



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0110716
(43) 공개일자 2016년09월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/45 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01) *A61K 8/97* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/45 (2013.01)
A23L 1/3002 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0033718

(22) 출원일자 2015년03월11일

심사청구일자 2015년03월11일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

양재경

경상남도 진주시 강변길 31 103동 402호 (가좌동, 가호에일린의뜰)

정지영

경상남도 사천시 숲뫼1길 12 가동 403호 (향촌동, 에이스빌라9차)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

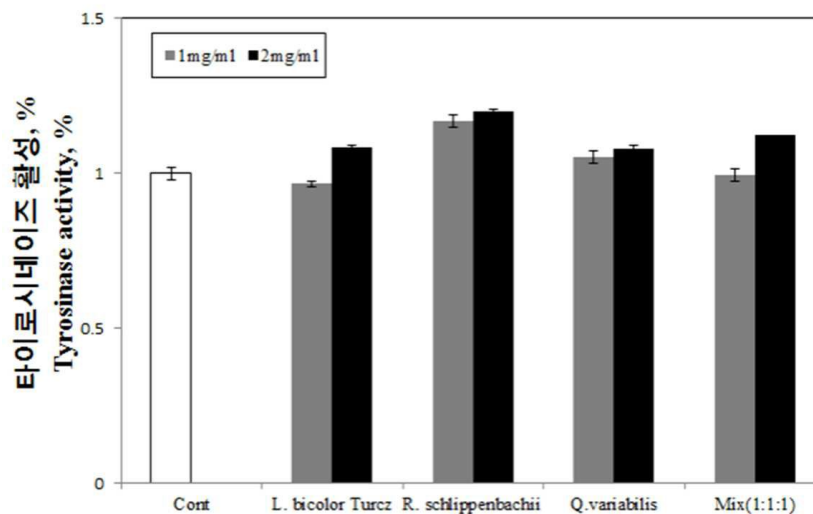
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 멜라닌 합성 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 철쭉 추출물, 싸리 추출물, 굴참나무 목부 추출물 또는 이들의 혼합물을 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물을 처리 시 멜라닌 합성을 유도하여 멜라닌 합성 장애에 의한 백반증 및 백모 개선 효과를 보이며, 이는 화학약품을 사용하지 않고 천연물만을 유효성분으로 한 백반증 또는 백모 개선용 조성물이므로, 백반증 또는 백모 개선을 위한 화장품, 약학 조성물 또는 건강기능식품으로써 유용하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/48 (2013.01)

A61K 8/97 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

A61K 2236/30 (2013.01)

A61K 2236/33 (2013.01)

(72) 발명자

송인관

경상남도 진주시 도동천로 227 (하대동)

김지수

경상남도 창원시 마산합포구 문화북2길 13 102호
(문화동, 동성아트빌라)

남정빈

경상남도 사천시 사천읍 선평길 42-4 (선인리)

강희영

경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76 6109동
204호 (이의동, e편한세상광고아파트)

김태홍

경상남도 창원시 성산구 동산로 115 121동 702호
(상남동, 대동아파트)

하시영

경상북도 구미시 형곡서로 11-15 102동 1507호 (형곡동, 형곡시영아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

철쭉 추출물을 포함하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 싸리 추출물, 굴참나무 추출물 또는 이들의 혼합물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 조성물은 철쭉 추출물 5 내지 90 중량%, 싸리 추출물 5 내지 90 중량% 및 굴참나무 추출물 5 내지 90 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

청구항 4

제 1항 및 제 2항에 있어서,

상기 추출물은 에탄올, 메탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 용매로 추출하는 것을 특징으로 하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

청구항 5

제 1항 및 제 2항에 있어서,

상기 조성물은 백반증 또는 백모 예방 또는 치료에 사용되는 것을 특징으로 하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

청구항 6

제 1항 및 제 2항에 있어서,

상기 조성물은 화장품 조성물인 것을 특징으로 하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

청구항 7

제 1항 및 제 2항에 있어서,

상기 조성물은 약학 조성물인 것을 특징으로 하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

청구항 8

제 1항 및 제 2항에 있어서,

상기 조성물은 건강기능식품인 것을 특징으로 하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 멜라닌 합성을 촉진하는 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 멜라닌 합성을 유도하여 백반증 또는 백모에 치료 효과가 있는 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 백반증은 피부 표피에 존재하는 멜라닌 세포에서 멜라닌이 오랫동안 생성되지 않아 하얀색 패치가 유발되는 색소 결핍증이다. 백반증이 유발되는 원인은 아직까지 정확하게 알려진 것은 없지만 유전적인 요인, 산화 활성 등의 자극에 의한 신경세포의 비정상적인 작용, 자가면역 파괴 등 멜라닌 세포의 기능을 감소시키는 것에 대한 가설들이 제시되고 있다.
- [0003] 최근에는 이러한 가설들이 복합적으로 작용하여 백반증이 유발된다는 설이 주목받고 있다. 백반증을 가진 많은 환자들에 있어서 하얀 반점은 삶의 질에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 최근 신문기사에 의하면 백반증 환자의 취업문제, 대인관계 문제가 심각한 것으로 보도되었다. 이는 백반증이 작은 장애로 보일 수 있지만 정도가 심한 색소 부족 질병을 가진 사람에게는 심리학적 자아 존중감 및 사회 활동에 영향을 줄 수 있다는 것을 의미한다.
- [0004] 백반증과 유사한 질병인 백모도 최근 경제 성장에 따른 문화 수준향상으로 외모에 대한 관심이 높아지면서 주목받고 있다. 백모는 모발색이 밝은 백인에 비해 흑인 모발을 가진 동양인에게 더욱 뚜렷이 나타나기 때문에 보건비용, 심리적인 면에서 연구대상이 되고 있다. 백모가 많을수록 백반증과 마찬가지로 심리적으로 우울하거나 스트레스가 증가하며 대인관계나 사회활동에서 불편함을 느끼고 있다.
- [0005] 이러한 백반증 또는 백모를 치료하기 위하여 색소 세포인 멜라닌 세포를 활성화 하는 것이 중요하며 멜라닌 세포의 활성화로 인한 멜라닌의 합성이 색소 재침착(repigmentation)에 큰 역할을 한다. 따라서 백반증 및 백모 치료의 목표는 주변 정상부 또는 병변 내부의 모낭에 존재하는 비활동성 멜라닌 세포 또는 색소 모세포를 자극하여 분화, 증식 및 이동을 촉진시키고 멜라닌을 생성하게 하는 것이다.
- [0006] 멜라닌 합성은 멜라닌 세포에서 멜라닌의 합성을 촉매 하는데 중요한 효소로 알려진 티로시나아제(tyrosinase)가 티로신(tyrosine)과 반응하여 도파(dopa)로, dopa가 다시 tyrosinase와 반응하여 도파-퀴논(dopa-quinone)으로 변환함으로써 최종적으로 멜라닌이 생성된다. 멜라닌은 검은색과 갈색을 띄는 유멜라닌(eumelanin)과 빨간색과 노란색을 띄는 페오멜라닌(pheomelanin)으로 나뉘며 pheomelanin의 경우 아미노산인 시스테인과 반응하면 생성되는 것으로 알려져 있다. 백반증 치료의 경우 검은색을 띄는 eumelanin의 생성이 높을수록 효과적이다.
- [0007] 현재, 백반증의 치료에 있어서 국부의 코르티코스테로이드, 칼시뉴린 억제제, 비타민 D 파생물, 광선치료(UVA, narrow band UVB, 광화학치료), 정상적인 멜라닌 세포를 가지고 있는 표피를 이식하는 수술적인 치료, 국부적인 치료와 광선치료의 조합을 포함한 다양한 치료들이 사용되고 있지만 비흑색종 피부암과 흑색종의 발생정도를 증가시키는 등 부작용을 가지고 있다.
- [0008] 더불어 백모 억제에 관한 연구에 사용되는 아이소뷰틸 메틸잔틴(isobutyl-methylxanthine, IBMX)은 멜라닌 생성을 촉진시키고 작은 안구증 연관 전사 요소(Microphthalmia-associated transcription factor, MITF)와 tyrosinase의 단백질 수준을 증가시켜 백모를 억제하는 효능을 가지고 있는 것으로 보고된 바 있다. 현재 백모 해결방안으로 다양한 모발 염모제가 사용되고 있는 실정이다. 그러나 이런 영구 염모제는 식물성 염모제, 금속성 염모제, 합성 염모제 등으로 이루어지기 때문에 화학작용으로 인하여 모발과 두피에 손상, 자극 등의 부작용을 가지고 있다.
- [0009] 따라서 부작용이 적으며 멜라닌 생성에 효과적인 천연물에 대한 연구와 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 10-1282280호.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 따라서 본 발명은 부작용이 적은 천연물질을 포함하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물을 제공하는 데 그 목적이 있

다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 철쭉 추출물을 포함하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 철쭉 추출물, 싸리 추출물, 굴참나무 추출물 또는 이들의 혼합물을 포함하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 철쭉 추출물, 싸리 추출물, 굴참나무 목부 추출물 또는 이들의 혼합물을 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물을 처리 시 멜라닌 합성을 유도하여 멜라닌 합성 장애에 의한 백반증 및 백모 개선 효과를 보이며, 이는 화학약품을 사용하지 않고 천연물만을 유효성분으로 한 백반증 또는 백모 개선용 조성물이므로, 백반증 또는 백모 개선을 위한 화장품, 약학 조성물 또는 건강기능식품으로써 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명에 따른 철쭉, 싸리와 굴참나무 목부 에탄올 추출물 추출물의 버섯형 티로시나아제 활성을 분석한 것이고,

도 2 및 도 3은 본 발명에 따른 철쭉, 싸리와 굴참나무 목부 에탄올 추출물의 B16 흑색종(melanoma) 세포에 대한 세포독성을 분석한 것이고,

도 4는 본 발명에 따른 철쭉, 싸리와 굴참나무 목부 에탄올 추출물의 B16 melanoma 세포에서 티로시나아제(tyrosinase) 활성에 대한 영향을 분석한 것이고,

도 5는 본 발명에 따른 철쭉, 싸리와 굴참나무 목부 에탄올 추출물의 B16 melanoma 세포에서 멜라닌 생성에 대한 영향을 분석한 것이고,

도 6은 (C57/BL6×BALB)F1 마우스의 털에서 본 발명에 따른 철쭉, 싸리와 굴참나무 목부 에탄올 추출물 처리군의 멜라닌 색소 침착에 대한 육안적인 영향을 나타낸 것이고,

도 7은 (C57/BL6×BALB)F1 마우스의 털에서 본 발명에 따른 철쭉, 싸리와 굴참나무 목부 에탄올 추출물 처리군의 멜라닌 생성에 대한 영향을 분석한 것이고,

도 8은 (C57/BL6×BALB)F1 마우스의 피부에서 본 발명에 따른 철쭉, 싸리와 굴참나무 목부 에탄올 추출물 처리군의 멜라닌 세포 변화에 대한 영향을 육안적으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명의 발명자들은 내성이나 안전성에 대한 문제가 대두되어지지 아니한 천연물 추출물의 기능성에 대하여 연구하던 중, 철쭉, 싸리와 굴참나무 목부 에탄올 추출물을 마우스에 처리할 시 멜라닌 합성이 유도되어 백반증과 백모에 개선 효과를 보이는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0017] 상기 철쭉(*Rhododendron schlippenbachii*)은 진달래과(Ericaceae) 진달래속(*Rhododendron*)에 속하는 식물로써 화경에 뚜렷한 검은 점들을 가지고 있으며, 꽃받침에 끈적끈적한 액이 있다. 철쭉의 꽃에는 그레이아노톡신(grayanotoxin) 등의 독성성분으로 인한 호흡마비 등의 위험성이 알려져 있으나, 철쭉의 잎과 목부는 고혈압의 치료 목적이나 당뇨와 관련하여 당대사 억제에 관련된 연구 소재로 사용되어 왔다. 국내에서는 주로 관상용으로 재배되는 특성상 철쭉 목부의 다양한 생리활성에 대한 연구는 아직까지 미흡한 상태이며, 일부 독성에 대한 증례만 보고되고 있다.

[0018] 상기 싸리(*Lespedeza bicolor*)는 콩과 식물로 줄기가 매우 곧고 꽃대가 길게 나오는 것을 특징으로 하고 있다. 싸리 목부에는 항산화 활성 및 항균활성을 가지고 있으며 구성성분으로는 여러 가지 알칼로이드, 플라보노이드, 아스코르빈산, 사포닌, 탄닌 등을 포함하고 있다. 싸리나무 추출물은 예로부터 타박상, 두통, 심장병, 알레르기, 아토피 등 다양한 질병을 완화시키는데 효과가 있다고 알려져 있다. 또한 싸리나무 추출물을 이용한 전자공여능, 과산화물제거효소(Superoxide dismutase, SOD) 유사 활성, 아질산염 소거능에 대한 연구가 수행되어 왔다. 하지만 싸리나무의 목부를 이용한 생리활성에 대한 연구 결과가 미비하며 싸리의 뿌리 및 꽃을 이용하여 의학 분야에 응용한 연구 결과가 다수인 것으로 보고되고 있다.

- [0019] 상기 굴참나무(*Quercus variabilis*)는 쌍떡잎식물 참나무목 참나무과의 낙엽교목으로 나무껍질이 노란빛을 띠는 것을 특징으로 하고 있다. 굴참나무는 예로부터 종실을 식용으로 사용하였고 탄닌(tannin), 유지방, 퀘세틴(quercetin) 등 여러 성분이 함유되어 있어 식품으로는 물론 약용 식물로도 아주 유용하여 장 및 혈관을 수축시키는 작용을 한다. 더불어 민간요법에서 일과 껍질을 수렴성 지혈, 설사, 탈황, 치질을 비롯하여 거담, 진통 등에 사용되어 왔다. 참나무류에 대한 물리적 특성, 생육특성, 분포 및 화학적 특성에 대한 연구는 그 동안 많이 진행되어 왔지만 이를 활용한 의학 분야의 개발은 미비한 실정이다.
- [0020] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0021] 본 발명은 철쭉 추출물을 포함하는 멜라닌 합성 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0022] 더불어 상기 조성물은 싸리 추출물, 굴참나무 추출물 또는 이들의 혼합물을 더 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 조성물은 철쭉 추출물 5 내지 90 중량%, 싸리 추출물 5 내지 90 중량% 및 굴참나무 추출물 5 내지 90 중량%를 포함한다.
- [0024] 상기 범위를 벗어날 시, 각 성분의 효능이 제대로 발휘되지 않는 문제가 발생할 수 있다.
- [0025] 상기 추출물은 에탄올, 메탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 용매로 추출하며, 에탄올을 사용하는 것이 바람직하지만 이제 제한되지는 않는다.
- [0026] 상기 조성물은 멜라닌 형성 장애에 의하여 발생하는 백반증 또는 백모의 예방 또는 치료용 조성물로 사용될 수 있다.
- [0027] 상기 조성물은 화장품 조성물, 약학 조성물 또는 건강기능식품으로써 제공될 수 있다.
- [0028] 상기 화장품 조성물은 피부 외용연고, 기초화장품, 메이크업 화장품, 바디 화장품 또는 면도용 화장품 등의 용도로 제공될 수 있으며, 상기 기초화장품의 예로는 에센스, 로션, 크림, 젤, 화장수, 팩, 마사지 크림, 유액 등이 있을 수 있고, 상기 메이크업 화장품의 예로는 파운데이션, 립스틱, 아이섀도, 아이라이너, 마스카라, 아이브로우 펜슬, 메이크업 베이스 등이 있을 수 있으며, 바디 화장품으로는 비누, 액체 세정제, 입욕제, 썸 스크린 크림, 썸 오일 등이 있을 수 있고, 면도용 화장품으로는 애프터셰이브로션, 셰이빙 크림 등이 있다.
- [0029] 상기 유효성분인 철쭉 추출물, 싸리 추출물, 굴참나무 목부 추출물 또는 이들의 혼합물 외에 추가로 기능성 물질이나 물성 개선을 위한 부형제, 희석제 등의 물질이 포함될 수 있다.
- [0030] 일 예로, 상기 화장품 조성물에는 물성 개선을 위하여 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제, 보습제, 점증제, 무기염류 또는 합성 고분자 물질 등이 추가로 첨가될 수 있다. 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로 유지 성분, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 안료, 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, pH 조정제, 알코올, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한제 또는 정제수 등일 수 있다.
- [0031] 상기 유효성분 이외의 첨가해도 되는 배합 성분은 한정되지 않으며, 상기 어느 성분도 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 배합 가능하다.
- [0032] 또한, 상기 화장품 조성물은 용액, 유화물, 점성형 혼합물 등의 형상을 취할 수 있으며, 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형일 수 있고 일 예로 스프레이, 유액, 크림, 화장수, 팩, 파운데이션, 로션, 미용액, 모발 화장료 등의 제형일 수 있다.
- [0033] 보다 구체적으로 본 발명의 화장품 조성물은 스프레이, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클린저, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트리젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지 크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스 및 팩의 제형을 포함할 수 있다.
- [0034] 일 예로, 본 발명의 제형이 스프레이 또는 파우더인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있으며, 특히 본 발명의 제형이 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 진분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

- [0036] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제, 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 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.
- [0038] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설소속신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아מיד, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0039] 상기 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0042] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다.
- [0043] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0044] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0045] 본 발명에 따른 약학 조성물의 유효성분인 철쭉 추출물, 싸리 추출물, 굴참나무 목부 추출물 또는 이들의 혼합물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중 또는 질환에 따라 달라질 수 있으나, 0.001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 약학 조성물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0047] 상기 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 기관지 내 흡입, 자궁 내 경막 또는 뇌척수관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0048] 상기 건강식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강식품은 유효성분인 철쭉 추출물, 싸리 추출물, 굴참나무 목부 추출물 또는 이들의 혼합물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0049] 상기 건강식품에 함유된 철쭉 추출물, 싸리 추출물, 굴참나무 목부 추출물 또는 이들의 혼합물의 유효용량은 상기 약학 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가

없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0050] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0052] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0054] <실시예 1> 철쭉, 싸리와 굴참나무 목부 에탄올 추출물 제조

[0055] 본 발명에 사용한 철쭉, 싸리와 굴참나무 목부는 경남 진주시 진주대로 경상대학교 학술림에서 채취한 후 -75℃ 저온 저장고에 보관하여 사용하였으며 이를 실온에서 음건시킨 후 사용하였다.

[0056] 건조한 철쭉, 싸리와 굴참나무 목부를 각각 작은 조각(약 3cm)으로 자른 후 200g에 95% 에탄올 500mL를 혼합하여 실온에서 7일간 추출했다. 추출물은 여과지(No.2, Whatman)로 여과한 후 동결건조기(freeze dryer)를 이용하여 여과된 추출액을 분말로 제조하였다.

[0058] <실시예 2> 항산화 활성 분석 (DPPH 라디칼 소거능 검토)

[0059] 추출물의 항산화 활성은 2,2-디페닐-1-피크릴히드라질(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH, Sigma, USA)을 이용한 DPPH 법에 의거하여 실시하였다(Monica et al., 2007 참고). 상기 실시예 1에서 제조한 추출물을 100ppm의 농도로 희석하여 이를 96 웰 플레이트(Falcon[®], USA)의 각 웰에 50μl씩 넣었다. 그리고 0.2 mM DPPH 용액을 200μl 첨가하고 실온에서 30분간 반응시킨 후 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, Anthos[®], Austria) 리더기로 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 뷰틸레이트하이드록시톨루엔(Butylated Hydroxy Toluene, BHT, Sigma, USA) 및 95% 에탄올을 사용하여 동일한 방법으로 측정하였다.

[0060] 그 결과, 하기 표 1과 같이 철쭉, 싸리, 굴참나무, 혼합(철쭉 에탄올 추출물 : 싸리 에탄올 추출물 : 굴참나무 에탄올 추출물, 1:1:1 (w/w/w)) 에탄올 추출물 각각 약 87, 91, 82 또는 90%로 양성 대조군인 BHT와 비슷한 활성(95%)을 가지는 것으로 확인되었다. 항산화 활성은 폴리페놀 함량과 비례적인 관계로, 높은 폴리페놀 함량 및 생리활성 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

표 1

추출물	항산화 활성(%)	총 폴리페놀 함량(mg/g)*	총 플라보노이드 함량(mg/g)**
싸리 에탄올 추출물	87.3 ± 0.5	106.9 ± 0.7	33.5 ± 0.5
철쭉 에탄올 추출물	91.9 ± 0.1	252.1 ± 0.0	74.0 ± 0.4
굴참나무 에탄올 추출물	82.7 ± 0.1	116.4 ± 0.7	27.7 ± 0.1
추출물 혼합	90.9 ± 0.5	200.2 ± 0.1	51.4 ± 0.1
BHT	95.5 ± 0.0	-	-

[0062] *: 파우더의 갈산 등가의 mg/g

[0063] **: 파우더의 등가의 케세틴 등가의 mg/g

[0065] <실시예 3> 폴리페놀 함량 분석

[0066] 추출물의 폴리페놀 함량은 폴린-시오칼토(Folin-Ciocalteu)법에 의거하여 실시하였다(Luis et al., 2007 참고). 갈산(Sigma, USA) 30 μl (1 mg/mL)를 증류수 3 mL에 혼합하고 100 μl의 Folin-Ciocalteu(Sigma, USA)시약을 첨

가하여 7분간 방치한 다음 300 μ l의 탄산나트륨(sodium carbonate)을 혼합하고 30분간 반응시켰다. 그 후 UV-분광광도계(UV-spectrophotometer, U-3000[®], Hitachi, Japan)를 사용하여 765nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였다. 동일한 방법으로 상기 실시예 1에서 제조한 추출물 분말의 흡광도를 측정한 후 검량선과 비교하여 추출물의 폴리페놀함량을 측정하였다.

[0067] 그 결과, 상기 실시예 2 중 표 1과 같이 싸리 에탄올 추출물, 철쭉 에탄올 추출물과 굴참나무 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 106.9mg/g, 252.1mg/g 또는 116.4mg/g이었고 싸리, 철쭉, 굴참나무 목부 에탄올 추출물의 1:1:1 (w/w/w) 혼합물은 200.2 mg/g 이었다.

[0069] <실시예 4> 플라보노이드 함량 분석

[0070] 추출물의 플라보노이드 함량은 데이비스(Davis's) 법에 의거하여 실시하였다(Monica et al., 2007 참고). 상기 실시예 1에서 제조한 추출물 분말 0.5g을 메탄올 1ml와 혼합하고 디에틸렌 글리콜(diethylene glycol)을 10ml씩 가하여 혼합한 후 1N NaOH를 1ml 첨가하였다. 이를 37℃ 워터 배스(water bath)에서 1시간 반응시키고 UV-spectrophotometer (U-3000[®], Hitachi, Japan) 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 퀘세틴을 사용하였다.

[0071] 그 결과, 상기 실시예 2 중 표 1과 같이 싸리 에탄올 추출물과 철쭉 에탄올 추출물, 굴참나무 에탄올 추출물의 플라보노이드 함량은 각각 33.5mg/g, 74.4mg/g 또는 27.7mg/g이었고 싸리 에탄올 추출물과 철쭉 에탄올 추출물, 굴참나무 에탄올 추출물의 1:1:1 (w/w/w) 혼합물은 51.4mg/g을 나타냈다.

[0073] <실시예 5> L-도파(L-DOPA)를 이용한 버섯형 티로시나아제(mushroom tyrosinase) 활성능 분석

[0074] 싸리, 철쭉, 굴참나무 에탄올 추출물의 멜라닌 생성능을 확인하기 위하여 멜라닌 생성에 중요한 작용을 하는 티로시나아제(tyrosinase)에 직접적인 작용을 관찰하였다. Tyrosinase는 L-티로신(L-tyrosine)을 L-DOPA로 전환시키고 이어서 L-도파(L-DOPA)를 L-도파 퀸온(L-DOPA quinone)으로 산화시킨다. 그러므로 tyrosinase의 기질로서 L-DOPA를 이용하여 정제한 mushroom tyrosinase의 활성을 측정하였다(Chang et al., 2007 참고). 0.1M의 인산완충액(phosphate buffer, pH 6) 100 μ l와 추출물 20 μ l(1mg/ml, 2mg/ml)를 혼합한 다음 mushroom tyrosinase (2000U/ml in phosphate buffer, pH 6) 20 μ l를 첨가하고 37℃에서 10분 동안 반응시켰다. 반응물은 UV-spectrophotometer (U-3000[®], Hitachi, Japan)를 사용하여 475nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성은 하기 수학적 식 1에 의거하여 도출하였다.

수학적 식 1

$$Tyrosinase\ activity = \frac{\text{추출물첨가구흡광도}}{\text{추출물무첨가구흡광도}} \times 100$$

[0075]

[0076] 그 결과, 도 1과 같이 L-DOPA를 기질로 사용한 경우 싸리와 철쭉, 굴참나무 에탄올 추출물을 2mg/mL 반응시켰을 때 대조군에 비해 각각 약 8%, 20% 또는 8% 증가하였다. 싸리, 철쭉, 굴참나무 에탄올추출물의 1:1:1 (w/w/w) 혼합물에 대한 mushroom tyrosinase 활성은 대조군에 비해 12% 증가한 것으로 확인되었으며 싸리 에탄올 추출물 및 굴참나무 에탄올 추출물의 단독 처리보다 비교적 높은 활성을 보였다.

[0078] <실시예 6> B16 흑색종(melanoma) 세포에서의 활성 분석

[0079] 1. B16 흑색종(melanoma) 세포 배양

[0080] C57BL/6J 마우스에서 유래한 B16 melanoma 세포는 아주대학교병원으로부터 분양받아 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, PBS)가 함유된 DMEM 배지로 37℃, 0.5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

[0081] 2. B16 melanoma를 이용한 세포 독성 분석

[0082] MTT 분석법은 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸리움 브로마이드(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT) 시약이 세포 내로 흡수된 후 미토콘드리아의 숙신산 탈수소효소(succinate dehydrogenase)에 의해 포르말잔(formazan)을 형성하는데 이 물질의 세포 내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하는 것으로써 세포의 성장율을 측정하는 대표적인 방법이다.

[0083] B16 melanoma 세포를 24 웰 플레이트에 적정 세포수 (7×10^3 cells/well)로 분주하고 37°C, 0.5% CO₂ 배양기에 서 24시간 배양한 다음 싸리, 철쭉 및 굴참나무 에탄올 추출물을 각각 농도별(5, 10, 20 mg/ml)로 희석시켜 이 를 1μl씩 넣은 후 0.5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 배양 후 플레이트의 배지를 제거한 다음 PBS로 1회 세척하고 MTT(5mg/ml)를 배지 500μl 당 50μl씩 넣은 후 37°C, 0.5% CO₂ 배양기에서 1시간 배양하였다. 반응 후 배지를 제거하고 디메틸설폭사화물(dimethyl sulfoxide, DMSO) 500μl씩 넣고 플레이트 셰이커(plate shaker)에 서 15분간 세포를 용해한 다음 ELISA 리더기로 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 성장률은 무처리구인 대조군과 비교하여 나타내었다.

[0084] 그 결과, 도 2와 같이 B16 melanoma 세포의 활성은 10, 20μg/mL 철쭉 에탄올 추출물, 10, 20μg/mL 혼합 처리군 을 제외하고 세포 증식에 대한 억제 효과를 일으키지 않는 것으로 확인되었다. 20μg/mL 철쭉 에탄올 추출물 처리군의 경우 B16 melanoma 세포에 72시간 처리했을 때 최대 49%까지 세포 생존율이 감소하는 것으로 나타났다. 하지만 통상적으로 세포의 분화 상태는 수상돌기 유사(dendrite-like) 형상 돌기세포의 형성에 의해 모니터링된다. 도 3은 싸리와 철쭉, 굴참나무 에탄올 추출물이 처리된 세포와 대조구의 육안적인 세포 변화를 나타냈다. 도 2에서 세포 증식 억제 효과가 나타난 철쭉의 경우 대조구 세포와 비교했을 때 전형적인 수지 돌기 세포상을 보였다. 이러한 dendrite-like 형상은 싸리, 철쭉과 굴참나무 에탄올 추출물 처리군에서 모두 농도가 증가함에 따라 점진적으로 확대하였다. 또한 기존 논문에서 dendrite-like 형상이 세포 분화 유도과 관계있는지 확인하기 위해 양성 대조 군으로 삼산화 비소를 세포에 처리한 결과 dendrite-like 형상이 분명하게 형성되는 것을 확인하였다.

[0085] 따라서 싸리와 철쭉, 굴참나무 에탄올 추출물이 효과적으로 B16 melanoma 세포 분화를 유도하는 것으로 판단된 다.

[0086] 3. B16 melanoma를 이용한 tyrosinase 활성능 분석

[0087] Tyrosinase는 멜라닌 생합성 중 세 단계를 촉진하므로 tyrosinase 활성의 측정은 매우 중요하다. 따라서 B16 melanoma 세포에서 싸리와 철쭉, 굴참나무 에탄올 추출물의 tyrosinase 활성에 미치는 영향에 대해 측정하였다. B16 melanoma 세포를 60 ø 플레이트에 적정 세포수 (8×10^4 cells/well)로 분주하고 37°C, 0.5% CO₂, 배양기에 서 24시간 배양한 다음 싸리, 철쭉과 굴참나무 에탄올 추출물을 각각 농도별 (5, 10, 20 mg/ml)로 희석시켜 1μl 씩 넣은 후 0.5% CO₂, 37°C 배양기에서 72시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 트립신으로 세포를 e-튜브 에 옮겨 담고 1% 트립톤 X-100 용액과 pH 6.8 PBS가 혼합된 용해 버퍼(lysis buffer)를 100μl씩 넣어 용해한 후 아이스박스에서 1시간 반응시켰다. 4°C, 10000rpm에서 30분간 원심분리한 상층액을 tyrosinase 활성 측정 용 액으로 사용하였고 단백질 분석 용액(Bio rad, USA)으로 흡광도를 측정, 동량의 단백질 양을 계산하였다. 단백 질 20μg을 포함한 세포 추출물과 시험 물질을 총 20μl가 되게끔 섞은 후 L-DOPA를 180μl씩 넣고 0.5% CO₂, 37°C 배양기에서 1시간 반응하였다. 반응 후 490nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

[0088] 그 결과, 도 4와 같이 싸리 목부 에탄올 추출물 처리군에서 20μg/ml 처리했을 때 대조군에 비해 최대 14% 증가 한 것으로 나타났고 철쭉 목부 에탄올 추출물의 경우 10μg/ml 처리했을 때 13% 증가한 것으로 나타났으며 굴참 나무 목부 에탄올 추출물은 20 μg/ml 처리했을 때 대조군에 비해 최대 14% 증가한 것으로 나타났다. 싸리, 철쭉 과 굴참나무 목부 에탄올 추출물의 혼합물 (1:1:1(w/w/w))은 10μg/ml 처리했을 때 7% 증가한 것으로 나타났고 분산분석(analysis of variance, ANOVA) 결과 혼합물을 제외한 싸리, 철쭉, 굴참나무 각각의 추출물의 단독 처 리군은 P<0.05의 유의성을 나타냈다. 따라서 싸리, 철쭉과 굴참나무 목부 에탄올 추출물은 B16 melanoma 세포 내 tyrosinase 활성화에 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

[0089] 4. B16 melanoma를 이용한 멜라닌 생성능 분석

[0090] B16 melanoma 세포를 60 ø 플레이트에 적정 세포수 (8×10^4 cells/well)로 분주하고 37°C, 0.5% CO₂, 배양기에 서 24시간 배양한 다음 싸리, 철쭉, 굴참나무 에탄올 추출물을 각각 농도별 (5, 10, 20 mg/ml)로 희석시켜 1μl

씩 넣은 후 0.5% CO₂, 배양기에서 72시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 트립신으로 세포를 떼어 e-튜브에 옮겨 담고 1% triton X-100 용액과 pH 6.8 PBS가 혼합된 lysis buffer를 100 μ l씩 넣어 용해한 후 얼음에 박아 1시간 반응시켰다. 4 $^{\circ}$ C, 10000rpm에서 30분간 원심분리한 상층액을 제거한 후 남은 펠렛을 멜라닌 함량 측정기에 사용하였다. 1N NaOH 용액으로 멜라닌을 용해시켜 490nm에서 흡광도를 측정하였고, 멜라닌 검량선($Y=0.00075X+0.0348$)을 이용해 함량을 계산하였다.

[0091] 그 결과, 도 5와 같이 B16 melanoma 세포에서 싸리와 철쭉, 굴참나무 목부 에탄올 추출물의 멜라닌 생성 효과에 대해 평가한 결과, 싸리, 철쭉과 굴참나무 목부 에탄올 추출물 모두 B16 melanoma 세포의 멜라닌 생성에 효과가 있었다. 대조군과 비교할 때 싸리 에탄올 추출물은 5, 10, 20 μ g/ml에서 각각 39, 81 또는 89% 증가한 것으로 나타나 멜라닌 생성능이 우수한 것으로 확인되었으며 철쭉 에탄올 추출물은 5, 10, 20 μ g/ml에서 각각 61, 78 또는 98% 증가한 것으로 나타났다. 굴참나무 에탄올 추출물은 5, 10 또는 20 μ g/ml에서 각각 14, 58 또는 61% 증가한 것으로 나타났다. 싸리와 철쭉, 굴참나무 에탄올 추출물의 멜라닌 생성능은 추출물 처리 농도 의존적으로 증가했고 대조군과 비교하여 ANOVA 통계 분석한 결과 굴참나무 목부 에탄올 추출물 단독 처리군과 싸리, 철쭉, 굴참나무 목부 에탄올추출 혼합물 (1:1:1 (w/w/w)) 5 μ g/ml를 제외하고 유의성 있게 증가한 것을 확인했다.

[0093] <실시예 7> 마우스 털 및 표피의 멜라닌 생성 효과 분석

[0094] 1. 실험 동물 준비

[0095] 양성 대조군인 C57/BL6 마우스와 시험구인 (C57/BL6 $\times$ BALB)F1 마우스는 6주령으로 중앙실험동물에서 구입하였으며, 경상대학교 실험동물관리실에서 사육하였다. 동물 사육실 온도 23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 35 내지 60%, 12시간 조명 주기 조건하에서 식이와 식수는 자유롭게 섭취토록 하였으며 7일간의 적응기간을 거친 후 7 주령 마우스를 이용하여 실험을 수행하였다.

[0096] 2. 싸리, 철쭉, 굴참나무 에탄올 추출물 또는 이들의 혼합물 처리

[0097] 마우스의 피부에 선택된 부분의 털을 먼저 제거한 후 휴지기의 분홍빛이 도는 피부에, 에탄올 추출물을 면봉을 사용하여 부드럽게 발라주었다(0.2 mL/cm²). 대조군은 동일한 마우스의 반대측의 피부에 60% 에탄올을 발라주어 유지하였다. 추출물 처리는 6달 동안 진행하였고 하루에 1회 처리해주었다. 피부 색깔과 관련된 마우스 털의 색상 변화는 정기적으로 관찰했다.

[0098] 3. 마우스 털의 육안적 관찰 및 멜라닌 함량 측정

[0099] 복잡한 전처리 과정과 고가의 장비를 구비하여야 분석 가능한 HPLC 분석에 비해 모발 내 멜라닌 수준을 파악하는데 보다 편리하게 사용할 수 있는 분광 광도법 분석을 사용하여 멜라닌 함량을 측정하였다(Lee et al., 2007 참고). 추출물을 도포 후 자라난 모발 내의 멜라닌 함량을 분광 광도법으로 측정하여 물질의 백반 방지 효능을 정량적으로 평가하였다.

[0100] 양성 대조군인 C57/BL6와 시험군의 (C57/BL6 $\times$ BALB)F1 마우스의 털을 면도기를 이용하여 수집한 다음 털 20mg당 1mL의 1M NaOH와 24시간 실온에서 반응시켰다. 대조군과 시험군 모두 파장 A500(total melanin)과 A650(eumelanin)에서 흡광도를 측정하였다. Melanin과 eumelanin 각각 1M의 NaOH에 농도 범위 0.05 내지 0.4 mg/mL의 멜라닌을 용해하여 작성한 검량선에 대입하여 멜라닌 함량을 계산하였다.

[0101] 그 결과, 도 6과 같이 60% 에탄올을 사용한 대조군과 비교했을 때 싸리 에탄올 추출물, 철쭉 에탄올 추출물, 굴참나무 에탄올 추출물, 혼합물(싸리 에탄올추출물: 철쭉 에탄올 추출물 : 굴참나무 에탄올 추출물, 1:1:1 (w/w/w))을 각각 처리 한 부분에서 검은색 털이 자란 것을 확인할 수 있다.

[0102] 또한 추출물 도포 후 자라난 모발 내의 멜라닌 함량을 분광 광도법으로 측정하여 물질의 백반 방지 효능을 정량적으로 평가한 결과, 도 7과 같이 마우스 털의 멜라닌 함량 측정 결과 60% 에탄올 처리구인 대조군과 비교했을 때 Melanin과 eumelanin 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 싸리 에탄올 추출물 처리군의 경우 멜라닌 함량이 40%, 철쭉 에탄올 추출물 처리군은 47%, 굴참나무 에탄올 추출물 처리군은 36%, 싸리와 철쭉, 굴참나무 에탄올 추출 혼합물(1:1:1(w/w/w))은 39% 증가했으며 검은색 색소를 나타내는 유멜라닌 함량도 마찬가지로 싸리 에탄올 추출물, 철쭉 에탄올 추출물, 혼합물 (싸리 에탄올 추출물: 철쭉 에탄올 추출물 : 굴참나무 에탄올 추출물 (1:1:1(w/w/w)))이 각각 29%, 29%, 21%, 27% 증가한 것으로 나타났다. 따라서 싸리와 철쭉, 굴참나무 에탄올 추출물이 멜라닌 생성에 긍정적인 역할을 한다고 판단할 수 있다.

[0103] 4. 마우스 피부의 L-DOPA 염색을 통한 멜라닌 세포 관찰

[0104] 멜라닌 세포는 DOPA에 의해 양성반응을 일으켜 검은색을 나타냄으로써 멜라닌 세포의 위치와 추출물 처리에 따른 변화를 육안적으로 파악할 수 있다. 마우스 피부의 깨끗한 조각이나 프로말린으로 고정된 조직을 pH 7.4의 3: 4: 디히드록시페닐알라닌(dihydroxyphenylalanine, Dopa) 용액에서 배양했을 때 세포 내에서 Dopa-melanin과의 산화를 일으켜 검은색으로 염색되게 된다. 이러한 세포의 변화를 도파-양성반응(dopa-positive)이라고 한다. 마우스 표피에서 이 반응은 일반적으로 색소 침착활동을 하는 멜라닌 세포에서 일어난다.

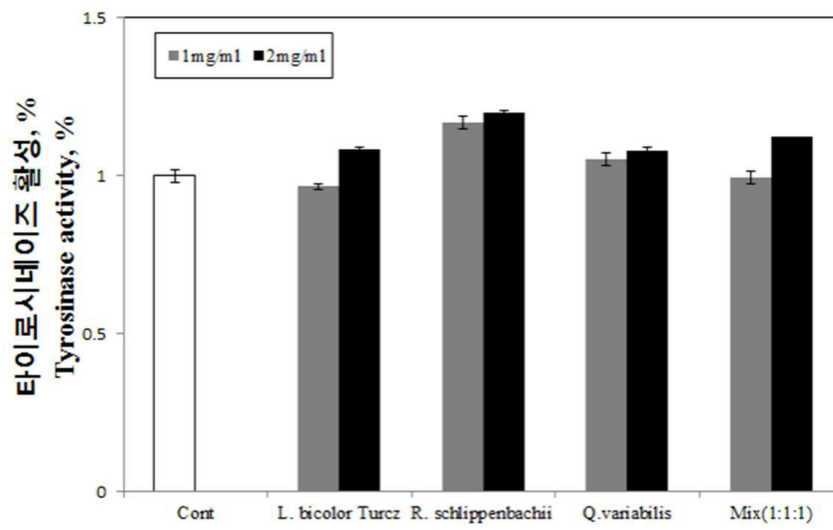
[0105] 이를 위하여 레이드로&블랙버그(Laidlaw & Blackberg)의 표준절차를 사용했고 반응을 수행하기 위해 깨끗한 시트와 마우스 피부를 준비했다. 우선 마우스 등에서 분리한 피부의 표피와 진피를 분리하기 위한 방법으로 에틸렌디아민사아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 용액을 사용했다. 6 웰 플레이트에서 2시간 동안 EDTA 용액과 반응시킨 후 마이크로포셉(microforcep)을 이용하여 표피를 분리하였다. 분리된 표피를 약 1분 동안 식염수로 세척하고 37℃, 1시간 동안 L-DOPA 용액에 넣어 배양하였다. 1시간 후 L-DOPA 용액을 교체하고 37℃, 8시간 동안 다시 배양하였다. 배양 후 약 1분 동안 식염수에 세척하고 10% 포르말린으로 20분 동안 고정시켰다. 고정 후 3분간 증류수를 이용하여 깨끗이 세척하고 이를 95% 에탄올(ethanol)과 100% ethanol에 20분 동안 순차적으로 반응시켜 표피 속의 공기를 제거하였다. 마지막으로 자일렌(xylene)에 2분간 반응시킨 후 카다나블라썸(cadana blasm) 용액을 이용하여 기포가 생기지 않도록 조심스럽게 커버 글라스를 덮었다. 그런 후 광학현미경을 이용하여 염색된 멜라닌 세포를 관찰하였다.

[0106] 싸리와 철쭉, 굴참나무 에탄올 추출물을 마우스 등에 5개월 동안 처리 후 표피를 분리해 관찰한 결과 도 8과 같이, 대조군과 비교했을 때 멜라닌 세포가 모낭 주위에서 더 많이 관찰되는 것을 확인할 수 있었다. 싸리와 철쭉, 굴참나무 에탄올 추출물 처리한 후, 60% 에탄올 처리군(vehicle) 피부에서 관찰되지 않았던 멜라닌 세포들이 모낭 주위에서 더 많이 관찰되었다. 멜라닌 세포의 활성화로 인해 마우스 모낭의 뿌리 주변에 멜라닌 세포가 증가하는 것은 이미 보고된 바 있다. 따라서 이 결과는 싸리와 철쭉, 굴참나무 에탄올 추출물이 백반증의 착색을 유도하는 것으로 판단된다.

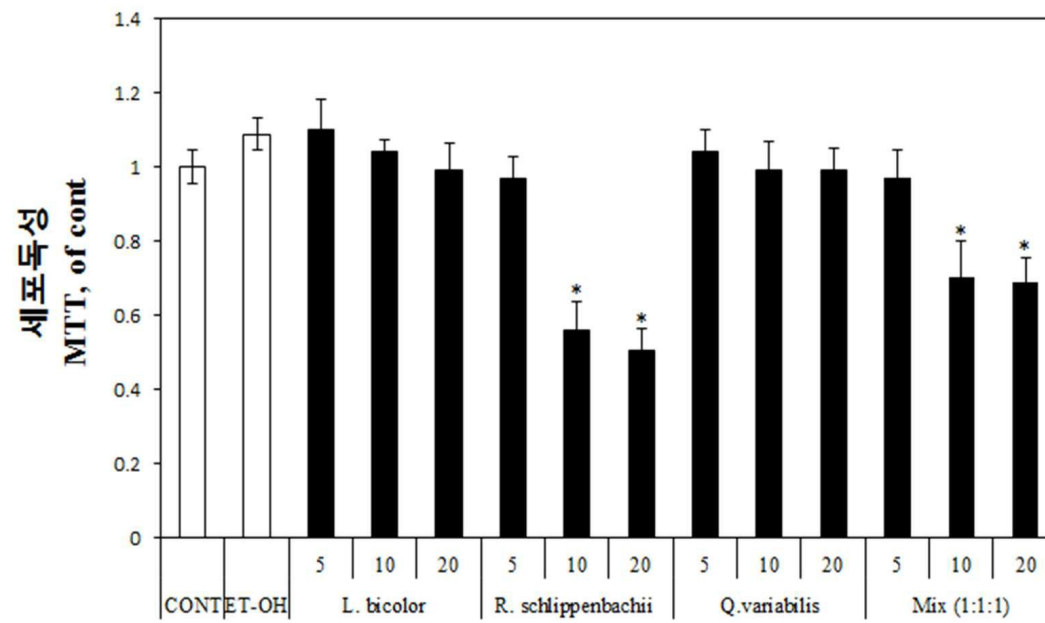
[0107] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

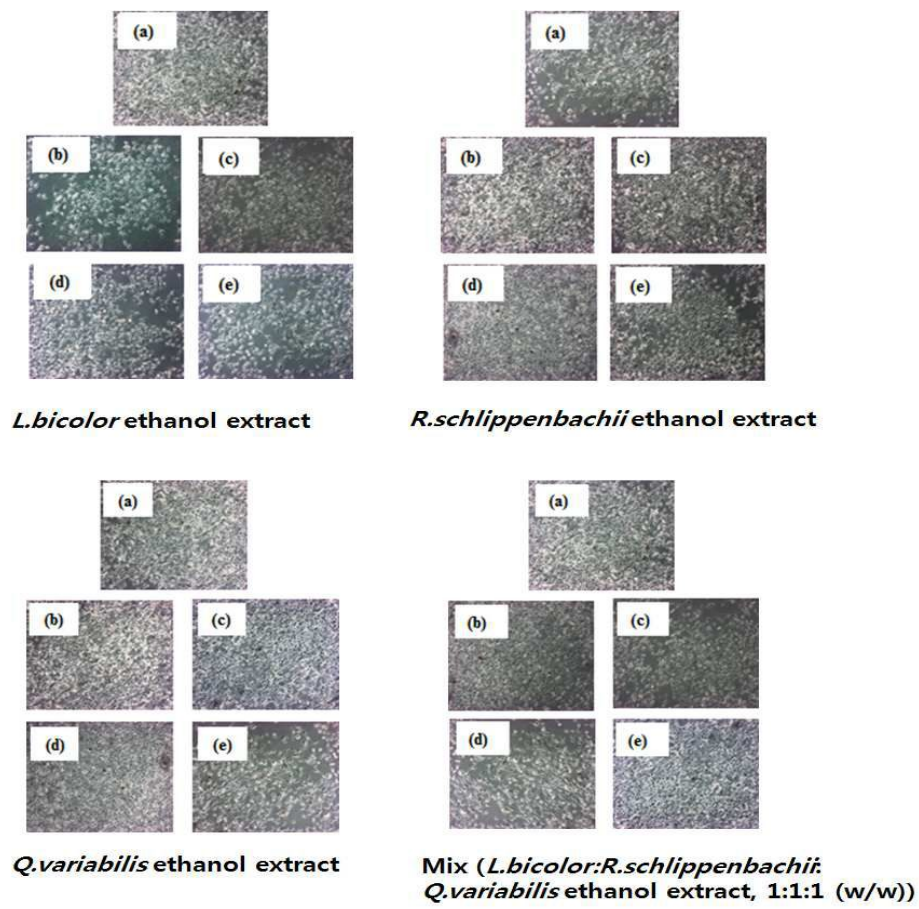
도면1



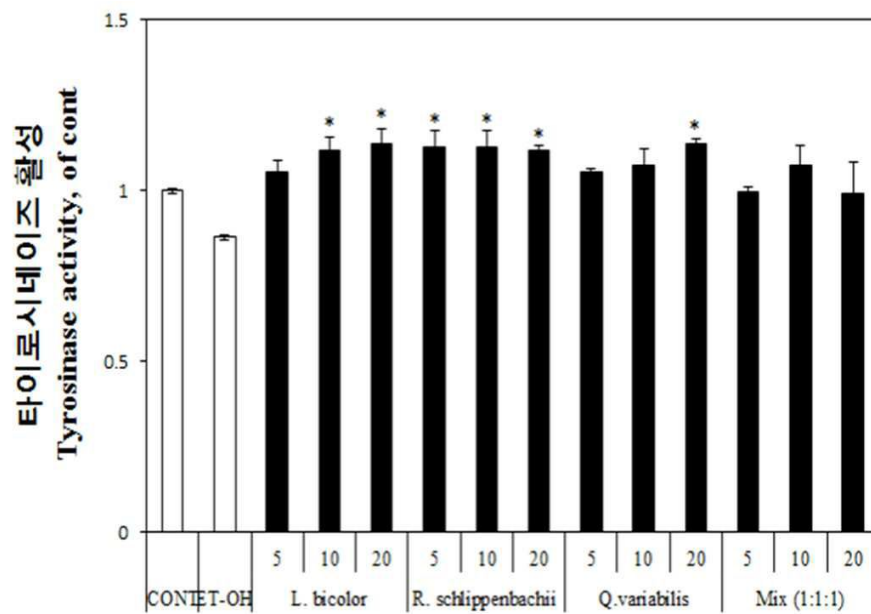
도면2



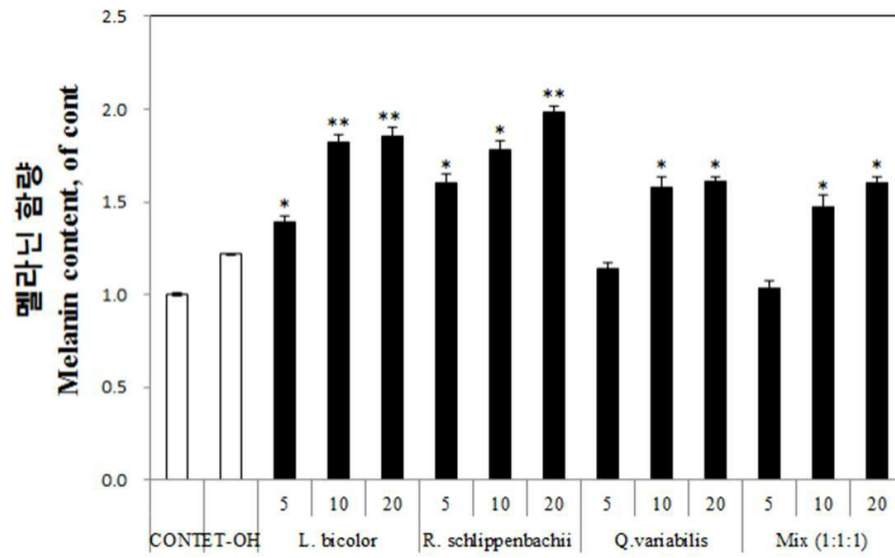
도면3



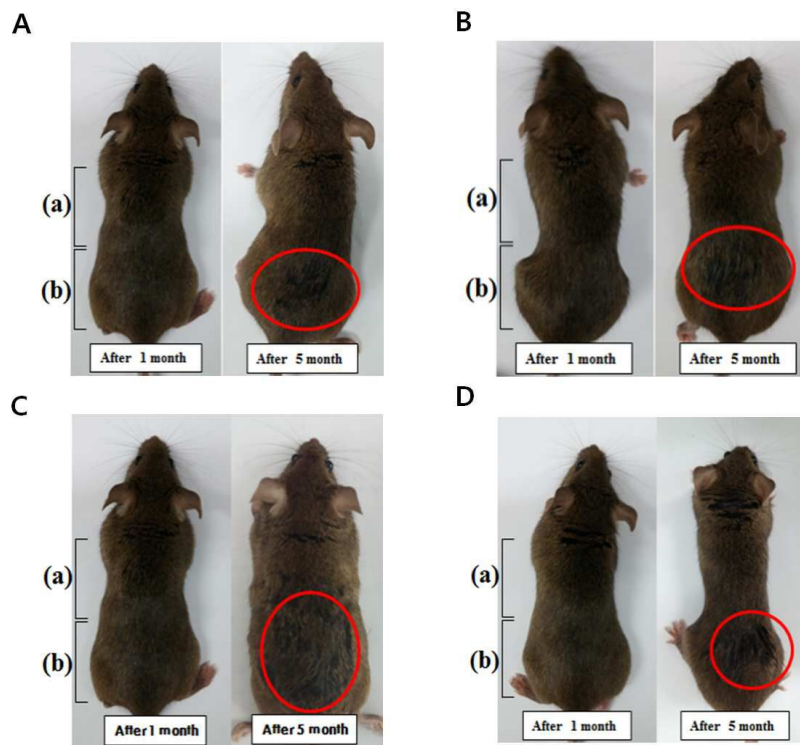
도면4



도면5

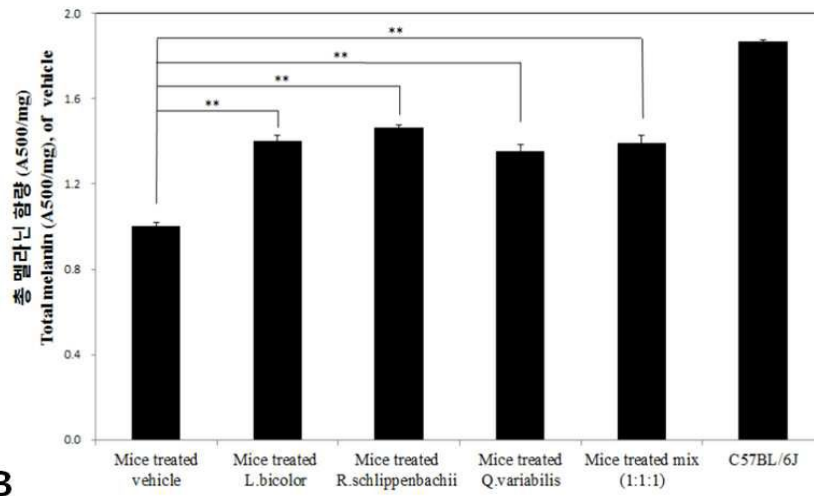


도면6

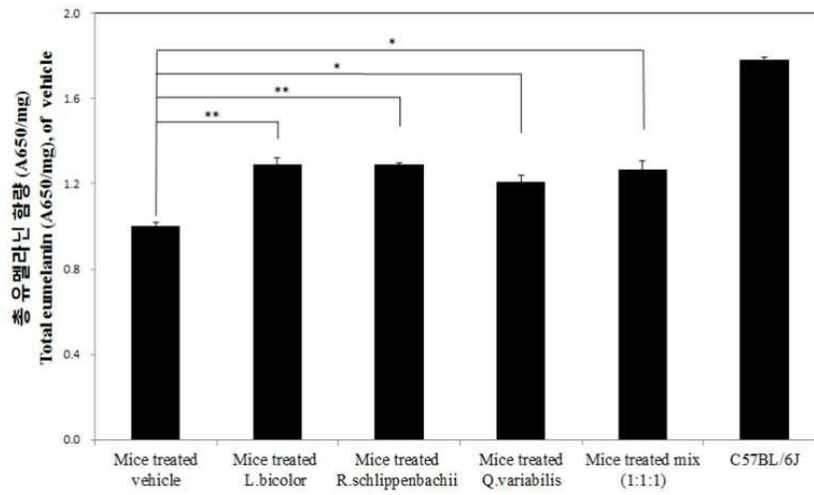


도면7

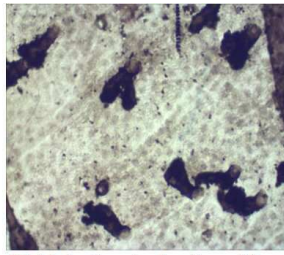
A



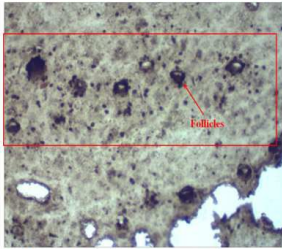
B



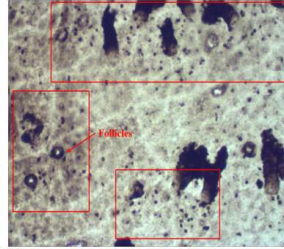
도면8



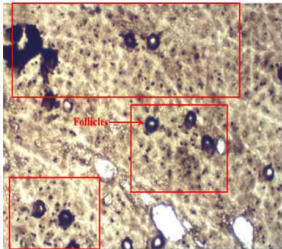
Vehicle-treated mice skin



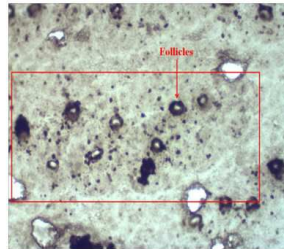
L. bicolor ethanol extract-treated



R. schlippenbachii ethanol extract-treated



Q. variabilis ethanol extract-treated



Mix (*L. bicolor* ethanol extract : *R. schlippenbachii* ethanol extract : *Q. variabilis* ethanol extract, 1:1:1 (w/w/w))