



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0040621
(43) 공개일자 2020년04월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/25 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 31/047 (2006.01) A61K 31/191 (2006.01)
A61K 36/488 (2006.01) A61K 8/34 (2006.01)
A61K 8/37 (2006.01) A61K 8/9789 (2017.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/25 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0120763

(22) 출원일자 2018년10월10일

심사청구일자 2018년10월10일

(71) 출원인

전남대학교산학협력단
광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)

(72) 발명자

김영란
광주광역시 남구 용대로74번길 11-1, 골든트레빌
102-202

박정업

광주광역시 북구 양산제로 110 연제주공 104동
208호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

윤대웅, 공병욱

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 황칠나무 추출물 또는 이로부터 분리된 신규 활성성분을 포함하는 피부 미백용 조성물

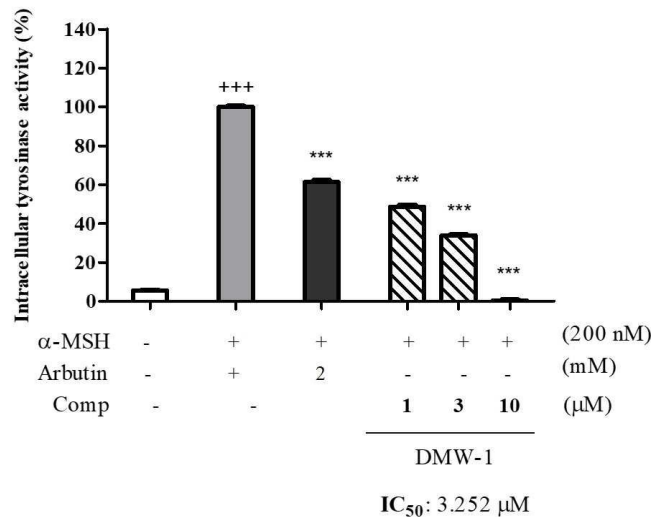
(57) 요약

본 발명은 황칠나무추출물 및 이로부터 분리된 신규 활성성분을 유효성분으로 함유하는 피부 색소침착 질환 또는 증상의 치료, 개선 또는 예방용 조성물, 또는 피부 미백용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 추출물 및 이로부터 분리된 신규 활성성분은 흑색종에서 멜라닌 생성 억제와 멜라닌 생성 관련 단백질(MITF, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2)의 발현 억제 효과가 우수하였다. 따라서, 과색소 침착을 포함한 다양한 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 화장품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

황칠나무추출물 및 신규 2가지 단일 성분을 유효성분으로 함유하는 미백 활성을 갖는 조성물은, 과색소 침착을 포함한 다양한 색소 침착 질환의 예방 또는 치료할 수 있는 약학 조성물, 화장품 조성물 또는 식품 조성물로 사용할 수 있다.

대표도 - 도7a



(52) CPC특허분류

A61K 31/047 (2013.01)

A61K 31/191 (2013.01)

A61K 36/488 (2013.01)

A61K 8/345 (2013.01)

A61K 8/375 (2013.01)

A61K 8/9789 (2017.08)

A61P 17/00 (2018.01)

A61Q 19/02 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자

김영호

대전광역시 유성구 봉명로 48, 인스빌리벨라
801-302

조세진

전라남도 순천시 오천8길 15, 호반베르디움아파트
108동 1502호

양서영

대전광역시 유성구 대학로 45, 705호

명세서

청구범위

청구항 1

황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물을 포함하는 피부 색소침착 질환 또는 증상의 치료, 개선 또는 예방용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 피부 색소침착 질환 또는 증상은 기미, 주근깨, 간반, 피부 노화로 인한 색소침착 변화, 검버섯 또는 갈색 반점, 저색소침착 및 과색소침착으로 구성된 군에서 선택되는 질환인 것인 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 과색소침착은 염증후 과색소침착(post-inflammatory hyperpigmentation), 또는 상처 또는 피부염으로 인한 약물 사용 후의 과색소침착인 것인 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 갈화(*Puerariae Flos*) 추출물을 추가적으로 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 조성물은 황칠나무잎 물추출물과 갈화 물추출물을 1:1 의 농도 비율로 혼합한 추출물을 포함하는 것인 조성물.

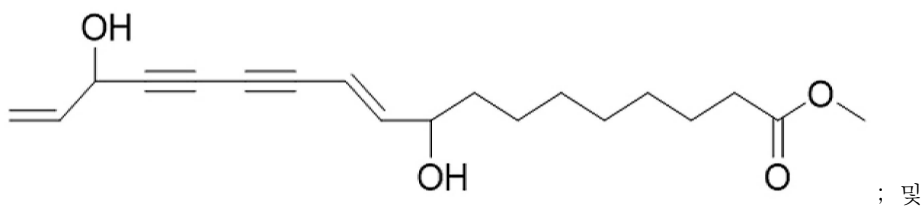
청구항 6

황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물을 포함하는 피부 미백용 조성물.

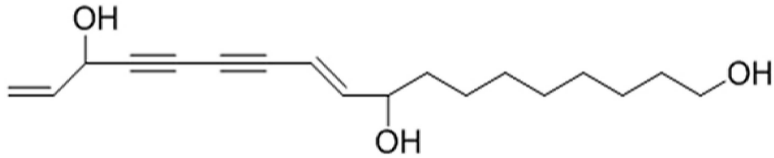
청구항 7

하기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물, 및 이들의 염(salts)으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 화합물을 포함하는 피부 미백용 조성물:

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적 조성물인 것인, 피부 미백용 조성물.

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 조성물은 화장품 조성물인 것인, 피부 미백용 조성물.

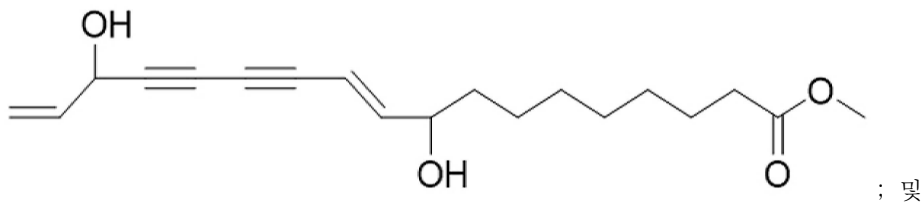
청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 조성물은 식품 조성물인 것인, 피부 미백용 조성물.

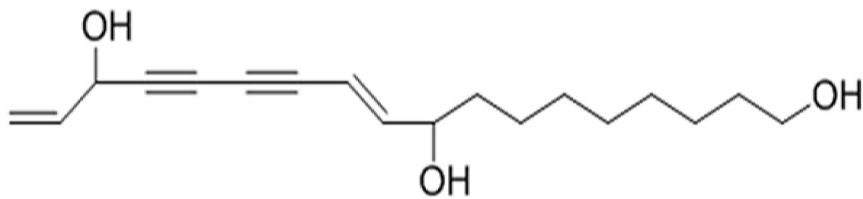
청구항 11

하기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물, 및 이들의 염(salts)으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 화합물을 포함하는 피부 색소침착 질환 또는 증상의 치료, 개선 또는 예방용 조성물:

[화학식 1]



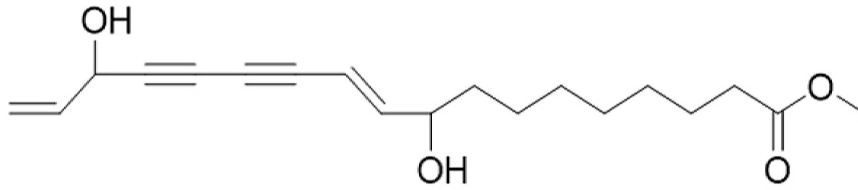
[화학식 2]



청구항 12

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 염(salts):

[화학식 1]



청구항 13

다음 단계를 포함하는 메틸(10E)-9,16-디하이드록시옥타데카-10,17-다이엔-12,14-다이노에이트 화합물의 분리 방법:

- (a) 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf)을 극성용매로 추출하는 단계;
- (b) 단계 (a)의 황칠나무잎 추출물로부터 에틸아세테이트 용매에 가용한 추출물만을 정제하여 에틸아세테이트 추출 분획물을 획득하는 단계; 및
- (c) 에틸아세테이트 추출 분획물을 정제하여 메틸(10E)-9,16-디하이드록시옥타데카-10,17-다이엔-12,14-다이노에이트를 획득하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 황칠나무잎 추출물을 포함하는 피부 미백용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 황칠나무잎 추출물로부터 분리된 신규한 미백 활성물질인 DMW-1, DMW-2 또는 이들의 염(salts)을 유효성분으로 포함하는 억제학적 조성물, 화장품 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 미백 조성물은 티로시나제 저해, 멜라닌 생성 억제, 멜라닌 생성관련 단백질 억제 및 그 메커니즘 저해 활성을 가지면서 세포 안정성이 우수하다.

배경 기술

[0002] 멜라닌은 인간이나 여러 동물의 피부나 눈, 머리카락의 색을 결정하는 중요한 역할을 하며 햇빛으로부터 피부를 보호하는 역할을 한다. 멜라닌은 멜라닌 세포 내에 존재하는 멜라노솜에서 생성되는 물질로서, 멜라닌 생성에 관여하는 주된 3가지의 효소인 티로시네이스 (tyrosinase), 티로시네이스 관련 단백질-1 (tyrosinase-related protein-1), 및 티로시나아제 관련 단백질-2 (tyrosinase-related protein-2)에 의하여 생성된다.

[0003] 티로시나아제는 티로신(tyrosine)을 가수분해하여 도파 (L-DOPA), 도파 퀴논 (DOPA quinone)으로 변환하여, 검은색을 띄는 유멜라닌(eumelanin)과 황갈색을 띄는 페오멜라닌(pheomelanin)의 2 종류 멜라닌을 합성한다.

[0004] 자외선, 사이토카인(cytokine), 성장인자(growth factor) 및 호르몬과 같은 인자들은 멜라닌 합성에 영향을 주는데, 그 중 가장 중요한 역할을 하는 대표적인 인자는 α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone)이다. MC1R (melanocortin 1 receptor)와 α -MSH가 결합하여 세포 내 신호 전달이 증폭되면 하류 신호전달 물질인 PKA (protein kinase A)를 활성화 하여 최종적으로 MITF (microphthalmia-associated transcription factor)의 발현을 증가시킨다. MITF는 멜라닌 세포에 특이적인 전사 조절 인자로서 티로시나아제(tyrosinase), 티로시나아제 관련 단백질-1, 및 티로시나아제 관련 단백질-2와 같은 효소들의 발현을 유도하여 멜라닌 합성을 조절한다.

[0005] 멜라닌 생성을 조절하는 신호 전달 경로는 매우 다양하지만 그 중에서도 MAPKs 신호전달 경로가 멜라닌 합성에 가장 중요하다고 알려져 있다. ERK, JNK의 경우 초기에는 인산화가 진행됨에 따라 멜라닌 생성이 증가하게 되지만 시간이 지남에 따라 오히려 인산화를 억제하여 최종적으로 멜라닌 합성을 억제한다고 알려져 있다. p38의 경우에는 인산화가 증가하게 되면 MITF의 발현을 증가하게 되어 멜라닌 합성에 기여하는 역할을 한다. 대표적인 멜라닌 합성 억제제인 알부틴 (arbutin), 코직산 (kojic acid), 비타민C (ascorbic acid), 닥나무 추출물과 같은 다양한 물질들은 기능성 화장품 원료로 인정되어 사용되어 왔다. 그러나, 현재 생활수준의 향상과 미용과 건강에 대한 관심이 급증함에 따라 천연물 소재를 이용한 여러 가지 화장품들이 많이 출시되고 많은 연구들이 진행되고 있으나, 아직까지는 미흡한 실정이다.

- [0006] 황칠 나무(*Dendropanax morbifera* Lev.)는 두릅나무과 황칠 나무속으로 한국 특산종으로서 우리나라의 남쪽 전남 해안지역과 제주도의 바닷가와 섬의 습한 지역에서 자생하는 상록 활엽 교목이다. 우리나라의 황칠 분포도를 보면 제주도, 전남 완도, 대흑산도, 거문도 등 바닷가 일대에서 가장 많이 자라고 있다. 예로부터 황칠 나무 껍질에 상처가 나면 나오는 황색의 진액은 가구나 갑옷, 무기 등을 칠하는데 사용하였고 황색의 진액이 마치 옷나무의 옷칠과 비슷하다고 하여 황칠이라고 불렀다.
- [0007] 최근 황칠 나무와 관련된 연구 결과에서, 황칠이 항암, 항산화, 항염증, 항비만, 항 당뇨, 항균, 항 혈전, 면역 증강, 관절염 억제 효과 등의 약리 효과가 있는 것으로 밝혀지면서 더욱 관심을 가지고 여러 분야에서 연구하는 추세이다.
- [0008] 황칠에는 다양한 생리 활성 물질인 덴드로파녹사이드(dendropanoxide), α -아미린(α -amyrin), β -아미린(β -amyrin), 테트라데칸올(tetradecanol), β -시스토스테롤(β -sistosterol)과 루틴(rutin) 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 또한 이들의 항염증, 면역 억제, 항비만, 항 당뇨, 항산화, 항암과 같은 약리 효과가 밝혀져 있다. 현재 다양한 연구를 통하여 밝혀진 효과를 기반으로, 황칠은 기능성 식품 및 화장품 등의 소재로서 주목 받고 있다.
- [0009] 대한민국 등록특허 제 10-1367306 호 "황칠 나무로부터 분리한 테트라데칸올을 유효성분으로 포함하는 미백 또는 보습용 화장품 조성물" 에는, 황칠나무 추출물로부터 분리된 단일 성분(테트라데칸올)이 티로시나제 저해 활성 및 멜라닌 생성 억제, 보습효과를 가진다고 개시되어 있다.
- [0010] 대한민국 등록특허 제 10-1650410호 "황칠나무, 섬오갈피나무 및 인삼이 포함된 복합물의 추출물을 유효성분으로 포함하는 미백 개선용 조성물, 및 이를 이용하여 제조되는 기능성 식품 및 한방 화장품"에는 황칠나무 및 복합 추출물의 티로시나아제 활성 저해 및 멜라닌 생성 관련 단백질의 저해 효과가 있어 미백 개선에 탁월한 효과를 나타낸다고 개시되어 있다.
- [0011] 본 발명자들은 미용에 대한 관심이 증가하는 것을 바탕으로 더 효과적으로 과색소 침착을 예방 또는 치료할 수 있는 인체에 안전한 물질, 특히 식물-유래 물질을 개발하고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명자들은 멜라닌 생성을 억제하는 식물-유래의 피부 미백용 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 본 발명자들은 황칠잎 추출물, 또는 황칠잎 추출물로부터 분리된 신규한 미백 활성물질인 DMW-1 또는 DMW-2를 포함하는 피부 미백 또는 피부 과색소침착 억제 조성물을 개발하게 되었다.
- [0013] 본 발명자들은 황칠나무 잎 추출물과 추출물에서 분리한 5가지 단일 성분이 활성화된 멜라닌의 축적을 억제시키며 미백 효과가 뛰어나 예방 또는 치료하는데 매우 유효하다는 것을 발견하였다. 이 중 신규 물질인 DMW-1과 DMW-2의 효능이 가장 뛰어난 것으로 나타났다.
- [0014] 또한, 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf)과 갈화(*Puerariae Flos*)의 혼합 조성물(1:1 또는 3:1의 비율로 혼합)을 처리하였을 때 단독처리하였을 때보다 세포 내 티로시나아제(tyrosinase) 활성 저해효과가 더욱 뛰어나다는 것을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0015] 따라서 본 발명의 목적은 피부 색소침착 질환 또는 증상의 치료, 개선 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적은 피부 미백용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 색소침착 치료, 억제 또는 개선방법을 제공하는 것이다.

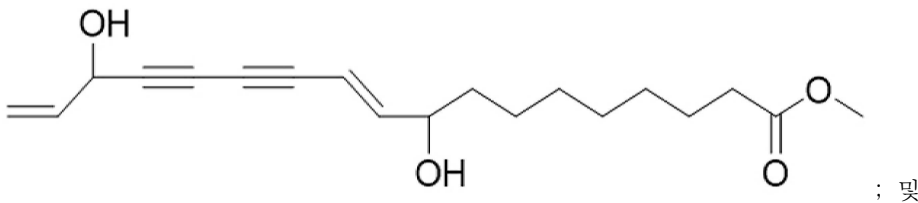
과제의 해결 수단

- [0018] 본 발명의 일 양태는, 황칠나무잎 (*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물을 포함하는 피부 색소침착 질환 또는 증상의 치료, 개선 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명자들은 멜라닌 생성을 억제하는 식물-유래의 피부 미백용 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 황칠잎 추출물, 또는 황칠잎 추출물로부터 분리된 신규한 미백 활성물질인 DMW-1 또는 DMW-2를 포함하는 피부 미백 또는 피부 과색소침착 억제 조성물을 개발하게 되었다.

- [0020] 본 발명자들은 황칠나무 잎 추출과 추출물에서 분리한 5가지 단일 성분이 활성화된 멜라닌의 축적을 억제시키며 미백 효과가 뛰어나 예방 또는 치료하는데 매우 유효하다는 것을 발견하였다. 이 중 신규 물질인 DMW-1과 DMW-2의 효능이 가장 뛰어난 것으로 나타났다.
- [0021] 또한, 황칠나무 잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf)과 갈화(*Puerariae Flos*)의 혼합 조성물(특히, 1:1의 비율로 혼합한 경우)을 처리한 경우, 각각의 추출물을 단독처리하였을 때보다 세포 내 티로시나아제(tyrosinase) 활성 저해효과가 더욱 뛰어나다는 것을 밝혔다.
- [0022] 황칠나무 잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물로부터 분리된 미백활성 물질은 다음과 같다.
- [0023] DMW-1: methyl(10E)-9,16-dihydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-diyanoate; 메틸(10E)-9,16-디하이드록시옥타데카-10,17-다이엔-12,14-다이이노에이트,
- [0024] DMW-2: (10E)-(-)-10,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol; (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올.
- [0025] 본 명세서에서 용어 "피부 색소침착 질환"은 멜라닌 과생성과 관련된 질환 또는 증상으로서, 상기 피부 색소침착 질환 또는 증상은 기미, 주근깨, 간반, 피부 노화로 인한 색소침착 변화, 검버섯 또는 갈색 반점, 저색소침착 및 과색소침착을 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 과색소침착은 염증후 과색소침착(post-inflammatory hyperpigmentation), 또는 상처 또는 피부염으로 인한 약물 사용 후의 과색소침착이다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 "유효성분으로 포함하는"이란, 황칠나무잎 추출물의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물에 포함된 황칠나무잎 추출물의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 황칠나무잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물, 화장품 조성물 또는 식품 조성물로서 실시될 수 있다.
- [0029] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0030] 본 발명의 황칠나무잎 추출물은 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf)을 건조 및 세절한 후, 추출용매로서 극성 용매 (예를 들어, 증류수, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등)를 가하여, 80℃-120℃로 가열하여 추출할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 2-8시간 동안 80℃-120℃로 가열하여 추출할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 추출방법에서 사용되는 극성 용매는, (i) 물, (ii) 알코올(바람직하게는, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 노말-부탄올), (iii) 아세트산, (iv) DMFO(dimethyl-formamide) 및 (v) DMSO(dimethyl sulfoxide)를 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 극성 용매는 물 및 탄소수 1 내지 3의 저급알코올로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 용매이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 극성용매는 물, 메탄올 또는 에탄올이다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 황칠나무잎에 극성용매를 가하여 90℃-110℃에서 3-5시간동안 추출할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 황칠나무잎에 극성용매를 가하여 95℃-105℃에서 3-5시간동안 추출할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 황칠나무잎에 극성용매를 가하여 95℃-105℃에서 4시간동안 추출할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 황칠나무 잎 추출시, 열수 추출법, 환류추출법, 상온 추출법 또는 초음파 추출법을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 열수추출법 또는 환류추출법을 사용할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 황칠나무 잎을 증류수로 추출하여, 여과, 감압 농축, 및 건조하였다.
- [0037] 본 발명에서는 황칠나무 잎을 증류수로 추출하여, 그 추출물이 흑색종 세포주인 B16-F10 세포에서 α-MSH에 의하여 유발된 세포내 티로시나아제 활성 및 멜라닌 축적을 저해하는 것을 확인하였다. 또한 황칠나무 잎 추출물은 멜라닌 생성 관련 단백질인 MITF, 티로시나아제(tyrosinase), TRP-1, TRP-2의 발현을 억제하였다. 황칠나무 잎 추출물은 멜라닌 생성에 관여하는 여러 가지 메커니즘 중에서도 MAPKs p38의 인산화를 억제하여 멜라닌 축적을 억제하였다.
- [0038] 한편, 본 발명의 조성물은 갈화(*Puerariae Flos*) 추출물을 추가적으로 포함할 수 있다.

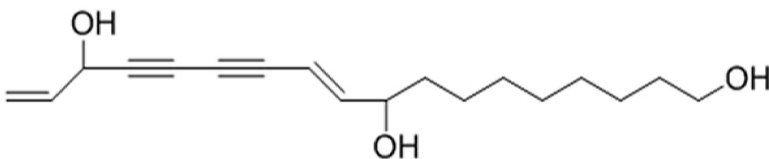
- [0039] 본 발명의 갈화 추출물은 갈화(*Puerariae Flos*)를 건조 및 세절한 후, 추출용매로서 극성용매(예를 들어, 증류수, 메탄올, 에탄올 등)를 가하여, 2-8시간 동안 60℃-100℃에서 환류시켜 수득할 수 있다. 갈화 추출물의 제조에 사용되는 극성용매는 상술한 바와 같다.
- [0040] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 갈화에 극성용매를 가하여 70℃-90℃에서 3-5시간동안 추출할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 갈화에 물 또는 메탄올을 가하여 75℃-85℃에서 3-5시간동안 추출할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 갈화에 물 또는 메탄올을 가하여 75℃-85℃에서 4시간동안 추출할 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 갈화 추출시, 열수 추출법, 환류추출법, 상온 추출법 또는 초음파 추출법을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 열수추출법 또는 환류추출법을 사용할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 피부 색소침착 질환 또는 증상의 치료, 개선 또는 예방용 조성물은 황칠나무잎 물추출물과 갈화 물추출물을 1:1의 중량 비율로 혼합한 추출물을 포함할 수 있다.
- [0045] 또는 본 발명의 피부 색소침착 질환 또는 증상의 치료, 개선 또는 예방용 조성물은 황칠나무잎 물추출물과 갈화 물추출물을 1:1의 농도(w/v) 비율로 혼합한 추출물을 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 황칠나무잎 물추출물과 갈화 물추출물을 각각 0.3 mg/ml (0.03%) 처리한 경우, 세포내 티로시나아제 활성 억제효과가 가장 우수한 것으로 나타났다.
- [0047] 또한, 본 발명의 추출물은 상술한 추출 용매에 의한 추출물뿐만 아니라, 통상적인 정제 과정을 거친 추출물도 포함한다. 예컨대, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외여과막을 이용한 분리, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 본 발명의 추출물에 포함되는 것이다.
- [0048] 본 발명의 추출물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 다른 양태는 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물을 포함하는 피부 미백용 조성물에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 양태는 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물을 포함하는 피부 외용제 조성물에 관한 것이다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 양태는, 하기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물, 및 이들의 염(salts)으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 화합물을 포함하는 피부 미백용 조성물에 관한 것이다:

[0054] [화학식 1]



[0055]

[0056] [화학식 2]



[0057]

[0058] 본 발명자들은 황칠나무 잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물로부터 5가지 단일 성분을 분리하였다. 레놀릭산 (Linolenic acid), 트리리놀레인 (Trilinolein), 메틸 클로로제네이트(methyl chlorogenate)와 신규물

질인 DPW1과 DPW2을 분리하였으며, 이들의 세포내 티로시나아제 저해 및 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하여 본 발명에 이르렀다.

[0059] 상기 성분 중 DMW-1 및 DMW-2의 화합물명은 다음과 같다:

[0060] DMW-1: methyl(10E)-9,16-dihydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-diynoate; 메틸(10E)-9,16-디하이드록시옥타데카-10,17-다이엔-12,14-다이이노에이트,

[0061] DMW-2: (10E)-(-)-10,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol; (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올.

[0062] 본 발명의 피부 미백용 조성물은 DMW-1 및/또는 DMW-2 의 2가지 단일 성분을 유효성분으로 함유하는 미백 활성을 갖는 조성물에 관한 것이다. 황칠나무잎 추출물에서 분리한 신규 물질인 DMW-1과 DMW-2는, 흑색종에서 세포내 티로시나아제 활성 억제, 멜라닌 생성 저해, 멜라닌 생성 관련 단백질인 MITF, 티로시나아제, 티로시나아제-연관 단백질-1(TRP-1), 티로시나아제-연관 단백질-2 (TRP-2)의 발현 억제, 및 멜라닌 생성 기작 중 하나인 MAPKs의 p38의 인산화 억제 효과가 우수하다. 따라서 과색소 침착을 포함한 다양한 색소침착 증상 또는 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

[0063] 본 발명의 조성물에 포함된 메틸(10E)-9,16-디하이드록시옥타데카-10,17-다이엔-12,14-다이이노에이트 및 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올은 천연식물재료인 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf)으로부터 분리한 화합물이다. 본 발명의 조성물에 포함된 상기 화합물 또는 이의 염(salts)의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 메틸(10E)-9,16-디하이드록시옥타데카-10,17-다이엔-12,14-다이이노에이트, (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올, 또는 이의 염(salts)을 유효성분으로 포함하는 조성물로서 실시될 수 있다.

[0064] 본 발명에서 유효성분으로 사용되는 화합물은 그 자체 또는 염(salts)의 형태, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하다. 상기 유리산은 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탄산 및 아스파르트산 등을 포함하며 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 무기산은 염산, 브롬산, 황산 및 인산 등을 포함하며 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 본 발명의 조성물에 포함된 메틸(10E)-9,16-디하이드록시옥타데카-10,17-다이엔-12,14-다이이노에이트 및 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올은, 천연식물재료인 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf)로부터 분리한 화합물이다. 황칠나무잎은 오랫동안 식용 및 민간약으로 사용되어 왔던 것이므로 이로부터 분리된 본 발명의 화합물 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없을 것으로 예상할 수 있다. 따라서, 메틸(10E)-9,16-디하이드록시옥타데카-10,17-다이엔-12,14-다이이노에이트 및 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올, 또는 이의 염(salts)은 의약품, 식품, 화장품 조성물로 사용될 수 있다.

[0066] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물일 수 있다.

[0067] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0068] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

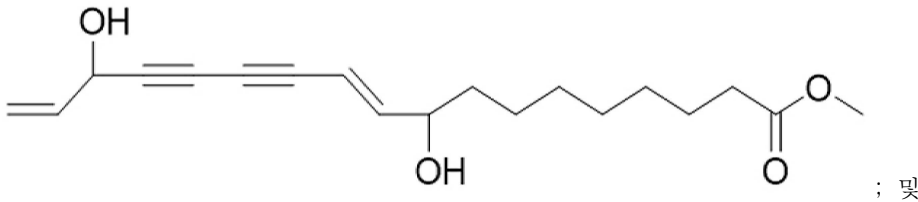
[0069] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.001-10000 mg/kg이다.

- [0070] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0071] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 화장료 조성물일 수 있다.
- [0072] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 스킨로션, 스킨토너, 로션, 수분로션, 영양크림, 마사지 크림, 수분 크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양 에센스, 샴푸, 린스, 비누, 클렌징폼, 클렌징 오일, 클렌징 로션, 클렌징 티슈, 바디크림, 바디 로션, 바디 클렌저, 팩, 스프레이 및 파우더로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0073] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이 인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로 카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0076] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분과 담체 성분 이외에, 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물에서 유효성분인 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 염(salts)의 양은 특별히 한정되지 않으며, 바람직하게는 상기 주름개선 및 보습유지 효능을 달성하는 데 충분한 양으로 포함된다.
- [0079] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 식품 조성물일 수 있다.
- [0080] 본 발명의 조성물이 식품 조성물인 경우에는 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등의 형태로 제조될 수 있다. 예컨대 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0081] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분으로서 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물, 메틸(10E)-9,16-디하이드록시옥타데카-10,17-다이엔-12,14-다이노에이트, (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올, 또는 이의 염(salts)뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시

르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 추출물 또는 화합물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함할 수 있다.

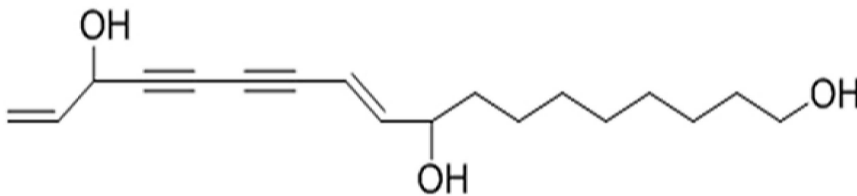
[0083] 본 발명의 또 다른 양태는, 하기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물, 및 이들의 염(salts)으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 화합물을 포함하는 피부 색소침착 질환 또는 증상의 치료, 개선 또는 예방용 조성물에 관한 것이다:

[0084] [화학식 1]



[0086] ; 및

[0087] [화학식 2]



[0088]

[0089] 본 발명의 피부 색소침착 질환 또는 증상의 치료, 개선 또는 예방용 조성물은 상술한 본 발명의 피부 미백용 조성물과 동일한 유효성분을 이용하는 것으로서, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.

[0090] 본 발명의 또 다른 양태는, 상기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물 및 이들의 염(salts)으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 화합물을 포함하는 피부 외용제 조성물에 관한 것이다.

[0091] 본 발명의 또 다른 양태는, 상기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물, 및 이들의 염(salts)으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 화합물을 포함하는 조성물을 대상(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는, 피부 색소침착 치료, 억제 또는 개선방법에 관한 것이다.

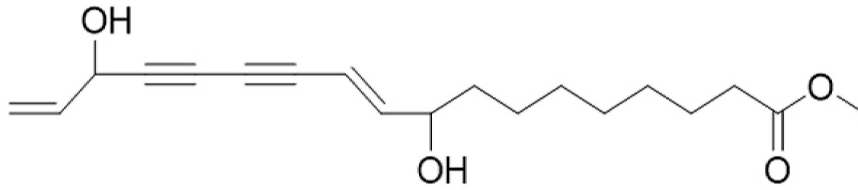
[0092] 본 명세서에서 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 대상(subject)에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미한다. 본 발명의 피부 색소침착 치료, 억제 또는 개선용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다.

[0093] 본 명세서에서 용어 "대상(subject)"은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함하고, 바람직하게는 포유류, 보다 바람직하게는 인간을 의미한다.

[0095] 본 발명의 또 다른 양태는, 상기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되는 화합물, 및 이들의 염(salts)으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 화합물의 피부 미백, 피부 색소침착 치료, 억제 또는 개선 용도에 관한 것이다.

[0097] 본 발명의 또다른 양태는, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 염(salts)에 관한 것이다:

[0098] [화학식 1]



[0099]

[0102] 본 발명의 또다른 양태는, 다음 단계를 포함하는 메틸(10E)-9,16-디하이드록시옥타데카-10,17-다이엔-12,14-다이이노에이트 또는 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올 화합물의 분리방법에 관한 것이다:

[0103] (a) 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf)을 극성용매로 추출하는 단계;

[0104] (b) 단계 (a)의 황칠나무잎 추출물로부터 에틸아세테이트 용매에 가용한 추출물만을 정제하여 에틸아세테이트 추출 분획물을 수득하는 단계; 및

[0105] (c) 에틸아세테이트 추출 분획물을 정제하여 메틸(10E)-9,16-디하이드록시옥타데카-10,17-다이엔-12,14-다이이노에이트 또는 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올을 수득하는 단계.

[0106] 황칠나무 잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf) 추출물로부터 분리된 미백활성 물질은 다음과 같다.

[0107] DMW-1: methyl(10E)-9,16-dihydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-diynoate; 메틸(10E)-9,16-디하이드록시옥타데카-10,17-다이엔-12,14-다이이노에이트,

[0108] DMW-2: (10E)-(-)-10,17-Octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol; (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올.

[0110] 이하, 상기 화합물의 분리방법에 대하여 상세히 설명한다.

[0111] 단계 (a): 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf)의 추출물 제조

[0112] 우선, 황칠나무잎(*Dendropanax morbifera* Lev. leaf)에 극성용매를 가하여 추출한다.

[0113] 황칠나무잎 추출물을 수득하는 방법은 상술한 바와 같다.

[0114] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 극성용매는 물 또는 탄소수 1 내지 3의저가 알코올이다.

[0115] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 황칠나무잎에 물 또는 메탄올을 가하여 80℃-120℃로 가열하여 추출물을 수득할 수 있다.

[0116] 단계 (b): 에틸아세테이트 추출 분획물 제조

[0117] 이어, 상기 단계 (a)의 황칠나무잎 추출물로부터 에틸아세테이트 용매에 가용한 추출물만을 정제함으로써, 에틸아세테이트 추출 분획물을 수득한다.

[0118] 본 발명의 일 구현예에 따르면 황칠나무잎 추출물 중량의 약 0.001 내지 100배, 바람직하게는 1 내지 70배, 더욱 바람직하게는 50배 부피 (v/w%)의 물을 가한 후, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 등의 비극성 용매를 이용한 통상적인 분획과정을 수행하여 비극성 용매에 가용한 비극성 용매 가용 추출 분획물을 수득할 수 있다.

[0119] 본 발명의 분리방법에서 사용되는 비극성 용매는, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 아세톤, 아세토나이트릴, 메틸아세테이트, 플루오로알칸, 펜탄, 2,2,4-트리메틸펜탄, 데칸, 사이클로헥산, 사이클로펜탄, 디이소부틸렌, 1-펜텐, 1-클로로부탄, 1-클로로펜탄, o-자일렌, 디이소프로필에테르, 2-클로로프로판, 톨루엔, 1-클로로프로판, 클로로벤젠, 벤젠, 디에틸 에테르, 디에틸 설파이드, 디클로로메탄, 1,2-디클로로에탄, 어닐린, 디에틸아민, 에테르, 사염화탄소 및 THF를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비극성 용매는 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 디클로로메탄이다. 본 발명의 특정

구현예에 따르면, 단계 (b)에서는 비극성 유기용매로서 (i) 헥산, 클로로포름, 및 에틸아세테이트를 순차적으로 이용하여 분배 분획물을 수득하거나; 또는 (ii) 디클로로메탄 및 에틸아세테이트를 순차적으로 이용하여 분배 분획물을 수득한다.

[0120] 한편, 비극성 용매를 이용한 분획물을 수득한 이후 남은 황칠나무잎 추출물로부터, 극성용매(예를 들어, 부탄올, 물 등)에 가용한 극성용매 가용 추출 분획물을 수득할 수 있다.

[0121] 본 발명의 분리방법에서 사용되는 극성 용매는, (i) 물, (ii) 알코올(바람직하게는, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 노말-부탄올, 1-펜탄올, 2-부톡시에탄올 또는 에틸렌글리콜), (iii) 아세트산, (iv) DMFO(dimethyl-formamide) 및 (v) DMSO(dimethyl sulfoxide)를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 극성 용매는 물 또는 알코올이다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 황칠나무잎 추출물에 부탄올을 가한 후 부탄올층과 수층의 분획물을 수득하였다.

[0122] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)는 다음과 같이 실시될 수 있다:

[0123] (b-1) 단계 (a)의 황칠나무잎 추출물로부터 디클로로메탄, 헥산, 클로로포름으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 비극성 용매에 가용한 추출물만을 포함하는, 추출 분획물을 분리하여 제거하는 단계; 및

[0124] (b-2) 단계 (b-1)의 추출 분획물을 분리하고 남은 황칠나무잎 추출물로부터

[0125] 에틸아세테이트 용매에 가용한 추출물만을 포함하는 에틸아세테이트 추출 분획물을 수득하는 단계.

[0127] 단계 (c): 메틸(10E)-9,16-디하이드록시옥타데카-10,17-다이엔-12,14-다이노에이트 또는 (10E)-(-)-10,17-옥타데카디엔-12,14-다이인-1,9,16-트리올 정제

[0128] 이어, 단계 (b)에서 수득한 에틸아세테이트 추출 분획물을 정제하여 각 화합물을 얻는다.

[0129] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 정제단계 (c)에서는 공지된 다양한 정제방법을 이용할 수 있으며, 예컨대 컬럼 크로마토그래피 및 박층크로마토그래피를 이용할 수 있다.

[0130] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)의 에틸아세테이트 추출 분획물을 컬럼에 로딩한 후, 비극성용매-극성용매의 용매 구배(gradient)를 이용하여 컬럼 크로마토그래피 정제를 실시할 수 있다.

[0131] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 클로로포름-메탄올의 용매 구배를 이용하여 정제된 에틸아세테이트 분획물을 수득할 수 있다.

[0132] 상기 정제된 에틸아세테이트 분획물은 극성 용매를 이동상으로 컬럼 크로마토그래피를 반복수행함으로써 화합물 DMW-1을 분리할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 정제된 에틸아세테이트 분획물을 YMC RP-18 컬럼 크로마토그래피를 반복수행하여, 화합물 DMW-1을 분리하였다.

[0133] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 극성 유기용매로서 메탄올-물을 이용할 수 있다.

[0134] 한편, 상기 정제된 에틸아세테이트 분획물은 비극성 용매를 이동상으로 컬럼 크로마토그래피를 반복수행함으로써 화합물 DMW-2를 분리할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 정제된 에틸아세테이트 분획물을 실리카겔 및 YMC RP-18 컬럼 크로마토그래피를 반복수행하여, 화합물 DMW-2를 분리하였다.

[0135] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 비극성 유기용매로서 헥산-아세톤을 이용할 수 있다.

[0136] 단계 (c)에서 이용가능한 극성 용매 또는 비극성 용매는 상술한 바와 같다.

발명의 효과

[0138] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0139] 본 발명은 황칠나무잎추출물 및 이로부터 분리된 신규 활성성분을 유효성분으로 함유하는 피부 색소침착 질환 또는 증상의 치료, 개선 또는 예방용 조성물, 또는 피부 미백용 조성물에 관한 것이다.

[0140] 본 발명의 추출물 및 이로부터 분리된 신규 활성성분은 흑색종에서 멜라닌 생성 억제와 멜라닌 생성 관련 단백질(MITF, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2)의 발현 억제 효과가 우수하였다. 따라서, 과색소 침착을 포함한 다양한

색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 화장료 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0141] 황칠나무잎추출물 및 2가지 단일 성분을 유효성분으로 함유하는 미백 활성을 갖는 조성물은, 과색소 침착을 포함한 다양한 색소 침착 질환의 예방 또는 치료할 수 있는 약학 조성물, 화장료 조성물 또는 식품 조성물로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0142] 도 1은 황칠나무 잎 물추출물(Dm)의 농도별 B16-F10 세포에서 α -MSH 유무에 따른 생존율에 미치는 영향을 나타낸다.

도 2는 황칠나무 잎 물추출물(Dm)의 농도별 B16-F10 세포에서 α -MSH에 의해 생성된 세포 내 티로시나아제 (intracellular tyrosinase)의 활성을 억제하는 정도를 나타낸다.

도 3a-3b는 황칠나무 잎 물추출물(Dm)의 농도별 B16-F10 세포에서 α -MSH에 의해 생성된 멜라닌 생성 저해 정도를 나타낸다. (3a) 멜라닌 함량; (3b) 세포의 펠렛 변화 사진.

도 4a-4b는 황칠나무 잎 물추출물(Dm)이 B16-F10 세포에서 α -MSH에 의한 활성화된 멜라닌 생성 관련 단백질의 억제정도를 나타낸다. (4a) MITF, 티로시나아제, TRP-1, TRP-2의 단백질; (4b) MITF, 티로시나아제, TRP-1, TRP-2 정량화 그래프.

도 5a-5f는 황칠나무 잎 물추출물(Dm)이 α -MSH에 의해 유도된 미백 관련 메커니즘에 관여하는 MAPKs 단백질의 인산화 억제를 나타낸다. MAPKs 단백질 인산화가 황칠나무 잎 추출물에 의해 억제되는 정도를 나타낸다. (5a) MAPKs (ERK, JNK, p38)의 단백질; (5b) MAPKs 정량화 그래프; (5c) 특이적 억제제(specific inhibitor) 처리를 통한 세포 내 티로시나아제 활성 변화 확인; (5d) 특이적 억제제 처리를 통한 멜라닌 생성 변화 확인; (5e) 황칠잎물추출물(Dm)과 p38 저해제 처리를 통한 세포 내 티로시나아제 활성 변화 확인; (5f) 황칠잎물추출물(Dm)과 p38 저해제 처리를 통한 멜라닌 생성 변화 확인.

도 6은 황칠나무 잎 물추출물(Dm)에서 분리한 5가지의 단일 성분인 레놀릭산 (Linolenic acid), 트리리놀레인 (Trilinolein), 메틸 클로로제네이트(methyl chlorogenate), 및 신규 물질인 DMW1과 DMW2의 멜라닌 생성 저해 정도를 나타낸다.

도 7a-7d는 황칠나무 잎 물추출물(Dm)에서 분리한 5가지의 단일 성분 중 가장 효과가 좋은 신규 물질인 DMW1 과 DMW2의 세포 내 티로시나아제 활성 저해 및 멜라닌 생성 억제 정도를 나타내는 그래프이다. (7a) 세포 내 티로시나아제 활성 (7b) 멜라닌 양; (7c) 세포의 펠렛 변화 사진; (7d)황칠 미백 유효성분 DMW-1과 DMW-2의 구조.

도 8은 황칠잎물추출물(Dm)과 갈화물추출물(Pf)을 단독처리 또는 혼합처리 (1:1, 3:1) 하였을 때 세포 내 티로시나아제 활성 저해 정도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0143] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0144] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0146] 실시예 1: 추출물의 제조

[0147] 1-1. 황칠나무 잎 물추출물(Dm)

[0148] 황칠나무 잎(장흥, 전라남도, 한국) 200 g에 4 L의 추출 용매 (증류수)를 가하여 4시간 동안 100℃에서 환류시켜 각각의 추출물을 수득하였다. 수득한 추출물을 여과지로 여과한 후, 여과액을 회전진공농축기로 감압 농축하였다.

[0149] 그 다음, 동결건조하여 얻은 각각의 추출물을 DPBS에 10 mg/mL 농도로 녹인 후 시린지 필터링(0.22 μ m)하였다. 이를 실험시료(황칠잎물추출물: Dm)로 사용하였다.

- [0151] 1-2. 갈화 물추출물(Pf)
- [0152] 갈화 (영주, 경상북도, 한국) 100 g에 1L 추출 용매 (증류수)를 가하여 4시간 동안 80℃에서 환류 시켜 총 2회 추출하여 추출물을 수득하였다. 수득한 추출물을 여과지로 여과한 후, 여과액을 회전진공농축기로 감압 농축하였다. 그 다음, 동결 건조하여 얻은 각각의 추출물을 DPBS에 10 mg/mL 농도로 녹인 후 시린지 필터링(0.22 μ m)하였다. 이를 실험시료 (갈화물추출물: Pf)로 사용하였다.
- [0154] 1-3. 황칠나무잎 및 갈화 혼합 추출물
- [0155] 황칠나무 잎 물추출물(Dm)과 갈화 물추출물(Pf)은 전체 조성물에 대하여 각각 0.03 중량% 또는 0.01 중량%로 혼합하였으며, 각 추출물의 혼합 중량비가 각각 1:1 또는 1:3 이 되도록 하였다.
- [0157] **실시예 2: 화합물의 분리**
- [0158] 건조하여 세절된 황칠나무잎(*Dendropanax Morbifera Leveille leaf*) 3.0 kg을 100% 메탄올 10 L로 3시간동안 3 회 환류 추출하였다. 이어 추출물을 여과하여 얻은 추출액을 감압농축하여 메탄올엑스 470 g을 수득하였다.
- [0159] 수득한 메탄올엑스 470 g에 증류수 2 L 및 디클로로메탄 2 L를 가하고 진탕하여 디클로로메탄층(A)과 수층(B)으로 분획하였다. 이후, 디클로로메탄층을 감압농축하여 디클로로메탄 분획물 159 g을 수득하였다.
- [0160] 상기 분획된 수층 (B) 2 L 에 에틸아세테이트 2 L를 가하고 진탕하여 에틸아세테이트층과 수층으로 나눈 다음, 에틸아세테이트층을 감압농축하여 에틸아세테이트 분획물 21 g을 수득하였다.
- [0161] 상기 분획된 수층(B) 2 L 에 부탄올 2 L를 가하고 진탕하여 부탄올층과 수층으로 나눈 다음, 부탄올층과 수층을 각각 감압농축하여 부탄올 분획물 56 g 및 수가용성 분획물 145 g을 수득하였다.
- [0162] 상기 수득한 에틸아세테이트 분획물을 실리카겔 컬럼에 로딩한 후, 클로로포름과 메탄올을 이동상으로 하여 용매 구배 (클로로포름-메탄올; 1:0, 60:1, 30:1, 15:1, 10:1, 7:1, 5:1, 3:1, 1:1, 0:1)로 용출하여 10 개의 에틸아세테이트 분획물 (EA1 ~ EA10)을 얻었다.
- [0163] 얻어진 EA3 분획 900 mg을 실리카겔 컬럼에 로딩한 후, 헥산과 에틸아세테이트를 이동상으로 하여 용매 구배 (헥산-에틸아세테이트; 3:1 ~ 1:6)로 기울기 용리하여 8 개의 분획물 (EA3A ~ EA3H)을 얻었다.
- [0164] 얻어진 EA3C 분획 70 mg을 MeOH-물 (3:1) 로 YMC RP-18 컬럼 크로마토그래피를 반복 수행하여 5.3 mg의 화합물 DMW-1을 수득하였다.
- [0165] 얻어진 EA3D 분획 238 mg을 n-헥산-아세톤 (1:1) 으로 실리카겔 및 YMC RP-18 컬럼 크로마토그래피를 반복수행하여 6.2 mg의 화합물 DMW-2를 수득하였다.
- [0167] **실시예 3: 화합물 DMW-1과 DMW-2의 구조 분석**
- [0168] 상기 실시예 2에서 수득한 화합물 DMW-1의 HR-MS 스펙트럼 (Agilent 6530 accurate mass QTOF LC/MS)을 측정하여([M+NH₄]⁺ m/z 336.2167, calcd for 336.2175), C₁₉H₂₆O₄의 분자식을 추정하였다. 1H-NMR, 13C-NMR, HMBC, HSQC 및 COSY 스펙트럼을 통해서 화합물 DMW-1은 천연에서 처음으로 분리되는 신규물질로 확인되었다. DMW-1은 폴리아세틸렌계 신규화합물인 methyl (10E)-9,16-dihydroxyoctadeca-10,17-dien-12,14-dienoate로 규명하였다.
- [0169] 화합물 DMW-2의 HR-MS 스펙트럼을 측정하여([M+HCOO]⁻ m/z 335.1872, calcd for 335.1858), C₁₈H₂₆O₃의 분자식을 추정하였다. 1H-NMR, 13C-NMR, HMBC, HSQC 및 COSY 스펙트럼을 통해서 (10E)-(-)-10,17-octadecadiene-12,14-diyne-1,9,16-triol인 프루티코트리올(fruticotriol)인 것으로 규명하였다.
- [0170] 하기 표 1에 화합물 DMW-1과 DMW-2의 물성치를 나타내었다.

표 1

-	-	화합물 1	-	화합물 2
위치	δ_c	δ_H (J in Hz)	δ_c	δ_H (J in Hz)

1	176.0	-	63.0	3.56, t (6.7)
2	34.8	2.34, t (7.5)	33.7	1.59*, m
3	26.0	1.62, m	26.9	1.37*, m
4	30.4	1.35*, m	30.7	1.37*, m
5	30.3	1.35*, m	30.6	1.37*, m
6	30.1	1.35*, m	30.5	1.37*, m
7	26.3	1.43*, m	26.4	1.54*, m
8	37.8	1.51, dt (11.7, 3.6)	37.8	1.53*, m
9	72.4	4.13, dtd (7.2, 5.7, 1.6)	72.5	4.14, m
10	151.9	6.34, dd (15.9, 5.7)	151.9	6.34, dd (15.9, 5.6)
11	108.4	5.79, ddd (15.9, 1.6, 0.9)	108.4	5.79, ddd (15.9, 1.6, 0.8)
12	78.0	-	78.0	-
13	74.0	-	74.0	-
14	70.6	-	70.6	-
15	82.2	-	82.2	-
16	64.0	4.96, dd (5.4, 1.1)	64.0	4.93, dd (5.5, 1.1)
17	138.1	5.94, ddd (17.1, 10.2, 5.4)	138.1	5.95, ddd (17.0, 10.2, 5.5)
18	116.6	5.42, d (17.1)5.22, d (10.2)	116.6	5.43, d (17.1) 5.22, d (10.2)
OCH ₃	52.0	3.67, s	-	-

* 신호가 중첩됨.

실험예 1: 세포 배양

마우스 흑색종 세포인 B16-F10은 한국 세포주 은행에서 구매하였으며, 10% FBS와 100 U/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 계대배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양되었다.

실험예 2: 세포독성 시험

세포독성시험은 MTS 분석법으로 시행되었으며, B16-F10 세포 (1×10^4 cells/well)를 하룻밤동안 배양하여 시료를 농도별로 α -MSH 유무에 따라 72시간 처리하였다. 상기 배양액에 MTS시약을 20 μ L 첨가하고, 2 시간 후에 마이크로플레이트 분광광도계(BioTek Instruments, Inc., VT, USA)를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포독성시험결과 농도별로 처리한 황칠잎물추출물(Dm)은 α -MSH 유무에 관계없이 세포생육을 저해하지 않는 것으로 나타났다. 즉, 세포독성이 없음을 확인하였다(도 1 참조).

실험예 3: 세포 내 티로시나아제(intracellular tyrosinase) 활성 저해시험

세포 내 티로시나아제 측정은 세포 용해액 내의 티로시나아제를 L-DOPA (2 mg/mL)을 처리하여 확인하였다. B16-F10 세포를 6-well 플레이트에 세포수가 1×10^5 cells/well 이 되도록 분주하고 24시간 배양하였다.

상기 배양액에 시료를 농도별로 2시간 전 처리하고, α -MSH (200 nM)로 72시간 동안 티로시나아제 활성화를 유도하였다. 배양 후 세포를 DPBS로 1회 세척한 후, lysis buffer (25mM Tris pH 7.5 with H₃PO₄, 2mM CDTA, 1% TritonX-100, 2mM DTT, 10% glycerol)에 포스파타아제 억제제 카테일을 첨가한 버퍼를 사용하여 세포 용해물(cell lysate)을 준비하였다. Bradford 시약으로 단백질 정량을 한 후, 단백질 50 μ g 과 L-DOPA를 혼합하여 37°C 인큐베이터에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 마이크로플레이트 분광광도계를 사용하여 490 nm에서 생성된 DOPA chrome을 측정하였다.

미백 효과를 세포 내 티로시나아제 활성 억제능으로 확인하였다. 그 결과, α -MSH를 처리한 세포의 세포 내 티

로시나아제는 α -MSH를 처리하지 않은 대조군과 비교했을 때 증가하였다. 황칠잎물추출물(Dm) 시료는 α -MSH에 의한 티로시나아제 활성을 용량 의존적으로 억제하였다(도 2 참조).

[0186] 실험예 4: 멜라닌 생성 억제 실험

[0187] B16-F10 세포를 6-well 플레이트에 세포수가 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 24시간 배양하였다. 상기 배양액에 시료를 농도별로 2시간 전 처리하고, α -MSH (200 nM)로 72시간 동안 멜라닌 생성을 유도하였다. 이후 세포를 DPBS로 1회 세척한 후, 트립신-EDTA 처리를 한 뒤 세포를 모아 원심 분리하였다. 펠렛(pellet)에 10% DMSO가 포함된 1N NaOH를 처리하고 60°C에서 1 시간동안 반응시켰다. 이후 마이크로플레이트 분광광도계를 사용하여 405 nm에서 생성된 멜라닌 양을 측정하였다.

[0188] 멜라닌 생성 억제 효과를 확인한 결과, α -MSH를 처리한 세포의 멜라닌 함량은 α -MSH를 처리하지 않은 대조군과 비교했을 때 증가하였다. 황칠잎물추출물(Dm) 시료는 α -MSH에 의한 멜라닌 생성을 용량 의존적으로 억제하였다(도 3a-3b 참조). 도 3b 는 펠렛의 색깔 변화를 사진으로 나타낸 것이다.

[0190] 실험예 5: 멜라닌 생성 관련 단백질, MITF, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 발현 억제 효능 평가 (Western-blotting)

[0191] 세포내 멜라닌 생성 관련 단백질 발현 양상측정은 웨스턴 블롯 분석을 적용하여 실시하였다.

[0192] 황칠잎물추출물의 멜라닌 생성 억제 효과를 알아보기 위하여 MITF (microphthalmia-associated transcription factor), 티로시나아제(tyrosinase), TRP-1 (tyrosinase-related protein-1), TRP-2 (tyrosinase-related protein-2)의 단백질의 양을 측정하였다.

[0193] B16-F10 세포를 6-well 플레이트에 세포수가 1.5×10^5 cells/well 이 되도록 분주하고 24시간 배양하였다. 상기 배양액에 시료(황칠잎물추출물: 30, 100, 300 μ g/mL)와 대조군 약물 (알부틴: 2 mM)을 2시간 전처리 후, α -MSH (200 nM)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 세포를 DPBS로 1회 세척한 후, lysis buffer (25mM Tris pH 7.5 with H3PO4, 2mM CDTA, 1% TritonX-100, 2mM DTT, 10% glycerol)에 포스파타아제 억제제 카테일을 첨가한 버퍼를 사용하여 세포 용해물을 준비하였다.

[0194] 상기 세포 용해물을 4°C 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상등 액을 총 단백질 추출액으로 사용하였다. Bradford 분석법(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)으로 단백질을 정량하였다. 정량한 단백질 20 μ g를 100°C에서 10분간 끓인 후, 10% SDS-PAGE에서 100 V에서 전기영동 하였다.

[0195] PVDF에 단백질을 부착하고, 5% skim milk로 블로킹(blocking)하였으며, MITF, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 의 1차 항체와 각각 반응시켰다. 이후 2차 항체로 HRP-컨쥬게이트된(conjugated) 항-마우스 항체로 처리하였다. 목적 단백질을 동정하기 위하여 기질로 ECL (enhancedchemiluminescence, Advansta Inc., CA, USA)을 사용하였다. 멤브레인(membrane)은 C300 chemiluminescence imager (Azure Biosystems, Inc., CA, USA)를 사용하여 밴드를 현상하였다.

[0196] 도 4a-4b는 황칠잎물추출물(Dm)의 α -MSH로 유도된 MITF, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 저해활성을 확인한 결과를 나타낸다. α -MSH에 의해 MITF, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 발현이 증가함을 확인하였다.

[0197] 황칠잎물추출물은 농도 의존적으로 MITF, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 네 개의 단백질에 대해 동시에 저해활성을 가지는 것으로 나타났다. 황칠잎물추출물은 대조군 약물인 알부틴(Arbutin)보다 강한 저해활성을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0199] 실험예 6: α -MSH로 유도되는 MARKs 활성화에 대한 억제효과

[0200] 시료에 의한 멜라닌 생성 신호경로에 어떠한 신호단백들이 관여하는지를 알기 위하여, MARKs (ERK, JNK, p38) 인산화를 웨스턴 블롯으로 분석하였다.

[0201] B16-F10 세포를 6-well plate에 세포수가 1.5×10^5 cells/well 이 되도록 분주하고 24시간 배양하였다. 상기 배양액에 시료(황칠잎물추출물: 30, 100, 300 μ g/mL)와 대조군 약물 (Arbutin: 2mM)을 2시간 전처리하였다. 이후, α -MSH (200 nM)를 처리하여 24시간 배양하였다. 상기 배양 후 세포를 DPBS로 1회 세척한 후, lysis

buffer (25mM Tris pH 7.5 with H3PO4, 2mM CDTA, 1% TritonX-100, 2mM DTT, 10% glycerol)에 포스파타아제 억제제 콕테일을 첨가한 버퍼를 사용하여 세포 용해물을 준비하였다.

[0202] 상기 세포 용해물을 4℃ 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 총 단백질 추출액으로 사용하였다. Bradford 분석(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)으로 단백질을 정량하였다. 정량한 단백질 20 µg를 100℃에서 10분간 끓인 후, 10% SDS-PAGE에서 100 V에서 전기영동 하였다.

[0203] PVDF에 단백질을 부착하고, 5% skim milk로 블로킹하였으며, ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, p38, p-p38의 1차 항체로 각각 반응시켰다. 이후, 2차 항체 HRP-컨쥬게이트된 항-래빗, 항-마우스 항체를 처리하였다.

[0204] 목적 단백질을 동정하기 위하여 기질로 ECL (enhanced chemiluminescence, Advansta Inc., CA, USA)을 사용한 후, 멤브레인을 C300 chemiluminescence imager (Azure Biosystems, Inc., CA, USA)를 사용하여 밴드를 현상하였다.

[0205] 도 5a-5b 에 나타난 바와 같이, α-MSH로 유도된 B16-F10 세포에서 황철염물추출물(Dm) 처리에 의하여 p38인산화가 감소하였다. 반면, ERK, JNK의 인산화는 증가하지 않았다. 이러한 결과는 MITF의 상위 단백질의 p38의 인산화를 조절함으로써 미백 활성을 나타냄을 의미한다.

[0207] 실험예 7: 황철염물추출물(Dm)과 p38 저해제가 세포 내 티로시나아제 활성화와 멜라닌 생성에 대한 저해 효과

[0208] 황철염물추출물의 멜라닌 생성 저해 기전으로 p38 신호 전달 경로의 영향을 알아보기 위해 p38 특이적 억제제인 SB203580을 사용하여 실험을 진행하였다.

[0209] B16-F10 세포를 6-well 플레이트에 세포수가 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 안정화하였다. 그 후 SB203580 (10 µM)을 1 시간 전처리 과정을 거친 뒤 앞의 실험에서와 동일하게 처리하였다. 즉, 황철염물추출물을 2시간 전 처리하, α-MSH (200 nM)로 72시간 동안 배양한 후 세포내 티로시나아제와 멜라닌 함량을 측정하였다.

[0210] 도 5c-5d에 나타난 바와 같이, α-MSH와 SB203580을 함께 처리한 군은 α-MSH를 단독 처리한 군에 비해 티로시나아제 활성화와 멜라닌 생성을 저해시켰고, α-MSH와 SB203580과 황철염물추출물 모두 처리한 경우를 비교하면 α-MSH와 SB203580을 함께 처리한 군에 비해 훨씬 더 티로시나아제 활성화와 멜라닌 생성을 저해하였다.

[0212] 실험예 8: 황철염물추출물(Dm)과 p38 저해제의 세포 내 티로시나아제 활성화 및 멜라닌 생성에 대한 저해 효과

[0213] 황철염물추출물의 멜라닌 생성 저해 기전으로 p38 신호 전달 경로의 영향을 알아보기 위해 p38 특이적 억제제인 SB203580을 사용하여 실험을 진행하였다.

[0214] B16-F10 세포를 6-well 플레이트에 세포수가 1.5×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 24 시간 동안 안정화하였다. 그 후 SB203580 (10 µM)을 1 시간 전처리한 뒤 앞의 실험에서와 동일하게 처리하였다. 즉, 황철염물추출물을 2시간 전 처리하고, α-MSH (200 nM)로 24 시간 동안 배양한 후 단백질 추출액을 웨스턴 블롯 분석을 통하여 멜라닌 생성 관련 단백질인 MITF 와 티로시나아제 단백질의 변화를 측정하였다.

[0215] 도 5e-5f에 나타난 바와 같이, α-MSH와 SB203580을 함께 처리한 군은 α-MSH를 단독 처리한 군에 비해 MITF 와 tyrosinase 단백질의 양이 감소하였고, α-MSH와 SB203580과 황철염물추출물 모두 처리한 경우를 비교하면 α-MSH와 SB203580을 함께 처리한 군에 비해 훨씬 더 MITF 와 티로시나아제 단백질의 양이 감소하였다.

[0217] 실험예 9: 황철염물추출물(Dm)에서 분리한 단일 성분의 세포 내 티로시나아제 활성화와 멜라닌 생성에 대한 저해 효과

[0218] 황철염물추출물에서 분리한 5가지의 단일 성분인 레놀릭산 (Linolenic acid), 트리리놀레인 (Trilinolein), 메틸 클로로제네이트 (Chlorogenic acid), 신규물질인 DMW1과 DMW2의 멜라닌 생성 저해 효과를 도 6에 표로 나타내었다.

[0219] 도 7a-7c에 나타난 바와 같이, α-MSH를 처리한 세포의 멜라닌 함량은 α-MSH를 처리하지 않은 대조군과 비교했

을 때 증가하였다. 신규물질인 DMW1과 DMW2는 α -MSH에 의한 세포 내 티로시나아제 활성과 멜라닌 생성을 용량 의존적으로 억제하였다. 신규 물질인 DMW1과 DMW2의 세포내 티로시나아제 활성 저해의 IC_{50} 는 각각 3.232 μ M 및 97.390 μ M이고, 멜라닌 생성 저해의 IC_{50} 는 각각 1.221 μ M 및 3.426 μ M 상당히 멜라닌 생성 저해 효과가 좋았다. 도 7c 는 펠렛의 색깔 변화를 사진으로 나타낸 것이다.

[0221] 실험예 10: 황칠나무잎물추출물(Dm)과 갈화물추출물(Pf)를 단독처리 또는 혼합처리 시 세포 내 티로시나아제 활성화 억제 효과

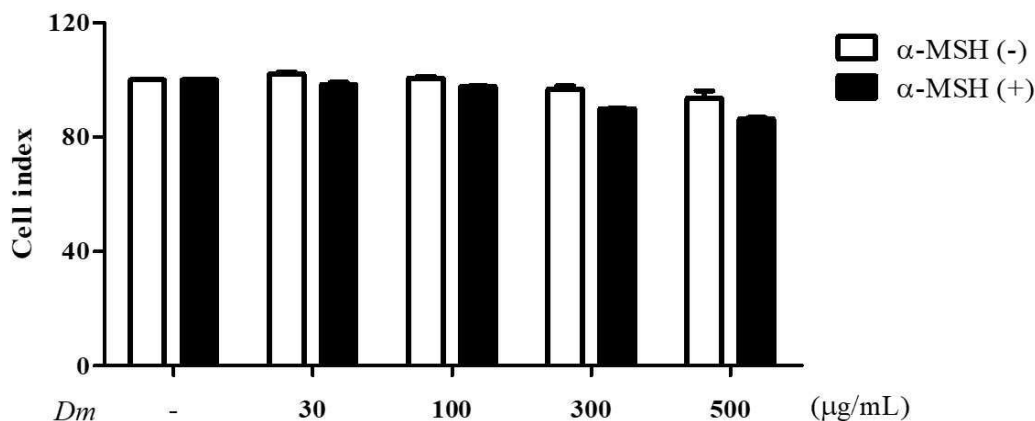
[0222] 황칠나무잎물추출물(Dm)과 갈화물추출물(Pf)를 단독처리 또는 혼합처리 (Dm:Pf =1:1, 3:1)하여 세포 내 티로시나아제 활성 저해 효과를 도 8 에 나타내었다. 세포 내 티로시나아제 활성 측정방법은 상술한 바와 같다.

[0223] 황칠나무잎물추출물(Dm)과 갈화물추출물(Pf)을 세포에 0.1 mg/ml (0.01%) 또는 0.3 mg/ml (0.03%) 로 처리하였다.

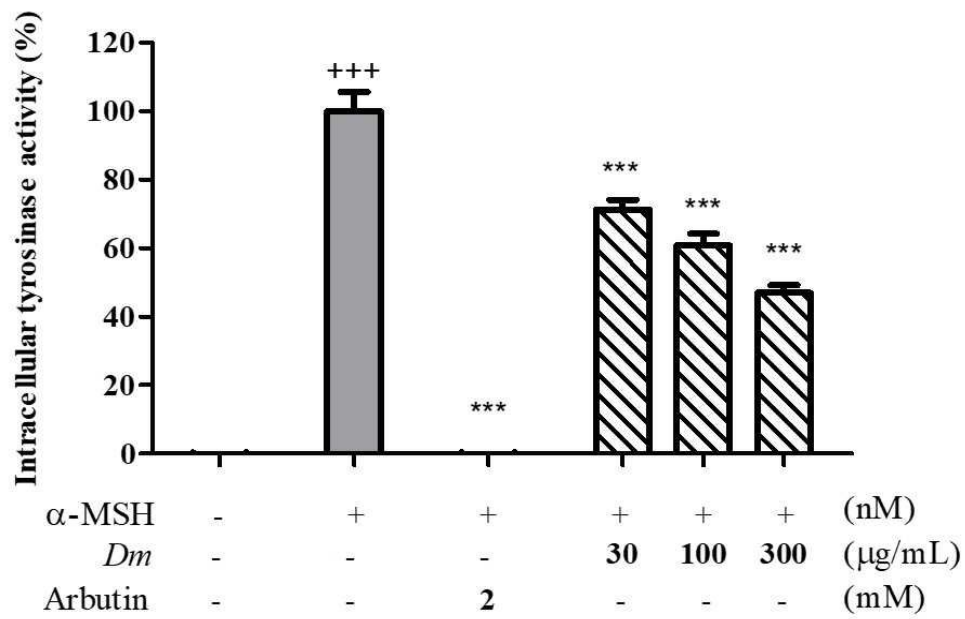
[0224] α -MSH를 처리한 세포에 황칠나무잎물추출물과 갈화물추출물을 단독처리한 경우보다, 황칠:갈화 = 1:1 또는 3:1의 비율로 혼합 처리한 경우 세포 내 티로시나아제 활성을 더욱 억제하였다. 특히 1:1 비율로 처리한 것의 효과가 가장 뛰어났다.

도면

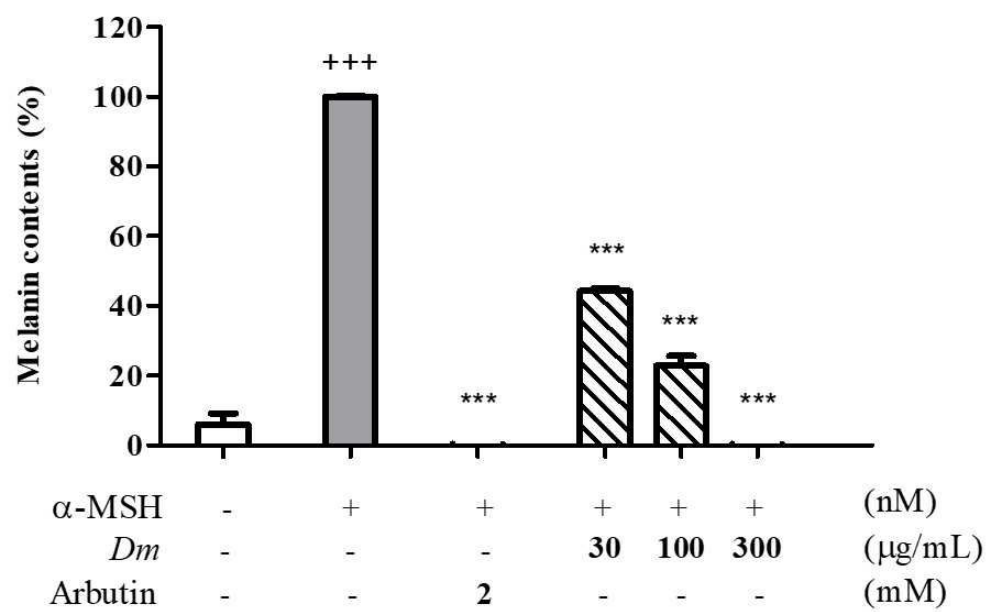
도면1



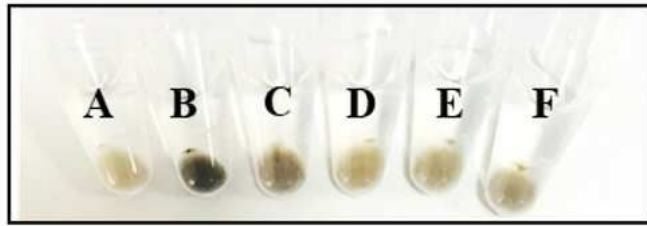
도면2



도면3a



도면3b



A: Control

B: α -MSH

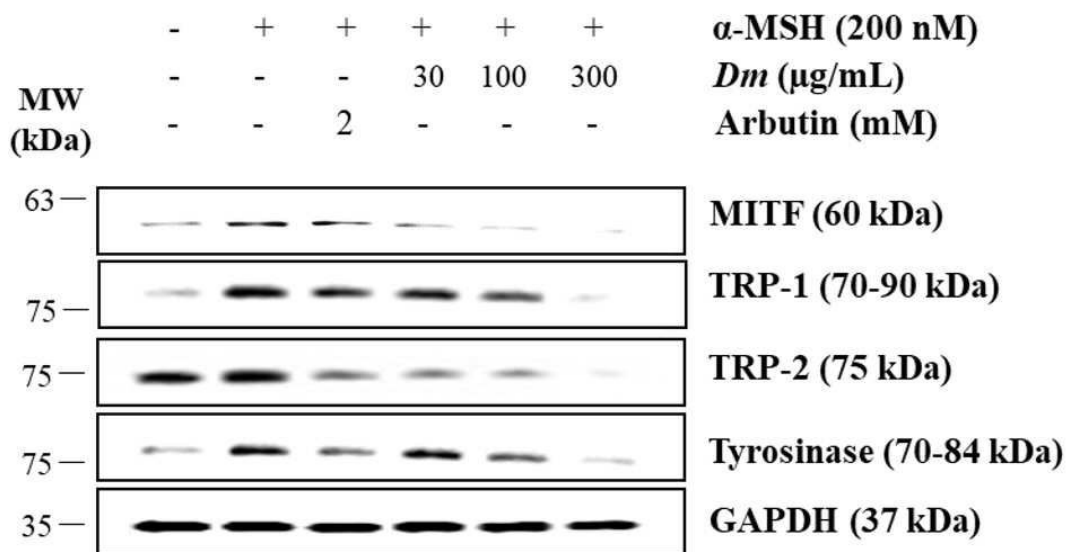
C: α -MSH + Arbutin 2 mM

D: α -MSH + *Dm* 300 μ g/mL

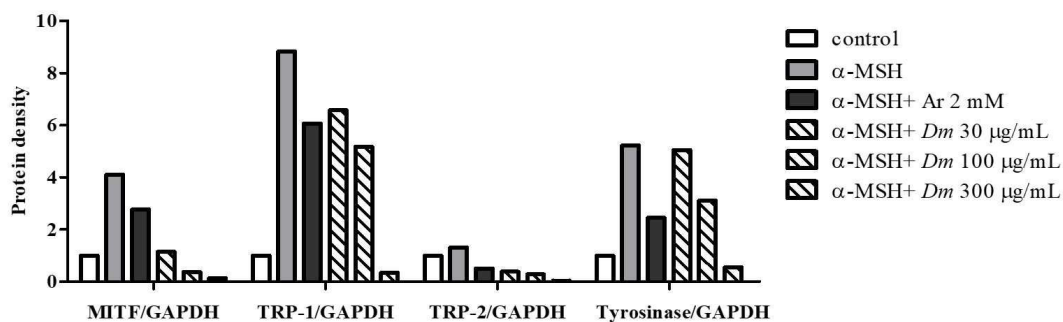
E: α -MSH + *Dm* 100 μ g/mL

F: α -MSH + *Dm* 30 μ g/mL

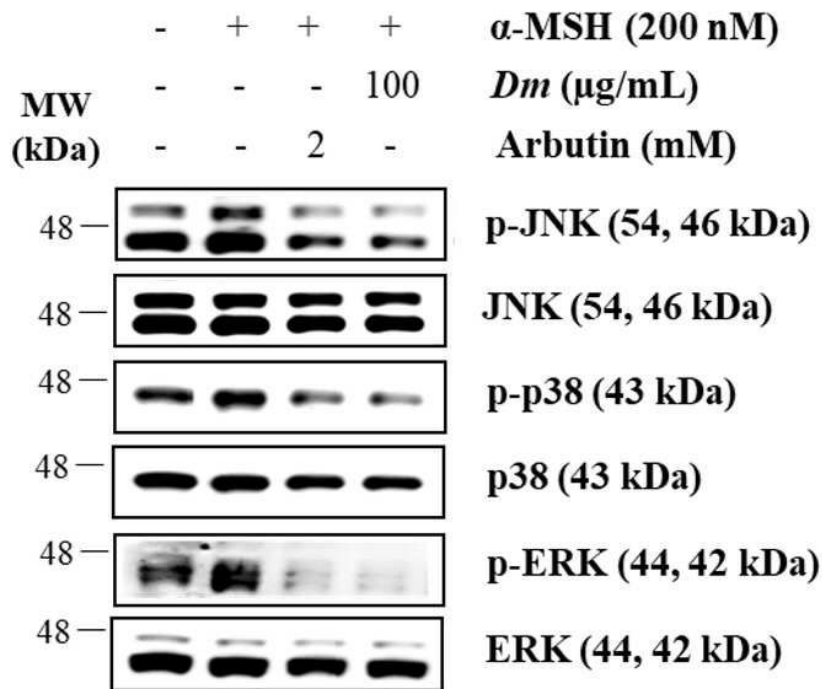
도면4a



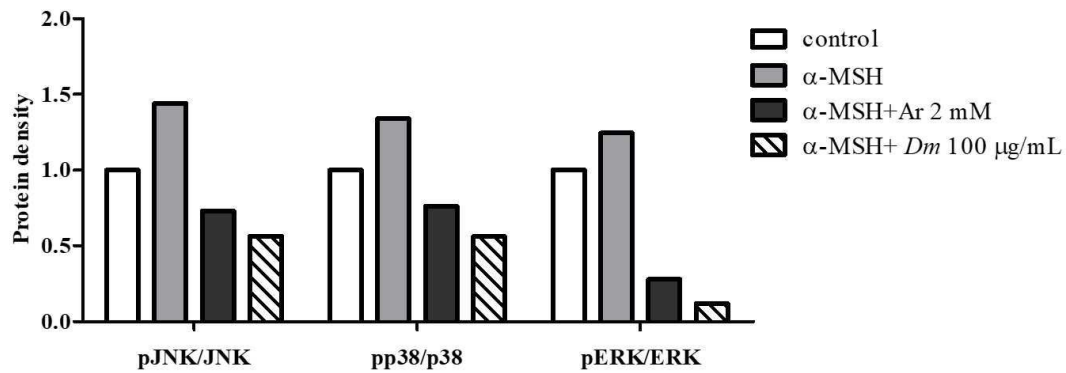
도면4b



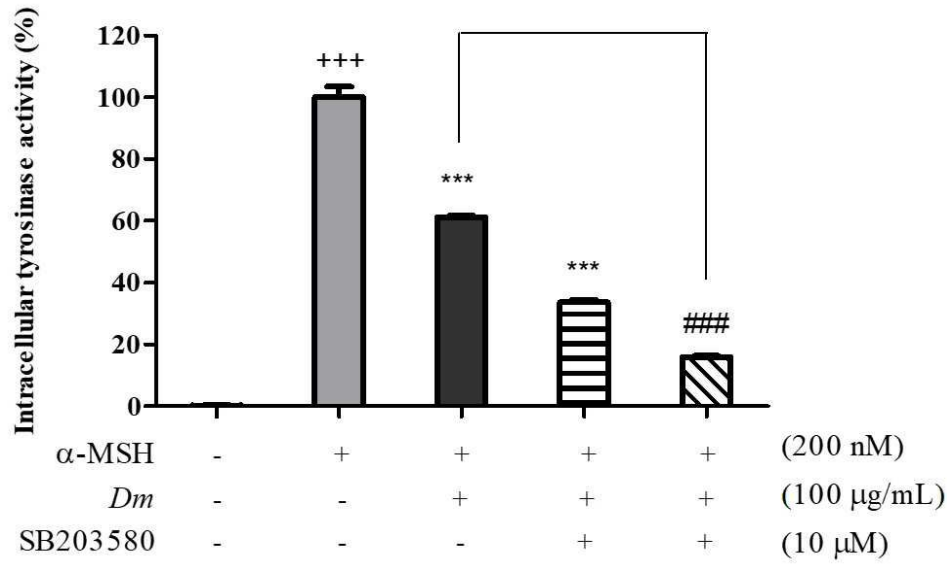
도면5a



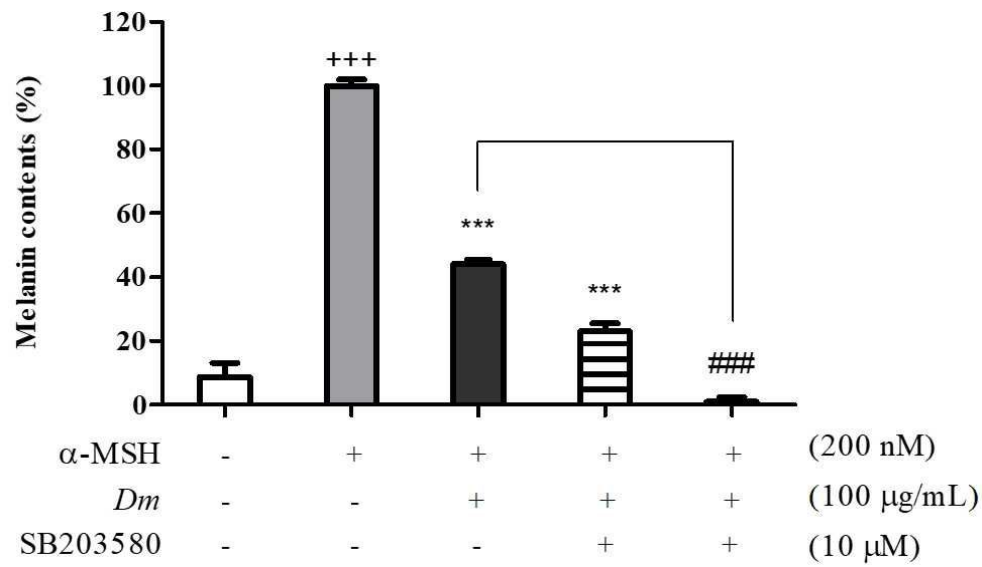
도면5b



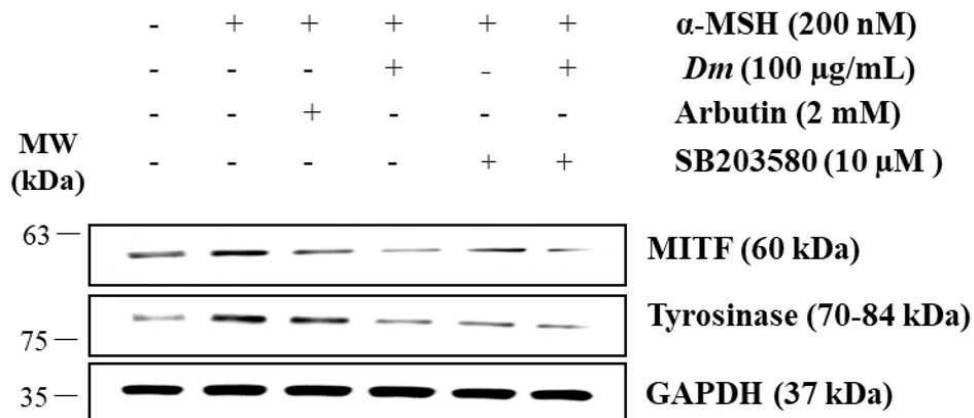
도면5c



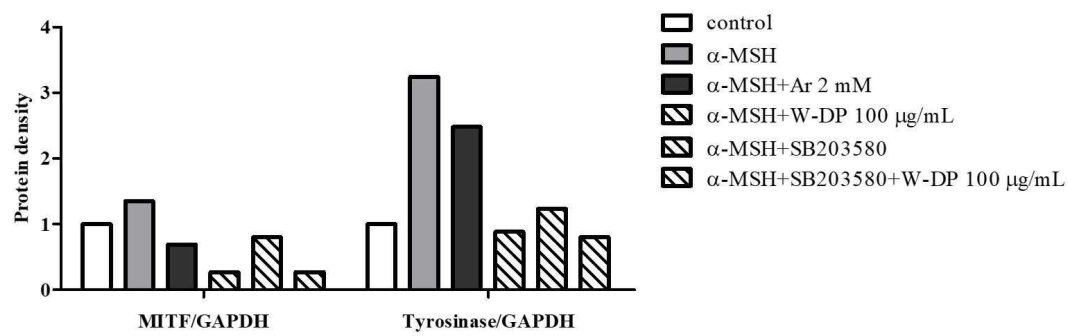
도면5d



도면5e



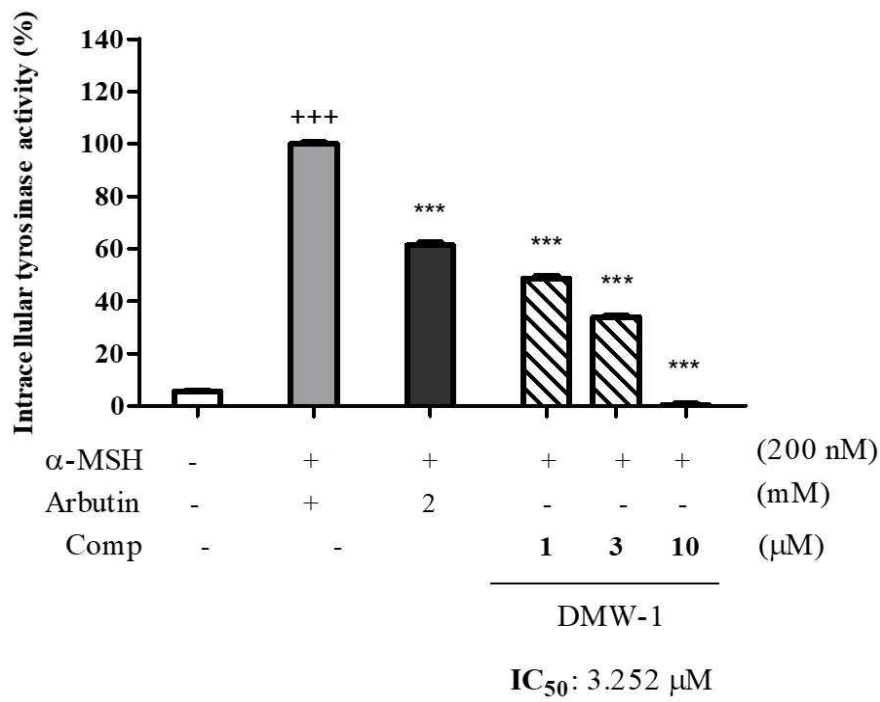
도면5f



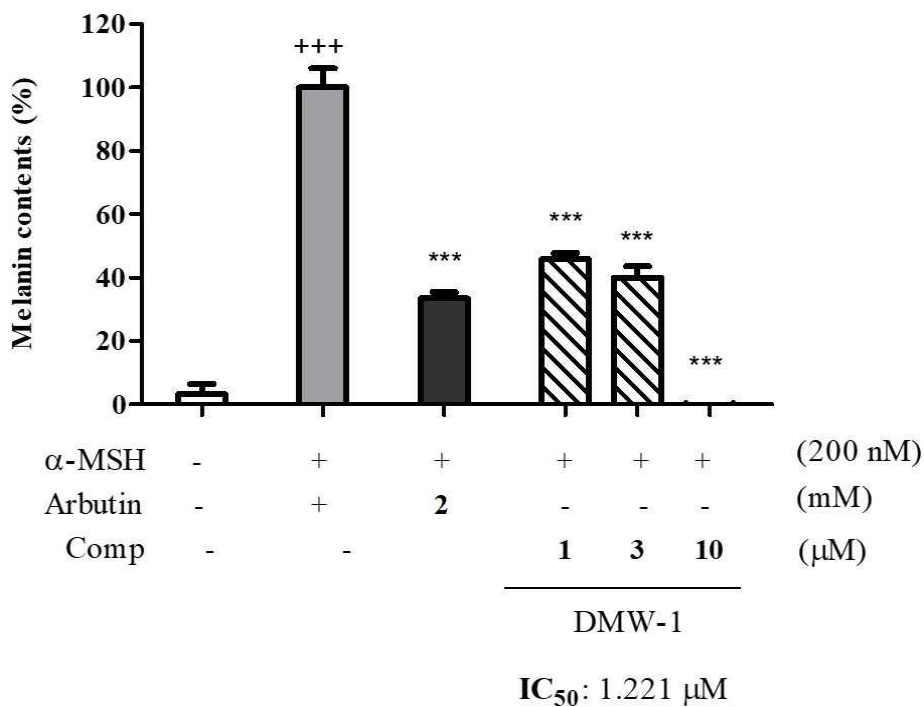
도면6

Name	MW	Final Concentration	Melanin contents (%)
Control	-	-	13.843 ± 3.737
α-MSH	-	200 nM	100 ± 0.000
Arbutin	272.25	2 mM	67.030 ± 0.182
Linolenic acid	278.43	10 μM	85.246 ± 1.639
Trilinolein	879.38	10 μM	81.420 ± 2.186
Methyl chlorogenate	426.72	10 μM	82.149 ± 2.451
DMW-1	318.1831	10 μM	8.379 ± 6.233
DMW-2	290.1882	10 μM	73.224 ± 1.093

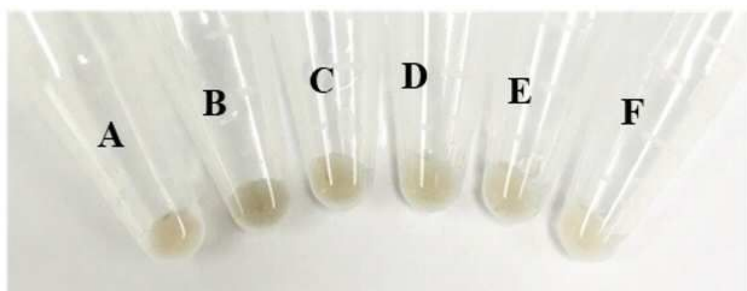
도면7a



도면7b



도면7c



A: Control

B: α -MSH

C: α -MSH + Arbutin 2 mM

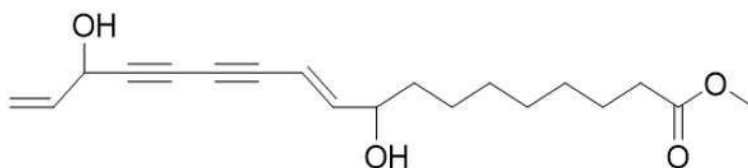
D: α -MSH + DMW-1 1 μ M

E: α -MSH + DMW-1 3 μ M

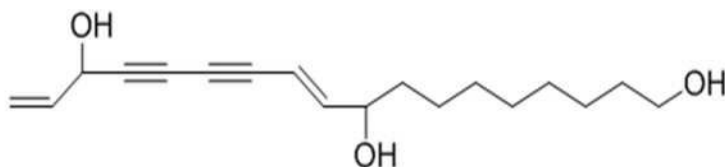
F: α -MSH + DMW-1 10 μ M

도면7d

DMW-1 (MW: 318.1831)



DMW-2 (MW: 290.1882)



도면8

