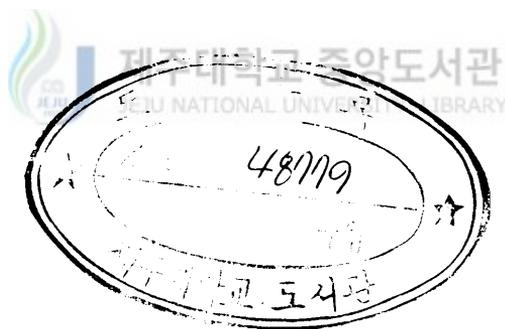


17  
570-19  
72381

碩士學位論文

# 손바닥선인장으로부터 生理活性 性分の 分離 및 活性 確認

指導教授 李 璿 柱



濟州大學校 教育大學院

化學教育專攻

康 國 哲

1999年 2月

손바닥선인장으로부터 生理活性 性分の  
分離 및 活性 確認

指導教授 李 璿 柱

이 論文을 教育學 碩士學位 論文으로 提出함

1999年 2月 日



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

濟州大學校 教育大學院 化學教育專攻

康 國 哲

康國哲의 教育學 碩士學位 論文을 認准함

1999年 2月 日

審 查 委 員 長 鄭 憲 商 印

審 查 委 員 李 南 昊 印

審 查 委 員 李 璿 柱 印

Purification of Bioactive Materials from *Opuntia ficus-dica*  
and Identification of Their Bioactivities

**Kuk Chul Kang**

(Supervised by Professor Sunjoo Lee, Ph. D.)



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF  
EDUCATION**

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

GRADUATE SCHOOL OF EDUCATION

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1999. 2

# 손바닥선인장으로부터 生理活性 性分の 分離 및 活性 確認

강 국 철

제주대학교 교육대학원 화학교육전공

손바닥선인장의 생리활성성분을 확인하기 위하여 메탄올, 헥산, 그리고 아세톤으로 손바닥선인장의 열매와 줄기를 추출하였다. 첫째, 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl를 이용하여 항산화효과를 측정하였다. 그 결과 열매 추출물의 항산화능력은 아세톤 추출물 ( $74 \pm 2\%$ ) > 메탄올 추출물 ( $61 \pm 5\%$ ) > 헥산 추출물 ( $59 \pm 5\%$ )의 순서로 나타났다. 둘째, 각각의 추출물을 물과 클로로포름을 이용하여 재 추출하였고, 이들 추출물들을 이용하여 *Escherichia coli* 8742와 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성 시험을 했다. 그 결과 *Escherichia coli* 8742에서는 아세톤과, 아세톤 추출물을 물과 클로로포름으로 추출한 클로로포름 추출물에서 박테리아의 성장을 저해하는 항균활성을 나타내었고, *Staphylococcus aureus*에서는 아세톤 추출물, 아세톤 추출물을 물과 클로로포름으로 추출한 클로로포름 추출물, 그리고 헥산 추출물에서 항균활성을 보였다.

이들 결과들을 종합해 보면 손바닥선인장의 열매와 줄기로부터 각종 용매를 이용하여 추출된 성분들이 항산화 및 항균성분을 함유하고 있다는 것을 시사한다.

앞으로 항산화 및 항균활성을 지니는 성분들을 순수하게 분리 추출하여 구조 및 화학적, 생물학적 기능과 그 활용성에 대하여 연구할 것이다.

# 목 차

국문초록 .....	i
List of Tables and Schemes .....	iii
List of Figures .....	iv
약어 .....	v
I. 서 론 .....	1
1. 천연물화학의 필요성 .....	1
2. 연구배경 및 목적 .....	4
II. 실험 .....	6
1. 재료 및 기기 .....	6
2. 실험방법 .....	7
1) 생리활성 물질들의 추출 .....	7
2) 항산화활성의 측정 .....	10
3) 항균활성 측정 .....	11
4) 크로마토그래피를 이용한 추출물의 성분 분석 .....	12
III. 결과 및 고찰 .....	13
1. 손바닥선인장 추출물 .....	13
2. 항산화활성 .....	13
3. 항균활성 .....	17
1) Gram negative 박테리아에 대한 활성 검색 .....	17
2) Gram positive 박테리아에 대한 활성 검색 .....	17
4. 크로마토그래피를 이용한 추출물의 성분 분석 .....	25
1) TLC을 이용한 추출물의 성분 분석 .....	25
IV. 결 론 .....	28
V. 참고문헌 .....	29
ABSTRACT .....	31

## List of Tables

Table 1. The Radical Scavenging Effect of Extracts of Fruits .....	14
Table 2. The Radical Scavenging Effect of MeOH Extract of Trunk .....	14

## List of Schemes

Scheme 1. Flow Chart for the Extraction of Fruit .....	8
Scheme 2. Flow Chart for the Extraction of Trunk .....	9
Scheme 3. The Antibacterial Activity of Extracts of <i>Opuntia ficus-dica</i> against <i>Escherichia coli</i> 8742 .....	19
Scheme 4. The Antibacterial Activity of Extracts of <i>Opuntia ficus-dica</i> against <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20

## List of Figures

Figure 1. A Schematic Diagram of Biosynthetic Pathway of Natural Products .....	3
Figure 2. Structure of 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl radical .....	10
Figure 3. The Radical Scavenging Effect of Extracts of Fruits .....	16
Figure 4. The Radical Scavenging Effect of MeOH Extract of Trunk .....	16
Figure 5. The Antibacterial Activity of MeOH Extract of Fruit against <i>E. coli</i> 8742 .....	21
Figure 6. The Antibacterial Activity of Hexane Extract of Fruit against <i>E. coli</i> 8742 .....	21
Figure 7. The Antibacterial Activity of Acetone Extract of Fruit against <i>E. coli</i> 8742 .....	22
Figure 8. The Antibacterial Activity of MeOH Extract of Trunk against <i>E. coli</i> 8742 (a) Control, (b) MeOH Extract, (c) Chloroform Extract of (b) .....	22
Figure 9. The Antibacterial Activity of MeOH Extract of Fruit against <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
Figure 10. The Antibacterial Activity of Hexane Extract of Fruit against <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
Figure 11. The Antibacterial Activity of Acetone Extract of Fruit against <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
Figure 12. The Antibacterial Activity of MeOH Extract of Trunk against <i>Staphylococcus aureus</i> (a) Control, (b) MeOH Extract, (c) Chloroform Extract of (b) .....	24
Figure 13. Thin Layer Chromatogram of Chloroform Layer from MeOH Extract of Fruit .....	27
Figure 14. Thin Layer Chromatogram of Chloroform Layer from Acetone Extract of Fruit .....	27

## 약 어

CoA	Coenzyme A
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
HPLC	High performance liquid chromatography
IR	Infrared spectrometry
MeOH	Methanol
MS	Mass spectrometry
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
SOD	Superoxide dismutase
TLC	Thin layer chromatography
UV	Ultraviolet spectrophotometry
DMSO	Dimethyl solfoxide
SAM	Senscencene accelerated mouse
ASTM	American society for testing marterials

# I. 서 론

## 1. 천연물화학의 필요성

문명의 발달과 더불어 의약품, 농약, 식품첨가물 등과 같이 각종 환경성 화학물질의 다양화와 생산량의 증대로 인하여 암 및 노화 등 퇴행성 질환의 발생 빈도가 높아지게 되었다. 일 예로서, 환경성 화학물질에 의한 세포막의 손상은 세포의 기능을 원활하게 하지 못하게 할 뿐 아니라 DNA 및 단백질을 손상시킴으로써 노화, 암 및 각종 성인병을 유발하는 것으로 알려지고 있다.<sup>1</sup> 천연물화학은 기존의 전통적 질병뿐만 아니라 새롭게 대두되는 이러한 질병들에 대한 치료제들을 천연 생물자원에서 얻고자 하는 목적에서 생물체내에서 생합성되어 축적된 유기화합물의 화학구조, 대사, 생합성, 분포, 생물활성 등을 연구하는 학문이다. 이를 위해서는 우선 대상으로 하는 성분의 분리, 정제, 동정이 필요 불가결하다.

천연물화학 발전의 역사적 과정을 살펴보면, 고대로부터 중세기까지는 만병통치약적 관념에 의한 특정 생물체의 일부 또는 전부를 생리활성을 지닌 의약으로 생각하였고, 생체활성을 지닌 천연물들의 주요 추출원은 식물 또는 동물들이었다. 이들로부터 특정 화학적 성질을 가진 천연물의 분리가 시도된 것은 18세기말부터이다. 즉, 스웨덴의 약사 Scheele가 포도에서 tartaric acid, 레몬에서 citric acid, 사과에서 malic acid, 우유에서 lactic acid, 요(尿)에서 uric acid 등을 분리한 것이 천연물화학의 근대 과학적 연구의 시초라 볼 수 있다. 19세기에 접어들면서 독일의 약사 Serturmer에 의해 아편에서 morphine이 분리된 이래 많은 alkaloid, terpenoid, 배당체 등이 분리되고 그 화학구조가 결정되었다. 20세기 초 헝가리의 유기화학자 Pregl에 의해 미량원소분석이 발명됨에 따라 소량의 원료로 천연유기화합물의 연구가 가능하게 되었으며, 소련의 식물학자

Tswet에 의해 column chromatography법이 개발되어 미량유사물질 분리가 용이하게 되면서 많은 생리활성물질이 발견되었고 천연물의 중요성이 인식되었다.

더욱이 제2차 세계대전 후에 Paper chromatography, Thin layer chromatography (TLC), Gas chromatography (GC), High performance liquid chromatography (HPLC) 등이 속속 개발되고 적외선 분광광도계 (IR), 자외선 분광광도계 (UV), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer, 질량분석기 (MS) 등 기기 장치가 천연물화학연구에 도입됨에 따라 천연물들의 추출분리가 수월하게 되었고, 이렇게 순수하게 분리되어 얻은 복잡한 화합물의 화학적 구조가 비교적 용이하게 해석될 수 있게 되었다. 더구나 X-ray 결정법과 전자계산기가 발달됨에 따라 구조를 결정하는데 큰 도움을 주었다.

생리활성을 가지는 천연물들은 종류가 다양하다. 즉, 생물 개체내의 작용물질인 호르몬, autacoid, 동종 생물간에 작용하는 물질인 pheromone, 타종 생물간에 작용하는 allelopathy 원인물질, 독소, 곤충기피물질(repellent), 유인물질(attractant), 유충호르몬, 변태호르몬, 고등동물에 대한 항생물질, 자극물질, 억제물질, 피임물질 등 다양한 생물활성물질이 분리되어 있고, 그 중에는 의약품으로 이용되고 있는 것도 많다. 한편, 천연물 종류의 비교분석은 생물분류의 지표로도 삼을 수 있다. 천연물들은 체내에서 효소에 의해 생합성되고(Figure 1), 효소 단백질은 유전자에 의하여 발현되므로 천연물들, 특히 2차 대사산물들은 생물분류의 지표로도 삼을 수 있으며 생리학, 병리학, 생물지리학, 생태학, 유전학, 고생물학, 계통발생학 등 생물분야에서도 생체 천연물에 대한 지식이 큰 도움이 된다.

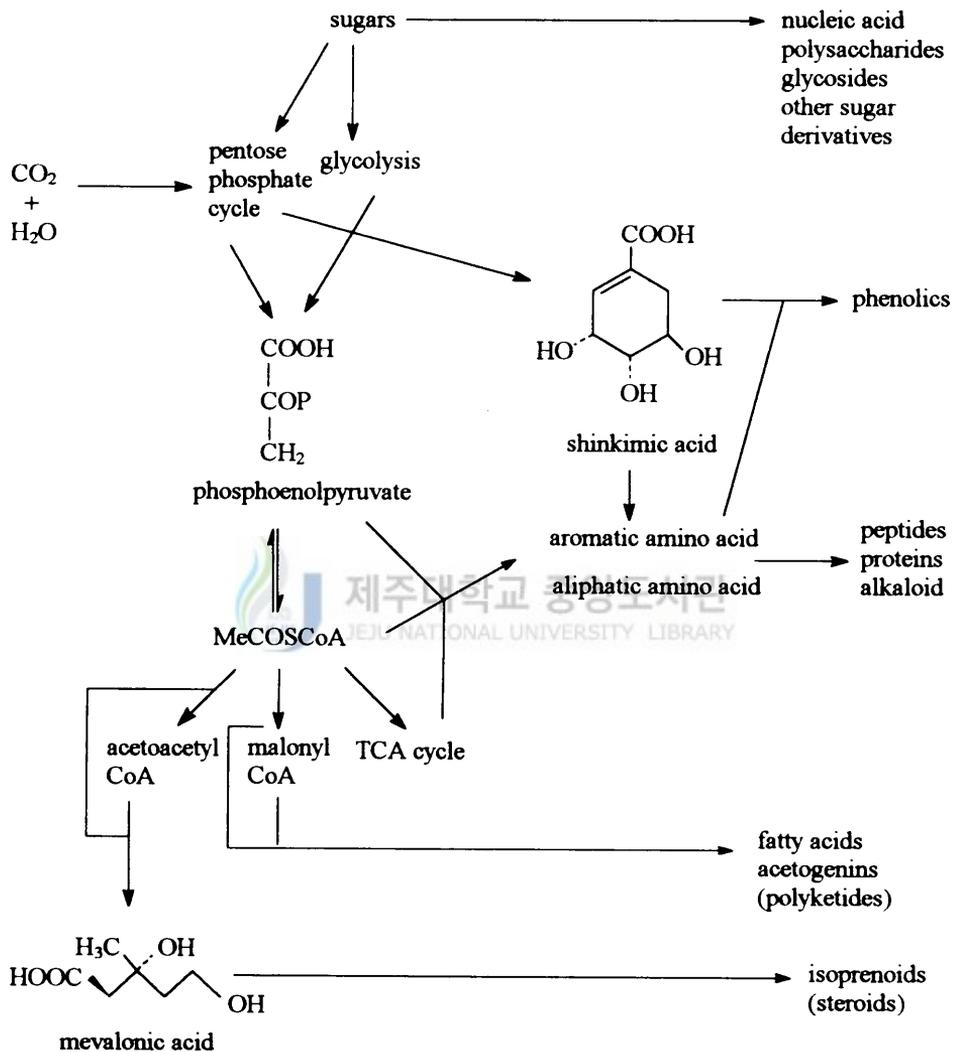


Figure 1. A Schematic Diagram of Biosynthetic Pathway of Natural Products

## 2. 연구배경 및 목적

현재 노화의 원인 중의 하나는 유해산소 즉, superoxide radical  $\cdot O_2$ , hydroxy radical  $\cdot OH$ , hydrogen peroxide  $H_2O_2$ 에 의한 산화과정이라고 해석하고 있다. 자유 라디칼들은 생체내 대사과정 중에 정상적으로 생성되는 화학종으로써 대식세포의 살균작용, 오래된 단백질의 제거에 이용되는 필수불가결한 물질로 알려져 있다.<sup>2,3,4</sup> 그리고 정상상태에서 생체는 자유 라디칼에 대응하여 glutathione peroxidase, superoxide dismutase (SOD), catalase 등의 항산화 효소를 생성, 활성산소를 제거함으로써 생체 항상성을 유지할 수 있게 된다.<sup>5</sup> 하지만 질병상태 또는 노화과정 중에 발생하는 활성산소들은 세포막에 있는 불포화 탄화수소를 공격하여 세포손상을 야기 시키고 있다. 이러한 유해산소들은 연쇄반응을 일으키면서 우리 몸의 세포를 하루 평균 1만회 이상 공격하고 있다. 이러한 공격으로 세포가 손상을 입게되어 궁극적으로 노화의 원인을 제공하고 있는 것이다.<sup>6,7,8,9,10,11</sup> 항산화계를 조절하여 노화 또는 활성산소에 의한 조직손상과 같은 생물학적 손상들을 지연 또는 경감시킬 가능성이 존재하며,<sup>12</sup> 이를 위해서 유효한 항산화물질의 개발은 인류 복지 증진에 있어 대단히 유의미한 일이라 사료된다.

최근 손바닥선인장 열매의 성분분석 결과 가용성 무질소물이 69.20%로서, 손바닥선인장의 주성분은 당류 같은 가용성 무질소물이다.<sup>13</sup> 가용성 무질소물이란 섬유를 제외한 전분, 당분, 고무질, 점질물, 펙틴, 색소류를 총칭하며 특히, free radical을 제거하는데 관여할 수 있는 것으로 알려진 polyphenol계 와 flavonoid 화합물을 다량 함유하고 있어 항산화 효능과 밀접한 관련성이 있을 것으로 생각된다.<sup>14</sup>

사람들은 예로부터 미생물에 의한 각종 질병과 맞서 싸워 왔으며, 그래서 많은 이들이 고통을 겪었고 심지어는 많은 사람들이 한꺼번에 목숨을 잃는 경우도 있었다는 것을 각종 문헌들에 의해 알 수 있다. 그리고

옛날 사람들은 이런 질병에 대한 치료제를 천연에서 얻으려고 노력하였다. 현대에 들어서면서 과학이 발달하고 유기화합 물질의 합성이 가능하게 되면서부터 합성된 각종 화학물질들을 이용하여 암(종양), microbes, 다양한 바이러스 감염과의 투쟁에서 상당한 성공을 거두어왔다. 현대에 와서는 새로운 신약 개발을 목표로 한, 생물체의 생명현상의 생물화학적 연구의 한 측면에서 미생물에 대한 연구가 진행중이다. 신약을 개발하는데 있어서는 steroid, flavonoid, terpenoid, peptide, nucleoside 혹은 nucleotide계통 등의 생리활성 물질을 합성하는 방법이 있다. 반면에 천연물로부터 직접 생리활성 물질을 추출하는 방법도 많이 이용되고 있으며, 많은 종류의 식물로부터 추출된 각종 질병에 약효 있는 물질들이 많이 보고되고 있다.

1889년 Doehle는 탄저균과 길항하는 한 세균에서 항탄저균물질의 추출을 시도하였다. 1889년 Gosio는 일종의 푸른곰팡이의 배양액에서 항균성물질(Mycophenolic acid)을 분리 정제하였으며, 1929년 Fleming은 푸른곰팡이의 일종인 *Penicillium notatum*의 배양액 중에 포도상구균 등 그람 양성균의 발육을 저해하는 물질(Penicillin)을 발견하였으며, 1942년 Waksman에 의해 streptomycin이 발견되었다.<sup>15,16</sup> 이를 계기로 하여 항생물질의 연구가 급속도로 진행되었다. 현재는 천연에서 추출된 항생물질의 유도체들이 합성되고 있으며, 새로운 항생물질을 천연에서 찾으려고 노력하고 있다. 항생물질의 연구는 세균이나 진균감염증에 유효한 물질에서 암이나 바이러스병에 유효한 물질의 탐색으로 발전되어가고 있으며, 최근에는 여러 가지의 내성균에 유효한 새로운 항생물질이나 항생물질 유도체의 연구 및 제암 항생물질의 연구까지 활발히 진행되고 있다.

따라서 본 연구의 목적은 제주도 특산물(제주도 지방기념물 제 35호)인 손바닥선인장(*Opuntia ficus-dica*)의 항산화 및 항균성을 조사하고 이러한 활성을 갖는 성분을 열매 및 줄기로부터 분리 추출하고자 하는데 있다.

## II. 실험

### 1. 재료 및 기기

본 실험에 사용된 손바닥선인장은 시중에서 시판되는 것 중 신선한 것을 구입하여 사용하였다. 추출용매 중 MeOH, Hexane, Diethylether 그리고 Chloroform은 Merck사(독일) 제품이며, Acetone은 Sigma사(미국) 제품이고 등급은 모두 HPLC grade이다.

항산화활성 측정시 사용한 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl(DPPH)은 Aldrich사(미국)에서 구입하여 사용하였고, 항균활성에 이용된 균들(황색 포도상구균과 *E. Coli* 8742)은 제주의료원과 제주대학교 식품공학과 고영환교수로부터 협조를 얻어 사용하였다.

NaCl, Mannose, Gelatine,  $K_2HPO_4$ , Lactose는 Sigma사, Yeast extract, Trypton, Silica gel 60(230-400mesh), Thin layer plates (Silica gel 60 F<sub>254</sub>)는 Merck사(독일) 제품을 사용하였다.

항산화활성 측정시 사용한 자외선 분광광도계(UV spectrophotometer)는 Hewlett Packard 8453(미국)을 사용하였고, Fraction collector는 Bio-Rad (미국), Aspirator와 Rotary evaporator는 Eyela(일본), Vacuum Freezer Dryer는 Heto(덴마크)사의 제품을 사용하였으며, 항균활성 측정시 사용한 Incubator는 주식회사 존샘의 Shaking Incubator와 Digital Incubator를 사용하였다.

Gram negative인 *E. Coli* 8742균에 대한 항균활성 측정에 사용된 LB배지는 Yest extract 5.0g/L, NaCl 10g/L, Trypton 10g/L를 증류수 1L에 녹인 후 pH 7.0으로 조정하고, LB 액체 배지의 적정량에 1.1%의 agar를 가하고 멸균시킨 후에 Sterilized Petri-dish에 용액을 부어서 고체 LB Plate를 만들어 사용하였다.

Gram positive 박테리아에 대한 항균활성 측정에 사용된 BHI 배지는 NaCl 75g, Mannose 10g, Gelatine 10g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.0g, Yeast extract 2.5g, Lactose 2.0g을 증류수 1L에 녹인 후 pH 7.0으로 조정하고, BHI 액체 배지의 적정량에 1.1%의 agar를 가하고 멸균시킨 후에 Sterilized Petri-dish에 용액을 부어서 고체 BHI Plate를 만들어 사용하였다.

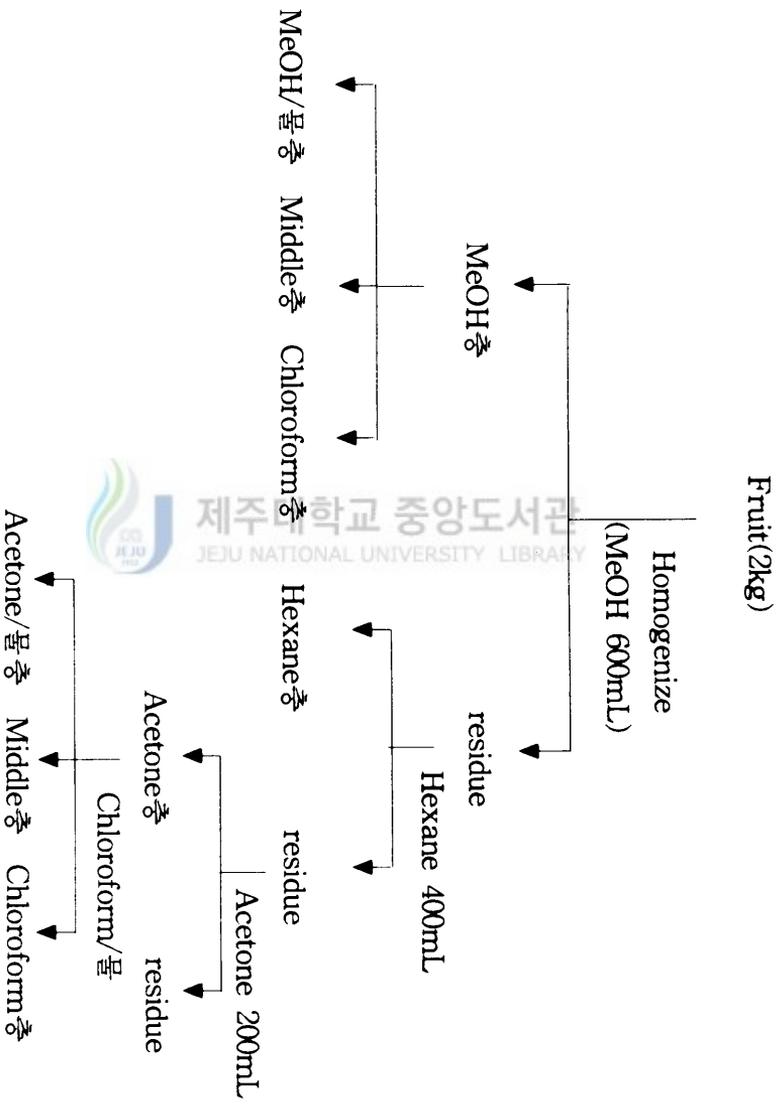
## 2. 실험방법

### 1) 생리활성 물질들의 추출

농익은 열매 2kg을 믹서를 이용 파쇄하여, MeOH 600mL에 넣고 5일 동안 Shaker를 이용 충분히 균질이 되게 하였다. Aspirator를 이용 감압 여과를 시켜 여액을 취하고 여과지에 걸러진 잔여물질은 다시 Hexane과 Acetone으로 5일간 위와 같은 방법으로 처리하였다. 각각의 추출물은 Rotary evaporator로 감압하에서 용매를 증발시킨 후에 4℃ 냉장 보관하면서 사용하였다.

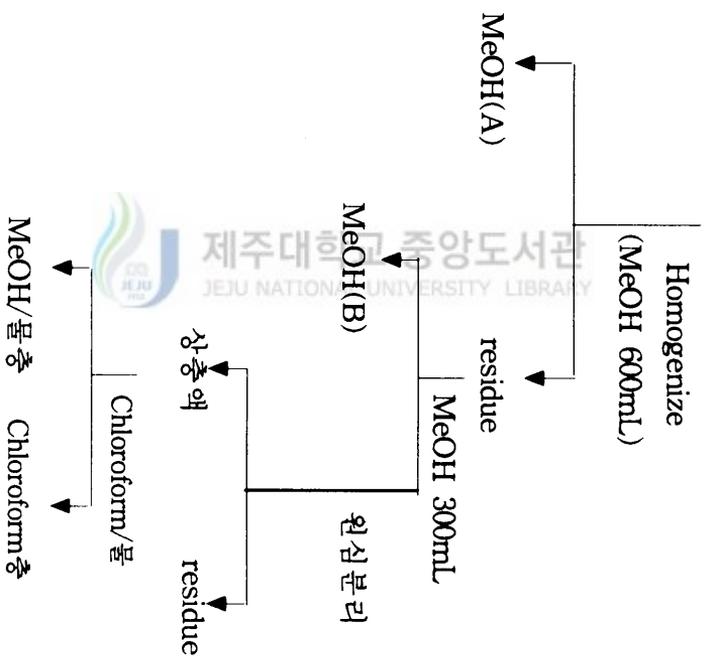
줄기는 2kg을 믹서를 이용 파쇄하여, MeOH 900mL에 넣고 5일 동안 Shaker를 이용 충분히 균질이 되게 하고, Aspirator를 이용, 감압여과를 시켜 여액을 취하였다. 여과지에 걸러진 잔여물질은 원심분리 (12,000rpm, 20min, 4℃)시킨 후 상층액을 여과, 4℃ 냉장 보관하면서 사용하였다.

생리활성검색에 이용된 손바닥선인장 열매와 줄기로부터의 추출물들은 Scheme 1과 Scheme 2에 그려진 것과 같은 순서에 따라 분리 추출되었다.



Scheme 1. Flow chart for the extraction of Fruit

Trunk(2kg)



Scheme 2. Flow chart for the extraction of Trunk

## 2) 항산화활성의 측정

손바닥선인장의 열매와 줄기로부터 Scheme 1과 Scheme 2의 단계에 의하여 추출한 각 분액들이 나타내는 항산화활성 검색은 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과(scavenging effect)를 측정하는 Blois법을 활용하였다. 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl 용액은 짙은 자주색을 나타내는 안정된 자유라디칼을 보유한 물질인데, 항산화효과를 갖는 Phenol성 물질 등에 의하여 라디칼이 소거된다. 이때 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl이 가진 특유한 518nm에서 강한 UV 흡광도가 사라지며 이러한 흡광도의 변화를 관찰함으로써 항산화활성을 측정하였다.

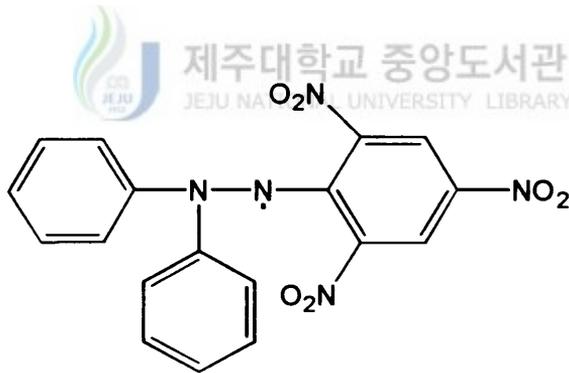


Figure 2. Structure of 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl radical

1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl(DPPH, Aldrich) 약 20mg을 EtOH 150mL에 녹여 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl 용액으로 제조하였다. 이 용액 600 $\mu$ l에 Dimethyl Sulfoxide(DMSO) 250mL를 첨가하여 희석한 후 10초간 진탕시켰다. UV spectrophotometer를 이용한 항산화활성의 측정

시에는 518nm의 파장에서 대조군의 UV 흡광도가  $0.98 \pm 0.025$ 가 되도록 적당량의 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl 용액을 취하여 DMSO로 조정한다. 반응시료 용액은 50% EtOH 20mL에 추출된 시료 100mg를 섞은 후 충분히 녹이고, 준비된 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl 용액  $900\mu\text{l}$ 에 시료용액  $100\mu\text{l}$ 를 넣고, 1mL로 맞춘 후 3회에 걸쳐 흡광도를 측정하였다. 이때 518nm에서 대조군에 대한 흡광도 감소치의 백분율을 항산화활성도(%)로 나타내었다.

### 3) 항균활성 측정

추출한 각 분액들에 대한 항산화활성 측정방법은 다음과 같다. 여과지의 직경이 약 1cm가 되게 자른 Disk를 만든 후에 고압멸균기(10psi, 240°F, 20min)에서 완전히 멸균을 시키고, 각각의 무게를 측정하였다. 시료(열매의 MeOH층, Hexane층, Acetone층, 줄기의 MeOH층)를 micropipette을 이용하여  $60\mu\text{l}$ 씩 도말하여 건조기(30°C)에 넣어 3일간 건조시켰다. 건조된 각 디스크의 무게를 측정하여 도말된 시료의 양을 측정하였다.

멸균시킨 시험관을 준비하고 5mL의 LB 액체배지를 넣은 후, 백금선을 가열하여 멸균시키고, -70°C에서 보관된  $400\mu\text{l}$ 의 *E. Coli* 8742균을 시험관에 넣어 희석하였다. 준비된 LB/agar Plate에 멸균시킨 백금선을 이용하여 대장균을 streak하고, Streaked LB/agar Plate를 37°C 항온기에서 20시간 incubation하여 대장균이 잘 자라도록 하였다. 이로부터 단일 종의 대장균 colony를 멸균된 백금선으로 취하여 시험관의 LB 액체배지에 접종시키고 37°C의 Shaking incubator에서 밤 동안 배양하였다. 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)도 위와 같은 절차에 의하여 단일 종의 균배양액을 얻었다.

항균활성시험은 이와 같이 얻은 박테리아균들을 각 고체배지 (BHI /agar Plate, LB/agar Plate)에 놓여진 추출 분액들이 도말된 Disk에 10 $\mu$ l 씩 적신 다음, 37 $^{\circ}$ C Incubator에서 24시간 배양시킨 후, 균의 증식정도를 추출 분액이 도말되지 않은 디스크의 대조군과 비교 확인하였다.

#### 4) 크로마토그래피를 이용한 추출물의 성분 분석

Thin Layer Chromatography(TLC)를 이용하여 손바닥선인장으로부터 추출된 혼합성분을 다양한 비율의 전개용매 Chloroform/Diethylether (1/1, 1/2, 1/4, 1/6, 2/1, 4/1)를 이용하여 분석하였다. 이 때 전개된 spot 은 자외선(UV lamp), I<sub>2</sub>, 그리고 10% 황산 수용액으로 확인하였다. 혼합물 등이 최대한으로 분리될 수 있는 전개용매 조성은 Chloroform /Diethylether(1/1)이었고, 이 전개용매를 사용하여 혼합물질들로부터 활성성분을 순수하게 분리 추출하기 위한 Column Chromtography를 하였다.

Column Chromtography의 정지상으로는 Silica gel (230-400mesh ASTM)을 이동상의 용액에다 slush를 만들어서 직경 1cm  $\times$  길이 40cm 의 Column에다 Packing 시킨 후 Chloroform/Diethylether(1/1)의 이동상을 이용하여 혼합물을 분리하였다. 분액분취기를 이용하여 용출액을 1mL/min속도로 분취 하였으며, 각각의 시험관에 있는 시료들을 TLC를 이용하여 채취된 분획의 물질조성 상태를 확인하였다. 각각의 spot에 대한 R<sub>f</sub>값을 구하여 같은 R<sub>f</sub>값을 갖는 것끼리 모아 감압상태에서 rotary evaporator로 농축하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 손바닥선인장 추출물

Scheme 1의 순서대로 추출된 열매 추출물의 색깔은 MeOH층과 Hexane층인 경우 적갈색, Acetone층은 담갈색을 띠며, 감압농축을 시켜 완전히 건조시킨 후에는 분말이 아닌 젤과 같은 굳은 상태가 되었으며, 이것을 다시 용해시키고자 할 때는 용해도가 낮아져서 소량의 물을 사용하여 용해시켜야 했다. 이러한 현상은 용매 추출시 손바닥선인장이 함유하고 있는 수분이 위의 용매와 함께 추출되는 성분의 용매화를 일으키는 것에 의해 야기된다고 생각된다. 그래서 실제로는 추출용매가 순수한 MeOH, Hexane 혹은 Acetone이 아닌 물과의 혼합용매인 것으로 생각된다.



#### 2. 항산화활성

손바닥선인장 열매의 MeOH층, Hexane층 및 Acetone층, 그리고 줄기의 MeOH층의 항산화효과를 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl 용액을 이용하여 측정하였다. 열매와 줄기로부터 분리 추출한 추출물들에 대해서 세 차례의 실험을 하였고, 그 결과는 Figure 3과 Figure 4에 UV spectra로 나타냈고, 이들을 각각 Table 1과 Table 2에 항산화활성도로 계산하여 도표화하였다.

항산화효과는 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl 용액만 존재하는 대조군과, 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl 용액과 선인장 추출액이 들어있는 반응시료액의 흡광도 차이로 표현되며 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl 용액의 라디칼이 제거되면 518nm에서의 흡광도가 감소한다. 그래서 그 차

이의 값이 클수록 항산화활성이 높다고 판단한다.

Table 1. The Radical Scavenging Effect of Extracts of Fruits

Sample	실험 횟수	EtOH과 Sample의 혼합액	DPPH와 EtOH의 혼합액(Control)	DPPH와 Sample의 혼합액	항산화 활성(%)	평균값 (%) (오차)
MeOH층	1	0.123371	0.955613	0.493126	61.30	61 ± 5
	2	0.136115	0.955683	0.466485	65.43	
	3	0.132584	0.927591	0.553914	54.57	
Hexane층	1	0.156998	0.955613	0.545004	59.39	59 ± 5
	2	0.179143	0.955683	0.495517	66.89	
	3	0.124544	0.927591	0.594294	49.35	
Acetone층	1	0.063725	0.955613	0.338748	71.22	74 ± 2
	2	0.069779	0.955683	0.308004	75.07	
	3	0.063214	0.927591	0.309083	73.50	

Table 2. The Radical Scavenging Effect of MeOH Extract of Trunk

Sample	실험 횟수	EtOH과 Sample의 혼합액	DPPH와 EtOH의 혼합액(Control)	DPPH와 Sample의 혼합액	항산화 활성(%)	평균값 (%) (오차)
MeOH층	1	0.075411	1.041382	0.810291	29.43	27 ± 2
	2	0.058570	1.042478	0.848215	24.25	
	3	0.137046	1.024315	0.894804	26.02	

항산화활성(%) = [ {Control - (DPPH와 Sample의 혼합액 - EtOH와 Sample의 혼합액)} / Control ] × 100

Table 1과 Table 2에서 계산된 항산화 활성효과는 손바닥선인장 열매와 줄기에서 다 나타나지만, 줄기에서의 항산화 역할은 열매에 비하여 2~3배정도 낮은 수준이다. 한편, 열매에서는 Hexane ( $59 \pm 5$ ), MeOH ( $61 \pm 5$ ), Acetone 추출물 ( $74 \pm 2$ )의 순서대로 항산화활성이 있는 것으로 관찰되었다.

아직 추출 혼합물중의 어떤 성분들이 항산화활성을 지니는 물질인지 동정이 되지 않았지만, Table 1과 Table 2에서와 같은 항산화활성을 지녔다는 것은 생체 내에서 통제되지 않은 라디칼들의 행동과 또 노화현상과 관련된 라디칼들의 행동을 억제하는데 손바닥선인장의 열매추출물들이 유용하게 사용될 수 있다는 것을 제시한다. 즉, 이들은 각각 생체의 항산화계를 도와서 노화 또는 활성산소에 의한 조직손상을 지연 또는 경감시킬 가능성이 크며,<sup>12</sup> 노화를 억제할 능력이 있다고 판단된다.

항산화효과를 보이는 성분은 아직 구명되지 않았으나, 선인장에 다량 포함되어 있는 polyphenol과 flavonoid계 물질일 가능성이 높은 것으로 판단되어진다.

최근에 노화촉진 마우스(senescence-accelerated mouse: SAM)를 대상으로 하여 손바닥선인장 열매의 항산화활성을 *in-vivo*로 조사한 연구결과가 보고되었다.<sup>17</sup> 이 보고에 의하면 SAM계에 손바닥선인장 열매를 30일간 경구 투여할 경우, 대조군에 비하여 간 조직의 과산화지질 함량이 감소함을 보였다. 또한, 항산화제인 Glutathion (GSH)의 농도가 어느 정도 증가됨을 관찰하였다. 이상의 결과는 손바닥선인장 열매가 생체 내 과산화지질 생성 방지와 함께 GSH의 함량을 증가시킴으로써, 항산화 작용과 밀접한 관련이 있음을 시사하고 있다.

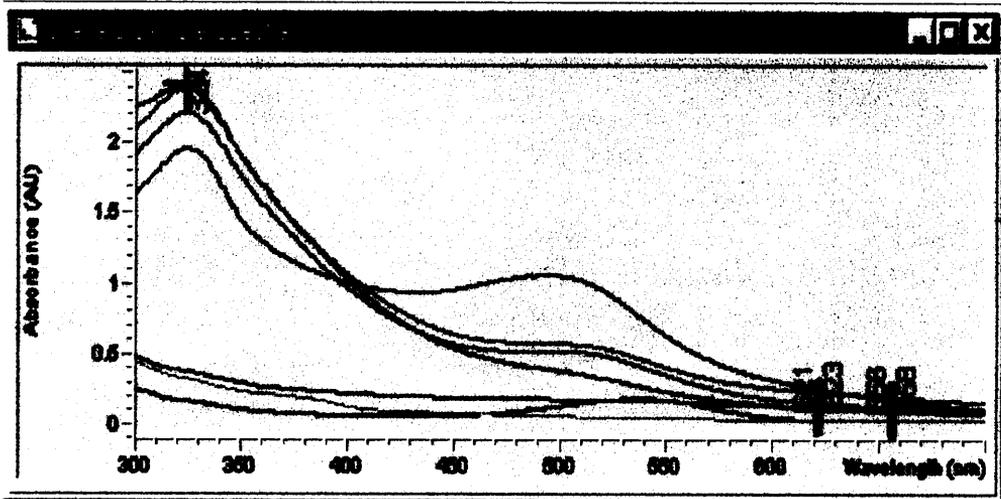


Figure 3. The Radical Scavenging Effect of Extracts of Fruits

범례 : 하단 → 메탄올 추출물 — 아세톤 추출물 — 헥산 추출물 —

상단 → 메탄올 추출물 — 아세톤 추출물 — 헥산 추출물 —

Control —

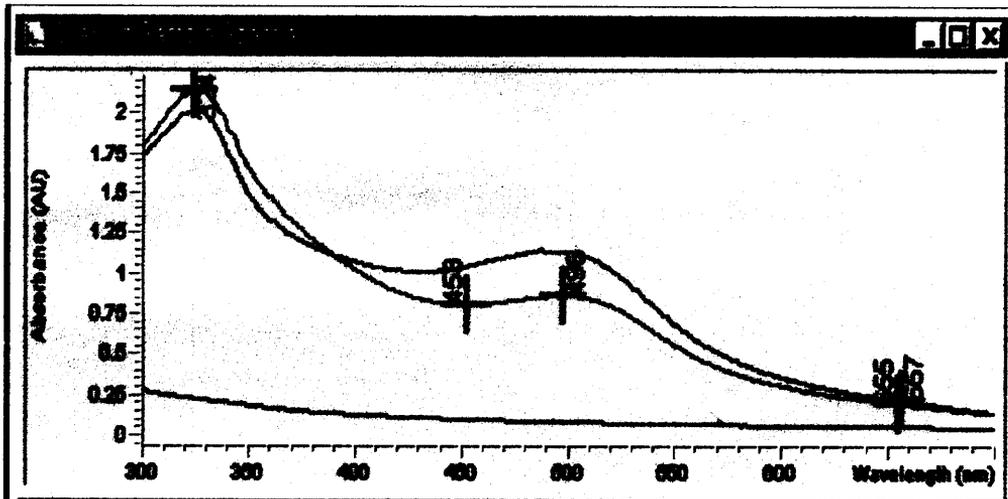


Figure 4. The Radical Scavenging Effect of MeOH Extract of Trunk

범례 : 에탄올 + 줄기 — Control — 줄기 —

### 3. 항균활성

#### 1) Gram negative 박테리아에 대한 활성 검색

손바닥선인장의 열매로부터 분리 추출한 MeOH층, Hexane층, Acetone층, 줄기로부터 분리 추출한 MeOH층, 그리고 각 층에 대해서 물과 Chloroform으로 처리했을 때 나타나는, 각 층의 Gram negative인 *E. Coli*. 8742균에 대한 항균활성은 Scheme 3과 Figure 5, Figure 6, Figure 7, Figure 8에 나타내었다.

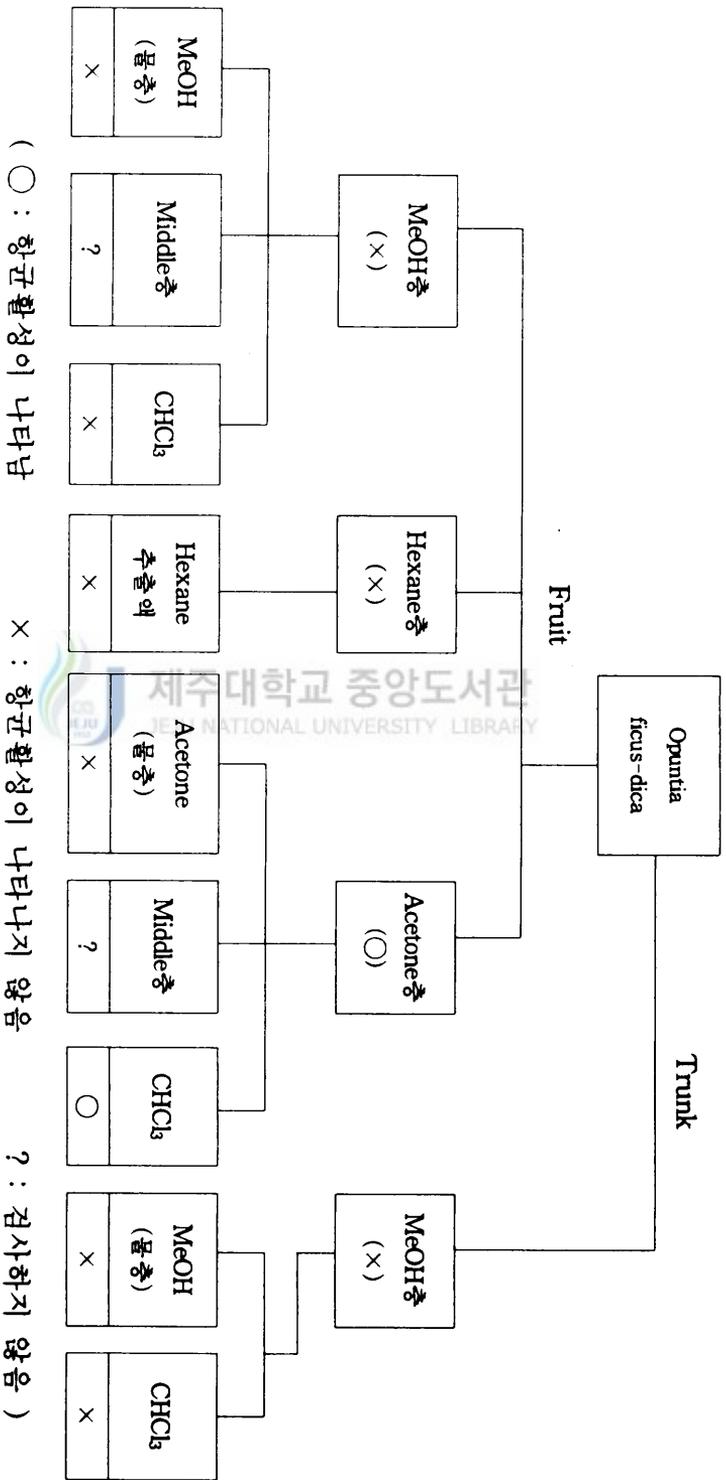
각 분리 추출 층에 대한 항균활성을 검색한 결과, 열매인 경우는 Acetone층과, Acetone층을 물과 Chloroform으로 추출한 Chloroform층에서 박테리아의 성장을 저해하는 항박테리아성 활성을 나타냄을 관찰할 수 있었다. 하지만 줄기인 경우는 MeOH층, 그리고 MeOH층을 물과 Chloroform으로 추출한 Chloroform층에 대한 항균활성을 검색한 결과 항박테리아성 활성을 찾을 수 없었다.

#### 2) Gram positive 박테리아에 대한 활성 검색

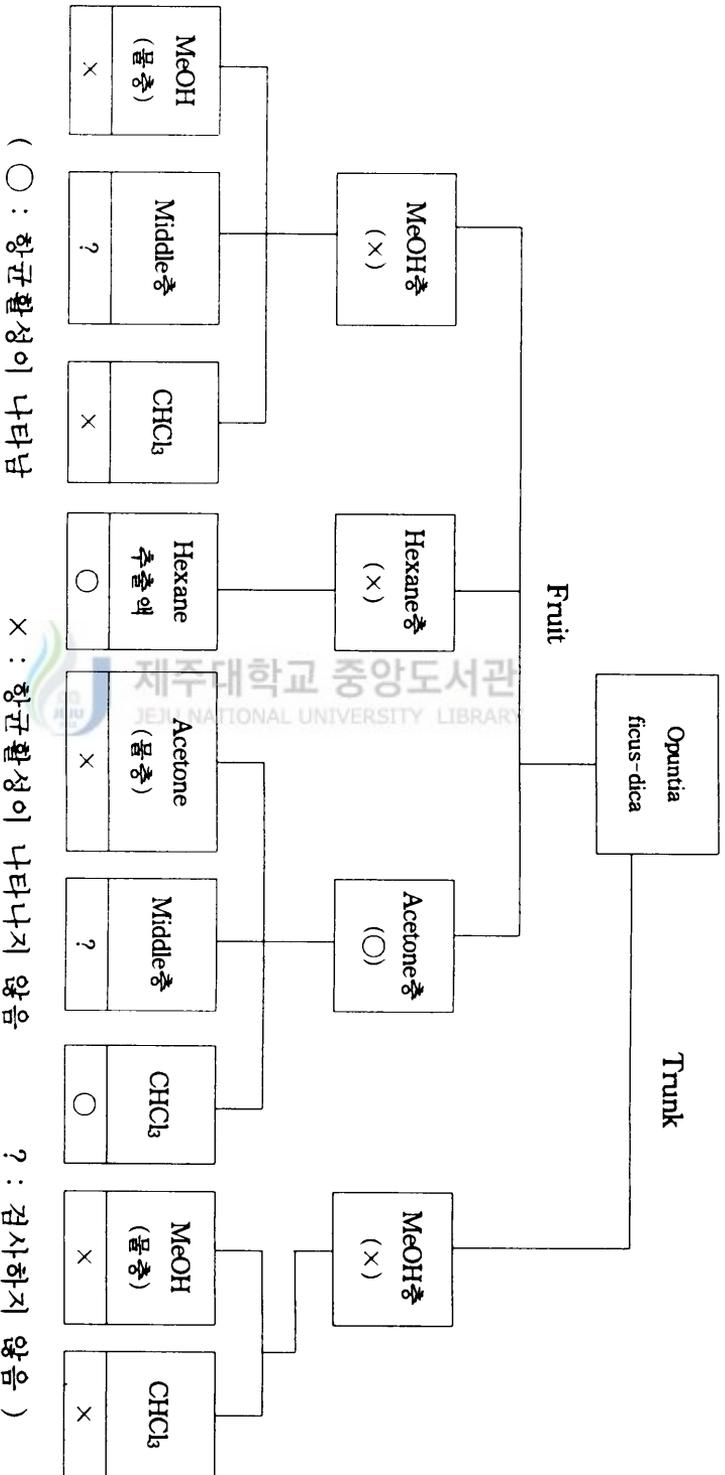
손바닥선인장의 열매로부터 분리 추출한 MeOH층, Hexane층, Acetone층과, 줄기의 MeOH층, 그리고 각 층에 대해서 물과 Chloroform으로 처리했을 때 나타나는 각 층이 가지는 Gram positive 박테리아에 대한 항균활성은 Scheme 4와 Figure 9, Figure 10, Figure 11, Figure 12에 나타내었다

황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 이용하여 열매의 MeOH층, Hexane층, Acetone층, 그리고 MeOH층과 Acetone층을 물과 Chloroform으로 추출하여 각 층에 대한 항균활성을 검색하였다. 그 결과 Acetone층과, Acetone층을 Chloroform으로 추출한 Chloroform층, 그리고 Gram negative 박테리아에서와는 달리 헥산 농축액에서 박테리아의 성장을 저해하는 항박테리아성 활성을 나타냄을 관찰할 수 있었다. 하지만 줄기의 MeOH층, 그리고 MeOH층을 물과 Chloroform으로 추출한 Chloroform층에 대한 항균활성을 검색한 결과, 의미 있는 항균활성을 찾을 수 없었다.

위에서 보여준 결과들은 Gram positive인 *Staphylococcus aureus*와 Gram negative인 *Escherichia coli* 8742 박테리아에 대하여 손바닥선인장의 열매와 줄기의 단계적 분리 추출물들이 박테리아의 증식을 억제하는 활성을 가지는 성분들을 포함하고 있다는 사실을 제시하였다. 추출액들은 여러 화합물 성분들의 혼합물로 존재하기 때문에 현단계에서는 아직 어떤 물질(들)이 항산화 및 항박테리아성 활성을 지니고 있는지가 분명하지 않다. 그러나 이 결과들은 손바닥선인장이 노화와 관련이 있는 자유라디칼들을 제거하거나, Gram positive인 *Staphylococcus aureus*와 Gram negative인 *Escherichia coli* 8742 박테리아의 성장을 억제할 수 있는 신물질을 개발하는데 이용될 수 있음을 제시하여 준다.



Scheme 3. The Antibacterial Activity of Extracts of *Opuntia ficus-dica* against *E. coli* 8742.



Scheme 4. The Antibacterial Activity of Extracts of *Opuntia ficus-dica* against *Staphylococcus aureus*.

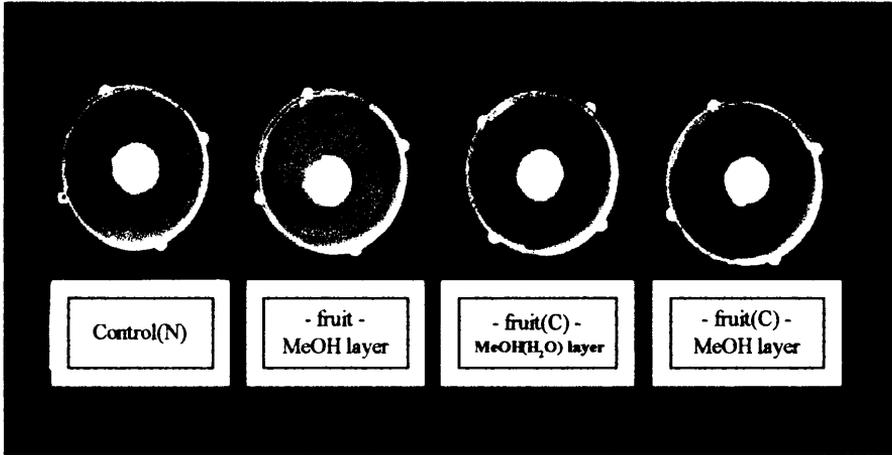


Figure 5. The Antibacterial Activity of MeOH Extract of Fruit against *E. coli* 8742.

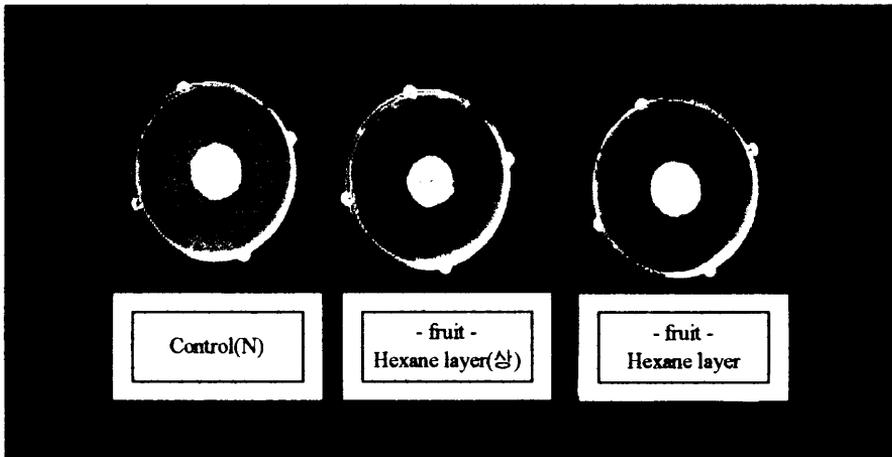


Figure 6. The Antibacterial Activity of Hexane Extract of Fruit against *E. coli* 8742.

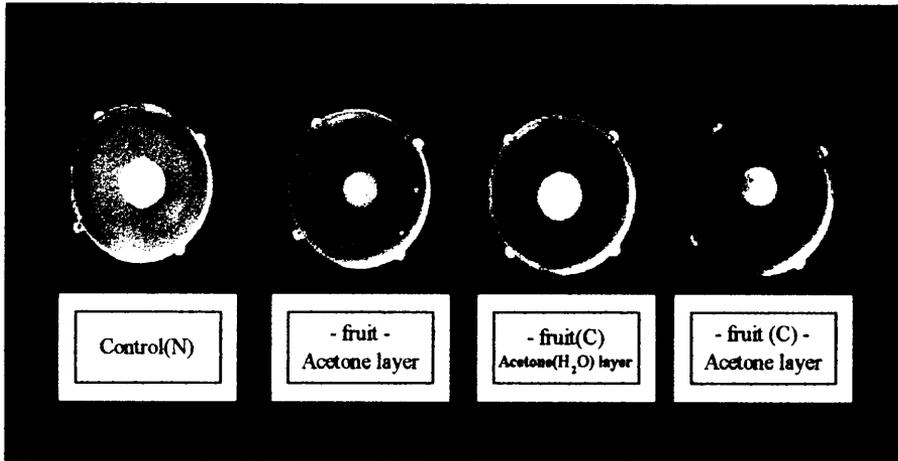


Figure 7. The Antibacterial Activity of Acetone Extract of Fruit against *E. coli* 8742.

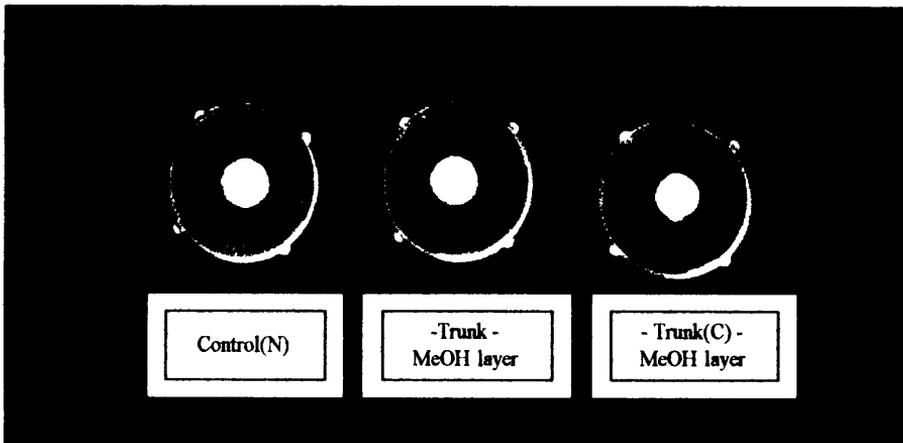


Figure 8. The Antibacterial Activity of MeOH Extract of Trunk against *E. coli* 8742 (a) Control, (b) MeOH Extract, (c) Chloroform Extract of (b).

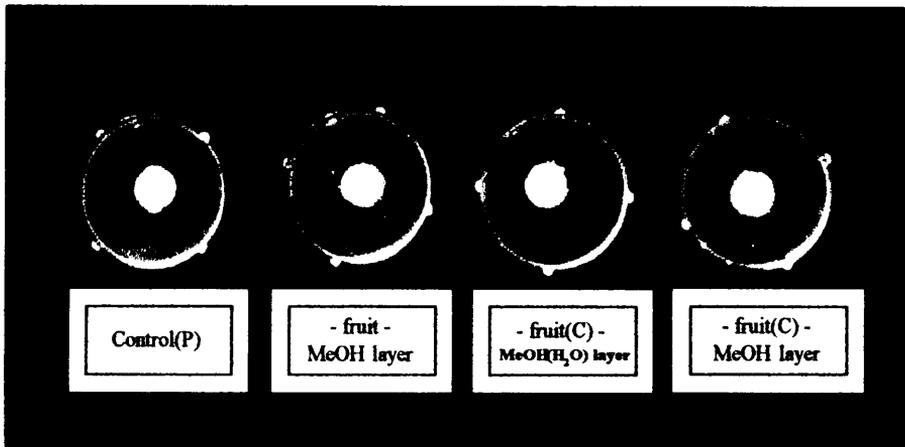


Figure 9. The Antibacterial Activity of MeOH Extract of Fruit against *Staphylococcus aureus*.

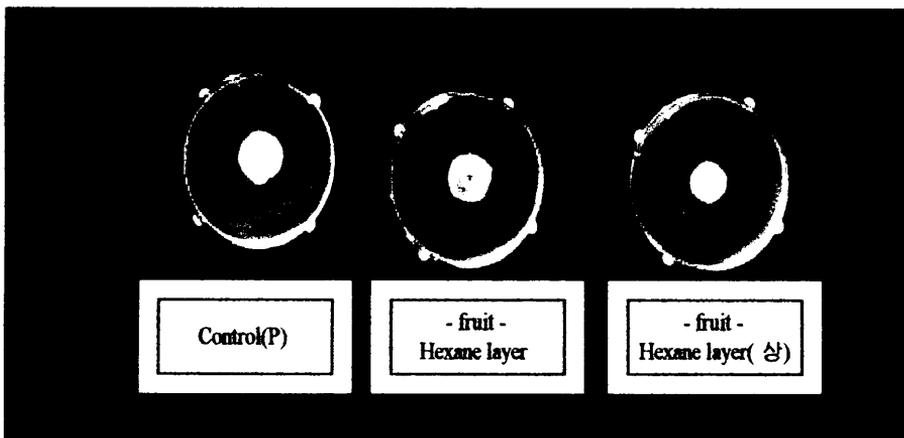


Figure 10. The Antibacterial Activity of Hexane Extract of Fruit against *Staphylococcus aureus*.

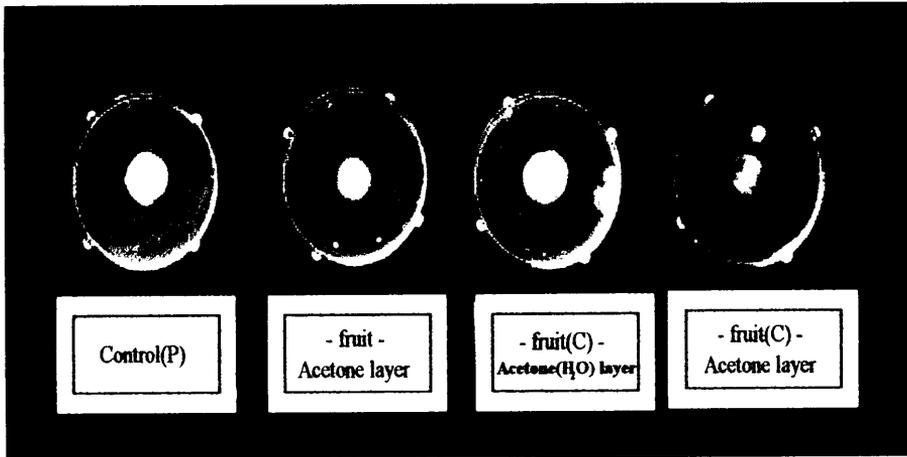


Figure 11. The Antibacterial Activity of Acetone Extract of Fruit against *Staphylococcus aureus*.

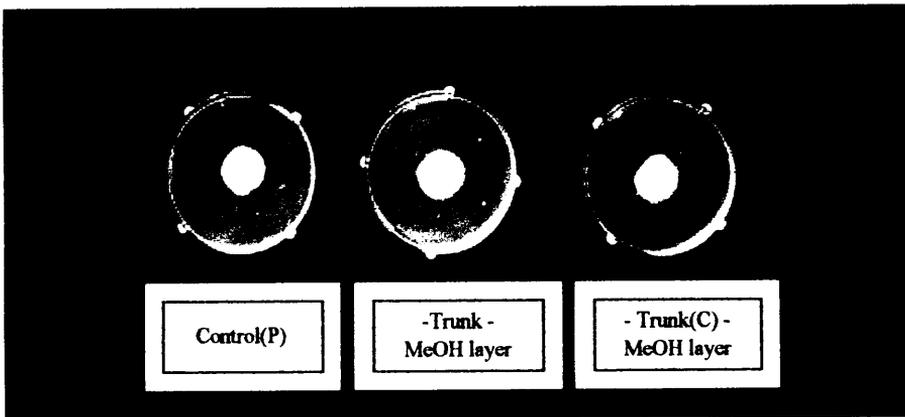


Figure 12. The Antibacterial Activity of MeOH Extract of Trunk against *Staphylococcus aureus* (a) Control, (b) MeOH Extract, (c) Chloroform Extract of (b).

#### 4. 크로마토그래피를 이용한 추출물의 성분 분석

##### 1) TLC을 이용한 추출물의 성분 분석

항산화 및 항균활성에 사용된 손바닥선인장의 추출물들은 혼합물이기 때문에 이들 활성을 지니는 물질(들)을 얻기 위한 기본 단계로서 Column chromatography와 TLC를 수행하였다. Column chromatography를 수행하는데 사용되는 적절한 이동상을 선정하기 위하여 여러 용매시스템을 시도한 결과, Chloroform과 Diethylether를 다양한 비율(1/1, 1/2, 1/4, 1/6, 2/1, 4/1)로 혼합한 용매를 이용하는 것이 효과적임을 발견하였다. 이들을 시료의 전개용매로 사용하여 MeOH층과, Acetone층을 몰과 Chloroform으로 분리 추출한 추출물의 혼합성분들을 TLC로서 분석하였으며 Figure 13, Figure 14에 그 결과를 나타내었다.

위의 전개용매 중 Chloroform/Diethylether(1/1)를 선택하여 Acetone층의 혼합성분에 대한 open column chromatography를 행하였다. 이때 추출된 혼합성분들은 용리되면서 여러 가지 색상의 띠를 이루며 차차 분리되었다. 평균 유속은 1mL/min으로 하였으며, fraction collector를 이용하여 분액을 분취하였다. 각각의 분액들을 TLC로서 분석하여 각 분액의 순도확인 및 같은 이동거리( $R_f$ )를 가지는 성분끼리 모았다.

TLC상에서는 spot의 분리가 잘 되지만 open column chromatography를 행할 때에는 분리가 잘 되지 않았다. 그러한 현상은  $R_f$  값이 0.5 이상인 성분들에 대해서 심하게 나타났다. 하지만  $R_f$  값이 0.3 근처의 성분들은 단일 spot으로 그 순도가 좋았다.

본 실험에서 얻어진, 단일 spot으로 분리된 이들 성분들은 앞으로 IR과 NMR, MS를 이용하여 구조분석 및 결정을 하려고 하며, 더불어 생리활성실험도 차후에 수행하려한다. 또, 이 물질들과 균의 상호작용기전

에 대한 연구가 이루어져야하며, 다른 생물체 및 사람 세포에 대한 생리활성 연구가 계속 이루어져서 긍정적인 결과가 얻어진다면, 새로운 의약으로 개발하는데 큰 기여를 할 것으로 생각된다.



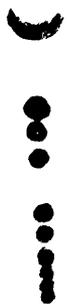
Thin Layer Chromatogram	$R_f$ values
	$i = 0.825$ $h = 0.575$ $g = 0.50$ $f = 0.425$ $e = 0.25$ $d = 0.20$ $c = 0.10$ $b = 0.05$ $a = 0.00$

Figure 13. Thin Layer Chromatogram of Chloroform Layer from MeOH Extract of Fruit



Thin Layer Chromatogram	$R_f$ values
	$h = 0.526$ $g = 0.447$ $f = 0.342$ $e = 0.237$ $d = 0.158$ $c = 0.132$ $b = 0.08$ $a = 0.00$

Figure 14. Thin Layer Chromatogram of Chloroform Layer from Acetone Extract of Fruit

## IV. 결 론

제주도에서 자생하는 손바닥선인장의 열매와 줄기에 함유된 성분들의 항산화 및 항균성의 생리활성을 확인하기 위하여 메탄올, 헥산, 그리고 아세톤, 클로로포름을 이용하여 손바닥선인장의 열매와 줄기를 분리 추출하였다. 항산화활성은 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl 용액만의 대조군이 흡수하는 UV Spectrophotometer에서의 흡광도와 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl 용액과 용매추출 분획의 혼합시료용액이 흡수하는 흡광도 차이를 지표로 하여 측정하였고, 값이 클수록 항산화활성이 높다. 열매 추출물의 항산화활성의 순서는 Acetone 추출물 > MeOH 추출물 > Hexane 추출물 순으로 나타났으며, 각각  $74 \pm 2\%$ ,  $61 \pm 5\%$ ,  $59 \pm 5\%$ 의 항산화활성을 나타냈다. 그리고 줄기를 MeOH로 추출했을 때, 항산화활성은  $27 \pm 2\%$ 이었다.

열매와 줄기로부터 각기 다른 용매로 분리 추출한 분획들이 지니는 항균활성 측정은 Gram negative인 *E. coli*. 8742와 Gram positive인 *Staphylococcus aureus*를 대상으로 시험하였다. *E. coli*. 8742균을 이용한 항균활성 측정에서, 열매의 Acetone 추출물, MeOH 추출물, Hexane 추출물, 그리고 줄기의 MeOH 추출물과 각각의 추출물을 물과 Chloroform으로 추출한 것에 대해서도 항균활성을 측정하였다. 열매의 Acetone 추출물과 Acetone 추출물을 Chloroform으로 추출한 것에서만 의미 있는 활성을 나타낸 반면, 줄기의 경우는 항균활성을 관찰할 수 없었다. 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 이용한 항균활성 측정에서, 열매의 Acetone 추출물과, Acetone 추출물을 Chloroform으로 추출한 것과 Hexane 추출물에서 의미 있는 활성을 나타내었다. 줄기의 경우엔 역시 의미 있는 활성을 관찰할 수 없었다.

이들 결과들은 손바닥선인장이 항산화활성, 그리고 항균활성을 갖는 성분들을 함유하고 있음을 나타내며, 항산화제 및 항균제를 개발하는 데 기초자료로 이용될 수 있다고 사료된다.

## V. 참고문헌

1. 박상신, 유국현, 민태진(1998); 버섯추출물의 항산화활성에 관한 연구, *The Korean journal of Mycology*, vol. 26, No. 1, 69-77
2. Babior, B.M. and Woodman, R.C(1990); Chronic granulomatous disease. *Semin. Herarol.*, 27. 247~259.
3. Bradford, M(1976); Protein assay. *Anal. Biochem.*, 72. 248~254.
4. Britton, C. and Meahly, A.C(1955); Assay of catalase and peroxidase. *Enzymology*, 2. 764~775.
5. Kellogg, E.W. and Fridovich, I(1986); Superoxide dismutase in the rat and mouse as a function of age and longevity. *J. Gerontol.* 31. 405~408.
6. Takanori Tsuda, Mie Watanabe, Katsumi Ohshima, Seiji Norinoby, Sang-Won Choi, Shunro Kawakishi, and Toshihiko Osawa(1994); Antioxidative Activity of the Anthocyanin Pigments Cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside and Cyanidin, *J. Agric. Food Chem.* 42, 2407-2410.
7. Hideo Okamura, Akio Mimura, Yasuko Yakoku, Mitsuru Niwano and Yoshimasa Takahara(1993); Antioxidant Activity of Tannins and Flavonoides in Eucalyptus Rostrata, *Phytochemistry*, Vol. 33, No. 3, 557-561.
8. Dong-Ung Lee, Uk-Seob Shin, and Keun Huh(1996); Inhibitory effects of Gagaminine, a Steroidal Alkaloid from *Cynanchum wilfordi*, on Lipid Peroxidation and Aldehyde Oxidase Activity, *Planta Medi.*, 62, 485-487.
9. Gow-Chin Yen and Hui-Yin Chen(1995); Antioxidant Activity of

- Various Tea Wxtracts in Relation to To Their Antimutagenicity, *J. Agric. Food Chem.* 43, 27-32.
10. Michael A. Trush, Edward G. Mimnaugh, Erika Ginsburg, and Theodore E. Gram(1981); In Vitro Stimulation by Paraquat of Reactive Oxygen-Mediated Lipid Peroxidation in Rat Lung Microsomes, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 60, 279-286.
  11. Hirotaka Katsuzaki, Shunro Kawakishi, and Toshihiki Osawa(1993); Structure of Novel Antioxidative Lignan Triglycoside Isolated from Sesame seed, *Heteocycles*, Vol. 36, No. 5.
  12. Ruuls, S.R., Bauer, J., Sontrop, K., Huitinga, I., ' t Hart, B.A. and Dijkstra, C.D(1995); Reactive oxygen species are involved in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.*, 56. 207~217.
  13. 이영철, 김홍만, 김영언, 황금희, 안채경(1997); 선인장의 성분분석 및 가공식품의 품질개선 시험, 한국식품개발 연구원.
  14. 안덕규(1993); 가정동의대전. 여강출판사, 서울.
  15. 정동효(1982); 항생물질개론, 교학연구사.
  16. S. A. Waksman(1956); *Antibiot. Chemoth.*, 6, 90.
  17. 백승규(1998); '손바닥선인장 열매가 노화촉진 마우스의 수동회피능 및 항산화효능에 미치는 영향', 제주대학교 대학원

[ABSTRACT]

## Purification of Bioactive Materials from *Opuntia ficus-dica* and Identification of Their Bioactivities

Kuk Chul Kang

Major in Education of Chemistry

Graduate School of Education, Cheju National University

Cheju, Korea

Supervised by Professor Sunjoo Lee, Ph. D.

In order to identify the bioactivity of components from the fruit and the trunk of *Opuntia ficus-dica*, they were extracted by using methanol, hexane, chloroform and acetone. Anti-oxidation activity were measured by using 1,1-Diphenyl-2-picrilhydrazyl, and the activity of extracts from the fruit was in order of acetone extract( $74. \pm 2\%$ ) > methanol extract( $61 \pm 5\%$ ) > hexane extract( $59 \pm 5$ ). The activity of methanol extract from the trunk was  $27 \pm 2\%$ .

Anti-bacterial activity of extracts mentioned above and substances separated by using water and chloroform from each extract were measured against Gram negative *E. coli* 8742 and Gram positive *Staphylococcus aureus*. Acetone extract, and chloroform extract from acetone extract showed anti-bacterial activity against *E. coli* 8742. Acetone extract, chloroform extract from acetone extract, and hexane extract also showed anti-bacterial activity against *Staphylococcus aureus*. These combined results suggest that *Opuntia ficus-dica* has anti-oxidation and anti-bacterial components.