생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
45(2) : 93 ~ 100 (2014)

산겨릅나무로부터 페놀화합물의 분리 및 항염증 활성의 측정

송나영 · 이광진 · 마진열*
한국한의학연구원 한의신약개발그룹

Isolation and Identification of Phenol Compounds from *Acer tegmentosum* and their Anti-inflammatory Activity

Na-Young Song, Kwang Jin Lee and Jin Yeul Ma*
KM-Based Herbal Drug Development Group, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

Abstract – The *Acer tegmentosum* (3 kg) were extracted with boiled water and the freeze dried extract powder was partitioned with CH_2Cl_2, EtOAc, *n*-BuOH and H_2O, successively. From the EtOAc and *n*-BuOH fraction, six phenolic compounds were isolated through the silica gel, octadecyl silica gel and sephadex LH-20 column chromatography. On the basis of spectroscopic methods, such as ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR, and LC/MS, the chemical structures of the compounds as feniculin (**1**), avicularin (**2**), (+)-catechin (**3**), (-)-epicatechin (**4**), salidroside (**5**) and 6'-*O*-galloylsalidroside (**6**). In this study, compounds **1** and **2** have been first isolated from the *A. tegmentosum*. To provide insight into the effects of six compounds isolated from *A. tegmentosum* on inflammation, we investigated its effect on nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells using lipopolysaccharide (LPS) stimulation. Compounds **1** and **6** slightly repressed NO production. Also, compounds **3** and **4** inhibited NO secretion with statistical significance. However, compounds **2** and **5** did not show any inhibitory effect on NO production.

Key words – *Acer tegmentosum*, Anti-inflammation, Avicularin, Feniculin, Isolation, NMR

산겨릅나무(*Acer tegmentosum*)는 단풍나무과(Aceraceae)에 속하며 낙엽활엽소교목으로 원산지는 한국이다. 높이는 10 m안팎이며, 수피는 회록색으로 검은 줄무늬가 있다. 잎은 대생하며 3~5개로 얕게 갈라지고, 꽃은 5월경에 황색의 총상화서로 나며, 열매는 9월에 황갈색으로 익는다.[1,2] 민간에서는 벌나무 또는 산청목이라 불리며, 간암, 간경화, 간위, 백혈병 등 간에 관련된 질병에 탁월한 효과가 있다고 보고되었다.[3] 또한 본초에서는 청해척이라 하여 종기와 외상출혈 치료에 사용되고 있다.[4]

산겨릅나무에서 분리된 성분으로는 β-sitosterol, β-sitosterol-3-*O*-β-D-glucoside, epifriedelinol과 같은 steroid와 terpenoid,[5] salidroside, tyrosol, 6'-*O*-galloylsalidroside, quercetin, isoquercetin, morin-3-*O*-α-L-lyxoside, fraxin, cleomiscosin A, scopoletin과 (+)-catechin, (-)-epicatechin 등과 같은 phenol 화합물이 있다.[6-8] 또한 산겨릅나무 추출물은 항산화 활성, 항지질과산화 활성, 항미생물 활성이 우수하고,[9] 주성분인 salidroside는 위의 손상과 통증을 억제하는 활성이 보고되었다.[10]

본 연구는 산겨릅나무로부터 보고되지 않은 화합물을 분리하기 위하여 dichloromethane(CH_2Cl_2)과 ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol(*n*-BuOH), H_2O의 용매로 계통분획을 실시하였다. 그 결과 EtOAc 분획물에서 feniculin, avicularin, (+)-catechin, (-)-epicatechin, 6'-*O*-galloylsalidroside과 *n*-BuOH 분획물에서 salidroside를 분리하였다. 이때 feniculin과 avicularin은 산겨릅나무에서 처음 분리된 화합물로 확인되었다. 또한 고순도의 6종의 화합물에 대하여 항염증 활성인 RAW 264.7 대식세포에 대하여 세포 독성을 확인하였고, 산화질소 생성에 대한 억제효과를 측정하여 탐색하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용한 산겨릅나무 시료는 2012년 7월 대창약업사로부터 구입하였으며, 표본시료는 한국한의학연구원 한의신약개발그룹에서 보관되어 사용되었다(구입한 시료는 충남대학교 약학대학 배기환 명예교수의 감별에 의하여 관리되었다).

*교신저자(E-mail) : jyma@kiom.re.kr
(Tel) : +82-42-868-9466

시약 및 기기 – Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(Merck, Germany)을 사용하였고, Octadecylsilane(ODS)은 LiChroprep RP-18(Merck)을 사용하였으며 Sephadex LH-20(Fluka, USA)을 사용하였다. Thin layer chromatography(TLC)는 Kiesel gel 60 F_{254} (Merck)와 RP-18 F_{254S}(Merck)를 사용하였다. NMR spectrum은 Varian Inova 400NB(Varian, USA)와 Varian Inova 600(Varian)으로 측정하였고, LC-MS는 Agilent LC-ESI-MSD 1100+ G1958(Agilent, USA)을 사용하였다. 시료의 추출과 분획에 사용한 CH_2Cl_2와 EtOAc, *n*-BuOH 용매는 대정화학주식회사에서 생산한 1급 시약을 사용하였으며, LC-MS 분석에 사용된 acetonitrile(J.T. Baker, USA)은 HPLC급 용매(99.9%)로 사용하였고, trifluoroacetic acid(TFA, Sigma-Aldrich, USA)은 분석급 시약을 사용하였다. 물은 초순수제조장치(Milipore, USA)를 이용하여 제조한 3차 증류수를 사용하였다.

세포주 배양에 필요한 RPMI 1640 배지, fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin(P/S), phosphate buffered saline(PBS)는 Lonza(Basel, Switzerland)에서 구입하였다. Lipopolysaccharide(LPS), bovine serum albumin(BSA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylthiazolium bromide (MTT)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다

추출 및 분획 – 산겨릅나무 3 kg을 증류수 30 L에 담가 105°C에서 3시간 열수 추출하여 standard testing sieves (150 μm, Retsch, Germany)로 여과하여 추출물 101.6 g을 얻었다. 그 중 20 g을 H_2O(600 mL)와 dichloromethane (CH_2Cl_2, 600 mL×3)으로 분배 추출하였고, H_2O 분획은 다시 ethyl acetate(EtOAc, 600 mL×4)로 분배 추출한 뒤 *n*-butanol(*n*-BuOH, 600 mL×4)로 분배 추출하였다. 각 분획물을 감압 농축하여 CH_2Cl_2 분획(420.8 mg), EtOAc 분획(1.24 g), *n*-BuOH 분획(4.18 g), H_2O 분획(13.51 g)을 얻었다.

화합물의 분리 – 산겨릅나무 EtOAc 분획(1.24 g)중 1.22 g으로부터 silica gel column chromatography(c.c.)[ϕ 4×10 cm, chloroform($CHCl_3$)-MeOH-H_2O = 15:3:1(1.2 L) 13:3:1(1.3 L) →10:3:1(1.2 L)→7:3:1(1 L)→4:3:1(1 L)→MeOH]를 실시하여 12개의 분획물(OS1E-1~OS1E-12)을 얻었다. 이 중 OS1E-6(55.5 mg) 분획을 Sephadex LH-20 c.c.[ϕ 1.5×45 cm, 50% MeOH(180 mL)→70% MeOH(300 mL)→100% MeOH]를 진행하여 7개의 분획(OS1E-6-1~OS1E-6-7)을 얻었으며 화합물 **1**(OS1E-6-2, 6.0 mg)과 화합물 **2**(OS1E-6-4, 5.9 mg)를 분리하였다. OS1E-7(260.3 mg) 분획에 대하여 Sephadex LH-20 c.c.[ϕ 1.5×44 cm, 80% MeOH(400 mL)→100% MeOH]를 실시하여 10개의 분획물(OS1E-7-1~OS1E-7-1-10)로 나누었고, 이 중 OS1E-7-6(53.1 mg)을 ODS c.c.[ϕ 1.5×8 cm, MeOH-H_2O = 1:6(900 mL) MeOH]를 진행하여 총 6개의 분획(OS1E-7-6-1~OS1E-7-6-6)을 얻었으며 화합물 **3**(OS1E-7-6-2, 30.7 mg)과 화합물 **4**(OS1E-7-6-4, 14.2 mg)을 분리하였다. OS1E-9(237.5 mg)을 ODS c.c.[ϕ 2.5×8 cm, MeOH-H_2O = 1:3(450 mL)→1:2(300 mL)→1:1(300 mL)→MeOH]를 수행하여 13개의 분획물(OS1E-9-1~OS1E-9-13)로 나누었으며 OS1E-9-3(77.8 mg)에 대하여 silica gel c.c.[ϕ 1.5×10 cm, $CHCl_3$-MeOH-H_2O=7:3:1(350 mL)→MeOH]를 진행하여 4개의 분획물(OS1E-9-3-1~OS1E-9-3-4)로 나누었으며, 화합물 **6**(OS1E-9-3-2, 60.3 mg)을 분리하였다. 산겨릅나무 *n*-BuOH분획(4.18 g)에 대하여 silica gel c.c.[ϕ 4×11 cm, $CHCl_3$-MeOH-H_2O = 10:3:1(2.2 L)→7:3:1(1.6 L)→4:3:1 (1.4 L)→MeOH]를 진행하여 10개의 분획물(OS1B-1~OS1B-10)을 얻었고 화합물 **5**(OS1B-3, 1.34 g)을 분리하였다.

화합물 1(feniculin) – yellow amorphous powder (MeOH); ESI-MS m/z 435.1 $[M+H]^+$; ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD, δ_H) 7.73 (1H, d, *J*=1.6 Hz, H-2'), 7.55 (1H, dd, *J*=8.4, 1.6 Hz, H-6'), 6.88 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.39 (1H, d, *J*=1.6 Hz, H-8), 6.19 (1H, d, *J*=1.6 Hz, H-6), 5.16 (1H, d, *J*=6.0 Hz, H-1''), 3.89 (1H, dd, *J*=8.0, 6.0 Hz, H-2''), 3.82 (1H, H-5''a), 3.80 (1H, m, H-4''), 3.64 (1H, dd, *J*=8.0, 2.8 Hz, H-3''), 3.44 (1H, dd, *J*=13.2, 3.2 Hz, H-5''b); ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD, δ_C): Table 1.

화합물 2(avicularin) – yellow amorphous powder (MeOH); ESI-MS m/z 435.1 $[M+H]^+$; ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD, δ_H) 7.52 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-2'), 7.49 (1H, dd, *J*=8.4, 1.8 Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.38 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-8), 6.20 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-6), 5.46 (1H, s, H-1''), 4.32 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-2''), 3.89 (1H, dd, *J*=4.8, 2.4 Hz, H-3''), 3.86 (1H, m, H-4''), 3.49 (2H, t, *J*=4.2, H-5''); ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD, δ_C): Table 1.

화합물 3[(+)-catechin] – brown powder (MeOH); ESI-MS m/z 291.0 $[M+H]^+$; ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD, δ_H) 6.83 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-2'), 6.76 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 6.71 (1H, dd, *J*=8.4, 2.4 Hz, H-6'), 5.92 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-6), 5.85 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-8), 4.56 (1H, d, *J*=7.2 Hz, H-2), 3.97 (1H, m, H-3), 2.50 (1H, dd, *J*=16.2, 8.4 Hz, H-4a), 2.84 (1H, dd, *J*=16.2, 6.0 Hz, H-4b); ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD, δ_C): Table 1.

화합물 4[(-)-epicatechin] – brown powder (MeOH); ESI-MS m/z 291.0 $[M+H]^+$; ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD, δ_H) 6.96 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-2'), 6.79 (1H, dd, *J*=8.4, 1.8 Hz, H-6'), 6.75 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5'), 5.93 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-6), 5.91 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-8), 4.80 (1H, br s, H-2), 4.16 (1H, m, H-3), 2.86 (1H, dd, *J*=16.8, 4.8 Hz, H-4a), 2.73 (1H, dd, *J*=16.8, 3.0 Hz, H-4b); ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD, δ_C): Table 1.

화합물 5(salidroside) – colorless powder (MeOH); ESI-MS m/z 301.1 $[M+H]^+$; ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD, δ_H)

Table 1. ^{13}C-NMR chemical shifts of compounds **1-6** isolated from *Acer tegmentosum*

No. of carbon	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
	CD_3OD 100 MHz	CD_3OD 150 MHz	CD_3OD 150 MHz	CD_3OD 150 MHz	CD_3OD 100 MHz	CD_3OD 150 MHz
1					130.82	130.56
2	158.70	159.44	82.81	79.86	131.03	130.83
3	135.65	135.00	69.78	67.47	116.19	116.08
4	179.48	180.09	28.47	29.25	156.85	156.52
5	163.05	163.19	157.54	157.66	116.19	116.08
6	99.88	99.95	96.28	96.38	131.03	130.83
7	166.07	166.25	157.78	157.98	36.43	36.33
8	94.70	94.84	95.50	95.88	72.16	72.20
9	158.43	158.69	156.88	157.35		
10	105.63	105.69	100.81	100.06		
1'	122.89	123.09	132.19	132.28		
2'	117.45	116.54	115.23	115.88		
3'	145.95	146.47	146.19	145.76		
4'	149.96	149.96	146.21	145.92		
5'	116.17	116.54	116.08	115.31		
6'	123.03	123.20	120.03	119.38		
sugar-1"	104.63	109.59			104.42	104.39
2"	72.87	83.41			75.17	74.99
3"	74.13	78.76			77.99	77.84
4"	69.11	88.10			71.69	71.67
5"	66.94	62.64			78.15	75.34
6"					62.81	64.70
galloyl-1'''						121.37
2'''						110.16
3'''						146.44
4'''						139.78
5'''						146.44
6'''						110.16
-COO-						168.31

7.08 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-2, 6), 6.71 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-3, 5), 4.31 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-1"), 4.07 (1H, H-6"a), 3.88 (1H, dd, *J*=12.4, 2.0 Hz, H-6"b), 3.73 (H-3"), 3.67 (H-4"), 3.36 (H-2"), 3.28 (H-5"), 3.21 (2H, t, *J*=8.4 Hz, H-8), 2.86 (2H, t, *J*=8.4 Hz, H-7); ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD, δ_C): Table 1.

화합물 6(6′-*O*-galloylsalidroside) – pale yellow oil (MeOH); ESI-MS m/z 453.1 $[M+H]^+$; ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD, δ_H) 7.10 (2H, br s, H-2''', 6'''), 6.96 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-2, 6), 6.65 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-3, 5), 6.65 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5), 4.52 (1H, dd, *J*=11.4, 2.4 Hz, H-6"a), 4.45 (1H, dd, *J*=11.4, 6.0 Hz, H-6"b), 4.32 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-1"), 3.95 (1H, m, H-8a), 3.70 (1H, m, H-8b), 3.55 (1H, m, H-5"), 3.42 (2H, t, *J*=7.8 Hz, H-3", 4"), 3.22 (1H, t, *J*=8.4 Hz, H-2"), 2.77 (2H, m, H-7); ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD, δ_C): Table 1.

LC-MS 분석 조건 – 산겨릅나무로부터 분리한 6종의 화합물에 대하여 LC-MS 분석을 수행하였고, 각각의 화합물은 MeOH에 녹여 200 ppm의 농도로 사용되었으며, LC-MS의 분석 조건은 Table 2와 같다. 이 조건에서 화합물 **1**의 머무름 시간은 32.6분, 화합물 **2**는 34.0분, 화합물 **3**은 12.1분, 화합물 **4**는 17.7분, 화합물 **5**는 8.0분, 화합물 **6**은 21.3분으

Table 2. LC-MS operating condition

LC-MS system	Agilent LC-ESI-MSD 1100 + G1958
Column	HECTOR-M-C_{18} (100×4.6 mm I.D., 3 μm, RS tech)
Column Temp.	40°C
Mobile phase	0.1% TFA water (A), acetonitrile (B) B Con. : 10-25%(0-35 min), 25-10%(35-37 min), 10%(37-45 min)
Flow rate	0.5 mL/min
Injection vol.	10 μL
Ionization source	API-ES (positive mode)
Fragmentor voltage	70 V
Quadrupole Temp.	99°C
Capillary voltage	3000 V
Nebulizer pressure	35 psig
Drying gas Temp.	350°C
Mass range (m/z)	Scan mode, 200~500

로 확인되었다.

세포 배양과 실험 약물의 처리 – 마우스 유래의 대식세포주(murine macrophage, RAW 264.7)를 사용하였다. RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구매하여 1%의 P/S와 10%의 FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지를 이용하여 배양하였다. 세포는 5% CO_2, 37°C, full humidify의 조건으로 배양하였다. 세포에 실험 약물을 처리하거나 자극원을 처리하기 위하여 배양 배지를 FBS가 첨가되지 않은 신선한 배지로 교체하였고 1시간 배양 후 실험 약물(10, 30, 50, 100 μM)을 처리하였으며 다시 1시간 배양 후 자극원인 LPS(200 ng/mL)를 처리하였다.

MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정 – RAW 264.7 세포를 5×104 cells/well의 농도로 96-well plate에 접종한 후 18시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 6종의 분리된 화합물을 10, 30, 50, 100 μM의 농도로 각각 처리하였다. 37°C 인큐베이터에서 24시간 배양한 후에 MTT 시약을 이용해 세포에 대한 실험 약물의 독성을 확인하기 위해 5 mg/ml 농도의 MTT 시약을 처리하였다. 4시간을 더 배양한 후 배지를 제거하고 각 well 마다 dimethylsulfoxide (DMSO)를 100 μl 첨가하여 형성된 formazane을 녹인 후 ELISA reader(infinite M200, TECAN, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

산화질소 생성의 측정 – 산화질소의 생성은 배양중인 대식세포의 배지에 포함된 아질산염을 측정함으로써 분석하였다. 세포에 실험 약물을 농도별로 처리하고 1시간 배양 후 자극원인 LPS를 처리하였다. 24시간을 배양한 후 상청액을 취하여 동일한 부피의 griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride and 2.5% phosphoric acid)과 혼합하여 상온에서 5분간 배양하였다.[18] 분석은 ELISA reader를 이용해 570 nm의 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

산겨릅나무 3 kg을 증류수 30 L에 담가 열수 추출하여 추출물 101.6 g을 얻었으며, 그 중 20 g에 대하여 용매의 극성에 따라 CH_2Cl_2, EtOAc, *n*-BuOH 및 H_2O로 분배 추출하였다. EtOAc 분획과 *n*-BuOH 분획으로부터 silica gel, ODS 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 반복 진행하여 화합물 **1-6**을 분리하였다. 각 화합물에 대하여 ^{1}H, ^{13}C-NMR을 측정하였고 문헌과 비교 분석하여 feniculin(**1**), avicularin(**2**), (+)-catechin(**3**), (-)-epicatechin(**4**), salidroside (**5**), 6'-*O*-galloylsalidroside(**6**)로 구조동정 하였으며(Fig. 1), 각 화합물에 대하여 분자량을 확인하기 위하여 LC-MS를 측정하였다(Fig. 2).

화합물 **1**과**2**는 ODS TLC 전개 후 10% H_2SO_4로 발색하면 노란색을 나타내어 flavonoid 화합물로 예상하였다. 화합물 **1**의 ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD, δ_H)에서 δ_H 6.39 (1H, d, *J*=1.6 Hz, H-8)와 δ_H 6.19 (1H, d, *J*=1.6 Hz, H-6)의 olefine methine proton signal로부터 1,2,3,5-4 치환 벤젠고리를 확인하였고, δ_H 7.73 (1H, d, *J*=1.6 Hz, H-2')과 δ_H 1.55 (1H, dd, *J*=8.4, 1.6 Hz, H-6'), δ_H 6.88 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-5')에서 관측된 olefine methine proton signal로부터 1,2,4-3 치환 벤젠고리가 존재함을 예상하였다. 산소가 치환된 영역의 δ_H 5.16 (1H, d, *J*=6.0 Hz, H-1")에서 한 개의 hemiacetal proton signal과 다수의 oxygenated methine이 관측되어 한 개의 당이 결합되어 있음을 예상하였다. ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD, δ_C)에서 총 20개의 signal이 관측되었으며, δ_C 179.48에서 ketone carbon signal (C-4)이 하나 관측되었다. 저자장에서 총 14개의 [δ_C 166.07 (C-7), δ_C 163.05 (C-5), δ_C 158.70 (C-2), δ_C 158.43 (C-9), δ_C 149.96 (C-4'), δ_C 145.98 (C-3'), δ_C 135.65 (C-3), δ_C 123.03 (C-6'), δ_C 122.89 (C-1'), δ_C 117.45 (C-2'), δ_C 116.17 (C-5'), δ_C

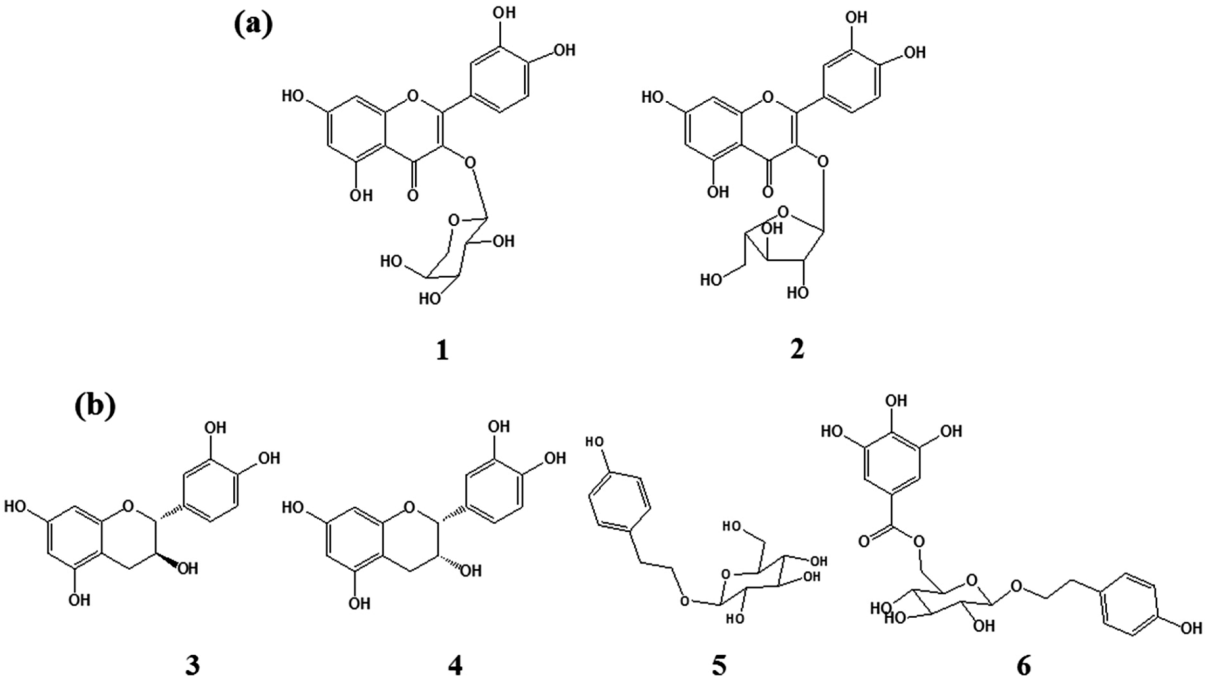

Fig. 1. Chemical structure of first isolated compounds (a) and reported compounds (b) from *Acer tegmentosum*.

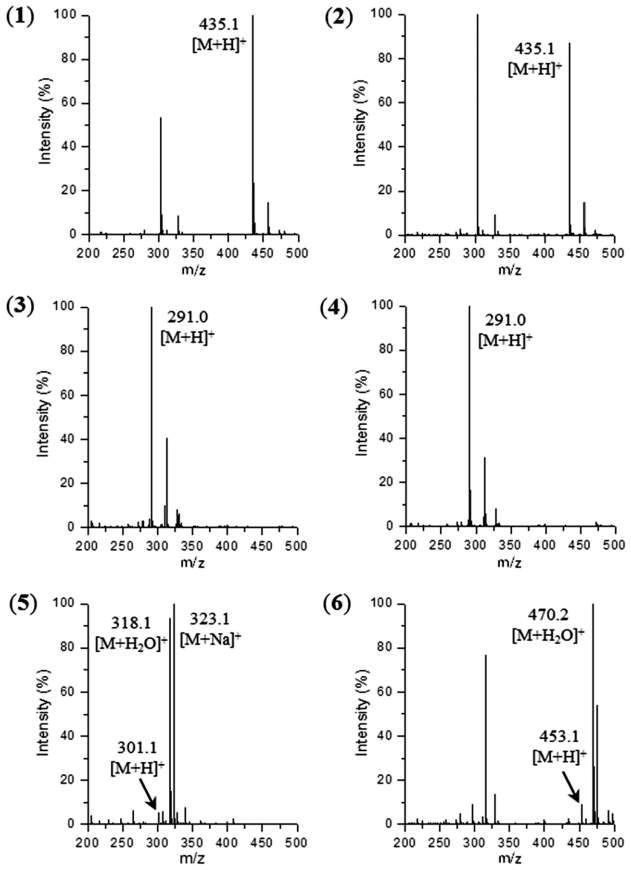

Fig. 2. MS spectra of feniculin (**1**), avicularin (**2**), (+)-catechin (**3**), (-)-epicatechin (**4**), salidroside (**5**) and 6'-*O*-galloylsalidroside (**6**) isolated from *Acer tegmentosum* using LC-MSD.

105.43 (C-10), δ_C 99.88 (C-6), δ_C 94.70 (C-8)] signal이 관측됨에 따라 벤젠고리 두 개와 이중결합 한 개가 존재함을 확인하였고, 이 중 δ_C 166.07, δ_C 163.05, δ_C 158.70, δ_C 158.43, δ_C 149.96, δ_C 145.98, δ_C 135.65의 signal이 저자장으로 shift 된 것으로부터 수산기가 치환되어 있음을 예상하여 flavonol 골격의 quercetin으로 확인하였다. δ_C 104.63 (H-1")의 anomer carbon signal이 하나 관측됨에 따라 당이 한 분자 결합하고 있음을 확인하였으며, 60~80 ppm에서 관측된 signal의 chemical shift 값으로부터 pyrane 형태의 arabinose가 결합하고 있음을 확인하였다. 위의 데이터를 종합하고 문헌과 비교하여 화합물 **1**을 quercetin에 arabinopyranoside가 결합된 feniculin으로 구조동정 하였으며,[11] positive mode의 ESI-MS를 측정하여 m/z 435.1 $[M+H]^+$을 얻었다.

화합물 **2**는 ^{1}H와 ^{13}C-NMR의 스펙트럼에서 화합물 **1**과 비슷한 양상을 나타내었으며, quercetin에 arbinose가 furane 형태로 결합된 avicularin으로 구조동정 하였고,[12] positive mode의 ESI-MS를 측정하여 m/z 435.1 $[M+H]^+$을 얻었다.

화합물 **3**과 **4**는 문헌과 비교하여 각각 (+)-catechin과 (-)-epicatechin으로 구조동정 하였고,[13] 두 화합물 모두 positive mode의 ESI-MS를 측정하여 m/z 291.0 $[M+H]^+$을 확인하였다.

화합물 **5**는 ODS TLC로 분석하고 10% H_2SO_4를 분무하여 가열하면 갈색으로 발색되어 페놀화합물로 예상하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD, δ_H)에서 δ_H 7.08 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-2, 6)과 δ_H 6.71 (2H, d, *J*=8.0 Hz, H-3, 5)에

서 총 4개의 olefine methine proton signal이 겹쳐서 나타나므로 대칭형의 ρ-2치환 벤젠고리가 존재함을 예상하였다. δ_H 4.31에서 8.0 Hz의 J값을 가지는 hemiacetal proton signal (H-1')과 3.0~4.1 ppm 사이의 다수의 oxygenated methine proton signal로부터 당 한 분자가 β 형태로 결합하고 있음을 확인하였다. δ_H 3.21 (2H, t, J=8.4 Hz, H-8)과 δ_H 2.86 (2H, t, J=8.4 Hz, H-7)에서 J값이 같은 두 개의 methylene proton signal이 관측되어 두 개의 methylene이 chain 형태로 결합되어 있음을 예상하였다. ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD, δ_C)에서 총 14개의 signal이 관측되었으며 저자장의 6개 [δ_C 156.85 (C-4), δ_C 131.03 (C-2, 6), δ_C 130.82 (C-1), δ_C 116.19 (C-3, 5)] signal로부터 벤젠고리가 하나 존재함을 확인하였고, 이 중 δ_C 156.85 signal이 저자장으로 shift 된 것으로부터 수산기가 결합되어 있음을 예상하였다. δ_C 104.42 (C-1')의 anomer carbon signal과 60~80 ppm의 5개의 oxygenated methine signal의 chemical shift 값으로부터 glucose가 한 분자 결합하고 있음을 확인하였다. δ_C 72.16 (C-8)과 δ_C 36.43 (C-7)에서 methylene carbon signal을 관측하였고 δ_C 72.16의 signal이 저자장으로 shift 된 것으로부터 수산기가 결합되어 있음을 예상하였다. 위의 데이터를 종합하고 문헌과 비교하여 화합물 **5**를 수산기가 하나 치환된 벤젠고리와 chain 형태의 methylene, 당 한 분자가 결합된 salidroside로 구조동정 하였다.[10] 화합물 **5**의 positive mode의 ESI-MS 측정값은 m/z 301.1 $[M+H]^+$로 확인하였다.

화합물 **6**의 ^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD, δ_H)은 화합물 **5**와 매우 비슷하였으나 δ_H 7.10 (2H, br s, H-2", 6")에서 broad singlet으로 split된 oxygenated methine proton signal이 겹쳐서 관측되어 1,2,3,5-4 치환 벤젠고리를 추가로 확인하였다. 또한 당의 6번 [δ_H 4.52 (1H, dd, J=11.4, 2.4 Hz, H-6'b), δ_H 4.45 (1H, dd, J=11.4, 6.0 Hz, H-6'a)] proton signal이 매우 저자장으로 shift 된 것으로부터 당의 6번에 작용기가 결합되어 있음을 예상하였다. ^{13}C-NMR (150 MHz, CD_3OD, δ_C) 또한 화합물 5의 데이터와 흡사하였으나, 저자장에서 6개의 [δ_C 146.44 (C-3", 5"), δ_C 139.78 (C-4"), δ_C 121.37 (C-1"), δ_C 110.16 (C-2", 6")]carbon signal과 한 개의 ester carbon signal (δ_C 168.31)이 관측되어 galloyl기 한 분자가 존재함을 예상하였다. 위의 데이터를 종합하여 화합물 **6**을 salidroside의 당 6번에 galloyl기가 결합된 6'-*O*-galloylsalidroside로 구조동정 하였으며,[14] positive mode의 ESI-MS를 측정하여 m/z 453.1 $[M+H]^+$을 확인하였다. (+)-catechin과 (-)-epicatechin은 항산화 활성이 보고되어 있으며,[15] salidroside는 anti-gastropathic activity가 보고되어 있고,[10] 6'-*O*-galloylsalidroside 또한 항산화 활성이 보고되어 있다.[6] 분리한 화합물 중 feniculin과 avicularin은 산겨릅나무에서는 처음 분리 된 화합물이며, feniculin은 antiplaque 활성과[16] avicularin은 간보호 활성이 보고되어 있다.[17]

RAW 264.7 세포의 생존율에 대한 분리된 화합물의 효과 – MTT assay를 통하여 6종의 화합물의 세포 독성을 확인한 결과 화합물 **1-5**는 100 μM의 높은 농도까지 세포독성이 나타나지 않았다. 화합물 **6**은 50 μM의 농도까지 전혀 세포독성이 나타나지 않았고, 100 μM의 농도에서 약간의 세포독성이 관찰되었다(Fig. 3). 이로써 화합물 **1-5**는 세포에 매우 안전하고 화합물 **6**은 50 μM의 농도까지 세포에 매우 안전한 것을 알 수 있었다.

산화질소 생성에 대한 분리된 화합물의 억제효과 – RAW 264.7 대식세포에서 산화질소 발현에 대한 화합물 **1-6**의 억제효과를 측정하기 위해 6종의 화합물을 세포에 전처리 한 후 LPS를 처리하고 산화질소의 발현량을 측정하였다. 양성대조군으로는 항염증 약물로 널리 쓰이는 덱사메타손(10 μM)을 사용하였다. Fig. 4를 통하여 보면 화합물**1**과 **6**은 고농도(100 μM)에서 산화질소 생성을 약하게 억제하는 효능이 관찰되었다. 또한 화합물 **3**과 **4**는 50과 100 μM의 농도에서 산화질소 생성을 억제하였으며 각각 통계적 유의성을 관찰

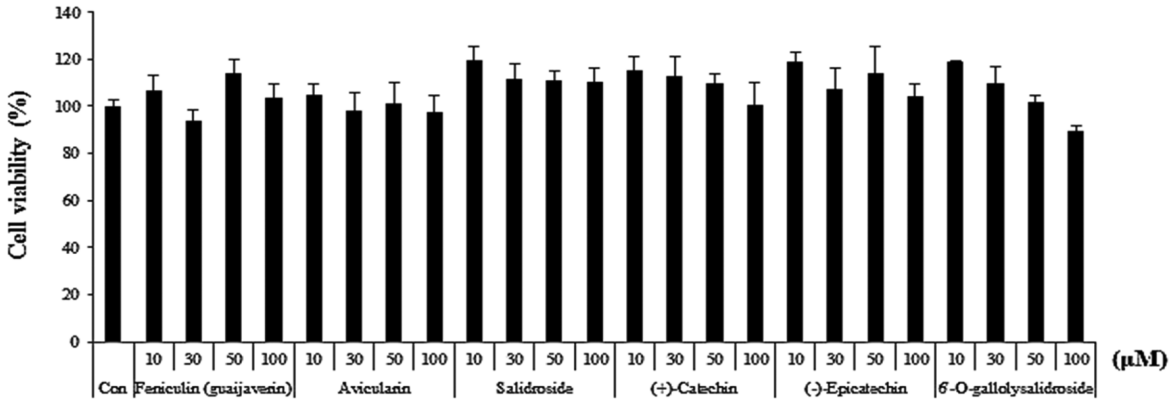

Fig. 3. The cytotoxicity of six compounds on RAW 264.7 macrophage cells at different doses (10, 30, 50 and 100 μM) was evaluated by an MTT assay.

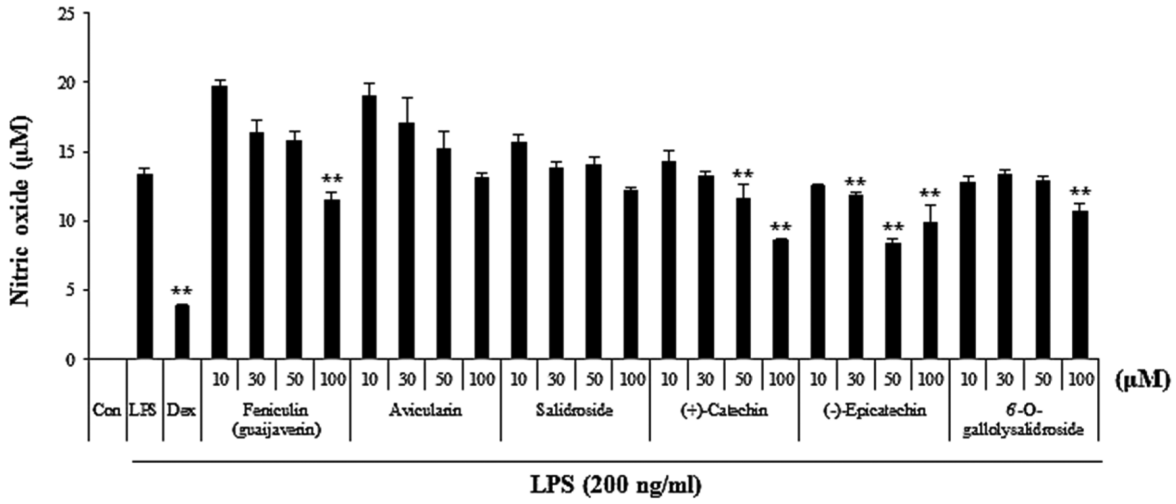

Fig. 4. Suppressive effect of six compounds on NO production by LPS stimulation. RAW 264.7 cells were pretreated with six compounds for 30 min before incubation with LPS for 24 hours. The culture supernatant was analyzed for nitrite production. As a control, the cells were incubated with vehicle alone. Data shows mean±SE values of triplicate determination from independent experiments. *p<0.01 and **p<0.001 were calculated from comparing with LPS-stimulation value.

할 수 있었다. 그러나 화합물 **2**와 **5**는 LPS로 유도된 산화질소의 생성에 대해 조금의 억제 효과도 나타내지 않았다.

결 론

산겨릅나무(*Acer tegmentosum*)의 EtOAc와*n*-BuOH 층 추출물에 포함된 feniculin(**1**), avicularin(**2**), (+)-catechin(**3**), (-)-epicatechin(**4**), salidroside(**5**), 6'-*O*-galloylsalidroside(**6**)을 컬럼크로마토그래피를 이용하여 순수 물질을 분리하여 구조동정 하였다. 이 결과, 화합물 **1**과 **2**는 산겨릅나무에서 처음 분리되었으며 순수 화합물 **1-6**에 대하여 RAW 264.7 대식세포에서 산화질소 생성 억제활성을 측정한 결과, **1**, **3**, **4**, **6**의 화합물은 높은 농도에서 미미한 활성을 보였고, **2**와 **5**의 화합물에서는 산화질소 생성 억제활성이 없는 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 한국한의학연구원의 연구지원(K14050)에 의하여 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

인용문헌

1. 김태정 (2008) 한국의 야생화와 자원식물 3, 211. 서울대학교출판부, 서울.
2. 이정석, 이계한, 오찬진 (2010) 새로운한국수목대백과도감(하), 166. 학술정보센터, 서울.
3. 김일훈 (1986) 신약, 79-288. 나무, 서울.
4. 안덕균 (1998) 한국본초도감, 523. 교학사, 서울.
5. Hur, J.-M., Jun, M., Yang, E.-J., Choi, S.-H., Park, J. C. and Song, K. S. (2007) Isolation of isoprenoidal compounds from the stems of *Acer tegmentosum* Max. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**: 67-70.
6. Kim, S., Hur, S. J., Kim, K. H., Gi, K. S. and Whang, W. K. (2012) Antioxidant and anti-inflammatory compounds isolated from *Acer tegmentosum*. *J. Med. Plants Res*. **6**: 3971-3976.
7. Park, K. M., Yang, M. C., Lee, K. H., Kim, K. R., Choi, S. U. and Lee, K. R. (2006) Cytotoxic phenolic constituents of *Acer tegmentosum* Maxim. *Arch. Pharm. Res*. **29:** 1086-1090.
8. Kwon, D.-J., Kim, J.-K. and Bae, Y.-S. (2011) DPPH radical scavenging activity of phenolic compounds isolated from the stem wood of *Acer tegmentosum*. *Mokchae Konghak* **39**: 104-112.
9. Hong, B. K., Eom, S. H., Lee, C. O., Lee, J. W., Jeong, J. H., Kim, J. K., Cho, D. H., Yu, C. Y., Kwon, Y. S. and Kim, M. J. (2007) Biological activities and bioactive compounds in the extract of *Acer tegmentosum* Maxim. stem. *Kor. J. Med. Crop. Sci*. **15:** 296-303.
10. Yoo, Y.-M., Nam, J. -H., Kim, M.-Y., Choi, J., Lee. K.-T. and Park, H.-J. (2009) Analgesic and anti-gastropathic effects of salidroside isolated from *Acer tegmentosum* heartwood. *Open Bioact. Compd. J*. **2**: 1-7.
11. Fraisse, D., Heita. A., Carnat, A., Carnat, A.-P. and Lamaison, J.-L. (2000) Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. *Fitoterapia* **71**: 463-464.
12. Kim, H. J., Woo, E.-R. and Park, H. (1994) A novel lignin and flavonoids from *Polygonum aniculare*. *J. Nat. Prod*. **57**:

581-586.
13. Watanabe, M. (1998) Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. *J. Agric. Food Chem*. **46**: 839-845.
14. Latte, K. P., Kaloga, M., Schafer, A. and Kolodziej, H. (2008) An ellagitannin, *n*-butyl gallate, two aryltetralin lignans, and an unprecedented diterpene ester from *Pelargonium reniforme*. *Phytochemistry* **69**: 820-826.
15. Fauconneau, B., Waffo-teguo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A. and Merillon, J.-M. (1997) Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests. *Life Sci*. **61**: 2103-2110.
16. Prabu, G. R., Gnanamani, A. and Sadulla, S. (2006) Guaijaverin-a plant flavonoids as potential antiplaque agent against *Steptococcus mutans*. *J. Appl. Microbiol*. **101**: 487-495.
17. Kim, S. M., Kang, K., Jho, E. H., Jung, Y. -J., Nho, C. W., Um, B.-H. and Pan, C.-H. (2011) Hepatoprotective effect of flavonoid glycosides from *Lespedeza cuneata* against oxidative stress induced by *tert*-butyl hyperoxide. *Phytother Res*. **25**: 1011-1017.
18. Choi, H. J., Kang, O. H., Park, P. S., Chae, H. S., Oh, Y. C., Lee, Y. S., Choi, J. G., Lee, G. H., Kweon, O. H. and Kwon, D. Y. (2007) Mume Fructus water extract inhibits pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Med. Food* **10**: 460-466.

(2014. 3. 27 접수; 2014. 4. 9 심사; 2014. 6. 5 게재확정)