

탕자 추출물에서 항염증 활성을 갖는 쿠마린 유도체의 효능에 관한 연구

김덕술[†]

[†]동명대학교 의용공학과

(2012년 12월 4일 접수 ; 2012년 12월 23일 수정 ; 2012년 12월 24일 채택)

A Study on the Efficacy of the Coumarine Derivatives with Anti-Inflammatory Activity in the Trifoliolate Orange Extract

Duck-Sool Kim[†]

[†]*Dept. of Biomedical Engineering, Tongmyong University,
179 Sinseseono, Nom-gu 608-711, Busan, Korea*

(Received December 4, 2012 ; Revised December 23, 2012 ; Accepted December 24, 2012)

요약 : 탕자에는 여러 종류의 monoterpenes, limonoids, flavonoids과 coumarins 등의 구성성분으로 이루어져 있다. 탕자의 구성 성분중에 7-제라닐옥시쿠마린은 7개의 탄소로 구성된 제라닐옥시기의 결사슬을 가진 물질이다. 그리고 7-제라닐옥시쿠마린은 여러 약리적인 효과들을 나타낸다고 알려져 있다. 본 연구에서는 탕자의 구성성분인 7-제라닐옥시쿠마린과 이들의 다양한 유도체를 합성하였다. 그리고 항염증에 대한 항염증 효능을 알아보기 위하여 염증을 유발하는 일산화질소 억제 cytokine을 측정할 결과는 6-제라닐옥시쿠마린의 성분이 사이토카인인 인터루킨-6가 1 μ M 농도에서 68.9% 를, 10 μ M에서 72.6% 의 저해효과를 나타냈다.

주제어 : 탕자, 제라닐옥시쿠마린, 항염증, 유도체, 사이토카인.

Abstract : Trifoliolate orange components consist of several kinds, such as monoterpenes, limonoids, flavonoids, and coumarins. Coumarin derivatives were shown to possess valuable pharmacological properties such as anti-inflammatory and dietary effect. Among them, 7-geranyloxy coumarin **6** is a promising chemopreventive agent against skin, tongue, oesophagus and colon carcinogenesis in rodents. Seven new coumarin derivatives structurally related to 7-geranyloxy coumarin were synthesised in good yields by Cs_2CO_3 /acetonitrile condition. We investigated the effect of anti-inflammatory activity on interleukin-6 for synthesised geranyloxy coumarin derivatives. 6-Geranyloxy coumarin **9** (68.9% / 1 μ M ; 72.6% / 10 μ M) of the anti-inflammatory activity is far higher than 7-Geranyloxy coumarin **5** (40.1% / 1 μ M ; 61.1% / 10 μ M) and their other derivatives.

Keywords : trifoliolate orange, geranyloxy coumarin, anti-inflammatory, coumarin derivatives, cytokine.

[†]주저자 (E-mail : dskim@tu.ac.kr)

1. 서론

염증은 피부 조직 및 관절 조직 등 모든 조직에 이학적, 화학적, 세균학적 변화를 수반하는 것을 특징으로, 그 요인은 여러 가지 있으나, 미생물 감염에 의한 유발 및 관절염과 같은 자가 면역 질환에 의한 염증이 주된 발생 원인으로 구분된다. 그리고 염증 반응에는 국소 혈관과 체액 중 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증 매개물질 분비, 체액 침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종 발열 통증 등의 외적 증상이 나타난다. 아이코사노이드(Eicosanoid)는 염증과 세포신호전달에 다양한 역할을 하는 여러 대사경로에 중요하게 연관되어 있다. 이 모든 경로의 중심에는 아라키돈산 대사가 있으며, 에스테르화되지 않은 아라키돈산은 시클로옥시게나제(cyclooxygenase), 리폭시게나제(lipoxygenase) 또는 사이토크롬 함유 에폭시게나제(epoxygenase) 등에 의해 즉시 대사가 일어난다. 따라서, 기존의 항염증제는 크게 스테로이드성 및 비스테로이드성 항염증제로 나누고, 이들 염증을 관한 치료제는 각각의 작용점을 차단하는 다양한 *in vitro* 검색법이 개발되어 있으나, 현재는 주로 효소활성도를 측정하여 염증치료제 개발에 관한 연구를 수행하고 있다. 그러나, 과거에는 시클로옥시게나제-1(cyclooxygenase-1; COX-1)과 시클로옥시게나제-2(cyclooxygenase-2; COX-2)에 대한 선택성을 고려하지 않고 연구되었으나, 최근 소염제의 COX-1 또는 COX-2에 대한 선택적인 길항작용에 대한 연구와 더불어 이를 기초로 하여 COX-2에 대한 선택적인 길항제를 개발하려는 움직임이 있다.

이 연구에서는 효과적인 항염증제 개발하기 위해서, 많은 천연물중에서 쿠마린 구조를 가지는 대부분의 성분들이 우수한 생리활성을 나타내고 있다. 특히 탱자에는 여러 종류의 monoterpenes, limonoids, flavonoids과 coumarins 등의 구성성분으로 이루어져 있다 [1]. 탱자의 구성 성분중에 7-제라닐옥시쿠마린은 7개의 탄소로 구성된 제라닐옥시기의 곁사슬을 가진 물질이다.

최근의 보고에 의하면, 7-제라닐옥시쿠마린은 여러 약리적인 효과 즉, 항암(anticancer)[2]/항종양(anticarcinogenic)[3], 항염증

(anti-inflammatory)[4], 항헬리코박터(antihelicobacter)[5], 항유전 독성(antigenotoxic)[6]과 신경보호(neuroprotective)[7] 효과들을 나타낸다고 알려져 있다. 또한 Koji Nagao 등[8]은 7-제라닐옥시쿠마린성분이 HepG2 hepatocytes에서 지질이상을 정상화시키는 효과가 있다고, 즉 다이어트를 유도할 수 있는 성분이라고 보고하고 있다. 이와같은 알려진 많은 성분들 중에서 쿠마린(coumarin)의 골격을 갖는 화합물들이 항염증 활성뿐만 아니라 알파-키모트립신(α -chymotrypsin)[9]과 인간백혈구 엘라스타아제(HLE; human leukocyte elastase)[10]에서도 저해활성을 나타낸다고 보고하고 있다. 이외에도 인삼, 탱자 등의 향료식물등이 생리활성을 가진다고 널리 알려져 있다[11-14].

본 연구에서는 이전에 실험한 데이터를 중심으로[15] 탱자의 구성성분인 7-제라닐옥시쿠마린과 이들의 다양한 유도체를 합성하여 염증에 대한 항염증 효능을 알아보기 위하여 염증을 유발하는 일산화질소 억제 cytokine을 측정해 보았다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

다양한 히드록시쿠마린(hydroxycoumarin)과 메르캅토쿠마린(mercaptocoumarin) 등은 98-99% 정도의 순도를 갖는 Aldrich, Fluka 등의 회사제품을 사용하였고, 알케닐사슬에 해당하는 출발물질은 95%의 브롬화제라닐(geranyl bromide, Aldrich)을 사용하였다. 또한 반응에 있어서 사용된 염기(base)로서는 NaOH, K_2CO_3 , 트리에탄올아민(TEA), CsOH, Cs_2CO_3 등을 사용하였다. 그 외 용매는 아세트니트릴, 에틸아세테이트, n-헥산, 아세톤, 에탄올을 사용하였다, 그리고 분석기기로서는 핵자기공명분광분석기(FT-NMR spectrometer; Bruker-AC 300MHz, Zug, Swiss)로 분석하였고, 이때 사용되는 용매는 내부 표준물질인 테트라메틸실란(TMS; tetramethylsilane)과 $CDCl_3$, CD_3OD 로 분석하였다. 화합물의 작용기에 대한 적외선 분광분석은 Nicolt Megna FT-IR 550 시리즈 II 스펙트로미터(Thermo Nicollet, USA)를 사용하였고 KBr 펠렛(KBr pellets)을 이용하여 구

조확인을 하였다. 그리고, 녹는점 측정은 파라핀 오일용기 하에 온도계를 장착하고 열린 유리모세관 방법으로 온도를 보정하지 않고 측정하였다.

2.2. 쿠마린 유도체들의 가스크로마토그래피-질량분석기(GC-MS) 분석

합성된 화합물들의 분자량분석은 가스크로마토그래피-질량분석기(HP6890GC + HP 5973 MSD ; USA)로 Table 1과 같은 조건으로 시행하였다. 각 화합물의 동정은 각 피크에 나타난 성분들은 윌리 8판 화학구조 라이브러리(미국, 에질런트사)와 비교하여 동일한 상태의 스펙트럼으로 비교하여 확인하였다. 분리된 각 화합물의 정량은 각 피크의 면적을 내부표준물질(4-데칸올(4-decanol))의 피크면적과 비교하여 산출하였으며, 이때의 응답계수(response factor)를 1로 가정하였다.

2.3. 실험방법

일반적인 합성방법 : 히드록시쿠마린(1 mmol)을 10 ml의 아세트니트릴 용매에 넣고 5분간 교반하여 녹인 후, 탄산세슘(cesium carbonate ; 1.1 mmol)과 브롬화제라닐(1.3 mmol, 95 %)을 쿠마린이 용해된 반응물에 넣고 상온에서 5분간 교반한 다음 1시간 10분간 환류하였다. 출발물질(5)이 박막크로마토그래피(TLC) 상에서 사라짐을 확인한 다음, 반응물을 실온으로 냉각시키고, 회전식 감압증류기로 용매를 제거하고, 50 ml의 디클로로메탄을 가하여 5분간 교반한 다음, 유리필터(glass filter)로 여과하고 세척하여 얻어진 여과액을 농축하여 잔여물을 얻었다.

이를 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 이용하여 용리액인 헥산/디클로로메탄(1:1, 용적비) 혼합용매를 가하여 여러 가지의 제라닐옥시쿠마린들을 수득하였다. 그리고, 합성된 여러 쿠마린 유도체들의 분석결과들은 다음과 같다. 이전에 실험[15]한 데이터를 중심으로 합성된 여러 쿠마린 유도체들의 분석결과들은 다음과 같다.

1. (*E*)-4-(3,7-dimethylocta-2, 6-dienyloxy) -2*H*-chromen-2-one **3**

액체, IR(KBr, cm^{-1}): ν 1722(>C=O); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 1.63(s, 3H, CH_3), 1.70(s, 3H, CH_3), 1.78(s, 3H, CH_3), 2.11-2.19(m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 4.72(d, J = 6.80Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 5.09-5.12(m, 1H), 5.50-5.54(m, 1H), 6.69 (s, 1H), 7.25-7.33(m, 2H), 7.52-7.57(m, 1H), 7.83-7.86(m, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 16.82, 17.74, 25.68, 26.21, 39.51, 66.27, 90.67, 115.94, 116.73, 117.10, 123.18, 123.47, 123.80, 132.10, 132.27, 143.71, 153.38, 163.02, 165.56 ; MS m/z = 298 (M⁺); CHN analysis($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$) 이론치 ; C, 76.48; H, 7.43. 실험치 ; C, 76.37; H, 7.41.

2. (*E*) -**3** - ((*Z*) -3,7 - dimethylocta -2,6-dienyloxy) -3- (2- ((*E*)-3,7- dimethylocta -2,6- dienyloxy)phenyl) acrylic acid (**4**)

액체, IR(KBr, cm^{-1}): ν 1634(>C=O); $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ 1.63(s, 3H, CH_3), 1.70(s, 3H, CH_3), 1.78(s, 3H, CH_3),

Table 1. GC-MS Analysis Condition of Coumarin Derivatives

| | |
|--|---|
| Column | Ultra 2(Ultra 2 ; 5% phenyl methyl siloxane, 50m*0.2mm, film thickness 0.33 μm) |
| Carrier gas | Helium, 53.2ml/분 |
| split ratio | None |
| Temperature programming and Heated zone conditions | The initial temperature ; 50 $^{\circ}\text{C}$ |
| | The initial time : 5 minutes |
| | Speed; 7 $^{\circ}\text{C}$ / minute |
| | The final temperature; 300 $^{\circ}\text{C}$ |
| The final time 5 minutes | |
| Injection port temperature | 250 $^{\circ}\text{C}$ |
| Ionization voltage | 70eV |

2.11-2.19(m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 4.72(d, $J = 6.80\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-$), 5.09-5.12(m, 1H), 5.50-5.54(m, 1H), 6.69 (s, 1H), 7.25-7.33(m, 2H), 7.52-7.57(m, 1H), 7.83-7.86(m, 1H); ^{13}C -NMR(75 MHz, CDCl_3): δ 16.82, 17.74, 25.68, 26.21, 39.51, 66.27, 90.67, 115.94, 116.73, 117.10, 123.18, 123.47, 123.80, 132.10, 132.27, 143.71, 153.38, 163.02, 165.56; MS $m/z = 298$ (M⁺); CHN analysis($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$) 이론치 C, 76.48; H, 7.43. 실험치 ; C, 76.37; H, 7.41.

3. (*E*)-7-(3,7-dimethylocta-2, 6-dienyloxy)-2H-chromen-2-one(**5**)

고체, IR(KBr, cm^{-1}): ν 1726 ($>\text{C}=\text{O}$), 1122 (C-O); ^1H -NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 1.60(s, 3H, CH_3), 1.66(s, 3H, CH_3), 1.70(s, 3H, CH_3), 2.16(m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 4.60(d, $J = 6.53\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-$), 5.06-5.09(m, 1H), 5.46(t, $J = 6.50\text{Hz}$, 1H), 6.22(dd, $J = 2.91, 9.47\text{Hz}$, 1H), 6.80-6.86(m, 2H), 7.34(d, $J = 8.47\text{Hz}$, 1H), 7.34(d, $J = 9.47\text{Hz}$, 1H); ^{13}C -NMR(75 MHz, CDCl_3): δ 16.72, 17.66, 25.60, 26.24, 39.49, 65.50, 101.63, 112.43, 112.94, 113.18, 118.50, 123.62, 128.65, 131.88, 142.24, 143.36, 155.88, 161.16, 162.16 ; MS $m/z = 298$ (M⁺); CHN analysis($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$) 이론치 ; C, 76.48; H, 7.43. 실험치 ; C, 76.37; H, 7.41.

4. (*E*)-7-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyloxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one (**6**)

고체, IR(KBr, cm^{-1}): ν 1724($>\text{C}=\text{O}$), 1121 (C-O); ^1H -NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 1.60(s, 3H, CH_3), 1.67(s, 3H, CH_3), 1.76(s, 3H, CH_3), 2.07-2.16(m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2.39(d, $J = 0.82\text{Hz}$, 3H, CH_3), 4.60(d, $J = 6.52\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-$), 5.06-5.09(m, 1H), 5.47(t, $J = 6.51\text{Hz}$, 1H), 6.12(d, $J = 0.63\text{Hz}$, 1H), 6.81-6.88(m, 2H), 7.48(d, $J = 8.74\text{Hz}$, 1H); ^{13}C -NMR(75 MHz, CDCl_3): δ 16.73, 17.66, 18.58, 25.60, 26.25, 39.50, 65.46, 101.66, 111.66, 112.89, 113.47, 118.54, 123.63, 125.40, 131.89, 142.21, 152.46, 155.29, 161.27, 161.98 ; MS $m/z = 312$ (M⁺); CHN analysis($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$) 이론치 C, 76.89; H, 7.74. 실험치 ; C, 76.87; H, 7.72.

5. (*E*)-7-(3,7-dimethylocta-2, 6-dienylthio)-2H-chromen-2-one(**7**)

고체, IR(KBr, cm^{-1}): ν 1718 ($>\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 1.58(s, 3H, CH_3), 1.65 (s, 3H, CH_3), 1.72 (s, 3H, CH_3), 2.01-2.12 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2.39(d, $J = 1.03\text{Hz}$, CH_3), 5.02-5.05(m, 1H), 5.31 (t, $J = 7.48\text{Hz}$, 1H), 6.20 (d, $J = 1.02\text{Hz}$, 1H), 7.13-7.17 (m, 2H), 7.43 (d, $J = 8.30\text{Hz}$, 1H); ^{13}C -NMR(75 MHz, CDCl_3): δ 16.32, 17.66, 18.49, 25.59, 26.36, 30.70, 39.50, 113.83, 114.53, 117.09, 117.99, 123.27, 123.68, 124.34, 131.78, 141.20, 143.81, 152.08, 153.84, 160.59 ; MS $m/z = 328$ (M⁺); CHN analysis($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{S}$) 이론치 ; C, 73.13; H, 7.36. 실험치 ; C, 73.12; H, 7.31.

6. (*E*)-7-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyloxy)-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-2-one(**8**)

고체, IR(KBr, cm^{-1}): ν 1732($>\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 1.60(s, 3H, CH_3), 1.66(s, 3H, CH_3), 1.77 (s, 3H, CH_3), 2.08-2.16(m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 4.63(d, $J = 6.53\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-$), 5.05-5.09(m, 1H), 5.44-5.48(m, 1H), 6.60(s, 1H), 6.87-6.94 (m, 2H), 7.59(m, 1H); ^{13}C -NMR(75 MHz, CDCl_3): δ 16.75, 17.66, 25.59, 26.22, 39.48, 65.69, 102.18, 106.91, 112.03, 113.96, 118.14, 123.54, 126.21, 131.97, 142.71, 156.35, 159.41, 162.89 ; MS $m/z = 366$ (M⁺); CHN analysis($\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{O}_3$) 이론치 ; C, 65.57; H, 5.78. 실험치 ; C, 65.56; H, 5.75.

7. (*E*)-6-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyloxy)-2H-chromen-2-one(**9**)

고체, IR(KBr, cm^{-1}): ν 1728($>\text{C}=\text{O}$), 1120 (C-O); ^1H -NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 1.60(s, 3H, CH_3), 1.67(s, 3H, CH_3), 1.75(s, 3H, CH_3), 2.07-2.16(m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 4.56(d, $J = 6.47\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2-$), 5.07-5.11(m, 1H), 5.48(t, $J = 6.10\text{Hz}$, 1H), 6.39 (dd, $J = 9.52\text{Hz}$, 1H), 6.92 (d, $J = 2.77\text{Hz}$, 1H), 7.09-7.13(m, 1H), 7.23 (d, $J = 9.02\text{Hz}$, 1H), 7.63(d, $J = 9.54\text{Hz}$,

1H) ; ^{13}C -NMR(75 MHz, CDCl_3): δ 16.68, 17.66, 25.62, 26.27, 39.50, 65.61, 111.19, 116.98, 117.75, 118.99, 119.14, 120.12, 123.66, 131.84, 141.80, 143.18, 155.36, 160.91 ; MS m/z = 298 (M+); CHN analysis($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$) 이론치 ; C, 76.48; H, 7.43. 실험치 ; C, 76.36; H, 7.42.

8. (E)-3-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyloxy)-2H-chromen-2-one(**10**)

고체, IR(KBr, cm^{-1}): ν 1728(>C=O), 1118 (C-O); ^1H -NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 1.59(s, 3H, CH_3), 1.64 (s, 3H, CH_3), 1.76(s, 3H, CH_3), 2.06-2.16(m, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 4.62(d, J = 6.53Hz, 2H, $-\text{CH}_2-$), 5.03-5.08(m, 1H), 5.50(t, J = 6.49 Hz, 1H), 6.82(s, 1H), 7.21-7.29(m, 2H), 7.34-7.39(m, 2H); ^{13}C -NMR(75 MHz, CDCl_3): δ 16.76, 17.66, 25.59, 26.18, 39.48, 66.26, 113.81, 116.23, 118.04, 119.82, 123.59, 124.58, 126.35, 128.28, 131.92, 142.45, 143.70, 149.58, 157.66. MS m/z = 312 (M+); CHN analysis($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$) 이론치 ; C, 76.48; H, 7.43. 실험치 ; C, 76.47; H, 7.42.

2.5. 일산화질소 억제 cytokine 측정 인터루킨-6의 생성 저해능 측정

생쥐 단핵/대식세포 계열의 세포주인 RAW 264.7(5×10^5 개)에 시료를 처리하고, 30분간 배양(incubation)한 후, 지방다당체(LPS ; lipopolysaccharide, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여, 24시간 동안 37°C , 5 % 이산화탄소 배양기(CO_2 incubator)에서 배양시켰다. 배양 후, 상층액을 수거하였으며, 상층액에 포함된 인터루킨-6(IL-6)의 양은 효소항체법(enzyme linked immunosorbent assay : ELISA)을 이용하여 측정하였다. 즉, 플레이트-바닥 마이크로웰(plate-bottom micro well)에 염소 항-인간 사이토카인(goat anti-human cytokine) 1차 항체 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 코팅완충제(coating buffer)(0.1 M NaHCO_3 , pH 8.2)에 희석하여 $50 \mu\text{l}/\text{well}$ 로 분주하고, 4°C 에서 하룻밤 둔 다음, 세정용액(0.05 % 트윈 20/PBS)으로 세척하였다. 세척된 마이크로웰은 10 % 우태혈청(FBS : fetal bovine serum)이 첨가된 인산염완충액(PBS ; phosphate buffered salines)로 정지(blocking)시켰으며, 실험에서 채취한 배양 상층액을 적당

한 비율로 희석한 후, 각 웰(well)에 분주하여 상온에서 반응시켰다. 그 다음, 비오틴(biotin)이 부착된 2차 항체($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 과 일정시간 상온에서 반응시킨 후, 아비딘-퍼옥시다아제(avidin- peroxidase)($2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 을 첨가하였다. 마지막으로 기질(2,2'-아지노-비스(2,2'-azino-bis), 0.1M 구연산(citric acid), H_2O_2)을 첨가하여 발색시킨 시료는 마이크로플레이트 판독기(micro-plate reader)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 인터루킨-6 농도는 표준곡선을 이용하여 환산하였고, 측정 농도의 한계치는 0.1 M 이었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 치환된 쿠마린 유도체들의 합성

Massimo Curini 등[4]은 제라닐옥시쿠마린 유도체에 대한 항염증효과를 살펴 본 결과, 천연물인 7-제라닐옥시쿠마린($1 \mu\text{M}/\text{cm}^2$)과 8-아세톡시 제라닐옥시쿠마린($1 \mu\text{M}/\text{cm}^2$) 등이 오에데마 감소 50 % 정도 얻었다. 이러한 결과에 대한 구조활성관계에 대한 세부적인 연구가 없는 실정이다. 이 연구에서 탱자에서 분리된 7-제라닐옥시쿠마린에 대한 다양한 약리적인 잠재적 효능 때문에, 보다 포괄적인 제라닐옥시쿠마린(geranyloxy coumarin)유도체를 합성하고, 이들의 생리활성들을 비교하였다. 먼저, 4-제라닐옥시쿠마린을 합성하기 위하여 4-히드록시쿠마린과 브롬화제라닐을 다양한 염기 (NaOH, K_2CO_3 , 트리에탄올아민(TEA), CsOH, Cs_2CO_3 , $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$)와 아세토니트릴용매 하에서 다양한 반응의 조건하에서 반응하였다. 그 결과, $\text{Cs}_2\text{CO}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ 조건하에서 2시간동안 상온에서 반응하여 화합물 **3**을 가장 높은 수율로 얻었으나, 환류 조건하에서는 C-알킬화반응(C-alkylation)에 의한 화합물 **4**가 90% 정도 얻어졌다. 이러한 과정의 4-히드록시쿠마린이 염기와 반응하여 주변이온(ambient ion)을 형성하여 브롬화제라닐과 치환하여 C-알킬화와 O-알킬화(o-alkylation)의 화합물이 형성됨을 확인하였다.

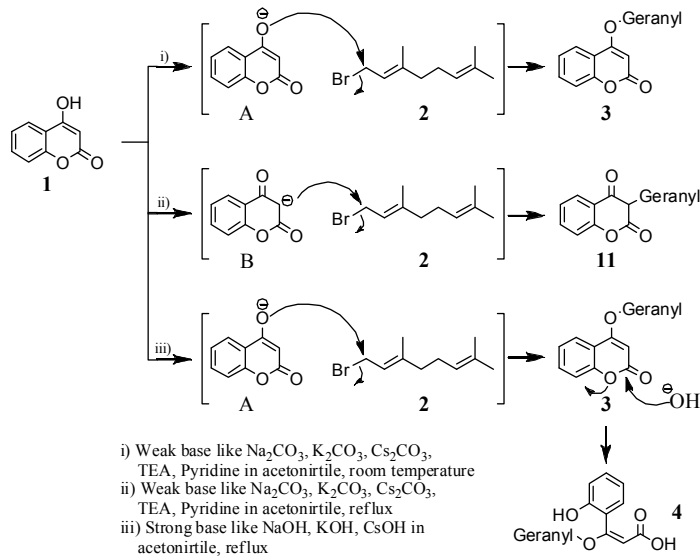


Fig. 1. Synthetic route to 4-hydroxycoumarin located selective reaction.

그림 1에 나타난 바와 같이, 4-히드록시쿠마린 1이 상온조건하에서의 약염기와 반응할 경우의 중간체가 O-음이온(O-anion ; A type)이 안정화되어 브롬화제라닐에 의해 O-알킬화된 화합물 3이 지배적으로 형성 하지만, 환류조건하에서 반응하였을 때 쿠마린의 중간체가 열역학적으로 고리상의 디케토형(diketo type ; B type)이 형성되어 C-알킬화된 화합물 11가 형성된다. 그러나, 히드록시 이온을 갖는 강염기(NaOH, KOH, CsOH, etc)가 화합물 1과 반응할 경우에는 쿠마린구조의 골격이 열린 형태의 화합물 4가 지배적으로 얻어졌다. 벤젠골격이 아닌 위치에 히드록시를 갖는 4-히드록시쿠마린 1과는 달리 히드록시기(OH기)가 쿠마린골격의 5,6,7,8번 위치에 있을 경우, 히드록시쿠마린(예, 6-히드록시쿠마린)과 브롬화제라닐, 탄산세슘, 아세토니트릴 조건하에서 상온에서 반응한 결과, 일반적인 O-알킬화된 화합물(5,6,7,8,9,10)을 좋은 수율로 얻을 수 있었다. 그러나 위의 경우와 같이 상온과 환류하여 반응하였을 때 생성물의 수율에 대한 변화가 상온에서는 긴 반응시간에서 50%정도의 수율로, 환류조건에서는 짧은 시간동안 90%정도의 높은 수율의 O-알킬화된 생성물을 얻을 수 있었다. 그림 2에 나타난 바와 같이, 주어진 조건으로 다양한 히

드록시쿠마린과 브롬화제라닐 간의 반응으로 아래와 같이 새로운 쿠마린 유도체들을 얻었다.

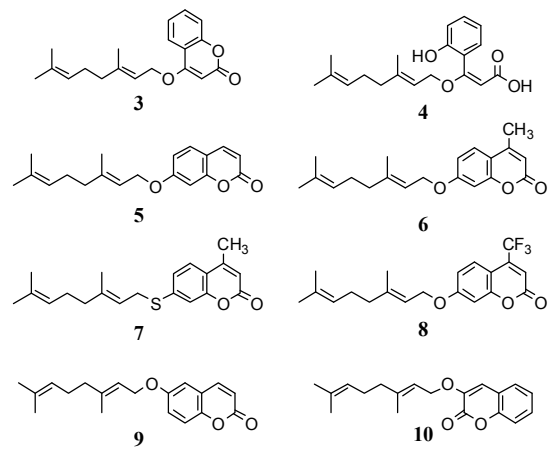


Fig. 2. Synthesized geranyloxy coumarin derivatives.

3.2. 쿠마린 유도체의 cytokine 측정항 인터루킨-6의 생성 저해능

항염증 효능을 알아보기 위하여 염증을 유발하는 사이토카인-6의 생성 억제능을 측정해 보

았다. 단핵/대식세포 계열의 세포주인 RAW 264.7를 5×10^5 로 분주하여 시료 6개 각각을 최종 농도가 1 μ M과 10 μ M 농도가 되도록 배지에 처리 한 후, 30분간 배양하였다. 염증을 유발하는 물질인 lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/ml)를 다시 처리하여 대식세포주에 염증을 유발하였다. 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5 % 이산화탄소 배양기에서 배양시킨 후 배지를 회수하여 원심 분리시킨 다음, 그 상등액으로 염증을 일으키는 사이토카인인 인터루킨-6의 생성량을 측정하였다. LPS만을 처리한 시험군과 생성량을 비교해 본 결과 표 2와 같이 각각의 시료는 50~60 % 정도 억제시키는 것으로 나타났으며, 대조 (+)군보다도 더 높은 활성을 보여 주었다.

Table 2. Cytokine Measurements Inhibits Under Nitric Oxide

| Treatment | Inhibition(%) | |
|-------------|---------------|------------|
| | 1 μ M | 10 μ M |
| Contrast(+) | - | 42.9 |
| 5 | 40.1 | 61.1 |
| 6 | 35.6 | 43.7 |
| 7 | 65.8 | 66.2 |
| 8 | 60.8 | 50.1 |
| 9 | 68.9 | 72.6 |
| 10 | 60.5 | 62.1 |

4. 결론

본 연구에서는 다음과 같은 실험 결과로 제라닐옥시쿠마린 유도체들은 항염증 저해활성을 갖는 기능성 원료로 응용 가능성이 있음을 알았다.

1. 항염증 효능을 가진 탱자의 구성 성분인 7-제라닐옥시쿠마린을 효과적으로 합성하였고, 또한 이러한 합성방법으로 다양한 알콕시쿠마린 유도체를 높은 수율로 얻었다.
2. 이와같이 얻어진 여러 유도체들의 항염증 생리활성을 조사한 결과, 일산화질소 하에서 억제 cytokine 측정 한 인터루킨-6의 생성 저해능에서 화합물 5~10이 염증을 일으키는 인터루킨-6을 50~60% 정도 억제

시키는 것으로 나타났다. 반면에, 6-제라닐옥시쿠마린의 성분이 사이토카인인 인터루킨-6가 1 μ M농도에서 68.9%를, 10 μ M에서 72.6%의 저해효과를 나타냈다.

참고문헌

1. T. Nabekura, T. Yamaki, S. Kitagawa, Effects of chemopreventive citrus phytochemicals on human P-glycoprotein and multidrug resistance protein 1. *Eur. J. Pharmacol.*, **600**, 45(2008).
2. Toshifumi Hirata, Misato Fujii, Kazuhiro Akita, Noriyuki Yanaka, Kaori Ogawa, Masanori Kuroyanagi, Daiki Hongo, Identification and physiological evaluation of the components from Citrus fruits as potential drugs for anti-obesity and anticancer, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**, 25(2009).
3. Byung Zun Ahn, Shin Il Kim, Sung Ho Ryu, Kyu Sang Kang, You Hui Lee, *the korea society of pharmacognosy*, **17(2)**, 168 (1986).
4. Massimo Curini, Francesco Epifano, Federica Maltese, Maria C. Marcotullio, Aurelia Tubaro, Gianmario Altinier, Sylvia Prieto Gonzalesc and Juan C. Rodriguezc, Synthesis and anti-inflammatory activity of natural and semisynthetic geranyloxycoumarins, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **14**, 2241 (2004).
5. K. Takeda, H. Utsunomiya, S. Kakiuchi, Y. Okuno, K. Oda, K. Inada, Y. Tsutsumi, T. Tanaka, K. Kakudo, Citrus auraptene reduces Helicobacter pylori colonization of glandular stomach lesions in Mongolian gerbils. *J. Oleo Sci.*, **56**, 253 (2007).
6. F. Soltani, F. Mosaffa, M. Iranshahi, G. Karimi, M. Malekaneh, F. Haghghi, J. Behravan, Auraptene from Ferula szowitsiana protects human peripheral lymphocytes against oxidative stress. *Phytother. Res.*, **24**, 85 (2010).

7. F. Epifano, G. Molinaro, S. Genovese, R. T. Ngomba, F. Nicoletti, M. Curini, Neuroprotective effect of phenylcoumarins from edible vegetables. *Neurosci. Lett.*, **443**, 57(2008).
8. Koji Nagao, Naomi Yamano, Bungo Shirouchi, Nao Inoue, Shigeru Murakami, Takao Sasaki, Teruyoshi Yangita, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 9028(2010).
9. Johan Wouters, Marjorie Huygens, Lionel Pochet, Bernard Pirotte, François Durant, Bernard Masereel, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **12**, 1109 (2002).
10. Lionel Pochet, Caroline Doucet, Georges Dive, Johan Wouters, Bernard Masereel, Michèle Reboud-Ravaux, Bernard Pirotte *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **1**, **8**, 489(2000).
11. S.S. Lim, and J.H. Lee, Effect of *Artemisia Princeps* var. *Oriental* and *Cirsium Japonicum* var. *Vssuriense* on Cardiovascular System of Hyper lipidemic Rat, *J. Korean Nutr. Soc.*, **30**, 797 (1997b).
12. B.K. Kim, and C.J. Jung, Effects of Feeding Dietary Mugwort Powder on the Fattening Performance and Carcass Characteristics in The Fattening Hanwoo, *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, **27**, 277 (2007a).
13. B.K. Kim, and C.J. Jung, Effects of Feeding Dietary Mugwort on the Beef Quality in Fattening Hanwoo, *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, **27**, 244 (2007b).
14. B.K. Kim, and Y.J. Kim, Effects of Dietary Mugwort and Crab Shell Powder on Physico-Chemical Properties of Korean Native Pork, *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, **43**, 535(2001).
15. D. S. Kim, E. J. Roh, Synthesis of Trifoliate orange extracts having anti inflammation activities, *J. Kor. Oil Chem Soc.*, **28(2)**, 196 (2011).