

碩士學位論文

제주산 자생식물들의  
DPPH, Superoxide, Elastase  
활성검색



濟州大學校 教育大學院

化學教育專攻

李 韓 娜

2008年 8月

제주산 자생식물들의  
DPPH, Elastase, Superoxide 활성검색

指導教授 鄭 憲 商

李 韓 娜

이 論文을 教育學 碩士學位 論文으로 提出함

2008年 8月

李韓娜의 教育學 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 教育大學院

2008年 8月

## 목 차

|  |     |
|--|-----|
| 국문초록 .....                                     | i   |
| List of Tables .....                           | ii  |
| List of Figures .....                          | iii |
| <br>   |     |
| I. 서론 .....                                    | 1   |
| <br>   |     |
| II. 재료 및 실험방법 .....                            | 5   |
| 1. 재료 .....                                    | 5   |
| 1) 시료준비 .....                                  | 5   |
| 2) methanol 추출물 .....                          | 5   |
| 3) methanol 추출물 용매분획 과정 .....                  | 6   |
| 2. 시약 및 기기 .....                               | 7   |
| 1) 추출 및 분리과정 .....                             | 7   |
| 2) 활성측정 .....                                  | 7   |
| 3. 실험방법 .....                                  | 8   |
| 1) DPPH radical 소거 활성 측정 .....                 | 8   |
| 2) Superoxide(O <sup>-2</sup> ) 소거능 측정방법 ..... | 8   |
| 3) Elastase inhibition 활성측정 .....              | 9   |
| <br>   |     |
| III. 실험결과 및 고찰 .....                           | 10  |
| 1. DPPH free radical 소거 활성측정 .....             | 10  |
| 1) 시료 추출물의 DPPH free radical 소거 활성측정 .....     | 10  |
| 2) 시료 분획물의 DPPH free radical 소거 활성측정 .....     | 12  |
| 2. Superoxide 소거능 측정 .....                     | 17  |
| 1) 시료 추출물의 Superoxide 소거능 활성측정 .....           | 17  |
| 2) 시료 분획물의 Superoxide 소거능 활성측정 .....           | 19  |

3. Elastase 활성 저해측정 ..... 24

    1) 시료 추출물의 Elastase 활성 저해측정 ..... 24

    2) 시료 분획물의 Elastase 활성 저해측정 ..... 26

IV. 결 론 ..... 31

V. 참 고 문 헌 ..... 33

VI. 부 록 ..... 37



제주산 자생식물들의 DPPH, Superoxide, Elastase 활성검색

이 한 나

제주대학교 교육대학원 화학교육전공

지도교수 정 덕 상

본 연구는 제주도에서 자생하는 식물 6종 쥐똥나무(잎), 석위(전초), 꽃향유(전초), 눈피불주머니(전초), 큰천남성(전초), 광대수염(전초)을 대상으로 DPPH free radical 소거 활성 측정, superoxide 소거 활성 elastase 활성 저해 측정을 측정하고 유기용매 분획을 실시하여 추출 분리한 뒤 각 분획물도 동일한 방법으로 항산화 활성을 조사하였다.

DPPH free radical 소거 활성을 측정하여 비교한 결과 각 추출물의 IC<sub>50</sub> 값은 석위가 17.32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 대조군에 비해 매우 뛰어난 radical 소거 활성을 보이는 것으로 나타났으며, 꽃향유는 70.98  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 쥐똥나무가 84.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$  순으로 조사되었다. 시료 분획물에서 위와 동일한 방법으로 DPPH free radical 소거 활성을 측정한 결과 IC<sub>50</sub>은 석위의 분획물중 EtOAc층이 17.17  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 꽃향유 분획물중 EtOAc층은 18.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 활성을 나타냄을 확인 할 수 있었다.

superoxide radical 소거 효과를 평가하여 측정 결과 각 시료 methanol 추출물의 IC<sub>50</sub> 값은 석위 48.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 좋은 활성은 아니나, 단일 물질이 아닌 methanol 추출물임을 감안한다면, 석위 methanol 추출물의 경우 비교적 좋은 항산화 활성을 보임을 확인 할 수 있었다.

각각의 시료 분획물의 superoxide 소거 활성에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 살펴보면 석위의 EtOAc층에서 28.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC<sub>50</sub> 값을 가장 좋은 활성을 보였다.

elastase 활성 저해 측정 실험에서는 비교 대조군인 빈랑자의 IC<sub>50</sub> 값이 10.54  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 나타내는 반면에 제주도에서 자생하고 있는 본 실험에 사용한 식물중의 경우 elastase 활성 저해 정도가 그다지 높지 않은 것으로 측정되었다. 본 연구에서 이용된 methanol 추출물 중에서 석위의 IC<sub>50</sub>이 18.09  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인하였고, EtOAc층에서 26.91  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 활성이 있음을 확인 하였다.

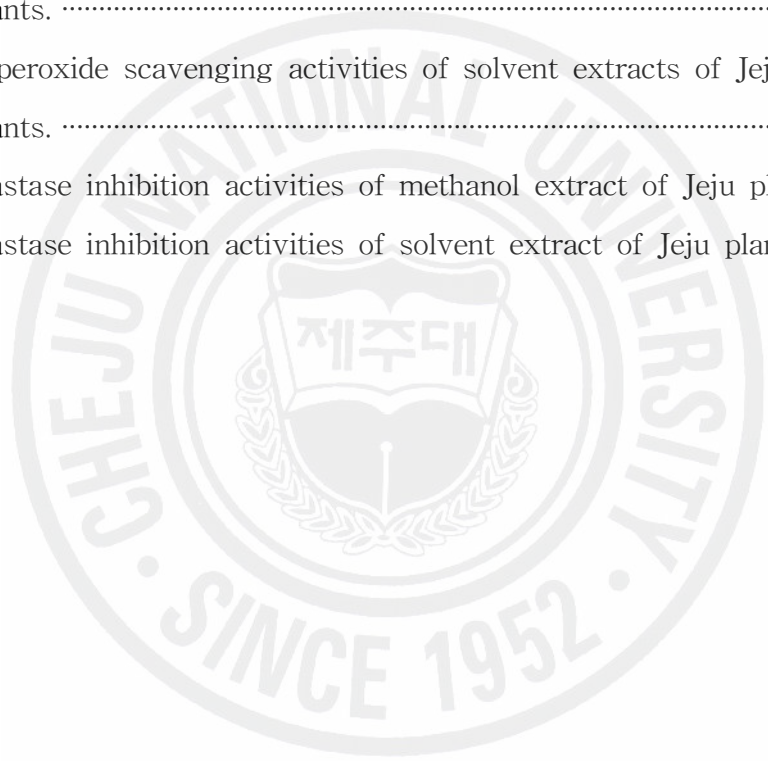
각각의 시료 분획물의 superoxide 소거 활성에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 살펴보면 석위의 EtOAc층에서 28.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC<sub>50</sub> 값을 가장 좋은 활성을 보였다.

위와 같은 결과를 종합해본 결과 DPPH free radical 소거활성 측정, superoxide radical 소거 효과 elastase 활성 저해 측정 실험 모두에서 가장 뛰어난 효능을 보인 식물 좋은 석위임을 알 수 있었다.

현재 국내외적으로 천연물에 대한 항산화 활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있어 제주지역에 자생하는 천연물의 항산화 효과에 대한 연구는 그 효용 가치가 높다고 여겨진다. 따라서 본 실험 연구의 결과를 토대로 항산화 효과가 우수한 석위에 대한 단일 물질에 대한 분리 작업과 함께 항염증이나, 항노화 등의 실험이 더 깊이 있게 진행된다면 새로운 천연물 유래 생리 활성 물질로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

## List of Tables

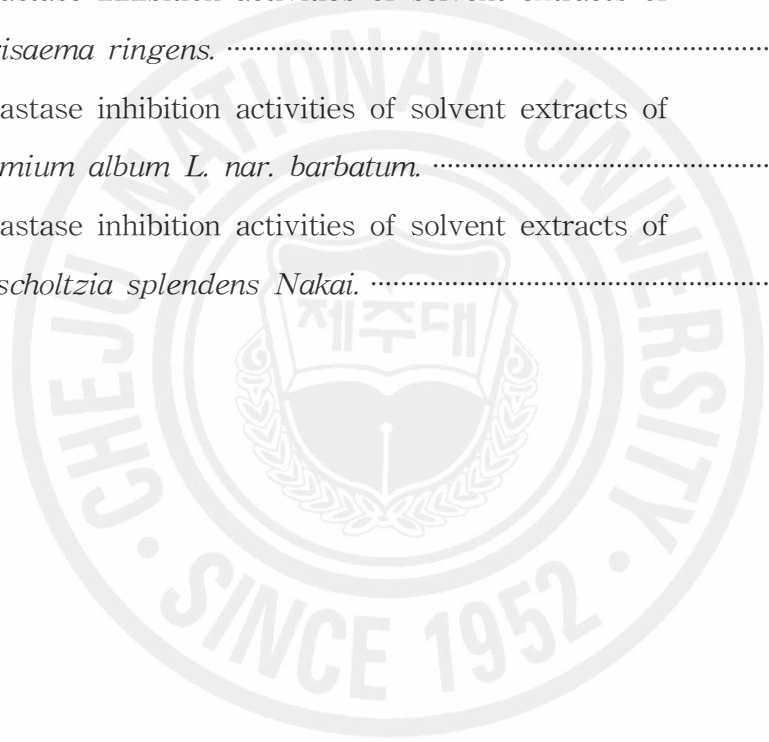
|  |    |
|--|----|
| Table 1. 화장품 산업의 주요 연구 분야. ....  | 4  |
| Table 2. DPPH free radical scavenging activities of methanol extracts of Jeju plants. .... | 11 |
| Table 3. DPPH free radical scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants. ....  | 13 |
| Table 4. Superoxide scavenging activities of methanol extracts of Jeju plants. ....        | 18 |
| Table 5. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants. ....         | 23 |
| Table 6. Elastase inhibition activities of methanol extract of Jeju plants.                | 25 |
| Table 7. Elastase inhibition activities of solvent extract of Jeju plants. ..              | 30 |



## List of Figures

|   |    |
|---|----|
| Figure 1. Fractionation scheme of methanol extract of each sample .....   | 6  |
| Figure 2. DPPH free radical scavenging activity of methanol extracts of Jeju plants. ....                                 | 11 |
| Figure 3. DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of <i>Ligustrum obtusifolium Sieb. et Zucc.</i> ..... | 14 |
| Figure 4. DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of <i>Pyrrhosia lingua Farwell.</i> .....             | 14 |
| Figure 5. DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of <i>Corydalis ochotensis Turczaninow.</i> .....     | 15 |
| Figure 6. DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of <i>Arisaema ringens.</i> .....                     | 15 |
| Figure 7. DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of <i>Lamium album L. nar. barbatum.</i> .....        | 16 |
| Figure 8. DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of <i>Elscholtzia splendens Nakai.</i> .....          | 16 |
| Figure 9. Superoxide scavenging activity of methanol extracts of Jeju plants. ....  | 18 |
| Figure 10. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of <i>Ligustrum obtusifolium Sieb. et Zucc.</i> .....     | 20 |
| Figure 11. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of <i>Pyrrhosia lingua Farwell.</i> .....                 | 20 |
| Figure 12. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of <i>Corydalis ochotensis Turczaninow.</i> .....         | 21 |
| Figure 13. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of <i>Arisaema ringens.</i> .....                         | 21 |
| Figure 14. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of <i>Lamium album L. nar. barbatum.</i> .....            | 22 |
| Figure 15. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of  |    |

|            |   |    |
|------------|---|----|
|            | <i>Elscholtzia splendens</i> Nakai. ....                          | 22 |
| Figure 16. | Elastase inhibition activity of methanol extracts of Jeju plants. | 25 |
| Figure 17. | Elastase inhibition activities of solvent extracts of             |    |
|            | <i>Ligustrum obtusifolium</i> Sieb. et Zucc. ....                 | 27 |
| Figure 18. | Elastase inhibition activities of solvent extracts of             |    |
|            | <i>Pyrrrosia lingua</i> Farwell. ....                             | 27 |
| Figure 19. | Elastase inhibition activities of solvent extracts of             |    |
|            | <i>Corydalis ochotensis</i> Turczaninow. ....                     | 28 |
| Figure 20. | Elastase inhibition activities of solvent extracts of             |    |
|            | <i>Arisaema ringens</i> . ....                                    | 28 |
| Figure 21. | Elastase inhibition activities of solvent extracts of             |    |
|            | <i>Lamium album</i> L. nar. <i>barbatum</i> . ....                | 29 |
| Figure 22. | Elastase inhibition activities of solvent extracts of             |    |
|            | <i>Elscholtzia splendens</i> Nakai. ....                          | 29 |





## I. 서론

화장품의 기원은 유사 이전부터 종교적인 행사, 자기과시 또는 자연환경 등으로부터 자신의 보호를 목적으로 식물기름, 꽃잎, 숯, 황토 등을 사용하여 화장을 한 것에서 유래한다. 그 후 시대의 변천에 따른 산업의 발전과 공업적인 유기합성 기술이 발전되어 유화제, 계면활성제, 향산화제, 방부제 등이 개발되면서 본격적인 화장품의 발전을 가져왔다.<sup>1)</sup> 오늘날에 있어서 고령화 인구의 증가와 노출된 피부에 대한 스트레스는 피부 관리에 대한 욕구를 증가 시키는 큰 원인이 된다. 또한 과거와 같이 피부를 여러 수단으로 변장하는 것이 아니라 피부를 자연스럽게 건강하며 보기 좋은 상태를 유지시키기 위해 여러 가지 방법을 강구하는 추세이다.<sup>2)</sup> 인류가 화장품을 통해 얻고자 하는 효과는 메이크업 이외에도 항 노화 (항 주름)효과, 보습, 미백효과가 있으며, 이러한 것들이 화장품 개발의 큰 테마가 되고 있다.<sup>3)</sup> 사람에게 있어서 피부노화는 화장품의 사용목적 가운데, 중요한 부분을 차지하고 오래 전부터 노화과정을 설명하기 위한 여러 가지 이론들이 제안되었으며, 아직도 많은 연구가 진행되고 있다.<sup>4)</sup>

최근 화장품에서는 기능성이 특히 강조되고 있다. 피부과학의 발전과 더불어 미백, 주름방지, 욱모 등의 피부 및 모발에 대한 화장품의 효과 향상에 대한 관심이 높아지고 있다. 현재 널리 연구되고 있는 화장품의 기술 분야는 Table 1과 같이 요약할 수 있다.<sup>6)</sup> 기능성 화장품이란 기존의 인체를 청결 또는 미화시키고, 피부 또는 모발을 건강하게 유지하기 위한 물품으로 인체에 대한 작용이 경미한 것에서 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키는 등의 적극적 의미를 내포하고 있어 피부 또는 모발의 건강을 유지할 뿐 아니라 증진하기 위한 물품으로 확대하여 정의하고 있다. 기능성 화장품을 구체적으로 정의하면 첫째, 미백에 도움을 주는 기능, 둘째, 피부의 주름을 완화 또는 개선하는 기능, 셋째, 피부를 곱게 태워주는 기능 마지막으로 자외선으로부터 피부를 보호하는 기능의 총 네 가지 기능을 화장품에 첨가한 화장품이 “기능성” 화장품이라는 신 개념이 도입되었다(화장품신문, 2001)

근래 경제 개발로 인해 지구 환경이 지속적으로 파괴됨에 따라 많은 문제들이 표면화되고 있다.<sup>5)</sup> 유럽, 미국, 일본 등의 선진국에서는 광우병의 발병으로 동물유래의 화장품 소재 등이 대부분 식물 유래의 소재로 급격히 대체되고 있으며, 식물 유래의 화장품 소재로 올리브유, 야자유와 사포닌, 소맥 배자유, 미강유, 인지질 등과 같은 계면활성성분, 아미노산, 단백질, 당류 등을 함유한 수용성 성분, 로즈메리 나뭇잎, 버드나무껍질 추출액, 나래지치뿌리, 꿀, 당근 등 다양한 천연물이 보습제, 피막 형성제, 피부 보호제, 립스틱, 향료 등으로 이용되고 있다. 최근 MMP-1(Matrix Metalloproteinase-1) 및 엘라스티나제의 활성을 억제하는 소재, 히알루론산의 합성을 촉진하는 소재, 활성산소 제거능을 가진 소재, 각화세포 및 섬유아세포의 증식을 촉진하는 소재 등이 연구개발 중이거나 이미 기능성 화장품의 원료로 사용되고 있다. 최근에는 콜라겐, 포도 씨 추출물, 석류추출물, 베타카로틴 등의 천연물을 사용해 식용이 가능한 신 개념의 화장품과 해양유래의 화장품 소재 개발도 활발하다.<sup>3)</sup>

인체 등의 유산소 호흡을 하는 생명체는 세포내에서의 호기성 물질대사에 필요한 전자전달 과정을 통해 에너지를 생성하고 이용할 수 있다. 생리적 조건에서 산소분자는 전자전달계를 거쳐 물로 환원되지만, 상대적으로 높은 산소 분 안에서는 superoxide anion( $O_2^-$ ) 등의 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 전자전달계의 부산물로서 생성된다.<sup>7)</sup> 활성산소란 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 지닌 산소 원자나 분자를 의미한다. 이들은 매우 불안정하여 이 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 잃거나 혹은 주위로부터 전자 하나를 얻어, 보다 안정된 상태로 가려는 성질을 가지고 있다.<sup>11)</sup> 때문에 대부분의 활성산소는 다양한 분자와 재빨리 반응하여 세포내 기능에 영향을 미친다. 활성산소와 관련 free radical은 노화, 염증 발암, 동맥경화를 비롯한 혈관 장애, 신장 장애 및 당뇨병 등 많은 질병의 병인인이 추측되고 있으므로<sup>8),9)</sup> 활성산소종이 생체 내에서 일으키는 반응은 자동 산화 반응의 개시 및 지질의 과산화 반응 등을 초래하며, 이러한 반응을 통해 여러 세포들이 공격을 받는다. 이러한 문제들의 원인이 되는 활성 산소종을 소거하거나 그 작용을 억제하는 메카니즘을 활성화하는 약물 또는 물질을 개발하는 것은 그 중요도가 높다고 할 수 있다. 이러한 효소들의 활성을 증대시키는 물질 및 항산화 작용이 있는 물질을 이용하여 활성산소종에 의한 산화적 손상으로부터 세포를 보호하고자 합성 화합물과 천연식물들에 관한 연구와 보고가 이루어지고 있다. 천연식물은 부작용이 적으며, 자

연에서 손쉽게 얻을 수 있고 음식물로도 섭취 할 수 있는 등의 여러 가지 장점으로 인하여 각광을 받고 있다.<sup>7), 10)</sup>

항산화제(antioxidant)란 산화성 스트레스로 인하여 생성되는 산화물질의 불균화 및 산화 억제 기능을 위해 방어하는 물질 또는 효소로 free radical의 독성을 억제 할 뿐만 아니라 유지의 산화속도를 억제하여 주는 물질들이나 요인을 말한다.<sup>12)</sup> 항산화제는 합성 항산화제와 천연 항산화제로 나눌 수 있다. 합성 항산화제는 천연항산화제에 비해 효과가 월등하나 그 안정성의 문제로 허용량을 준수하여야 한다. 폐놀화합물인 합성 항산화제는 여러 나라에서 널리 사용되고 있는데, 현재 우리나라에서 사용되고 있는 것은 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), PG(propyl gallate) 그리고 TBHQ(tertiarybutylhydroxyquinone) 등이다.<sup>13)</sup> BHA는 단용 혹은 혼용으로 일정수준 이상 섭취 시 심각한 여러 질병을 유발시킬 수 있다고 한다.<sup>14), 15), 20)</sup> 또한 합성 항산화제는 고온에서 불안정 하여 생체 부작용이 없고 활성 산소를 제거 할 수 있는 항산화력이 강한 천연 항산화제를 찾으려는 연구가 더욱 활발하게 진행 될 것으로 여겨진다.

본 연구는 이러한 흐름에 발맞추어 제주도에서 자생하고 있는 6종의 식물을 대상으로 유기용매 분획을 이용하여 각 추출물을 분리하고 각 분획별로 다음과 같이 DPPH radical 소거 활성 측정, superoxide(O<sup>-2</sup>) 소거능 측정, elastase inhibition 활성 측정을 하여 새로운 천연물 생리 활성 물질의 개발 가능성을 알아보고자 한다.

| 화장품 산업의 주요 연구 분야 |   |
|------------------|---|
| 연구 분야            | 연구 현황   |
| 주름 방지            | 피부노화 메커니즘에 관한 연구<br>신진대사 촉진 및 콜라겐 합성 촉진 물질 개발<br>Cytokine류의 개발 및 응용   |
| 보습               | Ceramide 및 pseudoceramade의 개발<br>Lamellar liquid crystal 구조 제형 개발<br>고분자 보습 성분의 개발  |
| 보호               | 천연물로부터 항산화, 항염증, 자외선 차단 성분 추출<br>자외선 차단제의 개발  |
| 미백               | 멜라닌 생성 억제 성분 개발<br>호르몬 발현 억제 및 유사체의 개발  |
| 여드름 방지           | 피지 분비 억제 물질 개발<br>항염증 성분 활용   |
| 소재 개발            | 무기분체의 크기 표면 특성 개량<br>유기/무기 복합화 기술   |
| 제형 개발            | Encapsulation을 이용한 활성 성분 안정화 시스템 개발<br>가시적 특이성이 부여된 제형 개발   |
| 효능 연구            | 보습, 미백, 유포, 탄력 등의 효능/효과 시험법 개발<br>DNA칩을 이용한 스크리닝법 개발<br>DNA shuffling, cell surface display, phage display를 이용한 효능원료 스크리닝법 개발 |

Table 1. 화장품 산업의 주요 연구 분야.

## II. 재료 및 실험방법

### 1. 재료

#### 1) 시료준비

본 연구에서 사용한 쥐똥나무는 2004년 1월에 제주대학교 근처에서 채집하여 잎을 실험에 사용하였으며, 2002년 6월 제주도 조천읍 선흘리에서 채집한 석위는 전초를 실험에 사용하였다. 눈괴불주머니는 2002년 10월 제주도 조천읍 선흘리에서 채집하여 전초를 이용하여 실험에 임하였고, 큰천남성은 제주도 성판악 일대에서 2002년 6월 채집하여 전초를 사용하였다. 2005년 5월 제주대학교 근처에서 광대수염, 꽃향유를 채집하여 전초를 사용하여 실험에 임하였다.

#### 2) Methanol 추출물

채취한 식물 6종을 음지에서 통풍건조 하였다. 건조된 시료를 잘게 파쇄하여 미세 분말로 만든 후, 추출용매인 80% methanol에 두 달 동안 침지하여 추출하였다. 추출액을 필터로 여과하여 고형물을 분리하고 methanol 추출액을 감압농축기를 이용하여 농축하여 분말상태로 냉장 보관하여 각 실험에 사용하였다.

### 3) Methanol 추출물 용매분획 과정

Crude methanol extracts 6종에 대해 DPPH free radical 소거 활성 측정, superoxide( $O_2^{\cdot-}$ ) 소거능 측정, elastase inhibition 활성 측정을 우선 실시하여 실험결과를 살핀 후, 용매분획을 실시하여 추출 분리하였다. 획득한 각각의 methanol 추출물 일정량을 1L의 1차 증류수에 현탁 시킨 후, 분획깔때기를 이용하여 극성이 다른 용매 n-hexane, ethyl acetate, butanol을 순차적으로 이용하여 용매분획을 실시하였다. 분획깔때기에 1L의 1차 증류수에 현탁 시킨 시료를 넣은 후 동량의 n-hexane을 넣고 잘 혼합한 후 최소 6시간을 방치하여 수층과 추출용매의 두층으로 나뉘도록 하였다. 추출 용매를 분리하고 남은 여액을 같은 방법으로 ethyl acetate와 butanol을 차례대로 넣고 각층별 용매를 얻어 감압농축을 통해 시료를 얻었다. (Figure 1)

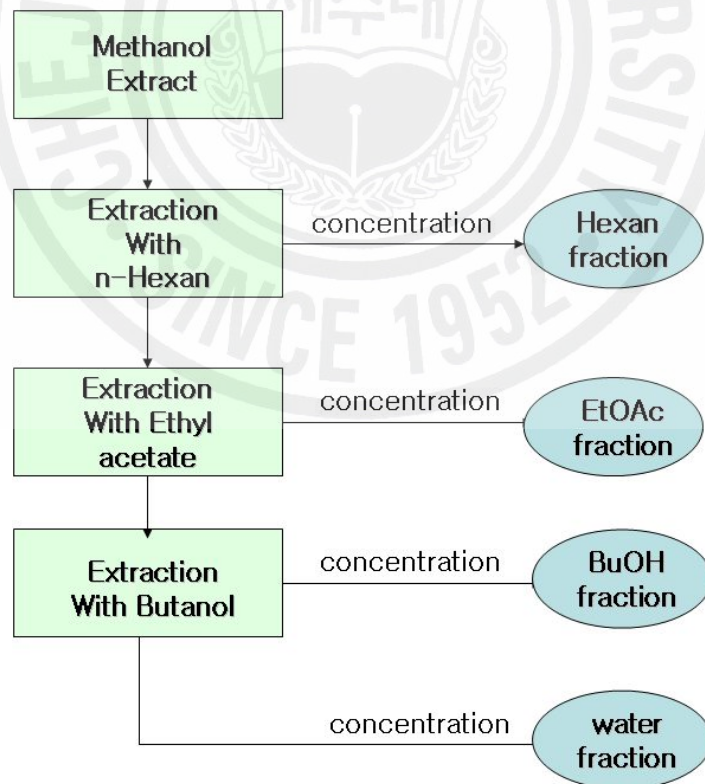


Figure 1. Fractionation scheme of methanol extract of each sample.

## 2. 시약 및 기기

### 1) 추출 및 분리과정

본 실험에서 시료의 추출 및 용매분획에 사용된 용매들은 Merck Co. junseiCo.,사의 제품을 사용하였다. 침출된 용매 및 용매 분획물 등을 감압농축 시키기 위하여 Evaporator(EYELA, JAPAN)를 사용하였고, 동결건조기(lishin Lab, Korea)를 사용하였다.

### 2)활성측정

항산화 활성 측정 시 사용한 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl(DPPH) 은 Sigma-Aldrich사(USA)에서 구입하여 사용하였으며, 대조군으로는 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich사(USA)에서 구입하여 사용하였다. elastase 주름억제활성 실험 시 기질로 사용된 N-succinyl-(ala-ala-ala)-*p*-nitroanilide)은 Sigma-Aldrich(USA)사에서 구입하였고, 효소로 사용된 elatase porcine pancreatic은 Sigma-Aldrich(USA)사에서 구입한 것을 사용하였다. superoxide 억제활성 실험 시 대조군으로 Superoxide Dismutase Bovine Liver는 CALBIOCHEM사 에서 구입하여 사용하였다. 활성 측정 시 사용한 기기로는 PerkinElmer 1420 Multilabel counter VICTOR3V를 사용하였다.

### 3. 실험방법

#### 1) DPPH radical 소거 활성 측정

전자공여능(electron donating ability) 측정은 Blois 방법에 의한 DPPH free radical 소거법에 따라 측정하였다. 즉, methanol에 녹인 여러 농도의 시료 각각을 96well plate에 100  $\mu$ l씩 분주하고 0.4 mM DPPH용액을 동량 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조군으로는 Vitamin C, butylated hydroxy anisole(BHA)를 사용하였다. DPPH radical 소거활성은 아래의 식으로 산출하였고, DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(RC<sub>50</sub>)로 표시하였다.

$$\text{DPPH radical 소거활성(\%)} = (\text{Acontrol} - \text{Asample}) / \text{Acontrol} \times 100$$

Asample = 시료를 첨가한 반응액의 흡광도

Acontrol = 시료 대신 methanol을 첨가한 반응액의 흡광도

#### 2) Superoxide(O<sup>-2</sup>) 소거능 측정 방법

superoxide는 phenazine methosulfate(PMS)- $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide(환원형 NADH)계에서 NADH 산화에 의하여 생성되고 nitroblue tetrazolium(NBT)의 산화에 의하여 측정하였다. 실험은 96well Plate에 sample과 30 mM Tris-HCl 완충 용액(pH 8.0)을 넣은 후 100  $\mu$ m의 PMS를 가한 후 560 nm 측정하였다(A1). 측정 후 5 mM NADH 와 0.5 mM NBT를 순차적으로 가하여 다시 560 nm 측정하였다(A2).

positive control : Asorbic acid

negative control : D.W (A0)

$$\text{Superoxide 소거능(\%)} = (\text{A0} - \text{A2} - \text{A1}) / (\text{A0} - \text{A1}) \times 100$$



### 3) Elastase Inhibition 활성 측정

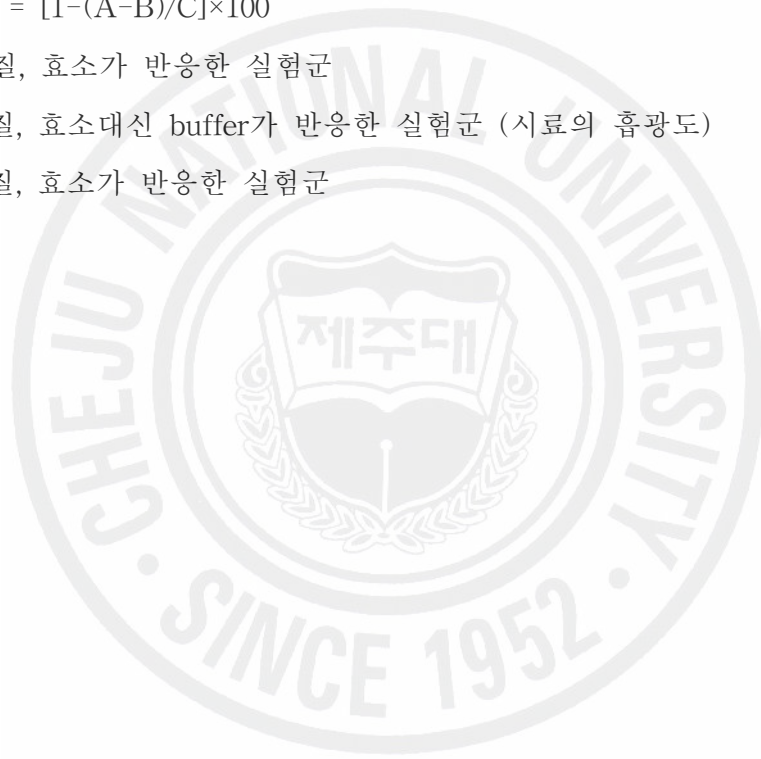
후보 생리활성물질 추출물을 농도별로 포함한 200 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0) 50  $\mu$ l에 10  $\mu$ l/ml elastase 100  $\mu$ l와 5 mM N-succinyl-ala-ala-ala-p-nitroanilide 50  $\mu$ l를 넣고 잘 섞은 후, 실온에서 20분간 반응시키고 생성된 p-nitroaniline의 양을 410 nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다. 대조군으로 추출물과 같은 농도인 빈랑자를 사용하여 위와 동일한 실험을 수행하여 후보물질의 elastase의 활성 억제 정도를 비교하였다.

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

A : 시료, 기질, 효소가 반응한 실험군

B : 시료, 기질, 효소대신 buffer가 반응한 실험군 (시료의 흡광도)

C : 용매, 기질, 효소가 반응한 실험군



### Ⅲ. 실험결과 및 고찰

#### 1. DPPH free radical 소거 활성 측정

##### 1) 시료 추출물의 DPPH free radical 소거 활성 측정

항산화 물질의 가장 큰 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 유리기 소거 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 식물중의 항산화 효과나 인체 내 노화를 억제하는 척도로 이용된다.<sup>18)</sup> DPPH는 비교적 안정된 프리 라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 515 nm~520 nm 부근에서 최대 흡광도를 가지며, 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주면서 라디칼이 소멸되고 특유의 보라색이 없어지면서 특정 파장대에서 흡수가 없어지게 된다.<sup>16), 19)</sup> DPPH free radical 소거활성 측정법은 1958년 처음 소개되었는데(Blois, 1958), 색상의 변화정도를 이용하여 항산화 활성을 측정하는 아주 간편한 방법<sup>17)</sup>이다. 제주도 자생식물 Methanol 추출물들과 대조군인 BHA(Butylated hydroxy anisole), Vitamin C에 의한 DPPH free radical 소거 활성을 측정하여 비교한 결과는 Table 2와 Figure 2와 같다. 결과에서 볼 수 있듯이 각 추출물의  $RC_{50}$  값은 석위에서  $17.32 \mu\text{g/mL}$ 로 대조군 BHA  $43.37 \mu\text{g/mL}$  와 Vitamun C  $29.59 \mu\text{g/mL}$ 보다 훨씬 높은 radical 소거 활성을 보이는 것으로 나타났으며, 꽃향유 ( $70.98 \mu\text{g/mL}$ ) > 쥐똥나무 ( $84.38 \mu\text{g/mL}$ ) > 눈피불주머니 ( $615.93 \mu\text{g/mL}$ ) > 큰천남성 ( $708.68 \mu\text{g/mL}$ ) > 광대수염 ( $>1000 \mu\text{g/mL}$ )순으로 조사되었다. 이러한 결과는 대조군에 비교하였을 때 아주 좋은 소거 활성을 나타내지는 않았지만, 단일 물질이 아닌 methanol 추출물임을 감안한다면 충분히 소거 화설이 있다고 할 수 있어, 대조군보다 뛰어난 소거 활성을 나타냈던 석위와 함께 시료 추출물에 대해 유기 용매 분획을 실시하였다.

Table 2. DPPH free radical scavenging activities of Methanol extracts of Jeju plants.

| sample    | 학 명   | RC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/mL) |
|-----------|---|--|
| 취퐁나무      | <i>Ligustrum obtusifolium</i> Sieb. et Zucc.                | 84.38                                  |
| 석위        | <i>Pyrrrosia lingua</i> Farwell                             | 17.32                                  |
| 눈괴불주머니    | <i>Corydalis ochotensis</i> Turczaninow                     | 625.92                                 |
| 큰천남성      | <i>Arisaema ringens</i> Schott                              | 708.68                                 |
| 광대수염      | <i>Lamium album</i> L. nar. <i>barbatum</i> (Sieb. et Zucc) | >1000                                  |
| 꽃향유       | <i>Elscholtzia splendens</i> Nakai                          | 70.98                                  |
| BHA       |   | 43.37                                  |
| Vitamin C |   | 29.59                                  |

1) RC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

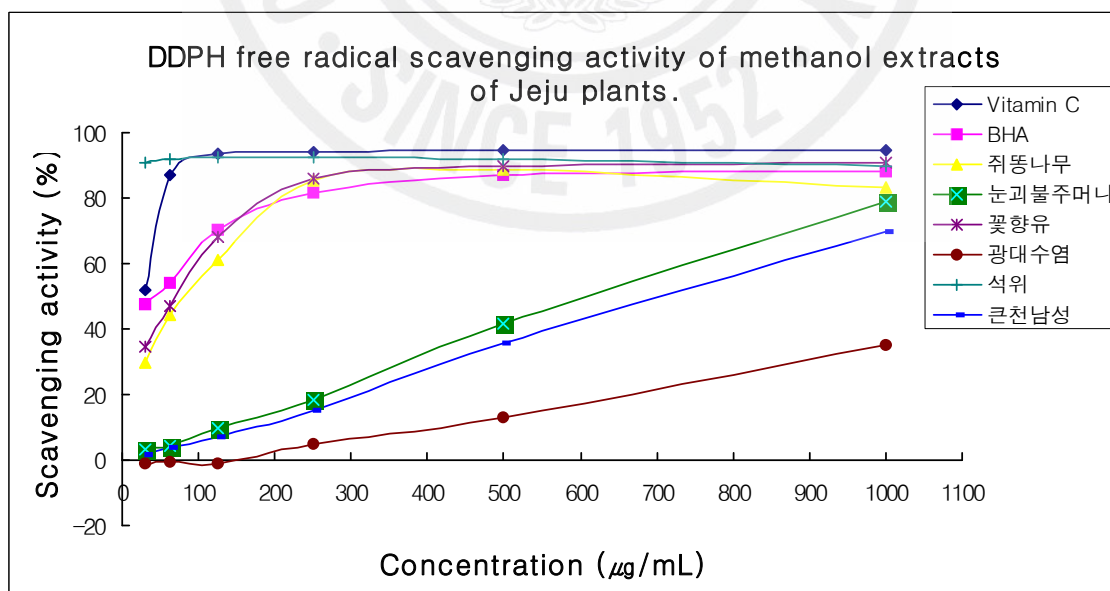


Figure 2. DPPH free radical scavenging activity of Methanol extracts of Jeju plants.

## 2) 시료 분획물의 DPPH free radical 소거 활성 측정

제주도 자생식물 6종 MeOH 추출물의 DPPH free radical 소거 활성을 측정하고 이 시료들을 유기 용매 분획을 실시하였으며, 위와 동일한 방법으로 DPPH free radical 소거 활성을 측정한 결과를 Table 3과 Figure 3, Figure 4, Figure 5, Figure 6, Figure 7, Figure 8에 나타내었다. 쥐똥나무의 분획물은 EtOAc 층에서  $RC_{50}$ 이  $115.55 \mu\text{g/mL}$ , BuOH층  $267.50 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  층에서  $370.37 \mu\text{g/mL}$ 의  $RC_{50}$  값을 나타내어 대조군인 BHA ( $43.37 \mu\text{g/mL}$ )과 Vitamin C ( $29.59 \mu\text{g/mL}$ )에 비해 소거 활성 정도가 많이 떨어지는 것으로 여겨진다. 눈피불주머니의 분획물은 EtOAc 층에서  $RC_{50}$ 이  $258.84 \mu\text{g/mL}$ , BuOH층의  $RC_{50}$ 이  $322.14 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ 층의  $RC_{50}$ 은  $946.50 \mu\text{g/mL}$ 로 대조군과 비교하였을 때 free radical 소거 활성이 좋지 않음을 알 수 있었다. 꽃향유 분획물 Hexane층에서  $603.44 \mu\text{g/mL}$ 로  $RC_{50}$  값을 보였고, EtOAc 층  $RC_{50}$ 값은  $18.03 \mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 BHA ( $43.37 \mu\text{g/mL}$ )과 Vitamin C ( $29.59 \mu\text{g/mL}$ )에 비해 뛰어난 활성을 보임을 확인 할 수 있었다. BuOH 층이  $RC_{50}$ 은  $98.24 \mu\text{g/mL}$ 을 보였다. 광대수염의 분획물은 EtOAc층  $331.32 \mu\text{g/mL}$ , BuOH층  $422.43 \mu\text{g/mL}$ 의  $RC_{50}$  값을 확인 할 수 있었으며, 석위의 분획물에서는 EtOAc 층에서  $17.17 \mu\text{g/mL}$ , BuOH층  $45.51 \mu\text{g/mL}$ 의  $RC_{50}$ 을 보여, 대조군인 BHA ( $43.37 \mu\text{g/mL}$ )과 Vitamin C ( $29.59 \mu\text{g/mL}$ )에 비해 소거 활성 정도 매우 뛰어남을 알 수 있었다.  $\text{H}_2\text{O}$ 층에는  $143.14 \mu\text{g/mL}$ 의  $RC_{50}$  값을 확인 하였다. 마지막으로 큰천남성의 분획물에서는 EtOAc층에서  $42.82 \mu\text{g/mL}$ 의  $RC_{50}$ 을 확인하여 대조군 BHA와 유사한 활성을 보임을 확인하였고, BuOH층에서  $522.62 \mu\text{g/mL}$ 의  $RC_{50}$  값을 확인하였다.

| Fractions               | RC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/mL) | Fractions             | RC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/mL) |
|-------------------------|--|-----------------------|--|
| 귀퉁나무-Hexane             | >1000                                  | 광대수염-Hexane           | >1000                                  |
| 귀퉁나무-EtOAc              | 115.54                                 | 광대수염-EtOAc            | 331.32                                 |
| 귀퉁나무-BuOH               | 267.49                                 | 광대수염-BuOH             | 422.43                                 |
| 귀퉁나무-H <sub>2</sub> O   | 370.36                                 | 광대수염-H <sub>2</sub> O | >1000                                  |
| 눈피불주머니-Hexane           | >1000                                  | 석위-Hexane             | >1000                                  |
| 눈피불주머니-EtOAc            | 258.84                                 | 석위-EtOAc              | 17.17                                  |
| 눈피불주머니-BuOH             | 322.14                                 | 석위-BuOH               | 45.51                                  |
| 눈피불주머니-H <sub>2</sub> O | 946.50                                 | 석위-H <sub>2</sub> O   | 143.14                                 |
| 꽃향유-Hexane              | 603.44                                 | 큰천남성-Hexane           | >1000                                  |
| 꽃향유-EtOAc               | 18.03                                  | 큰천남성-EtOAc            | 42.82                                  |
| 꽃향유-BuOH                | 98.24                                  | 큰천남성-BuOH             | 522.62                                 |
| 꽃향유-H <sub>2</sub> O    | >1000                                  | 큰천남성-H <sub>2</sub> O | >1000                                  |
| BHA                     | 43.37                                  | Vitamin C             | 29.59                                  |

Table 3. DPPH free radical scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants.

1) IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

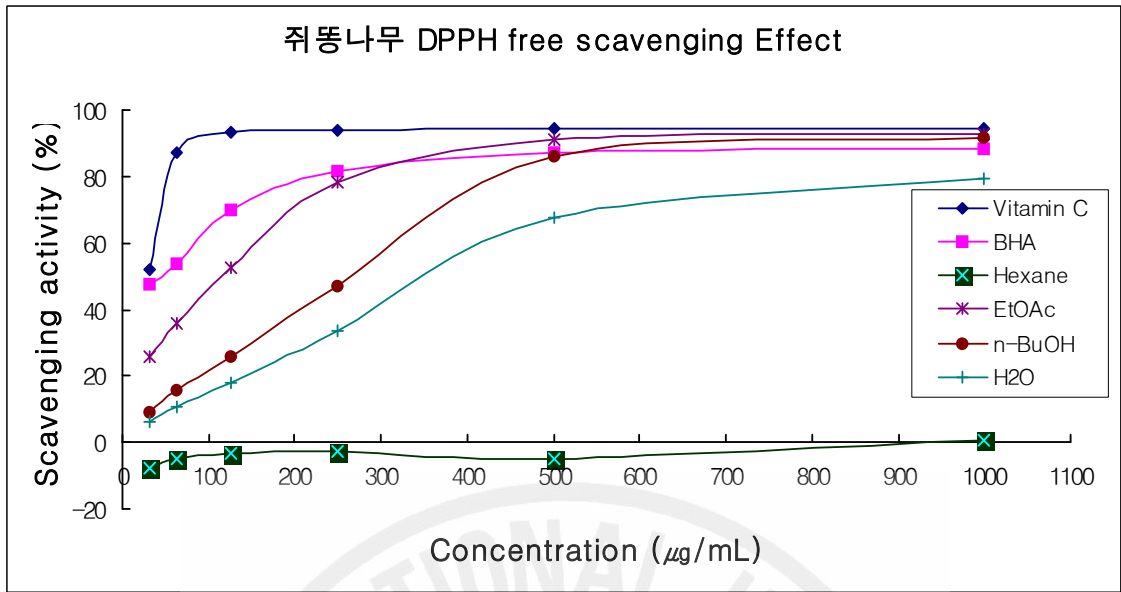


Figure 3. DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of *Ligustrum obtusifolium* Sieb. et Zucc.

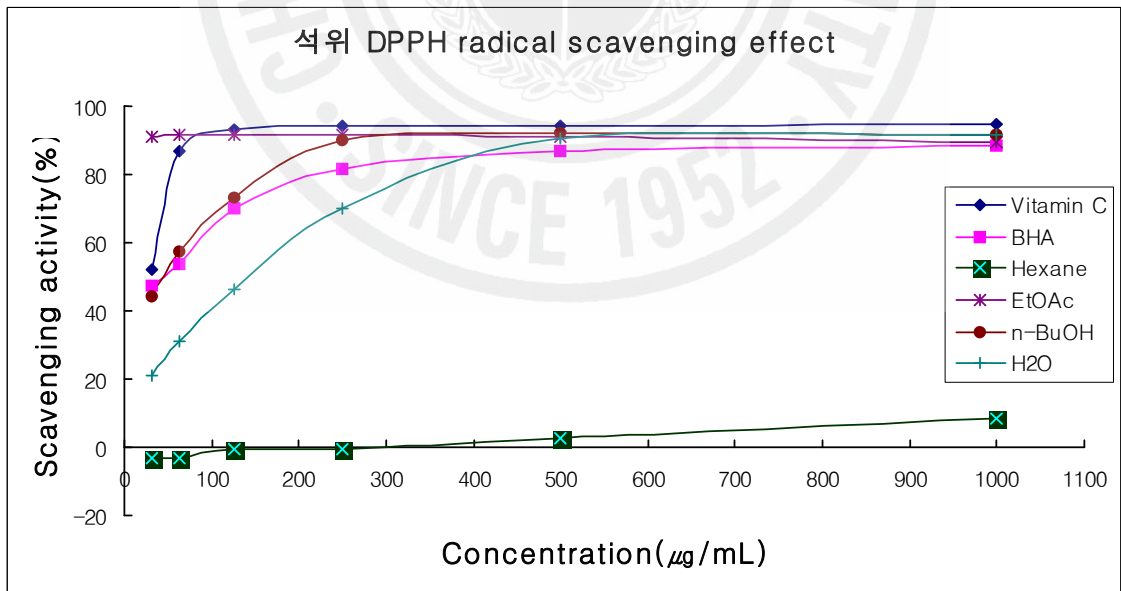


Figure 4. DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of *Pyrrrosia lingua* Farwell.

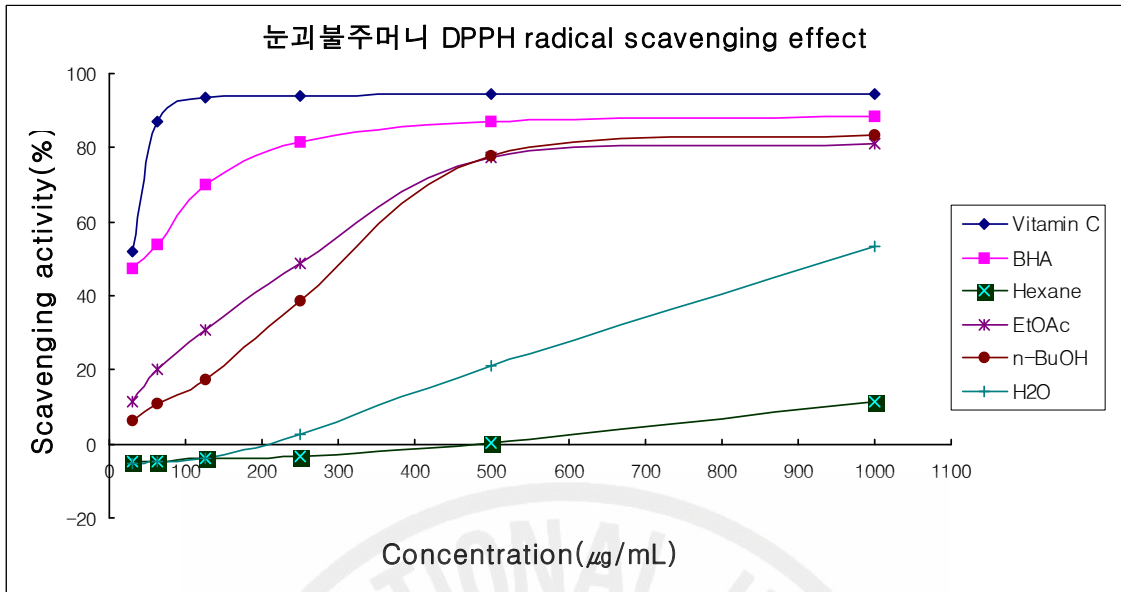


Figure 5. DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of *Corydalis ochotensis Turczaninow*.

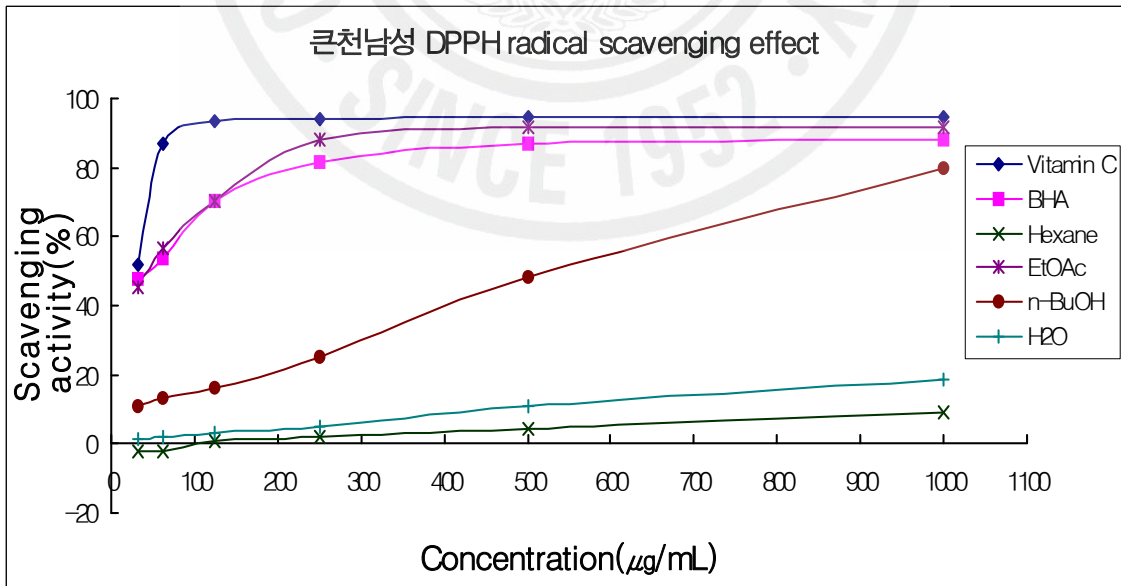


Figure 6. DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of *Arisaema ringens*.

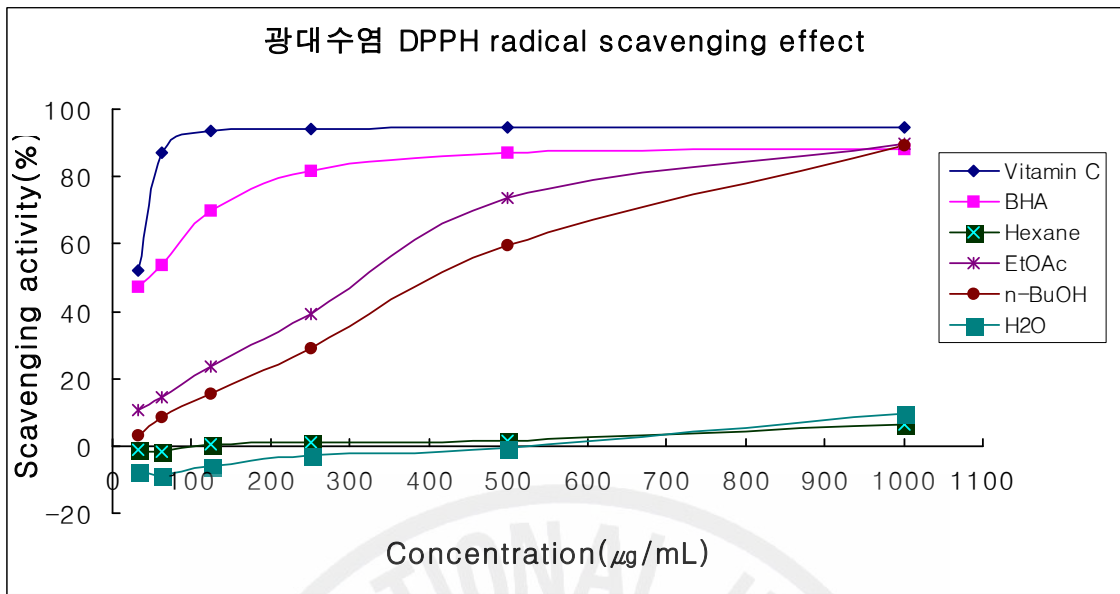


Figure 7. DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of *Lamium album L. nar. barbatum*.

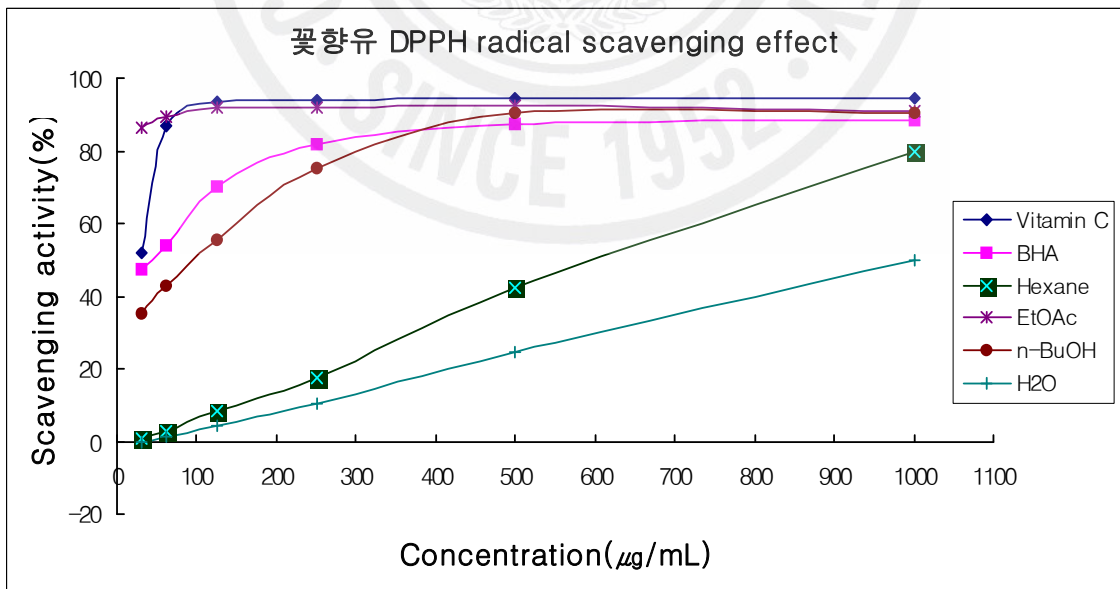


Figure 8. DPPH free radical scavenging activity of solvent extracts of *Elscholtzia splendens Nakai*.



## 2. Superoxide 소거 활성 측정

### 1) 시료 추출물의 Superoxide 소거 활성 측정

생체 내에 활성 산소가 너무 많으면 암을 발생시키거나 노화를 촉진하는 등 나쁜 영향을 미친다. 이런 활성 산소는 과식, 스트레스, 흡연, 지나친 운동으로 인한 과호흡 등에 의해 그 양이 증가하는데, 이러한 활성 산소를 분해시키는 역할을 하는 효소가 superoxide dismutase(SOD)이다.<sup>18)</sup> 생명체내 존재하는 항산화 효소 중의 하나인 SOD는 세포에 유해한 superoxide를 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이며, SOD에 의해 생성된 과산화수소는 생체 조직을 산화시키기도 하고 peroxidase나 catalase에 의하여 자신은 분해하여 무해한 물 분자와 산소 분자로 전환된다.<sup>21)</sup>

제주도 자생식물 6종의 superoxide radical 소거 효과를 평가하여 측정결과를 Table 4와 Figure 9에 나타내었다.

결과에서 보는 바와 같이 각 시료 methanol 추출물의 IC<sub>50</sub> 값을 살펴보면 석위의 추출물에서 48.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 우수한 superoxide radical 소거 효과를 보였으나, 대조군인 superoxide dismutase(SOD)의 IC<sub>50</sub> 값 13.43  $\mu\text{g}/\text{mL}$  보다는 좋지 않은 활성을 보임을 알 수 있었다. 쥐똥나무의 methanol 추출물과 꽃향유의 methanol 추출물의 IC<sub>50</sub>은 각각 117.59  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 151.97  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 superoxide radical 소거 활성을 보였으며 마지막으로, 눈피불주머니의 methanol 추출물은 659.97  $\mu\text{g}/\text{mL}$  순으로 조사되어 대체적으로 이들 성분들은 활성이 존재하는 것으로 나타났다.

Table 4. Superoxide scavenging activities of methanol extract of Jeju Plants.

| sample            | 학 명   | IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/mL) |
|-------------------|---|--|
| 쥐똥나무              | <i>Ligustrum obtusifolium</i> Sieb. et Zucc.                | 117.59                                 |
| 석위                | <i>Pyrrrosia lingua</i> Farwell                             | 48.12                                  |
| 눈괴불주머니            | <i>Corydalis ochotensis</i> Turczaninow                     | 659.97                                 |
| 큰천남성              | <i>Arisaema ringens</i> Schott                              | >1000                                  |
| 광대수염              | <i>Lamium album</i> L. nar. <i>barbatum</i> (Sieb. et Zucc) | >1000                                  |
| 꽃향유               | <i>Elscholtzia splendens</i> Nakai                          | 151.97                                 |
| SOD <sup>2)</sup> |   | 13.43                                  |

1) IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

2) SOD (superoxide dismutase)

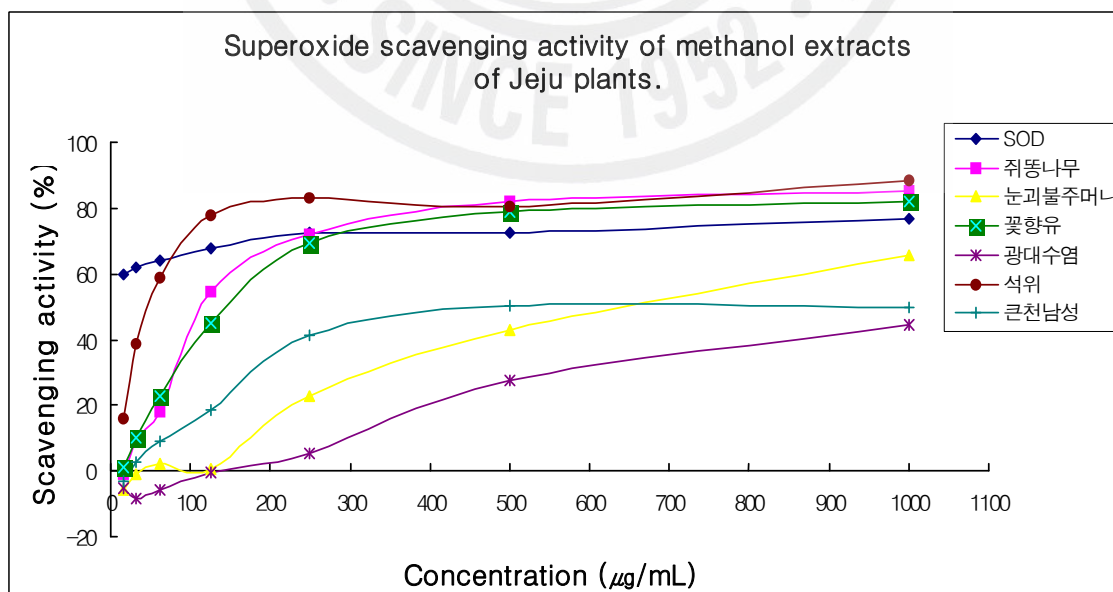


Figure 9. Superoxide scavenging activity of methanol extracts of Jeju plants.

## 2) 시료 분획물의 Superoxide 소거 활성 측정

제주도 자생식물 6종 Methanol 추출물의 항산화 활성을 측정하고, 결과를 확인한 후 시료 추출물에 대해 유기 용매 분획을 실시하였으며, 위와 동일한 방법으로 superoxide 소거 활성을 측정한 결과를 Table 5와 Figure 10, Figure 11, Figure 12, Figure 13, Figure 14, Figure 15로 나타내었다. 각각의 시료 분획물의 superoxide 소거 활성에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 살펴보면 쥐똥나무의 분획물 EtOAc층에서 500.82  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BuOH층과 H<sub>2</sub>O층에서 각각 IC<sub>50</sub>이 327.32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 298.47  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 superoxide 소거 활성을 보임을 알 수 있었다. 눈피불주머니의 분획물 BuOH층에서 716.41  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC<sub>50</sub> 값을 확인 할 수 있었다. 꽃향유 분획물 EtOAc층에서 64.62  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , BuOH층, H<sub>2</sub>O층에서 각각 176.83  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 228.54  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC<sub>50</sub>값을 확인 할 수 있었다. 광대수염 분획물 BuOH층에서 826.71  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC<sub>50</sub>값을 확인하였다. 석위의 분획물에서는 EtOAc층 28.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , BuOH층 112.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , H<sub>2</sub>O층 134.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC<sub>50</sub> 값을 확인 하였고, 마지막으로 큰천남성의 분획물에서 EtOAc층에서 222.44  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC<sub>50</sub>값을 BuOH층에서 471.06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , H<sub>2</sub>O층에서 985.76  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC<sub>50</sub>값을 확인하여 대조군인 SOD (13.43  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에 비해 좋은 활성은 확인을 할 수 없었으나, 어느 정도의 활성을 가짐은 알 수 있었다.

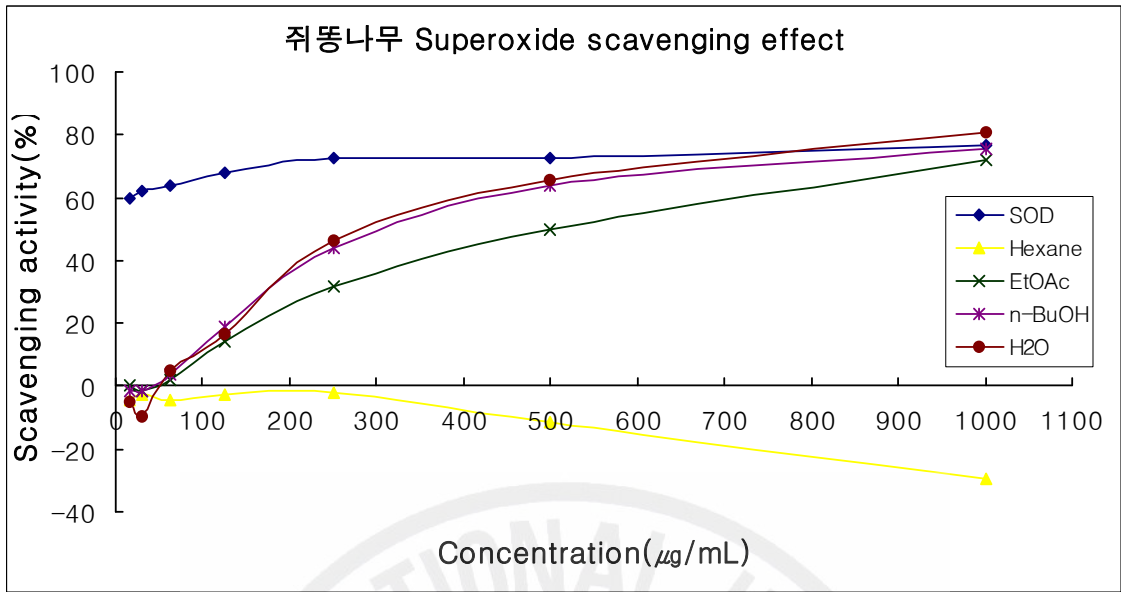


Figure10. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of *Ligustrum obtusifolium* Sieb. et Zucc.

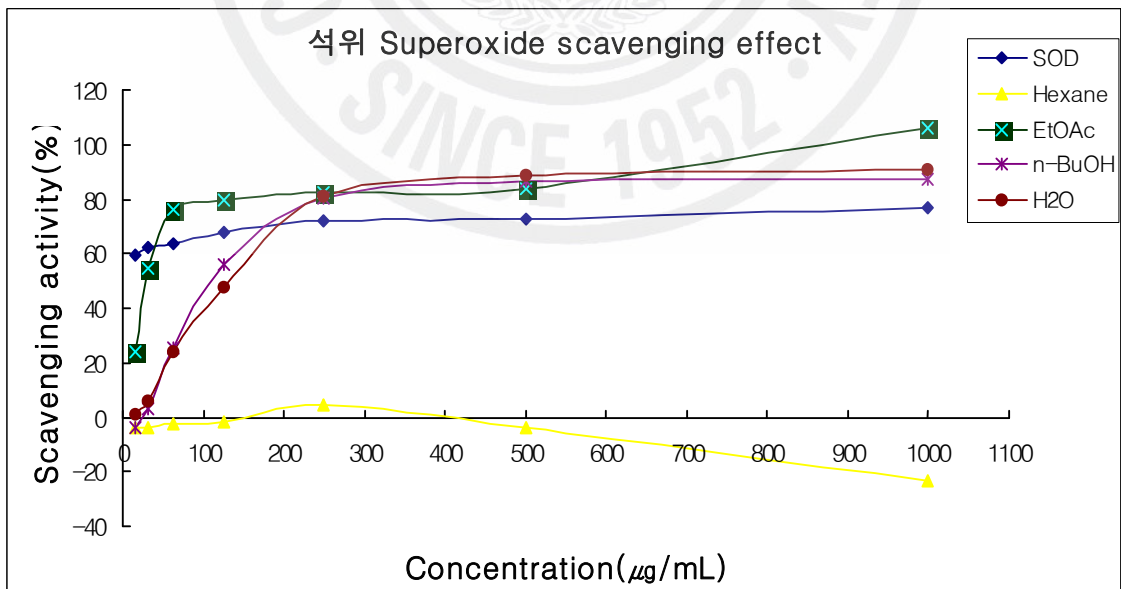


Figure11. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of *Pyrrosia lingua* Farwell.

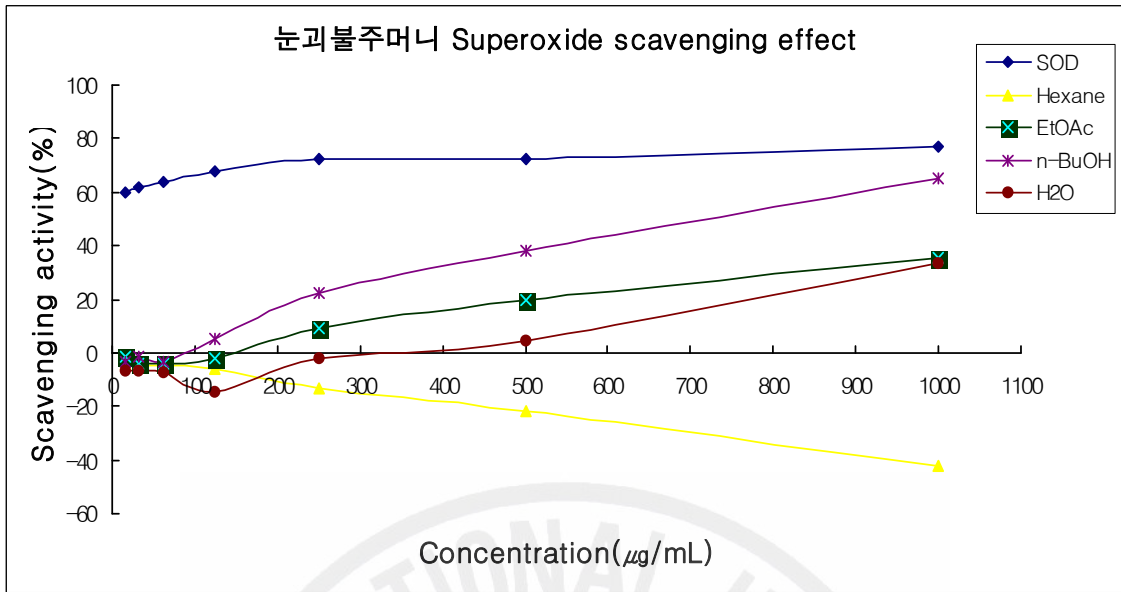


Figure12. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of *Corydalis ochotensis Turczaninow*.

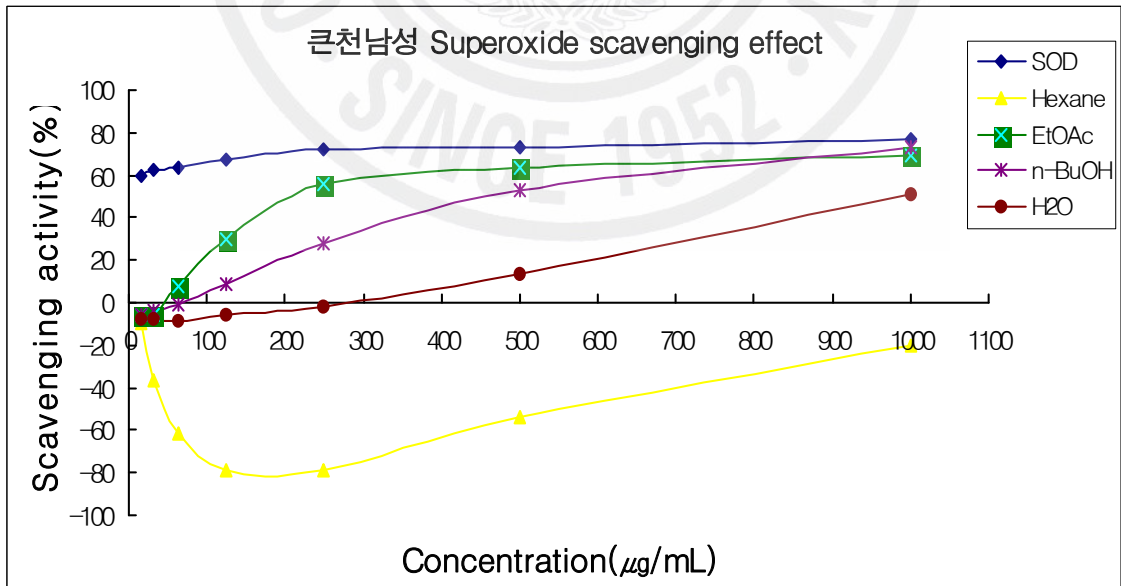


Figure13. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of *Arisaema ringens*.

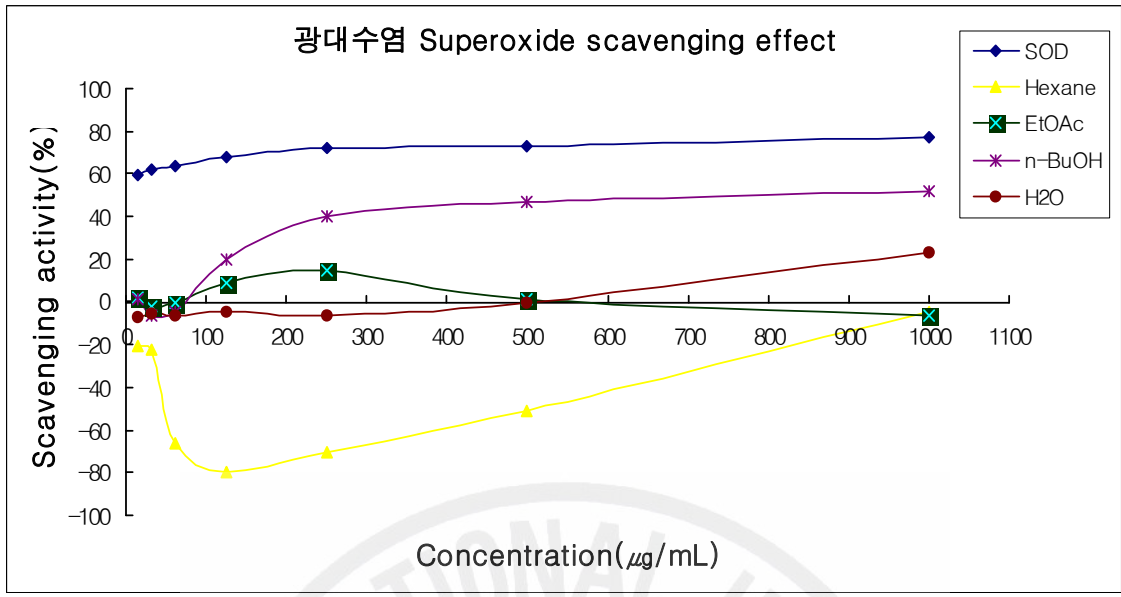


Figure14. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of *Lamium album L. nar. barbatum*.

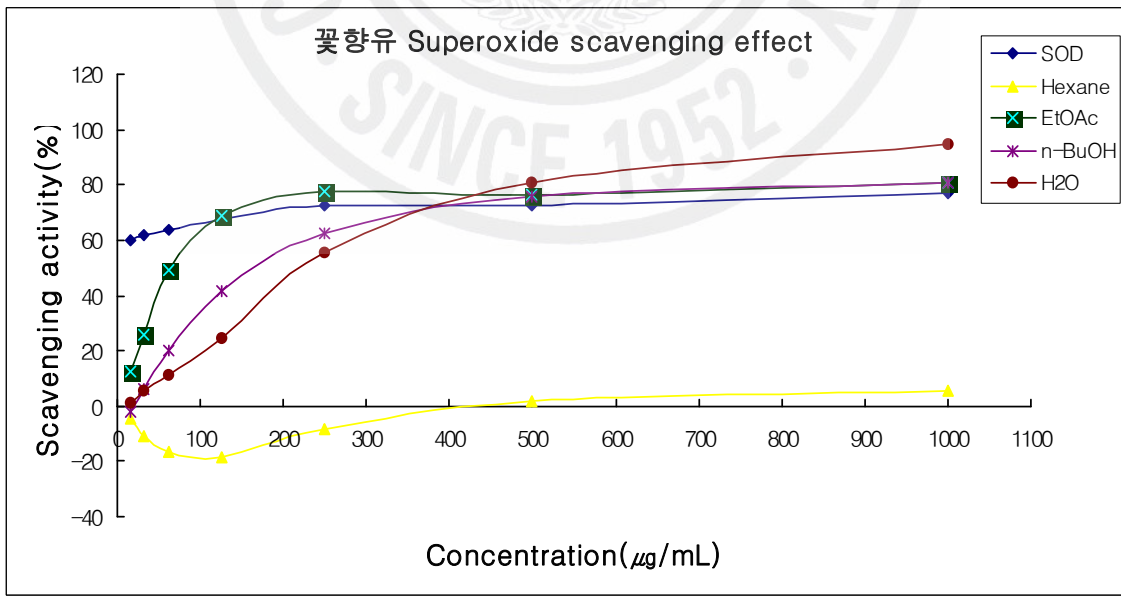


Figure15. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of *Elscholtzia splendens Nakai*.

Table 5. Superoxide scavenging activities of solvent extracts of Jeju plants.

| Fractions               | IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/mL) | Fractions             | IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/mL) |
|-------------------------|--|-----------------------|--|
| 귀퉁나무-Hexane             | >1000                                  | 광대수염-Hexane           | >1000                                  |
| 귀퉁나무-EtOAc              | 500.82                                 | 광대수염-EtOAc            | >1000                                  |
| 귀퉁나무-BuOH               | 327.32                                 | 광대수염-BuOH             | 826.71                                 |
| 귀퉁나무-H <sub>2</sub> O   | 298.47                                 | 광대수염-H <sub>2</sub> O | >1000                                  |
| 눈피불주머니-Hexane           | >1000                                  | 석위-Hexane             | >1000                                  |
| 눈피불주머니-EtOAc            | >1000                                  | 석위-EtOAc              | 28.12                                  |
| 눈피불주머니-BuOH             | 716.41                                 | 석위-BuOH               | 112.12                                 |
| 눈피불주머니-H <sub>2</sub> O | >1000                                  | 석위-H <sub>2</sub> O   | 134.56                                 |
| 꽃향유-Hexane              | >1000                                  | 큰천남성-Hexane           | >1000                                  |
| 꽃향유-EtOAc               | 64.62                                  | 큰천남성-EtOAc            | 222.44                                 |
| 꽃향유-BuOH                | 176.83                                 | 큰천남성-BuOH             | 471.06                                 |
| 꽃향유-H <sub>2</sub> O    | 228.54                                 | 큰천남성-H <sub>2</sub> O | 985.76                                 |
| SOD                     |  |                       | 13.43                                  |

1) IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

2) SOD (superoxide dismutase)

### 3. Elastase 활성저해 측정

#### 1) 시료 추출물의 Elastase 활성저해 측정

모든 생명체는 태어나면서부터 성숙과 노화 그리고 죽음의 과정을 겪게 된다. 피부도 나이가 들면 표면에 많은 잔주름이 형성되고 부위에 따라 굵은 주름을 형성하며 피부의 표면이 거칠어지고 신축성이 감소된다. 이는 나이가 들면서 유두상 진피의 혈관 분포가 감소하여 모세 혈관 벽의 기저막이 두꺼워져, 진피에 분포하는 섬유조직의 구조적 변성 및 하부 지방조직의 감소가 동반되어 지기 때문이다. 최근 피부 탄력을 유지하기 위해 elastin을 분해시키는 elastase 효소에 억제력이 있는 화합물 연구가 활발하다.<sup>22)</sup> elastase는 동물결합조직의 불용성 탄성섬유 단백질인 elastin을 분해 시켜 피부의 세포 기저층의 그물망 구조를 끊어주어, 주름을 생성하는 주된 원인으로 알려져 있다.<sup>23)</sup>

제주도 자생식물 methanol 추출물들과 대조군으로 사용된 빈랑자에 의해 elastase 활성 저해를 측정하여 비교한 결과는 Table 6, 그리고 Figure 16과 같다. 6종의 methanol 추출물중 유일하게 석위에서만 elastase 활성 저해정도를 볼 수 있었다. 석위 methanol 추출물의 IC<sub>50</sub>은 18.09  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 대조군으로 사용한 빈랑자 (10.54  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에 비교하여 아주 좋은 활성 저해를 보이지는 않으나, 단일 물질이 아닌 methanol 추출물임을 감안한다면 충분히 활성 저해가 있음을 확인 할 수 있었다.



Table 6. Elastase inhibition activities of methanol extract of Jeju Plants.

| sample | 학 명   | IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/mL) |
|--------|---|--|
| 취퐁나무   | <i>Ligustrum obtusifolium</i> Sieb. et Zucc.                | >1000                                  |
| 석위     | <i>Pyrrrosia lingua</i> Farwell                             | 18.09                                  |
| 눈괴불주머니 | <i>Corydalis ochotensis</i> Turczaninow                     | >1000                                  |
| 큰천남성   | <i>Arisaema ringens</i> Schott                              | >1000                                  |
| 광대수염   | <i>Lamium album</i> L. nar. <i>barbatum</i> (Sieb. et Zucc) | >1000                                  |
| 꽃향유    | <i>Elscholtzia splendens</i> Nakai                          | >1000                                  |
| 빈랑자    |   | 10.54                                  |

1) IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

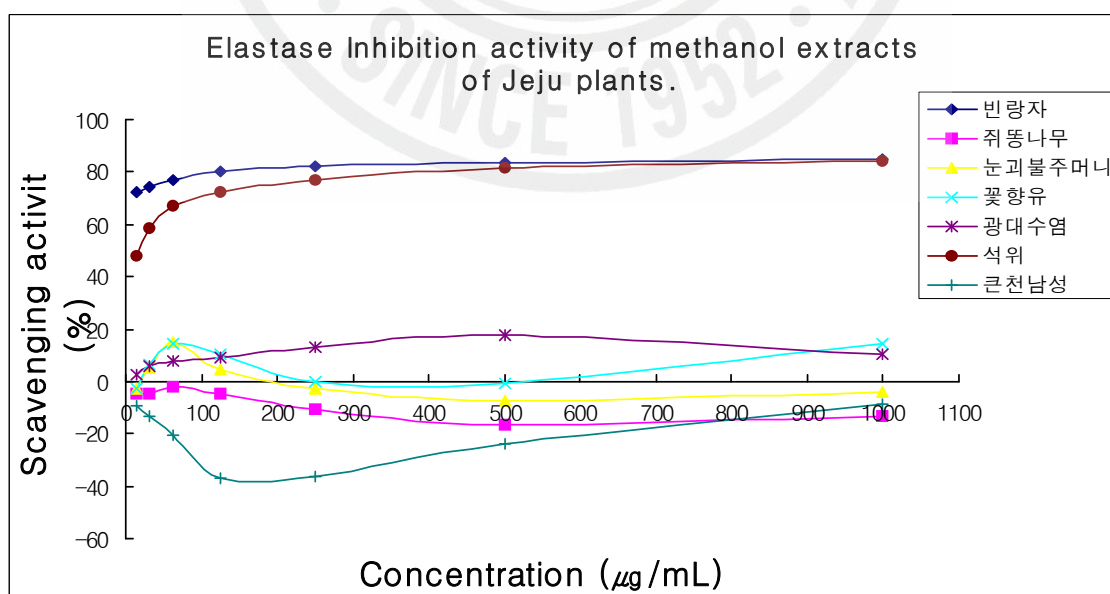


Figure 16. Elastase inhibition activity of methanol extracts of Jeju plants.

## 2) 시료 분획물의 Elastase 활성저해 측정

제주도 자생식물 6종 MeOH 추출물의 elastase 활성 저해를 측정하고 각 시료별 유기 용매 분획을 실시하였으며, 위와 동일한 방법으로 elastase 활성 저해를 측정한 결과를 Table 7과 Figure 17, Figure 18, Figure 19, Figure 20, Figure 21, Figure 22로 나타내었다. 석위의 분획물에서만 활성을 확인 할 수 있었는데 EtOAc 층에서  $IC_{50}$  이  $26.91 \mu\text{g/mL}$ 을 보이며 대조군 빈랑자 ( $10.54 \mu\text{g/mL}$ )에 비해 좋은 활성은 아니지만 비슷한 활성을 보임을 알 수 있었고, BuOH층과  $H_2O$ 층에서 각각  $116.80 \mu\text{g/mL}$ 와  $196.19 \mu\text{g/mL}$ 의  $IC_{50}$ 을 보여 주어 대조군에 미치지 못하는 활성을 가짐을 알 수 있었다.



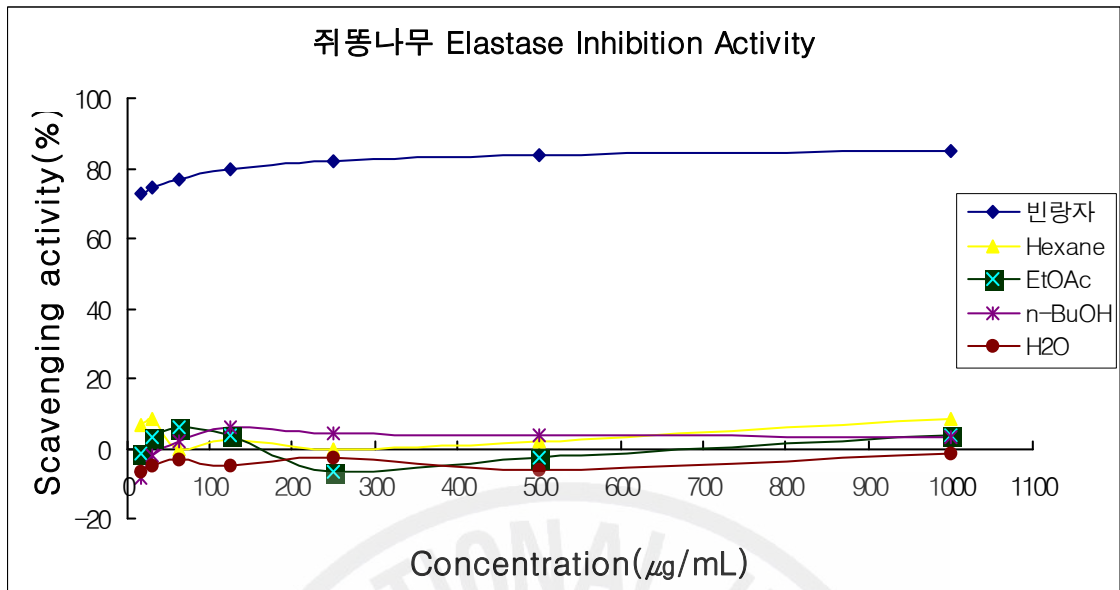


Figure17. Elastase inhibition activities of solvent extracts of *Ligustrum obtusifolium* Sieb. et Zucc.

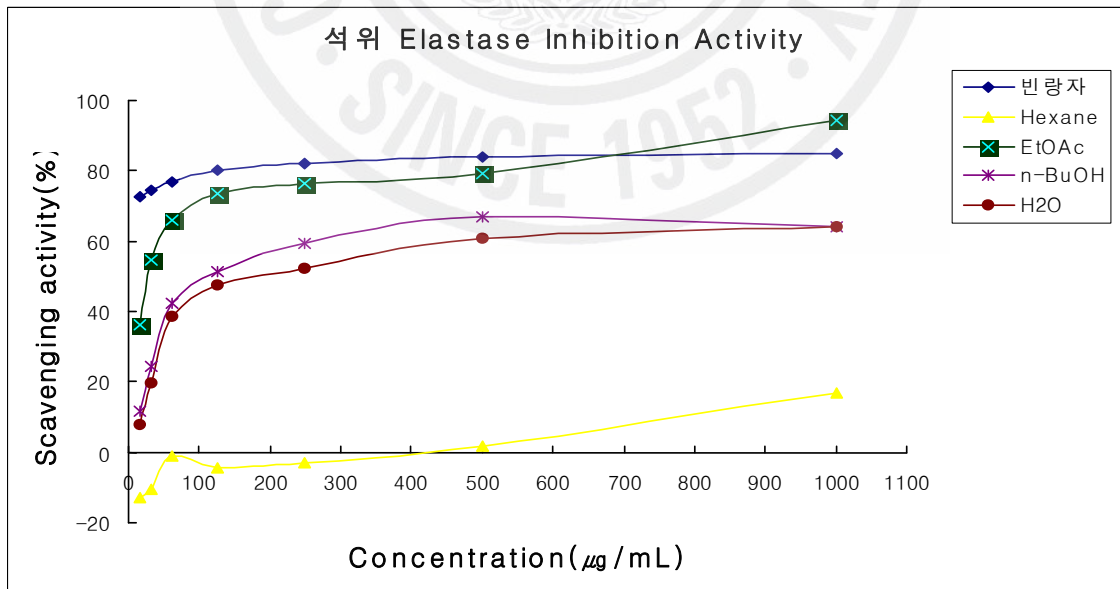


Figure18. Elastase inhibition activities of solvent extracts of *Pyrrosia lingua* Farwell.

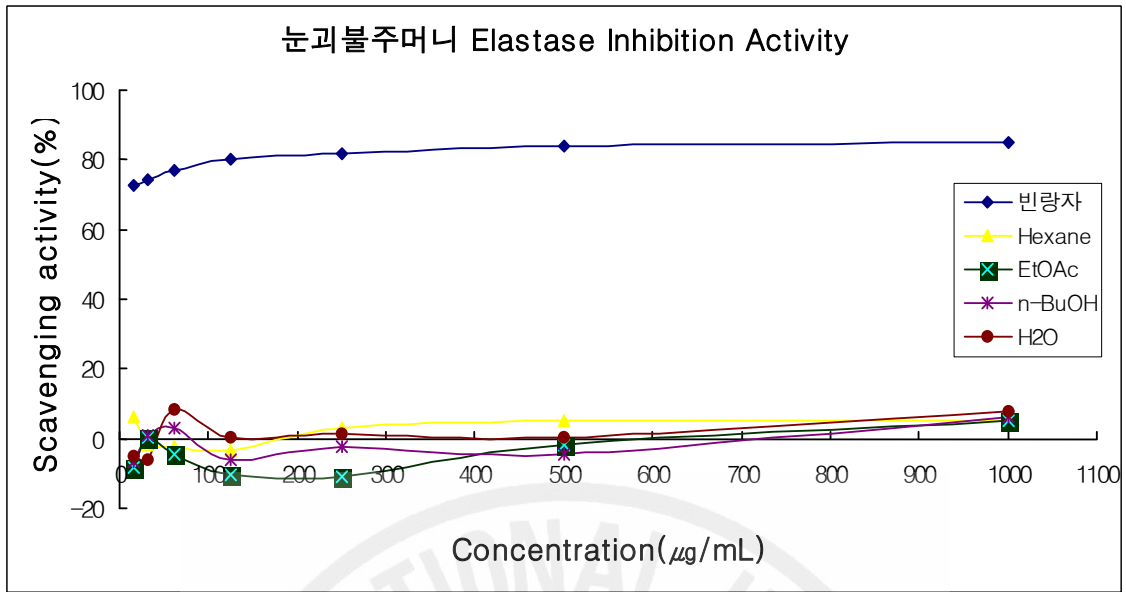


Figure19. Elastase inhibition activities of solvent extracts of *Corydalis ochotensis* Turczaninow.

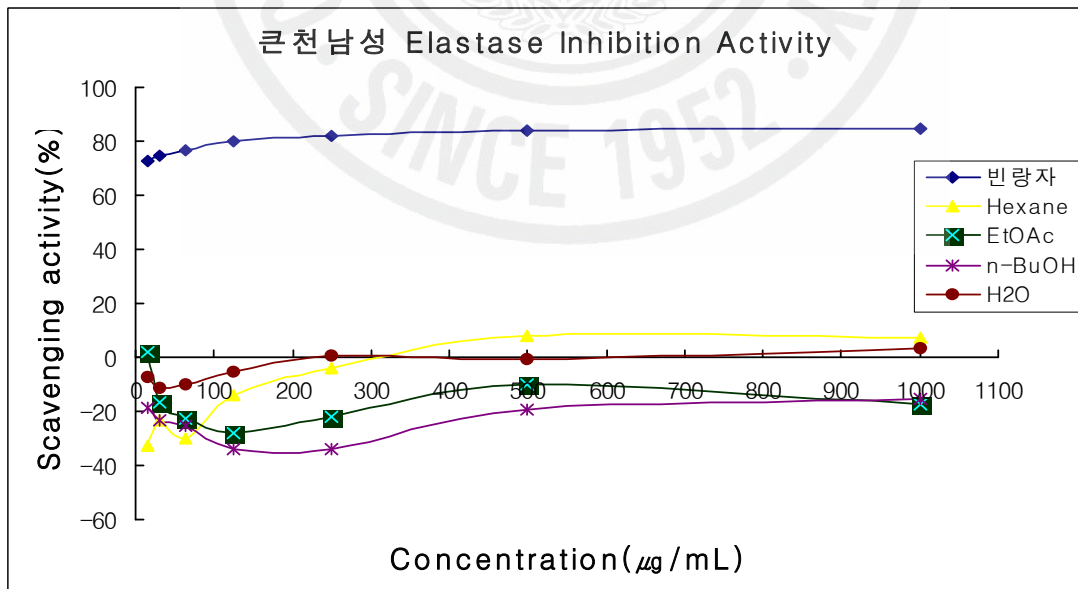


Figure20. Elastase inhibition activities of solvent extracts of *Arisaema ringens*.

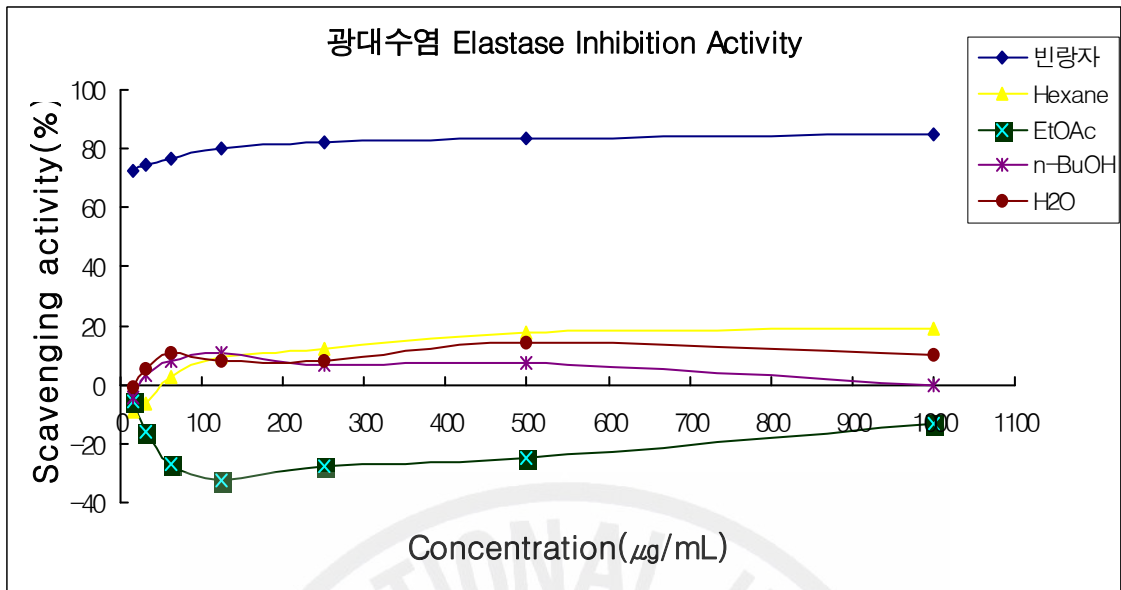


Figure21. Elastase inhibition activities of solvent extracts of *Lamium album* L. nar. *barbatum*.

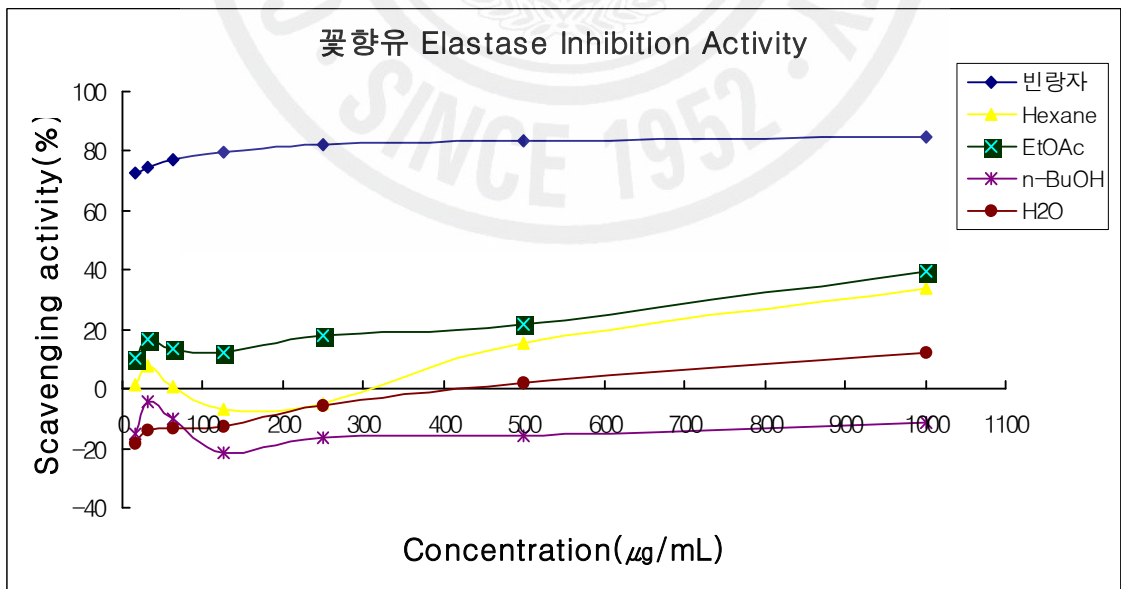


Figure22. Elastase inhibition activities of solvent extracts of *Elscholtzia splendens* Nakai.

Table 7. Elastase inhibition activities of solvent extract of Jeju Plants.

| Fractions               | IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/mL) | Fractions             | IC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/mL) |
|-------------------------|--|-----------------------|--|
| 귀퉁나무-Hexane             | >1000                                  | 광대수염-Hexane           | >1000                                  |
| 귀퉁나무-EtOAc              | >1000                                  | 광대수염-EtOAc            | >1000                                  |
| 귀퉁나무-BuOH               | >1000                                  | 광대수염-BuOH             | >1000                                  |
| 귀퉁나무-H <sub>2</sub> O   | >1000                                  | 광대수염-H <sub>2</sub> O | >1000                                  |
| 눈피불주머니-Hexane           | >1000                                  | 석위-Hexane             | >1000                                  |
| 눈피불주머니-EtOAc            | >1000                                  | 석위-EtOAc              | 26.91                                  |
| 눈피불주머니-BuOH             | >1000                                  | 석위-BuOH               | 116.80                                 |
| 눈피불주머니-H <sub>2</sub> O | >1000                                  | 석위-H <sub>2</sub> O   | 196.19                                 |
| 꽃향유-Hexane              | >1000                                  | 큰천남성-Hexane           | >1000                                  |
| 꽃향유-EtOAc               | >1000                                  | 큰천남성-EtOAc            | >1000                                  |
| 꽃향유-BuOH                | >1000                                  | 큰천남성-BuOH             | >1000                                  |
| 꽃향유-H <sub>2</sub> O    | >1000                                  | 큰천남성-H <sub>2</sub> O | >1000                                  |
| 빈랑자                     |  |                       | 10.54                                  |

1) IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using five different concentrations in triplicate experiments.

#### IV. 결 론

본 연구는 제주도에서 자생하는 식물 6종 (취퐁나무(잎), 석위(전초), 꽃향유(전초), 눈피불주머니(전초), 큰천남성(전초), 광대수염(전초))을 대상으로 DPPH free radical 소거 활성 측정, superoxide 소거 활성 측정 및 elastase 활성 저해 측정을 측정하였으며, 각 식물에 대하여 유기용매 분획을 실시하여 추출 분리한 뒤 각각의 분획물을 얻었으며, 각 분획별로 위와 동일한 항산화 활성을 조사하여 새로운 천연물 유래 생리 활성 물질의 개발 가능성을 검토하고자 실험을 진행하였다. 다양한 방법으로 이들 식물들의 항산화 효과를 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

제주도 자생식물 methanol 추출물들과 합성항산화제인 BHA 및 Vitamin C에 의한 DPPH free radical 소거 활성을 측정하여 비교한 결과 각 추출물의  $RC_{50}$  값은 석위가  $17.32 \mu\text{g/mL}$ 으로 대조군에 비해 매우 뛰어난 radical 소거 활성을 보이는 것으로 나타났으며, 꽃향유는  $70.98 \mu\text{g/mL}$ , 취퐁나무가  $84.38 \mu\text{g/mL}$  순으로 조사되었으며, 비교 대조군인 BHA나 Vitamin C와 비교하였을 때 단일 물질이 아닌 methanol 추출물임을 감안한다면 비교적 좋은 항산화 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 시료 분획물에서 위와 동일한 방법으로 DPPH free radical 소거 활성을 측정한 결과  $IC_{50}$ 은 석위의 분획물중 EtOAc층이  $17.17 \mu\text{g/mL}$ , 꽃향유 분획물중 EtOAc층은  $18.03 \mu\text{g/mL}$ 로 비교 대조군인 BHA나 Vitamin C보다 더 좋은 활성을 나타냄을 확인 할 수 있었다. 석위의 BuOH층이  $45.51 \mu\text{g/mL}$ ,  $H_2O$ 층  $143.14 \mu\text{g/mL}$  대조 비교군에는 미치지 못하나 유기 용매 분획을 실시한 시료 중에선 비교적 좋은 활성을 나타내고 있었다.

superoxide radical 소거 효과를 평가하여 측정 결과 각 시료 methanol 추출물의  $IC_{50}$  값은 석위  $48.12 \mu\text{g/mL}$ , 취퐁나무  $117.59 \mu\text{g/mL}$ , 꽃향유  $151.97 \mu\text{g/mL}$ 으로 대조군 SOD(superoxide dismutase)의  $IC_{50}$ 값  $14.43 \mu\text{g/mL}$ 에 비해 좋은 활성은 아니나, 단일 물이 아닌 methanol 추출물임을 감안한다면, 석위 methanol 추출물의 경우 비교적 좋은 항산화 활성을 보임을 확인 할 수 있었다.

각각의 시료 분획물의 superoxide 소거 활성에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 살펴보면 석위의 EtOAc층에서 28.12 µg/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 보임으로 비교 대조군과 비슷한 소거 활성 효과를 보임을 알 수 있었다. 다음으로 꽃향유 EtOAc층에서 64.62 µg/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 보였고, 석위의 BuOH층에서는 112.12 µg/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 보였다. 석위 H<sub>2</sub>O층에서 134.56 µg/mL, 꽃향유 BuOH층에서 176.83 µg/mL, 꽃향유 H<sub>2</sub>O층에서 228.54 µg/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 확인 할 수 있었다. 쥐똥나무 분획층에서도 IC<sub>50</sub> 값을 확인 하였는데, H<sub>2</sub>O층, BuOH층, EtOAc층에서 각각 298.47 µg/mL, 327.32 µg/mL, 500.82 µg/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 확인 하였는데, 이는 다른 분획 시료물과는 다르게 H<sub>2</sub>O, BuOH, EtOAc층의 순으로 소거 활성을 보여, 다른 EtOAc층들의 좋은 소거활성과는 다른 경향을 보임을 확인 하였다.

elastase 활성 저해 측정 실험에서는 비교 대조군인 빈랑자의 IC<sub>50</sub> 값이 10.54 µg/mL를 나타내는 반면에 제주도에서 자생하고 있는 본 실험에 사용한 식물종의 경우 elastase 활성 저해 정도가 그다지 높지 않은 것으로 측정되었다. 본 연구에서 이용된 methanol 추출물 중에서 석위의 IC<sub>50</sub>이 18.09 µg/mL로 비교 대조군에 비해서 활성을 떨어지나 대조군과 비슷한 정도의 활성을 보임을 확인하였고. EtOAc층에서 26.91 µg/mL, BuOH층이 116.80 µg/mL이며, 마지막으로 H<sub>2</sub>O 분획층에서 196.19 µg/mL의 IC<sub>50</sub> 값을 보이며, 그 외의 시료에서는 IC<sub>50</sub>을 >1000 µg/mL로 확인 할 수 있었다.

위와 같은 결과를 종합해본 결과 DPPH free radical 소거활성 측정, superoxide radical 소거 효과, elastase 활성 저해 측정 실험 모두에서 가장 뛰어난 효능을 보인 식물종은 석위임을 알 수 있었다.

현재 국내외적으로 천연물에 대한 항산화 활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있어 제주지역에 자생하는 천연물의 항산화 효과에 대한 연구는 그 효용 가치가 높다고 여겨진다. 따라서 본 실험 연구의 결과를 토대로 항산화 효과가 우수한 석위에 대한 단일 물질에 대한 분리 작업과 함께 항염증이나, 항노화 등의 실험이 더 깊이 있게 진행된다면 새로운 천연물 유래 생리 활성 물질로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.



## V. 참고문헌

- 1) 김주덕: A Study on future trends of Cosmetic Industrial Development. 금구논총 제6집 경북과학대학 (1998)
- 2) 기능성 화장품 원료로서 세라미드의 유용성에 관한 이론적 고찰 대원과학대학 메이크업 코디과 오유경, 충청대학 피부미용과 김기연
- 3) 국내 기능성 화장품 생산 실태 카톨릭대학교 생활문화학부 김혜수
- 4) Jin-Tae Lee, Yeon-Suk Jeong, Bong-Jeun An: Physiological activity of *Salicornia herbacea* and Its application for Cosmetic materials. 대한본초학회지 제17권 제2호 (2002년 12월) Kor. J. Herbology 2002;17(2):51-60
- 5) 조수현: Anti-Oxidative and Nitric Oxide Production Inhibitory Effect of roots of *Rhododendron mucronulatum*. 중앙대학교 의약식품 대학원 석사학위논문 (2006)
- 6) 김진웅, 장이섭, 강학회, '고기능성 화장품 산업에서 고분자의 응용', Polymer Science and Technology, Vol. 13, No.4, August 2002
- 7) 이시은, 주은미, 김정희: Protective Effect of Natural Medicinal Plants against Oxidative Damage Induced by Reactive Oxygen Species. 경희대학교 치과대학 구강생화학교실. KOR. J. ENVIRON. TOXICOL. Vol. 15, No. 4, 147~155 (2000)

- 8) Kator, K (1998) Aging. In Nakano, M (ed.). Active oxygen—molecular mechanism of its production. scavenging and effect in organism. 475–483. Kyourits Press. Tokyo\*
- 9) Schwarz. K. B. (1996) Oxidative stress during viral infection: A review. Free Radic. Biol. Med. 21: 641–649\*
- 10) Jayat, C. and Ratinaud, M. H. (1993) Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. Biol. Cell 78, 15–25
- 11) H. J. Bu, H. J. Lee, E. S. Yoo, D. S. Jung, K. Z. Riu, and S. J. Lee: Antioxidant effects and inhibitory effect on NO synthesis by extracts of *Canavalia lineata*. Kor. J. Pharmacogn. 35(4) 338–345 (2004)
- 12) 김영곤. 항산화제. 여문각. 2004
- 13) 한명규: 지방질의 산화반응기구와 항산화제의 역할. 용인대학교 논문집. 제 15호 (1998).
- 14) Branen, A. L. (1975). Toxicological and biochemistry of Butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. J. Am. Oil Chem. Soc, 52, 59–63
- 15) Choe, S. Y. and Yang, K. H. : Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene(BHT) and Butylated hydroxyanisole(BHA). Korea J. Food Sci. Technol., 14(3), 283–288 (1982)

- 16) 김철홍, 윤현민, 장경전, 송춘호, 안창범 ;활성당의 NO 억제, DPPH 소거 및 Microarray상 유전자 발현에 미치는 영향. 대한칩구학회지 제21권 제5호 2004년 10월)
- 17) 최점섭, 오정임, 황인택, 김성은, 전재철, 이병화, 김진석, 김태준, 조광연; 96-well plate를 이용한 DPPH free radical 소거활성 측정과 응용. 한국농약과학회지 제 7권 제 2호 (2003)
- 18) 장현주: Screening for Antioxidant Activity of Jeju Native Plant. 제주대학교 교육대학원 석사학위논문 (2007)
- 19) 김경범: Identification and Characterization of Luteolin isolated from *Cassia mimosoides* var. *nomame* 제주대학교 일반대학원 석사학위논문 (2006)
- 20) 강현희: The Effect of natural antioxidants on formation of cholesterol oxides during fermentation of low salted anchovy. 경상대학교 일반대학원 석사학위논문 (1999)
- 21) 손미예, 김성희, 남상해, 박석규, 성낙주; 국내산 녹차 및 후발효차 추출물의 항산화 효과. Journal of Life Science. 14(6): 920-924 (2004)
- 22) 단은화: Elastase효소 억제작용이 있는 플라보노이드화합물의 구조와 활성 연구. 중앙대학교 의약식품대학원 석사학위논문.

- 23) 곽윤진, 이대형, 김나미, 이종수, 각종 약용 식물로부터 피부노화 억제관련 Elastase 저해물질의 탐색 및 추출 조건; Korean J. Medicinal Crop Sci. 13(6); 213-216(2006)



## VI. 부록

쥐똥나무(*Ligustrum obtusifolium* Sieb. et Zucc.)는 해발 1700m 이하 산과 들 및 골짜기에 나는 낙엽관목으로 어린가지에는 잔털이 많으나 차차 없어지고, 잎은 대생, 타원형, 길이 2~5cm, 폭 7~25mm, 가장자리는 밋밋하고, 표면은 짙은 녹색, 뒷면은 연두색을 띤다. 광나무와 비슷하지만 소형이며 5~6월에 백색 꽃이 핀다. 쥐똥나무의 열매를 수랍과라고 하며 이는 강장, 지혈의 효능이 있으며, 신체허약, 신허, 유정, 자한, 토혈, 혈변의 치료에 사용한다. 일본 대만 및 우리나라 전국의 산에 자생한다



석위(*Pyrrosia lingua* Farwell) 바위 또는 고목 곁에 붙어서 자라는 상록성 다년 초로써 땅속줄기는 길게 뻗으며, 철사 모양으로 단단하다. 지름은 2.5~4mm로 붉은 갈색이거나 누런갈색의 비늘조각이 있다. 잎자루는 어릴 때는 별 모양의 털이 많으며 기부에 비늘조각이 있다. 잎몸은 다소 폭이 넓고, 끝이 뾰족해지며 난상 또는 넓은 피침형이다. 가장자리가 밋밋하나, 간혹 물결모양을 띠기도 한다. 어릴 때는 옆면에 납작한 별 모양의 털이 있으며, 잎맥은 잎살에 묻혀 있고 그물코를 형성하여 안에 유리맥을 가지고 있다. 제주도 흑산도 강진에 자생하며 석위는 임질로 인한 동통, 혈뇨, 요로결석, 자궁출혈, 세균성설사, 만성기관지염의 치료에 사용되어진다.



꽃향유(*Elscholtzia splendens* Nakai) 해발 1300m 이하 산록에 나는 일년초 식물로 향유와 비슷하지만 잎의 뒷면에 선점이 있으며, 자주색의 꽃이 전체적으로 뺨뺨하게 달려있다. 개화기는 9~10월이며 결실기는 10월이다. 전초는 약용, 관상용으로도 사용되어지고 있다. 키 50cm가량으로 줄기는 네모지고 가지가 많이 난다. 잎 자루가 길고 난형으로 나 있으며, 가장자리에 이 모양의 둔한 톱니가 나있다. 꽃은 분홍빛이 나는 자주색, 줄기는 한쪽으로 몰린 이삭화서를 이루고 있다. 꽃향유는 발한, 해서, 화습의 효능이 있으며, 두통, 발열, 오한, 복통, 구토 치료에 사용된다. 육탕의 향료로 사용되어지기도 한다.

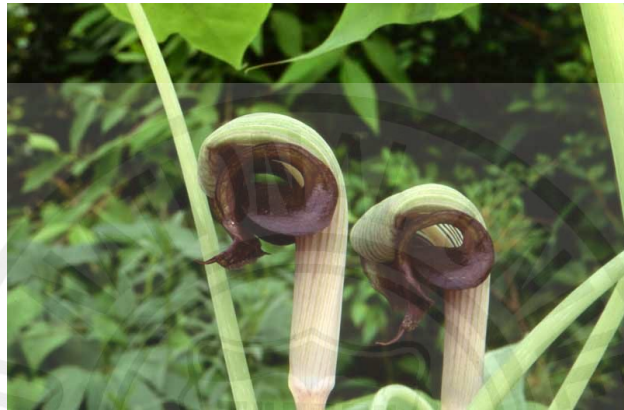


광대수염(*Lamium album* L. nar. *barbatum* (Sieb. et Zucc)) 저지대 산지의 야간 그늘진 곳에 나는 다년초로 키는 30~60cm이다. 줄기는 네모지고, 털이 조금 있으며 잎은 대생이다. 잎자루가 있고, 난형을 띠며 끝이 뾰족하고 밑은 둥글거나 심장형이다. 꽃은 흰색, 연한 홍자색, 잎겨드랑이에 5~6송이씩 돌려난 것처럼 붙어있다. 꽃받침은 5개로 중앙까지 갈라지며 끝이 뾰족하고 가장자리에 철이 있으며 화관은 상순이 투구처럼 앞으로 굽고 하순이 밑으로 넓게 퍼진다. 7월에 열매가 익으며 수과는 3개의 능선이 있다. 광대수염의 물 추출물은 동맥 및 자궁을 수축시킨다. 뼈가 부러진 상처에 달여서 먹고, 찢어서 환부에 바르면 어혈이 풀리고 뼈가 치료된다.





큰천남성(*Arisaema ringens* Schott) 해발 1400m이하에 자라는 다년초. 땅속줄기는 평평하고 둥글며, 1~2개의 작은 구멍을 가진다. 헛줄기는 짧고 크며, 연한녹색을 띤다. 잎은 2장이 대생, 잎자루가 있고, 3장의 작은 잎이 붙어 있다. 작은 잎은 넓은 난상 타원형으로 잎의 밑이 뾰족하고 끝이 꼬리모양으로 잎자루가 없으며, 연록색을 가진다. 제주도 남부지방 다도해의 섬 지방의 음지에 자생하며. 진정효과가 있다.



눈피불주머니(*Corydalis ochotensis Turczaninow*) 해발 1200m 이하 산지의 습한 곳에 나는 월년초. 길이 60cm이고 전초가 분백색을 띤다. 가지가 많이 갈라져 엉키고, 줄기는 모가 진다. 잎은 호생, 삼각형을 띠며, 2~3회 3출엽한다. 최종 작은 잎은 흔히 3갈래로 갈라지고, 갈래는 긴 타원형이다. 7~9월에 개화하며 한국, 만주, 일본, 오흐츠크해 연안에 분포하고 있다.



- 감사의 글 -

기대와 설렘으로 대학원을 입학하고 어느덧 열번의 계절이 변했습니다. 뒤돌아보면 너무나 길고도 짧은 시간이었던 듯합니다.

설레이는 마음으로 대학원 첫 수업에 임하고, 떨리는 마음으로 교생실습을 했으며, 두려움 마음으로 졸업시험과 논문을 준비하며 벌써 졸업을 앞두고 되었습니다.

이 모든 일들이 저 혼자 힘으로는 이룰 수 없던 일들임을 알기에 지면을 통해서 남아 절 도와주신 많은 분들께 감사의 말씀을 전하려 합니다.

먼저 언제나 절 믿어주시고 격려해주신 우리 엄마, 아빠. 많이 부족한 저를 언제나 자랑스럽게 생각하고 세상에서 제일 똑똑한 사람이라고 생각하는 예쁜 동생 유나와 슬. 한 시간이고 두 시간이고, 꾸밈을 말없이 들어주던 막내이모, 현숙언니 세상에서 가장 이쁘고 잘난 사람이 저라고 말씀하시던 우리 팔불출 이모들. 정말 사랑하는 가족이 있기에 제가 하고픈 일 모두 하면서 즐겁게 생활 할 수 있었습니다.

아무것도 모르는 저에게 논문을 쓸 수 있는 기회를 만들어 주시고 하나부터 열까지 가르쳐 주시고 지도해주신 정덕상 교수님과, 언제나 따스한 말씀으로 격려하고 위로해주시던 변종철교수님, 김덕수교수님, 이선주교수님, 김원형교수님, 강창희교수님, 이남호교수님께도 감사의 말씀을 전합니다.

이년 반 동안 동고동락하며 막내라는 자리를 꿰차고 모든 특권과 함께 안어울리는 어리광 애교에도 이빠라 해주었던 킹왕짱 우리언니들. 항상 곁에서 안아주고 다독여주며 눈물도 닦아주던, 민혁이 민건이에 이어 나이 많은 딸 하나 얼떨결에 생겨 너무 고생 많았던 이쁜 은경언니, 사랑스런 은경언니, 옷도 잘 만드는 은경언니(약속대로 이름 3번 썼어요...^^) 언제나 잘하고 있다고 격려해 주던 미정언니. 조용히 곁에서 웃어주던 화숙언니. 언니들이 없었으면 지금의 저는 없었으리라 생각합니다. 또한 실험실에 혼자 있던 절 위해 많은 관심을 주셨던 한충훈선생님, 백종석선생님, 김정미선생님, 오태현선생님, 그리고 미연이 주희 정말 감사드립니다.

마지막으로 대학원 다니던 내내 논문을 준비하는 내내 모든 스트레스와 짜증을 받아주던 내 반쪽 성진이. 포기하려 할때마다 언제나 다시 일어날 수 있도록 항상 곁에 있어주던 무심코 뒤돌아보면 항상 내 뒤에 서서 웃어주던 언제든지 힘들때면 기대어 쉴 수 있는 든든한 버팀목이 되어주던, 아낌없이 주는 나무처럼 끊임없는 사랑을 주었던 당신을 너무도 사랑합니다.

이 논문은 제가 쓴 논문이 아닙니다. 주변에서 도와주신 모든 분들이 제게 만들어 주신 선물입니다. 논문을 볼 때마다 항상 도움주신 분들을 생각하겠습니다. 평생 기억에 남을 소중한 선물을 주신 여러분들 정말 감사합니다. 그리고 사랑합니다.

2008. 07. 어느날  
이한나 올림