

계피나무로부터 항알러지물질의 분리

박관하¹ · 고동수² · 임용호*

건국대학교 응용생물화학과, ¹군산대학교 해양생명의학과,
²동덕여자대학교 응용화학과

(2000년 11월 8일 접수, 2000년 12월 1일 수리)

Key words: 계피나무, 항알러지, epicatechin

알러지 반응은 항원에 대하여 면역계가 과도하게 반응하여 생기는 제반 현상으로 크게 네 가지 유형으로 나눌 수 있는데, 이 중 통상 알러지 질환으로 일컬어지는 유형은 제 1형으로 비만세포에서 분비되는 각종 화학매체들의 직간접적인 악리작용과 이로 인해 야기되는 염증 반응에 의한 것이다. 고령화, 현대화 사회로의 전환으로 인해 과거의 질병 형식과는 달리 순환기, 신경계, 알러지성, 비만 등 좋은 영양 섭취 및 환경오염의 결과에 기인하는 질병의 비율이 증가하고 있는 추세이다. 이 분야 중 순환기 분야의 질병은 끊임없는 연구, 개발의 결과 상당히 진보된 의약품들이 만들어져 그 수준이 고객의 요구에 상당히 부응하고 있는 현실이나, 알러지성 질환 치료 부분은 아직은 연구, 개발이 덜된 분야이다. 알러지 현상의 발현은 그 기전이 복잡하고 관여하는 생체 유래 생리활성물질의 종류가 다양하기 때문에 가능한 치료방법도 다양한 반면, 어떤 한 개의 시스템에 작용하는 약물은 모든 환자에 유효할 가능성이 낮은 단점도 아울러 지니고 있다. 따라서 향후의 이상적인 항알러지 약으로서의 하나의 기전을 가진 약물보다는 두 개 이상의 복합적인 기전을 보유한 약물이 높은 치료율을 나타낼 것이라고 기대하고 있다.^{1,3)} 새로운 항알러지 물질을 찾기 위해 본 연구자들은 항알러지 효과를 갖고 있다고 알려진 계피나무(*Cinnamomum cassia*)의 수피를 실험 대상으로 하였다.

계피나무는 한방에서 육계로 불리어지며 항알러지제보다는 혈압강화제, 진경작용제, 혈당상승제 등으로 사용하고 있다.⁴⁾ 중국 남부, 베트남, 스리랑카, 자바 등지에서 생산되며, 생산지 별로 향기와 맛이 다르다. 육계의 항알러지 효과는 수용성 추출물에 함유된 diterpenoid가 갖고 있는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 본 연구자들은 육계의 acetone-water 추출물로부터 항알러지 효과를 발견하였고, 약효에 따른 분리를 더 진행하여 육계가 함유하고 있는 약효물질을 규명하였다. 그러나 diterpenoid가 아닌 flavonoid의 일종인 화합물을 발견하여서 그 결과를 보고하고자 한다.

추출, 분리 및 정제에 사용한 methanol, acetone, chloroform, ethylacetate는 Aldrich사(Sheboygan, USA)의 시약급으로 구입한 그대로 사용하였으며, column chromatography에 사용한

Silica Gel은 Merck사(Whitehouse Station, USA)의 230-400 mesh, 60Å를 사용하였다. Prep-HPLC는 Gilson 118UV/VIS detector, Gilson 306 dual piston pump system, Gilson FC 205 Fraction collector, Rheodyne 500uL loop injector이었고, column은 Vydac protein & peptide C18(22 mm×25 cm)을 사용하였다. Prep-HPLC에 사용한 이동상 용매는 Burdick & Jackson사(Muskegon, USA)의 HPLC용 용매였다. 또한 HPLC에 사용한 3차중류수는 저항값이 18 MΩ이상이었다. 핵자기공명분광기는 Bruker DPX 400(9.4 T)를 사용하였는데 5 mm dual probe를 사용하였다. 핵자기공명분광법을 위해 사용한 용매는 Merck사의 99.9% 순도를 가진 DMSO-d₆였다. 자외선분광기는 Shimadzu사(Yokohama, Japan)의 UV-1601PC였고, centrifuge는 Megafuge Heraeus사(Duluth, USA) 기기였다. 실험에 사용된 rat은 군산대학교 해양생명의학과에서 사육하여 사용하였다. 본 실험에서 사용한 육계는 1997년 서울소재 경동시장에서 중국산을 구입하여 사용하였다. 시료 600 g을 acetone-water(7:3) 혼합물로 3일간 3회 반복 추출하여서 여과한 후 여과액을 35°C에서 감압증류하였다. 증류 후 남은 분획을 chloroform과 증류수로 충분히하였고, 약효가 있다고 판단된 수용액층을 ethylacetate로 충분히한 후 동결건조시켰다. 건조된 분획을 ethanol 이동상의 column chromatography로 분리하였고, 약효가 발견된 분획을 prep-HPLC로 분리하였다. 이 때 분리된 분획 중 약효물질로 판명된 CC1-1을 동결건조하여 10 mg 얻었다. 동결건조되어 분말형태인 시료를 수용액층은 생리식염수에, 그 외의 추출분획은 DMSO에 적절한 농도로 현탁하여 사용하였다. 2차 이상의 분획에서는 saline 또는 DMSO 중에서 용해성이 있는 용매를 사용하였다. 대조군에서는 각각의 용매만을 투여하였다. Passive cutaneous anaphylaxis(PCA) 실험에 사용한 rat의 항체생산을 위한 감작은 음성 Wistar rat(250-300 g)에 ovalbumin(chicken egg albumin, Grade VI, Sigma) 1 mg/rat과 Pertussis antigen(Gibco; San Francisco, USA) 0.7 ml를 음성 Wistar rat(250 g 정도) 근육 내와 복강으로 각각 투여하고 12일 째에 복대동맥으로 채혈하여 혈청을 분리하여 사용하였다. 이 혈청의 PCA역가를 측정하고 Evans blue의 확산 직경이 10-20 mm 사이가 되는 농도로 희석하여 음성 Wistar rat(180-230 g)의 등부위 털을 깎고 2부위에 적절히 희석한 혈청(인산완충 생리식염수에 희석, pH 7.4) 0.1 ml씩을 피내투여하고 48시간 후 ovalbumin 5 mg을 0.5 ml의 saline에 용해(1%)한 Evans blue와 혼합하여 꼬리정맥으로 투여하였다. Ovalbumin투여 30분 후 피부를 박리하고 Evans blue의 확산직경을 측정하였다. CC1-1의 구조 결정을 위해서 수소핵자기공명분광법(¹H-NMR), 탄소핵자기공명분광법(¹³C-NMR), COSY (COrelation Spectroscopy)⁵⁾, HMQC(Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)⁶⁾, DEPT(Distortionless Enhancement of Polarization Transfer)⁷⁾의 5가지 실험을 수행하였다.

육계 분획의 약효 시험 결과는 Table 1과 같다. 여기서 보듯이 최종적으로 얻은 CC1-1이 약효를 보이는 단일물질로 판명되었다.

*연락처자

Phone : 82-2-450-3760; Fax : 82-2-453-3761

E-mail : yoongho@kkucc.konkuk.ac.kr

Table 1. Anti-allergic effects of fractions separated from *Cinnamomum cassia* in rat passive cutaneous anaphylaxis tests

Fractions	Dose	n	Effect(% of control)	Remarks
acetone-water extract	90 mg/kg, <i>ip</i>	5	50.2±6.6	effective
2nd separation	chloroform fraction	50 mg/kg, <i>ip</i>	89.4±13.2	
	water fraction	50 mg/kg, <i>ip</i>	67.5±11.9	effective
3rd separation of CHCl ₃ fr.	ethylacetate fraction	50 mg/kg, <i>ip</i>	44.4±8.7	effective
	water fraction	50 mg/kg, <i>ip</i>	91.2±8.8	
4th separation of ethylacetate fr.	CC1	20 mg/kg, <i>iv</i>	64.5±7.8	effective
	CC2	20 mg/kg, <i>iv</i>	111.2±14.2	
	CC3	20 mg/kg, <i>iv</i>	93.2±7.6	
	CC4	20 mg/kg, <i>iv</i>	88.5±15.5	
5th separation of CC1	CC1-1	20 mg/kg, <i>iv</i>	61.0±5.4	effective
	CC1-2	15 mg/kg, <i>iv</i>	84.8±2.1	weak or ineffective
	CC1-3	15 mg/kg, <i>iv</i>	95.5±3.3	
	CC1-4	15 mg/kg, <i>iv</i>	100.3±8.0	
DMSO control	50 µl/rat, <i>iv</i>	7	100	
Saline control	50 µl/rat, <i>iv</i>	6	100	
Ketotifen	1 mg/kg, <i>iv</i>	5	34.7±10.0	effective

Freeze-dried test substances were dissolved in either DMSO or saline depending solubility. For calculation of effect, corresponding vehicles were used as control, namely 100% effective. Data expressed in mean±sem of n determinations.
ip: intraperitoneal
iv: intravenous

CC1-1의 ¹³C-NMR spectrum은 15개의 peaks을 보여주는데 DEPT 실험으로부터 methylene group이 1개, methine group이 7개, quaternary group이 7개로 밝혀졌다. 또한 ¹H-NMR spectrum에서 proton의 갯수가 9개라는 결과를 얻었다. 이와 같은 사실과 COSY 및 HMQC 실험 결과에 근거하여 이 화합물은 flavonoid의 일종으로 판단되었다. Dictionary of Natural Products(Chapman & Hall)⁸⁾로부터 본 실험에서 얻은 자료와 일치하는 화합물을 검색한 결과 epicatechin으로 밝혀졌다.

따라서 본 저자들은 육계로부터 분리한 물질은 이미 알려진 화합물일 뿐만 아니라 Table 1에서 보여준 바와 같이 그 약효가 뛰어난 것도 아니어서 항알러지 치료를 위한 신약 후보물질로서는 부적합하다고 판단하였다. 그러나 육계가 함유하고 있다고 알려진 기존의 diterpenoid와는 다른 항알러지 물질의 발견은 현재까지 보고된 바가 없기 때문에 이와 같이 보고하는 바이다.

참고문헌

1. Lagunoff, D., Martin, T. and Read, G. (1983) Agents that release histamine from mast cells. *Ann. Rev. Pharmacol.*

Toxicol. **23**, 331-451.

2. Musser, J. H. and Krefit, A. (1992) 5-Lipoxygenase: Properties, pharmacology, and the quinolinyl(bridged)aryl class of inhibitors. *J. Med. Chem.* **35**, 2501-2524.
 3. Gomes, J. C., Di Stasi, L., Sgarbosa, F. and Barata, L. (1994) Pharmacological evaluation of the inhibitory effect of extracts from *Anchietia salutaris* on the histamine release induced in the rat and the guinea pig. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **103**, 188-193.
 4. Han, D. (1995) In *Pharmacognogy*, 7th ed., DongMyungSa, Seoul.
 5. Bax, A. and Freeman, R. (1981) A simple method for suppressing dispersion-mode contributions in nmr spectra: the "pseudo echo". *J. Magn. Reson.* **43**, 333-338.
 6. Bax, A., Griffey, R. and Hawkins, B. (1983) Correlation of proton and nitrogen-15 chemical shifts by multiple quantum nmr. *J. Magn. Reson.* **55**, 301-315.
 7. Dodrell, D. M., Pegg, D. and Bendall, M. (1982) Distortionless enhancement of nmr signals by polarization transfer. *J. Magn. Reson.* **48**, 323-327.
 8. Dictionary of Natural Products on CD-ROM. (1997) Chapman & Hall. London. U.K.

Anti-allergic Compound Isolated from *Cinnamomum cassia*

Kwanha Park¹, Dongsoo Koh² and Yoongho Lim*(*Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea; ¹Department of Marine Biomedical Sciences, Kunsan National University, Kunsan 573-702, Korea; ²Department of Applied Chemistry, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea*)

Key words: *Cinnamomum cassia*, anti-allergy, epicatechin

*Corresponding author