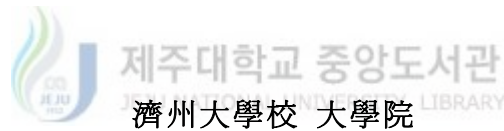


碩士學位論文

손바닥 선인장(*Opuntia ficus-indica*)의
라디칼 소거 활성, Tyrosinase 억제 활성,
항알레르기 활성 검색 및 유효성분 분리



化學科

尹 振 碩

2000年 1月

손바닥 선인장(*Opuntia ficus-indica*)의
라디칼 소거 활성, Tyrosinase 억제 활성,
항알레르기 활성 검색 및 유효성분 분리

指導教授 李 南 昊

尹 振 碩

이 論文을 化學科 碩士學位 論文으로 提出함



2000年 1月

尹振碩의 化學科 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

2000年 1月

Separation of Active Components, and Screening
of the Radical Scavenging Effects, Tyrosinase
Inhibition and Anti-allergic Activities Using
Opuntia ficus-indica

Jin-Suk Yun

(Supervised by Professor Nam Ho Lee)



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

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2000. 1. .

Abstract

We have examined radical scavenging effects, tyrosinase inhibition activities and anti-allergic activities on the methanol extracts of *Opuntia ficus-indica* cultivated in Cheju island. By the comparison of the four samples, methanol and 50% methanol extracts of respective fruits and stems of *Opuntia*, the most desirable activities were obtained in the sample of the stems methanol extracts.

The aq. methanol extracts of the *Opuntia ficus-indica* were subjected to chromatographic separations including preparative HPLC. Analysis of the components using the NMR spectra showed the presence of a flavonoid component. Further study is necessary to identify the active components in more detail.



목 차

| | |
|------------------------|-----|
| Abstract | i |
| List of figures | iii |
| List of tables | v |
| | |
| I. 서론 | 1 |
| II. 재료 및 방법 | 3 |
| 1. 재료 | 3 |
| 2. 시약 및 기기 | 3 |
| 3. 실험방법 | 4 |
| 1) 선인장의 메탄올 추출물 제조 | 4 |
| 2) 라디칼 소거 활성 측정 | 7 |
| 3) Tyrosinase 억제 활성 검색 | 7 |
| 4) 수동피부감작 실험 | 7 |
| 5) 적출 기관지 실험 | 8 |
| 6) 선인장으로부터 유효성분의 분리 | 8 |
| III. 결과 및 고찰 | 10 |
| 1) 라디칼 소거 활성 측정 | 10 |
| 2) Tyrosinase 억제 활성 검색 | 14 |
| 3) 수동피부감작 실험 | 15 |
| 4) 적출 기관지 실험 | 16 |
| 5) 선인장으로부터 유효성분의 분리 | 16 |
| IV. 결론 | 27 |
| V. 참고문헌 | 29 |

List of Figures

- Figure 1.** Isolation procedure using *Opuntia ficus-indica*.
- Figure 2.** Active oxygen generating factors in environments.
- Figure 3.** Radical scavenging effect of MeOH extract from *Opuntia ficus-indica* stem.
- Figure 4.** Radical scavenging effect of 50% MeOH extract from *Opuntia ficus-indica* stem.
- Figure 5.** Radical scavenging effect of MeOH extract from *Opuntia ficus-indica* fruit.
- Figure 6.** Radical scavenging effect of 50% MeOH extract from *Opuntia ficus-indica* fruit.
- Figure 7.** Melanin synthesis pathway
- Figure 8.** Ethylacetate 추출물의 TLC 결과
- Figure 9.** Separation of I-fr3 of EtOAc extract from *Opuntia ficus-indica* using HPLC
- Figure 10.** ^1H -NMR spectrum of I-fr1 of EtOAc extract from *Opuntia ficus-indica*
- Figure 11.** ^1H -NMR spectrum of I-fr2 of EtOAc extract from *Opuntia ficus-indica*
- Figure 12.** ^1H -NMR spectrum of I-fr3 of EtOAc extract from *Opuntia ficus-indica*
- Figure 13.** ^{13}C -NMR spectrum of I-fr3 of EtOAc extract from *Opuntia ficus-indica*
- Figure 14.** ^1H -NMR spectrum of I-fr3 of EtOAc extract from *Opuntia ficus-indica*

- Figure 15.** ^{13}C -NMR spectrum of I-fr3 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*
- Figure 16.** ^1H -NMR spectrum of I-fr4 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*
- Figure 17.** ^1H -NMR spectrum of I-fr5 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*
- Figure 18.** ^1H -NMR spectrum of I-fr6 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*
- Figure 19.** ^1H -NMR spectrum of I-fr3-1 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*
- Figure 20.** ^1H -NMR spectrum of I-fr3-2 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*
- Figure 21.** ^{13}C -NMR spectrum of I-fr3-2 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*
- Figure 22.** ^1H -NMR spectrum of I-fr3-3 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*
- Figure 23.** ^{13}C -NMR spectrum of I-fr3-3 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*
- Figure 24.** ^1H -NMR spectrum of I-fr3-4 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*
- Figure 25.** ^1H -NMR spectrum of I-fr3-5 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*

List of Tables

- Table 1.** DPPH radical scavenging effects and tyrosinase inhibition effects of *Oputia ficus-indica* extracts.
- Table 2.** Inhibitory activity of *Oputia ficus-indica* extracts on PCA response in rats.
- Table 3.** Effects of *Oputia ficus-indica* extracts on isolated tracheal contraction of guinea pigs induced by histamine and leukotriene D₄
- Table 4.** I-fr3-2와 t-dihydrokaempferol의 ¹³C NMR spectrum data 비교



I. 서 론

손바닥선인장(*Opuntia ficus-indica*, 제주도 지방 기념물 35호)은 선인장과(Cactaceae)에 속하는 열대성 식물로 ‘백년초’라고도 한다. 손바닥 선인장은 다년생초본(多年生草本)이며 높이 2m 안팎이고 편평한 가지가 많이 갈라진다. 손바닥선인장의 줄기는 짙은 녹색이고 긴 타원형 또는 긴 도란형이고 육질(肉質)이며 표면에 길이 1~3cm의 가시가 2~5개씩 돋아 있고 바로 옆에 털이 있다. 오래된 줄기는 나무처럼 굵고 둥근 원줄기 위에서 가시가 사방으로 갈라지며 잎은 일찍 떨어진다. 7월에 꽃이 피고 꽃은 황색이며 줄기 윗가장자리에서 큰 레몬 모양의 꽃이 피고 많은 꽃받침 잎과 꽃잎 및 수술이 있으며 암술은 1개이고 자방은 하위(下位)이다. 9월에 열매가 성숙되며 이런 열매는 서양배와 같은 모양이고 많은 종자(種子)가 들어 있으며 먹기도 한다. 손바닥선인장은 열대지방이 원산지이며 관상용뿐만 아니라 각처의 원예농가에서 재배하기도 한다. 우리나라는 제주도 서남쪽 해변마을과 마라도 남단의 해변에 야생으로 자생하고 있는 귀화식물(歸化植物)이다.

손바닥선인장은 예로부터 민간요법을 통하여 여러 가지 효능이 알려져 있다. 소화기능의 향상, 창상치유 효과 및 류마치스 관절염에 효능이 알려지는 등 민간 요법에 일부 활용되어 왔다. 특히 각혈, 관절염, 기관지 폐렴, 천식, 늑막염, 화농성 염증, 장염, 만성대장염, 신장결핵, 폐결핵 등의 질병에 항염증제로 널리 사용되어 왔다. 그리고 한방에서는 본초강목이라든지 중약대사전등에 기록되어 있는 것처럼 선인장의 뿌리와 줄기에 관하여 기행혈활(氣行血活), 청열해애(淸熱解毒)의 효능이 있어 심장과 위의 통증, 인후통, 치질, 화상, 이질, 뱀에 의한 교상 등의 치료에 사용한다. 선인장의 열매는 비장을 보호하여 위를 건강하게 하고 원기가 없어 오랜 기간 설사하는데에도 효능이 있다고 기술되어 있다.

본 연구의 목적은 제주도 특산(제주도 지방기념물 제35호)인 손바닥 선인장의 친피부적 성질을 조사하여 유효 성분 탐색 및 기능성 화장품등의 원료 물질 개발을 위한 기초자료를 확보하는 데에 있다. 이를 위하여 라디칼 소거 활성, tyrosinase 저해 활성 및 항알레르기 활성을 조사하였다.

피부노화의 원인 중의 하나는 라디칼 인자인 유해산소 등에 의한 피부 세포의 산화라고 여겨지고 있다. 본 연구에서는 손바닥 선인장의 항산화활성을 DPPH법¹을 이용한 라디칼 소거 활성을 통하여 조사하여 보았다. 생체 내의 melanin은 tyrosine으로부터 중요한 초기 단계인 tyrosinase의 효소작용을 거쳐서 생합성된다. 따라서 tyrosinase의 억제제는 피부의 멜라닌 색소의 조절을 통하여 피부 미백효과를 기대할 수 있다. 미백효과를 염두에 두어, 손바닥 선인장의 tyrosinase 억제 활성²을 조사하였다. 산업화가 가속되면서 현대인들은 다양한 형태의 allergen에 노출되어 있어서, 알레르기에 의한 피부 질환의 가능성이 높아지고 있는 실정이다. 따라서, 손바닥 선인장의 항알레르기 효과를 조사하여 보았다. 알레르기 반응의 *in vivo* 모델인 rat homologous passive cutaneous anaphylaxis(PCA)³을 이용하여 약효를 확인하였다.

한편, 최근에 손바닥 선인장의 효능과 성분에 대한 다양한 연구 결과들이 보고되고 있다. 노화 촉진 마우스를 대상으로 한 항산화효과,⁴ 마우스를 대상으로 한 방사선 방호효과,⁵ 랫트를 대상으로 한 면역계 세포의 활성화에 대한 연구,⁶ 당뇨 모델 랫트를 이용한 혈당 강하 효과⁷등이 발표된 바 있다. 또한 성분에 대한 연구로서, 선인장의 매탄올 수용액 추출물을 조사한 바에 의하면, flavonoid 및 페놀성 물질의 함량이 시료 부위에 따라 최대 4.9%에 이르고 있음이 보고되어 있다.⁸ 이는 다른 식물에 비하여 매우 높은 함량비율을 나타낸다. 단일 성분에 대한 연구로서 flavonoid 성분인 *t*-dihydrokaempferol 및 *t*-dihydroquercetin이 손바닥선인장에서 분리되어 보고된 바 있다.⁹

지금까지 이뤄진 연구는 효능에 대한 것에 그치고 그 구조적인 측면에서의 연구는 그다지 많지 않다. 이에 본문에서는 앞서 연구된 자료를 바탕으로 손바닥선인장에서 다양한 효능을 보이는 물질들에 대한 보다 정확한 구조를 밝히기 위한 초기 단계인 단일물질로의 분리를 시도했다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

손바닥 선인장 - 선인장 줄기 및 열매는 제주도 한림읍 금능리 선인장마을에서 경작한 시료를 사용하였다. 수확하여 잘게 절단한 선인장을 냉동 건조시킨 후, 미분쇄한 분말로 -20°C 에서 보관하면서 사용하였다.

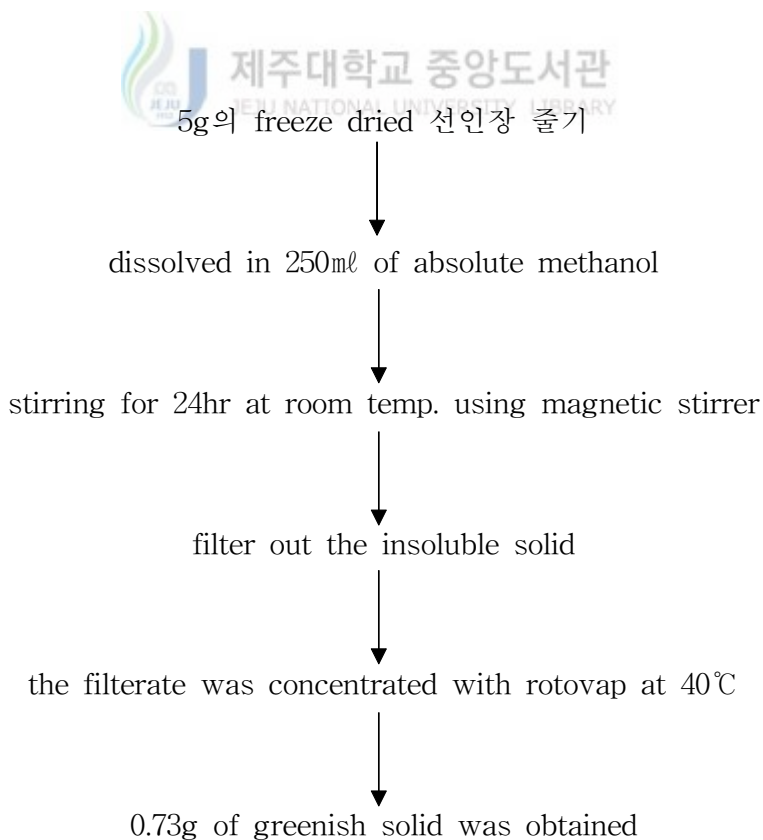
2. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 용매들은 Merck Co., Junsei Co., Hyman Co.사의 제품을 사용하였다. Normal-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 60 (230-400mesh ASTM, Merck)이 사용되었으며 분리과정에서 사용된 TLC(Thin-Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silica gel 60 F254, 2.0mm, Merck)를 사용하였다. TLC상에서 분리된 물질들을 확인하기 위해 UV lamp를 사용하거나 혹은 visualizing agent를 침적시킨 후 plate를 dry gun을 이용하여 건조시켰다. visualizing agent는 3% KMnO_4 , 20% K_2CO_3 , 그리고 0.25% NaOH 을 혼합한 수용액을 사용하였다. HPLC(High Performance Liquid Chromatography)는 Waters 2487(Dualabsorbance detector, Waters)를 사용하였고, ODS column을 장착하여 분리했다. NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400(FT NMR system, JEOL)을 이용하여 확인했다.

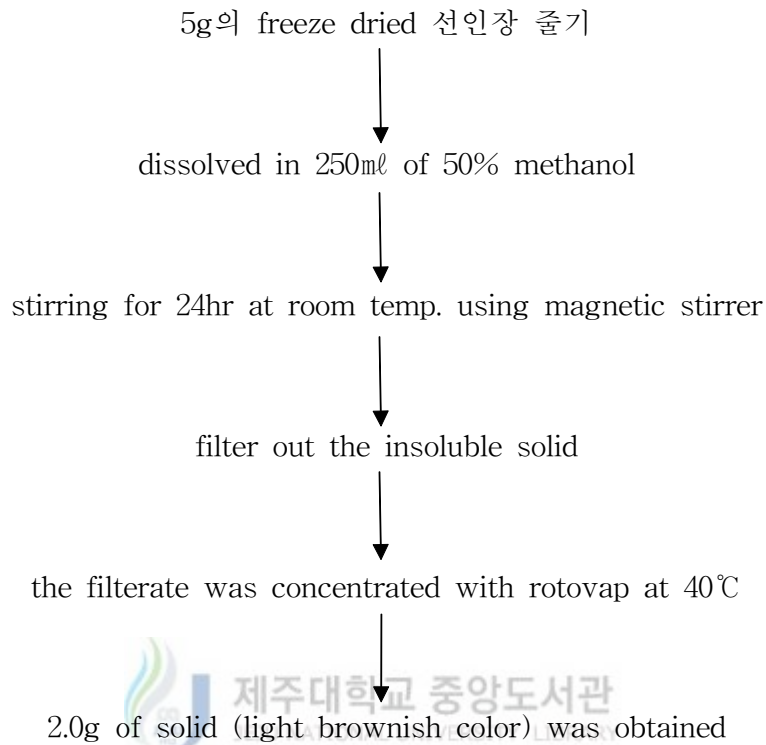
3. 실험방법

1) 선인장의 메탄올 추출물 제조 - 메탄올 250ml가 들어 있는 플라스크에 선인장 열매 혹은 줄기 분말(5g)을 넣고 상온에서 24시간 교반하였다. 난용성 물질을 여과하여 분리한 후 메탄올 용액을 얻고, 여과액은 40℃에서 회전농축기를 이용하여 농축시켰다. 2.0g 내외의 메탄올 추출물을 얻었다. 선인장 열매의 경우, 라디칼 소거활성 시험에 방해가 되는 붉은 보라빛의 색소는 탄소 분말을 처리하여 탈색하였다. 메탄올 수용액(50% methanol)추출물의 경우도 같은 방법을 이용하여 제조하였다. 그러나, 이 경우 점액성 물질이 과다 존재로 funnel을 이용한 여과과정이 용이하지 않아 원심분리기를 이용하여 상층액을 취하여 추출액으로 사용하였다.

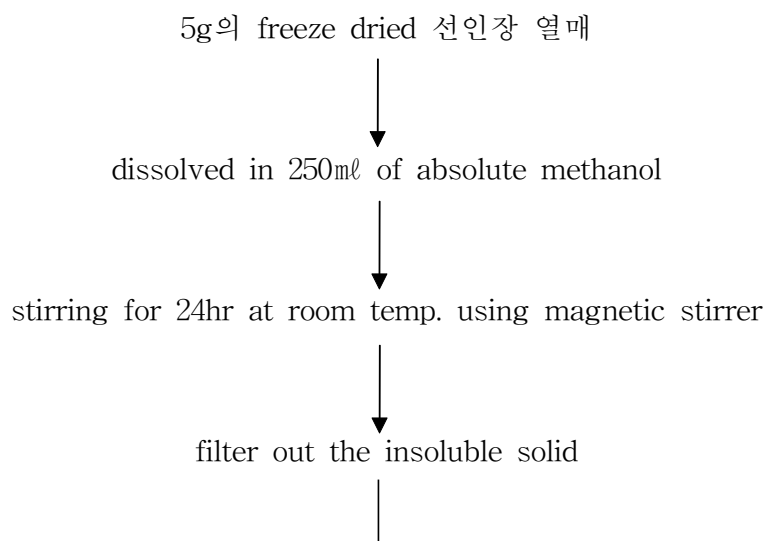
① 선인장 줄기 추출물(methanol 이용)

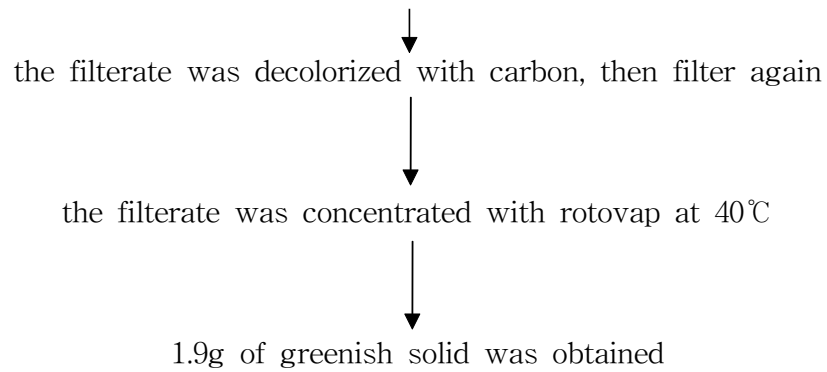


② 선인장 줄기 추출물(50% methanol 이용)

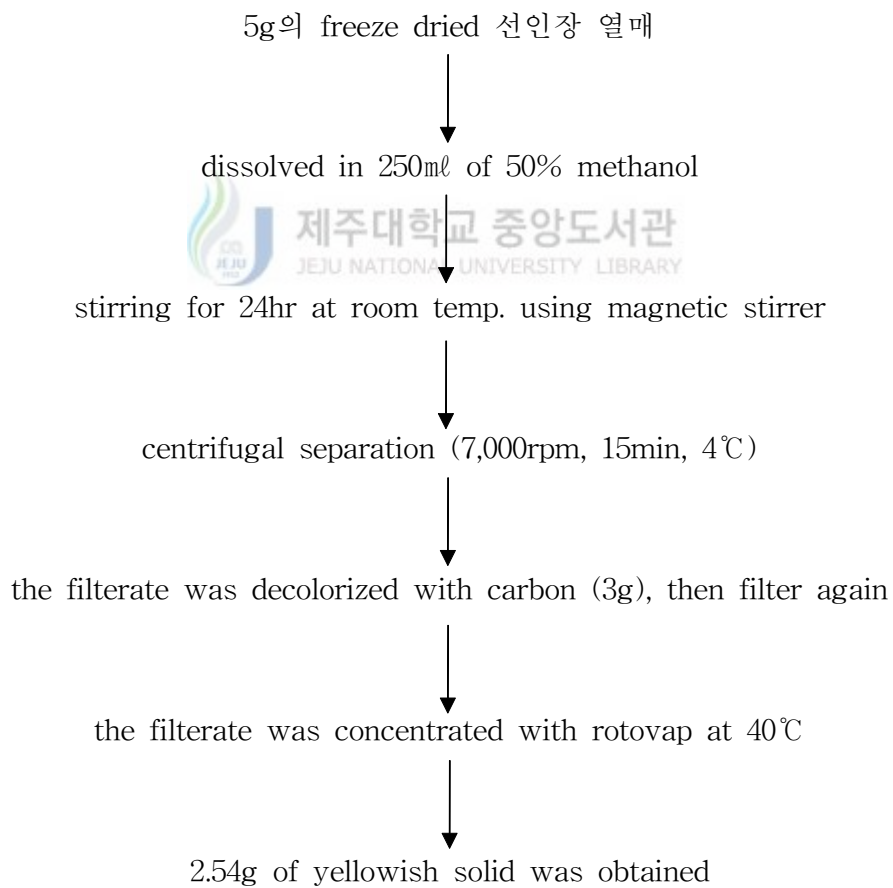


③ 선인장 열매 추출물(methanol 이용)





④ 선인장 열매 추출물(50% methanol 이용)



2) **라디칼 소거 활성 측정¹⁾** - 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Aldrich) 20mg을 에탄올 150ml에 녹여 DPPH 용액을 제조하였다. 이 용액 60 μ l에 DMSO 250ml를 첨가시키고 적당량의 에탄올로 희석한 후 10초간 진탕시켰다. 이때 518nm의 파장에서 대조군의 UV-Vis. 분광기 흡광도가 0.94-0.97이 되도록 조정하였다. 용매 10ml에 분말로 추출된 시료 0.100g을 섞은 후 충분히 녹이고 준비된 DPPH 900 μ l에 시료용액 100 μ l를 넣고, 1mM의 농도로 맞춘 후 흡광도를 측정하였다. 이때 518nm에서, 대조군에 대한 흡광도 감소치(ΔA)를 항산화 활성도로 나타내었다.

3) **Tyrosinase 억제 활성 검색²⁾** - 150 μ l의 mushroom tyrosinase(150unit, Sigma), 225 μ l(2.5mM)의 L-tyrosine, 225 μ l의 0.4M HEPES buffer(pH6.8), 그리고 300 μ l의 에탄올 용액 혹은 시료(1mg/ml)용액을 섞은 후 배양 전 그리고 15분간 배양 한 후 475nm에서 흡광도를 각각 측정하여 억제되는 정도를 관찰하였다. Tyrosinase 억제 정도는 다음과 같이 측정하였다.

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

A와 B는 각각 시료를 넣은 용액의 배양 전 및 후의 흡광도이며, C와 D는 각각 시료를 넣지 않은 용액의 배양 전 및 후의 흡광도이다.

4) **수동피부감작 시험(Passive Cutaneous Anaphylaxis, PCA)³⁾** - Ovalbumin(Grade IV, Sigma) 1mg/rat와 Pertussis antigen(Difco) 0.7mg을 250-300g의 웅성 Wistar rat의 근육 내와 복강으로 각각 투여하고 12일 후 복대 동맥으로 채혈하여 혈청을 분리하여 사용하였다. 이 혈청의 PCA 역가를 측정하고 Evans blue의 확산 직경이 10-20mm가 되는 농도로 희석하여 사용하였다. Wistar rat에서 제조된 혈청은 Wistar rat(180-230g, 일본 B&K)의 등부위 털을 깎고 4부위에 2배 계열 희석한 혈청(인산완충 생리식염액에 희석, pH 7.4) 0.1ml씩 피내 투여하고 48시간 후 Ovalbumin 5mg을 0.5ml의 saline에 용해한 Evans blue(0.25%)와 혼합하여 꼬리 정맥으로 투여하였다. Ovalbumin 투여 30분 후 피부를 박리하고 Evans blue의 확산 직경을 측정하였다. 시험물질을 Ovalbumin을

정맥투여하기 30분전에 투여하였다.

5) **적출 기관지 시험**¹⁰⁾ - Guinea pig를 ether로 흡입 마취하고 복대동맥을 통해 방열 치사한 후 경부의 피부를 일직선으로 절개하여 기관지를 노출시켰다. 기관지를 주의 깊게 길이를 따라 열고 표본당 기관지의 4-5개 연골 링이 포함되도록 잘라 링을 개환하여 silk로 2개의 표본을 연결하였다. 표본 양측을 cell pin으로 고정하고 Krebs-Henseleit 용액(pH7.4, 37°C)이 포함된 13ml의 organ bath에 현수하였다. 기본장력을 1g으로 유지하여 안정화시킨 뒤 iodomethacin을 5 μ M의 농도로 가하여 cyclooxygenase를 차단한 후 histamine 10 μ M 또는 leukotriene D₄ 5nM로 수축을 유도하였다. 수축작용이 안정화 된 후 시료를 가하여 시험물질이 수축력을 감소시키는 정도를 측정하였다. 장력의 변화를 isometric transducer로 측정하였다.

6) 선인장으로부터 유효성분의 분리

① 선인장으로부터 유효성분 분리과정 - 동결건조된 선인장 줄기 분말을 삼각플라스크에 넣고 absolute methanol를 가하여 침출시킨다. 침출시킨 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여과한다. 이와 같은 방법으로 잔사에 대하여 2-3회 반복 실시하여 용매 추출액을 얻는다. 여과 후 얻어진 용액을 회전농축기로 농축하여 추출물을 얻는다. 이 추출물을 normal-phase column chromatography로 분리한다. 이 과정에서 얻어진 분획들에 대하여 각각 ODS column을 장착한 HPLC를 실시하여 다시 여러개의 분획들을 얻는다. 이렇게해서 얻어진 분획들을 회전농축기로 농축하여 NMR 기기로 확인한다.

② Normal-phase Silica gel column chromatography에 의한 분리과정 - MeOH 추출물을 각 유기용매에 의해 separation 시킨 후 각각의 유기용매층을 얻는다. 이 중에서 EtOAc층을 fraction으로 분리하기 위하여 glass column(2.5×60)에 silica gel을 충전시킨다. EtOAc층 일부를 소량의 용매에 녹인 후 충전된 column에 전개용매(Hex/EtOAc = 2/5)을 사용하여 전개시킨다. 이렇게 해서 얻

어진 fraction을 회전농축기로 농축시켜서 각각의 분획들로 다시 얻는다(**figure 1**).

③ HPLC(High Performance Liquid Chromatography)에 의한 분리과정 - 과정 ②에서 얻어진 분획들을 ODS column(μ Bondapak C18, 7.8 \times 300mm column)을 장착한 HPLC (Waters 2487)를 이용하여 각각의 fraction들로 분리하였다. 이동상으로 사용한 용매는 70% MeOH(HPLC용, Fisher)이며, flow rate는 3.5ml/min의 조건으로 실시하여 사용하였다.

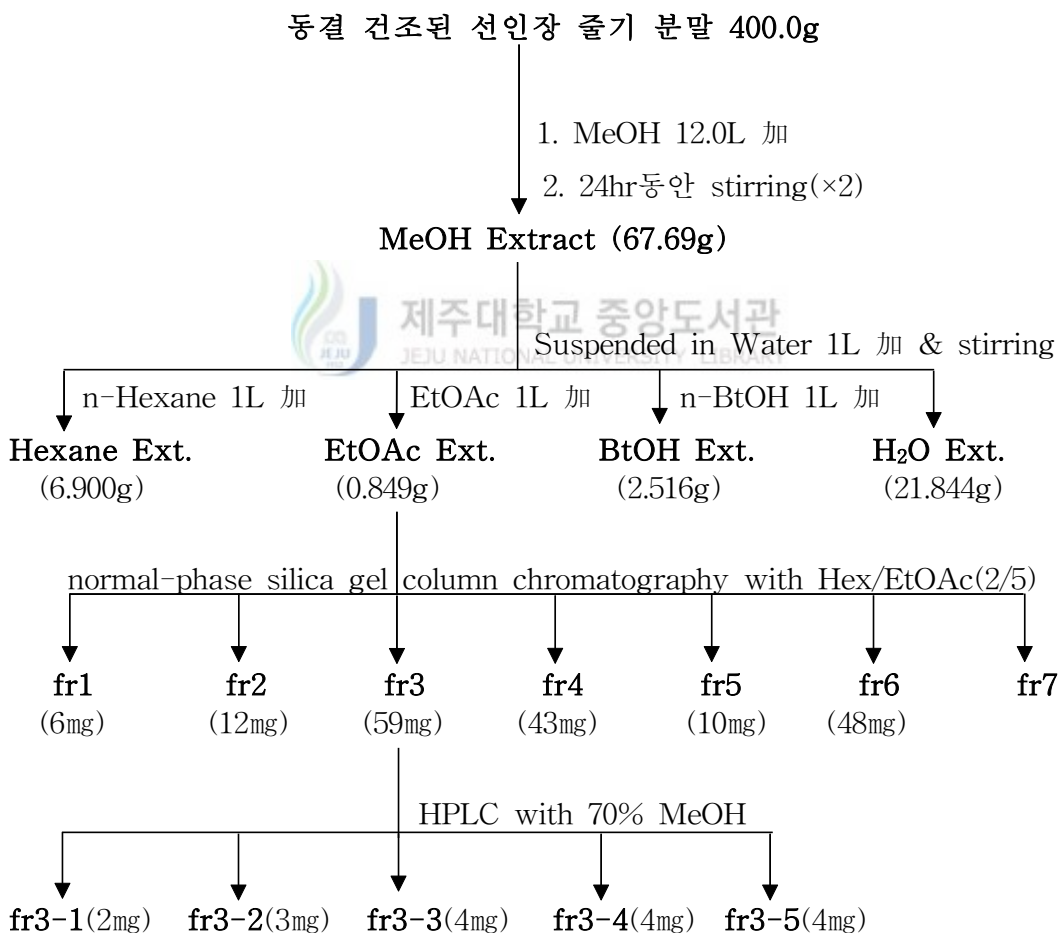
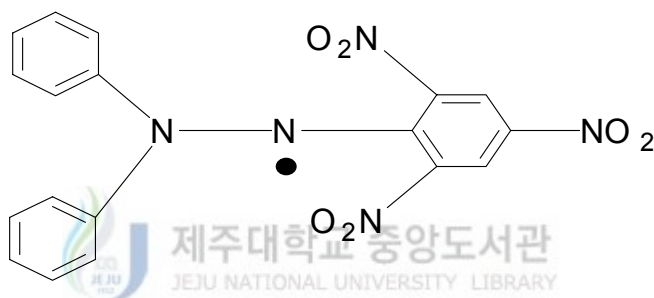


Figure 1. Isolation procedure using *Opuntia ficus-indica*.

Ⅲ. 결과 및 고찰

라디칼 소거 활성 - 손바닥 선인장 줄기 및 열매의 메탄올, 그리고 50% 메탄올 수용액의 DPPH의 라디칼 소거활성을 조사하였다(**Table 1**). 본 실험에 사용된 DPPH는 안정한 형태로 존재하는 라디칼 화합물로서, 시료에 의하여 라디칼이 제거되면 UV 분광기에서 518nm의 흡수파장이 사라지게 된다. 따라서, 라디칼 소거 활성 ΔA 는 대조군과의 흡광도 차이를 나타낸 것이므로, 값이 클수록 활성이 높다.



1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)

생명유지에 절대적으로 필요한 산소는 안정한 분자상태인 기저삼중항 산소 (ground state triplet oxygen)가 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학반응 등의 각종 물리적, 화학적 요인등에 의하여 반응성이 매우 큰 활성산소가 생성된다(**figure 2**). 이렇게 생체 내 산화물질로 작용하는 활성 산소 등은 대표적 라디칼 물질로서, 라디칼 소거 활성 물질은 항산화제로 인식되고 있다. 항산화효과는 피부의 노화와 관련이 있으며, 효과적인 피부 항산화 활성은 피부 노화를 억제할 가능성이 있다. 표 1의 실험 결과를 보면, 선인장 줄기의 메탄올 추출물에서 가장 강한 항산화활성이 나타나고 있다. 따라서, 화장품 등의 첨가제로 줄기의 메탄올 추출물이 적합하리라 판단된다. 라디칼 소거 활성을 나타내는

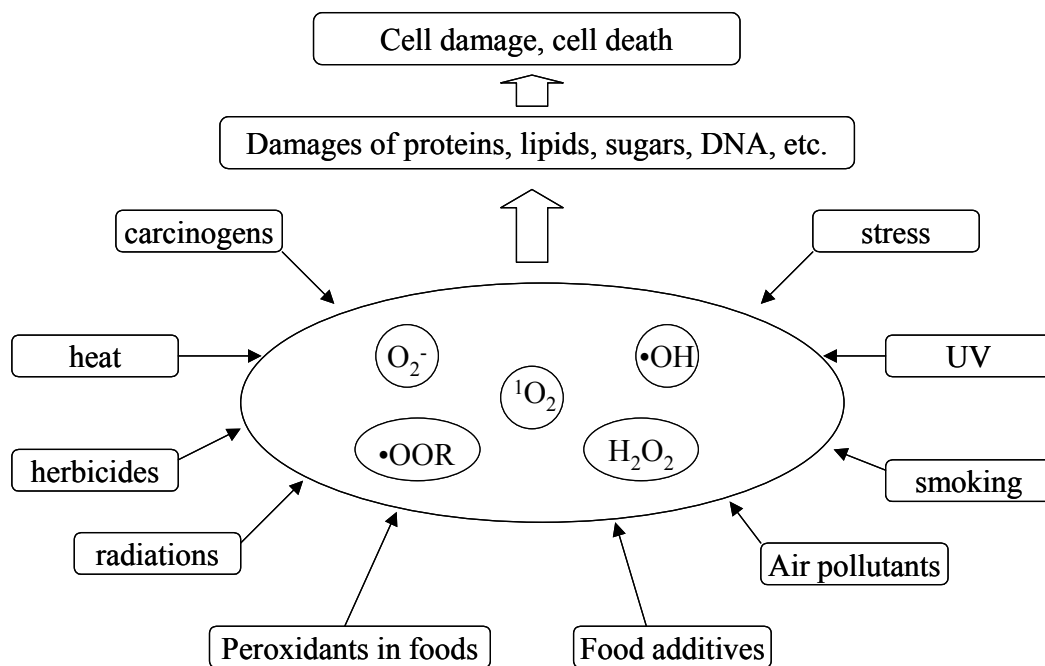


Figure 2. Active oxygen generating factors in environments

유효 성분은 아직 규명되지 않은 상태이나, 선인장에 포함되어 있는 페놀계 물질일 가능성이 있다. 메탄올 수용액 추출물의 경우, 다당류 점액질 물질이 다량 포함되어 있어서, 페놀성 물질의 함량이 상대적으로 적은 것으로 추측된다.

| 시료 종류 | | 소거 활성(ΔA) | Tyrosinase inhibition % |
|--------|-------------|---------------------|-------------------------|
| 선인장 줄기 | 메탄올 추출물 | 0.803 | 68 |
| | 50% 메탄올 추출물 | 0.759 | 7.1 |
| 선인장 열매 | 메탄올 추출물 | 0.640 | 56 |
| | 50% 메탄올 추출물 | 0.309 | -11 |

Table 1. DPPH radical scavenging effects and tyrosinase inhibition effects of *Oputia ficus-indica* extracts

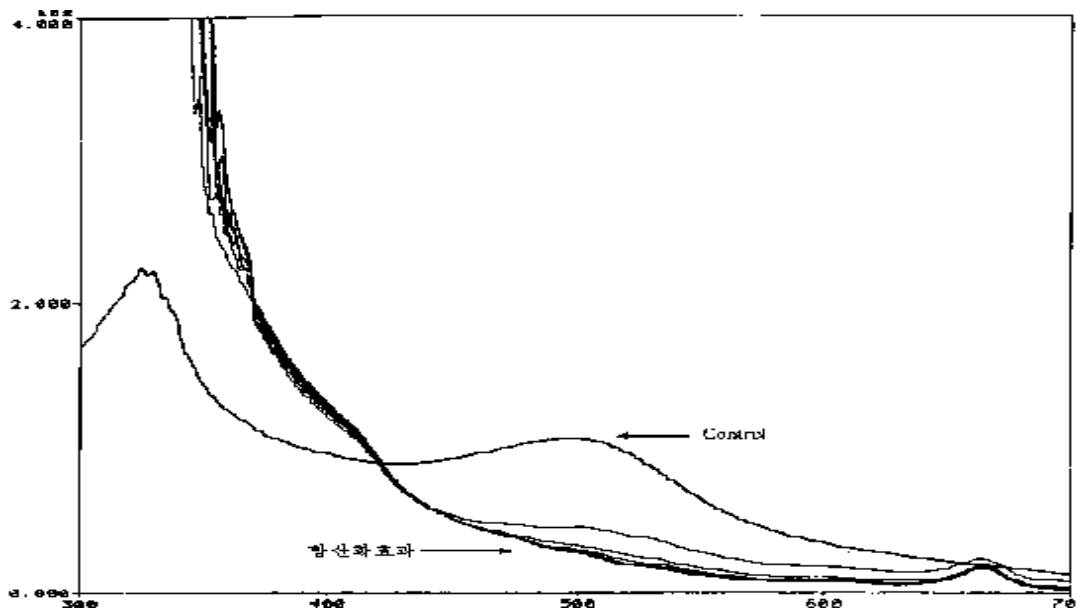


Figure 3. Radical scavenging effect of MeOH extract from *Oputia ficus-indica* stem.

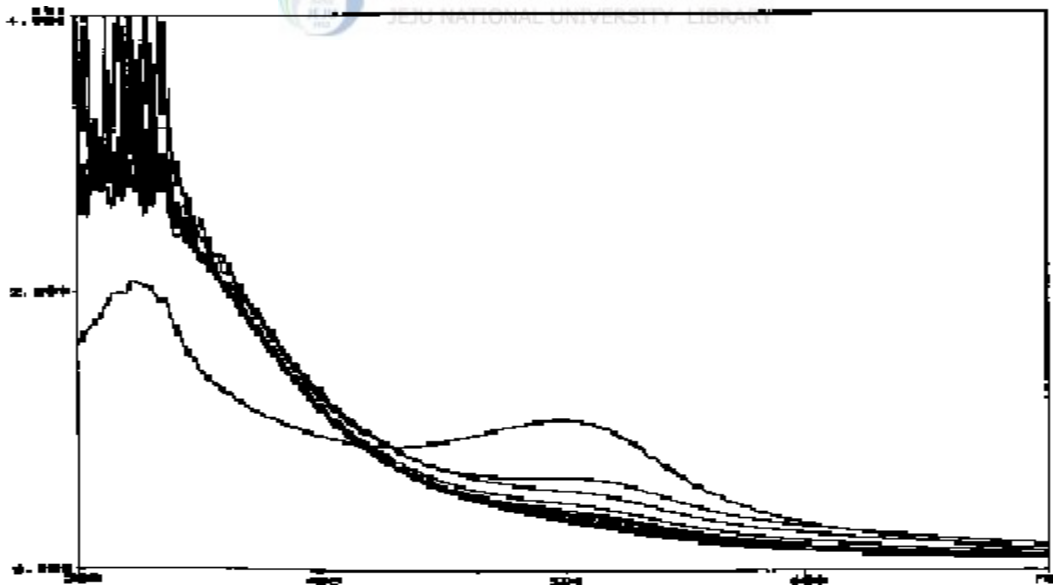


Figure 4. Radical scavenging effect of 50% MeOH extract from *Oputia ficus-indica* stem.

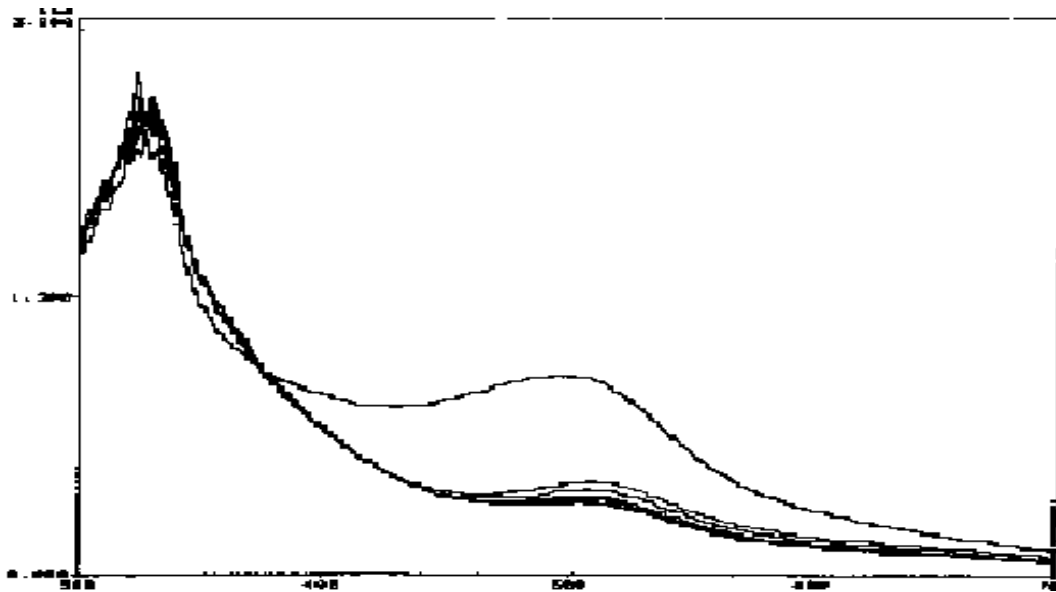


Figure 5. Radical scavenging effect of MeOH extract from *Oputia ficus-indica* fruit.

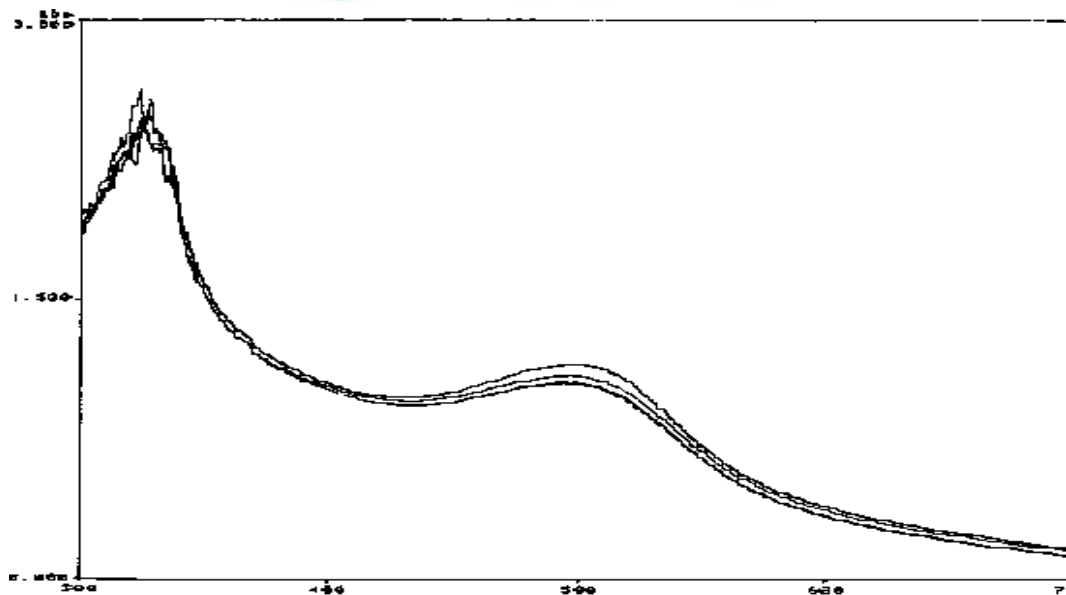


Figure 6. Radical scavenging effect of 50% MeOH extract from *Oputia ficus-indica* fruit.

Tyrosinase 억제 활성 검색 - 멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 생물고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 멜라닌은 각 개체에 따라 다양하며 그 주요기능은 전파, 건조, 극한 온도 등에 대한 생존능력을 높여주고, 미생물에 대한 면역체계의 역할을 수행한다. 그리고 인체의 피부에 존재하며 자외선에 대한 보호기능을 하는 역할을 하며 멜라닌의 생합성 과정은 다음 그림과 같다(Figure 3).

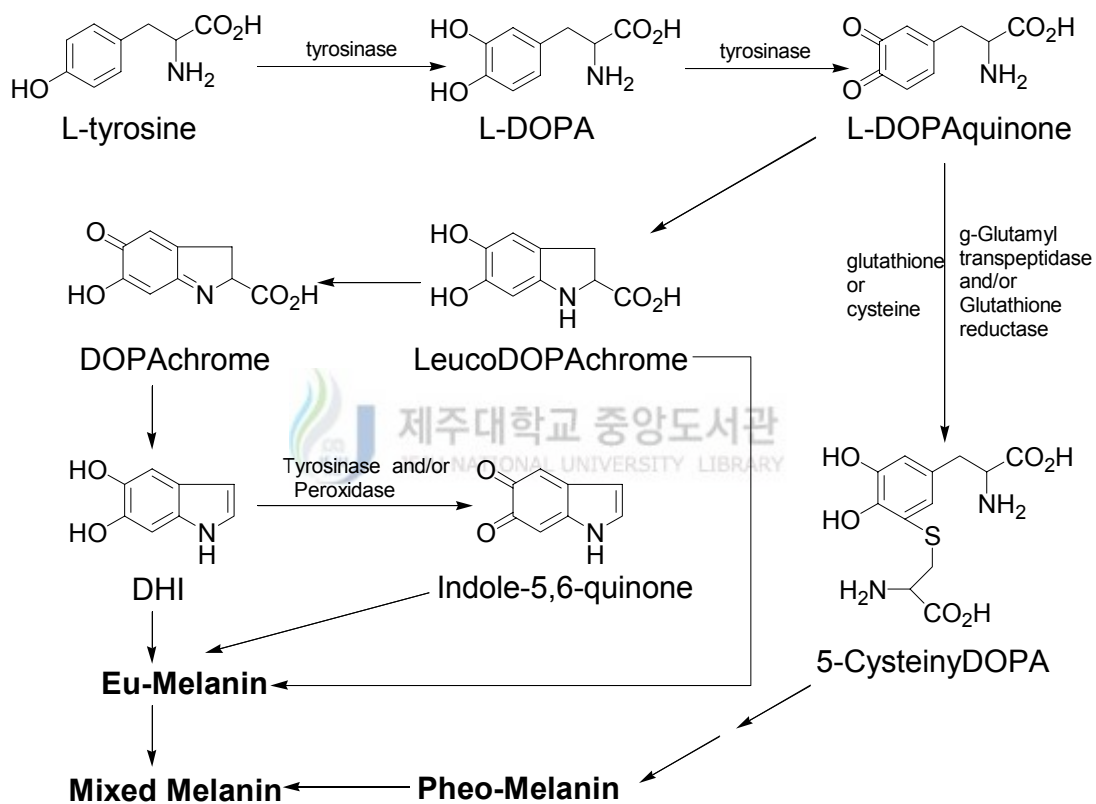


figure 7. Melanin synthesis pathway

그러나 멜라닌의 과잉생산은 인체에 기미, 주근깨를 형성하고, 피부노화를 촉진한다. 이 과정에서 Tyrosinase는 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 효소이며, 이 효소의 활성을 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제한다. 그래서 Tyrosinase 저해 활성을 검사함으로써 손바닥 선인장의 미백효과의 가능성을 검토하였다 (Table 1). 본 실험에서도 선인장 줄기의 메탄올 추출물에서 가장 좋은 활성 데

이터를 얻었다. 용매 분획을 통하여 활성인자를 추적하고자 시도하였다. 우선 메탄올 추출물을 hexane과 80% 메탄올로 분획화한 결과, 메탄올층에 성분이 존재함을 확인하였다. 이 수용성 메탄올층을 감압 휘발한 후 chloroform과 30%메탄올로 분획화하였다. 그 결과 30%메탄올층 잔액(저해효과: 14%)에 비하여 chloroform층 잔액(저해효과: 96%)에서 매우 높은 활성을 보임을 확인하였다. 이 층에 존재하는 유효 성분은 현재 추적 분리 중에 있다.

수동 피부 감각 시험 - Table 2에서 보이는 것처럼 rat PCA 시험에서 선인장 줄기의 메탄올 추출물은 현저한 알레르기 저해작용이 있음을 확인하였다. 반면, 열매의 메탄올 추출물은 미약한 효능을 보였으며, 50% 메탄올 수용액 추출물의 경우 줄기와 열매 모두 항알레르기 활성이 나타나지 않았다. 따라서, 화장품 등의 첨가제로서 선인장 줄기의 메탄올 추출물은 활성 성분에 대한 연구가 필요하리라 생각한다.

| 선인장 시료 | | 용량 | n | PCA response, Mean±SD(diameter, mm) | 비고 |
|---------|------------|--------------------------|----|----------------------------------------|----------|
| control | | saline, 0.9ml/rat, ip | 10 | 15.4±0.6 | |
| 줄기 | 메탄올 추출물 | 450mg/kg, ip | 3 | 9.0±1.1 | p <0.01 |
| | | 650mg/kg, ip | 5 | 3.3±0.7 | p <0.01 |
| | 50%메탄올 추출물 | 720mg/kg, ip | 4 | 14.8±0.8 | |
| 열매 | 메탄올 추출물 | 450mg/kg, ip | 4 | 13.3±0.5 | p = 0.04 |
| | 50%메탄올 추출물 | 700mg/kg, ip | 4 | 16.0±0.5 | |

Table 2. Inhibitory activity of *Oputia ficus-indica* extracts on PCA response in rats [P values indicate significant statistical difference from control (Student's t-test)]

적출 기관지 시험 - 위의 *in vivo* 실험인 PCA에서 선인장 줄기의 메탄올 추출물이 유효하였기 때문에, 이 시료가 알레르기 주요 매개물인 histamine이나 leukotriene D₄에 직접적으로 길항작용을 하는지의 여부를 guinea pig의 적출 기관지를 이용하여 시험하였다. 그 결과 80-240 μ g/ml의 농도에서 유의성 있는 이완작용이 관찰되지 않았다(Table 3). 이 결과는, 이들 두 종류의 주요 매개물에 대한 직접적인 저해작용이 없음을 시사한다. 그러므로 선인장 줄기의 항알레르기 작용은 유리된 매개물질의 작용을 저해하기보다는 mast cell 등에서 매개물질의 유리를 억제하였을 가능성을 시사한다. 그러나, 아직도 검증되지 않은 작용, 예를 들어 cAMP의 분해 억제 작용이나 bradykinin, serotonin, PAF등의 매개물질에 대한 길항작용에 관해서는 추가적인 연구가 필요하다.

| 시험물질 농도 | 수축유발 물질 | % change |
|----------------|----------------------------|----------|
| 80 μ g/ml | histamine | -6.5 |
| | leukotriene D ₄ | 0 |
| 240 μ g/ml | histamine | -3.0 |
| | leukotriene D ₄ | 0 |

Table 3. Effects of *Oputia ficus-indica* extracts on isolated tracheal contraction of guinea pigs induced by histamine and leukotriene D₄. [Mean values from three determinations; (-): relaxation]

유효성분에 대한 분리 및 구조분석 - 선인장 줄기 분말을 가지고 MeOH 추출물을 얻었다. 이 MeOH추출물을 다시 *n*-hexane과 ethylacetate, *n*-buthanol, water 층으로 분리하였다. ethylacetate 층을 가지고 normal-phase silica gel column chromatography을 먼저 Hex/EtOAC(2/5)의 전개용매를 사용하여 6개의 분획으로 분리하였고, 나머지 1개의 분획은 absolute methanol를 사용하여 얻었다. 다음은 ethylacetate 층을 normal-phase silica gel column chromatography로 분리한 TLC 결과이다(**figure 8**).

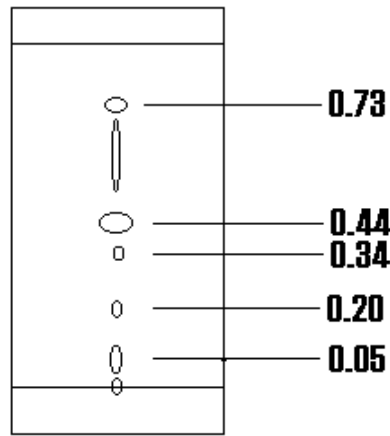


figure 8. Ethlyacetate 추출물의 TLC 결과

이 분획중에서 I-fr3의 NMR spectrum(**figure 12**)을 확인한 결과 flavonoid component라고 예상되는 특성치인 peak가 6~8ppm에서 doublet으로 확인되었다. 이 I-fr3을 가지고 HPLC 기기를 이용하여 다시 5개의 분획으로 fraction을 얻었다.

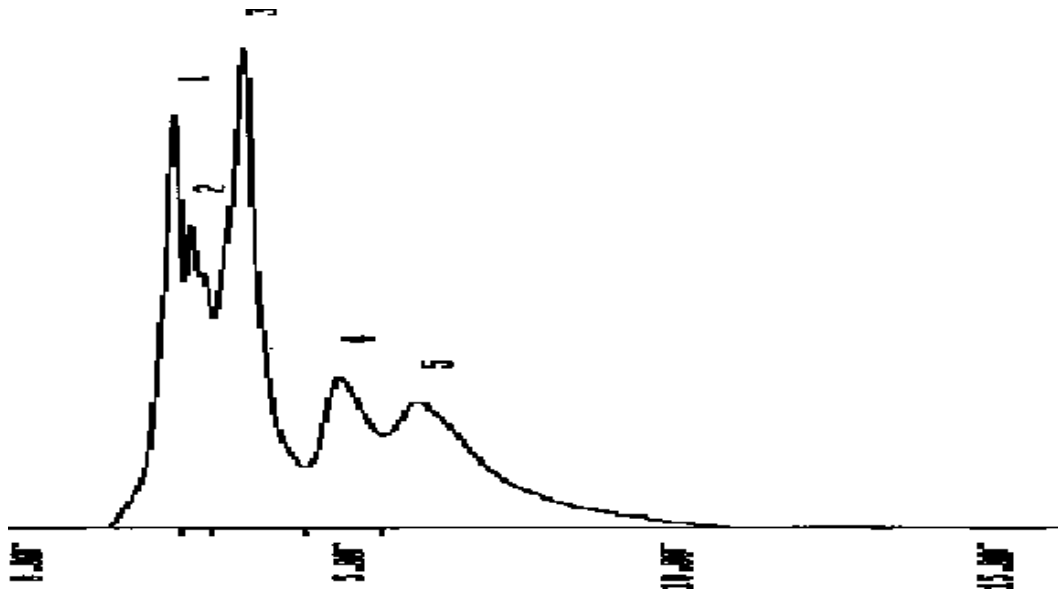


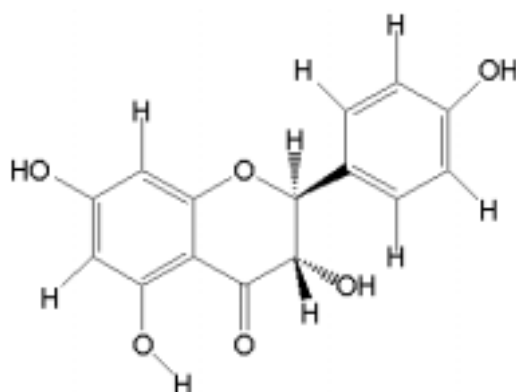
Figure 9. Separation of I-fr3 of EtOAc extract from *Opuntia ficus-indica* using HPLC

이 중에서 I-fr3-2의 NMR spectrum(**figure 20**)을 확인한 결과 기존에 발견되어진 *t*-dihydrokaempferol라는 화합물의 peak와 거의 일치함을 확인할 수 있었다(**Table 4**).

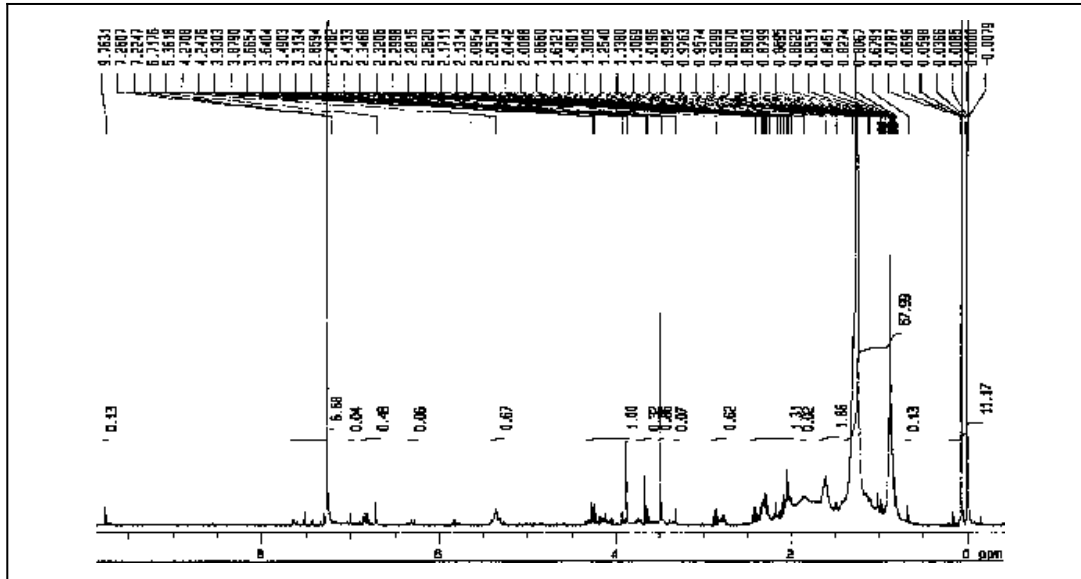
| I-fr3-2 ¹³ C NMR (100MHz, MeOH- <i>d</i> ₄) | <i>t</i> -dihydrokaempferol ¹³ C NMR (100MHz, ACTN- <i>d</i> ₆) |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 73.6 | 73.0(C-3) |
| 85.1 | 84.3(C-2) |
| 96.2 | 95.9(C-8) |
| 97.3 | 96.9(C-6) |
| 101.7 | 101.3(C-10) |
| 115.1 | 115.7(C-3',5') |
| 129.3 | 129.0(C-1') |
| 130.3 | 130.2(C-2',6') |
| 159.2 | 158.8(C-4') |
| 164.4 | 164.1(C-9) |
| 165.3 | 164.7(C-5) |
| 168.7 | 167.8(C-7) |
| 198.5 | 198.2(C-4) |

Table 4. I-fr3-2와 *t*-dihydrokaempferol의 ¹³C NMR spectrum data 비교

그리고 I-fr3-3의 NMR spectrum(**figure 22**)을 확인한 결과 I-fr3-2의 NMR spectrum과 거의 유사함을 확인하였다.

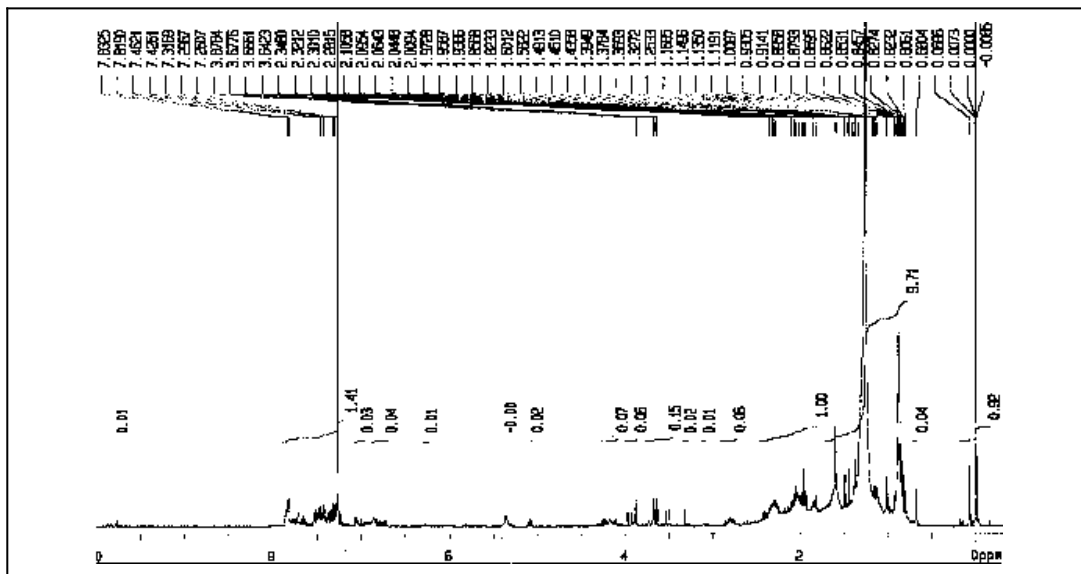


t-dihydrokaempferol



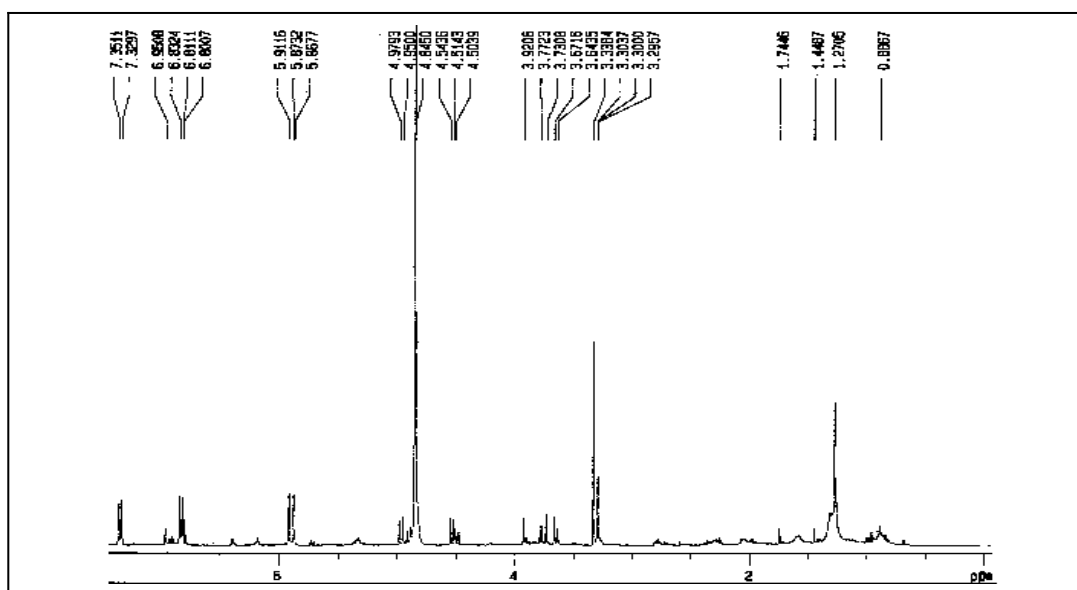
400MHz, CD₃OD

Figure 10. ¹H-NMR spectrum of I-fr1 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



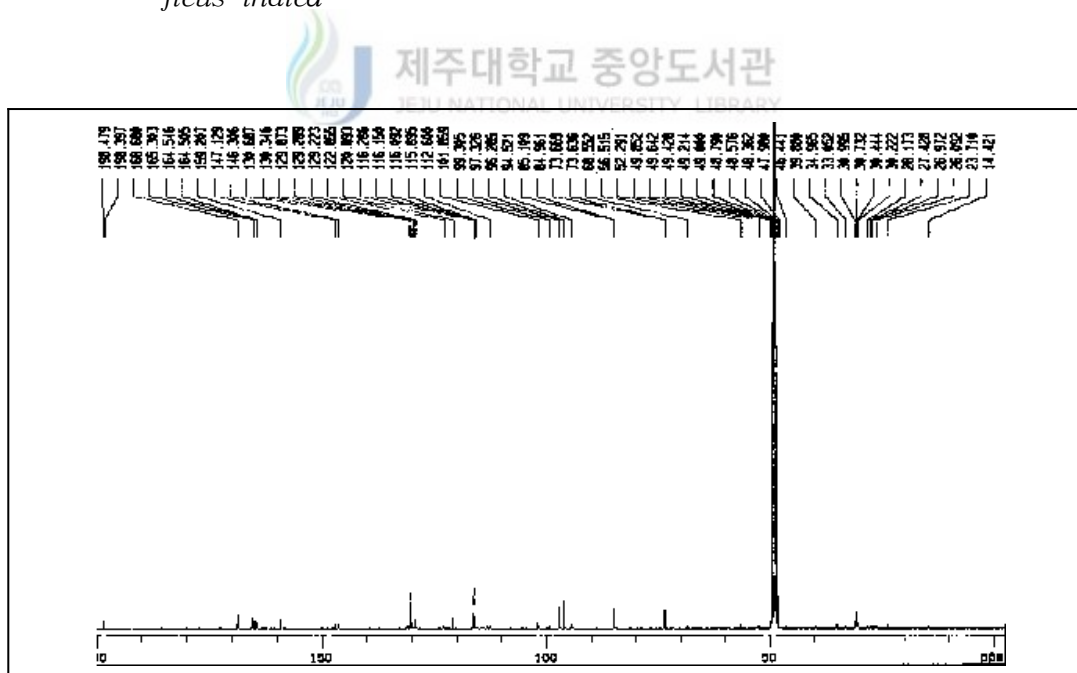
400MHz, CD₃OD

Figure 11. ¹H -NMR spectrum of I-fr2 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



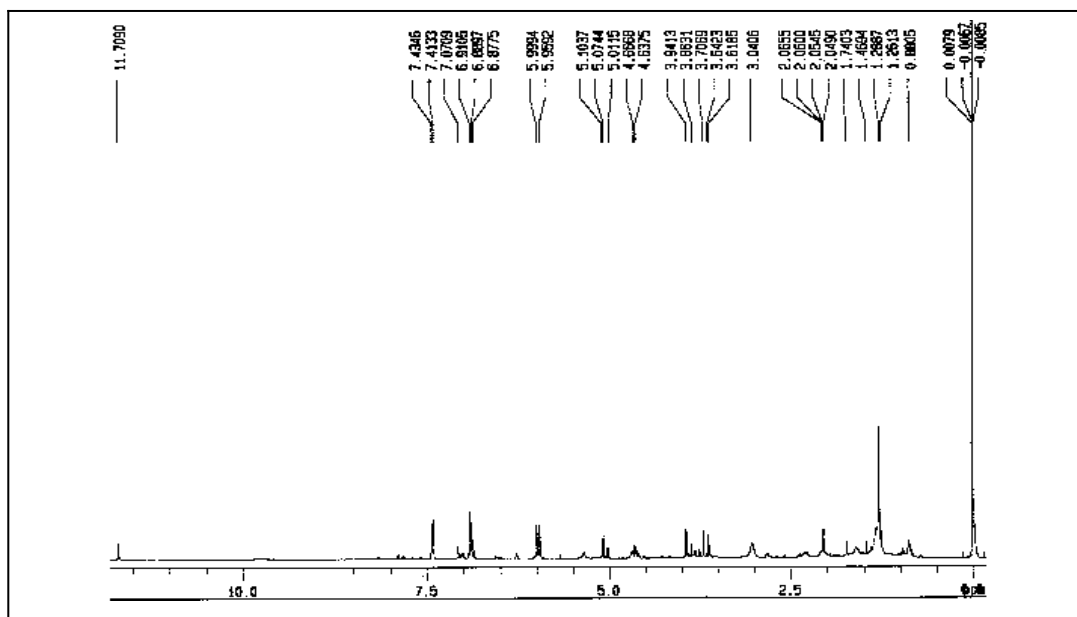
400MHz, CD₃OD

Figure 12. ¹H-NMR spectrum of I-fr3 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



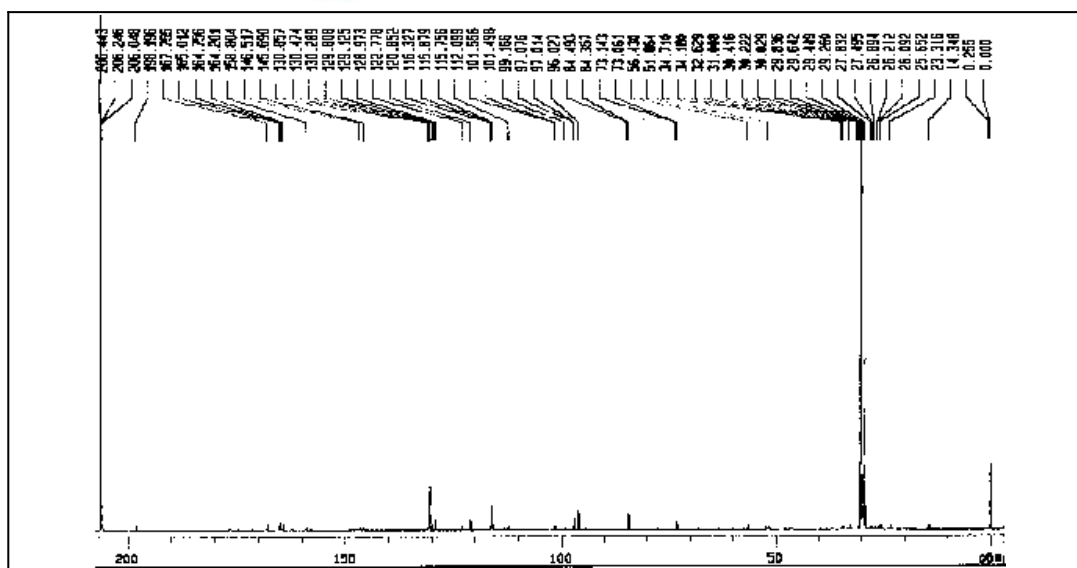
400MHz, CD₃OD

Figure 13. ¹³C-NMR spectrum of I-fr3 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



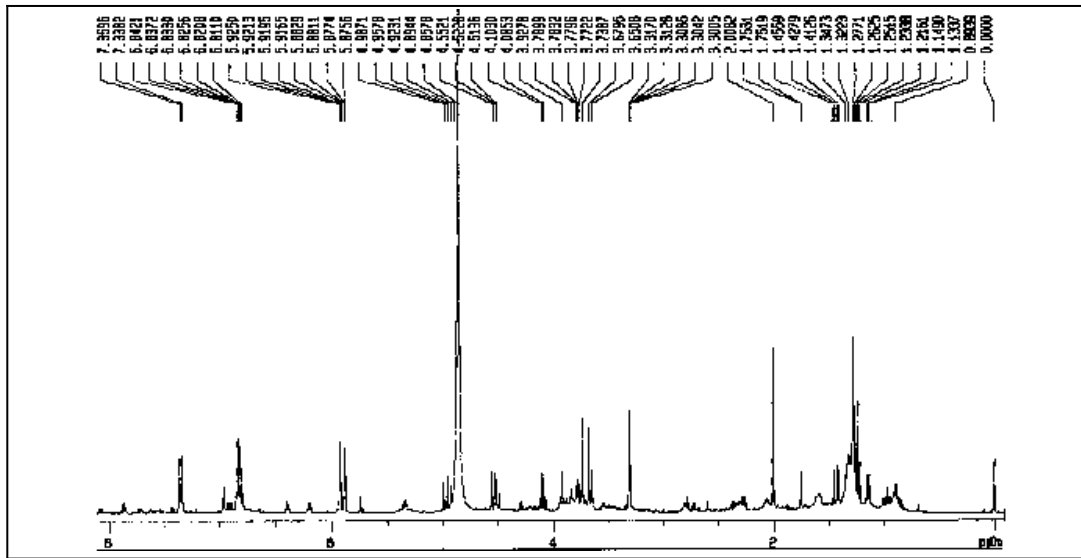
400MHz, ACTN

Figure 14. ^1H -NMR spectrum of I-fr3 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



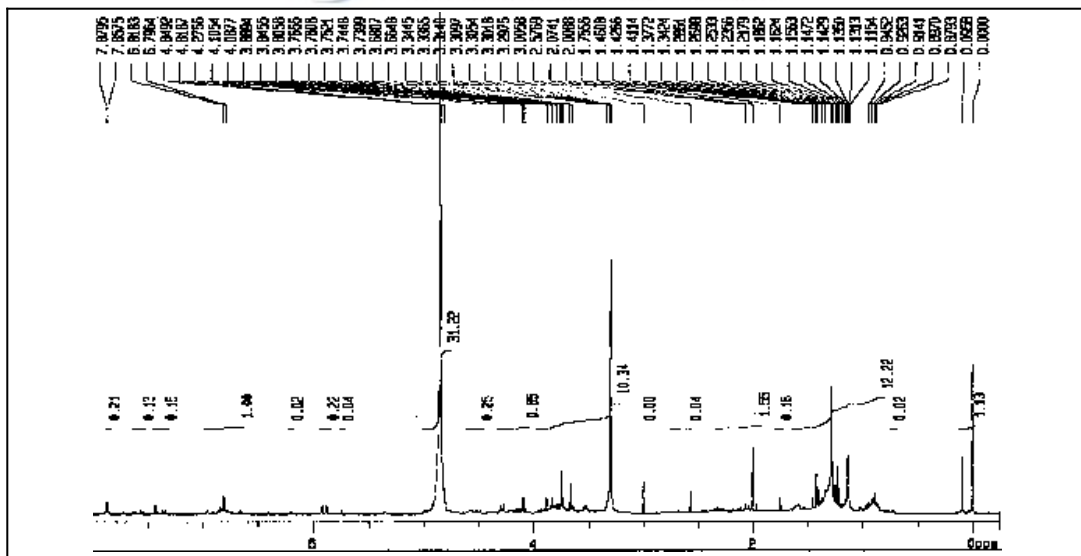
400MHz, ACTN

Figure 15. ^{13}C -NMR spectrum of I-fr3 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



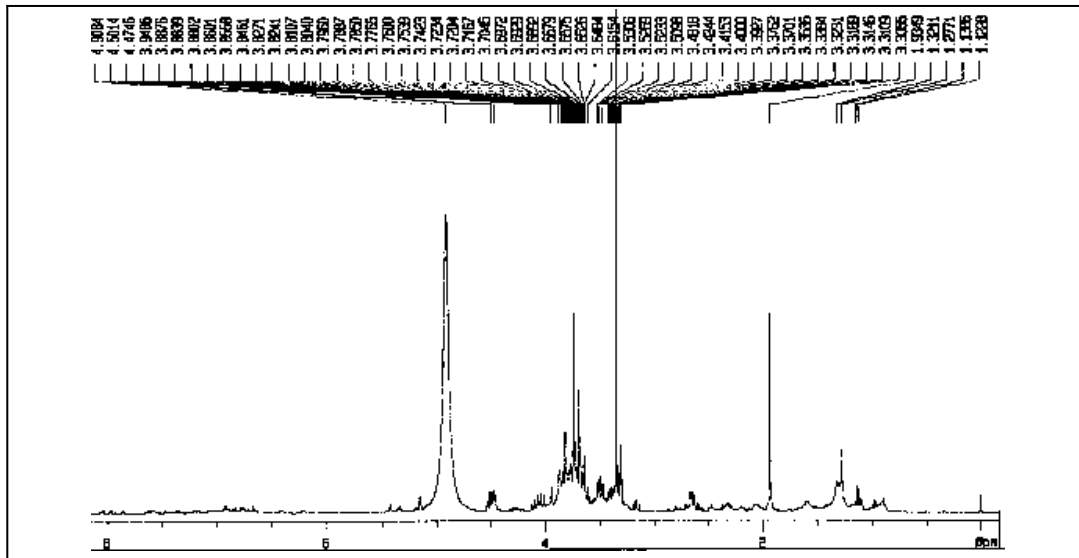
400MHz, CD₃OD

Figure 16. ¹H-NMR spectrum of I-fr4 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



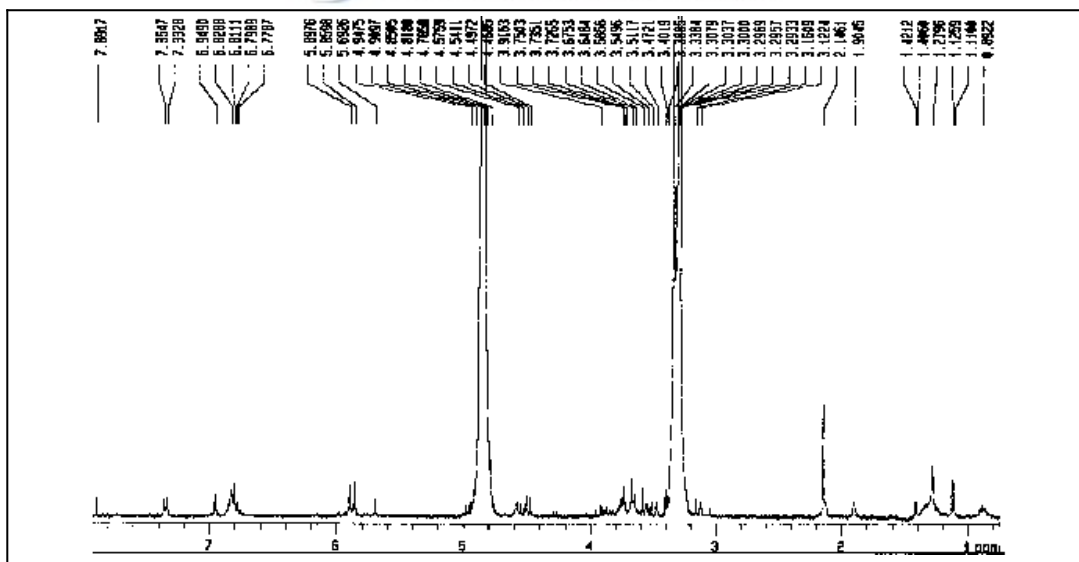
400MHz, CD₃OD

Figure 17. ¹H-NMR spectrum of I-fr5 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



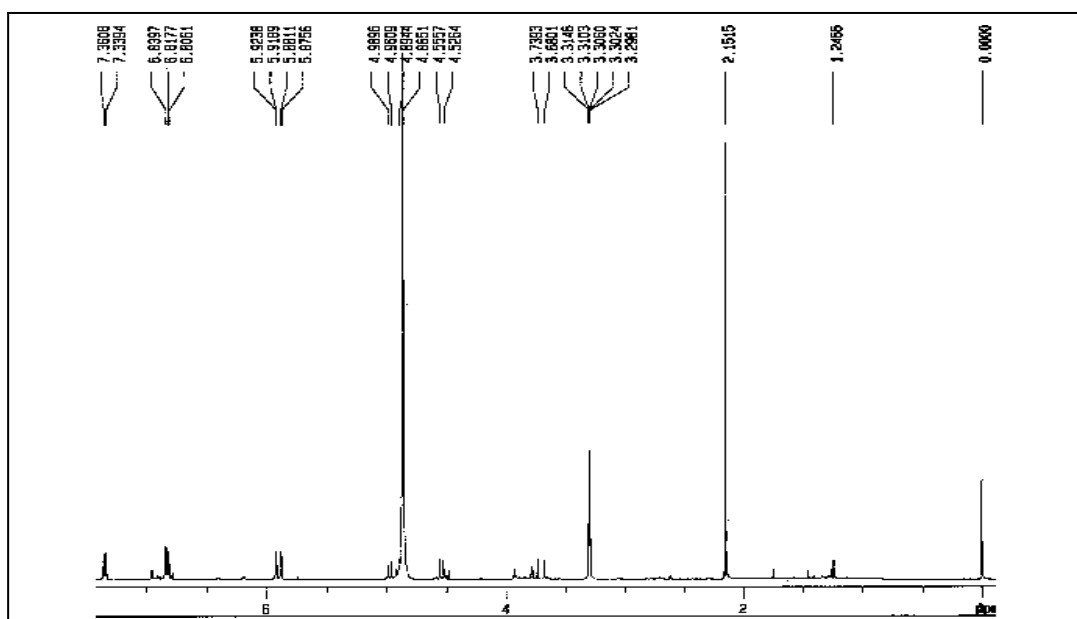
400MHz, CD₃OD

Figure 18. ¹H-NMR spectrum of I-fr6 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



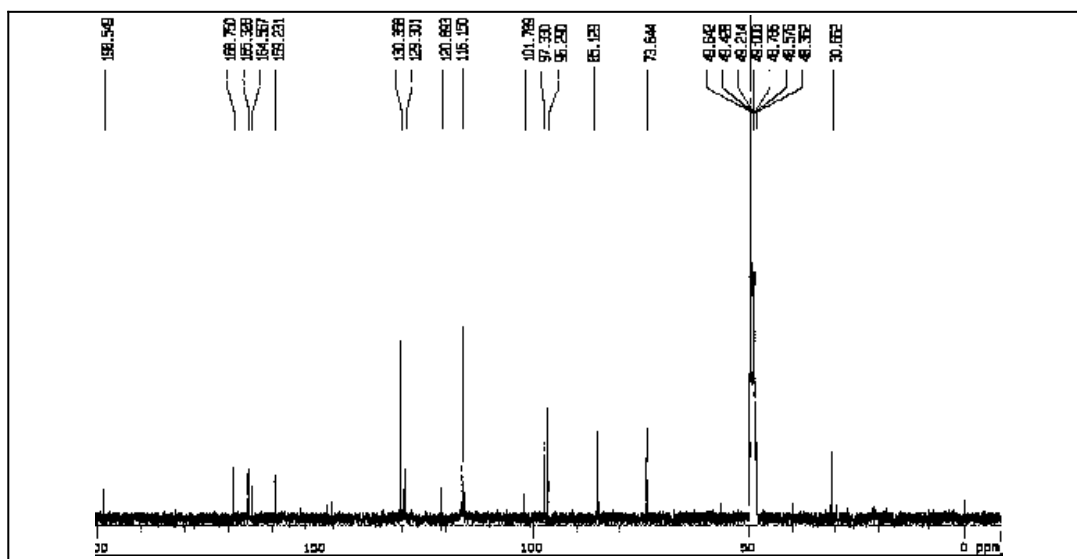
400MHz, CD₃OD

Figure 19. ¹H-NMR spectrum of I-fr3-1 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



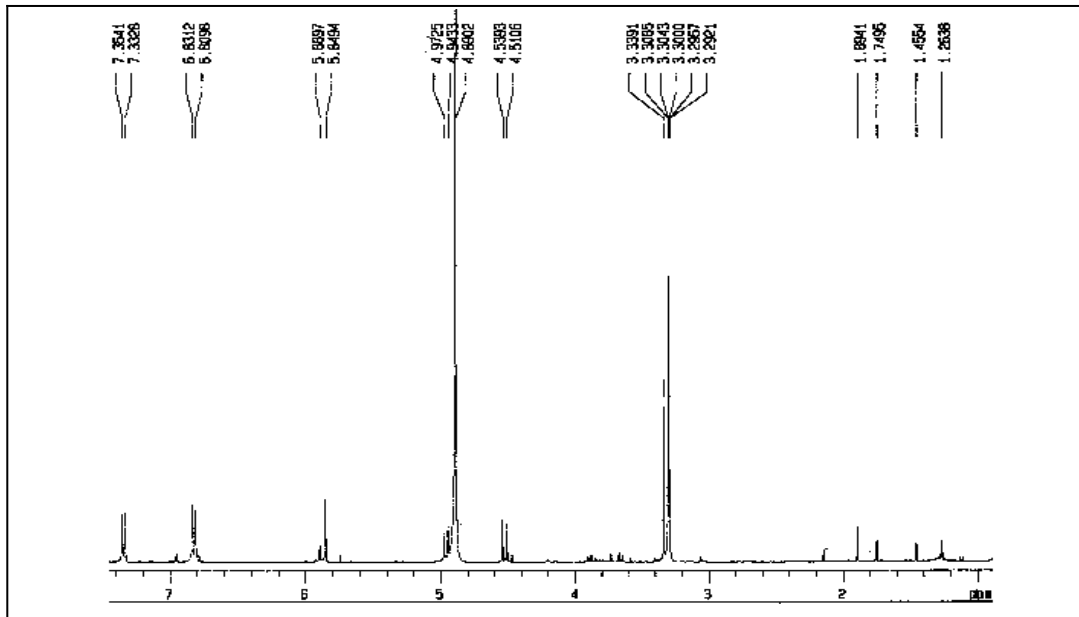
400MHz, CD₃OD

Figure 20. ¹H-NMR spectrum of I-fr3-2 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



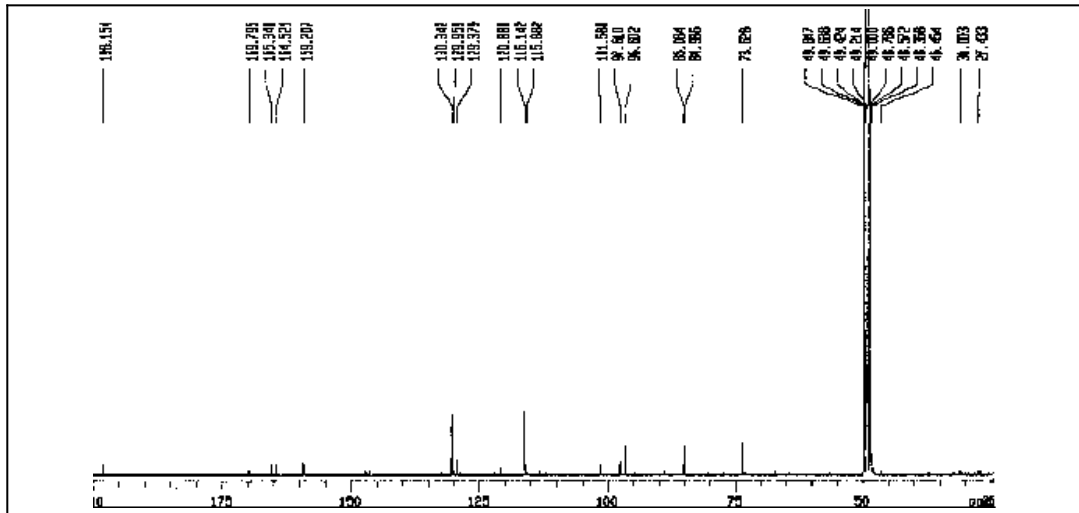
400MHz, CD₃OD

Figure 21. ¹³C-NMR spectrum of I-fr3-2 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



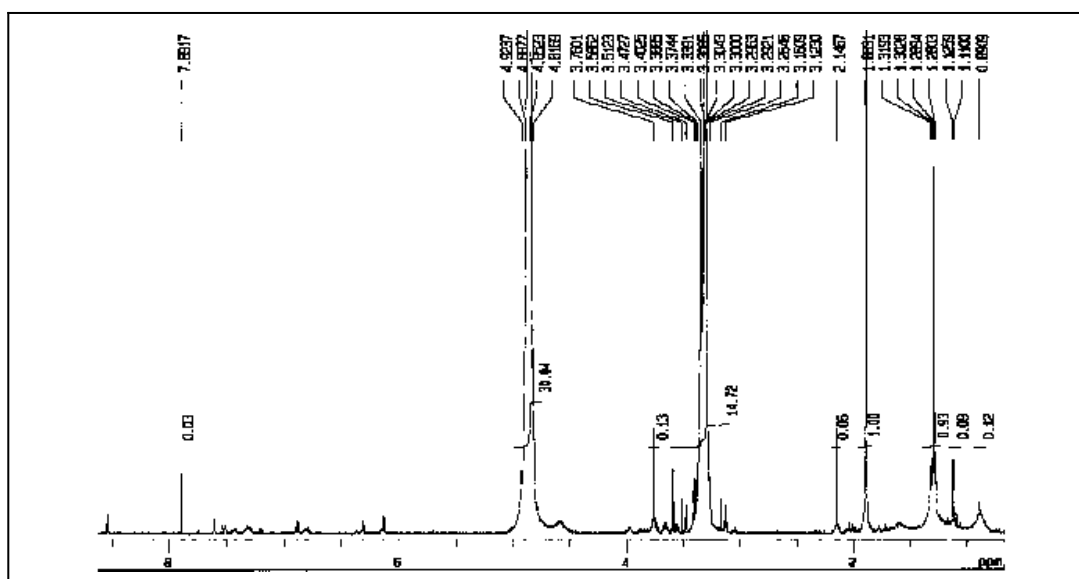
400MHz, CD₃OD

Figure 22. ¹H-NMR spectrum of I-fr3-3 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



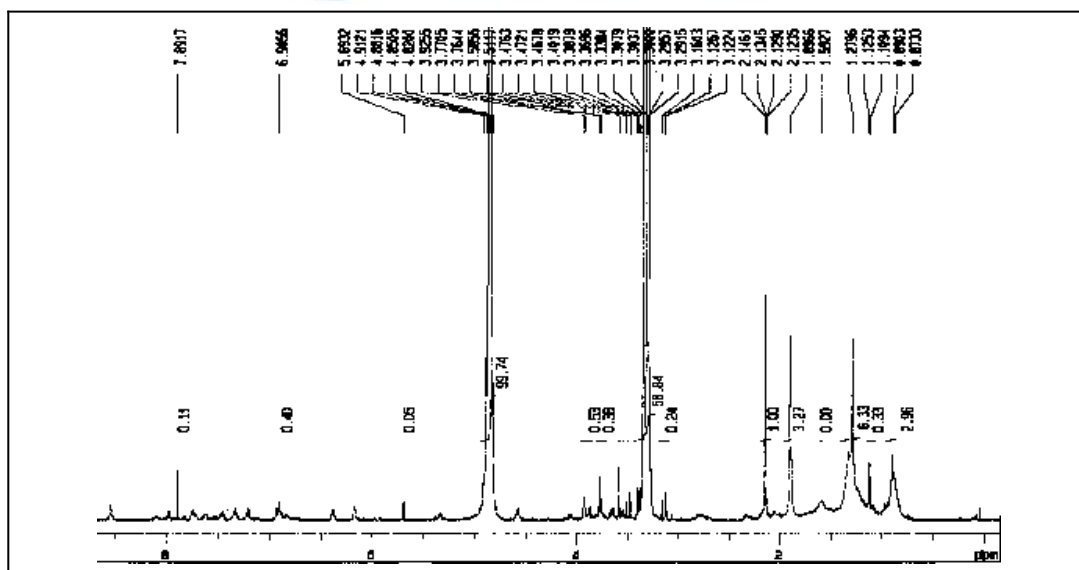
400MHz, CD₃OD

Figure 23. ¹³C-NMR spectrum of I-fr3-3 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



400MHz, CD₃OD

Figure 24. ¹H-NMR spectrum of I-fr3-4 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*



400MHz, CD₃OD

Figure 25. ¹H-NMR spectrum of I-fr3-5 of EtOAc extract from *Oputia ficus-indica*

IV. 결론

제주도 자생식물인 손바닥 선인장 시료를 대상으로 라디칼 소거 활성, tyrosinase 저해 활성, 항알레르기 활성을 조사하였다. 그 결과 손바닥 선인장의 줄기 부분의 메탄올 추출물에서 가장 우수한 활성들이 나타남을 확인하였다. DPPH 용액을 이용한 라디칼 소거 활성 시험의 경우, 0.1g/10ml 농도에서 대조군과의 흡광도차(ΔA)가 0.803을 나타내었다. 이 수치는 비교적 우수한 항산화활성을 갖고 있음을 나타낸다. 이러한 항산화 작용은 선인장 내 페놀성 물질에 의한 영향을 받았을 가능성이 있다. 선인장 내 페놀류의 존재는 정성적으로 제시된 바 있으며, 페놀류의 라디칼 소거에 의한 항산화활성은 잘 알려져 있다.

Tyrosinase 저해 활성인자의 경우, 1mg/ml의 농도로 68%의 저해활성을 나타내었다. 비교적 우수한 저해 활성을 나타낸다고 판단된다. 용매 분획을 통하여 활성인자를 추적한 바에 의하면, chloroform 가용성 물질이라고 판단된다. 클로로포름 가용성 물질일 경우, 비교적 작은 분자량의 유기화합물일 가능성이 크므로, 활성 성분의 분리 및 구조 동종의 가능성이 높다고 하겠다.

In vivo 모델인 rat PCA 실험에서, 줄기의 메탄올 추출물 450-650mg/kg에서 유의성 있는 항알레르기 효과를 확인하였다. 항알레르기 작용기전을 추적하기 위한 적출 기관지 실험 결과, 최소한 알레르기 주요 매개물인 histamine 혹은 leukotriene D₄의 직접적인 길항에 의한 효과는 아닌 것으로 판단되었다. 이에 대한 연구는 앞으로 추가 실험이 요구되어 지고 있다.

선인장의 유효성분의 분리 및 확인에 있어서, 에틸아세테이트 추출물의 1차 분획을 NMR 기기를 사용하여 확인한 결과 I-fr3에서 phenolic component의 특이적인 peak를 발견하였다. 이 I-fr3을 가지고 다시 HPLC 기기를 이용하여 제 2차 분획들을 얻었는데, 이 분획들을 다시 NMR 기기를 사용하여 확인하였다. 그 결과, 기존에 밝혀진 dihydroflavonol 화합물 구조의 peak와 거의 일치함을 확인하였다. 특히 I-fr3-2는 dihydrokaempferol임을 확인하였다. 이 분획을 Mass, IR 기기등을 이용하여 더욱 정확한 구조를 밝혀야 할 것이다. 이상의 연구 결과는 손바닥 선인장의 친피부적인 효과를 나타내어 주고 있다. 따라서, 본

연구 결과는 화장품 첨가제 등 관련 분야에의 활용 및 유효 성분의 분리, 동정의 기초 자료로서 이용되리라 생각한다.



V. 참고문헌

1. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical *Nature* 181: 1199-1200.
2. Hearing Jr., V. J. (1987) Mammalian monophenol monooxygenase (Tyrosinase): Purification, properties, and reaction catalyzed. *Method in Enzymology* 142: 154-165.
3. Levier, J., Duval D., Prouteau, M., Voltz, C., Berry, C. N., Lloyd, K. G., Scatton, B. (1995) Antianaphylactic activity of the novel selective histamin H₁ receptor antagonist Mizolastatine in the rodent. *Arzneim-Forsch.* 45: 559-568.
4. 백승규, 김희연, 양승돈, 송창우, 신태균, 한상섭 (1999) 손바닥선인장 (*Opuntia ficus-indica*) 열매가 노화촉진 마우스(Senescence-accelerated mouse)의 항산화능에 미치는 영향. *한국노화학회지* 9: 70-77.
5. 신태균, 김성호 (1998) 손바닥선인장의 방사선 방호 효과. *제주생명과학연구* 1: 25-32.
6. 신태균, 이선주, 김세재 (1998) 손바닥선인장 추출물이 면역계 세포의 활성화에 미치는 영향. *한국수의병리학회지* 2: 31-35.
7. 신태균, 김승준, 문창중, 위명복, 현병화 (1999) Streptozotocin 유발 당뇨병에 대한 손바닥선인장 추출물의 혈당강하 효과. *한국노화학회지* 9: 78-83.
8. 이영철, 김홍만, 김영언, 황금희, 안채경 (1997) 선인장의 성분 분석 및 가공식품의 품질개선 시험. *한국식품개발연구원 보고서*.
9. Jeong, S. J., Jun, K. Y., Kang, T. H., Ko, E. B., Kim, Y. C. (1999) Flavonoids from the Fruits of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. *Kor. J. Pharmacogn.* 30: 84-86.
10. Robert, D. K., Aharony, D., Buckner, C. K., Keith, R. A., Kusner, E. J., Snyder, D. W., Bernstein, P. R., Matassa, V. G., Yee, Y. K., Brown, F. J., Heps, B., Giles, R. E. (1990) The preclinical pharmacology of ICI 204,219. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 978-987

11. 정세준, 진기용, 강태현, 조용배, 김윤철(1999) 손바닥 선인장 열매의 Flavonoid 성분. 생약회지 10(1): 84-97.

