

碩士學位論文

조록나무잎에 함유된 기능성
화장품 활성성분 분리



濟州大學校 教育大學院

化學教育專攻

李美靜

2008年 8月

조록나무잎에 함유된 기능성 화장품 활성성분 분리

指導教授 李 南 昊

李 美 靜

이 論文을 教育學 碩士學位 論文으로 提出함

2008年 8月

李美靜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

Isolation of Functional Cosmetic Ingredient from
Distylium racemosum Leaves

Mi-Jeong Lee

(Supervised by professor Nam-Ho Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of Master of Education

2008. 8

This thesis has been examined and approved.

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

국문초록

본 실험은 제주산 식물들의 70% 에탄올 추출물에 대한 활성 테스트를 한 후 활성이 가장 좋았던 조록을 선택하여 활성성분 분리 동정을 하였다.

조록나무 잎의 70% ethanol 추출물을 *n*-hexane, ethyl acetate, butanol, water 로 용매분획을 하고 ethyl acetate 분획에 대해, normal silica gel chromatography를 실시하여 분리된 분획들을 NMR 기기로 확인하고 문헌들과 비교한 결과 조록나무 잎에서 afzelin을 분리하였다

Normal silica gel chromatography를 통하여 분리된 afzelin에 대해 DPPH radical 소거 활성실험을 하였고, RC_{50} 을 확인해 본 결과, 조록 나무 잎에서 분리된 afzelin은 RC_{50} 값이 $>100 \mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 비타민 C의 RC_{50} $3.7 \mu\text{g/mL}$ 비해 소거 능력이 떨어짐을 확인할 수 있었다. 또한 elastase inhibition test에서도 대조군인 oleanolic acid의 IC_{50} 값이 $27.17 \mu\text{g/mL}$ 값을 갖는데 비해 afzelin은 RC_{50} 값이 $>100 \mu\text{g/mL}$ 로 활성이 떨어지는 것을 알 수 있었다.

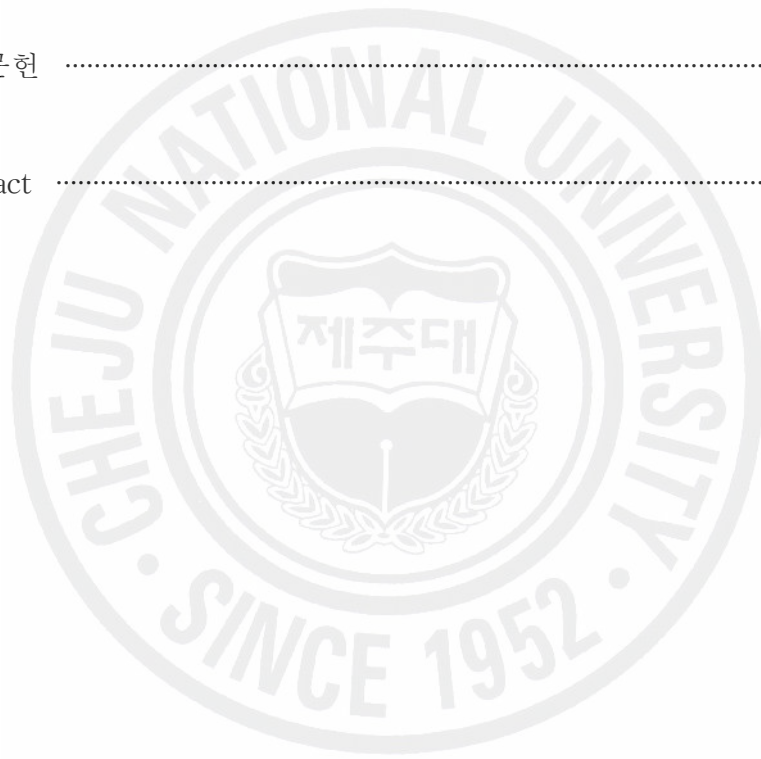
그러나, tyrosinase inhibition effect 실험에서는 대조군인 arbutin의 IC_{50} 값이 $35.05 \mu\text{g/mL}$ 대해 afzelin는 $38.79 \mu\text{g/mL}$ 로 소거 능력이 비슷함을 알 수 있었다.

따라서, 본 실험결과를 통하여 제주도에서 자생하고 있는 조록나무 잎에서 분리된 화합물을 이용하여 미백 개발 가능성을 엿볼 수 있었다.

목 차

List of Shemes	iii
List of Tables	iii
List of Figures	iv
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재료	4
2. 시약 및 기기	8
3. 실험방법	9
3-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리	9
3-1-1. 제주산 식물의 70% 에탄올 추출	9
3-1-2. 조록나무 잎의 70% EtOH 추출물 및 용매 분획	9
3-2. 항산화 활성 실험; DPPH radical 소거 활성	11
3-3. Tyrosinase 활성 저해 측정 실험	14
3-4. Elastase 활성 저해 측정 실험	17
III. 결과 및 고찰	21
1. DPPH free radical 소거 활성에 의한 항산화 활성 측정	21
1-1. 제주산 식물의 70% 에탄올 추출물에 대한 DPPH, Tyrosinase, Elastase 활성실험	21
1-2. 조록나무 잎에서 분획분에 대한 라디칼 소거활성	25
1-3. 분리된 물질에 대한 라디칼 소거 활성	27
2. Tyrosinase 활성 억제 실험	29
2-1. 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 Tyrosinase 활성 억제 실험	29
2-2. 분리물에 대한 Tyrosinase 활성 억제 실험	31

3. Elastase 활성억제 측정	33
3-1. 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 Elastase 활성 억제 실험	33
3-2. 분리물에 대한 Elastase 활성억제 실험	34
4. 조록나무 잎의 성분 분리 및 구조 확인	36
4-1. Compound 1 의 분리 및 구조 확인	36
 IV. 요약 및 결론	 42
 V. 참고문헌	 43
 VI Abstract	 45



List of Sheme

Scheme 1. Procedure of extraction and various fraction from <i>Distylium racemosum</i> leaves	10
--	----

List of Tables

Table 1. DPPH radical scavenging effect of plant in Jeju	22
Table 2. Tyrosinase inhibition effect of plant in Jeju	23
Table 3. Elastase inhibition effect of plant in Jeju	24
Table 4. RC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of several extracts	26
Table 5. IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of afzelin	28
Table 6. IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of several extracts	30
Table 7. IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of afzelin	32
Table 8. IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of several extracts	34
Table 9. IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of Afzelin	35
Table 10. NMR data of Afzelin	39

List of Figures

Figure 1. Photograph of <i>Distylium racemosum</i>	6
Figure 2. Photograph of <i>Distylium racemosum</i> leaves	6
Figure 3. Photograph of <i>Distylium racemosum</i> flower	7
Figure 4. Photograph of <i>Distylium racemosum</i> fruits	7
Figure 5. Scavenging of the DPPH radical by phenol	12
Figure 6. Measurement of DPPH radical scavenging effect	13
Figure 7. Melanin synthesis pathway	15
Figure 8. Measurement of Tyrosinase inhibition effect	16

Figure 9. Structure of skin	18
Figure 10. Chemical structures of anti-wrinkle agents	19
Figure 11. Measurement of Elastase inhibition effect	20
Figure 12. DPPH radical scavenging effect of several extracts	25
Figure 13. DPPH radical scavenging effect of afzelin	27
Figure 14. Inhibition of Tyrosinase activity by several extracts	29
Figure 15. Inhibition of Tyrosinase activity by Afzelin	31
Figure 16. Inhibition of Elastase activity by several extracts	33
Figure 17. Inhibition of Elastase activity by afzelin	35
Figure 18. ¹ H NMR(400MHz) of compound 1 in CD ₃ OD	37
Figure 19. ¹³ C NMR(100MHz) of compound 1 in CD ₃ OD	38
Figure 20 Chemical structure of Afzelin	40
Figure 21 Cell viability of <i>Distylium racemosum</i> leaves extracts (FSfE) and α-MSH on B16-f10 melanoma cells by MTT assay	41
Figure 22. The inhibition effect of FSfE on melanin production in B16-f10 melanoma cells	41

I. 서론

천연식물에서 유효성분을 추출하는 바이오 기술이 미백 기능성화장품 성분 연구의 최신 트렌드로 부상하고 있다. 2007년 7월부터 시행된 국내 화장품 법에서는 ‘기능성 화장품은 미백 제품, 주름개선 제품, 자외선 차단 제품’으로 한정하고 있다.

한국보건산업진흥원이 발간한 ‘보건산업기술동향 여름호에 게재된 ‘미백화장품 연구동향(김나연 (주)태평양기술연구원)’에 따르면 최근 바이오기술을 이용한 천연식물에서의 미백성분 찾기가 미백화장품 연구의 가장 주목할 만한 흐름으로 분석된다.

지금까지 미백 관련 연구동향은 의하면 자외선 흡수제 관련 연구와 아스코르빈산 유도체, 알부틴류와 기타 다른 합성 미백제 등 원료합성에 대한 연구에 초점이 맞춰졌으나 최근 들어서는 전 세계적으로 각 화장품 회사들이 경쟁적으로 식물에서 미백성분을 추출해, 이를 바이오기술을 이용, 추출한 미백성분의 효능을 검증하는 것에 초점을 두고 있다. 국내외 주요사들의 최근 보고한 논문이나 특허를 보면 최근 미백화장품 개발에 있어서의 천연물에 대한 관심과 연구는 더욱 활발해지고 있는 것으로 나타났다.

국내의 경우 2002년 발표한 미백화장품 특허출원 내용을 살펴보면 총 특허출원 수 2백16건의 핵심성분 중 57%가 천연 추출물 성분으로 가장 큰 비중을 차지했다. 일본은 주요 화장품 회사들이 멜라닌 합성에 영향을 주는 신호전달 물질(호르몬)을 조절하거나 멜라닌세포 표면에 있는 수용체를 조절해 외부 신호전달을 차단함으로써 멜라닌 생성을 억제하는 등의 연구를 대부분 천연물을 통해 얻은 유효성분을 이용한 방향으로 진행되고 있으며 이미 상품화된 제품이 있는 것으로 나타났다.

유럽계 회사나 미국계 회사도 최근 미백에 대한 관심이 모아지면서 존슨앤드존슨사는 콩과 식물에서 추출한 성분을 처리해 피부의 색소 형성을 억제할 수 있는 제품을 이미 개발한 상태로 나타났다.

국내·외의 미백화장품 관련 천연추출물을 이용한 바이오 기술에 대한 연구와

개발이 더욱 활발해짐에 따라 이와 관련한 색소 이상증의 발생원인, 자외선에 의한 색소 침착, 호르몬 관련 색소 침착 등에 대한 연구도 더욱 활발해 질 것으로 전망되고 있어 더욱 향상된 미백제품의 개발이 이루어질 것으로 기대를 모으고 있다.

한편 현재 미백 기능성 원료로 고시된 원료는 닥나무 추출물·알부틴·유용성 감초추출물·3-에토시 아스코르빈산 등으로 미백 제품을 개발하기 위해서는 이들 고시원료를 사용하거나 새로운 미백제를 개발, 인체효력시험을 거친 후 별도의 효력입증 자료를 제출해야 한다. ¹⁾

최근 주목받는 미백성분은 다음과 같다.

비타민c 유도체 : 현재 가장 주목받는 성분. 비타민c에 인산을 첨가한 것으로, 피부 깊숙이 침투한다. 기미, 주름, 여드름 등에 효과를 기대할 수 있으며 활성 산소를 억제하여 여드름 때문에 생기는 염증도 방지한다.

코직산 : 쌀의 누룩에서 미백 성분. 멜라닌 생성 효소인 티로시나아제를 억제하여 눈 밑에 생기는 기미와 자외선에 노출되어 생기는 기미 예방에 효과가 있다.

알부틴 : 고산식물인 율굴 등에서 추출되는 성분으로 티로시나아제를 억제하여 멜라닌 생성을 막는다. 안전하지만 침투성은 조금 떨어지는 편이라 효과를 보려면 고농도로 사용해야 한다.

엘라그산 : 멜라닌 생성 효소인 티로시나아제 작용을 막아 멜라닌 생성을 억제한다. 엘라그 산이 들어간 제품은 가격이 저렴한 것이 많아서 얼굴뿐만 아니라 목과 팔등의 색소 침착 방지용으로도 좋다.

루시놀 : 미국에서 기미 치료에 사용되는 하이드로키논과 아주 비슷한 물질이다. 멜라닌 생성 억제 효과가 좋으며 세포에 미치는 해도 적다. 알부틴에 비하면 피부 침투성이 좋아 적은 양으로도 큰 효과를 얻을 수 있다.

룸프안: 보습 추출물이라고 표시한다. 인도네시아산 생강과 식물에서 채취한 미백 성분으로 멜라닌 생성 효소의 유전자 생성을 억제한다.

카모밀라ET : 카밀레 추출물이라고도 표시된다. 멜라닌을 생성하라는 지령을 내리는 엔도텔린을 억제하여 멜라닌 생성을 막는다. 기미와 주근깨가 있는 부분

에만 미백 효과를 보고 싶은 사람에게 적합하다.

고삼추출물 : 고삼이라는 식물에서 채취한 미백 성분으로 햇빛에 노출되었던 피부나 기미 부분에서 분비되는 멜라노사이트 자극 호르몬이라는 물질의 작용을 막아 멜라닌 생성을 억제한다.

화극추출물 : 화극이라는 장미과 식물에서 추출한 미백성분. 보습 성분이라고 표시한다. 활성산소를 제거하는 효과가 커서 기미 방지와 개선에 효과를 기대할 수 있다. 자외선에 의한 피부 염증 억제에도 효과가 있다.

지용성 감초 추출물 : 보습 추출물이라고 표시한다. 감초에서 짠 기름으로 미백효과가 뛰어나다. 티로시나아제의 작용을 억제하고 활성산소를 없애는 효과도 있다. 기미 치료에 이용되기도 한다.

로즈베리케톤글루코시드 : 최신 미백 성분의 하나로 보습성분으로 분류된다. 기미의 원인인 일산화탄소를 없애 기미를 방지한다. 자외선에 노출된 후 바로 사용하면 높은 효과를 얻을 수 있다.

상백피 추출물 : 뽕 추출물이라고도 한다. 뽕나무 뿌리의 껍질을 건조시킨 것에서 추출한다. 옥시레스베라트롤이라는 성분에 티로시나아제의 활동을 억제하는 작용이 있어 흰 피부를 유지하게 해준다.

본 연구에서는 제주도내 자생하고 있는 식물을 시료로 이용하여 추출물을 제조하고 기능성 화장품 관련 활성 (tyrosinase 억제 활성, elastase 억제 활성, DPPH 라디칼 소거활성)을 검색하였다. 그 중에서 미백활성 (tyrosinase 억제 활성)이 있는 조록나무(*Distylium racemosum*) 잎에 함유된 활성성분을 분리하여 그 구조를 동정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

조록나무는 쌍떡잎식물 장미목 조록나무과의 상록교목으로 학명은 *Distylium racemosum* 이고, 분포지역은 한국(제주·완도)·일본이며, 서식장소는 산기슭 저지대이다. 이명으로는 버레혹나무, 산유지남, 조레지남, 조로기라고 불리며, 유사종으로는 넓은잎조록나무(var. *latifolia* NAK.)가 있다.

조록나무는 높이 20m에 달하며 어린 가지에 성상모(星狀毛:여러 갈래로 갈라져 별 모양의 털)가 있다가 없어진다. 잎은 어긋나고 두꺼우며 긴 타원형이고 가장자리가 밋밋하나 때로는 위쪽에 물결 모양 톱니가 있다. 꽃은 4월에 피고 잎겨드랑이에 총상꽃차례로 달리며 위쪽에 양성화, 밑에 수꽃이 달린다. 그리고 잎에 커다란 벌레집이 많이 생긴다.

꽃잎은 없고 꽃받침조각은 3~6개, 수술은 6~8개이며 암술은 1개이다. 열매는 9~10월에 결실하며 삭과(殼果)로 목질이고 겉에 털이 밀생하며 2개로 갈라져서 종자가 나온다. 심재(心材)는 검은 자홍색이며 단단하다. 목재는 가구재·건축재로 쓰이며, 관상용으로 심는다. 잎이 보다 넓은 것을 넓은잎 조록나무(var. *latifolia*)라고 한다. 그리고 잎에 충영을 형성하는 것이 특징이며 뿌리가 잘 썩지 않아 수백 년 묵은 것은 그 다양한 형상 때문에 예술적 가치가 높다. 잎은 길이 3-8 cm, 폭 1.5-3 cm로서 호생하며 두껍고 타원형 또는 좁은 도란형이며 침두 또는 둔두이고 예저이며 혁질이고 가장자리는 밋밋하며 광택이 나고 양면에 털이 없으며 탁엽이 일찍 떨어진다. 불나무처럼 앞에 충영이 잘 생긴다. 교목이나 대개 관목상으로 자라며 수형이 타원형이다. 바람에 민감하여 주풍방향의 반대편으로 수관이 비뚤어져 모양을 이루며 수피는 적갈색이고 가지에 성모가 있으나 곧 없어진다. 꽃은 양성화로서 화관 없이 붉은 꽃받침으로만 구성된 작은 꽃이 4~5월경에 핀다. 총상화서는 액생하고 성모가 있으며 길이 8 cm 정도이고 꽃받침은 5~6개로 갈라지며 피침형이고 겉에 갈색의 성모가 있다. 수술은 6-8개이며 꽃밥은 적색이고 암술은 수꽃에서는 퇴화되며 양성화에 1개 있고

자방은 2실이며 곁에 성모가 있고 암술대는 1개로서 2개로 갈라진다. 삭과는 길이 1~1.5cm이고 목질이며 곁에 밀모가 있고 9-10월에 익으며 2개로 갈라져서 종자가 나온다.

생태적 특성으로 내공해성은 강하고, 내한성은 약하며, 내염은 중간이다. 꽃은 4월에 피고, 열매는 10월에 맺는다.

경관 및 용도적 특성으로는 공원수, 정원수, 풍치수, 독립수, 광택이 있으며 두껍고 호생하는 질푸른 잎이 특징이며 꽃받침만 있는 붉은꽃이 엽병과 잎 사이에 뭉쳐피는 점이 특이하다. 잎의 관상가치가 높아 남부지방에서 공원수, 정원수, 풍치수로 적당하고 중부지방에서는 분에 심어 실내에서 관상한다. 가로수로도 이용되나 편심 성장하여 곤란하다.

본 실험에서는 제주에서 자생하고 있는 조록나무 잎에서 생리 활성 물질을 탐색 및 분리하여 분리된 화합물에 대해 구조분석 및 활성 실험으로 DPPH radical scavenging effect test, tyrosinase 억제활성, 억제활성 실험을 실시하였다.



Figure 1. Photograph of *Distylium racemosum*

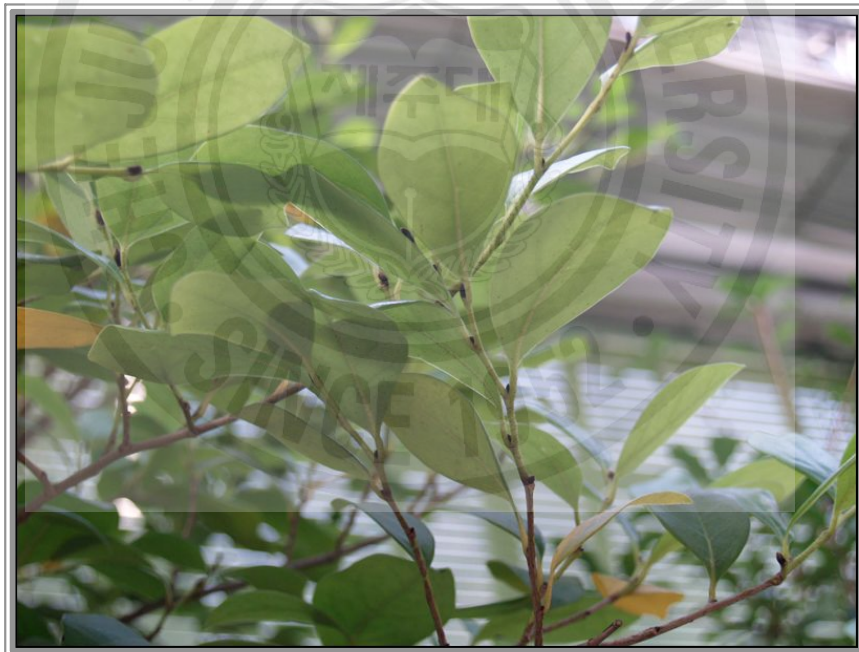


Figure 2. Photograph of *Distylium racemosum* leaves



Figure 3. Photograph of *Distylium racemosum* flower



Figure 4. Photograph of *Distylium racemosum* fruits^{1) 2)}

2. 시약 및 기기

실험에서 시료의 추출 및 용매분획에 사용된 용매들은 Merck 社 제품을 사용하였다. Column packing material은 RP 18(YMC-GEL ODS-A, 12nm, S-75 μm), SephadexTM LH-20(Amersham Biosciences), normal silica gel 60(230-400mesh ASTM)을 사용하였으며, TLC plate는 silica gel 60 F₂₅₄를 사용하였다. TLC상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다.

Visualizing agent로는 3% KMnO₄, 20% K₂CO₃ 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다. 시료의 흡광도를 측정하기 위해서는 UV spectrometer는 Biochrom Libra s22(cambridge Inc., England)를 이용하였으며 구조분석에 이용하였던 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400 (FT-NMR system, JEOL)을 이용하였으며, NMR 측정시 사용되었던 용매는 CD₃OD가 사용되었다.

항산화 관련 활성 실험을 하기 위하여 사용하였던 DPPH 시약은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, SIGMA 社)가 사용되었다.

Elastase 주름억제활성 실험시 사용한 기질로 사용된 N-Succinyl-(Ala-Ala-Ala)-p-nitroanilide은 Sigma-Aldrich(USA)사에서 구입한 것을 사용하였다. Tyrosinase 억제활성 실험에서 쓰인 L-tyrosine은 Sigma-Aldrich(USA)사의 시약을 사용하였고, 활성 측정 시 사용한 자외선 분광광도계 (UV-visible spectrophotometer)는 Hewlett Packard 8453과 Biochrom Libra S22(Cambridge INC., England)을 사용하였다.

3. 실험방법

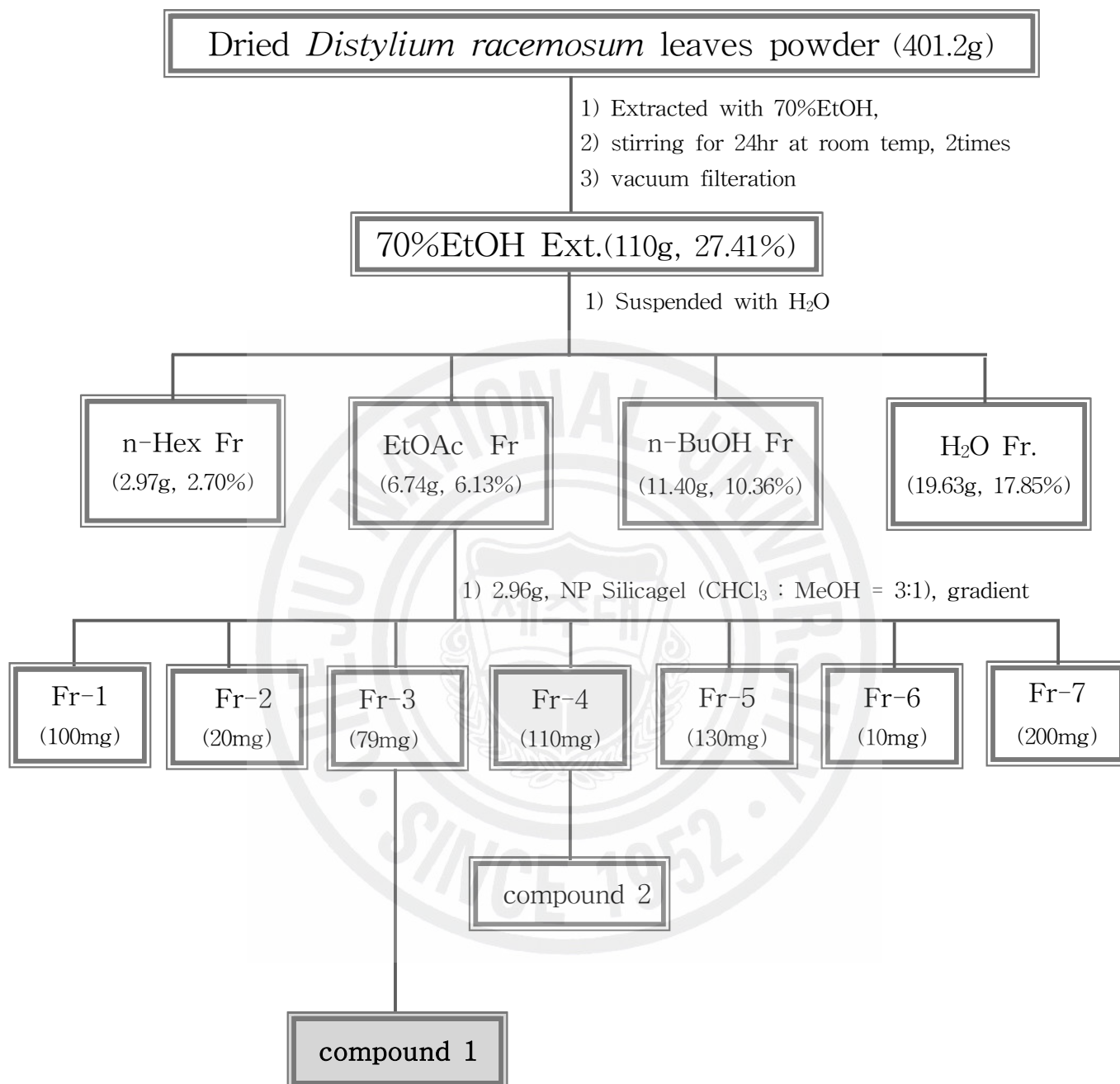
3-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리

3-1-1. 제주산 식물의 70% 에탄올 추출

건조된 제주산 식물들을 70% 에탄올에 침적하고, 실온에서 24시간 교반하여 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 여과하여 잔사를 분리한 후 여액만을 취하였으며 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일하게 2회 반복 실시하였다.

3-1-2. 조록나무 잎의 70% EtOH 추출물 및 용매 분획

조록 나무 잎을 잘게 간 분말 401.2g을 70% EtOH 25L에 침출하고, 실온에서 24시간 동안 교반하여 침출시킨 시료를 감압여과 장치를 통해 여액을 취해 감압농축 하였으며, 분리된 잔사는 추출과정을 동일한 조건에서 2회 반복하였다. 이 과정을 통해 70% EtOH 추출물 110.0g을 얻었다. 얻어진 70% EtOH 추출물을 증류수 1L에 현탁시키고 분별 깔대기를 이용해 각각 1L 씩 *n*-hexane층, ethyl acetate층, *n*-butanol층, H₂O층을 얻었다. 그리고 분획층 중에서 ethyl acetate층을 fraction으로 분리하기 위하여 glass column에 silical gel을 충전시켰다. 그리고 ethyl acetate층 일부를 소량의 용매에 녹인 후 충전된 glass column chromatography에 전개용매[2.96g, NP Silicagel(CHCl₃ : MeOH = 3:1), gradient]를 사용하여 전개시켰다. 이렇게 해서 얻은 얻어진 fraction을 회전 농축시켜서 각각의 분획물을 다시 얻었다(Scheme 1).



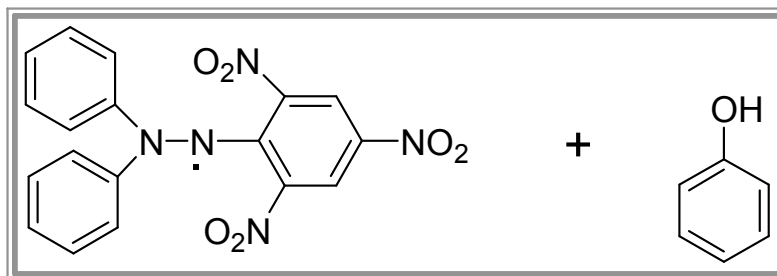
Scheme 1. Procedure of extraction and various fraction from *Distylium racemosum* leaves

3-2. 항산화 활성 실험; DPPH radical 소거 활성

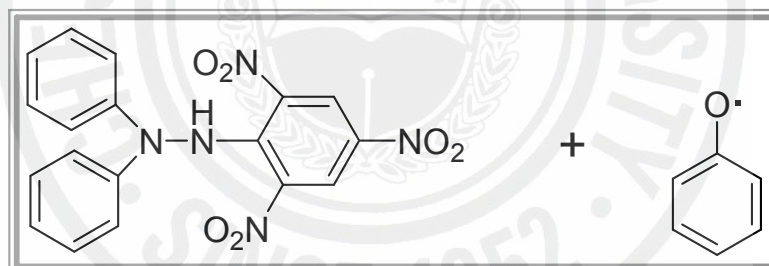
1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거작용은 광범위하게 쓰이는 간단한 항산화 검색방법으로 특히 phenol과 aromatic amines의 항산화 활성의 측정에 많이 사용하는 방법이다. 일종의 염료인 diphenylpicrylhydrazine은 자신이 가지고 있는 흡수의 전자 때문에 525 nm에서 강한 흡수 띠를 보인다. 그러나 phenol과 같은 수소나 전자를 제공해주는 전자공여체와 반응을 하게 되면 공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 생성하게 된다. 이때 흡수 띠도 사라지고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며, 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색은 점점 없어지게 되고, 흡광도도 감소하게 되므로 반응액의 색이 노란색으로 변하는 것을 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거활성을 알 수 있다.

실험 방법은 다음과 같이 실행하였다.

먼저 시료를 1 mg/mL의 농도가 되도록 70% ethanol을 용매로 하여 녹인다. DPPH 시약은 4 mM농도가 되도록 100% Ethanol을 용매로 하여 녹여, UV spectrometer를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하여 0.97~0.98이 되도록 맞춘다. 맞춰진 DPPH 용액과 시료는 각각 200 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 섞은 후, 실온에서 10분 반응을 한 후, UV spetrometer를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하게 된다. 또한, DPPH를 첨가하지 않고 대신에 100% ethanol을 시료와 섞은 후 시료자체흡광도를 측정한다. 이 두 흡광도를 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내고, 소거활성 백분율이 50%일 때의 시료의 농도(RC₅₀)를 계산하였다.⁵⁾



DPPH • (violet, 525nm)



Diphenylpicrylhydrazine
(yellow)

Phenoxy
(radical)

Figure 5. Scavenging of the **DPPH** radical by phenol

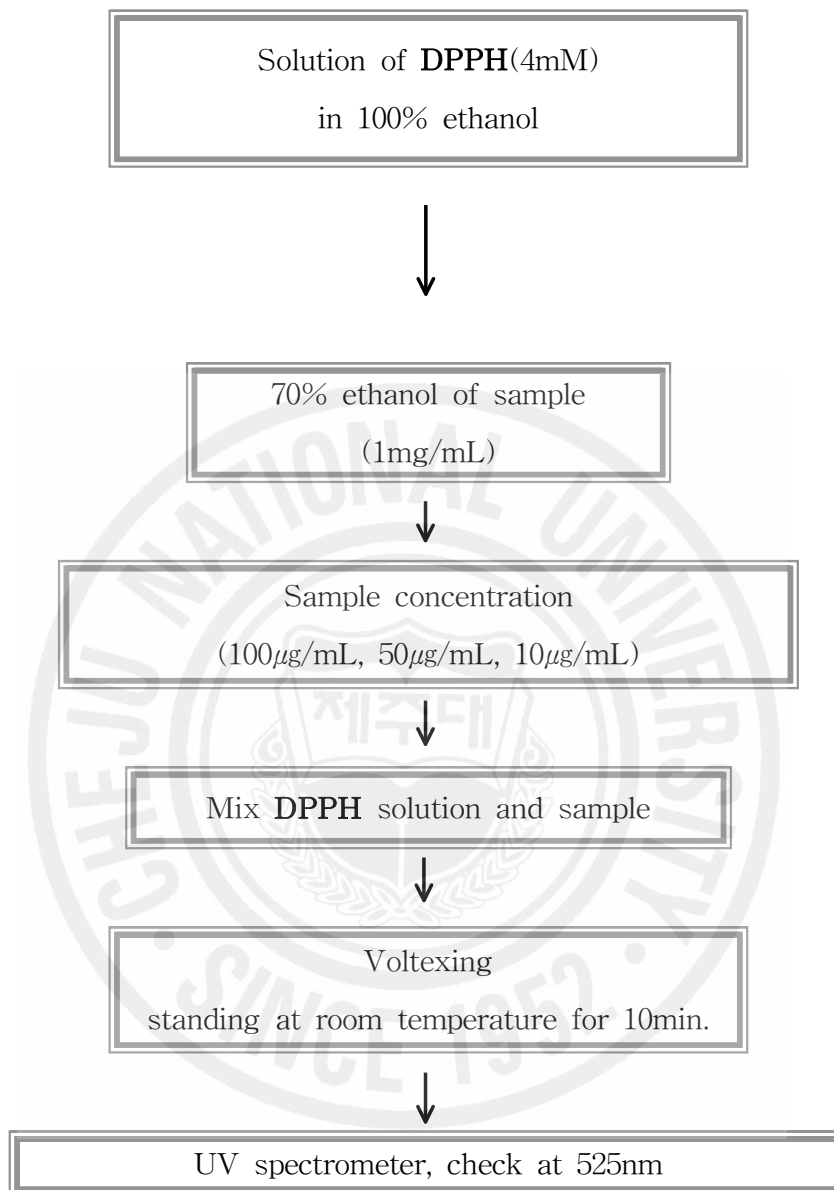


Figure 6. Measurement of **DPPH** radical scavenging effect

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

A: Control의 흡광도

B: Sample의 흡광도

C: Blank의 흡광도

3-3. Tyrosinase활성 저해 측정 실험

Tyrosinase inhibition test는 DOPA chrom법을 응용하여 사용하였다. Buffer는 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.8)을 사용하였고, 사용된 기질로써 L-tyrosine을 사용하였다.

실험방법은 buffer 1.0mL, sample 0.9mL (20 mg/mL, stock), L-tyrosine(0.3 mg/mL, substrate) 1mL, mushroom tyrosinase(1250 units/mL, Enzyme) 0.1 mL, 을 넣고, 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 480nm에서 UV/VIS 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 효소 저해능력은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 각 시료의 IC₅₀을 구하였다. 이 때 사용된 대조군으로는 arbutin(20 mg/mL, stock)을 사용하였다.

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

A: 기질, 효소, 시료를 넣고 반응시킨 흡광도

B: 시료자체의 흡광도

C: 시료대신 buffer용액을 넣고 반응시킨 흡광도(control)

Tyrosinase 억제 활성 검색- 멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 생물고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 멜라닌은 각 개체에 따라 다양하며 그 주요 기능은 전파, 건조, 극한 온도 등에 대한 생존 능력을 높여주고, 미생물에 대한 면역체계의 역할을 수행한다. 그리고 인체의 피부에 존재하며 자외선에 대한 보호기능을 하는 역할을 하며 멜라닌의 생합성 과정은 다음 그림과 같다(**Figure 7**).

그러나 멜라닌의 과잉 생산은 인체에 기미, 주근깨를 형성하고, 피부노화를 촉진한다. 이 과정에서 tyrosinase는 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 효소이며, 이 효소의 활성을 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제한다.⁶⁾

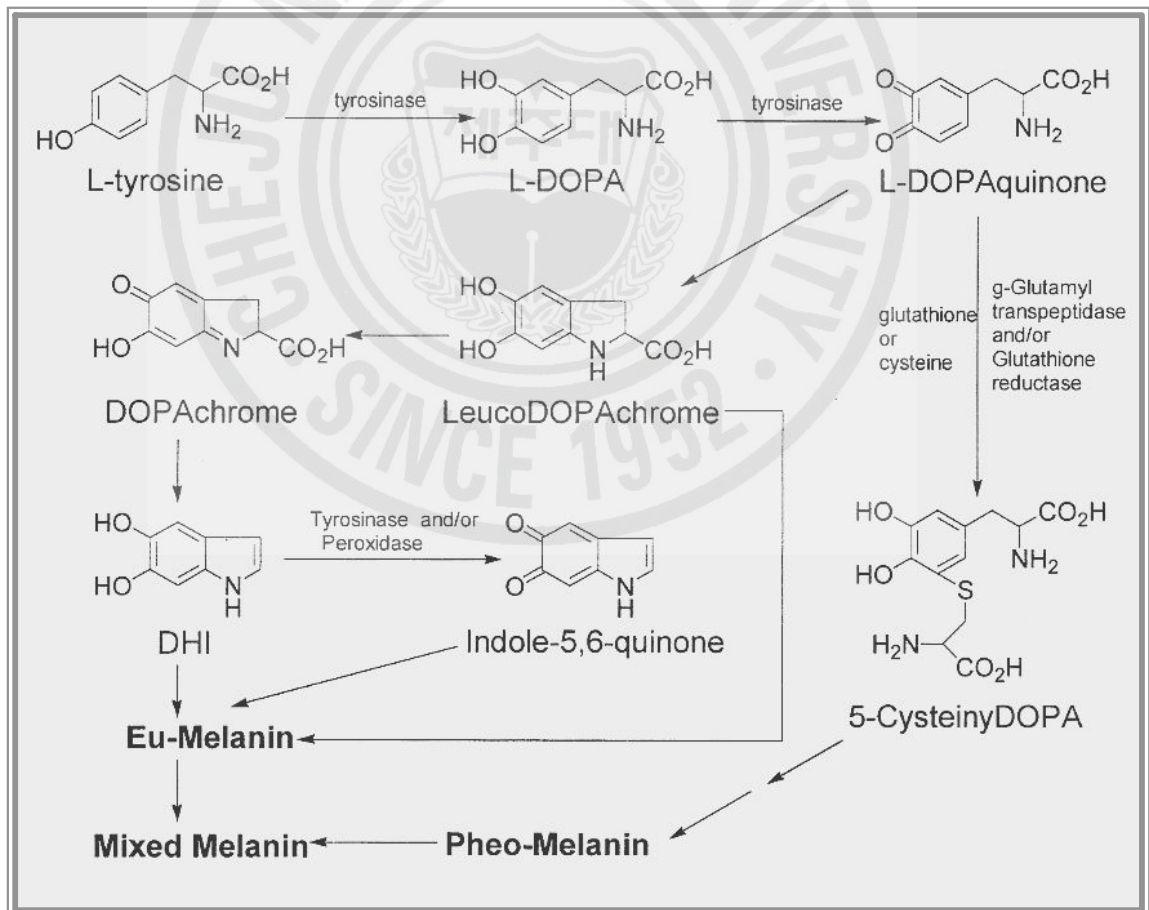


Figure 7. Melanin synthesis pathway

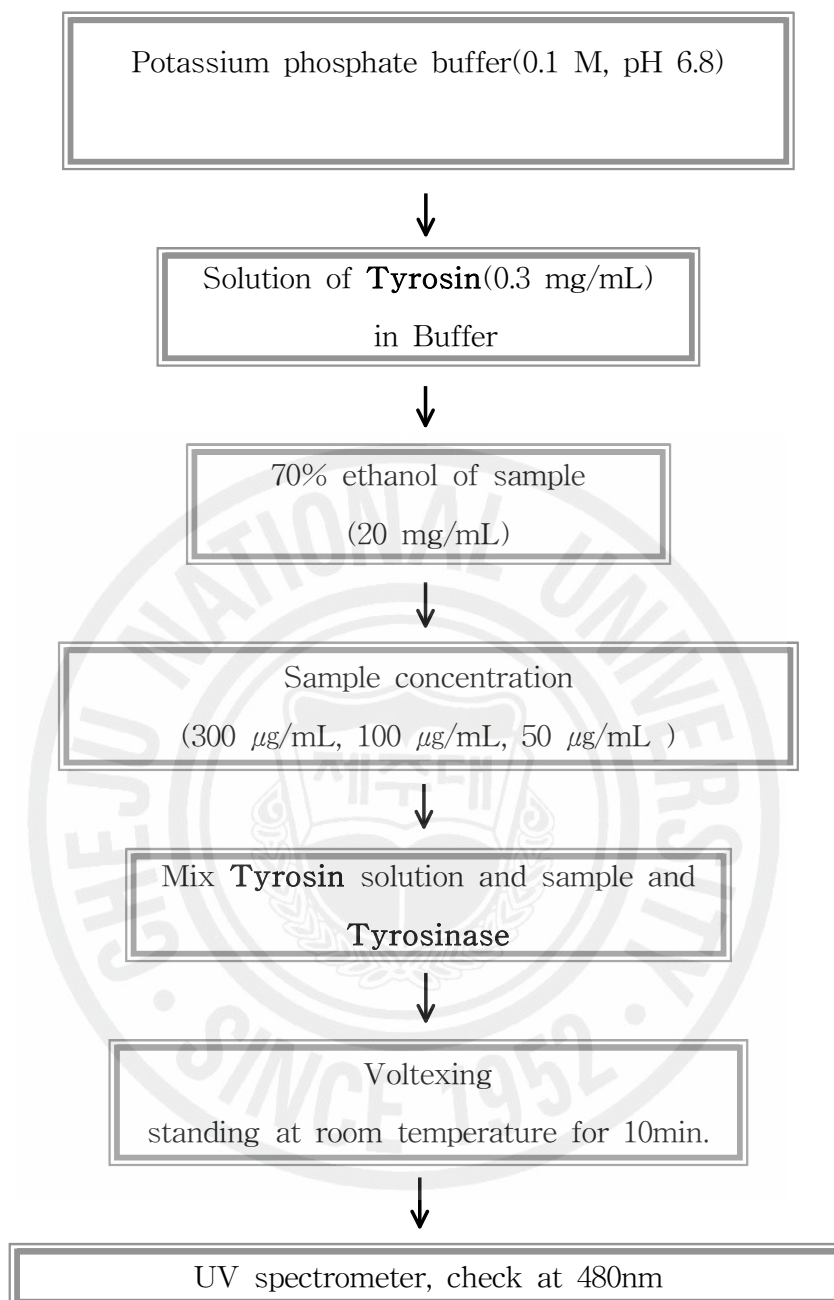


Figure 8. Measurement of **Tyrosinase** inhibition effect

3-4. Elastase 활성 저해 측정 실험

Elastase inhibition test는 James법을 응용하여 사용하였다. Buffer는 0.2M Tris-HCL Buffer(pH8.0)를 사용하였고, 사용된 기질은 N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide를 사용하였다.

실험은 Buffer 84(pH 8.0), sample 1(10 mg/mL, stock), N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide 10(4 mM, substrate), elastase 1(100 µg/mL, Enzyme) 비율로 섞고, 25 °C에서 15분간 반응시킨 후 410 nm에서 UV/VIS 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 효소 저해 능력은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 각 시료의 IC₅₀ 을 구하였다. 이 때 사용된 대조군으로는 oleanolic acid(10 mg/mL, stock), 빈랑자 추출물(10 mg/mL, stock)을 사용하였다.

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

A: 기질, 효소, 시료를 넣고 반응시킨 흡광도

B: 시료자체의 흡광도(Sample Blank)

C: 시료대신 완충용액을 넣고 반응시킨
흡광도(control)

D: 시료대신 완충용액을 넣은 용액에서 효소를
빼고 반응시킨 흡광도(control-Blank)

Elastase는 피부 탄력성에 관련된 elastin을 분해 시켜 collagen과 이루어진 피부의 진피 조직의 그물망 구조 결합을 끊어 줌으로 주름 생성의 주원인 효소로 알려져 있다⁷⁾(**Figure 9**). 그리고 주요 기능성 주름 개선제의 활성성분으로 Retinol, L-Carnitine, α -Tocopherol, Oleanolic acid, Adenosin, Tensolin-F등등이 있으며, 구조는 그림과 같다⁸⁾(**Figure 10**).

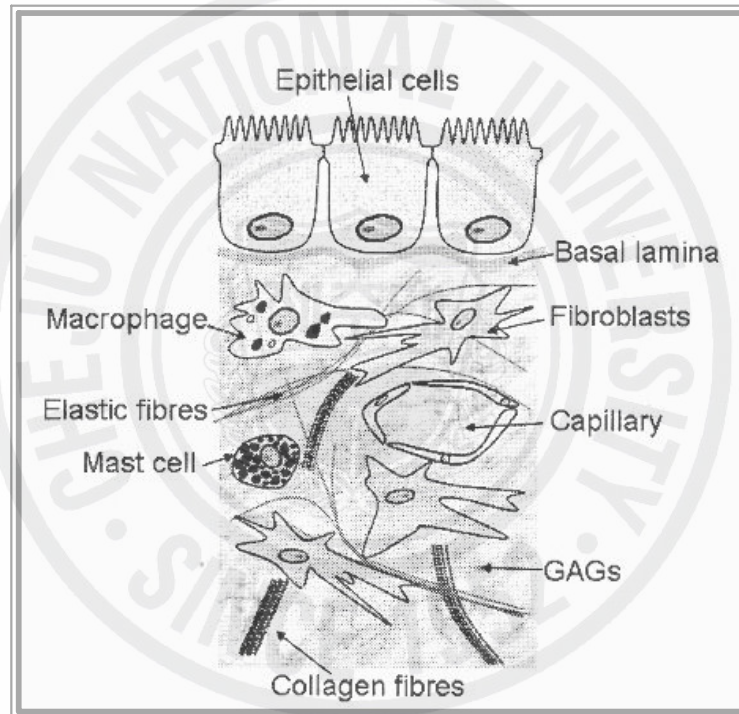


Figure 9. Structure of skin

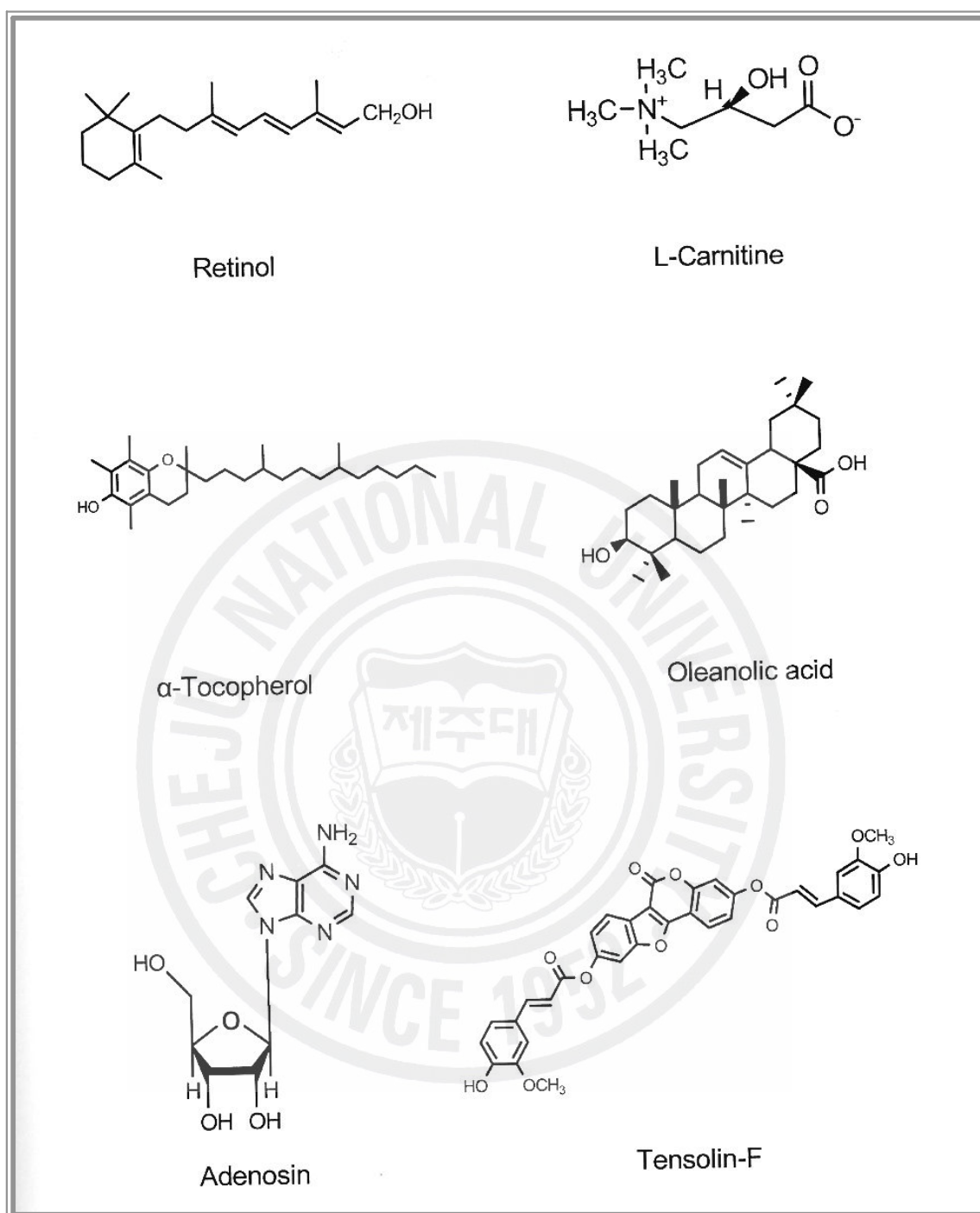


Figure 10. Chemical structures of anti-wrinkle agents

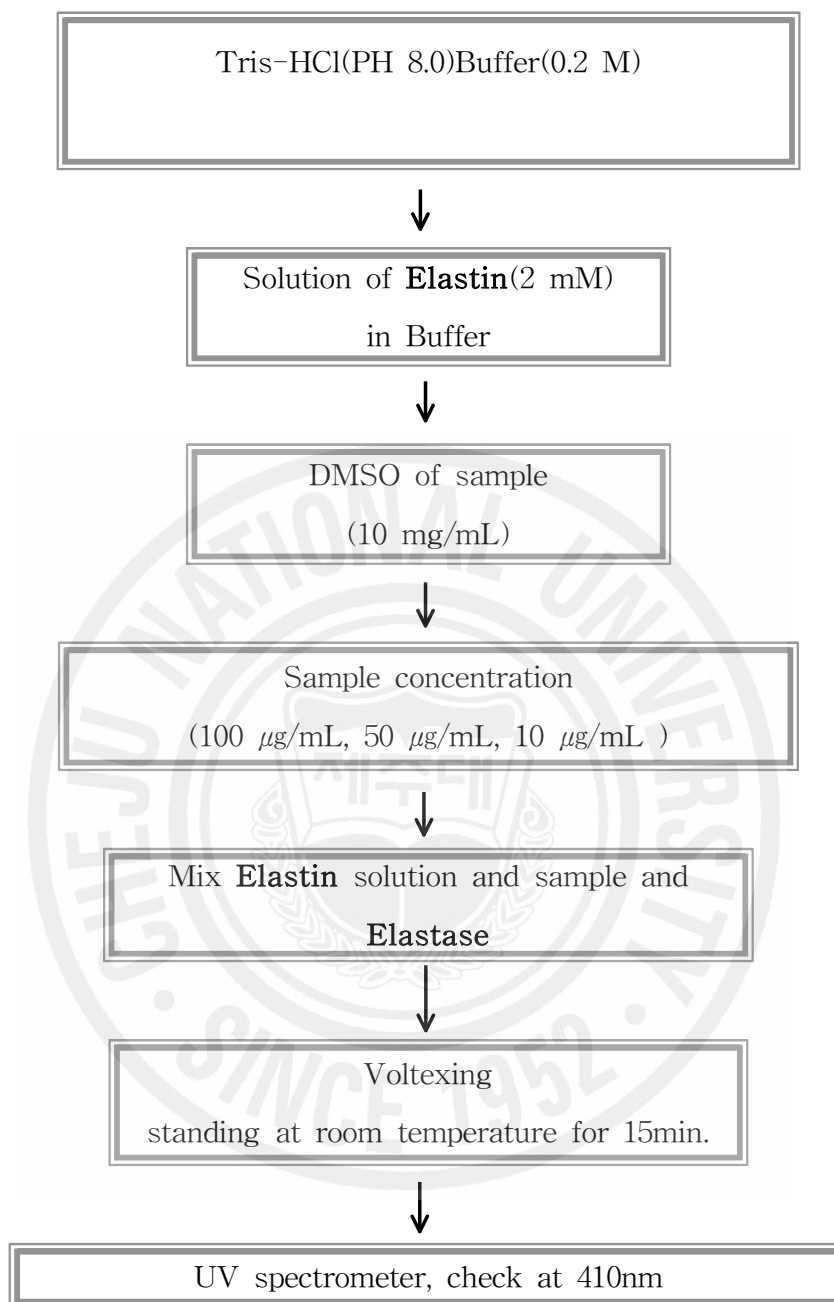


Figure 11. Measurement of **Elastase** inhibition effect

III. 결과 및 고찰

1. DPPH free radical 소거 활성에 의한 항산화 활성 측정

DPPH free radical법은 전자 공여능을 측정하는 방법으로 환원력이 클수록 강력한 항산화제가 된다는 것에 착안하여 DPPH의 환원정도를 기준으로 측정 물질의 환원력과 항산화력을 측정하게 된다. DPPH는 질소를 중심으로 그 자체가 매우 안정한 라디칼 구조의 화합물로서, 시료에 의하여 환원되어 라디칼이 소거되면 특유의 보라색이 없어지면서 최대흡수파장인 520 nm에서 보이던 흡수파장이 사라지게 된다. 항산화 효과는 DPPH 용액만 존재할 때와 DPPH 용액과 각 추출물 및 분획물이 들어 있는 반응용액의 흡광도 차이로 표현된다. 이 차이의 값이 커질수록 항산화 활성이 높다고 판단되어지며, 본 실험에서는 농도 별로 DPPH radical 소거활성을 측정하여 RC_{50} 값으로 표현하였다. RC_{50} 값이 작을수록 활성이 좋음을 의미한다.

1-1. 제주산 식물의 70% 에탄올 추출물에 대한 DPPH, Tyrosinase, Elastase 활성실험

제주산 식물들의 70% 에탄올 추출물에 대한 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 이 실험은 환원력이 클수록 강력한 항산화제라는 것을 착안하여 DPPH의 환원정도를 기준으로 측정 물질의 환원력과 항산화력을 측정하여 Inhibition값 또는 RC_{50} 으로 표현하게 된다. Inhibition값은 %저해율로 이 값이 높을수록 저해정도가 큰 것을 나타내고 RC_{50} 값은 값이 작을수록 적은 농도에서 저해율이 큰 것을 의미한다. 그 결과 대조군으로 사용된 비타민 C(Ascorbic acid)값이 (RC_{50} 3.78 $\mu\text{g/mL}$)인 것과 비교했을 때 산딸나무(잎)(RC_{50} 4.59 $\mu\text{g/mL}$), 사람주나무(잎)(RC_{50} 1.06 $\mu\text{g/mL}$) 조록(잎) (RC_{50} 11.75 $\mu\text{g/mL}$)등에서 대조군과 대등하거나 비교적 좋은 활성을 나타내는 것을 알 수가 있었다. 그리고, tyrosinase, elastase활성실험결과는 대조군과 비교한 결과 조록이 다른 식물에 비해 활성이 좋음을 알 수 있었다 (Table 1-3).

여러 물질들이 함유되어 있다고 판단되어지는 추출물인 점을 감안하였을 때 이 추출물들의 분획물 또한 좋은 활성을 지닌 물질이 포함되어 있다고 판단되어진다.

Table 1. DPPH radical scavenging effect of plant in Jeju

No.	Sample	학명	DPPH radical scavenging effect
			RC ₅₀ (μ g/mL)
1	고추나무(잎)	<i>Staphylea bumalda</i>	12.76
2	검은재나무(잎)	<i>Symploco sprunifolia</i>	26.13
3	검은재나무(가지)	<i>Symploco sprunifolia</i>	23.69
4	굴피나무(잎)	<i>Platycarya strobilacea</i>	31.88
5	바위수국(열매)	<i>Schizophragma hydrangeoides</i>	5.66
6	비쭈기나무(열매)	<i>Cleyera japonica</i>	19.67
7	사람주나무(잎)	<i>Sapium japonicum</i>	1.06
8	사람주나무(가지)	<i>Sapium japonicum</i>	16.66
9	사람주나무(열매)	<i>Sapium japonicum</i>	27.14
10	산딸나무(잎)	<i>Cornus kousa</i>	4.59
11	조록(잎)	<i>Distylium racemosum</i>	11.75
12	vit - C		3.78
132	녹차		9.90

Table 2. Tyrosinase inhibition effect of plant in Jeju

No.	Sample	학명	Tyrosinase inhibition effect
			IC ₅₀ (μ g/mL)
1	고추나무(잎)	<i>Staphylea bumalda</i>	>100
2	검은재나무(잎)	<i>Symploco sprunifolia</i>	216.36
3	검은재나무(가지)	<i>Symploco sprunifolia</i>	>100
4	굴피나무(잎)	<i>Platycarya strobilacea</i>	>100
5	바위수국(열매)	<i>Schizophragma hydrangeoides</i>	>100
6	비쭈기나무(열매)	<i>Cleyera japonica</i>	>100
7	사람주나무(잎)	<i>Sapium japonicum</i>	>100
8	사람주나무(가지)	<i>Sapium japonicum</i>	>100
9	사람주나무(열매)	<i>Sapium japonicum</i>	>100
10	산딸나무(잎)	<i>Cornus kousa</i>	>100
11	조록(잎)	<i>Distylium racemosum</i>	37.75
12	Arbutin		85.70

Table 3. Elastase inhibition effect of plant in Jeju

No.	Sample	학명	Elastase inhibition effect
			IC ₅₀ (μ g/mL)
1	고추나무(잎)	<i>Staphylea bumalda</i>	41.90
2	검은재나무(잎)	<i>Symploco sprunifolia</i>	41.90
3	검은재나무(가지)	<i>Symploco sprunifolia</i>	74.50
4	굴피나무(잎)	<i>Platycarya strobilacea</i>	>100
5	바위수국(열매)	<i>Schizophragma hydrangeoides</i>	39.27
6	비쭈기나무(열매)	<i>Cleyera japonica</i>	51.52
7	사람주나무(잎)	<i>Sapium japonicum</i>	>100
8	사람주나무(가지)	<i>Sapium japonicum</i>	58.61
9	사람주나무(열매)	<i>Sapium japonicum</i>	31.30
10	산딸나무(잎)	<i>Cornus kousa</i>	35.81
11	조록(잎)	<i>Distylium racemosum</i>	5.74
12	oleanolic acid		8.35
13	빈랑자		7.05

1-2. 조록나무 잎에서 분획분에 대한 라디칼 소거활성

70% EtOH추출물의 실험결과에서 좋은 활성효과를 보이는 제주산 식물 시료 중에 조록나무 잎의 분획물에 대한 라디칼 소거 활성을 확인해 보았다.

그 결과 각 분획층의 농도별 활성을 측정한 결과 (Figure 12)과 (Table 4)을 통하여 확인 한 결과, BuOH층과 H₂O층을 제외한 층에서 좋은 활성을 나타내었으며, 그 중에 EtOAc분획층이 가장 활성이 좋았으며, 대조군인 Vit.C, 녹차와 비슷한 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

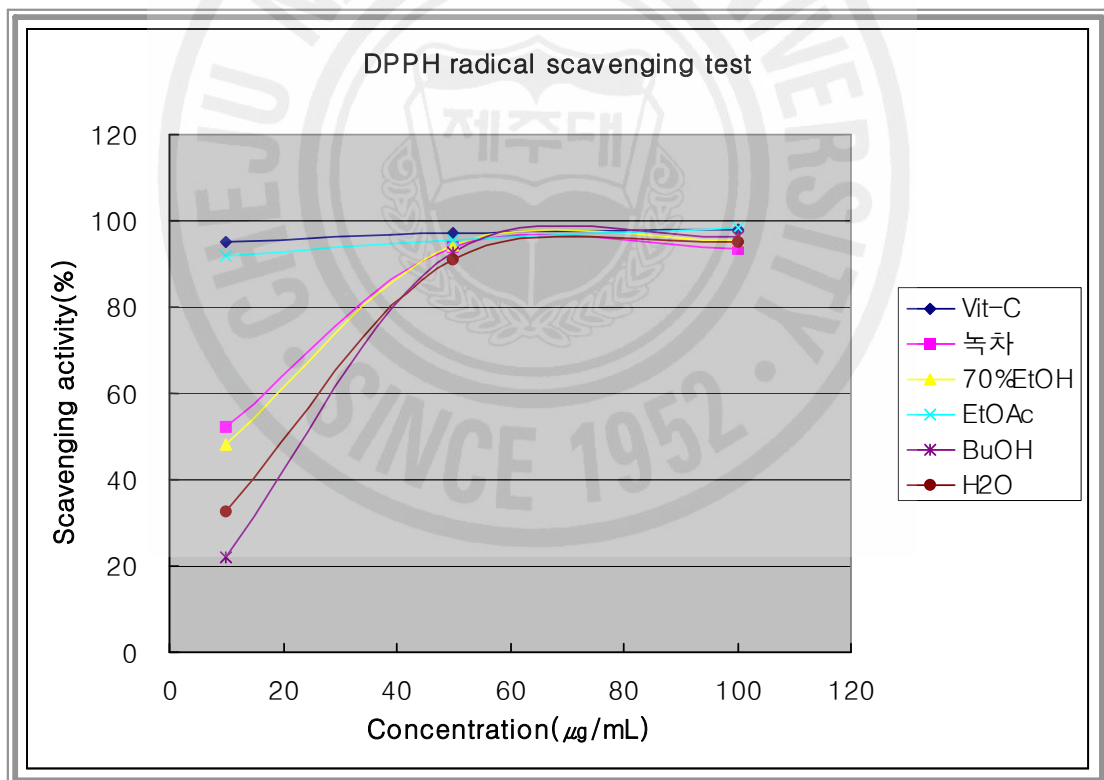
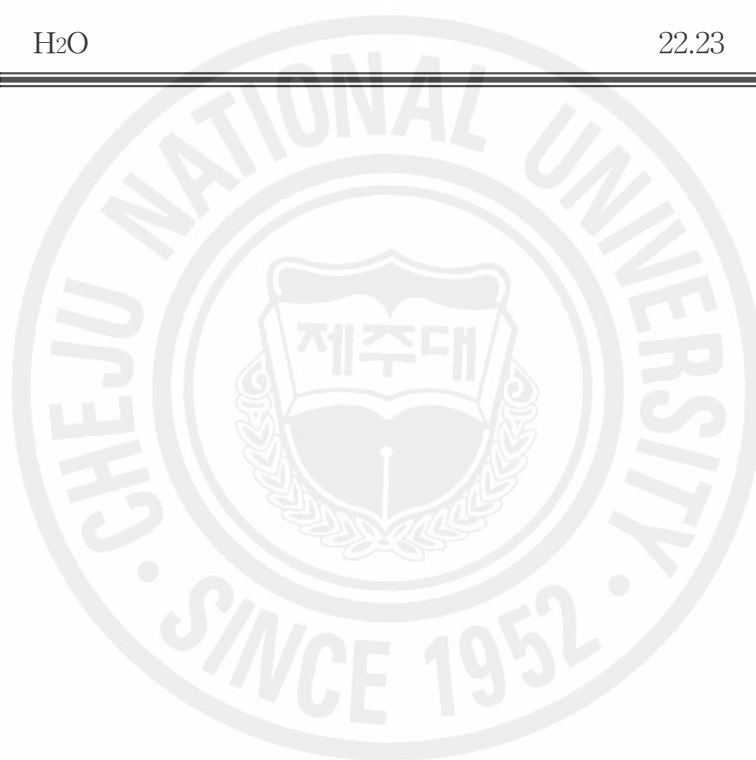


Figure 12. DPPH radical scavenging effect of several extracts

Table 4. RC₅₀($\mu\text{g}/\text{mL}$) of several extracts

No.	Sample	DPPH radical scavenging effect
		RC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	vit - C	3.78
2	녹차	9.90
3	70%EtOH	11.75
4	EtOAc	5.42
5	BuOH	25.71
6	H ₂ O	22.23



1-3. 분리된 물질에 대한 라디칼 소거 활성

조록나무 잎으로부터 분리된 afzelin의 DPPH radical 소거 정도를 비교하기 위해 대조군의 비타민 C과 비교를 하였다. 비타민 C와 비교시 활성 억제 정도가 좋지 않음을 확인 할 수 있었다.

대조군으로 사용된 비타민 C의 RC_{50} 3.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인데 반해 afzelin은 활성이 거의 없었다(Figure 13, Table 5).

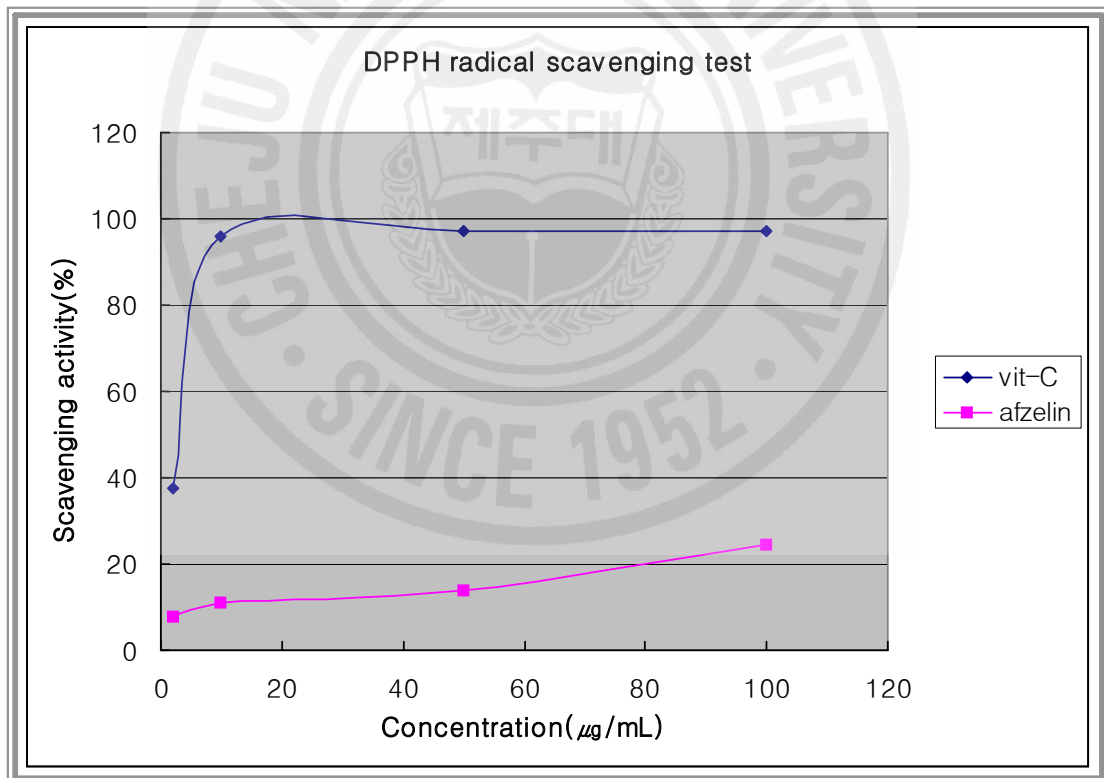


Figure 13. DPPH radical scavenging effect of afzelin

Table 5. RC₅₀($\mu\text{g}/\text{mL}$) of afzelin

No.	Sample	DPPH radical scavenging effect
		RC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	vit - C	3.78
2	Afzelin	100 >



2. Tyrosinase 활성 억제 실험

2-1. 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 Tyrosinase 활성 억제 실험

앞서서 DPPH radical scavenging effect가 좋았던 조록나무 잎에 대하여 추출물과 그 용매 분획물을 대상으로 Tyrosinase 활성 억제 실험을 하였다. 각각 300 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 활성을 본 결과 대조군인 arbutin은 좋은 활성을 보이고 있고, 추출물 및 다른 분획물에서도 좋은 활성결과를 보였다 (Figure 14, Table 6).

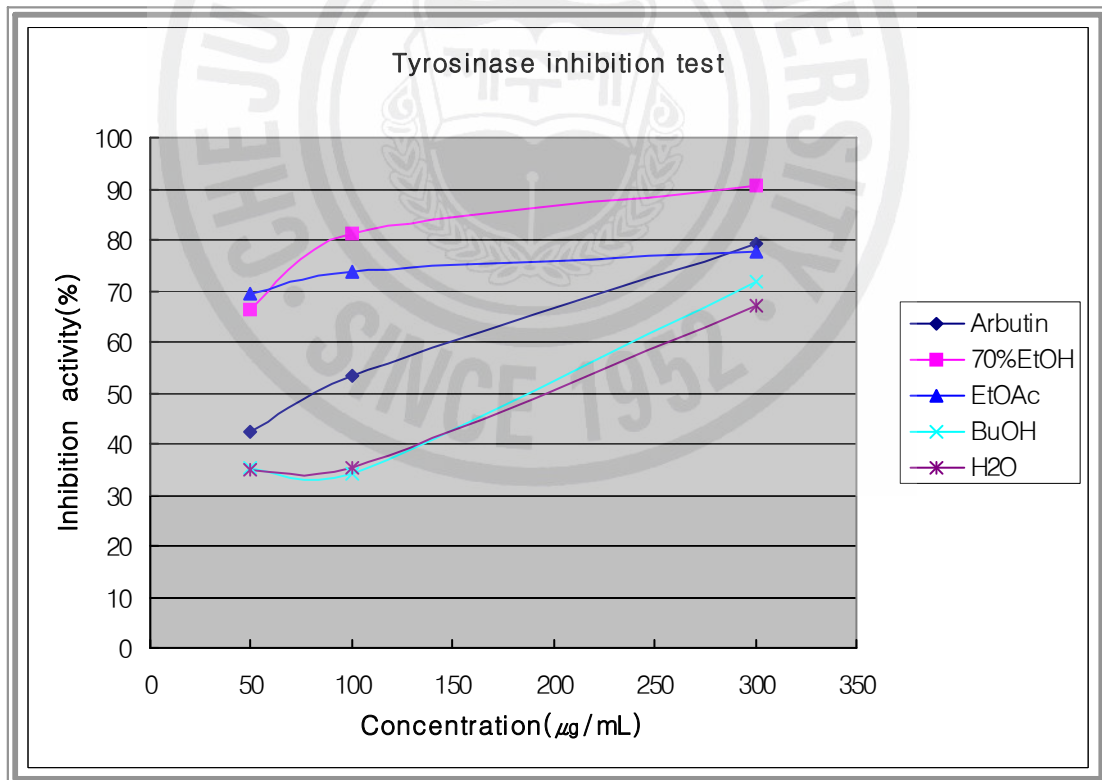
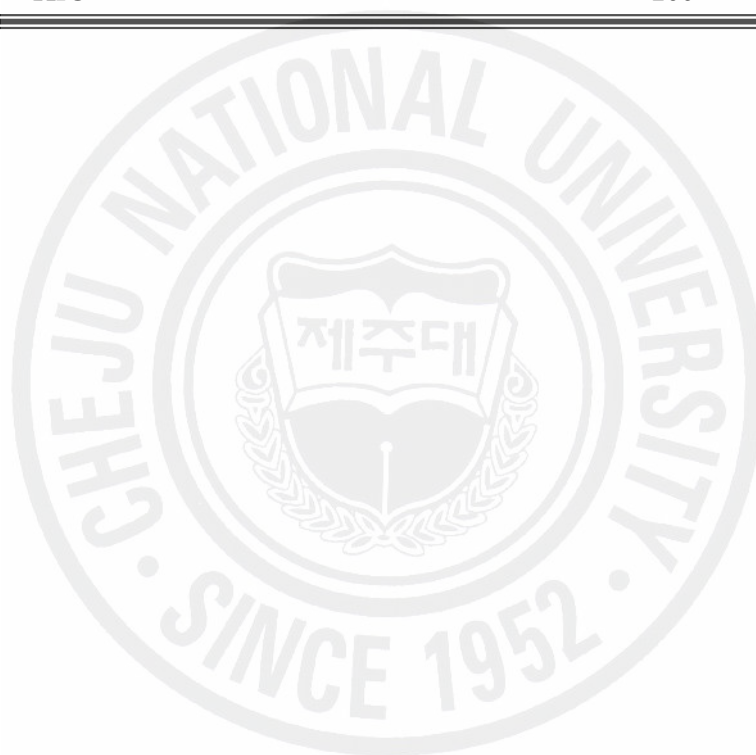


Figure 14. Inhibition of Tyrosinase activity by several extracts

Table 6. IC₅₀($\mu\text{g}/\text{mL}$) of several extracts

No.	Sample	Tyrosinase Inhibition effect
		IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	Arbutin	85.70
2	70%EtOH	37.75
3	EtOAc	36.50
4	BuOH	>100
5	H ₂ O	>100



2-2. 분리물에 대한 Tyrosinase 활성 억제 실험

조록나무 잎에서 분리된 afzelin에 대하여 tyrosinase 활성 억제 정도를 대조군인 arbutin과 비교를 하였다.

DPPH radical scavenging effect가 좋지 않았던 afzelin은 tyrosinase 활성 억제 실험에서는 좋은 활성을 보여주고 있었으며 대조군인 arbutin 과 비슷한 억제 정도가 높음을 알 수 있었다(Figure 15, Table 7).

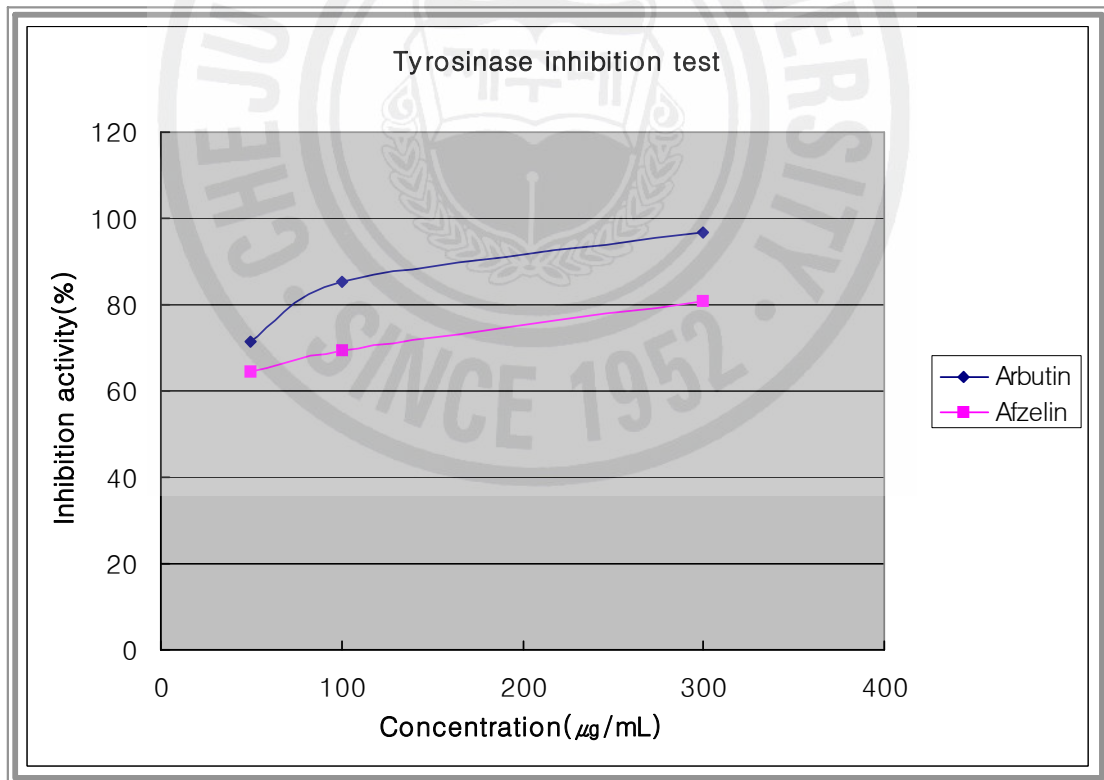


Figure 15. Inhibition of Tyrosinase activity by Afzelin

Table 7. IC₅₀($\mu\text{g}/\text{mL}$) of afzelin

No.	Sample	Tyrosinase Inhibition effect
		IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	Arbutin	35.05
2	Afzelin	38.79



3. Elastase활성억제 측정

3-1. 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 Elastase 활성 억제 실험

DPPH의 활성이 좋았던 조록나무 잎에 대해 elastase 활성을 억제하는 실험을 하였다 대조군인 oleanolic acid과 비교 하였을 때 추출물을 비롯한 대부분의 분획층에서 좋은 활성을 보였다(Figure 16, Table 8).

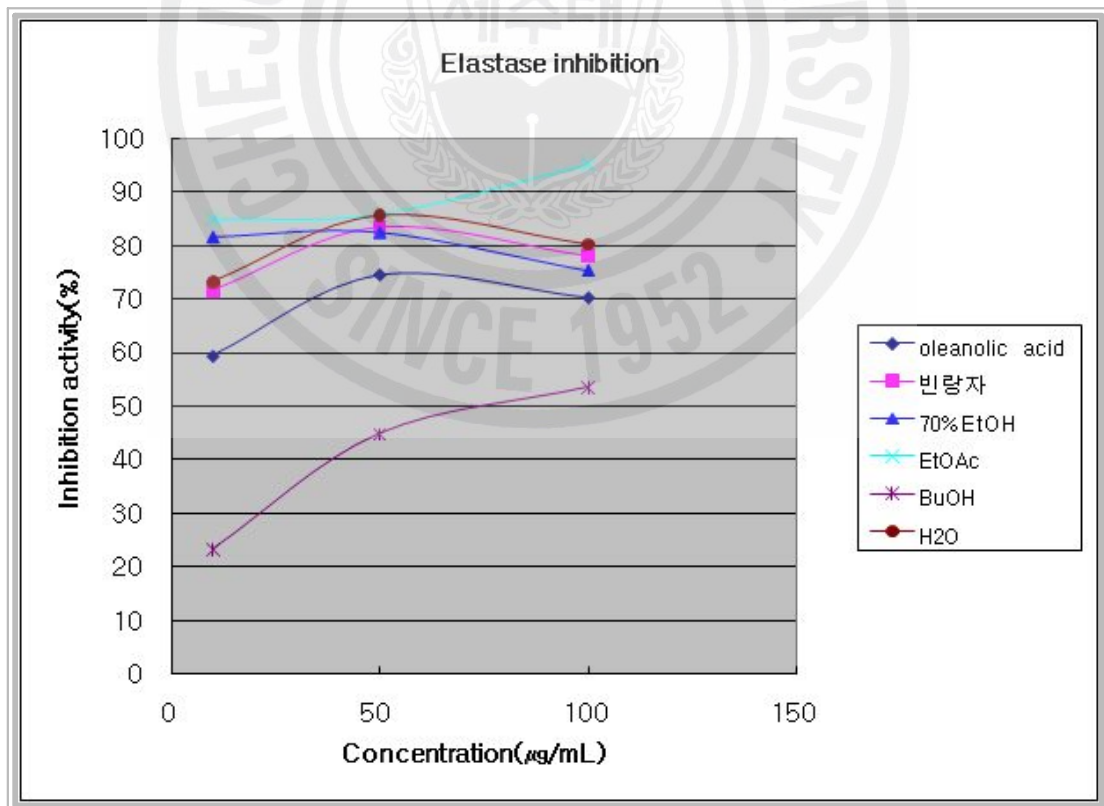


Figure 16. Inhibition of Elastase activity by several extracts

Table 8. IC₅₀($\mu\text{g}/\text{mL}$) of several extracts

No.	Sample	Elastase inhibition effect
		IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	oleanolic acid	8.35
2	빈랑자	7.05
3	70%EtOH	5.74
4	EtOAc	5.92
5	BuOH	79.83
6	H ₂ O	6.88

3-2. 분리물에 대한 **Elastase** 활성억제 실험

조록나무 잎의 EtOAc층에서부터 분리된 afzelin에 대하여 elastase 활성 억제 실험을 실시한 결과 전반적으로 활성이 거의 없음을 알 수 있었다

(Figure 17, Table 9).

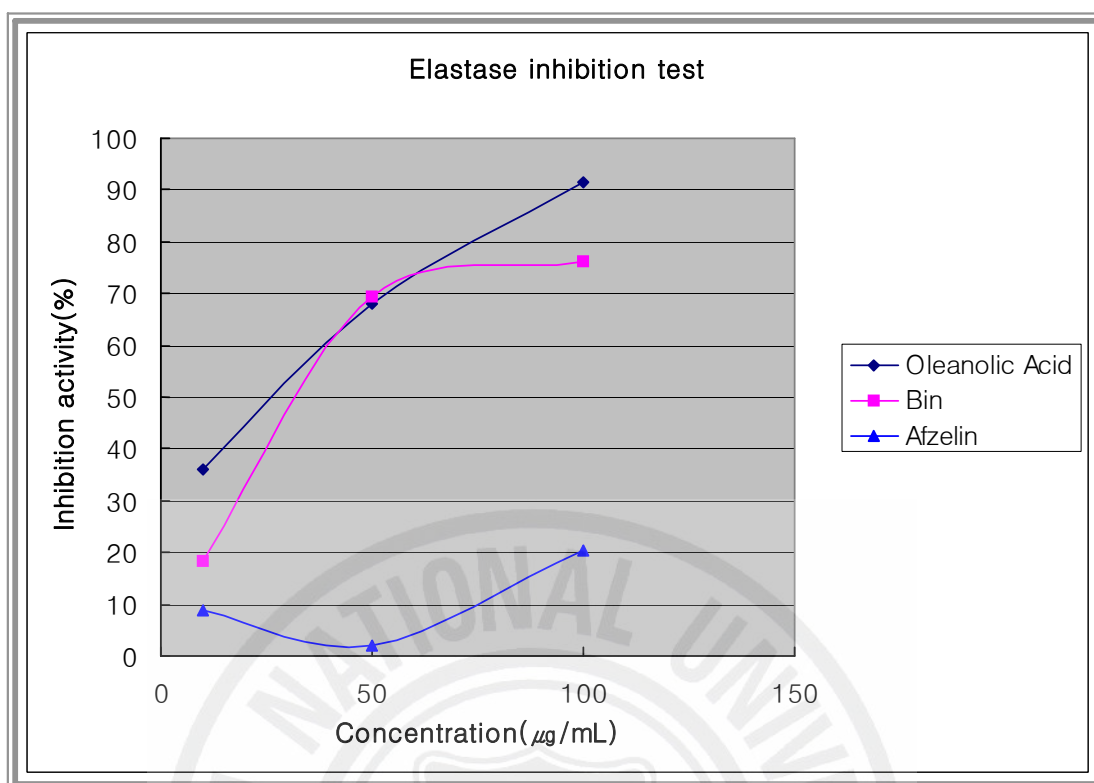


Figure 17. Inhibition of Elastase activity by afzelin

Table 9. IC₅₀(μg/mL) of Afzelin

No.	Sample	Elastase inhibition effect
		IC ₅₀ (μg/mL)
1	Oleanolic acid*	27.17
2	빈랑자*	76.13
3	Afzelin*	300 >

* in DMSO

4. 조록나무 잎의 성분 분리 및 구조 확인

4-1. Compound 1의 분리 및 구조 확인

^1H NMR 스펙트럼에서 6.20 ppm에서 나타나는 $J=1.8$ Hz의 doublet은 8번 proton과 *meta* coupling하여 나타난 것이며 6.34 ppm에서 나타나는 $J=1.8$ Hz의 doublet은 6번 proton이 8번 proton과 *meta* coupling하여 나타난 것이다. 6.92 ppm에서 나타나는 2H에 해당하는 $J=8.8$ Hz의 doublet은 H-3'와 H-5'에 기인한 것이며, 7.74 ppm에서 나타나는 2H에 해당하는 $J=8.8$ Hz의 doublet은 H-2'와 H-6'에 기인하여 나타난 것이다(Figure 18).

^{13}C NMR 스펙트럼에서 당의 각 탄소의 signal이 0.96 ppm에서 C-6", 3.36 ppm에서 C-5", 3.37 ppm에서 C-4", 3.72 ppm에서 C-3", 4.21 ppm C-2", 5.35 ppm에서 C-1"이 각각 나타나는 것으로 보아 결합된 당은 rhamnose임을 알 수 있었다(Figure 19).

이상의 데이터를 통하여 수소-수소 간, 수소-탄소 간, 수소-탄소 간의 long range coupling 등을 관찰하여 아래의 (Table 10)에 정리를 하였다.

이상의 결과와 문헌⁹⁻¹³⁾을 비교하여 compound1이 kaempferol-3-rhamno pyranoside 즉 afzelin으로 확인 되었으며, 이 화합물은 조록나무 잎에서는 처음으로 분리되었고, 구조는 (Figure 20)와 같다.

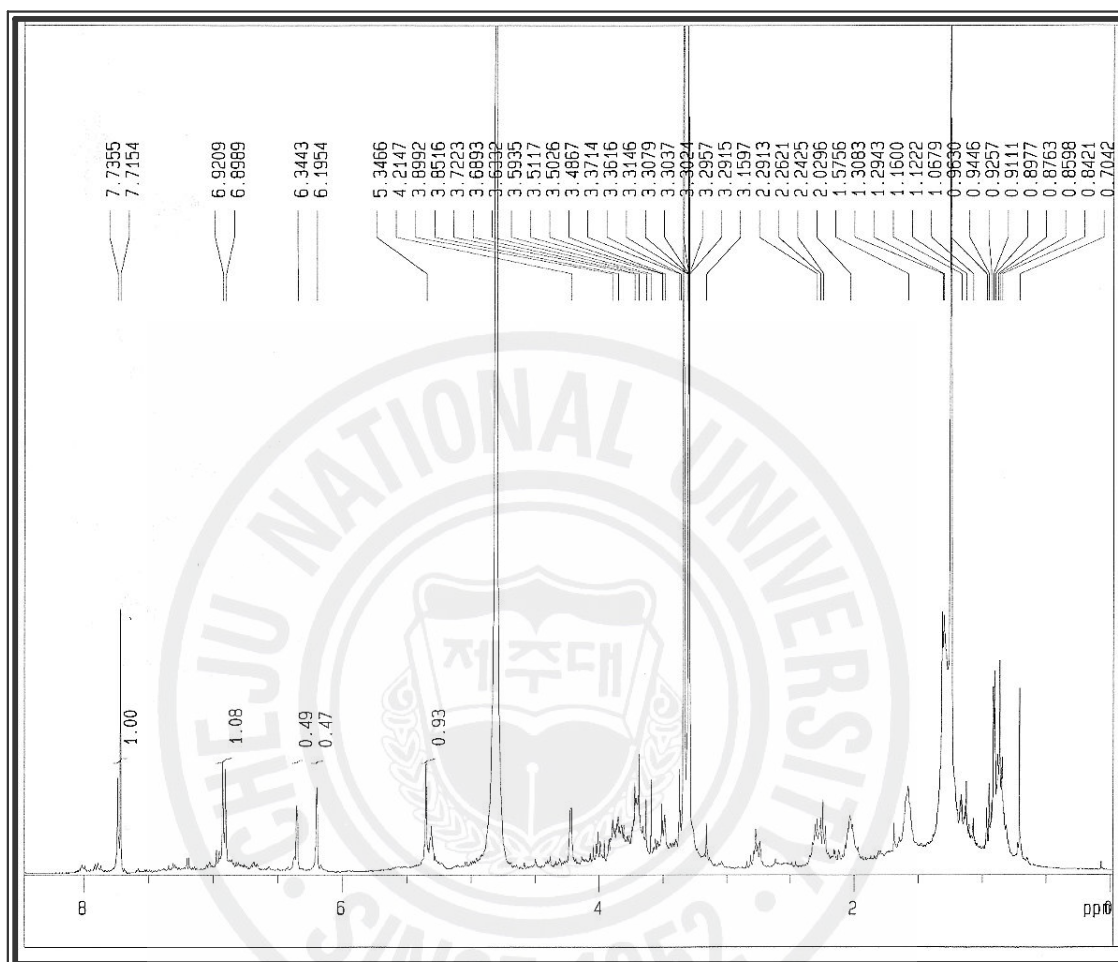


Figure 18. ^1H NMR(400MHz) of compound 1 in CD_3OD

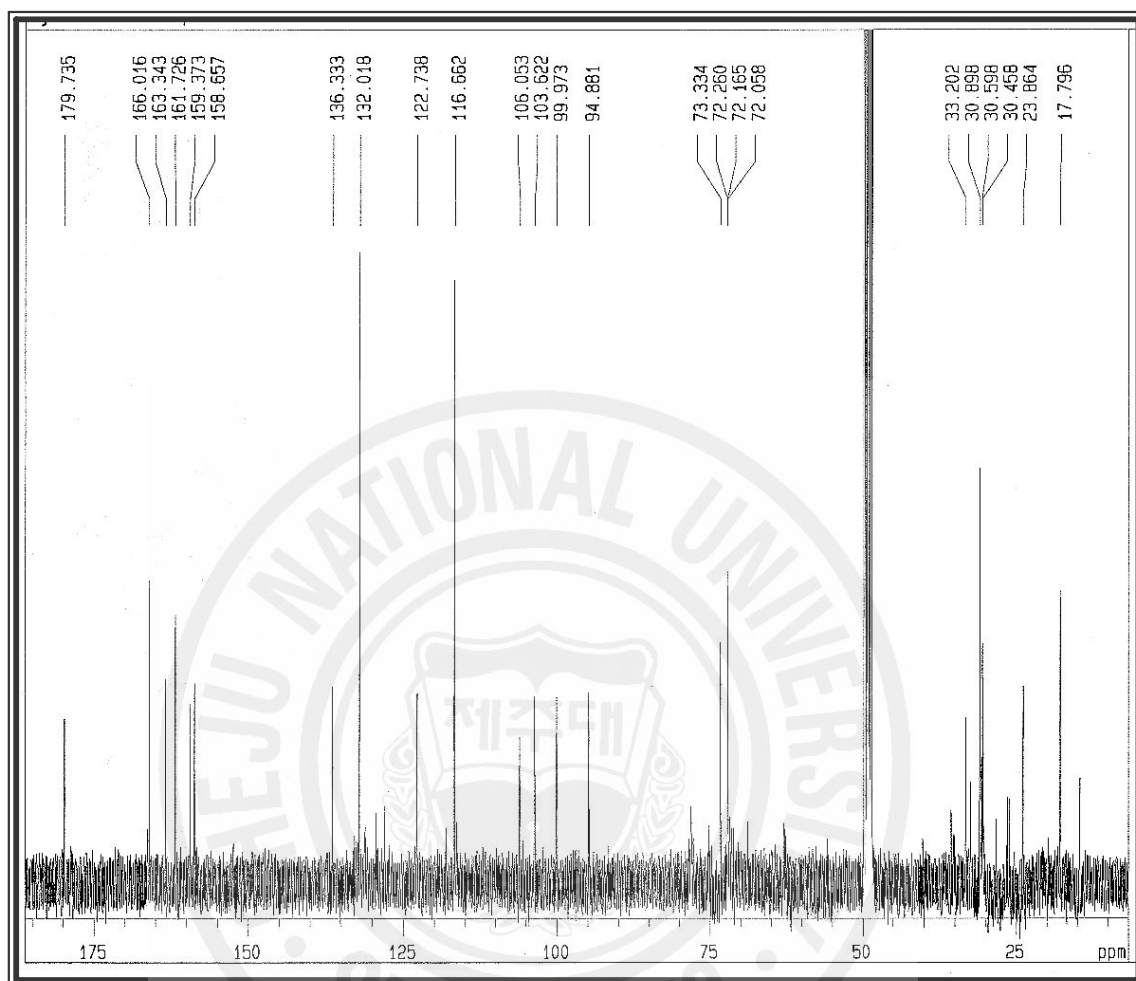
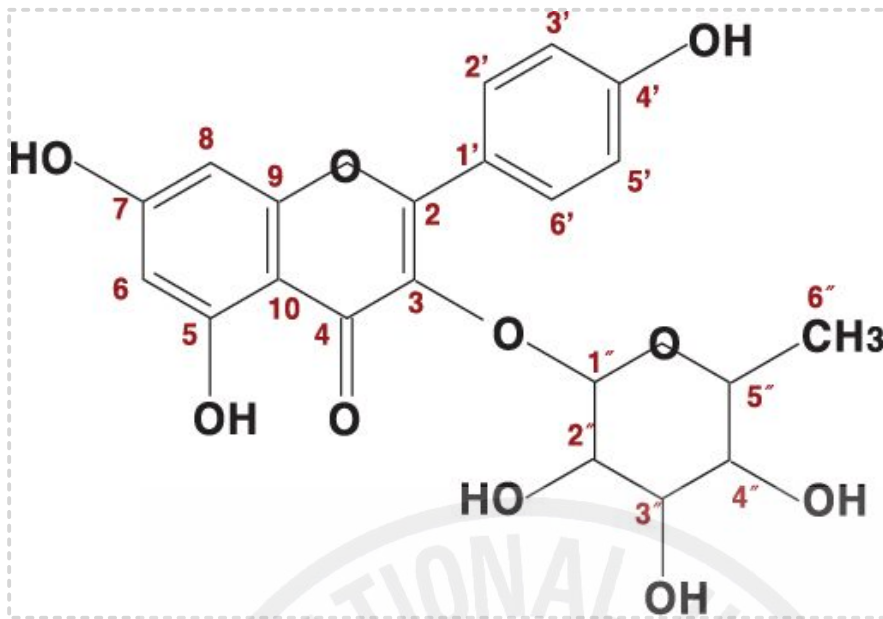


Figure 19. ^{13}C NMR(100MHz) of compound 1 in CD_3OD

Table 10. NMR data of **afzelin**

No.	Compound 1		Afzelin (Reference) ⁹⁾	
	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (int., multi., J Hz)	δ_{C} (ppm)
1				
2		158.7		159.0(s)
3		136.3		136.4(s)
4		179.7		179.9(s)
5		163.3		163.2(s)
6	6.20(1H, d , $J=1.8$)	100.0	6.22(1H, d , $J=1.8$)	99.6(d)
7		166.0		165.2(s)
8	6.34(1H, d , $J=1.8$)	94.9	6.40(1H, d , $J=1.9$)	95.1(d)
9		159.4		159.6(s)
10		106.1		106.4(s)
1'		122.7		123.2(s)
2'	7.74(1H, d , $J=8.8$)	132.0	7.78(2H, d , $J=8.5$, H-6')	132.(d)
3'	6.92(1H, d , $J=8.8$)	116.7	6.95(2H, d , $J=8.5$, H-5')	116.8(d)
4'		161.7		161.9(s)
5'	6.92(1H, d , $J=8.8$)	116.7	6.95(2H, d , $J=8.5$, H-3')	116.8(d)
6'	7.74(1H, d , $J=8.8$)	132.0	7.78(2H, d , $J=8.5$, H-2')	132(d)
1''	5.35(1H, d , $J=3.3$)	103.6	5.40(1H, d , $J=3.3$)	103.5(d)
2''	4.21(1H, dd , $J=1.8, 3.3$)	73.3	4.28(1H, dd , $J=1.7, 3.2$)	73.5(d)
3''	3.38~3.34(1H, m)	72.3	3.75(1H, dd , $J=3.2, 9.3$)	72.5(d)
4''	3.38~3.34(1H, m)	72.2	3.38~3.34(1H, m)	72.3(d)
5''	3.38~3.34(1H, m)	72.1	3.38~3.34(1H, m)	69.6(d)
6''	0.93(3H, d , $J=6.1$)	17.8	0.96(3H, d , $J=6.1$)	17.9(q)

¹H, ¹³C NMR spectra were recorded in CD₃OD solution at 400MHz and 100MHz, respectively.



kaempferol-3-rhamnopyranoside (Afzelin)

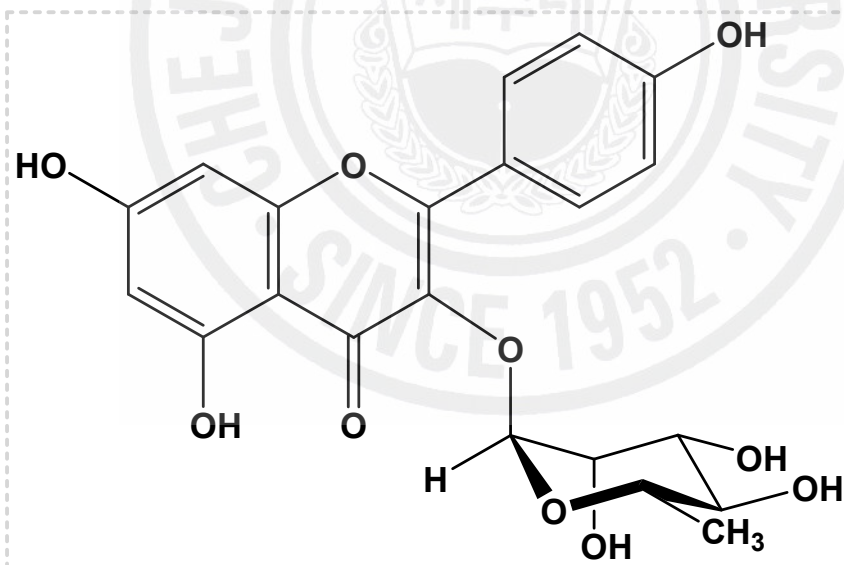


Figure 20. Chemical structure of Afzelin

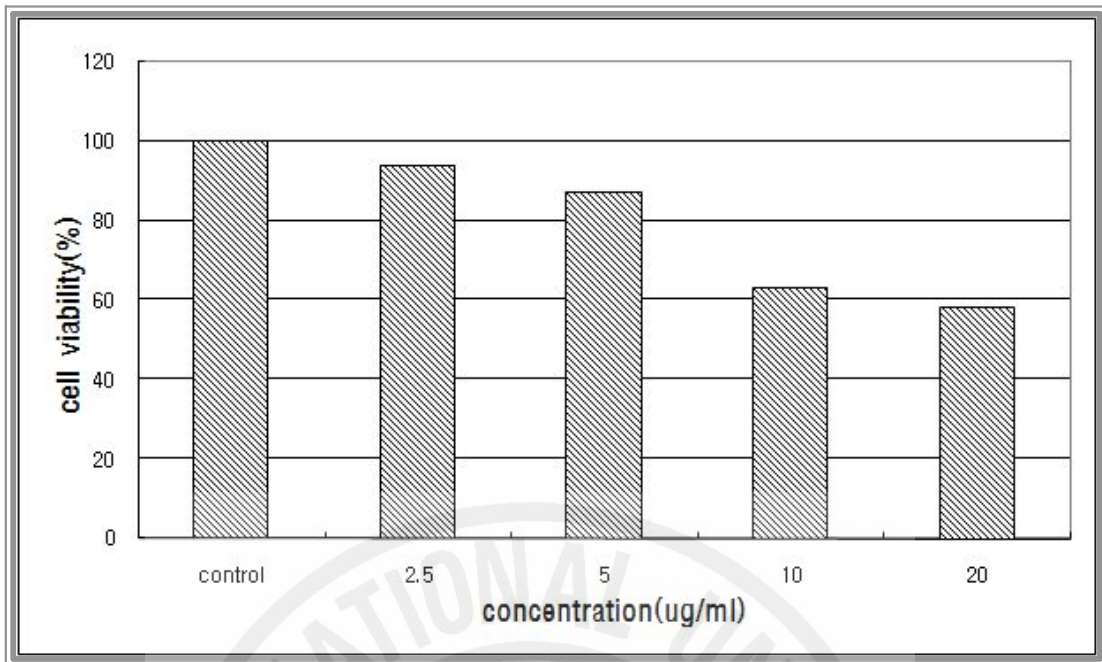


Figure 21. Cell viability of *Distylium racemosum* leaves extracts (FSfE) and α -MSH on B16-f10 melanoma cells by MTT assay

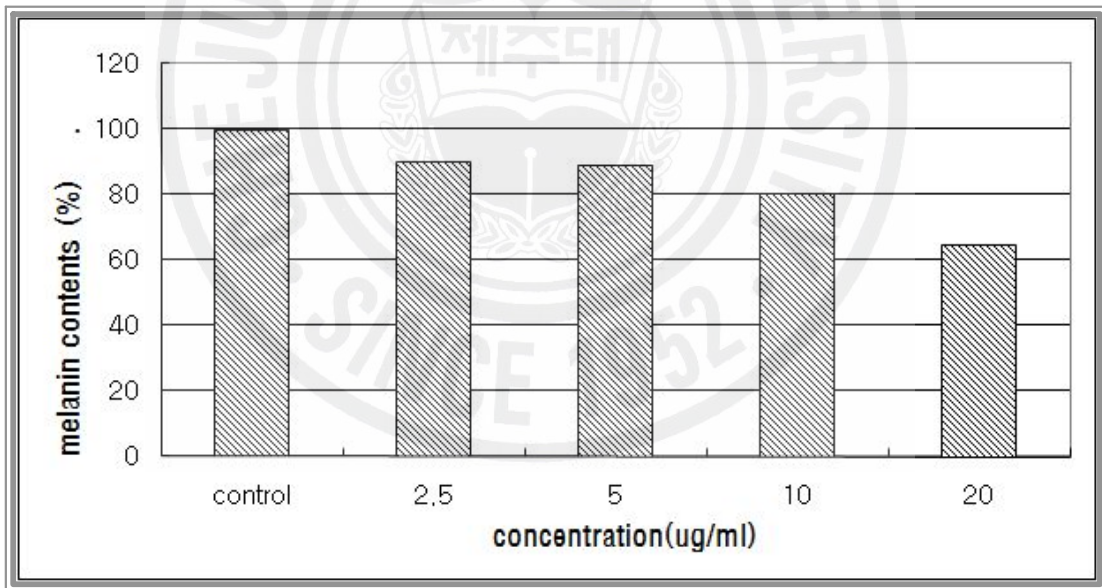


Figure 22. The inhibition effect of FSfE on melanin production in B16-f10 melanoma cells 따라서, Cell B16(F10)에서는 활성을 거의 볼 수가 없었다¹⁴⁾ (Figure 21, Figure 22).

IV. 요약 및 결론

조록나무 잎의 70% ethanol 추출물을 *n*-hexane, ethyl acetate, butanol, water로 용매분획을 하고 ethyl acetate 분획에 대해, normal silica gel chromatography를 실시하여 분리된 분획들을 NMR 기기로 확인하고 문헌들과 비교한 결과 조록나무 잎에서 afzelin을 분리하였다.

Normal silica gel chromatography를 통하여 분리된 afzelin의 DPPH radical 소거 활성실험을 하였고, RC_{50} 을 확인해 본 결과, 조록 나무 잎에서 분리된 afzelin은 $>100 \mu\text{g/mL}$ 로 대조군인 비타민 C $3.78 \mu\text{g/mL}$ 비해 소거 능력이 없음을 확인할 수 있었다. 또한 Elastase inhibition effect 실험도 대조군인 oleanolic acid $27.17 \mu\text{g/mL}$ 에 비해 거의 활성이 없는 것을 알 수 있었다.

그러나, tyrosinase inhibition effect 실험에서는 대조군인 arbutin이 $35.05 \mu\text{g/mL}$ 대해 afzelin는 $38.79 \mu\text{g/mL}$ 로 소거 능력이 비슷함을 알 수 있었다.

따라서, 본 연구의 실험결과를 통하여 제주도에서 서식하고 있는 조록나무 나무 잎에 분리된 화합물에서 활성이 좋았던 화합물을 이용하여 미백 개발 가능성을 엿볼 수 있었다.

V. 참고 문헌

- 1) <http://blog.naver.com/diluan/40006035526>
- 2) <http://cafe.naver.com/skindrs/126>
- 3) 사진 출처:<http://blog.daum.net/cleandew3679/14557942>
- 4) 사진 출처:<http://cafe.naver.com/tiger20/3530>
- 5) 문미연; "Identification of Anti-oxidant Components from *Quercus gilva*, *Cornus kousa* and *Callophyllis japonica*" 제주대학교 대학원 2008년도 석사학위청구논문
- 6) 윤진석; "손바닥 선인장 (*Opuntia ficus-indica*)의 라디칼 소거 활성, Tyrosinase억제 활성, 항알레르기 활성 검색 및 유효성분 분리" 제주대학교 대학원 2000년도 석사학위청구논문
- 7) 김대경; "제주산 들깨풀(*Mosla punctulata Nakai*)로부터 분리된 Luteolin의 구조 확인 및 생리활성에 관한 연구" 제주대학교 대학원 2008년도 석사학위청구논문
- 8) 고려경; "종가시나무, 조록나무 및 수련을 이용한 기능성 화장품 활성성분 규명" 제주대학교 대학원 2008년도 석사학위청구논문
- 9) Jung, T. Y.; Kim, M. A. and A. Daniel Jones "Antioxidative Activity of Flavonoides Isolated from Jidalrae Flowers (*Rhododendron mucronulatum* Turcz.)" *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 1996, 39(4), 320-326
- 10) Lee, J, H; Kwon, Y, S. and Kim, C, M. "Flavonoids from the Stern Bark of *Platycarya strobilacea*" *Kor. J. Pharmacogn*, 1998, 29(4), 353-356
- 11) Lee, H. T.; Park, Y. K. and Kwon, Y, H. "Flavonol Glycosides from the Wood of *Platycarya strobilacea*" *Mokchae Konghak*, 2003, 31(3)
- 12) Park, J. C; Young, H. S.; Park, H. J.; Park, S. C. " *Flavonol Glycosides from the Leaves of Machilus thunbergii*" *Kor. J. Pharmacogn*, 1990, 21(1), 60-63

- 13) Park , J. C; Hur, J. M.; Park, H. J.; Park, S. J.; Lee, J. H.; Sung, N. S.; Choi, M. R.; Song, S. H.; Kim, M. S.; Choi, J. W. "The Effect of Houttuynia cordata on the Haptic Bromobenzene Metabolizing Enzyme System in Rats and Isolation of Phenolic Compounds" *Kor. J. Pharmacogn*, 2000, 31(2), 228-234
- 14) Lee, J. N; Park, J. H., Kim, S. W.; Yoo, Y. K.; Lee, G. T.; Lee, K. K. "A Study on the Whitening Effect of the Oriental Medicinal Herd Forsythia suspensa Fruit as a Cosmetic Ingredient" *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.*, 2007, 33(2), 79-86



Abstract

For the development of functional cosmetic additives, we have screened plants in Jeju island on DPPH inhibition activities, **tyrosinase** Inhibition test and **elastase** inhibition test. *Distylium racemosum* leaves distributed in Jeju has shown inhibition activities on free radical scavenging test, **tyrosinase** Inhibition test and **elastase** inhibition test.

Dried sample was extracted with 70% ethanol and crud extracts were subjected to solvent fractionations. The active component from the selected fraction was obtained by normal silica gel chromatography.

The identification of the isolated compound was made extensive 1D-NMR (¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT) experiments. Isolated compound was identified as afzelin.

We have examined the isolated compound for the activity on DPPH inhibition activities and **tyrosinase** inhibition test as well as **elastase** inhibition activitie.

As a result, IC₅₀ of **tyrosinase** inhibition test for afzelin was similar to that of arbutin.

감사의 글

대학원을 입학하기 위해 입학시험을 준비하던 겨울이, 엇그제 같은데 벌써 2년 반이라는 시간이 흘러 이렇게 논문을 완성하게 되었습니다. 그 동안 대학원 생활을 잘 할 수 있도록 지도해 주시고, 미흡한 논문을 세심하게 다듬어 주신 이남호 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 논문심사를 해주신 강창희 교수님과 김원형 교수님 그리고 입학때부터 항상 따뜻하게 지켜봐 주신 정덕상 교수님, 김덕수 교수님, 변종철 교수님, 이선주 교수님께도 감사 드립니다.

또한, 입학때부터 졸업까지 모든 대학원 생활을 함께 했던 은경, 화숙, 한나 그리고 승아, 현주, 장환오빠, 성문, 정민, 정효, 지현, 현옥 선생님, 정미언니, 태현 선생님, 상숙 선생님, 미연씨, 려경씨, 주희씨, 유기방 식구들 모든 분들께 고마움을 드립니다.

마지막으로 저에게 항상 용기를 주는 윤희 언니, 은형 그리고 가족들에게 감사의 말씀 전하고 싶습니다.

2008년 8월

이 미 정