

정향(*Eugenia caryophyllata* Thunb.) Eugenol 및 그 유도체의 항산화 및 항염증활성

임현희¹ · 김은옥¹ · 서미자² · 최상원^{1*}

¹대구가톨릭대학교 식품영양학과
²하늘호수

Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Eugenol and Its Derivatives from Clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.)

Hyun-Hee Leem¹, Eun-Ok Kim¹, Mi-Jae Seo², and Sang-Won Choi^{1*}

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

²Skylake Co., Gyeongbuk 712-841, Korea

Abstract

Antioxidant and anti-inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) were evaluated using *in vitro* assay systems by measuring 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, cyclooxygenase-2 (COX-2), and 15-lipoxygenase (15-LOX). Among eight different crude medicinal drugs tested, volatile extracts of clove extracted by steam distillation extraction (SDE) showed potent DPPH radical scavenging activity (IC₅₀=8.85 µg/mL) as well as strong inhibitory activity against COX-2 (58.15%) and 15-LOX (86.15%) at 10 µg/mL and 25 µg/mL, respectively. Major volatile components of clove were identified as eugenol, *trans*-caryophyllene, and acetyleneugenol by GC-MS analysis. Out of three eugenol derivatives, eugenol, methyl eugenol, and acetyl eugenol, eugenol showed the strongest DPPH radical scavenging activity and COX-2 inhibitory activity, whereas methyl eugenol exhibited the strongest 15-LOX inhibitory activity. Finally, the contents of the three eugenol derivatives in clove were quantified by analytical HPLC. Contents of eugenol and acetyl eugenol in clove were 6.95% and 1.85% per dry weight, respectively. These results suggest that eugenol and its derivatives in steam distilled extract of clove may be useful as potential antioxidant and anti-inflammatory agents.

Key words: clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.), volatile components, eugenol derivatives, antioxidant and anti-inflammatory activity

서 론

항산화물질(antioxidant)은 불포화지방산의 자동산화에 의해 생성되는 지질과산화물을 억제하여 식품의 산패를 억제해 줄 뿐만 아니라 생체 내에서 생성되는 각종 활성산소종(¹O₂, O₂⁻, H₂O₂, ·OH)에 의한 지질과산화반응을 억제하여 암, 동맥경화증, 염증, 당뇨, 및 노화를 예방해주는 생리활성 물질로서 크게 각광을 받고 있다(1,2). 항산화물질에는 α-tocopherol 및 L-ascorbic acid와 같은 천연항산화제와 BHT (butylated hydroxytoluene), BHA(butylated hydroxyanisole) 및 TBHQ(*t*-butylhydroquinone) 등과 같은 여러 합성항산화제가 널리 사용되고 있으나(3,4), 천연항산화제의 높은 가격 및 낮은 항산화 활성, 그리고 합성항산화제의 발암성 및 독성 등의 안전성 문제가 제기되면서 보다 안전하고 효과적인 천연항산화제의 개발이 요구되고 있다(5,6).

염증은 생체나 조직에 물리적 충격이나 화학물질 및 세균 감염 등의 자극에 대한 생체 방어 기전이며, 지속적인 염증 반응은 점막손상을 촉진시켜 결과적으로 관절염, 당뇨병, 동맥경화증 및 암 등의 발생을 이끈다(7). 생체 내 염증을 촉진하는 효소로는 cyclooxygenase-2(COX-2)와 lipoxygenase(LOX)가 잘 알려져 있으며(8,9), 이들 효소를 저해하는 물질은 염증성 질환을 저해하는 항염증제로서 개발 가능성이 높다(10). 지금까지 개발된 항염증제는 크게 스테로이드계(히드로코르티손, 프레드니솔론, 베타메타손)와 비스테로이드계(아스피린, 인도메타신, 이부프로펜)로 나눌 수가 있는데, 모두 염증반응의 주요 매개체인 프로스타글란딘의 생합성을 억제해줌으로써 항염증작용을 나타내는 약제이다. 그러나 이들 항염증제는 위염, 신장염, 및 심장질환 등을 초래함으로써 인체 안전성면에서 대부분 문제점을 안고 있어(11, 12) 그 사용이 일부 제한되고 있기에 현재 천연으로부터 보

*Corresponding author. E-mail: swchoi@cu.ac.kr
Phone: 82-53-850-3525, Fax: 82-53-850-3516

다 안전한 항염증 치료제의 개발이 활발히 이루어지고 있다.

정향(丁香, 학명: *Eugenia caryophyllata* Thunb.)은 도금양과(Myrtaceae)에 속하는 상록 소고목의 꽃으로 9월에 길이 9~12 mm의 꽃봉오리로 익으며 맛은 맵고 약성은 따뜻하여 독성이 없다(13). 정향은 그 특유의 강한 향 때문에 식품의 향신료로서 뿐만 아니라 화장품 및 의약품 등의 산업에서 방향성소재로서 널리 이용되고 있으며, 정향추출물은 강한 항산화(14), 항균(15), 항바이러스(16), 항스트레스(17) 등 여러 생리작용을 지니고 있어 천연의 기능성 소재로서 크게 각광을 받고 있다. 또한 정향의 주된 향기성분인 eugenol의 항산화(18), 항염증(19), 항암(20), 항균(21), 항알레르기 효과(22)에 관해 보고된 바 있다. 이와 같이 지금까지 정향의 향기성분 분석과 정향추출물 및 정유성분의 생리활성에 관한 많은 연구가 보고된 바가 있으나 정향 eugenol 유도체의 생리활성에 관한 연구는 아직 미비한 실정이다.

본 연구는 정향을 포함한 여러 생약의 증류추출액으로 제조된 한방스킨의 품질 표준화 및 과학화를 이루기 위한 연구의 일환으로 정향의 휘발성 향기성분을 연속수증기증류추출(steam distilled extraction, SDE)법으로 추출한 후 gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)를 이용하여 향기성분을 분석하였으며, 아울러 주된 향기성분인 eugenol로부터 그 유도체를 합성한 후 *in vitro* assay 시스템을 사용하여 그들의 항산화 및 항염증 활성을 측정하였다. 또한, HPLC를 이용하여 정향의 eugenol 및 그 유도체를 정량분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 8가지 생약[정향(*Eugenia caryophyllata* Thunb.), 고본(*Angelica tenuissima*), 노간주(*Juniperus ridiga*), 박하(*Mentha arvensis* L.), 당귀(*Angelica gigas*), 목향(*Saussurea lappa*), 애엽(*Artemisiae asiaticae*) 및 천궁(*Cnidium officinale*)] 중 정향(인도네시아산)을 제외하고는 전부 국산으로 2009년 영천 약전시장에서 구입한 것을 사용하였으며, 건조된 상태로 저온(-5°C)에서 보관하면서 실험 재료로 사용하였다.

시약 및 크로마토그래피용 충전제

본 실험에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), eugenol, nor-dihydroguaiaretic acid(NDGA), dimethylformamide(DMF), cesium carbonate(CsCO₃), methyl iodide(CH₃I), 4-dimethylaminopyridine(DMAP), acetic anhydride(Ac₂O), dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA)로부터, cyclooxygenase(COX) 및 lipoxigenase(LOX) 저해 실험용 kit는 Cayman Chem. Co. (Ann Arbor, MI, USA)로부터 각각 구입하여 사용하였다. 그리고 column chromatography 충전물질로서 silica gel

60(70-230 mesh, Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였으며, 물질분리 및 확인을 위한 thin-layer chromatography(TLC)는 pre-coated silica gel 60(0.25 mm, Merck) plate를 사용하였다. HPLC용 메탄올은 Merck의 제품을 사용하였으며, 그 외 시약류는 분석용 특급 또는 1급 시약을 각각 사용하였다.

정향을 포함한 8가지 생약의 증류추출액의 제조

정향을 포함한 8가지 생약의 증류추출액은 SDE법에 의해 다음과 같이 제조하였다. 먼저, Schultz 등(23)의 방법에 따라 분쇄한 생약 50 g에 초순수 1 L를 혼합하고 SDE 장치에서 재증류한 diethylether 500 mL를 사용하여 상압 하에서 4시간 동안 추출한 후 무수황산나트륨을 가하여 -4°C에서 하룻밤 방치시켜 탈수시키고 유기용매층은 rotary vacuum evaporator(Eyela, Tokyo, Japan) 및 질소 purger를 이용하여 0.5 mL까지 농축하여 증류추출액을 제조하였다.

정향 증류추출액의 휘발성 향기성분의 분석

정향 증류추출액의 휘발성 향기성분의 분석은 GC-MS를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. GC-MS 기기는 HP 5973 Mass selective detector(Agilent Technologies Inc., Chandler, AZ, USA)가 장착된 Agilent 5975C Series gas chromatography(Agilent Technologies Inc.)를 사용하였으며, 분리용 칼럼은 HP-5MS 5% phenyl methyl silox nonpolar(30 m×0.25 mm, i.d., 0.25 μm film thickness, J & W, Folsom, CA, USA)를 사용하였고, 이때 oven의 온도는 50°C에서 3분간 유지한 다음 5°C/min의 속도로 300°C까지 상승시켰으며, carrier gas의 유속은 1 mL/min(He)로 유지하였다. 분리된 화합물의 이온화는 electron impact ionization(EI mode) 방법으로 행하였으며 ionization voltage와 ion source의 온도는 각각 70 eV와 230°C로 설정하였고, 분석할 분자량의 범위는 40~350(m/z)로 설정하였으며, GC injector의 온도는 250°C로 설정하였다. SDE추출법으로 추출된 증류추출액 0.5 μL를 split ratio 1:20으로 주입하여 분석하였다.

GC-MS에 의해 total ionization chromatogram(TIC)에 분리된 각 peak의 휘발성 향기성분 분석은 mass spectrum library(Wiley 275&7N, NBS 75K)(24)와 mass spectral data book의 spectrum과 그리고 문헌상의 retention index와의 일치 및 표준물질의 분석 data를 비교하여 확인하였다.

Eugenol 유도체의 합성 및 화학구조 분석

Eugenol 및 그 유도체의 항산화 및 항염증 활성을 측정하기 위해 eugenol로부터 methyl eugenol 및 acetyl eugenol의 합성은 Fig. 1과 같이 실시하였다. 먼저, methyl eugenol의 합성은 1 mM eugenol 154.9 μL와 금속 촉매제인 5 mM CsCO₃ 1.63 g을 각각 취하여 vial에 넣고 DMF 1.5 mL로 용해한 후 10 mM CH₃I 625.29 μL를 첨가하여 50~60°C에서 30분간 반응시켰다. 다음, 반응혼합물의 CsCO₃를 제거하기 위해 3% HCl 50 mL와 에틸아세테이트 50 mL를 첨가하여

분획한 후 상층의 에틸아세테이트층을 얻었으며, 여기에 포화염화나트륨 수용액 50 mL를 2회 가하여 세척하였다. 이어서 무수황산나트륨으로 탈수하고 여과지(Whatman No. 2 filter paper, Whatman, Maidstone, England)로 여과한 후 얻은 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압·농축하여 에틸아세테이트 분획물을 얻었다. 다음 이 분획물을 silica gel 60을 이용하여 hexane-EtOAc(5:1, v/v) 혼합용매로 flash column chromatography를 실시하여 튜브당 10 mL씩 30개를 분취하고 각 분획을 precoated silica gel TLC (용매는 위와 동일)를 이용하여 합성된 성분을 확인하였고, 원하는 물질이 함유된 분획을 모아 농축한 후 노르말-헥산으로 재결정화하여 methyl eugenol(120.5 mg, 수율: 77.8%)을 얻었다.

한편, acetyl eugenol의 합성은 1 mM eugenol 154.9 μ L에 촉매제인 3 mM 4-DMAP 366.51 mg을 각각 취하여 vial에 넣고 CH_2Cl_2 2 mL로 용해한 후 2 mM Ac_2O 189.06 μ L를 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 이어서 반응혼합물의 정제는 앞서 methyl eugenol의 정제방법과 유사하게 실시한 후 최종 노르말-헥산으로 재결정화하여 acetyl eugenol (144.72 mg, 수율: 93.4%)을 얻었다.

다음으로 합성한 methyl eugenol 및 acetyl eugenol의 화학구조를 확인하기 위해 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz)와 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) spectra를 Varian Unity Plus 400 spectrometer (Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 상온에서 측정하였으며, 이때 시료는 CD_3OD 에 용해하였다. 그리고 tetramethylsilane (TMS)을 내부표준물질로 첨가하여 시료의 화학적 이동값을 δ 치(ppm)로 나타내었다.

정향의 증류추출액 및 eugenol유도체의 항산화활성 측정

정향의 증류추출액 및 eugenol로부터 합성된 3가지 유도체의 항산화활성은 Tagashira와 Ohtake(25)의 방법을 약간 변형하여 DPPH에 대한 전자공여 효과로 각 시료의 활성을 측정하였다. 즉, 시료 용액 100 μ L에 100 μM DPPH를 함유한 메탄올 용액 2 mL를 가해 vortex하여 실온에서 10분간 방치한 후 UV-Vis spectrophotometer(SINCO S-3100, Seoul, Korea)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도의 감소를 측정하였다. 이때 DPPH radical 소거활성은 다음 식에 따라 계산하였다. DPPH radical scavenging activity(%)=(1-A/B)×100(A: 517 nm에서 시료 흡광도, B: 517 nm에서 대조구 흡광도). 여기서 시료를 넣지 않은 대조구를 함께 측정하여 시료의 상대적인 DPPH radical 소거활성을 측정한 후 회귀분석에 의해 산출된 IC_{50} 치(DPPH radical을 50% 저해하는 시료의 농도)를 나타내었다.

정향의 증류추출액 및 eugenol유도체의 COX-2 저해활성 측정

정향의 증류추출액 및 eugenol유도체의 COX-2 저해활성은 COX 반응에서 생성된 COX 유래의 PGH_2 를 염화주석

(SnCl_2) 환원에 의해 생성된 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 의 양을 직접적으로 측정하는 방법으로, 생성된 PG 화합물에 모두 결합할 수 있는 polyclonal rabbit antiserum을 사용하여 enzymatic immuno assay(EIA)를 통해 정량하였으며, COX inhibitor screening assay kit(Cayman Chem. Co.)를 사용하여 다음과 같이 측정하였다.

먼저 5 mM EDTA 및 2 mM phenol이 함유된 Tris-HCl buffer(pH 8.0) 950 μ L에 heme 10 μ L, COX-2 20 μ L, 시료 20 μ L를 넣고 기질인 arachidonic acid 10 μ L를 첨가하여 37°C에서 2분간 반응시켜 COX-2를 활성화시켰다. 다음, 1.0 M HCl 50 μ L를 넣어 반응을 정지시켰으며 SnCl_2 100 μ L 첨가한 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 얻어진 반응혼합물 50 μ L를 취하여 acetylcholinesterase(AChE) tracer 50 μ L와 antiserum 50 μ L를 첨가하여 상온에서 18시간 동안 반응시킨 후 Ellman's reagent 200 μ L를 첨가하여 암실에서 60~90분간 발색시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 COX-2의 저해활성은 다음의 식에 따라 계산하였다. COX-2 저해활성(%)=(1-A/B)×100(A: 420 nm에서 시료의 흡광도, B: 420 nm에서 대조구의 흡광도).

정향의 증류추출액 및 eugenol 유도체의 15-LOX 저해활성 측정

정향의 증류추출액 및 eugenol 유도체의 15-LOX 저해활성은 lipoxygenase inhibitor screening assay kit(Cayman Chem. Co.)를 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 15-LOX(220 units/mL) 90 μ L와 시료 10 μ L를 첨가한 후 기질인 arachidonic acid 10 μ L를 첨가하여 5분간 잘 혼합하여 반응시킨 다음 발색제인 chromogen 100 μ L를 첨가하여 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 15-LOX 저해활성은 다음의 식에 따라 계산하였다. 15-LOX 저해활성(%)=(1-A/B)×100(A: 500 nm에서 시료의 흡광도, B: 500 nm에서 대조구의 흡광도)

정향의 eugenol 및 그 유도체의 정량분석

정향의 eugenol유도체의 함량은 HPLC를 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 분쇄한 정향 10 g을 취해 에탄올 100 mL를 가한 후 2시간 동안 ultrasonicator(Power Sonic 420, Hwashin Instrument, Seoul, Korea)로 2회 반복 추출한 다음 여과하여 감압농축한 후, 에탄올 100 mL에 다시 용해하여 일야 방치하였다. 침전물을 여과하여 얻어진 여과액을 다시 감압농축 하여 남아있는 에탄올을 완전히 제거한 후 에탄올 100 mL에 용해하고 0.45 μm PVDF syringe filter (Whatman, Maidstone, England)에 통과시킨 후 HPLC로 정량분석 하였다. 이때 HPLC는 Waters 600 controller HPLC system(New York, NY, USA)을 사용하였으며, 칼럼은 YMC-Pack Pro C_{18} (5 μm , 4.6×250 mm)을, 이동상 용매는 0.05% H_3PO_4 in H_2O (A)/100% MeOH(B)를 35분간 linear gradient으로 용출하였으며, 검출은 280 nm에서 0.8 mL/min

유속으로 측정하였으며 이때 sample 주입량은 10 μ L이었다. 다음, eugenol 및 그 유도체는 이전에 합성한 eugenol 유도체의 HPLC chromatogram의 retention time을 비교하여 확인하였으며, 각 화합물의 calibration curve는 회귀분석그래프를 이용하여 작성한 후 eugenol 및 그 유도체의 함량을 측정하였다.

통계처리

본 연구의 실험결과들은 3회 반복 측정하여 평균값 \pm 표준편차로 나타내었으며, 모든 자료의 통계분석은 SAS(Statistical Analysis System, Cary, NC, USA) software package를 사용하여 실시하였고, 이때 분산분석은 ANOVA test를, 각 시험구간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 Duncan multiple range test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준일 때 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

정향을 포함한 8가지 생약 증류추출액의 항산화활성 비교

현재 H사 화장품 회사에서 판매하고 있는 한방스킨은 정향을 포함한 8가지 생약의 증류추출액으로 제조된 것이기에 먼저 SDE법으로 추출한 이들 생약 증류추출액의 항산화활성을 DPPH radical 소거활성을 이용하여 측정한 결과는 Table 1과 같다. 즉, 8가지 생약 중 정향(*Eugenia caryophyllata* Thunb.) 및 고본(*Angelica tenuissima*)의 IC_{50} 이 각각 8.85 μ g/mL 및 1,250.5 μ g/mL로 높은 항산화활성을 나타낸 반면 그 외 증류추출액은 매우 낮은 항산화활성(>20 mg/mL)을 나타내었다. 이와 같이 정향은 천연항산화제인 α -tocopherol($IC_{50}=12.32$ μ g/mL)보다 더 높은 항산화활성을 나타낸 반면, L-ascorbic acid($IC_{50}=4.05$ μ g/mL)보다는 다소 낮은 활성을 나타내었다. Lee와 Takayuki(26)의 보고에 의하면 정향의 휘발성 향기성분은 50 μ g/mL의 농도에서 항산

화제인 α -tocopherol 및 BHT(butylated hydroxytoluene)와 유사하게 지질과산화 억제효과가 우수하였고, 160 μ g/mL의 농도에서 지질산패의 최종생성물인 malondialdehyde를 93% 저해한다고 보고한 바 있다. 따라서 정향의 휘발성향기 성분은 천연항산화제와 유사한 자유라디칼 및 지질과산화 저해활성을 지니고 있음을 확인할 수 있었다.

정향을 포함한 8가지 생약 증류추출액의 항염증활성 비교

SDE법으로 추출한 정향을 포함한 8가지 생약 증류추출액의 항염증 효과를 확인하기 위해 COX-2 및 15-LOX 저해활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 먼저 COX-2의 저해활성을 보면, 10 μ g/mL 농도에서 노간주(*Juniperus ridiga*, 50.05%), 목향(*Saussurea lappa*, 55.52%), 천궁(*Cnidium officinale*, 16.43%), 당귀(*Angelica gigas*, 70.57%), 정향(*Eugenia caryophyllata* Thunb., 58.15%), 고본(*Angelica tenuissima*, 56.29%), 박하(*Mentha arvensis*, 48.67%), 애엽(*Artemisia asiatica*, 59.92%)으로서 8가지 생약 중 당귀가 가장 강한 저해활성을 나타내었으며, 그 다음으로 애엽, 정향, 목향, 고본이 비슷한 저해활성을 보였고 그 외의 것은 낮은 활성을 나타내었다. 다음, 15-LOX 저해활성을 보면, 25 μ g/mL 농도에서 노간주(*Juniperus ridiga*, 59%), 목향(*Saussurea lappa*, 59.83%), 천궁(*Cnidium officinale*, 37.12%), 당귀(*Angelica gigas*, 64.27%), 정향(*Eugenia caryophyllata* Thunb., 86.15%), 고본(*Angelica tenuissima*, 66.48%), 박하(*Mentha arvensis*, 32.41%), 애엽(*Artemisia asiatica*, 16.34%)으로서 8가지 생약 중 정향이 가장 강한 저해활성을 나타내었으며, 그 다음으로 고본 및 당귀 그리고 노간주와 목향이 비슷한 저해활성을 보였고 그 외의 것은 낮은 저해활성을 나타내었다. 이와 같이 정향 증류추출액의 COX-2 및 15-LOX 저해활성이 비록 COX-2 및 15-LOX 저해제로 잘 알려진 indomethacin(5 μ g/mL 농도에서 87.15% 저해)과 NDGA(5 μ g/mL에서 87.81% 저해)에 비해 낮은

Table 1. DPPH radical scavenging activity of volatile extracts from eight different crude drugs, including clove extracted by SDE

Medicinal herb (Scientific name)	DPPH radical scavenging activity (IC_{50} , μ g/mL)
<i>Juniperus ridiga</i>	$>20,000^c$
<i>Saussurea lappa</i>	$>20,000^c$
<i>Cnidium officinale</i>	$>20,000^c$
<i>Angelica gigas</i>	$>20,000^c$
<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.	8.85 ± 0.01^a
<i>Angelica tenuissima</i>	$1,250.5 \pm 5.2^b$
<i>Mentha arvensis</i> L.	$>20,000^c$
<i>Artemisia asiatica</i>	$>20,000^c$

Values are mean \pm SD of triplicate analyses.

Values with different superscript letters (a-c) are significantly different at $p < 0.05$.

IC_{50} represents the concentration of a compound required for 50% inhibition of DPPH radicals.

Table 2. Inhibitory effects of volatile extracts from eight different crude drugs, including clove extracted by SDE against COX-2 and 15-LOX

Medicinal herb (Scientific name)	COX-2 inhibition (%) ¹⁾	15-LOX inhibition (%)
<i>Juniperus ridiga</i>	50.05 ± 1.82^c	59.00 ± 17.17^c
<i>Saussurea lappa</i>	55.52 ± 2.41^b	59.83 ± 14.68^c
<i>Cnidium officinale</i>	16.43 ± 7.41^d	37.12 ± 5.26^d
<i>Angelica gigas</i>	70.57 ± 2.01^a	64.27 ± 0.83^b
<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.	58.15 ± 0.23^b	86.15 ± 0.01^a
<i>Angelica tenuissima</i>	56.29 ± 3.04^b	66.48 ± 2.49^b
<i>Mentha arvensis</i> L.	48.67 ± 3.09^c	32.41 ± 1.66^d
<i>Artemisia asiatica</i>	59.92 ± 1.58^b	16.34 ± 1.11^e

Values are mean \pm SD of triplicate determination.

Values with different superscript letters (a-e) within a column are significantly different at $p < 0.05$.

¹⁾The concentrations of eight different medicinal herbs used for determination of activity of COX-2 and 15-LOX were 10 and 25 μ g/mL, respectively.

저해활성을 나타내었지만, 8가지 생약 중 가장 높은 15-LOX 저해활성을 나타내었을 뿐만 아니라 당귀 다음으로 높은 COX-2 저해활성을 나타내었다. 따라서 정향의 휘발성 증류추출액에는 염증 유발 관련 효소의 활성을 저해하는 특성의 생리활성물질이 존재할 것으로 생각되며, 이에 그 주된 휘발성 성분을 추적하였다.

정향의 휘발성 향기성분 분석

앞서 보는 바와 같이 항산화 및 항염증활성이 우수한 정향 증류추출액의 휘발성 향기성분을 확인하기 위해 SDE법으로 추출한 후 GC-MS로 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 먼저, eugenol(peak 1, M.W.=164.20), *trans*-caryophyllene(peak 2, M.W.=204.35) 및 acetyl eugenol(peak 3, M.W.=206.24)을 확인하였으며 이들 향기성분 중 eugenol이 정향의 가장 주된 휘발성 향기성분임을 확인하였다. 이들 향기성분 중 eugenol은 MS spectrum 상에서 분자이온 피크(164 m/z)와 fragment 이온[149(MW-CH₃), 131(149-H₂O), 121, 103, 91, 77 m/z]의 분열양상으로 보아 확인할 수 있었으며, 아울러

acetyl eugenol의 분자이온 피크(206 m/z)와 분열된 fragment 이온[164(MW-CH₃CO), 149, 131, 121, 103, 91, 77 m/z] 피크로부터 동일하게 확인할 수 있었다. 또한, 각 화합물의 peak를 library searching한 결과 matching quality가 전부 98% 이상을 나타내어 각 향기성분을 확인할 수 있었다. 이와 같이 정향 증류추출액의 주된 향기성분은 eugenol 및 acetyl eugenol임을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 eugenol, acetyl eugenol, caryophyllene 및 *a*-humulone 등이 정향의 주된 향기성분임을 보고한 Park 등(27)의 연구결과와 유사하였다.

두 가지 eugenol 유도체의 합성 및 화학구조 동정

정향의 주된 휘발성향기성분인 eugenol과 그 유도체간의 항산화 및 항염증 활성을 비교하기 위해 Fig. 2와 같이 eugenol로부터 methyl eugenol 및 acetyl eugenol을 각각 합성하였으며, 합성한 eugenol 유도체의 화학구조는 Fig. 3 및 Fig. 4와 같이 ¹H- 및 ¹³C-NMR spectra를 통해 확인하였다. 먼저, methyl eugenol의 경우 ¹H-NMR spectrum에서 3개의 벤젠고리 proton(δ6.7~δ6.8 ppm)과 δ6.0, 5.0, 3.3 ppm

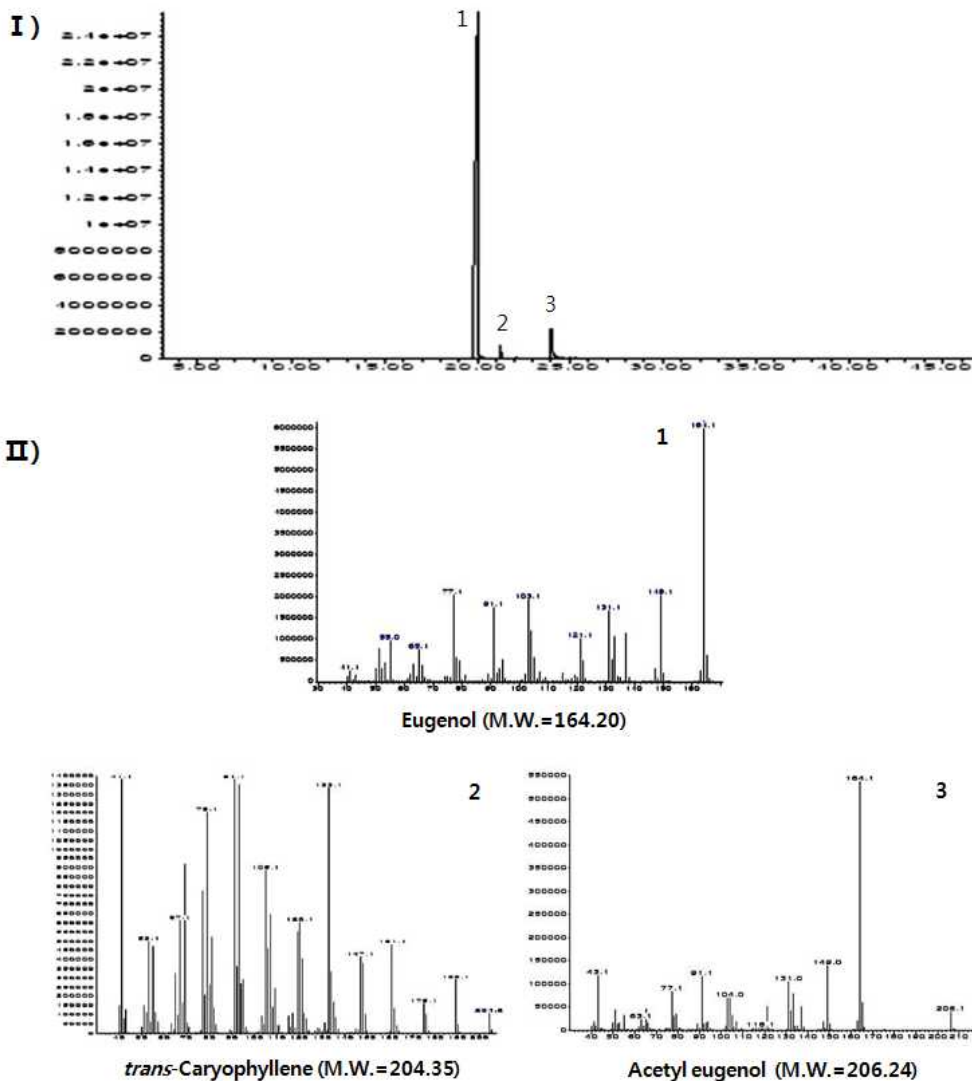


Fig. 1. GC chromatograms (I) and mass spectra (II) of the volatile components of clove extracted by SDE.

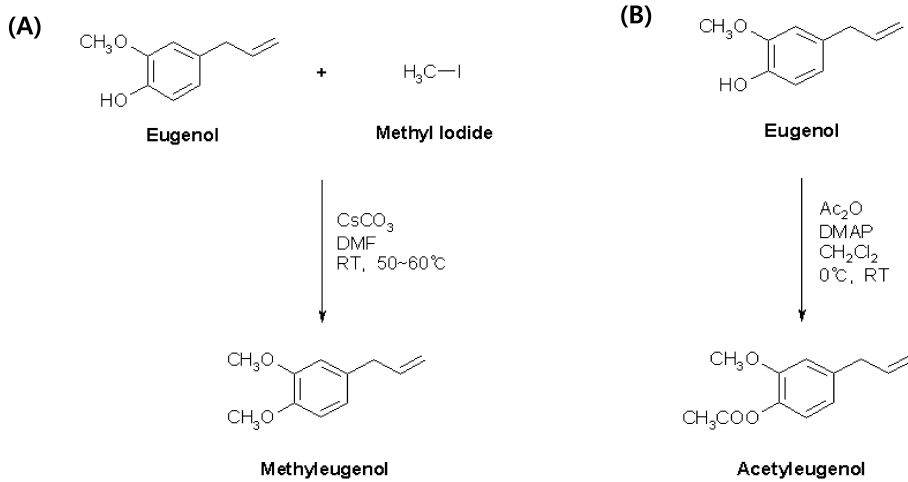


Fig. 2. Schematic procedure for synthesis of methyl eugenol (A) and acetyl eugenol (B) from eugenol.

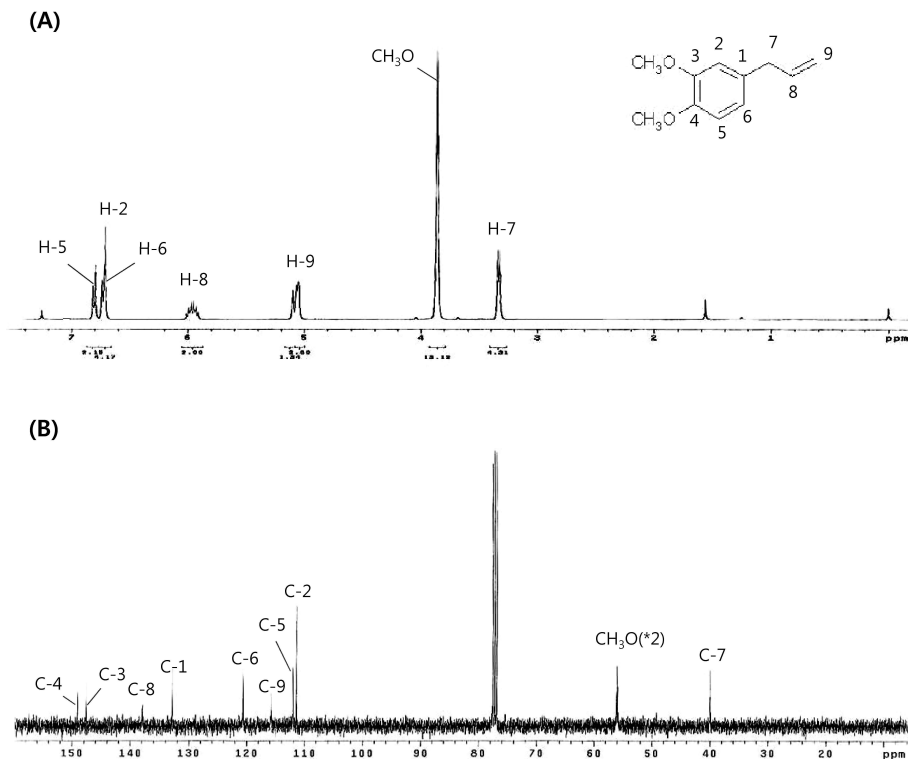


Fig. 3. ^1H - (A) & ^{13}C -NMR (B) spectra of methyl eugenol synthesized from eugenol.

에서의 propylene기, 그리고 δ 3.9 ppm에서 2개의 methoxyl기를 각각 확인하였다. 다음, ^{13}C -NMR spectrum 상에서 δ 148 ppm 부근에서 2개의 methoxyl기 치환 벤젠고리를, δ 111~120 ppm에서 벤젠기를, δ 137, 132 및 40 ppm 부근에서 aliphatic hydrocarbon group 치환 벤젠고리와 δ 56 ppm에서 2개의 methoxyl기를 각각 확인하였다. 이와 같은 ^1H - 및 ^{13}C -NMR spectra 결과로부터 본 화합물은 methyl eugenol임을 확인할 수 있었다.

한편, 합성한 acetyl eugenol를 확인하기 위해 먼저 ^1H -NMR spectrum을 측정된 결과, δ 2.3 ppm에서 1개의 acetyl기를 확인하였고 그 외 것은 앞의 methyl eugenol과 유사하였다. 다음으로 ^{13}C -NMR spectrum에서도 δ 20 ppm에서 1

개의 acetyl기 이외 모두 앞서 methyl eugenol과 유사하여 본 화합물은 acetyl eugenol임을 확인할 수 있었다.

Eugenol 및 그 유도체의 항산화활성

Eugenol 및 그 유도체의 항산화활성을 비교하기 위해 DPPH radical 소거활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 3가지 화합물 중 eugenol(IC_{50} =5.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$)은 천연항산화제로 잘 알려진 α -tocopherol(IC_{50} =12.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에 비해 약 2배 정도 높은 항산화활성을 나타내었으며, 반면, L-ascorbic acid(IC_{50} =4.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)보다는 다소 낮은 항산화활성을 나타내었다. 한편, eugenol 유도체인 methyl eugenol 및 acetyl eugenol은 DPPH radical 소거활성이 거의 나타나지 않았

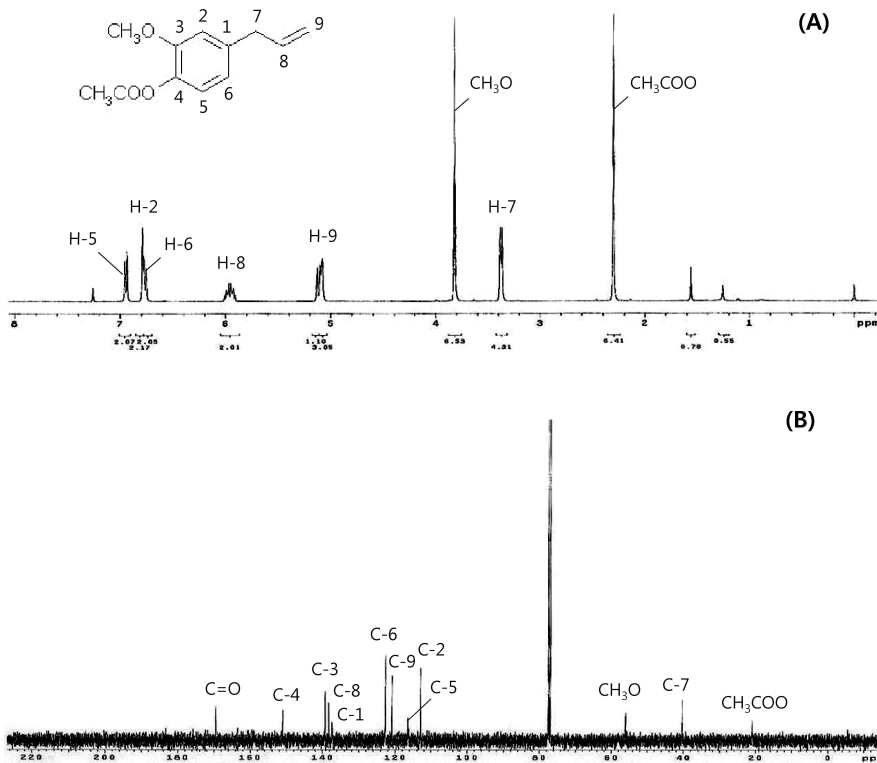


Fig. 4. ¹H- (A) & ¹³C-NMR (B) spectra of acetyl eugenol synthesized from eugenol.

Table 3. DPPH radical scavenging activity of eugenol and its derivatives

Compound	DPPH radical scavenging activity (IC ₅₀ , µg/mL)
Eugenol	5.99 ± 0.19 ^b
Methyl eugenol	>100
Acetyl eugenol	>100
L-Ascorbic acid	4.05 ± 0.01 ^c
α-Tocopherol	12.32 ± 0.33 ^a

Values are mean ± SD of triplicate determination. Values with different superscript letters (a-c) are significantly different at p < 0.05. IC₅₀ represents the concentration of a compound required for 50% inhibition of DPPH radical. L-Ascorbic acid and α-tocopherol were used as positive references.

데 이는 -NH, -OH 및 -SH group을 가지는 화합물이 강한 hydrogen donator 및 radical scavenger로서 작용한다는 Brand-Williams(28)의 연구결과로 미루어 보아, radical scavenger로 작용하는 OH group이 methoxyl 및 acetyl group으로 전환됨에 따라 DPPH 라디칼 소거활성이 소실된 것으로 사료된다. Eugenol은 화장품 및 식품의 방향제로 널리 사용하고 있는 천연항산화성분으로서 지질과산화반응을 효과적으로 억제할 뿐만 아니라 간 독성을 완화해주는 생리활성물질로 알려져 있다(29,30). 그러나 높은 농도에서는 산화촉진제로서 작용할 수 있으며, 아울러 세포독성을 나타낼 수 있기에(31,32) 이를 개선할 수 있는 methyl- 및 acetyl-eugenol의 역할이 기대된다.

Table 4. Inhibitory effects of eugenol and its derivatives against COX-2 and 15-LOX

Compound	Concentration (µg/mL)	COX-2 inhibition (%)	15-LOX inhibition (%)
Eugenol		85.35 ± 0.58 ^b	79.48 ± 3.07 ^b
Methyl eugenol	20	81.23 ± 2.56 ^{bc}	83.29 ± 3.92 ^b
Acetyl eugenol		76.85 ± 2.17 ^c	69.15 ± 4.17 ^c
Indomethacin	5	87.92 ± 1.05 ^a	—
NDGA		—	87.66 ± 0.50 ^a

Values are mean ± SD of triplicate determination. Values with different superscript letters (a-c) within a column are significantly different at p < 0.05. Indomethacin and NDGA were used as positive references.

Eugenol 및 그 유도체의 항염증 효과

Eugenol 및 그 유도체의 항염증 효과를 알아보기 위해 COX-2 및 15-LOX 저해활성을 측정된 결과는 Table 4와 같다. 3가지 화합물 중 COX-2 저해활성은 20 µg/mL 농도에서 eugenol(85.35%) > methyl eugenol(81.23%) > acetyl eugenol(76.86%) 순으로, eugenol이 가장 높은 저해활성을 나타내었다. 여기서 eugenol은 COX-2 저해물질로 잘 알려진 indomethacin(5 µg/mL, 87.92%)과 비교하였을 때 다소 낮은 활성을 나타내었다. 한편, eugenol 및 그 유도체의 15-LOX 저해활성은 20 µg/mL 농도에서 methyl eugenol(83.29%) > eugenol(79.43%) > acetyl eugenol(69.15%) 순으로 COX-2와 달리 methyl eugenol이 3가지 eugenol 유도체 중 가장 높은 15-LOX 저해활성을 나타내었다. 이러한 결과를 통해 eugenol 뿐만 아니라 그 유도체는 비록 COX-2 저해

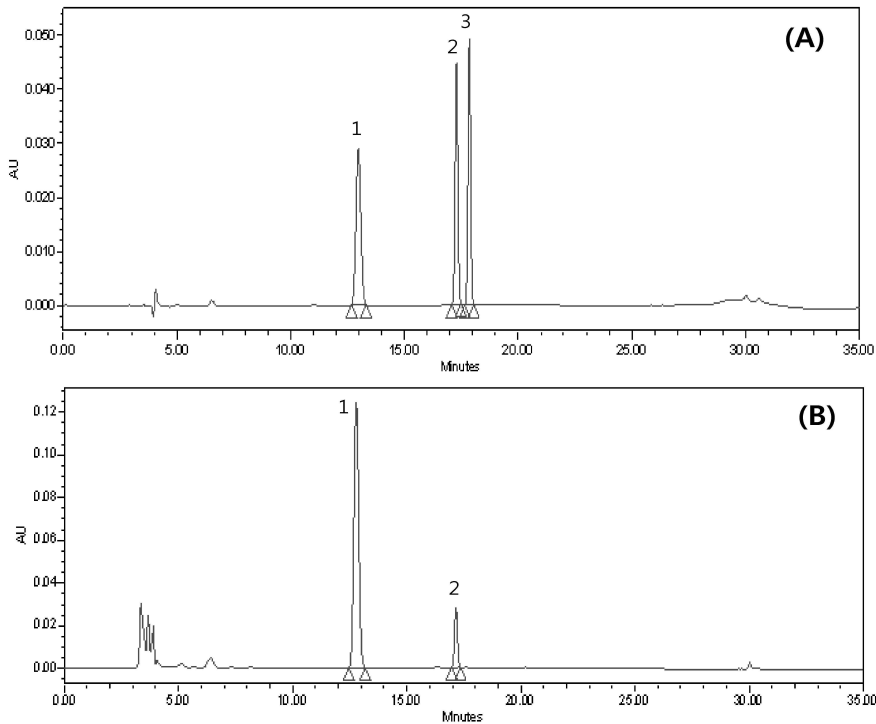


Fig. 5. HPLC chromatograms of three eugenol standards (A) and ethanol extract (B) of *Eugenia caryophyllata* Thunb. 1: eugenol, 2: acetyl eugenol, 3: methyl eugenol.

물질인 indomethacin과 15-LOX 저해물질인 NDGA에 비해서는 낮은 저해활성을 나타내었지만 항염증작용이 있음을 알 수 있었다. Eugenol은 염증 유발 효소 COX-2 저해제로서 뿐만 아니라 염증 유발 인자 TNF- α 및 NF- κ B 저해제로서 작용하는 항염증물질로 알려져 있으나 아직까지 eugenol 유도체인 methyl- 및 acetyl-eugenol의 항염증활성에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다(33-35). 본 연구에서 methyl eugenol은 eugenol보다 알레르기 유발 15-LOX 억제 효과가 우수하였으며, 최근 An 등(36)은 페놀기의 hydroxyl기가 methyl 또는 acetyl기로 전환되면 세포막에 대한 투과성이 증가되어 실제 세포에서는 생리활성이 증가될 수 있음을 보고한 바가 있다. 따라서 eugenol 뿐만 아니라 methyl 또는 acetyl eugenol은 화학합성 염증치료제를 보완할 수 있는 천연 유래의 염증억제물질로서 기능성식품, 화장품 및 의약품 소재로서 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

정향의 eugenol 및 그 유도체의 함량

정향 에탄올추출물의 eugenol 및 그 유도체의 정량을 위한 3가지 표준물질 및 정향 에탄올추출물의 HPLC 크로마토

그램은 Fig. 5와 같으며, 이로부터 정향의 eugenol 및 그 유도체의 함량을 측정된 결과는 Table 5와 같다. 정향 에탄올추출물에는 eugenol 및 acetyl eugenol은 존재하였으나 methyl eugenol은 확인할 수 없었다. Eugenol 및 acetyl eugenol의 함량을 보면, 건물당 각각 6.95% 및 1.85%이었으며, 이는 정향 메탄올추출물에서 eugenol 함량이 6.1%이라는 Dong 등(37)의 연구결과와 유사하였다.

요 약

본 연구는 한방스킨의 원료로 널리 사용되고 있는 8가지 생약의 휘발성증류추출액 중 항산화 및 항염증활성이 가장 강한 정향의 증류추출액으로부터 주된 향기성분을 SDE법으로 추출한 후 GC-MS로 확인하였으며, 주된 향기성분인 eugenol과 그 유도체를 합성한 후 항산화 및 항염증활성을 측정하고 비교하였으며, 아울러 HPLC를 이용하여 정향의 eugenol 및 그 유도체를 정량분석 하였다. 8가지 생약의 휘발성증류추출액 중 정향의 증류추출액이 가장 강한 항산화 활성(IC_{50} =8.85 μ g/mL) 및 COX-2 저해활성(10 μ g/mL 농도에서 저해율은 58.15%)을 나타내었으며, 반면 15-LOX 저해활성(25 μ g/mL 농도에서 저해율은 86.15%)은 당귀 다음으로 가장 높았다. 정향 증류추출액의 휘발성 향기성분을 SDE법으로 추출한 후 GC-MS를 이용하여 분석한 결과, eugenol, *trans*-caryophyllene 및 acetyl eugenol을 확인하였다. 한편, eugenol 및 그 유도체(methyl eugenol 및 acetyl eugenol)의 항산화 및 항염증 활성을 측정된 결과, eugenol(IC_{50} =5.99 μ g/mL)이 가장 높은 항산화활성을 나타낸 반면, methyl eugenol

Table 5. Contents of eugenol and its derivatives in *Eugenia caryophyllata* Thunb.

Medicinal herb	Content (% , dry weight)		
	Eugenol	Methyl eugenol	Acetyl eugenol
<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.	6.95 \pm 0.05	ND ¹⁾	1.85 \pm 0.02

Values are mean \pm SD of triplicate analyses.

¹⁾ND: not detected.

및 acetyl eugenol은 거의 활성을 나타내지 않았다. COX-2의 경우 20 µg/mL 농도에서 eugenol(85.35%)이 가장 강한 저해활성을 나타낸 반면, 15-LOX는 20 µg/mL 농도에서 methyl eugenol(83.29%)이 가장 높은 저해활성을 나타내었다. 정향 에탄올추출물의 eugenol 및 유도체의 함량을 HPLC로 분석한 결과, eugenol 및 acetyl eugenol이 각각 6.95%, 1.85% 함유되어 있었으며 methyl eugenol은 검출되지 않았다. 이와 같이 정향 유래의 eugenol 및 그 유도체는 안전성이 문제시되고 있는 합성항산화제 및 항염증제를 대체할 수 있는 천연 유래의 항산화 및 항염증물질로서 잠재적 가치가 있어 향후 기능성식품, 화장품 및 의약품 소재로 널리 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 중소기업청의 산학협력실 지원사업의 연구 사업비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- Halliwell B, Gutteridge J. 1996. Free radicals, ageing, and disease. In *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, London, UK. p 416-423.
- Emerit J, Chaudiere J. 2008. Free radicals and lipid peroxidation in cell pathology. In *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*. Miquel J, Quintanilha A, Weber H, eds. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Vol 1, p 177-185.
- Nakatani N. 1990. Recent advances in the study on natural antioxidants. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 37: 569-576.
- Giese J. 1996. Antioxidants: Tools for preventing lipid oxidation. *Food Tech* 11: 73-79.
- Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc* 52: 59-64.
- Ito N, Fukushima S, Fukushima H. 1985. Carcinogenicity and modification of the carcinogenicity response by BHA and BHT, and other antioxidants. *CRC Crit Rev Food Technol* 15: 109-111.
- Liao JF, Chiou WF, Shen YC, Wang GJ, Chen CF. 2011. Anti-inflammatory and anti-infectious effects of *Evodia rutaecarpa* (Wuzhuyu) and its major bioactive components. *Chinese Med* 6: 1-8.
- Hoshino T, Tabuchi K, Hara A. 2010. Effects of NSAIDs on the inner ear: possible involvement in cochlear protection. *Pharmaceuticals* 3: 1286-1295.
- Rimon G, Sidhu R, Lauver D, Lee J, Sharma N, Yuan C, Frieler R, Trievel R, Lucchesi B, Smith W. 2010. Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. *PNAS* 107: 28-33.
- Anderson GD, Keys KL, Ciechi PAD, Masferrer JL. 2009. Combination therapies that inhibit cyclooxygenase-2 and leukotriene synthesis prevent disease in murine collagen induced arthritis. *Inflamm Res* 58: 109-117.
- Dogne JM, Hanson J, Supuran C, Pratico D. 2006. Coxibs and cardiovascular side-effects: from light to shadow. *Curr Pharm Des* 12: 917-975.
- Makins R, Ballinger A. 2003. Gastrointestinal side effects of drugs. *Expert Opin Drug Saf* 2: 421-429.
- Wuik, CS, Moon YH, Lee GJ. 1994. *Hankookbonchohak*. Hyungseoul Publishing Co., Seoul, Korea. p 304.
- Dong S, Moon JS, Rhee SK, Son JY. 2004. Antioxidant activities of clove by extraction solvent. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 609-613.
- Lee OH, Jung SH, Son JY. 2004. Antimicrobial activity of clove extract by extraction solvents. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 494-499.
- Kang SY, Kim TG, Park MS, Han HM, Jung KK, Kang JH, Moon AR, Kim SH. 1999. Inhibitory effects of *Eugenia caryophyllata*, *Ephedra sinica* and *Cinnamomum cassia* on the replication of HBV in HepG2 cells. *J Appl Pharmacol* 7: 133-137.
- Singh AK, Dhamanigi SS, Asad M. 2009. Anti-stress activity of hydroalcoholic extract of *Eugenia caryophyllus* buds (clove). *Indian J Pharmacol* 41: 28-31.
- Ito M, Murakami K, Yoshino M. 2005. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. *Food Chem Toxicol* 43: 461-466.
- Öztürk A, Özbek H. 2005. The anti-inflammatory activity of eugenia caryophyllata essential oil: an animal model of anti-inflammatory activity. *Eur J Gen Med* 2: 159-163.
- Kaur G, Athar M, Alam M. 2010. Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. *Mol Carcinog* 49: 290-301.
- Wang C, Zhang J, Chen J, Fan Y, Shi Z. 2010. Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. *Trop Plant Pathol* 35: 137-143.
- Kim SH, Shin TY, Kim HY, Lee YM, Lee EH, Shin BK, Kim YC, An NH, Kim HM. 1996. Inhibition of immediate allergic reaction by eugenol. *Yakhak Hoeji* 40: 679-683.
- Schultz TH, Flath RA, Mon TR, Egging SB, Teranishi R. 1977. Isolation of volatile components from a model system. *J Agric Food Chem* 25: 446-449.
- Sehagen ES, Abbrahansom F, McLafferty W. 1974. The Wiley/NBS registry of mass spectral data. John Wiley and Sons, Ithaca, NY, USA. p 135
- Tagashira M, Ohtake Y. 1988. A new antioxidative 1,3-benzo-dioxole from *Melisa officinalis*. *Planta Med* 64: 555-558.
- Lee KG, Takayuki S. 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aomaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chem* 74: 443-448.
- Park MK, Park JH, Shin YG, Shin YK, Kim HH. 1997. Chemical constituents of *Eugenia caryophyllata*. *Yakhak Hoeji* 41: 149-152.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 28: 25-30.
- Masahiro O, Midori H, Shiro U, Toyoshige E. 2000. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chem Pharm Bull* 48: 1467-1469.
- Baskaran Y, Periyasamy V, Venkatraman AC. 2010. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology* 268: 204-212.
- Fujisawa S, Atsumi T, Kadoma Y, Sakagami H. 2002. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology* 177: 39-54.
- Park HJ. 2006. Toxicological studies on the essential oil of *Eugenia caryophyllata* Buds. *Natural Product Sci* 12: 94-

- 100.
33. Murakami Y, Shoji M, Hanazawa S, Tanaka S, Fujisawa S. 2003. Preventive effect of *bis*-eugenol, a eugenol *ortho* dimer, on lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and inflammatory cytokine expression in macrophages. *Biochem Pharmacol* 66: 1061-1066.
34. Murakami Y, Shoji M, Hirata A, Tanaka S, Yokoe I, Fujisawa S. 2005. Dehydrodiisoeugenol, an isoeugenol dimer, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nuclear factor kappa B activation and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Arch Biochem Biophys* 434: 326-332.
35. Magalhaes CB, Riva DR, Depaula LJ, Brando-Lima A, Koatz VLG, Leal-Cardoso JH, Zin WA, Faffe DS. 2010. In vivo anti-inflammatory action of eugenol on lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Appl Physiol* 108: 845-851.
36. An SM, Lee SI, Choi SW, Moon SW, Boo YC. 2008. *p*-Coumaric acid, a constituent of *Sasa quepaertensis* Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by α -melanocyte stimulating hormone. *Brit J Dermatol* 159: 292-299.
37. Dong S, Jung SH, Moon JS, Rhee SK, Son JY. 2004. Antioxidant activities of clove by extraction solvent. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 609-613.

(2011년 6월 16일 접수; 2011년 8월 31일 채택)