

碩士學位論文

Purification and Identification of
Antioxdants from *Canavalia lineata*



濟州大學校 教育大學院

化學教育專攻

高 東 佑

2006年 8月

碩士學位論文

Purification and Identification of
Antioxdants from *Canavalia lineata*



濟州大學校 教育大學院

化學教育專攻

高 東 佑

2006年 8月

Purification and Identification of Antioxdants from *Canavalia lineata*

指導教授 李 璿 柱

高 東 佑

이 論文을 教育學 碩士學位 論文으로 提出함

2006年 8月



高東佑의 教育學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 卞 鍾 轍 印

委 員 李 璿 住 印

委 員 李 南 昊 印

濟州大學校 教育大學院

2006年 8月

Purification and Identification of Antioxidants from *Canavalia lineata*

Dong-Woo Ko

(Supervised by Professor Sunjoo Lee Ph. D)

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

2006. 8.

MAJOR IN EDUCATION OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL OF EDUCATION
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT	i
List of Tables	ii
List of Figures	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 실험방법	3
1. 재료	3
2. 시료 및 기기	3
3. 해녀콩 분리방법	5
3-1 해녀콩의 메타올 추출물 및 용매분획	5
3-2 HPLC에 의한 물질 분리과정	5
4. DPPH radical 소거활성에 의한 항산화검색	7
5. Tyrosinase 활성억제실험	8
6. Elastase 활성저해 측정	8
7. Melanin 함량 측정	9
8. 세포의 Viability 측정(MTT assay)	9
9. MG(Methyl gallate) 정량분석	10
III. 실험결과 및 고찰	12
1. DPPH radical 소거활성에 의한 항산화검색	12
2. Tyrosinase 활성억제실험	13
3. Elastase 활성저해 측정	14
4. Melanin 함량 측정	15
5. Cell viability 측정(MTT assay)	17
6. 분리물질 구조분석	19

7. MG(Methly gallate) 정량분석	27
IV. 결 론	29
V. 참 고 문 헌	30

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 150mm column. The eluent systems were H₂O/ Acetonitril(95/5) for 35 min, then H₂O/ Acetonitril(0/100). Two relatively pure and one mixture fraction were collected. Structure of one fraction was identified to be a methyl gallate by H- 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 methyl gallate showed antioxidation, and inhibitions of tyrosinase activity and melanin synthesis. These results were same as those of previous data reported elsewhere.

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

List of Tables

Table 1. HPLC instrumental conditions for <i>Cancalia lineate</i> analysis	10
Table 2. Mobile phase conditions for HPLC gradientelution.	11
Table 3. Comparison of the NMR data of P3 and Methyl gallate	24

List of Figures

Figure 1. Isolation procedure of EtOAc layer of <i>Cancalia lineata</i>	6
Figure 2. HPLC chromatogram of Methyl gallate 0.1(mg/mL)	11
Figure 3. DPPH free radical scavenging effects of extracts of P1, P2 ,P3 of <i>Cancalia lineata</i>	12
Figure 4. Inhibition of tyrosinase activity by ethyl acetate extract of <i>Cancalia lineata</i>	13
Figure 5. Inhibition of elastase activity by ethyl acetate extract of <i>Cancalia lineata</i>	14
Figure 6. Effect of several subfractions of EtOAc extract of <i>Canavalia lineata</i> on melanin contents of melanin-a cell.	15
Figure 7. Effect of several subfractions of EtOAc extract of <i>Canavalia lineata</i> on melanin contents of melanin-a cell.	16
Figure 8. Effect of several subfractions of EtOAc extract of <i>Canavalia lineata</i> on proliferation of melanin-a cell.	17
Figure 9. Effect of several subfractions of EtOAc extract of <i>Canavalia lineata</i> on proliferation of melanin-a cell.	18
Figure 10. ¹ H-NMR sepectrum of P3	20

Figure 11. ^{13}C -NMR sepectrum of P3	21
Figure 12. ^1H -NMR sepectrum of methyl gallate	22
Figure 13. ^{13}C -NMR sepectrum of methyl gallate	23
Figure 14. ^1H -NMR sepectrum of P2	25
Figure 15. ^{13}C -NMR sepectrum of P2	26
Figure 16. Structure of methyl gallate	27
Figure 17. Calibration curve determine the analyses methyl gallate	28
Figure 18. HPLC chromatogram for <i>Cancalia lineata</i> EtOAc extract	28



I. 서론

사람들은 일상생활에서 호흡 등을 통하여 많은 산소를 체내에 흡수하고 있다. 그중에 95%는 신진대사에 필요한 에너지원으로 사용되고 있고 나머지 5%는 우리몸에 악영향을 주는 활성산소로 변화되고 있다. 이러한 활성산소는 슈퍼옥사이드 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 radical을 소거할 수 있는 또는 과산화물 생성을 억제하기 위하여 항산화제에 대한 연구가 1969년 Mccord와 Fridovich가 superoxide radical을 소거하는 효소인 Super oxide dismutase(SOD)를 발견한 것을 계기로 생체내의 활성산소의 발생, 생물독성 및 방어·소거기구 등에 관하여 관심을 갖게 되면서 본격적으로 진행되었다.

합성항산화제인 Buthylated hydroxytoluene (BHT), Butylated hydroxyaniuole (BHA), Propyl gallate (PG), Tert-Butylhydroquinone (TBHQ)등과 천연 항산화제인 a-tocopherol⁴⁾ ascorbic acid, polyphenol등이 사용되고 있다. 합성 항산화제는 가격이 싸고 효과가 탁월하여 식품가공 및 의약품에 널리 사용되고 있으나 안전성 문제가 있다. in vitro에서 항산화력이 강한 천연항산화제인 a-tocopherol 및 ascorbic acid 등은 in vivo에서는 항산화력이 떨어지는 문제가 있다. 따라서 식품산업에서는 안전성에 문제가 없고, 가격이 저렴하면서 in vitro 및 in vivo에서 항산화력이 강한 천연물 유래 천연항산화제에 대한 수고가 날로 증가하고 있다.⁵⁾

항산화 물질의 개발과 함께 tyrosinase 저해활성을 가진 물질 개발 또한 매우 중요한 역할을 한다. Tyrosinase 는 Poly-Phenol Oxidase(PPO)라고도 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 반응을 통하여 melanin이 형성된다. 그리고 멜라닌 생성에 이 효소는 미생물과 동·식물에서 발견되며, 과일, 채소와 갑각류의 갈변에도 관여 한다 이러한 melanin색소가 과

잉 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. 그리고 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.

본 연구에 사용된 해녀콩(*Candelia lineate*)은 해도두라 하며, 콩과식물에 속한다. 제주도, 일본, 타이완, 중국남부의 바닷가에서 자라고 옛날에 목초용으로 쓰이고, 가축의 먹이로도 쓰이기도 했다. 여러 가지 콩과식물에 대한 연구는 많이 진행되어 있지만 해녀콩에 대한 항산화 실험 및 분리 실험 자료가 거의 존재하지 않음으로 국내에서 많이 연구되지 않은 해녀콩에 존재하는 활성성분을 분리하여 그 활성물질이 현대인의 가장 큰 고민인 피부 및 질병예방하기 위한 기초 실험을 수행하기 위해 항산화 및 tyrosinase저해 활성 실험 및 melanin 저해실험, MTT assay실험을 을 실시하였다.



II. 재료 및 실험방법

1. 재료

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

2. 시약 및 기기



본 실험에서 시료의 추출에 사용된 용매들은 Merck Co(USA), Junsei Co(JAPAN), Hyman Co.사의 제품을 사용하였다. Reverse phase 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-HPLC (preparative Liquid Chromatography)는 Waters Delta Prep-C를 사용하였고 Sunfile™ Prep-C ODS 5 μ m 19 \times 150mm column을 장착하여 사용하였고, 구조분석에 이용되는 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400(FT NMR System, JEOL)을 사용하였다. NMR 측정시 용매로는 Methanol-D₄가 사용되었다.

Elastase 활성저해율을 측정할 때 사용한 기질 N-Succ-Ala-Ala-Ala-P-nitroanilide는 와 효소 Porcine Pancreatic Elastase(PPE), 그리고 Tyrosinase를 활성저해율 실험에 사용된 Tyrosinase와 Tyrosin은 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였다.

합성 melanin과 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide

(MTT)시약, 그리고 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical 소거활성에 의한 항산화 효과 실험에 사용된 DPPH와 대조군으로 사용한 Vitamin C, BHA (Butylated Hydroxyanisole) 시약 역시 Sigma(USA)사의 것을 구입하여 사용하였다.



3.해녀콩 분리방법

3-1 해녀콩의 메탄올 추출물 및 용매분획

해녀콩 건조시료 1220g을 80% MeOH 용매에 넣은 후 한 달간 교반하여 침출시켰다. 이 침출시료를 감압여과하여 잔사를 제거하였고, 이과정은 세 번 반복하였다. 이 과정을 통해 메탄올 추출물(Methanol crude extract)을 얻을 수 있었다.

이 추출물을 증류수에 현탁하고 분별 깔때기에서 비극성용매부터 hexane chloroform(CHCl_3), 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) 분획물로 사용하였다.

Ethyl acetate층을 분리하기 위해 TLC로 찍어 전개용매를 확인한 후 Reverse phase column chromatography($40\sim 63\mu\text{m}$)에서 MeOH / H_2O (2/3)의 전개용매로 전개시켜 분리하였다 (Figure 1.)



3-2 HPLC에 의한 물질 분리과정

Ethyl acetate층을 Reverse phase c-18 column chromatography에 통과한 후 Prep-LC를 이용하고 전개용매를 H_2O / Acetonitril(95/5)을 기울기로 35분 동안 용리한 후 H_2O / Acetonitril(0/100) 이용하여 compound를 얻어서 NMR로 확인하였다.

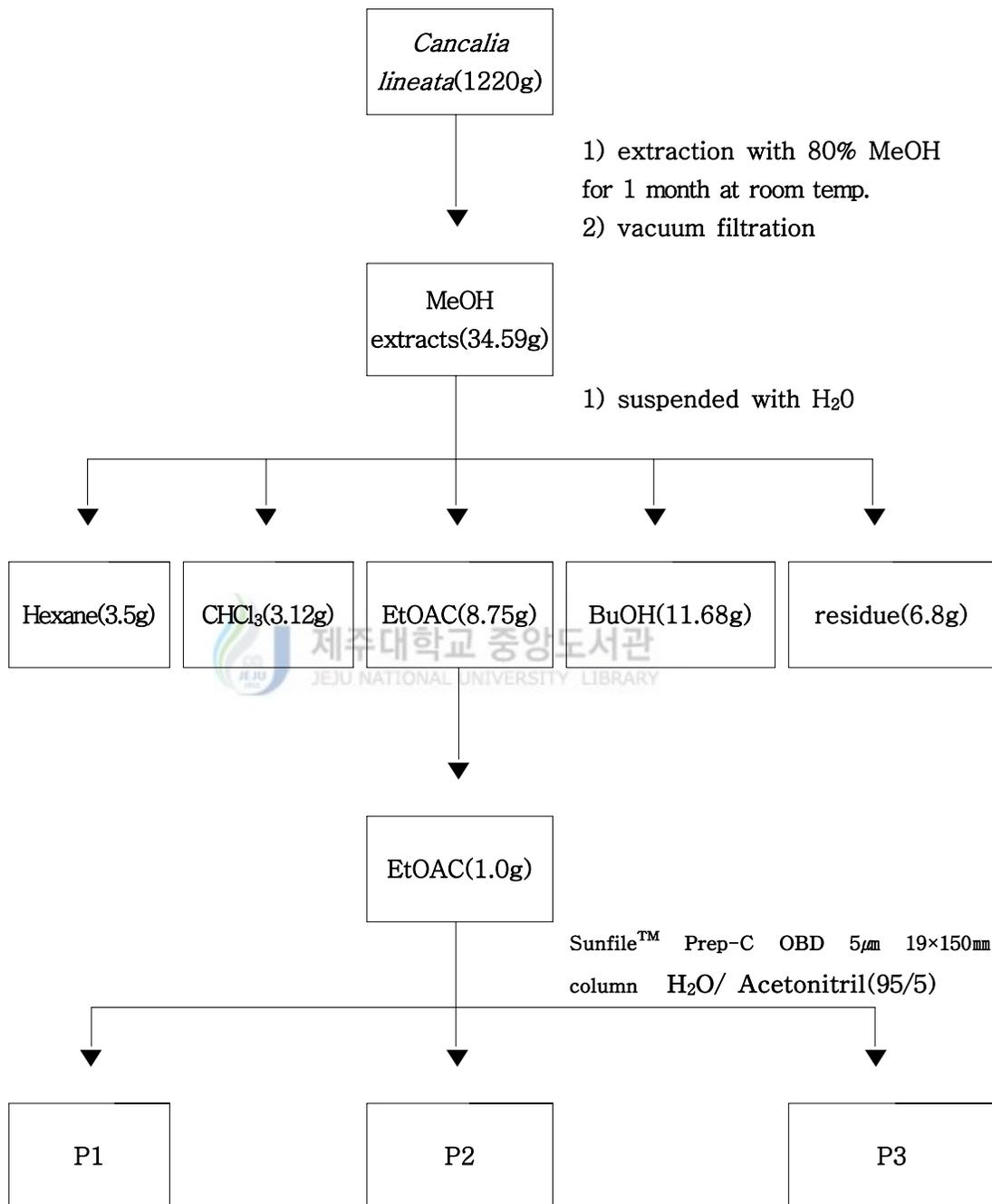


Figure 1. Isolation scheme of *Cancialia lineata*

4. DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-Hydrazyl) radical 소거활성에 의한 항산화 검색

시료의 항산화 활성은 DPPH법을 이용하여 radical 소거효과를 측정하는 Blois⁷⁾법을 이용하였다. DPPH는 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 517nm에서 강한 흡수 band를 보이거나 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 옅어지게 되고 흡광도도 감소하게 된다. DPPH 시약을 EtOH에 녹여 0.3mM 농도가 되게 제조하여 DPPH용액 450 μ l에 여러 농도의 시료용액 5 μ l를 넣어 잘 섞은 후 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 반응 시킨 시료는 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 517nm의 파장에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 시료의 환원력의 크기는 라디칼 소거활성(scavenging activity, IC₅₀)으로 표시하며 IC₅₀은 DPPH의 농도가 50%감소하는데 필요한 농도로 나타낸다.

Free radical 소거 활성 정도는 다음과 같이 계산하였다.

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

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

5. Tyrosinase 활성도 실험

Tyrosinase 저해활성 측정은 dopa chrome 방법⁸⁾을 이용하여 UV/Vis 분광광도계로 측정하였다.

0.1M potassium phosphate Buffer(pH 6.8) 728 μ g, 시험시료 8 μ l, mushroom Tyrosinase(1500U/mL ~ 2000 U/mL) 액 16 μ l, 1mM Tyrosin액 48 μ l 섞어서 37 $^{\circ}$ C에서 15분 반응 시켰다 그리고 이것을 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 475nm에서 흡광도를 측정하였다. 공 시료액으로 시료액 대신 시료를 녹인 용매를 넣어 측정하였다. 억제정도는 효소를 넣지 않았을 때의 흡광도와 효소를 첨가시켜 배양한 후의 흡광도의 차이를 살폈다. Tyrosinase 억제정도는 다음과 같이 측정하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition (\%)} = 100 - \frac{b-b'}{a-a'} \times 100$$

a: 공시료액의 반응후의 흡광도

b: 시료액의 반응 후의 흡광도

a',b': Tyrosinase 대신 완충액으로 대체하여 측정된 흡광도

6. Elastase 활성저해 측정

Elastase의 억제효과는 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 0.2M(stock) Tris-HCl Buffer(pH8.0) 840 μ l에 4mM(stock) NSucc-Ala-Ala-Ala-P-nitroanilide 100 μ l를 섞고, 2mg/ml(stack) Sample 50 μ l도 섞는다. 1.0 μ l/ml(final)의 Porcine Pancreatic elastase(PPE) 10 μ l를 넣어 흔들어 섞어 25 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후 P-nitroanilide의 생성량을 410nm에서 측정한다. Elastase의 저해율은 다음 식에 따라 계산되며, IC₅₀은 Elastase의 기질을 50% 저해하는데 요구되는 시료의 농도(μ l/ml)를 표시하였다.

$$\text{Elastase inhibition} = \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \times 100$$

A : 시료대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하여 반응한 후의 흡광도

B : 시료대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하지 않은 상태로 반응한 후의 흡광도

C : 효소를 첨가하여 반응한 후의 시료의 흡광도

D : 효소를 넣지 않은 상태로 반응한 후의 시료의 흡광도

7. Melanin 함량 측정

해너콩 추출물의 멜라닌 생성 억제 정도를 melan-a cell을 이용하여 최종 생성되는 멜라닌 생성 억제 정도를 측정하였다.⁹⁾ Melan-a cell은 non-tumorigenic mouse melanocyte의 성질을 대부분 가지고 있으면서도 immortalization 되어 있어 실험에 이용하기 적당하다.

Melan-a(1.0×10^5 cell/well)로 24well plate에 1.0×10^5 cells/well로 plating 한 후 전배양 시키고, 부착된 cell에 시료를 처리한 후 3일간 37°C 10% CO₂ 항온기에서 배양하였다. plate의 배지 제거 후 trypsin-EDTA로 cell을 떼어내고 PBS로 희석 후 원심분리하여 pellet 만 얻었다. 얻어진 pellet을 1N NaOH 150ml를 넣고 95°C에서 2분간 멜라닌을 녹인 후 450nm에서 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.

8. 세포의 Viability 측정

MTT assay는 Mosmann의 방법을 이용하였다.¹⁰⁾

Melan-a cell을 Melan양 측정에 사용된 방법과 동일하게 1×10^5 cells/well로 조정하여

사용하였다.

추출용액에 의한 세포 독성평가를 위하여 24 well-plate(Corning, NY, U.S.A)에 cell 을 37°C 10% CO₂ incubator에서 전 배양을 시킨 후 세포가 바닥에 부착이 되면, well당 sample을 처리하고 10% CO₂ Incubator에서 37°C, 3일간 배양하였다.

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

9. MG(Methly gallate) 정량분석

methlygallate 정량분석은 Folin-Denis법⁹⁾을 약간 변형시켜 측정하였다.

해너콩의 Ethyl acetate층 추출물에 methlygallate 성분 분석에는 Waters사의 HPLC(Water2695)를 이용하였다. HPLC 분석에서 용리액은 acetonitrile 1,000ml 에 acetic acid 5ml를 혼합한 용액에 기울기 용리법으로 분리하였다. 이때 methly gallate 성분 분석을 위한 HPLC 기기조건을 Table 1 에 나타내었고 이동상의 기울기 용리 조건을 Table 2에 수록하였다. 또 이러한 분석조건으로 분리한 methlygallate 표준 물질의 크로마토그램을 농도별로 (Figure 2 ~5) 까지 나타내었다.

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

HPLC	waters Alliance system waters 2695
column	Atlantis dc-18, 5 μ m(4.6 \times 250mm)
Detector	photodiode array Detector
Flow rate	1.0mL/min
Injection volume	10 μ l
column Temp	40°C
sample Temp	10°C

Table 2. Mobile phase conditions of 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

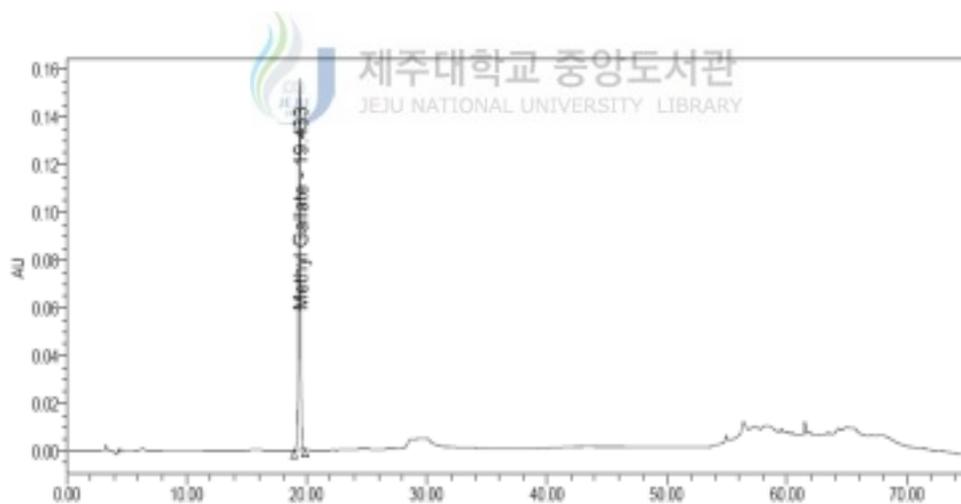


Figure 2. HPLC chromatogram of Methyl gallate 0.1(mg/mL)

III. 실험결과 및 고찰

1. DPPH 자유 radical 소거 활성

DPPH free radical법은 전자공여능을 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 515~517nm에서 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 비교 대조군으로 쓰인 Vit.C와 BHA(비교시 항산화 효과는 P1.은 활성 억제가 거의 없는 편이고 P2, P3.는 활성 억제가 상당히 뛰어난 편이다.(Figure 3.)

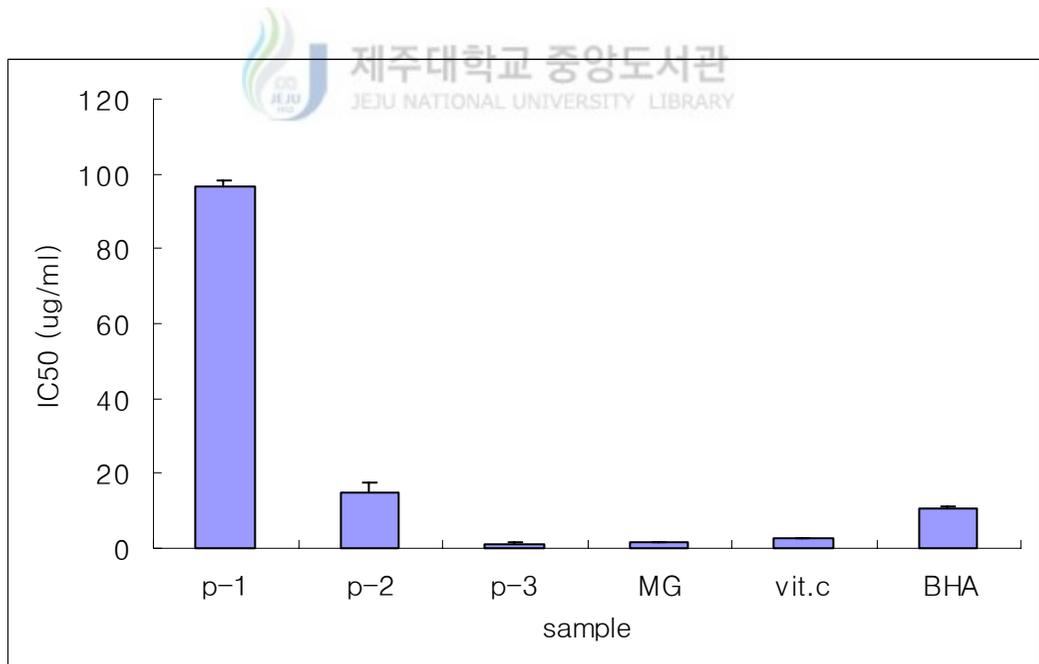


Figure 3. DPPH free radical scavenging effects of extracts of P1, P2 ,P3 of *Cancaia lineata*

2. Tyrosinase 활성도 실험

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

*cancalia lineata*에서의 EtOAc층에서 P1,P2 약간의 tyrosinase 활성 저해능을 가지고 있으며 P3는 그 것보다도 좋은 활성 저해능을 가지고 있는 것을 확인하였다.

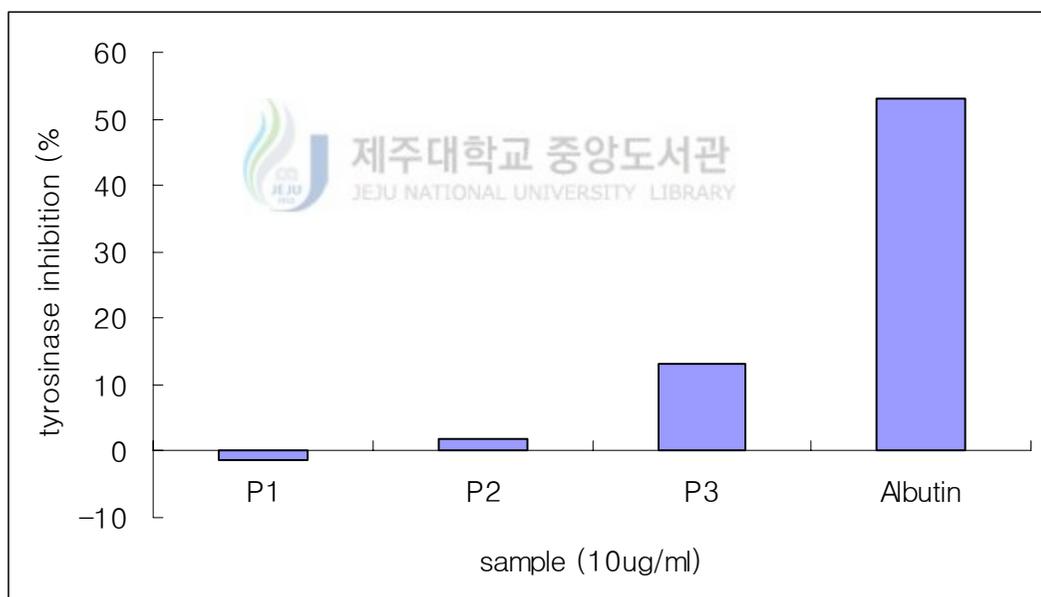


Figure 4. Inhibition of tyrosinase activity by ethyl acetate extract of *Cancaia lineata*

3. Elastase 활성저해 측정

Elastase의 활성에 영향을 주는 여러요인중의 하나는 자외선이다. 장기간에 걸친 태양광선 중의 자외선 노출은 피부의 광노화를 촉진시켜 주름과 색소 침착을 일으키고 피부의 긴장도를 감소시키는 원인이 된다.

이러한 elastase의 활성저해 측정에서 P1, P2, P3 전부 대조군인 빈랑자에 비해 활성저해 효과가 거의 없는 것으로 확인되었다.(Figure 5.)

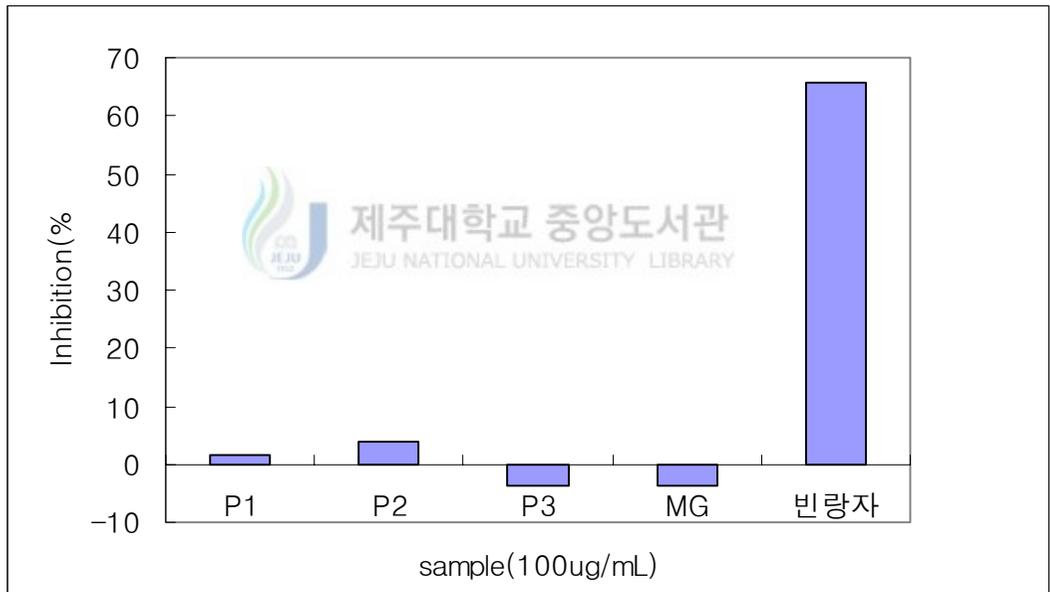


Figure 5. Inhibition of elastase activity by ethyl acetate extract of *Cancialia lineata*

4. melanin 양 측정

생체 피부에서의 색소 침착은 tyrosinase 활성을 감소시켜서 억제할 수 있다. 이는 Melanin 합성에 있어서 중요한 효소인 tyrosinase의 합성을 저해함으로써, 혹은 tyrosinase의 기질 유사체를 사용함으로써 가능하다.(쓸것임) 제23회 p110

EtOAc층에서 분리한 분획의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위해 최종산물인 melanin 양을 측정하였다.

melanin-a cell을 이용하여 melanin concentration를 조사한 결과 세포에 (1.0×10^5 cell/well)의 sample을 처리하였더니 대조군 Arbutin보다 P3가 melanon 생성 저해 효과가 좋게 나타나는 것을 확인 하였으며 ,P2는 오히려 증진작용을 보였다.(Figure 6~7.)

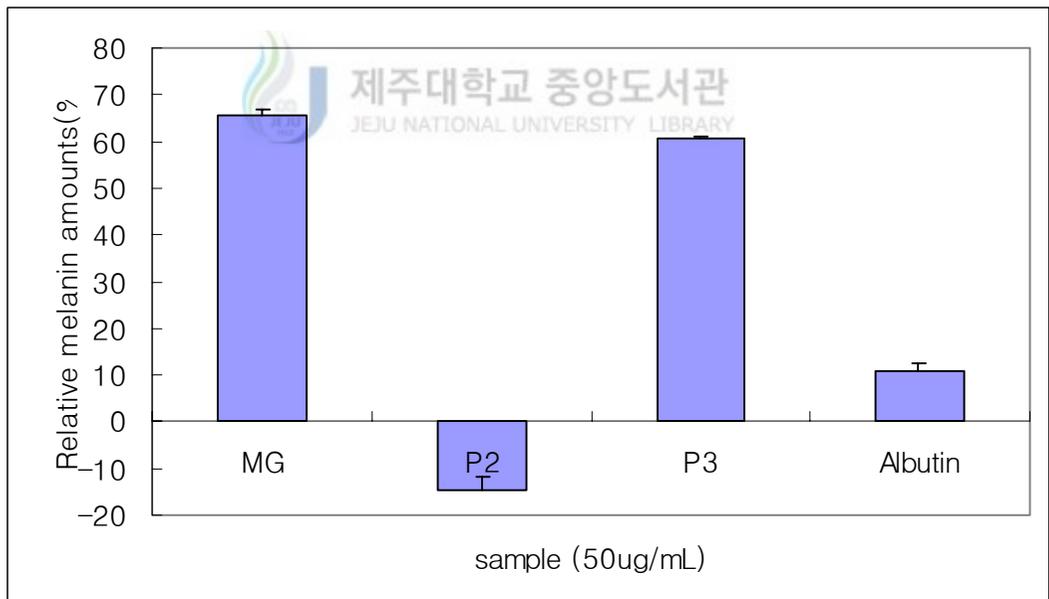


Figure 6. Effect of several subfractions of EtOAc extract of *Canavalia lineata* on melanin contents of melanin-a cell.

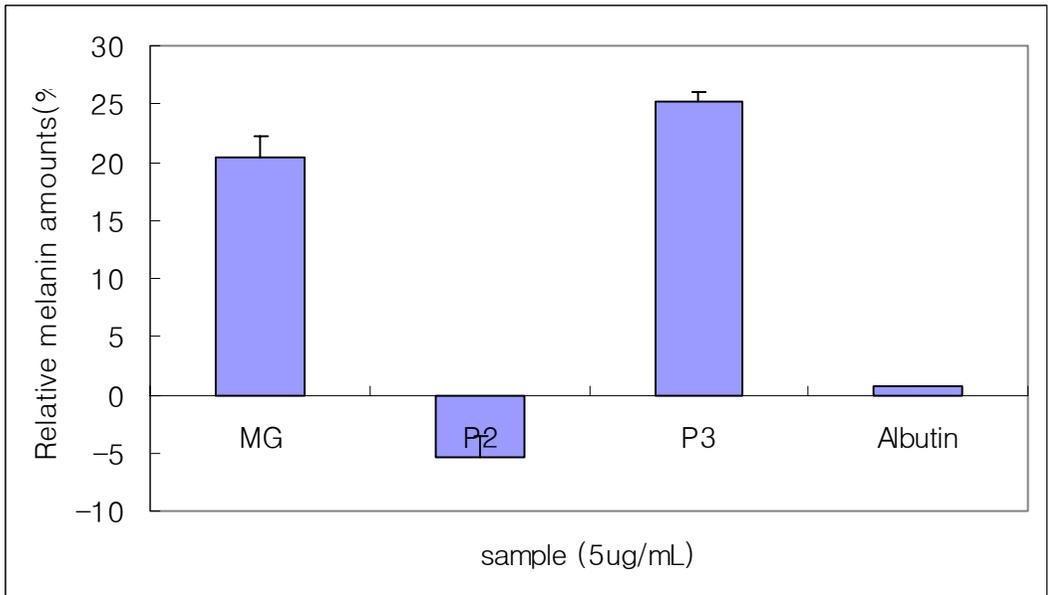
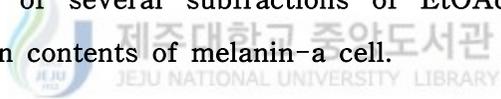


Figure 7. Effect of several subfractions of EtOAc extract of *Canavalia lineata* on melanin contents of melanin-a cell.



5. Cell viability (MTT assay)

Melanin-a cell에 대한 각 분획 sample 별로 melanin 생성 저해 효과를 따른 세포독성을 보기 위한 MTT assay를 했다.

세포에 (1.0×10^5 cell/well) sample을 처리하였을 때 대조군인 Albutin에 비해 P3는 독성이 높았다. 그렇지만 농도를 낮춰 살펴본 결과 세포독성이 그다지 크지 않게 나타나는 걸 확인 할 수 있었다. 마찬가지로 P2도 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 세포독성이 높았지만 낮은 농도인 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 세포독성이 많이 줄어들었다. (Figure 8~9.)

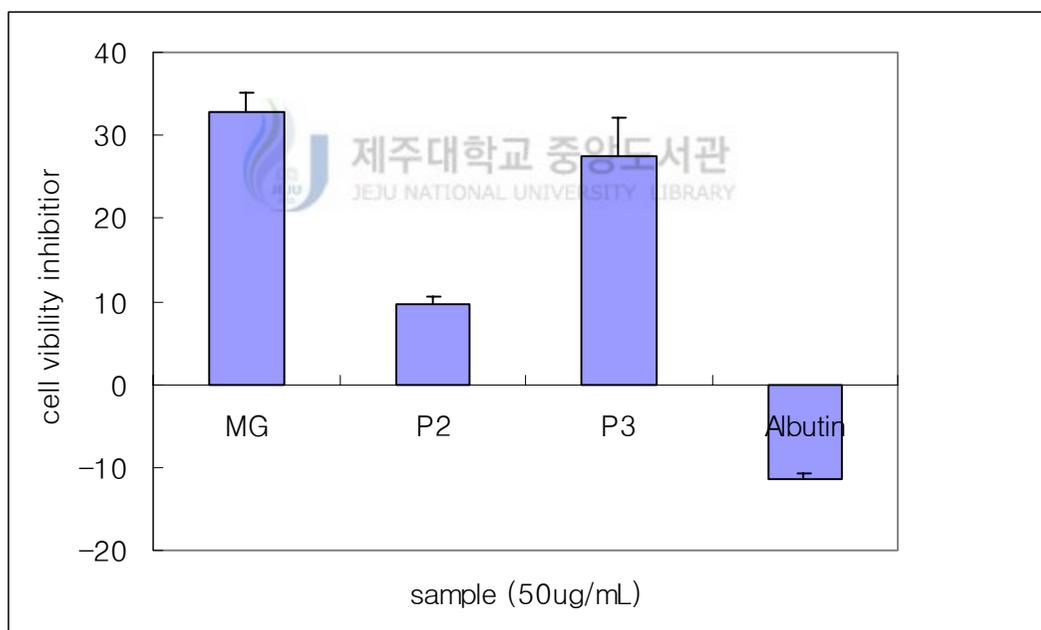


Figure 8. Effect of several subfractions of EtOAc extract of *Canavalia lineata* on proliferation of melanin-a cell.

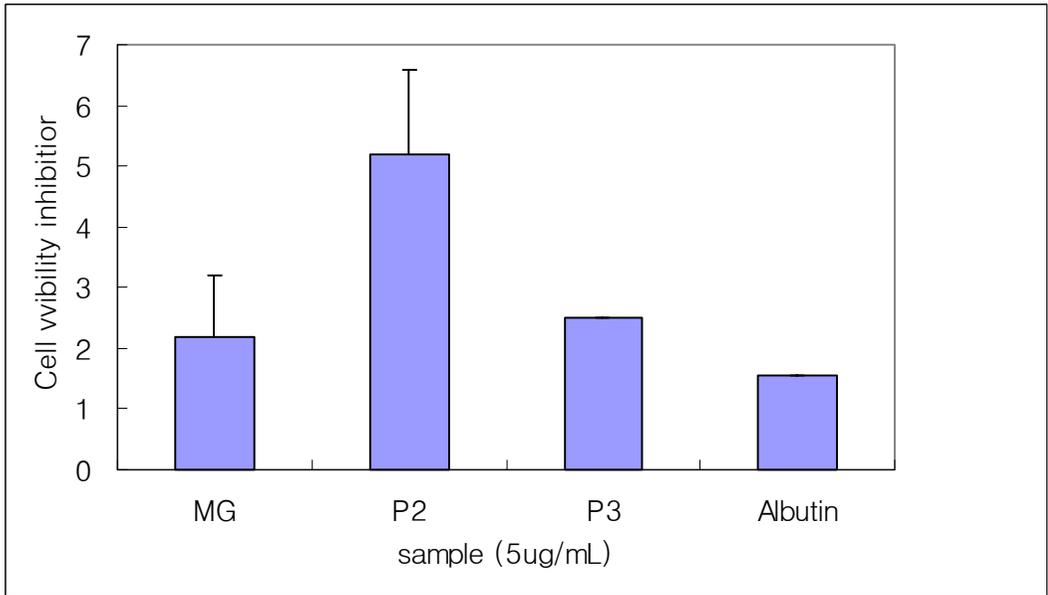


Figure 9. Effect of several subfractions of EtOAc extract of *Canavalia lineata* on proliferation of melanin-a cell.

1. 해너콩(*cancalia lineate*)성분에 대한 분리

1-1 P3의 분리 및 구조 확인

해너콩 (*cancalia lineate*)건조시료를 1220g로 80% Methanol 추출물을 증류수에 현탁하고 분별 깔때기에서 비극성용매부터 hexane chloroform(CHCl_3), 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 가지고 Revers phase-18 column chromatogrepy에서 MeOH / H_2O (2/3)의 전개용매로 전개시켜 분리하였다. 그 결과 단일 물질이라 여겨지는 물질을 분리하였고 이를 P3라 하였다. 이 분획을 가지고 NMR기기로 구조를 확인하였다.

P3의 ^1H -NMR을 확인 한 결과 7.04 ppm(2H, s)에서 나타나는 signal로 보아 벤젠에 붙어 있는 H로 예상할 수 있었다. 그리고 3.81ppm(2H, s)에서 나타나는 signal로 보아 sp^3 혼성구조로 옆에 전기 음성도가 큰 O원자가 붙어 있는 형태라고 예상할 수 있었다.(Figure 10).

C^{13} -NMR 스펙트럼을 통해서는 탄소수가 8개임을 확인 할 수 있었고, 169.15ppm의 위치로 보아 에스테르 같은 경우라 예측 할 수 있었고, 52.40ppm의 위치로 보아 sp^3 혼성구조로 옆에 전기 음성도가 큰 O원자가 붙어 있는 형태라고 예상할 수 있었다. 그리고 110ppm~150ppm에 위치하는 탄소가 6개로 보아 방향족 형태라 예측 할 수 있었다. (Figure 11)..

이상과 같은 정보를 종합하여 볼 때 P3을 예상한 결과 methyl gallate라 예상하고 시중에 파는 methyl gallate를 구입하여서 ^1H -NMR 과 C^{13} -NMR스펙트럼으로 확인 한 결과 같은 결과로 나와 P3는 methyl gallate로 확인 할 수 있었다.

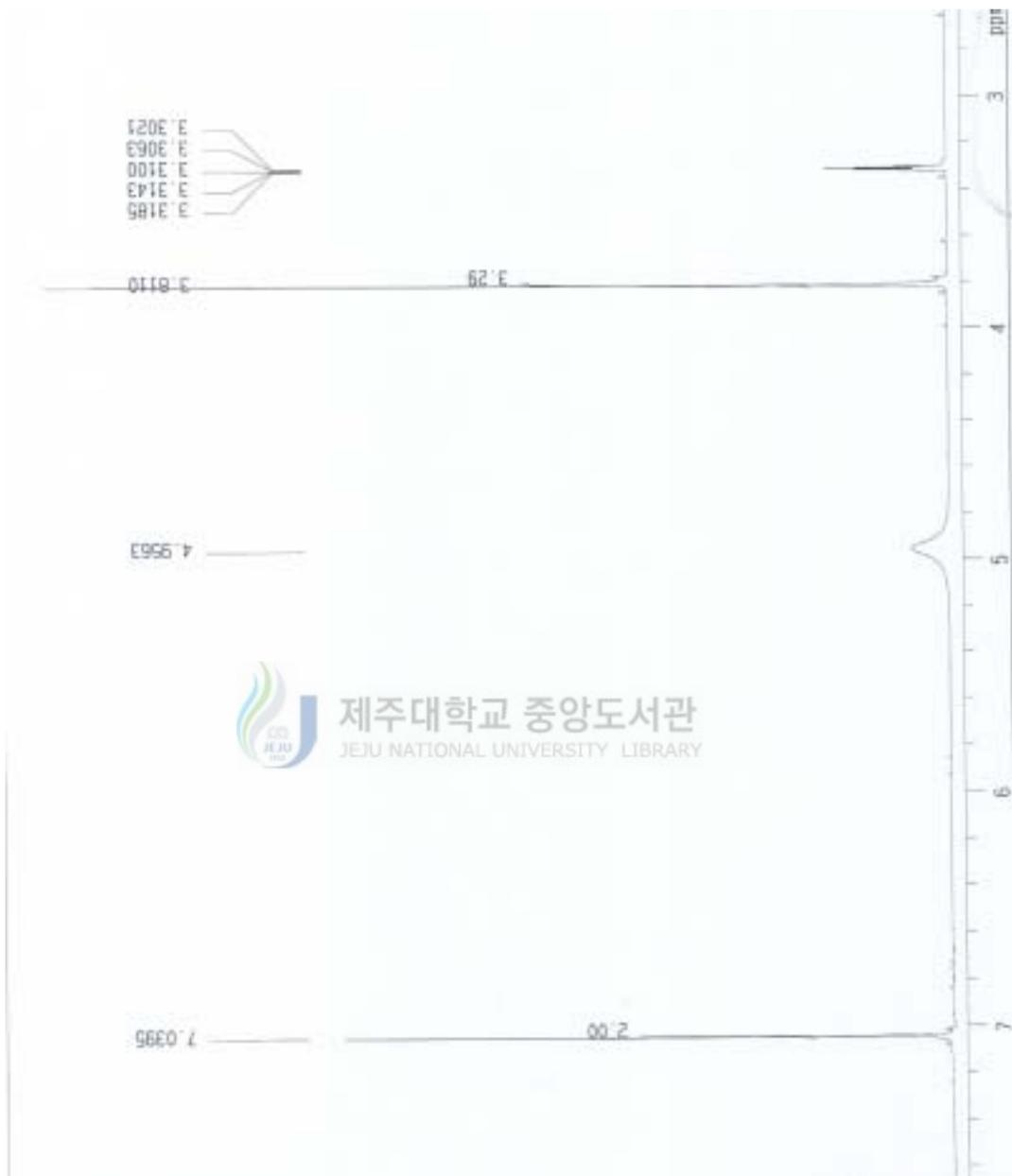


Figure 10. $^1\text{H-NMR}$ sepectrum of P3

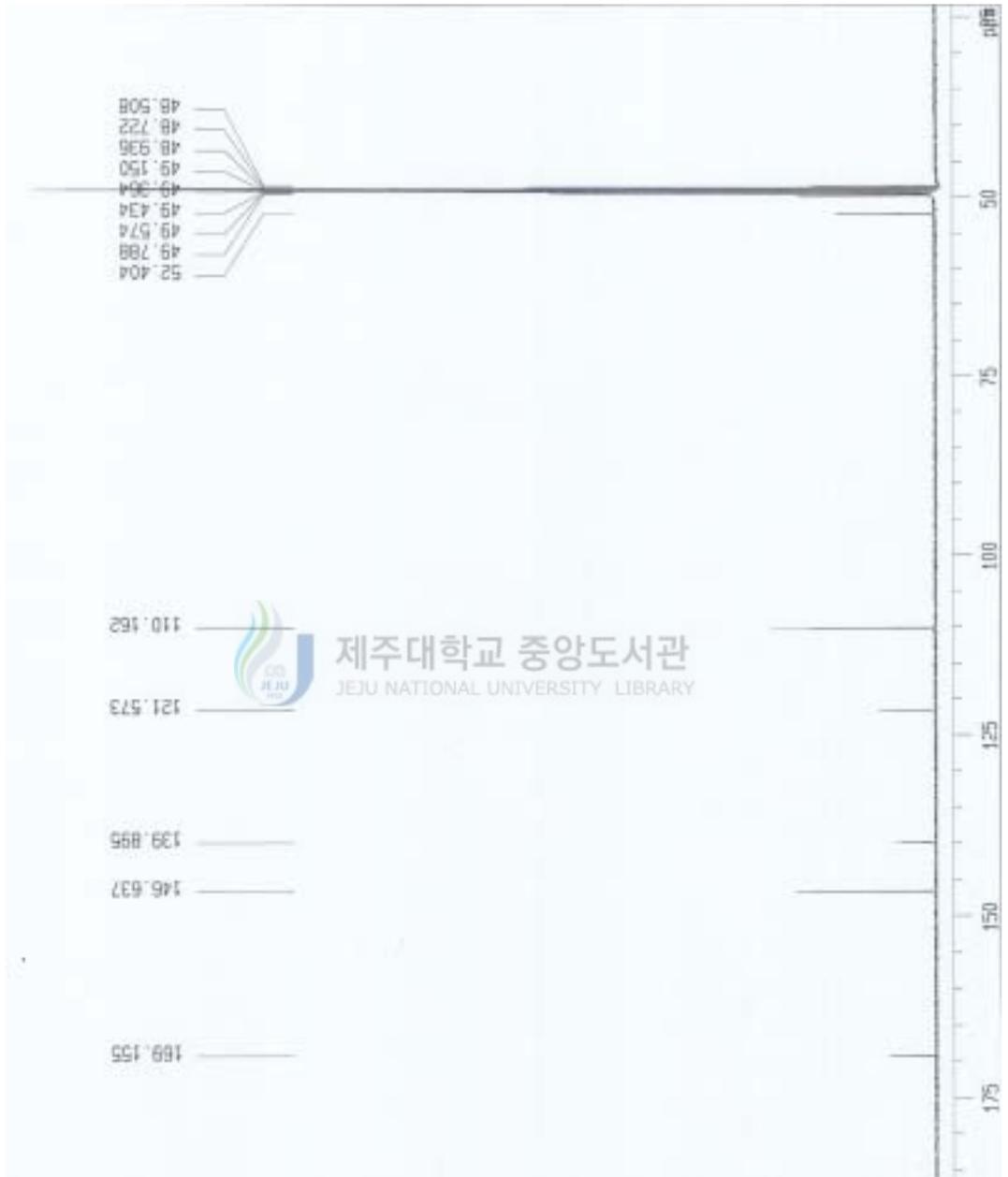


Figure 11. ^{13}C -NMR spectrum of P3

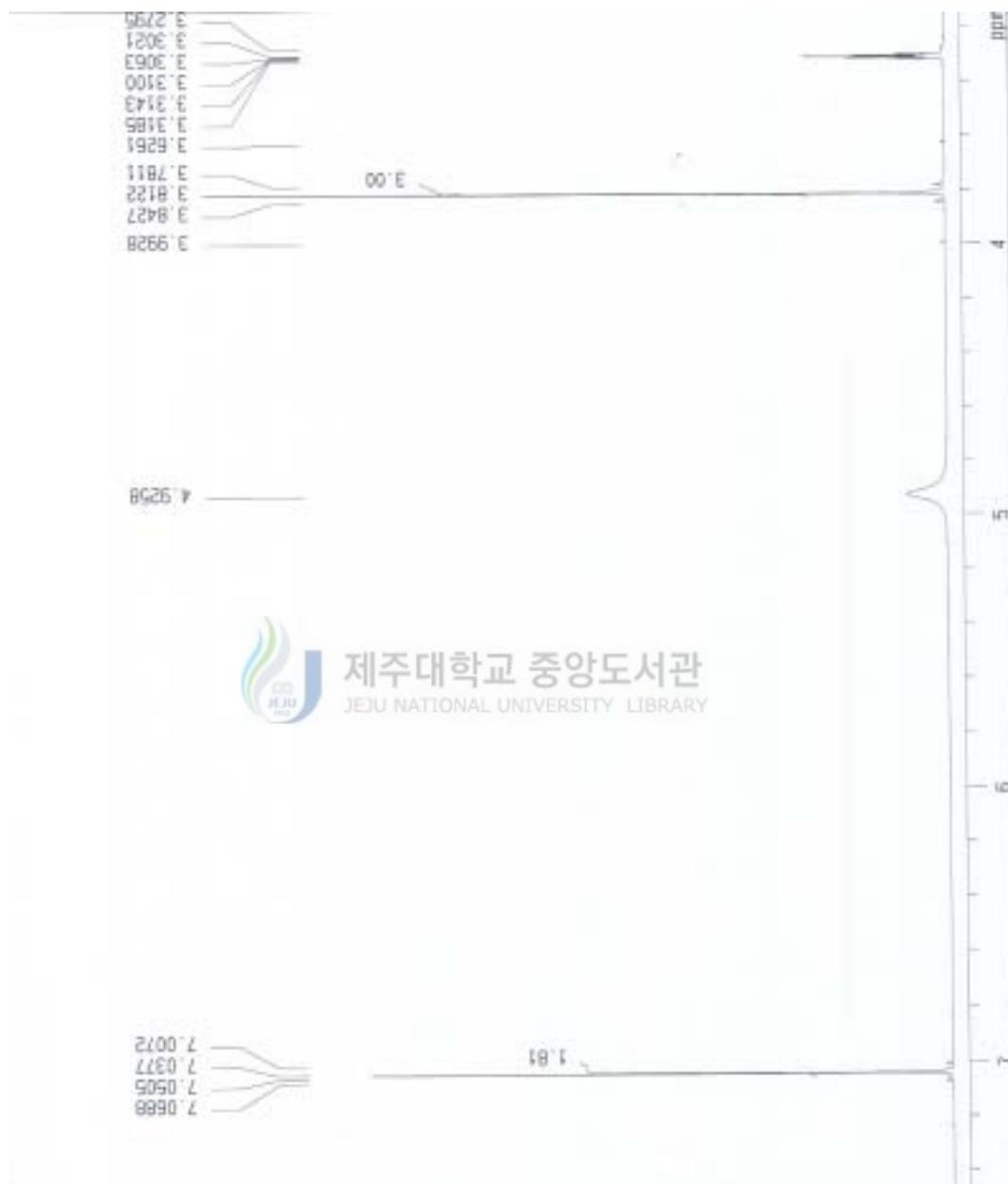


Figure 12. ^1H -NMR spectrum of methyl gallate

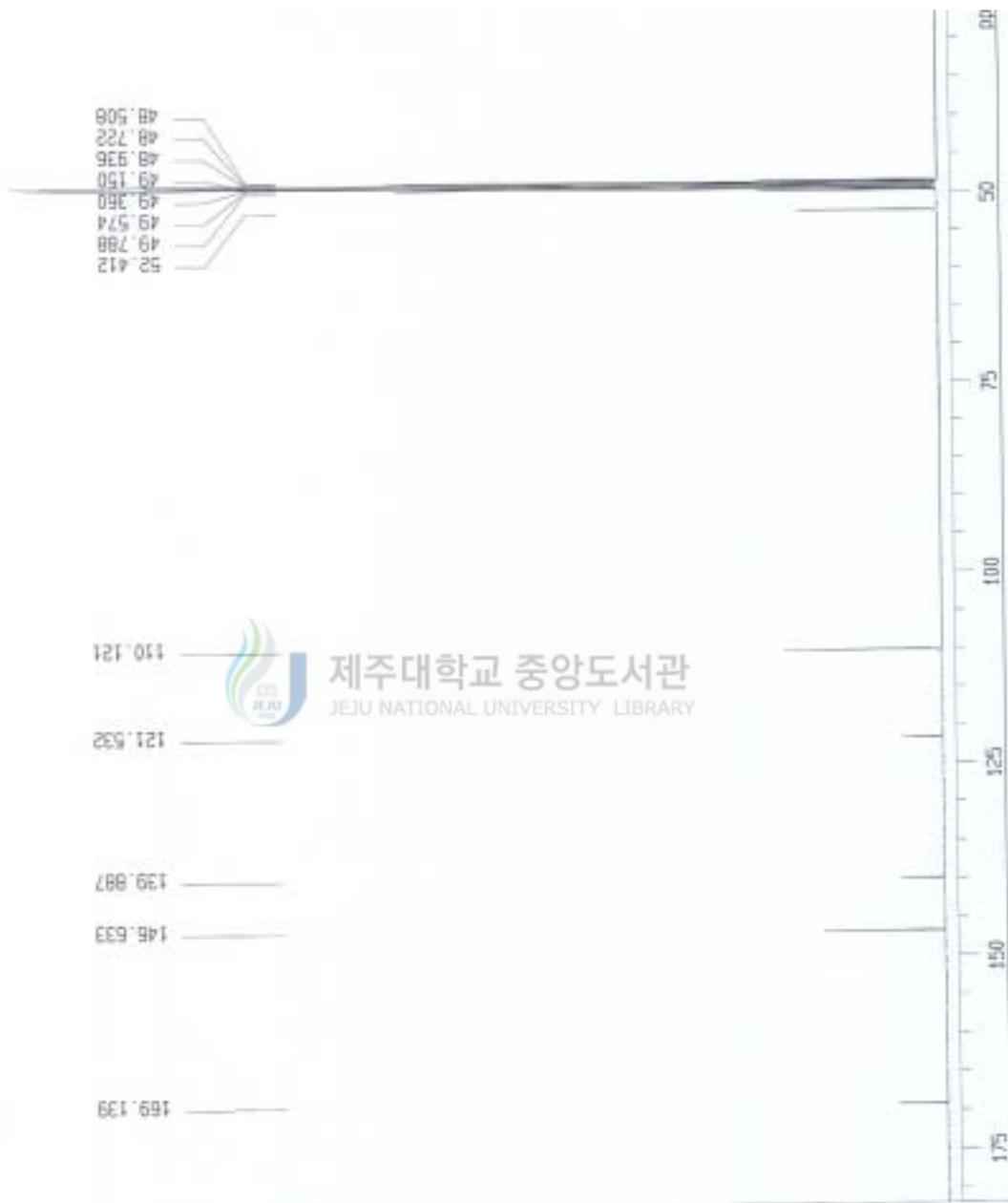


Figure 13. ^{13}C -NMR spectrum of methyl gallate

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

Position	P3		Position	Methyl gallate	
	δ_c	$\delta_H(\text{multi, } J\text{Hz})$		δ_c	$\delta_H(\text{multi, } J\text{Hz})$
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)



1-2 P2의 분리 및 구조 확인

1-1에서 와 같은 방법으로 분리한 P2를 NMR 기기로 확인 하였다.

시료 P2의 $^1\text{H-NMR}$ 과 $\text{C}^{13}\text{-NMR}$ spectrum data에서 보면 순수하게 분리 되었다고 보이고 , 당이 연결되어 있는 구조라고 예측이 되어진다. 본논문에서는 이물질에 대한 정확한 구조를 밝히지는 않고 NMR data 만 기록하였다. (Figure 14~15).

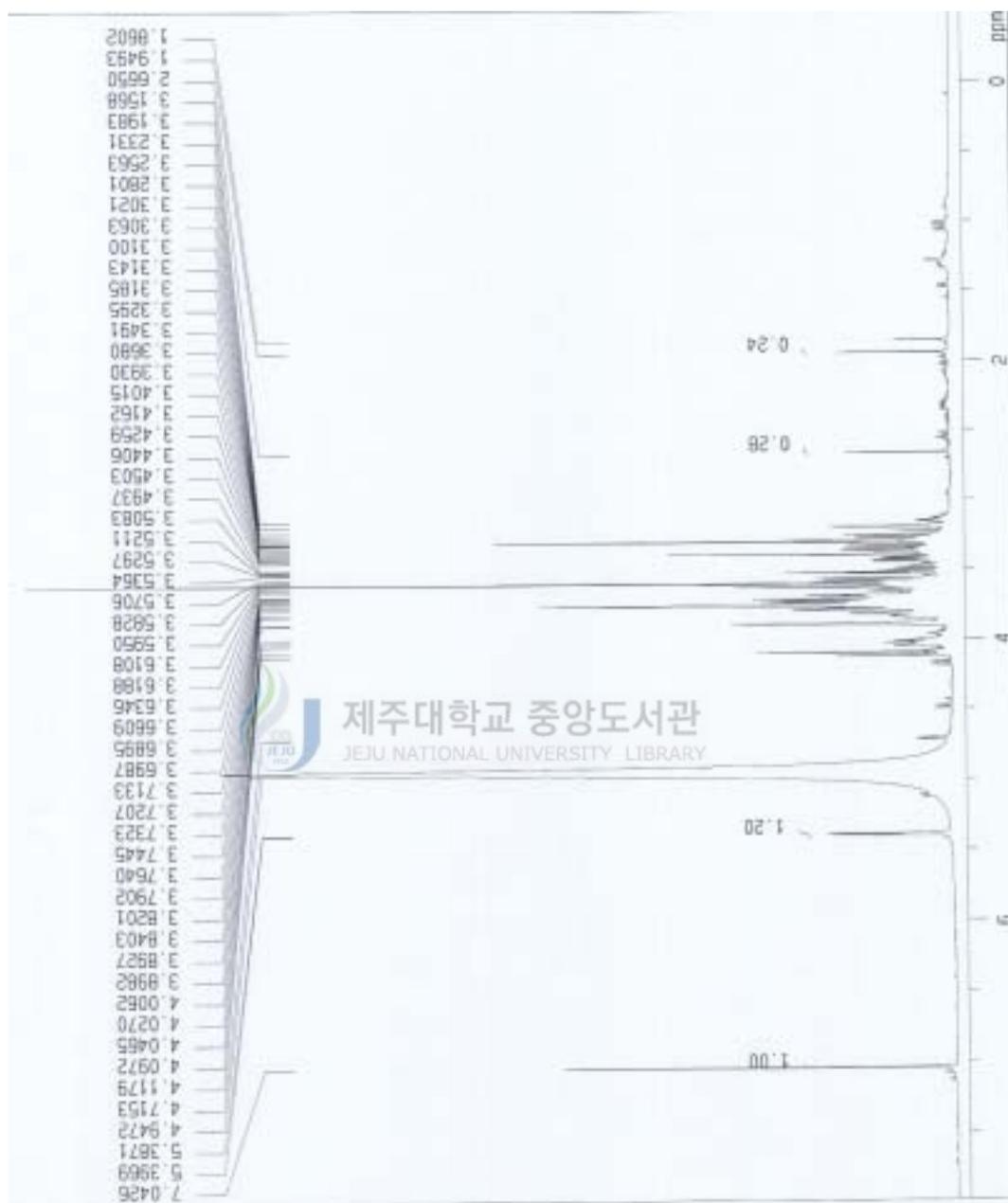


Figure 14. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of P2



Figure 15. ^{13}C -NMR spectrum of P2

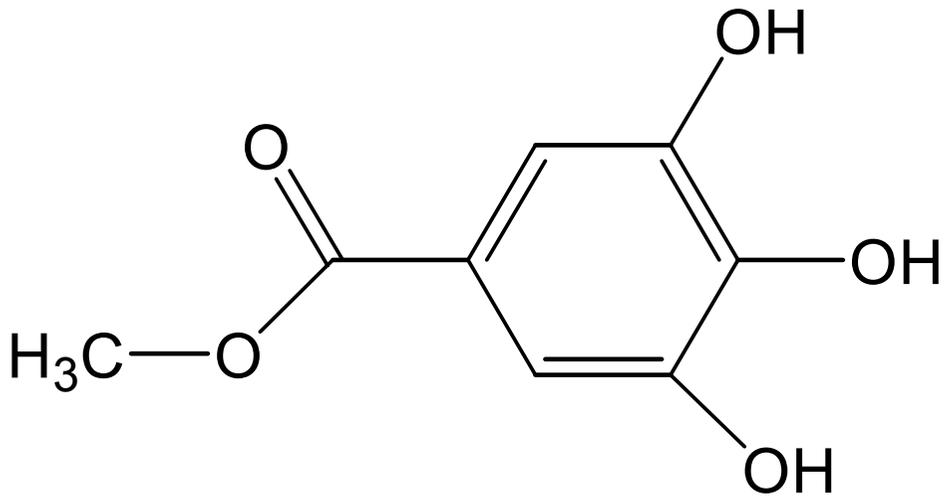


Figure 16. Structure of methyl gallate



2. MG(Methyl gallate) 정량분석

2-1 HPLC의 검선량

HPLC에 의한 Methyl gallate 정량분석을 위한 작성한 검량선을 (Figure 7)에 나타내었다. 이때 표준용액의 농도범위는 0.1, 0.5, 1.0, 5.0mg/mL이다 결과에서 보는 것처럼 Methyl gallate의 HPLC분석 검량선은 0.997424범위로 높은 상관성을 나타내었다.

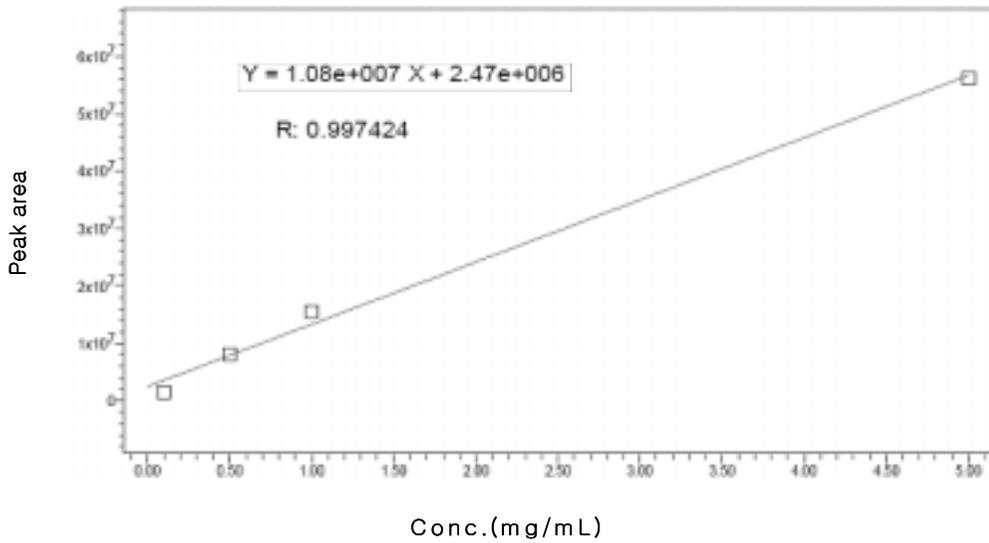


Figure 17. Calibration curves to determine the analyses methyl gallate

2-2 MG(Methyl gallate) 정량분석결과



해너콩 ethyl acetate (EtoAc)층에 존재하는 methyl gallate의 양을 정량 분석한 결과 이양은 ethyl acetate 추출량의 2.813(%)를 차지한다.

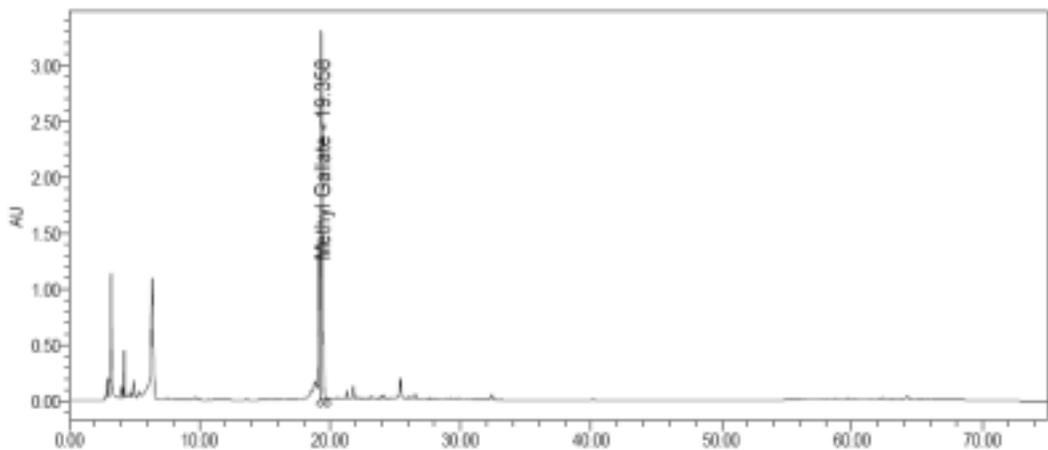


Figure 18. HPLC chromatogram for ethyl acetate extract of *Cancialia lineata*

IV. 결론

본 연구는 제주도에서 자라는 해녀콩 (*cancalia lineate*) 건조시료를 가지고 80% Methanol 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 (EtoAc)을 동결 건조하여 Revers phase-18 column chromatogrepy에서 MeOH / H₂O (2/3)의 전개용매로 전개시켜 분리하였다. 그 결과 단일 물질이라 여겨지는 물질을 분리하였고 이를 P3라 하였다. 이 분획을 가지고 NMR기기로 구조를 확인 및 시료 구입후 NMR기기로 구조를 비교한 결과 Methyl gallate 임을 확인하였다. P2를 NMR로 확인한 결과 당의 함유하는 구조임을 확인 할 수 있었다. 하지만 구조는 명확하게 알 수 없었다.

이 분획물로 MG의 정량 분석 결과 2.813(%) 으로 높은 함유량을 보였다. 그리고 항산화 실험 및 미백 등을 확인하기 위해 tyrosionase 활성을 본 결과 P1가 P2 약간의 tyrosionase 활성 저해능을 가지고 있으며 P3는 그 것보다도 좋은 활성 저해능을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다. melanin-a cell을 이용하여 melanin concentrents를 조사한 결과 세포에 (1.0×10⁵ cell/well)의 sample을 처리하였더니 대조군 Arbutin보다 P3가 melanon 생성 저해 효과가 좋게 나타나는 것을 확인 하였으며, P2는 흑화작용을 보였다. 그러나 세포독성을 P2, P3 전부다 가지고 있었지만 농도를 낮추고 실험한 결과 세포독성이 많이 줄어드는 것을 확인 할 수 있었다.

각 분획별로 항산화 효과를 확인하기 위하여 DPPH free radical 소거 활성 정도를 비교 대조군으로 쓰인 Vit.C와 BHA에 대하여 비교시 항산화 효과는 P1은 활성 억제 가 거의 없는 편이고 P2, P3는 활성 억제가 상당히 뛰어난 편이다

본 연구의 실험결과를 통하여 제주도에서 자라는 해녀콩을 이용한 항산화제 개발 가능성을 엿볼 수 있었다.

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. Lsolation of Antioxidant and Antibrowning Substance from Chionamthus 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. Blois, M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181** : 1199.
8. Gutfinger, T. J. *Am. Oil Chem.Soc.*, 1981, **58**, 966-968
9. P.R. Gordon, C. P. Mansur, and B. A. Gilcrest, Regulation of human melanocyte derived factors, *J. Invest. Dermatol.*, 2, 566(1989)
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 syrvall application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65**, 55(1983)

감사의 글

대학원에 들어 온지 벌써 2년 반이란 시간이 지났다는 생각에 작은 미소가 띄워집니다. 스스로 공부하겠다는 생각에 들어왔지만 지금 곰곰이 생각해보면 제가 한 게 뭐 있을까 그런 후회만 듭니다. 처음 실험실에 들어왔을 때 내가 무엇을 해야 할지 앞으로 뭘 해야 할지 모를 때 옆에서 항상 도움을 준 우리 생화학 실험실 식구들에게 정말 감사드립니다. 항상 철없이 날뛰는 저를 다독겨려주신 희정누나, 은숙이, 지금 외국에 있는 경범이와 우리 이쁜막내 수복이와 주희, 과묵하지만 술먹으면 웃긴 승우, 마지막으로 상훈이에게 다시 감사합니다.

그리고 항상 뒤에서 버팀목이 되어주신 이선주교수님과 이하 화학과 교수님들에게 모두 감사드립니다.

또 우리 화학교육대학원생 여러분께 감사합니다. 그리고 실험 많이 도와준 종현이형 정말 고마워요 ..

마지막으로 우리 부모님 그리고 누나하고 우리막내에게 고맙다는 말을 하고 싶습니다.

모두들 감사하고 고맙습니다.

