

碩士學位論文

# 제주산 들깨풀의 활성물질 검색



濟州大學校 大學院

化學科

梁 元 赫

2005年 12月

# 제주산 들깨풀의 활성물질 검색

指導教授 鄭 憲 商

梁 元 赫

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2005年 12月



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

梁元赫의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ 印

委 員 \_\_\_\_\_ 印

委 員 \_\_\_\_\_ 印

濟州大學校 大學院

2005年 12月

DPPH Radical Scavenging and Component Analysis  
from *Mosla punctulata*

Weong Hyuk Yang

(Supervised by professor Duk-Sang Jung)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE  
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF  
NATURAL SCIENCE

2005. 12.

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

List of Tables .....	ii
List of Figures .....	iii
ABSTRACT .....	iv
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
1. 재료 .....	4
2. 시약 및 기기 .....	4
3. 실험방법 .....	5
3-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리 .....	5
3-2. 유효성분의 확인 .....	6
3-3. 라디칼 소거 활성 측정 .....	8
III. 결과 및 고찰 .....	11
1. 라디칼 소거 활성 .....	11
1-1. 제주산 식물의 80% 메탄올 추출물에 대한 라디칼 소거 활성 .....	11
1-2. 제주산 들깨풀의 분획물들에 대한 라디칼 소거 활성 .....	13
1-3. 분리된 물질들에 대한 라디칼 소거 활성 .....	14
2. 제주산 들깨풀 성분에 대한 분리 .....	15
2-1. MPN-A의 분리 및 구조 확인 .....	15
2-2. MPN-B의 분리 및 구조 확인 .....	18
2-3. MPN-C의 분리 및 구조 확인 .....	21
2-4. MPN-D의 분리 및 구조 확인 .....	24
IV. 결 론 .....	26
V. 참 고 문 헌 .....	27

## List of Tables

Table 1. GC/MSD conditions .....	7
Table 2. LC/MS conditions .....	8
Table 3. DPPH radical scavenging effects of several extracts of natural products from Jeju .....	12
Table 4. DPPH radical scavenging effects of several extracts of <i>Mosla punctulata</i> from Jeju .....	13
Table 5. Comparison of the NMR data of MPN-A and MPN-B .....	20
Table 6. NMR data of MPN-C .....	21



## List of Figures

Figure 1. Isolation procedure of <i>Mosla punctulata</i> from Jeju .....	9
Figure 2. Isolation procedure of Hexane layer of <i>Mosla punctulata</i> from Jeju .....	9
Figure 3. Isolation procedure of EtOAc layer of <i>Mosla punctulata</i> from Jeju .....	10
Figure 4. Inhibition of several extracts of <i>Mosla punctulata</i> from Jeju .....	13
Figure 5. DPPH radical scavenging effects of MPN-A, B, C and D of <i>Mosla punctulata</i> from Jeju .....	14
Figure 6. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of MPN-A .....	16
Figure 7. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of MPN-A .....	16
Figure 8. DEPT of MPN-A .....	17
Figure 9. H-H COSY of MPN-A .....	17
Figure 10. Structure of MPN-A (Methyl-hexadecanate) .....	17
Figure 11. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of MPN-B .....	19
Figure 12. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of MPN-B .....	19
Figure 13. Structure of MPN-B (9, 12-octadecadienoic acid, linoleic acid) .....	20
Figure 14. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of MPN-C .....	22
Figure 15. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of MPN-C .....	22
Figure 16. DEPT of MPN-C .....	23
Figure 17. HMQC of MPN-C .....	23
Figure 18. Structure of MPN-C .....	23
Figure 19. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of MPN-D .....	25
Figure 20. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of MPN-D .....	25

## ABSTRACT

Mosla punctulata has been widely used in a traditional oriental medicine to treat hookworm, Endtermin, eczema, urticaria and so on. By applying in vitro scavenging assay, I examined the antioxidant effect of the leaves of Mosla punctulata.

To search for the active components, the extract was suspended in water and subjected to successive partitioning with n-Hexane, Ethyl acetate, and n-Butanol.

The n-Hexane fractions and EtAoc fractions were purified from the silica gel column chromatography, sephadex LH-20, prep-HPLC.

And the compounds were elucidated by the spectrophotometric methods as  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ .



## I. 서 론

최근 천연자원이나 약용식물로부터 생리활성 성분의 약리 기전이 밝혀지면서 천연물의 생리활성 물질들이 성인병의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 증명되기도 하고(박, 2002), 항산화 작용과 항암성을 가지는 약용식물의 성분들은 이미 제품화 되어 있기도 하다.(Lee et al, 1993).

노화란 생명의 발전이 신체 신진대사의 힘으로 생존하는 것에서 쇠퇴를 좇고 점점 사망을 향하여 나아가는 것 혹은 성숙기 이후부터 생기는 신체변화로 기능생태학적 변화의 생물학적 과정으로 인식된다(이 등, 1997). 학설로는 소모설 (wear and tear theory)과 유전자설 (genome-based theory)이 있으며 free radical설은 소모설에 속한다(이 등, 2001;김,2002).

Free radical설은 생체노화에 관한 많은 이론들 중에서 가장 주목을 받고 있는 학설이며 Harman이 최초로 발표한 생체내 분자상 효소가 산화효소의 촉매작용에 의해 free radical이 생성되어 노화가 진행된다는 이론이다(Harman, 1956).

활성산소(active oxygen)는 체내에서 산소가 사용되면서 다양하게 생성된다. 대표적으로  $O^2$ ,  $OH^-$ ,  $H_2O_2$  가 있다(Fridovich, 1986). 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. 활성산소가 약 2% 정도까지 생성되면 체내에서 항산화 체계를 통해 활성산소를 억제하거나 불활성 시킬 수 있지만, 독성이 강한 활성 산소의 생성이 조절되지 않아 3%이상으로 생성되는 경우 유전자, 지질, 단백질에 영향을 미쳐 류마티스성 관절염, 허혈 증상, 호흡기 질환 등을 일으킬 수도 있다. 특히 신체의 모든 세포막 및 미토콘드리아 막은 이중 결합이 있는 불포화 지방산이 풍부하여 탄소 사이에 이중결합이 쉽게 활성산소에 의해 파괴될 수 있다. 이러한 반응을 통해 과산화 radical이 한번 형성되면 연쇄적으로 산화를 유도하고 동맥경화증을 일으키며 혈액의 흐름을 방해하여 심각한 문제를 일으키게 된다. 따라서 인체에 free radical이 생성되면 발암, 염증, 동맥경화, 간 질환, 성인병 및 노화촉진 등과 같은 여러 가지 독작용이 유발된다(위, 1989; 서 등. 1997).



활성산소의 대사과정은 즉, 산소에 한 개의 전자가 첨가되어 superoxide anion radical이 생성된다. 이 radical은 superoxide dismutase에 의해 hydrogen peroxide가 되어 glutathione peroxidase나 catalase에 의해서 H<sub>2</sub>O나 O<sub>2</sub> 로 변환 인체에 해가되지 않는다. 또한 생성된 hydrogen peroxide는 Cu, Fe의 fenton reaction에 의해 hydroxyl radical ( $\cdot$ OH)로 전이된다. 이 hydroxyl radical은 지질, 단백질, 유전형질 및 염색체에 영향을 미쳐서 지질대사이상, 심혈관계질환으로 암, 노화, 돌연변이 등 각종성인병 질환을 유발한다. 또한  $\beta$ -carotene에 의해 제거되어지거나 비타민 C, E, Bio 플라보노이드에 의해 억제 제거되기도 한다.

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 있다(서 등, 1997; Halliwell, 1991; Lavelle et al., 1973). 최근에는 한 bilirubin이나 뇌와 골격근에 많이 존재하는 carnosine에도 강력한 항산화 작용이 있음이 발견되고 있다(Liu et al., 2003; Hipkiss et al., 2001).

항산화 효과를 측정하는 방법에는 POV(peroxide value), AV(adic value), COV(carbonyl value), IV(iodine value)를 구하는 방법과 DPPH의 환원성을 이용하여 구하는 방법 등이 있다(Bindoli et al., 1977).

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. DPPH-radical법은 일종의 전자공여능을 측정하는 방법으로 DPPH의 환원정도를 기준으로 측정물질의 환원력과 항산화력을 가늠하게 된다(강, 2000). 즉, DPPH는 질소를 중심으로 안정한 라디칼 구조를 하고 있는데, 515~517 nm에서 최대 흡수를 나타내다가 환원이 되어 radical을 소실하게 되면 측정 파장대에서 흡수가 없어지게 되므로 대조구의 흡광도 값과 비교하여 백분율로 나타내어 시료의 환원력 크기, 라디칼 제거활성, 항산화 활성으로 표시하게 된다. 그러므로 추출물내의 측정 파장대에서 강하게 흡광하는 물질이 있다면 추출물이 DPPH radical을 제거하게 되고 DPPH 특유의 흡수가 없어지게 되더라도 높은 흡광값을 나타내어 항산화력이 없는 것으로 된다.

DPPH radical 소거작용실험을 통하여 활성산소의 인체 내 독성작용을 저지하는 활

성물질 분리는 항산화제가 될 가능성이 있다. 항산화제는 각종 유리 radical 또는 유지의 peroxy radical에 수소난 전자의 공여체로 작용하여 비 radical 소거제(radical scavenger)가 대표적이며 그 외의 기능상 금속제거제, 과산화물 분해제와 상충제 등으로 나눌 수 있다(박 등, 1991). 지난 수십 년 간 널리 사용되어오던 BHA(butylated hydroxy toluene), BHT(butylated anisole)등의 합성 항산화제들은 항산력은 뛰어나나 그들의 안정성에 관한 우려로 미국, 일본 등 선진 각국에서는 그 사용량이 법적으로 규제되어 천연 항산화제로 대체하는 추세에 있다(지 등, 1996). 따라서 최근에는 비타민 C, E와 같은 천연 항산화제의 사용이 급격히 증가하는 추세에 있으며 이러한 증가 추세는 앞으로도 지속될 전망이다. 이외에 천연 항산화제에 재료는 호마(胡麻)의 종자유, 유칼리나무의 잎, 생약류 해조류 등 그 종류가 매우 다양하며 sesamol, resemmary, sage, ginger, clove, thyme, mace, cinnamon등의 향신료와 혼연성분 중의 phenol 성분들, 대두 등에 함유된 isoflavone 성분들이 항산화 효과가 있다고 알려져 있으며 일본에서는 감초 추출물, rosemary 추출물 등이 천연 항산화제로서 개발, 시판되고 있다(강 등, 1998).

본 실험에서는 25종의 제주산 식물들의 DPPH radical 소거실험을 하여 그 중 DPPH 활성이 가장 좋았던 들깨풀을 가지고 실험을 하였다. 본 실험의 재료로 사용한 들깨풀은 꿀풀과(Lamiaceae)에 속하는 1년생 초로서 식물체에는 가는 털이 있으며 특이한 향기가 있다. 줄기(높이 60 cm안팎)는 곧추서고 윗부분에 털이 성글게 나있으며 자름 면이 네모지고 흔히 보라색을 띠며 가지를 많이 친다. 잎은 홀잎이고 마주나며 잎 꼭지가 있다. 잎 몸은 버들잎모양이거나 긴 타원모양(길이 2~4 cm, 너비 1~2.5 cm)이며 밑 부분이 썩기모양이고 윗부분이 뾰족하다. 변두리는 얇은 톱니모양이다. 잎 앞면은 흔히 풀빛이 도는 보라색이다. 꽃은 8~9월에 줄기와 가지 끝에서 긴 송이 꽃차례를 이루고 여러 송이 성글게 모여 피는데 연한보라색이며 짧은 꼭지가 있다. 꽃 싹은 버들잎모양이며 꽃꼭지보다 길다. 꽃받침은 종 모양의 두 입술 모양이다. 꽃 갓은 방사상칭에 가까운 종 비슷한 입술모양인데 윗입술과 아랫입술이 뚜렷하게 구별되지 않는다. 수꽃술은 2개이며 꽃의 뒤쪽에 붙어있다. 열매는 여윈 열매이며 둥그스름한데 겉면에 그물모양의 도드라기가 있고 꽃받침이 붙어있으며 10월경에 여문다.

본 실험에서는 제주산 들깨풀을 이용하여 항산화 물질에 효과를 나타내는 물질을 분리하여 구조분석 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

본 연구에 사용되는 들깨풀 및 제주산 식물은 제주도 북제주군 조천읍 선흘리에 자생하는 것을 채취하여 수세한 후, 통풍이 잘 되는 곳에서 음건한 후 세절하여 사용하였다.

### 2. 시약 및 기기

본 실험에서 시료의 추출에 사용된 용매들은 Merk Co., junsei Co., Hyman Co.사의 제품을 사용하였다. Normal-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 60(230-400mesh ASTM, Merck), Reverse-phase column chromatography에는 Silica gel 100(RP-18, 230-400 mesh ASTM, Merck)이 사용되었으며, 분리과정에서 사용된 TLC(Thin-Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 2.0 mm, Merck)를 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다. Visualizing agent로는 3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다. 분리과정에서는 prep-HPLC (Preparative Liquid Chromatograph, Delta Prep 4000)을 사용하였고, 구조분석에 이용되는 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400(FT NMR system, JEOL)을 이용하였다. NMR 측정시 용매로는 CD<sub>3</sub>OD과 D<sub>2</sub>O이 사용되었다.

분리된 화합물의 질량분석을 위해 LC-MS Spectrophotometer (Waters ZQ 4000) 와 GC-MSD Spectrophotometer(HP 5890 II/5972A)를 사용하였다.

항산화 활성 측정 시 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)은 Aldrich사(USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한, 활성 측정 시 사용한 자외선 분광광도계(UV-visible spectrophotometer)는 Hewlett Packard 8453을 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 80 % 메탄올 19L에 침적하여 119.3 g의 추출물을 얻었다. 이 80 % 메탄올 추출물 중 10 g을 증류수 1 L에 현탁하고 separate funnel에서 *n*-Hexane과 EtOAc, *n*-Butanol을 사용하여 순차적으로 용매분획하여 *n*-Hexane층, EtOAc층, *n*-Butanol층 및 H<sub>2</sub>O층을 얻었다. (Figure. 1)

##### 3-1-3. Normal-phase column chromatography에 의한 *n*-Hexane층 분리과정

용매분획하여 얻어진 각 분획층들 중에서 *n*-Hexane층(2.341 g)을 normal-phase column chromatography(2.5×25, Kieselgel 60)에서 Hexane/EtOAc(13/2)와 Hexane/EtOAc/Acetic acid(2/1/0.1) 전개용매로 전개시켜 MPN-A 및 MPN-B를 분리하였다. (Figure. 2)

##### 3-1-4. Normal-phase column chromatography에 의한 EtOAc층 분리과정

용매분획하여 얻어진 각 분획층들 중에서 EtOAc층(0.529 g)을 normal-phase column chromatography(6×20, Kieselgel 60)에서 전개용매 CHCl<sub>3</sub>/EtOAc/MeOH/ H<sub>2</sub>O

(2/10/5/1)로 전개 시켜 4개의 분획을 얻었다.

### 3-1-5. Sephadex column chromatography에 의한 분리과정

3-1-4에서 얻어진 4개의 분획들 중에서 분획3(120 mg)을 분리하기 위하여 glass column 에 sephadex LH-20을 충전 시킨다. 분획을 소량의 메탄올로 녹인 후 충전 된 column에 전개용매(MeOH/H<sub>2</sub>O = 1/1)를 사용하여 전개시키고 분취용액을 감압 농축 하여 4개의 분획을 얻었다.

### 3-1-6. MPN-C 및 MPN-D의 분리과정

3-1-5에서 얻어진 4개의 분획들 중에서 분획 3을 ODS column을 장착한 prep-HPLC 기기를 이용하여 이동상 0% MeOH을 30분에 걸쳐서 100%로 하는 기울기 용리법으로 MPN-C를 순수 분리하였다.

그리고 3-1-4에서 얻어진 4개의 분획들 중에서 분획4(43 mg)를 위의 prep-HPLC 기기를 이용해 이동상 Acetonitrile/H<sub>2</sub>O(3/97)으로 등용리법을 이용해 MPN-D를 순수 분리하였다. (Figure. 3)

## 3-2. 유효성분의 확인

유효성분의 구조분석은 JNM-LA 400(FT NMR system, JEOL)을 이용하였고, 분자량 확인을 위하여 GC/MSD 및 LC/MS를 이용하였으며 이들의 분석 조건은 다음과 같다.

### 3-2-1. GC/MSD 분석조건

분리된 시료 중 MPN-A와 MPN-B는 GC/MSD를 사용하여 분석하였으며, GC는 Hewlett Packard, Model HP 5890 series II 이고, MS는 quadrupole type으로 HP 5972

MSD이다. 또 시료 주입구의 온도 270 °C, 검출기 온도 312 °C이며, 이때 GC 컬럼은 HP-5(0.25  $\mu$ m $\times$ 30 m $\times$ 0.25 mm), 운반기체는 헬륨을 사용하였다. 이러한 GC/MSD의 상세한 분석조건을 Table 1에 수록하였다.

Instruments	Conditions
GC/MSD	Hewlett Packard 5890 series II/HP 5970 MSD
Column	HP-5 (0.25 $\mu$ m $\times$ 30 m $\times$ 0.25 mm)
Injection temp.	270 °C
Injection volumn	3 $\mu$ l
Oven temperature	38 °C $\rightarrow$ 5 °C/min $\rightarrow$ 300 °C (10min)
Carrier gas flow	0.9 ml/min(He)
Ionizatio voltage	Electron impact mode with electron energies of 70 eV
Monitoring mode	Selected ion monitoring(SIM) mode

Table 1. GC/MSD conditions

### 3-2-1. LC/MS 분석조건



분리된 시료 중 MPN-C의 분자량을 확인하기 위하여 LC/MS(Waters ZQ 4000) 사용하여 분석하였다. 운반기체는 N<sub>2</sub> gas를 사용하였고, Detector 분석 방식은 ESI mode (Electron spray ionization)를 이용하였다. 또한 분석시 cone voltage를 변화시켜 가면서(20 V~200 V) 분자량을 확인하였다. 이러한 LC/MS의 상세한 분석조건을 Table 2에 수록하였다.

Instruments	Conditions
LC/MS	Waters ZQ 4000
Column	X-terra column
Capillary(kV)	3.20
Cone(V)	20~200
Injection volumn	20 $\mu$ l
Source Temperature( $^{\circ}$ C)	150
Desolvation Temperature( $^{\circ}$ C)	200
Cone Gas Flow(L/Hr)	600
Desolvation Gas Flow(L/Hr)	50
Detector	ESI mode (Electron spray ionization)

Table 2. LC/MS conditions

### 3-3. 라디칼 소거 활성 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 의한 자유라디칼 소거활성은 Yoshida et al.'s (1989)등의 방법을 변형하여 실시하였다. 0.1 mM의 DPPH용액 0.9 ml에 시료용액 0.1 ml을 혼합한 후 vortex하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도의 감소를 측정하였다. 이 때 DPPH 라디칼 소거활성은 다음 식에 따라 계산하였으며, 라디칼 소거활성 정도가 50 % 감소할 때 시료의 농도를 나타내는  $RC_{50}$ 값으로 효과를 표시하였다.

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

A : absorbance of not adding samples

B : absorbance of adding samples

C : absorbance of samples

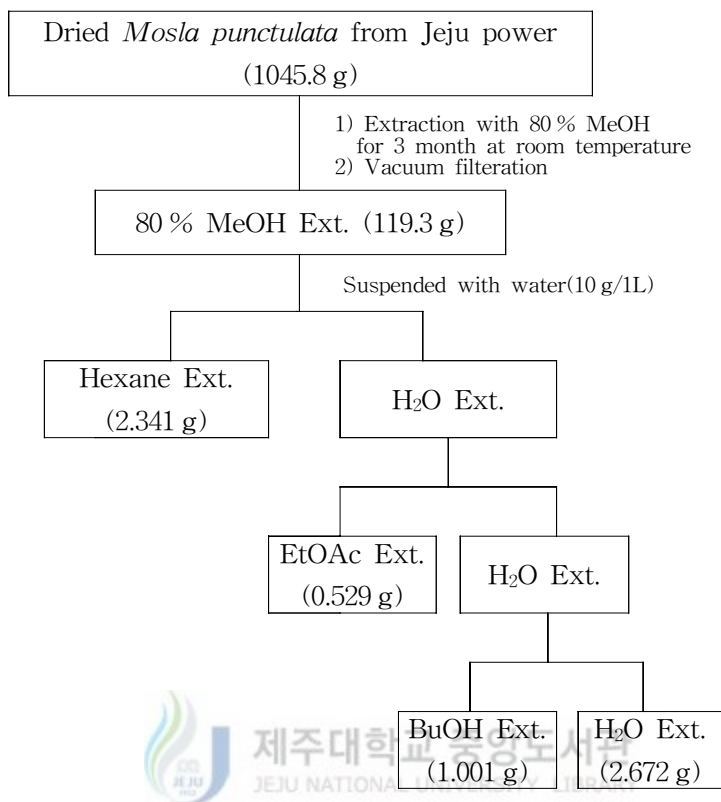


Figure. 1 Isolation procedure of *Mosla punctulata* from Jeju

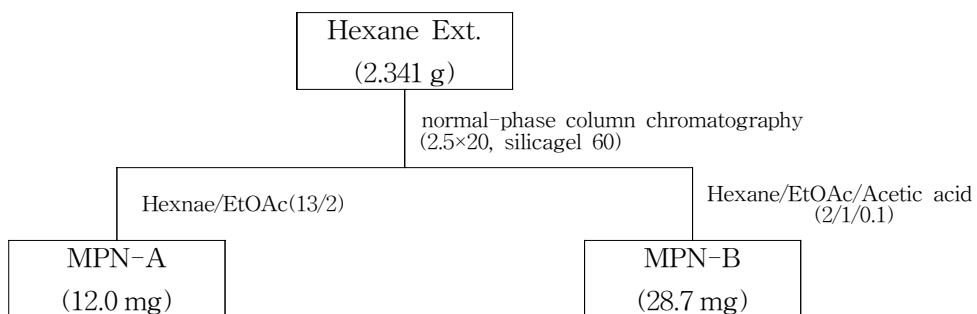


Figure. 2 Isolation procedure of Hexane layer of *Mosla punctulata* from Jeju



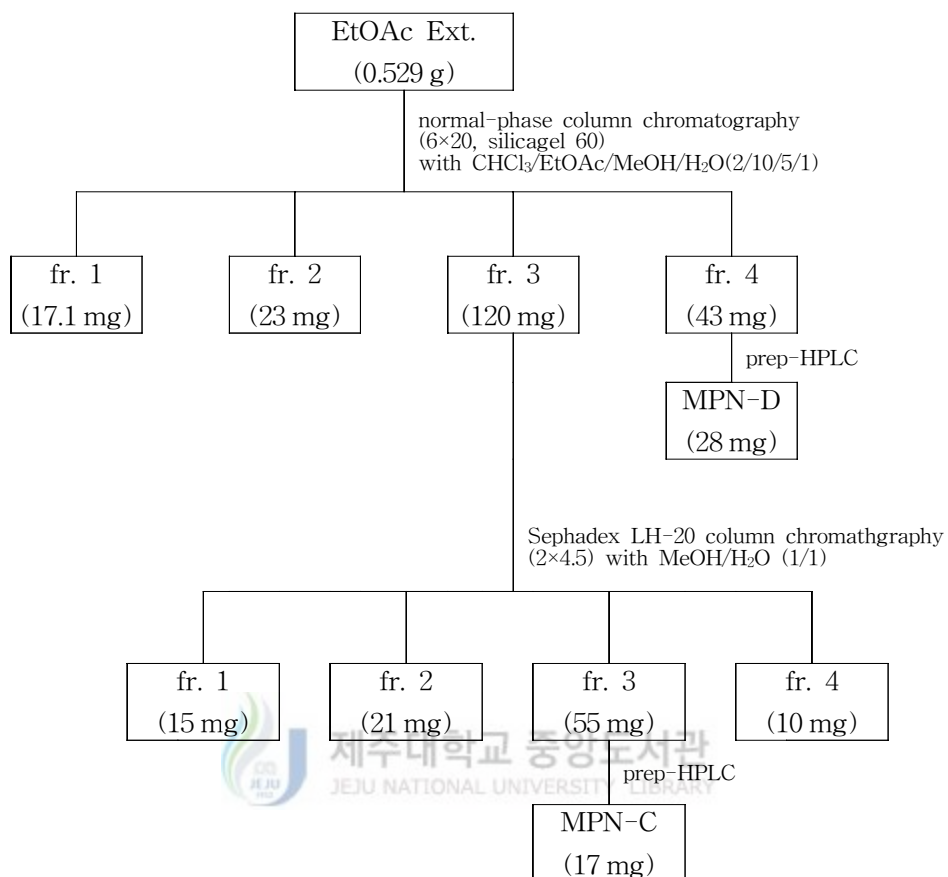
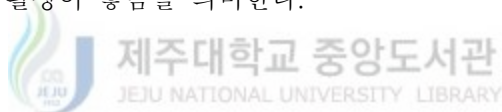


Figure. 3 Isolation procedure of EtOAc layer of *Mosla punctulata* from Jeju

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 라디칼 소거 활성

제주산 식물 및 들깨풀을 활성이 좋다고 알려져 있는 Ascorbic acid를 대조군으로 하여 DPPH radical 소거법에 의한 항산화 활성 실험을 실시하였다. 라디칼 소거 활성 능력 측정에 사용된 DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical 화합물로서, 시료에 의하여 라디칼이 제거되면 517 nm에서 흡수파장이 사라지게 되며, 항산화 효과는 DPPH 용액만 존재할 때와 DPPH 용액과 각 추출물 및 분획물이 들어 있는 반응용액의 흡광도 차이로 표현된다. 이 차이의 값이 클수록 항산화 활성이 높다고 판단되며, 이 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 활성 측정 하였다. 그 결과, 활성이 좋다고 알려진 비타민 C (Ascorbic acid)의  $RC_{50}$ 값이 3.74인 것과 비교하였을 때 들깨풀, 털산박하, 까실쭉부쟁이, 땡땡이덩굴, 금불초에서 각각 24.13, 35.56, 25.63, 38.11, 10.00, 22.82로 좋은 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다(Table 3). 이 값은 비타민 C의 값과 비교하면 비교적 높은 값이라고 할 수 있지만 비교한 물질들이 추출물임을 감안하였을 때는 활성이 좋다고 판단되어진다.

plants	DPPH radical scavenging effect	
	Inhibition (100 $\mu$ g/ml, %)	RC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)
Ascorbic acid	96.6	3.74
<i>Lamium amplexicaule</i>	43.25	>100
<i>Adonis amurensis</i>	44.54	>100
<i>Mosla punctulata</i>	91.75	24.13
<i>Isodon inflexus</i>	79.97	54.36
<i>Isodon inflexus</i> var. <i>canescens</i> Kudo.	85.67	38.06
fruit of <i>Ligustrum obtusifolium</i>	45.05	>100
<i>Aster ageratoides</i>	88.56	35.56
<i>Corydalis ochotensis</i>	32.85	>100
<i>Vicia angustifolia</i> var. <i>segetilis</i>	35.85	>100
<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	20.95	>100
<i>Gnaphalium affine</i>	81.08	25.63
<i>Hedera rhombea</i>	76.4	54.43
<i>Veratrum patulum</i>	33.4	>100
<i>Cirsium japonicum</i> var. <i>ussuriense</i>	89.21	49.65
<i>Cassia mimosoides</i> var. <i>nomame</i>	93.06	38.11
<i>Houttuynia cordata</i>	33.06	>100
<i>Hydrangea serrata</i> for. <i>acuminata</i>	40.37	>100
<i>Coculus trilobus</i>	92.47	10
<i>Geranium nepalense</i> subsp. <i>thunbergii</i>	84.92	50.69
<i>Leonurus sibiricus</i>	42.13	>100
<i>Corydalis incisa</i>	23.88	>100
<i>Inula britannica</i> var. <i>chinensis</i>	87.67	22.82
<i>Solidago virga-aurea</i> var. <i>asiatica</i>	81.57	51.58
<i>Persicaria hydropiper</i>	52.35	48.07
<i>Siegesbeckia pubescens</i>	61.02	79.09

Table 3. DPPH radical scavenging effects of several extracts of natural products from Jeju

## 1-2. 제주산 들깨풀의 분획물들에 대한 라디칼 소거 활성

앞에서 활성이 좋다고 알려진 제주산 식물중 들깨풀의 분획물들(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에 대한 라디칼 소거 활성을 확인해 보았다(Figure 4). 그 결과 EtOAc층 분획이 Ascorbic acid 과 비슷한 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다(Table 4).

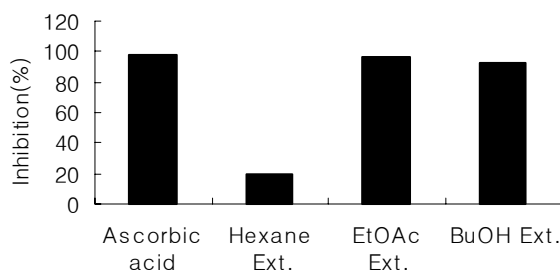


Figure 4. Inhibition of several extracts of *Mosla punctulata* from Jeju

Fraction	DPPH radical scavenging effect	
	Inhibition (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , %)	RC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
Ascorbic acid	97.74	2.32
Hexane	19.2	>100
EtOAc	97.09	4.52
BuOH	93.01	21.22

Table 4. DPPH radical scavenging effects of several extracts of *Mosla punctulata* from Jeju

### 1-3. 분리된 물질들에 대한 라디칼 소거 활성

제주산 들깨풀에서 분리한 4가지 물질들(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에 대한 라디칼 소거활성을 확인해 보았다. 그 결과 MPN-C에서 다른 세 개의 물질보다 좋은 활성이 나타남을 알 수 있었다. 그러나 전체적으로 활성은 앞의 EtOAc층 분획에 비해 매우 낮게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 5).

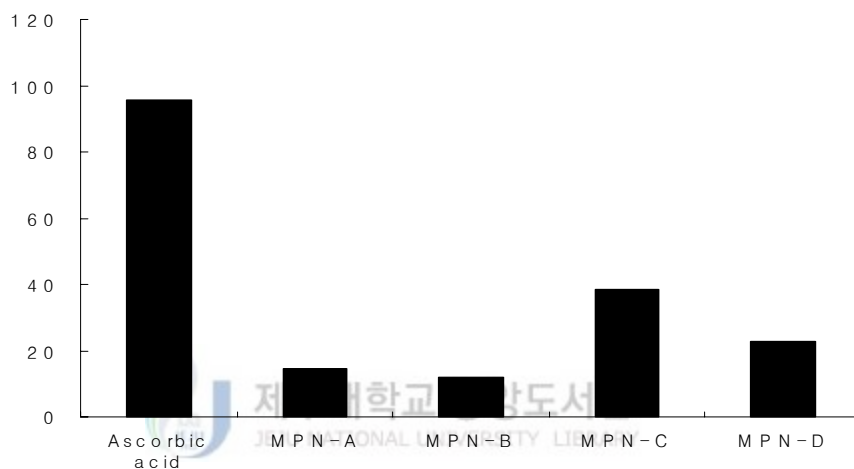


Figure 5. DPPH radical scavenging effects of MPN-A, B, C and D of *Mosla punctulata* from Jeju

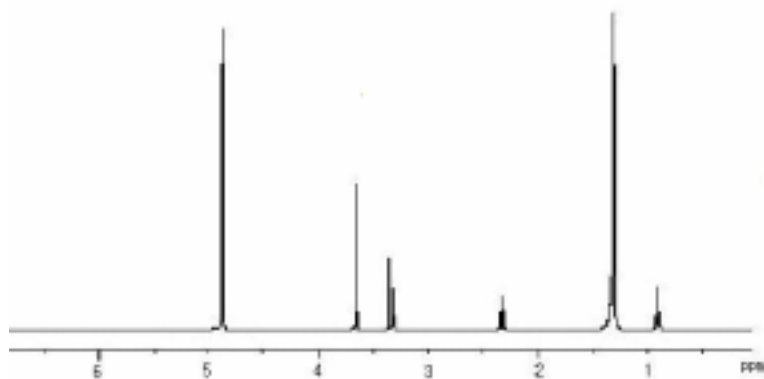
## 2. 제주산 들깨풀 성분 에 대한 분리

### 2-1. MPN-A의 분리 및 구조 확인

제주산 들깨풀(1045.8 g)을 80% 메탄올로 추출한 후 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol을 사용하여 순차적으로 각각 *n*-hexane층, EtOAc층, *n*-butanol층 그리고 water층으로 분리하였다. 이 용매 분획층 중 *n*-Hexane층을 가지고 normal-phase column chromatography (Hexane/EtOAc=13/2)로 분리한 결과 단일물질이라 여겨지는 물질을 분리하였고 이를 MPN-A라 하였다. 이 분획을 가지고 NMR 기기로 구조를 확인하였다. <sup>1</sup>H-NMR을 확인 한 결과 3.66 ppm(2H, s)에서 나타나는 signal로 보아 sp<sup>3</sup> 혼성구조에 전기음성도가 큰 O원자가 붙어 있는 형태라고 예상 할 수 있었다. 1.30 ppm(12H, m) 위치에서 나타나는 signal로 보아 고리형태 보다는 탄소 사슬이 연결되어 있는 지방족 형태일 것이라고 예측 할 수 있었다 (Figure 6).

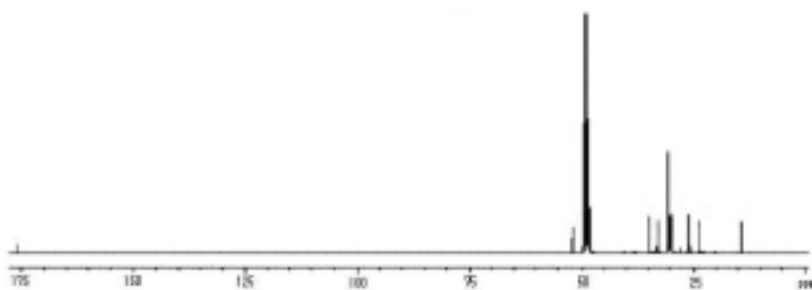
C<sup>13</sup> NMR 스펙트럼을 통해서도 탄소수가 17개임을 확인 할 수 있었고, 176.03 ppm의 위치로 보아서 유기산 형태인 RCOOH의 탄소가 존재함을 예측 할 수 있었다 (Figure 7). DEPT NMR 데이터를 분석하면 2개의 CH<sub>3</sub>와 14개의 CH<sub>2</sub>, 그리고 한 개의 4차탄소가 존재함을 확인 할 수 있었다(Figure 8).

이상과 같은 정보를 종합하여 볼 때 MPN-A는 유기산 형태를 가지며 지방족의 모양을 하고 있으며, 이중결합은 없는 것으로 예상 되어진다. H-H COSY를 통해 (Figure. 9) 분자의 결합을 예측해 보았고 이러한 구조를 가진 분자로 Methyl hexadecanate를 예상하였다(Figure 10). 또한, MPN-A의 분자량을 확인하기 위하여 GC/MSD를 이용하여 확인한 결과 분자량이 270임을 알 수 있었다.



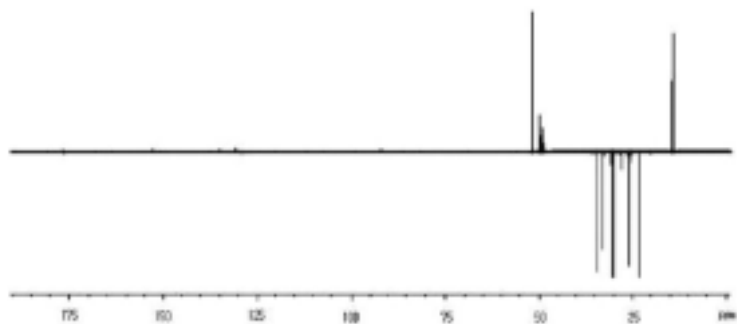
$^1\text{H-NMR}$  : 400 MHz in  $\text{CDCl}_3$

Figure 6.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of MPN-A

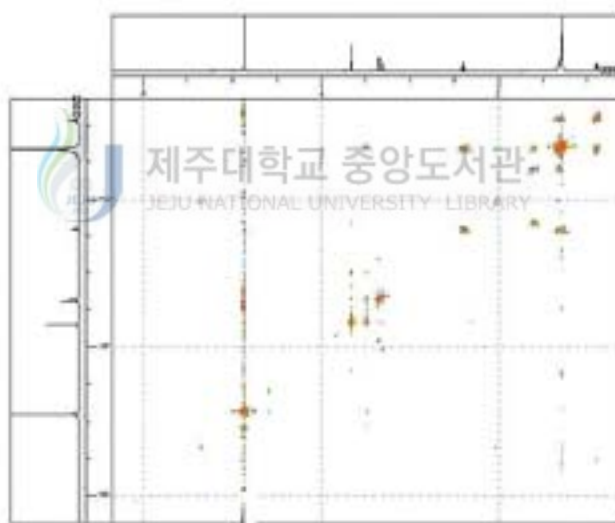


$^{13}\text{C-NMR}$  : 100 MHz in  $\text{CDCl}_3$

Figure 7.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of MPN-A



$^{13}\text{C}$ -NMR : 100 MHz in  $\text{CDCl}_3$ , 135DEPT  
Figure 8. DEPT of MPN-A



$^1\text{H}$ -NMR : 400 MHz in  $\text{CDCl}_3$   
Figure 9. H-H COSY of MPN-A

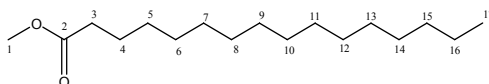


Figure 10. Structure of MPN-A (Methyl hexadecanoate)



## 2-2. MPN-B의 분리 및 구조 확인

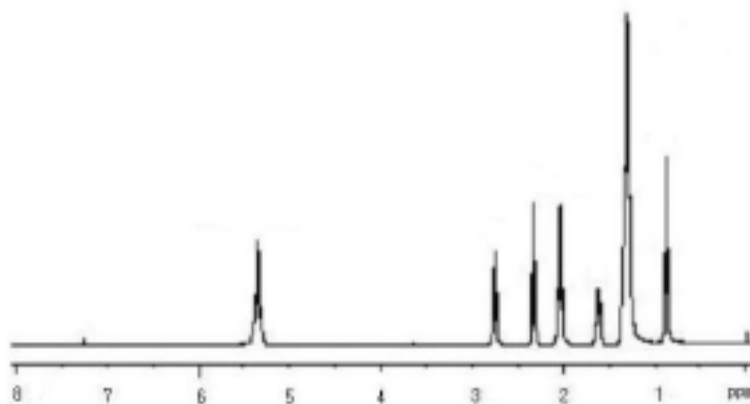
위에서 분리한 용매 분획층 중 다시 *n*-Hexane층을 가지고 normal-phase column chromatography (Hexane/EtOAc/Acetic acid=2/1/0.1)로 분리한 결과 단일물질이라 여겨지는 물질을 분리하였고 이를 MPN-B라 하였다. 이 분획을 가지고 NMR 기기로 구조를 확인하였다.

시료 MPN-B의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서는 5.38 ppm(2H, m, 9.76), 5.37 ppm(2H, m, 9.76), 5.36 ppm(2H, m, 9.76), 5.35 ppm(2H, m, 9.76)의 신호에서 vinyl proton의 존재를 알 수 있었다. 그리고 2.77 ppm(1H, t, 6.36, 5.96) 신호에서 두개의 이중결합 사이에 위치한 메틸렌기가 존재함을 알 수 있었으며, 1.34 ppm(7H, 25.4)의 큰 신호에서  $\text{CH}_2$ 기가 다수 존재함을 알 수 있었다(Figure 11).

시료 MNP-B의  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서는 130.92 ppm, 130.86 ppm, 129.1 ppm, 129.04 ppm에 존재하는 4개의 신호에서 이중결합이 2개 존재함을 알 수 있었다(Figure 12). 이 사실과  $^1\text{H-NMR}$  spectrum의 분석결과를 종합하여  $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$ 가 이 물질에 1개 존재하며 다른 형태의 이중결합은 존재하지 않음을 알 수 있었다. 또한 177.61 ppm의 위치로 보아서 유기산 형태인  $\text{RCOOH}$ 의 탄소가 존재함을 예측 할 수 있었다.

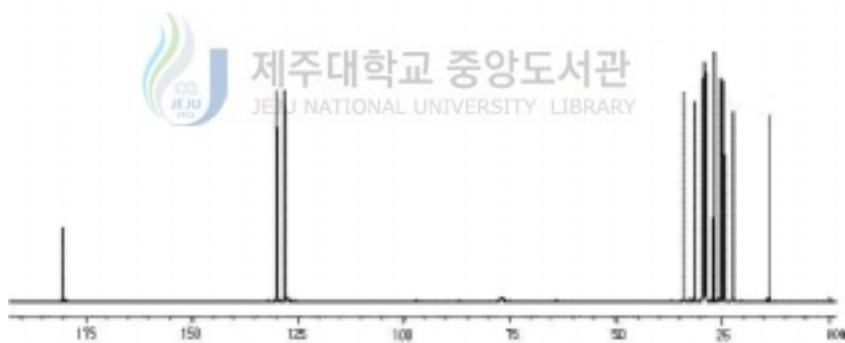
이상의 분석에서 MPN-B는 9,12-octadecadienoic acid (linoleic acid)로 예측을 할 수 있었다(Figure 13). 또한, MPN-B의 분자량을 확인하기 위하여 GC/MSD를 이용하여 확인한 결과 분자량이 270임을 알 수 있었다.

MPN-A와 MPN-B의 분석결과 구조가 비슷한 형태를 나타내어 두 물질의 NMR data를 비교하여 표로 나타내 보았다(Table 5).



<sup>1</sup>H-NMR : 400 MHz in CDCl<sub>3</sub>

Figure 11. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of MPN-B



<sup>13</sup>C-NMR : 100 MHz in CDCl<sub>3</sub>

Figure 12. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of MPN-B

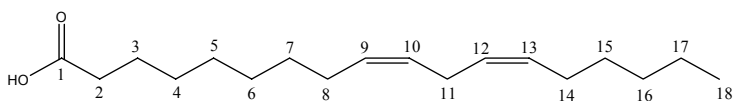


Figure 13. Structure of MPN-B (9, 12-octadecadienoic acid, linoleic acid)

POSITION	linoleic acid		POSITION	Hexadecanoic acid		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (multi, J/Hz)		$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	DEPT
1	177.61		1	176.03		
2	34.97	2.27(2H, m )	2	34.81	2.32(2H, t, 7.56)	CH <sub>2</sub>
3	26.09	1.34(2H, m)	3	26.03	1.30(2H, m)	CH <sub>2</sub>
4	28.16	1.34(2H, m)	4	30.89	1.30(2H, m)	CH <sub>2</sub>
5	28.17	1.34(2H, m)	5	30.76	1.30(2H, m)	CH <sub>2</sub>
6	26.56	1.34(2H, m)	6	30.68	1.30(2H, m)	CH <sub>2</sub>
7	30.07	1.34(2H, m)	7	30.57	1.30(2H, m)	CH <sub>2</sub>
8	32.67	2.04(2H, m)	8	30.47	1.30(2H, m)	CH <sub>2</sub>
9	130.86	5.37(1H, m)	9	30.37	1.30(2H, m)	CH <sub>2</sub>
10	129.1	5.36(1H, m)	10	30.24	1.30(2H, m)	CH <sub>2</sub>
11	30.48	2.77(2H, t, 6.36)	11	30.19	1.30(2H, m)	CH <sub>2</sub>
12	129.04	5.35(1H, m)	12	28.12	1.30(2H, m)	CH <sub>2</sub>
13	130.92	5.38(1H, m)	13	28.09	1.30(2H, m)	CH <sub>2</sub>
14	32.95	2.06(2H, m)	14	33.07	1.30(2H, m)	CH <sub>2</sub>
15	30.31	1.34(2H, m)	15	23.73	1.30(2H, m)	CH <sub>2</sub>
16	30.23	1.34(2H, m)	16	14.43	0.91(3H, t, 6.6)	CH <sub>3</sub>
17	23.63	1.34(2H, m)	17	51.95	3.66(3H, s)	CH <sub>3</sub>
18	14.47	0.89(3H, t, 6.6)				

Table 5. Comparison of the NMR data of MPN-A and MPN-B

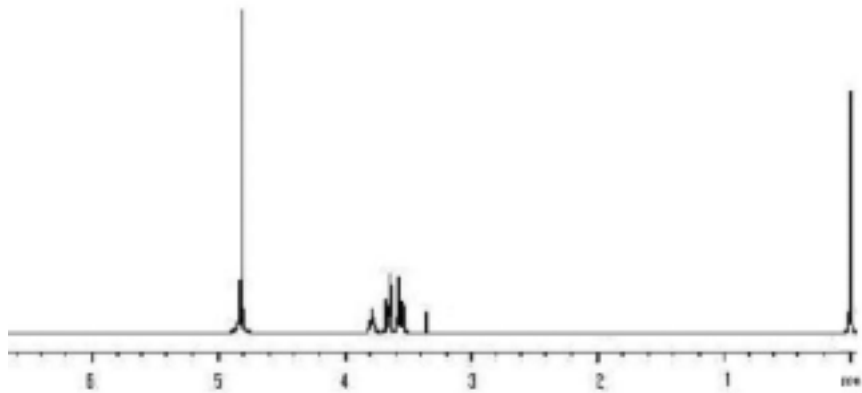
### 2-3. MPN-C의 분리 및 구조 확인

앞에서 분리한 용매분획층들 중에서 ethyl acetate층을 가지고 Sephadex LH-20 column chromatography (MeOH/H<sub>2</sub>O=1/1)로 분리한 결과 4개의 분획을 얻을 수 있었다. 이렇게 얻어진 분획들 중 세 번째 분획을 용매 3% CH<sub>3</sub>CN을 이동상으로 사용하여 역상 HPLC로 분리하였다. 이렇게 얻어진 분획을 NMR 기기로 확인하였다.

시료 MPN-C의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서는 3-4 ppm 근처에서 나타나는 것을 보아, 당의 형태를 취하고 있을 것이라 예상이 되어진다. 특히, 3.78 ppm(4H, m, 21.72) 위치는 전기음성도가 큰 원소가 결합되어 있는 CH<sub>2</sub>가 존재 할 것이라 예상이 되어진다 (Figure 14). 시료 MNP-C의 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 탄소의 개수는 4개라고 예상되어지고, 카본의 위치로 미루어 볼때 전기음성도가 큰 물질이 옆에 있을 것이라 예상할 수 있다 (figure 15). DEPT data를 통해 두 개의 CH<sub>2</sub>와 두개의 CH가 존재함을 알 수 있었다 (Figure 16). HMQC data를 통해 (Figure 17) C-H 결합의 위치를 확인하였고 tetrahydrofuran-3,4-diol 이라고 예측하였다 (Figure 18). 분자량 확인을 위해 LC/MS를 이용하였고, 분자량이 108임을 확인하였다. MPN-C의 NMR data를 표로 정리해 나타내었다 (Table 6).

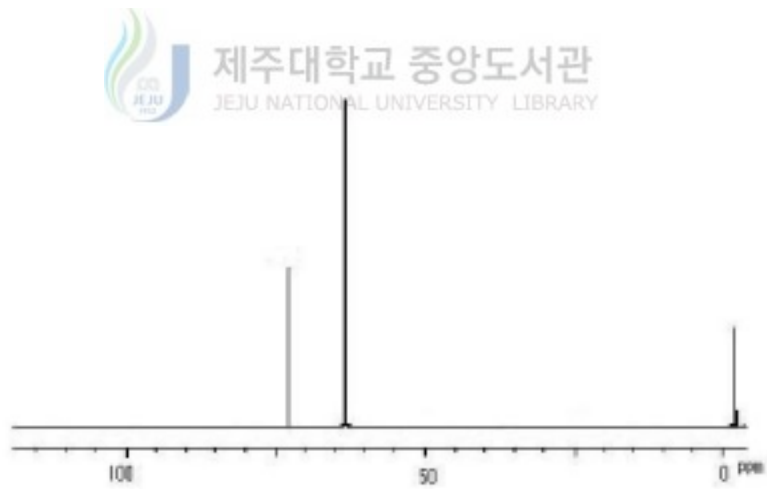
POSITION	Glycerol		
	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H(multi, J/Hz)	DEPT
1	72.863	3.78(1H, m)	CH
2	63.295	3.61(2H, m)	CH <sub>2</sub>

Table 6. NMR data of MPN-C



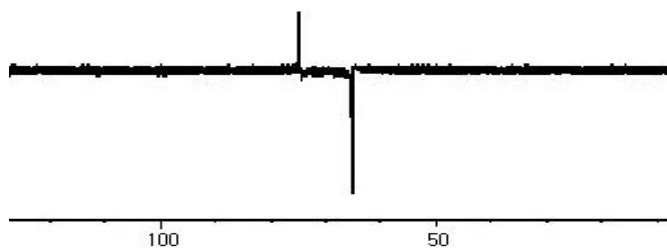
$^1\text{H-NMR}$  : 400 MHz in  $\text{D}_2\text{O}$

Figure 14.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of MPN-C



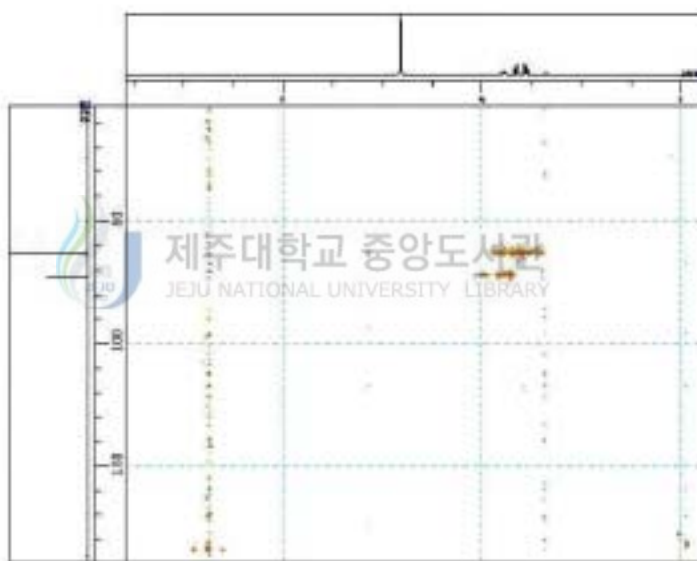
$^{13}\text{C-NMR}$  : 100 MHz in  $\text{D}_2\text{O}$

Figure 15.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of MPN-C



$^{13}\text{C}$ -NMR : 100 MHz in  $\text{D}_2\text{O}$ , 135DEPT

Figure 16. DEPT of MPN-C



$^1\text{H}$ -NMR : 400 MHz in  $\text{D}_2\text{O}$

Figure 17. HMQC of MPN-C

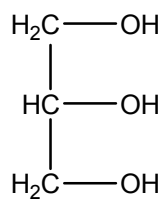


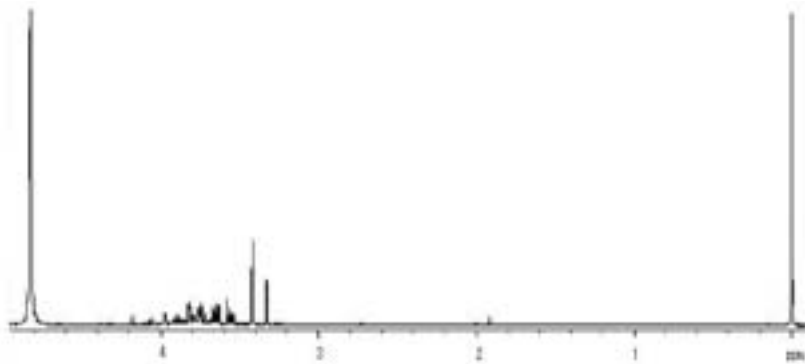
Figure 18. Structure of MPN-C

## 2-4. MPN-D의 분리 및 구조 확인

2-3에서 Sephadex LH-20 column chromatography (MeOH/H<sub>2</sub>O=1/1)로 분리하여 얻은 분획 중 네 번째 분획을 이동상 Acetonitrile/H<sub>2</sub>O(3/97)으로 등용리법을 이용해 HPLC로 분리하였다. 이렇게 얻어진 분획을 NMR 기기로 확인하였다.

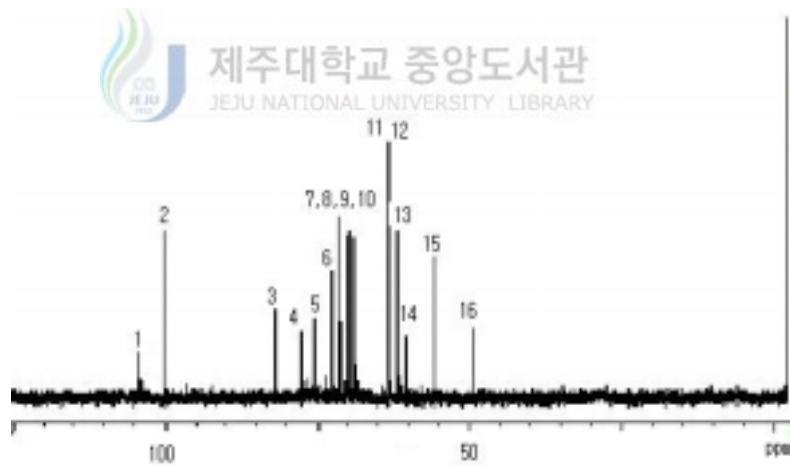
시료 MPN-D의 <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR spectrum data에서 보면 순수하게 분리 되었다고 보이고, 당이 연결되어 있는 구조라고 예측이 되어지나, 정확한 구조를 해석하는 데는 어려움이 있었다(Figure 19, 20).





$^1\text{H-NMR}$  : 400 MHz in  $\text{D}_2\text{O}$

Figure 19.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of MPN-D



$^{13}\text{C-NMR}$  : 100 MHz in  $\text{D}_2\text{O}$

Figure 20.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of MPN-D



## IV. 결 론

제주산 식물을 80% 메탄올로 추출한 추출물에 대해서 라디칼 소거활성 효과를 측정하였다. 그 결과, 들깨풀, 털산박하, 까실쑥부쟁이, 땃땃이덩굴, 금불초에서 좋은 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

그 중에서 활성이 좋은 들깨풀을 이용하여 실험을 하였으며, 들깨풀의 용매분획층 중 EtOAc층에서 비타민 C (Ascorbic acid)와 비슷한  $RC_{50}$ 값이 나타나는 것을 확인하였다.

들깨풀의 성분을 분석하기 위해서 Hexane 층과 활성이 좋은 EtOAc층을 분리한 결과 MNP-A, B, C, D를 얻을 수 있었다.

MNP-A는 Hexadecanoic acid로 NMR data 와 GC/MS data를 통해 확인 할 수 있었고, MNP-B의 NMR data를 문헌과 비교 분석한 결과 Linoleic acid임을 알 수 있었다. EtOAc층에서 분리한 MNP-C의 NMR data 분석결과 간단한 당의 구조임을 알 수 있었고, MNP-D는 NMR data를 통해 순수하게 분리되었다고 판단되어지고, 당이 두 개 결합한 형태일 것이라고 예측이 되어진다. 하지만 구조는 명확하게 알 수 없었다. 앞에서 분리한 MPN-A, B, C, D의 라디칼 소거활성을 확인 한 결과 80%메탄올 추출물과 용매분획한 EtOAc층에서 좋은 활성을 나타낸것과는 다르게 좋은 활성을 나타내지는 않았다.

앞으로 EtOAc층을 더 분리하여 라디칼 소거 활성물질을 분리 검색하고, 아직 분리를 하지 않은 BuOH층을 분리 검색 하는 작업이 진행되어야 할 것이다.

## V. 참고문헌

- 강정옥, 1998, 송엽의 항산화능에 관한 연구. 東義대학교 동의논집, 28 : 11-18.
- 강미정, 2000a, 민들레 추출물의 항산화성 및 자유라디칼 소거활성, 영남대학교 박사학위논문.
- 강순옥, 2000b, 초두구(*Alpinia katsumadai*)와 빈랑(*Areca catechu*) 추출물의 자유라디칼 소거 활성, 충북대학교 석사학위논문.
- 박영미, 2000, 천연물로부터 항산화 물질 screening에 관한 연구, 건국대학교 농축대학원 석사학위논문.
- 박종철, 2002, 기능성식품의 천연물과학, 도서출판 효일, 서울 : 13-16.
- 백동민, 2002, citrus flavonoids의 분리 및 free radical 제거능력에 관한 연구, 연세대학교 석사학위논문.
- 이승은, 2001, 참취의 항산화 특성과 그 활성 물질에 관한 연구, 부산대학교 박사학위논문.
- 장규관, 오현철, 고은경, 강기홍, 박성은, 오명훈, 김윤철, 2002, 자귀나무잎의 자유라디칼 소거물질, 생약학회지, 33 : 18-20.
- 지옥화, 양차범, 1996, 방아 추출물의 항산화 효과, 한국식품과학회지, 28 : 1157-1163.
- 한춘애, 1999, 천연물로부터 항산화 물질 탐색을 위한 추출 조건 확립, 건국대학교 농축대학원 석사학위논문.
- Bindoil, A., L. Cavallini and N. Silipran야, 1997, Inhibitory action of silymarin of lipid peroxide formation in rat mitochondria and microsomes, *Biochem Pharmacology*, 26 : 2405-2409.
- Fridovich, I., 1986, Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys*, 247 : 1-11.
- Harman, D., 1956, Aging - A theory based on free radical and radiation chemistry, *J Gerontology*, 11 : 298-300.
- Hipkiss, A.R., C. Brownson and M.J. Carrier, 2001, Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups, *Mechanisms of Ageing and Development*, 122 : 1431-1445.
- Lavelle, F., A.M. Midhelson and L. Dimitrijevic, 1973, Biological protection by superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 55 : 350.