



### 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



**저작자표시.** 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



**비영리.** 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



**변경금지.** 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

**저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.**

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

차풀(*Cassia mimosoides* var. *nomame*)로부터  
Luteolin의 분리, 동정 및 활성분석



濟州大學校 大學院

化學科

金京範

2006年 12月

차풀(*Cassia mimosoides* var. *nomame*)로부터  
Luteolin의 분리, 동정 및 활성분석

指導教授 李 璿 柱


金 京 範

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함


2006年 12月

金京範의 理學 碩士學位 論文을 認准함


審査委員長

鄭 真 高 

委 員

金 德 珠 

委 員

이 선 주 

濟州大學校 大學院

2006年 12月

Identification and Characterization of Luteolin  
isolated from *Cassia mimosoides* var. *nomame*

Kim, Gyoung Bum

(Supervised by Professor Sunjoo Lee)

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

2006. 12.

This thesis has been examined and approved.

Jung, Duk Sang  
Kim, Duk Soo  
Sunjoo Lee

Dec. 30, 2006

Date

Department of Chemistry  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

## ABSTRACT

For the purpose of development of novel cosmeceutical materials from native Jeju plants, this study was carried out to investigate the antioxidative activities and Elastase inhibition by the methanol extract and following fractions of *Cassia mimosoides* var. *nomame*. An antioxidative activity of fractions of *Cassia mimosoides* var. *nomame* were examined by measuring the radical scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical. An Elastase inhibition test, also was performed to isolate the wrinkle-reducing agents.

Ethyl Acetate fraction of crude methanol extract of *Cassia mimosoides* var. *nomame* showed good activity among 4 other organic fractions. The active substance in ethyl acetate fraction was successively isolated with Celite and Sephadex™ LH-20 column chromatography. The purified active substance was identified as Luteolin by <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR and 2D NMR.

This compound exhibited DPPH radical scavenging activity with the RC<sub>50</sub> value of 3.86μg/mL and Elastase inhibition with the IC<sub>50</sub> value of 53.98μg/mL.

Considering antioxidative activity on DPPH assay and Elastase inhibition test, Luteolin isolated from *Cassia mimosoides* var. *nomame* showed a possibility to be used as a new material for functional cosmeceutical.

# 목 차

ABSTRACT .....	i
List of Figures .....	iv
List of Tables .....	v
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	7
1. 재료 .....	7
2. 시약 및 기기 .....	7
3. 실험방법 .....	8
3-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리 .....	8
3-2. DPPH free radical 소거활성에 의한 항산화 활성 측정 .....	10
3-3. Elastase 활성저해 측정 .....	10
3-4. Tyrosinase 활성저해 측정 .....	11
III. 실험결과 및 고찰 .....	12
1. DPPH free radical 소거활성에 의한 항산화 활성 측정 .....	12
2. Elastase 활성저해 측정 .....	13
3. Tyrosinase 활성저해 측정 .....	14
4. Luteolin의 분리 및 구조 확인 .....	15

IV. 결 론 ..... 24

V. 참고문헌 ..... 25



## List of Figures

Figure 1 . The principle of Skin Whitening .....	4
Figure 2 . Picture of <i>Cassia mimosoides</i> var. <i>nomame</i> .....	6
Figure 3 . Isolation scheme of <i>Cassia mimosoides</i> var. <i>nomame</i> .....	9
Figure 4 . DPPH free radical scavenging effect of Luteolin .....	12
Figure 5 . Inhibition of Elastase activity by Luteolin .....	13
Figure 6 . Inhibition of Tyrosinase activity by Luteolin .....	14
Figure 7 . Chemical structure of Luteolin .....	16
Figure 8 . <sup>1</sup> H-NMR spectrum of Luteolin .....	17
Figure 9 . <sup>1</sup> H-NMR spectrum of Luteolin(expanded) .....	18
Figure 10. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of Luteolin .....	19
Figure 11. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of Luteolin(expanded) .....	20
Figure 12. <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spectrum of Luteolin .....	21
Figure 13. HMQC spectrum of Luteolin .....	22
Figure 14. HMBC spectrum of Luteolin .....	23



## List of Tables

Table 1. 화장품 산업의 주요 연구 분야 ..... 3



## I. 서론

피부는 신체의 3 ~ 5 kg을 차지하는 기관으로서 생물학적 기능은 물론 인간의 외모, 사회적 접촉, 자기 이미지에 대해 상당한 영향력을 주어서 결과적으로 자신의 행복에도 영향을 미친다. 오늘날에 있어서 고령화 인구의 증가와 노출된 피부에 대한 스트레스는 피부 관리에 대한 욕구를 증가시키는 큰 원인이 된다.

최근 자연주의와 자연성분을 선호하며 다양한 한방 및 천연원료로 한 화장품의 개발이 잇따르고 있다. 이러한 한방이나 천연물을 사용한 화장품은 장기간 사용하여도 부작용이 없고 그 효과가 지속적이며, 전반적으로 피부를 좋게 한다는 것이 가장 큰 장점이라고 할 수 있다. <sup>1)</sup>

화장품의 어원은 그리스어의 cosmetics로 ‘잘 정리하다’, ‘잘 감싼다’ 라는 의미를 갖으며, 조화를 뜻하는 cosmos에서 유래했다. 우리나라 화장품법 제1장 총칙 제2조에 의하면 “화장품”이라 함은 인체를 청결·미화하여, 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키거나 피부·모발의 건강을 유지 또는 증진하기 위하여 인체에 사용되는 물품으로서 인체에 대한 작용이 경미한 것이라고 되어 있다. 화장품의 종류와 기능이 다양해지고 있는데 화장품은 근본적으로 아름답게 하기 위하여 사용되나 단순한 미의 추구뿐 아니라 우리의 정신적 및 육체적 건강, 그리고 대인관계에도 영향을 준다. <sup>2)</sup>

최근 화장품 기술은 치유의 개념이 도입된 cosmeceutical의 개발에 집중되고 있다. Cosmeceutical은 cosmetics와 pharmaceutical의 합성어로서, 크게 기능성을 갖는 활성성분의 연구, 효능성분의 경피 흡수 방법과 이를 포함한 제형의 연구 및 피부생리에 대한 기초연구에 집중되고 있다. <sup>3)</sup>

최근 화장품에서는 기능성이 특히 강조되고 있다. 피부과학의 발전과 더불어 미백, 주름방지, 육모 등의 피부 및 모발에 대한 화장품의 효과 향상에 대한 관심이 높아지고 있다. 현재 널리 연구되고 있는 화장품 기술 분야는 Table 1과 같이 요약할 수 있다. 표에 요약되어 있는 화장품 산업의 주요 연구 현황에서 알 수 있듯이, 주요 연구는 피부 생리학의 연구에 바탕을 두어 신규 물질의 탐색이나 피부 노화를 억제할 수 있는 방법의 발견과 천연물 추출, 신규 원료 합성 등의 방법을 적용하여 새로운 원료의 개발에 주력하고 있다. 특히 노화 지연에 대한 연구는 화장품 뿐만 아니라 의약품 산업에서도 끊임없이 연구되고 있으며, 이러한 연구는 앞으로도 계속 진행될 전망이다.<sup>4)</sup>

인간을 비롯한 모든 호기성 생물체들은 공기 중의 산소를 이용하여 생명 유지에 필요한 에너지를 생성하는 과정에서 활성 산소종 ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$  등)이 발생하며, 이들에 대한 자기 방어 기구를 가지고 있다. 그러나 생체 방어 기구에 이상이 초래되거나 각종 물리, 화학적 요인들에 의해 활성 산소종의 생성이 증가 되면 산화적 손상을 입게 되어 직접 또는 간접적으로 생체에 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>5)</sup>

활성 산소종은 산화 효소, 식세포 및 금속 이온 (철, 구리 등) 에 의한 자동 산화 반응과 catecholamine의 산화 반응 등에 의한 내인적 생성 요인과 햇빛, 담배, 매연, 약물, 방사선 등의 외인적 요인에 의해 생성되어 단백질, 핵산, 효소 및 면역계를 손상하여 각종 질환을 야기한다. 특히 생체막의 구성 성분인 불포화 지방산을 공격하여 생성되는 과산화 지질의 축적은 생체 기능의 저하나 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>6, 7)</sup>

따라서 활성 산소를 방어하는 항산화 물질은 이러한 질병 치료의 가능성 때문에 주목 받고 있으며, 그 중 천연물에서 추출한 자연 항산화제에 관한 연구가 활발하다.

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

Table 1. 화장품 산업의 주요 연구 분야

Elastase는 진피 내 피부탄력을 유지하는 데 중요한 기질 단백질인 Elastin을 분해하는 효소이다. 또한 Elastase는 다른 중요한 기질 단백질인 콜라겐을 분해

할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다. 따라서 Elastase 저해제는 피부 주름을 개선하는 작용을 나타내며,<sup>8)</sup> ursolic acid 등이 Elastase 저해제로 이용되고 있다.<sup>9)</sup>

Melanin은 동물, 식물 및 미생물에 널리 존재하는 페놀류의 고분자 물질로 검은 색소와 단백질로 이루어져 있다. 자외선, 건조, 극한 온도 등에 대한 생존능력을 높여주고, 커피, 차, 담배 등의 질을 향상시키나,<sup>10, 11)</sup> 과도한 Melanin 합성은 인체에 기미, 주근깨, 검버섯을 형성하고 피부 노화를 촉진하며 피부암 유발에 관여하는 것으로 알려져 왔다. 식품에서는 채소, 과일, 생선 등의 갈변화 현상으로 품질을 저하시키는 문제점이 있다.<sup>12)</sup>

Melanin은 생물에 따라 다양한 종류가 알려져 있으며, Tyrosinase에 의해 생합성된다. Tyrosinase는 Tyrosine을 dihydroxy-L-phenylalanine(L-DOPA)로, L-DOPA를 DOPAquinone으로 변환시키는 작용을 한다.<sup>13, 14)</sup> 현재까지 알려진 Tyrosinase 저해제로 hydroquinone, 4-hydroxyanisole, ascorbic acid 유도체, kojic acid, azelaic acid, corticosteroids, retinoids, arbutin 등이 있으나, 안전성과 경제성 등의 문제점으로 사용에 있어서 어려움이 있다.<sup>15, 16)</sup>

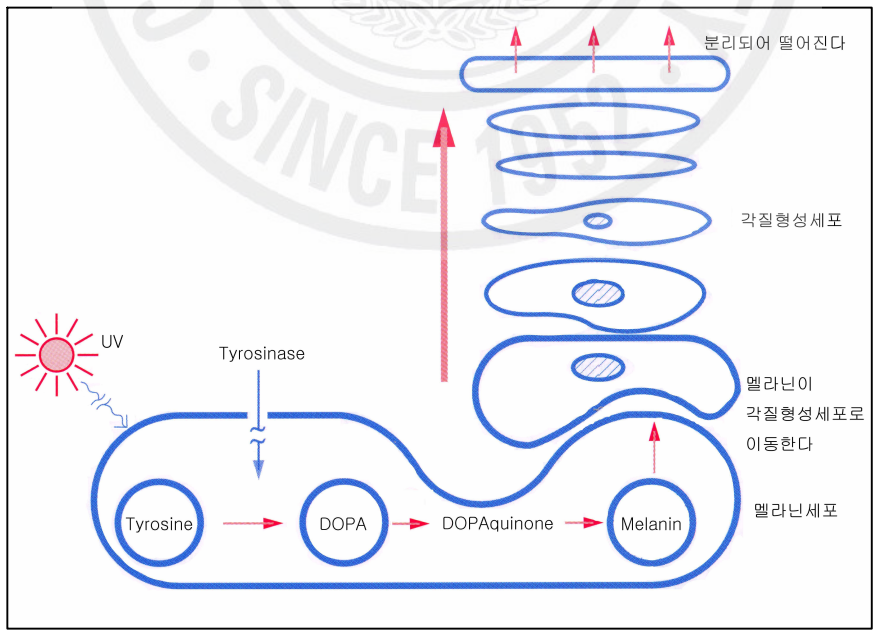


Figure 1. The principle of Skin Whitening

차풀(*Cassia mimosoides* var. *nomame*)은 콩과(Leguminosae) 식물로 전초를 건조한 것을 산편두(山扁豆)라고 한다. 냇가 근처의 양지에서 자라는 일년초로써 높이 30~60cm이고, 흔히 가지가 갈라지며 줄기 안으로 꼬부라진 짧은 털이 있다. 잎은 호생(互生)하고 우수우상복엽(偶數羽狀複葉)으로서 엽병(葉柄)이 있으며 길이 3~8cm이다. 소엽(小葉)은 30~70개이고 선상 타원형이며 가장 자리에 털이 약간 있고, 첫째 소엽(小葉)바로 밑에 선(腺)이 있다. 탁엽(托葉)은 침형 또는 선상 피침형이며 끝이 뾰족하고 길이 밑 부분에 맥(脈)이 있다. 꽃은 7~8월에 피며 황색이고 엽액(葉腋)에 1~2개씩 달리며 소화경(小花梗) 끝에 소포(小苞)가 있다. 10월에 열매가 익으며 협과(莢果)편평한 타원형이고 곁에 털이 있으며 2개로 갈라지고 종자는 흑색이며 윤채(潤彩)가 있고 편평하지만 약간 네모가 진다. 전초 및 종자에 aloe-emodin을 함유하여, 종자에 myristic acid, palmitic acid,  $\beta$ -sitosterol을 함유한다. 산편두의 물 추출액은 대장(大腸)의 운동을 원활히 하여 배변이 잘되도록 한다. 식물체를 말려 차(茶)의 대용으로 사용하므로 차풀이라 한다. <sup>17,18)</sup>

본 연구에서는 천연의 차풀로부터 항산화, 미백, 주름개선 기능이 있는 물질을 동정하기 위하여 단일물질을 분리하고 생리활성 실험을 통해 기능성 화장품 신소재로서의 가능성을 탐색하였다.



Figure 2. Picture of *Cassia mimosoides* var. *nomame*

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

본 연구에 사용되는 차풀은 2004년도 4월경 제주대학교 부근 계곡에서 채집하여, 실온에서 자연 건조시킨 후 완전히 마른 전초를 분쇄하여 사용하였다.

### 2. 시약 및 기기

실험에서 시료의 추출 및 용매분획에 사용된 용매들은 Merck 社 및 Junsei 社의 제품을 사용하였다. Sephadex column chromatography에는 Sephadex<sup>TM</sup> LH-20 (Amersham Biosciences)을 사용하였고, 분리 과정에서 사용된 TLC(Thin-Layer Chromatography)는 precoated silica gel aluminium sheet(Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 2.0mm, Merck)를 사용하였다. TLC상에서 분리된 물질들을 확인하기 위하여 UV lamp를 사용하거나 TLC plate를 visualizing agent에 침적시킨 후 heat gun을 이용하여 건조시켰다.

Visualizing agent로는 3% KMnO<sub>4</sub>, 20% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 0.25% NaOH를 혼합한 수용액을 사용하였다. 구조분석에 이용되는 NMR(Nuclear Magnetic Resonance)은 JNM-LA 400 (FT-NMR system, JEOL)을 이용하였다. NMR측정시 용매로는 CD<sub>3</sub>OD와 CDCl<sub>3</sub>, DMSO-d<sub>6</sub>가 사용되었다.

활성실험에 사용된 시약은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, SIGMA 社), Elastin(N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide, SIGMA 社), Elastase(pancreatic from porcine pancreas, SIGMA 社), L-Tyrosine(L-3[4-Hydroxyphenyl]alanine, SIGMA 社), Tyrosinase mushroom(5370 Unit/mg solid , SIGMA 社)가 사용되었다.



### 3. 실험방법

#### 3-1. 시료의 추출 및 유효성분 분리

##### 3-1-1. 차풀의 methanol 추출 및 용매분획

건조된 차풀 2127.41g을 80% methanol 11L에 침적하고, 실온에서 1개월 동안 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만을 취하였다. 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일하게 2회 반복 실시하고 여액을 감압 농축하여 80% methanol 추출물 250.94g을 얻었다.

이 80% methanol 추출물 중 40g을 10g씩 4회에 걸쳐 20% methanol 1L에 현탁하고 separate funnel에서 *n*-hexane과 ethyl acetate, *n*-butanol을 사용하여 순차적으로 용매 분획하여 *n*-hexane 층, ethyl acetate 층, *n*-butanol 층 및 20% methanol 층을 얻었다.

##### 3-1-2. Celite column chromatography에 의한 분리과정

앞에서 얻은 4개의 분획층 중, 활성이 괜찮은 ethyl acetate 분획층을 Celite를 충전한 glass column을 이용하여 분리하였다. 용출용매는 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol을 사용하여 순차적으로 용매 분획하여 *n*-hexane 층, chloroform 층, ethyl acetate 층, methanol 층을 얻었다.

##### 3-1-3. Sephadex column chromatography에 의한 분리과정

Celite에서 얻어진 4개의 분획들 중에서 ethyl acetate 분획층을 분리하기 위하여 glass column에 Sephadex™ LH-20을 충전시킨다. Ethyl Acetate 분획을 소량의 methanol로 녹인 후 충전된 column에 전개용매 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH=4/1 to 1/1)를 사용하여 gradient로 전개시키고, 분취용액을 감압 농축하여 10개의 분획을 얻었다.

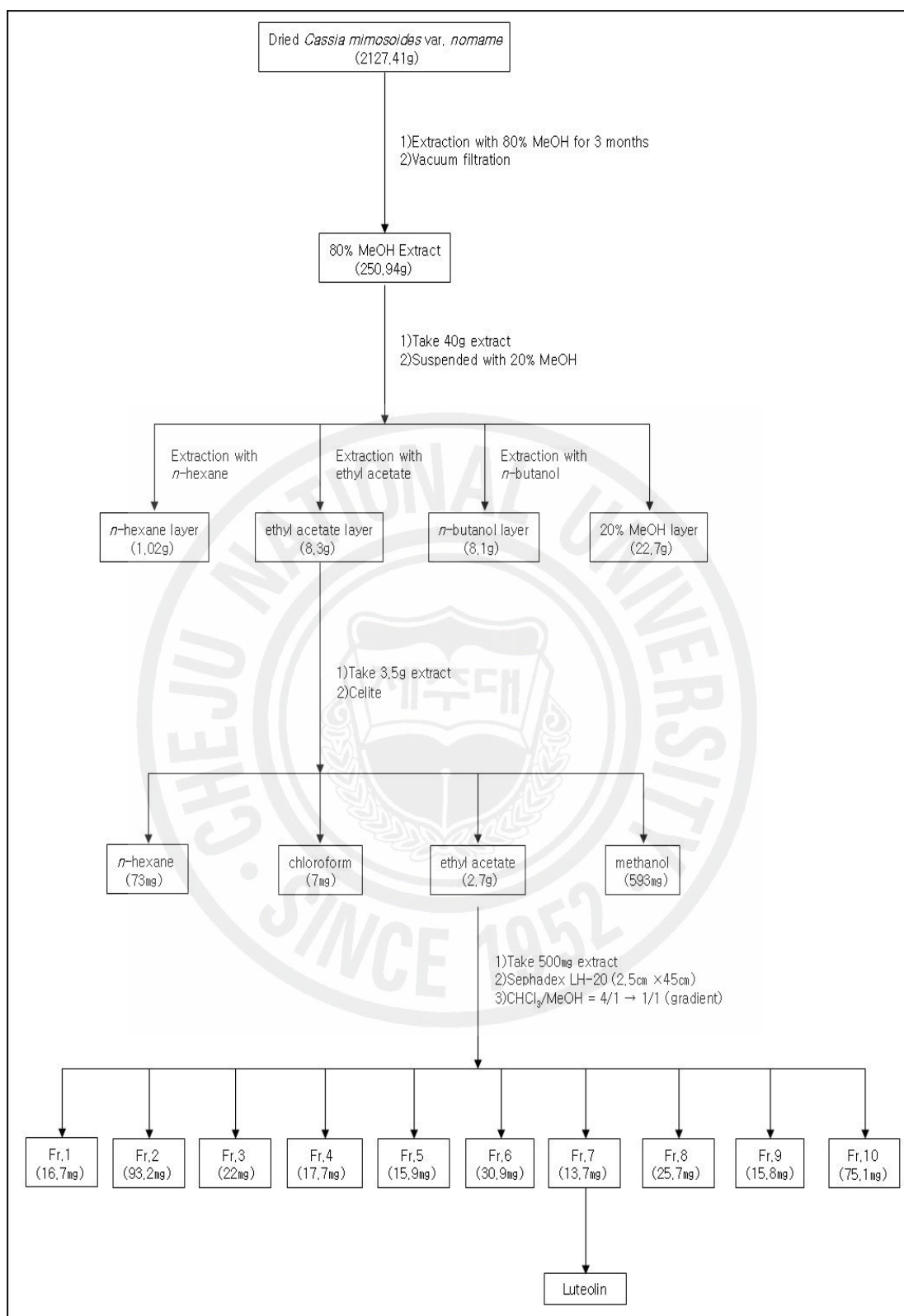


Figure 3. Isolation scheme of *Cassia mimosoides* var. *nomame*

### 3-2. DPPH free radical 소거활성에 의한 항산화 활성 측정

Sample의 항산화 활성은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)을 이용하고 Luciana법<sup>19)</sup>을 응용하여 free radical 소거효과를 측정하였다. Sample을 70% ethanol에 녹여 1.0mg/mL(stock)을 제조하고, 이것을 각각 100, 50, 10, 5, 2.5 $\mu$ g/mL의 농도로 70% ethanol로 희석하였다. 0.2mM DPPH 용액 500 $\mu$ L에 서로 다른 농도의 sample 1000 $\mu$ L를 첨가하고 잘 섞은 후, 실온(25 $^{\circ}$ C)에서 10분간 반응시킨 후에 525nm에서 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Radical 소거활성은 RC<sub>50</sub>(Reduction Concentration)으로 표시하며, RC<sub>50</sub>은 DPPH의 농도가 50% 감소하는데 필요한 sample의 농도( $\mu$ g/mL)이다. 항산화 활성은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Antioxidant activity(AA)}=[1-(\text{Abs}_{\text{sample}}-\text{Abs}_{\text{blank}})/\text{Abs}_{\text{control}}]\times 100$$

### 3-3. Elastase 활성저해 측정

Sample의 Elastase 활성저해 효과는 James법<sup>20)</sup>을 응용하여 사용하였다. 기질로써 Elastin(N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide)을 사용하고, 25 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후에 410nm에서 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 p-nitroanilide의 생성량을 측정하였다.

실험은 0.2M Tris-HCl buffer(pH8.0), 100 $\mu$ g/mL Elastase(Enzyme), 4mM Elastin(Substrate), sample 10mg/mL(stock)을 섞어 25 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후, 410nm에서 p-nitroanilide의 생성량을 측정하였다. Elastase의 저해율은 다음 식에 따라 계산되며, IC<sub>50</sub>(Inhibition Concentration)은 Elastase의 기질을 50% 저해하는데 요구되는 sample의 농도( $\mu$ g/mL)를 표시한 것이다.

$$\text{Elastase inhibition}=\frac{(A-B)-(C-D)}{(A-B)} \times 100$$

A: Sample대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하여 반응한 후의 흡광도

B: Sample대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하지 않은 상태로 반응한 후의 흡광도

C: 효소를 첨가하여 반응한 후의 sample의 흡광도

D: 효소를 넣지 않은 상태로 반응한 후의 sample의 흡광도

### 3-4. Tyrosinase 활성저해 측정

Sample의 Tyrosinase 활성저해 측정은 DOPA chrome법<sup>21)</sup>을 응용하여 사용하였다. 기질로써 L-Tyrosine(L-3[4-Hydroxyphenyl]alanine)을 사용하고, 37°C에서 15분간 반응시킨 후에 475nm에서 UV/Vis 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

실험은 0.1M Potassium Phosphate buffer (pH 6.8), mushroom Tyrosinase (1500 U/mL ~ 2000 U/mL, Enzyme), 1mM Tyrosine(Substrate), sample 20mg/mL(stock)을 섞어 37°C에서 15분간 반응시킨 후, 475nm에서 흡광도를 측정하였다. 억제정도는 효소를 넣지 않았을 때의 흡광도와 효소를 첨가시켜 반응한 후의 흡광도의 차이를 살폈다. Tyrosinase 저해율은 다음과 같은 식에 의해 계산되었다.

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

- A: Sample대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하여 반응한 후의 흡광도
- B: Sample대신 solvent를 넣고 효소를 첨가하지 않은 상태로 반응한 후의 흡광도
- C: 효소를 첨가하여 반응한 후의 sample의 흡광도
- D: 효소를 넣지 않은 상태로 반응한 후의 sample의 흡광도

### III. 실험결과 및 고찰

#### 1. DPPH free radical 소거활성에 의한 항산화 활성 측정

DPPH free radical 법은 전자공여능을 측정하는 방법으로 환원력이 클수록 강력한 항산화제가 된다는 것에 착안하여 DPPH의 환원정도를 기준으로 측정물질의 환원력과 항산화력을 측정하게 된다. DPPH는 질소를 중심으로 안정한 라디칼 구조를 하고 있는데 515 ~ 525nm에서 최대 흡수를 나타내다가 환원이 되어 라디칼을 소실하게 되면 특유의 보라색이 없어지면서 측정 파장대에서 흡수가 없어지게 된다.

차풀로부터 단일물질로 분리된 compound의 항산화 활성 효과를 확인하기 위하여 DPPH free radical 소거 활성 정도를 비교 대조군으로 쓰인 Vit. C와 비교시 활성 억제 정도가 비슷함을 확인할 수 있었다.

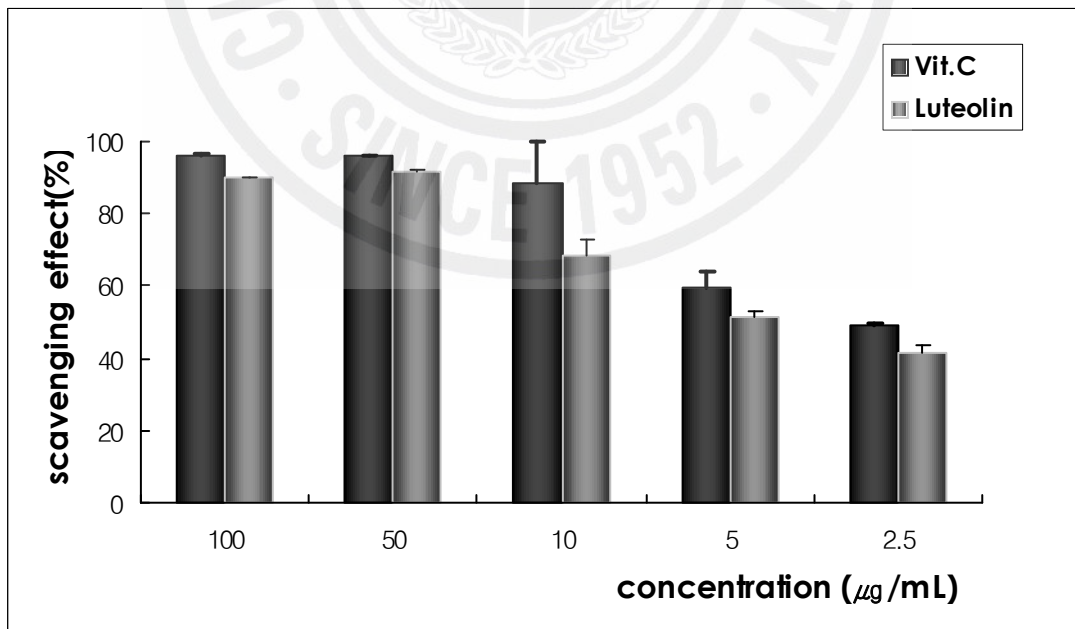


Figure 4. DPPH free radical scavenging effect of Luteolin

## 2. Elastase 활성저해 측정

Elastase 활성저해 효과는 기질인 Elastin(N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide)과 효소인 Elastase와의 반응에 sample이 첨가됨에 따른 *p*-nitroanilide의 생성량을 측정함으로써 확인할 수 있었다.

이러한 Elastase의 활성저해 측정에서 차풀로부터 단일물질로 분리된 compound는 대조군인 빈랑자와 비교시 희석된 sample 농도가 100 $\mu$ g/mL에서 활성저해가 비슷하게 나오는 것을 확인할 수 있었다.

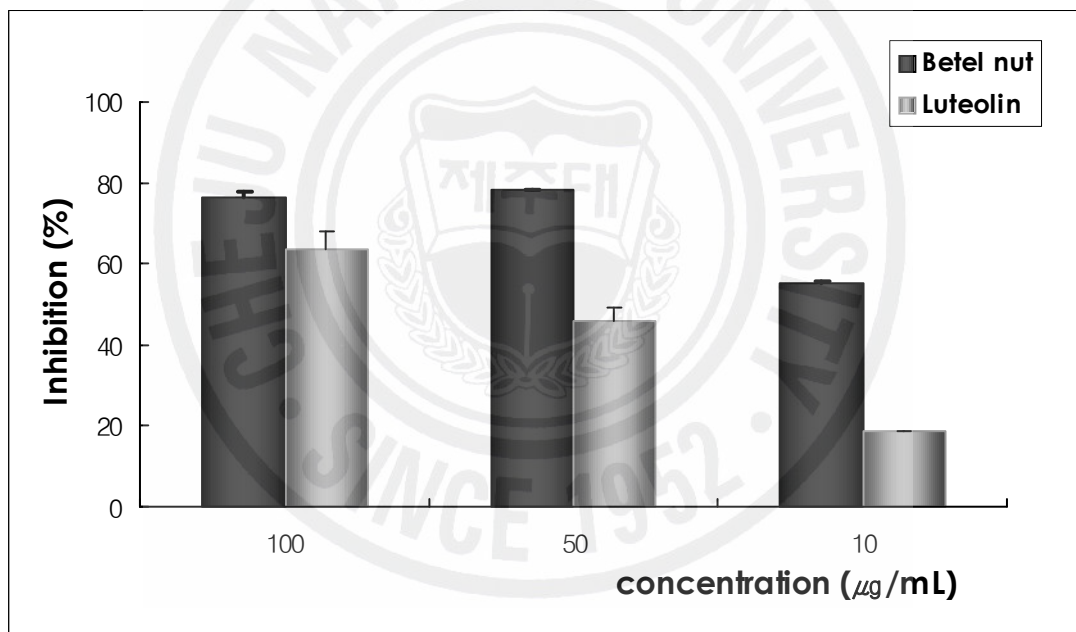


Figure 5. Inhibition of Elastase activity by Luteolin

### 3. Tyrosinase 활성저해 측정

Tyrosinase 활성저해 측정은 기질인 L-Tyrosine(L-3[4-Hydroxyphenyl]alanine)과 효소인 mushroom Tyrosinase와의 반응에 sample의 첨가에 따른 475nm에서의 흡광도를 측정함으로써 저해정도를 확인할 수 있었다.

이러한 Tyrosinase의 활성저해 측정에서 차폴로부터 단일물질로 분리된 compound는 대체적으로 대조군인 Arbutin과 비교시 그다지 좋은 활성을 기대할 수가 없었다.

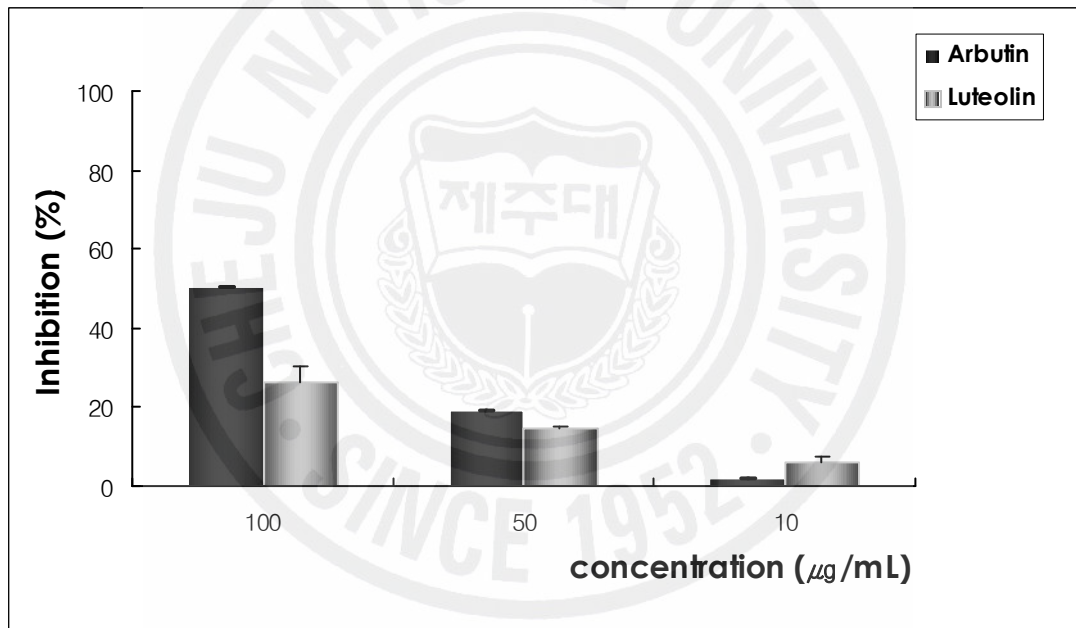


Figure 6. Inhibition of Tyrosinase activity by Luteolin

#### 4. Luteolin의 분리 및 구조 확인

건조된 차풀 2127.41g을 80% methanol 11L에 침적하고, 실온에서 1개월 동안 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만을 취하였다. 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일하게 2회 반복 실시하고 여액을 감압 농축하여 80% methanol 추출물 250.94g을 얻었다.

이 80% methanol 추출물 중 40g을 10g씩 4회에 걸쳐 20% methanol 1L에 현탁하고 separate funnel에서 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol을 사용하여 순차적으로 용매 분획하여 *n*-hexane 층, ethyl acetate 층, *n*-butanol 층 및 20% methanol 층을 얻었다.

활성이 괜찮았던 ethyl acetate 분획층을 celite를 통해 4개의 분획층(*n*-hexane층, chloroform층, ethyl acetate층, methanol층)을 얻었다.

Celite에서 얻어진 4개의 분획층들 중에서 ethyl acetate 분획층을 분리하기 위하여 glass column에 Sephadex™ LH-20을 충전시킨다. Ethyl Acetate 분획층을 소량의 methanol로 녹인 후 충전된 column에 전개용매 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH=4/1 to 1/1)를 사용하여 gradient로 전개시키고, 분취용액을 감압 농축하여 10개의 분획을 얻었다. 10개의 분획 중 단일물질로 여겨지는 Fr.7을 NMR을 이용하여 구조 동정을 하였다.

단일물질로 여겨지는 Fr.7의 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼을 확인한 결과 6.50ppm ~ 8.00ppm에서 나타나는 signal을 통해 방향족 고리의 수소의 존재가 예상되었고, 6.50ppm, 6.25ppm부근에서 1.96Hz의 signal이 나타나는 것으로 보아 수소간의 *meta*-coupling이 있음이 예상되었다. 아울러, 7.50ppm, 7.00ppm부근에서 8.28Hz의 signal이 나타나는 것을 통하여 수소간에는 *ortho*-coupling이 존재하는 것으로 예상되었다. 7.50ppm과 7.25ppm사이에서 2.2Hz의 signal이 나타나는 것으로 보아 *meta*-coupling이 있음이 예상되었다.



한편,  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼을 통해서 탄소수가 15개임을 확인할 수 있었고,  $\delta_{\text{C}} = 183.5\text{ppm}$  나타나는 signal로 보아 방향족 고리 탄소에 carbonyl group이 존재함을 예상할 수 있었다. 그리고 100ppm ~ 160ppm에서 나타나는 signal을 통해  $\text{sp}^2$  혼성구조를 갖는 방향족 고리의 탄소가 존재함을 예상할 수 있었다.

이상과 같은 정보를 종합하여 구조를 동정한 결과 다음과 같은 구조를 예상할 수 있었고, 문헌비교를 통하여 단일물질로 여겨지던 Fr 7.은 Luteolin임을 알 수 있었다.

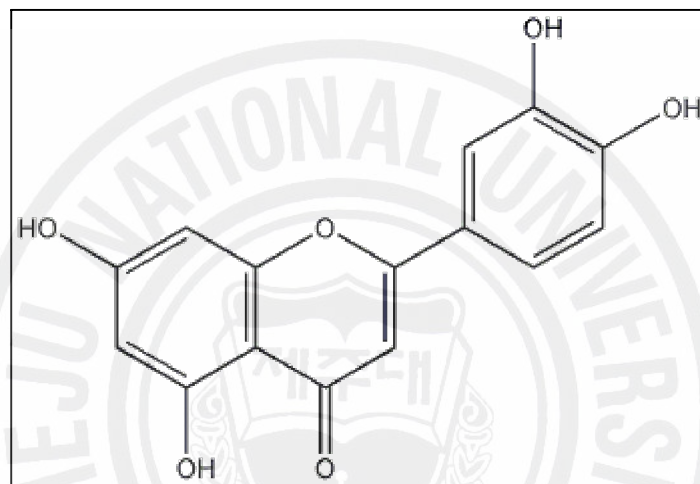
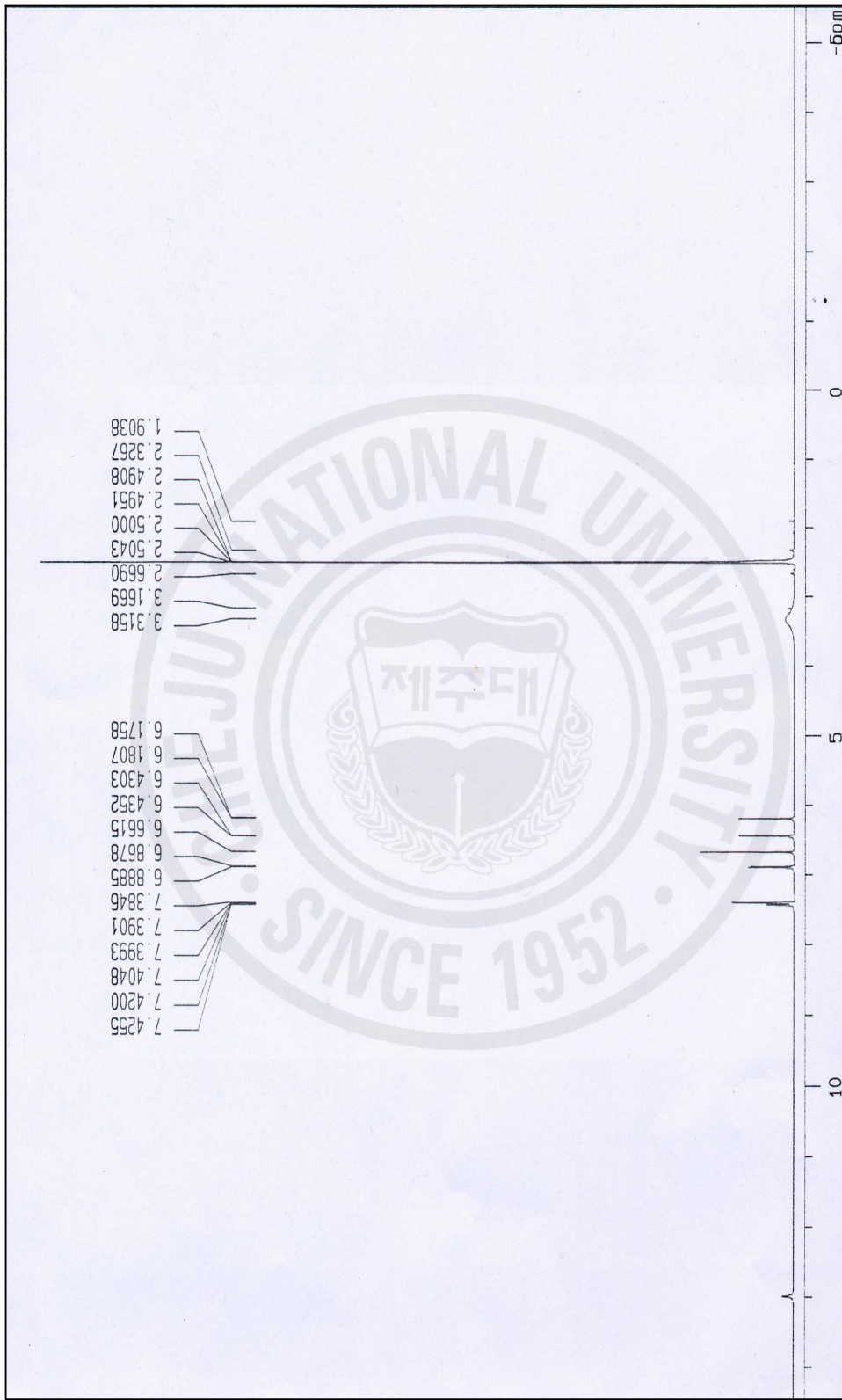
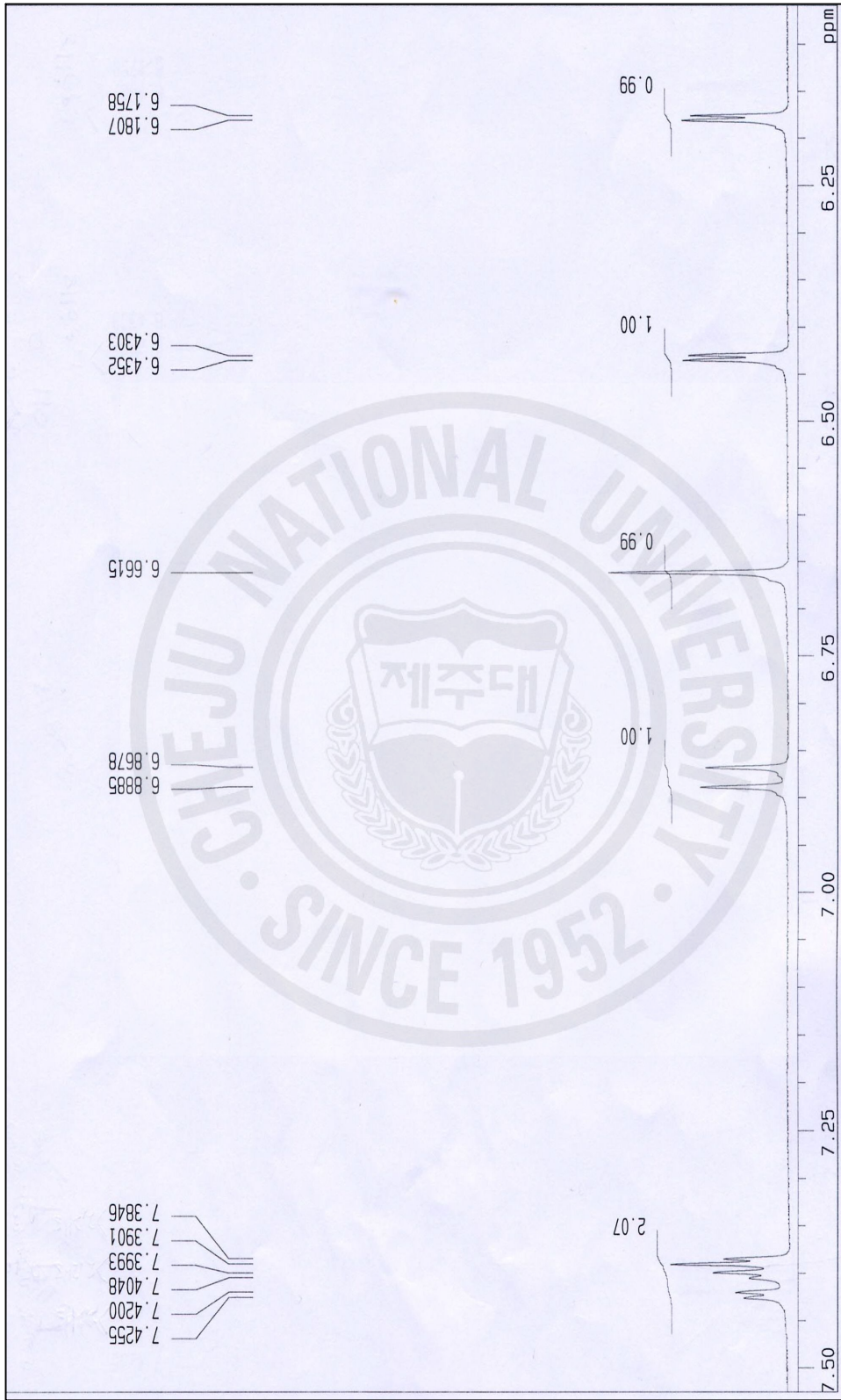


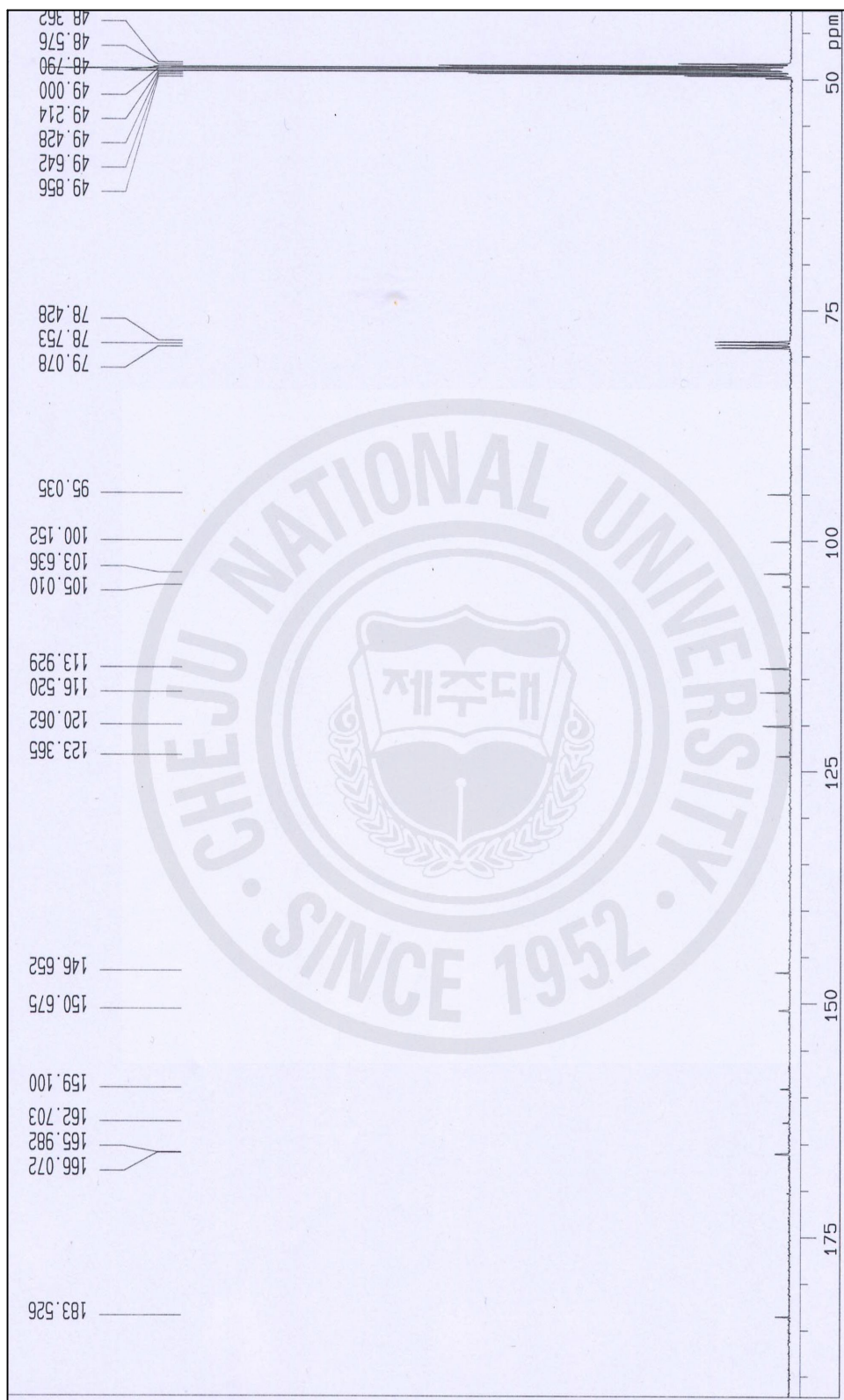
Figure 7. Chemical structure of Luteolin





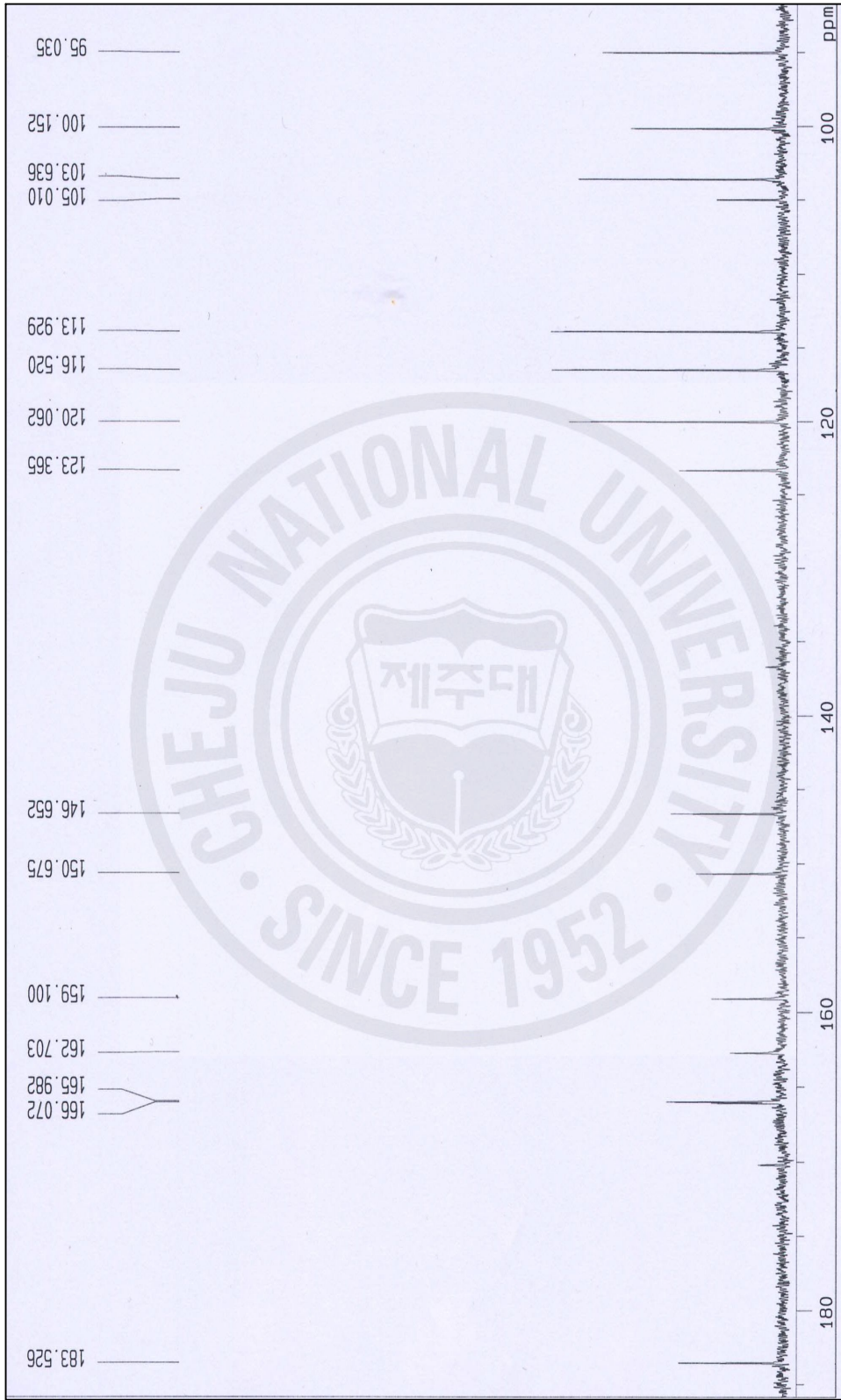
400MHz in DMSO-d<sub>6</sub>

Figure 9. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of Luteolin (expanded)



100MHz in CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD

Figure 10. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of Luteolin



100MHz in CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD

Figure 11. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of Luteolin(expanded)

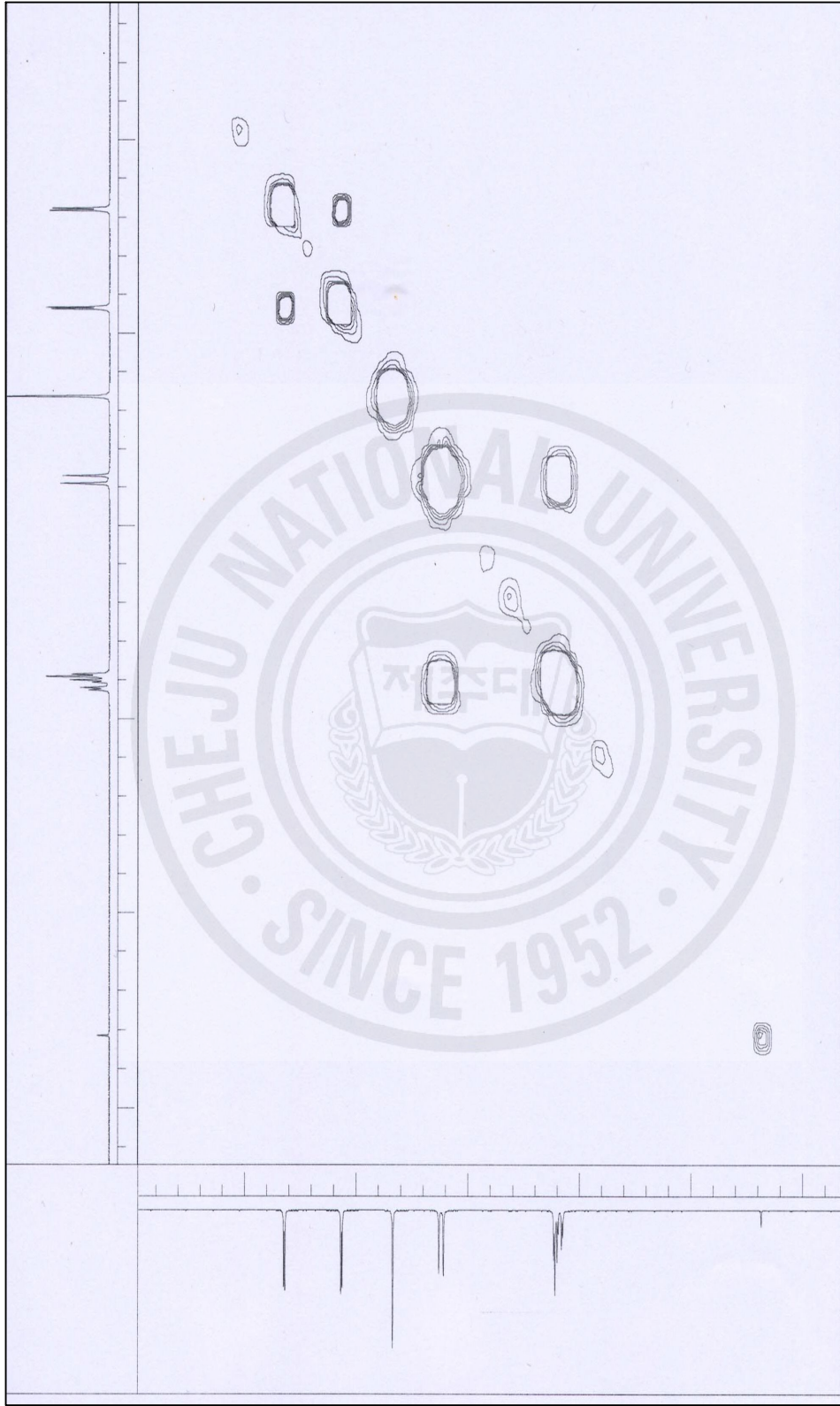


Figure 12.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of Luteolin

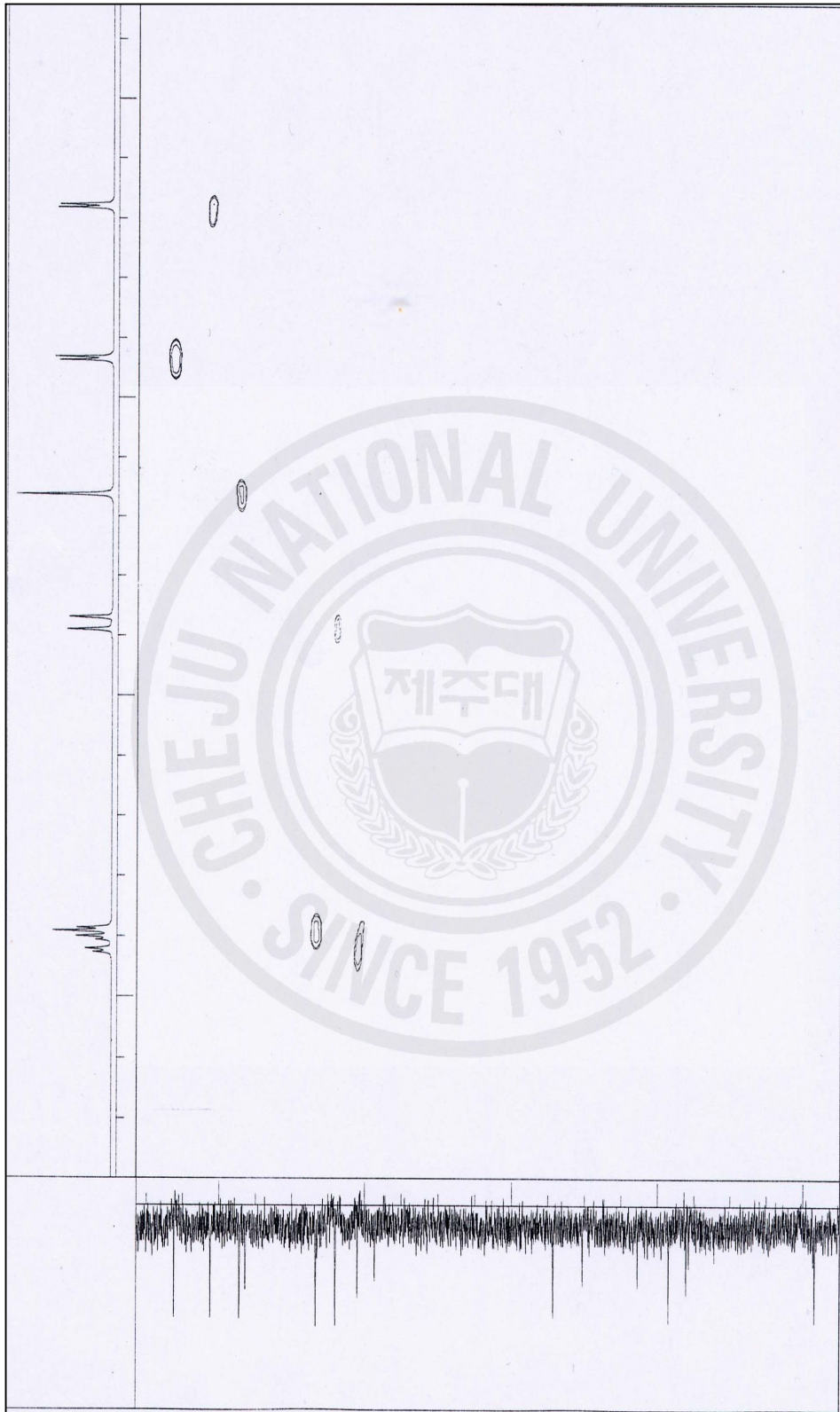


Figure 13. HMQC spectrum of Luteolin

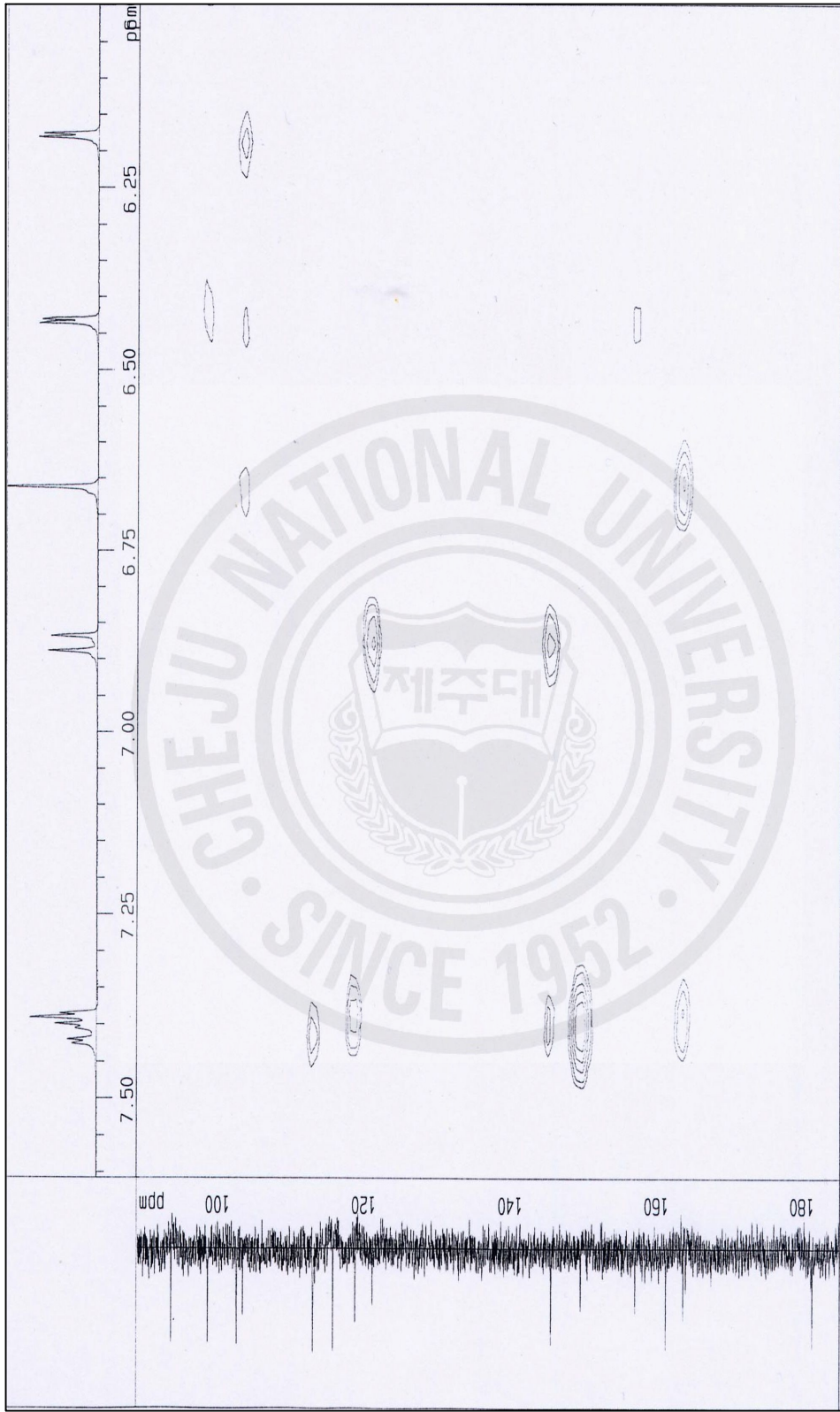


Figure 14. HMBC spectrum of Luteolin



## IV. 결 론

본 연구는 천연물인 차폴 (*Cassia mimosoides* var. *nomame*)로 부터 기능성 화장품 소재를 분리·동정하고 생리활성 실험을 통해 기능성 화장품 신소재로서의 가능성을 탐색하고자 하였다.

건조된 차폴을 80% methanol로 추출하고, 20% methanol로 현탁한 추출물은 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol을 사용하여 용매 분획을 하고, 4가지 분획층 중 활성이 좋았던 ethyl acetate층은 Celite와 Sephadex column chromatography를 통해 분리를 하여, 단일물질로 여겨지는 compound를 분리하였다.

$^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , 2D NMR 실험을 통해 분리한 compound를 구조 동정 하였으며, 분리된 compound는 문헌비교를 통하여 Luteolin임을 확인할 수 있었다.

차폴로부터 단일물질로 분리된 compound의 항산화 활성 효과를 확인하기 위하여 DPPH free radical 소거 활성을 측정한 결과 비교 대조군으로 쓰인 Vit. C와 비교할 때 활성 억제가 Vit. C와 비슷함을 확인할 수 있었다.

Elastase 활성저해 측정에서도 차폴로부터 단일물질로 분리된 compound는 대조군인 빈랑자와 비교시 희석된 sample 농도가  $100\mu\text{g/mL}$ 일 때, 활성저해가 비슷하게 나오는 것을 확인할 수 있었다.

DPPH free radical 소거에 따른 황산화 활성 측정에서는  $\text{RC}_{50}$  값이  $3.86\mu\text{g/mL}$ 로 나왔고, Elastase 활성저해 측정에서는  $\text{IC}_{50}$  값이  $53.98\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다.

이로서 차폴 (*Cassia mimosoides* var. *nomame*)로부터 분리된 compound인 Luteolin은 항산화 활성 측정과 Elastase 활성저해 측정 결과를 통해 볼 때, 기능성 화장품 신소재로서의 이용 가능성이 있다고 보여진다. 그리고 본 연구 결과는 화장품 첨가제 등 관련 분야에의 활용의 기초 자료로서 이용될 수 있으리라 생각한다.

## V. 참고문헌

- 1) Eom JN, Kim JD. An empirical study on the oriental herbal cosmetic purchase behavior in women in the Metropolitan area. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*. 2004;30:93-102.
- 2) 이문영, 김용숙, “20대-30대 남성들의 라이프스타일에 따른 화장품 구매행동”, *Journal of the Korean Society of Costume*, Vol.56, No.1(Jan. 2006), pp.56-69.
- 3) K. F. De Polo, "A Short Textbook of Cosmetology", Verlag für chemische Ind., Augsburg, Germany, 1998.
- 4) 김진웅, 장이섭, 강학회, "고기능성 화장품 산업에서 고분자의 응용", *Polymer Science and Technology*, Vol. 13, No.4, August 2002.
- 5) Gutteridge, J. M. C. and Halliwell, B.(1994) In *Antioxidants in nutrition, health, and disease*. Oxford University Press, pp.1-62.
- 6) Jayat, C. and Ratinaud, M. H. (1993) Cell cycle analysis by flow cytometry : principles and applications. *Biol. Cell* 78, 15-25.

- 7) Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-605.
- 8) Tsuji, N., Moriwaki, S., Suzuki, Y., Takemura, Y., and Imokawa, G. (2001) The role of elastase secreted by fibroblasts in wrinkle formation; implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem. and Photobiol.* 74:283-287.
- 9) 생리활성 정밀화학 기술개발 로드맵 (2002) . 229-322. 산업자원부. 서울.
- 10) Bell, A. A. and M. H. Weeler (1986), Biosynthesis and function of fungal melanin, *Ann. Rev. Phytopathol.* 24, 411-451.
- 11) Lerner, A. B. and T. B. Fitzpatrick (1950), Biochemistry of melanin formation, *Physiol. Rev.* 30, 91-126.
- 12) Chen, J. S., C. Wei, and M. R. Marshall (1991), Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.* 39, 1897-1901.
- 13) Mason, H. S. (1959), Structure of melanins, In *Pigment Cell Biology*, M. Gorden, ed., p.563, Academic Press, New York.
- 14) Pawelek, J. M. and A. M. Korner (1982), The biosynthesis of mammalian melanin, *Am. Sci.* 70, 136-145.

- 15) Jung, S.-W., N.-K. Lee, S. J. Kim, and D. Han (1995), Screening of tyrosinase inhibitor from plants, *Kor. J. Food Sci. Technol.* 27, 891-896.
- 16) Tomita, K., N. Oda, M. Kamel, T. Miyaki, and T. Oki. (1990), A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*, *J. Antibiotics.* 12, 1601-1605.
- 17) 박종희, 한국의 약초도감 (Medical Plant of Korea), 도서출판 신일상사, 2004.3, p.728.
- 18) 고경익, 전의식 공저, 한국의 야생식물, 일진사, 2003.3, p.327.
- 19) Luciana L. Mensor, Fábio S. Menezes, Gilda G. Leitão, Alexandre S. Reis, Tereza C. dos Santos, Cinita S. Coube and Suzana G. Leitão. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. *Phytother. Res.* 2001, 15, 127-130.
- 20) James, A. E. K., Timothy, D. W. and Gordon, L. *Biochemistry* 1996, 35, 9090-6.
- 21) Gutfinger, T. J. *Am. Oil Chem. Soc.*, 1981, 58, 966-968.
- 22) 하병조, 화장품학(Cosmetic Science), 수문사, 1999.2, p.93.
- 23) 오유경, 김기연, "기능성 화장품 원료로서 세라마이드의 유용성에 관한 이론적 고찰", 한국미용학회지, pp.107-115.