

## 수국 꽃 추출물 유래 항산화 및 항염 활성 성분

조연정<sup>1,\*</sup> · 이용범<sup>2</sup> · 현지선<sup>1</sup> · 김창윤<sup>1</sup> · 이남호<sup>1,3,†</sup>

<sup>1</sup>(사)제주산학융합원 연구개발팀

<sup>2</sup>제주한의학연구원 연구개발팀

<sup>3</sup>제주대학교 화학·코스메틱스학과, 교수

(2020년 9월 25일 접수: 2020년 10월 30일 수정: 2020년 10월 30일 채택)

### Anti-oxidative and Anti-inflammatory Constituents from the Extracts of *Hydrangea macrophylla* Flowers

Yeon Jeong Jo<sup>1</sup> · Yong bum Lee<sup>2</sup> · Ji Seon Hyun<sup>1</sup> · Chang Yun Kim<sup>1</sup> · Nam Ho Lee<sup>1,3,†</sup>

<sup>1</sup>R&D Team, Jeju Industry-University Convergence Center, Korea

<sup>2</sup>R&D Tem, Jeju Institute of Korean Medicine, Korea

<sup>3</sup>Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Korea

(Received September 25, 2020; Revised October 30, 2020; Accepted October 30, 2020)

**요약** : 본 연구에서는 수국 꽃 추출물 및 용매 분획물의 항산화, 항염 활성을 확인하고 유효성분을 분리하여 화학구조를 규명하였다. 항산화 활성을 확인하기 위하여 DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성을 측정하였으며, 항염 활성은 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 nitric oxide (NO) 생성 억제 효과로 측정하였다. 실험 결과, 에틸아세테이트 분획물에서 우수한 항산화 및 항염 활성을 확인하였으며 크로마토그래피를 실시하여 3개의 유효 성분을 분리하였고 NMR 데이터 분석을 통하여 화학구조를 동정하였다: Hydrangenol (1), prunin (2), astragaln (3). 분리된 화합물 1-3에 대하여 HPLC 분석을 수행한 결과 hydrangenol이 수국 꽃 추출물의 주요 성분으로 확인되었다. 화합물 1-3의 항염 활성을 확인한 결과 세포 독성 없이 NO의 생성을 감소시키는 것으로 나타났다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 수국 꽃 추출물은 천연 항산화 및 항염 소재로써 활용이 가능할 것으로 사료된다.

**주제어** : 수국, 항산화, 항염, 천연물, 분리

**Abstract** : In this study, the extracts of *Hydrangea macrophylla* (*H. macrophylla*) flowers were investigated for the anti-oxidative and anti-inflammatory activities, and their active constituents were identified. The anti-oxidative effects were tested by DPPH and ABTS<sup>+</sup> assays. To evaluate anti-inflammatory activities, LPS-induced RAW264.7 cells were examined. Among the extracts, the ethyl acetate fraction showed potent radical scavenging activities and inhibition of nitric oxide (NO) production. Chromatographic purification of the extract led to isolation of the compounds:

†Corresponding author

(E-mail: namho@jejunu.ac.kr)

hydrangenol (1), prunin (2) and astragalin (3). The chemical structures of the constituents were elucidated based on spectroscopic data including NMR spectra, as well as comparison of the data in the literature values. Quantitative analysis by high pressure liquid chromatography (HPLC) determined hydrangenol (1) as the major constituent. Isolated compounds 1-3 decreased the NO level without causing cell toxicities. Based on these results, it was suggested that the extract from *H. macrophylla* flowers could be potentially applicable as an anti-oxidative and/or anti-inflammatory ingredients.

*Keywords* : *Hydrangea macrophylla*, Anti-oxidation, Anti-inflammation, Natural product, Isolation

## 1. 서론

피부는 외부 환경에 직접적으로 노출되는 신체 부위로서, 외부의 자극으로부터 우리 몸의 중요한 기관들을 보호하는 보호막 역할을 할 뿐만 아니라 세균침입 등의 이물이나 물리화학적 변화를 완충시켜 안정된 내부 환경을 유지한다. 하지만, 피부는 신체의 가장 바깥쪽에 위치하기 때문에 태양에 의한 자외선, 기온변화로 인한 수분 부족과 같은 다양한 요인들에 노출될 수밖에 없다. 이러한 환경적 스트레스는 피부 자극을 유발하게 되는데, 이중 과도한 자외선과 산소는 피부세포에 자유라디칼(free radical)과 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성시켜 염증 및 조직 손상, 면역억제, DNA 및 결합조직의 손상 등을 초래하며 collagen의 분해 촉진, 주름의 형성 등 피부질환 및 피부노화를 촉진시킨다[1]. 생체 대사 과정에서 끊임없이 발생하는 활성산소는 산소의 환원 대사물로 미토콘드리아의 대사과정이나 세포질 내 효소들의 작용으로 형성된다[2]. 과도하게 생성된 활성산소는 체내의 항산화 방어체계의 균형을 깨뜨려 세포내 구조와 세포막에 손상을 일으키며 산화적 스트레스를 유발한다. 이때 생성된 산화적 스트레스는 세포의 노화, 유전적 변형, 염증반응을 촉진시켜 인체에서 발생하는 거의 모든 병의 발생과 진행에 관여한다[3].

피부에서 염증은 매우 다양한 의미를 가진다. 아토피성 피부질환, 여드름성 피부질환, 광민감성 피부질환, 민감성 피부질환의 생리학적 기전은 염증반응의 과정을 거치며, 다양한 염증 현상에 의해 hyaluronidase, elastase, collagenase 등의 진피층을 파괴하는 효소들의 발현이 증가하여 피부의 노화 및 주름형성에 직접적으로 영향을 준다[4]. 염증반응에 관여하는 주요 세포는 macrophage로 알려져 있으며, 여러 자극이나 면

역세포들이 분비하는 사이토카인 등에 의해 활성화 되어 nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>), pro-inflammatory cytokine을 생성함으로써 통증, 부종, 열 등의 염증 반응을 유발하고 염증부위로 면역세포의 이동을 촉진시킨다[5]. 염증은 감염이나 상처에 대한 후천적인 방어기전이지만 염증 반응이 진행되는 동안 대식세포에서 생산되는 염증 매개물질들이 과도하게 생성되면 관절염, 기관지 천식, 패혈증, 암 등과 같은 많은 질병을 일으킨다. 따라서 염증 반응의 억제는 단순한 염증 질환뿐만 아니라 각종 성인병, 면역질환, 암을 치료하는데 있어서도 매우 중요한 목표가 된다[6].

수국(*Hydrangea macrophylla*)은 범의귀과(saxifragaceae)에 속하는 낙엽관목으로 6~7월에 10~15 cm 크기의 꽃이 피며 한국, 중국, 일본, 인도네시아 등에 분포하고 있다. 꽃이 피기 시작한 초기의 수국은 녹색이 약간 들어간 흰 꽃이었다가 점차 밝은 청색으로 변하며 이후엔 붉은 자주색으로 바뀐다. 토양이 강한 산성일 때는 청색을 많이 띠게 되고, 알칼리성 토양에서는 붉은색을 띠는 생리적 특성이 있어 관상용으로 많이 심는다. 수국은 꽃이나 잎, 뿌리 모두 약재로 귀하게 쓰이는데 심한 열이 나거나 가슴이 두근거릴 때 증상을 완화해주는 효능이 있으며 당뇨병 환자가 설탕 대용으로 쓰기도 한다. 수국에 관한 연구는 항말라리아[7], 항염[8], 항당뇨[9] 등의 효능에 대하여 수행된 바가 있으나 화장품 소재와 관련된 연구는 아직 부족한 실정이다.

최근 적은 양으로도 좋은 효과를 가지는 천연물 소재의 발굴에 많은 관심이 집중되고 있어 피부 친화적이고 안전한 식물 추출물을 대상으로 화장품 소재로서의 기능성을 확인하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이에 따라 본 연구에서는 수국 꽃 추출물 및 용매 분획물의 항산화, 항염

활성을 확인하고 유효 성분을 분리·동정하였다. 또한 이와 함께 분리된 화합물의 효능을 확인하여 기능성 식·의약품 및 화장품 관련 천연 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매 분획 및 유효 성분 분리에 사용된 용매들은 Merk, OCI 및 대정화금의 제품을 사용하였다. Medium pressure liquid chromatography (MPLC, BÜCHI Labortechnik AG)에는 flash pure select (C<sub>18</sub>, BÜCHI Labortechnik AG) 컬럼을 사용하였다. 구조분석을 위한 nuclear magnetic resonance (NMR)는 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, JEOL, Japan)을 이용하였으며 NMR 측정 용매는 CIL사의 NMR 전용 용매로 CD<sub>3</sub>OD, DMSO-*d*<sub>6</sub>를 사용하였다.

### 2.2. 수국 꽃 추출 및 용매 분획

실험에 사용된 수국은 제주도 구좌읍 세화리에서 2019년 7월에 채집하였다. 채집한 시료는 음지건조 후 분쇄하여 사용하였으며 시료 257.0 g을 70% 에탄올 5.2 L에 넣고 실온에서 24 h 동안 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 흡입여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 1회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 40°C 이하의 수욕 상에서 회전 진공 농축기로 농축하여 추출물 96.2 g을 얻었으며, 얻어진 추출물 75.0 g을 증류수에 현탁시키고 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 n-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), n-butanol (BuOH), water 분획물을 얻었다.

### 2.3. 유효 성분의 분리 및 동정

EtOAc 분획물 3.0 g을 극성에 따라 세분화하기 위하여 MPLC를 수행하였다. H<sub>2</sub>O-MeOH (10-100%)의 용매를 기울기 조건으로 각 25 mL씩 용출하여 총 85개의 분획물을 얻었다(Fr. MP1-45). MPLC 분획물 중 Fr. MP61로부터 화합물 1 (18.5 mg), Fr. MP26으로부터 화합물 2 (34.1 mg), Fr. MP32로부터 화합물 3 (35.8 mg)을 얻었다. 화합물 1-3의 NMR 데이터는 아

래와 같다.

Hydrangenol (1) <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub>: 10.93 (1H, s, 8-OH), 9.64 (1H, s, 4'-OH), 7.52 (1H, t, 8.2 Hz, H-6), 7.33 (2H, d, 8.7 Hz, H-2', 6'), 6.89 (1H, d, 8.7 Hz, H-7), 6.87 (1H, d, 7.7 Hz, H-5), 6.80 (2H, d, 8.7 Hz, H-3', 5'), 5.66 (1H, dd, 2.7, 12.3 Hz, H-3), 3.39 (1H, dd, 12.3, 16.4 Hz, H-4), 3.12 (1H, dd, 2.7, 16.4 Hz, H-4), <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>C</sub>: 169.4 (C-1), 160.9 (C-8), 157.8 (C-4'), 140.6 (C-4a), 136.3 (C-6), 128.4 (C-1'), 128.3 (C-2', 6'), 118.4 (C-7), 115.4 (C-5), 115.2 (C-3', 5'), 108.4 (C-8a), 80.5 (C-3), 33.5 (C-4)

Prunin (2) <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 7.31 (2H, d, 8.7 Hz, H-2', 6'), 6.81 (2H, d, 8.7 Hz, H-3', 5'), 6.20 (1H, d, 1.8 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, 1.8 Hz, H-6), 5.36 (1H, dd, 2.7, 12.8 Hz, H-2), 4.96 (1H, d, 7.3 Hz, H-1''), 3.89-3.49 (sugar peak), 3.16 (1H, dd, 13.2, 17.4 Hz, H-3), 2.73 (1H, dd, 2.7, 17.4 Hz, H-3), <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>C</sub>: 198.7 (C-4), 167.1 (C-8), 165.0 (C-10), 164.7 (C-6), 159.2 (C-4'), 130.9 (C-2', 6'), 129.2 (C-1'), 116.4 (C-3', 5'), 105.0 (C-5), 101.3 (C-1''), 98.1 (C-9), 97.0 (C-7), 80.8 (C-2), 78.3 (C-5''), 77.9 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.2 (C-4''), 62.4 (C-6''), 44.2 (C-3)

Astragalinal (3) <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub>: 8.04 (2H, d, 9.1 Hz, H-2', 6'), 6.87 (2H, d, 9.1 Hz, H-3', 5'), 6.37 (1H, d, 2.2 Hz, H-8), 6.18 (1H, d, 2.2 Hz, H-6), 5.24 (1H, d, 7.3 Hz, H-1''), 3.71-3.29 (sugar peak), <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>C</sub>: 179.6 (C-4), 166.0 (C-7), 163.1 (C-5), 161.6 (C-4'), 159.1 (C-9), 158.5 (C-2), 135.5 (C-3), 132.4 (C-2', 6'), 122.8 (C-1'), 116.1 (C-3', 5'), 105.8 (C-10), 104.2 (C-1''), 100.0 (C-6), 94.8 (C-8), 78.5 (C-3''), 78.1 (C-5''), 75.8 (C-2''), 71.4 (C-4''), 62.7 (C-6'')

### 2.4. 항산화 활성

#### 2.4.1. DPPH 라디칼 소거 활성

2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성 실험은 Blois 등의 방법[10]을 응용

하여 실시하였다. DPPH 라디칼에 대한 시료의 전자공여능을 측정하기 위해, 시료 용액 20  $\mu\text{L}$ 에 0.2 mM DPPH (Sigma, USA) 용액 180  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 상온에서 20분간 반응시켰다. Microplate reader (SpectraMax® ABS PLUS, Molecular Devices, USA)를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였고, 각 시료의 라디칼 소거율이 50%일 때의 시료 농도(SC<sub>50</sub>)를 계산하였다.

#### 2.4.2. ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 양이온 라디칼 소거 활성 실험은 Re 등의 방법[11]을 응용하여 실시하였다. ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성을 측정하기 위해, 7.4 mM ABTS (Sigma, USA)와 2.6 mM potassium persulfate (Sigma, USA)를 혼합하여 상온, 암소에서 16시간 동안 반응시켜 ABTS<sup>+</sup> 라디칼을 형성시켰다. 이 용액은 700 nm에서 흡광도가  $0.78 \pm 0.02$ 가 되도록 에탄올로 희석하여 실험에 사용하였다. 시료 용액 20  $\mu\text{L}$ 에 희석한 ABTS<sup>+</sup> 용액 180  $\mu\text{L}$ 를 가하여 상온에서 15분 동안 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였고, 각 시료의 라디칼 소거율이 50%일 때의 시료 농도(SC<sub>50</sub>)를 계산하였다.

### 2.5. 항염 활성

#### 2.5.1. 세포 배양

Murine macrophage cell line인 RAW264.7 cell은 american type cell culture (ATCC, USA)로부터 분양받아 100 U/mL penicillin, 100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin과 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% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 2-3일 간격으로 계대 배양하였다.

#### 2.5.2. NO 생성 억제 활성

24 well plate에 RAW264.7 cell을  $2.0 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18시간 전 배양하였다. 1  $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 포함하는 배지로 교환하고 농도별로 시료를 각각 가

하여 24시간 배양하였다. 이후 세포 배양 상등액 100  $\mu\text{L}$ 와 griess reagent (Sigma, USA) 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>, Janssen Chimica, Belgium)를 표준물질로 사용하여 작성한 표준검정곡선을 통해 세포 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였으며 각 시료의 NO 생성 저해율이 50%일 때의 시료 농도(IC<sub>50</sub>)를 계산하였다.

#### 2.5.3. 세포 독성 평가(MTT assay)

RAW264.7 cell을 24 well plate에  $2.0 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 18시간 전 배양 후, LPS와 시료를 농도별로 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 500  $\mu\text{g/mL}$ 의 thiazoyl blue tetrazolium bromide (MTT, Biosesang, Korea)를 첨가하여 37°C에서 3-4시간 반응시킨 후, 상등액을 제거하였다. 이후 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

### 2.6. HPLC 성분 분석

수국 꽃 추출물의 성분을 분석하기 위하여 70% 에탄올 추출물 20 mg을 메탄올 2 mL에 녹인 후, 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과시킨 용액을 실험에 사용하였다. HPLC 분석은 Merk의 HPLC grade H<sub>2</sub>O 및 methanol (MeOH)을 이용하여 기울기 용리법으로 분리하였고, 이때 HPLC 기기 분석 및 용리 조건은 Table 1에 나타내었다. 분석 기기로 HPLC (Waters e2695 separation module system, USA)와 PDA detector (Waters 2998, USA)를 사용하였으며 데이터 분석 S/W는 Waters의 Empower system을 이용하였다.

### 2.7. 통계 분석

모든 실험은 3회 반복으로 실시하였고 통계 분석은 평균과 표준편차(mean  $\pm$  SD)로 나타내었으며, Student's *t*-test법을 이용하여 *p*-value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Table 1. HPLC Chromatographic conditions of control factors

Conditions of HPLC analysis			
Column	Kromasil C <sub>18</sub> (4.6 × 250 mm, 5 μm)		
Column temperature	40°C		
Injection volume	10 μL		
UV wavelength	230 nm		
Flow rate	1.0 mL/min		
Mobile phase conditions for gradient elution	Time	H <sub>2</sub> O	MeOH
	0	70	30
	30.0	30	70
	32.0	0	100
	35.0	0	100

Table 2. SC<sub>50</sub> values of extract and solvent fractions from *H. macrophylla* flowers on DPPH and ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities

Fractions	DPPH (μg/mL)	ABTS <sup>+</sup> (μg/mL)
Extract	100.9	42.7
Hex	>500	433.4
EtOAc	164.1	45.2
BuOH	103.7	50.3
Water	151.2	58.0

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 수국 꽃 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성

활성산소에는 hydroxy radical (·OH), superoxide radical (·O<sub>2</sub><sup>-</sup>)과 같은 자유 라디칼이 있으며, 이들은 홀 전자를 가지고 있어 반응성이 매우 높아 생체 내에서 지질과산화 연쇄반응을 일으켜 체내 다양한 손상을 일으킨다. 일반적으로 전자는 쌍으로 존재하려는 경향이 있어 라디칼은 전자를 받아 환원됨으로써 높은 반응성이 소멸될 수 있다[12]. 이와 같이 전자를 제공함으로써 라디칼을 소거하는 능력인 환원력을 통해서 시료의 항산화 활성을 확인할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 비교적 안정한 라디칼로 존재하는 DPPH 및 ABTS<sup>+</sup>을 이용하여 수국 꽃 추출물 및 용매 분획물의 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 추출물 및 용매 분획물에 대한 실험 결과 70% EtOH 추출물의 SC<sub>50</sub>값이 각각 100.9, 42.7 μg/mL로

이중 가장 우수한 DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성이 있음을 확인하였다(Table 2).

#### 3.2. 수국 꽃 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성

염증반응의 지표물질인 NO는 L-arginine에서 NO synthase (NOS) 의해 합성된다. NOS에는 endothelial NOS, neuronal NOS, inducible NOS (iNOS)의 세 가지 형태가 있으며, 이들 중 iNOS에 의한 NO 생성은 병리학적으로 중요한 역할을 한다. 일반적으로 정상적인 NO는 세균을 죽이거나 종양을 제거하는 중요한 면역반응의 역할을 하지만 그람 음성 박테리아 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 대식세포의 활성화 인자에 의해 과도하게 생성된 NO는 염증을 유발시켜 신경 손상, 조직 손상 및 유전자 변이를 일으키는 것으로 알려져 있다[13]. 이에 따라 시료의 항염 효과를 확인하기 위해 대식세포에 LPS 자극을 가하여 NO 및 전염증성 사이토카인

생성 억제 효과를 확인하는 방법이 널리 이용되고 있다.

수국 꽃 추출물 및 용매 분획물의 NO 생성 억제 효과를 확인하기 위하여 RAW264.7 세포를 이용하였다. 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 실험을 진행한 결과, EtOAc 분획물이 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 62.1% 저해시키는 것을 확인하였다(Figure 1A). 활성이 우수한 EtOAc 분획물에 대해 12.5–100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위로 다시 실험한 결과, 50  $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 세포 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였으며, IC<sub>50</sub>값은 42.0  $\mu\text{g/mL}$ 로 확인하였다(Figure 1B).

### 3.3. 수국 꽃으로부터 분리된 화합물의 구조 동정

항산화 및 항염 활성이 우수했던 수국 꽃 EtOAc 분획물에 대하여 MPLC를 수행하여 단일 물질을 분리하였다. <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR을 이용하

여 화합물의 구조를 확인하였으며, 문헌과 비교하여 총 3개의 화합물을 동정하였다. 화합물 1은  $\delta_{\text{H}}$  6.80, 7.33의 피크를 통해 대칭구조의 벤젠 고리가 결합되어있는 isocoumarin 계열의 화합물로 예상하였으며 문헌[14]을 통하여 hydrangenol로 확인하였다. 화합물 2, 3은 19개의 carbon 피크가 관찰되며  $\delta_{\text{H}}$  3.49–3.89, 3.29–3.71의 overlap 되어 있는 여러 개의 proton 피크와 당의 anomeric proton에 해당하는  $\delta_{\text{H}}$  4.96 (1H, d, 7.3 Hz) 및  $\delta_{\text{H}}$  5.24 (1H, d, 7.3 Hz)의 피크를 통해 flavonoid 골격에 육탄당이 하나씩 결합되어 있는 구조일 것이라 예상하였다. 이들 데이터를 바탕으로 문헌[15, 16]과 비교하여 화합물 2는 prunin (naringenin-7-O-glucoside), 화합물 3은 astragalin (Kaempferol-3-O-glucoside)으로 확인되었다(Figure 2).

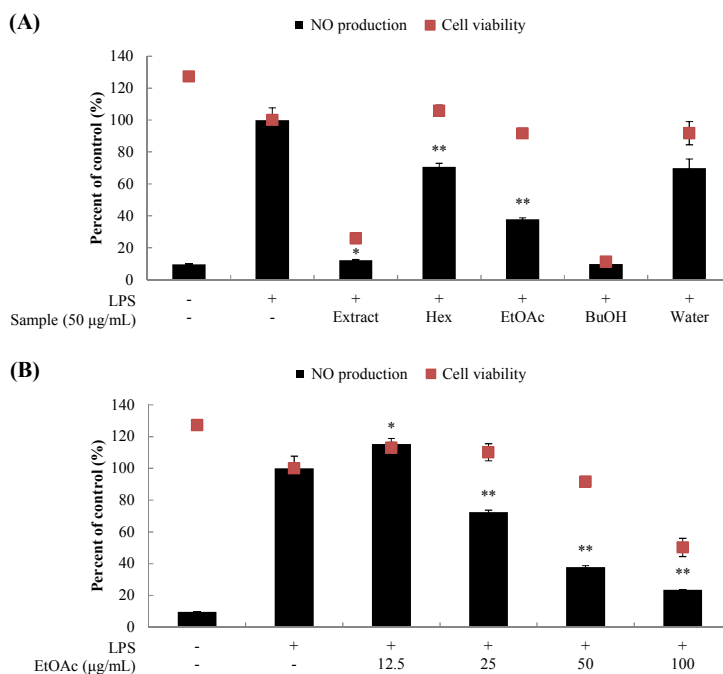


Fig. 1. Effects of extract, solvent fractions (A) and EtOAc fraction (B) from *H. macrophylla* flowers on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 compared with control.

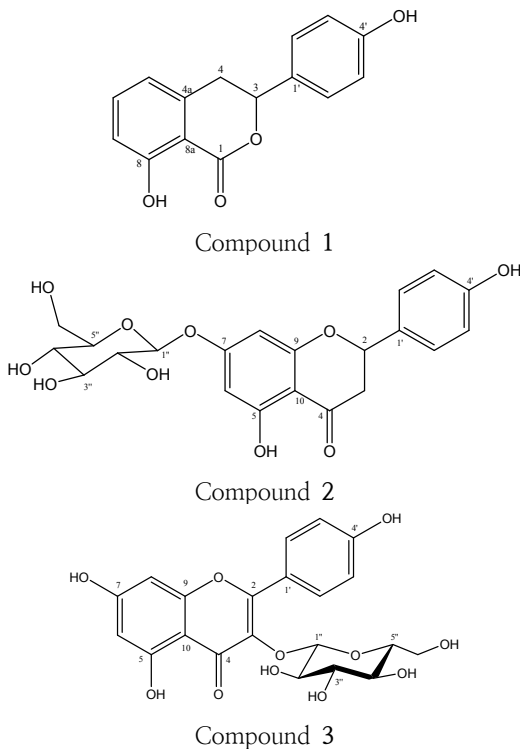


Fig. 2. Isolated compounds 1-3 from *H. macrophylla* flowers.

### 3.4. 수국 꽃 추출물 및 EtOAc 분획물의 성분 분석

수국 꽃 추출물 및 EtOAc 분획물의 주요 성분을 확인하기 위하여 HPLC를 통한 정성, 정량 분석을 수행하였다. 분석 결과, 분리된 화합물의 머무름 시간(retention time, RT)은 각각 prunin (2) 13.0분, astragalin (3) 15.6분, hydrangenol (1) 25.9분으로 확인되었다(Figure 3). 수국 꽃 유래 성분들의 함량은 농도(x축)와 피크의 면적비(y축)에 대한 검정곡선을 작성하고 회귀직선방정식에 대입하여 각각의 성분 함량을 산출하였다. 그 결과 수국 꽃 추출물에서 hydrangenol (1), prunin (2), astragalin (3)이 각각 27.0, 18.9, 20.5 mg/g의 함량이 확인되었으며, EtOAc 분획물에서 각각 121.5, 101.6, 76.5 mg/g이 함유되어 있는 것으로 확인되었다.

### 3.5. 수국 꽃으로부터 분리된 화합물의 항염 활성

수국 꽃에서 분리된 화합물들을 50, 100, 200, 300  $\mu$ M 농도로 각각 처리한 실험군의 세포 배양액을 이용하여 NO 생성량을 측정된 결과 화합물 모두 NO의 생성을 저해하는 것으로 확인되었다. 300  $\mu$ M 농도 처리군에서 화합물 2는 미미하지만 20% 정도의 NO 생성 억제 활성이 있으며, 화합물 1, 3은 세포 독성 없이 NO의 생성을

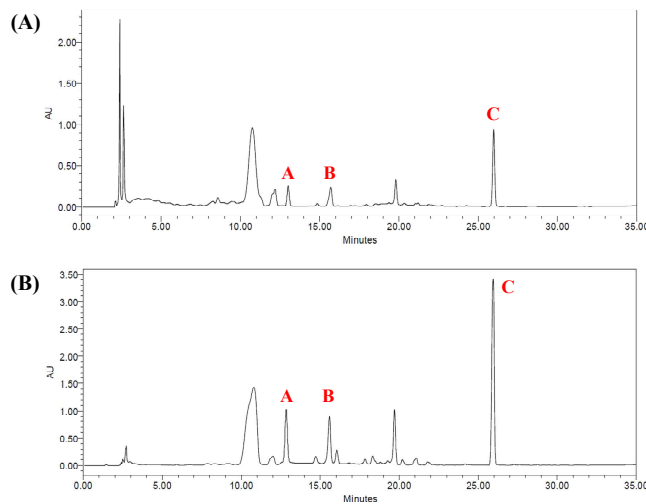


Fig. 3. HPLC chromatogram of 70% EtOH extract (A) and EtOAc fraction (B) from *H. macrophylla* flowers at 230 nm (A; prunin, B; astragalin, C; hydrangenol).

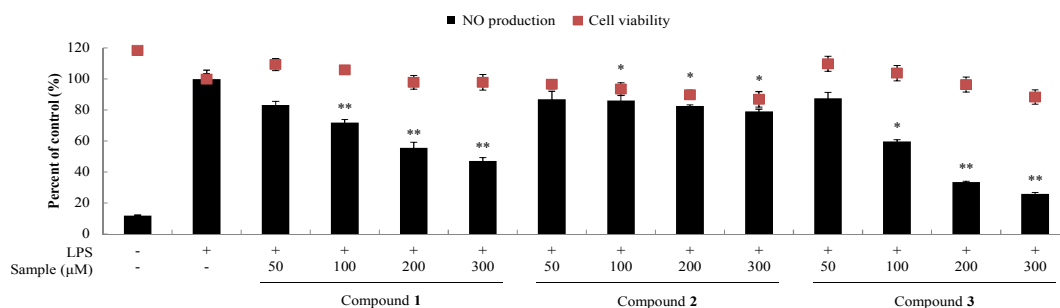


Fig. 4. Effects of isolated compounds 1–3 from *H. macrophylla* flowers on NO production and cell viability in LPS-induced RAW264.7 cells. The data represent the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 compared with control.

50% 이상 크게 감소시키는 것으로 나타났다 (Figure 4). 화합물 1과 3은 농도 의존적으로 NO의 생성을 저해시켰으며 IC<sub>50</sub>값은 각각 265.8, 146.4  $\mu$ M로 확인하였다. 이들은 염증성 매개인자 발현의 주요인자인 nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) pathway를 차단시킴으로써 NO 생성 억제 활성이 보고되어 있어[17, 18] 추가적인 기전 연구는 진행하지 않았다.

#### 4. 결론

최근 생활수준의 향상과 현대 의학의 발달에 따른 인간수명의 증가로 건강하고 아름다운 삶에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이에 따라 노화방지 및 건강유지를 위한 기능성 식·의약품 및 화장품에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[19]. 이로 인하여 새로운 기능성 소재 개발에 대한 요구 또한 증가하고 있는데, 천연에서 유래한 phytochemical은 인체에 유용한 다양한 생리활성을 보유하고 있어 기능성 소재의 새로운 자원으로 각광받고 있다. 이전에는 식물을 주 연구 대상으로 연구하여 왔으나 현재는 미생물, 동물, 해양 자원 등 자연에 존재하는 모든 것을 대상으로 천연물에 대한 연구가 광범위하게 이루어지고 있다[20]. 이에 따라, 본 연구에서는 수국 꽃 추출물의 항산화 및 항염 활성을 확인하고 유효 성분을 규명하기 위하여 단일물질 분리 과정 및 화합물 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물의 생리활성을 검색하여 화장품, 식품 관련 천연 소재로서의 활용가능성을 검토하였다.

우선 수국 꽃 70% 에탄올 추출물을 극성에 따라 분획하여 Hex, EtOAc, BuOH, water 분획물을 얻었으며 항산화 활성을 측정한 결과, 추출물과 Hex 분획물을 제외한 모든 용매 분획물에 대하여 우수한 라디칼 소거 활성을 확인하였다. 또한 항염 활성 실험 결과, EtOAc 분획물이 50  $\mu$ g/mL 이하의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 NO의 생성을 농도 의존적으로 저해시키는 효과가 있음을 확인하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 유효 성분을 찾고자 EtOAc 분획물에 대해 MPLC를 수행하여 3개의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR을 이용해 구조를 동정하였으며 문헌과 비교하여 hydrangenol (1), prunin (2), astragalinalin (3)으로 확인되었다. 수국 꽃 추출물 및 EtOAc 분획물을 HPLC 함량 분석한 결과 hydrangenol (1)은 수국 꽃의 주요 성분이며, 분리된 화합물들에 대한 항염 활성 실험을 통해 우수한 NO 생성 저해 효과가 있음을 확인하였다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 수국 꽃 추출물은 항산화 및 항염 효과를 갖는 천연 기능성 소재로의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

#### References

1. H. J. Kim, K. S. Kim, D. I. Kim, "Inhibitory Effects of *Lespedeza cuneata* Ethanol Extract on Ultraviolet-Induced Photo Aging", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.41, No.11, pp.1540–1545, (2012).



2. J. E. Seo, E. S. Hwang, G. H. Kim, "Antioxidative and Differentiation Effects of *Artemisia capillaris* T. Extract on Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage of MC3T3-E1 Osteoblast Cells", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.40, No.11, pp.1532-1536, (2011).
3. H. W. Kim, B. J. Kim, S. H. Lim, H. Y. Kim, S. Y. Lee, S. I. Cho, Y. K. Kim, "Anti-oxidative Effects of Taraxaci Herba and Protective Effects on Human HaCaT Keratinocyte", *Kor. J. Herbology*, Vol.24, No.3, pp.103-108, (2009).
4. H. E. Kim, Y. J. Jo, N. H. Lee, "Anti-inflammatory and Anti-bacterial Constituents from the Extracts of *Daucus carota* var. *sativa* Aerial Parts", *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.44, No.4, pp.427-436, (2018).
5. E. S. Lee, H. K. Ju, T. C. Moon, E. K. Lee, Y. D. Jahng, S. H. Lee, J. K. Son, S. H. Baek, H. W. Chang, "Inhibition of Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Production by Propenone Compound through Blockade of Nuclear Factor (NF)- $\kappa$ B Activation in Cultured Murine Macrophages", *Biol. Pharm. Bull.*, Vol.27, No.5, pp.617-620, (2004).
6. J. P. Bak, J. H. Son, Y. M. Kim, E. Y. Lee, K. H. Leem, E. H. Kim, "Suppression of Inflammatory Macrophage Response by *Glycyrrhiza Uralensis* Herbal Acupuncture Extract", *Korean Journal of Acupuncture*, Vol.28, No.4, pp.49-58, (2011).
7. K. Kamei, H. Matsuoka, S. Furuhashi, R. Fujisaki, T. Kawakami, S. Mogi, H. Yoshihara, N. Aoki, A. Ishii, T. Shibuya, "Anti-Malarial Activity of Leaf-Extract of *Hydrangea macrophylla*, a Common Japanese Plant", *Acta Med. Okayama*, Vol.54, No.5, pp.227-232, (2000).
8. M. G. Dilshara, R. G. P. T. Jayasooriya, S. H. Lee, J. B. Jeong, Y. T. Seo, Y. H. Choi, J. W. Jeong, Y. P. Jang, Y. K. Jeong, G. Y. Kim, "Water extract of processed *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. leaf attenuates the expression of pro-inflammatory mediators by suppressing Akt-mediated NF- $\kappa$ B activation", *Environmental toxicology and pharmacology*, Vol.35, No.2, pp.311-319, (2013).
9. H. Zhang, H. Matsuda, A. Kumahara, Y. Ito, S. Nakamura, M. Yoshikawa, "New type of anti-diabetic compounds from the processed leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* (Hydrangeae Dulcis Folium)", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol.17, No.17, pp.4972-4976, (2007).
10. M. S. Blois, "Antioxidant determination by the use of a stable free radical", *Nature*, Vol.181, pp.1199-1200, (1958).
11. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol.26, No.9-10, pp.1231-1237, (1999).
12. B. J. Kong, Y. J. Kim, J. S. Baek, D. B. Lee, J. W. Lee, N. Y. Min, A. Y. Kim, S. N. Park, "Antioxidative Effects and Tyrosinase Inhibitory Activities of Mate (*Ilex paraguariensis*) Extract/Fractions", *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.41, No.4, pp.391-400, (2015).
13. N. Mukaida, Y. Ishikawa, N. Ikeda, N. Fujioka, S. Watanabe, K. Kuno, K. Matsushima, "Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock: biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF- $\kappa$ B and regulation of cytokine production/action through  $\beta_2$  integrin in vivo", *Journal of Leukocyte Biology*, Vol.59, No. 2, pp.145-151, (1996).
14. M. Günes, A. Speicher, "Efficient syntheses of ( $\pm$ )-hydrangenol, ( $\pm$ )-phyllodulcin and ( $\pm$ )-macrophyllol", *Tetrahedron*, Vol.59, NO.44, pp.8799-8802, (2003).
15. N. H. Tung, J. H. Son, K. W. Cho, J. A. Kim, J. H. Hyun, H. K. Kang, G. Y.

- Song, C. J. Park, Y. H. Kim, "Phenolic components from the leaves of *Panax ginseng* and their effects on HL-60 human leukemia cells", *Food Sci. Biotechnol.*, Vol.19, No.1, pp.271-274, (2010).
16. J. H. Lee, C. H. Ku, N. I. Baek, S. H. Kim, H. W. Park, D. K. Kim, "Phytochemical Constituents from *Diodia teres*", *Arch. Pharm. Res.*, Vol.27, No.1, pp.40-43, (2004).
  17. H. J. Kim, C. H. Kang, R. G. P. T. Jayasooriya, M. G. Dilshara, S. H. Lee, Y. H. Choi, Y. T. Seo, G. Y. Kim, "Hydrangenol inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglial cells by suppressing the NF- $\kappa$ B pathway and activating the Nrf2-mediated HO-1 pathway", *International Immunopharmacology*, Vol.35, No.3, pp.61-69, (2016).
  18. M. S. Kim, S. H. Kim, "Inhibitory Effect of Astragalin on Expression of Lipopolysaccharide induced Inflammatory Mediators through NF- $\kappa$ B in Macrophages", *Arch. Pharm. Res.*, Vol.34, No.12, pp.2101-2107, (2011).
  19. S. J. Park, D. H. Seong, D. S. Park, S. S. Kim, J. G. Gou, J. H. Ahn, W. B. Yoon, H. Y. Lee, "Chemical Compositions of Fermented *Codonopsis lanceolata*", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.38 No.3, pp.396-400, (2009).
  20. K. S. Jin, Y. N. Oh, J. A. Park, J. Y. Lee, S. J. Jin, S. K. Hyun, H. J. Hwang, H. J. Kwon, B. W. Kim, "Anti-Oxidant, Anti-Melanogenic, and Anti-Inflammatory Activities of *Zanthoxylum schinifolium* Extract and its Solvent Fractions", *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.40, No.4, pp.371-379, (2012).