

해너콩(*Candelia lineata*)으로부터 항산화 및 미백 기능성물질의 분리 동정

고동우, 부희정, 송수복, 김주희, 이선주

제주대학교 자연과학대학 화학과

요 약

본 연구는 제주도 해너콩의 메탄올 추출물에서 용매분획한 것들 중 에틸아세테이트 분획물을 선택하여 C18 column chromatography를 이용하여 분리하고 이어서 Prep-HPLC로 순수분리하여 단일물질을 얻어 그 중에서 항산화와 멜라닌 생성억제 능력이 있는 분획의 구조를 규명하였다. H-NMR, C13-NMR스펙트럼을 얻어 분석한 결과 methyl gallate임을 확인하였다. 이 물질은 비타민 C와 BHA보다 훨씬 항산화 효과가 있었으며, 미백의 상업용으로 사용되는 알부틴보다 더 나은 효과를 나타내었다. Methyl gallate는 알려진 물질이지만 해너콩에서는 처음 발견된 것으로 해너콩을 이용한 항산화제와 기능성 화장품 소재를 개발할 수 있는 계기를 마련한 연구라고 판단한다.

I. 서 론

항산화제에 대한 연구는 1969년 Mccord와 Fridovich가 superoxide radical을 소거하는 효소인 SOD를 발견한 것을 계기로 생체내의 활성산소의 발생, 생물독성 및 방어·소거기구 등에 관하여 관심을 갖게 되면서 본격적으로 진행되었다. 활성산소에는 O_2^- , $\cdot OH$ 과 같은 산소중심의 라디칼들, 즉, 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 지닌 산소원자나 분자 종류가 있다. 이들은 매우 불안정하여 이 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 잃거나 혹은 주위로부터 전자 하나를 얻어, 보다 안정된 상태

로 가려는 성질을 가지고 있다. 이 때 주위의 화합물로부터 쉽게 전자의 주고받음이 일어나기 때문에 이들은 높은 반응성을 나타낸다. 또한 reactive oxygen species(ROS)에는 1O_2 , H_2O_2 와 같은 비 라디칼종들이 있으며, 그리고 생체 성분과 이들 ROS와 반응에서 유리된 $ROO\cdot$, $RO\cdot$, $ROOH$ 및 $HOCl$ 등이 포함된다. 하지만 생체에는 계속해서 생기는 활성 산소종들을 제거하는 항산화효소(superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase)와 비효소적 항산화제(tocopherol, ascorbic acid, carotenoid, flavonoid, glutathione)들로 구성된 항산화 방어망을 통

해 활성 산소종의 생성과 제거 사이에서 세포 기능을 유지하고 있다. 활성 산소종은 정상적인 대사 과정에서도 생성되며, 질병상태나 산화적인 스트레스를 받을 때는 과잉으로 생성되는데 특히 피부는 항상 산소와 태양 자외선에 노출되기 때문에 활성 산소종을 만드는 광화학적 반응들이 계속해서 일어나고 있다.

수퍼옥사이드 라디칼 O_2^- , 하이드록시 라디칼($\cdot OH$), 과산화수소(H_2O_2), 싱글렛옥시젠(1O_2)등¹⁾과 같은 반응성이 매우 큰 활성산소는 세포구성성분들인 지질, 단백질, 당 및 DNA에 파괴 작용을 하고 뇌하수체, 부신, 난소, 정소 등 내분비계통의 호르몬의 영향에 의해서도 색소침착이 이루어지는 것으로 보고되고 있다.^{2,3)} 이러한 활성산소에 의해 야기되는 Free radical, 또는 과산화물 생성을 억제하기 위하여 합성 항산화제인 BHT, BHA등과 천연 항산화제인 α -tocopherol⁴⁾ ascorbic acid, polyphenol등이 사용되고 있다. 합성 항산화제는 가격이 싸고 효과가 탁월하여 식품가공 및 의약품에 널리 사용되고 있으나 안전성 문제가 있다. 건강식품식품과 화장품산업에서는 안전성에 문제가 없고, 가격이 저렴하면서 in vitro 및 in vivo에서 항산화력이 강한 천연물 유래 천연항산화제에 대한 수요가 날로 증가하고 있다.⁵⁾ 최근 천연물로 항산화제 연구는 식품공업, 발효공업 및 의약산업 분야, 농업분야 등 다방면의 분야에서 이용될 수 있기 때문에 국가 경제 산업적 측면에서 매우 큰 파급효과를 기대할 수 있다.

특히 지금까지 알려진 항산화제가 약한 활성, 독성 및 사용상의 한계로 인하여 의약활성물질로 사용하는 데에 있어서 많은 문제점

을 내포하고 있다. 따라서 천연으로부터 보다 안전하고 강한 활성을 지닌 신규 천연항산화제의 개발의 요구된다. 항산화제 시장규모를 보면 식품분야에서 만도 년 간 10억불 이상의 세계시장을 확보하고 있는데, 이들은 대부분이 천연 항산화제가 이용되고 있다.

항산화 물질의 개발과 함께 tyrosinase 저해활성을 가진 물질 개발 또한 매우 중요한 역할을 한다. Tyrosinase는 polyphenol oxidase라고도 알려진 구리가 함유된 효소로서 L-tyrosine을 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)⁶⁾으로 DOPA를 L-dopaquinone으로 그리고, 5,6-dihydroxyindole을 melannochrome으로 전환시켜, 산소와 전자를 전달하는 phenol 산화효소이며, 이어서 자동적으로 일어나는 일련의 산화반응을 통하여 melanin이 형성된다. 이 효소는 미생물과 동·식물에서 발견되며, 과일, 채소와 감각류의 갈변에도 관여한다. 이러한 melanin 색소가 과잉 생산될 경우 인체에 기미, 주근깨, 피부노화 촉진과 피부암을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 tyrosinase 저해제 개발은 과잉 색소 침착, 기미, 주근깨 치료 및 예방에 사용되어 현재 tyrosinase 저해 활성 물질을 이용한 기능성 화장품 개발에 매우 높은 관심이 집중되고 있는 것도 사실이다.

해녀콩(*Canthalia lineate*)은 해도두라 하며, 콩과식물에 속한다. 제주도, 일본, 타이완, 중국남부의 바닷가에서 자라고 옛날에 제주도에서 목초용으로 쓰이기도 했다. 그러나 독성이 있어 식용으로 사용되지는 못했다. 국내에서는 일부 연구 소재로 사용되었다. 그러나 이 식물은 콩과 식물로서 콩의 장점들을 가지고 있을 수 있고, 현재 진행 중인 항산화 및 기능성 화장품 소재를 개발하는 한

대상으로 선별되어 용매 추출물을 검색한 결과 항산화와 미백기능이 있음을 알게 되어 기능성 단일 물질을 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 실험방법

재료 및 기기

제주도 연안에 자생하고 있는 해녀콩 종자를 2004년 10월 중순경 채집하여 2회 수세하고 염분을 제거한 후 실내에서 통풍건조 하였다. 건조된 시료는 분쇄기로 갈아 미세분말로 만든 후 80% 메탄올로 한 달간 침적시켜 추출하였다. 침적 후 식물체를 여과한 여액은 감압 및 진공건조를 거쳐 농축시키고, 동결 건조기를 사용하여 잔여 수분을 제거한 후 최종적으로 분말시료를 얻어 내어 시료를 사용하였다.

본 실험에서 시료의 추출에 사용된 용매들은 Merk Co., Junsei Co., Hyman Co.사의 제품을 사용하였다. C18 column chromatography에는 Silica gel 100(RP-18, 230-400 ASTM Merck)이 사용되었으며, 분리과정에서 사용된 TLC(Thin-Layer Chromatography) RP-18F_{254S}는 MERCK 제품을 사용하였다. TLC 상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp를 사용하였다. 분리과정에서 Prep-HPLC는 Waters Delta Prep-C를 사용하였고 Sunfile™ Prep-C OBD 5 μm 19×150 mm column을 장착하여 사용하였으며, 구조분석에 이용되는 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400(FT NMR system, JEOL)을 사용하였다. NMR 측정시 용매로는 Methanol-d₄가 사용되었다.

기질 Suc-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide와 porcine pancreatic elastase(PPE), 그리고 Tyrosinase 활성 저해율 실험에 사용된 Tyrosinase와 Tyrosine은 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였다. 합성 melanin과 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 그리고 항산화 효과 실험에 사용된 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)와 대조군으로 사용한 비타민 C, BHA(Butylated Hydroxyanisole) 역시 Sigma(USA)사의 것을 구입하여 사용하였다.

해녀콩 분리 및 구조 규명

해녀콩 건조시료 1220 g을 80% MeOH 용매에 넣은 후 한 달간 침출시켰다. 이 침출시료를 감압 여과하여 식물체를 제거하였고, 이과정은 세 번 반복하여 crude methanol extract를 얻을 수 있었다.

Methanol 추출물을 증류수에 현탁하고 분별 깔때기에서 비극성용매부터 hexane chloroform(CHCl₃), ethyl acetate (EtOAc), butanol(BuOH)을 사용하여 용매 분획한 뒤 여과, 감압 농축하여 각각의 분획물을 얻었으며 그중에서 ethyl acetate (EtoAc)을 동결 건조하여 ethyl acetate (EtoAc)층을 분획물로 사용하였다. 용매의 추출과정은 Figure 1에 나타내었다.

Ethyl acetate층을 분리하기 위해 TLC 전개용매를 확인한 후 C18 column chromatography(40~63 μm)에서 MeOH / H₂O (2/3)의 전개용매로 전개시켜 분리하였다. Ethyl acetate층을 C18 column chromatography에 통과한 후 Prep C OBD, column이 장착된 Prep-LC를 이용하여 이동상 H₂O/ Acetonitrile(95/5)에

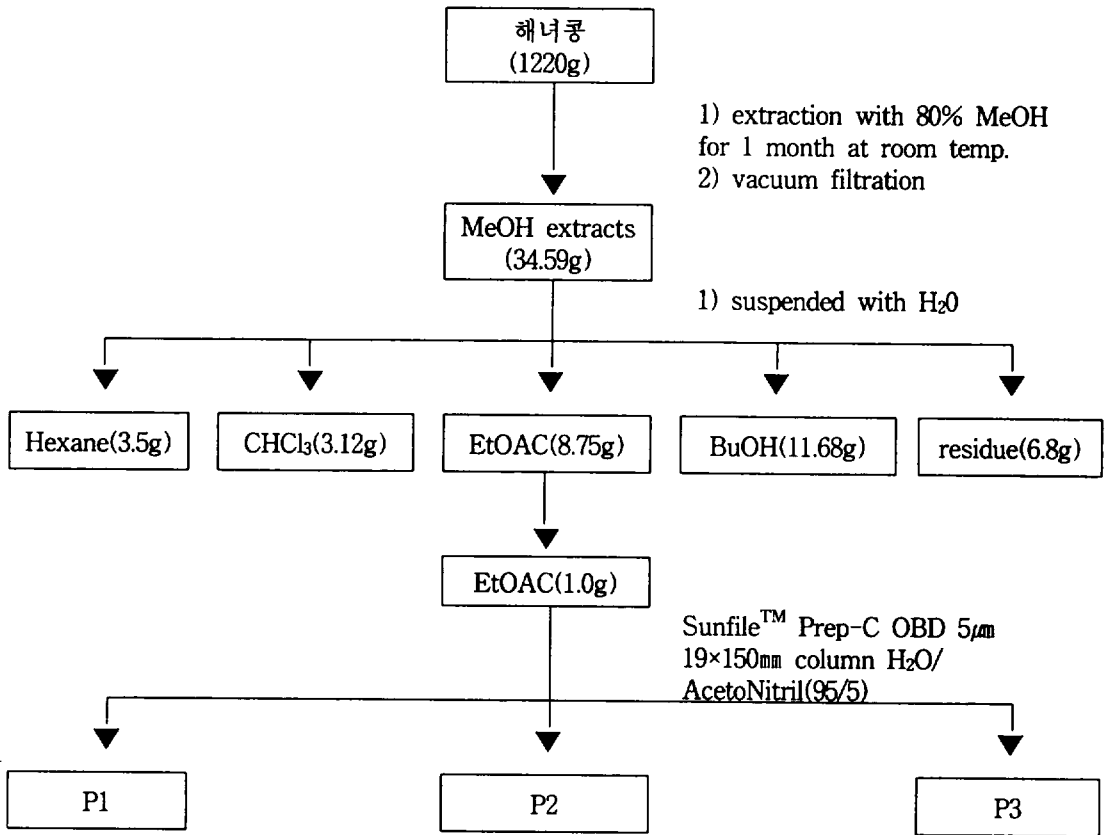


Figure 1. Isolation Scheme of Ethyl Acetate Layer of *Cancalia lineata*.

서 H₂O/Acetonitrile(0/ 100)의 기울기 용리로 35분 동안 분리한 후 단일 compound를 얻어서 이들의 구조를 NMR로 확인하였다.

Methyl gallate 정량분석

methylygallate 정량분석은 Folin-Denis법을 약간 변형시켜 측정하였다.⁷⁾ 해녀콩의 Ethyl acetate층 추출물에 포함된 methyl gallate 성분 분석에는 Waters사의 HPLC(Waters Alliance System 2695)를 이용하였다. HPLC 분석에서 이동상은 acetonitrile(0.5% acetic acid) 혼합 용액에 기울기 용리법으로 분리하였다. methyl gallate 성분 분석을 위한 HPLC 기기조건을 Table 1에 나타내었다.

이동상의 기울기 용리 조건을 Table 2에 수록하였다. 또 이러한 분석조건으로 분리한 methyl gallate 표준 물질의 크로마토그램을 Figure 2에 나타내었다.

Table 1. HPLC instrumental conditions for *Cancalia lineata* analysis

HPLC	Waters Alliance System 2695
Column	Atlantis dc-18, 5µm(4.6×250mm)
Detector	photodiode array detector
Flow rate	1.0mL/min
Injection volume	10µm
Column Temp.	40℃
Sample Temp.	10℃

Table 2. Mobile Phase Conditions for HPLC Gradient Elution.

Program order	Time (min)	water (%)	Acetonitrile (%)
1	0	80	20
2	20	80	20
3	25	70	30
4	35	70	30
5	40	60	40
6	50	60	40
7	55	20	80
8	65	20	80
9	70	80	20
10	75	80	20

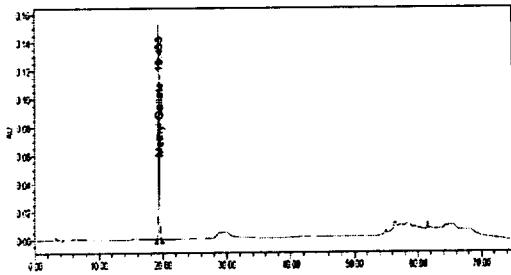


Figure 2. HPLC Chromatogram for Methyl Gallate at 0.1 mg/mL

Tyrosinase 활성도 실험

Tyrosinase 저해활성 측정은 dopachrome 방법을 이용하여 UV/VIS 분광광도계로 측정하였다.⁸⁾ 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 728 μ g, 시험시료 8 μ l, mushroom Tyrosinase(1500 U/mL~2000 U/mL) 16 μ l, 1mM Tyrosine 48 μ l 섞어서 37 $^{\circ}$ C에서 15분동안 반응 시켰다 그리고 이것을 UV/VIS 분광광도계를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. blank로 시료액 대신 시료를 녹인 용매를 넣어 측정하였다. 억제 정도는 효소를 넣지 않았을 때의 흡광도와 효소를 첨가시켜 반응시킨 후의 흡광도의 차이

를 살폈다. Tyrosinase 억제정도는 equation 1 과 같이 계산하였다.

Tyrosinase inhibition (%) =

$$100 - \frac{b - b'}{a - a'} \times 100 \quad \text{equation 1}$$

a : 공시료액의 반응후의 흡광도

b : 시료액의 반응 후의 흡광도

a', b' : Tyrosinase 대신 완충액으로 대체 하여 측정한 흡광도

Elastase 활성저해 측정

Elastase의 억제효과는 UV/VIS 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 0.2M Tris-Hcl Buffer(pH 8.0) 840 μ l에 4 mM Suc-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide 100 μ l를 섞고, 2 mg/ml의 sample 50 μ l도 섞는다. 100 μ g/ml의 porcine pancreatic elastase 10 μ l를 넣어 흔들어 섞어 25 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후 p-nitroanilide의 생성량을 410 nm에서 측정한다. Elastase의 저해율은 equation 2에 따라 계산되며, IC₅₀은 Elastase의 기질을 50% 저해하는데 요구되는 시료의 농도(μ g/ml)를 표시하였다.

Elastase inhibition =

$$\frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \times 100 \quad \text{equation 2}$$

A : 시료대신 solvent를 넣고 효소를 첨가 하여 반응한 후의 흡광도

B : 시료대신 solvent를 넣고 효소가 없는 상태로 반응한 후의 흡광도

C : 효소를 첨가하여 반응한 후의 시료의 흡광도

D : 효소를 넣지 않은 상태로 반응한 후의 시료의 흡광도

1, 1-Diphenyl-2-picryl-Hydrazyl (DPPH) radical 소거 항산화활성 검색

시료의 항산화 활성은 DPPH법을 이용하여 radical 소거효과를 측정하는 Blois⁹⁾법을 이용하였다. DPPH는 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 517 nm에서 강한 흡수 band를 보이나 phenolic 화합물과 같이 수소에 전자를 제공해주는 전자 공여체와 반응을 하게 되면 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 된다. 따라서 흡수 band도 사라지게 되고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색깔은 점점 없어지게 되고 흡광도도 감소하게 된다. DPPH 시약을 EtOH에 녹여 0.3 mM 농도가 되게 제조하여 DPPH 용액 450 μ l에 여러 농도의 시료용액 5 μ l를 넣어 잘 섞은 후 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 반응 시킨 시료는 UV/VIS 분광광도계를 이용하여 517 nm의 파장에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 시료의 환원력의 크기는 라디칼 소거활성(scavenging activity, IC₅₀)으로 표시하며 IC₅₀은 DPPH radical의 농도가 50% 감소하는데 필요한 농도로 나타낸다.

Free radical 소거 활성 정도는 equation 3로 계산하였다.

$$\text{Free radical scavenging activity (\%)} = \frac{A - (B - C)}{A} \times 100 \quad \text{equation 3}$$

A는 시료가 포함되지 않은 control의 흡광도이고, DPPH와 시료 용액의 혼합액이면 C는 에탄올과 시료의 혼합액이다.

Melanin 함량 측정

해너콩 추출물의 멜라닌 생성 억제 정도를 mouse 피부멜라닌 세포인 melan-a cell을 이용하여 최종 생성되는 멜라닌 생성 억제 정도를 측정하였다.¹⁰⁾ Melan-a cell은 non-tumorigenic mouse melanocyte의 성질을 대부분 가지고 있으면서도 immortalization 되어 있어 실험에 이용하기 적당하다.

Melan-a cell을 24 well plate에 1.0×10^5 cells/well로 plating 한 후 전배양 시키고, 부착된 cell에 시료를 처리한 후 3일간 37 $^{\circ}$ C, 10% CO₂ 항온기에서 배양하였다. plate의 배지를 제거한 후 trypsin-EDTA로 cell을 떼어내고 PBS로 희석 후 원심분리하여 pellet 만 얻었다. 얻어진 pellet을 1N NaOH 150 ml를 넣고 95 $^{\circ}$ C에서 2분간 멜라닌을 녹인 후 450 nm에서 ELISA로 측정하여 대조군과 비교하였다. 합성 멜라닌을 이용하여 standard solution을 만들고 sample과 standard solution을 96 well plate에 넣고 흡광도를 측정한다. 멜라닌 농도는 합성 멜라닌으로 작성된 표준 농도 곡선으로부터 결정하였다.

세포의 Viability 측정

MTT assay는 Mosmann의 방법을 이용하였다.¹¹⁾ Melan-a cell을 멜라닌 양 측정에 사용된 방법과 동일하게 1×10^5 cells/well로 조정하여 사용하였다. 추출용액에 의한 세포 증식 평가를 위하여 24 well-plate (Corning, NY, USA)에 cell을 37 $^{\circ}$ C, 10% CO₂ incubator에서 전배양을 시킨 후 세포가 바닥에 부착이 되면, well당 sample을 처리하고 10% CO₂ Incubator에서 37 $^{\circ}$ C, 3일간 배양하

었다. 3일 뒤 MTT solution (50 mg/ml)을 well당 0.1 mg씩 분주한 뒤, 4시간 동안 37 °C에서 반응시킨 후, 얻어진 formazan을 DMSO로 녹인 후 ELISA Reader를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

III. 실험결과 및 고찰

Tyrosinase 활성도 실험

DOPA 등 phenolic 화합물에 호기적 산화를 촉진 시키고, 자외선에 노출된 피부에 melanin 색소를 침착시켜 피부노화를 초래하며, 식품의 갈변화 현상과 관련이 있는 tyrosinase 활성을 저해하는 유효성분을 찾고자 해너콩을 tyrosinase 활성 저해능을 검색하였다.

Figure 3에서와 같이 해너콩의 EtOAc층에서 분리한 P1, P2는 약간의 tyrosinase 활성 저해능을 가지고 있으며 P3는 현재 미백제로 많이 사용되고 있는 알부틴의 29% 정도의 활성 저해능을 가지고 있는 것을 확인하였다.

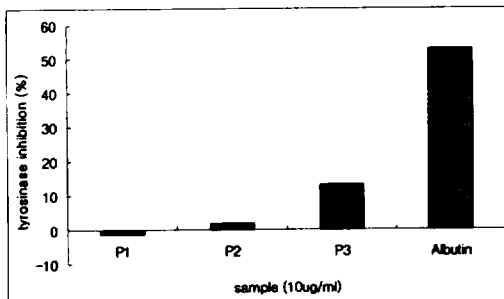


Figure 3. Inhibition of tyrosinase activity by P1, P2, P3 of ethyl acetate extracts of *Candelia lineata*.

Elastase 활성저해 측정

Elastase의 활성에 영향을 주는 여러 요인중의 하나는 자외선이다. 장기간에 걸친 태양광선 중의 자외선 노출은 피부의 광노화를 촉진시켜 주름과 색소 침착을 일으키고 피부의 긴장도를 감소시키는 원인이 된다. elastin은 피부의 진피층에 존재하며 피부의 탄성을 주지만 상호cross linking에 의하거나 분해됨으로써 피부노화가 이루어지게 한다. elastase는 elastin을 분해하는 효소로서 이의 활성 저해는 노화방지에 기여를 한다. 그러나 해너콩에서 분리한 물질들의 경우, 이러한 elastase의 활성저해 측정에서 P1, P2, P3와 methyl gallate(MG) 전부 대조군인 빈랑자에 비해 활성저해 효과가 거의 없는 것으로 확인되었다(Figure 4).

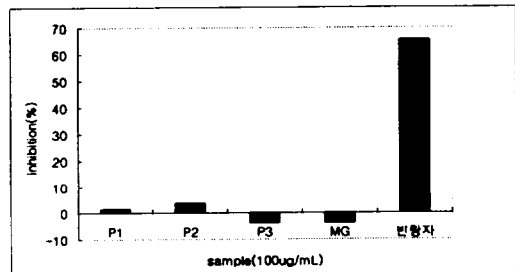


Figure 4. Inhibition of elastase activity by P1, P2, P3 of ethyl acetate extracts of *Candelia lineata*.

DPPH 자유 radical 소거 활성

DPPH free radical법은 전자 공여능을 측정하는 방법으로 환원력이 클수록 강력한 항산화제가 된다는 것에 착안하여 DPPH의 환원정도를 기준으로 측정물질의 환원력과 항산화력을 측정하게 된다. DPPH는 질소를 중심으로 안정한 라디칼 구조를 하고 있는데

515~517 nm에서 최대 흡수를 나타내다가 환원이 되어 라디칼을 소실하게 되면 특유의 보라색이 없어지면서 측정 파장대에서 흡수를 없어지게 된다.

각 분획별로 항산화 효과를 확인하기 위하여 DPPH free radical 소거 활성 정도를 IC₅₀ 값으로 비교 대조군으로 쓰인 Vit. C와 BHA에 비교 시 P1은 항산화 활성이 거의 없는 편이고 P2, P3는 활성이 상당히 뛰어난 편이다(Figure 5).

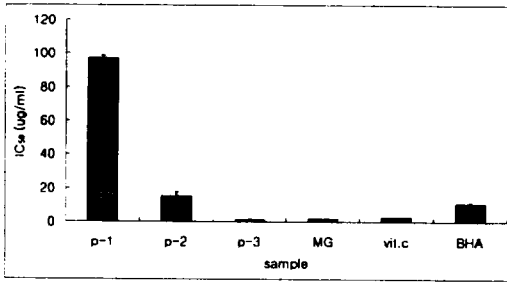


Figure 5. DPPH free radical scavenging effects of extracts of P1, P2, P3 of *Canthalia lineata*.

melanin 양 측정

생체 피부에서의 색소 침착은 tyrosinase 활성을 감소시켜서 억제할 수 있다. 이는 멜라닌 합성에 있어서 중요한 효소인 tyrosinase의 합성을 저해함으로써 가능하다. 그러나 in vitro에서의 효소활성 저해 실험은 종종 세포 실험과 다른 양상을 보여주기도 하였다. 그래서 EtOAc층에서 분리한 순수물질들의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위해 세포실험을 하여 최종산물인 melanin 양을 측정하였다.

melanin-a cell을 이용하여 melanin content를 조사한 결과, Figure 6에서 나타내

듯이 대조군 Arbutin보다 P3가 melanin 생성 저해 효과가 좋게 나타나는 것을 확인 하였다. 이는 구조가 밝혀진 methyl gallate와 같은 값을 보여주고 있다. 그러나 P2는 미백보다는 오히려 멜라닌 양을 증가시킴으로써 백색증에 흑화치료를 할 수 있는 물질임을 알게되었다.

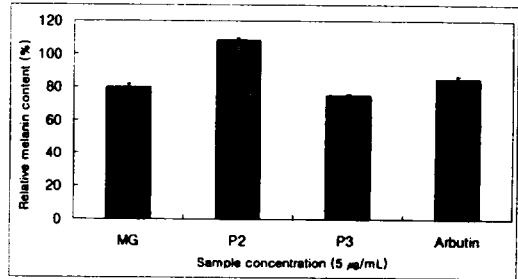


Figure 6. Effect of several subfractions of EtOAc fraction of *Canthalia lineata* on melanin contents of melanin-a cell. The tested concentration was 5µg/µL

Cell viability(MTT assay)

Melanin-a cell에 대한 각 분획 sample 별로 melanin 생성 저해 효과를 따른 세포독성 평가를 위한 MTT assay를 수행하였다.

세포에 (1.0×10⁵ cell/well) sample을 처리하였을 때 높은 농도에서 P3는 의미 있는 세포독성을 가지고 있었고 P2도 약한 정도의 세포 독성을 가지고 있음을 확인하였다. 그러나 Figure 7에서 보듯이 낮은 농도에서 P3와 methyl gallate는 상업용으로 사용되고 있는 알부틴에 비해 독성이 크게 강하지 않고 비슷하였다. Figure 6에서 얻은 멜라닌 양의 측정은 이와같은 독성이 무시될만한 농도범위 내에서 실험을 수행한 결과이다.

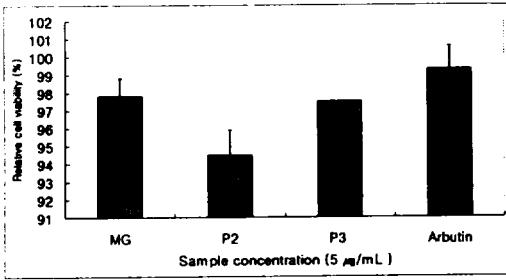


Figure 7. Effect of several subfractions of EtOAc fraction of *Canthalia lineata* on proliferation of melanin-a cell at 5 µg/µL.

해녀콩(*canthalia lineate*) P3 성분의 분리 및 구조 확인

단일 물질이라 여겨지는 P2, P3 분획을 가지고 NMR 기기로 구조를 확인하였다. P3의 ¹H-NMR을 확인한 결과 7.04 ppm(2H, s)에서 나타나는 peak로 보아 벤젠에 붙어 있는 H로 예상할 수 있었다. 그리고 3.81 ppm(2H, s)에서 나타나는 peak로 보아 sp³ 혼성구조로 옆에 전기 음성도가 큰 산소원자가 붙어 있는 형태라고 예상할 수 있었다(Figure 8). ¹³C-NMR 스펙트럼에서는 탄소수가 8개임을 확인 할 수 있었고, 169.15 ppm의 위치로 보아 에스테르 같은 경우라 예측 할 수 있었으며, 52.40 ppm의 peak 위치로 보아 sp³ 혼성구조로 옆에 전기 음성도가 큰 산소원자가 붙어 있는 형태라고 예상할 수 있었다. 그리고 110 ppm~150 ppm에 위치하는 탄소가 6개는 방향족 형태라 예측 할 수 있었다(Figure 9).

이상과 같은 정보를 종합하여 볼 때 P3 구조를 methyl gallate라 예상하고 Sigma에서 구입한 methyl gallate의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR스펙트럼으로 확인한 결과 같은 스펙

트럼을 얻어, P3가 methyl gallate임을 확인할 수 있었다. methyl gallate의 구조는 Figure 10에 나타내었다.

P2의 NMR 스펙트럼도 얻었으나 아직 그 구조를 정확히 규명하지 못하였으며, 그 추출량이 매우 적어 좀 더 철저한 실험을 수행하지 못하고, 본 논문에는 그 구조를 밝히지 못하는 애로를 겪고 있다.

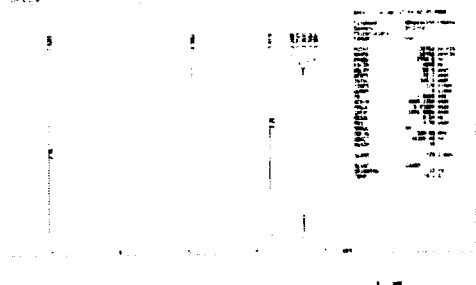


Figure 8. ¹H-NMR spectrum of P3

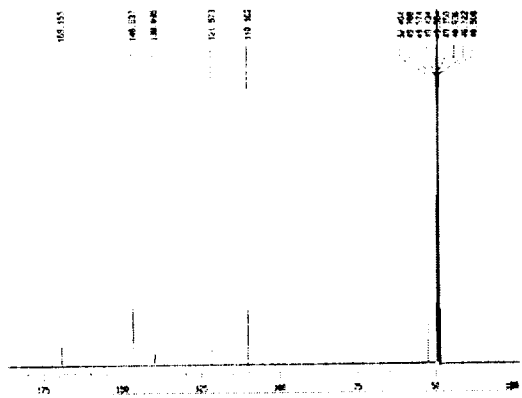


Figure 9. ¹³C-NMR spectrum of P3

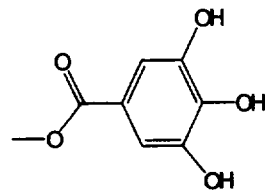


Figure 10. Structure of methyl gallate

Table 3. Comparison of the NMR data of P3 with Methyl gallate

Position	P3		Position	Methyl gallate	
	δ_c	$\delta H(\text{multi, JHz})$		δ_c	$\delta H(\text{multi, JHz})$
1	121.57		1	121.53	
2	110.62	7.04(s)	2	110.12	7.04(s)
3	146.63		3	146.63	
4	139.89		4	139.88	
5	146.63	7.04(s)	5	146.63	7.04(s)
6	110.62		6	110.12	
7	169.15		7	169.13	
8	52.40	3.81(s)	8	52.41	3.81(s)

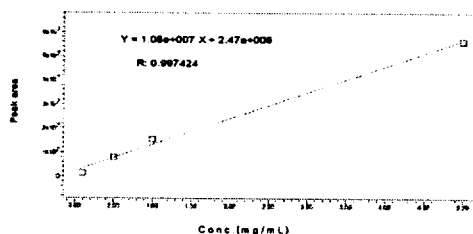
MG(Methyl gallate) 정량분석

HLPC에 의한 methyl gallate 정량분석을 위해 작성한 검량선을 Figure 11A에 나타내었다. 이때 표준용액의 농도범위는 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mg/mL이다. 분석 검량선은 0.997424 범위로 높은 상관성을 나타내었다. 이를 이용하여 해녀콩의 ethyl acetate 추출물에서

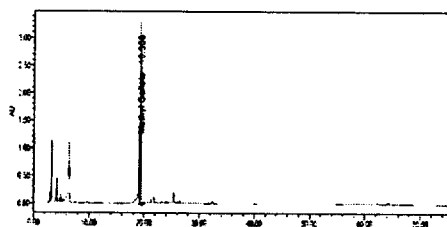
함유량을 분석한 결과 28.13 mg/g 으로 높은 함유량을 나타내었다(Figure 11B). 해녀콩의 메탄올 추출물에는 0.202 mg/g의 methyl gallate가 함유되어 있음을 알 수 있었다.

IV. 결 론

본 연구는 제주도에서 자라는 해녀콩 (*Cancalia lineate*) 건조시료를 80% Methanol 을 이용하여 추출하고, 그 추출물을 증류수에 현탁하고 비극성용매부터 hexane chloroform (CHCl₃), ethyl acetate(EtOAc), butanol (BuOH)을 사용하여 용매 분획한 뒤 여과, 감압 농축하여 각각의 분획물을 얻었으며 그중에서 ethyl acetate 분획물을 동결 건조하여 C18 Revers phase column chromatogrepy에서 MeOH / H₂O(2/3)의 전개용매로 전개시켜 분리하였다. 활성분획을 다시 Prep-HPLC 를 이용하여 순수한 물질분리를 시도하였다. 그 결과 단일 물질이라 여겨지는 물질을 분리하였고 이를 P2, P3라 하였다. 이 분획을 가지고 NMR기기로 구조를 확인 및 문헌과 비교한 결과 P3는 Methyl gallate 임을 확인하였고 P2는 NMR기기로 확인한 결과 당의



(A)



(B)

Figure 11. Calibration curves for HPLC analyses and HPLC chromatogram for EtOAc extract of *Cancalia lineata*.

구조임을 확인 할 수 있었다. 하지만 구조는 명확하게 규명이 되지 않았다.

P3 분획물로 MG의 정량 분석 결과 에틸 아세트 분획물에 28.13 mg/g으로 높은 함유량을 보였다. 즉, 해너콩의 메탄올 추출물에는 0.202 mg/g의 methyl gallate가 함유되어 있음을 알 수 있었다. 그리고 항산화 실험 및 미백 등을 확인하기 위해 tyrosionase 활성을 본 결과 P1, P2 약간의 tyrosionase 활성 저해능을 가지고 있으며 P3는 그것보다도 좋은 활성 저해능을 가지고 있는 것을 확인 하였다. 그러나 알부틴보다는 좋지 않은 활성을 보였다. 그러나 melanin-a cell을 이용하여 melanin content를 조사한 결과 대조군 Arbutin보다 P3가 melanin 생성 저해 효과가 좋게 나타나는 것을 확인 하였으며, P2는 흑화작용을 보였다.

한편, 각 분획별로 항산화 효과를 확인하기 위하여 DPPH free radical 소거 활성 정도를 비교 대조군으로 쓰인 비타민 C와 BHA에 대하여 비교시, 항산화 효과는 P1은 라디칼 소거기능이 거의 없는 편이고 P2, P3는 DPPH free radical 소거 활성이 상당히 뛰어난 편이다.

이 결과로 앞으로 해너콩은 항산화 기능을 가지는 methyl gallate를 포함한 여러 항산화 물질들을 함유하고 있으며, 본 연구에서 구조와 기능을 규명한 methyl gallate는 세포내에서 멜라닌생성을 억제하는 것이 현재 사용되는 알부틴 이상의 효과가 있음을 밝혔다. 또한 아직 그 구조를 명확히 밝히지 못하였지만 P2역시 항산화물질로서의 좋은 후보가 될 것이다.

V. 참고문헌

1. Fridovich, I., 1986, Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys*, 247 :1-11
2. Zalfa Abdelek, "Regulation of human pigmentation by ultraviolet light and by endocrin, paracine, and autocrine hormones." *The pigmentary System, Physiology and pathology*, Edited by James J. Nordlund et al. 155-133(1998)
3. Park, S. N., "skin aging and antioxidant." *Journal of the society of cosmetic scientists of korea* 23(1) : 75-132(1997)
4. Funasaka, Y. ; Ichibashi. M., Inoue, K., "Depigmenting Effect of a-Tocophenyl Ferulate on Normal Human Melanocytes." *Digment.Cell. Res.* 8 : 170-174(2000)
5. Isolation of Antioxidant and Antibrowning Substance from *Chionanthus retusa* Leaves *J korea Soc Food Sci Nutr* 33(9), 1419-1425(2004)
6. Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J. N., Garcia-Canova, F.and Garcia-Carmona, F(1995) Tyrosinase : acomprehensive revoew of its mechanism. *Biochim Biophys. Acta* 1247, 1-11.
7. Gutfinger, T. J. *Am. Oil Chem.Soc.*, 1981, 58, 966-968
8. P.R. Gordon, C. P. Mansur, and B. A. Gilchrest, Regulation of human melanocyte derived factors, *J. Invest. Dermatol.*, 2, 566(1989)
9. Blois, M.S. (1958) Antioxidant

determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181** : 1199.

10. K. Meada and M. Fukuda, In vitro effectiveness of whitening cosmetic compoinents in human melanocyte, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, 361(1991).
11. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the celluar growth and syrval application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65**, 55(1983)

감사의 말씀

본 연구는 2007년 8월 화학과 한성빈 교수님의 정년기념 논문의 일환으로 제출하며, 연구지원은 일부 2006년 제주하이테크산업진흥원에서 지원하는 연구비와 일부 2006년 제주대학교 연구소 연구지원프로그램(기초과학연구소 지원)의 지원을 받아 수행하였고, 본 내용은 한국응용생명화학회지에 투고 중이다.

ABSTRACT

Methyl gallate was purified and identified from *Cancalia lineate*. It was in the ethyl acetate extract of 80% methanol extract of the plant. Ethyl acetate extract was applied to reverse phase C-18 column chromatography, then applied to Prep-HPLC equipped with Sunfile™ Prep-C ODS 5 μ m 19 \times 150 mm column. The eluent systems were H₂O/Acetonitrile(95/5) for 35 min, then H₂O/Acetonitrile(0/100). Two relatively pure and one mixture fraction were collected. Structure of one fraction was identified to be a methyl gallate by H¹- and C¹³-NMR spectra. Structure of another peak fraction was not able to be determined due to the insufficient data yet.

Purified peak fraction were tested for bioactivities, such as antioxidative effect, tyrosinase and elastase inhibition abilities, regulation of melanin synthesis in the cultured cell. Peak fraction for P3 of methyl gallate showed antioxidation, and inhibitions of tyrosinase activity and melanin synthesis. Not only its antioxidative effect was better than vitamin C and BHA. but also its inhibition of melanin synthesis was better than arbutin.

In this study, we reported for the first time that methyl gallate was one of secondary metabolites found in *Cancalia lineate*