 살아가는 동안 에너지와 생존에 필요한 물질을 만들기 위해 대사 과정을 거치게 되는데, 이 과정에서 생기는 물질을 대사산물이라 한다. 대사산물은 생물의 생명 유지, 발육 및 증식에 관여하는 당, 아미노산, 지질 및 그들의 중합체와 같은 물질인 1차 대사산물과 식물체가 주위 환경으로부터 병해충 침입 및 공격에 대항하기 위해 생성하는 tannin, flavonoid와 같은 물질인 2차 대사산물로 나눌 수 있으며, 천연물 내 생리 활성 성분이 이에 해당한다.²

Tannin은 여러 가지 폴리페놀류가 중합된 구조를 가진 화합물을 말하며 폴리페놀은 생체 내 단백질과 결합할 수 있기 때문에 다양한 생리 활성을 가지고 있다. 높은 항산화 활성을 가진다고 알려진 flavonoid 및 ellagic acid가 이에 속한다. Flavonoid는 C₆-C₃-C₆를 기본골격으로 하는 물질을 말하며 가장 일반적인 flavonoid 화합물의 골격구조는 5번과 7번 위치에 hydroxy group (OH)을 갖고 있는 구조이다. 이와 같이 대부분의 flavonoid는 A, B환에 phenolic -OH기를 가지고 있으며 이러한 구조적인 이유로 높은 항산화 활성을 가진다. Ellagic acid는 식물체 내에서 ellagitannin으로 존재하다가 산 조건하에 락톤과 결합하여 형성되며, 주로 딸기, 포도 등과 같은 과일 및 채소에 풍부하게 함유되어 있는 강력한 항산화 성분이다.³

□ 활성산소

산소는 대부분의 생물에 있어 생체 내 에너지를 만드는 필수 불가결한 분자이지만 일부는 유독작용을 하는 활성산소 종(reactive oxygen species, ROS)으로 전환되어 여러 가지 해를 끼친다. 활성산소는 세포에 손상을 입히는 변형된 산소의 모든 종류를 말하며, 산소를 이용하는 생물체는 미토콘드리아 내의 정상적인 대사과정에서 superoxide radical anion ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxy radical ($\cdot\text{OH}$) 및 hydrogen peroxide (H_2O_2) 등과 같은 활성산소를 생성한다. Radical은 쌍을 이루지 못한 전자를 포함하는 원자, 이온 및 분자를 말한다. 일반적으로 전자는 쌍으로 존재하려는 경향 때문에 홀로 있으면 다른 분자들과 반응하려는 경향이 크다. 따라서 $\cdot\text{O}_2^-$ 및 $\cdot\text{OH}$ 와 같은 radical의 활성산소 종이 가진 자유 전자로 인해 구조적으로 불안정한 상태이므로 생체 분자의 전자와 빠르게 반응하여 세포를 손상시킨다. 한편, H_2O_2 는 자유 전자를 가지고 있지 않아 radical이라고는 할 수 없지만, 생체막을 통과하여 손상을 가하기 때문에 산화촉진제로써 한정된 반응성을 가지고 있다.^{4,5}

인간은 정상적인 경우 활성산소의 생성계 및 소거계의 균형을 통해 일정한 상태를 유지하고 있다. 그러나 자외선, 배기가스, 중금속, 화학 산화제 및 염증반응 등과 같은 외부 자극에 의해 활성산소의 생성이 증가되면 생체 내부의 항산화 시스템의 균형이 깨져 산화적 스트레스를 야기한다. 산화적 스트레스는 피부 질환뿐만 아니라 세포 차원의 산화적 손상을 입히는데, 생산이 증가된 활성산소가 세포막을 이루는 지질, 핵산 및 단백질 등 중요한 생체분자와 반응하게 한다. 이는 세포의 구조 변화 및 기능 저하를 유발하고 비정상적인 유전자를 발현시켜 각종 질환을 유발하게 되는데, 상처 치유의 지연, 염증 생성 및 악화, 고혈압, 동맥경화, 뇌질환 등의 문제를 초래한다.^{6,7}

□ 염증반응

활성산소는 생체 내 여러 가지 세포의 작용을 조절하는 염증반응의 유발원인이 되기도 한다. 염증은 다양한 경로를 통한 외부 감염, 대사산물 등 내외적 자극에 대한 생체 내 방어기전의 발현으로 세포 내 다양한 염증 조절인자들이 매개체로써 관여한다.⁸ 생체 내의 박테리아가 죽으면서 세포 외막에 존재하는 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)를 방출하여 대식세포를 활성화 시킨다. RAW264.7과 같은 대식세포들이 활성화되면 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) 및 cytokine 등 다양한 염증반응을 유발하는 매개물질을 분비한다.⁹

그 중 pro-inflammatory cytokine의 종류로는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) 및 interleukin-1 β (IL-1 β)가 있다. LPS의 자극을 받은 대식세포들은 이들을 분비하여 염증반응의 전사인자 발현을 유도한다. TNF- α 및 IL-6는 PGE₂의 발현을 유도하며, TNF- α 및 IL-1 β 는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현을 유도한다.¹⁰

PGE₂는 TNF- α 및 IL-6 등에 의해 활성화된 효소인 cyclooxygenase (COX)에 의해 arachidonic acid로부터 만들어지며, COX에는 COX-1과 COX-2로 분류된다. COX-1은 대부분의 조직에서 꾸준히 만들어져 체내에서 혈소판의 형성, 위벽 보호 및 신장 기능의 유지 등과 같은 정상적인 생체 기능을 작용하는 반면에 COX-2는 동물이나 인간의 염증반응 과정에서 발현되는 유도성 효소이다.¹¹

iNOS는 세포 내에 존재하지 않으나 TNF- α 및 IL-1 β 에 의해 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성한다. NO는 세포내 항상성 유지, 항암 작용과 세포독성에 관여하는 신호전달자이지만, 과량으로 존재할 경우 세포 손상이나 염증반응으로 이어져 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 또한, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 통증, 부종 등의 염증반응을 촉진 시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.¹²

□ 아열대 작물

최근 석탄, 석유와 같은 화석연료 및 냉장고, 에어컨의 냉매제 등에서 배출되는 프레온 가스가 대기 중으로 유입되어 오존층 파괴를 일으키는데 많은 문제가 되고 있다. 지난 100년 동안 지구의 평균 기온은 0.7℃가 상승한 반면, 우리나라는 약 1.5℃가 상승하며 가파른 상승을 보이고 있다. 따라서 3년 후인 2020년에는 우리나라 농경지 면적의 약 10% 정도가 아열대 기후에 속하게 되고 2080년에는 60% 이상이 속하게 된다.

아열대 기후는 1년 중 8개월 이상이 월평균 기온 10℃ 이상이며, 가장 추운 달은 평균 기온이 18℃ 이하인 기후를 말한다. 또한, 여름에는 비가 많이 내리고 겨울에는 건조해 비의 양이 적으며, 눈은 거의 내리지 않는다. 난대해양성 기후였던 제주도가 오존층 파괴로 인하여 이와 같은 아열대 기후로 변화되고 있는데 열대 및 아열대 지역에서 드물게 자라는 희귀식물이 제주도 곳곳에서 발견되고 있는 것이 그 증거이다.

이러한 기후변화에 대응하여 새로운 소득 작물을 찾기 위해 현재 아열대 과수를 제주도에 도입시키는 연구가 활발히 진행되고 있다. 수입하는 아열대 과일의 대부분은 냉동 상태로 수입되어 향기가 없고 저장성이 떨어지지만 국내에서 아열대 과수를 재배한다면 유통되는 기간이 짧아 신선한 아열대 과일을 맛볼 수 있으며, 품질이 우수한 이점이 있다. 따라서 제주도에서는 앞으로 아열대 과수의 안정생산 기술개발 시험연구에 착수하여 제주도 많은 농가에 재배 기술을 보급할 예정이다.^{13,14}

망고, 알로에 및 올리브 등의 아열대 작물은 항산화¹⁵, 주름개선, 미백¹⁶ 및 항당뇨¹⁷ 등과 같은 생리 활성이 알려져 있어 아직 알려지지 않은 아열대 작물에 대한 연구가 필요하다. 또한, 아열대 작물을 재배할 경우, 시기에 맞춰 간벌 및 전정 작업을 시행하게 되는데, 이때 발생하는 나무의 잎, 가지 등은 대부분 폐기된다. 이를 바탕으로 아열대 작물의 잎, 가지는 최근 대두되고 있는 잉여자원의 부가가치를 높이기 위한 자원 순환형 소재로 이용이 가능할 것이다.¹²

□ 식물 캘러스(callus)

천연물 내 생리 활성 물질인 식물의 2차 대사산물을 이용하기 위해서는 많은 양의 식물이 필요하다. 그러나 식물의 생산에는 지리적 불안정성과 가뭄, 병해충과 같은 환경적인 요인의 영향뿐만 아니라 파종에서 수확까지의 긴 재배기간 및 고수익을 갖는 품종 선택의 어려움 등의 문제가 따른다.¹⁸

특히, 난초과 식물은 종자식물 중에서 종자가 가장 작고, 길이가 1 mm 이하인 것이 대부분이며, 내부에는 미발달한 세포벽이 있을 뿐, 배의 분화도 없고 발아할 때 양분이 되는 씨젓도 준비되어 있지 않다. 따라서 자연에서는 난균이 난초씨의 세포에 공생하여 생육을 도와야만 발아 및 생육이 가능하다. 이와 같이 크기가 작고 재배 조건이 까다로운 난초과 식물을 천연물 소재로 사용할 경우 캘러스를 이용한 대량 생산이 필요하다.¹⁹

식물의 조직을 일부 떼어내어 배지 위에 치상하면 식물 조직에서 미분화된 세포 덩어리, 즉 캘러스가 형성된다. 이러한 캘러스는 식물세포배양의 한 종류로 이용되며 유래된 식물로 자라나 대량 생산을 가능하게 한다. 다양한 식물 캘러스 추출물은 항염증, 항산화 및 항비만 효과에 관한 연구가 보고되어 있고^{20,21} 국내 특허로는 산삼, 토마토, 녹차 등 20여종의 캘러스 추출물이 화장품 조성물로 등록되어 있으며, 바이오 화장품의 핵심 소재로 활용되고 있다.²²

이에 본 연구에서는 아열대 작물인 물사과(*Syzygium aqueum* Burm.f. Alston) 가지 및 풍란(*Neofinetia falcata* Thunb. Hu) 캘러스 추출물에 대한 항산화 및 항염 활성을 확인하고 다양한 유효 성분을 분리·동정하고자 하였다. 또한 분리된 화합물의 생리 활성을 확인하여 안전한 의약품, 건강기능식품 및 기능성 화장품 관련 천연 소재로서의 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 연구에서 시료의 추출, 분획 및 활성 성분 분리에 사용된 용매들은 Merck, OCI 및 대정화금의 제품을 사용하였다. 활성 성분 분리 과정에서 사용된 Medium pressure liquid chromatography (MPLC; Biotage Co.)에는 KP-C18-HS (Biotage Co.) 컬럼을 사용하였고 silica gel chromatography에는 silica gel 60 (0.04-0.063 mm, Merck Co.)을 사용하였으며, gel filtration chromatography에는 SephadexTM LH-20 (0.1-0.025 mm, GE healthcare Co.)을 사용하였다. 또한, thin layer chromatography (TLC)는 precoated silica gel aluminium sheet (silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck Co.)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 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 anisaldehyde (1% anisaldehyde, 5% H₂SO₄)를 필요에 따라 사용하였다.

분리된 화합물들을 구조분석하기 위하여 사용된 NMR (nuclear magnetic resonance spectrometer)은 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, 400 MHz, JEOL Co.) 혹은 AVANCE III (FT-NMR system, 500 MHz, Bruker Co.)이며, NMR 측정 용매는 CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)의 NMR 전용 용매로 CD₃OD, CDCl₃ 및 C₅D₅N를 사용하였다. 생리 활성 검색을 위한 흡광도 측정에는 microplate reader (SunriseTM, Tecan Co.)를 사용하였다. 분리된 화합물의 함량 분석에 사용된 high performance liquid chromatography (HPLC; Waters 2695, Waters Co., USA)에는 SunfireTM C18 (5 μm, 4.6 × 250 mm, Waters Co., USA) 컬럼을 사용하였으며, 검출기는 UV detector (Waters 2998, Waters Co., USA)를 사용하였다.

2. 생리 활성 평가

1) 항산화

가. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법²³을 응용하여 실시하였으며, 표준물질로 gallic acid를 사용하였다. 표준물질 및 시료 100 μ L에 증류수 900 μ L를 가하여 희석시키고 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 μ L를 첨가하여 혼합한다. 이를 상온에서 3분간 반응시킨 후, 7%(w/v) Na_2CO_3 용액 200 μ L를 가하고 증류수 700 μ L를 첨가하여 총 2 mL가 되도록 혼합한다. 이를 상온에서 1시간 반응시킨 후, 96 well plate에 200 μ L씩 옮겨 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid의 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준검정곡선(Figure 1)을 통해 환산되었으며, 표준검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

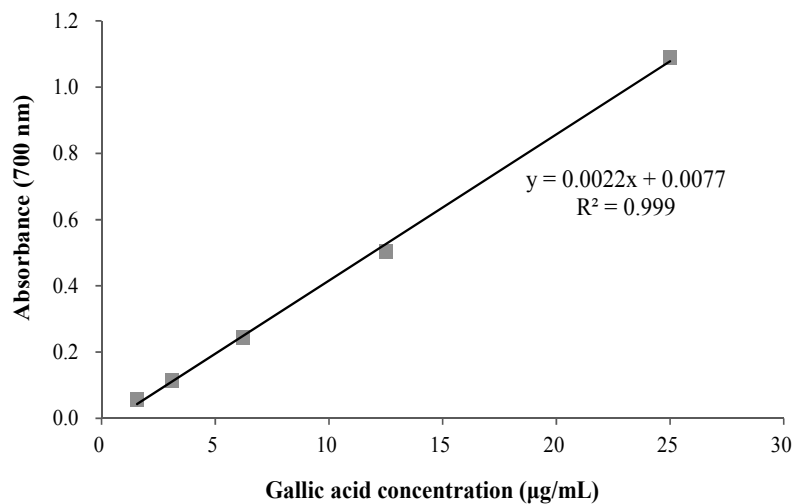


Figure 1. Calibration curve of standard gallic acid for quantification of total polyphenol contents.

나. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 Davis 등의 방법²⁴을 응용하여 실시하였으며, 표준물질로 quercetin을 사용하였다. 96 well plate에 표준물질 및 시료 15 μ L와 ethylene glycol 150 μ L를 넣고 0.1 N NaOH 15 μ L를 첨가하여 총 180 μ L가 되도록 혼합한다. 이를 상온에서 1시간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료의 총 플라보노이드 함량은 quercetin의 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준검정곡선(Figure 2)을 통해 환산되었으며, 표준검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

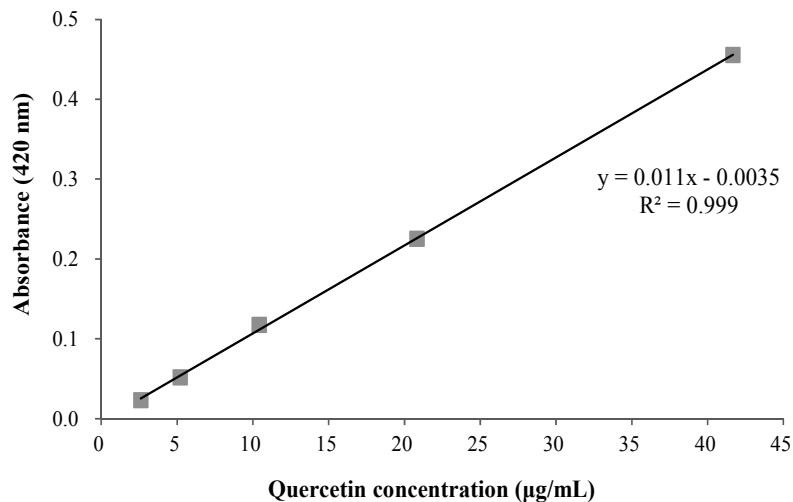


Figure 2. Calibration curve of standard quercetin for quantification of total flavonoid contents.

다. DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거 활성 실험은 Blois 등의 방법²⁵을 응용하여 실시하였다. 대조군으로 대표적인 항산화 물질인 BHT와 vitamin C로 잘 알려진 ascorbic acid를 사용하였다. 96 well plate에 대조군 및 시료 20 μ L와 ethanol로 용해시킨 0.2 mM DPPH radical 용액 180 μ L를 혼합한다. 이를 상온에서 20분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. Radical 소거율은 아래의 식에 대입하여 백분율로 나타내었다. 또한, 각 시료의 radical 소거율이 50%일 때의 시료 농도 (SC_{50})를 구하였다.

Radical scavenging activity (%)

$$= [1 - (Abs_{sample} - Abs_{blank}) / Abs_{control}] \times 100$$

$Abs_{control}$: 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

Abs_{blank} : 시료만의 흡광도

라. ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) cation radical 소거 활성 실험은 Re 등의 방법²⁶을 응용하여 실시하였다. 대조군으로 대표적인 항산화 물질인 BHT와 vitamin C로 잘 알려진 ascorbic acid를 사용하였다. ABTS⁺ radical 용액은 7.0 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 상온, 암소에서 16시간 동안 반응시켜 제조하였으며, 이 용액은 700 nm에서 흡광도가 0.78 ± 0.02 가 되도록 ethanol로 희석하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 대조군 및 시료 20 μ L와 희석한 ABTS⁺ radical 용액 180 μ L를 혼합한다. 이를 상온, 암소에서 20분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Radical 소거율은 아래의 식에 대

입하여 백분율로 나타내었다. 또한, 각 시료의 radical 소거율이 50%일 때의 시료 농도(SC₅₀)를 구하였다.

Radical scavenging activity (%)

$$= [1 - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$$

Abs_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

Abs_{blank} : 시료만의 흡광도

마. 세포 보호 효과

(1) HaCaT cell 배양

Immortalised human keratinocyte cell line인 HaCaT cell은 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양받아 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin; Gibco Inc., USA)과 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco Inc., USA)이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; Gibco Inc., USA) 배지에 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였으며, 3일 간격으로 계대 배양하였다.

(2) 과산화수소(H₂O₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과

HaCaT cell을 96 well plate에 1.0×10^4 cells/well로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서 24시간 배양하였다. 세포 배양 상등액을 제거한 후, 세포에 자극을 주기위해 H₂O₂를 처리하여 세포 배양기에서 30분간 배양하였다. 배양한 세포를 dulbecco's phosphate buffered saline (1 × DPBS; Gibco Inc., USA)로 2회 세척하고 FBS가 함유되지 않은 배지에 시료를 농도별로 처리하여 교환한 후, 세포 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 500 µg/mL의 농도로 MTT

(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서 3시간 반응시켰다. 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물에 DMSO를 가하여 용해시키고 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 아래의 식에 대입하여 %로 나타내었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

Abs_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

2) 항염

가. RAW264.7 cell 배양

Murine macrophage cell line인 RAW264.7 cell은 American Type Cell Culture (ATCC)로부터 분양받아 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin; Gibco Inc., USA)과 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco Inc., USA)이 함유된 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; Gibco Inc., USA) 배지에 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였으며, 2일 간격으로 계대 배양하였다.

나. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

RAW264.7 cell을 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서 18시간 배양하였다. 0.1 µg/mL의 LPS를 포함한 배지로 교환하고 시료를 농도별로 각각 처리하여 세포 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 96 well plate에 세포 배양 상등액 100 µL를 회수하고 griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene-diamine in 2.5% phosphoric

acid) 100 μ L를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시켰다. 이후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 sodium nitrite (NaNO_2)를 사용하였고 생성된 NO의 양은 NaNO_2 의 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준검정곡선을 통해 정량되어 백분율로 나타냈으며, 표준검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다. 또한 각 시료의 NO 생성 저해율이 50%일 때의 시료 농도(IC_{50})를 구하였다.

다. PGE_2 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정

RAW264.7 cell을 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 37°C , 5% CO_2 조건의 세포 배양기에서 18시간 배양하였다. 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 포함한 배지로 교환하고 시료를 농도별로 각각 처리하여 세포 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 얻어진 세포 배양 상등액에서 PGE_2 및 전염증성 cytokine 생성 함량은 각각 PGE_2 (R&D Systems), $\text{TNF-}\alpha$ (Invitrogen), IL-6 (Invitrogen) 및 IL-1 β (R&D Systems) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하여 측정하였다. 각각의 표준물질 농도에 따른 흡광도 값을 이용하여 작성된 표준검정곡선을 통해 정량되어 백분율로 나타냈으며, 표준검정곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다. 또한, 각 시료의 PGE_2 및 전염증성 cytokine 생성 저해율이 50%일 때의 시료 농도(IC_{50})를 구하였다.

라. Western blot analysis

RAW264.7 cell을 60 mm culture dish에 2.0×10^5 cells/dish로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서 18시간 배양하였다. 0.1 µg/mL의 LPS를 포함한 배지로 교환하고 시료를 농도별로 각각 처리하여 세포 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 세포 배양 상등액을 제거하고 차가운 phosphate buffered saline (PBS; Sigma Co.)으로 2회 세척한 후, lysis buffer (1 × RIPA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 사용하여 4°C에서 overnight으로 lysis시켰다. 단백질을 분리하기 위해 15000 rpm, 15 min, 4°C 조건으로 원심분리 하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 Bradford 시약을 사용하여 정량하였다.

정량한 단백질을 8-12%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane에 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk가 포함된 TTBS (0.1% Tween 20, Tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 90분간 blocking 시킨 후, TTBS 용액으로 3회 세척하였다. Membrane과 1차 항체를 반응시키기 위해 β-actin antibody (1:20000, Sigma), iNOS antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) 및 COX-2 antibody (1:1000, BD)를 사용하여 4°C에서 overnight 시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 membrane은 TTBS 용액으로 5회 세척하였다. Membrane과 peroxidase-conjugated된 2차 항체(1:5000 또는 1:20000, Santa Cruz Biotechnology)를 상온에서 1시간 반응 시킨 후, TTBS 용액으로 5회 세척하였다. 단백질은 WEST-ZOL (western blot detection system, iNtRON) 용액을 이용해 ECL 기질과 반응 시킨 후, Chemidoc (Fusion solo S, VILBER LOURMAT, France)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

3) 세포 독성 평가(MTT assay)

HaCaT cell 및 RAW264.7 cell을 각각 1.0×10^4 , 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건의 세포 배양기에서 18시간 및 24시간씩 배양하였다. HaCaT cell은 FBS가 함유되지 않은 배지에, RAW264.7 cell은 0.1 µg/mL의 LPS가 포함된 배지에 시료를 농도별로 각각 처리하여 세포 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 500 µg/mL의 농도로 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 첨가하여 세포 배양기에서 3시간 반응시켰다. 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물에 DMSO를 가하여 용해시키고 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 아래의 식에 대입하여 %로 나타내었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

Abs_{control} : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

Abs_{sample} : 시료를 첨가한 반응용액의 흡광도

3. HPLC 함량 분석

풍란 캘러스에서 분리된 화합물의 함량은 Sunfire™ C18 컬럼을 이용한 HPLC 분석을 통해 확인하였다. 분리된 화합물은 methanol에 녹여 각각 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL의 농도로 제조한 후, syringe filter로 여과하여 분리된 화합물의 함량을 측정하였다. 측정 후, peak 면적을 구하고 회귀 방정식을 이용한 표준검정곡선을 작성하였다(Figure 3). 이동상은 0.1% acetic acid가 함유된 증류수와 methanol을 사용하였고 유속은 1.0 mL/min으로 하였으며, 검출기는 UV detector (265 nm)를 사용하였다. 용출 조건은 gradient mode로 30 min 동안 methanol의 비율을 변화시키며 측정하였다(Table 1, 2).

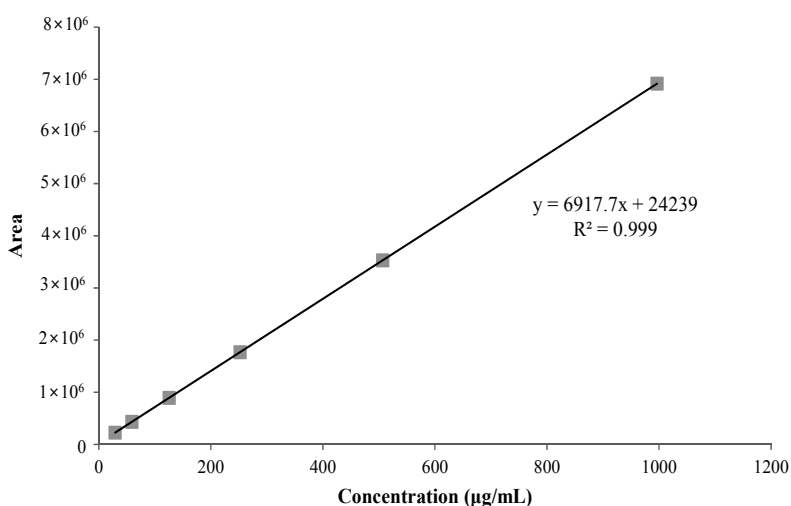


Figure 3. Calibration curve for quantification of kaempferol 3-*O*-robinobioside.

Table 1. HPLC chromatographic conditions of the control factors

Control Factor	Conditions
Infection volume	10 μ L
Column	Sunfire TM C18 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm)
Mobile phase	A: 0.1% acetic acid, B: methanol
Flow rate	1.0 mL/min
Column Temperature	40 $^{\circ}$ C
Wavelength	265 nm
Detector	Waters 2998 PDA (Waters, USA)
Separation Module	Waters 2695 (Waters, USA)

Table 2. Gradient elution condition for HPLC analysis

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow (mL/min)
0	90	10	1.0
5	55	45	1.0
25	45	55	1.0
30	0	100	1.0

Ⅲ. 연구 1 : 물사과 가지 추출물의 항산화 및 항염 활성 성분 연구

1. 재료

물사과는 도금양과(Myrtaceae)에 속하는 식물이다. 인도 남부에서 말레이시아 동부에 이르는 동남아시아 지역이 원산지이며, ‘수분이 많은 사과 같은 과일’이라는 뜻의 영어이름인 water apple을 직역한 것이다. 맛은 열은 편이지만 수분감과 청량감이 있으며, 아삭한 식감을 가졌다. 열매는 붉은 품종이 널리 재배되며, 흰색, 녹색, 연분홍색 및 빨간색인 품종도 가끔 볼 수 있다.²⁷

물사과 잎 추출물에 대해서는 항산화²⁸, 항고혈당²⁹ 등의 효능이 알려져 있고 Myricetin-3-*O*-rhamnoside, phloretin 및 hydroxybenzaldehyde 등의 유효 성분이 분리 보고 되어 있다.²⁹ 하지만 아직까지 물사과 가지에 대한 생리 활성 및 유효 성분에 대한 연구는 보고되어 있지 않으므로 본 연구에서는 물사과 가지 추출물 및 용매 분획물의 생리 활성을 확인하고 다양한 유효 성분을 분리·동정하였다.

실험에 사용된 물사과(*Syzygium aqueum* Burm.f. Alston) 가지(시료번호 : 474)는 2016년 12월에 제주시 오등동에 위치한 국립원예특작과학원 온난화대응 농업연구소에서 채집하였다. 채집한 물사과 가지는 동결 건조 후 분쇄하여 사용하였다(Figure 4).



Figure 4. Picture of *Syzygium aqueum* tree.

2. 물사과 가지의 추출, 분획 및 활성 성분 분리

1) 물사과 가지의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄된 물사과 가지 500.0 g을 70% EtOH 10 L에 넣고 상온에서 24 시간 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 37-40°C의 수욕 상에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% EtOH 추출물 148.8 g을 얻었다. 얻어진 70% EtOH 추출물 15.0 g을 증류수 1 L에 현탁시키고 분별 깔때기를 이용해 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 ethyl acetate, *n*-butanol 및 water layer를 얻었다. 이와 같은 방법으로 5회 더 반복 실시하여 추출물 총 90.0 g을 용매 분획하였다(Figure 5).

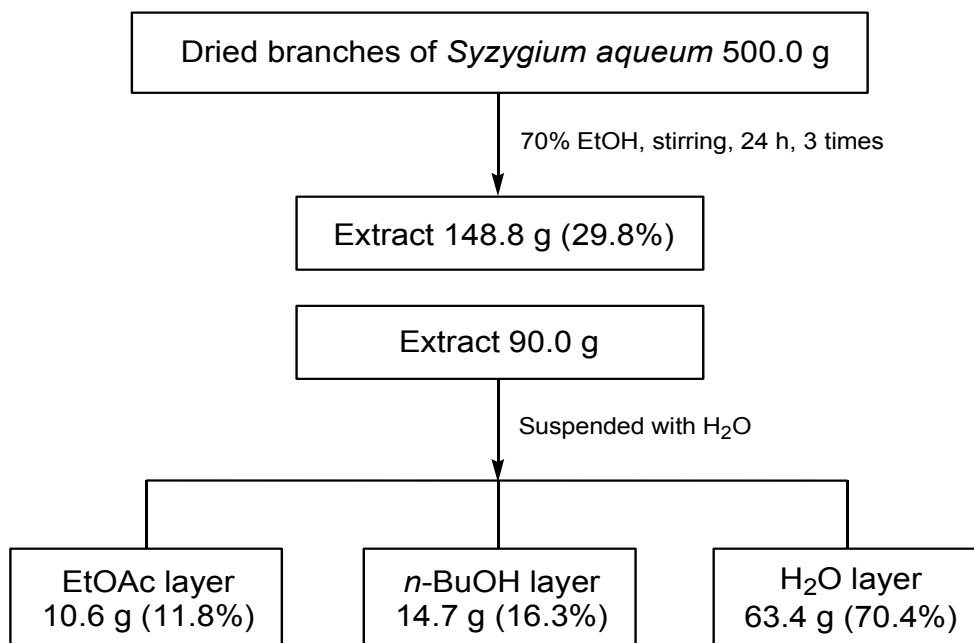


Figure 5. Extraction and solvent fractionation of *S. aqueum* branches.

2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

용매 분획 후 얻어진 각 분획물들 중 EtOAc 분획물 5.0 g은 극성에 따라 세분화하기 위하여 medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 수행하였다. 컬럼은 역상 silica gel (KP-C18-HS, 40+M, Biotage Co.)을 사용하였으며, H₂O-MeOH (20-100%)의 용매를 gradient 조건으로 각 30 mL씩 용출하여 총 48개의 fraction을 얻었다(Fr. MP1-48).

MPLC fraction들 중 Fr. MP9 (99.8 mg)는 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH = 5:1)를 수행하여 compound 1 (13.4 mg)을 분리하였고 Fr. MP12-14 (119.2 mg)는 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH = 3:1)를 수행하여 compound 2 (8.4 mg)를 분리하였다. 또한, Fr. MP27 (14.6 mg)과 Fr. MP36 (19.7 mg)은 단일 화합물로 각각 compound 3과 compound 4로 확인되었다(Figure 6).

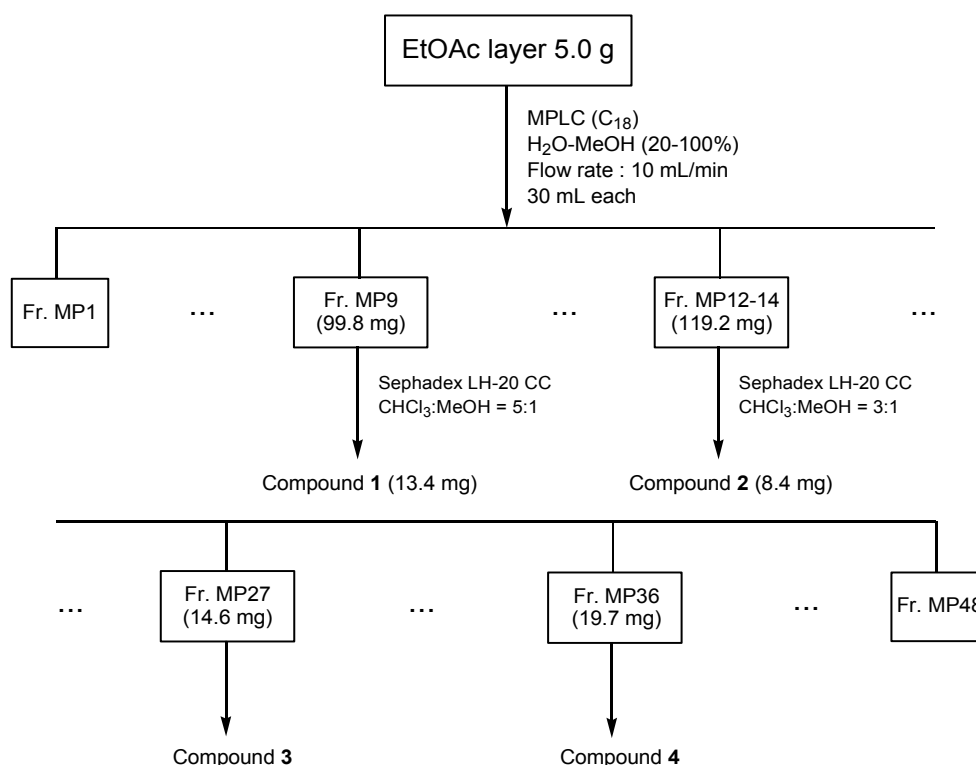


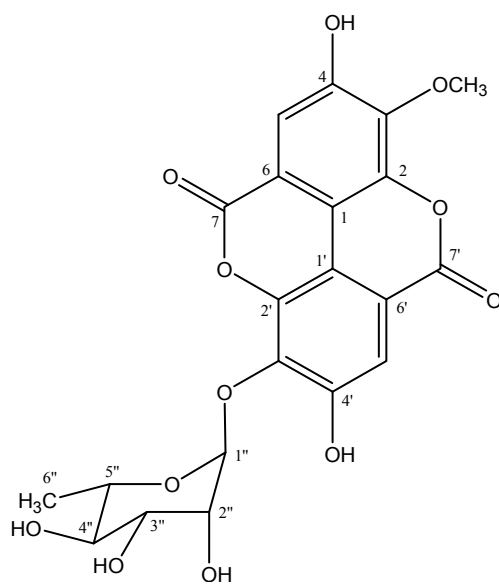
Figure 6. Isolation of compounds from *S. aqueum* branches.

3. 분리된 화합물의 구조 분석

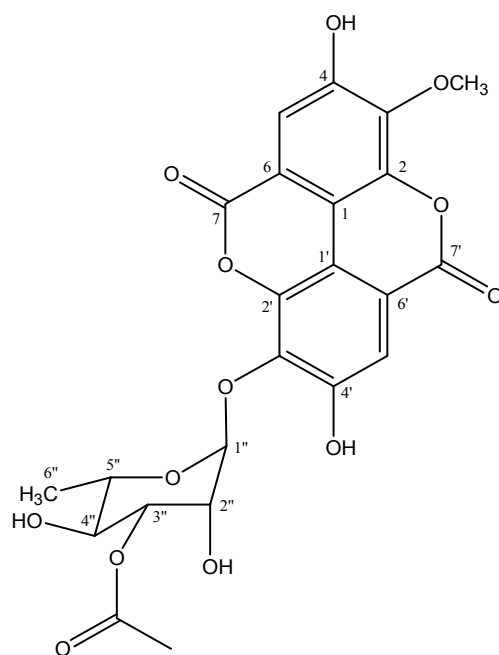
1) Compound 1, 2의 구조 동정

Compound 1은 ^{13}C NMR spectrum에서 21개의 carbon 피크가 관찰되며, 그 중 δ_{C} 112.9에서 154.2에 해당하는 12개의 피크를 통해 2개의 aromatic ring이 존재함을 예상하였다. 또한, δ_{C} 160.4 및 160.5의 피크를 통해 2개의 ester group이 분자 내에 존재함을 알 수 있으며, 2개의 δ_{H} 7.46 (1H, s) 피크와 종합하여 볼 때, ellagic acid 구조임을 예상하였다. δ_{C} 62.2 및 δ_{H} 4.18 (3H, s)의 deshielding된 methyl group의 피크를 통해 분자 내에 methoxy group이 치환되어 있음을 알 수 있다. δ_{H} 3.49-4.37, δ_{C} 72.0-73.8의 피크들과 당의 anomeric에 해당하는 δ_{H} 5.65 (1H, brs), δ_{C} 104.0의 피크 및 δ_{H} 1.22 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), δ_{C} 18.0의 피크를 종합하여 볼 때, α -form의 rhamnopyranoside가 결합되어 있는 구조를 예상할 수 있다. 정확한 구조 동정을 위해 2D NMR인 HMQC 및 HMBC를 측정하였다. HMQC NMR spectrum을 통해 각각의 proton과 carbon 사이의 one bond 결합 위치를 확인하였고 HMBC NMR spectrum 분석을 통해 proton과 carbon 사이의 long range coupling을 확인하였다. 그 결과, methoxy group과 당의 결합 위치를 확인하여 전체 구조를 예상하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌³⁰을 통해 compound 1은 3-*O*-methylellagic acid 3'-*O*- α -L-rhamnopyranoside로 확인되었다(Figure 7-12, Table 3).

Compound 2는 ^1H 및 ^{13}C NMR spectrum 분석 결과, compound 1과 매우 유사한 구조이나 δ_{C} 172.9의 피크를 통해 분자 내에 carbonyl group이 존재함을 예상하였고 δ_{H} 2.17 (3H, s) 및 δ_{C} 18.0의 피크를 통해 methyl group이 존재함을 예상하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌³⁰을 통해 compound 2는 3-*O*-methylellagic acid 3'-*O*- α -L-3''-*O*-acetyl-rhamnopyranoside로 확인되었다(Figure 7, 13, 14, Table 3).



Compound 1



Compound 2

Figure 7. Chemical structures of compounds 1 and 2.

Table 3. ¹H and ¹³C NMR data of compounds **1** and **2** (400 and 100 MHz)

No.	Compound 1 (CD ₃ OD)		Compound 2 (CD ₃ OD)	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
1		113.3		113.1
2		142.0		142.1
3		142.4		142.5
4		154.2		154.3
5	7.46 (1H, s)	112.9	7.52 (1H, s)	113.5
6		113.6		113.4
7		160.5		160.6
1'		113.2		113.0
2'		143.6		143.9
3'		138.7		138.7
4'		153.6		153.7
5'	7.46 (1H, s)	113.0	7.57 (1H, s)	114.9
6'		114.5		113.8
7'		160.4		160.5
1''	5.65 (1H, brs)	104.0	5.66 (1H, brs)	103.8
2''	3.49-4.37	72.1	3.46-5.27	71.0
3''	3.49-4.37	72.2	3.46-5.27	72.1
4''	3.49-4.37	73.8	3.46-5.27	75.5
5''	3.49-4.37	72.0	3.46-5.27	69.8
6''	1.22 (3H, d, 6.4)	18.0	1.26 (3H, d, 6.4)	21.2
3-OCH ₃	4.18 (3H, s)	62.2	4.18 (3H, s)	62.0
COO				172.9
CH ₃			2.17 (3H, s)	18.0

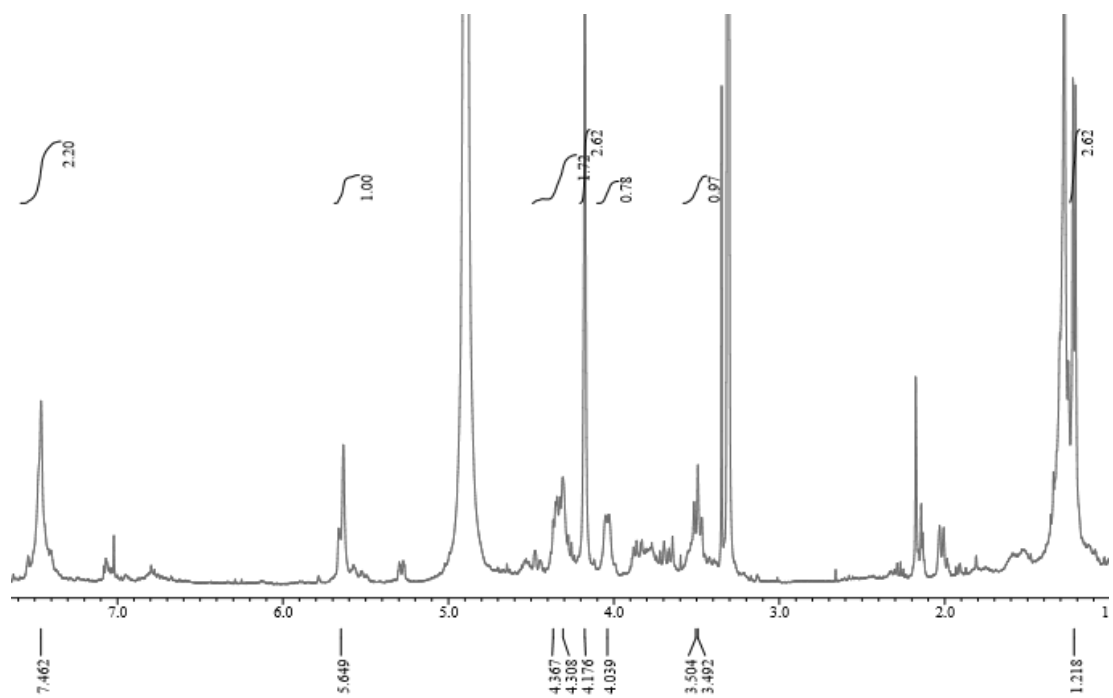


Figure 8. ^1H NMR spectrum of compound 1 (CD_3OD).

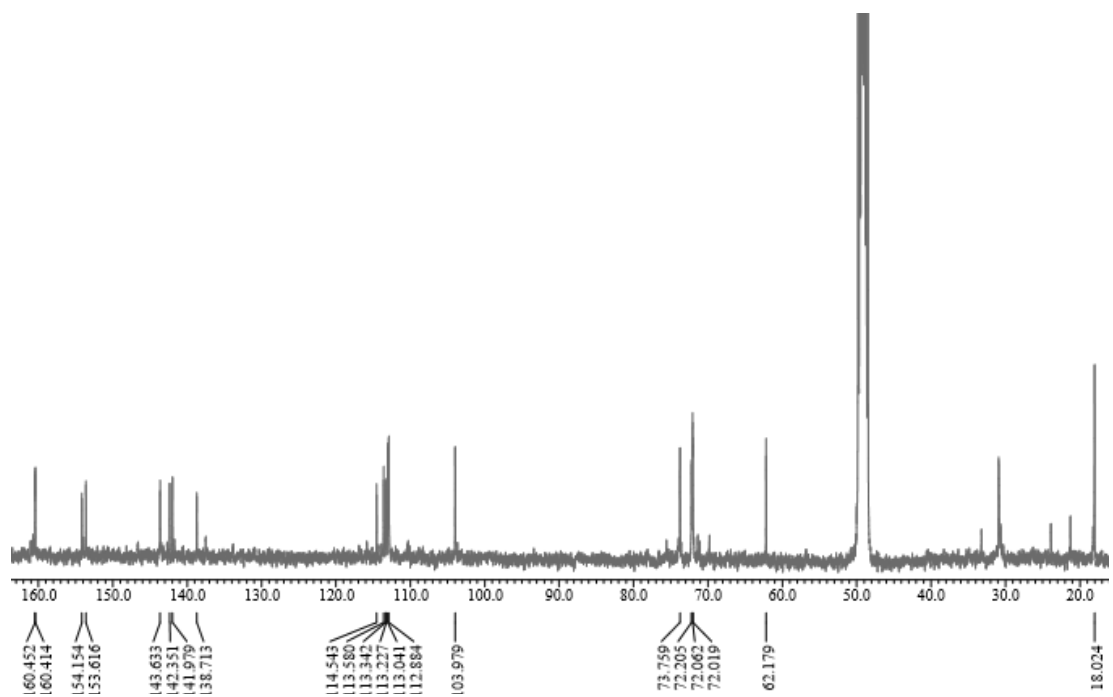


Figure 9. ^{13}C NMR spectrum of compound 1 (CD_3OD).

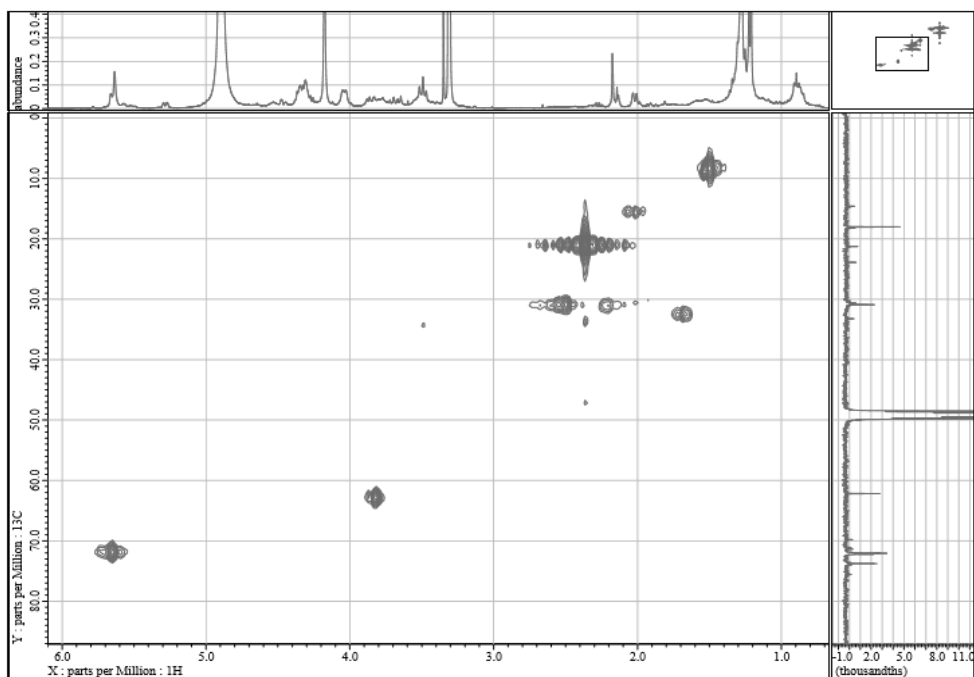


Figure 10. HMQC NMR spectrum of compound 1 (CD₃OD).

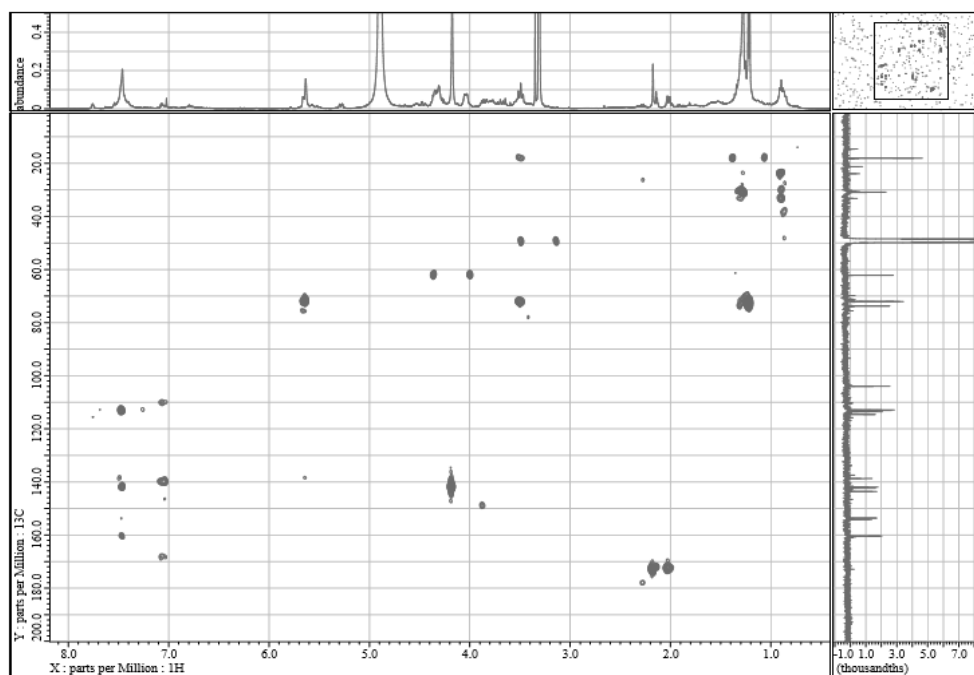


Figure 11. HMBC NMR spectrum of compound 1 (CD₃OD).

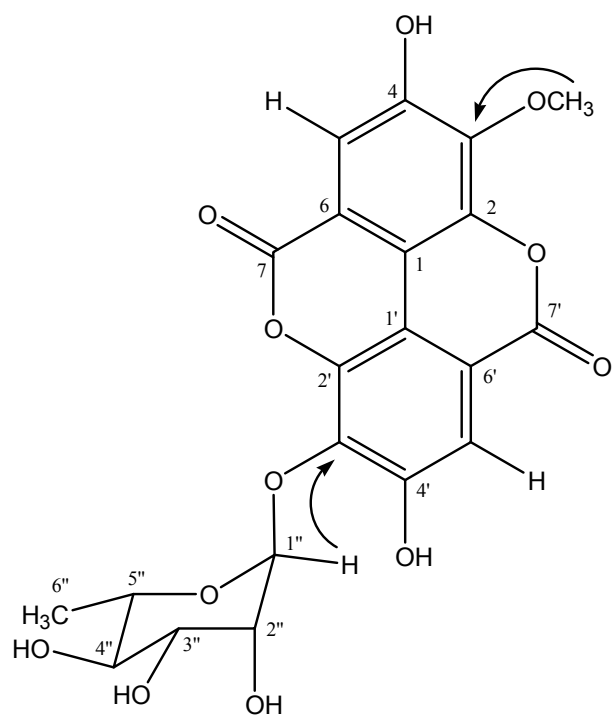


Figure 12. The key HMBC NMR spectrum of compound 1.

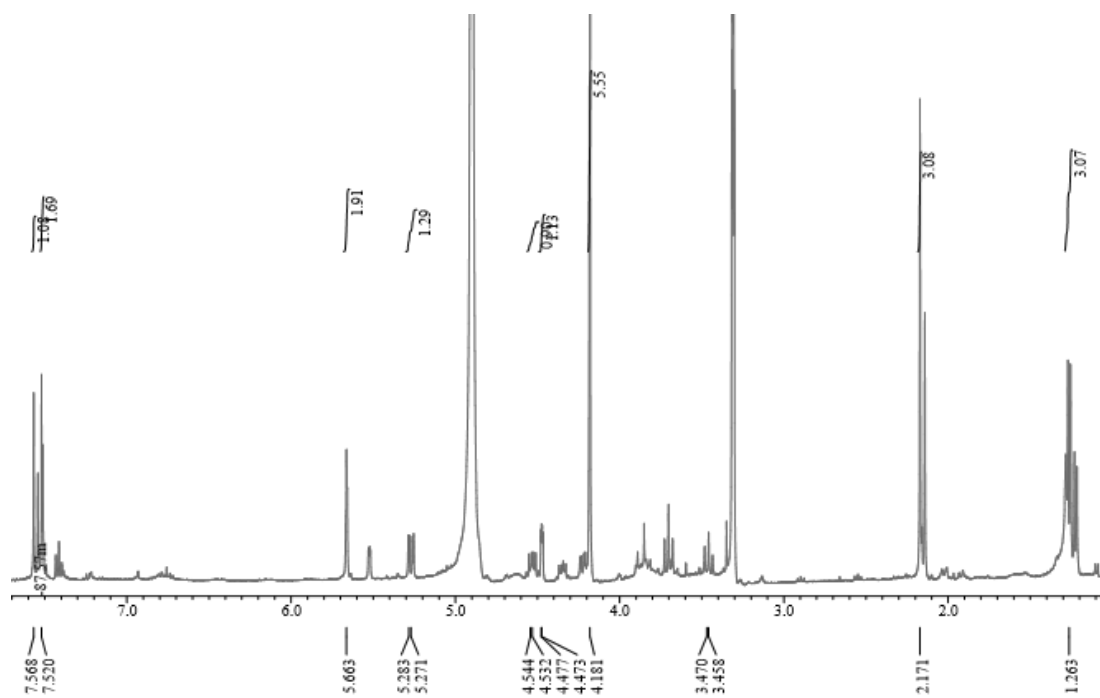


Figure 13. ^1H NMR spectrum of compound 2 (CD_3OD).

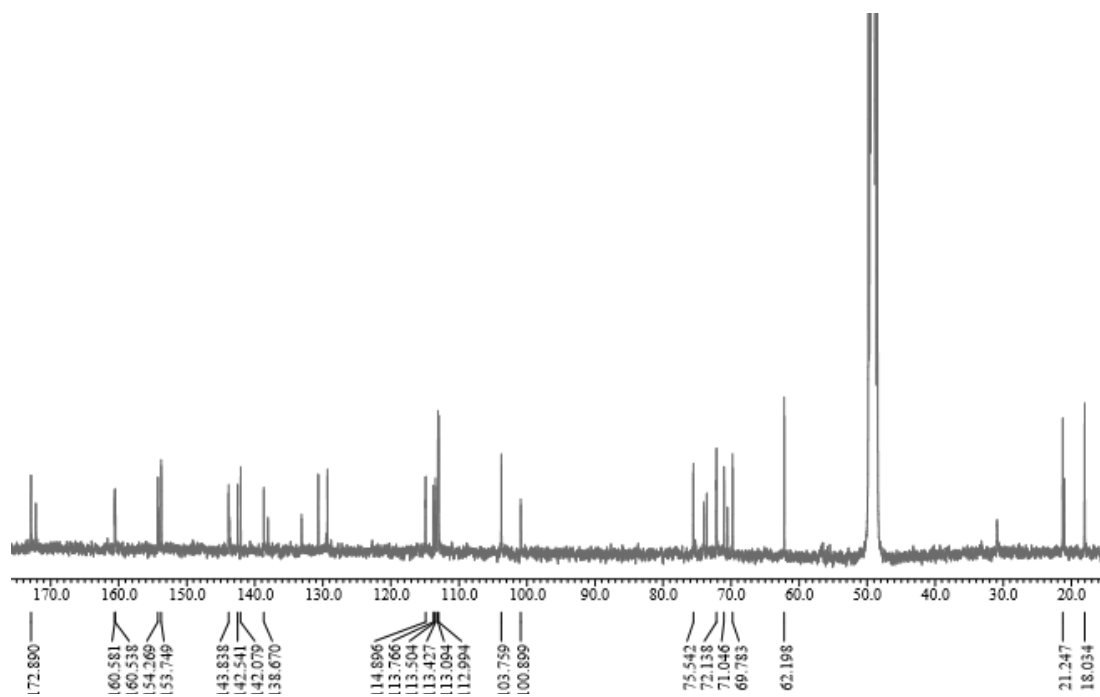
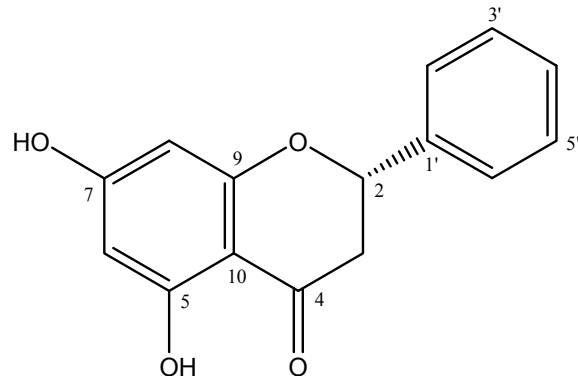


Figure 14. ^{13}C NMR spectrum of compound 2 (CD_3OD).

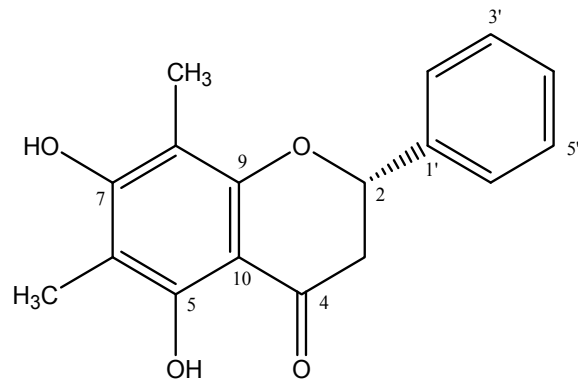
2) Compound 3, 4의 구조 동정

Compound 3은 ^{13}C NMR spectrum을 통해 대칭인 2개의 carbon을 포함하여 총 15개의 carbon이 있는 전형적인 flavonoid 골격임을 예상할 수 있다. 그 중 δ_{H} 7.39-7.49 (5H, overlapped)의 피크를 통해 flavonoid의 B ring이 대칭 구조임을 알 수 있으며, δ_{C} 197.5의 피크는 carbonyl group으로 예상할 수 있다. δ_{H} 2.77-3.09 및 δ_{C} 44.3, 80.6의 피크를 통해 flavanone 골격임을 알 수 있으며, 이들 데이터를 바탕으로 문헌³¹을 통해 compound 3은 pinocembrin으로 확인되었다(Figure 15-17, Table 4).

Compound 4는 ^1H 및 ^{13}C NMR spectrum 분석 결과, compound 3과 유사한 구조이나 δ_{H} 2.01 (3H, s), δ_{H} 2.02 (3H, s) 및 δ_{C} 7.6, 8.3의 피크가 더 나타난 것으로 보아 2개의 methyl group이 치환되어 있을 것이라 예상하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌³²을 통해 compound 4는 desmethoxymatteucinol로 확인되었다(Figure 15, 18, 19, Table 4).



Compound 3



Compound 4

Figure 15. Chemical structures of compounds 3 and 4.

Table 4. ¹H and ¹³C NMR data of compounds **3** and **4** (400 and 100 MHz)

No.	Compound 3 (CD ₃ OD)		Compound 4 (CD ₃ OD)	
	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., <i>J</i> Hz)	δ_{C}
2	5.46 (1H, dd, 3.2, 12.8)	80.6	5.43 (1H, dd, 3.2, 12.4)	80.2
3	2.77 (1H, dd, 3.2, 17.4)	44.3	2.80 (1H, dd, 3.2, 16.9)	44.4
	3.09 (1H, dd, 12.8, 17.4)		3.05 (1H, dd, 12.4, 16.9)	
4		197.5		198.1
5		165.6		160.5
6	5.94 (1H, d, 2.3)	96.4		104.3
7		168.6		164.4
8	5.90 (1H, d, 2.3)	97.3		105.1
9		164.8		159.2
10		103.5		103.4
1'		140.6		141.0
2', 6'	7.49 (2H, dd, 1.8, 8.7)	127.5	7.51 (2H, overlapped)	127.3
3', 5'	7.39 (2H, overlapped)	129.8	7.39 (2H, overlapped)	129.8
4'	7.39 (1H, overlapped)	129.9	7.39 (1H, overlapped)	129.6
6-CH ₃			2.01 (3H, s)	8.3
8-CH ₃			2.02 (3H, s)	7.6

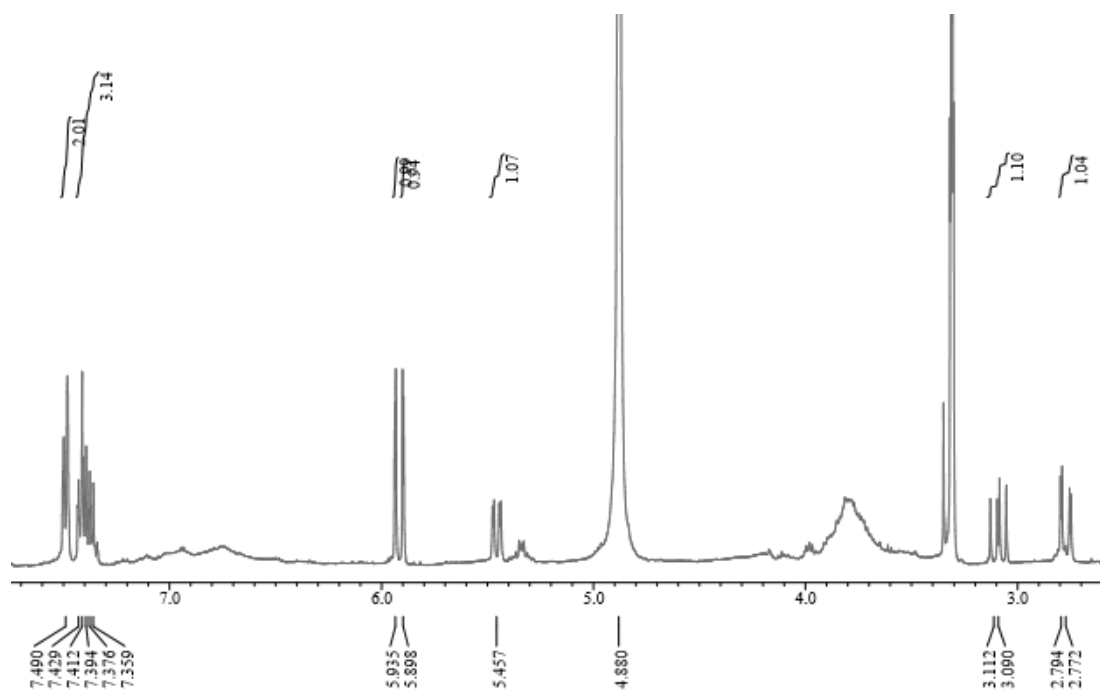


Figure 16. ^1H NMR spectrum of compound **3** (CD_3OD).

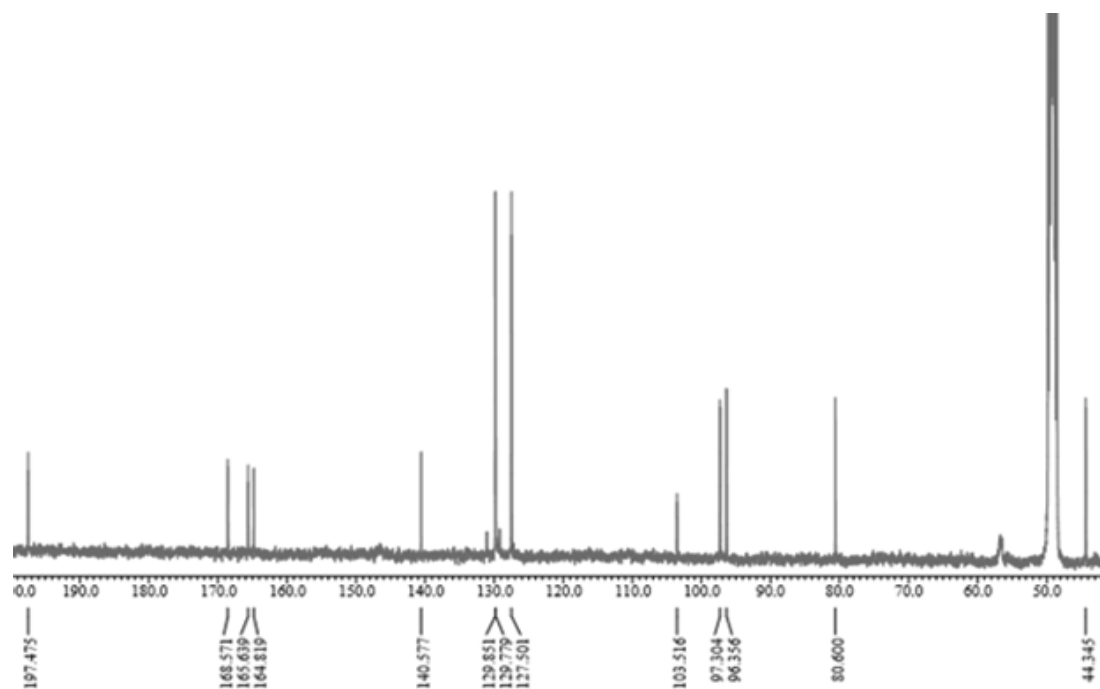


Figure 17. ^{13}C NMR spectrum of compound **3** (CD_3OD).

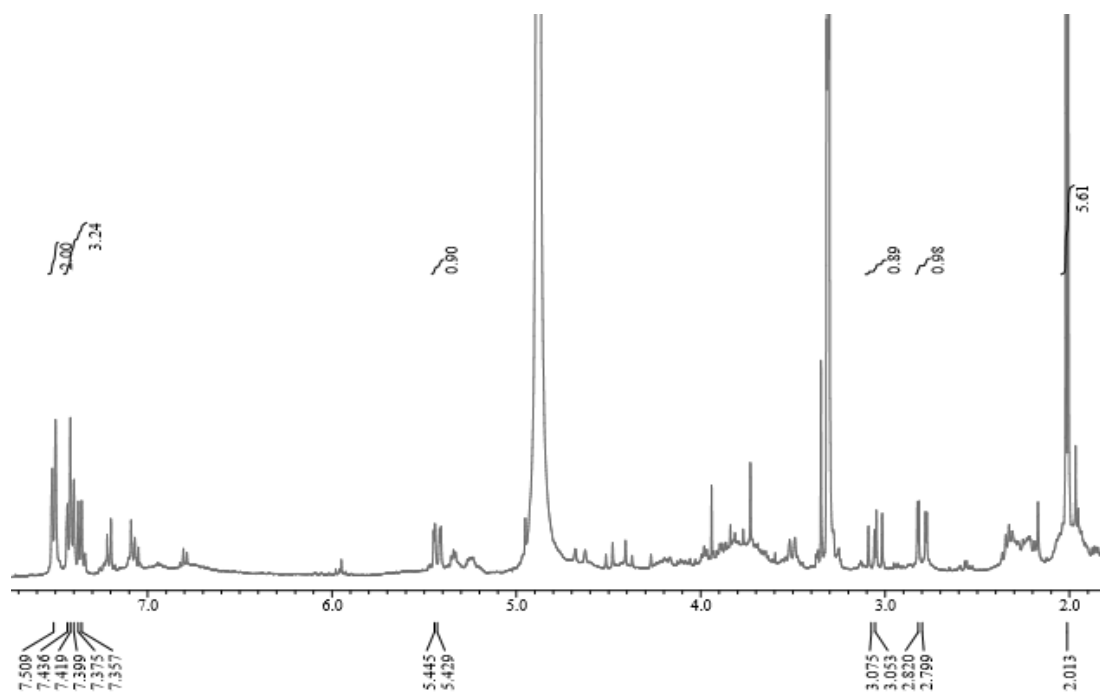


Figure 18. ^1H NMR spectrum of compound **4** (CD_3OD).

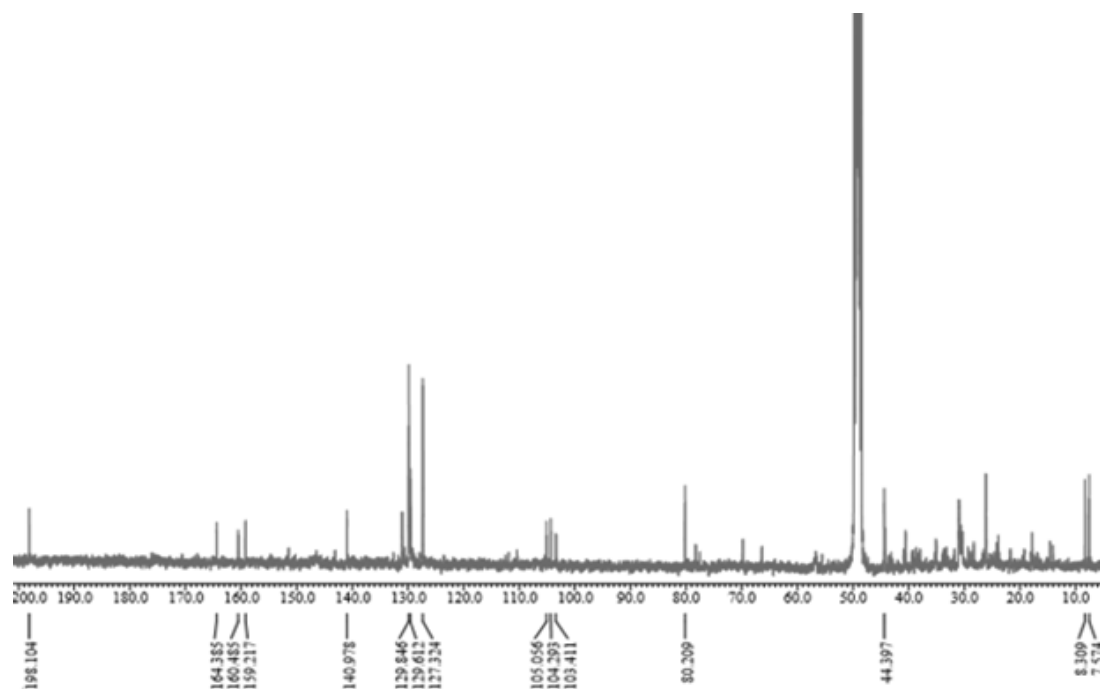


Figure 19. ^{13}C NMR spectrum of compound **4** (CD_3OD).

4. 물사과 가지 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

1) 항산화

가. 총 폴리페놀 함량 측정

물사과 가지 추출물 및 용매 분획물의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid 표준용액의 표준검정곡선을 통해 추출물 및 용매 분획물의 중량 1 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 측정되었다. 그 결과, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물이 많은 폴리페놀(270.6, 283.5 mg/g GAE)을 함유하고 있었다. 이는 다른 항산화 활성 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상하였다(Figure 20).

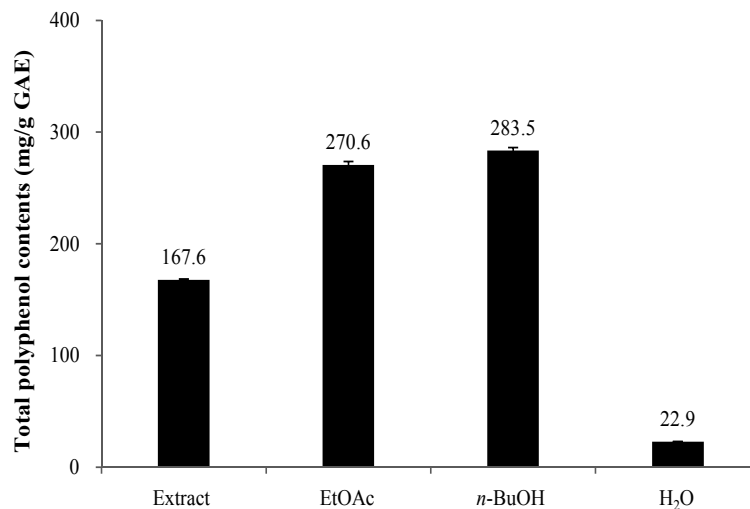


Figure 20. Total polyphenol contents of extract and solvent layers from *S. aqueum* branches. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

나. 총 플라보노이드 함량 측정

물사과 가지 추출물 및 용매 분획물의 총 플라보노이드 함량은 quercetin 표준 용액의 표준검정곡선을 통해 추출물 및 용매 분획물의 중량 1 g당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산하여 측정되었다. 그 결과, EtOAc 분획물이 가장 많은 양의 플라보노이드(89.2 mg/g QE)를 함유하고 있었다. 이는 다른 항산화 활성 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상하였다 (Figure 21).

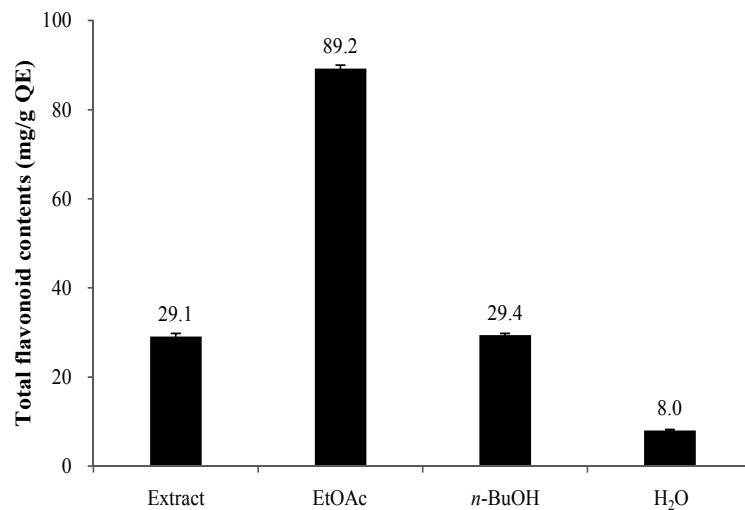


Figure 21. Total flavonoid contents of extract and solvent layers from *S. aqueum* branches. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

다. DPPH radical 소거 활성 측정

물사와 가지 추출물 및 용매 분획물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 3.125, 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 진행하였으며, 각각에 대하여 SC_{50} 값을 계산하였다. 그 결과, 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 많았던 EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물의 SC_{50} 값이 각각 10.6, 10.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 ascorbic acid 만큼 높은 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 22, Table 5).

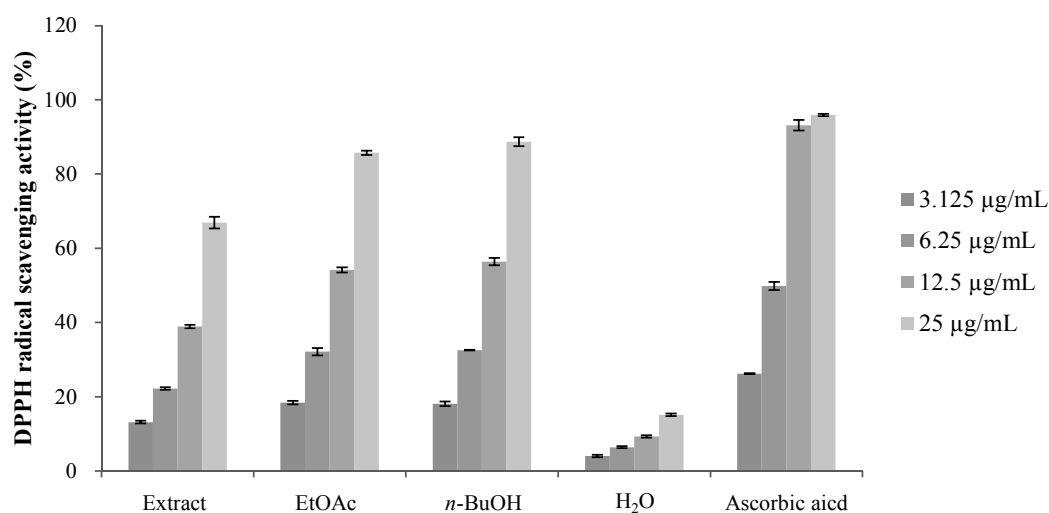


Figure 22. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers from *S. aqueum* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 5. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent layers from *S. aqueum* branches

	Extract	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	Ascorbic acid
SC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	17.8	10.6	10.5	>25.0	6.4

라. ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

물사와 가지 추출물 및 용매 분획물에 대하여 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 3.125, 6.25, 12.5, 25 µg/mL의 농도로 진행하였으며, 각각에 대하여 SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 많았던 EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물의 SC₅₀값이 각각 5.8, 6.1 µg/mL로 대조군인 ascorbic acid 만큼 높은 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인하였다 (Figure 23, Table 6).

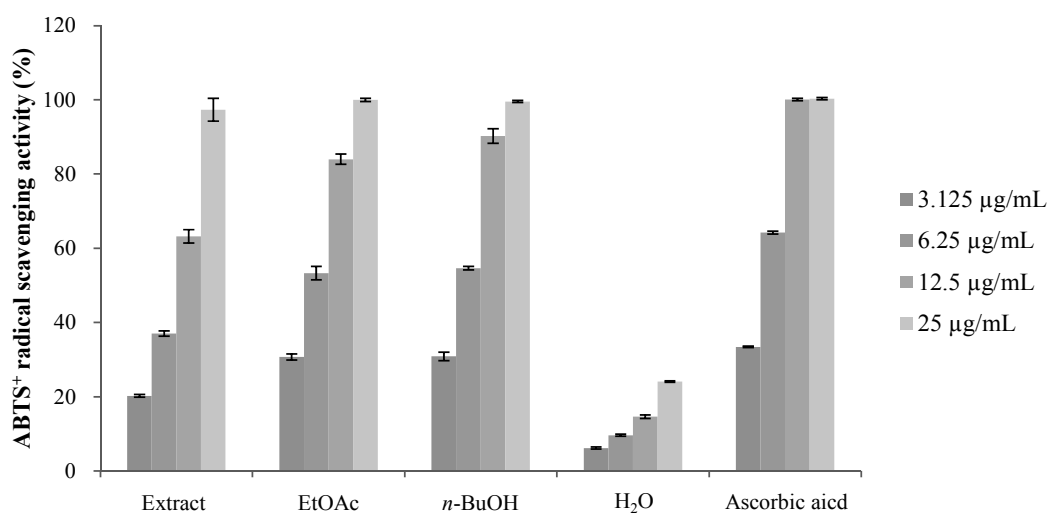


Figure 23. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers from *S. aqueum* branches. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

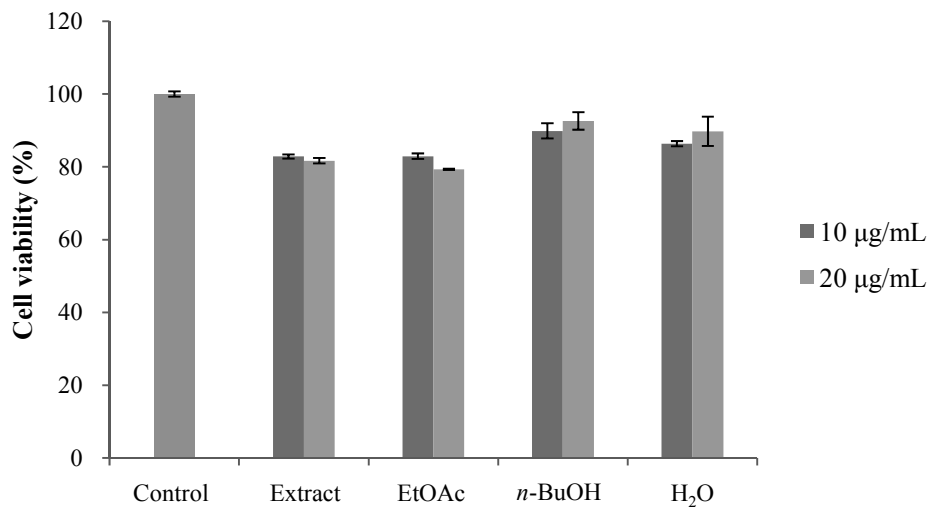
Table 6. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities for extract and solvent layers from *S. aqueum* branches

	Extract	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	Ascorbic acid
SC ₅₀ (µg/mL)	9.5	5.8	6.1	>25.0	5.7

마. 세포 보호 효과

(1) 세포 독성 평가(MTT assay)

물사과 가지 추출물 및 용매 분획물에 대하여 세포 항산화 활성을 측정하기 위해 HaCaT cell을 이용하여 세포 독성(MTT assay) 및 과산화수소(H₂O₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 먼저, 실험에 사용될 시료의 농도를 정하기 위해 HaCaT cell에 대하여 추출물 및 용매 분획물의 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, 추출물 및 용매 분획물은 10, 20 µg/mL의 농도에서 세포 생존율이 모두 80% 이상이었다. 따라서 본 실험에서 사용될 시료의 농도는 80% 이상의 세포 생존율을 나타내는 최고 농도인 10, 20 µg/mL로 설정하였다 (Figure 24).



Figuer 24. Effects of extract and solvent layers from *S. aqueum* branches on HaCaT cells viability. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and cytotoxicity was then determined by MTT assay. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(2) 과산화수소(H_2O_2)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과

물사과 가지 추출물 및 용매 분획물에 대하여 H_2O_2 로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 먼저, 실험에 사용될 H_2O_2 의 농도를 정하기 위해 HaCaT cell에 대하여 H_2O_2 의 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, 4 mM의 농도에서 세포 생존율은 60.2%로 확인되었다. 따라서 본 실험에서는 4 mM의 H_2O_2 를 처리하여 손상된 세포에 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 추출물 및 용매 분획물을 처리하였다. 그 결과, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 물사과 가지 추출물 및 용매 분획물은 세포 생존율에 영향을 미치지 않았으나 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 추출물 및 EtOAc 분획물의 세포 생존율은 각각 71.0, 70.3%로 확인되었다. 따라서 물사과 가지 추출물 및 EtOAc 분획물은 H_2O_2 로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 11.7, 10.9%의 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다(Figure 25).

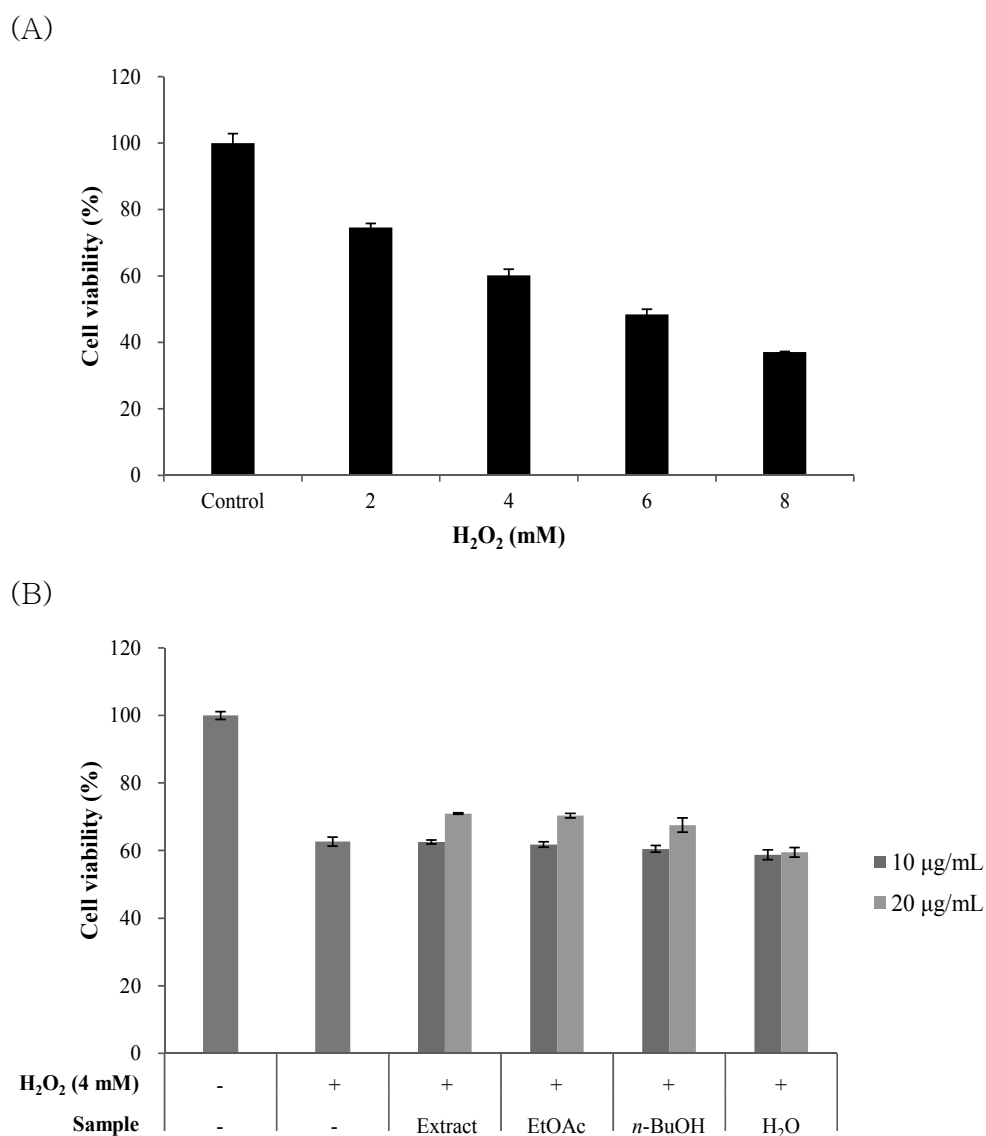


Figure 25. (A) Cell viability on H₂O₂-induced cell damage in HaCaT cell system. (B) Cell protective effects of extract and solvent layers from *S. aqueum* branches on H₂O₂-induced HaCaT cell. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

2) 항염

가. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

물사과 가지 추출물 및 용매 분획물에 대하여 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 먼저, 추출물 및 용매 분획물은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, EtOAc 분획물이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 61.1%의 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였다(Figure 26). 따라서 세포에 대한 독성 없이 NO 생성 억제 활성이 우수했던 EtOAc 분획물에 대해 추가적으로 독성이 없는 범위인 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 실험을 진행하였다. 그 결과, 물사과 가지 EtOAc 분획물은 세포에 대한 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, IC_{50} 값은 51.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다(Figure 27).

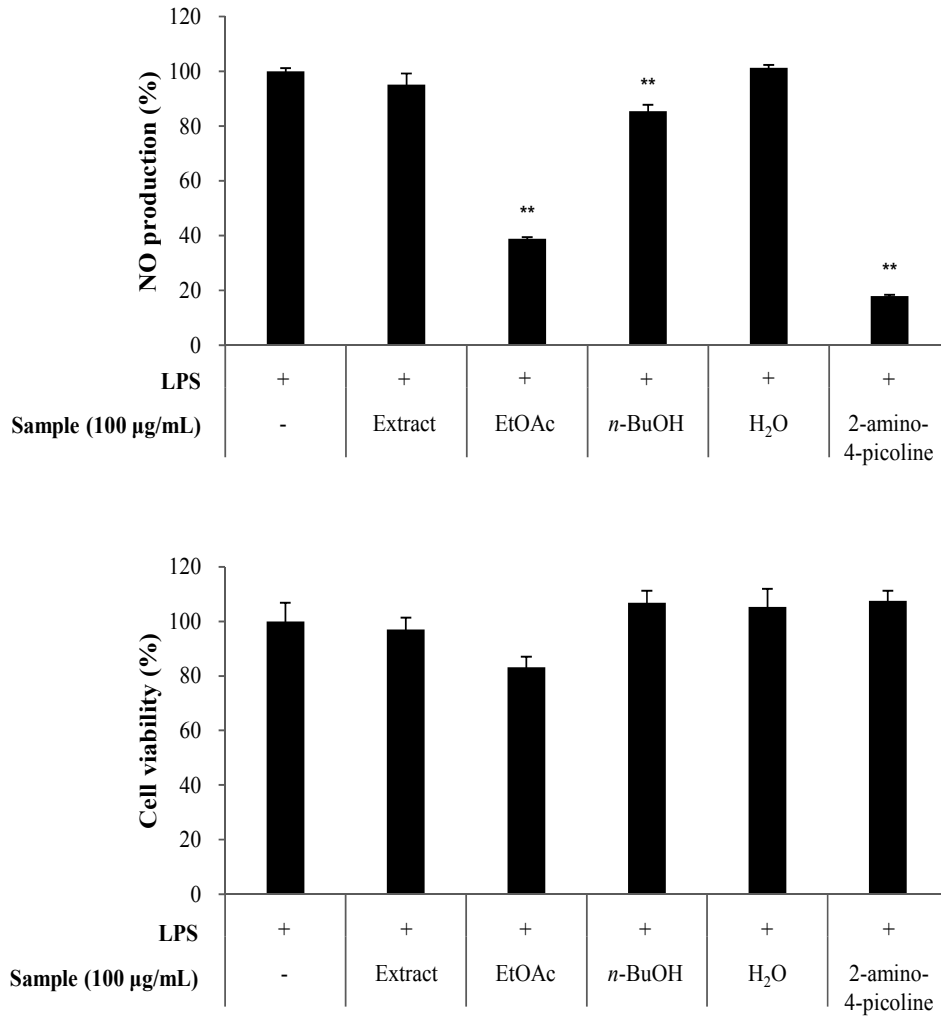


Figure 26. Effects of extract and solvent layers from *S. aqueum* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0.1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus *S. aqueum* branches and 2-amino-4-picoline (positive control, 10 µM) for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. ** $p < 0.01$

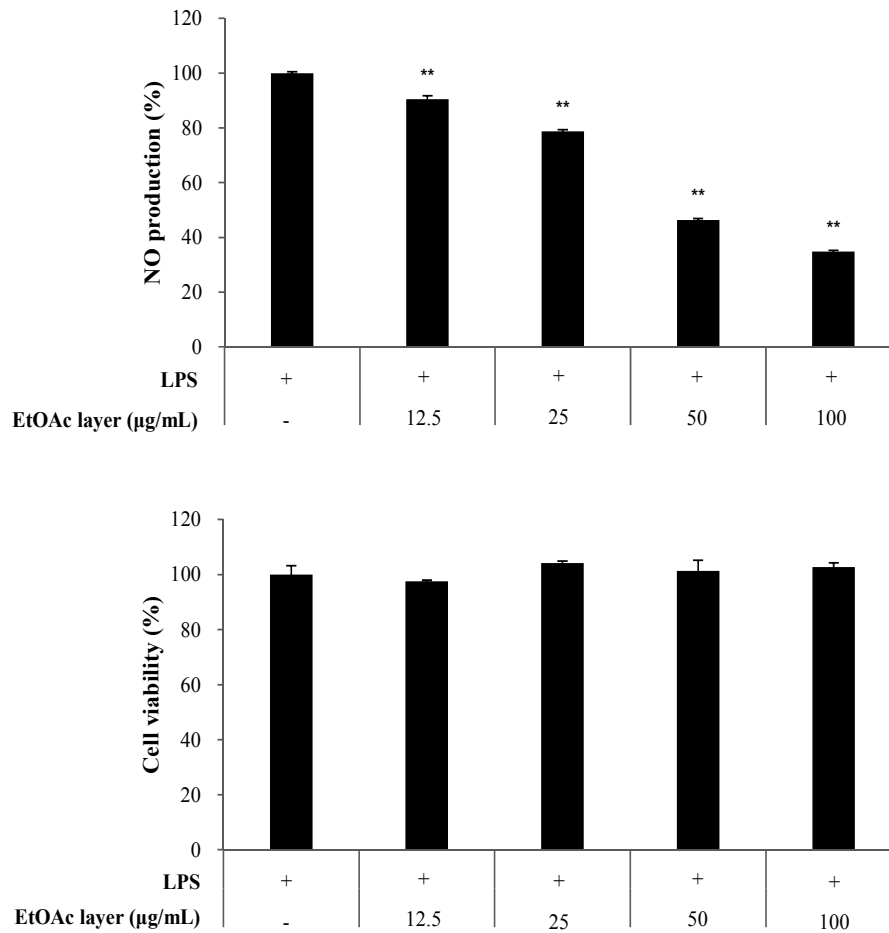


Figure 27. Effects of EtOAc layer from *S. aqueum* branches on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0.1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc layer from *S. aqueum* branches for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. ** $p < 0.01$

나. PGE₂ 생성 억제 활성 측정

NO 생성을 억제시킨 물사과 가지 EtOAc 분획물에 대하여 PGE₂ 생성 억제 활성을 sandwich ELISA kit로 측정하였다. 실험은 독성이 없는 범위인 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 진행하였으며, 이에 대하여 IC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, PGE₂의 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것을 확인하였으며, PGE₂의 IC₅₀값은 47.9 µg/mL로 확인되었다(Figure 28).

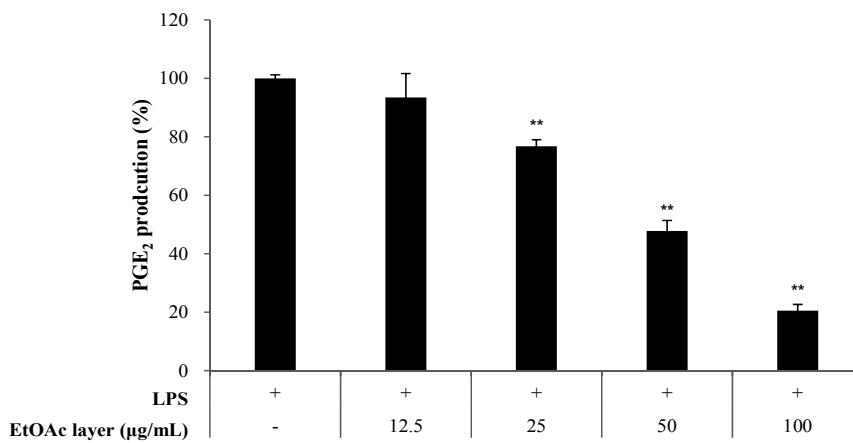


Figure 28. Effects of EtOAc layer from *S. aqueum* branches on PGE₂ production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. ***p* < 0.01

다. iNOS 및 COX-2 단백질 발현 측정

NO 생성을 억제시킨 물사과 가지 EtOAc 분획물에 대하여 iNOS 및 COX-2 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과, iNOS 단백질의 발현을 농도 의존적으로 억제시키는 것을 확인하였으며, COX-2 단백질의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Figure 29).

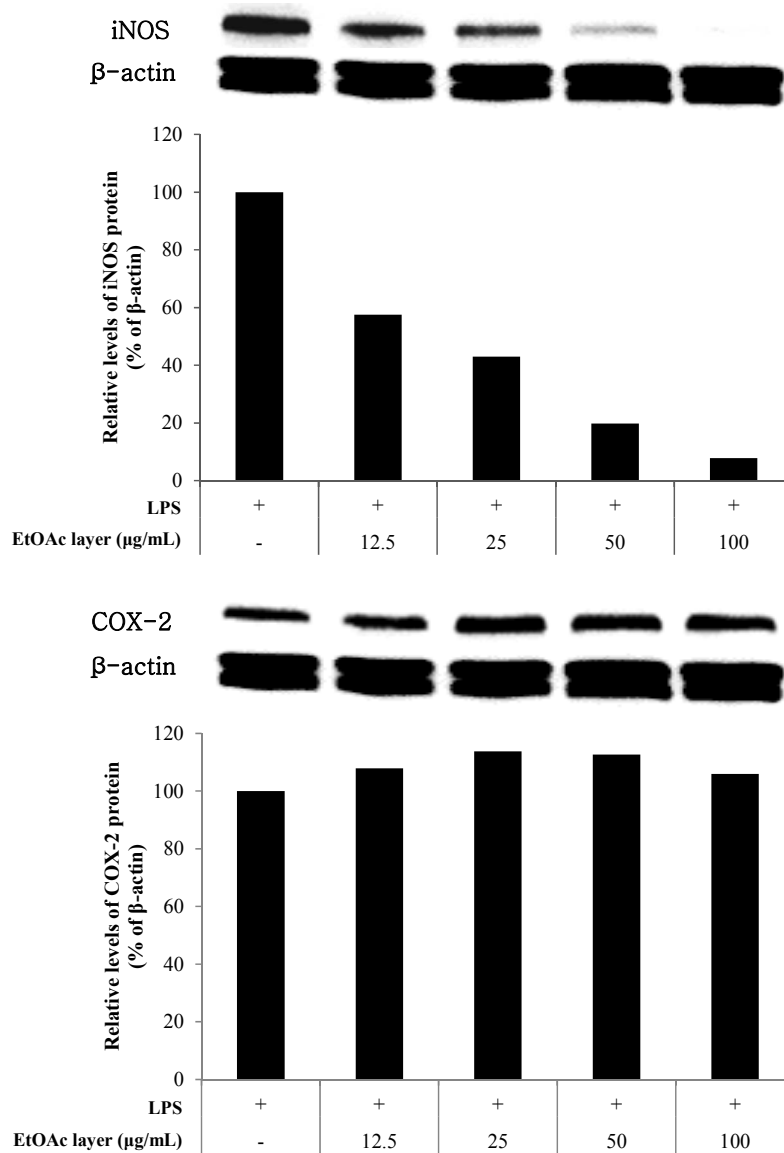


Figure 29. Effects of EtOAc layer from *S. aqueum* branches on the levels of iNOS and COX-2 protein. The iNOS or COX-2 protein levels in each sample was normalized to the quantity of β-actin.

라. 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정

iNOS 단백질의 발현을 억제시킨 물사과 가지 EtOAc 분획물에 대하여 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-6 및 IL-1 β)의 생성 억제 활성을 sandwich ELISA kit로 측정하였다. 실험은 독성이 없는 범위인 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 진행하였으며, 각각에 대하여 IC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, EtOAc 분획물은 TNF- α 의 생성을 억제하는데 영향을 미치지 않은 반면(Figure 30, Table 7), IL-6 및 IL-1 β 의 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것을 확인하였다. IL-6의 IC₅₀값은 100 $\mu\text{g/mL}$ 이상이었으며, IL-1 β 의 IC₅₀값은 68.7 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되었다(Figure 31, Table 7).

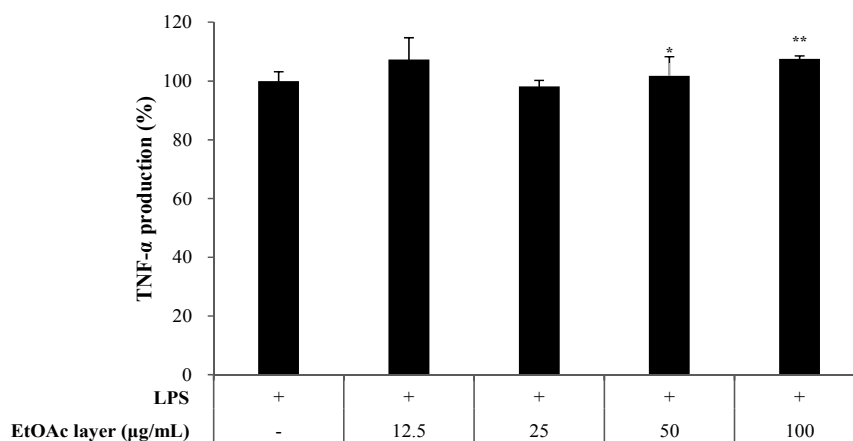


Figure 30. Effects of EtOAc layer from *S. aqueum* branches on TNF- α production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

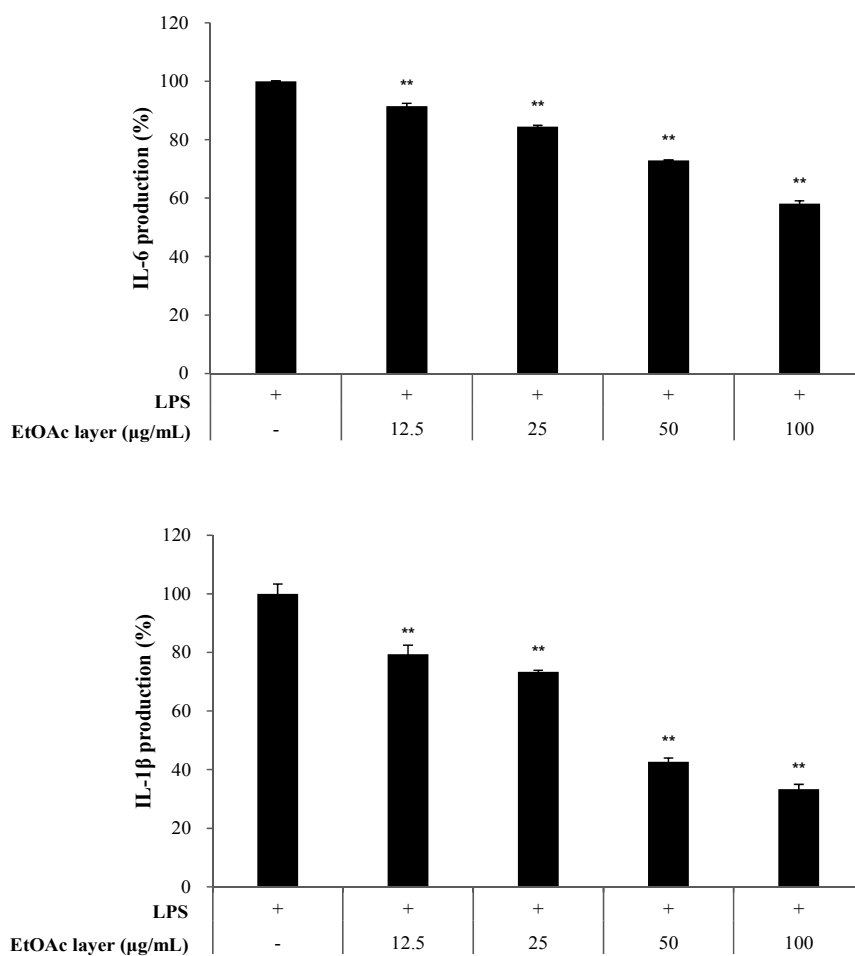


Figure 31. Effects of EtOAc layer from *S. aqueum* branches on IL-6 and IL-1 β production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. ** $p < 0.01$

Table 7. IC₅₀ values of EtOAc layer from *S. aqueum* branches on pro-inflammatory cytokines production in LPS-induced RAW264.7 cells

	TNF- α	IL-6	IL-1 β
IC ₅₀ (μg/mL)	N.A.*	>100.0	68.7

* N.A. : No activity

5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

1) 항산화

가. DPPH radical 소거 활성 측정

물사과 가지에서 분리된 화합물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. Compound 2는 다른 화합물과 혼합된 상태로 분리되어 compound 1, 3, 4에 대하여 실험을 진행하였다. 실험은 25, 50, 100, 200, 400 μM 의 농도로 진행하였으며, 각각에 대하여 SC_{50} 값을 계산하였다. 그 결과, compound 1의 SC_{50} 값은 82.8 μM 로 가장 높은 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인하였다 (Figure 32, Table 8).

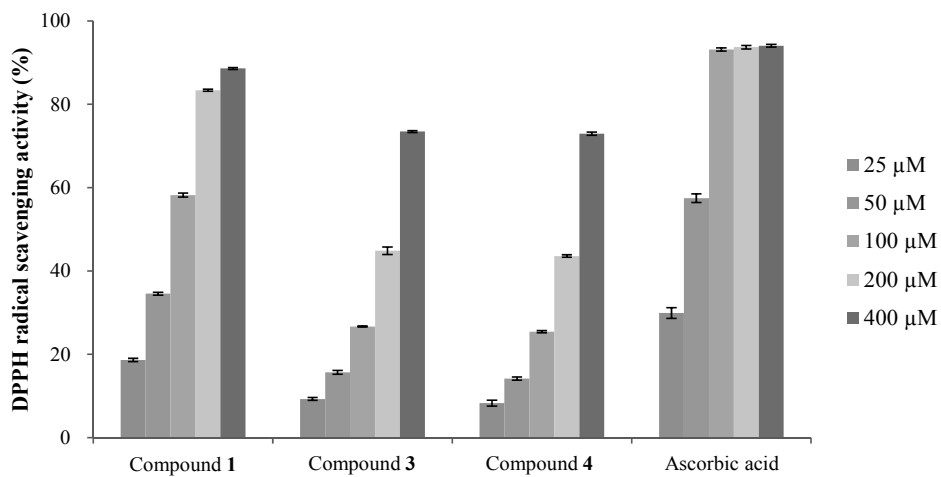


Figure 32. DPPH radical scavenging activities of isolated compounds 1, 3 and 4. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 8. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activities for isolated compounds 1, 3 and 4

	Compound 1	Compound 3	Compound 4	Ascorbic acid
SC_{50} (μM)	82.8	248.0	255.3	43.2

나. ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

물사와 가지에서 분리된 화합물에 대하여 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 12.5, 25, 50, 100 μM의 농도로 진행하였으며, 각각에 대하여 SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, compound 1의 SC₅₀값은 17.9 μM로 대조군인 ascorbic acid보다 더 높은 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인하였다 (Figure 33, Table 9).

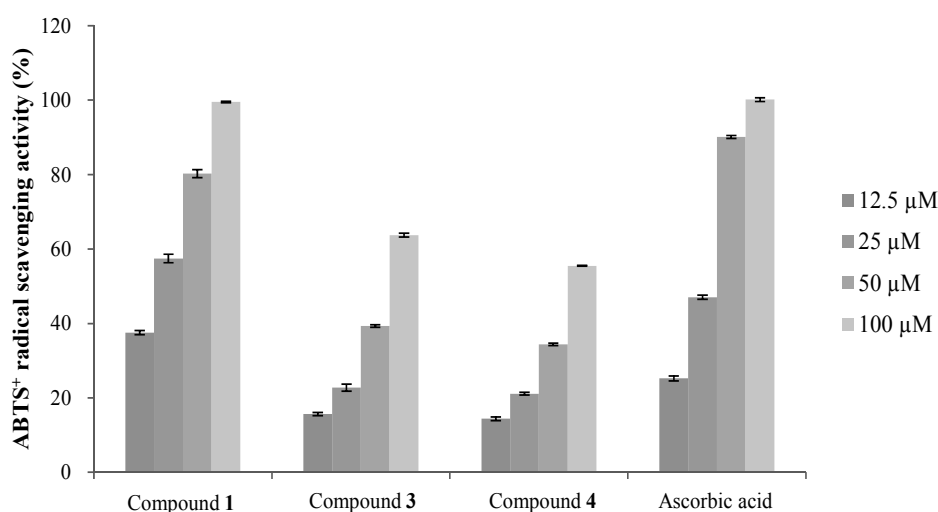


Figure 33. ABTS⁺ radical scavenging activities of isolated compounds 1, 3 and 4. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 9. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities for isolated compounds 1, 3 and 4

	Compound 1	Compound 3	Compound 4	Ascorbic acid
SC ₅₀ (μM)	17.9	73.5	86.8	26.8

다. 세포 보호 효과

(1) 세포 독성 평가(MTT assay)

물사과 가지에서 분리된 화합물에 대하여 세포 항산화 활성을 측정하기 위해 HaCaT cell을 이용하여 세포 독성(MTT assay) 및 H₂O₂로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 먼저, 실험에 사용될 화합물의 농도를 정하기 위해 HaCaT cell에 대하여 물사과 가지에서 분리된 화합물의 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, compound 1은 50, 100 µM의 농도에서 세포에 대한 독성이 나타났으며, compound 3, 4는 세포 생존율이 모두 80% 이상이었다. 따라서 본 실험에서 사용될 화합물의 농도는 80% 이상의 세포 생존율을 나타내는 최고 농도인 50, 100 µM로 설정하였으며, 세포에 대한 독성이 나타난 compound 1은 실험을 진행하지 않았다(Figure 34).

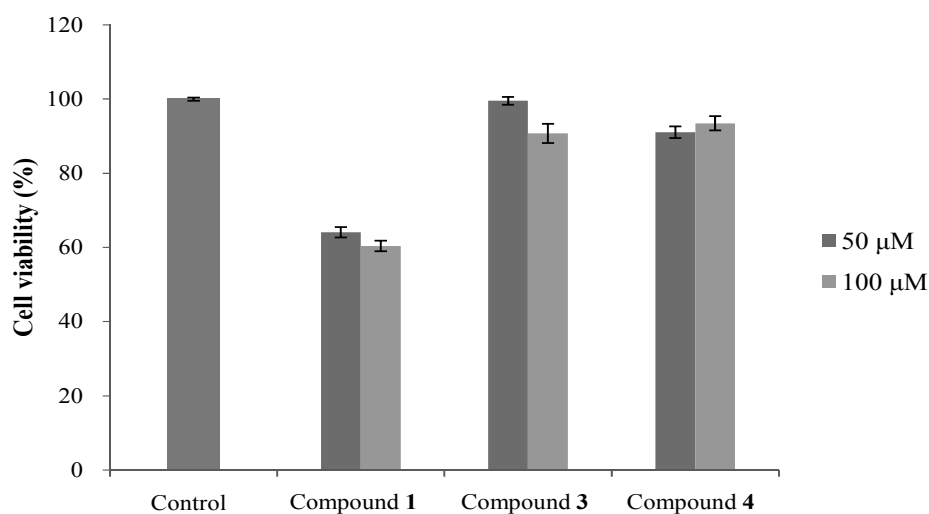
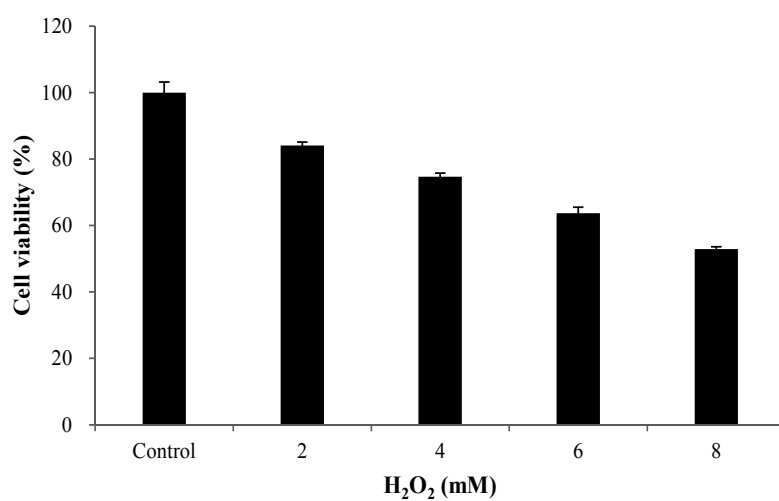


Figure 34. Effects of isolated compounds 1, 3 and 4 on HaCaT cells viability. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and cytotoxicity was then determined by MTT assay. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

(2) 과산화수소(H_2O_2)로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과

물사과 가지에서 분리된 화합물에 대하여 H_2O_2 로 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 먼저, 실험에 사용될 H_2O_2 의 농도를 정하기 위해 HaCaT cell에 대하여 H_2O_2 의 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, 6 mM의 농도에서 세포 생존율은 63.7%로 확인되었다. 따라서 본 실험에서는 6 mM의 H_2O_2 를 처리하여 손상된 세포에 50, 100 μ M의 분리된 화합물을 처리하였다. 그 결과, 50 μ M의 농도에서 compound **3**, **4**의 세포 생존율은 각각 68.2%, 68.9%이며, 100 μ M의 농도에서 compound **3**, **4**의 세포 생존율은 각각 77.3%, 77.9%로 확인되었다. 따라서 물사과 가지에서 분리된 화합물인 compound **3**, **4**는 100 μ M의 농도에서 H_2O_2 로 유도된 세포 손상에 대하여 각각 21.2, 23.8%의 세포 보호 효과가 있음을 확인하였다(Figure 35).

(A)



(B)

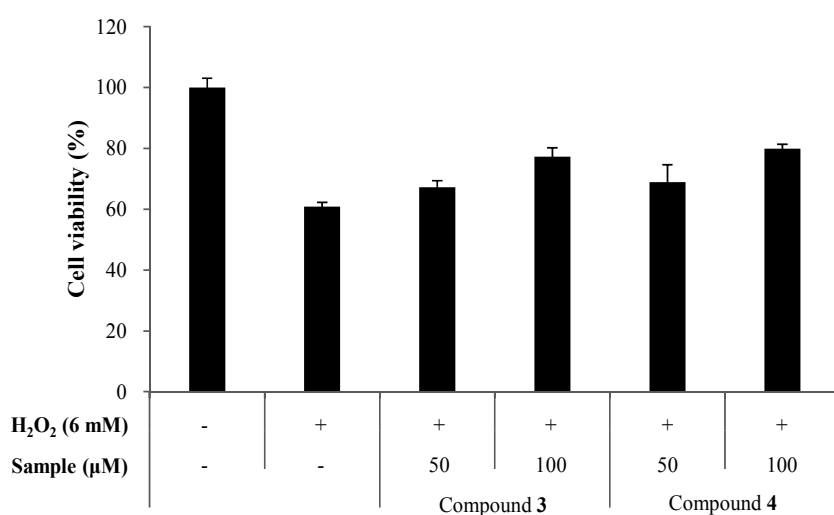


Figure 35. (A) Cell viability on H₂O₂-induced cell damage in HaCaT cell system. (B) Cell protective effects of isolated compounds **3** and **4** on H₂O₂-induced HaCaT cell. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments.

2) 항염

가. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

물사과 가지에서 분리된 화합물에 대하여 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. Compound 2는 다른 화합물과 혼합된 상태로 분리되어 compound 1, 3, 4에 대하여 실험을 진행하였으며, 실험은 100, 200, 300 μ M의 농도로 진행하였다. 그 결과, compound 1, 3, 4는 300 μ M의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, compound 3, 4의 IC₅₀값은 각각 239.0, 262.1 μ M로 확인되었다(Figure 36, Table 10).

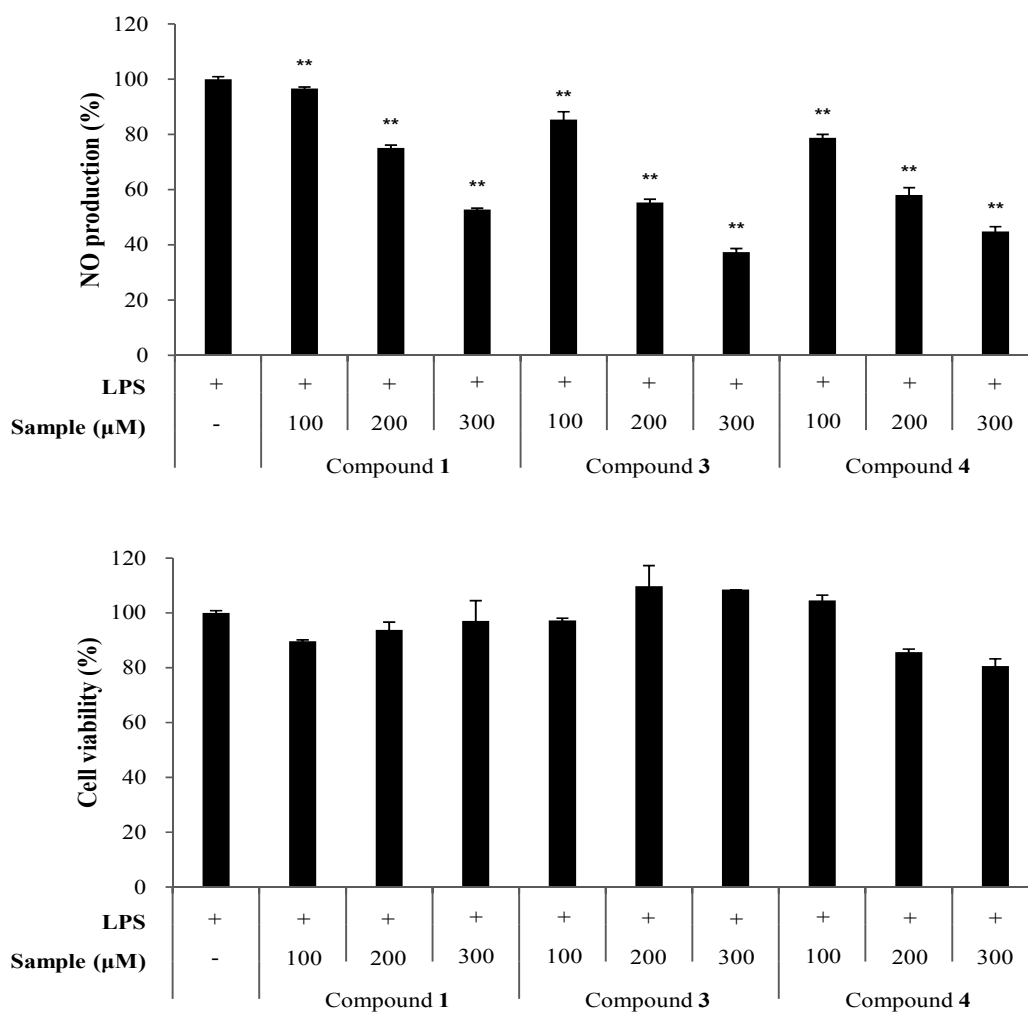


Figure 36. Effects of isolated compounds 1, 3 and 4 on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0.1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus isolated compounds 1, 3 and 4 for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. ** $p < 0.01$

Table 10. IC₅₀ values of isolated compounds 1, 3 and 4 on NO production in LPS-induced RAW264.7 cells

	Compound 1	Compound 3	Compound 4
IC ₅₀ (μM)	>300.0	239.0	262.1

6. 요약 및 결론

현재까지 물사과 잎에 대해서는 생리 활성 및 성분 연구가 보고 되어 있지만 가지에 대해서는 알려진 생리 활성이 없으며, 성분에 대한 연구 또한 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 물사과 가지의 다양한 생리 활성을 확인하고 유효 성분을 분리·동정하여 의약품, 건강기능식품 및 화장품 관련 천연 소재로써의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

물사과 가지 70% EtOH 추출물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 얻었다. 얻어진 각 분획물들 중 EtOAc 분획물에 대해 MPLC 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일물질을 분리하고 ¹H, ¹³C NMR 등을 이용해 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 4개의 화합물을 분리·동정하였다.

분리된 화합물은 3-*O*-methylelagic acid 3'-*O*- α -L-rhamnopyranoside (1), 3-*O*-methylelagic acid 3'-*O*- α -L-3''-*O*-acetyl-rhamnopyranoside (2), pinocembrin (3), desmethoxymatteucinol (4)로 확인되었다. 분리된 화합물인 compound 1, 2, 4는 물사과에서 처음으로 분리되었다.

물사과 가지에 대한 항산화 활성 실험 결과, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물이 많은 폴리페놀(270.6, 283.5 mg/g GAE)을 함유하고 있었으며, EtOAc 분획물이 가장 많은 플라보노이드(89.2 mg/g QE)를 함유하고 있었다. DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성 실험 결과, 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높았던 EtOAc와 *n*-BuOH 분획물은 대조군인 ascorbic acid만큼 높은 radical 소거 활성이 있음을 확인하였다. 또한, immortalised human keratinocyte cell line인 HaCaT cell을 이용한 세포 항산화 실험으로 4 mM의 H₂O₂를 처리하여 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과 실험 결과, 세포에 대한 독성이 없는 20 μ g/mL의 농도에서 추출물, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물이 세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 다른 화합물과 혼합된 상태로 분리된 compound 2를 제외하고 compound 1, 3, 4에 대하여 항산화 실험을 진행하였다. DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성 실험 결과, compound 1이 가장 높은 radical 소거 활성이 있음을 확인하였다. 또한, 세포 항산화 실험은 세포에 대한 독성이 있었던

compound 1을 제외하고 compound 3, 4에 대하여 실험을 진행하였다. 6 mM H₂O₂를 처리하여 유도된 세포 손상에 대한 세포 보호 효과 실험 결과, 세포에 대한 독성이 없는 100 μM의 농도에서 compound 3, 4가 세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

Murine macrophage cell line인 RAW264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였으며, 이와 같은 경향으로 iNOS 단백질의 발현을 농도 의존적으로 억제시키는 것을 확인하였다. 이는 전염증성 cytokine인 IL-1β 및 IL-6의 생성을 억제시키는 기전에 의한 것으로 확인하였다. 또한, PGE₂의 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것을 확인하였으나 COX-2 단백질의 발현에는 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 다른 화합물과 혼합된 상태로 분리된 compound 2를 제외하고 compound 1, 3, 4에 대한 항염 활성 실험 결과, 모두 세포에 대한 독성 없이 NO 생성 억제 활성이 있음을 확인하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 물사과 가지 추출물은 항산화 및 항염 효과가 있는 의약품, 건강기능식품 및 화장품 관련 천연 소재로서의 활용가능성이 있음을 확인하였다.

IV. 연구 2 : 풍란 켈러스 추출물의 항산화 및 항염 활성 성분 연구

1. 재료

풍란은 조란이라고도 하며, 난초과(Orchidaceae)에 속하는 식물이다. 주로 우리나라 통영군, 거제군 등의 남부지방과 제주도, 흑산도, 완도 등의 도서지방에서 바위나 나무에 붙어사는 착생란이며, 일부는 중국과 일본의 남부 해안 지방에도 자생하고 있다. 풍란은 바람이 잘 통하는 곳을 좋아한다고 하여 유래된 이름이며, 그윽한 향기가 있다하여 계란(桂蘭)이라고도 하고 나무 위나 바위 등 높고 깨끗한 곳에서 산다고 하여 선초라고도 한다.

아직까지 풍란 혹은 풍란 켈러스에 대한 생리 활성 및 유효 성분에 대한 연구는 보고되어 있지 않으므로 본 연구에서는 풍란 켈러스 추출물 및 용매 분획물의 생리 활성을 확인하고 다양한 유효 성분을 분리·동정하였다.

실험에 사용된 시료인 풍란(*Neofinetia falcata* Thunb. Hu) 켈러스(시료번호 : 471)는 2016년 3월에 (주)아미코스메틱으로부터 건조된 원물 형태로 제공받아 사용하였다(Figure 37).

(A)



(B)

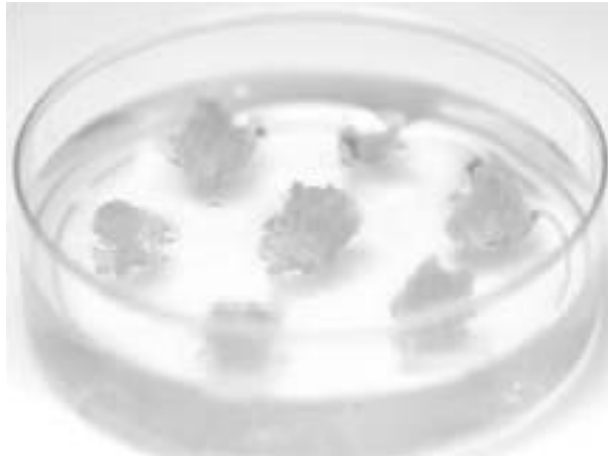


Figure 37. Picture of *Neofinetia falcata* (A) and solid medium condition of *Neofinetia falcata* callus (B).

2. 풍란 켈러스의 추출, 분획 및 활성 성분 분리

1) 풍란 켈러스의 추출 및 용매 분획

건조 및 분쇄된 풍란 켈러스 251.2 g을 70% EtOH 5 L에 넣고 상온에서 24 시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 여과 장치를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 1회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 37-40°C 이하의 수욕 상에서 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 70% EtOH 추출물 120.8 g을 얻었다. 얻어진 70% EtOH 추출물 20.0 g과 16.7 g을 각각 증류수 1 L에 현탁시키고 분별 깔때기를 이용해 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 ethyl acetate, *n*-butanol, water layer를 얻었다. 70% EtOH 추출물 20.0 g을 이와 같은 방법으로 4회 더 반복 실시하여 추출물 총 116.7 g을 용매 분획하였다 (Figure 38).

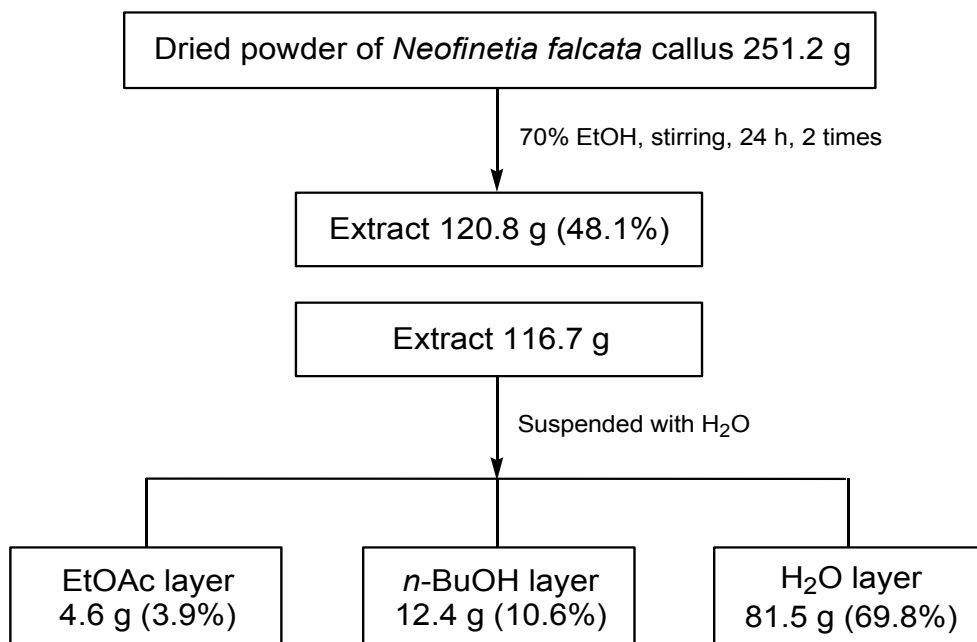


Figure 38. Extraction and solvent fractionation of *N. falcata* callus.

2) Ethyl acetate 분획물의 활성 성분 분리

용매 분획 후 얻어진 각 분획물들 중 EtOAc 분획물 3.9 g은 극성에 따라 세분화하기 위하여 medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 수행하였다. 컬럼은 역상 silica gel (KP-C18-HS, 40+M, Biotage Co.)을 사용하였으며, H₂O-MeOH (10-100%)의 용매를 gradient 조건으로 각 40 mL씩 용출하여 총 47개의 fraction을 얻었다(Fr. MP1-47). MPLC fraction들 중 Fr. MP19 (62.2 mg)는 단일 화합물인 compound 5로 확인되었다.

EtOAc 분획물 0.8 g은 silica gel column chromatography (CHCl₃:MeOH = 30:1→10:1)를 수행하여 compound 6 (8.8 mg)을 분리하였다(Figure 39).

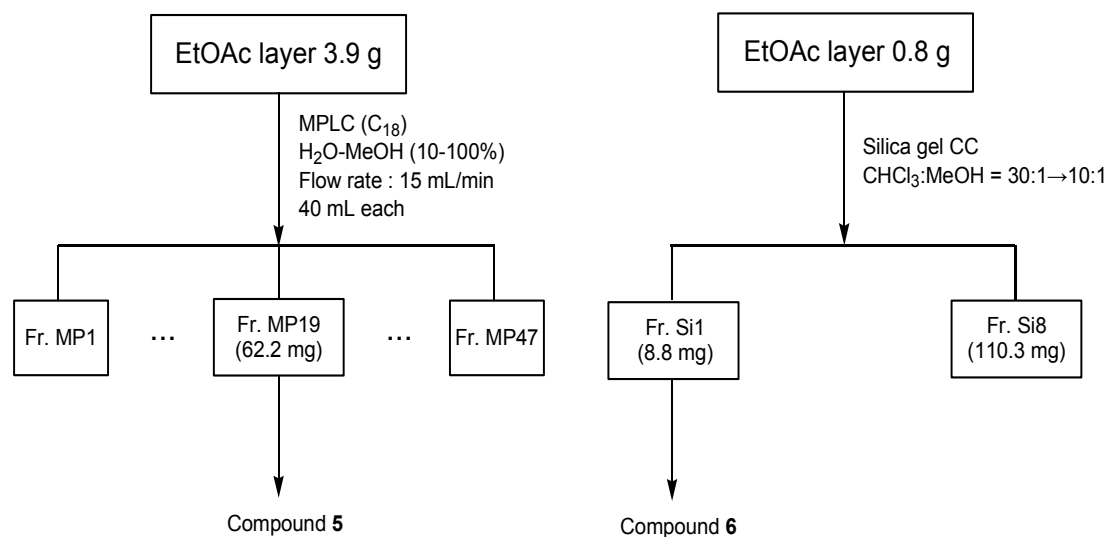


Figure 39. Isolation of compounds 5 and 6 from *N. falcata* callus.

3) *n*-butanol 분획물의 활성 성분 분리

용매 분획 후 얻어진 각 분획물들 중 *n*-BuOH 분획물 5.0 g은 극성에 따라 세분화하기 위하여 medium pressure liquid chromatography (MPLC)를 수행하였다. 컬럼은 역상 silica gel (KP-C18-HS, 40+M, Biotage Co.)을 사용하였으며, H₂O-MeOH (10-100%)의 용매를 gradient 조건으로 각 40 mL씩 용출하여 총 45개의 fraction을 얻었다(Fr. MP1-45). MPLC fraction들 중 Fr. MP19 (131.0 mg)는 앞서 분리한 compound 5로 확인되었다.

n-BuOH 분획물 2.1 g은 Sephadex column chromatography (MeOH = 100)를 수행하여 compound 7 (3.6 mg)을 분리하였다(Figure 40).

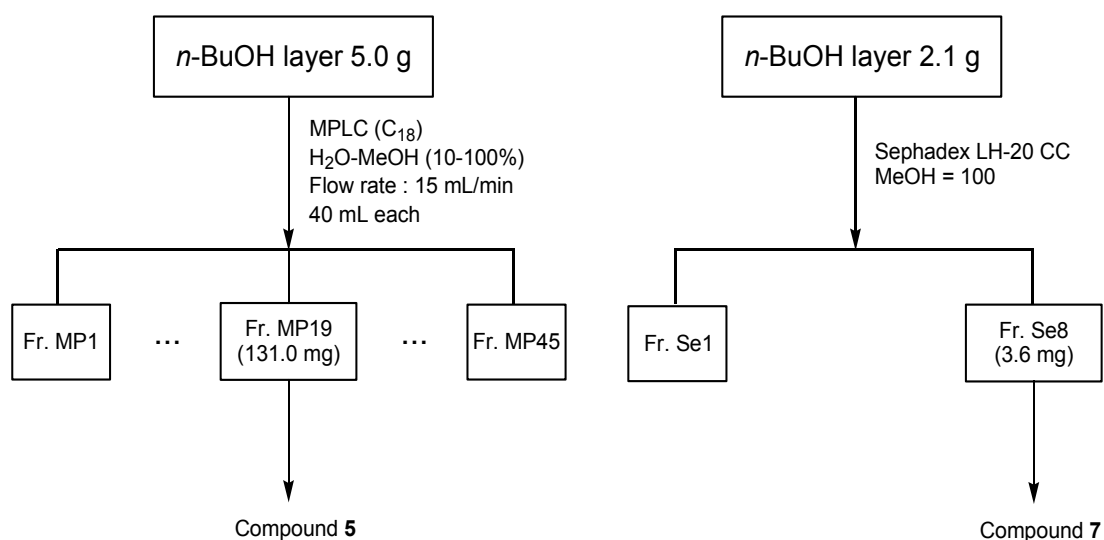
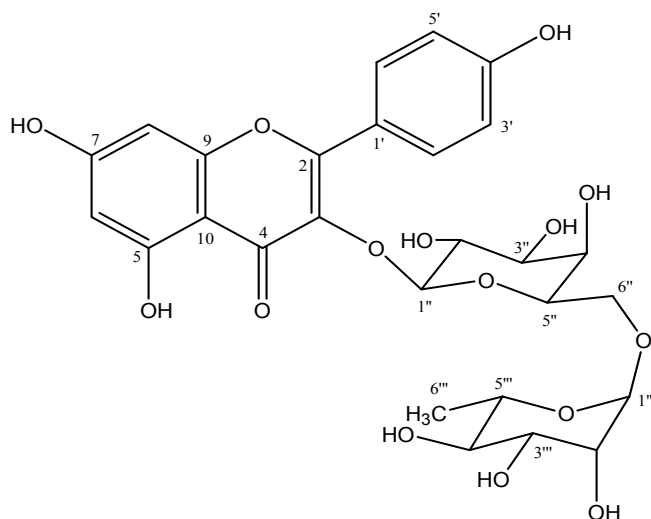


Figure 40. Isolation of compounds 5 and 7 from *N. falcata* callus.

3. 분리된 화합물의 구조 분석

1) Compound 5의 구조 동정

Compound 5는 ^{13}C NMR spectrum에서 대칭인 2개의 carbon 피크를 포함하여 총 25개의 carbon 피크가 관찰되었다. 그 중 δ_{H} 8.09 (2H, d, $J = 9.0$ Hz), δ_{H} 6.89 (2H, d, $J = 9.0$ Hz)의 피크를 통해 flavonoid의 B ring이 대칭 구조임을 알 수 있었으며, δ_{C} 179.7의 피크는 carbonyl group으로 예상할 수 있다. ^1H NMR spectrum에서 δ_{H} 3.50-3.79의 proton 피크와 δ_{H} 5.04 (1H, d, $J = 7.6$ Hz) 및 4.53 (1H, brs)에 해당하는 당의 anomeric proton으로 보아 2개의 당이 결합되어 있는 배당체일 것이라 예상하였다. 그 중 δ_{H} 5.04 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), δ_{H} 1.18 (3H, d, $J = 6.2$ Hz) 및 δ_{C} 18.1 피크를 통해 α -form의 rhamnopyranoside를 예상할 수 있다. 또한, 4.53 (1H, brs)의 anomeric proton의 피크를 통해 β -form의 육탄당을 예상하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌³³을 통해 compound 5는 kaempferol 3-*O*-robinobioside로 확인되었다 (Figure 41-43, Table 11).



Compound 5

Figure 41. Chemical structure of compound 5.

Table 11. ^1H and ^{13}C NMR data of compound **5** (500 and 125 MHz)

No.	Compound 5 (CD_3OD)	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
2		158.7
3		135.9
4		179.7
5		163.1
6	6.21 (1H, d, 2.0)	100.1
7		166.2
8	6.41 (1H, d 2.0)	95.0
9		159.5
10		105.8
1'		122.8
2', 6'	8.09 (2H, d, 9.0)	132.6
3', 5'	6.89 (2H, d, 9.0)	116.3
4'		161.8
1''	5.04 (1H, d, 7.6)	105.7
2''	3.50–3.79	72.2
3''	3.50–3.79	75.2
4''	3.50–3.79	70.3
5''	3.50–3.79	75.5
6''	3.50–3.79	67.5
1'''	4.53 (1H, brs)	102.0
2'''	3.50–3.79	73.1
3'''	3.50–3.79	72.4
4'''	3.50–3.79	74.0
5'''	3.50–3.79	69.9
6'''	1.18 (3H, d, 6.2)	18.1

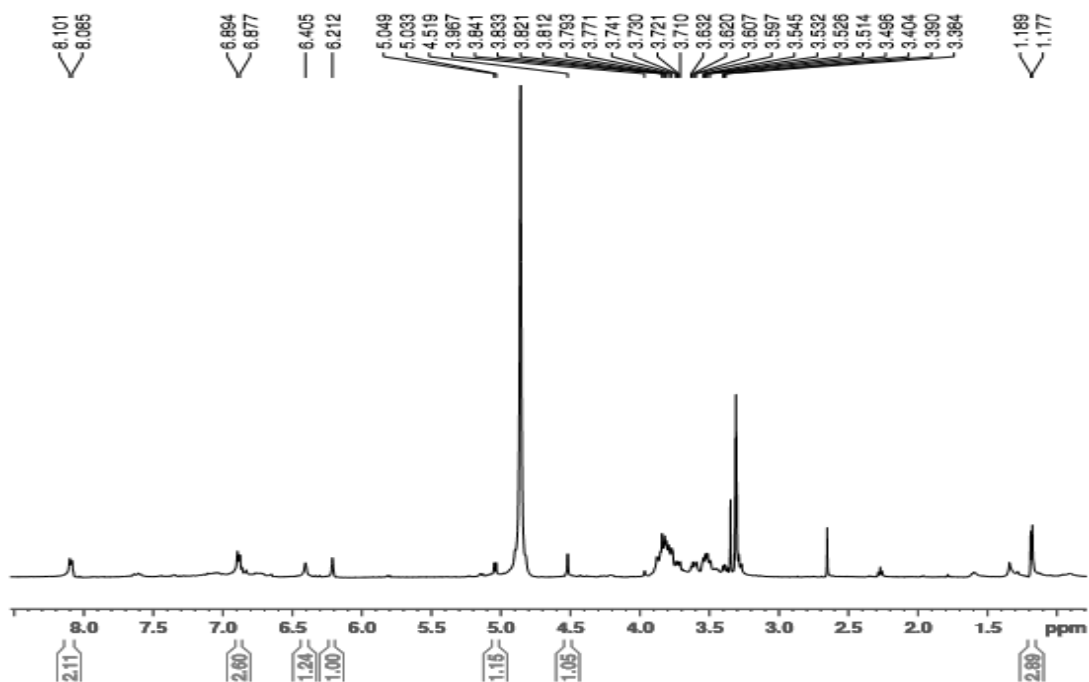


Figure 42. ^1H NMR spectrum of compound 5 (CD_3OD).

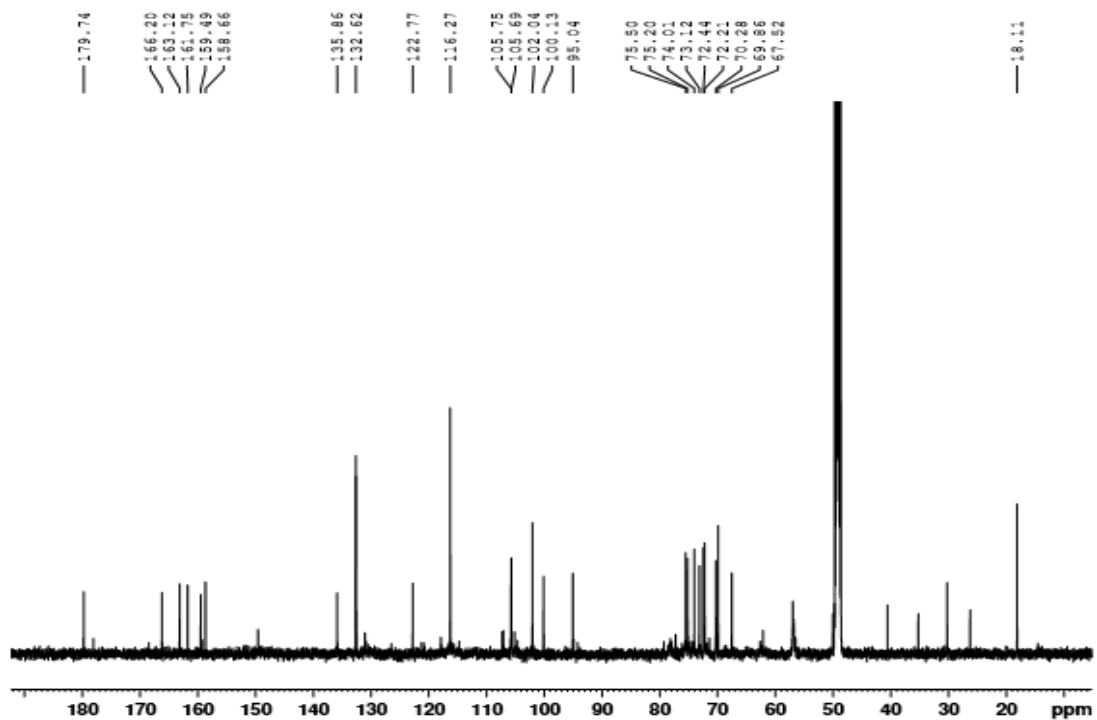
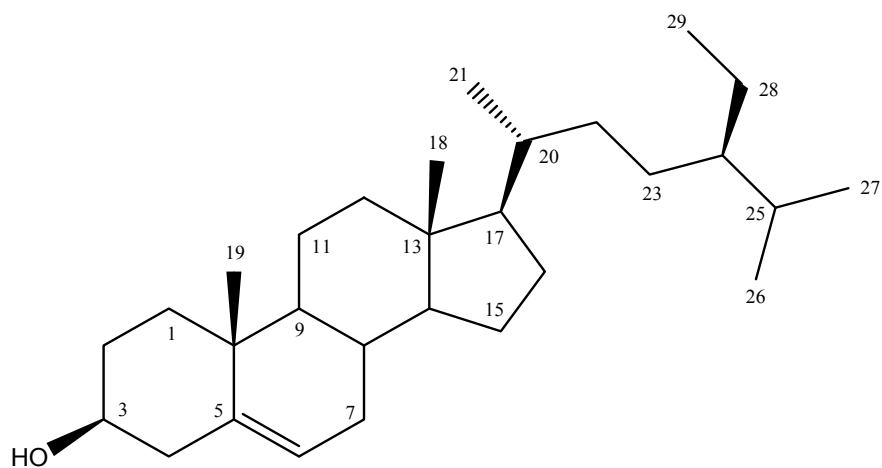


Figure 43. ^{13}C NMR spectrum of compound 5 (CD_3OD).

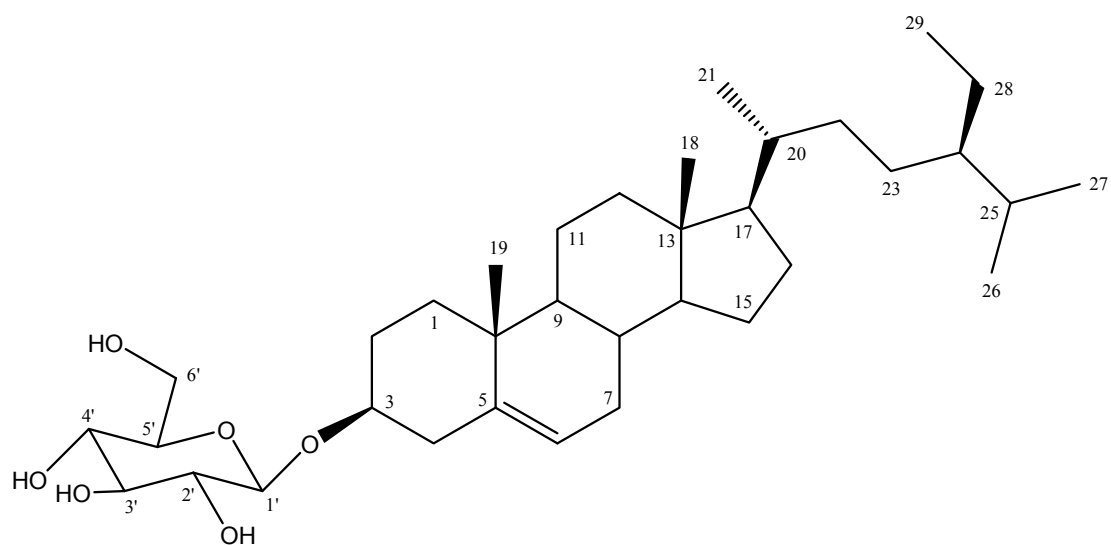
2) Compound 6, 7의 구조 동정

Compound 6은 ^{13}C NMR spectrum에서 29개의 carbon 피크와 ^1H NMR spectrum에서 6개의 methyl group인 단일피크를 포함하여 넓은 범위의 aliphatic signal을 바탕으로 sterol임을 예상하였다. 그 중 δ_{C} 121.9와 141.0의 피크를 통해 sp^2 혼성을 갖는 carbon이 있음을 예상하였고 δ_{C} 72.0의 피크는 다른 sp^3 피크들 보다 chemical shift 값이 deshielding 된 것으로 보아 전기음성도가 큰 치환기가 결합해 있는 carbon임을 예상하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌³⁴을 통해 compound 6은 β -sitosterol임을 확인하였다(Figure 44-46, Table 12).

Compound 7은 ^1H 및 ^{13}C NMR spectrum 분석 결과, compound 6과 유사한 구조이나 δ_{H} 4.02-4.58, δ_{C} 63.3-78.9의 피크들과 당의 anomeric에 해당하는 δ_{H} 5.09 (1H, d, $J = 7.8$ Hz) 및 δ_{C} 103.0의 피크를 종합하여 볼 때, β -form의 glucopyranoside가 결합되어 있는 배당체임을 예상하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌³⁵을 통해 compound 7은 daucosterol임을 확인하였다(Figure 44, 47, 48, Table 12).



Compound 6



Compound 7

Figure 44. Chemical structures of compounds 6 and 7.

Table 12. ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **6** and **7** (400 and 100 MHz)

No.	Compound 6 (CDCl_3)		Compound 7 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C}
1		37.5		37.9
2		31.9		30.7
3	3.53 (1H, m)	72.0	3.85 (1H, m)	79.1
4		42.5		39.8
5		141.0		141.4
6	5.36 (1H, d, 5.0)	121.9	5.37 (1H, d, 4.1)	122.3
7		32.1		32.6
8		32.1		32.5
9		50.3		50.8
10		36.7		37.4
11		21.3		21.7
12		40.0		40.4
13		42.5		42.9
14		57.0		57.2
15		26.3		24.9
16		28.5		29.0
17		56.3		56.7
18	0.69 (3H, s)	36.4	0.68 (3H, s)	12.4
19	1.02 (3H, s)	19.3	0.96 (3H, s)	19.6
20		34.2		36.8
21	0.93 (3H, d, 6.9)	24.5	1.01 (3H, d, 6.4)	19.4
22		46.1		34.6
23		23.3		26.8
24		12.2		46.5
25		29.4		29.9
26	0.84 (3H, d, 7.3)	20.0	0.92 (3H, t, 7.3)	20.4
27	0.82 (3H, d, 6.9)	19.6	0.90 (3H, d, 8.7)	19.8
28		19.0		23.8
29	0.85 (3H, t, 7.3)	12.1	0.88 (3H, d, 7.8)	12.6
1'			5.09 (1H, d, 7.8)	103.0
2'			4.02-4.58	75.8
3'			4.02-4.58	78.9
4'			4.02-4.58	72.1
5'			4.02-4.58	78.5
6'			4.02-4.58	63.3

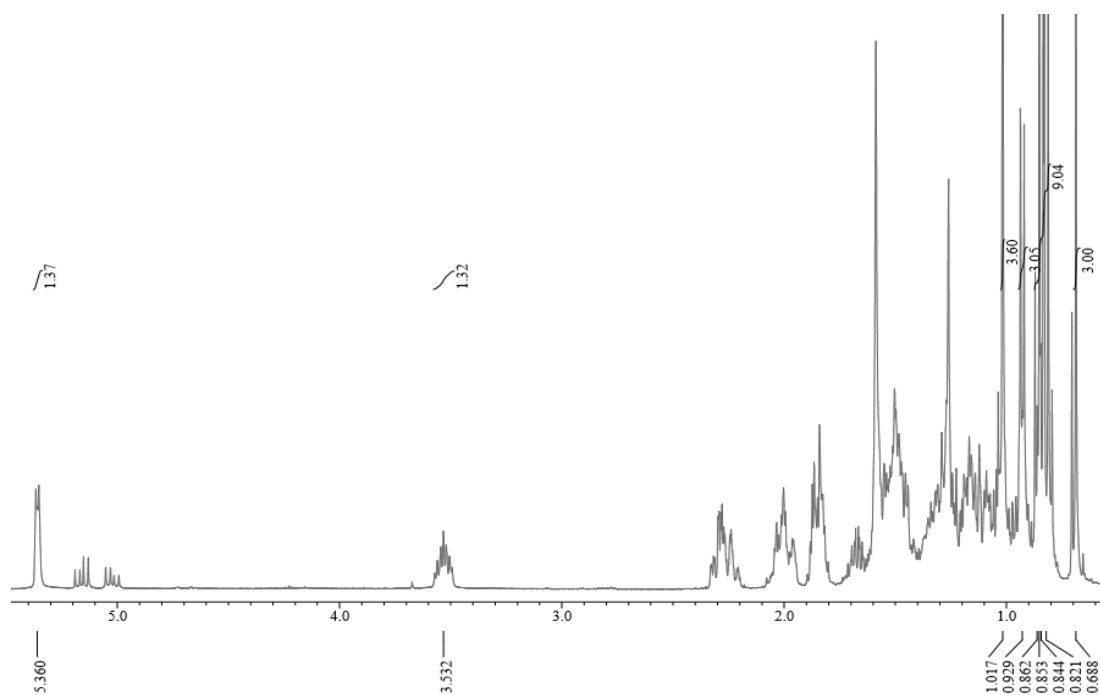


Figure 45. ^1H NMR spectrum of compound **6** (CDCl_3).

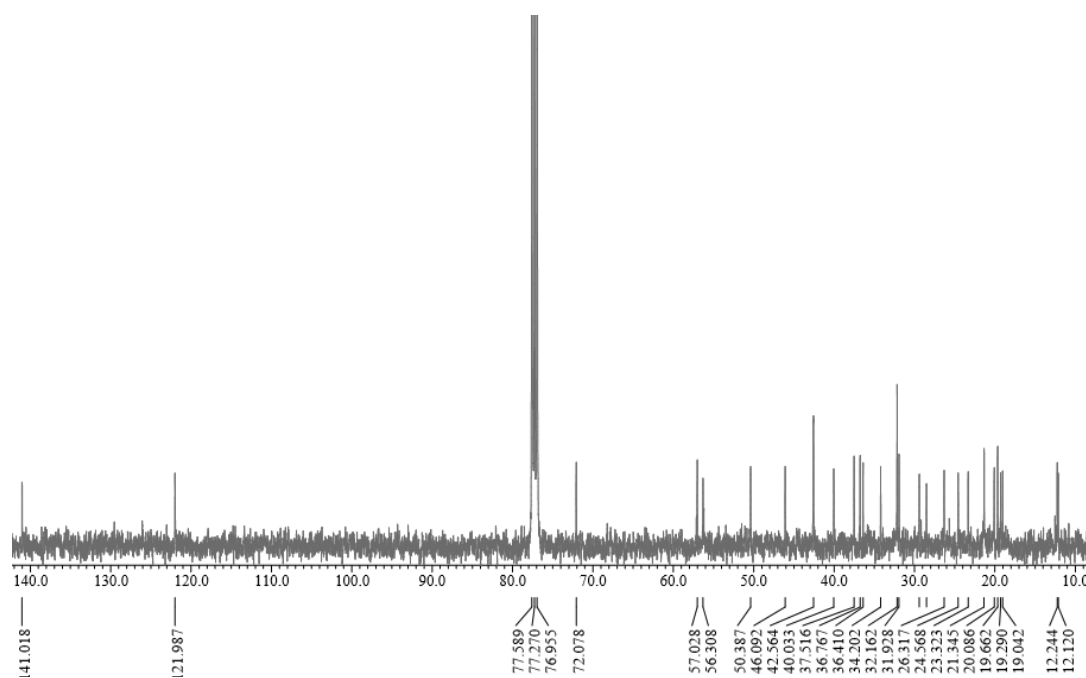


Figure 46. ^{13}C NMR spectrum of compound **6** (CDCl_3).

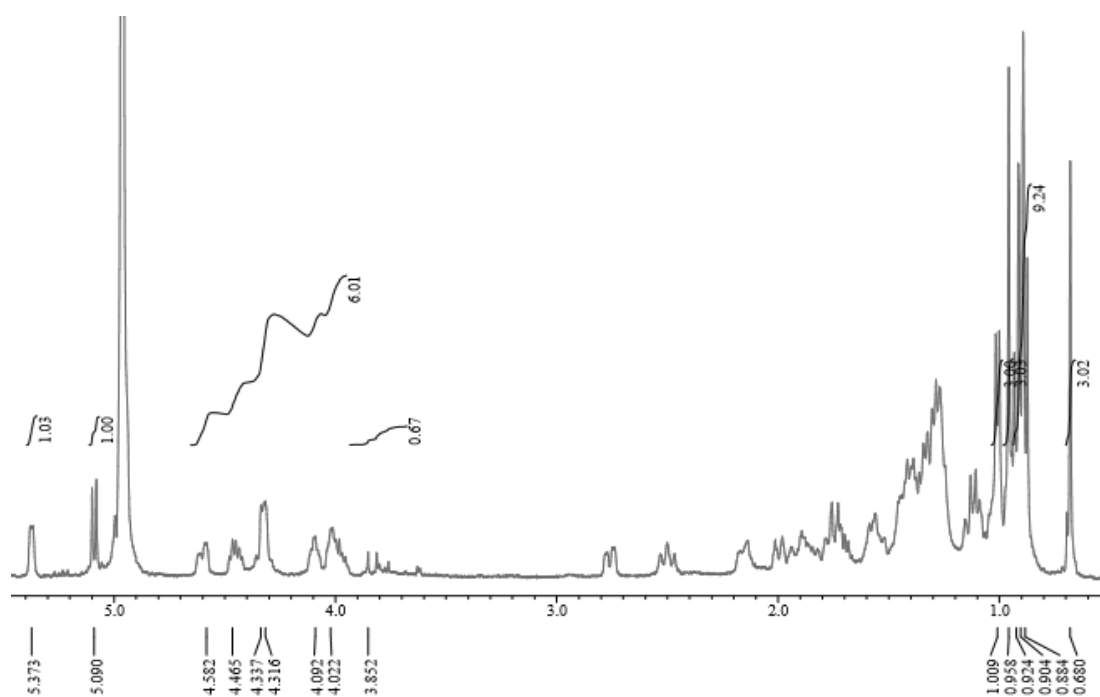


Figure 47. ^1H NMR spectrum of compound **7** ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

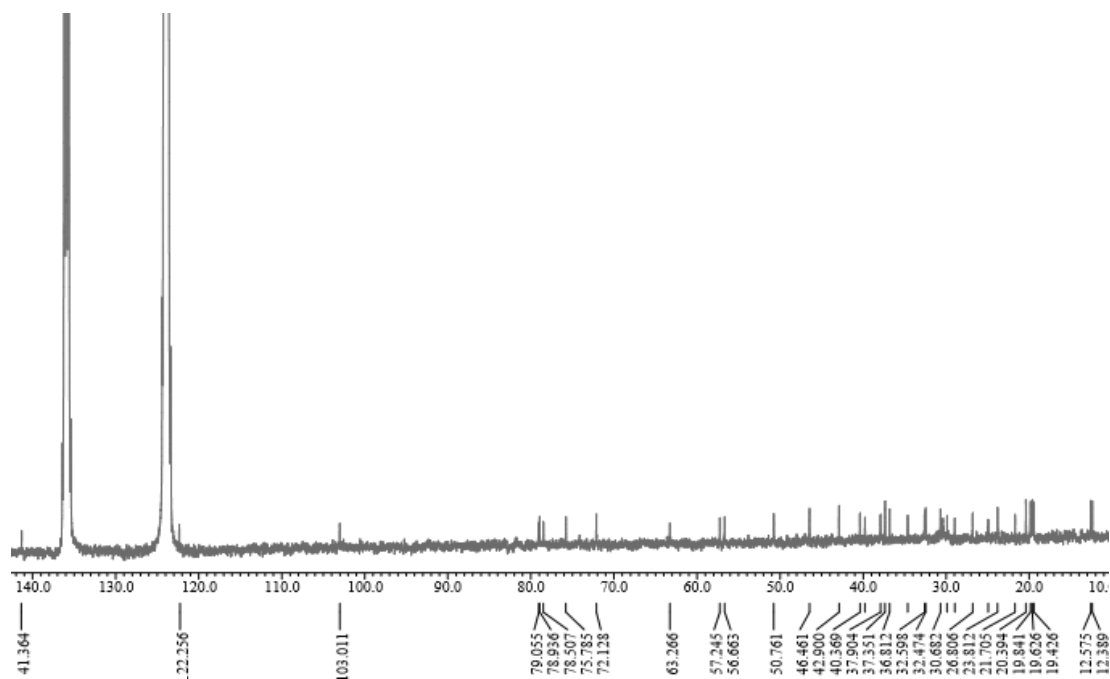


Figure 48. ^{13}C NMR spectrum of compound **7** ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

4. 풍란 캘러스 추출물 및 분획물의 활성 실험 결과

1) 항산화

가. 총 폴리페놀 함량 측정

풍란 캘러스 추출물 및 용매 분획물의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid 표준용액의 표준검정곡선을 통해 추출물 및 용매 분획물의 중량 1 g당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE; gallic acid equivalent)으로 환산하여 측정되었다. 그 결과, EtOAc 분획물이 가장 많은 폴리페놀(365.1 mg/g GAE)을 함유하고 있었다. 이는 다른 항산화 활성 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상하였다(Figure 49).

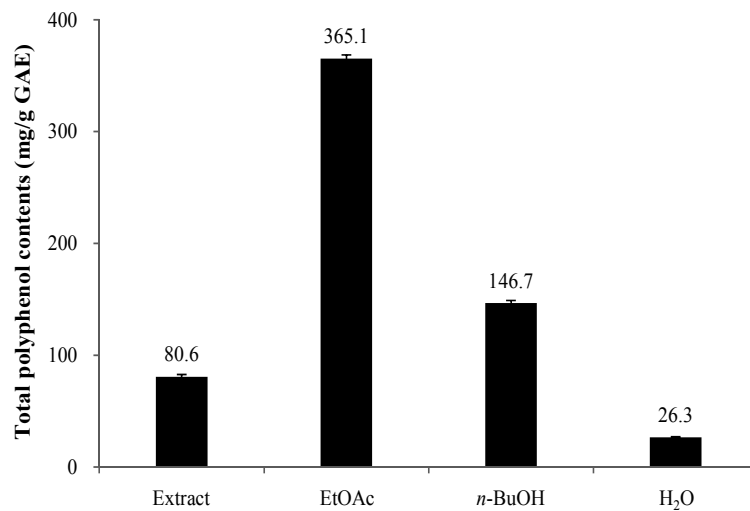


Figure 49. Total polyphenol contents of extract and solvent layers from *N. falcata* callus. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

나. 총 플라보노이드 함량 측정

풍란 캘러스 추출물 및 용매 분획물의 총 플라보노이드 함량은 quercetin 표준 용액의 표준검정곡선을 통해 추출물 및 용매 분획물의 중량 1 g당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE; quercetin equivalent)으로 환산하여 측정되었다. 그 결과, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물이 비슷한 양의 플라보노이드(25.5, 30.4 mg/g QE)를 함유하고 있었다(Figure 50).

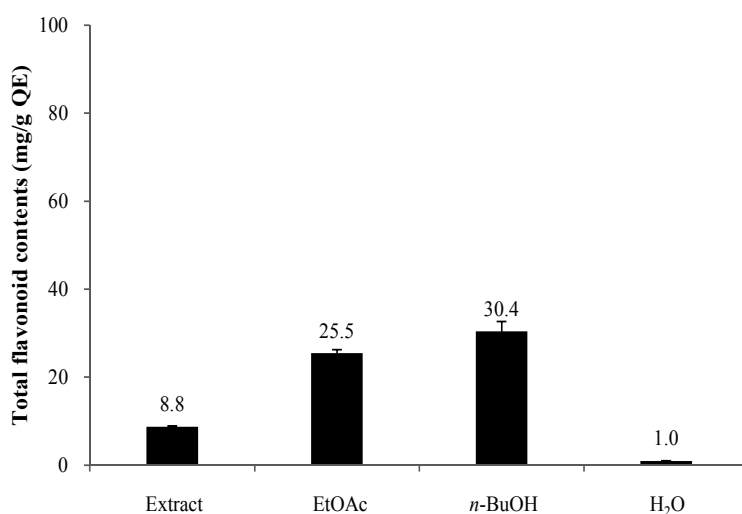


Figure 50. Total flavonoid contents of extract and solvent layers from *N. falcata* callus. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

다. DPPH radical 소거 활성 측정

풍란 캘러스 추출물 및 용매 분획물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 100, 200, 400 µg/mL의 농도로 진행하였으며, 각각에 대하여 SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, 총 폴리페놀 함량이 많았던 EtOAc 분획물의 SC₅₀값이 309.9 µg/mL로 가장 높은 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 51, Table 13).

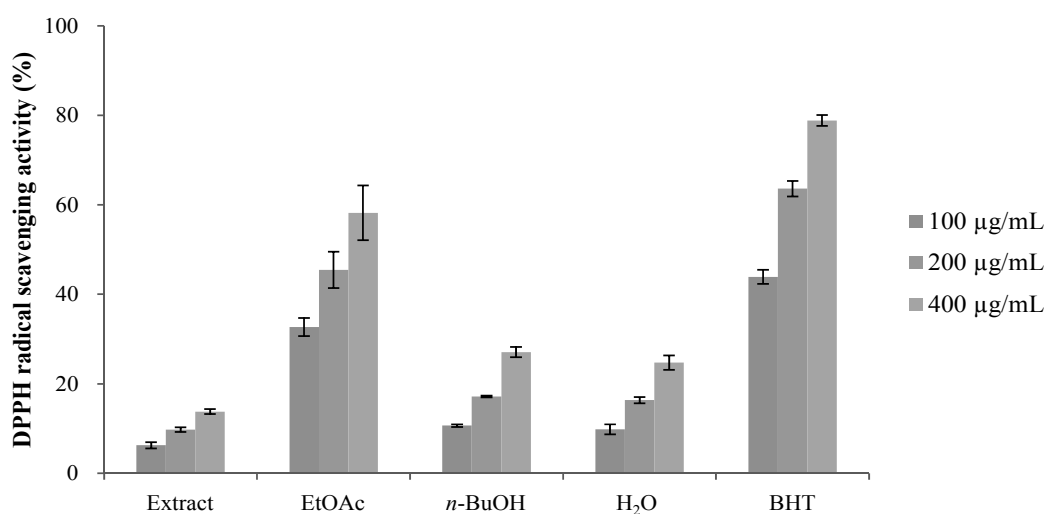


Figure 51. DPPH radical scavenging activities of extract and solvent layers from *N. falcata* callus. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 13. SC₅₀ values of DPPH radical scavenging activities for extract and solvent layers from *N. falcata* callus

	Extract	EtOAc	n-BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	>400.0	309.9	>400.0	>400.0	124.1

라. ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

풍란 캘러스 추출물 및 용매 분획물에 대하여 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 진행하였으며, 각각에 대하여 SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 많았던 EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물의 SC₅₀값이 각각 46.2, 85.7 µg/mL로 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 52, Table 14).

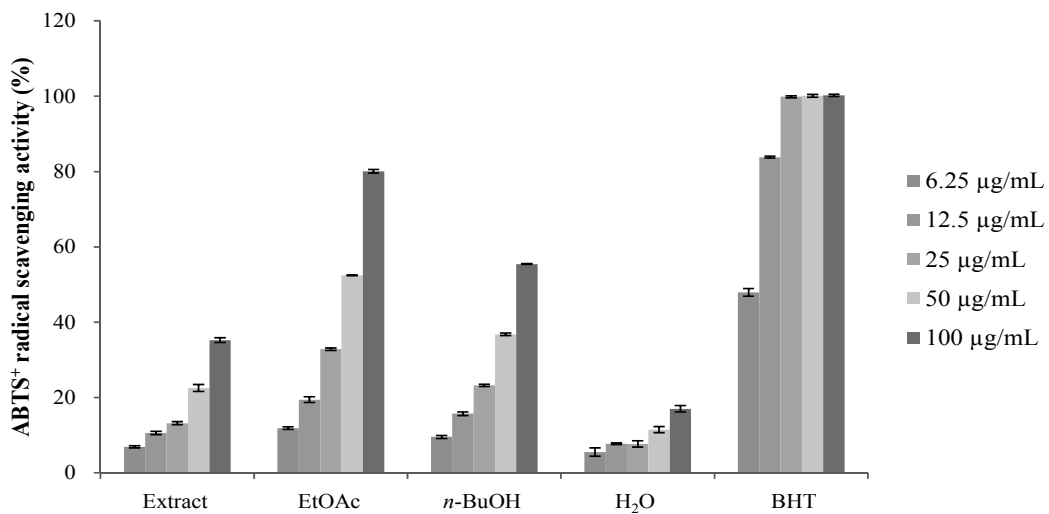


Figure 52. ABTS⁺ radical scavenging activities of extract and solvent layers from *N. falcata* callus. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 14. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activities for extract and solvent layers from *N. falcata* callus

	Extract	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O	BHT
SC ₅₀ (µg/mL)	>100.0	46.2	85.7	>100.0	7.0

2) 항염

가. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

풍란 켈러스 추출물 및 용매 분획물에 대하여 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 먼저, 추출물 및 각 용매 분획물은 100 µg/mL의 농도로 실험을 진행하였다. 그 결과, EtOAc 분획물이 100 µg/mL의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 16.8%의 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였다(Figure 53). 따라서 세포에 대한 독성 없이 NO 생성 억제 활성이 우수했던 EtOAc 분획물에 대해 추가적으로 독성이 없는 범위인 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도에서 실험을 진행하였다. 그 결과, 풍란 켈러스 EtOAc 분획물은 세포에 대한 독성 없이 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, IC₅₀값은 39.0 µg/mL로 확인되었다(Figure 54).

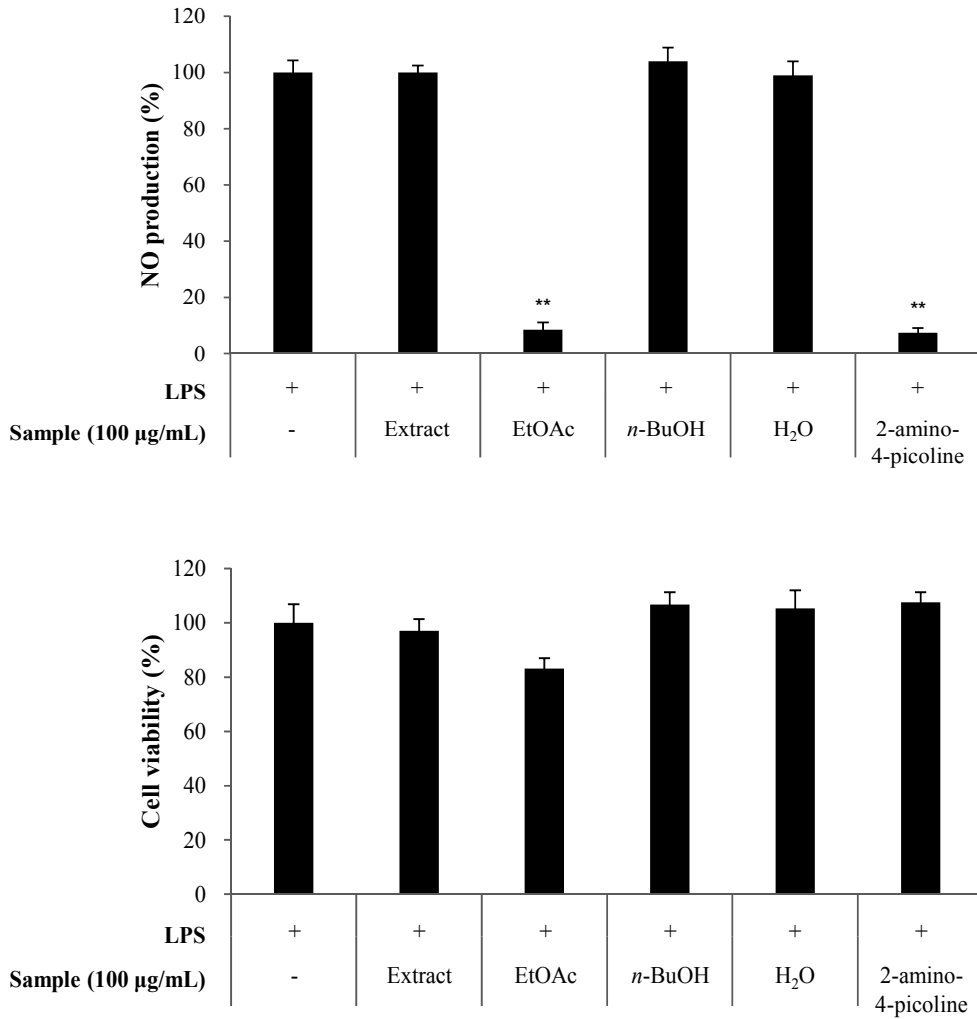


Figure 53. Effects of extract and solvent layers from *N. falcata* callus on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0.1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus *N. falcata* callus 2-amino-4-picoline (positive control, 10 µM) for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. ** $p < 0.01$

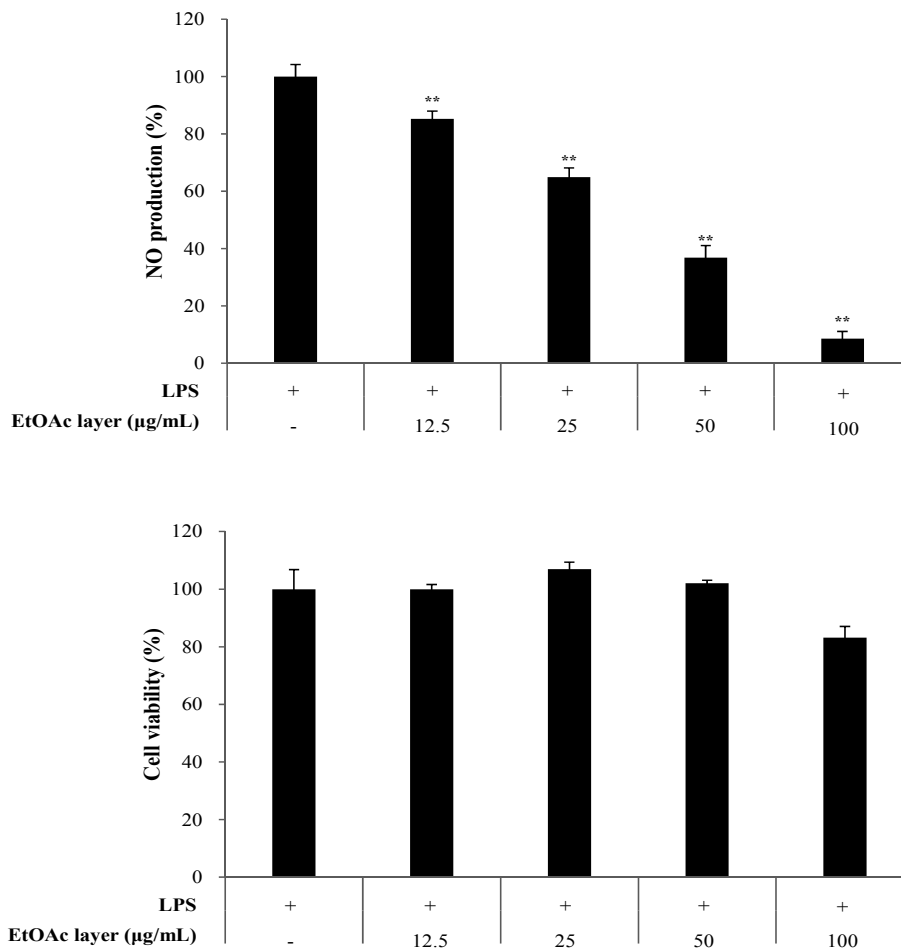


Figure 54. Effects of EtOAc layer from *N. falcata* callus on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0.1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc layer from *N. falcata* callus for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. ** $p < 0.01$

나. PGE₂ 및 전염증성 cytokine 생성 억제 활성 측정

NO 생성을 억제시킨 풍란 칼러스 EtOAc 분획물에 대하여 PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-6 및 IL-1 β)의 생성 억제 활성을 sandwich ELISA kit로 측정하였다. 실험은 독성이 없는 범위인 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 진행하였으며, 각각에 대하여 IC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, EtOAc 분획물은 PGE₂ 및 전염증성 cytokine의 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것을 확인하였으며, PGE₂, IL-6 및 IL-1 β 의 IC₅₀값이 각각 52.7, 69.8 및 75.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다(Figure 55, 56, Table 15).

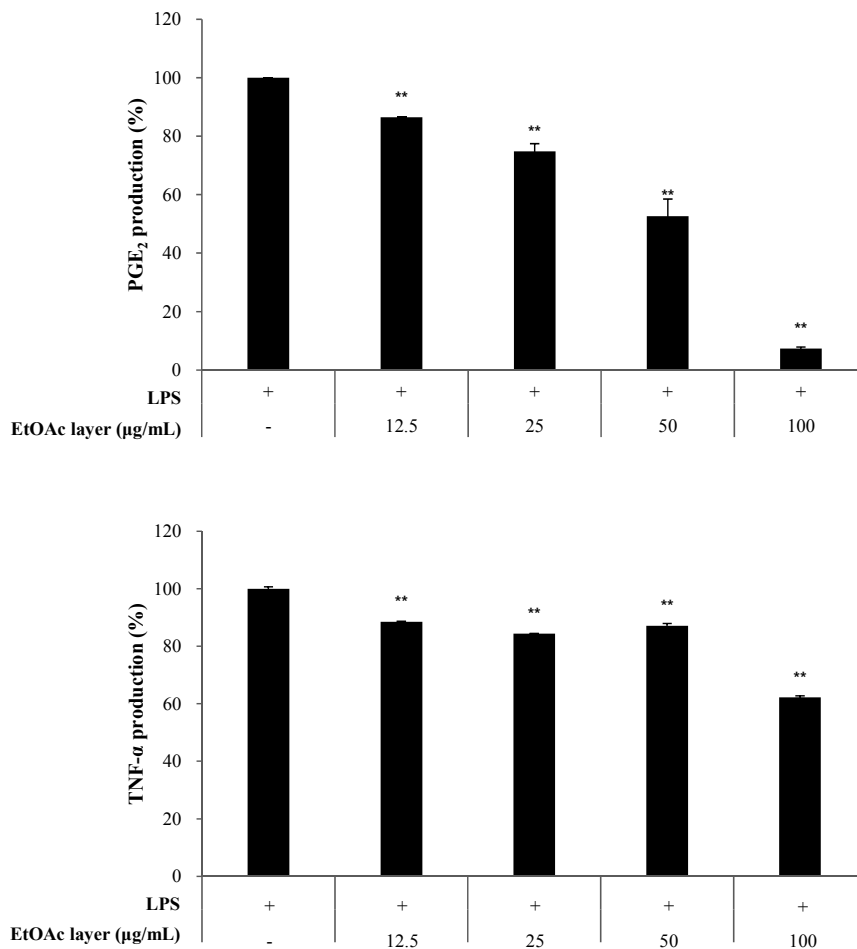


Figure 55. Effects of EtOAc layer from *N. falcata* callus on PGE₂ and TNF-α production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. ** $p < 0.01$

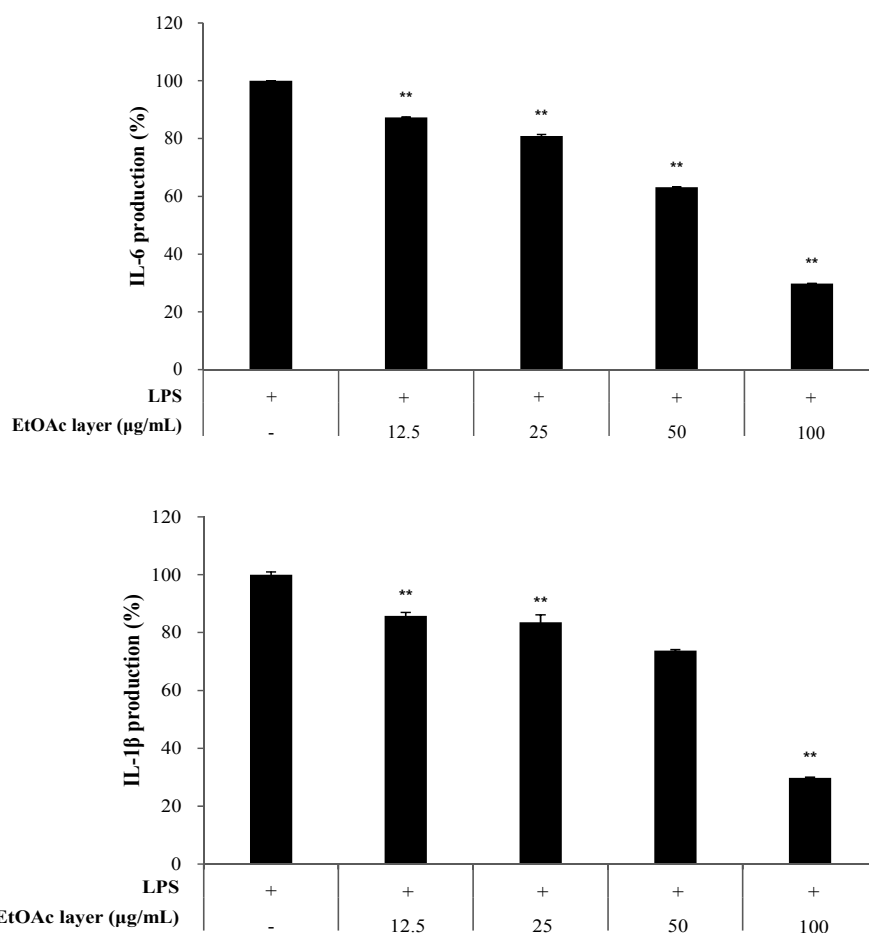


Figure 56. Effects of EtOAc layer from *N. falcata* callus on IL-6 and IL-1β production in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. ** $p < 0.01$

Table 15. IC₅₀ values of EtOAc layer from *N. falcata* callus on PGE₂ and pro-inflammatory cytokines production in LPS-induced RAW264.7 cells

	PGE ₂	TNF-α	IL-6	IL-1β
IC ₅₀ (μg/mL)	52.7	>100.0	75.0	69.8

5. 분리된 화합물의 활성 실험 결과

1) 항산화

가. DPPH radical 소거 활성 측정

풍란 캘러스에서 분리된 화합물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. Compound 6, 7은 항산화 활성이 없어 compound 5에 대하여 실험을 진행하였다. 실험은 100, 200, 400, 800 μM 의 농도로 진행하였으며, 이에 대하여 SC_{50} 값을 계산하였다. 그 결과, compound 5의 SC_{50} 값은 630.5 μM 로 DPPH radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 57, Table 16).

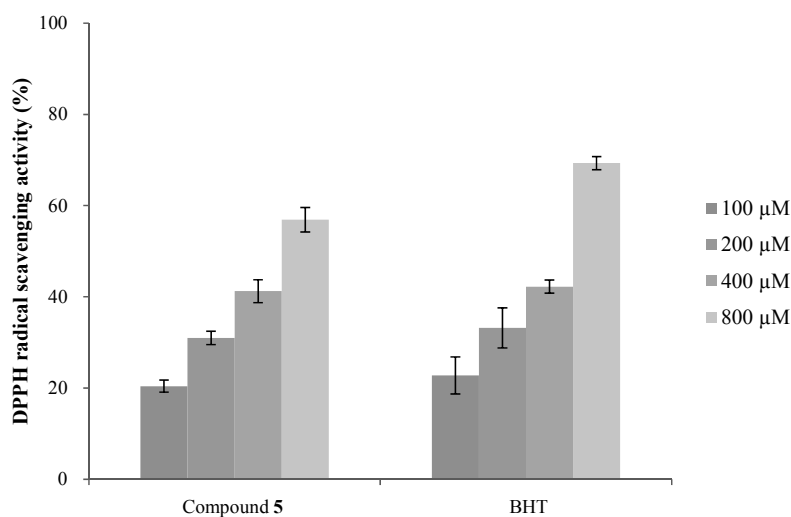


Figure 57. DPPH radical scavenging activity of the compound 5. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

Table 16. SC_{50} values of DPPH radical scavenging activity for the compound 5

	Compound 5	BHT
SC_{50} (μM)	630.5	501.5

나. ABTS⁺ radical 소거 활성 측정

풍란 캘러스에서 분리된 화합물에 대하여 ABTS⁺ radical 소거 활성을 측정하였다. 실험은 25, 50, 100, 200 μM의 농도로 진행하였으며, 이에 대하여 SC₅₀값을 계산하였다. 그 결과, compound 5의 SC₅₀값이 93.1 μM로 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인하였다(Figure 58, Table 17).

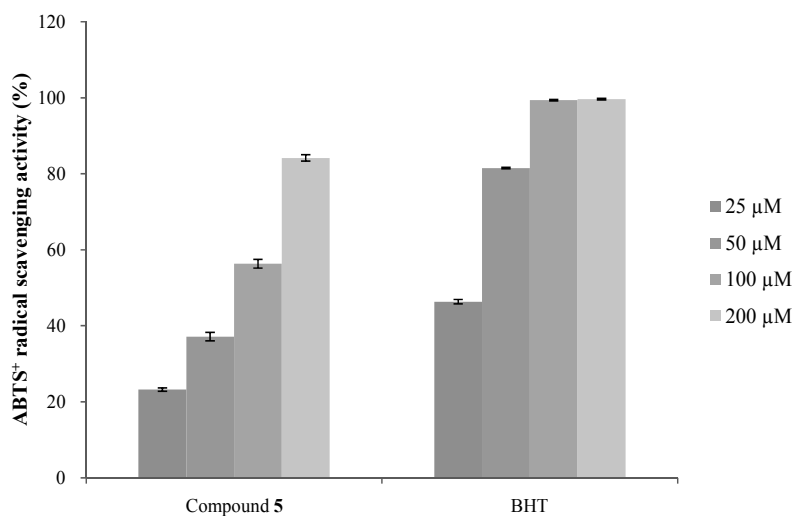


Figure 58. ABTS⁺ radical scavenging activity of the compound 5. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 17. SC₅₀ values of ABTS⁺ radical scavenging activity for the compound 5

	Compound 5	BHT
SC ₅₀ (μM)	93.1	28.6

2) 항염

가. Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

풍란 캘러스에서 분리된 화합물에 대하여 항염 활성을 측정하기 위해 RAW264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성(MTT assay)을 확인하였다. 앞서 항염 활성이 보고된 바 있는 compound 6, 7을 제외하고 compound 5에 대하여 실험을 진행하였으며, 실험은 12.5, 25, 50, 100 μ M의 농도로 진행하였다. 그 결과, compound 5는 NO 생성을 억제하는데 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Figure 59).

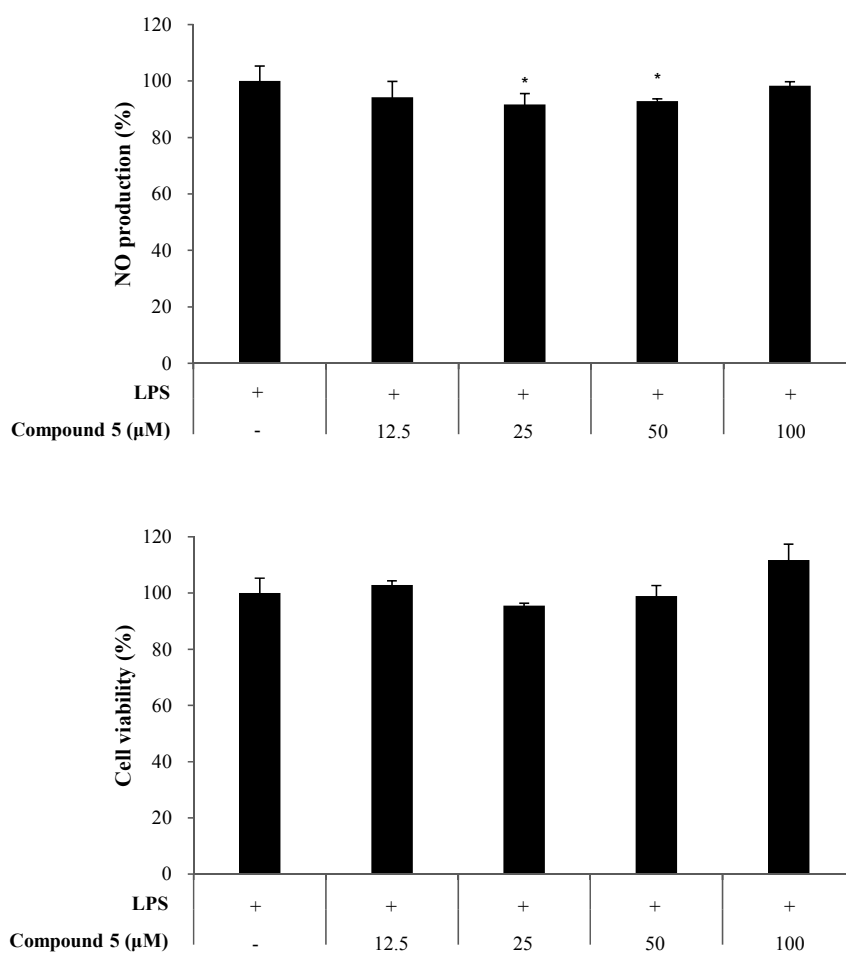


Figure 59. Effects of the compound 5 on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0.1 μg/mL of LPS only, or with LPS plus the compound 5 from *N. falcata* callus for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$

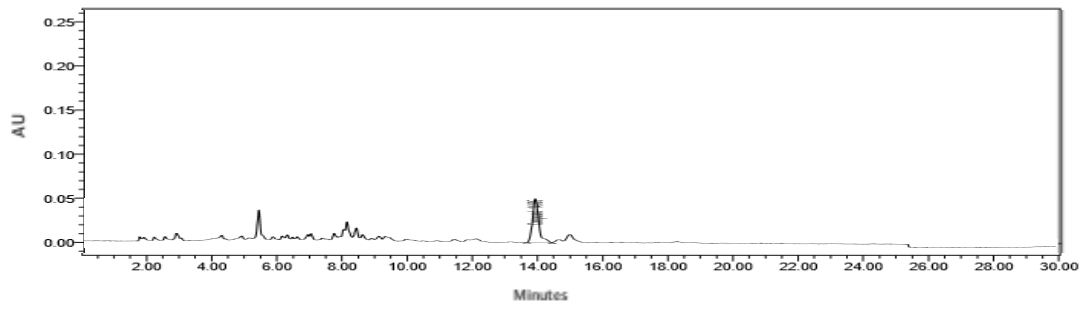
6. 분리된 화합물의 함량 분석

1) Compound 5의 함량 분석

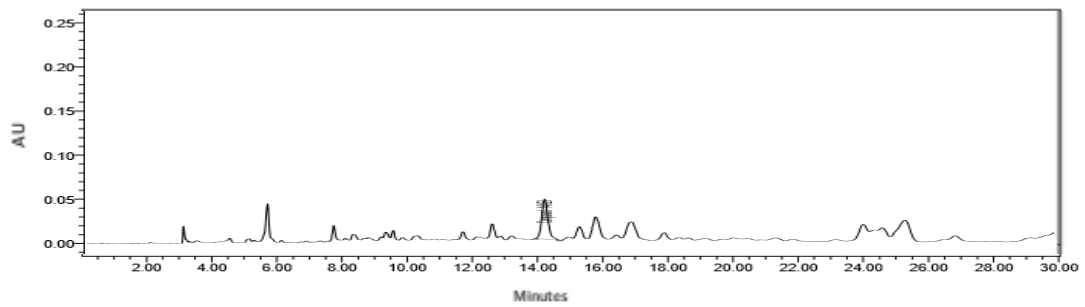
풍란 캘러스에서 분리된 화합물들 중 지표성분으로 예상되는 compound 5의 함량은 Sunfire™ C18 컬럼을 사용한 HPLC 분석을 통해 확인하였다. 그 결과, 70% EtOH 추출물 1 g당 compound 5는 14.6 mg (1.46%)이 함유되어 있으며, EtOAc 분획물에는 14.4 mg (1.44%)이 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 특히 *n*-BuOH 분획물에는 87.3 mg (8.73%)으로 가장 많이 함유되어 있는 것을 확인하였다(Table 18, Figure 60).

Table 18. The contents of compound 5 isolated from *N. falcata* callus

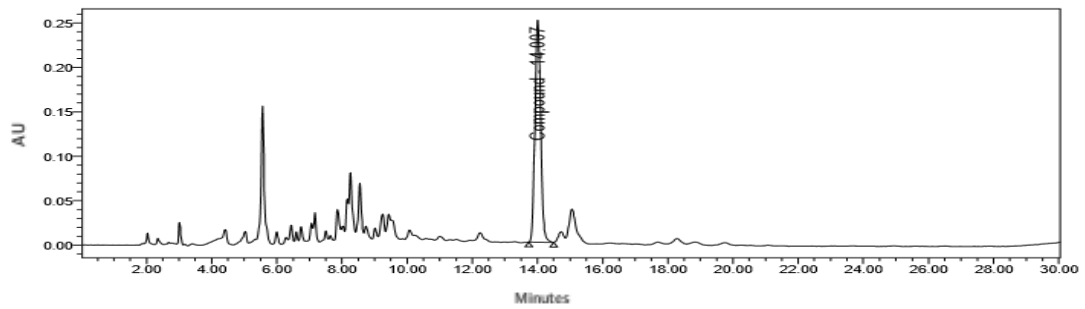
	Extract	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O
Contents (mg/g)	14.6	14.4	87.3	-



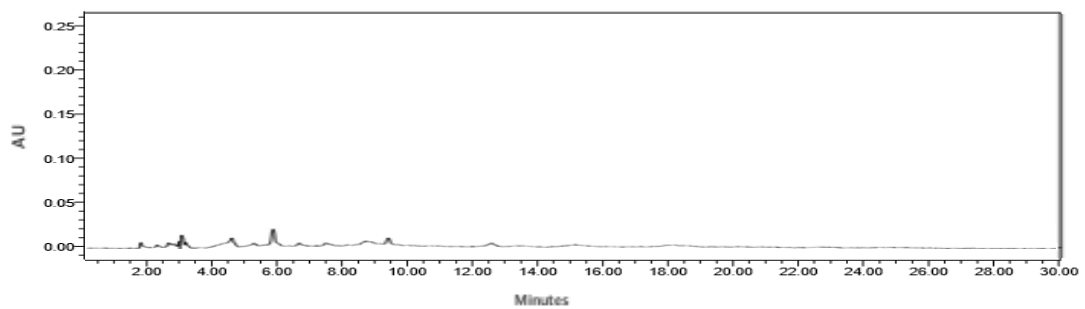
(A)



(B)



(C)



(D)

Figure 60. HPLC chromatogram of 70% EtOH extract (A), EtOAc layer (B), *n*-BuOH layer (C) and water layer (D) from *N. falcata* callus at 265 nm.

7. 요약 및 결론

현재까지 풍란 및 풍란 캘러스에 대하여 알려진 생리 활성이 없으며, 성분에 대한 연구 또한 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 풍란 캘러스의 다양한 생리 활성을 확인하고 유효 성분을 분리·동정하여 의약품, 건강기능식품 및 화장품 관련 천연 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

풍란 캘러스 70% EtOH 추출물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 얻었다. 얻어진 각 분획물들 중 EtOAc와 *n*-BuOH 분획물에 대해 MPLC, silica gel 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 단일물질들을 분리하고 ¹H, ¹³C NMR을 이용해 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 3개의 화합물을 분리·동정하였다.

분리된 화합물은 kaempferol 3-*O*-robinobioside (5), β-sitosterol (6), daucosterol (7)로 확인되었다. 분리된 화합물인 compound 5, 6, 7은 모두 풍란에서 처음으로 분리되었다.

풍란 캘러스 추출물 및 용매 분획물에 대하여 분리된 화합물 중 지표성분인 compound 5의 함량을 확인하기 위하여 HPLC를 이용하여 정량 분석을 수행한 결과, 70% EtOH 추출물이 14.6 mg/g, EtOAc 분획물이 14.4 mg/g을 함유하고 있었으며, 특히 *n*-BuOH 분획물이 87.3 mg/g으로 가장 많은 함유량을 나타냈다.

풍란 캘러스에 대한 항산화 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 가장 많은 폴리페놀(365.1 mg/g GAE)을 함유하고 있었으며, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물이 비슷한 양의 플라보노이드(25.5, 30.4 mg/g QE)를 함유하고 있었다. DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성 실험 결과, 폴리페놀 함량이 높았던 EtOAc 분획물에서 가장 높은 radical 소거 활성이 있음을 확인하였다. 항산화 활성이 없는 compound 6, 7을 제외하고 compound 5에 대하여 항산화 활성 실험을 진행한 결과, DPPH radical 소거 활성(SC₅₀: 630.5 μM) 및 ABTS⁺ radical 소거 활성(SC₅₀: 93.1 μM)이 있음을 확인하였다.

Murine macrophage cell line인 RAW264.7 cell을 이용한 항염 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제

하는 것을 확인하였으며, 또한, PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-6 및 IL-1 β)의 생성을 억제 하는 것을 확인하였다. Compound 6, 7은 앞서 항염 활성이 보고된 바 있어 compound 5에 대하여 항염 활성 실험을 진행한 결과, compound 5는 NO의 생성을 억제하는데 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 풍란 껍질 추출물 EtOAc 분획물의 항염 활성에는 compound 6, 7이 관여하는 것으로 판단된다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 풍란 껍질 추출물은 항산화 및 항염 효과가 있는 의약품, 건강기능식품 및 화장품 관련 천연 소재로서의 활용가능성이 있음을 확인하였다.

V. 종합 결론 및 고찰

본 연구는 의약품, 건강기능식품 및 화장품의 소재로 쓰이는 각종 합성 물질을 대체할 수 있는 천연물 유래 소재를 찾기 위해 물사과(*Syzygium aqueum* Burm.f. Alston) 가지 및 풍란(*Neofinetia falcata* Thunb. Hu) 켈러스의 추출물과 용매 분획물에서 유효 성분을 분리·동정하고 항산화 및 항염 활성을 검색하였다.

물사과 가지 70% EtOH 추출물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 얻었다. 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성 실험 결과, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물은 DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성이 대조군인 ascorbic acid 만큼 좋은 것을 확인하였다. 세포를 이용한 항산화 실험 결과, 추출물, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물은 H₂O₂로 자극된 HaCaT keratinocyte에서 세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 또한, LPS로 자극된 RAW264.7 macrophage를 이용한 항염 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 억제시키는 것을 확인하였고 이와 같은 경향으로 iNOS 단백질의 발현을 억제시키는 것을 확인하였다. 이는 전염증성 cytokine (IL-1 β , IL-6)의 생성을 억제시키는 기전에 의한 것으로 확인되었다. 이를 바탕으로 항산화 및 항염 활성이 좋은 EtOAc 분획물에서 물사과 가지의 유효 성분을 분리·동정하였다.

분리된 화합물은 3-*O*-methylelagic acid 3'-*O*- α -L-rhamnopyranoside (1), 3-*O*-methylelagic acid 3'-*O*- α -L-3''-*O*-acetyl-rhamnopyranoside (2), pinocembrin (3), desmethoxymatteucinol (4)로 확인되었다. 이 중 compound 1, 2, 4는 물사과에서 처음으로 분리된 화합물이다. 분리된 화합물들은 생체 내 단백질과 결합할 수 있어 다양한 생리 활성을 가진다고 알려진 ellagic acid와 flavonoid 계열의 화합물이다.⁴ 이들은 폴리페놀류 화합물에 속하며, 폴리페놀은 모노페놀보다 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 이는 conjugated double bond의 비편재화된 전자를 가지고 있는 구조적 특징에 의해 radical과 반응하여 전자를 잃어도 안정한 상태를 유지할 수 있어 높은 radical 소거 활성을 가지기 때문이다. 또한 compound 3, 4와 같은 flavonoid 계열의 화합물들은

대부분 A, B환에 hydroxy group의 개수와 결합 위치에 따라 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다.^{36,37} 이를 바탕으로 화합물이 혼합되어 분리된 compound 2를 제외하고 compound 1, 3, 4에 대하여 항산화 활성 실험을 진행하였다. DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성 실험 결과, compound 1이 가장 높은 radical 소거 활성이 있음을 확인하였으며, 세포를 이용한 항산화 실험 결과, compound 3, 4는 H₂O₂로 자극된 HaCaT keratinocyte에서 세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인하였다. Compound 4는 compound 3과 비교하였을 때 C₆, C₈ 위치에 methyl group이 치환되어 있는 구조적 차이를 보이는데 항산화 활성 실험에서 모두 유사한 결과를 나타내는 것으로 보아 이러한 구조적 차이는 항산화 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 또한 분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험 결과, compound 1, 3, 4는 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 억제하는 것을 확인하였다.

풍란 켈러스 70% EtOH 추출물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 얻었다. 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성 실험 결과, EtOAc 분획물은 DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성이 있음을 확인하였다. 또한, LPS로 자극된 RAW264.7 macrophage를 이용한 항염 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 억제하는 것을 확인하였으며, PGE₂ 및 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β)의 생성을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 항산화 및 항염 활성이 좋은 EtOAc 분획물에서 풍란 켈러스의 유효 성분을 분리·동정하였다.

분리된 화합물은 kaempferol 3-*O*-robinobioside (5), β -sitosterol (6), daucosterol (7)로 확인되었다. 이는 모두 풍란에서 처음으로 분리되었으며, 이 중 compound 5는 flavonoid 계열의 화합물이다. 1차 스크리닝 결과, 항산화 활성이 나타나지 않은 compound 6, 7을 제외하고 compound 5에 대하여 추가 실험을 진행하였다. Compound 5는 DPPH 및 ABTS⁺ radical 소거 활성 실험 결과, radical 소거 활성을 나타냈으며, 이는 물사과 가지에서 분리된 flavonoid 계열의 화합물과 마찬가지로 A, B환에 있는 hydroxy group에 의한 것으로 판단된다. 또한 분리된 화합물 중 항염 활성이 보고되지 않은 compound 5에 대하여 항염 활성 실험을 진행한 결과, compound 5는 NO의 생성을 억제하는데 영향을

미치지 않는 것으로 확인되었다. Compound 6, 7의 경우, 생물체에서 흔하게 분리되는 화합물로 항염 활성이 있음이 보고되어 있다.³⁸ 따라서 풍란 켈러스 EtOAc 분획물의 항염 활성에는 compound 6, 7이 관여하는 것으로 판단된다.

본 연구 결과를 바탕으로 몰사과 가지와 풍란 켈러스의 추출물 및 분리된 화합물은 향후 의약품, 건강기능식품 및 화장품 관련 천연소재로써의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Yoon, J. H.; Park, S. G.; Lee, M. J.; Park, J. Y.; Seo, K. S.; Woo, K. C.; Lee, C. E. Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of *Bletilla striata Reichenbach fil.* Fractions as Cosmetic, *Journal of Life Science* **2013**, 9, 1073-1078.
2. 김정은, 섬오갈피 열매, 참꽃나무 잎, 당근 지상부 및 구멍갈파래 추출물의 항염, 항균 활성 성분 연구, *제주대학교* **2016**, 박사학위논문.
3. 이남호, 천연물화학, *신일서적(주)* **2014**, 125, 130-131, 186.
4. Halliwell, B. Antioxidants in Human Health and Disease, *Annual Review of Nutrition* **1996**, 16, 33-50.
5. Yasuko, S.; Takashi, H. Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UVA irradiation, *Journal of Dermatological Science* **1997**, 14, 225-232.
6. Ames, B. N. Dietary Carcinogens and Anticarcinogens, *Science* **1983**, 221, 1256-1264.
7. Antolovich, M.; Prenzler P. D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. Methods for testing antioxidant activity, *Analyst* **2002**, 127, 183-198.
8. 김미혜, 미강 추출물의 항산화, 항염작용 및 화장품의 응용에 관한 연구, *남부대학교* **2012**, 박사학위논문.
9. 김수연, 아사이베리(Acai Berry) 에탄올 추출물 항산화 및 항염증 효과, *계명대학교* **2015**, 석사학위논문.
10. 현은아, 세이지(*Salvia officinalis*) 추출물의 항염증 효과, *제주대학교* **2003**,

석사학위논문.

11. 조연정, '부지화' 잎·가지 추출물의 항염 및 항산화 활성 성분 연구, *제주대학교 2017, 석사학위논문*.
12. An, S. J.; Pae, H. O.; Oh, G. S.; Choi, B. M.; Jeong, S.; Jang, S. I.; Oh, H.; Kwon, T. O.; Song, C. E.; Chung, H. T. Inhibition of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 productions and NF- κ B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae), *International Immunopharmacology* **2002**, *2*, 1173-1181.
13. 농촌진흥청 공식블로그, 2017.09.01., <https://blog.naver.com/rda2448>, 2017.11.24.
14. 제주도, 아열대 과수 '리치' 안정생산 기술개발, 시사제주, 2017.10.10.
15. 박안나, 망고 잎 추출물의 EM발효 및 유산균발효가 항산화성에 미치는 영향 연구, *전북대학교 2014, 박사학위논문*.
16. 장혜인, 주름개선 및 미백 활성 연구에 의한 알로에 베라 부산물의 화장품 원료로서의 효능 연구, *아주대학교 2011, 박사학위논문*.
17. 유아남, 올리브 잎 추출물이 고지방식이와 streptozotocin으로 유도된 제 2형 당뇨병에 미치는 항 당뇨병효과, *숙명여자대학교 2013, 석사학위논문*.
18. Dicosmo, F.; Misawa, M. Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production, *Biotechnology Advances* **1995**, *13*, 425-453.
19. Daum 백과사전, 2010.02.27., <http://cafe.daum.net/callalilies>, 2017.11.24.
20. 김명옥, Aloe vera 캘러스의 현탁배양 최적화 및 현탁배양 생성물의 특성,

- 강원대학교 2011, 박사학위논문.
21. 김일숙, 개똥쑥 형성층 유래 세포의 특징과 세포 추출물의 항염증 활성, 전북대학교 2011, 석사학위논문.
 22. 특허정보넷 KIPRIS, 2012.01.12., www.kipris.or.kr, 2017.11.24.
 23. Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils, *J Am Oil Chem Soc* **1981**, 58, 966-968.
 24. Davis, F. B.; Middleton, E.; Davis, P. J.; Blas, S. D. Inhibition by quercetin of thyroid hormone stimulation in vitro of human red blood cell Ca^{2+} -ATPase activity, *Cell Calcium* **1983**, 4, 71-81.
 25. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature* **1958**, 181, 1199-1200.
 26. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med* **1999**, 26, 1231-1237.
 27. 김기중, 열대의 과일 자원, *지오북* **2012**, 408.
 28. Osman, H.; Rahim, A. A.; Isa, N. M.; Bakhr, N. M. Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Paederia foetida* and *Syzygium aqueum*, *Molecules* **2009**, 14, 970-978.
 29. Manaharan, T.; Appleton, D.; Cheng, H. M.; Palanisamy, U. D. Flavonoids isolated from *Syzygium aqueum* leaf extract as potential antihyperglycaemic agents, *Food Chemistry* **2012**, 132, 1802-1807.
 30. Kim, J. P.; Lee, I. K.; Yun, B. S.; Chung, S. H.; Shim, G. S.; Koshino, H.; Yoo, I. D. Ellagic acid rhamnosides from the stem bark of *Eucalyptus globulus*, *phytochemistry* **2001**, 57, 587-591.

31. Ching, A. Y. L.; Wah, T. S.; Sukari M. A.; Lian, G. E. C.; Rahmani, M.; Khalid, K. Characterization of flavonoid derivativers from *Boesenbergia rotunda* (L.), *The Malalysian Journal of Analytical Sciences* **2007**, 1, 154-159.
32. Mustafa, K. A.; Perry, N. B.; Weavers, R. T. Lipophilic C-methylflavonoids with no B-ring oxygenation in *Metrosideros* species (Myrtaceae), *Biochemical Systematics and Ecology* **2005**, 33, 1049-1059.
33. Hou, W. C.; Lin, R. D.; Lee, T. H.; Huang, Y. H.; Hsu, F. L.; Lee, M. H. The phenolic constituents and free radical scavenging activities of *Gynura formosana* Kiamnra, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2005**, 85, 615-621.
34. Venkata Sai Prakash, C.; Prakash, I. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*, *International Current pharmaceutical journal* **2012**, 1, 239-242.
35. Esmaeili, M. A.; Farimani, M. M.; Inactivation of PI3K/Akt pathway and upregulation of PTEN gene are involved in daucosterol, isolated from *Salvia sahendica*, induced apoptosis in human breast adenocarcinoma cells, *South African journal of Botany* **2014**, 93, 37-47.
36. Frankel, E. N.; German, J. B.; Kinsella, J. E.; Parks, E.; Kanner, J. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic subsatances in red wine, *The Lancet* **1993**, 341, 454-457.
37. Khanduja, K. L.; Bhardwaj, A. Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol compared in vitro with some other bioflavonoids, *Indian Journal of Biochemistry &*

Biophysics **2003**, 40, 416-422.

38. Koh, Y. J.; Cha, D. S.; Ko, J. S.; Park, H. J.; Choi, H. D. Anti-Inflammatory Effect of *Taraxacum officinale* Leaves on Lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells, *Journal of Medicinal Food* **2010**, 13, 870-878.