

생달나무 잎 추출물 유래 항염 및 항산화 활성 성분

김소희 · 김정은 · 이남호*
제주대학교 화학·코스메틱스학과
(접수 2020. 11. 4; 게재확정 2020. 11. 21)

Anti-inflammatory and Anti-oxidative Constituents from the Extract of *Cinnamomum yabunikkei* Leaves

So Hee Kim, Jung Eun Kim, and Nam Ho Lee*

Department of chemistry and cosmetics, Jeju National University, Jeju 63243, Korea.

*E-mail: namho@jejunu.ac.kr

(Received November 4, 2020; Accepted November 21, 2020)

요 약. 본 연구에서는 생달나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 항염 및 항산화 효능을 확인하고 유효성분을 분리하여 화학구조를 동정하였다. RAW 264.7 세포를 이용한 분획 시료의 NO 생성 억제 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 세포 독성 없는 농도에서 NO의 생성을 억제시키는 효능을 확인하였다. 또한 EtOAc 분획물이 iNOS 단백질의 발현 및 전염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β) 생성 저해 효과를 나타내었다. 항산화 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거능이 우수함을 확인하였다. EtOAc 분획물의 활성 성분을 규명하기 위해 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 5개의 화합물을 분리하였다; (4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-isopropyl-2-methylcyclohex-2-enone (**1**), methoxy-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)ethanediol (**2**), afzelin (**3**), nicotiflorine (**4**), narcissin (**5**). 화합물 **1-5**는 모두 생달나무에서 처음으로 분리되었다. 분리 화합물에 대한 항염 활성 실험 결과, 화합물 **1, 3, 4** 및 **5**는 세포 독성 없이 NO 생성 저해 효과를 나타내었다. 또한 화합물 **1**은 염증 매개인자인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성 억제 활성을 보여주었다. 이상의 연구결과를 바탕으로 생달나무 잎은 항염 및 항산화 효과를 갖는 의약품 및 화장품 관련 천연 소재로의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

주제어: 생달나무, 항염, 항산화, 성분, 분리

ABSTRACT. In this study, the extract of *Cinnamomum yabunikkei* leaves were investigated for the anti-inflammatory and anti-oxidative activities and their active constituents were identified. In the anti-inflammatory tests using LPS-stimulated RAW 264.7 cells, the ethyl acetate (EtOAc) fraction inhibited the production of nitric oxide (NO) without causing cell toxicity. In addition, the EtOAc fraction reduced expression of iNOS protein and production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β). Upon the anti-oxidative studies by DPPH and ABTS⁺ radicals, potent radical scavenging activities were observed in the EtOAc fraction. Five phytochemicals were isolated from the extract of *C. yabunikkei* leaves; (4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-isopropyl-2-methylcyclohex-2-enone (**1**), methoxy-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)ethanediol (**2**), afzelin (**3**), nicotiflorine (**4**) and narcissin (**5**). As far as we know, compounds **1-5** were isolated for the first time from this plant. In the anti-inflammatory tests for the isolates, compound **1, 3, 4** and **5** were determined to decrease NO production without causing cell toxicity. Furthermore, compound **1** reduced expression of iNOS protein and exhibited potent inhibitory activities of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6). Based on these results, it was suggested that the extract and isolated compounds from *C. yabunikkei* leaves could be potentially applicable as natural source for pharmaceutical and/or cosmetic ingredients.

Key words: *Cinnamomum yabunikkei*, Anti-inflammation, Anti-oxidation, Constituents, Isolation

서 론

피부는 외부의 물리적, 화학적 자극으로부터 신체를 보호하는 물리적 장벽으로서 인체 항상성을 유지하고 체내 독소를 배출하는 역할을 한다. 표피가 화학물질이나 자외선 등의 환경적 스트레스에 지속적으로 노출되면 체내 대

사 균형이 무너지며, 피부 노화나 염증 반응을 유발한다.¹ 피부 염증 질환 치료방법으로 스테로이드제와 항히스타민제 등의 약물 처방 등이 있다. 이는 장기간 사용시 색소 침착, 피부 위축, 알레르기 등을 유발한다고 알려져 있어 부작용이 적은 피부질환 완화제 개발이 요구되고 있다.² 염증반응은 면역세포 중 하나인 대식세포가 내외부의

자극에 의한 조직 손상에 대응하기 위해 일어나는 정상적인 방어 기전이다. 지속적이고 과도한 염증반응은 오히려 조직의 손상, 류머티즘 등의 자가면역질환을 유발하므로 염증반응을 조절하는 것이 매우 중요하다.^{3,4} 대식세포가 체내 독소인 lipopolysaccharide (LPS)의 자극을 받으면 염증반응과 더불어 nitric oxide (NO)와 interleukin (IL)-6, IL-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α 등의 전염증성 사이토카인의 분비를 유도한다.⁵ 염증상태에서 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 생성된 과도한 NO는 염증 매개 물질의 생합성을 촉진하여 염증을 악화시키는 것으로 알려져 있다. 사이토카인 IL-6는 조직 손상과 감염에 대한 숙주의 반응에 있어서 중요한 역할을 하며 IL-1 β 는 만성염증 유발 매개인자로 염증 관련 중앙형성에 관여한다. 따라서 NO의 생성 및 전염증성 사이토카인의 발현을 조절하는 물질은 염증성 질환을 예방할 수 있다.^{4,6,7}

생체 내에서 정상적인 대사과정을 통해 사용되는 산소 중 일부는 유해한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 변하게 된다. 활성산소는 안정한 형태인 삼중항산소(3O_2)가 환원되어 생성되며 superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$), singlet oxygen (1O_2) 등이 있다. 이와 같은 유해 활성산소는 대부분 화학적으로 불안정한 free radical이다. 과도한 활성산소 생성은 신체에 악영향을 끼쳐 각종 질병과 노화를 유발하는 주범이 되고 있다.^{8,9}

생달나무(*Cinnamomum yabunikkei*)는 녹나무과(Lauraceae)에 속하는 나무로 내음성이 강하고 습기가 많은 저지대 경사지에 잘 자란다. 한국, 중국, 대만, 일본 등에 분포해 있으며 한반도에서는 전라남도 및 제주도에 분포하고 있다. 생달나무 껍질(bark)의 열수 추출물과 에탄올 추출물에 대해서는 항염 효능이 알려져 있으며 cinnamic acid, cinnamaldehyde 등의 유효성분 분석이 보고되어 있다.¹⁰ 또한 생달나무 에센셜 오일(essential oil)의 미백 효능과 항균 효과가 보고되어 있다.¹¹ 그러나 아직까지 생달나무 잎(leaves)을 대상으로 한 유효성분 연구는 보고된 바가 없으므로 본 연구에서는 잎 추출물의 항염 및 항산화 효능을 확인하고, 유효성분의 분리 및 구조동정 연구를 진행하였다.

실 험

시약 및 기기

시료의 추출, 용매 분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck 및 대정화학 제품을 사용하였다. Medium pressure liquid chromatography (MPLC, Biotage Co.)에는 KP-C18-HS (Biotage Co.) 컬럼, vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.002-0.025 mm, Sigma Co.)을 사용하였고, gel filtration

chromatography (GFC)에는 Sephadex™ LH-20 (0.025-0.1 mm, GE healthcare Co.)을 사용하였다. 구조분석을 위한 nuclear magnetic resonance (NMR)는 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, ZEOL, Japan)을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL (USA)의 NMR 전용 용매인 $CDCl_3$, CD_3OD 을 사용하였다.

생달나무 잎의 추출 및 용매 분획

실험에 사용된 생달나무 잎(시료번호 : 483)은 제주시 한경면 청수리에서 2017년 8월에 채집하였다. 채집한 시료는 동결건조 후, 분쇄하여 사용하였으며, 시료 500 g을 70% 에탄올 10 L에 침적하여 실온에서 24 h 동안 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 흡입여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 여과하여 얻어진 여액은 40°C 수욕상에서 감압 농축하여 추출물 122 g을 얻었으며, 얻어진 추출물 112 g을 증류수에 현탁시키고, 용매 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH), H_2O 분획물을 얻었다.

활성 성분의 분리

EtOAc 분획물 5.0 g을 극성에 따라 순차적으로 세분화하기 위하여 MPLC를 사용하였으며, H_2O -MeOH (10-100%)의 용매를 gradient 조건으로 각 40 mL씩 용출하여 총 48개의 분획물을 얻었다(분획물 MP1-48). 분획물 MP18 (170.0 mg)은 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피($CHCl_3$: MeOH = 10 : 1)를 수행하여 화합물 2 (16.5 mg)를 얻었으며, MP19 (160.1 mg) 또한 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피($CHCl_3$: MeOH = 15 : 1)를 통하여 화합물 1 (1.1 mg)과 화합물 2 (12.6 mg)를 분리하였다. 추가적으로 EtOAc 분획물 5.4 g은 VLC를 수행하였으며, *n*-Hex-EtOAc (0-100%), EtOAc-MeOH (0-50%)의 용매를 극성을 5%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하여 총 32개의 분획물을 얻었다(분획물 V1-32). 분획물 V8 (111.7 mg)은 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피($CHCl_3$: MeOH = 40 : 1)를 수행하여 3개 분획물로 나누었고, 그 중 V8-3 (50.8 mg)을 같은 용매 조건으로 재분리하여 화합물 1 (9.7 mg)을 얻었다. V23 (496.8 mg), V25 (527.0 mg) 및 V26 (500.0 mg)은 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피(H_2O : MeOH = 1 : 1)를 통하여 화합물 3 (8.5 mg), 화합물 4 (21.9 mg) 및 화합물 5 (4.1 mg)를 분리하였다.

항염 활성

세포배양. Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell은 American Type Cell Culture (ATCC, USA)로부터 분양 받아

100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO Inc., USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO Inc., USA) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 2-3일에 한 번씩 계대 배양하였다.

NO 생성 억제 활성. 24 well plate에 2×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 18 h 배양 후 배지를 제거하였다. 1 µg/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 24 h 배양하였다. 이후 세포배양 상등액 100 µL와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 µL를 혼합하여 96 well plate에서 10 min 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였고, sodium nitrite (NaNO₂)를 standard로 사용하여 정량하였다.

Western Blot Analysis. 60 mm dish에 9×10^5 cells/dish로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 18 h 배양 후 배지를 제거하였다. 1 µg/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 24 h 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, RIPA buffer (Sigma, USA)를 이용해 4 °C, overnight으로 lysis 시킨 후 원심분리 (15,000 rpm, 15 min, 4 °C)하여 단백질 상등액만 분리하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 Bradford 시약(BIO-RAD, USA)을 사용하여 정량하였다. 정량한 단백질을 8-12%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane에 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk를 포함한 TTBS (0.1% Tween 20, Tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 2 h blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체 반응은 iNOS antibody (1 : 1,000, SantaCruze, USA), β-actin antibody clone AC-74 (1 : 20,000, Sigma, USA)를 이용하여 4 °C에서 overnight 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 membrane은 TTBS 용액으로 5회 세척 후, peroxidase-conjugated 2차 항체(1 : 5,000 또는 1 : 20,000, SantaCruze, USA)와 상온에서 1 h 반응 시킨 뒤, TTBS 용액으로 5회 세척하였다. 단백질은 WESTA NOVA 2.0 (Cyanagen, Italy) 용액을 이용해 ECL 기질과 반응 시킨 후, Chemidoc (Fusion solo, VILBER LOURMAT, Germany)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

전염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β, IL-6) 생성 억제 활성. 24 well plate에 2×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 18 h 배양 후 배지를 제거하였다. 1 µg/mL의 LPS를 포함하는 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 24 h 배양하였다. 이후 세포배양 상등액의 사

이토카인 생성 함량을 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 이용하여 정량하였으며, TNF-α ELISA kit (Invitrogen, USA), IL-1β ELISA kit (R&D Systems, USA), IL-6 ELISA kit (Invitrogen, USA)를 사용하였다. Standard에 대한 표준곡선의 r² 값은 0.99 이상이었다.

세포독성 평가(MTT Assay). MTT assay는 RAW 264.7 세포를 24 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 18 h 전배양 후, LPS와 시료를 농도별로 동시에 처리하여 24 h 배양하였다. 이후 500 µg/mL의 농도로 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 첨가하여 37 °C에서 3-4 h 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존률(%)을 계산하였다.

항산화 활성

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정. 총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Deinis 방법¹²을 응용하였고 각 시료 용액 100 µL에 증류수 900 µL와 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100 µL를 가하여 상온에서 3 min 간 반응시켰다. 여기에 7% (w/v) Na₂CO₃ 용액 200 µL와 증류수 700 µL를 가하여 실온에서 1 h 반응시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질인 gallic acid를 이용하여 농도에 따른 표준검정곡선을 작성한 후 총 폴리페놀 함량을 구하였다. 총 플라보노이드 함량 측정은 Davis 등의 방법¹³을 응용하였고 각 시료 용액 15 µL에 ethylene glycol 150 µL와 0.1 N NaOH 15 µL를 가하여 상온에서 1 h 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 quercetin을 이용하여 농도에 따른 표준검정곡선을 작성한 후 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성 실험은 Blois 방법¹⁴을 응용하였고 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20 µL와 0.2 mM DPPH 용액 180 µL를 혼합하여 상온에서 10 min 간 반응시킨 후, 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 소거 활성(scavenging activity) 백분율이 50%일 때의 농도(SC₅₀)를 계산하였으며 양성 대조군으로는 butylated hydroxytoluene (BHT)을 사용하였다.

ABTS⁺ 라디칼 소거 활성. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 양이온 라디칼 소거 활성은 Re 등의 방법¹⁵을 응용하였고, 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온 및 암소에서 16 h 동안 반응시켜 ABTS⁺ 라디칼을 형성시켰다. 이 용액을 에탄올로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78 ± 0.02가 되도록 하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액

20 μL 와 ABTS⁺ 용액 180 μL 를 혼합하여 상온에서 15 min 간 반응시킨 후, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 소거 활성(scavenging activity) 백분율이 50%일 때의 농도(SC₅₀)를 계산하였으며 양성 대조군으로는 BHT를 사용하였다.

결과 및 고찰

생달나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성

NO 생성 억제 활성. 생달나무 잎 추출물 및 극성별 용매 분획물의 항염 활성을 확인하기 위해 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포를 이용하여 NO 생성 억제 활성을 측정하였다. 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 내독소로 잘 알려진 LPS는 대식세포 또는 단핵구를 자극하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 염증성 사이토카인들의 분비를 촉진하며 NO의 대량 생성에 관여하게 되어 숙주에 치명적인 결과를 초래한다고 알려져 있다.¹⁶ 건조 및 분쇄한 생달나무 잎은 70% 에탄올을 이용하여 추출하였으며 얻어진 추출

물을 용매의 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물을 얻었다. 추출물 및 분획물에 대하여 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 NO 생성량을 측정할 결과, 70% 에탄올 추출물, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 NO 생성 억제 활성을 보였으며, 그 중 EtOAc 분획물은 세포 독성이 나타났다. 추가적으로 EtOAc 분획물의 농도를 20-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 하여 실험한 결과, 생달나무 잎 EtOAc 분획물은 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰고 IC₅₀ 값은 28.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다(Fig. 1).

iNOS 단백질 발현 억제 활성. 대식세포가 interferon- γ 또는 LPS에 의해 자극될 때 iNOS가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 되고 염증반응의 매개물질 역할을 하게 된다.¹⁷ 이러한 염증반응에 관여하는 물질인 iNOS의 발현을 Western blot 분석법으로 측정할 결과, 생달나무 잎 EtOAc 분획물은 iNOS 단백질의 발현을 농도 의존적으로 억제시키는 효과가 있었으며, 이는 NO 생성이 저해되는 것과 유사한 경향으로 나타남을 확인하였다(Fig. 2).

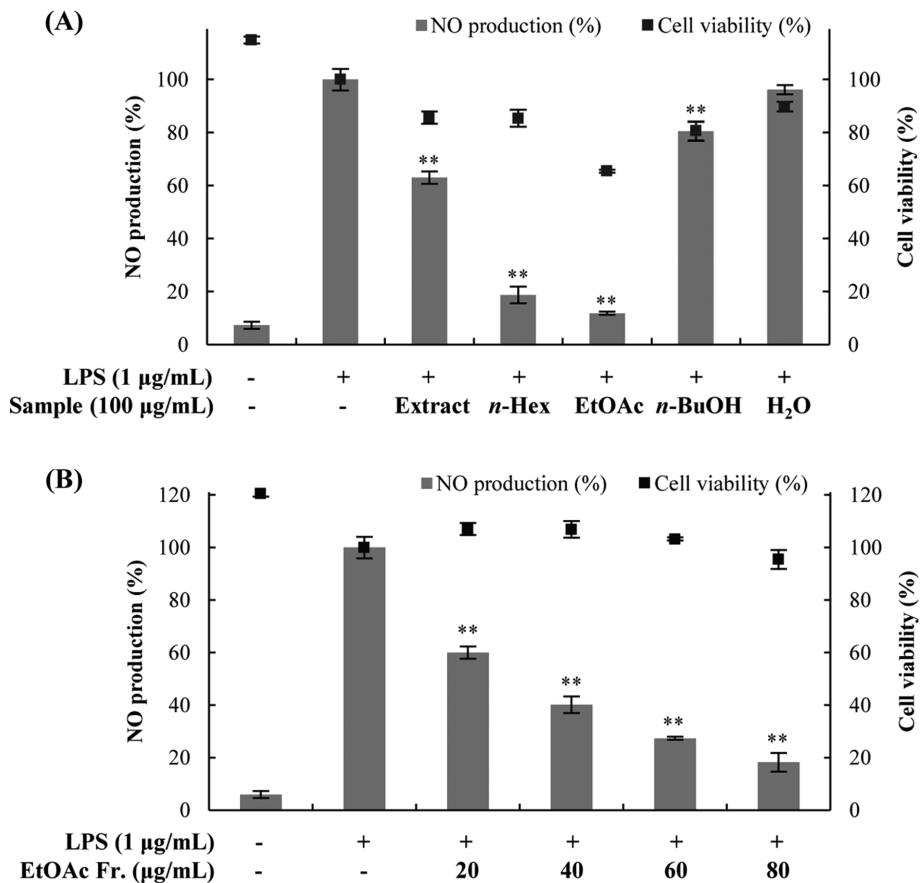


Figure 1. Effects of extract, solvent fractions (A) and EtOAc fraction (B) from *C. yabunikkei* leaves on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS only, or with LPS plus extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* leaves for 24 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

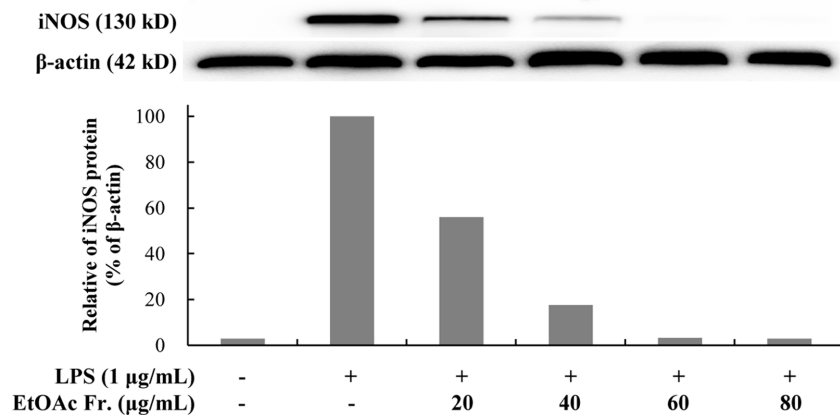


Figure 2. Effects of EtOAc fraction from *C. yabunikkei* leaves on level of iNOS protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc fraction from *C. yabunikkei* leaves for 24 h. The iNOS protein levels in each sample was normalized to the quantity of β-actin.

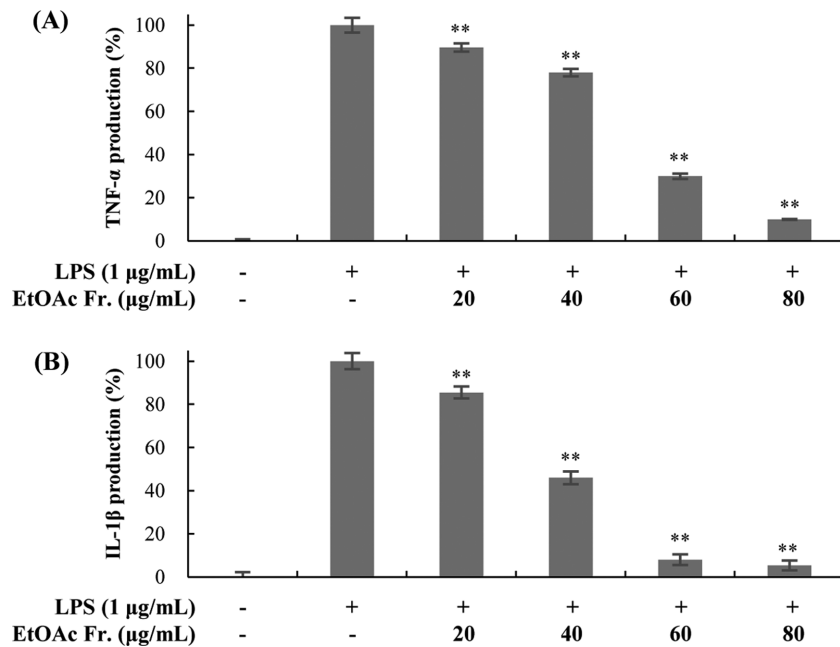


Figure 3. Effects of EtOAc fraction from *C. yabunikkei* leaves on TNF-α (A) and IL-1β (B) production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus EtOAc fraction from *C. yabunikkei* leaves for 24 h. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. **p* < 0.05; ***p* < 0.01

전염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β) 생성 억제 활성. 생달나무 잎 EtOAc 분획물의 추가적인 항염 활성 기전을 연구하기 위해 ELISA kit를 이용하여 전염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 측정하였다. 그 결과, 생달나무 잎 EtOAc 분획물이 TNF-α 및 IL-1β의 생성을 농도 의존적으로 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 3).

생달나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정. 생달나무 잎의 항산화 활성을 확인하기 위해 총 폴리페놀 및 플라보노이

드 함량을 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 검정곡선을 이용하여 추출물 및 용매 분획물의 중량 1 g 당 함유하고 있는 gallic acid의 양(GAE, gallic acid equivalent)으로 환산하였으며, 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 표준물질로 검정곡선을 이용하여 중량 1 g 당 함유하고 있는 quercetin의 양(QE, quercetin equivalent)으로 환산하였다. 추출물 및 극성별 용매 분획물에 대한 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량 측정 결과, EtOAc 분획물이 가장 많은 폴리페놀(61.7 mg/g GAE) 및 플라보노이드(51.0 mg/g QE)를 함유하고 있음을 확인하였다(Fig. 4).

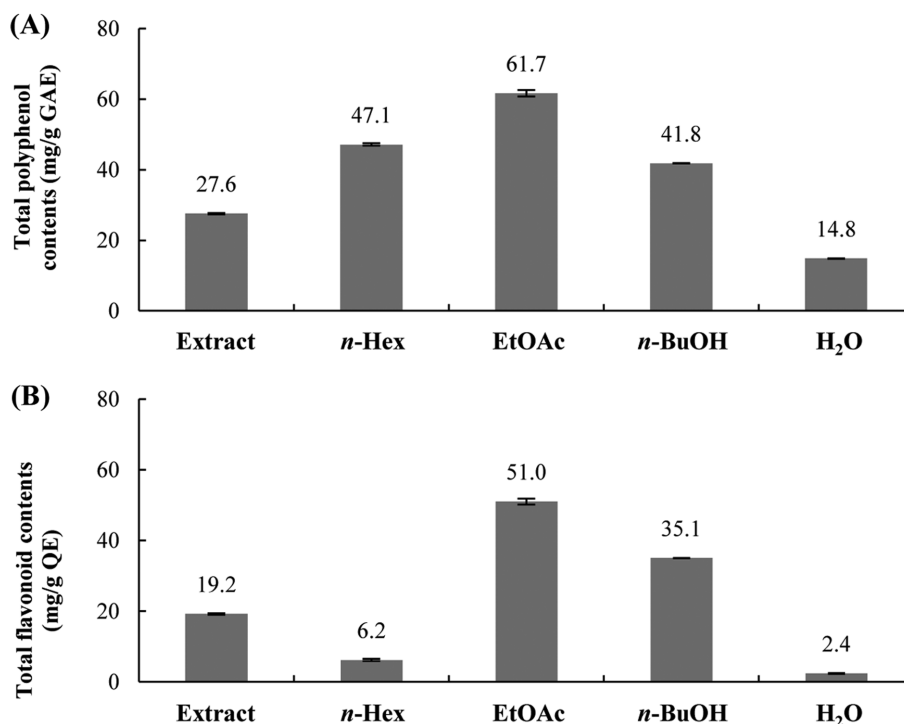


Figure 4. Total polyphenol contents (A) and total flavonoid contents (B) of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* leaves. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments.

DPPH 및 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성. DPPH는 비교적 안정한 hydrazyl 라디칼 화합물로서, 항산화 기질과 반응하여 중성인 hydrazin으로 변환되며 DPPH 용액의 변색이 수반된다. 식물 추출물의 라디칼 소거 활성 측정법으로서 DPPH 용액의 흡광도 변화를 추적하는 방법이 매우 효과적으로 이용되고 있다. 또한 ABTS⁺를 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS⁺ 유리 라디칼이 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법이다. DPPH assay와 마찬가지로 인위적인 라디칼을 제거하는 작용 기작이 공통적이며, DPPH 라디칼 제거능과 유의적인 상관성을 보이는 것으로 알려져 있다.¹⁸ 생달나무 잎 추출물 및 용매 분획물에 대한 DPPH 라디칼 소거 활성 실험 결과, EtOAc 및 *n*-BuOH 분획물의 SC₅₀ 값이 각각 112.1, 219.0 μ g/mL로 대조군인 BHT (267.2 μ g/mL) 보다 라디칼 소거 활성이 우수함을 확인하였다. 또한 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성 실험 결과, EtOAc 분획물에서 우수한 라디칼 소거 활성을 나타내었다(Fig. 5, Table 1).

생달나무 잎에서 분리된 화합물의 구조 동정

항염 및 항산화 효능이 우수한 생달나무 잎 EtOAc 분획물에 대해 MPLC, VLC 및 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토

그래피를 수행하여 5개의 화합물을 분리하였고, 이를 ¹H 및 ¹³C NMR을 이용하여 화학구조를 확인하였다(supporting information). 화합물 1은 ¹³C NMR 스펙트럼 분석 결과, 10개의 carbon 피크를 확인하였으며 그 중 δ_c 200.4의 피크를 통해 carbonyl기가 있음을 예상 하였다. δ_c 143.1 및 137.4의 피크를 통해 하나의 이중결합이 있음을 확인하였고, δ_c 64.4의 피크는 전기음성도가 큰 OH기가 결합되어 있음을 확인 하였다. ¹H NMR 스펙트럼에서 δ_H 0.95 (3H, d, J = 6.4 Hz), 1.02 (3H, d, J = 6.4 Hz), 1.78 (3H, brs) 피크의 적분값을 통해 3개의 methyl기를 확인하였으며, 이들을 종합하여 문헌¹⁹을 통해 화합물 1은 (4*S*, 5*R*)-4-hydroxy-5-isopropyl-2-methylcyclohex-2-enone으로 확인되었다. 화합물 2는 ¹³C NMR 분석 결과 대칭인 3개의 피크를 포함하여 총 8개의 carbon 피크를 확인하였으며, 그 중 δ_c 55.7 및 56.9의 피크와 ¹H NMR 스펙트럼에서 δ_H 3.85 (9H, overlapped) 피크의 적분값 등을 통해 3개의 methoxy기를 확인하였다. δ_H 6.66 (2H, s)의 피크는 적분값과 ¹³C NMR 데이터를 종합하여 대칭 구조의 aromatic ring의 proton으로 예상하였으며 이들 데이터를 바탕으로 문헌²⁰을 통해 화합물 2는 methoxy-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)ethanediol로 확인되었다. 화합물 3은 ¹³C NMR 스펙트럼에서 대칭인 2개를 포함하여 총 19개의 carbon 피크가 관찰되었으며, B ring이 대칭인 플

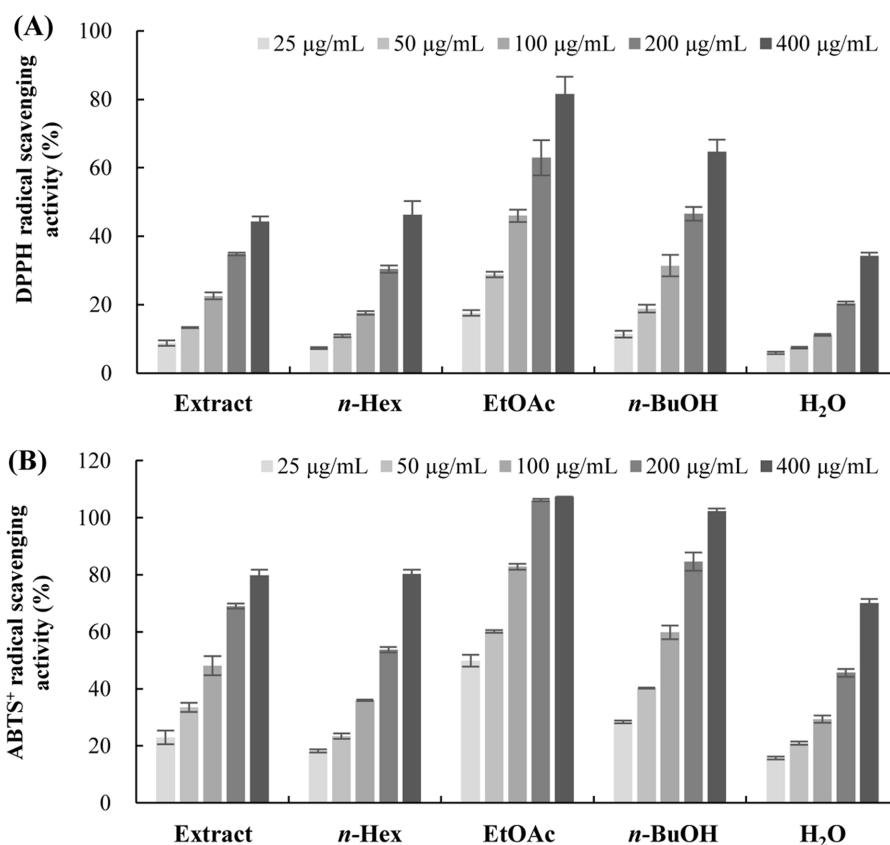


Figure 5. DPPH (A) and ABTS⁺ (B) radical scavenging activities of extract and solvent fractions from *C. yabunikkei* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean ± SD of triplicate experiments.

Table 1. SC₅₀ Values of Extract and Solvent Fractions from *C. yabunikkei* Leaves on DPPH and ABTS⁺ Radical Scavenging Activities

SC ₅₀ ¹⁾ (µg/mL)	DPPH radical	ABTS ⁺ radical
Extract	>400	115.7
<i>n</i> -Hex	>400	178.5
EtOAc	112.1	26.0
<i>n</i> -BuOH	219.0	75.6
H ₂ O	>400	248.4
BHT	267.2	8.4

¹⁾SC₅₀; scavenging concentration for 50% of radical

라보노이드 배당체일 것이라 예상하였다. δ_H 6.82 (2H, d, *J* = 8.7 Hz) 및 δ_H 7.65 (2H, d, *J* = 8.7 Hz)의 피크는 서로 *ortho*-coupling을 하고 있는 대칭구조의 aromatic proton이며, δ_H 6.06 (1H, d, *J* = 2.3 Hz) 및 δ_H 6.23 (1H, d, *J* = 2.3 Hz)의 피크는 서로 *meta*-coupling을 하고 있는 aromatic proton 임을 확인하였다. 또한 δ_H 5.26 (1H, d, *J* = 1.8 Hz) 및 δ_H 0.81 (3H, d, *J* = 5.5 Hz) 피크를 통해 결합되어 있는 당이 α-form의 rhamnopyranoside일 것이라 예상하였으며, 이들 데이터를 바탕으로 문헌²¹을 통해 화합물 3은 afzerin (kaempferol 3-

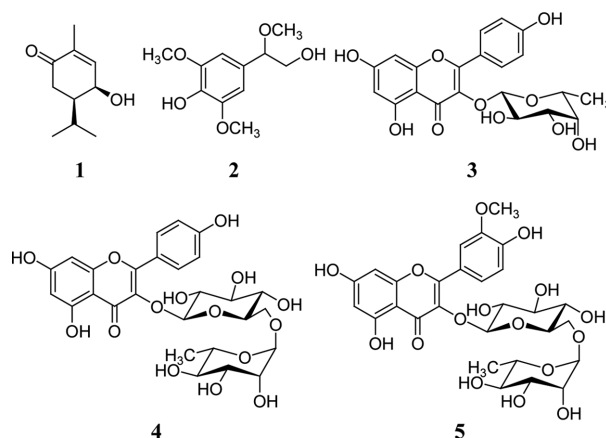


Figure 6. Isolated compounds 1–5 from *C. yabunikkei* leaves.

O-α-L-rhamnopyranoside)으로 확인되었다. 화합물 4는 ¹H 및 ¹³C NMR 분석 결과, 화합물 3과 유사한 구조에 β-form의 육탄당이 한 개 더 결합되어 있을 것이라 예상하였으며, 문헌²²을 통해 nicotiflorine (kaempferol-3-*O*-rutinoside)으로 확인되었다. 화합물 5는 δ_H 3.84 (3H, s) 및 δ_C 56.9의

피크를 통해 화합물 4에 methoxy기가 치환되어 있는 구조일 것이라 예상하였으며, δ_{H} 6.80 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), δ_{H} 7.52 (1H, dd, $J = 1.8, 8.7$ Hz) 및 δ_{H} 7.84 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)의 피크는 서로 *ortho*- 및 *meta*-coupling을 하고 있는 플라보노이드 B ring의 aromatic proton임을 확인하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌²³을 통하여 화합물 5는 narcissin (isorhamnetin-3-*O*-rutinoside)으로 동정하였다. 이들 화합물은 모두 생달나무에서 처음으로 분리되었다. 한편, 생달나무와 같은 녹나무속(*Cinnamomum*) 식물에 대한 성분은 정유성분의 분석 또는 cinnamic acid, cinnamaldehyde 분석에 대한 연구가 대부분이며, 그 중 녹나무(*Cinnamomum camphora*) 앞에서는 플라보노이드 배당체인 화합물 3, 4, 5를 포함하여 리그난 등이 분리 보고되어 있다.²⁴ 그러나 녹나무속 식물에서 화합물 1, 2는 처음으로 분리된 물질이다.

생달나무 잎으로부터 분리된 화합물의 항산화 및 항염 활성

생달나무 잎으로부터 분리된 화합물의 항산화 효능 실험 결과, 화합물 1, 2는 항산화 효능이 나타나지 않았으며, 플라보노이드 배당체인 화합물 3-5는 문헌^{21,25,26}을 통해 항산화 효능이 있음을 확인하였다. 또한 분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험 결과, 화합물 1, 3, 4, 5가 세포독성 없이 NO의 생성을 억제시킴을 확인하였으며, 그 중 화합물 3-5는 문헌²⁷⁻²⁹에 항염 활성 기전이 보고되어 있어 추가적인 기전 연구는 진행하지 않았다. 항염 활성 기전이 알려지지 않은 화합물 1에 대해서는 추가적인 항염 기전 연구를 하였으며, 그 결과 화합물 1은 NO 및 iNOS 단백질의 발현을 저해시키는 효과가 있었다(Fig. 7, 8). 또한 화합물 1은 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성을 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다(Fig. 9).

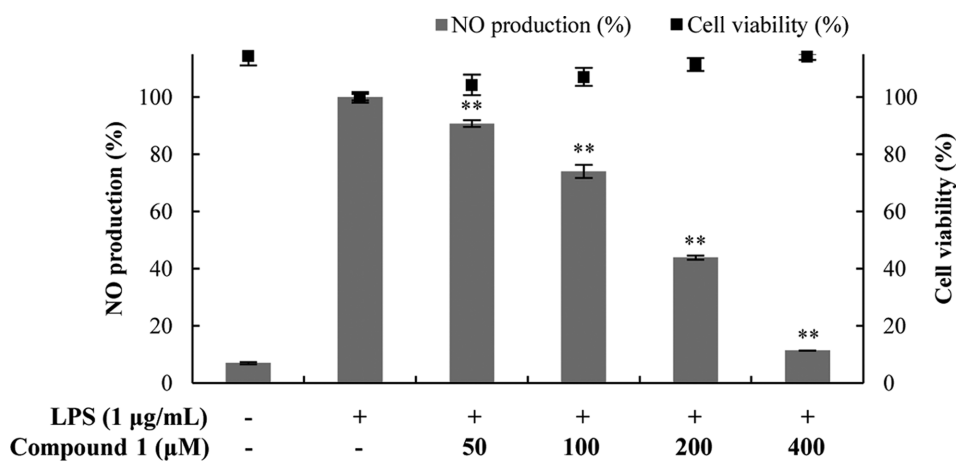


Figure 7. Effects of isolated compound 1 from *C. yabunikkei* leaves on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus compound 1 from *C. yabunikkei* leaves for 24 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

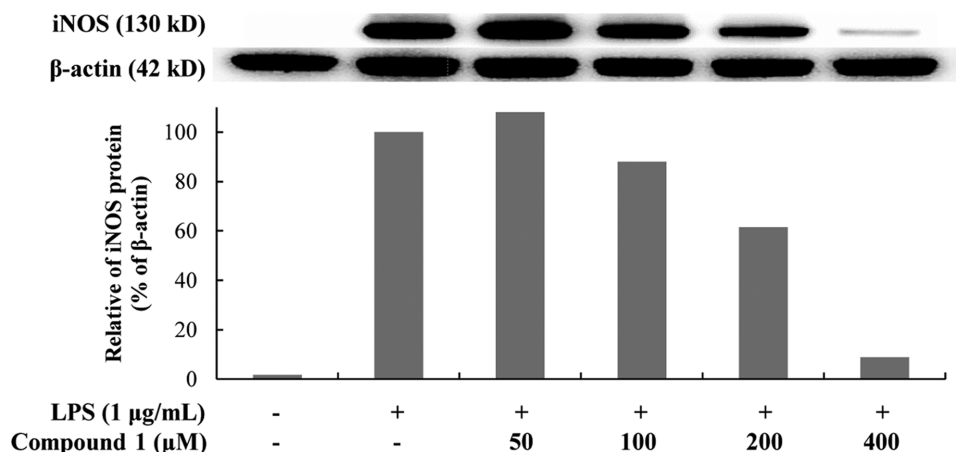


Figure 8. Effects of isolated compound 1 from *C. yabunikkei* leaves on levels of iNOS protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus compound 1 from *C. yabunikkei* leaves for 24 h. the iNOS protein levels in each sample was normalized to the quantity of β -actin.

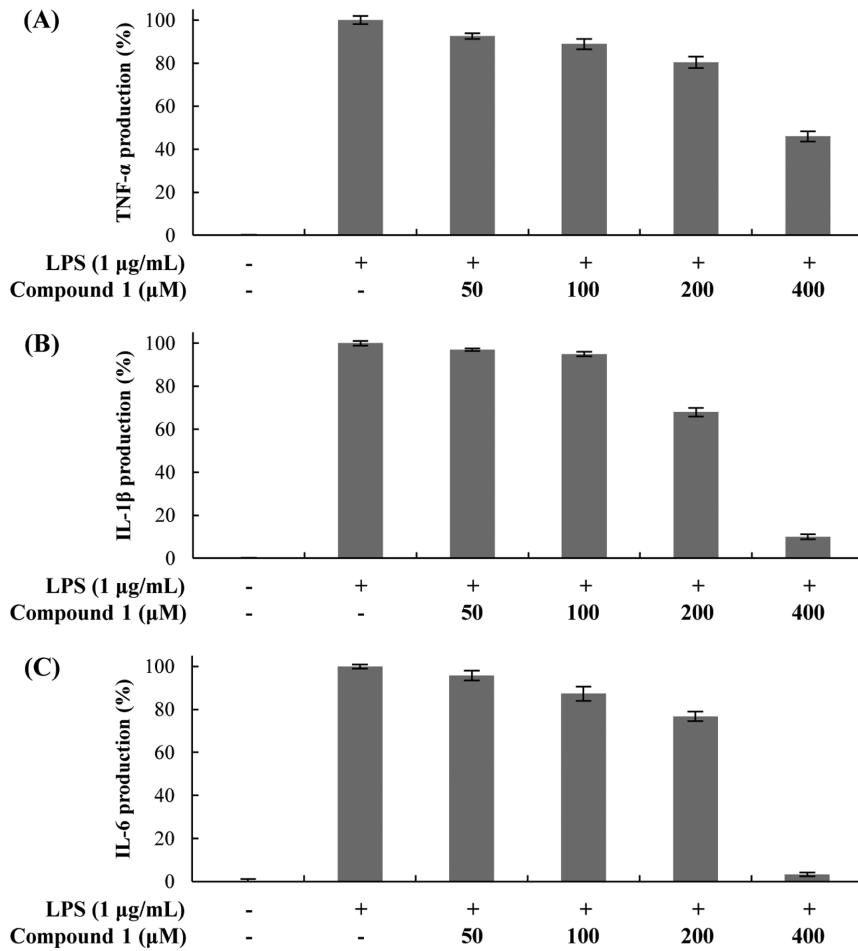


Figure 9. Effects of isolated compound 1 from *C. yabunikkei* leaves on TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C) production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated 1 μ g/mL of LPS only, or with LPS plus compound 1 from *C. yabunikkei* leaves for 24 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01

결론

현재 생달나무(*C. yabunikkei*) 잎에 대한 유효 성분 연구는 보고된 바가 없으므로 본 연구에서는 생달나무 잎 추출물 및 용매 분획물의 항염, 항산화 효능을 확인하고 유효성분의 분리 및 구조를 동정하였다. 생달나무 잎 EtOAc 분획물은 항염 및 항산화 효과가 우수함을 확인하였고, 이와 같은 결과를 바탕으로 활성 성분을 확인하기 위해 컬럼 크로마토그래피 및 NMR을 이용하여 화학구조를 동정하였으며, (4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-isopropyl-2-methylcyclohex-2-enone (1), methoxy-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)ethanediol (2), afzelin (3), nicotiflorine (4), narcissin (5)으로 확인되었다. 또한 분리된 화합물 중 화합물 1의 항염 활성이 우수함을 확인하였다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 생달나무 잎은 항염 및 항산화 효과를 갖는 의약품 및 화장품 관련 천연 소재로써 개발이 가능할 것이라 사료된다.

Acknowledgements. 이 논문은 2019학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음.

Supporting information. 화합물 1-5의 NMR 데이터.

REFERENCES

1. Lee, E. K.; Jung, S. H. *J. Kor. Soc. Cosm.* **2018**, *24*, 42.
2. Choi, D. H.; Kim, M. R.; Kim, M. Y.; Kim, H. H.; Park, S. Y.; Hwang, H. S. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **2019**, *45*, 37.
3. Willoughby, D. A. *Ann. Rheum. Dis.* **1975**, *34*, 471.
4. Kim, M. J.; Bae, N. Y.; Kim, K. B. W. R.; Park, J. H.; Choi, J. S.; Ahn, D. H. *J Korean Soc Food Sci Nurt* **2016**, *45*, 181.
5. Kim, R. G.; Shin, K. M.; Chun, S. K.; Ji, S. Y.; Seo, S. H.; Park, H. J.; Choi, J. W.; Lee, K. T. *Yakhak Hoeji* **2002**, *46*, 343.
6. Kim, M. H.; Kim, J. H.; Lee, Y. K.; Kim, W. S.; Kim, H.

- K. *Korean J. Dairy Sci. Technol.* **2011**, *29*, 17.
7. Park, S. B.; Song, H. M.; Kim, H. N.; Park, G. H.; Son, H. J.; Um, Y.; Park, J. A.; Jeong, J. B. *Korean J. Plant Res.* **2018**, *31*, 117.
8. Hah, D. S.; Kim, C. H.; Kim, G. S.; Kim, E. G.; Kim J. S. *Korean J. Vet Res.* **2005**, *45*, 341.
9. Seo, J. E.; Hwang, E. S.; Kim, G. H. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **2011**, *40*, 1532.
10. Kim, M. S.; Kim, J. Y. *Appl. Biol. Chem.* **2017**, *60*, 553.
11. Lin, C. C.; Yang, C. H.; Wu, P. S.; Kwan, C. C.; Chen, Y. S. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 6203.
12. Gutfinger, T. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**, *58*, 966.
13. Davis, F. B.; Middleton, E.; Davis, P. J.; Blas, S. D. *Cell Calcium* **1983**, *4*, 71.
14. Blois, M. S. *Nature* **1958**, *181*, 1199.
15. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231.
16. McDaniel, M. L.; Kwon, G.; Hill, J. R.; Marshall, C. A.; Corbett, J. A. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1996**, *211*, 24.
17. Guzik, T. J.; Korbut, R.; Adamek-guzik, T. *J. Physiol. Pharmacol.* **2003**, *54*, 469.
18. Park, S. H.; Kim, J. E.; Lee, N. H. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **2016**, *42*, 321.
19. Delort, E.; Jaquier, A.; Decorzant, E.; Chapuis, C.; Casilli, A.; Frerot, E. *Phytochemistry* **2015**, *109*, 111.
20. Qi, S. H.; Huang, L. S.; He, F.; Zhang, S.; Dong, J. D. *Biochemical Systematics and Ecology* **2012**, *43*, 128.
21. Xu, G. H.; Ryoo, I. J.; Kim, Y. H.; Choo, S. J.; Yoo, I. D. *Arch. Pharm. Res.* **2009**, *32*, 275.
22. Oliveira, D. M.; Siqueira, E. P.; Nunes, Y. R. F.; Cota, B. B. *Braz. J. Pharmacogn.* **2013**, *23*, 614.
23. Kim, D. K. *Natural Product Sciences* **2011**, *17*, 261.
24. Sun, C. L.; Tang, X. L.; Zhou, J. F.; Wu, H. *Nat. Prod. Res. Dev.* **2014**, *26*, 1793.
25. Areu, P. M.; Braham, H.; Jannet, H. B.; Mighri, Z.; Matthew, S. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 32.
26. Novaes, P.; Torres, P. B.; Cornu, T. A.; Lopes, J. C.; Ferreira, M. J. P.; Santos, D. Y. A. C. *South African Journal of Botany* **2019**, *123*, 253.
27. Kim, S. K.; Kim, H. J.; Choi, S. E.; Park, K. H.; Choi, H. K.; Lee, M. W. *Arch. Pharm. Res.* **2008**, *31*, 424.
28. Zhao, J.; Zhang, S.; You, S.; Liu, T.; Xu, F.; Ji, T.; Gu, Z. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 587.
29. Atay, I.; Ilter, A. Z.; Bagatur, Y.; Telci, D.; Goren, A. C.; Kirmizibekmez, H.; Yesilada, E. *Planta Med.* **2015**, *81*, 69.
-