Neuroprotective effects of phenolic compounds isolated from *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*

Seon Min Oh^{1,2} · Doo Jin Choi¹ · Hyoung-Geun Kim² · Jae Won Lee¹ ·
Young-Seob Lee¹ · Jeong-Hoon Lee¹ · Seung-Eun Lee¹ · Geum-Soog Kim¹ ·
Nam-In Baek² · Dae Young Lee¹

조팝나무(*Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*)로부터 분리한 페놀 화합물의 신경세포 보호효과

오선민^{1,2} · 최두진¹ · 김형근² · 이재원¹ · 이영섭¹ · 이정훈¹ · 이승은¹ · 김금숙¹
· 백남인² · 이대영¹

Received: 12 November 2018 / Accepted: 30 November 2018 / Published Online: 31 December 2018
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2018

Abstract The leaves of *Spiraea prunifolia* were extracted with 80% aqueous MeOH and the concentrates were partitioned into EtOAc, *n*-BuOH, and H₂O fractions. The repeated SiO₂ or ODS column, and medium pressure liquid chromatographies for the *n*-BuOH fraction led to isolation of two phenolic glucosides. The chemical structures of these compounds were determined as isosalicin (1) and crenatin (2) based on spectroscopic analyses including Nuclear magnetic resonance and MS. Extracts were analyzed using UPLC-MS/MS providing a short analysis time within 5 min using MRM technique. The concentration of crenatin was higher as 9.53 mg/g and isosalicin was lower as 0.65 mg/g. Neuroprotective effects of these compounds against hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced neurotoxicity were evaluated. The results showed that exposure to H₂O₂ induced morphological changes,

cell death and neurotoxicity in SK-N-MC cells. However, pretreatment with crenatin resulted in inhibition of morphological change, reduction of loss of cell viability and attenuation of neuronal damage. These results suggested that neuroprotective effect of crenatin isolated from *S. prunifolia* can be a good candidate for the development of health beneficial foods which can ameliorate the degenerative neuronal disease caused by oxidative stress.

Keywords Crenatin · Isosalicin · Neuroprotective effect · Nuclear magnetic resonance · Quantification · *Spiraea prunifolia*

Seon Min Oh and Doo Jin Choi contributed equally to this study.

Dae Young Lee (✉)
E-mail: dylee0809@gmail.com

¹Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Eumseong 27709, Republic of Korea

²Department of Oriental Medicine Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

알츠하이머 치매(Alzheimer's disease; AD) 질환으로 대표되는 퇴행성 뇌신경계 질환은 노령화 인구의 급증으로 인해 발병 추세가 증가하고 있으며, 그에 따른 사회·경제적 문제가 지속적 으로 대두됨에 따라 대책 마련이 시급한 실정이다. AD의 주요 발병 원인은 신경세포에서 amyloid β protein의 과도한 생성 및 축적과 과도한 산화스트레스 유발 등으로 인한 신경세포가 사멸하는 것으로 알려져 있다. 세포 내 자유라디칼(free radical) 및 활성산소종(reactive oxygen species)의 과생성으로 인해 유발된 산화스트레스는 단백질, 지질 및 DNA등 주요 생체분자들의 손상을 일으켜 세포의 형태학적 변화, 기능 손실 및 세포사멸(apoptosis)을 유발한다고 알려져 있다[1,2]. 따라서 최근에는

다양한 천연물을 이용하여 산화스트레스로부터 신경세포 보호 효과를 검증하는 연구가 각광 받고 있다[3,4].

조팝나무(*Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*)는 쌍떡잎식물, 장미과에 속하는 낙엽활엽관목으로 중국, 타이완 등을 포함한 동북아시아 지역에 널리 분포하며, 우리나라에서는 함경북도를 제외한 전역에 자생한다고 알려져 있다[5]. 한방에서는 조팝나무의 뿌리를 소염화 또는 상산목이라 하여 상산(*Dichroa febrifuga* Lour.)의 대용으로 해열, 소염, 진통, 신경통 및 학질 등의 치료에 이용하여 왔다[6,7]. 조팝나무를 포함하는 *Spiraea*속 식물에는 diterpenoid, triterpenoid, flavonoid 및 phenolic 화합물 등 다양한 성분이 함유되어 있다[8,9]. 조팝나무 뿌리에는 주로 urasolic acid, tormentic acid 등의 triterpenoid 계열, campesterol, β -sitosterol 등의 steroid 계열 및 *p*-hydroxycinnamic acid 등 phenolic 화합물 등이 보고되어 있다[10-12]. 조팝나무를 이용한 생리활성 연구는 뿌리 추출물을 이용한 항염증 활성과 조팝나무 가지 추출물의 항암 및 신경세포 성장인자 분비촉진 활성이 보고되었으며[13-15], 화합물로는 뿌리에서 분리된 prunioside A의 항산화 및 항염증 활성이 보고되었다[16,17]. 조팝나무는 주로 뿌리 및 가지 부위를 이용한 성분 분석과 활성 연구가 진행되었으나, 잎을 이용한 성분 동정, 정량 및 기능성 연구는 미비한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 알츠하이머 치매 질환의 기초연구를 위하여 조팝나무 잎에서 물질을 분리 및 동정하였으며, 분리된 화합물에 대한 함량 평가 및 hydrogen peroxide (H_2O_2)에 의해 유발된 산화스트레스로부터 신경세포 보호 활성 여부를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에서 사용된 조팝나무 잎은 2017년 8월에 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부에서 제공받아 실험을 진행하였으며, 표본시료 (NIHHS-1708)는 국립원예특작과학원 인삼특작부에 물질분석실에 보관되어 있다.

시약 및 기기

Column chromatography (c. c.)용 silica gel (SiO_2) resin은 Kiesel gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany)을 octadecyl SiO_2 (ODS)은 Lichroprep RP-18 (40-60 μ M, Merck)을 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC)는 Kiesel gel 60 F254와 RP-18 F254s (Merck)을 사용하였다. 물질 정제에 사용된 기기는 YMC LC-Forte/R (YMC Co., LTD. Kyoto, Japan)를 사용하였다. Nuclear magnetic resonance (NMR) 스펙트럼은 400 MHz FT-NMR spectrometer (Varian Inova AS-400, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였고, infrared spectrum은 Perkin model 599B (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)로 측정하였다. 분석을 위한 증류수, 메탄올 및 아세트오니트릴은 HPLC급 (Fisher Scientific Korea Ltd., Seoul, Korea)이었으며, 분석 용매에 첨가한 formic acid는 Fluka (Sigma-aldrich Co. St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 그 외의 시약 및 용매는 모두 일급 이상의 시약을 구입하여 사용하였다. 신경세포 배양을 위해 사용된 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM),

fetal bovine serum (FBS)은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, penicillin-streptomycin, trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), hydrogen peroxide solution (H_2O_2) 및 N-acetyl-L-cysteine (NAC)는 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하였다.

추출 및 분리

건조된 상태의 조팝나무 잎, 1 kg를 80% MeOH 수용액에 24 시간 담가서 실온에서 추출하였다. 얻어진 여액을 합쳐 감압농축하여 MeOH 추출물(105 g)을 얻었다. 얻어진 MeOH 추출물을 EtOAc (2 L)/ H_2O (2 L)로 2회 분배 추출하였고, 다시 H_2O 층을 *n*-BuOH (1.8 L)로 2회 분배 추출하였다. 각층을 감압농축하여 EtOAc 분획(SPLE, 12 g)과 *n*-BuOH 분획(SPLB, 28 g) 및 H_2O 분획을 얻었다. 위에서 얻어진 *n*-BuOH 분획 25 g을 Diaion HP-20 c.c. (ϕ 10×40 cm, H_2O →MeOH를 실시하여 각 500 mL씩 분취하였다. 각 분취액을 SiO_2 TLC로 확인하여 유사한 부분을 함께 모으고, 농축하여 5개의 분획물(SPLB-1~SPLB-5)을 얻었다. SPLB-3 분획(3 g)에 대하여 SiO_2 c.c. (Φ 5.0×15.0 cm, $CHCl_3$ -MeOH- H_2O =12:3:1→10:3:1→7:3:1→65:35:10, 총 5 L 사용)를 실시하여 총 10개의 분획물(SPLB-3-1~SPLB-3-10)을 얻었다. 그중 SPLB-3-5 분획(320 mg)에 대하여 중압분취장비(Medium pressure liquid chromatography, YMC LC-Forte/R)를 이용하여 분리를 진행하였다. 이때 사용된 컬럼은 YMC-pack pro C18 (20 mm×250 mm, 10 μ m)를 사용하였으며 이동상의 기울기 조건은 A (H_2O):B (Acetonitrile)=90:10의 조건에서 A (H_2O):B (Acetonitrile)=10:90의 조건으로 30분간 2.5 mL/min의 유속으로 210 nm 파장에서 분리를 하였다. 총 12개의 분획물 (SPLB-3-5-1~SPLB-3-5-12)을 얻었으며 화합물 1 (SPLB-3-5-5, 17.0 mg)를 분리하였다. SPLB-5 분획(1.2 g)에 대하여 ODS c.c. (Φ 5.0×10.0 cm, MeOH- H_2O =1:2, 총 2.8 L 사용)를 실시하여 총 8개의 분획물(SPLB-5-1~SPLB-5-8)을 얻었다. SPLB-5-1-1 분획(120 mg)에 대하여 중압분취장비를 이용하여 분리를 진행하였다. 이때 사용된 컬럼은 Phenomenex Luna C-18 (10 mm×250 mm, 10 μ m)를 사용하였으며 이동상의 기울기 조건은 A(H_2O):B (Acetonitrile)=87:13의 조건으로 30분간 2.5 mL/min의 유속으로 210 nm 파장에서 분리를 하였다. 총 12개의 분획물(SPLB-5-1-1-1~SPLB-5-1-1-5)을 얻었으며 화합물 2 (SPLB-5-1-1-5, 25 mg)를 분리하였다.

화합물 1 (isosalicin): White amorphous powder (MeOH); positive ESI/MS m/z 287 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, methanol- d_4 , δ_H) 7.75 (1H, dd, J =7.6, 1.6 Hz, H-6), 7.22 (1H, ddd, J =8.0, 7.6, 1.6 Hz, H-4), 7.11 (1H, dd, J =8.0, 1.2 Hz, H-3), 6.93 (1H, ddd, J =7.6, 7.6, 1.2 Hz, H-5), 5.46 (1H, d, J =12.4 Hz, H-7a), 5.24 (1H, d, J =12.4 Hz, H-7b), 5.09 (1H, d, J =7.6 Hz, H-1'), 4.51 (1H, dd, J =11.6, 2.4 Hz, H-6'a), 4.39 (1H, dd, J =11.6, 5.2 Hz, H-6'b), 4.25 (1H, m, H-2'), 4.25 (1H, m, H-4'), 4.12 (1H, dd, J =8.8, 8.8 Hz, H-3'), 3.91 (1H, m, H-5'); ^{13}C -NMR (100 MHz, methanol- d_4 , δ_C) 156.5 (C-2), 129.7 (C-6), 129.0 (C-4), 125.8 (C-1), 119.5 (C-5), 115.9 (C-3), 104.4 (C-1'), 78.6 (C-3'), 78.6 (C-5'), 75.3 (C-2'), 71.7 (C-4'), 67.3 (C-7), 62.8

(C-6').

화합물 2 (crenatin): Amorphous powder (MeOH); positive ESI/MS m/z 319 $[M+H]^+$; 1H -NMR (400 MHz, pyridine- d_5 , δ_H) 7.01 (2H, br. s, H-2, 6), 5.40 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1'), 4.97 (2H, s, H-7), 4.49 (1H, dd, $J=11.6, 2.4$ Hz, H-6'a), 4.32 (1H, dd, $J=11.6, 5.2$ Hz, H-6' b), 4.22 (3H, overlapped, H-2', 4', 5'), 3.91 (1H, m, H-3'); ^{13}C -NMR (100 MHz, pyridine- d_5 , δ_C) 153.8 (C-3), 153.8 (C-5), 143.9 (C-1), 134.1 (C-4), 106.1 (C-1'), 105.3 (C-2), 105.3 (C-6), 78.6 (C-3'), 77.4 (C-5'), 75.3 (C-2'), 71.7 (C-4'), 64.5 (C-7), 62.8 (C-6').

UPLC-ESI-MS/MS 분석

건조된 조팝나무 잎을 불밀(Retsch MM400 mixer mill, Haan, Germany)을 이용하여 미세한 분말로 갈았다. 2 mL 튜브에 조팝나무 시료 100 mg과 80% MeOH 1 mL을 넣고 초음파 추출기(Bransonic 3510R-DTH, Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, USA)를 이용하여 40 °C에서 30분간 추출을 진행하였다. 원심분리기(HITACHI koki Co. Ltd. Tokyo, Japan)를 이용하여 3500×g에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 1 mL 튜브에 넣고 회전식 증발기(Eyela NVC-2100, Tokyo, Japan)를 이용하여 감압 하에서 용매를 제거하였다. 잔사를 1 mL 메탄올에 녹이고, 0.2 μ m의 13 mm 디스크 필터(Chromdisc Co., Daegu, Korea)로 여과하여 기기분석에 사용하였다. 분리된 화합물의 정량분석을 위하여, UPLC (Waters ACQUITY I-Class, Waters Corp. Milford, MA, USA)가 부착된 3200 QTRAP mass spectrometer (AB SCIEX, Framingham, MA, USA)를 사용하였으며, 컬럼은 Waters사의 ACQUITY BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μ m)을 사용하였다. 컬럼의 오븐 온도는 40 °C로 설정하였다. 이동상 용매 시스템은 0.1% formic acid 수용액(A)과 아세트나이트릴(B)로 이루어졌으며 이동상 조건은, 처음 0.34분간 B를 0-3%로 증가, 5.78분간에 걸쳐 B를 80%로 증가시켰으며, 8분간에 걸쳐 B를 다시 3%로 회기 하였다. 컬럼 유속은 0.37 mL/min이며, 주입량은 10 μ L이었다. MS/MS 실험은 Turbo VTM source와 Turbo Ion Spray probe가 장착된 API 3200 QTRAP LC/MS/MS system을 이용하여 수행하였다. 질량분석기의 이온화 방식에는 전기분무 이온화(electrospray ionization, ESI)법을 사용하였다. 질량 스펙트럼은 Positive ion과 Multiple Reaction Monitoring (MRM mode)의 분석법을 이용하여 분리된 물질의 선구이온(precursor ion)을 선택 후, 선택된 선구이온에 대하여 충돌 에너지를 적용하고 생성이온(product ion)을 분석하여 정량분석에 적용하였다. 질량분석 스펙트럼은 0.05 amu의 스텝사이즈로 m/z 50-1,000 범위에서 측정되었다. 분석 시에 사용된 기기의 중요 parameter 값은 화합물 1은 319→139, 화합물 2는 285→179의 질량 값에서 검출하였고, collision energy는 31 V, Ion spray voltage는 5.5 kV, Ion source 온도는 450 °C로 설정하여 분석하였다. 장비 분석 및 데이터 수집에는 AB SCIEX에서 제공된 BioAnalystTM (Ver.1.4.2) 프로그램을 사용하였다.

화합물의 정량

분리된 화합물 2종을 검량 곡선을 이용하여 정량 하였다. 각 물질을 메탄올에 용해시켜 만들었으며 -4 °C에서 보관하였다. 직선성은 0.0156-1 ppm 사이의 5농도에서 평가하였다.

세포 배양

본 실험에 사용한 사람의 신경모세포종인 SK-N-MC 세포는 American Type Culture Collection (ATCC HTB-10TM)에서 구입하여 사용하였으며, 10% FBS 및 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 EMEM 배지에서 37 °C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다.

세포독성 측정

SK-N-MC 세포에 대한 시료의 세포독성(Cytotoxicity)을 평가하기 위해 각각 최종 농도가 100 μ M이 되도록 시료를 세포에 처리한 후, 24시간 동안 반응시켰다. 1 mg/mL 농도의 MTT 시약을 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후, 200 μ L DMSO를 첨가하여 생성된 formazan crystal을 녹여 microplate reader (BIO-TEK, Winooski, VT, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과값은 아무것도 처리하지 않은 정상 대조군(Control)에 대한 백분율로 나타내었다.

세포 생존율 측정

H₂O₂ 처리에 의한 신경세포 사멸에 대한 시료의 세포보호 효과는 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 세포는 96 well plate에 1×10^5 cells/mL로 분주하고, 24시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 시료를 100 μ M 농도로 2시간 동안 전처리 한 후, 200 μ M H₂O₂를 24시간 동안 처리하였다. 각 well에 최종 농도 1 mg/mL의 MTT 시약을 첨가하여 4시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 반응시켰다. 생성된 formazan crystal은 200 μ L의 DMSO를 첨가하여 녹인 후, (BIO-TEK, Winooski, VT, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 아무것도 처리하지 않은 정상 대조군을 100%로 하여 각 실험군의 상대적인 세포 생존율을 계산하였다. Positive control은 NAC을 사용하였다.

LDH assay

시료 100 μ M 농도로 2시간 동안 전처리 한 후, 200 μ M H₂O₂를 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 세포 배양액을 취하였다. 10분간 원심분리 (250×g, 4 °C) 하여 100 μ L 상등액을 취한 후, LDH 세포독성 검출 키트(Takara bio inc, Tokyo, Japan)를 이용하여 신경세포 손상 정도를 측정하였다. 최종적으로 Microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였고, 시료를 첨가하지 않은 정상 대조군을 100%로 하여 각 실험군의 상대적인 세포 독성을 구하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 mean $\pm$ SD로 나타내었고($n=3$), 각 실험군 간 차이의 통계적 유의성은 Graph-pad prism 5 software를 이용하여 ANOVA 분산분석과 Tukey's multiple comparison test로 유의성 검정을 시행하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

화합물 1은 White amorphous powder 형상으로서 TLC 전개 후, 10% 황산 발색 시 갈색으로 발색 되었다. Positive ESI/

MS에서 m/z 287 $[M+H]^+$ peak의 관측으로 질량 값은 286 $[M]^+$ 로 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, methanol- d_4 , δ_{H})의 olefin 영역에서 네 개의 olefin methine proton signal [δ_{H} 7.75 (1H, dd, $J=7.6$, 1.6 Hz, H-6), 7.22 (1H, ddd, $J=8.0$, 7.6, 1.6 Hz, H-4), 7.11 (1H, dd, $J=8.0$, 1.2 Hz, H-3), 6.93 (1H, ddd, $J=7.6$, 7.6, 1.2 Hz, H-5)]을 통해 1,2-치환 benzene ring 이 하나 존재함을 예상하였고, 산소가 치환된 methylene proton signal [δ_{H} 5.46 (1H, d, $J=12.4$ Hz, H-7a), 5.24 (1H, d, $J=12.4$ Hz, H-7b)]을 관측하였다. 한 개의 hemiacetal proton signal [δ_{H} 5.09 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1')] 및 산소가 치환된 영역에서 네 개의 oxygenated methine proton signal [δ_{H} 4.25 (1H, m, H-2'), 4.25 (1H, m, H-4'), 4.12 (1H, dd, $J=8.8$, 8.8 Hz, H-3'), 3.91 (1H, m, H-5')] 그리고 한 개의 oxygenated methylene proton signal [δ_{H} 4.51 (1H, dd, $J=11.6$, 2.4 Hz, H-6'a), 4.39 (1H, dd, $J=11.6$, 5.2 Hz, H-6'b)]로부터 한 개의 당이 존재함을 예상하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, methanol- d_4 , δ_{C}) spectrum에서 탄소수가 13개임을 확인하였고, 이를 통해 phenylmethyl glycoside임을 확인하였다. 또한 당에서 유래한 한 개의 hemiacetal carbon signal [δ_{C} 104.4 (C-1')], 네 개의 oxygenated methine carbon signals [δ_{C} 78.6 (C-3'), 78.6 (C-5'), 75.3 (C-2'), 71.7 (C-4')], 한 개의 oxygenated methylene carbon signals [δ_{C} 62.8 (C-6')], chemical shift 및 anomer proton signal의 결합 정수($J=7.6$ Hz)로부터 당의 구조가 β -glucopyranose임을 확인하였다. Aglycone에서는 한 개의 oxygenated olefin quaternary carbon signal [δ_{C} 156.5 (C-2)], 한 개의 olefin quaternary carbon signal [δ_{C} 125.8 (C-1)], 네 개의 olefin methine carbon signal [δ_{C} 129.7 (C-6), 129.0 (C-4), 119.5 (C-5), 115.9 (C-3)], 한 개의 oxygenated methylene carbon signal [δ_{C} 67.3 (C-7)]을 관측하였다. 당의 결합 위치를 확인하기 위하여 gHMBC를 측정하였다. 그 결과, anomer proton (δ_{H} 5.09, H-1')이 C-7의 oxygenated methylene carbon (δ_{C} 67.3)과 cross peak를 보여 glucose가 7번에 결합하고 있음

Fig. 1 Chemical structures of compound 1 and 2 isolated from *S. prunifolia*

을 알 수 있었다(Fig. 1). 이를 종합해 문헌과 비교한 결과, isosalicin로 구조 동정 하였다[18].

화합물 2는 White amorphous powder 형상으로서 TLC 전개 후, 10% 황산 발색 시 진한 갈색으로 발색 되었다. Positive ESI/MS에서 m/z 319 $[M+H]^+$ peak의 관측으로 질량 값은 318 $[M]^+$ 로 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5 , δ_{H}) spectrum 과 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- d_5 , δ_{C}) spectrum 을 통하여 화합물 1 (isosalicin)과 매우 유사한 구조이나, olefin 영역에서 두 개의 적분 값을 가지는 한 개의 olefin methine proton signal [δ_{H} 7.01 (2H, br.s, H-2,6)]을 통해 benzene ring 이 1,2,3,5-치환이 되었음을 확인하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, methanol- d_4 , δ_{C}) spectrum에서 탄소수가 13개임을 확인하였고, 네 개의 olefin quaternary carbon signal [δ_{C} 153.8 (C-3,5), 143.9 (C-1), 134.1 (C-4)] 및 대칭의 형태로 겹쳐서 관측 된, olefin carbon signal [δ_{C} 105.3 (C-2,3)]이 확인되었다. 화합물 1과 마찬가지로, 한 개의 hemiacetal carbon signal, 네 개의 oxygenated methine carbon signal, 한 개의 oxygenated methylene carbon signal이 관측되어 β -glucopyranose로 결합된 당 한 분자가 존재함을 확인하였다. 당의 결합 위치를 확인하기 위하여

Fig. 2 Total ion chromatograms and calibration curves of compound 1 and 2 isolated from *S. prunifolia*

Fig. 3 Neuroprotective effects of the compounds isolated from *S. prunifolia* against H₂O₂ induced neurotoxicity in SK-N-MC cells. (A) Cytotoxicity of compound 1 and 2 (100 mM) in SK-N-MC cells. (B) Morphological changes were observed using a microscopy (×100). Cell viability was determined by MTT assay (C) and neuronal damage was measured by LDH activity (D). NAC was used as a positive control. All data were expressed as the means ± SD (n=3). **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001 compared with untreated control cells

gHMBC를 확인한 결과, anomer proton (δ_{H} 5.40, H-1')이 C-4의 oxygenated olefin quaternary carbon (δ_{C} 134.1)과 cross peak를 보여 화합물 1과는 달리 glucose가 4번에 결합하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). 이를 종합해서 문헌과 비교한 결과, crenatin으로 구조 동정 하였다[19].

분리된 화합물 2종의 정량분석을 위해 UPLC가 부착된 QTRAP mass spectrometer (AB SCIEX)를 사용하여 질량스펙트럼과 크로마토그램을 분석하였다. 최적화된 기기분석조건을 고려하여 머무름 시간을 비교하였을 때, 화합물 1은 1.01분 및 화합물 2는 2.41분에서 검출되었다(Fig. 2). 화합물 1과 2에 대하여 [M+H]⁺이 선구이온(precursor ion)으로 선택되었는데 +ESI (positive mode)에서 화합물 1은 *m/z* 287 및 화합물 2는 *m/z* 319로 선택되었다. MRM 모드로 정량 분석했을 때, 최적의 fragment 에너지를 형성하였고 가장 감도가 좋은 생성이온(products ion)을 선택하여(화합물 1: *m/z* 179, 화합물 2: *m/z* 139) 정량분석을 실시하였다. 검량 곡선은 표준물질의 5농도 범위 안에서 측정된 값을 회기 분석을 통해 작성하였다. 회기 방정식은 $y = ax + b$ 를 사용하였는데, 여기서 *y*와 *x*는 각 화합물의 피크 면적과 농도를 나타낸다. 상관계수(*r*²)는 화합물 1 및 2에 대해 각각 0.9997 및 0.9999이므로 매우 높은 값을 보여주었다. 조팝나무 잎에 있는 각 화합물의 함량 분석한 결과, 화합물 1 (isosalicin)은 0.65 mg/g으로 함량이 낮았으며 화합물 2 (crenatin)의 함량은 9.53 mg/g으로 상대적으로 함량이 높았다.

조팝나무 잎에서 분리한 두가지 단일 화합물의 신경세포에

대한 독성을 평가하기 위해 MTT assay를 수행한 결과, 화합물 1 및 2 (100 mM) 모두 세포 생존율이 정상 대조군(control)과 유사한 결과값을 나타내었으며, SK-N-MC 세포에 대한 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다(Fig. 3A). SK-N-MC 세포에 활성산소종인 H₂O₂를 처리하여 산화스트레스 유발에 따른 신경세포의 손상 또는 세포 사멸에 대한 화합물 1 및 2의 신경세포 보호효과를 확인하기 위해 신경세포의 형태학적 변화 관찰, MTT 및 LDH assay를 실시하였다. H₂O₂처리에 따른 신경세포의 형태학적 변화에 미치는 영향을 확인해본 결과, H₂O₂처리군은 세포체 응축, 신경돌기 소실, 세포막수포현상 등 세포 사멸의 형태적인 특징을 나타내었다(Fig. 3B). 그러나, 100 μM 농도의 화합물 2를 처리한 경우 H₂O₂처리에 의한 형태학적 변화가 감소하였으며, 동일 농도의 화합물 1의 처리군 보다 더 효과적으로 감소하는 것을 확인하였다. H₂O₂처리에 따른 세포 생존율의 변화를 확인한 결과, H₂O₂처리군은 정상 대조군(100%)과 비교하여 세포 생존율이 약 48.6%까지 감소하였다. 그러나, 화합물 1 및 2의 처리군은 각각 57.4, 71.6%의 세포 생존율을 나타내었고, H₂O₂ 처리군과 비교 시 각각 15.3, 32.2%의 증가율을 보였다(Fig. 3C). 특히 화합물 2의 처리군은 양성대조군인 NAC (500 mM) 처리군의 세포 생존율(75.2%)과 유사한 결과값을 나타내었다. 이러한 결과는 화합물 2가 산화스트레스에 의한 신경세포 사멸을 억제하여 세포 생존율을 증가시킨 것으로 생각된다. 화합물 1 및 2의 신경세포 보호효과를 추가적으로 확인하기 위해 LDH 활성을 측정하였다. 신경세포의 경우 산화

스트레스에 취약한 지질 성분을 많이 함유하고 있다고 알려져 있다[20]. 이러한 신경세포의 구조적 특성을 이용하여 H_2O_2 로 유도된 산화스트레스에 의한 신경 세포막 손상 정도를 세포 외로 방출된 LDH의 활성 수치 측정을 통해 확인하였다. 그 결과 H_2O_2 처리군은 정상 대조군(100%)과 비교하여 약 219.6%의 LDH 활성 수치를 나타내었으며, 화합물 1 및 2의 처리군은 각각 195.0, 190.3%의 수치를 보였다(Fig. 3D). 이러한 결과를 통해, 화합물 2가 H_2O_2 에 의한 신경세포 손상을 억제하여 세포 외로 LDH 방출량이 감소한 것으로 생각된다. Choi 등[21] 연구에 의하면 조팝나무 MeOH 추출물은 높은 항산화 활성을 가지며 조팝나무 구성 성분 중 높은 폴리페놀 함량과 항산화 활성과의 연계성이 크다고 보고하였으며, Jeong 등[22] 연구에서는 구아바 잎 열수 추출물이 H_2O_2 로 유도된 신경세포 사멸을 억제하고 LDH 방출량 감소에 따른 산화스트레스로부터 신경세포 보호효과가 있는 것으로 보고하였다. 따라서, 조팝나무에서 분리한 phenolic glucoside 중 화합물 2 (crenatin)는 항산화 활성으로 인해 산화 스트레스에 의한 신경세포의 형태학적 변화, 신경세포 손상 및 세포 사멸을 억제 시킴으로써 산화스트레스로부터 신경세포 보호효과를 나타내는 것으로 판단된다. 또한 화합물 2의 신경세포 보호효과의 작용기작 규명을 위해서 분자생물학적인 접근방법을 통한 기전 연구 및 퇴행성 뇌신경계 질환 동물 모델을 이용한 *in vivo* 연구가 필요할 것으로 사료된다. 본 연구 결과를 종합해 볼 때, 조팝나무 잎에서 분리 및 동정된 화합물은 함유량도 높으며(crenatin의 경우) 산화 스트레스로부터 신경세포 보호효과를 나타내어 향후 보다 심도 깊은 연구를 통해 퇴행성 뇌신경계질환 등의 예방 및 개선을 위한 건강식의약소재의 기능성 지표성분으로 개발될 가능성이 높다고 할 수 있겠다.

초 록

조팝나무(*Spiraea prunifolia*) 잎을 80% MeOH 수용액으로 추출한 뒤, 감압 농축한 추출물을 EtOAc, *n*-BuOH과 H_2O 층으로 계층 분획을 실시하였다. *n*-BuOH분획에 대하여 SiO_2 , ODS column chromatograph 및 중압분취 장비를 반복실시하여 2종의 phenolic glucoside 화합물을 분리 및 정제하였다. NMR 및 Mass데이터를 해석하여, isosalicin (1)와 crenatin (2)로 구조 동정 하였다. 분리한 2종의 화합물에 대하여 UPLC-MS/MS 질량 분석기를 기반으로 다중반응검지 (MRM mode) 분석법을 이용하여 정량분석 하였다. 그 결과, crenatin은 9.53 mg/g 및 isosalicin은 0.65 mg/g이 조팝나무 잎 추출물에 함유된 것을 확인하였다. 조팝나무 잎에서 분리된 화합물이 H_2O_2 에 의해 유발된 산화스트레스로부터 신경세포 보호효과를 검증한 결과, 신경모세포종인 SK-N-MC 세포에 대해서 화합물 1 및 2 (100 mM) 모두 세포 독성은 보이지 않았으며, 특히 화합물 2 (crenatin)는 H_2O_2 처리에 따른 신경세포의 외형적 변화, 세포 손상, 세포 사멸을 억제하여 산화스트레스로부터 신경세포를 보호하는 효과가 있음을 확인하였다.

Keywords 신경세포 · 정량분석 · 조팝나무 · Crenatin · Isosalicin · Nuclear magnetic resonance

감사의 글 본 논문은 농촌진흥청 연구사업 (과제번호: PJ01193202)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

References

- Jensen SJK (2003) Oxidative stress and free radicals. *J Mol Struct* 666: 387–392
- Benz CC, Yau C (2008) Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax. *Nat Rev Cancer* 8: 875–879
- Choi DJ, Cho SR, Seo JY, Lee HB, Park YI (2016) Neuroprotective effects of the *Phellinus linteus* ethyl acetate extract against H_2O_2 -induced apoptotic cell death of SK-N-MC cells. *Nutr Res* 36: 31–43
- Hu XL, Niu YX, Zhang Q, Tian X, Gao LY, Guo LP, Meng WH, Zhao QC (2015) Neuroprotective effects of Kukoamine B against hydrogen peroxide-induced apoptosis and potential mechanisms in SH-SY5Y cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 40: 230–240
- Kim SY, Song NY, Cho JG, Kwon JH, Song MC, Ahn EM, Kang HC, Baek NI (2015) Phenylglycosides from the stems of *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*. *Chemistry of Natural Compounds* 51: 873–876
- Bae JY, Lee CH, Ahn MJ, Park JH (2012) Pharmacognostical studies on the folk medicine “JoPabNaMu”. *Kor J Pharmacogn* 43: 193–197
- Woo MH, Lee EH, Chung SO, Kim CW (1996) Constituents of *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*. *Kor J Pharmacogn* 27: 389–396
- Jang SW, Suh WS, Kim CS, Kim KH, Lee KR (2015) A new phenolic glycoside from *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora* twigs. *Arch Pharm Res* 38: 1943–1951
- Lui HY, Ni W, Chen CX, Di YT, Hao XJ (2009) Two new diterpenoid Lactams from *Spiraea japonica* var. *ovalifolia*. *Helvetica Chimica Acta* 92: 1198–1202
- Ro JS (1982) Studies on the Constituents of the Spirea Plants (1) Sterols from the Root of *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*. *Kor J Pharmacogn* 13: 39–42
- Woo MH, Lee EH, Chung SO, Kim CW (1996) Constituents of *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*. *Kor J Pharmacogn* 27: 389–396
- Youn HS, Chung BS (1987) Studies on the Constituents of the Roots of *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*. *Kor J Pharmacogn* 18: 107–111
- Jun CS, Yoo MJ, Lee WY, Kwak KC, Bae MS, Hwang WT, Son DH, Chai KY (2007) Ester derivatives from tannase-treated prunioside A and their anti-inflammatory activities. *Bull Korean Chem Soc* 28: 73–76
- Kim CS, Oh JS, Suh WS, Jang SW, Subedi L, Kim SY, Choi SU, Lee KR (2017) Investigation of chemical constituents from *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora* and their biological activities. *Phytochem Lett* 22: 255–260
- Yean MH, Kim JS, Kang SS, Kim YS (2014) A new megastigmane glucoside and three new flavonoid glycosides from *Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*. *Helvetica Chimica Acta* 97: 1123–1131
- Oh HC, Shin HS, Oh GS, Pae HO, Chai KY, Chung HT, Lee HS (2003) The absolute configuration of prunioside A from *Spiraea prunifolia* and biological activities of related compounds. *Phytochemistry* 64: 1113–1118
- Sim MO, Lee HJ, Jang JH, Lee HE, Jung HK, Kim TM, No JH, Jung JK, Jung DE, Cho HW (2017) Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Spiraea prunifolia* Sieb. et Zucc. var. *simpliciflora* Nakai in RAW 264.7 cells. *Korean J Plant Res* 30: 335–342
- Kanho H, Yaoya S, Kawahara N, Nakane T, Takase Y, Masuka K, Kuroyanagi M (2005) Biotransformation of benzaldehyde-type and acetophenone-type derivatives by *Pharbitis nil* Hairy Roots. *Chem Pharm Bull* 53: 361–365
- Ozawa T, Takino Y (1979) Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of phenolic glycosides isolated from chestnut galls. *Agric Biol Chem* 43: 1173–1177
- Ha GJ, Lee DS, Seung TW, Park CH, Park SK, Jin DE, Kim NK, Shin HY, Heo HJ (2015) Anti-amnesic and neuroprotective effects of

-
- Artemisia argyi* H. (Seomae mugwort) extracts. Korean J Food Sci Technol 47: 380–387
21. Choi EY, Heo SI, Kwon YS, Kim MJ (2016) Anti-Oxidant Activity and Anti-Inflammatory Effects of *Spiraea fritschiana* Schneid Extract. Korean J Medicinal Crop Sci 24: 31–37
22. Jeong CH, Jeong HR, Choi GN, Kwak JH, Kim JH, Park SJ, Kim DO, Shim KH, Choi SG, Heo HJ (2011) Neuronal cell protective effects of hot water extracts from Guava (*Psidium guajava* L.) fruit and leaf. Korean J Food Preserv 18: 124–129