

오디(Mulberry) 추출물의 성분분석 및 생리활성에 관한 연구*1

이 상 극*2 · 이 학 주*2† · 강 하 영*2 · 최 돈 하*2 · 조 현 진*2 · 이 태 성*3

Studies on the Chemical Constituents Biological Activities of Mulberry Extracts*1

Sang-Keug Lee*2 · Hak-Ju Lee*2† · Ha-Youg Kang*2 · Don-Ha Choi*2 ·
Hyun-Jin Jo*2 · Tae-Seong Lee*3

요 약

동결 오디(Mulberry) 10 kg을 80% 에탄올(EtOH)로 추출하고 분획깔때기 상에서 헥산(*n*-hexane), 에틸아세테이트(EtOAc) 및 물 가용부로 분획하였다. 에틸아세테이트 가용부(22 g)를 Sephadex LH-20으로 충전한 칼럼에서 MeOH-H₂O (2 : 1~1 : 3, v/v)을 용출용매로 사용하여 칼럼크로마토그래피를 실시하였다. 분리된 화합물들은 셀룰로오스 박층크로마토그래피(TLC)로 확인한 후 ¹H-, ¹³C-NMR 등의 스펙트럼을 사용하여 정확한 구조를 구명하였고 FAB 및 EI-MS로써 분자량을 측정하였다. 오디의 에틸아세테이트 가용부에서 quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside (화합물 1), protocatechuic acid (화합물 2), *p*-hydroxybenzoic acid (화합물 3)을 분리할 수 있었다. 항산화 시험 결과 에틸아세테이트와 물 가용부에서 BHT보다 우수한 활성을 나타내었으며 MTT assay에 의한 세포생존율 측정결과 세포독성은 없는 것으로 나타났다. 또한, 미백활성 및 항암활성은 낮았지만 세포신장 효과가 우수하여 주름개선 화장품 소재로서 충분히 이용 가능성이 있는 것으로 판단되어 진다.

ABSTRACT

The frozen Mulberry (10 kg) was extracted with 80% EtOH, concentrated, and fractionated with a series of *n*-hexane, ethyl acetate, and water on a separatory funnel. A portion of ethyl acetate soluble (22 g) was chromatographed on a Sephadex LH-20 column using a series of

* 1 접수 2008년 9월 9일, 채택 2008년 10월 30일

* 2 국립산림과학원 화학미생물과, Dept. of Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea.

* 3 (주)화진화장품 기술연구소, Technical Research Institute, Hwajin Cosmetics CO., LTD., Seoul 135-880, Korea.

† 주저자(corresponding author) : 이학주(e-mail: Leehj99@forest.go.kr)

aqueous methanol as eluents. The isolated compounds were identified by cellulose TLC, ^1H , ^{13}C -NMR, FAB, and EI-MS. Quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (Compound I), protocatechuic acid (Compound II), *p*-hydroxybenzoic acid (Compound III) were isolated from the ethyl acetate soluble fraction. In antioxidative activities of the fractionated extractives using DPPH radical scavenging test, EtOAc and water soluble fractions indicated better than BHT as control and in *in vitro* tests using MTT assay, there was no cytotoxicity. Also, tyrosinase inhibition and anticancer activities were not so good, but there may be a potential as a cosmetic raw material because the cell extension effect was excellent.

Keywords: Mulberry, cosmetics, quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside, protocatechuic acid, *p*-hydroxybenzoic acid

1. 서 론

뽕나무(*Morus alba* L.)는 뽕나무과(Moraceae)에 속하는 낙엽교목 또는 관목의 총칭으로서 그 중의 한 종인 *M. alba*를 가리킨다. 견사를 생산하는 누에의 먹이로서 중요한 식물이며, 잎은 수 cm의 자루가 어긋나게 자라고, 가장자리에 톱니가 있는 깨진잎과 톱니가 없는 둥근잎으로 구분한다. 초여름에 타원형의 수상꽃차례로 많은 작은 꽃이 피며 여름에 암꽃차례가 빨강에서 검정으로 성숙하여 1개의 꽃차례가 1개의 열매처럼 보인다. 이것이 뽕나무의 열매로 오디(Mulberry)라고 하는데, 5월부터 6월에 걸쳐 검은색 또는 자홍색을 나타낼 때 채취하여 주로 식용하거나 건조한 후 한약재로 사용되고 있다. 예로부터 한방에서는 오디를 상심자라 하여 백발을 검게 하고 소갈(당뇨)을 덜어주며 오장을 이롭게 할 뿐만 아니라 빈혈, 고혈압 및 관절통 등의 치료에 효능이 있는 것으로 알려져 있다(김현복, 2003). 또한, 최근에는 항산화, 항간독성 등의 여러 가지 생리활성 효능이 있는 것으로 알려져, 기능성 식품의 소재로도 각광을 받고 있다(김현복 등, 1999).

지금까지 오디에 대한 연구로는 김현복과 김선림(2003; 2004)이 HPLC를 이용하여 오디에서 C3G(cyanidin-3-glucoside)를 분리 및 동정하고 계통별 함량 분석을 하였으며 뽕나무 계통별 오디함유 rutin 분석 및 품종변이에 대하여 보고하였다. 김태완 등(1996)은 오디의 항당뇨 효능에 관한 연구에

서 오디를 이용하여 인슐린 비의존성 당뇨병에 대하여 항당뇨효과를 가진 기능성 식품을 개발 할 수 있는 가능성을 제시하였다. 또한, 차원섭 등(2004)은 오디로부터 분리한 페놀성 물질의 항산화 효과에 관한 연구에서 오디 추출물이 천연항산화 물질로 활용 할 수 있다고 보고하였다. 이 외에 오디에는 HPLC 정량분석에 의하여 적색색소로 잘 알려진 C3G와 같은 anthocyanin 외에 quercetin 배당체인 rutin(quercetin-3-O-rutinoside) 등이 함유되어 있는 것으로 보고되어 있지만 그 외의 오디 성분에 대한 분리·정제 및 정확한 NMR data 등에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 오디 과육의 추출성분을 분리·정제하여 화학구조를 결정하고 항산화 및 항암활성 등의 생리활성 시험을 수행하여 천연색소 소재로써 기능성 화장품에 응용하기 위한 기초 자료를 얻고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

2006년 9월 경상남도 진주시에 있는 K식품으로부터 동결 오디를 구입하여 추출용 공시재료로 사용하였다.

2.2. 추출물의 조제 및 분리

동결 오디 10 kg을 80% 에탄올 용액에 침적하여 약 3일 동안 상온에서 추출하였으며 이와 같은 조작을 2회 반복 실시하여 회전감압 농축기로 농축하였다. 농축시킨 추출물은 분획할때기 상에서 헥산, 에틸아세테이트, 물 가용부로 분획한 후 농축하여 시료로 사용하였다.

2.3. 추출물의 단리 및 구조구명

혼합물로부터 순수한 화합물을 단리하기 위하여 에틸아세테이트 가용부에 대한 칼럼크로마토그래피를 실시하였고, 충전물질로는 Sephadex LH-20을, 용출용매로는 주로 메탄올 수용액을 사용하였다. 화합물의 단리여부를 확인하기 위하여 박층크로마토그래피(TLC)를 실시하였으며 전개용매로는 *t*-butanol-HOAc (3:1:1, solvent A)와 6% HOAc (solvent B)를 사용하였다. TLC 상에 전개된 화합물은 UV램프(254, 365 nm)로 관찰하였고, 발색제로는 vanillin-HCl-EtOH (4.8 g:12 ml:480 ml)을 사용하여 TLC판에 분무한 후 가열, 건조하여 반응하는 색을 관찰하였다.

오디의 에틸아세테이트 가용부 22.53 g을 유리칼럼에 주입하고 용출용매로는 MeOH-H₂O (3:1, v/v)를 사용하여 1차 분리를 실시하여 5개의 fraction으로 분리하였으며 MFE로 표기하였다. 농축 후 먼저 MFE-3을 MeOH-H₂O (1:1, 1:3, v/v)를 사용하여 연속적으로 칼럼크로마토그래피를 실시한 결과 MFE-331에서 화합물 3 (*p*-hydroxybenzoic acid)을 단리 할 수 있었다. 다시 MFE-4를 MeOH-H₂O (1:1, 1:3, v/v)를 사용하여 칼럼크로마토그래피를 실시한 결과 MFE-422에서 화합물 2 (protocatechuic acid)를 단리 할 수 있었다. 화합물 1 (quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside)은 MFE-5를 MeOH-H₂O (1:1, v/v)로 채크로마토그래피를 실시하여 단리 되었다.

2.4. 단리화합물의 구조분석

단리된 화합물들의 구조결정은 한국기초과학지원연구원 서울분소의 NMR (Bruker AM-500, Varian UI 500 NMR)을 사용하여 ¹H-, ¹³C-NMR 스펙트럼을 분석하였으며 분석용매로는 CD₃OD를 사용하였다. 또한 분자량 측정은 GC/MS (JEOL JMS-600W)를 사용하여 FAB 및 EI-MS 스펙트럼을 분석하였다.

2.4.1. 화합물 1 : quercetin-3-O- β -D-glu-copyranoside (isoquercitrin)

FAB-MS *m/z* : 449 [M+H]⁺, 391, 307, 289, 154 (base ion), 136. **¹H-NMR (500 MHz, δ , CD₃OD)** : 3.19~3.71 (4H, *m*, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6''), 5.23 (1H, *d*, *J* = 7.60 Hz, H-1''), 6.19 (1H, *d*, *J* = 1.79 Hz, H-6), 6.37 (1H, *d*, *J* = 1.56 Hz, H-8), 6.86 (1H, *d*, *J* = 8.47 Hz, H-5'), 7.57 (1H, *dd*, *J* = 1.98 Hz, 8.47 Hz, H-6'), 7.70 (1H, *d*, *J* = 1.93 Hz, H-2'). **¹³C-NMR (125 MHz, δ , CD₃OD)** : 62.56 (C-6''), 71.22 (C-4''), 75.72 (C-2''), 78.11 (C-3''), 78.36 (C-5''), 94.71 (C-8), 99.89 (C-6), 104.35 (C-1''), 105.69 (C-10), 116.00 (C-2'), 117.58 (C-5'), 123.07 (C-1'), 123.19 (C-6'), 135.63 (C-3), 145.88 (C-3'), 149.83 (C-4'), 152.40 (C-9), 158.45 (C-2), 163.02 (C-5), 165.79 (C-7), 179.49 (C-4).

2.4.2. 화합물 2 : protocatechuic acid

EI-MS *m/z* : 154 [M]⁺, 137 (base ion), 110, 109, 81, 57. **¹H-NMR (500 MHz, δ , CD₃OD)** : 6.83 (1H, *d*, *J* = 8.08 Hz H-5), 7.45 (1H, *dd*, *J* = 2.00 Hz and *J* = 11.27 Hz H-6), 7.33 (1H, *d*, *J* = 2.00 Hz, H-2). **¹³C-NMR (125 MHz, δ , CD₃OD)** : 115.76 (C-2), 117.73 (C-5), 123.09 (C-1), 123.89 (C-6), 146.04 (C-3), 151.52 (C-4), 170.22 (C-7).

2.4.3. 화합물 3 : *p*-hydroxybenzoic acid

EI-MS *m/z* : 138 ([M]⁺, base ion), 121, 93,

65. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, δ , CD_3OD) : 6.82 (2H, d , $J = 8.61$ Hz, H-2, 6), 7.88 (2H, d , $J = 8.61$ Hz, H-3, 5). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, δ , CD_3OD) : 116.45 (C-2, 6), 123.13 (C-1), 133.43 (C-3, 5), 163.78 (C-4), 170.50 (C-7).

2.5. 항산화활성 시험(DPPH Radical 소거능)

DPPH radical 소거효과는 Blois (1958)의 방법을 변형하여 측정하였다. 96 well microplate에 시료를 희석(500 ppm)하여 100 μl 씩 넣은 후 0.2 mM DPPH 용액을 100 μl 넣고 실온에서 30분간 반응 시킨 후 microplate reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 무첨가 대조군은 시료대신 에탄올을 가하여 같은 방법으로 측정하였으며 시료의 색을 보정하기 위하여 0.2 mM DPPH 용액 대신 에탄올을 넣어 실험 하였다.

2.6. 미백 활성시험(Tyrosinase 활성억제 시험)

Zheng 등(2008)과 같은 방법으로 미백활성 시험을 실시하였다. 0.1 M PBS (pH 6.5) 용액과 tyrosine (1.5 nM in 0.1 M PBS)을 혼합한 후 sample을 적정 농도로 희석, 첨가하여 혼합액을 만들고 mushroom tyrosinase (1,000 units in 0.05 M PBS)를 가하여 최종적으로 반응액이 200 μl 가 되도록 96 well plate에 넣었다. 반응액을 37°C에서 5~10 분간 배양 후 ELISA를 사용하여 490 nm의 파장으로 dopachrome 생성량을 측정하였다.

2.7. MTT Assay에 의한 세포독성 및 항암활성 시험

2.7.1. 공시세포

세포독성 시험을 위하여 대식세포인 Raw 264.7 cell (Murine macrophage cell line), 섬유아세포인 L929 cell (Mouse Fibroblast), 항암활성 시험

을 위하여 유방암세포(MCF-7 cell)와 자궁경부암세포(Hela cell)를 한국세포주은행(Korean Cell Line Research Foundation)에서 구입하여 사용하였다.

2.7.2. 세포배양

모든 공시세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 Gibco사의 fetal bovine serum (FBS)를 10%, 100 U/ml penicillin 및 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 72시간 배양하였다. Cell 배양 flask에 cell의 밀도가 $2\sim 3 \times 10^6/\text{ml}$ 정도가 되게 계대배양하여 5% CO_2 조건으로 cell 상태를 유지하였다.

2.7.3. 세포독성 시험

세포독성 시험은 윤원중 등(2007)의 실험방법을 응용하여 실시하였다. 세포 생존율을 측정하기 위하여 70% 이상의 밀도가 되도록 배양된 쥐 유래 정상 세포인 대식세포(Raw 264.7 cell)와 섬유아세포(L929 cell)를 무혈청배지로 교체한 후 시험하고자 하는 시료를 농도별로 각각 well에 투여하여, 이를 48시간 추가 배양하였다. 살아있는 미토콘드리아 탈수소 효소들의 반응에 의하여 푸른색의 formazan product로 변화 시키는 MTT (2 mg/ml in PBS)시약을 각 well에 20 μl 씩 투여하고 4시간 추가 배양한 후, 상층액을 제거하였다. PBS로 세척한 다음 DMSO를 가하여 formazan product를 완전히 용해시킨 후, microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7.4. 항암활성 시험

항암활성 시험은 남경수 등(2004)이 수행한 방법을 이용하였다. 먼저 배양된 유방암세포(MCF-7 cell)와 자궁경부암세포(Hela cell) 세포를 trypsin을 처리하여 plate에서 띄어낸 다음 haemocytometer를 사용하여 세포 수를 측정한 후, 세포부유액을 96 well plate의 각 well에 1×10^4 개로 넣어 준다. 이것을 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간

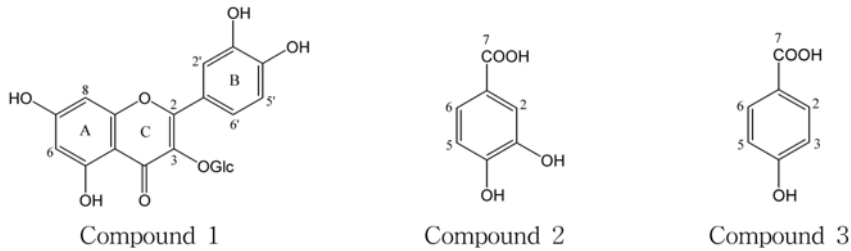


Fig. 1. Chemical structures of the isolated compounds from Mulberry.

배양한 후, 측정하고자 하는 시료를 농도별로 첨가하고 24시간 배양한 다음, 각 well에 MTT시약(5 mg/ml) 10 ul를 처리하여 30분 동안 다시 배양한다. 현미경을 통해 cell이 MTT시약에 의해 염색된 것을 확인한 후 배지를 제거하고, 배지를 제거한 well에 200 ul의 DMSO를 처리하여 30분 동안 배양한 다음, ELISA reader를 사용하여 흡광도 570 nm에서 세포생존율을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 화합물 1

화합물 1은 aglycone이 quercetin으로서 그 C-3 위치에 glucose가 결합된 형태의 구조를 하고 있으며 isoquercitrin이라고도 한다. UV램프로 관찰하였을 때 갈색으로 나타났고, 바닐린 발색제에는 진한 노란색으로 반응을 하였다.

¹H-NMR 스펙트럼에서 δ 7.70의 signal은 B환의 H-2'로 이웃한 H-6'와 meta coupling ($J = 1.93$ Hz)이며 δ 7.57에서의 signal은 H-6'로 H-2'와 H-5'의 두 proton의 영향으로 double doublet으로 나타나고 있다. δ 6.86의 signal은 H-5'로 H-6'와의 ortho coupling ($J = 8.46$ Hz)하고 있다. 또한, δ 6.37과 δ 6.19의 두 개의 doublet signal은 H-8과 H-6으로 서로 meta coupling으로 J 값은 각각 1.56과 1.79 Hz였다. 따라서 이 화합물은 catechol B환과 phloroglucinol A환을 갖는 flavonol 화합물임을 예측할 수 있었다(함연호, 2000; Oleszek *et al.*, 2002). δ 5.23에서 glucose의 H-1"의 signal이

doublet으로 관찰되었으며 J 값이 7.60 Hz인 것으로 β -D-glucopyranose의 형태임을 알 수 있었다. 또한 glucopyranose의 나머지 proton들은 δ 3.19~3.71에서 H-2'', 3'', 4'', 5'', 6''에 해당하는 signal이 나타났다.

¹³C-NMR 스펙트럼에서 C-4는 179.49 ppm으로 flavonol의 전형적인 carbonyl group을 나타내고 있다. A환에서 hydroxyl group이 결합되어 있는 C-7과 C-5는 각각 165.79 ppm과 163.02 ppm에서 나타나고 있으며 C-6과 C-8은 99.89 ppm과 94.71 ppm에서 signal이 나타나고 있는데, 이것은 전형적인 phloroglucino A환을 보여주는 것이다(함연호, 2000; Oleszek *et al.*, 2002; Agrawal, 1989). C-2와 C-3은 이중결합을 하고 있기 때문에 flavan의 signal보다 크게 downfield되어 각각 158.45 ppm과 135.63 ppm에서 나타나고 있으며 C-2가 quercetin보다 10 ppm 정도 downfield되어 glucose가 C-3에 결합하고 있는 것을 예측할 수 있었다. B환에서 hydroxyl group이 결합되어 있는 C-3'와 C-4'는 145.88 ppm과 149.83 ppm에서 signal을 보여주고 있으나 hydroxyl group이 결합되지 않은 C-2', 5', 6'는 upfield 되어 각각 116.00 ppm, 117.58 ppm, 123.19 ppm에서 전형적인 catechol B환의 형태를 나타내고 있다(함연호, 2000). 104.35 ppm에서 glucose의 C-1"이 나타나고 있으며 75.72 ppm, 78.11 ppm, 71.22 ppm, 78.36 ppm, 62.56 ppm의 signal은 C-2'', 3'', 4'', 5'', 6''의 signal로 전형적인 glucose의 형태를 보여주고 있다.

Fernandez 등(2005)이 *Argemone platyceras*의 잎의 EtOAc 분획에서 단리하여 보고한 NMR data

와 동일하였으며 특히, 이 화합물은 친식에 탁월한 효능을 갖고 있음을 보고하였다. Positive FAB-MS 스펙트럼에서 $[M+H]^+$ m/z 465로 이 화합물의 분자량 464와 일치하였다. 따라서 화합물 1은 quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside (isoquercitrin)으로 구조를 구명하였다.

3.2. 화합물 2

화합물 2는 benzoic acid 계열인 pyrocatechol의 유도체로서 benzoic acid의 C-3과 C-4의 위치에 수산기가 결합되고 C-1 위치에 카르복시기가 결합된 형태의 화합물이다. 이 화합물은 진한 갈색의 분말로 단리 되었으며 UV램프에서 갈색으로 보였고, 바닐린 발색제에는 무색으로 반응을 하였다.

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 H-5의 signal은 δ 6.83에서 doublet으로 나타나는데, J 값이 8.08 Hz인 것으로 보아 H-6과 *ortho* coupling 되었음을 알 수 있고, H-6은 δ 7.45에서 double doublet으로 나타나는데, J 값이 각각 2.04 Hz와 11.27 Hz인 것으로서 H-5와는 *ortho* coupling, H-2와는 *meta* coupling 되어 있는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 H-2는 δ 7.33에서 H-6과 *meta* coupling이 되어 J 값이 1.93 Hz인 doublet signal을 보이고 있다. 따라서 이상의 chemical shift로써 catechol형태의 구조임을 알 수 있었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 170.22 ppm의 signal은 전형적인 carboxyl기의 탄소를 나타내고 있으며 수산기가 결합하고 있는 C-3과 C-4는 146.04 ppm과 151.52 ppm에서 각각 특징적인 signal을 주고 있다. 한편, methine 탄소인 나머지 C-2, 5, 6은 각각 115.76 ppm, 117.73 ppm, 123.09 ppm에서 signal을 나타내고 있으며 carboxyl기가 결합하고 있는 C-1은 123.09 ppm에서 signal을 주고 있는데, 이는 flavonoid catechol환의 chemical shift와 매우 유사한 형태를 보여주는 것이다. 이상의 NMR 분석 자료는 Cha 등(2000)이 보고한 protocatechuic acid의 NMR분석과 일치하고 있으며 Kim과 Bae(2001)가 비자나무 잎에서 단리한 화합물과도 정확

하게 일치하고 있다.

EI-MS 스펙트럼에서 분자량 분석은 $[M]^+$ m/z 154로서 이 화합물의 분자량 154와 일치하였으며 protocatechuic acid로 구조를 구명하였다.

3.3. 화합물 3

화합물 3 역시 benzoic acid 계열의 유도체로서 *para* 위치인 C-4에 수산기가 결합되고, C-1 위치에 카르복시기가 결합된 형태의 비교적 단순한 화합물이다. 진한 갈색의 분말로 단리 되었으며 UV램프에서 갈색으로 보였고, 바닐린 발색제에는 무색으로 반응을 하였다.

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 서로 대칭구조를 하고 있는 H-3, 5와 H-2, 6의 signal은 각각 δ 7.88과 δ 6.82에서 J 값이 8.16 Hz인 하나의 doublet peak로 나타나고 있으며 적분 값으로도 두 개의 proton peak임을 알 수 있었다(이상극과 배영수, 2006).

$^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서 역시 대칭 구조인 C-2, 6과 C-3, 5의 signal이 각각 116.45 ppm과 133.43 ppm에서 하나의 peak로 나타나고 있으며 그 영향으로 C-4는 화합물 2보다 8 ppm 정도 downfield된 163.78 ppm에서 나타나고 있다(이상극과 배영수, 2006).

EI-MS 스펙트럼에서 분자량 분석은 $[M]^+$ m/z 138로서 이 화합물의 분자량 138과 일치하였으며 protocatechuic acid로 구조를 구명하였다.

3.4. 항산화 활성

오디 추출물의 핵산 및 에틸아세테이트, 물 가용부에 대하여 free radical 소거능을 측정하였으며 대조구로는 합성항산화제인 BHT를 사용하였다. Fig. 2에서 보논바와 같이 에틸아세테이트 가용부는 85% 이상의 높은 free radical 소거능을 보였으며 물 가용부도 70% 이상의 소거능을 보여 대조구인 BHT에 비하여 우수한 활성을 나타내었다. 에틸아세테이트 가용부에서 높은 활성을 나타낸 것은 플라보노이드 계열인 화합물 1에 의한 영향이 큰 것으

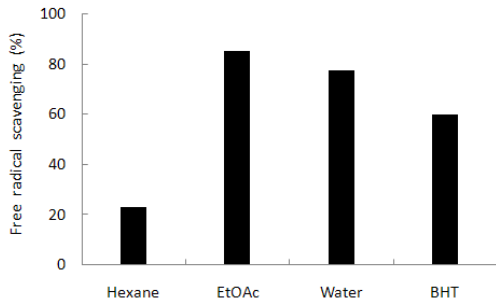


Fig. 2. DPPH free radical scavenging of fractionated extracts from Mulberry.

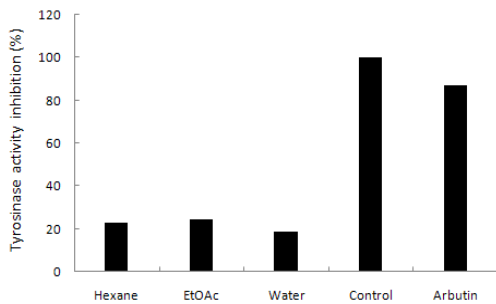
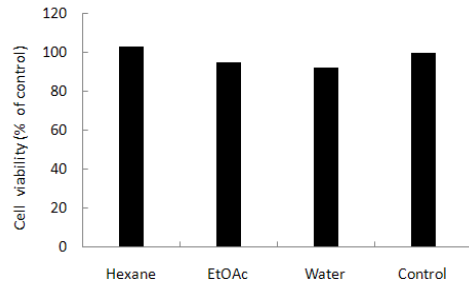


Fig. 3. Tyrosinase inhibitory activity of fractionated extracts from Mulberry.

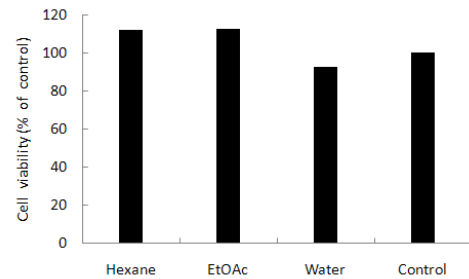
로 생각되어지는데, Rice-Evans 등(1996)은 플라보노이드가 항산화 활성이 있는 것은 폴리페놀성 구조와 C-4의 카르보닐기와 C-5 또는 C-3의 수산기 때문이라고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 화합물 시료의 농도를 500 ppm으로 다소 높게 측정 하였으나 화장품 소재로 사용되는 대부분의 물질들의 기준 농도가 1,000~50,000 ppm 정도임을 감안하면 화장품 소재로서 충분히 가능성이 있다고 생각된다.

3.5. 미백 활성

오디 추출물에 대한 미백활성을 측정하기 위하여 가장 기본적인 tyrosinase 활성 저해 시험을 실시하였으며 대조구로는 arbutin을 사용하였다. Fig. 3에서 보는바와 같이 오디 추출물의 각 분획물에 대한



RAW264.7 cell



L929 cell

Fig. 4. Cytotoxicity of fractionated extracts against RAW264.7 cell and L929 cell from Mulberry.

tyrosinase 활성 저해능은 20% 정도로서 80% 이상의 대조구에 비하여 미백활성은 높지 않은 것으로 나타났다.

3.6. 세포독성

화장품 소재는 독성이 없고 피부에 대한 트러블이 없어야 하기 때문에 오디 추출물의 각 분획물에 대한 대식세포(RAW264.7 cell)와 섬유아세포(L929 cell)의 MTT assay를 실시하여 세포 증식에 부정적인 또는 긍정적인 영향이 있는지를 확인하였다. Fig. 4에서 보는바와 같이 각 분획물을 100 µg/ml 농도로 세포배양 배지에 첨가한 결과 전체적으로 모든 시료에서 세포독성을 나타내지 않았다. 대식세포의 경우 헥산 가용부에서 시료가 첨가되지 않은 대조구에 비하여 100% 이상의 세포 생존율을 보였으며 섬유아세포의 경우 헥산 및 에틸아세테이트 가용

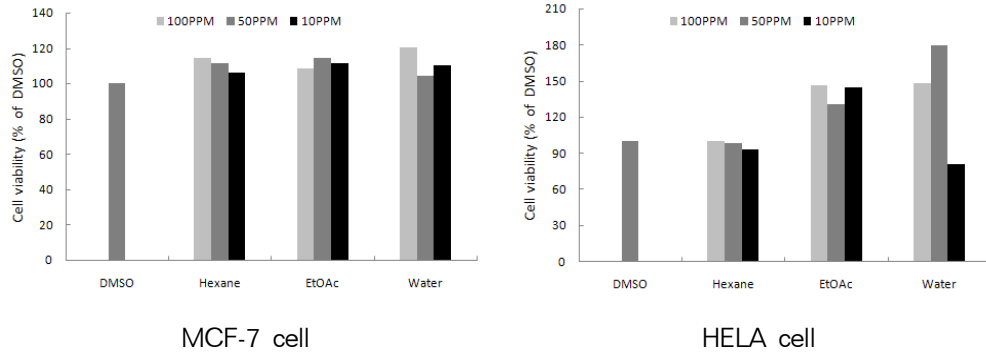


Fig. 5. Anticancer activity of fractionated extractives against MCF-7 cell and Hela cell from Mulberry.

부에서 110% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 따라서, 오디 추출물은 면역작용에 관여하는 대식세포에 대하여 세포독성이 없으며 100% 이상의 세포 증강 효과를 나타내기 때문에 면역증강에 도움이 되는 소재로 이용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 정상 세포에 독성이 없으며, 특히 섬유아세포에 영향을 주기 때문에 주름개선 기능성 소재로서 충분히 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

3.7. 항암 활성

세포독성 시험에서 100% 이상의 세포 생존율을 보이며 면역증강 효능을 나타내었기 때문에 일반적으로 많이 사용하는 유방암 세포(MCF-7 cell)와 자궁경부암 세포(Hela cell)에 대한 항암활성 시험을 실시하였다. Fig. 5에서 보는바와 같이 오디 추출물의 각 분획물은 모두 항암활성을 보이지 않았지만, 세포독성 시험과 유사한 세포신장 효과를 나타내었다. 유방암 세포의 경우 각 분획물 모두 세포 생존율이 110% 이상으로 나타났으며 자궁경부암 세포는 에틸아세테이트 가용부가 150% 이상, 물 가용부가 180% 이상의 세포 생존율을 나타내었다.

4. 결 론

뽕나무 열매인 오디의 성분 분석을 위하여 80%

에탄올 추출물 중 에틸아세테이트 가용부에 대한 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그래피를 실시하였다. NMR 및 Mass 기기를 이용한 분석결과 플라보노이드 배당체인 quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside, benzoic acid 계열인 protocatechuic acid 및 p-hydroxybenzoic acid로서 구조를 구명하였다. 오디 추출물의 각 분획물에 대한 다양한 생리활성 시험을 실시하여 기능성 화장품 첨가 소재로서 이용 가능 여부를 확인한 결과, 항산화 활성 시험에서는 분획물 모두 대조구에 비해 우수한 활성을 나타내어 기초활성 소재로서 이용 가능할 것으로 판단되었다. 또한, 세포독성 시험결과 정상세포에 대한 독성은 나타나지 않았고, 미백활성 및 항암활성 효능은 없었지만 오히려 세포를 신장시키는 효과를 나타내었기 때문에 주름개선 화장품 소재로서 충분히 이용 가능 하다는 결과를 얻을 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Agrawal, P. K. (Ed.) 1989. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier. New York.
2. Blois, M. L. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 181: 1199~1224.
3. Cha, B. C., S. B. Lee, T. J. Rhim, and K. H. Lee. 2000. Constituents of Antioxidative Activity and Free Radical Scavenging Effect from *Galla Rbois* (*Rbus javanica* Linne). Kor. J. Pharmacognosy.

- 31(2): 185~189.
4. Fernandez, J., R. Reyes, H. Ponce, M. Oropeza, M. R. VanCalsteren, C. Jankowski, and M. G. Campos. 2005. Isoquercitrin from Argemone platyceras inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. *European Journal of Pharmacology*. 522: 108~115.
 5. Kim, J. K. and Y. S. Bae. 2001. Extractives from the needles of *Torreya*. *Mokchaekonghak*. 29(4): 53~59.
 6. Oleszek, W., A. Stochmal, P. Karolewski, A. M. Simonet, F. A. Macías, and A. Tava. 2002. Flavonoids from *Pinus sylvestris* needles and their variation in trees of different origin grown for nearly a century at the same area. *Biochemical Systematics and Ecology*. vol. 43.1 BSE 1023.
 7. Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, and G. paganga. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free radical Biology & Medicine*. 20(7): 933~956.
 8. Zheng, Z. P., K. W. Cheng, J. Chao, J. Wu, and M. Wang. 2008. Tyrosinase inhibitors from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*). *Food Chemistry*. 106: 529~535.
 9. 김태완, 권영배, 이장현, 양일석, 엄종경, 이희삼, 문재유. 1996. 오디의 항당뇨 효능에 관한 연구. *韓蠶學誌*. 38(2): 100~107.
 10. 김현복. 2003. 오디와 포도의 안토시아닌 색소 물질 조성 비교 및 C3G 정량. *韓蠶學誌*. 45(1): 1~5.
 11. 김현복, 김선림. 2003. 오디에서 C3G (cyanidin-3-glucoside)의 분리, 동정 및 계통별 함량분석. *韓蠶學誌*. 45(2): 90~95.
 12. 김현복, 김선림. 2004. 뽕나무 계통별 오디함유 rutin 분석 및 품종변이. *韓蠶學誌*. 46(1): 1~5.
 13. 김현복, 방혜선, 이희완, 석영식, 성규명. 1999. 뽕나무 품종별 오디의 화학적 특성. *韓蠶學誌*. 41(3): 123~128.
 14. 남경수, 손옥례, 이경화, 조현정, 손윤희. 2004. 천궁이 유방암세포 증식, Nitric Oxide 생성 및 Ornithine Decarboxylase 활성화에 미치는 영향. *생약학회지*. 35(4): 283~287.
 15. 윤원중, 이정아, 김길남, 김지영, 박수영. 2007. 큰비쭉 (*Artemisia fukudo*) 추출물의 murine macrophage RAW 264.7 세포에서 *in vitro* 항염효과. *한국식품과학회지*. 39(4): 464~469.
 16. 이상국, 배영수. 2006. 독일가문비(*Picea abies* Karsten) 잎 추출성분의 항산화 활성. *한국임학회지*. 95(4): 429~434.
 17. 차원섭, 신해룡, 박준희, 오상룡, 이원영, 천성숙, 추재원, 조영제. 2004. 오디로부터 분리한 페놀성 물질의 항산화 효과. *한국식품저장유통학회지*. 11(3): 383~387.
 18. 함연호. 2000. 사시나무속과 버드나무속 주요 수종 수피의 추출성분에 관한 연구. 강원대학교 박사학위논문.