(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년11월09일
(11) 등록번호 10-1081910
(24) 등록일자 2011년11월03일

(51) Int. Cl.
A61K 8/97 (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0024612
(22) 출원일자 2011년03월18일
심사청구일자 2011년03월18일
(56) 선행기술조사문헌
JP08259431 A*
JP10072336 A*
JP2007223977 A*
KR1020050115817 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
주식회사 아이피어리스
경기도 안성시 미양면 계륵리 267-4 제2공단
(72) 발명자
김영부
경기도 수원시 영통구 영통동 947-8 와이티오피스텔 611호
강인오
경기도 용인시 수지구 죽전동 1003-8 동성2차아파트 105-1104
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

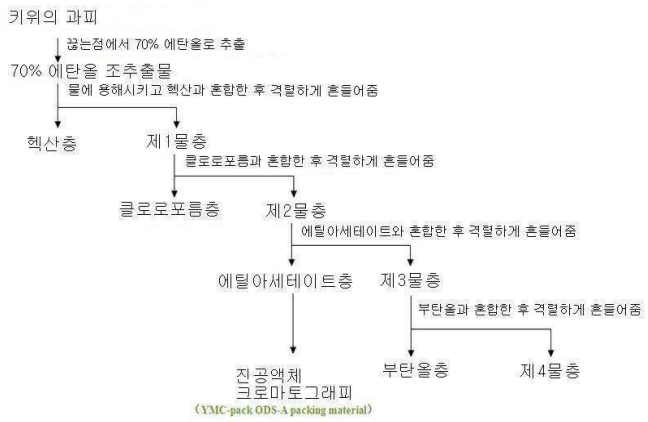
전체 청구항 수 : 총 1 항 심사관 : 성영환

(54) 키위 추출물을 함유하는 피부톤 개선 및 피부노화방지 효과가 있는 화장료 조성물

(57) 요 약

본 발명은 키위(*Actinidia chinensis*)의 과피 추출물을 유효성분으로 함유하고 피부의 당화반응을 억제하는 것을 특징으로 하는 당화저해제, 및 이를 함유하고 피부톤 개선 및 피부노화방지 효과가 있는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물을 개시한다.

대 표 도 - 도7



(72) 발명자

이선영

서울특별시 서대문구 남가좌 2동 삼성래미안 2차아파트 106동 1502호

김연경

서울특별시 송파구 잠실4동 315동 403호

이광원

경기도 성남시 분당구 이매1동 삼환아파트 2동 803호

홍충의

서울특별시 동대문구 제기동 136-155호 1층

이얀희이

서울시 성북구 안암동 고려대학교 CJ 식품안전관 203호 Food Biochemistry & Toxicology Lab

김지훈

경상남도 창원시 성산구 상남동 9-2 롯데리더스빌 701호

특허청구의 범위

청구항 1

키위(*Actinidia Chinensis*)의 과피의 70%에탄올 조추출물에 대해서 헥산으로 분획을 실시하여 제1물층을 수득하고, 상기 제1물층에 대하여 클로로포름으로 분획을 실시하여 제2물층을 수득하고, 상기 제2물층에 대하여 에틸아세테이트로 분획을 실시하여 수득한 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하고,

상기 에틸아세테이트 분획물은 퀘세트린(Quercitrin)을 함유하여 피부의 당화반응을 억제함에 따라 피부톤 개선, 피부탄력개선 및 주름완화 효과가 있는 것을 특징으로 하는 피부톤 개선 및 노화방지용 화장료 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 당화저해제와 피부톤 개선 및 피부노화방지용 화장료 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는, 키위의 과피 추출물을 함유하는 당화저해제와 상기 당화저해제를 함유하고 피부톤 개선 및 피부노화방지 효과가 있는 화장료 조성물에 관한 것이다.

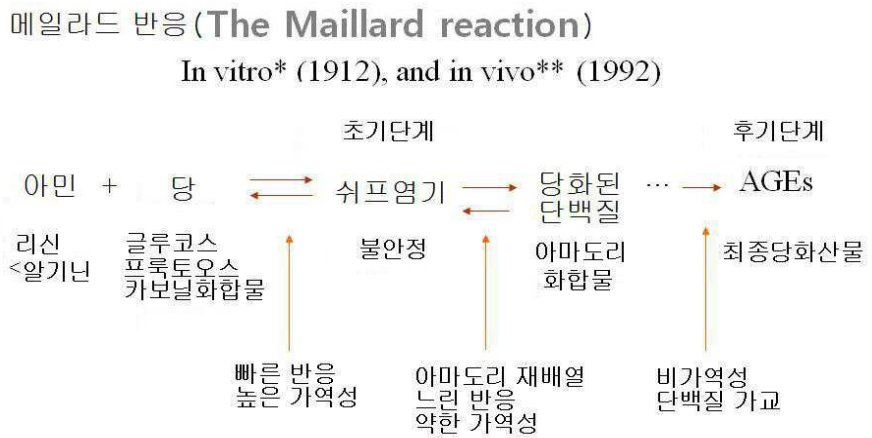
배 경 기 술

[0002] 피부는 인체의 모든 장기와 기관을 싸고 있는 기관으로 체중의 15~20%를 차지할 정도로 가장 큰 기관으로 외부 침입으로부터 신체를 보호하며, 체내의 수분과 온도를 보존하여 체내의 항상성을 조정하는데 중요한 역활을 한다. 피부의 노화는 나이가 들어가면서 자연적으로 발생하는 변화이며 그 밖에도 자외선, 담배 및 환경오염 등 많은 외부적 인자에 의해서 발생한다(Park S-H, Hong Y, Choi JH, Kim BK. 2008. Antiwrinkle effect of mugwort(*Artemisia vulgaris*) extract on UVB-irradiated hairless mouse skin. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1136-1141).

[0003] 피부의 노화는 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 하나는 나이가 들어감에 따라 콜라겐, 엘라스틴 등 세포외 기질 단백질의 합성양이 줄어들고 탄력이 감소되며 피부세포 내 수분이 손실되고 각질층의 구조가 변하는 내인성 노화와 다른 하나는 태양광선의 자외선 등과 같은 외부자극이 반복되면서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 발생시키고, 사이토카인의 생성이 촉진되어 여러 가지 신호전달 체계를 활성화시킴으로써 activator protein-1(AP-1)과 nuclear factor κB(NF-κB)의 활성화에 의한 염증반응이 유도되어 피부를 구성하는 지질, 단백질, 핵산, 효소 등이 손상되어 노화가 일어나는 외인성 노화로 나눌 수 있다(Kang S, Cho S, Chung JH, Hammerberg C, Fisher GJ, Voorhees JJ. 2005. Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor-κB and activator protein-1 in inflammatoryacne lesions *in vivo*. *Am J Pathol* 166: 1691-1699).

[0004] 당화반응(글라이케이션 반응, Glycation reaction), 혹은 비효소적 당화반응(non-enzymatic glycation reaction)이란 단백질의 유리 아미노기인 리신(lysine)이나 알기닌(arginine)과 환원당의 카르보닐기(carbonyl group)가 반응하여 초기 당화반응 생성물인 쉬프 염기(shiff base)를 형성하고 이때 형성된 화합물들이 계속적

으로 축합, 재전위, 산화, 분열, 고리화 등의 일련의 복잡한 반응을 통하여 갈색의 화합물(melanoidine)을 만들어 총체적인 개념의 비가역적 최종당화산물(advanced glycation end products, AGEs)을 형성하는 반응이다(Maillard-Lefebvre H, Boulanger E, Daroux M, Gaxatte C, Hudson BI, Lambert M. 2009. Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* 48: 1190-1196.). 이를 간략하게 나타내면 하기와 같다.



*Maillard LC and Gautier MA , 1912, CR Seances Acad Sci

**BucalaR, VlassaraH, Cerami A, 1992, In :Post translation modification of protein

[0005]

[0006] 당화 반응은 고혈당을 가지는 당뇨환자에서 정상인보다 급격히 일어나지만 정상혈당의 경우에도 노화가 진행됨에 따라 체내에서 일어난다. 비교적 반감기가 긴 콜라겐은 쉽게 당화반응이 일어나고 콜라겐의 가교결합(cross-linking)이 일어나면서 여러 단계의 반응을 거쳐 최종적으로 생성된 최종당화산물(AGEs)이 피부에 축적되어 피부는 누렇고 칙칙하게 되며 탄력 감소 및 주름을 일으킨다고 알려져 있다.

[0007] 특히, 피부에서 주요 구성 요소로 존재하는 것은 콜라젠 type I과 III가 있는데, 무게비로 각각 70%와 15%를 차지하고 있어 진피에 탄력과 안정성을 주고 있다. 또 다른 형태인 콜라겐 type IV는 표피의 안쪽 부위에 위치하여 진피와 연결을 해주는 기저막(basement membrane)으로 알려진 피부의 골격에 기계적인 안정성을 부여한다. 건강한 콜라겐 대사과정은 젊고 건강한 피부의 탄력 있고 투명한 외관을 유지하기 위해 균형있는 합성과 분해를 요구하는 복잡한 과정으로 진행된다. 그러나 피부 노화 시에는 특히 당화 반응에 취약하게 되는데 이는 콜라겐이 체내단백질의 1/3을 이루고 있고 교체율이(turnover) 매우 느리게 일어나기 때문이다. 당화 반응이 일어나게 되면 콜라겐 섬유는 재생능력이 감소하여 피부 노화를 주는 탄력이 저하되어 주름이 발생하고, 칙칙하고 누렇게 변색되게 된다.

[0008] 한편, 최근에는 피부·미용에 대한 관심이 급격히 증가하면서 단순히 하얀 피부보다는 맑고 투명한 피부를 선호하는 경향이 높아지고 있다. 그러나 아직까지 피부의 당화 반응을 억제하여 피부톤을 맑고 투명하고 환하게 개선시킬 수 있는 화장료 조성물에 대해서는 활발한 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다.

[0009] 이에 본 발명의 발명자는 피부의 당화반응을 억제하여 피부톤을 맑고 환하게 개선시킴과 동시에 피부의 탄력 감소를 방지하고 주름을 예방할 수 있는 천연 추출물에 대하여 예의연구한 결과 본 발명을 완성하기에 이른 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 피부의 당화반응을 효과적으로 억제할 수 있으며, 인체에 무해하여 안정성이 우수한 천연 추출물 및 이를 포함하는 당화저해제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 피부의 당화반응을 효과적으로 억제하여 누렇고 칙칙한 피부를 맑고 투명하고 환하게 개선시킬 수 있는 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 피부의 당화반응을 효과적으로 억제하여 두껍고 딱딱해진 피부를 탄력 있게 개선시켜 주름을 완화시킬 수 있는 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기의 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 당화저해제는 키위(*Actinidia chinensis*)의 과피 추출물을 유효성분으로 함유하고, 피부의 당화반응을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 또한, 본 발명의 당화저해제는 상기 키위의 과피 추출물이 에틸 아세테이트 분획물인 것을 특징으로 한다.

[0015] 또한, 본 발명의 당화저해제는 상기 에틸 아세테이트 분획물이 퀘세트린(Quercitrin)을 함유하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 상기 당화저해제를 함유하고 피부톤 개선효과가 있는 것을 특징으로 한다.

[0017] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 상기 당화저해제를 함유하고, 탄력개선 및 주름완화 효과가 있는 것을 특징으로 한다.

[0018] 이하, 본 발명의 당화저해제와 피부톤 개선 및 피부 노화 방지용 화장료 조성물에 대하여 자세히 설명하고자 한다.

[0019] 본 발명은 당화저해제에 관한 것으로, 특히 피부의 당화반응을 탁월하게 억제시킬 수 있는 당화저해제를 특징으로 한다. 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질인 콜라겐은 세포 분할과 분화의 유도, 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포 접착의 지탱 등의 기능을 가지고 있는데, 이러한 콜라겐에 당화반응이 일어나서 최종당화산물이 축적되면 피부는 누렇고 칙칙하며 두껍고 딱딱하게 된다. 그러데 본 발명의 당화저해제는 피부의 당화반응을 효과적으로 억제하여 콜라겐에 최종당화산물이 과도하게 축적되는 것을 방지함에 따라 피부가 누렇고 칙칙하며 두껍고 딱딱하게 되는 것을 탁월하게 방지하여 피부톤을 매우 맑고 투명하고 환하게 개선시킬 수 있음과 동시에 탄력감소를 예방하고 주름을 방지할 수 있다.

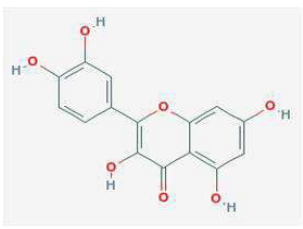
[0020] 이러한 본 발명의 당화저해제는 키위 추출물을 함유하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 키위(Kiwi), 바람직하게는 골드키위(Gold Kiwifriut)는 양다래 또는 차이니즈 구스베리(Chinese gooseberry)라고도 하며, 다래나무과(*Actinidiacese*)에 속하는 키위(*Actinidia chinensis*)의 열매이다. 중국과 타이완이 원산지이지만 지금은 뉴질랜드와 캘리포니아에서 상업적으로 재배한다. 달걀 모양의 키위는 껍질이 갈색을 띤 녹색으로 털이 나 있으며, 단단하고 투명한 과육의 가운데에 자줏빛이 도는 검은색의 식용가능한 씨가 있다. 망고와 멜론을 혼합한 향이 나고 약간 신맛이 나며, 페놀성 화합물로 쿠마르산(Coumaric acid), 카페산(Caffeic acids), 에피카테킨(Epicatechin), 카테킨(Catechin), 프로시아니딘(Procyanidins), 케르세틴(Quercetin) 및 캠퍼롤(Kaempferol)을 함유한다.

[0021] 또한, 본 발명의 키위 추출물은 키위의 과피 추출물인 것이 바람직하다. 키위의 과피 추출물은 키위의 과육 추출물 또는 키위 전체의 추출물에 비하여 플라보노이드, 폴리페놀 등을 많이 함유하고 있어 항산화력 및 항당화력이 훨씬 뛰어나다.

[0022] 또한, 본 발명의 키위의 과피 추출물은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 얻을 수 있으며, 바람직하게는 추출용매를 사용하여 추출되는 것이다. 이러한 추출용매의 바람직한 예로는 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올 (예: 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등), 아세톤, 에틸 아세테이트, 클로로포름, 1,3-부틸렌글리콜 또는 이들 중 2종 이상의 혼합물이 있으며, 보다 바람직하게는, 70% 에탄올이다.

[0023] 또한, 본 발명의 키위의 과피 추출물은 바람직하게는 에틸 아세테이트 분획물이다. 키위의 과피 추출물의 에틸 아세테이트 분획물은 퀘세트린(Quercitrin)을 다량 함유하고 있어 항산화력 및 항당화력이 매우 뛰어나다. 퀘세트린(Quercitrin)은 퀘르세틴(Quercetin) 유도체로 플라보노이드 그룹에 속하며, 일명 퀘르세틴-3-O-람노사이드(quercetin-3-O-rhamnoside)라고도 하며, 항산화효과, 소염효과 및 항암효과 등이 뛰어나다.

화학식 1

[0024] 

[0025] 퀘르세틴(Quercetin)

[0026] MW : 302.236g/mol

[0027] MF : $C_{15}H_{10}O_7$

화학식 2

[0028] 

[0029] 퀘세트린(Quercitrin)

[0030] MW : 448.377g/mol

[0031] MF : $C_{21}H_{20}O_{11}$

[0032] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 상기 당화저해제를 함유하여 피부톤 개선 및 노화방지효과가 매우 뛰어난 것을 특징으로 한다. 특히, 본 발명의 화장료 조성물은 피부를 맑고 투명하고 환하게 해주어 피부톤을 효과적으로 개선시켜줄 뿐 아니라 두껍고 딱딱해진 피부를 부드럽게 해주어 탄력개선 효과가 있어 주름을 효과적으로 완화시켜 주는 효과를 나타낼 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명의 피부톤 개선 및 피부노화방지용 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있다. 일예로 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 크림, 에센스, 수중유(O/W)형 및 유중수(W/O)형으로 이루어진 기초화장료 제형과, 수중유형 및 유중수형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이섀도, 치크칼라 및 아이브로우 펜슬류로 이루어진 색조화장료 제형과, 바디로션, 바디오일, 바디에센스, 바디팩 등 바디용 제형 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명에 의하면 피부의 당화반응을 효과적으로 억제할 수 있으며, 인체에 무해하여 안정성이 우수한 천연 추출물 및 이를 포함하는 당화저해제를 제공할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명에 의하면 피부의 당화반응을 효과적으로 억제하여 누렇고 칙칙한 피부를 맑고 투명하고 환하게 개선시킬 수 있는 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명에 의하면 피부의 당화반응을 효과적으로 억제하여 두껍고 딱딱해진 피부를 탄력 있게 개선시켜 주름을 완화시킬 수 있는 있는 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 키위의 과육, 과피, 전체 각각의 70% 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량을 나타내는 그래프이다.

도 2는 키위의 과육, 과피, 전체 각각의 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량을 나타내는 그래프이다.

도 3은 키위의 과육, 과피, 전체 각각의 70% 에탄올 추출물의 DPPH · SC_{50}값을 나타내는 그래프이다.

도 4는 키위의 과육, 과피, 전체 각각의 70% 에탄올 추출물의 FRAP값을 나타내는 그래프이다.

도 5는 키위의 과육, 과피, 전체 각각의 70% 에탄올 추출물의 세포 생존력을 나타내는 그래프이다.

도 6은 키위의 과육, 과피, 전체 각각의 70% 에탄올 추출물의 당화 저해 능력을 나타내는 그래프이다.

도 7은 키위 과피의 70% 에탄올 추출물의 분획과정을 나타내는 개략도이다.

도 8은 키위 과피의 70% 에탄올 추출물의 각 분획물에 대한 DPPH · SC_{50}값을 나타내는 그래프이다.

도 9는 키위 과피의 70% 에탄올 추출물의 각 분획물에 대한 FRAP값을 나타내는 그래프이다.

도 10은 키위 과피의 70% 에탄올 추출물과 키위 과피의 에틸아세테이트 분획물의 총 플라보노이드 함량을 나타내는 그래프이다.

도 11은 키위 과피의 70% 에탄올 추출물과 키위 과피의 에틸아세테이트 분획물의 총 폴리페놀 함량을 나타내는 그래프이다.

도 12는 키위 과피의 에틸아세테이트 분획물에 대하여 HPLC로 퀘세트린의 함량을 분석한 그래프이다.

도 13은 키위 과피의 에틸아세테이트 분획물의 당화 저해 능력을 측정하기 위한 과정을 나타내는 개략도이다.

도 14는 키위 과피의 에틸아세테이트 분획물의 당화 저해 능력을 나타내는 그래프이다.

도 15는 당화된 콜라겐 매트릭스에서 AGEs 분포를 알기 위해 면역 형광 염색을 한 결과이다. (A) 당화되지 않은 콜라겐, (B) 당화된 콜라겐, (C) 5mM 아미노구아니딘 처리된 당화된 콜라겐, (D) 10mM 아미노구아니딘 처리된 당화된 콜라겐, (E) 1mg/ml 키위 과피의 에틸아세테이트 분획물이 처리된 당화된 콜라겐.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 본 발명에 대해 하기 실시예에서 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0039] **실시예 1: 키위의 70% 에탄올 추출물의 항산화력 및 항당화력의 평가**

[0040] 키위(*Actinidia chinensis*)의 과육(pulp) 100g, 키위의 과피(rind) 100g, 키위 통째(whole kiwi) 100g을 준비한 후, 각각 70% 에탄올로 추출하였다. 이들에 대하여 각각 총 플라보노이드의 함량, 총 폴리페놀의 함량, FRAP, DPPH · SC_{50}, 세포생존력 및 당화저해능력을 측정하여 비교평가하였다.

[0041] 실시예 1-1 : 총 플라보노이드(Flavonoid) 함량의 측정

[0042] 상기 키위의 과육, 과피 및 전체의 70% 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정하기 위하여 $AlCl_3$ colorimetric assay를 수행하였다. 각 추출액 100 μL에 2% $AlCl_3 6H_2O$ 용액을 100 μL 가하고 5분 방치한 후, 흡광도 값 430 nm에서 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 퀘르세틴 당량(QE, quercetin equivalents)로 나타내었으며, 그 결과는 표 1 및 도 1에 나타내었다.

[0043] 표 1 및 도 1에 의하면, 키위의 과피 추출물(1mg)은 플라보노이드를 총 1.3㎍함유하고 있는 반면, 키위 전체는 1.05㎍, 키위의 과육은 0.8㎍ 함유하고 있어, 키위 과피의 총 플라보노이드 함량이 매우 높음을 알 수 있었다.

[0044] 실시예 1-2 : 총 폴리페놀(Polyphenol) 함량의 측정

[0045] 상기 키위의 과육, 과피 및 전체의 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위하여 TF assay를 수행하였다. 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 일부 변형하여 정량하였다. 추출물 100 μL에 folin-ciocalteu reagent 0.25 mL를 가한 후 증류수 0.4 mL을 넣어 희석한 후 20% Na_2CO_3포화 용액 1.25 mL을 가하여 잘 섞고, 실온에서 40분 방치한 후 spectrophotometer(BioTek)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 갈산 당량(GAE, gallic acid equivalents)으로 나타내었으며, 그 결과는 표 1 및 도 2에 나타내었다.

[0046] 표 1 및 도 2에 나타나는 바와 같이, 키위의 과피 추출물(1mg)은 폴리페놀을 총 140㎍을 함유하는 반면, 키위 과육은 37㎍, 키위 전체는 52㎍ 함유하고 있어, 키위 과피의 총 폴리페놀 함량이 매우 높음을 알 수 있었다.

[0047] 실시예 1-3 : FRAP(Ferric-reducing antioxidant power)의 측정

[0048] 상기 키위 과육, 과피 및 전체의 70% 에탄올 추출물의 항산화력을 알아보기 위하여 FRAP assay를 수행하였다. FRAP 분석은 3.6의 낮은 pH에서 Fe^{3+}-TPTZ(ferric tripyridyltriazine)복합체가 환원제(antioxidant)에 의해서 파란색의 Fe^{2+}-TPTZ(ferrous tripyridyltriazine) 복합체로 될 때 흡광도를 측정하여 검색하고자 하는 화합물에

대한 환원력(ferric reducing ability)을 보는 것이다(IF Benzie 및 JJ Strain, Anal Biochem, 1996, 239, 70-76). FRAP reagent로서 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 2.5 mL에 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 2.5 mL과 pH 3.6의 0.3 M acetate buffer 25 mL을 가하였다. 그 후 FRAP reagent 3 mL에 농도별로 키위 추출물 100 μL를 넣어 혼합한 것을 37℃에서 5분경과 후에 593 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 곡선으로 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$를 사용하여 철 이온의 환원력을 산출하였다. 결과는 표 1 및 도 3에 나타내었다.

[0049] 표 1 및 도 3에 나타나는 바와 같이, FRAP값은 농도 의존적이며 키위의 과피 추출물에서 가장 높은 값을 나타냄을 알 수 있었다. 1mg의 키위의 과피 추출물은 125㎍/ml의 비타민 C보다 높은 환원력을 가지며, 2.5mg의 키위의 과피 추출물은 250㎍/ml의 비타민 C와 유사한 정도의 높은 환원력은 가졌다. 반면, 5mg의 키위의 과육 및 전체 추출물은 1mg의 키위의 과피 추출물보다도 낮은 환원력을 가졌다.

[0050] 실시예 1-4 : DPPH · SC_{50}(DPPH-scavenging capacity)의 측정

[0051] 상기 키위의 과육, 과피 및 전체의 70% 에탄올 추출물의 항산화력을 알아보기 위해 DPPH assay를 수행하였다. 에탄올에 녹인 200 μM DPPH reagent 100 μL에 농도별 시료 100 μL를 넣고 잘 섞어주고 어두운 상태로 30분간 보관한 후 515 nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였고, 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다. 각 시료의 SC_{50}(scavenging activity 50%)은 DPPH의 농도를 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도로 하였다. 그 값은 초기 DPPH 라디칼 50%를 감소시키는데 필요한 샘플의 농도로 나타내었으며, 그 결과는 표 1 및 도 4에 나타내었다.

[0052] 표 1 및 도 4에 나타나는 바와 같이, 키위의 과피 추출물은 라디칼 50%을 감소시키는데 8mg 정도만 필요한 반면, 키위의 전체는 14mg, 키위의 과육은 23mg이 필요함을 알 수 있었다.

표 1

[0053]

	총 폴라보노이드 함량 (㎍QE/1mg DM)	총폴리페놀 함량 (㎍GAE/1mg DM)	FRAP (mM Fe(Ⅱ)/mg DM)	DPPH · SC_{50} (mgDM/mL)
과육	0.81 ± 0.02^{a}	37.0 ± 5.7^{a}	0.14 ± 0^{a}	23.8 ± 7.0^{a}
과피	1.38 ± 0.20^{b}	139.8 ± 5.5^{b}	0.82 ± 0.02^{b}	8.1 ± 3.4^{b}
전체	$1.05 \pm 0.05a^{b}$	52.3 ± 4.6^{a}	0.22 ± 0.01^{c}	14.5 ± 4.7^{ab}
비타민 C (250㎍/ml)			1.72 ± 0.10^{d}	87.7㎍/ml ± 6.4^{c}

[0054] (DM은 건조중량, Mean±SD, n=3, 신뢰구간 p<0.05에서 유의적 차이를 나타냄)

[0055] 실시예 1-5 : 세포 생존력(Cell Viability)의 측정

[0056] 상기 키위의 과육, 과피 및 전체의 70% 에탄올 추출물의 세포 생존력을 측정하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 이는 t-BHP에 의해 산화 스트레스가 유발된 HepG2 세포의 생존 보호 효과로 측정되었다. HepG2 cell 은 24-well plates에 1×10^5의 농도로 처리한 다음 24 시간 배양하였다. 세포가 바닥에 부착되면, 10 μl 0.3 mM t-BHP 와 62.5, 125, 250, 500, 1000 μg/mL의 농도로 키위 추출물을 2 시간 처리하였다. 이 후 40 μL의 MTT 시약과 DMEM 배지 200 μL의 조건으로 배지를 3시간 동안 교환하고, 20% SDS를 이용하여 생성된 포르마잔(formazan) 결정을 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. MTT 측정법은 하기 식에 의해 세포생존률을 계산하였으며, 그 결과는 도 5에 나타내었다.

수학식 1

[0057]
$$\text{세포생존률} = [\text{실험군 O.D} / \text{대조군 O.D.}] \times 100\ (\%)$$

[0058] 도 5에 나타나는 바와 같이, 0.3mM t-bHP가 처리되고 2시간 후 세포 생존력은 17%까지 현격하게 감소하였지만,

키위 과피의 추출물이 1mg 처리된 경우에는 세포 생존력이 60%까지 증가함을 알 수 있었다.

[0059] 실시예 1-6 : 당화 저해 능력(Glycation Inhibitory Activity)의 측정

[0060] 상기 키위의 과육, 과피 및 전체의 70% 에탄올 추출물의 당화 저해 능력을 측정하기 위해 Glycation inhibitory assay를 수행하였다. 10mM glyceraldehyde, 10mg/mL bovine serum albumin, 1mM의 DTPA 와 0.1M의 phosphate buffer (pH 7.4), 미생물 억제제로 sodium azide 0.02%와 키위 추출물을 사용하여 37℃에서 7일간 암소 보관하였으며, 7일 후 반응에 참여하지 않은 당을 제거하기 위해 0.1M phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 24시간 동안 투석하였다. 양성 대조군으로는 10mM의 aminoguanidine을 사용하였고, 음성대조군으로는 무처리군을 사용하였다 AGEs의 생성 억제 확인은 형광도를 측정하여 확인하였으며(VICTOR3TM, PerkinElner, USA), excitation 파장 370nm와 emission 파장 440nm에서 측정하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[0061] 도 6에 나타나는 바와 같이, 키위의 과피 추출물(1mg)은 최종당화산물을 16%까지 저해시킬 수 있는 반면, 키위의 전체 및 과육 추출물은 3% 정도 저해시킬 수 있었다.

[0062] **실시예 2: 키위 과피의 70% 에탄올 추출물의 분획물의 항산화력 평가**

[0063] 상기 실시예 1에서 얻은 키위 과피의 70% 에탄올 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트 및 부탄올로 차례로 분획하였다(도 7 참조). 이후, 각 분획물에 대하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 FRAP, DPPH · SC_{50}을 측정하여 표 2 및 도 8, 9에 나타내었다.

표 2

[0064]

	헥산 분획물	클로로포름 분획물	에틸 아세테이트 분획물	부탄올 분획물	물층	비타민 C
DPPH.SC_{50} (mgDM/mL)	2859±180[a]	2026±115[b]	416±9[c]	3434±321[d]	18645±568[e]	73±6.6[f]
FRAP (mMFe(Ⅱ)/mg DM)	1.88±0.06[a]	1.82±0.05[a]	5.72±0.26[b]	0.6±0.01[c]	0.57±0[d]	9.8±0.04[e]

[0065] 상기 표 2 및 도 8, 9에 나타나는 바와 같이, 키위 과피의 에틸 아세테이트 분획물은 다른 분획물에 비하여 항산화력이 매우 높다는 것을 알 수 있었다.

[0066] **실시예 3 : 키위 과피의 에틸 아세테이트 분획물의 총 플라보노이드, 총 폴리페놀 및 퀘세트린의 함량**

[0067] 상기 실시예 2에서 얻은 키위 과피의 에틸 아세테이트 분획물에 대하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀의 함량을 측정하여 도 10, 11에 나타내었다.

[0068] 도 10, 11에 나타나는 바와 같이, 키위 과피의 에틸 아세테이트 분획물은 키위 과피의 70% 에탄올 추출물에 비하여 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량이 훨씬 높다는 것을 알 수 있었다.

[0069] 또한, 키위 과피의 에틸 아세테이트 분획물에 대하여 HPLC 크로마토그래피를 이용하여 퀘세트린의 함량을 분석하여 도 12에 나타내었다.

[0070] 도 12에 나타내는 바와 같이, 키위 과피의 에틸 아세테이트 분획물의 10mg(건조중량)은 퀘세트린을 17.3㎍이나 함유하고 있어 퀘세트린을 매우 많이 함유하고 있음을 알 수 있었다.

[0071] **실시예 4 : 키위 과피의 에틸 아세테이트 분획물의 당화 저해 능력의 평가(*in vitro*)**

[0072] 본 실시예에서는 상기 실시예 2에서 얻은 키위 과피의 에틸 아세테이트 분획물에 대하여 "프리-글리케이티드 콜라겐 모델(pre-glycated collagen model)"을 이용하여 당화 저해 능력을 측정하였다(*in vitro*).

[0073] 도 13에 도시된 방법으로 수행하였으며, 양성 대조군으로는 아미노구아니딘, 음성 대조군으로는 무처리군을 사용하였다. 당화 저해 능력은 각 형광 정도 측정값을 이용하여 블랭크(무처리군, 100%)와 비교하여 측정하였으며, 그 결과는 도 14에 나타내었다.

[0074] 도 14에 나타나는 바와 같이, 본 발명의 키위 과피의 에틸 아세테이트 분획물(1mg/ml)은 67% 라는 높은 당화 저해 능력을 가지며, 이는 아미노구아니딘(5mM)의 당화 저해 능력과 유사한 정도임을 알 수 있었다.

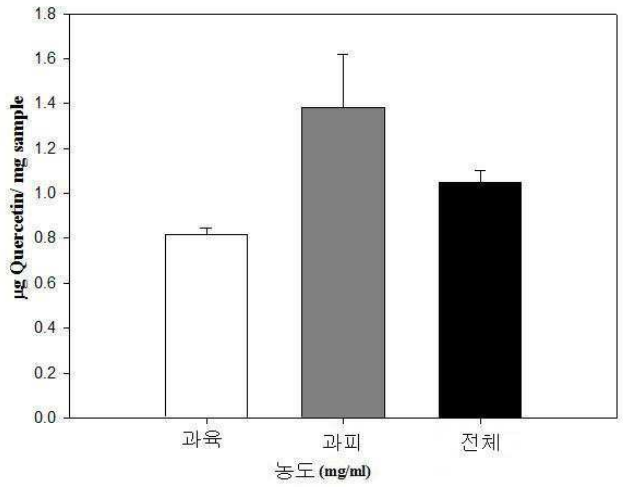
[0075] **실시예 5 : 키위 과피의 에틸 아세테이트 분획물의 당화 저해 능력의 평가(*ex-vivo*)**

[0076] 본 실시예에서는 상기 실시예 2에서 얻은 키위 과피의 에틸 아세테이트 분획물에 대하여 *ex-vivo* 실험을 통하여 당화 저해 능력을 평가하였다. goat anti-mouse Alexa 488 fluor를 이용하였으며, 최종당화산물 1차 항체를 이용하여 면역 형광 염색을 함으로써 최종당화산물의 분포를 관찰하였다. 2.6mg/ml 콜라겐, 0.001N HCI buffer, 10mM glycoaldehyde과 1mg/ml키위 추출물을 사용하여 37 ℃에서 7일간 암소에서 반응시켰다. 9일 후 반응에 참여하지 않은 당을 제거하기 위해 0.001N HCI buffer를 이용하여 24 시간 동안 투석하였다. 위에 만든 glycated collagen 과 처리되지 않은 콜라겐을 1 대 1 비율로 섞어서 준비한 콜라겐 솔루션과 sterile reconstitution buffer는 8 대 1 의 비율로 섞어서 collagen gel lattice를 만들었다. 이 반응물은 48 wells-plate에 겔(gel)화 시켰다. 24시간 후 겔은 well에 파견하여 액체 질소에 담근후 냉동실에서 보관하였다. 그 다음에 이 냉동된 gel lattice는 cryotome을 사용하여 50㎛로 잘랐다. 마지막으로 Immunofluorescence staining을 위해서 섹션한 gel lattice는 유리 슬라이드에 올렸다. 실험군과 대조군 각 anti-AGEs antibody(TransGenic, Kobe, Japan, 2/mL) 처리 후 phosphate buffer saline (PBS)로 씻고 마지막으로 goat anti-mouse Alexa 488 fluor antibody(Invitrogen, Carlsbad, USA, 1:200)를 처리하였다. Confocal laser scanning microscope을 이용하여 당화된 콜라겐 매트릭스에서 AGEs 분포를 확인하였다.

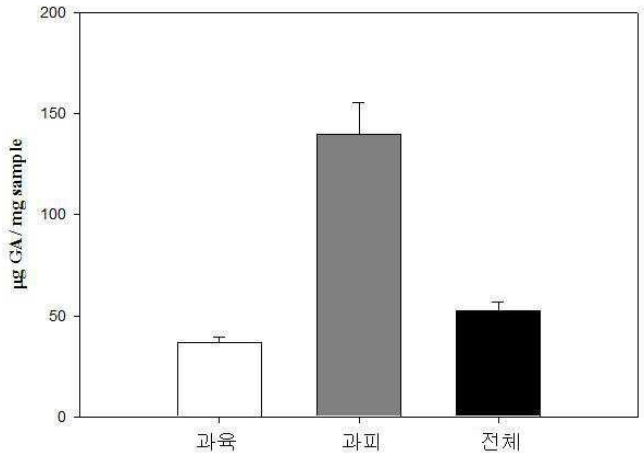
[0077] 도 15는 당화된 콜라겐 매트릭스에서 AGEs 분포를 확인하기 위하여 면역 형광 염색을 한 결과를 나타내는데, 당화된 부분은 녹색을 나타낸다. 이에 의하면, 본 발명의 키위 과피의 에틸아세테이트 분획물(1mg/ml)은 아미노구아니딘(5mM)과 동등 이상의 당화 저해 능력을 가짐을 알 수 있었다.

도면

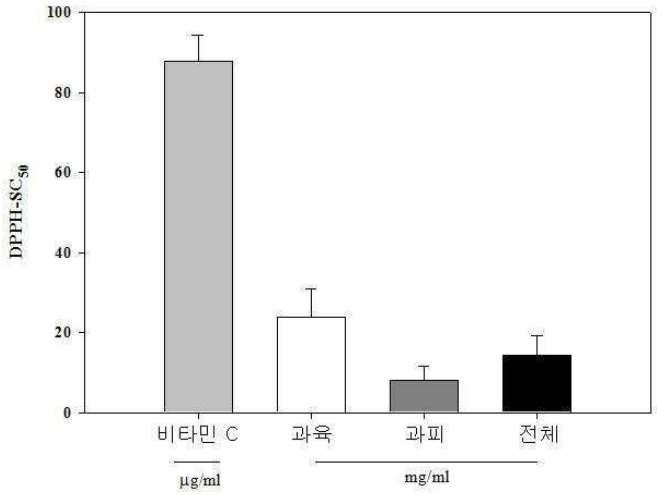
도면1



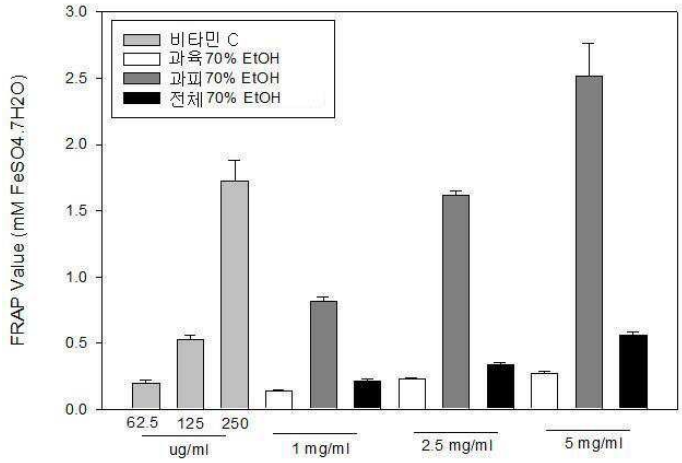
도면2


200
150
100
50
0
μg GA / mg sample
과육
과피
전체

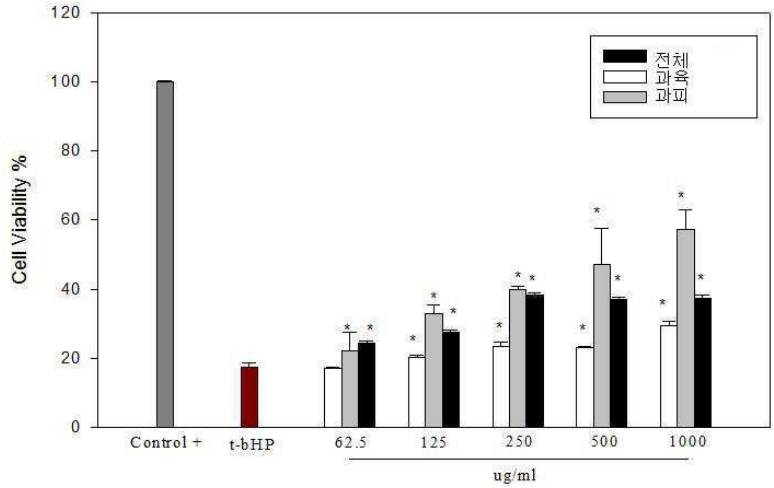
도면3


100
80
60
40
20
0
DPPH-SC50
비타민 C
과육
과피
전체
μg/ml
mg/ml

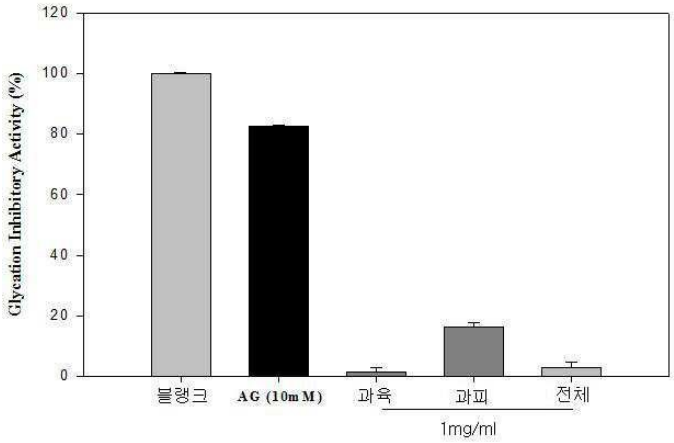
도면4


3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
FRAP Value (mM FeSO4.7H2O)
비타민 C
과육70% EtOH
과피70% EtOH
전체70% EtOH
62.5
125
250
ug/ml
1 mg/ml
2.5 mg/ml
5 mg/ml

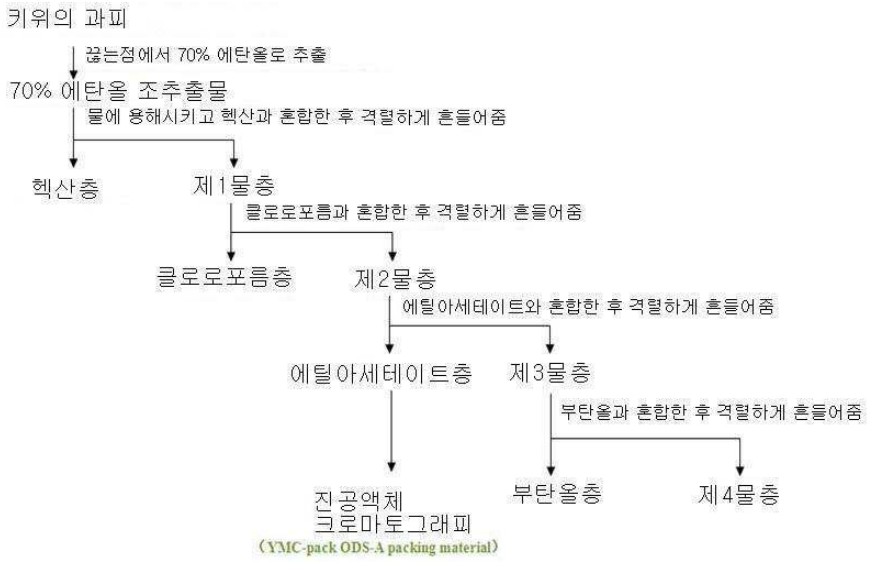
도면5


120
100
80
60
40
20
0
Cell Viability %
전체
과육
과피
Control +
t-bHP
62.5
125
250
500
1000
ug/ml

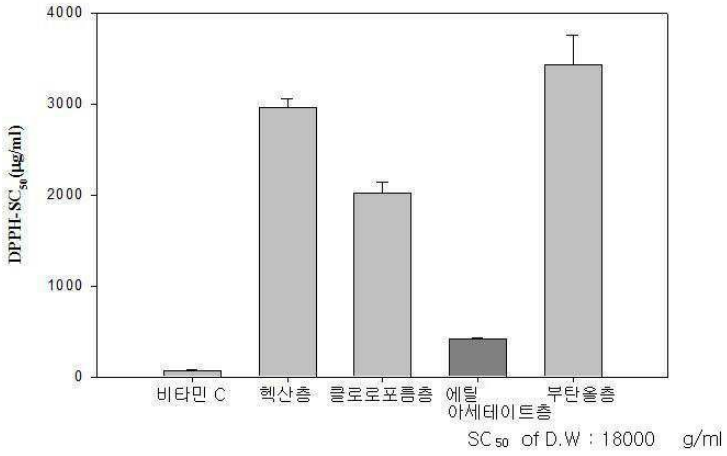
도면6


120
100
80
60
40
20
0
Glycation Inhibitory Activity (%)
블랭크
AG (10mM)
과육
과피
전체
1mg/ml

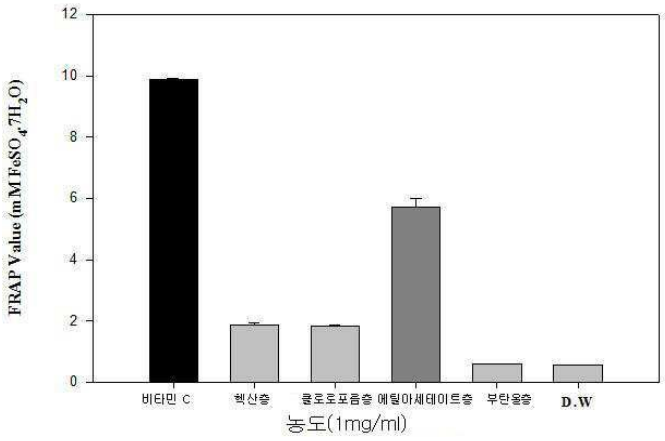
도면7


키위의 과피
끓는점에서 70% 에탄올로 추출
70% 에탄올 조추출물
물에 용해시키고 헥산과 혼합한 후 격렬하게 흔들어줌
헥산층
제1물층
클로로포름과 혼합한 후 격렬하게 흔들어줌
클로로포름층
제2물층
에틸아세테이트와 혼합한 후 격렬하게 흔들어줌
에틸아세테이트층
제3물층
부탄올과 혼합한 후 격렬하게 흔들어줌
진공액체
크로마토그래피
(YMC-pack ODS-A packing material)
부탄올층
제4물층

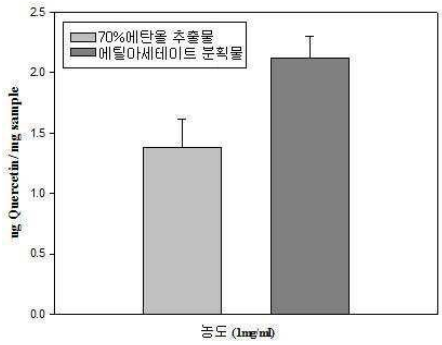
도면8


4000
3000
2000
1000
0
DPPH-SC50 (μg/ml)
비타민 C
헥산층
클로로포름층
에틸 아세테이트층
부탄올층
SC50 of D.W : 18000 g/ml

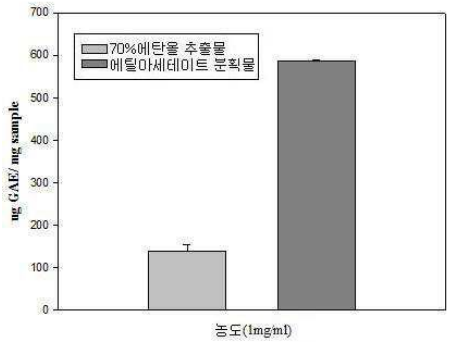
도면9


12
10
8
6
4
2
0
FRAP Value (mM FeSO4·7H2O)
비타민 C
헥산층
클로로포름층
에틸아세테이트층
부탄올층
D.W
농도(1mg/ml)

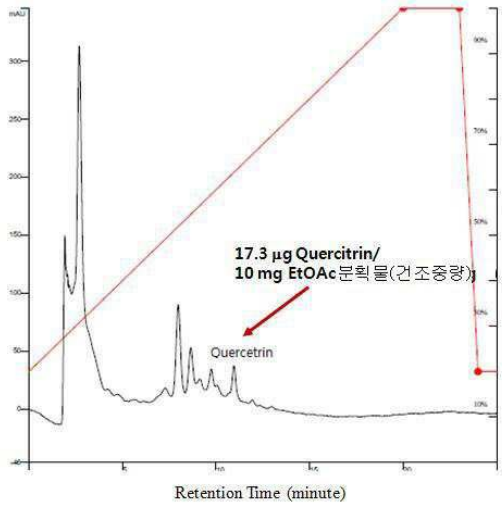
도면10


2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
mg Quercetin / mg sample
70%에탄올 추출물
에틸아세테이트 분획물
농도 (1mg/ml)

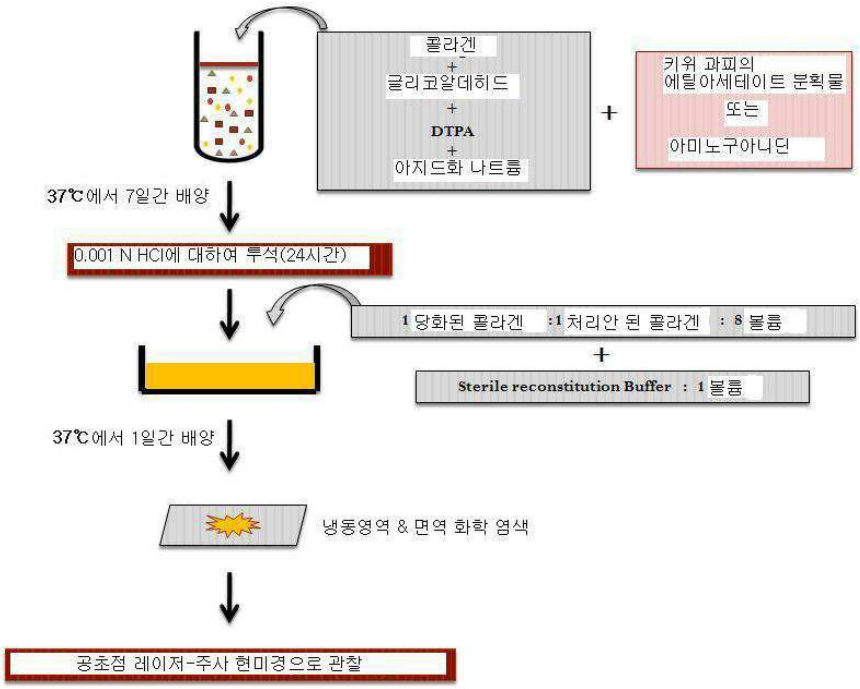
도면11



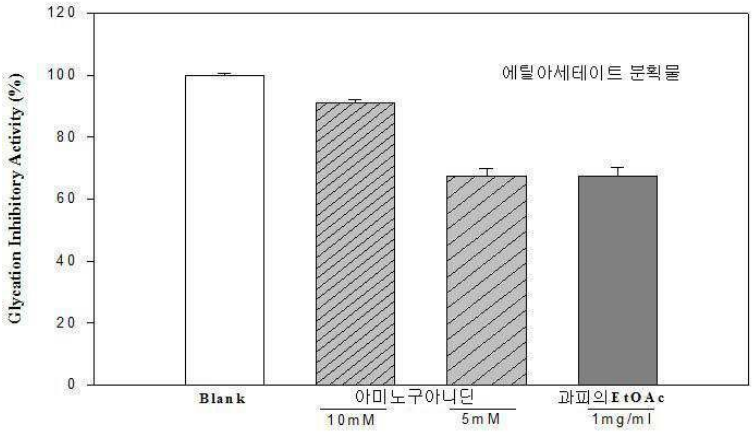
도면12



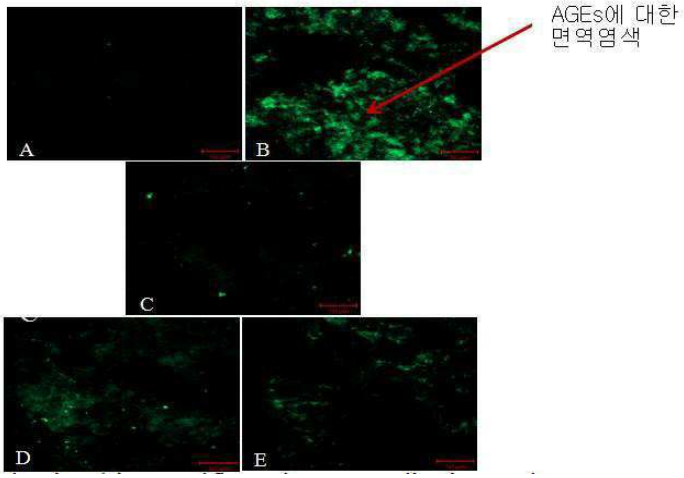
도면13



도면14


120
100
80
60
40
20
0
Glycation Inhibitory Activity (%)
에틸아세테이트 분획물
Blank
아미노구아니딘
10mM
5mM
과피의EtOAc
1mg/ml

도면15


AGEs에 대한
면역염색
A
B
C
D
E