

아까시나무 뿌리껍질의 항염증활성물질

강동민¹ · 박우성¹ · 김혜진¹ · 정우진¹ · 강권규² · 안미정^{1*}

¹경상국립대학교 약학대학 약학과, ²한경대학교 생명공학부 원예생명공학전공

Anti-inflammatory Constituents of *Robinia pseudoacacia* Root Bark

Dong-Min Kang¹, Woo Sung Park¹, Hye-Jin Kim¹, Woo-Jin Jeong¹,
Kwon Kyoo Kang², and Mi-Jeong Ahn^{1*}

¹College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Gyeongsang National University,
Jinju 52828, Korea

²Division of Horticultural Biotechnology, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

Abstract – *Robinia pseudoacacia* L. (Leguminosae) is widely distributed in Asia, North America and Europe. The root bark has been traditionally used for hemostasis, arthritis and hypertension. Therefore, this study was conducted to identify the biological activity and the bioactive constituents of the root bark. We found that the methanol extract obtained from the root bark of *R. pseudoacacia* reduced the level of ROS and NO production in LPS-induced inflammation of RAW 264.7 cell line. Among the fractions, methylene chloride fraction showed the highest inhibitory activity against the inflammation. Seven constituents (1-7) were isolated from this fraction, and the chemical structures were determined to be medicarpin (1), (-)-vestitol (2), indole 3-carboxaldehyde (3), 3-acetylindole (4), liquiritigenin (5), 4(1*H*)-quinolone (6) and 8-methoxyononin (7). Among the isolates, medicarpin (1), (-)-vestitol (2), 3-acetylindole (4) and liquiritigenin (5) inhibited ROS and NO production in a dose-dependent manner. This is the first study to show the anti-inflammatory activity of the root bark of *R. pseudoacacia*, and it is suggested that the four constituents (1, 2, 4, and 5) could play a role in the biological activity.

Keywords – *Robinia pseudoacacia*, Anti-inflammation, Nitric oxide, Reactive oxygen species

염증은 알러지 반응, 감염, 상처 및 화학적 자극과 같은 외부 자극에 반응하여 일어나는 자연스러운 인체의 방어기전 중 하나이다.¹⁾ 염증 반응이 일어나게 되면 TNF- α (tumor necrosis factor- α), COX-2(cyclooxygenase-2), NO(nitric oxide)와 ROS(reactive oxygen species) 등 여러 염증인자가 발현된다.²⁾ 하지만 염증이 만성화되면 암, 루푸스, 섬유 근육통, 류마티스 관절염 등의 중증질환으로도 발전할 수 있다.³⁾ 현재 과도한 염증반응을 막기 위하여 스테로이드와 비스테로이드성 소염진통제가 치료제로 사용되지만 이러한 약물들은 속쓰림과 복통, 궤양, 두통, 피로감 등 다양한 부작용이 있다.⁴⁾ 따라서, 부작용이 적고 효능이 좋은 항염증 제제의 개발이 요구되며, 그 원천소재로서 천연물에 관한 연구가 활발히 진행 중에 있다.⁵⁾

아까시나무(*Robinia pseudoacacia* L.)는 콩과(Leguminosae)의

여러해살이 낙엽교목으로 한국 각처의 산과 들에 분포하며, 전통적으로 지혈, 관절염 및 고혈압에 사용되어 왔다.⁶⁾ 한의학에서는 아까시나무의 꽃을 자괴화(刺槐花)라 하여 감(甘), 평(平)한 약성으로 지혈(止血)의 효능을 가지고 있어 대장하혈(大腸下血), 객혈(咯血), 토혈(吐血), 혈붕(血崩)을 치료하는데 사용하며, 고혈압에 차로 끓여 복용한다. 또한, 아까시나무의 뿌리를 자괴근(刺槐根)이라 하여 고(苦), 미한(微寒)한 약성으로 양혈지혈(涼血止血), 서근활락(舒筋活絡)의 효능을 가지고 있어 변혈(便血), 객혈(咯血), 토혈(吐血), 붕루(崩漏), 노상핍력(勞傷乏力), 풍습골통(風濕骨痛), 질타손상(跌打損傷)을 치료하는데 사용한다.^{7,8)}

아까시나무의 성분으로는 수피에서 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl 3 β , 22 β -dihydroxyolean-12-en-29-oic acid, abrisapogenol B 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranoside 등과 같은 triterpene glycoside 계열들이 분리 보고되었고,⁹⁾ norathyriol, urolithin C, urolithin M6, catechin lactone A,

*교신저자(E-mail): amj5812@gnu.ac.kr
(Tel): +82-55-772-2425

bis(2-ethylhexyl)phthalate 등의 phenolic 계열 성분들이 분리 보고되었다.¹⁰⁾ 심재에서는 stilbene 계열인 resveratrol, piceatannol이 보고되었으며,¹¹⁾ 2,3-*trans*-3,4-*cis*-3,4,7,3',4',5'-hexahydroxy flavan, 4'-methoxy-2,3-*trans*-3,4-*cis*-3,4,7,3',5'-pentahydroxy flavan 등의 dihydroflavonols, dihydroflavones, flavonols, chalcones과 같은 flavonoid 계열을 포함한 여러 phenolic 계열 화합물들이 분리 보고되었다.^{12,13)} 잎에서는 flavonoid계열인 robipseudin A, kuwanon S이 분리 보고되었으며,¹⁴⁾ luteolin 7-*O*- β -D-glucuronopyranosyl-(1 \rightarrow 2)[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranoside 등의 flavonoid 배당체도 분리 보고되었다.¹⁵⁾ 한편, 아까시나무의 근피에서는 flavonoid 계열인 (-)-vestitol, isoliquiliginin, 7-*O*- β -D-glucopyranosyl-4',8-dimethoxy-isoflavone, medicarpin, biochanin A, formononetin, 3'-methoxydaidzein 등이 분리 보고되었다.¹⁶⁾ 아까시나무와 관련한 생리활성연구로는 현재까지 아까시나무 잎과 줄기껍질(수피)의 항염증작용¹⁷⁾과 꽃의 항산화작용은 보고되어 있으나,¹⁸⁾ 뿌리껍질(근피)의 생리활성에 관한 연구는 보고된 적이 없다. 따라서, 본 연구에서는 아까시나무 뿌리껍질의 항염증활성을 측정하고 그 활성물질을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 – 경상남도 진주시 집현면 일대에서 아까시나무 (*R. pseudoacacia*)의 근피(4.7 kg)를 2020년 3월 채집하여 실험에 사용하였으며, 경상국립대학교 약학대학 안미정 박사의 감정을 받은 후 사용하였다.

시약 및 기기 – NMR 분석에 사용한 기기는 Bruker DRX-500 spectrometers(Billerica, MA, USA)이며, MS 측정에는 Jeol JMS-700(Tokyo, Japan)을 사용하였다. 흡광도는 PerkinElmer Victor X5(Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였고, HPLC 분석에는 Agilent 1260 HPLC system (Santa Clara, CA, USA)을 사용하였다. 컬럼크로마토그래피를 충전하는 재료로는 Merck Silica gel 60, 0.040-0.063 mm (Darmstadt, Germany)와 GE Healthcare Sephadex LH-20 (Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 메탄올, *n*-헥산(*n*-hexane), 메틸렌클로라이드(CH₂Cl₂), 에틸아세테이트(EtOAc), *n*-부탄올(*n*-BuOH)은 Daejung Chemicals & Metals(Siheung, South Korea)에서 구입하였으며, HPLC용 물과 아세트니트릴은 Fisher Scientific(Hampton, NH, USA)에서 구입하여 사용하였다. NMR 용매는 Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. HPLC를 제외한 실험에 사용한 물은 탈이온수(DDW, deionized water)로 MDM Wellix plus 2(Suwon, South Korea)를 사용하여 얻었다. 세포생존율과 항염증실험에 사용된 MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide)와 sulfanilamide, *N*-(1-

Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, NaNO₂, DCFH₂-DA(2',7'-dihydrodichlorofluorescein)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

추출 및 분획 – 아까시나무의 근피(4.7 kg)를 잘게 잘라 음건하여, 메탄올로 60분씩 3회 초음파 추출하고 여과하였다. 이를 감압농축하여 메탄올 추출물 600 g을 얻었으며, 물에 현탁하고 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH 및 물의 순서대로 층분리를 실시하여 각각 70 g, 8.5 g, 118 g, 400 g의 분획물을 얻었다. 이 중 CH₂Cl₂ 분획물에 대하여 *n*-hexane과 EtOAc, 메탄올의 혼합용액(100:0:0 \rightarrow 0:100:0 \rightarrow 0:0:100)을 전개용매로 open silica gel 컬럼크로마토그래피(CC)를 실시하여 7개의 소분획물(fr.1 ~ fr.7)을 얻었다. 이 중 fr.4에 대하여 같은 용매로 silica gel CC로 분리한 후 fr.4.3을 메탄올로 재결정화하여 화합물 1(20 mg)을 얻었다. fr.4.4를 클로로포름과 메탄올의 혼합용액을 전개용매로 silica gel CC를 실시하여 4개의 소분획물(fr.4.4a ~ fr.4.4d)을 얻었고 이 중 fr.4.4c에 대하여 메탄올을 전개용매로 Sephadex LH-20 CC를 실시하여 화합물 2(58 mg)를 얻었다. 클로로포름과 메탄올의 혼합용액을 전개용매로 fr.4.5에 대하여 silica gel CC를 실시하여 4개의 소분획물(fr.4.5a ~ fr.4.5d)을 얻었다. 소분획물 fr.4.5b에 대하여 Luna C18 column(250 \times 4.6 mm, 5 μ m)을 사용하여 30°C 조건에서 prep-HPLC를 실시하였다. 물과 아세트니트릴의 혼합용액을 전개용매로 처음 20분간은 아세트니트릴 20%에서 25%로 흘려준 후 5분간 용매조성을 유지하여 화합물 3(3 mg, *t*_R 17 min)과 화합물 4(3 mg, *t*_R 20 min)를 얻었다. 소분획물 fr.4.5d에 대하여 물과 아세트니트릴의 혼합용액(65:35)을 전개용매로 isocratic 조건하에 prep-HPLC를 실시하여 화합물 5(3 mg, *t*_R 8 min)를 얻었다. 소분획물 fr.6에 대하여 클로로포름과 메탄올의 혼합용액을 전개용매로 silica gel CC를 실시하여 4개의 소분획물(fr.6.1 ~ fr.6.4)을 얻었으며, fr.6.2와 fr.6.4에 대하여 각각 메탄올을 전개용매로 하여 Sephadex LH-20 CC를 실시하여 화합물 6(11 mg)과 화합물 7(8 mg)을 얻었다.

Medicarpin(1)¹⁹⁾ – Red sticky powder; C₁₆H₁₄O₄ EI-MS (*m/z*): 270 [M]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ ppm): δ 7.41 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-1), 7.15 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H-7), 6.57 (1H, dd, *J*=8.4, 2.4 Hz, H-2), 6.48 (1H, dd, *J*=8.8, 2.2 Hz, H-8), 6.47 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H-10), 6.43 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-4), 5.51 (1H, d, *J*=6.7 Hz, H-11a), 4.25 (1H, dd, *J*=10.9 Hz, H-6eq), 3.79 (3H, s, 9-OCH₃), 3.64 (1H, t, *J*=10.9 Hz, H-6ax), 3.55 (1H, m, H-6a); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ ppm): δ 161.2 (C-9), 160.7 (C-10a), 157.1 (C-3), 156.7 (C-4a), 132.2 (C-1), 124.8 (C-7), 119.1 (C-6b), 112.6 (C-11b), 109.8 (C-2), 106.4 (C-10), 103.7 (C-4), 96.9 (C-8), 78.6 (C-11a), 66.6 (C-6), 55.5 (C-6a), 39.5 (9-OCH₃).

(-)-Vestitol(2)²⁰⁾ – Red sticky powder; C₁₆H₁₆O₄ EI-MS

(*m/z*): 272 [M]⁺; ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, δ ppm): δ 6.96 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-6'), 6.87 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H-5), 6.40 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-3'), 6.38 (1H, dd, $J=8.2, 2.4$ Hz, H-5'), 6.31 (1H, dd, $J=8.2, 2.4$ Hz, H-6), 6.24 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-8), 4.23 (1H, dd, $J=10.2, 3.4$ Hz, H-2b), 3.94 (1H, t, $J=10.2$ Hz, H-2a), 3.72 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.44 (1H, m, H-3), 2.93 (1H, dd, $J=15.6, 10.8$ Hz, H-4a), 2.78 (1H, dd, $J=15.6, 5.2$ Hz, H-4b); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD, δ ppm): δ 159.4 (C-4'), 156.1 (C-7), 155.8 (C-2'), 155.0 (C-9), 129.8 (C-5), 127.4 (C-6'), 119.9 (C-1'), 113.6 (C-10), 107.6 (C-6), 104.4 (C-5'), 102.4 (C-8), 101.1 (C-3'), 69.7 (C-2), 54.2 (4'-OCH₃), 31.7 (C-3), 29.9 (C-4).

Indole 3-carboxaldehyde(3)²¹ – White powder; C₉H₇NO EI-MS (*m/z*): 145 [M]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD, δ ppm): δ 9.90 (1H, s, H-8), 8.17 (1H, dd, $J=7.8, 1.3$ Hz, H-4), 8.10 (1H, s, H-2), 7.49 (1H, dd, $J=7.8, 1.1$ Hz, H-7), 7.29 (1H, td, $J=7.8, 1.3$ Hz, H-6), 7.25 (1H, td, $J=7.8, 1.1$ Hz, H-5); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD, δ ppm): δ 186.0 (C-8), 138.3 (C-2), 137.5 (C-7a), 124.3 (C-3a), 123.6 (C-6), 122.2 (C-5), 120.9 (C-4), 118.7 (C-3), 111.7 (C-7).

3-Acetylindole(4)²² – White powder; C₁₀H₉NO EI-MS (*m/z*): 159 [M]⁺; ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, δ ppm): δ 8.24 (1H, d, $J=6.2$ Hz, H-4), 8.16 (1H, s, H-2), 7.45 (1H, d, $J=6.2$ Hz, H-7), 7.23 (2H, m, H-5, 6), 2.54 (3H, s, H-9); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD, δ ppm): δ 195.1 (C-8), 137.1 (C-7a), 134.1 (C-2), 125.4 (C-3a), 122.9 (C-6), 121.8 (C-5), 121.4 (C-4), 117.1 (C-3), 111.4 (C-7), 25.8 (C-9).

Liquiritigenin(5)²³ – Yellow sticky powder; C₁₅H₁₂O₄ EI-MS (*m/z*): 256 [M]⁺; ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, δ ppm): δ 7.74 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-5), 7.34 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.83 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3', 5'), 6.51 (1H, dd, $J=8.7, 2.1$ Hz, H-6), 6.37 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 5.40 (1H, dd, $J=13.0, 2.9$ Hz, H-2), 3.07 (1H, dd, $J=17.0, 13.0$ Hz, H-3b), 2.70 (1H, dd, $J=17.0, 2.9$ Hz, H-3a); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD, δ ppm): δ 192.1 (C-4), 165.5 (C-7), 164.2 (C-9), 157.6 (C-4'), 129.9 (C-1'), 128.5 (C-5), 127.6 (C-2', 6'), 114.9 (C-3', 5'), 113.5 (C-10), 110.4 (C-6), 102.4 (C-8), 79.6 (C-2), 43.6 (C-3).

4(1*H*)-Quinolone(6)²⁴ – Brown powder; C₉H₇NO EI-MS (*m/z*): 145 [M]⁺; ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, δ ppm): δ 8.26 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5), 7.98 (1H, d, $J=7.3$ Hz, H-2), 7.71 (1H, t, $J=8.3$ Hz, H-7), 7.59 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-8), 7.42 (1H, t, $J=8.3$ Hz, H-6), 6.35 (1H, d, $J=7.3$ Hz, H-3); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD, δ ppm): δ 179.3 (C-4), 140.3 (C-8a), 140.2 (C-2), 132.1 (C-7), 125.4 (C-4a), 124.8 (C-5), 123.9 (C-6), 118.2 (C-8), 108.4 (C-3).

8-Methoxyononin(7)²⁵ – White powder; C₂₃H₂₄O₁₀ ESI-MS (*m/z*): 483 [$M+Na$]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): δ 8.49 (1H, s, H-2), 7.81 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-5), 7.53 (2H, d, $J=8.9$ Hz, H-2', 6'), 7.37 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-6), 7.01 (2H, d, $J=8.9$ Hz, H-3', 5'), 5.11 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-1''), 3.95 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.80 (3H, s, 8-OCH₃), 3.71(1H, ddd, $J=11.8, 5.3, 1.9$ Hz, H-6''a), 3.49 (1H, m, H-6''b), 3.41 (1H, m, H-5'), 3.36 (2H, m, H-2', 3'), 3.21 (1H, m, H-4''); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): δ 175.3 (C-4), 159.5 (C-4'), 154.5 (C-7), 154.14 (C-2), 150.5 (C-9), 137.3 (C-8), 130.6 (C-2', 6'), 124.4 (C-1'), 123.6 (C-3), 120.8 (C-5), 119.8 (C-10), 114.5 (C-6), 114.1 (C-3', 5'), 100.9 (C-1''), 77.7 (C-5''), 77.2 (C-3''), 73.8 (C-2''), 70.0 (C-4''), 61.7 (8-OCH₃), 61.1 (C-6''), 55.6 (4'-OCH₃).

RAW 264.7 세포배양 – 실험에 사용한 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium) 배지에 배양하였다. 배양은 5% CO₂, 37°C의 조건에서 48 시간마다 배양하였다.

세포생존율 측정 – RAW 264.7 세포를 1 × 10⁶ cells/ml 농도로 96 well에 분주하여 24시간 배양한 다음 시료를 처리하여 각각의 실험에 사용하였다. 세포 생존율의 실험은 MTT assay를 이용하였고, thiazolyl blue tetrazolium bromide를 0.5 mg/ml로 녹여 MTT 시약으로 사용하였다. 이후 MTT 시약을 넣고 반응시킨 후 상등액을 제거하고 DMSO를 넣고 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

항염증활성 측정 – 항염증활성을 확인하기 위해서 ROS와 NO의 생성량을 측정하였으며, ROS와 NO 생성의 측정은 다음의 과정을 따랐다. 배양된 RAW 264.7 세포에 LPS 1 μ g/ml로 처리한 후 24시간 후 상등액은 Griess 시약을 넣고 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성량을 확인하였으며, 표준물질로 NaNO₂를 사용하여 검량선을 만든 후 환산하였다. 상등액을 제거한 배지에 DCFH₂-DA 시약을 넣은 후 형광도(Excitation, 485 nm; Emission, 535 nm)를 측정하여 ROS의 생성량을 확인하였다.

HPLC 분석 – 분석 시료는 CH₂Cl₂ 분획물 10 mg을 DMSO 1 ml에 녹였으며, 표준물질인 medicarpin과 (-)-vestitol을 1 mM 농도로 메탄올에 녹여 사용하였다. 분석에는 Luna C18 column(250 × 4.6 mm, 5 μ m)을 사용하여 물과 아세트오니트릴의 혼합용액을 전개용매로 처음 40분간 아세트오니트릴 10%에서 60%로 흘러주었다. 이후 15분간은 아세트오니트릴 60%에서 100%로 높여주었다. 칼럼 온도는 30°C로 유지하였고, 시료 주입량은 5 μ l, 유속은 1.0 ml/min으로 하여 210 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리 – 모든 데이터는 3회 반복으로 시행하였으며, 평

균값(mean) ± 표준편차(standard deviation)로 표현하였다. 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)은 Microsoft Excel 2019 (Redmond, WA, USA)를 이용하여 신뢰구간 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 으로 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

아까시나무(*R. pseudoacacia* L.) 근피의 메탄올 추출물이 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 cell에서의 ROS와 NO

생성을 농도의존적으로 저해하는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 메탄올 추출물을 극성에 따라 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, 물분획물의 4가지로 분리하였다. 4가지 분획물의 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성을 조사한 결과 200 µg/ml의 농도까지 세포 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인하였으며, 따라서 분획물의 최종농도가 25, 50, 100, 200 µg/ml이 되도록 실험에 사용하였다(Fig. 1A). 분획물의 ROS 생성을 억제하는 것을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 시료를 처리하고 LPS를 넣은 후 배양하여 생성된 ROS의

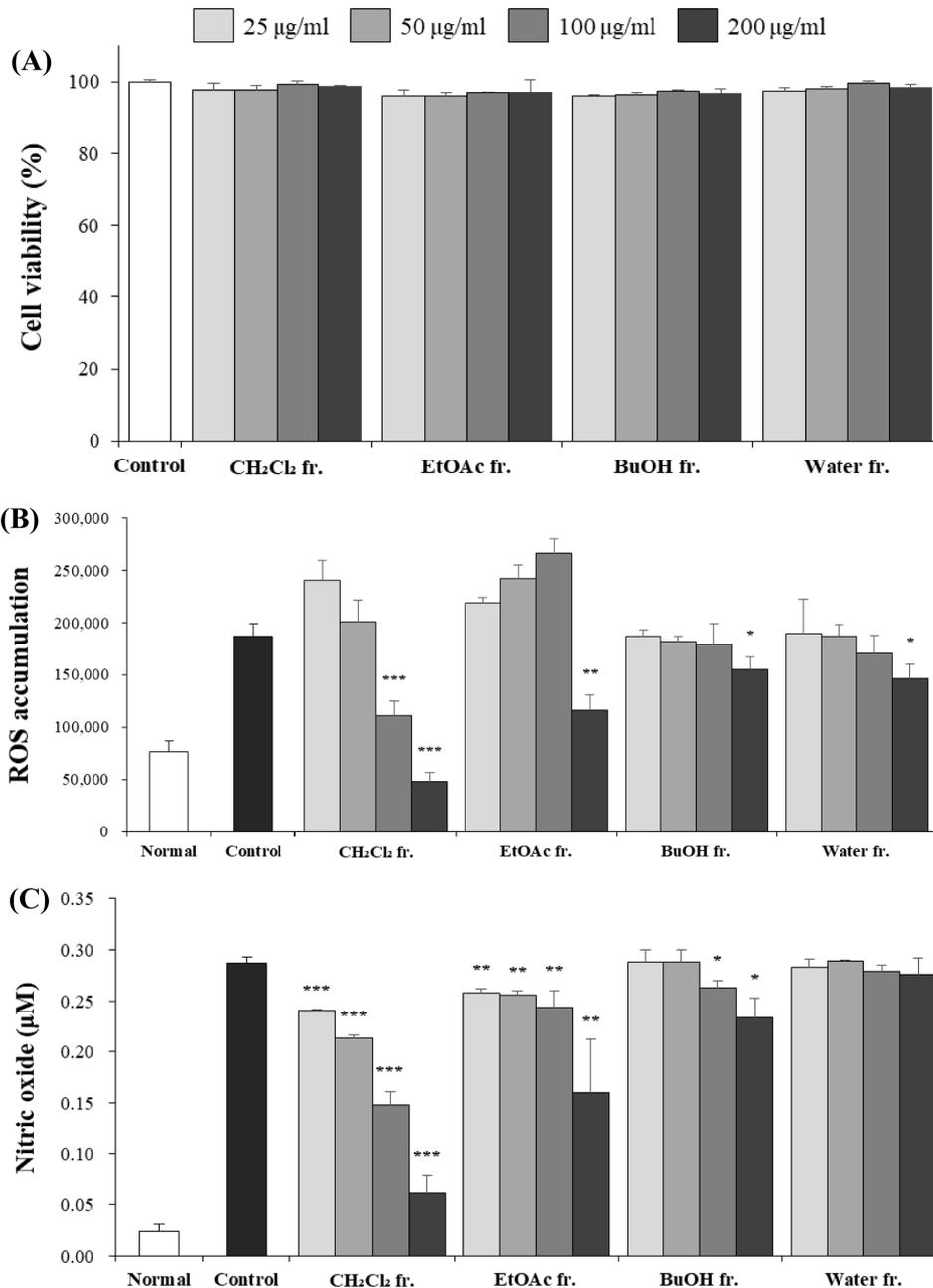


Fig. 1. Anti-inflammatory effect of four fractions from the methanol extract of *R.pseudoacacia*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, when compared with control.

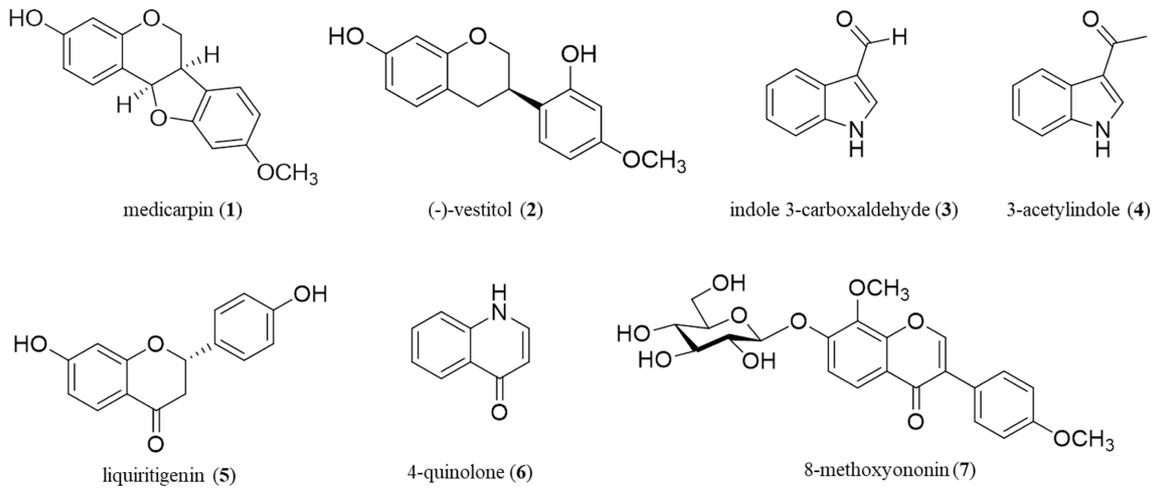


Fig. 2. Seven compounds (1-7) isolated from the rook bark of *R. pseudoacacia*.

양을 측정하였다. 그 결과, CH_2Cl_2 분획물이 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 40%, 74%로 농도의존적으로 강한 억제활성을 보였다. EtOAc 분획물은 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서만 37%의 억제활성을 보였고, *n*-BuOH 분획물, 물분획물은 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 17%, 21%의 억제활성을 보이는 데 그쳤다(Fig. 1B). NO 생성량에서도 비슷한 경향성이 나타났는데 CH_2Cl_2 분획물의 경우, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 48%, 78%의 가장 높은 억제활성을 보였다. EtOAc와 *n*-BuOH 분획물은 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 44%, 19%의 억제활성을 보였다(Fig. 1C).

4종류의 분획물 중에서 CH_2Cl_2 분획물이 ROS와 NO 생성을 가장 강하게 억제하였으므로, CH_2Cl_2 분획물에 대하여 항염증활성물질 분리를 시도하였다. 그 결과, 7개의 화합물을 얻었으며, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, EI-MS, ESI-MS와 같은 분광학적 데이터를 바탕으로 각 화합물의 화학구조를 medicarpin(1), (-)-vestitol(2), indole 3-carboxaldehyde(3), 3-acetylindole(4), liquiritigenin(5), 4-(1*H*)quinolone(6), 8-methoxyononin(7)으로 동정하였다(Fig. 2). 한편, CH_2Cl_2 분획물에 대하여 HPLC 분석을 실시하여 CH_2Cl_2 분획물에서 관찰되는 두 개의 주요한 피크를 각각 (-)-vestitol (t_R , 32 min)과 medicarpin (t_R , 35 min)으로 규명하였다(Fig. 3).

분리한 화합물(1-7)은 200 μM 농도까지 세포독성을 나타내지 않았으므로, 항염증활성 측정에서 각 화합물의 최종농도가 각각 25, 50, 100, 200 μM 이 되도록 사용하였다(Fig. 4A). RAW 264.7 세포에서의 ROS 생성량을 확인한 결과, medicarpin(1), (-)-vestitol(2), 3-acetylindole(4), liquiritigenin(5), 4-(1*H*)quinolone(6)이 농도의존적으로 LPS 처리에 의해 증가된 ROS 생성을 감소시키는 것을 확인하였다. 그 중에서 medicarpin이 100, 200 μM 에서 각각 46, 89%의 가장 강한 억제활성을 보였다. (-)-Vestitol은 각각 20%와 75%, 3-acetylindole은 각각 35%와 43%, liquiritigenin은 각각 24%와

43%, 4-(1*H*)quinolone은 각각 31%와 40%의 억제활성을 보였다(Fig. 4B). NO 생성량에 있어서는 medicarpin(1)과 (-)-vestitol(2), 3-acetylindole(4), liquiritigenin(5)이 농도의존적으로 LPS 처리에 의해 증가된 NO 생성을 억제하였다. Medicarpin은 100, 200 μM 에서 각각 80, 89%의 가장 강한 억제활성을 보였다. (-)-Vestitol은 각각 60%와 86%, 3-acetylindole은 각각 31%와 38%, liquiritigenin은 각각 32%와 85%의 억제활성을 보였다(Fig. 4C).

현재까지 아까시나무 근피의 항염증활성은 보고된 적이 없으며, 분리한 화합물(1-7) 중 indole 3-carboxaldehyde(3)와 3-acetylindole(4), 4-quinolone(6)은 이 식물에서 처음으로 분리되는 화합물이다. 7가지 화합물 중 medicarpin(1)과 (-)-vestitol(2), 3-acetylindole(4), liquiritigenin(5)의 4가지 화합물은 LPS로 유도한 RAW 264.7 cell에서 ROS와 NO의 생성량을 농도의존적으로 감소시켰으므로써 항염증활성을 보였다. Medicarpin은 LPS로 유도한 RAW 264.7 cell에서 NO 생성을 저해하며, leukotriene의 생성을 억제하여 항염증활성을 나타낸다는 연구결과가 있다.²⁶⁾ 또한 (-)-vestitol과 liquiritigenin은 NF- κ B의 활성을 억제하여 NO, TNF- α , IL-6 등의 염증인자의 생성을 저해한다고 보고되었다.^{27,28)} 3-Acetylindole의 항염증활성은 처음으로 보고되는 것이다. HPLC 분석에서 medicarpin과 (-)-vestitol이 CH_2Cl_2 분획물의 주요 성분이었으므로, 이 두 성분을 해당 분획물의 주요 활성물질로 볼 수 있다. 이상으로 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포를 사용하여 아까시나무 근피의 ROS와 NO 생성억제활성을 확인하였으며, 아까시나무 근피의 메탄올추출물과 CH_2Cl_2 분획물, 근피로부터 분리한 4가지 화합물의 염증질환치료제 후보 물질로의 가능성을 확인하였다.

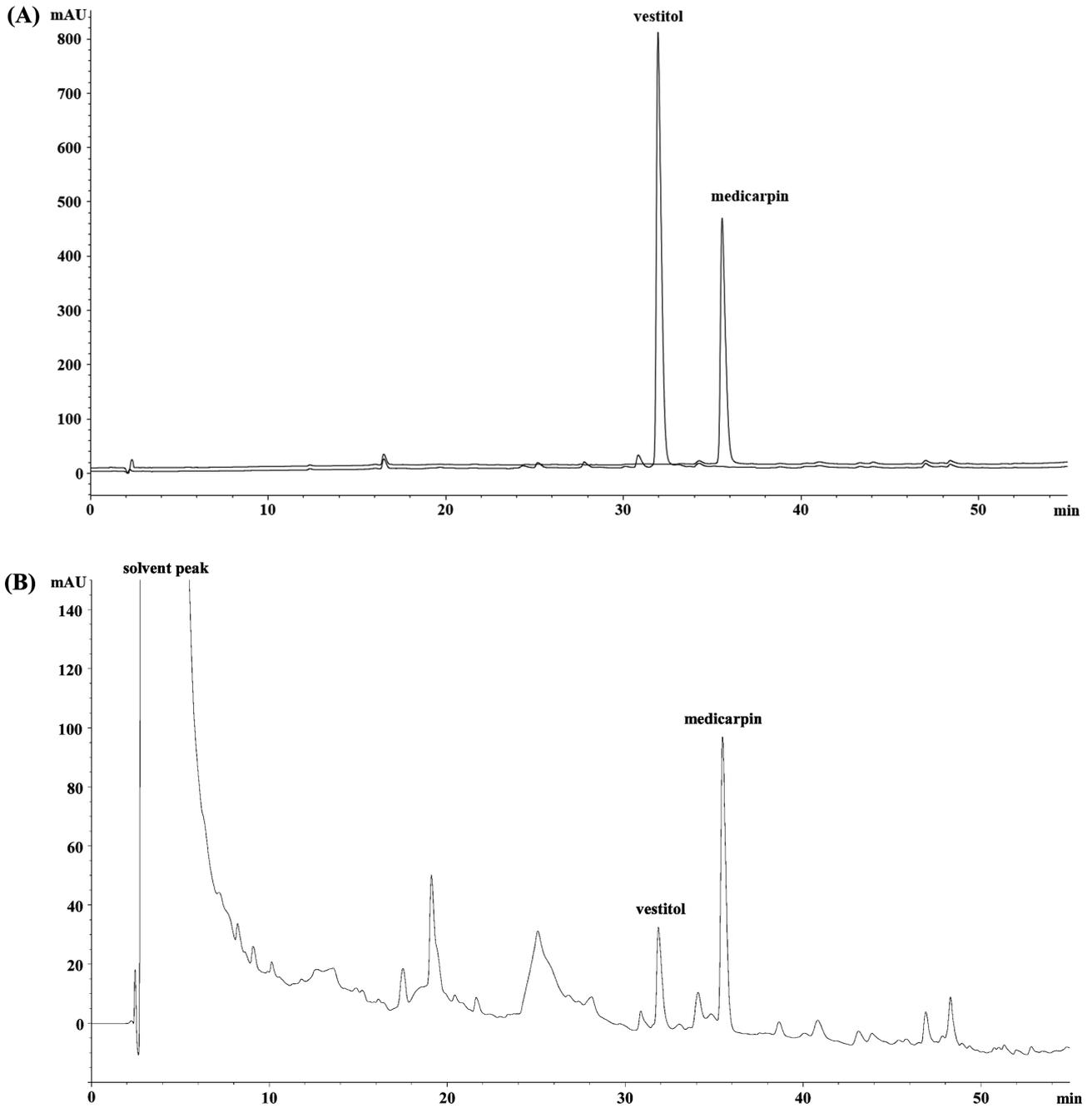


Fig. 3. HPLC chromatograms of standard solutions at 1 mM concentration of (-)-vestitol and medicarpin (A), and the CH₂Cl₂ fraction from *R. pseudoacacia* root bark (10 mg/ml) (B).

결론

아까시나무의 근피 추출물의 CH₂Cl₂ 분획물에서 강한 항염증활성을 관찰하였으며, 이로부터 7개의 화합물을 분리하였다. 분리한 화합물 중 indole 3-carboxaldehyde(3)와 3-acetylindole(4), 4-quinolone(6)은 이 식물에서 처음으로 분

리되는 화합물이다. 또한 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에서 medicarpin(1)과 (-)-vestitol(2), 3-acetylindole(4), liquiritigenin(5)은 ROS와 NO 수치를 농도의존적으로 감소시켰다. 본 연구를 통하여 아까시나무 근피의 항염증활성을 처음으로 밝혔으며, 그 주요 활성물질이 medicarpin과 (-)-vestitol, 3-acetylindole, liquiritigenin임을 규명하였다.

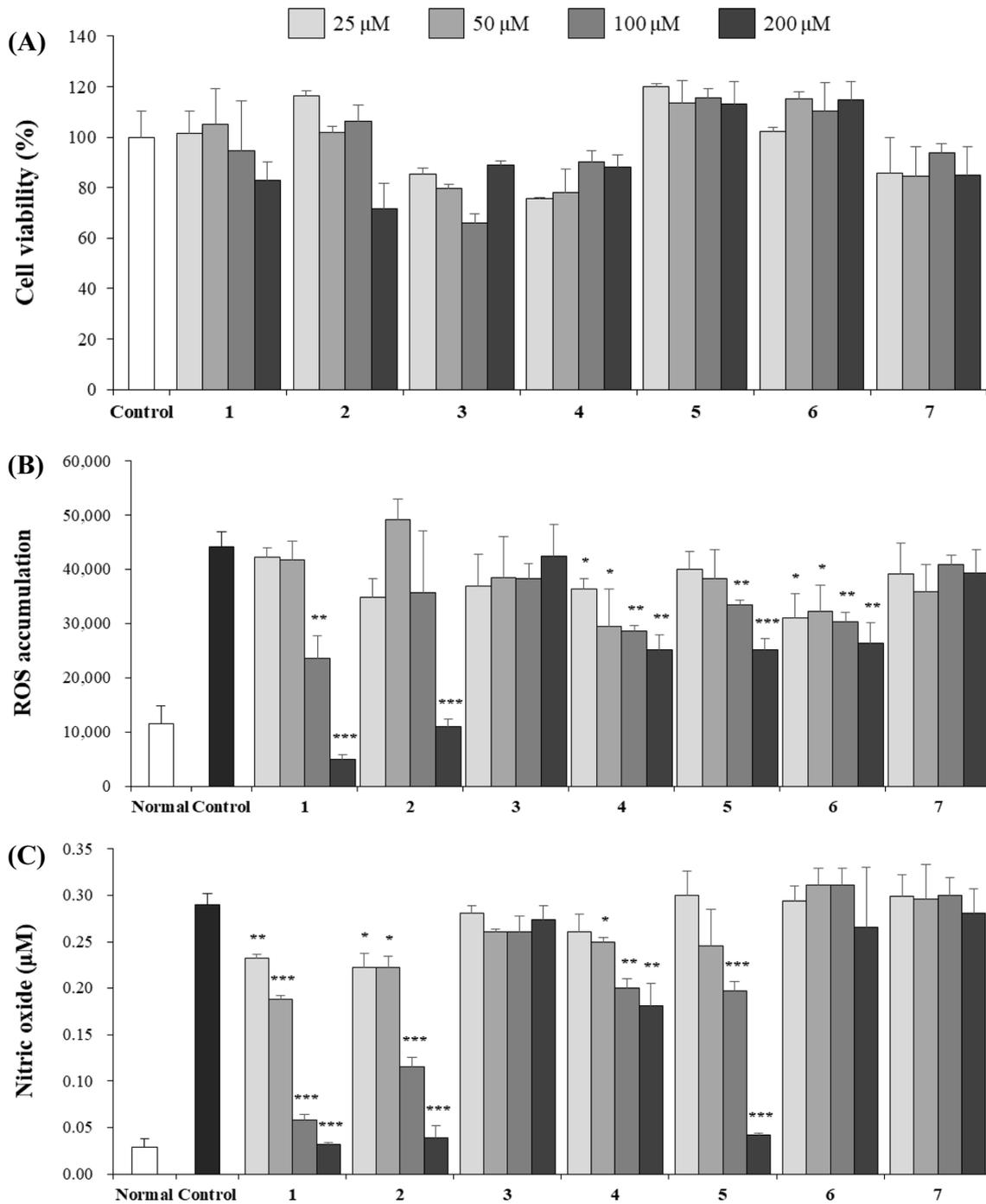


Fig. 4. Anti-inflammatory activity of seven compounds from the root bark of *R. pseudoacacia*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, when compared with control. 1, medicarpin; 2, (-)-vestitol; 3, indole 3-carboxaldehyde; 4, 3-acetylindole; 5, liquiritigenin; 6, 4(1*H*)-quinolone; 7, 8-methoxyononin.

사 사

인용문헌

이 논문은 2021년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. 2021R111A4A0105729511)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

1. Isailovic, N., Daigo, K., Mantovani, A. and Selmi, C. (2015) Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J. Autoimmun.* **60**: 1-11.

2. Somasundaram, V., Gilmore, A. C., Basudhar, D., Palmieri, E. M., Scheiblin, D. A., Heinz, W. F., Cheng, R. Y. S., Ridnour, L. R., Altan-Bonnet, G., Lockett, S. J., McVica, D. W. and Wink, D. A. (2020) Inducible nitric oxide synthase-derived extracellular nitric oxide flux regulates proinflammatory responses at the single cell level. *Redox Biol.* **28**: 101354.
3. Lee, T. H., Kwak, H. B., Kim, H. H., Lee, Z. H., Chung, D. K., Baek, N. I. and Kim, J. Y. (2007) Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF- κ B transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol. Cells* **23**: 398-404.
4. Singh, G. and Triadafilopoulos, G. (1999) Epidemiology of NSAID induced gastrointestinal complications. *J. Rheumatol. Suppl.* **56**:18-24.
5. Wang, Y. H. and Zeng, K. W. (2019) Natural products as a crucial source of anti-inflammatory drugs: recent trends and advancements. *J. Tradit. Chin. Med.* **4**: 257-268.
6. 이창복(1985) 원색 대한식물도감 (상). 향문사, 서울, p633.
7. 정보섭(1990) 향약대사전. 영림사, 서울, p706.
8. 國家中醫藥管理局 中化本草 編委會(1999) 中化本草 (4). 上海科學技術出版社, Shanghai, p624.
9. Cui, B., Kinzo, J. and Nohara, T. (1993) Triterpene glycosides from the bark of *Robinia pseudo-acacia* L. *Chem. Pharm. Bull.* **41**: 553-556.
10. Hong, S. H., Suh, H. J. and Oh, J. S. (2017) Phenolic chemical constituents of the stem barks of *Robinia pseudoacacia*. *Chem. Nat. Compd.* **53**: 359-361.
11. Sergeant, T., Kohnen, S., Jourez, B., Beauve, C., Schneider, Y. J. and Vincke, C. (2014) Characterization of black locust (*Robinia pseudoacacia* L. heartwood extractives: identification of resveratrol and piceatannol. *Wood Sci. Technol.* **48**: 1005-1017.
12. Bae, Y. S., Ham, Y. H. and Kim, J. K. (2000) New flavan 3,4-diol derivatives from the heartwood of *Robinia pseudoacacia*. *Mokchae Konghak* **28**: 25-28.
13. Sanz, M., Simon, B. F. D., Esteruelas, E., Munoz, A. M., Cadahía, E., Hernandez, T., Estrella, I. and Pinto, E. (2011) Effect of toasting intensity at cooperage on phenolic compounds in acacia (*Robinia pseudoacacia*) heartwood. *J. Agric. Food Chem.* **59**: 3135-3145.
14. Zhang, L., B., Lv, J. L. and Zhang, H. (2013) Geranyl flavonoids from *Robinia pseudoacacia*. *Nat. Prod. Commun.* **8**: 335-336.
15. Veitch, N. C., Elliott, P. C., Kite, G. C. and Lewis, G. P. (2010) Flavonoid glycosides of the black locust tree, *Robinia pseudoacacia*. *Phytochemistry* **71**: 479-486.
16. Kwon, Y. S., Jeon, S. H. and Kim, C. M. (2000) Isoflavonoids from the root cortex of *Robinia pseudo-acacia*. *Nat. Prod. Sci.* **6**: 139-141.
17. Kim, H. S., Jang, J. M., Yun, S. Y., Zhou, D., Piao, Y., Ha, H. C., Back, M. J., Shin, I. C. and Kim, D. K. (2019) Effect of *Robinia pseudoacacia* leaf extract on interleukin-1 β -mediated tumor angiogenesis. *In vivo* **33**: 1901-1910.
18. Ji, H. F., Du, A. L., Zhang, L. W., Xu, C. Y., Yang, M. D. and Li, F. F. (2012) Effects of drying methods on antioxidant properties in *Robinia pseudoacacia* L. flowers. *J. Med. Plants Res.* **6**: 3233-3239.
19. Yahara, S., Ogata, T., Saijo, R., Konishi, R., Yamahara, J., Miyahara, K. and Nohara, T. (1989) Isoflavan and related compounds from *Dalbergia odorifera*. I. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 979-987.
20. Zhao, X., Mei, W., Gong, M., Zuo, W., Bai, H. and Dai, H. (2011) Antibacterial activity of the flavonoids from *Dalbergia odorifera* on *Ralstonia solanacearum*. *Molecules* **16**: 9775-9782.
21. Ashour, M. A., Elkhayat, E. S., Ebel, R., Edrada, R. and Proksch, P. (2007) Indole alkaloid from the Red Sea sponge *Hyrtios erectus*. *ARKIVOC* xv: 225-231.
22. Guchhait, S. K., Kashyap, M. and Kamble, H. (2011) ZrCl₄-mediated regio- and chemoselective friedel-crafts acylation of indole. *J. Org. Chem.* **76**: 4753-4758.
23. Khamsan, S., Liawruangrath, S., Teerawutkulrag, A., Pyne, S., Garson, M. and Liawruangrath, B. (2012) The isolation of bioactive flavonoids from *Jacaranda obtusifolia* H. B. K. *ssp. rhombifolia* (G. F. W. Meijer) Gentry. *Acta Pharm.* **62**: 181-190.
24. Bunce, R. A. and Nammalwar, B. (2010) 4(1H)-Quinolinones by a tandem reduction-addition-elimination reaction. *Org. Prep. Proced. Int.* **42**: 557-563.
25. Neng, T. R., Bo, Q. X., Hong, G. S., Ping, X. P., Yang, S. Y. and An, G. D. (2012) Chemical constituents of *Spatholobus suberectus*. *Chin. J. Nat. Med.* **10**: 0032-0035.
26. Miller, D. K., Sadowski, S., Han, G. Q. and Joshua, H. (1989) Identification and isolation of medicarpin and a substituted benzofuran as potent leukotriene inhibitors in an anti-inflammatory Chinese herb. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **38**: 137-143.
27. Bueno-Silva, B., Rosalen, P. L., Alencar, S. M. and Mayer, M. P. A. (2020) Vestitol drives LPS-activated macrophages into M2 phenotype through modulation of NF- κ B pathway. *Int. Immunopharmacol.* **82**: 106329.
28. Kim, Y. W., Zhao, R. J., Park, S. J., Lee, J. R., Cho, I. J., Yang, C. H., Kim, S. G. and Kim, S. C. (2008) Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF- κ B-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Br. J. Pharmacol.* **154**: 165-173.

(2022. 3. 17 접수; 2022. 3. 23 심사;
2022. 3. 24 게재확정)