

빈카 마이너 추출물에 함유된 알칼로이드들의 분광학적 분석 및 항산화 효능 연구

김준섭 · 주지혜 · 강조은 · 장선동 · 정경환 · 문기성 · 이향렬[†]

한국교통대학교 생명공학과

(2015년 3월 5일 접수; 2015년 3월 16일 수정; 2015년 3월 25일 채택)

Antioxidant Effects and Spectrophotometry Analysis of Alkaloids from *Vinca minor*

Jun-Sub Kim · Ji-Hye Joo · Jo-Eun Kang · Sun-Dong Jang · Kyung-Hwan Jung
Gi-Seong Moon · Hyang-Yeol Lee[†]

*Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation,
61 Daehak-ro, Jeungpyeong-gun, Chungbuk 368-701*

(Received March 5, 2015; Revised March 16, 2015; Accepted March 25, 2015)

요약 : 빈카마이너 L.의 알칼로이드는 HPLC의 PDA 검출기를 이용하여 측정하고 이를 표준시료인 빈카민의 자외선/가시광선 흡수 스펙트럼과 비교하여 분석하였다. 플라보노이드류를 포함하여 추출물에서 9개 이상의 화합물에 대한 자외선/가시광선 흡수 스펙트럼을 얻었다. 추출방법에 따라 에탄올 추출물과 열수 추출물을 얻고 이를 DPPH 라디칼 소거법에 의해 항산화 효과를 조사하였다. 그 결과 에탄올 추출물과 열수 추출물 모두 비교군인 케르세틴과 비타민 C 대비 약 14~15%의 항산화 효과를 보여 추출법에 상관없이 유사한 결과를 보였다.

Abstract : Alkaloids of *Vinca minor* L. were characterized by HPLC equipped with the photo diode array detector and compared their UV/vis absorption spectra with an index material such as vincamine. UV/vis absorption spectra of more than 9 compounds belong to various classes such as flavonoids were shown and characterized. Extracts with ethanol or hot water were tested against the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free-radical to investigate their antioxidant activity. Based on the results, those extracts show about 14-15% of antioxidant activity of quercetine and vitamin C used as standards.

Keywords : *Vinca minor* extract, Vincamine, Anti-oxidant effect

[†]Corresponding author
(E-mail : hyl@ut.ac.kr)

1. 서론

본 연구에 사용된 *Vinca minor*는 페리윙클이라 불리는 식물의 주요한 종으로서 페리윙클에는 *Vinca rosea*, *Vinca herbacea*, *Vinca major* 등이 있으며 재배가 쉽고 다양한 색깔의 꽃을 피워 관상수 등으로 많이 길러지고 있다. 이 중 *Vinca rosea* (= *Catharanthus roseus*)는 마다가스카르가 원산지이며 푸른 잎과 5개의 꽃잎이 있는 꽃을 피우는 약용식물이다¹⁻³. 유효성분에 대한 집중적인 연구결과 빈카 로지아(*Vinca rosea*) 추출물로부터 약 150개 이상의 알칼로이드가 분리되어 그 구조가 밝혀졌으며 그 중 인돌알칼로이드의 이합체 형태인 빈블라스틴(Vinblastine)과 빈크리스틴(Vincristine)이 탁월한 항암효과를 보이고 있다. 현재 빈블라스틴은 림프선, 비장, 간에 영향을 주는 암인 호지킨병(Hodgkin's disease)의 치료에 사용되고 있다. 빈크리스틴은 빈블라스틴보다 항암효과는 더 뛰어나나 신경독성이 더 큰 것으로 알려져 있으며 소아 백혈병(leukaemia), 림프종(lymphomas), 소세포 폐암(small-cell lung cancer), 자궁암(cervical cancer)와 유방암(breast cancer) 등을 치료하는데 사용되고 있다⁴⁻⁹. 빈카 메이저(*Vinca major*)는 스페인과 프랑스 남부인 남유럽과 서남아시아 및 터키에 이르는 지역에 자생하며 'Large Periwinkle' 또는 'Greater Periwinkle' 이라고도 불린다. 특히 빈카 마이너(*Vinca minor*)는 'Dwarf Periwinkle', 'Small Periwinkle' 및 'Common Periwinkle' 이라고도 불리는데, 전통의학에 의하면 말린 잎, 상층부 또는 빈카 마이너 식물 전체를 사용, 혈액순환을 강화하고 뇌의 신진대사를 강화하며 심혈관계 질환을 치료하는데 이용되고 있다. 빈카 마이너에서 발견되는 대표적인 인돌알칼로이드인 빈카민(Vincamine)과 빈카민 유도체 등은 노화에 대항하여 뇌의 인지능력 또는 기억력을 강화하는 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 현재 빈카민은 혈액순환 개선제 및 뇌혈관 개선제 등으로 이용되고 있다.

이외에도 잎의 여러 가지 알칼로이드 성분에 의한 강장, 수렴작용이 있어 내출혈, 월경출혈감소제로서 사용되며 궤양, 인후염, 고혈압 치료제, 뇌의 혈류를 원활하게 한다는 연구 결과가 있어 혈액순환 개선을 통한 두피환경 개선에 효과가 있을 것으로 기대되고 있다¹⁰⁻¹⁵. 이 중 빈카 메이저 및 빈카 마이너는 국제 화장품 원료집(ICID)에

등재되어 있다. 본 연구에서는 빈카 마이너의 잎을 열수 추출법과 에탄올 추출법을 사용하여 혼합물을 얻고 이들 추출법에 따른 추출물의 성분 분포와 그 성분의 분광학적 특성을 조사하였다. 또한 이 추출물의 항산화효과를 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능 측정법을 사용하여 조사하였다.

2. 실험

2.1. 재료 및 기기

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), trifluoro acetic acid(TFA), acetonitrile, methanol, vincamine 등은 Sigma-Aldrich사 시약을 사용하였다. 분광광도계는 Mecasys사의 Optizen 2120UV spectrophotometer, HPLC는 영린기기사 YL9100(검출기: PDA detector)를 사용하여 분석 하였다. 빈카 마이너는 경기도 과천 그린피아사에서 재배한 식물을 구매하여 실험 재료로 사용하였다.

2.2. 빈카 마이너의 EtOH 추출법

빈카 마이너의 잎을 10g정도 채취하여 물에 세척한 후 건조한다. 이 잎을 잘게 절단한 후 EtOH을 소량씩 가하며 막자사발로 분쇄하였다. 그 후 여과 하여 이물질을 제거한 뒤 회전식 진공농축기를 이용하여 농축한 후 여과 과정을 한 차례 더 반복하였다. 최종적으로 syringe filter를 이용하여 불순물을 깨끗이 제거한 후 다시 한 번 농축하여 빈카 마이너 EtOH 추출물을 얻었다. 수득한 건조 EtOH 추출물은 0.26g이었다.

2.3. 빈카 마이너의 열수 추출법

빈카 마이너의 잎 10g을 채취하여 물에 세척한 후 건조한다. 삼각플라스크 1L에 증류수 200mL을 넣고 90-100°C 정도로 끓였다. 잎을 잘게 자른 뒤 끓는 물에 30min정도 담구고 상온에서 식힌 후 여과하였다. 여과액은 Freeze drier를 이용하여 동결건조 하였고 최종적으로 0.20g의 건조된 열수 추출물을 수득하였다.

2.4. 빈카 마이너 추출물의 TLC 분석 방법

빈카 마이너의 잎부분을 열수 추출법과 EtOH 추출법을 사용하여 아래 Fig. 1과 같은 추출물을 얻었다.



Fig. 1. Hot water extract (left) and Ethanol extract (right) of *Vinca minor*

이 추출물들은 PDA detector를 검출기로 사용하는 HPLC를 이용하여 복잡한 혼합물의 성분 분석에 이용되었다. 빈카 마이너 추출물을 HPLC로 분석하기에 앞서 TLC를 이용하여 주성분을 살펴보았다. 이동상의 용매는 EtOH: ethyl acetate비를 5:5(1:1)로 만들어 사용하였다. Fig. 2의 TLC 왼쪽 spot은 표준물질로써 빈카민을, 오른쪽은 빈카 마이너 열수 추출물을 나타낸다. 추출물의 spot이 길게 늘어지는 것으로 보아 배당체 같은 극성의 물질이 많이 함유되어 있으며 또한 자외선 하에서 빛을 흡수하는 것으로 보아 다양한 방향족 화합물들이 포함되어 있는 것으로 추정되었다.

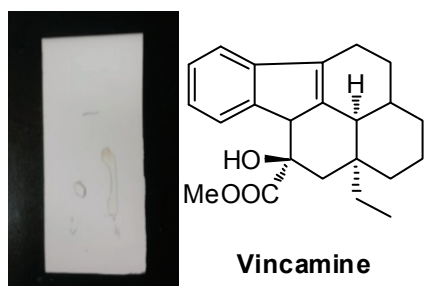


Fig. 2. TLC of hot water extract of *Vinca minor* and the chemical structure of Vincamine. Eluent = EtOH : ethyl acetate (1:1). Vincamine standard (left), Hot water extract of *Vinca minor* (right).

2.5. 항산화효과(자유라디칼 소거 효과) 검증 방법

빈카 마이너 추출물의 자유라디칼(Free Radical)

소거 효과를 측정하기 위하여 DPPH법을 적용하였다.

$$\text{자유라디칼 소거 효과(\%)} = [1 - (\text{실험군 흡광도} - \text{Blank 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도}] \times 100$$

DPPH 라디칼 소거능의 측정은 Bosis 등 (1958)의 방법(참고문헌에 없음)에 의해 측정하였다. 1mg DPPH를 50mL ethanol에 녹인 다음 추출물이나 시료 50 μ L에 0.05mM DPPH 2mL를 가하였다. 빈카 마이너 추출물이나 시약은 0.05mM DPPH 2mL에 첨가하여 최종 100ppm, 75ppm, 50ppm, 25ppm, 12.5ppm, 0ppm 농도의 용액이 되도록 하였다. 그 후 실온에서 16min 동안 반응시킨 다음 517nm에서 흡광도를 측정하여 상기와 같은 식에 의해 저해율을 계산하였다. 대조군으로 사용한 성분은 quercetin과 ascorbic acid이다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 빈카 마이너 추출물들의 성분 분석

추출물의 성분을 TLC를 이용하여 확인한 후 HPLC를 이용하여 분석해 보았다. HPLC를 이용한 혼합물의 분석 조건은 Table 1과 같다.

Fig. 3에서 열수 추출법을 사용한 추출물과 EtOH 추출법을 사용한 추출물 성분은 HPLC chromatogram에서 거의 유사하게 나타났으나 열수 추출물의 경우 배당체와 같은 친수성 천연물 성분의 함량이 EtOH 추출법을 사용한 추출물보다 더 높은 것을 알 수 있었다. 빈카 마이너의 주요 알칼로이드 성분은 빈카민이다. 추출물의 지표 성분 및 표준물질로써 사용된 빈카민의 용리시간은 18.3min으로서 나타났으며 이 피크는 열수 추출물과 EtOH 추출물에서 18.4min에 나타난 성분의 피크의 용리시간과 거의 일치함을 알 수 있었다. 따라서 이 피크가 빈카민 성분임을 확인할 수 있었다.

또한 이 성분이 빈카민임을 재확인하기 위하여 PDA 검출기를 이용하였다. 그 결과 표준 물질인 빈카민의 UV spectrum과 열수 추출물과 EtOH 추출물에서 18.4min에 나타난 성분의 UV spectrum이 서로 일치하는 것으로 나타나 이 성분이 빈카민임을 재확인 하였다. Fig. 3의 빈카민과 일치하는 용리시간 대에 나타나는 피크의

UV/visible spectra를 Fig. 4에 나타내었다.

Table 1. Analytical conditions of *Vinca minor* extracts for HPLC.

| 분석 조건 | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------|--------|---------|-----|---|----|----|----|----|---|-----|----|-----|---|
| HPLC 기기 종류 | YL-9100 HPLC | | | | | | | | | | | | | | | |
| 용매조건 | -용매 A: 물(0.1% TFA 함유) -용매 B: Acetonitrile -용매 C: Methyl alcohol | | | | | | | | | | | | | | | |
| 파장 | 270nm(PDA detector) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 온도 | 25°C | | | | | | | | | | | | | | | |
| 주입 | 20uL | | | | | | | | | | | | | | | |
| 유속 | 1mL/min | | | | | | | | | | | | | | | |
| 용매 기울기 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>용매A(%)</th> <th>용매B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Initial</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | 용매A(%) | 용매B(%) | Initial | 100 | 0 | 30 | 60 | 40 | 35 | 0 | 100 | 40 | 100 | 0 |
| | Time (min) | 용매A(%) | 용매B(%) | | | | | | | | | | | | | |
| | Initial | 100 | 0 | | | | | | | | | | | | | |
| | 30 | 60 | 40 | | | | | | | | | | | | | |
| | 35 | 0 | 100 | | | | | | | | | | | | | |
| | 40 | 100 | 0 | | | | | | | | | | | | | |
| | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>용매A(%)</th> <th>용매B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Initial</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table> | Time (min) | 용매A(%) | 용매B(%) | Initial | 100 | 0 | 30 | 70 | 30 | 35 | 0 | 100 | 40 | 100 | 0 |
| | Time (min) | 용매A(%) | 용매B(%) | | | | | | | | | | | | | |
| | Initial | 100 | 0 | | | | | | | | | | | | | |
| | 30 | 70 | 30 | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | 0 | 100 | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | 100 | 0 | | | | | | | | | | | | | | |

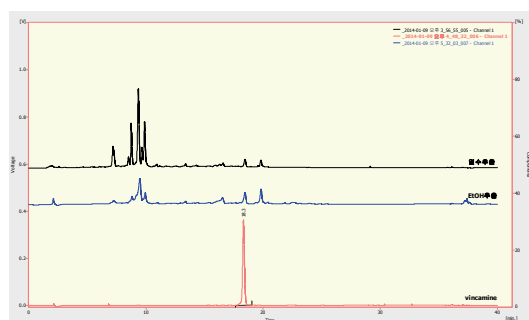


Fig. 3. HPLC chromatograms of *Vinca minor* extracts. A: Hot water extract, B: EtOH extract, C: Vincamine as a standard.

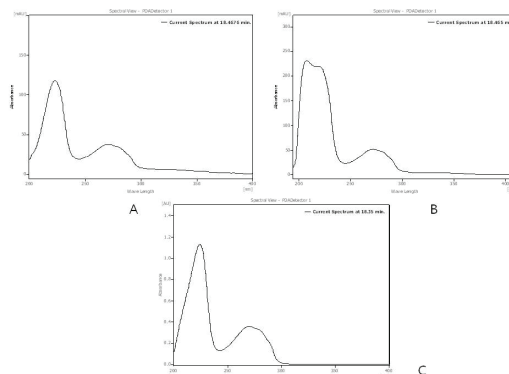


Fig. 4. UV/visible absorption spectra of *Vinca* alkaloids eluted at 18.4min (A) and 18.5min and vincamine (C) as a standard.

Fig. 4의 UV/visible spectra A와 B는 표준물질인 빈카민(C)의 UV/visible spectrum과 거의 일치하였다. 따라서 18.4min경에 용리되는 피크는 빈카민임을 재확인할 수 있었다.

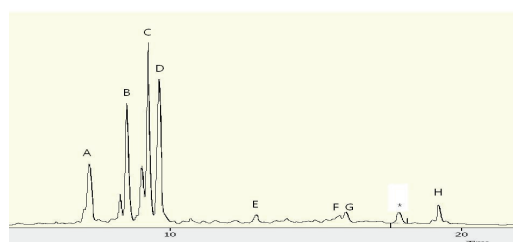


Fig. 5. Expanded HPLC chromatogram of hot water extract of *Vinca minor*. * is vincamine conformed with the standard material.

Fig. 3에서 나타난 추출물들의 HPLC chromatogram을 확대하여 Fig. 5에 나타내었다. 이 중 밝혀진 빈카민 성분 이외의 주요 성분들에 대한 UV/visible spectra를 얻어 Fig. 6에 나타내었다.

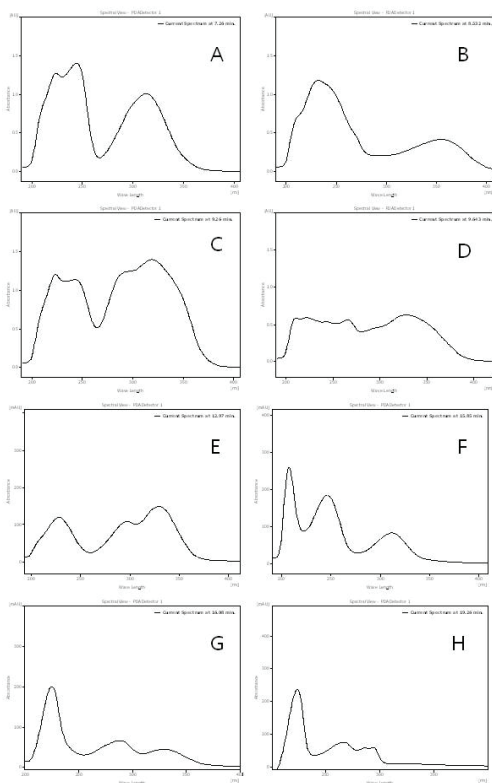


Fig. 6. UV/vis absorption spectra of Vinca minor hot water extract. A~D: eluted from 7 to 10 min. E~H: eluted from 13min to 19 min.

Fig. 5의 7min에서 10min사이에 보이는 성분들(A~D)은 HPLC에서 초기에 용리되므로 친수성인 물질이다. 이것들은 폴리페놀 성분들로 추정되며 배당체의 형태를 가질 것으로 추정된다. 이 중 특히 B는 약 250nm와 300nm에서 최대흡광도(λ_{max})를 가지고 있으며 이물질의 UV/vis absorption spectrum을 근거로 볼 때 quercetin 배당체 중의 하나로 추정된다.

3.2. DPPH radical 소거활성(항산화) 시험 결과

두 가지 방법에 의해 추출된 빈카 마이너 추출물을 12.5ppm, 25ppm, 50ppm, 75ppm, 100ppm 농도에서 자유라디칼을 소거하는 항산화능을 측정하였다. 그 결과, DPPH에 의한 항산화능은 EtOH-추출물과 열수 추출물 모두 100ppm에서 약 8% 정도의 항산화능을 보였다.

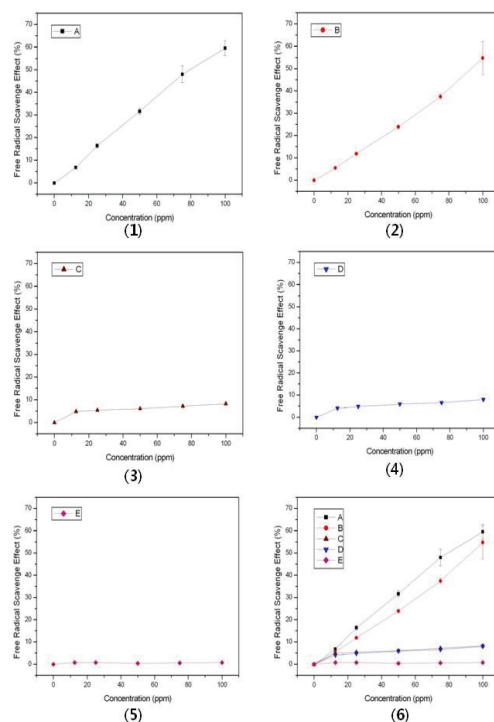


Fig. 7. The percentage inhibition (%) of free DPPH radical in the presence of different concentration of antioxidants. (1) Quercetin (2) Vitamin C (3) EtOH extract (4) Hot water extract (5) Vincamine as a standard. (6) Overall.

자유라디칼 소거 활성. (1) Quercetin의 자유라디칼 소거 활성, (2) Vitamin C의 자유라디칼 소거 활성, (3) 빈카 마이너 EtOH 추출물의 자유라디칼 소거 활성, (4) 빈카 마이너의 열수 추출물의 자유라디칼 소거 활성, (5) 표준물질인 빈카민의 자유라디칼 소거 활성, (6) (1)~(5)의 결과를 모두 포함한 그래프. * A: Quercetin, B: Vitamin C, C: EtOH-추출물, D: 열수 추출물, E: 빈카민.

이는 비교군인 quercetine에 비해 약 14%, Vitamin C에 비해 약 15%의 저해능에 해당한다. 빈카 마이너의 주요한 알칼로이드 성분인 빈카민의 경우 항산화능은 측정되지 않았다. 따라서 빈카 마이너에 함유된 빈카민계 알칼로이드들은 항산화능이 거의 없는 것으로 보이지만 이 식물에 함유된 또 다른 천연물인 flavonoids (kempferol

계 및 quercetin계) 성분에 의해 약 15%의 항산화효과를 보이는 것으로 추정된다.

4. 결론

열수 추출법을 사용한 추출물과 EtOH 추출법을 사용한 추출물 성분은 HPLC chromatogram에서 거의 유사하게 나타났으나 열수 추출물의 경우 배당체와 같은 친수성인 천연물 성분의 함량이 EtOH 추출법을 사용한 추출물보다 더 높은 것으로 나타났다. 이 중 에탄올 추출물에서 빈카민이 많이 추출되는 것을 표준물질과 UV/spectra를 비교하여 확인 하였다. 그 외에 quercetin류의 배당체와 같은 다양한 폴리페놀의 UV/visible absorption spectra를 얻었다. DPPH radical 소거활성시험법을 이용한 항산화 효과를 측정한 결과 빈카 마이너의 주요 알칼로이드인 빈카민은 항산화능이 거의 없는 것으로 나타났으나 추출물에서는 비교군인 quercetin에 비해 약 14%, Vitamin C에 비해 약 15%의 항산화 효과를 보였다. 이는 플라보노이드계 배당체들에 의한 효과로 추론되었다.

References

1. J. Roepke, V. Salim, M. Wu, A. M. K. Thamm, J. Murata, K. Ploss, W. Boland, and V. De Luca, Vinca drug components accumulate exclusively in leaf exudates of Madagascar periwinkle. *PNAS*, 107, 15287-15292(2010).
2. R. van der Heijden, D. I. Jacobs, W. Snoeijer, D. Hallard and R. Verpoorte, The Catharanthus Alkaloids: Pharmacology and Biotechnology. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 607-628(2004).
3. H-Y. Lee, N. Yerkes, and S.E. O'Connor, Aza-Tryptamine Substrates in Monoterpene Indole Alkaloid Biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 16, 1225-1229(2009).
4. S. Mahroug, V. Courdavault, M. Thiersault, B. St-Pierre, V. Burlat, Epidermis is a pivotal site of at least four secondary metabolic pathways in *Catharanthus roseus* aerial organs. *Planta*, 223, 1191-1200 (2006).
5. J. Murata, J. Roepke, H. Gordon, and V. De Luca, The Leaf Epidermis of *Catharanthus roseus* Reveals Its Biochemical Specialization. *The Plant Cell*, 20, 524-542(2008).
6. R. Bhadra, S. Vani, and J. V. Shanks, Production of indole alkaloids by selected hairy root lines of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 581-592(1993).
7. J. A. Morgan, J. V. Shanks, Inhibitor studies of tabersonine metabolism in *C. roseus* hairy roots. *Phytochemistry*, 51, 61-68(1999).
8. A. Verma, K. Hartonen, and M-L. Riekkola, Optimisation of Supercritical Fluid Extraction of Indole Alkaloids from *Catharanthus roseus* using Experimental Design Methodology-Comparison with other Extraction Techniques. *Phytochemical Analysis*, 19, 52-63(2008).
9. S. Hisiger and M. Jolicoeur, Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC. *Phytochem Rev.*, 6, 207-234(2007).
10. Kyung-Hwan Jung and Hyang-Yeol Lee, 'Escherichia coli b-galactosidase-catalyzed synthesis of 2-phenoxyethanol galactoside and its characterization' *Bioprocess Biosyst Eng.* 38, 365-372(2014)
11. Hyang-Yeol Lee and Kyun-Hwan Jung, 'Enzymatic Synthesis of 2-phenoxyethanol Galactoside by Whole Cells of b-Galactosidase-Containing Escherichia coli.' *J. Microbiol. Biotechnol.* 24. 9. 1254-1259(2014)
12. Soo, Lee and Hyang-Yeol Lee, 'Studies of vindoline metabolism in *Catharanthus roseus* cell cultures using deuterium-labeled tabersonine,' *J. of the Korean Oil Chemists' Soc.*, 29(1), 71-80(2010).
13. Sang-Eun Lee, Tae-Min Jo, Hyang-Yeol Lee, Jongsung Lee, Kyung-Hwan Jung, 'β-Galactosidase-Catalyzed Synthesis of Galactosyl Chlorphenesin and Its

- Characterization.’ *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 1299–1312(2013).
14. Sang-Eun Lee, Hyang-Yeol Lee, and Kyung-Hwan Jung, ‘Production of Chlorphenesin Galactoside by Whole Cells of β -Galactosidase-Containing *Escherichia coli*.’ *Journal of microbiology and biotechnology*, 23(6), 826–832(2013).
15. Hyang-Yeol Lee, ‘Analytical Characterization of Aza-Indole Alkaloids in the Biosynthesis of *Catharanthus roseus*, *J. of the Korean Oil Chemists’ Soc.*, 29(2), 248–256(2010).