

碩士學位論文

제주산 들깨풀(*Mosla punctulata*
Nakai)로부터 분리된 Luteolin의 구조
확인 및 생리활성에 관한 연구



濟州大學校 大學院

化學科

金 昊 璟

2008年 2月

제주산 들깨풀(*Mosla punctulata*
Nakai)로부터 분리된 Luteolin의
구조 확인 및 생리활성에 관한 연구

指導教授 鄭 惠 商

金 吳 璟

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2008年 2月

金吳璟의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

이 신주

委 員

정적상

委 員

이 남호



濟州大學校 大學院

2008年 2月

Studies on Biological Activities of Luteolin
from *Mosla punctulata* in Jeju

Kim Dae Kyung

(Supervised by professor Duk-Sang Jung)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for
the degree of Master of Natural Science

2008. 2.

This thesis has been examined and approved.

Duk-Sang Jung

Sung-in Lee

Nam-Hi Lee

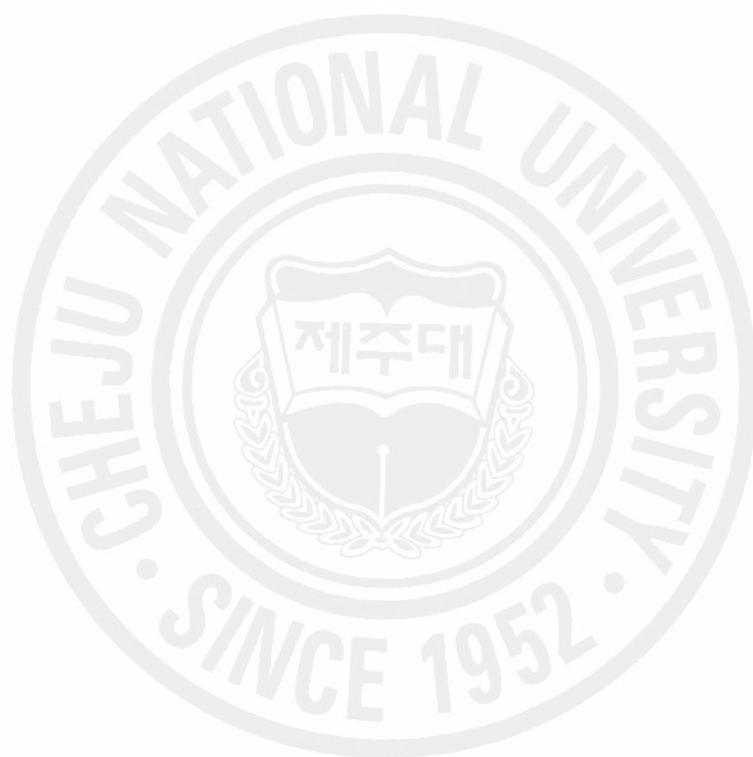
Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of shemes	iii
List of table	iv
List of figures	v
Abstract	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 재료	6
2. 시약 및 기기	6
3. 실험방법	7
3-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리	7
3-1-1. 제주산 식물의 메탄올 추출	7
3-1-2. 제주산 들깨풀의 메탄올 추출 및 용매분획	7
3-1-3. VLC에 의한 ethyl acetate층 분리과정	8
3-1-4. Sephadex column chromatography에 의한 분리과정	8
3-1-5. HPLC system에 의한 분리 정제과정	8
3-2. DPPH free radical 소거활성에 의한 항산화 활성 측정	11
3-3. Elastase 활성저해 측정실험	11
3-4. Tyrosinase 활성저해 측정실험	12
III. 결과 및 고찰	14
1. DPPH free radical 소거 활성에 의한 항산화 활성 측정	14
1-1. 제주산 식물의 80% 메탄올 추출물에 대한 라디칼 소거 활성	14
1-2. 제주산 들깨풀의 분획분에 대한 라디칼 소거활성	15
1-3. 분리된 물질에 대한 라디칼 소거활성	17
2. Elastase 활성억제 측정	18
2-1. 80% MeOH 추출물 및 분획물의 elastase 활성억제 실험	18

2-2. 분리물에 대한 elastase 활성억제 실험	18
3. Tyrosinase 활성억제 측정	20
3-1. 80% MeOH 추출물 및 분획물의 tyrosinase 활성억제 실험	20
3-2. 분리물에 대한 tyrosinase 활성억제 실험	20
4. 제주산 들깨풀의 성분분리 및 구조 확인	22
4-1. Compound 1의 분리 및 구조 확인	22
IV. 요약 및 결론	29
V. 참고문헌	31



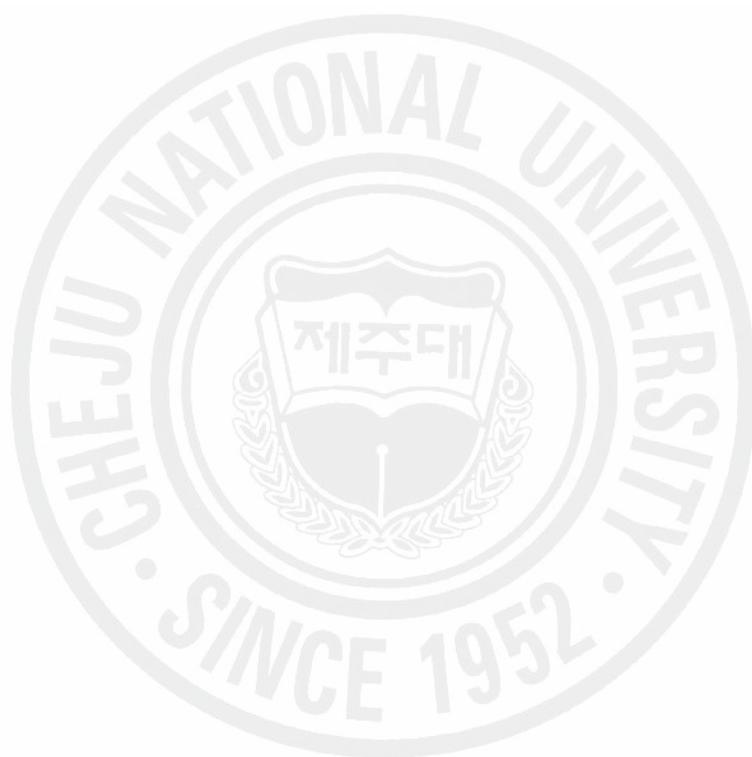
List of schemes

scheme 1. Extraction and fractionation of the <i>Mosla puntulata</i> Nakai	9
scheme 2. Isolation of the EtOAc layer of <i>Mosla puntulata</i> Nakai	10



List of table

Table 1. DPPH radical scavenging effect of plants in Jeju	15
Table 2. RC ₅₀ (μg/mL) of several extracts	16
Table 3. NMR data of luteolin	23



List of figures

Figure 1. Effect of ROS(Reactive Oxygen Species)	2
Figure 2. Structure of 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl(DPPH)	3
Figure 3. Structure of skin	3
Figure 4. The pathway of melanin polymer formulation	4
Figure 5. DPPH radical scavenging effect of several extracts	16
Figure 6. DPPH radical scavenging effect of luteolin	17
Figure 7. Inhibition of elastase activities by several extracts	18
Figure 8. Inhibition of elastase activity by luteolin	19
Figure 9. Inhibition of tyrosinase activity by several extracts	20
Figure 10. Inhibition of tyrosinase activity by luteolin	21
Figure 11. ¹ H-NMR(400MHz) of compound 1 in CD ₃ OD	24
Figure 12. ¹³ C-NMR(100MHz) of compound 1 in CD ₃ OD	25
Figure 13. COSY of compound 1 in CD ₃ OD	26
Figure 14. HMQC of compound 1 in CD ₃ OD	26
Figure 15. HMBC of compound 1 in CD ₃ OD	27
Figure 16. Key HMBC of compound 1	27
Figure 17. Chemical structure of luteolin	28

Abstract

To search for the antioxidation activities of 15 plants species obtained in Jeju, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging test was performed. Only *Mosla punctulata* among them showed better radical scavenging activity than vitamin C.

The active compound was isolated from the methanol extract of *Mosla punctulata*, and identified to be luteolin, whose structure was confirmed by 1 dimensional NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) and 2 dimensional NMR, such as HMQC, HMBC and COSY, data.

Luteolin found to be isolated from *Mosla punctulata* for the first time.

Reduction concentration(RC_{50}) of DPPH radical scavenging for luteolin were 3.18 $\mu\text{g/mL}$. Its radical scavenging activity in terms of RC_{50} was much stronger than vitamin C.

The cosmeceutical activities of luteolin were also tested. It slightly inhibited both tyrosinase and elastase activities. The result indicated that luteolin had moderate whitening and anti-wrinkle activities.

Since the antioxidation is necessary to prevent skin pigmentation and aging, luteolin purified from *Mosla punctulata* can be used as functional cosmetics.

I. 서론

천연물이란 동·식물 등의 생물자원으로부터 얻어지는 산물을 일컫는다. 이러한 천연물들은 합성된 물질 보다 인체 내에서 안정성이 높아 그 활용 범위가 점차 확대되어 여러 방면으로 기능성에 대한 연구가 진행되는 추세이다. 우리나라는 전통적으로 동양의약을 기반으로 하는 생약에 대한 연구가 많이 진행되어왔고, 축적된 데이터베이스를 활용하여 천연물의 연구에 더욱 박차를 가할 수 있을 것이라고 생각되며 이러한 점은 기능성 물질 개발연구를 주도해오던 선진국과도 대등하게 연구 성과가 나오리라 기대된다.

현대사회에서는 활발한 산업발달로 인한 공해와 스트레스로 인해 많은 활성산소종이 체내에 유입되어 각종 질병 및 노화를 촉진 시키는 작용을 하고 있고, 이러한 기능성 화장품의 원료는 요즘엔 천연물 특히 약용 식물이나 허브를 중심으로 많이 개발되고 있으며 특히 노화 억제와 관련된 천연 항산화 물질에 대한 연구들이 매우 활발하게 진행되고 있다¹⁾.

활성산소(active oxygen)는 체내에서 산소가 사용되면서 다양하게 생성된다. 대표적으로 O_2^- , OH , H_2O_2 가 있다²⁾. 이러한 활성 산소는 분자 내에 쌍을 이루지 않은 전자가 불안정한 상태로 좌충우돌하면서 주변에 있는 분자 내지, 세포막, 미토콘드리아 막, 유전정보, 단백질, 지질 등에 악영향을 주게 된다(Figure 1).

이러한 활성산소에 의해 발생하는 과산화반응 및 손상에 대한 생체 내 방어기구가 여러 면에서 연구되고 있으며, superoxide dismutase(SOD), catalase 및 glutathione peroxidase(GSH) 등의 효소, tocopherol, ascorbic acid, riboflavin, uric acid 등의 항산화 영양소 등에 대한 연구가 있다³⁾.

DPPH는 hydrazyl의 질소원자가 불안정한 상태에 있으므로 쉽게 수소원자를 받아들이는 성질을 가지고 있어 항산화성 물질과 반응하여 수소원자를 받아들임으로서 자체의 적색성을 잃게 되는 성질을 이용하여 항산화능의 정도를 측정할 수 있게 된다. 즉, DPPH는 질소를 중심으로 안정한 라디칼 구조를 하고 있으며(Figure 2), 최대 흡수를 나타내다가 환원이 되어radical을 소실하게 되면 측정 파장대에서 흡수가 없어지게 되므로 그 값의 비교로 측정하게 된다.

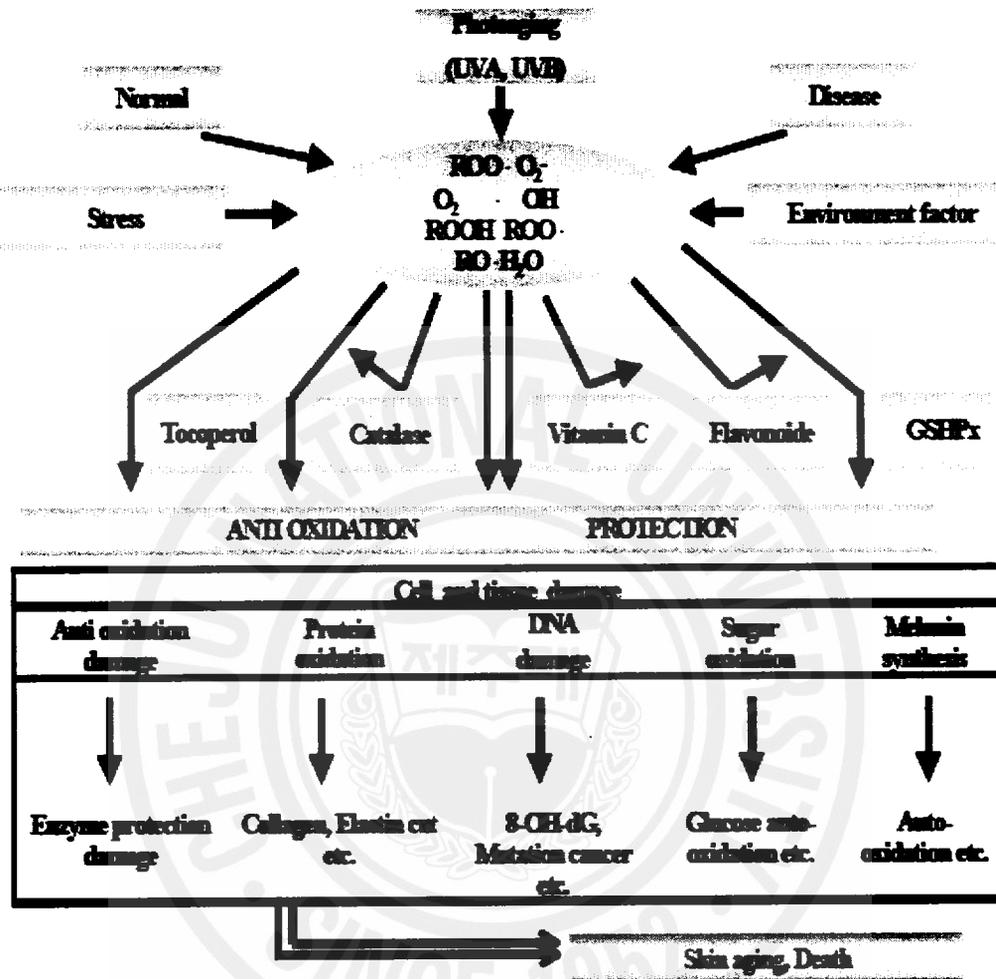


Figure 1. Effect of ROS(Reactive Oxygen Species)

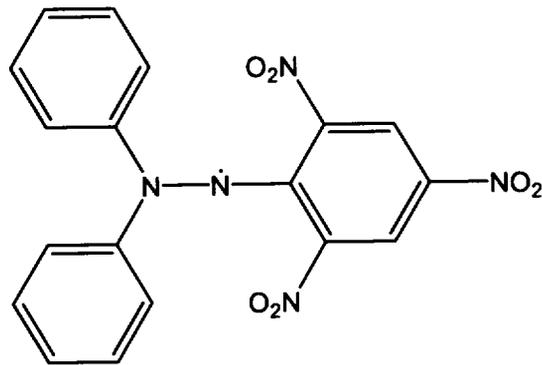


Figure 2. Structure of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)

지난 수십 년 간 널리 사용되어오던 BHA(butylated hydroxy toluene), BHT (butylated hydroxy anisole)등의 합성 항산화제들은 항산화력은 뛰어나나 안정성에 관한 우려로 미국, 일본 등 선진 각국에서는 그 사용량이 법적으로 규제되어 천연 항산화제로 대체하는 추세에 있다⁴⁾.

Elastase는 피부 탄력성에 관련된 elastin을 분해 시켜 collagen과 이루어진 피부의 진피 조직의 그물망 구조 결합을 끊어 줌으로 주름 생성의 주원인 효소로 알려져 있다(Figure 3).

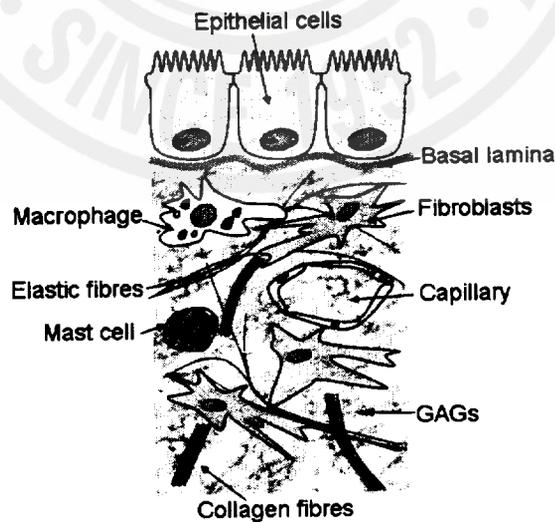


Figure 3. Structure of skin

Melanosome 내에 있어서의 melanin 생성과정은 tyrosine이 효소 tyrosinase에 의해 산화되어 DOPA→DOPA quinone→DOPA chrome으로 melanin 생성의 전구체가 되어 그 생합성량에 따라 피부색이 짙고 옅게 되는 정도가 된다(Figure 4).

Tyrosinase는 동, 식물계에 가장 많이 분포되어 있는 polyphenol oxidase로서 활성부위에 구리이온을 함유하는 metalloprotein이기도 한 이 물질은 생체에서 두 가지의 다른 반응을 촉매한다. 그 하나는 monohydroxyphenolic compound를 *O*-dihydroxyphenol로 산화시키는 tyrosine oxidase로서의 기능이고, 다른 하나는 *O*-dihydroxyphenol을 *O*-quinone으로 산화시키는 dopa oxidase로서의 기능이다.

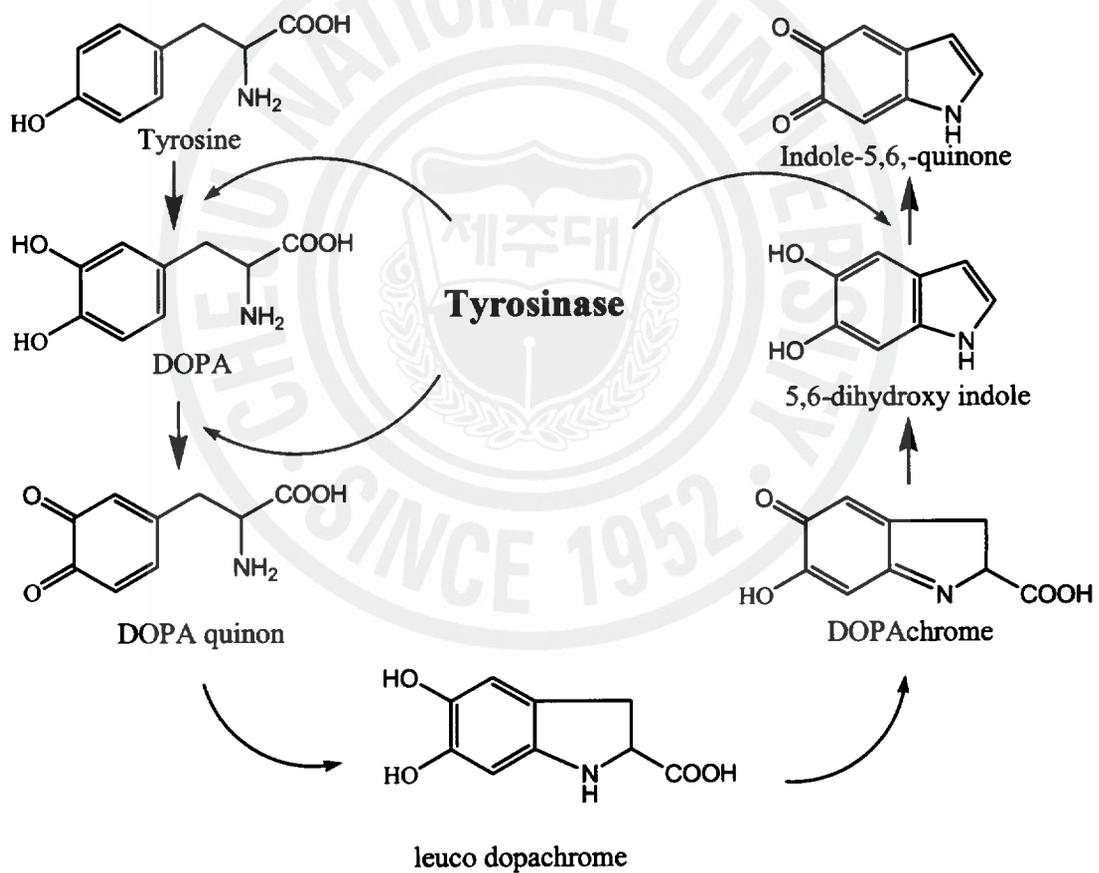


Figure 4. The pathway of melanin polymer formulation

Tyrosinase는 생체 내에서 이러한 기능 때문에 melanin polymer를 생합성하는데 중요한 역할을 하고 있다. 멜라닌 생성억제는 tyrosinase 활성을 억제하는 작용을 하는 물질에 초점을 맞추어서 연구가 진행되고 있다. 이런 억제제는 미백제라고 칭하기도 하는데, 비타민 C 유도체, 알부틴 및 코직산이 유효성분으로 허가되어 있다.

본 연구에서는 제주산 자생식물 15종에 대하여 DPPH 라디칼 소거능 측정을 통하여 선별된 제주산 들깨풀을 이용하여 활성성분이 있는 물질을 규명하기 위하여 단일물질을 분리하고 항산화 및 항노화, 미백효과에 대하여 실험을 실시하였다.

들깨풀(*Mosla punctulata* Nakai)은 꿀풀과(Lamiaceae)에 속하는 일년초로서 지상부를 건조한 것을 석제정(石薺莖)이라고 한다. 들에서 흔히 자라고 높이는 20~60 cm이고, 줄기는 둔한 사각형이며 자주빛이 돌며, 곧추서고 윗부분에 가는 털이 성글게 나있으며 자른 면이 네모지고 가지를 많이 친다. 잎은 대생(對生), 난상(卵狀) 피침형(披針形), 긴 타원형이고 양끝이 뾰족하며 길이 2~4 cm, 폭 1~2.5 cm, 표면과 뒷면 맥에 털이 있고, 가장자리에 낮은 톱니가 있으며 이 톱니가 7개 이상인 잎도 다수 존재하며, 잎자루의 길이는 1~2 cm이다. 꽃은 8~9월에 줄기와 가지 끝에서 긴 송이 꽃차례를 이루고 여러 송이가 성글게 모여서 피는데 연한 홍자색을 띠며, 가지 끝에 이삭 모양으로 달리고, 포는 피침형, 꽃자루 길이와 비슷하다. 꽃받침은 위쪽은 3갈래, 아래쪽은 2갈래인 방사상칭에 가까운 종 비슷한 입술모양을 하며, 갈래 끝은 뾰족하고, 화관은 길이 3~4 mm, 상순 꽃잎은 중앙이 약간 오목하고, 하순 꽃잎은 3갈래, 수술 4개중 2개는 길며, 열매는 분과(分果)로 거꾸로 선 달걀 모양이며 지름 1 mm정도로 융기하는 그물 무늬가 있고 4개가 꽃받침으로 싸이며, 10월경에 여문다. 지상부에는 정유가 함유되어 있으며, 주성분으로는 정유성분 중에 l-thujone이 75%정도 함유되어 있으며 α -sabinene, d-limonene, limonene 등을 함유하고 있다고 알려져 있다 감기로 인한 두통과 인후염, 급성위장염 및 이질, 신우신염으로 인한 부종억제, 피부염, 가려움증, 습진 다발성 종기 등에 사용되어 왔다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용되는 들깨풀은 제주도 제주시 조천읍 선홀리에 자생하는 것을 채취하여 수세한 후 통풍이 잘되는 곳에서 음건한 후 완전히 마른 전초를 세절하여 사용하였다.

2. 시약 및 기기

1) 추출 및 분리과정

본 실험에서 시료의 추출 및 용매분획에 사용된 용매들은 Merck Co., junsei Co.,사의 제품을 사용하였다. VLC silica gel column chromatography에는 Silica-gel 60 (230-400mesh ASTM, Merck), Sephadex column chromatography에는 Sephadex™ LH-20(Amersham Bioscience)을 사용하였고, 분리과정에서 사용된 TLC(Thin Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet (Silica gel 60 F₂₅₄, 2.0 mm, Merck)를 사용하였다. TLC상에서 분리물을 확인하기 위하여 UV lamp를 통하여 확인하는 방법과, TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후, heat gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 3% KMnO₄, 20% K₂CO₃ 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다.

침출된 용매 및 용매분획물 등을 감압농축 시키기 위하여 Evaporator(EYELA, JAPAN)를 사용하였고, 동결건조를 위하여 Deep Freezer 는 UF8650(Biocryos co. Ltd., Korea), 동결건조기(ilshin Lab, Korea)를 사용하였다.

분리과정 시 사용된 고성능 액체 크로마토그래피는 prep-HPLC (Preparative Liquid Chromatograph, Young Lin Instrument Co., Ltd, Korea)을 사용하였고, 구조분석에 이용되는 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400(FT-NMR system, JEOL, Japan)을 이용하였다. NMR 측정 시 사용된 용매로는

CD₃OD-d₄ 과 DMSO-d₆이 사용되었다.

2) 활성측정

항산화 활성 측정 시 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)은 Sigma-Aldrich사(USA)에서 구입하여 사용하였다. Elastase 주름억제활성 실험 시 사용한 기질로 사용된 N-Succinyl-(Ala-Ala-Ala)-p-nitroanilide)은 Sigma-Aldrich(USA)사에서 구입하였고, 효소로 사용된 Elastase porcine pancreatic은 Sigma-Aldrich(USA)사에서 구입한 것을 사용하였다. Tyrosinase 억제활성 실험에서 쓰인 L-tyrosine은 Sigma-Aldrich(USA)사의 시약을 사용하였고, 활성 측정 시 사용한 자외선 분광광도계 (UV-visible spectrophotometer)는 Hewlett Packard 8453과 Biochrom Libra S22(Cambridge Inc., England)을 사용하였다.

3. 실험방법

3-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리

3-1-1. 제주산 식물의 메탄올 추출

건조된 제주산 식물들을 80% 메탄올에 침적하고, 실온에서 3개월간 교반하여 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 여과하여 잔사를 분리한 후 여액만을 취하였으며 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일하게 2회 반복 실시하였다.

3-1-2. 제주산 들깨풀의 메탄올 추출 및 용매분획

제주산 들깨풀 1045.8 g을 위와 같은 방법으로 메탄올 19L에 침적하여 119.3 g의 추출물을 얻었다. 이 80% 메탄올 추출물 중 10 g을 20% 메탄올 1 L에 현탁하고 separate funnel에서 *n*-Hexane과 Methylene Chloride, EtOAc, *n*-Butanol을 사용하여 순차적으로 용매분획 하여, *n*-Hexane, Methylene Chloride, EtOAc,

n-Butanol 및 H₂O층을 얻었다(Scheme 1).

3-1-3. Vacuum Liquid Chromatography(VLC)에 의한 ethyl acetate층 분리과정

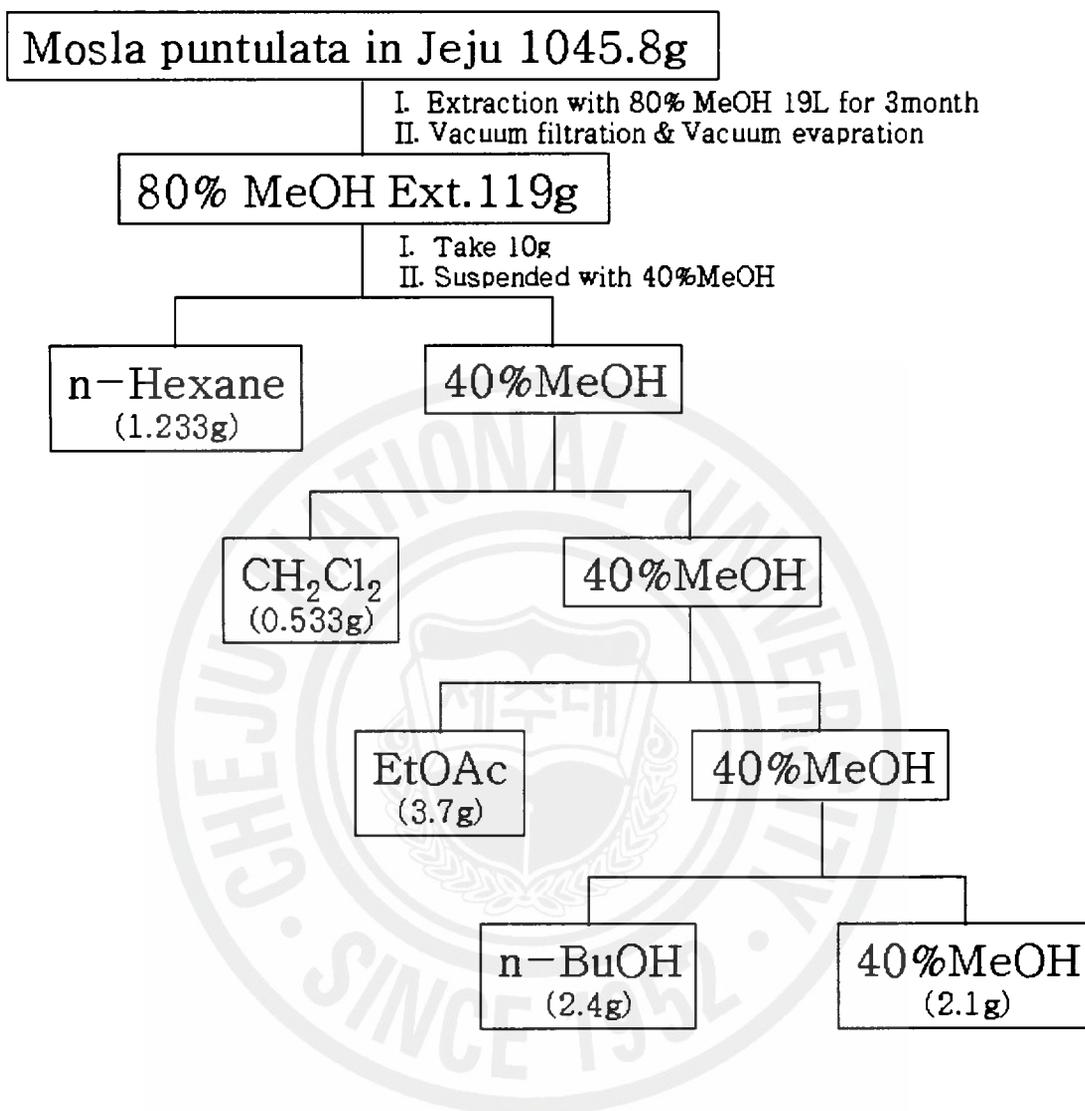
용매 분획 후 얻어진 각 분획층들 중에서 ethyl acetate층(3.7 g)을 VLC(5.4 × 5 cm, silica-gel, mash 20~40)에서 Hexane→EtOAc→MeOH을 사용하여, 각 용매의 배합비를 5%씩 증감하여 극성을 높이는 순으로 용액을 제조한 뒤 stepwise 용출방법을 사용하였다. 이 결과로 29개의 분획을 얻어낼 수 있었다(Scheme 2).

3-1-4. Sephadex column chromatography에 의한 분리과정

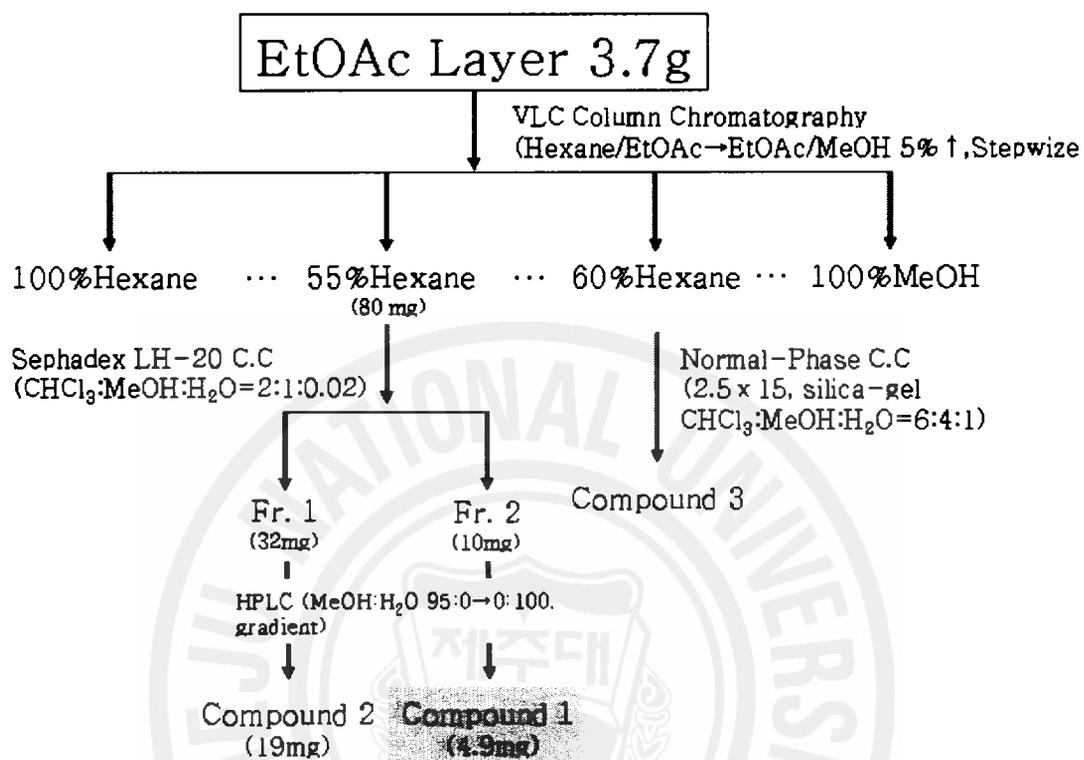
3-1-3에서 얻어진 29개의 분획들 중에서 55% hexane 분획층을 분리하기 위하여 glass column에 chloroform/methanol/H₂O=2/1/0.02의 전개용매에 24시간 팽윤시킨 Sephadex LH-20을 충전시킨다(2.5×15cm). 분획 80 mg을 소량의 methanol로 녹인 후 충전된 column에 팽윤시킨 용매와 동일조건의 전개용매를 사용하여 전개시키고, 분취용액을 감압 농축하여 3개의 fraction을 얻었다(Scheme 2).

3-1-5. HPLC system에 의한 분리 정제과정

3-1-4에서 얻어진 3개의 fraction의 중 TLC로 확인한 결과 두개의 분획이 단일 spot으로 확인되어 이 두개의 분획의 순도를 높이기 위하여, 분획1(32 mg)과 분획2(10 mg)를 각각 prep-HPLC system을 이용하여 이동상으로 MeOH:H₂O를 5:95→100:0로 순차적으로 진행시키는 gradient 법을 이용하여 분획1에서 compound 2 및 분획2에서 compound 1을 분리 하였다(Scheme 2). 그리고 이 두개의 단일물질을 FT-NMR 분광기기를 사용하여 그 구조를 확인하였다.



Scheme 1. Extraction and fractionation of the *Mosla punctulata* Nakai



Scheme 2. Isolation of the EtOAc layer of *Mosla punctulata* Nakai

3-2. DPPH free radical 소거활성에 의한 항산화 활성 측정

Sample의 항산화 활성측정은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 의한 자유라디칼 소거활성은 Yoshida 등의 방법을 응용하여, 그 소거효과정도를 측정하였다. Sample을 70% ethanol에 녹여 1.0 mg/mL(stock)을 제조하고 이것을 각각 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL의 농도로 70% ethanol로 희석하였다. 0.2 mM의 DPPH 용액 500 µL에 서로 다른 농도의 sample과 나머지는 70% ethanol을 사용하여 1000 µL로 보정한 후 이 sample 용액을 첨가하여 vortex를 이용해 잘 섞은 후, 실온에서 10분간 반응시킨 후에 517 nm에서 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하는 것을 2회 반복하여 실험을 실시하였다. Radical 소거 활성은 RC₅₀(Reduction Concentration)으로 표시하며, RC₅₀은 DPPH의 농도가 50%감소하는데 필요한 sample의 농도(µg/mL)를 나타냄. 항산화 활성은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = [A - (B - C)] / A \times 100$$

A: Control의 흡광도 [DPPH, EtOH]

B: DPPH +Sample의 흡광도

C: Blank의 흡광도

3-3. Elastase 활성저해 측정실험.

피부조직의 탄력성을 유지 하는데 가교결합을 관여하는 elastin을 가수 분해하는 효소인 elastase의 활성 측정을 통하여 피부 탄력 및 피부 주름 예방 효과를 평가하였다.

활성측정을 위해 먼저 효소 1 mg 0.2 M Tris-HCl Buffer(pH 8.0)을 가하여 효소 용액을 제조한다. 기질용액은 Succ-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide를 증류수에

녹여 4 mM stock solution을 제조하여 준비한다.

들깨풀 추출물의 elastase 억제정도를 알아보기 위하여 메탄올 추출물 및 분획층, 분리물에 대하여 증류수로 녹이고, 만약 잘 녹지 않으면 소량의 DMSO를 가하여 충분히 녹인 후에 사용한다.

0.2 M Tris-HCl buffer 870 μ L에 4 mM Succ-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide 10 μ L, 효소 10 μ L을 넣고 sample을 첨가한 것과 그렇지 않은 부분 두 조건을 410 nm에서 그 흡광도를 측정하여 기질로부터 나오는 p-nitroanilide의 양을 정량한다. elastase 활성 1 unit은 분당 1 μ mol의 p-nitroanilide을 생성하는 elastase의 효소의 양으로 하였다. 저해활성은 다음의 식으로부터 계산하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = [1 - (A - B)] / (C - D) \times 100$$

A : 기질, 효소, 시료를 넣고 반응 시킨 흡광도

B : 시료 자체만의 흡광도(Sample Blank)

C : 시료대신 완충용액을 넣고 반응시킨 흡광도(Control)

D : 시료대신 완충용액을 넣은 용액에서 효소를 빼고 반응시킨 흡광도(Control Blank)

3-4. Tyrosinase 활성 저해 측정실험.

0.30 mg/mL 기질 (L-tyrosine)과 1250 unit/mL로 맞춘 효소(tyrosinase)를 제조한다. 여기에 사용된 용매는 0.2 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)을 사용한다. Sample에 대한 용매도 0.2 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)을 사용한다. 완충용액에 완전히 녹지 않는 sample은 DMSO로 녹인 후 완충용액으로 희석하여 완전하게 용해시킨다. Tyrosinase 억제정도를 위한 실험은 앞서서 준비한 0.2 M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 927.5 μ L, 0.30 mg/mL L-tyrosin 500 μ L, sample 22.5 μ L, tyrosinase(1250 unit/mL) 50 μ L를 혼합하여 10분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후, 475 nm에서 흡광도를 측정한다. 이 때 control의 흡광도

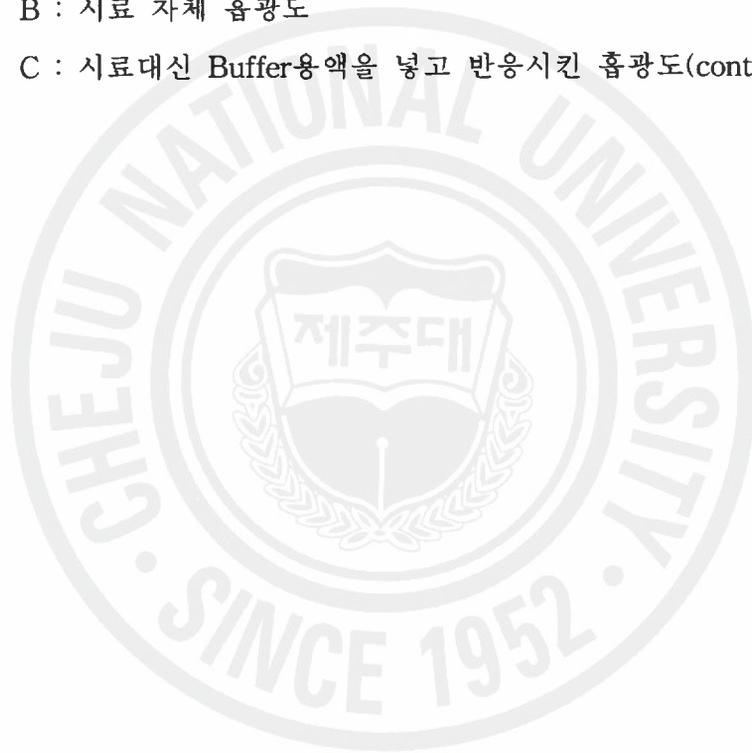
값을 0.3~0.4 범위가 되도록 맞춰주고 만약 이 값보다 낮으면 효소를 더 넣어주고, 높으면 효소의 양을 줄여 적정농도가 되도록 조절해준다. sample은 각각 자체적으로 고유의 색을 띄는 경우가 있기 때문에 sample 자체의 흡광도를 측정하기 위해 효소를 넣지 않고 그 sample 자체흡광도를 측정해준다.

$$\text{Inhibition(\%)} = 1 - (A - B) / C \times 100$$

A : 기질, 효소, 시료를 넣고 반응시킨 흡광도

B : 시료 자체 흡광도

C : 시료대신 Buffer용액을 넣고 반응시킨 흡광도(control)



III. 실험결과 및 고찰

1. DPPH free radical 소거 활성에 의한 항산화 활성 측정

DPPH free radical 법은 전자 공여능을 측정하는 방법으로 환원력이 클수록 강력한 항산화제가 된다는 것에 착안하여 DPPH의 환원정도를 기준으로 측정물질의 환원력과 항산화력을 측정하게 된다. DPPH는 질소를 중심으로 그 자체가 매우 안정한 라디칼 구조의 화합물로서, 시료에 의하여 환원되어 라디칼이 소거되면 특유의 보라색이 없어지면서 최대흡수파장인 517 nm에서 보이던 흡수파장이 사라지게 된다. 항산화 효과는 DPPH 용액만 존재할 때와 DPPH용액과 각 추출물 및 분획물이 들어 있는 반응용액의 흡광도 차이로 표현된다. 이 차이의 값이 커질수록 항산화 활성이 높다고 판단되어지며, 본 실험에서는 농도별로 DPPH radical 소거활성을 측정하여 RC_{50} 값으로 표현하였다. RC_{50} 값이 작을수록 활성이 좋음을 의미한다.

1-1. 제주산 식물의 80% 메탄올 추출물에 대한 라디칼 소거 활성

제주산 식물들의 80% 메탄올 추출물에 대한 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 이 실험은 환원력이 클수록 강력한 항산화제라는 것을 착안하여 DPPH의 환원정도를 기준으로 측정 물질의 환원력과 항산화력을 측정하여 inhibition 값 또는 RC_{50} 값으로 표현하게 된다. Inhibition 값은 %저해율로 이 값이 높을수록 저해정도가 큰 것을 나타내고 RC_{50} 값은 값이 작을수록 적은 농도에서 저해율이 큰 것을 의미한다. 그 결과 대조군으로 사용된 비타민 C (Ascorbic acid)의 inhibition 값이 92.66 % (RC_{50} 25.95)인 것과 비교했을 때 금란초(RC_{50} 24.82), 차풀(RC_{50} 38.11), 털산박하(RC_{50} 38.06), 들깨풀(RC_{50} 29.07) 등에서 대조군과 대등하거나 비교적 좋은 활성을 나타내는 것을 알 수가 있었다(Table 1).

여러 물질들이 함유되어있다고 판단되어지는 추출물인 점을 감안하였을 때 이

추출물들의 분획물 또한 좋은 활성을 지닌 물질이 포함되어있다고 판단되어진다.

Table 1. DPPH radical scavenging effect of plants in Jeju

No.	Sample	DPPH radical scavenging effect	
		Inhibition(%)	Rc ₅₀ (μ g/ μ L)
1	Ascorbic acid	92.66	25.95
2	<i>Ajuga decumbens</i> Thunberg	87.27	24.82
3	<i>Cassia mimosoides</i> var.nomame	93.06	38.11
4	<i>Cirsium japonicaum</i> DC. var <i>ussuriense</i> (Regel) Kitamura	89.21	49.65
5	<i>Leonurus sibiricus</i> Linne	42.13	48.15
6	<i>Lespedeza bicolor</i>	70.67	54.43
7	<i>Pyrrrosia lingua</i> (Thunb.) Farw.	76.24	42.52
8	<i>Mosla Punctulata</i> Nakai	92.11	29.07
9	<i>Lamium amplexicaule</i> Linne	24.37	>100
10	<i>Chrysanthemum boreale</i>	35.04	>100
11	<i>Solanum nigrum</i> Linne	23.85	>100
12	<i>Ligustrum obtusifolium</i> Sieb. et Zucc.	49.16	46.42
13	<i>Arisaema ringens</i> (Thunb.) Schott	22.33	>100
14	<i>Isodon inflexus</i> (Thunb.) Kudo	74.63	54.36
15	<i>Persicaria filiformis</i> Nakai	82.35	48.07
16	<i>Isodon inflexus</i> var. <i>canescens</i> (Nakai) Kudo	82.67	38.06

1-2 제주산 들깨풀의 분획분에 대한 라디칼 소거활성

80% MeOH추출물의 실험결과에서 좋은 활성효과를 보이는 제주산 식물 시료

중에 들깨풀의 분획물에 대한 라디칼 소거 활성을 확인해 보았다. 그 결과 각 분획층의 농도별 활성 측정된 결과(Figure 5)와 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 Inhibition값과 각 농도에서 측정된 값을 이용하여 RC_{50} 값을 구해 비교한 결과를 나타낸 표 (Table 2)를 통하여 확인 한 결과, hexane 층을 제외한 CH_2Cl_2 층, EtOAc층, BuOH층에서 좋은 활성을 나타내었으며, 그 중에 EtOAc분획이 가장 활성이 좋았으며, 대조군인 ascorbic acid보다 조금 더 나은 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

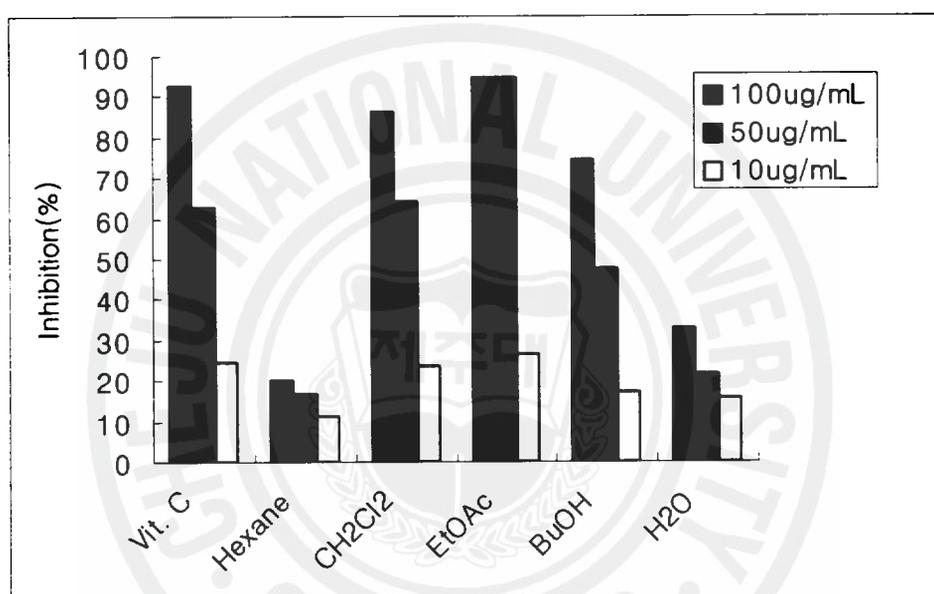


Figure 5. DPPH radical scavenging effect of several extracts

Table 2. RC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) of several extracts

Sample	DPPH radical scavenging effect	
	Inhibition (100 $\mu\text{g/mL}$, %)	RC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ascorbic acid	92.662	25.95
Hexane	20.142	> 100

Methylene Chloride	86.032	27.30
Ethyl Acetate	94.686	15.51
Butanol	74.393	43.07
H ₂ O	32.844	> 100

1-3 분리된 물질에 대한 라디칼 소거 활성

제주산 들깨풀로부터 분리된 luteolin의 항산화 활성 효과를 비교하기 위하여 DPPH radical 소거 정도를 비교하기 위해 대조군의 Vit. C과 비교를 하였다. Vit. C와 비교 시 활성억제 정도가 뛰어남을 확인 할 수 있었다(Figure 6).

대조군으로 사용된 Vit. C의 RC₅₀ 값이 25.94 µg/mL 인데 반해 luteolin의 RC₅₀ 값은 3.18 µg/mL으로 대조군보다 7배정도 좋은 라디칼 소거를 할 수 있다는 결과를 얻을 수 있었다.

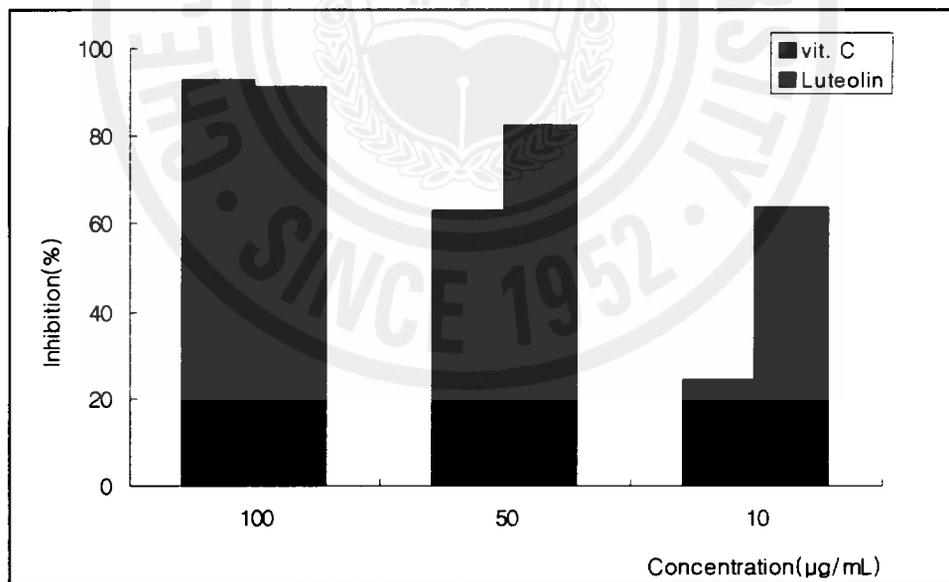


Figure 6. DPPH radical scavenging effect of luteolin

2. Elastase 활성억제 측정

2-1 80% MeOH 추출물 및 분획물의 elastase 활성억제 실험

DPPH의 활성이 좋았던 들깨풀에 대해 elastase 활성을 억제하는 실험을 하였다. 대조군인 oleanolic acid 과 비교 하였을 때 추출물을 비롯한 대부분의 분획층에서 그다지 좋은 활성을 보이지 않음을 알 수 있었으나, CH₂Cl₂ 층에서는 다른 분획층에서 보여준 결과보다 월등한 억제 효과를 나타냄을 알 수 있었다 (Figure 7).

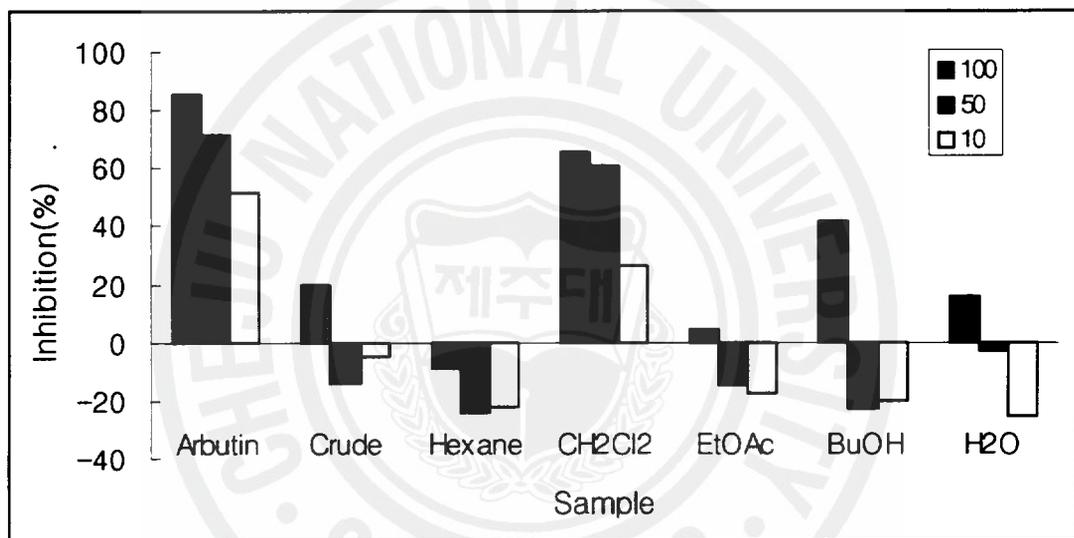


Figure 7. Inhibition of elastase activities by several extracts

2-2 분리물에 대한 elastase 활성억제 실험

제주산 들깨풀의 EtOAc층에서부터 분리된 luteolin에 대하여 elastase 활성 억제 실험을 실시한 결과 100 µg/mL 농도에서는 대조군보다 좋은 활성을 보이고 있지만, 50 µg/mL 농도 이하에서는 활성 억제정도가 낮음을 보여 농도 의존적으로 억제 효과를 보이고 있음을 알 수 있었다(Fig 8). IC₅₀ 값을 산출한 결과 대조군인 oleanolic acid는 9.27 µg/mL의 좋은 결과를 보여주었으나 luteolin의 IC₅₀

값은 36.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 대조군보다 좋은 결과라 할 수는 없지만 충분히 억제 정도는 있다고 판단되어진다.

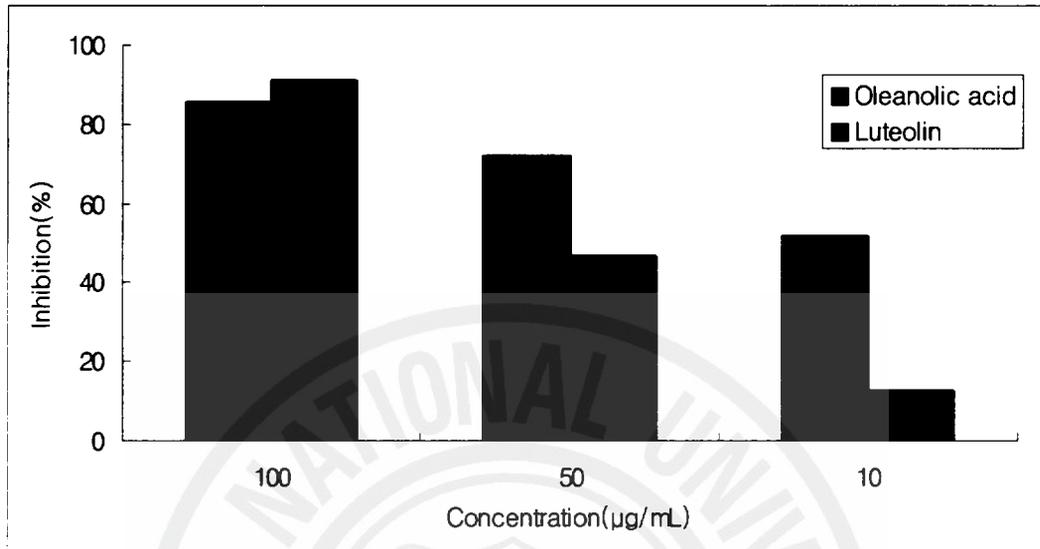


Figure 8. Inhibition of elastase activity by luteolin

3. Tyrosinase 활성억제 실험

3-1 80% MeOH 추출물 및 분획물의 tyrosinase 활성억제 실험

앞서서 DPPH radical scavenging effect가 좋았던 들깨풀에 대하여 추출물과 그 용매 분획물을 대상으로 tyrosinase 활성 억제 실험을 하였다. 각각 300 μ g/mL, 100 μ g/mL, 50 μ g/mL에서 활성을 본 결과 대조군인 arbutin은 좋은 활성을 보이고 있지만 추출물 및 다른 분획물에서는 그다지 좋은 활성 결과를 기대할 수가 없었다(Figure. 9).

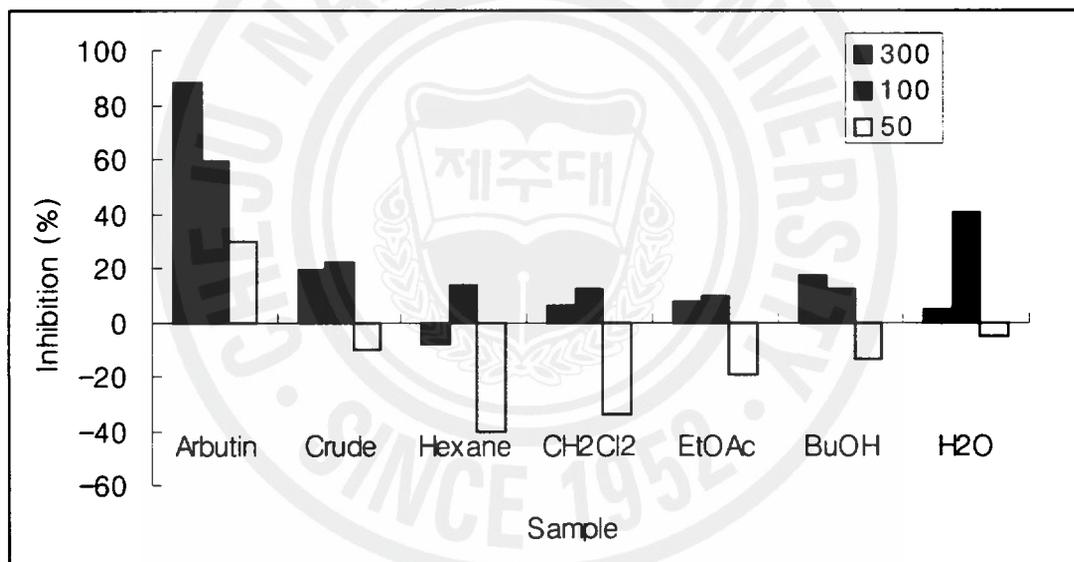


Figure 9. Inhibition of tyrosinase activity by several extracts

3-2 분리물에 대한 tyrosinase 활성억제 실험.

제주산 들깨풀에서 분리된 luteolin에 대하여 tyrosinase 활성 억제 정도를 대조군인 arbutin과 비교를 하였다.

추출물과 용매 분획물에서는 결과가 좋지 않던 반면 luteolin의 활성결과는 좋은 활성을 보여주고 있었으나, 대조군인 arbutin 보다는 억제정도가 떨어짐을 알 수 있었다(Figure 10).

이때 각각의 IC₅₀값은 86.38 µg/mL과 309.3 µg/mL 로 arbutin도 50% 저해할 때 과량이 필요하다고 보았을 때, luteolin의 경우는 3배정도 많은 양이 필요하다고 볼 수 있다.

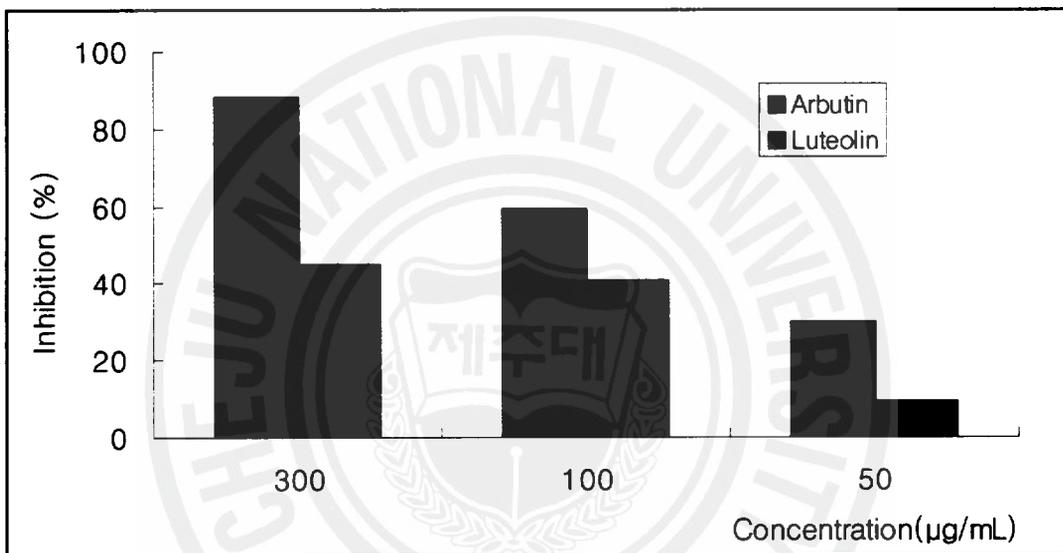


Figure 10. Inhibition of tyrosinase activity by luteolin

4. 제주산 들깨풀의 성분분리 및 구조 확인

4-1. Compound 1의 분리 및 구조 확인

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 확인한 결과 7.43 ppm ~ 6.18 ppm에서 나타나는 signal을 통해 방향족 고리의 수소의 존재가 예상되었고, 6.85 ppm과 7.41 ppm에서 나타나는 두개의 signal의 coupling constant 값이 8.0 Hz인 것을 보아 ortho-coupling이 존재하는 것으로 예상되었다. 7.43 ppm과 7.41 ppm에서 나타나는 두개의 signal과 6.18 ppm과 6.43 ppm의 두 signal에서 각각 coupling constant 값이 1.5 Hz, 2.0 Hz 인 것을 보아 방향족 고리의 두 수소 간에 meta-coupling을 하고 있음을 알 수 있었다. 6.67 ppm peak은 방향족 고리의 coupling을 하지 않는 수소임을 알 수 있었다(Figure. 11).

$^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼을 통하여 탄소수가 15개임을 확인 할 수가 있었고, δ 183.8에서 나타나는 signal로 보아 carbonyl group이 존재함을 예상할 수 있었다. 그리고 94 ppm ~ 166 ppm대에서 나타나는 signal을 통해 sp^2 혼성구조를 갖는 방향족 고리의 탄소가 존재함을 예상할 수 있었다(Figure 12).

이상의 조건을 통하여 COSY(Figure 13), HMBC(Figure 14), HMQC(Figure 15, 16)의 데이터를 통해 수소-수소간, 수소-탄소간, 수소-탄소의 long range coupling 등을 관찰하여 아래의 Table 3에 정리를 하였고, 문헌과 비교해본 결과 compound 1은 luteolin으로 확인 되었으며, 이 화합물은 들깨풀에서 처음으로 분리되었다(figure 17).

Luteolin은 차풀(*Cassia mimosoides* var. nomame)의 전초⁵⁾ 와, 쑥의 에탄올 추출물⁶⁾ 등에서도 분리되어 보고 된 바가 있다.

Luteolin의 활성에 관한 연구로는 lipxygenase에 의해 콩 속에 있는 불포화 지방산이 산화되는데 lipxygenase의 활성을 억제시키는데 quercetin과 kaempferol과 같은 다른 플라보노이드 보다 적은 농도에서의 억제제로서 기능이 있으며⁷⁾, 만성 알레르기성 염증 치료효과를 갖는 Interleukin-5(IL-5)의 억제제로서 apigenin, cosmosin과 비슷한 효과를 보이며 다른 플라보노이드보다 월등한 억제 효과가 있다고⁸⁾ 보고 된 바 있다.

Table 3. NMR data of luteolin

POSITION	NMR DATA		
	δ_H (multi, J/Hz)	δ_C	HMBC
2		166.3	
3	6.51 (1H, s)	103.8	C-5, C-10, C-2', C-5', C-6'
4		183.8	
5		163.2	
6	6.19 (s, H-6)	100.1	C-5, C-7, C-8, C-10
7		166.0	
8	6.42 (s, H-8)	94.9	C-4, C-6, C-7, C-9, C-10
9		159.4	
10		105.3	
1'		123.7	
2'	7.37 (d, $J = 6.56\text{Hz}$)	114.1	C-1', C-3', C-4', C-6'
3'		147.0	
4'		150.9	
5'	6.89 (d, $J = 8.52\text{Hz}$)	116.7	C-1', C-3', C-4'
6'	7.35 (d, $J = 6.56\text{Hz}$)	120.3	C-1', C-2', C-4', C-5'

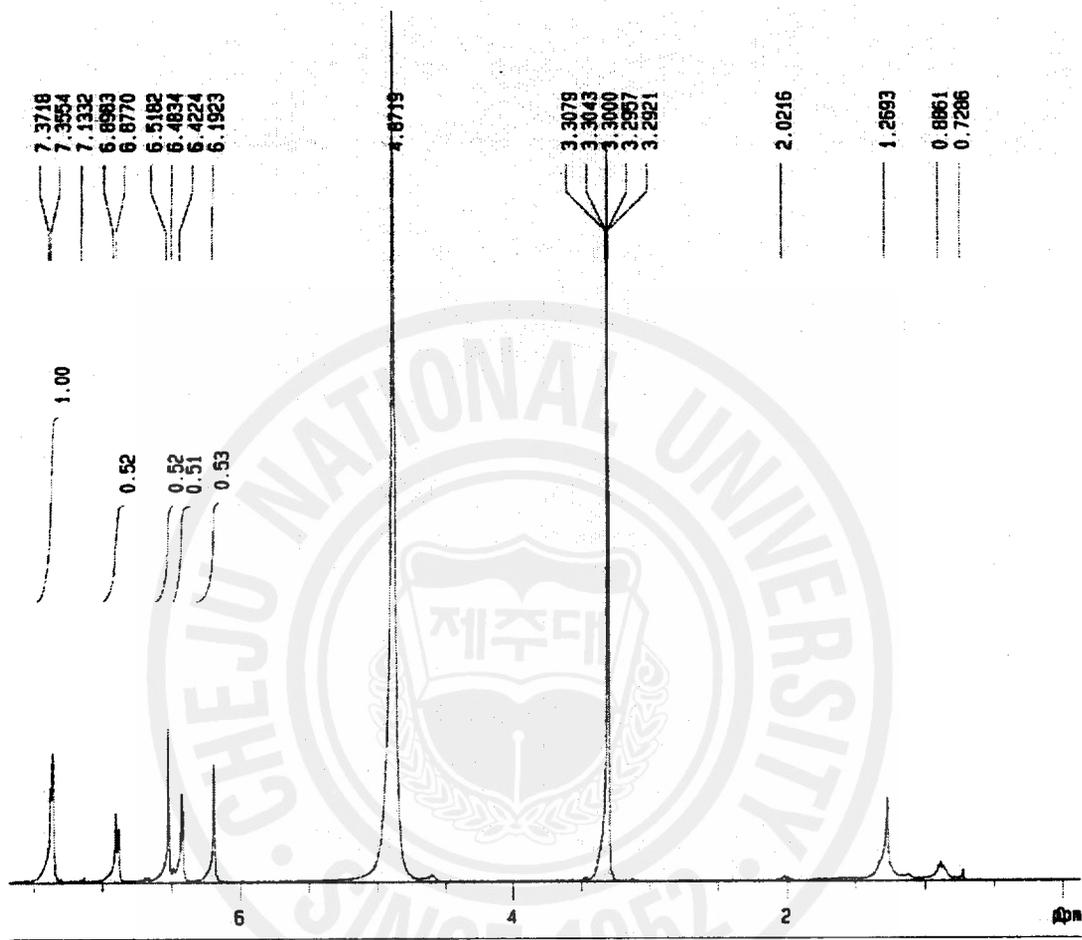


Figure 11. $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) of compound 1 in CD_3OD

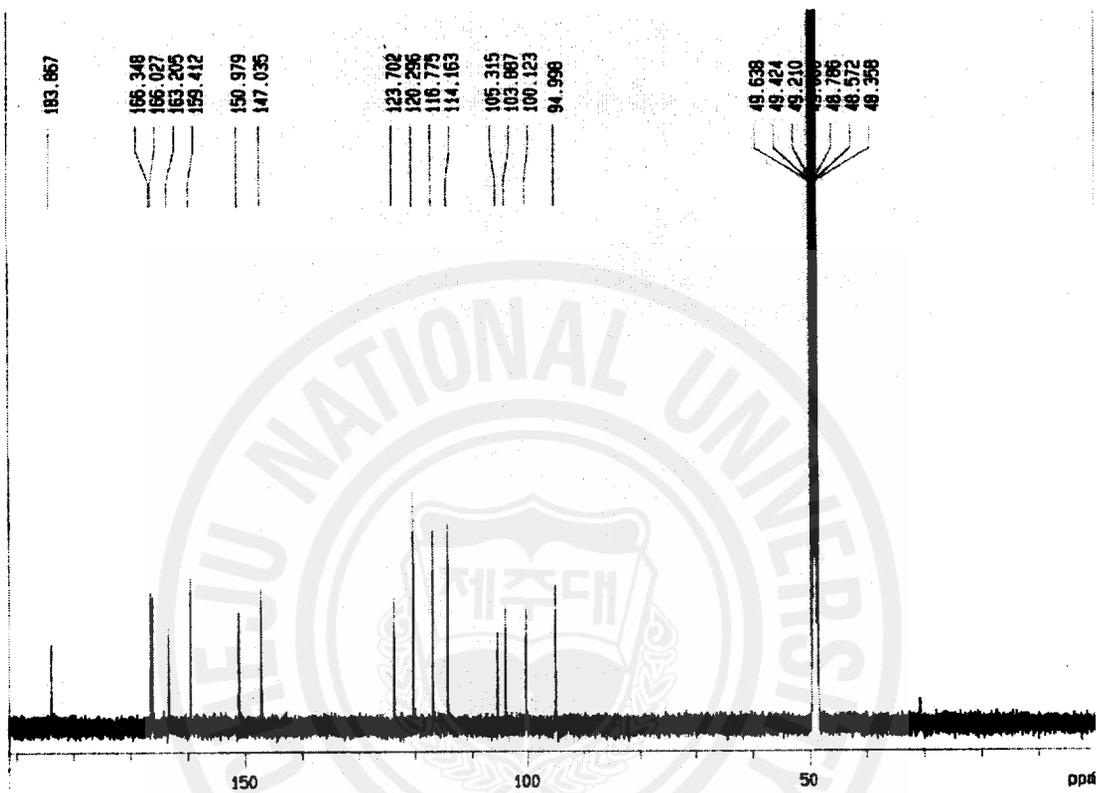


Figure 12. ^{13}C -NMR(100MHz) of compound 1 in CD_3OD

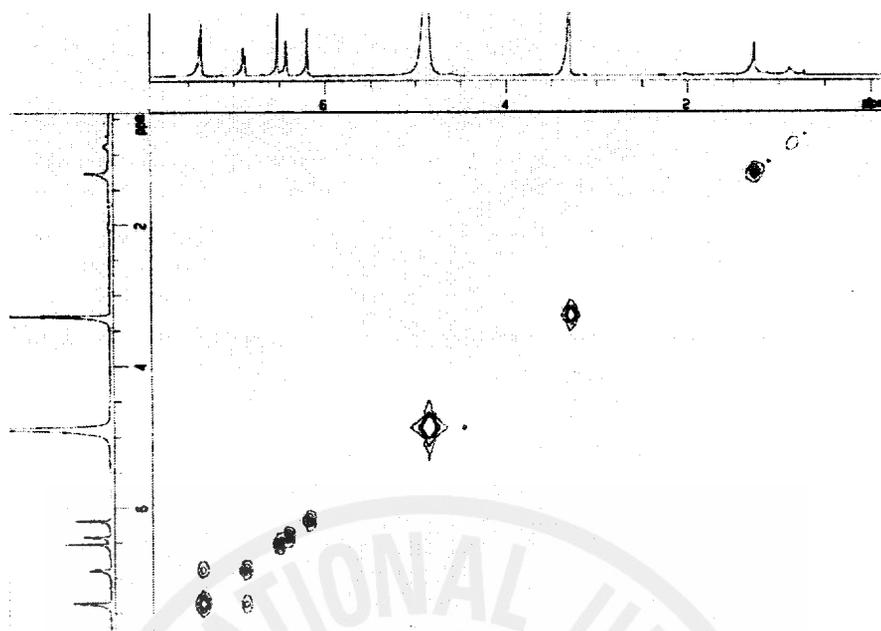


Figure 13. COSY of compound 1 in CD₃OD

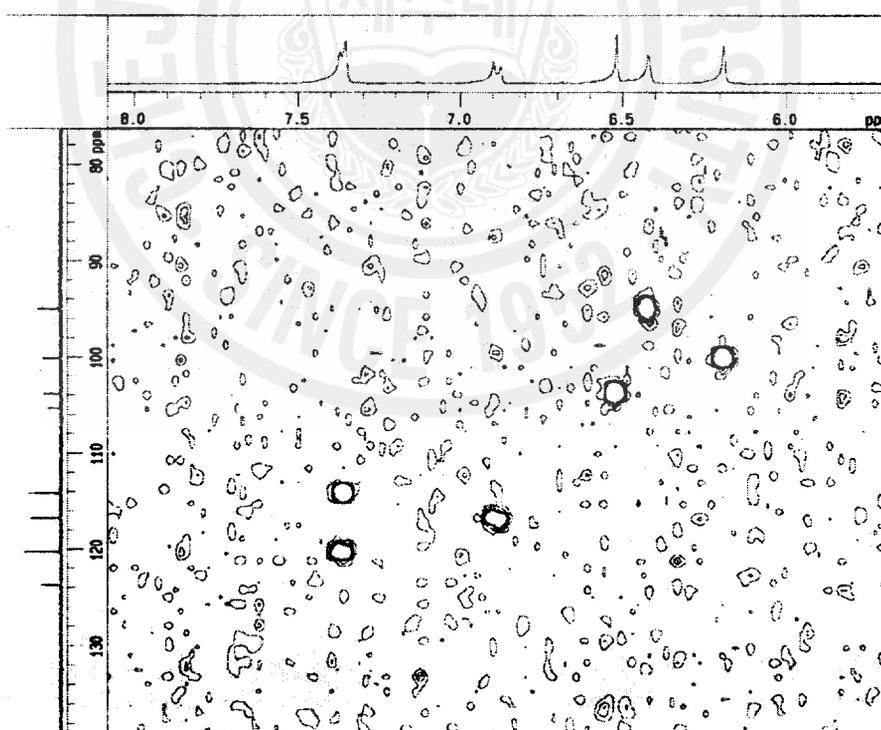


Figure 14. HMQC of compound 1 in CD₃OD

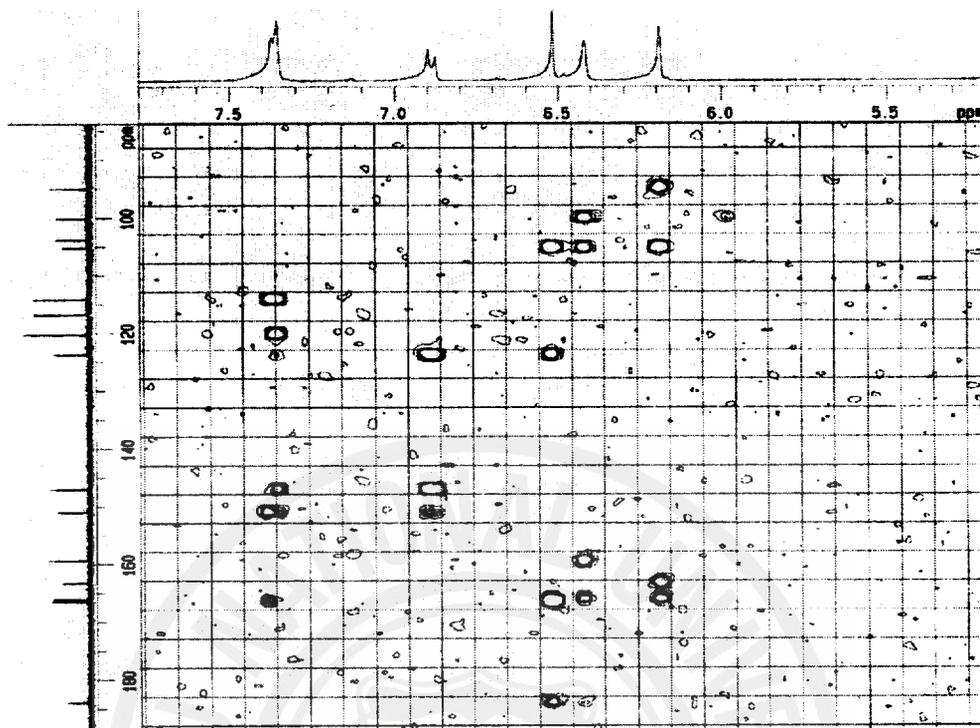


Figure 15. HMBC of compound 1 in CD_3OD

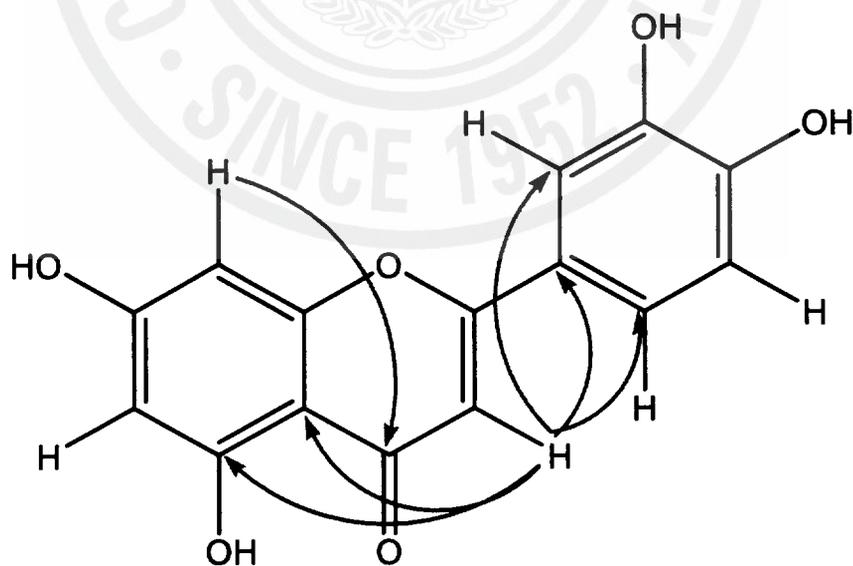


Figure 16. Key HMBC of compound 1

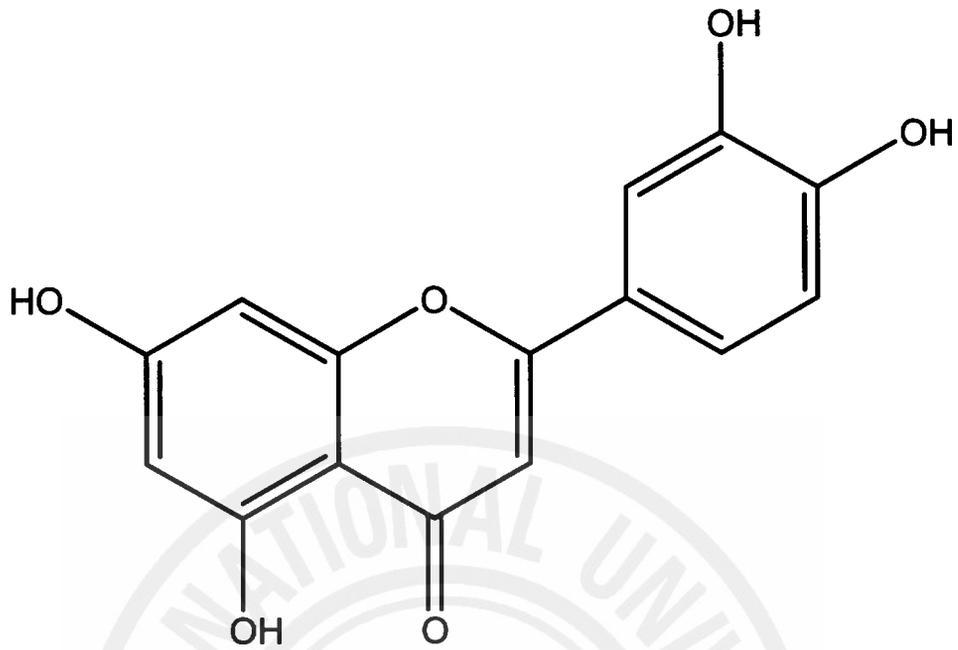


Figure 17. Chemical structure of luteolin

IV. 요약 및 결론

본 연구는 제주산 자생식물인 들깨풀(*Mosla punctulata* Nakai)로부터 생리활성 성분을 분리·동정하고 생리활성검색을 통해 유효성분의 유·무를 알아보았다.

제주산 식물 15종을 80% 메탄올로 추출한 추출물에 대하여 DPPH radical 소거 활성 효과를 측정하였다. 그 결과, 비타민 C(Ascorbic acid)의 RC_{50} 값이 25.95 μ g/mL인 것과 비교했을 때 금란초(RC_{50} 24.82 μ g/mL), 차풀(RC_{50} 38.11 μ g/mL), 털산박하(RC_{50} 38.06 μ g/mL), 들깨풀(RC_{50} 29.07 μ g/mL) 등의 좋은 활성이 있음을 확인 할 수 있었다.

이 중 활성이 좋았던 들깨풀 전초를 음건 세절하고 80% MeOH로 추출한 후, 추출물을 용매의 극성을 증가 시키는 계통분획법에 의해 n-Hexane, CH_2Cl_2 , EtOAc, n-BuOH 및 H_2O 분획물을 얻었다. 이 중 DPPH radical 소거활성이 좋았던 EtOAc 분획에 대하여 VLC, sephadex LH-20 column chromatography를 실시하고 HPLC를 이용하여 정제한 결과 1종의 플라보노이드 화합물을 순수하게 분리 하였다. 이 화합물의 화학구조는 1H -NMR, ^{13}C -NMR, COSY, 및 HMBC, HMQC의 분광기기를 통하여 compound를 확인 할 수 있었고 문헌비교를 통해 luteolin으로 확인하였다.

들깨풀의 생리활성을 알아보려고 DPPH radical 소거활성 실험, elastase 활성억제 실험, tyrosinase 활성억제실험을 추출물 및 분획물, 분리물에 대하여 각각 실시하였다.

들깨풀의 분획물과 luteolin에 대하여 DPPH radical 소거활성실험 결과 대조군인 Vit. C와 비교 시 CH_2Cl_2 층과 EtOAc층에서 좋은 활성결과를 얻을 수 있었고 EtOAc층에서 분리된 luteolin은 RC_{50} 값이 3.18 μ g/mL로 대조군보다 높은 DPPH radical 소거활성을 보였다.

Elastase 활성 억제 실험에서도 마찬가지로의 sample로 실험을 진행하였다. 대조군인 oleanolic acid와 비교 시 CH_2Cl_2 층에서만 좋은 활성을 보였을 뿐 대조군과는 현저하게 낮은 차이가 있음을 알 수 있었고, luteolin은 IC_{50} 값 비교 시 36.70 μ g/mL의 활성효과가 관찰되었다.

Tyrosinase 활성 억제 실험에서는 분획물들에 대한 활성정도는 매우 낮았고, 분리물인 luteolin의 경우 300 µg/mL의 농도에서 대조군인 arbutin이 88%인데 반해, 44%정도의 억제정도를 확인 할 수 있었다.

이상 생리활성검색결과 luteolin은 DPPH 활성에서 대조군보다 우수한 결과가 있음을 확인하여 새로운 항산화제제로의 이용 가능성이 있다고 보여 진다. 항산화 효과도 뛰어난데다가 다른 활성실험결과에서도 나쁘지 않은 결과를 보임으로써 피부 미백 및 주름개선제제로의 기능성 화장품신소재로 이용 가치가 있을 것으로 사료된다.

들깨풀에서 분리된 luteolin 이외에도 활성결과가 좋았던 CH₂Cl₂층 및 EtOAc층에는 여러 활성성분들이 있을 것으로 예상되어져 분리 검색 및 동정 실험이 진행되어야 할 것으로 사료된다.



V. 참고문헌

- 1) O. Wiedow., J. M. Schroder., and E. Christophers., 1990, Elafin :An elastase specific inhibition of humna skin. *J. Biol. Chem.*, 265(25) : 14791-14801.
- 2) Fridovich, I., 1986, Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys*, 247 : 1-11.
- 3) 서형주, 김영순, 이성동, 정수현, 1997, 수원 5호 메밀의 유리라디칼소거 및 Xanthine oxide 활성저해, *한국식품영약과학회지*, 26 : 411-417.
- 4) 지옥화, 양차범, 1996, 방아 추출물의 항산화 효과, *한국식품과학회지*, 28 : 1157-1163.
- 5) 김경범, 2007, 차풀(*Cassia mimosoides* var.nomame)로 부터 Luteolin의 분리, 동정 및 활성분석, 제주대학교 석사학위논문.
- 6) 이상준, 정하열, 이인경, 유익동, 1999, 쑥의 에탄올 추출물에 함유된 Flavonoid들의 분리 및 동정과 이들의 항산화효과, *Korean J. FOOD SCI. TECHNOL*, vol 31, NO.3, 815-822.
- 7) Sang-Won Choi, Hyo-Jin Kim, 1998, Lipoxygenase Inhibition and Antioxidative Activity of Flavonoids from the Perilla Seed cake, *연구논문집* vol. 58 NO. 2, 229-236.
- 8) Keun-Yeong Park, Seung-Ho Lee, Bo-Kyung Min, Kyong Soon Lee,

Jea-Sue Choi, See-Ryun Chung, Kyung-Rak Min and Young-Soo Kim, 1999, Inhibitory effect of Luteolin-4'-O-Glucoside from kummerowia striatasnd other Flavonoids on Interleukin-5 Bio activity, Planta Med., 65, 457-459.

