

감쪽지의 Tyrosinase와 Elastase 저해 활성 성분

차배천* · 이은희

상지대학교 보건과학대학 제약공학과

Ingredients of Tyrosinase and Elastase Inhibitory Activity from Calyx of *Diospyros kaki* Thunberg

Bae Cheon Cha* and Eun Hee Lee

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Health Sciences, Sangji University, Wonju, 220-702, Korea

Abstract – This study was conducted to investigate glutathione S-transferase(GST) activity, tyrosinase inhibitory effect and elastase inhibitory effect in persimmon calyx(calyx of *Diospyros kaki* Thunberg) for screening of functional materials from natural products. As a result, EtOAc extract of persimmon calyx turned out to be having tyrosinase inhibitory effect and elastase inhibitory effect. The active constituents of tyrosinase and elastase inhibitory effect were isolated from EtOAc extract of persimmon calyx. Their structure of compounds were identified as ursolic acid and (–)-daucosterol by spectroscopic evidence, respectively.

Key words – Persimmon calyx, Calyx of *Diospyros kaki* Thunberg, Tyrosinase inhibitory effect, Elastase inhibitory effect, GST(glutathione S-transferase), Ursolic acid, Daucosterol

환경오염과 흡연 그리고 스트레스에 의해 발생한 체내의 다양한 독성 물질이 피부 노화를 유발하고,¹⁾ 환경 파괴에 따른 오존층의 분해로 증가되어진 자외선은 표피내의 멜라닌 색소를 증가시켜²⁾ 기미와 주근깨와 같은 피부 손상과 함께 자외선에 의하여 파괴되어진 DNA가 불완전하게 복구되거나 혼란된 면역체계가 비정상적으로 작동되면서 암 발생과 연관된 유전자에 의해 심하게는 피부암까지 유발할 수 있다.³⁾ 또한 자외선에 노출된 피부는 피부 구조 단백질인 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin) 등이 파괴되어 피부 탄력이 떨어지고 주름이 형성되는 등의 심각한 피부 노화를 촉진하고 있다.⁴⁾

이에 본 연구는 다양한 피부 노화를 유발하는 독성 인자와 자외선 등에 대해 해독 효과와 미백 및 주름개선 효과를 나타내는 기능성 물질을 천연물로부터 탐색하고자 하는 연구의 하나로 우리나라에서 식용으로 널리 사용되는 과일인 감(*Diospyros kaki* Thunberg)의 다양한 부위 중 민간에서 천식, 기침, 만성기관지염 및 딸꾹질 억제 효과 등이 알려져 있고, 혈액응고 억제효과⁵⁾와 항산화 및 항염증 연구⁶⁾ 등이 보고되어져 있는 생약명이 시체(柿蒂)로 알려진 감 열매의

꽃받침인 감쪽지에 대하여 감과 같은 해독 효과와 함께 미백 및 주름 개선효과를 나타내는지에 대하여 연구하고자 하였다.

감쪽지에 대한 해독 효과는 세포로 유입된 cytotoxic, genotoxic한 물질 등을 glutathione(GSH, γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine)과의 conjugation을 통하여 제거하거나, 외부로부터 오는 다양한 스트레스 자극으로부터 세포를 보호하는데 중요한 역할을 하는 해독 관련 효소인⁷⁾ glutathione S-transferase(GST; EC2.5.1.18)의 활성을 측정하여 실험하고, 미백 효과는 hydroxylation 또는 산화 환원 반응에 의해 L-tyrosine을 분해하여 L-DOPA를 거쳐 melanin 색소의 생성에 관여하는 효소⁸⁾인 tyrosinase의 저해 활성 실험에 의해 미백 효과를 측정하고자 하였다. 주름개선 효과는 피부 단백질(protein of skin)의 분해에 의해 피부 노화를 유발하는 효소⁹⁾로 알려진 elastase의 저해 활성 실험에 의한 주름개선 효과를 판단하고자 하였다. 또한 이들 활성 실험 결과 우수한 활성을 나타낸 감쪽지의 극성별 용매 추출물에 대하여서는 새로운 기능성 물질로서의 활성 주성분을 탐색하기 위해 계속하여 column chromatography에 의한 분획 및 연속적인 생리 활성 검색을 실시하여 감쪽지에 함유되어진 활성 주성분을 확인하였으므로 이를 보고하고자 한다.

*교신저자(E-mail): bccha@sangji.ac.kr
(Tel): +82-33-730-0554

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에 사용한 감꼭지는 강원도 원주시 천 일약업사에서 시판되고 있는 감꼭지(시체)를 구입하여 음건하고 세절하여 사용하였으며 표본은 상지대학교 제약공학과 의약화학실험실에 보관중이다.

시약 및 기기 – 실험에 사용된 FT-NMR은 Varian Mercury 300 MHz(USA)를 이용하여 TMS를 내부 표준물질로 사용하여 측정하였으며, chemical shift는 δ unit로 나타내었다. 용점은 Mettler FR-5 용점 측정기를 사용하였고 보정은 하지 않았다. FT-IR은 Nicolet Impact 420을 사용하여 KBr법으로 측정하였고, UV는 Milton-Roy Spectronic Genesys-5 분광계를 사용하였다. EI-MS와 FAB-MS는 JMS-700(JEOL, Tokyo, Japan)으로 측정하였다. 성분 분리를 위한 순상 column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(particle size 70-230 mesh, ASTM, Merck)을 사용하였고, Lipophilic Sephadex-LH 20은 Sigma사, 성분 확인용 TLC plate는 Kiesel gel 60F₂₅₄(ART. 5715, Merck)를 사용하였다. GST에 의한 해독작용 측정을 위한 glutathione, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, DMSO, 20% Trichloroacetic acid 및 GST 용액은 Sigma사 제품을 사용하였다. 효소 반응을 위한 tyrosinase와 elastase 그리고 기질인 N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide, L-tyrosine과 반응용 시약 및 완충 용액용 시약은 Sigma사 제품을 사용하였다. 분석용매는 spectrometer 용 용매를 사용하였으며, 추출 및 분획용 용매는 모두 특급 및 1급 시약을 사용하였다.

추출 및 분리 – 음건한 감꼭지 390.04 g을 MeOH 3500 ml를 가하여 수욕상에서 3회 추출하여 여과 후 농축하여 감꼭지 MeOH ext.(13.21 g)를 얻었다. 얻어진 MeOH ext.의 일부를 증류수에 현탁시켜 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH 및 H₂O 순으로 분획 후 농축하여 각 분획물 *n*-hexane ext.(1.12 g), EtOAc ext.(4.83 g), *n*-BuOH ext.(1.93 g), 및 H₂O ext.(4.55 g)를 각각 얻었다. 분획물 중 가장 우수한 tyrosinase 및 elastase 억제 활성 효과를 나타낸 EtOAc ext.(3.80 g)을 CHCl₃ : MeOH = 60 : 1부터 단계적으로 극성을 높인 전개 용매를 이용하여 silica gel column chromatography를 실시하여 4개의 활성 소분획인 fraction 1(0.10 g), fraction 2(1.18 g), fraction 3(0.21 g) 및 fraction 4(0.23 g)로 나누었다. Tyrosinase 및 elastase 억제 효과를 나타낸 fraction 2와 fraction 4로부터 활성 주성분을 규명하기 위하여 재차 silica gel column chromatography와 Sephadex-LH 20을 실시하여 fraction 2로부터는 화합물 1(15.7 mg)을 fraction 4로부터는 화합물 2(11.3 mg)를 분리하였다.

화합물 1 – White amorphous powder; mp 287-289°C; IR(KBr, cm⁻¹) 3422 (OH), 1691 (COOH), 1030 (C-O); ¹H-NMR (300 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 5.49(1H, br s, H-12),

3.46(1H, br t, *J*=7.7 Hz, H-3) 2.63(1H, d, *J*=11.4 Hz, H-18), 1.24, 1.22, 1.05, 1.02, 0.88(3H each, s, CH₃), 1.00(3H, d, *J*=6.9 Hz, CH₃-30), 0.95(3H, d, *J*=6.9 Hz, CH₃-29); ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 180.3(C-28), 139.6(C-13), 126.0(C-12), 78.5(C-3), 56.2(C-5), 53.9(C-18), 48.4(C-9), 48.4(C-17), 42.9(C-14), 40.3(C-8), 39.9(C-4), 39.8 (C-19), 39.8(C-20), 39.4(C-1), 37.8(C-22), 37.7(C-10), 33.9(C-7), 31.4(C-21), 29.2(C-23), 29.2(C-15), 28.5(C-2), 25.3(C-16), 24.3(C-29), 24.0(C-11), 21.8(C-30), 19.2(C-6), 17.9(C-29), 17.8(C-26), 17.0(C-24), 16.1(C-25); EI-MS *m/z* 456 [M]⁺.

화합물 2 – Colorless crystals(MeOH-H₂O); mp 285-288°C; IR(KBr, cm⁻¹) 3414 (OH), 1638(C=C), 1076, 1024 (glycosidic C-O); ¹H-NMR (300 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 5.34(1H, br s, H-6), 5.05(1H, d, *J*=7.6 Hz, Glc H-1), 4.57(1H, dd, *J*=2.1, 11.8 Hz, Glc. H-6a), 4.11 (1H, dd, *J*=5.1, 11.7 Hz, Glc. H-6b), 3.59(1H, m, H-3), 1.0(3H, d, *J*=7.6 Hz, H-21), 0.93(3H, s, H-19), 0.90(3H, d, *J*=7.2 Hz, H-26), 0.88(3H, d, *J*=7.2 Hz, H-27), 0.85(3H, t, *J*=7.6 Hz, H-29), 0.66(3H, s, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, pyridine-*d*₅) δ : 140.8 (C-5), 121.9(C-6), 102.5(Glc. C-1), 78.6(Glc. C-3), 78.5(Glc. C-5), 78.1 (C-3), 75.4(Glc. C-2), 71.7(Glc. C-4), 62.9(Glc. C-6), 56.9(C-14), 56.3 (C-17), 50.4(C-9), 46.1(C-24), 42.5(C-13), 40.0(C-4), 39.4(C-12), 37.5(C-1), 37.0(C-10), 36.5(C-20), 34.3(C-22), 32.2(C-7), 32.1(C-8), 30.3(C-2), 30.1(C-25), 28.6(C-16), 26.4(C-23), 24.6(C-15), 21.4(C-11), 20.1(C-27), 19.5(C-19), 19.3(C-21), 12.3(C-29), 12.1(C-18); FAB-MS *m/z* 577 [M+1]⁺.

감꼭지 극성 용매별 분획물의 GST(glutathione S-transferase) 활성 – GST 활성은 환원형 GSH를 포함물질로 하고, CDNB를 기질로 하는 포합반응을 기초로 하여 실시하였다.¹⁰⁾ 5 ml의 반응용기에 200 mM potassium phosphate 500 μ l와 GST 용액 10 μ l를 넣고 대조군에는 증류수 290 μ l와 glutathione 용액 100 μ l를 가한다. 반면 실험군은 증류수 289 μ l와 glutathione 용액 100 μ l와 감꼭지 극성 용매별 분획물 각 125 mg과 250 mg을 DMSO 1 ml에 녹인 후 최종 농도가 125 μ g/ml와 250 μ g/ml가 되도록 시료를 가한다. 이들 대조군과 실험군을 25°C에서 2분간 preincubation 시킨 후, 각각의 용기에 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 100 μ l를 가한 후 25°C에서 1분간 반응 시킨 후 20% TCA 100 μ l를 가하여 효소반응을 종결시킨 후 원심분리 하고 상등액을 UV 380 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군의 흡광도 수치를 100으로 하고 실험군의 대조군 수치와 비율로 계산하여 이를 활성 수치로 나타내었다.

감꼭지 극성 용매별 분획물 및 활성 주성분의 tyrosinase 저해활성 측정 – Tyrosinase 억제 효과는 dopachrome 방법

을¹¹⁾ 이용하여 측정하였다. 0.2 M potassium phosphate buffer(pH 6.5) 2.3 ml와 2 mM L-tyrosine 용액 0.4 ml을 가한 후 감꼭지 극성 용매별 분획물 15 mg을 DMSO 2 ml에 녹인 후 최종농도와 500 µg/ml 되도록 0.2 ml를 가하였고, 활성 주성분은 DMSO 2 ml에 녹인 후 최종 농도가 0, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500 µg/ml가 되도록 0.2 ml를 가하고, mushroom tyrosinase(110 unit/ml) 0.1 ml를 첨가하여 37°C 수욕상에서 20분간 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 저해 활성은 농도별 저해 비율 또는 50% 저해하는 농도를 내삽에 의하여 구하고, 이를 IC₅₀ 값으로 하였다. 저해 비율은 다음과 같이 계산하였다.

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

여기서 A는 효소만 첨가된 반응 용액, B는 효소와 시료가 모두 첨가된 반응 용액, C는 시료만 첨가된 반응 용액, D는 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응 용액의 475 nm에서의 흡광도 값이다.

감꼭지 극성 용매별 분획물 및 활성 주성분의 elastase 저해 활성 측정 - Elastase 저해 효과는 Lyu 등의 방법¹²⁾ 이용하여 측정하였다. 0.05 M Tris-Cl buffer(pH 8.0) 2.3 ml와 0.2 mM N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide 기질 용액 0.4 ml을 가한 후 감꼭지 극성 용매별 분획물 15 mg을 DMSO 2 ml에 녹인 후 최종농도와 500 µg/ml 되도록 0.2 ml를 가하였고, 활성 주성분은 DMSO 2 ml에 녹인 후 최종 농도가 0, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml가 되도록 0.2 ml를 가하고 기질의 활성화를 위해 25°C 수욕상에서 20분간 배양시켰다. 반응액에 porcine pancreatic elastase(0.5 unit/ml) 0.1 ml를 첨가하여 25°C 수욕상에서 20분간 반응시킨 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 저해 활성은 농도별 저해 비율 또는 50% 저해하는 농도를 내삽에 의하여 구하고, 이를 IC₅₀ 값으로 하였다. 저해 비율은 다음과 같이 계산하였다.

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

여기서 A는 효소만 첨가된 반응 용액, B는 효소와 시료가 모두 첨가된 반응 용액, C는 시료만 첨가된 반응 용액, D는 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응 용액의 410 nm에서의 흡광도 값이다.

결과 및 고찰

감은 동의보감이나 향약집성방에서 종기나 염증질환, 부스럼, 화상을 치료하고 숙취해소와 고혈압을 예방하고 동맥경화에 효능이 있다고 알려져 있으며, 폴리페놀성 물질과 비타민 A와 C 성분이 풍부하여 숙취해소와 기침치료에도 효과가 있고,¹³⁾ 잎의 flavonoid 성분들도 혈압상승에 관여하

는 angiotensin converting enzyme(ACE) activity에 약간의 저해작용이 있으며,¹⁴⁾ tannin성분이 뱀의 독과 박테리아의 toxin을 제거한다고 보고되어져 있고,¹⁵⁾ 추출물은 human lymphoid leukemia Molt 4B cell에 투여 시 세포의 성장저해와 세포자살을 유도하는 효과¹⁶⁾를 가진 것으로 알려져 감의 꽃받침 부분인 감꼭지도 감과 유사한 해독 작용과 함께 피부의 멜라닌 생성에 주효소로 작용하는 tyrosinase 저해 활성과 주름 생성에 관여하는 elastase 저해 활성이 있는지를 실험하였다. 그 결과, Table I에 나타난 바와 같이 감꼭지의 극성 용매별 분획물에 대하여 GST 억제 활성법을 이용한 해독효과 실험에서는 뚜렷한 효과를 나타내지 못하였다. 그러나 미백 효과를 확인하는 tyrosinase 저해효과 실험에서는 Table II에서 보는 바와 같이 EtOAc 분획물에서 ascorbic acid 보다는 약하나 강한 억제 활성을 나타내었다. 또한 주름 개선 효과를 판단하는 elastase 저해 활성 실험에

Table I. Glutathione S-transferase activity of extracts obtained from calyx of *Diospyros kaki* Thunberg

Samples	GST activity (%)	
	125 (µg/ml)	250 (µg/ml)
Control	100	100
MeOH ext.	86.16 ± 1.20	87.22 ± 5.61
n-Hexane ext.	33.73 ± 1.82	56.98 ± 10.00
EtOAc ext.	89.37 ± 8.71	91.63 ± 1.63
n-BuOH ext.	86.60 ± 5.81	94.10 ± 2.48
H ₂ O ext.	63.00 ± 11.26	72.28 ± 14.47

Table II. Tyrosinase inhibitory activity of extracts obtained from calyx of *Diospyros kaki* Thunberg

Samples	Inhibitory effect(%)
Ascorbic acid	97.55 ± 0.33
MeOH ext.	67.46 ± 3.55
n-Hexane ext.	79.32 ± 2.73
EtOAc ext.	89.59 ± 0.28
n-BuOH ext.	55.31 ± 2.19
H ₂ O ext.	48.79 ± 2.20

Table III. Elastase inhibitory activity of extracts obtained from calyx of *Diospyros kaki* Thunberg

Samples	Inhibitory effect(%)
Oleanolic acid	98.75 ± 0.22
MeOH ext.	70.46 ± 2.98
n-Hexane ext.	55.47 ± 4.23
EtOAc ext.	82.59 ± 0.28
n-BuOH ext.	65.11 ± 3.12
H ₂ O ext.	31.12 ± 5.13

서도 Table III에 나타낸 것과 같이 EtOAc 분획물에서 대조군인 oleanolic acid 보다는 약하나 강한 억제 활성을 나타내었다.

이상의 실험 결과, 해독 효과에서는 효과를 나타내지 않았지만 tyrosinase와 elastase 저해효과 실험에서 우수한 효과를 나타낸 EtOAc 분획물에 대하여 활성 주성분을 규명하기 위하여 CHCl_3 와 MeOH로 극성을 단계적으로 높인 전개용매를 이용하여 silica gel column chromatography를 실시하여 얻어진 4종의 소분획물에 대해서 tyrosinase와 elastase 저해효과를 실시하여 우수한 저해 효과를 나타낸 fraction 2와 4에 대해 MeOH : H_2O = 10 : 1에서 1 : 10으로의 전개 용매를 사용한 Lipophilic Sephadex LH-20으로 재정제하여 fraction 2로부터 화합물 1을 fraction 4로부터 화합물 2를 분리하였다.

분리하여 얻어진 화합물 1은 백색의 무정형 분말로 Liebermann-Burchard 반응에서 양성을 나타내며 IR spectrum에서 OH와 COOH의 존재를 추정할 수 있으므로 triterpenoid계 화합물로 추정하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 보논바와 같이 δ 0.88-1.24에서 7개의 CH_3 기가 나타나는데 이중 2개가 doublet로 2급의 CH_3 이고 5개는 3급의 CH_3 에 상당하는 peak들이 나타나는 것으로 보아 ursan계로 추정되었다. 이외에도 δ 2.63에서 doublet signal(1H, $J=11.4$ Hz), δ 3.46에서 broad triplet-like signal(1H, $J=7.7$ Hz), 5.49에서 olefinic proton signal 등의 α -amyrin계의 특징적인 흡수 signal들이 나타나는 것으로 보아 α -amyrin계인 ursolic acid로 추정하였다. 동시에 기존 문헌의 data^{17,18}와 비교하여 검토한 결과 화합물 1의 구조는 ursolic acid로 확인하였으며, 구조는 Fig. 1에 나타내었다.

화합물 2는 TLC에 전개시킨 후 10% 황산 발색 시 자색으로 발색되었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum으로부터 고자장 영역에서 singlet methyl proton signal(δ 0.93, 0.66) 2개와 doublet methyl proton signal(d 1.00, 0.90, 0.88) 3개, triplet methyl proton signal(δ 0.85) 1개가 관측되어 sterol 구조의 화합물로 추정할 수 있었다. δ 5.05에서 관측된 anomeric proton signal 외에 δ 3.59-4.57에서 당에서 유래한 oxygentaed methine 또는 methyl signal 들이 관측되었다. Anomeric proton signal의 coupling constant 값($J=7.6$ Hz)으로부터 당이 β 결합하고 있는 것을 확인하였다. 또한 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 모두 35개의 signal이 관측되었으며, 각 signal의 chemical shift로부터 결합한 당은 D-glucopyranose였고, aglycone은 β -sitosterol로 확인되었다. 따라서 화합물 2는 β -sitosterol의 C-3 수산기에 D-glucopyranose가 β 결합하고 있는 화합물임을 알 수 있었다. 이상의 결과를 기존 문헌의 data¹⁹⁻²¹와 비교하여 검토한 결과 화합물 2의 구조는 Fig. 1에 나타낸 것과 같이 daucosterol로 구조를 결정하였다.

감쪽지의 tyrosinase 및 elastase 저해 활성 주성분으로 단

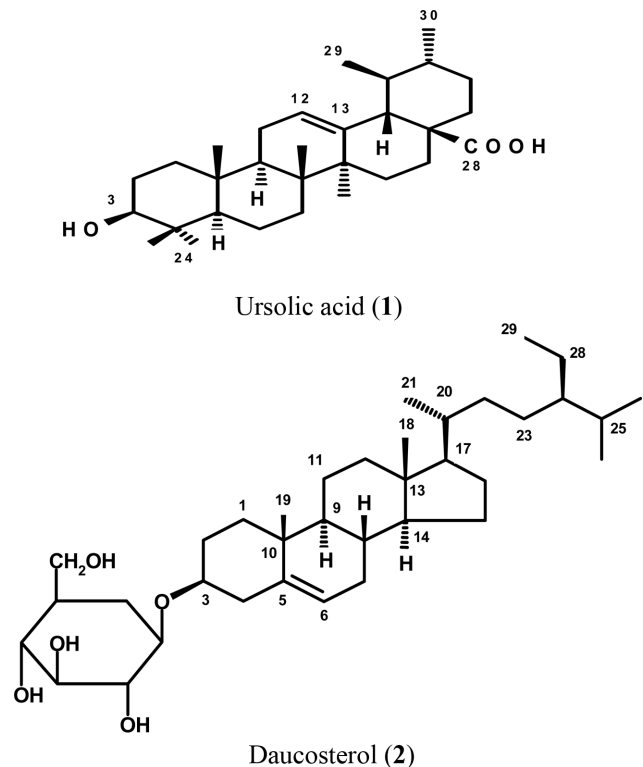


Fig. 1. Structure of compound 1 and compound 2 isolated from EtOAc ext. of calyx of *Diospyros kaki* Thunberg.

Table IV. Tyrosinase inhibitory activity of compounds isolated from calyx of *Diospyros kaki* Thunberg

Samples	IC ₅₀ (μg/ml)
Ascorbic acid	35.70 ± 1.33
Ursolic acid	98.31 ± 3.89
Daucosterol	56.87 ± 2.18

Table V. Elastase inhibitory activity of compounds isolated from calyx of *Diospyros kaki* Thunberg

Samples	IC ₅₀ (μg/ml)
Oleanolic acid	89.10 ± 1.33
Ursolic acid	100.31 ± 3.89
Daucosterol	86.35 ± 2.18

리한 triterpenoid계 화합물인 ursolic acid와 sterol계 배당체인 daucosterol에 대해서도 분획물과 같은 tyrosinase와 elastase 저해 효과 실험을 실시한 결과, Table IV에 나타낸 바와 같이 tyrosinase 저해효과에서는 화합물 모두 대조군인 ascorbic acid 보다는 약하나 우수한 tyrosinase 저해효과를 나타내었고, 이는 daucosterol이 tyrosinase 저해 활성을 가진다는 보고 결과²²와 일치한다. 또한 Table V에서와 같이 elastase 저해 효과에서도 ursolic acid는 대조군 보다 약한 저해 활성을 보였으나, daucosterol은 대조군인 oleanolic acid

와 유사한 우수한 저해 활성을 보여 daucosterol이 elastase 저해 활성도 있다는 보고²³⁾와 유사한 결과를 나타내었다.

결 론

인체에 축적되어지는 다양한 독성 물질과 자외선이 피부 반점, 기미, 주근깨 등의 피부 색소 침착과 함께 주름 증가 또는 탄력 감소 현상과 같은 피부 노화를 일으킬 뿐만 아니라 심각하게는 피부암의 발생 원인이 되고 있다. 이와 같이 피부 노화의 원인이 되는 독성 물질과 자외선에 대해 해독 효과와 함께 미백 및 주름 개선 효과를 나타내는 물질을 천연물로부터 탐색하기 위해 감쪽지에 대해 해독효과와 미백 및 주름 개선효과에 대하여 실험을 실시한 결과 다음과 같은 지견을 얻었다.

1. 감쪽지의 극성별 용매 분획물에 대하여 GST 활성에 의한 해독 효과를 실험한 결과, 감쪽지는 감과 같은 해독 효과를 나타내지 못하였다.

2. 감쪽지의 극성별 용매 분획물에 대하여 tyrosinase 및 elastase 저해 효과를 실험한 결과, 감쪽지의 EtOAc 분획물이 tyrosinase 저해에 의한 미백 효과와 elastase 저해에 의한 주름 개선 효과를 나타내었다.

3. Tyrosinase 및 elastase 저해 활성 주성분을 규명하기 위하여 우수한 미백 및 주름 개선 효과를 나타낸 감쪽지의 EtOAc 분획물에 대하여 저해 활성 확인과 함께 분리 정제를 실시한 결과, 소분획물 fraction 2로부터 화합물 1을, fraction 4로부터 화합물 2를 얻었다.

4. 분리된 화합물 1과 2의 기기 분석치를 표준품 및 문헌치와 spectral data 를 비교한 결과, 화합물 1은 ursolic acid 로, 화합물 2는 β -sitosterol glucoside인 daucosterol로 구조를 동정하였다.

5. 단리된 ursolic acid와 daucosterol은 tyrosinase와 elastase 저해 활성을 나타냄으로서 감쪽지는 미백과 주름 개선 효과가 있는 새로운 천연자원 으로서의 개발 가능성을 시사하고 있다.

사 사

본 연구는 상지대학교 2011년 교내연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Puizina-Ivic, N. (2008) Skin aging. *Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica Adriat.* **17**: 47-54.
- Iwata, M., Corn, T., Iwata, S., Evertt, M. A. and Fuller, B. B. (1990) The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J. Invest. Dermatol.* **95**: 9-15.
- Gilcherst, B. A., Zhai, S., Eller, M. S., Yarosh, D. B. and Yaar, M. (1993) Treatment of human melanocytes and S91 melanoma cells with the DNA repair enzyme T4 endonuclease V enhances melanogenesis after ultraviolet irradiation. *J. invest. Dermatol.* **101**: 666-672.
- Lubart, R., Friedmann, H., Lavie, R., Longo, L., Jacobi, J., Baruchin, O. and Baruchin, A. M. (2007) A reasonable mechanism for visible light-induced skin rejuvenation. *Lasers Med. Sci.* **22**: 1-3.
- Sa, Y. S., Kim, K. A. and Choi, H. S. (2003) Purification and characterization of anti-coagulant activity fraction from persimmon stem. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 1323-1327.
- Kim, H. J., Park, T. S., Jung, M. S. and Son, J. H. (2011) Study on the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of sarcocarp and calyx of persimmon (Cheongdo Bansi). *J. Appl. Biol. Chem.* **54**: 71-78.
- Angelucci, S., Sacchetta, P., Moio, P., Melino, S., Petruzzelli, R., Gervasi, P. and Di Ilio, C. (2000) Purification and characterization of glutathione transferases from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**: 435-441.
- Aroca, P., Urabe, K., Kobayashi, K., Taskamoto, K. and Hearing, V. J. (1993) Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem.* **268**: 25650-25655.
- Robert, L. and Homebck, W. (1989) Elastin and elastases. Vol. 2, 5762. CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974) Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* **249**: 7130-7139.
- Hearing Jr. V. J. (1987) Mammalian monophenol monooxygenase (Tyrosinase) : Purification, properties and reaction catalyzed. *Methods Enzymol.* **142**: 154-165.
- Lyu, S. Y., Moon, Y. S., Kwon, Y. J., Joo, H. J. and Park, W. B. (2003) Inhibition of porcine pancreatic elastase(PPE) by Korean mistletoe (*Viscum album* var. *Coloratum*) fractions. *Nat. Prod. Sci.* **9**: 278-285.
- Hyun, Y. H., Koo, B. S., Song, J. E. and Kim, D. S. (2004) In food materials. 152-153. Hyungseul Publish, Daegu, Korea.
- Kameda, K., Takaku, T., Okuda, H., Kimura, Y., Okuda, T., Haitian, T., Agata, I. and Arichi, S. (1987) Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin- converting enzyme activity. *J. Natl. Prod.* **50**: 680-683.
- Okonogi, T., Hattori, Z., Ogiso, A. and Motsui, S. (1979) Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. *Toxicon.* **17**: 524-527.
- Hibasami, H., Achiwa, Y., Fujikawa, T. and Komiya, T. (1996) Induction of programmed cell death (apoptosis) in human lymphoid leukemia cells by catechin compounds. *Anticancer Res.* **16**: 1943-1946.
- Jin, Q., Jin, H. G., Shin, J. E., Choi, E. J. and Woo, E. R.

- (2010) Inhibition of IL-6 production in TNF- α stimulated MG-63 by the triterpenoids isolated from *Aucuba japonica*. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**: 97-102.
18. Jaki, B. U., Franzblau, S. G., Chadwick, L. R., Lankin, D. C., Zhang, F., Wang, Y. and Pauli, G. F. (2008) Purity activity relationships of natural products: The case of anti-TB active ursolic acid. *J. Nat. Prod.* **71**: 1742-1748.
19. Lyu, H. N., Park, J. H., Kwak, H. Y., Lee, D. Y., Cho, J. G., Kim, S. Y., Kim, K. T. and Baek, N. I. (2009) Isolation of sterols from the *Kalopanax Cortex*. *J. Appl. Biol. Chem.* **52**: 41-44.
20. Hong, Y., Qiao, Y., Lin, S., Jiang, Y. and Chen, Feng. (2008) Characterization of antioxidant compounds in *Eriobotrya fragrans* Champ leaf. *Sci. Hortic.* **118**: 288-292.
21. Lee, D. Y., Song, M. C., Yoo, J. S., Kim, S. H., Chung, I. S., Kim, D. K., Park, M. H., Kwon, B. M., Kim, S. Y. and Baek, N. I. (2006) Development of biologically active compounds from edible plant sources-17: Isolation of sterols from the fruits of *Cornus kousa* Burg. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**: 82-85.
22. 박은영 (2009) 황촉규 지상부의 항산화 및 항염 활성. 숙명여자대학 대학 원 약학과, 박사학위논문.
23. Sultana, N. and Lee, N. H. (2007) Antielastase and free radical scavenging activities of compounds from the stems of *Cornus kousa*. *Phytother. Res.* **21**: 1171-1176.
- (2013. 5. 3 접수; 2013. 5. 16 심사; 2013. 5. 22 게재확정)