(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0097293
(43) 공개일자 2010년09월03일

(51) Int. Cl.
A61K 8/97 (2006.01) *A61K 8/49* (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0016167
(22) 출원일자 2009년02월26일
심사청구일자 2009년02월26일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
윤나영
부산광역시 수영구 망미1동 더샵 파크리치아파트 107동 303호
엄태길
경상남도 창원시 대방동 대동아파트 101동 301호
김세권
부산광역시 동래구 사직2동 쌍용예가아파트 125동 1402호
(74) 대리인
이덕록

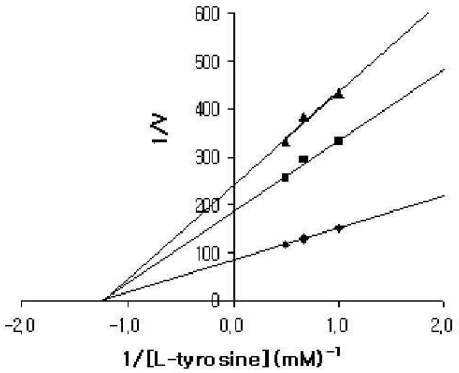
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 피부 미백활성을 갖는 감태 추출물

(57) 요 약

본 발명은 피부 미백활성을 갖는 감태 추출물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 티로시나아제 저해 및 멜라닌 생합성 저해활성을 갖는 감태 추출물 및 이로부터 분리된 플로로탄닌 화합물을 포함하는 피부 미백용 약학 조성물 및 화장품 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 감태 추출물 및 그의 성분인 7-플로로엑콜의 머쉬룸 티로시나아제에 대한 강력한 저해효과를 나타내었으며, 특히, 7-플로로엑콜은 머쉬룸 티로시나아제 및 흑색종 세포에서 멜라닌의 합성에 대해 유의적인 저해효과가 나타났다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

감태 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 약학 조성물.

청구항 2

감태 유래 7-플로로엑콜을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 약학 조성물.

청구항 3

감태 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 4

감태 유래 7-플로로엑콜을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피부 미백활성을 갖는 감태 추출물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 감태 추출물 및 이로부터 분리된 플로로탄닌 화합물을 포함하는 피부 미백용 약학 조성물 및 화장품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하는데 필수적이지만, 비정상적인 멜라닌 축적은 기미, 주근깨, 모반 및 노인성 반점 (senile lentigines)과 같은 색소 침착과 관련된 질환을 유발시킨다. 멜라닌은 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌 세포에서 생성되며, 핵심 효소인 티로시나아제에 의해 조절된다. 폴리페놀 옥시다아제 (polyphenoloxidase, PPO)로 알려진 티로시나아제는 구리-함유 모노옥시게나아제로서 멜라닌 합성에서 필수효소로 작용한다. 티로시아나제 (tyrosinase)는 두 가지 산화반응, 즉 L-티로신이 L-디하이드록시페닐알라닌 (L-DOPA)로의 산화와 이어지는 DOPA의 DOPA 퀴논 (EC 1.10.3.1, 카테콜 옥시다아제)으로 산화가 촉진된다. 퀴논은 고도 반응성인 화합물로서 아미노산과 단백질과 반응하며, 고분자량 화합물 또는 갈색 색소 (유멜라닌 또는 페오멜라닌)를 형성한다. 이러한 반응은 갈색 색소의 생성을 촉진시킨다. 티로시나아제의 활성을 저해시키기 위하여, 많은 티로시나아제 저해제가 유기물의 합성 또는 천연물로부터 분리되는 방법으로 개발되고 있다. 이들은 미백제로서, 또한 색소침착 억제 약물로서 화장품에 이용할 수 있다.

[0003] 미백제 개발에 대한 광범위한 연구에도 불구하고, 강한 독성, 낮은 안정성 및 피부-투과성, 불충분한 활성으로 인해 현존하는 미백제의 사용이 제한되고 있다. 합성 티로시나아제 저해제의 부작용으로 인해, 천연물로부터 새로운 티로시나아제 저해제 개발에 많은 관심을 가지고 있다.

[0004] 종래 티로시나아제 저해제와 관련하여, 대한민국 등록특허 제10-0190992호 “천문동 추출물과 티로시나아제 저해제를 함유한 피부미백용 조성물”에는 기미나 주근깨 개선 및 피부 미백제로서 천문동 추출물과 1종 이상의 티로시나아제 저해제를 함유하는 피부 미백용 조성물이 개시되어 있고, 대한민국 특허출원 제1002000-0073163호 “어성초 추출물로 이루어진 티로시나아제 저해제 및 이를 함유하는 미백 화장료”에는 어성초 추출물로 이루어진 티로시나아제 저해제 및 어성초 원료 kg당, 물, 에탄올, 메탄올, 아세톤, 프로판올, 1,3-부틸렌글리콜에서 선택되는 1종 이상의 용매의 혼합용매 20ℓ를 가하고, 40℃에서 8시간 추출, 여과한 후, 실온 (20 내지 25℃)에서 7일간 숙성시키는 단계를 포함하여 이루어지는 티로시나아제 저해제의 제조방법과, 어성초 추출물을 함유하

는 미백 화장료가 개시되어 있다.

[0005] 또한 대한민국 등록특허 제10-0561185호 “티로시나아제 저해활성이 증진된 티로시나아제 저해물질의 추출방법”에는 유기용매로 추출된 티로시나아제 저해 물질 함유 식물 추출물을 특정 함량의 폴리사카라이드 분해효소를 함유한 수성 용매에 혼합하여 식물 추출물 내에 함유되어 있는 티로시나아제 저해물질과 결합되어 있는 폴리사카라이드를 제거함으로써 티로시나아제 저해활성을 증진시키고, 기존의 식물 추출물의 티로시나아제 저해활성이 낮은 문제점을 해결함과 동시에 보다 높은 티로시나아제 저해활성을 가진 미백제를 생산할 수 있도록 저해활성이 증진된 티로시나아제 저해물질의 추출방법이 개시되어 있고, 대한민국 특허출원 제10-2002-0046121호 “티로시나아제 저해용 3,4-디하이드록시만델릭산 화합물”에는 3,4-디하이드록시만델릭산 화합물은 멜라닌 생합성 과정에 핵심적으로 작용하는 효소인 티로시나아제에 대해 저해제로 작용하여 티로시나아제의 활성을 효과적으로 저해하므로, 기미, 주근깨, 반점, 임신기 과색소 침착증 등 멜라닌의 과잉 합성에 따른 피부질환 치료제는 물론, 멜라닌 생성 저해를 통한 미백기능, 피부노화방지 및 피부보호기능을 갖는 화장용 조성물에 있어 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있음이 개시되어 있다.

[0006] 또한 대한민국 등록특허 제10-0502392호 “티로시나아제 저해제용 4,4′-디하이드록시바이페닐 화합물”에는 4,4′-디하이드록시바이페닐은 멜라닌 생합성 과정에 핵심적으로 작용하는 효소인 티로시나아제에 대해 저해제로 작용하여 티로시나아제의 활성을 효과적으로 저해하므로, 기미, 주근깨, 반점, 임신기 과색소 침착증 등 멜라닌의 과잉 합성에 따른 피부질환 치료제는 물론, 멜라닌 생성 저해를 통한 미백기능, 피부노화방지 및 피부보호기능을 갖는 화장용 조성물에 있어 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있음이 개시되어 있고, 대한민국 특허출원 제10-2006-7027751호 “이핵성 효소의 강력한 저해제로서의 디아릴알칸”에는 활성 식물 추출물 및 특별한 화합물 - 이핵성 효소 기능을 특이적으로 저해하는 추출물 안의 디아릴알칸 및/또는 디아릴알카놀을 확인하기 위한 화학적 중복분리방지 방법과 함께 효소 저해 검정을 조합한 방법 및 이핵성 효소의 활성, 특히 티로시나아제를 저해하는 방법 및 이핵성 효소의 기능과 관련된 질병 및 질환의 예방 및 치료를 위한 방법과, 멜라닌 과생성 및 이와 관련된 피부의 질병 및 질환의 예방 및 치료를 위한 방법 및, 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께 하나 또는 그 이상의 식물로부터 합성 및/또는 분리된 하나 또는 그 이상의 디아릴알칸 및/또는 디아릴알카놀을 포함하는 유효량의 조성물을 그것을 필요로 하는 수용자에게 투여하는 것이 개시되어 있다.

[0007] 감태 (*Ecklonia cava* Kjellman)는 다년생 갈조류로서, 다시마과에 속한다. 감태는 대한민국 제주도 해안에 널리 서식하며, 다시마 (*Laminaria japonica*)와 미역 (*Undaria pinnatifida*)과 함께 식용으로 사용되고 있다. 종래의 연구에서, 감태는 항산화, 항암, 항응혈, MMP 저해활성 등의 많은 유용한 생리활성이 보고되었다.

[0008] 플로로탄닌은 폴리페놀 화합물로서 에클로니아 (*Ecklonia* sp.) 속의 주요 대사산물이며, 활성 산소종 (ROS) 소거, 항플라스민, 항돌연변이, 항균, 세포손상, HIV-1 역전사효소, 안지오텐신-전환 효소 및 콜린에스테라아제 저해활성과 같은 다양한 생리활성의 활성성분으로 알려져 있다.

[0009] 본 발명에서는 안전하고 효과적인 피부 미백제를 개발하기 위하여, 감태 유래의 플로로탄닌의 머쉬룸 티로시나아제 및 마우스 B16F10 흑색종 세포에서 멜라닌 생성 저해효과를 연구하고 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 감태로부터 유래된 플로로탄닌 화합물을 포함하는 티로시나아제 저해제를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적은 감태 추출물로부터 플로로탄닌 화합물을 수득하고, 이들의 티로시나아제 저해활성 및 멜라닌 생합성 저해활성을 확인함으로써 달성되었다.

[0012] 본 발명은 감태 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 감태 유래 7-플로로엑콜을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명에 있어서, “유효성분”이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능·효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군 (약리학적 활성성분 등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.

[0015] 본 발명의 7-플로로엑콜은 멜라닌 생합성에 있어 속도조절 작용 효소인 티로시나아제에 대해 비경쟁적 저해제로 작용한다. 따라서 티로시나아제의 작용으로 멜라닌 생합성의 과잉에 따른 각종 질병, 예를 들어 기미, 주근깨, 임신기 과색소 침착증 (hyperpigmentation) 또는 노인성 반점 (senile lentigo)을 포함하는 피부질환의 치료제로서 상기 7-플로로엑콜은 유용하게 이용될 수 있다.

[0016] 본 발명의 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 약학 조성물의 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합 뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0018] 또한 본 발명은 감태 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은 감태 유래 7-플로로엑콜을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공한다.

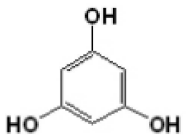
[0020] 본 발명의 피부 미백용 화장품 조성물은 7-플로로엑콜을 유효성분으로 하여, 크림, 연고, 거품, 로션, 플라스터, 정제, 과립 또는 에멀션 형태의 미백제로 제형화 될 수 있다. 이때 조성물의 분포를 용이하게 하기 위하여 조성 내 활성성분에 대한 희석제, 분산제 또는 운반체로서 작용하는, 화장용 조성물에 허용되는 각종 부형제를 포함할 수도 있다. 수분 이외의 부형제 또는 수분을 포함하는 부형제로는 액체 또는 고체 형태의 피부 연화제, 용매, 습윤제 또는 증점제 또는 분말 등을 포함한다.

[0021] 한편 멜라닌 과생성에 따른 피부질환 치료제로 사용하기 위하여 연고, 크림, 액상 치료제 등으로 제형화 할 수 있으며, 이때 제형의 겔화를 위해서 셀룰로스 유도체, 조류 (algal) 유도체, 천연 검 및 합성 중합체 등을 혼합할 수 있다.

[0022] 본 발명에서는 감태로부터 하기 화학식 1 내지 3의 세 가지 플로로탄닌 화합물을 분리, 동정하였다.

[0023] 화합물 1 내지 3의 화학 구조는 플로로글루시놀 (화합물 1), 디옥시노디하이드로엑콜 (화합물 2) 및 7-플로로엑콜 (화합물 3)로 동정되었으며, 화합물 1 내지 3의 화학식을 다음과 같다.

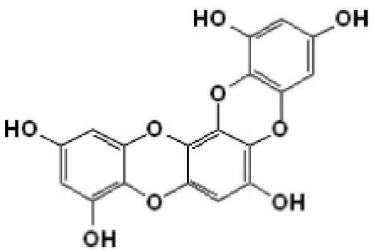
[0024] <화학식 1>



[0025]

[0026] 플로로글루시놀

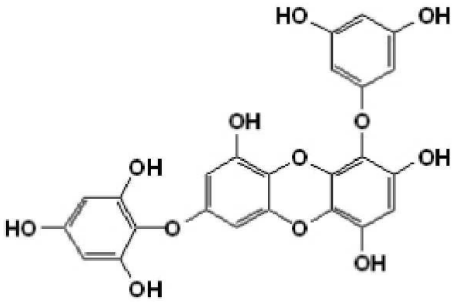
[0027] <화학식 2>



[0028]

[0029] 디옥시노디하이드로엑콜

[0030] <화학식 3>



[0031]

[0032] 7-플로로엑콜

[0033] 본 발명은 감태의 에탄올 추출물 및 그의 성분인 7-플로로엑콜이 머쉬룸 티로시나아제에 대한 강력한 저해효과가 있음을 보여주었다. 특히, 7-플로로엑콜이 머쉬룸 티로시나아제 및 마우스 흑색종 세포에서 멜라닌의 합성에 대해 유의적인 저해효과가 나타났다. 상기 화합물은 또한 BF16F10 흑색종 세포에서 IBMX-유도 멜라닌 합성에 대해 유의적인 저해효과를 나타내었다. 이러한 결과는 감태 유래 7-플로로엑콜이 피부-미백제로서 우수한 후보물질이 될 수 있음을 제시하는 것이다.

효 과

[0034] 본 발명에 따른 감태 추출물 및 그의 성분인 7-플로로엑콜이 머쉬룸 티로시나아제에 대한 강력한 저해효과를 나타내며, 특히, 7-플로로엑콜이 머쉬룸 티로시나아제 및 흑색종 세포에서 멜라닌의 합성에 대해 유의적인 저해효과가 나타나므로 피부 미백제로서 우수한 후보물질이 될 수 있기 때문에, 본 발명은 피부 미백 제약 산업 및 화장품 산업에서 매우 유용한 발명이 될 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0035] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시예를 참고로 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0036] **실시예 1 : 에탄올 추출물 및 분획물 제조**

[0037] 감태 동결건조 분말 (4.0 kg)를 고온 에탄올 (3×10 L)로 추출하였다. 추출물 (584.3 g)을 유기용매로 분획하여 *n*-헥산 (114.3 g), CH_2Cl_2 (40.6g), EtOAc (55.0 g), *n*-BuOH (96.5 g), H_2O 분획물 (277.9 g)을 수득하였다.

[0038] **실시예 2 : 화합물의 분리**

[0039] 감태 EtOAc 분획물 (55.0 g)을 실리카겔을 이용하여 CH_2Cl_2:MeOH (30:1 내지 1:1)로 컬럼 크로마토그래피하여 16개의 하부 분획물 (EF01 내지 EF16)을 수득하였다. 분획물 2 (EF02, 1.1g)를 MeOH로 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피하여 5개의 하부 분획물 (EF0201 내지 EF0205)을 수득하였다. 분획물 1 (EF0201, 648.9 mg)을 동일한 용매조건에서 세파덱스 LH-20으로 컬럼 크로마토그래피하여 플로로글루시놀 (600.0 mg)을 분리하였다. 분획물 2 (EF0202, 110.4 mg)을 세파덱스 LH-20 (100% MeOH)을 사용하여 디옥시노데하이디로엑콜 (88.0 mg)를 정제하였다. RP-18 (20% MeOH 내지 100% MeOH, 구배) 및 세파덱스 LH-20 (100% MeOH)를 이용하여 분획물 11 (EF11, 135mg)로부터 7-플로로엑콜 (43.4 mg)을 분리하였다. 발표된 구조 데이터와 비교하여 플로로글루시놀, 디옥시노데하이디로엑콜 및 7-플로로엑콜의 구조를 동정하였다.

[0040] **실험예**

[0041] ^{1}H- 및 ^{13}C-NMR 스펙트럼 (JNM ECP-400, JEOL, Japan)은 테트라메틸실란 (TMS)을 표준물질로 화학적 이동치를 측정하고, 시료는 DMSO-d_6로 녹여서 측정하였다. 컬럼 크로마토그래피를 실리카겔 60 (70-230 mesh, Merck, Germany), RP-18 리크로프레프 (Merck, Germany) 및 세파덱스 LH-20 (Sigma, st. Louis, MO, USA)로 수행하였다. TLC는 프리코티드 머크 키젤겔 (precoated Merck Kieselgel 60 F_{254}) 플레이트 (0.25 mm) 및 RP-18 F_{254s} 플레이트 (Merck, Germany)에서 수행하였고, 발색은 50% H_2SO_4 시약을 이용하였으며, 자외선 램프를 이용하여 화합물의 분리정도를 확인하였다. 컬럼 크로마토그래피에 사용된 모든 용매는 high grade의 시약을 이용하였다.

[0042] 알부틴, 코즈산 (kojic acid), 3-이소부틸-1-메틸크산틴 (3-isobutyl-1-methylxanthine; IBMX) 및 머쉬룸 티로시나아제 (mushroom tyrosinase, EC 1.14.18.1)는 시그마사 (Sigma Chemical Company; St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. L-티로신 및 K_2HPO_4는 준세이사 (Junsei Chemical Co. Ltd.; Tokyo, Japan)에서 구입하였고, KH_2PO_4는 야쿠리사 (Yakuri Pure Chemicals Co. Ltd.; Osaka, Japan)에서 구입하였다.

[0043] 티로시나아제에 대한 저해효과를 노 등 (No *et al*)이 개발한 실험법을 이용하여 측정하였다. 상이한 농도의 각 시료 용액 10 μL 및 인산염 완충액 (pH 6.5) 중의 머쉬룸 티로시나아제 20 μL를 96-웰 마이크로플레이트에 1 mM L-티로신 용액, 50 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.5) 및 증류수가 10:10:9의 비율로 함유된 혼합용액을 170 μL를 가하였다. DMSO에 용해한 시료들은 증류수로 30배로 희석하여 사용하였다. 37℃에서 30분 동안 배양한 후, 반응액의 흡광도를 GENios마이크로플레이트 리더기 (Tecan Austria GmbH, Austria)를 사용하여 490nm에서 측정하였다. 시료 첨가에 의한 티로시나아제 저해 정도는 50% 저해율 (IC_{50})로 나타내었다. 티로시나아제 저해율을 하기식으로 계산하였다.

[0044] 저해율 % = [{1 (Aa Ab)/Ac} × 100]

[0045] 상기 식에서, Aa는 시험 시료 및 효소에 대한 490 nm에서의 흡광도이고,

[0046] Ab는 효소 없이 시료에 대한 490 nm에서의 흡광도이며,

[0047] Ac는 시료 없이 효소에 대한 490 nm에서의 흡광도이다.

[0048] 반응 혼합물은 50 mM 인산염 완충액 (pH 6.5) 60 μL, 물 50 μL, 시료용액 10 μL 및 머쉬룸 티로시나아제 수용액 (1000 U/mL) 20 μL를 넣어 제조하였다. 상기 혼합물을 37℃에서 5분 동안 예비배양 하였다. 이어서, 1 mM L-티로신 60 μL를 가하고, 2분 배양 후, 490 nm에서 반응을 측정하였다.

[0049] 시료의 효소 저해 패턴 (enzyme kinetic) 연구는 L-티로신 (1 내지 6mM)를 다섯 개의 상이한 농도로 제조된 반응 혼합물을 이용하였으며, 다양한 농도의 각 시료를 각각 반응 혼합물에 가하였다. 미카엘리스 상수 (Michaelis constant; K_m) 및 티로시나아제의 최대속도 (V_{max})를 기질로서 다양한 농도의 L-티로신을 이용한 라인위버-버크 (Lineweaver-Burk) 플롯으로 계산하였다.

[0050] 마우스 흑색종 B16F10 세포 (CRL 6323)를 ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. B16F10 세포를 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 10 mM HEPES 완충액, 100 U/mL 페니실린 G, 100 mg/mL 스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지에 배양시키고, 5% CO_2와 37℃의 습윤 환경에서 배양하였다.

[0051] 흑색종 B16F10 세포에 대한 화합물의 세포독성은 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 방법을 이용하여 측정하였다. 세포를 96-웰 플레이트에 1×10^5 cells/well 밀도로 분주하였다. 24시간 후, 세포를 새로운 배지로 교체하고 상이한 농도의 화합물로 처리하였다. 배양 72시간 후, 배지를 제거하고, MTT 용액 (5 mg/mL) 100 μL를 넣은 후, 4 시간 동안 배양하였다. 최종적으로, DMSO (100 μL)를 넣어 형성된 포르마잔 염을 용해시켜 GENios마이크로플레이트 리더기로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 시료의 세포독성을 측정하였다. 세포독성은 대조군과 비교하여 %로 정량화하고, 용량-반응성 곡선을 만들었다. 데이터는 3회 이상의 독립적 실험의 평균으로 나타내었다.

[0052] 호소이 등 (Hosoi *et al*)이 개발한 방법을 이용하여 멜라닌 함량을 측정하였다. B16F10 흑색종 세포를 24-웰 플레이트에 2×10^4 cells/well 밀도로 분주하고, 24시간 동안 배양하였다. 세포에 다양한 농도의 시료 (12.5-100 μM)를 처리하였다. 1시간 후, 100 μM의 3-이소부틸-1-메틸크산틴 (IBMX)을 처리하고, 72시간 동안

배양하였다. 세포를 PBS로 2회 세척하고, 60℃에서 30분간 가열하여 1N NaOH (in 10% DMSO)에 용해시켰다. 용리물을 5000×*g*로 5분간 원심분리한 후, 405 nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다.

[0053] 데이터는 3회 실험의 평균 ± 표준편차의 값으로 나타내었다. 평균은 Student's *t* 테스트를 이용하여 통계적으로 분석하였다. 통계적 유의성을 $p<0.001$, 0.01 및 0.05로 표시하였다.

[0054] **실험예 1 : 감태 추출물의 티로시나아제 저해효과 분석**

[0055] 본 발명에서는 50 μg/mL 농도의 감태 에탄올 추출물을 비롯하여, *n*-헥산, CH_2Cl_2, EtOAc, *n*-BuOH, H_2O 분획물을 포함한 용매 가용성 분획물의 티로시나아제 저해효과를 연구하였다 (표 1 참조).

[0056] <표 1>

[0057] 50 μg/mL 농도에서 감태 유래 에탄올 추출물 및 그의 용매 가용성 분획의 머쉬룸 티로시나아제에 대한 저해효과

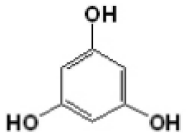
[0058]

시료	저해율 (%)
EtOH ex.	67.35 ±2.08
n-Hexane fr.	32.02 ±1.63
CH_2Cl_2 fr.	32.01 ±1.32
EtOAc fr.	79.97 ±2.09
n-BuOH fr.	52.73 ±1.47
H_2O fr.	30.17 ±1.73
알부틴[a]	57.13 ±1.83

[0059] [a]알부틴을 양성 대조군으로 사용하였다. 각 값은 3회 실험의 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

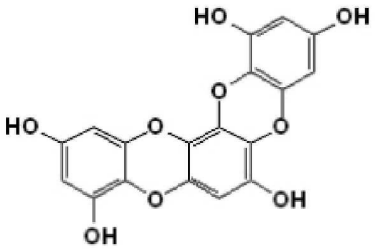
[0060] 에탄올 추출물 및 분획물 중, 에탄올 추출물 (67.35 ± 0.28%) 및 EtOAc 가용성 분획물 (79.97 ± 2.09%)이 티로시나아제의 활성을 현저히 저해하였다. EtOAc 분획물은 양성 대조군으로 사용된 알부틴 (57.13 ± 1.83%)보다 강력한 저해활성이 나타났다. EtOAc 분획물의 저해효과는 에클로니아 속의 대사산물인 플로로탄닌에 의해 나타나는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 발명에서는 EtOAc 분획물을 실리카겔 및 RP-18겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피를 반복적으로 수행하여 세 가지 화합물을 분리하였다. 상기 세 가지 화합물의 구조는 1D (^{1}H-, ^{13}C-NMR) 및 2D (HMQC와 HMBC) NMR의 분광학적 방법을 수행하였고, 발표된 문헌과 비교하여 동정하였다. 화합물 1 내지 3의 화학적 구조는 각각 플로로글루시놀 (화합물 1), 디옥시노디하이드로엑콜 (화합물 2) 및 7-플로로엑콜 (화합물 3)로 확인하였다.

[0061] <화학식 1>

[0062] 

[0063] 플로로글루시놀

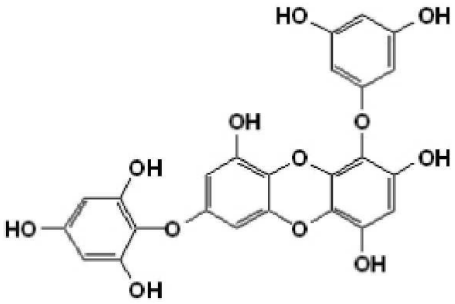
[0064] <화학식 2>



[0065]

[0066] 디옥시노디하이드로엑콜

[0067] <화학식 3>



[0068]

[0069] 7-플로로엑콜

[0070] **실험예 1 : 감태 추출물로부터 분리한 화합물의 머쉬룸 티로시나아제 저해효과 분석**

[0071] 상기에서 분리된 화합물의 머쉬룸 티로시나아제에 대한 저해활성을 조사하였다 (표 2 참조)

[0072] <표 2>

[0073] 감태 에탄올 추출물의 EtOAc 분획물로부터 분리한 화합물의 머쉬룸 티로시나아제에 대한 저해효과

[0074]

시료	IC_{50}[a] (μM)
플로로글루시놀 (화합물 1)	> 300
디옥시노데하이드로엑콜 (화합물 2)	222.94
7-플로로엑콜 (화합물 3)	0.85
알부틴[b]	243.16
코즈산[c]	40.28

[0075] [a]저해효과는 농도 저해 곡선으로부터 얻은 50% 저해농도로 나타내었다.

[0076] [b, c]알부틴 및 코즈산을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0077] 디옥시노디하이드로엑콜 (화합물 2) 및 7-플로로엑콜 (화합물 3)은 티로시나아제에 의해 촉진된 L-트립신의 산화에 대한 저해효과는 각각 IC_{50}값이 222.94 및 0.85 μM로 나타났다. 특히, 7-플로로엑콜 (화합물 3)은 양성 대조군인 코즈산 (40.28 μM) 및 알부틴 (243.16 μM)에 비해 각각 47배 및 286배 강한 저해효과를 나타내었다. 그러나 플로로글루시놀 (화합물 1)은 어떠한 티로시나아제 저해효과는 나타나지 않았다. 플로로글루시놀 (화합물 1) 및 디옥시노디하이드로엑콜 (화합물 2)은 종래 티로시나아제 저해효과가 보고된 바 있다. 본 발명에서는 상기 화합물들이 종래 연구와 비교하여 티로시나아제에 대한 유사한 저해효과를 가지고 있음을 제시하였다. 그러나 머쉬룸 티로시나아제에 대한 7-플로로엑콜 (화합물 3)의 저해효과는 본 발명에서 최초로 보고하는 것이다.

[0078] **실험예 3 : 7-플로로엑콜의 enzyme kinetic 연구**

[0079] 머쉬룸 티로시나아제에 의해 촉매화된 L-티로신에 대한 7-플로로엑콜 (화합물 3)의 kinetic 연구는 라인위버-버크 (Lineweaver-Burk) 플롯을 이용하여 분석하였다 (도 1 참조). 7-플로로엑콜 (화합물 3)의 K_i 값은 기질농도 3 μM에서 2.5 μM로, 5 μM에서 2.7 μM로 나타났다. 7-플로로엑콜 (화합물 3)은 각각 3 및 5 μM에서 K_m 값이 1.3×10^{-3} M, V_{max}값은 각각 5.3×10^{-3} M 및 4.1×10^{-3} M을 나타내었다 (표 3 참조).

[0080] <표 3>

[0081] 7-플로로엑콜 (화합물 3)의 존재하에 머쉬룸 티로시나아제의 kinetic parameters

[0082]

화합물	K_m (M)	V_{max} (M)	K_i (μM)
7-플로로엑콜	1.3 ± 10^{-3}		
3 (μM)		5.3 ± 10^{-3}	2.5
5 (μM)		4.1 ± 10^{-3}	2.7

[0083] 다양한 기질농도에 따라, 기질에 대한 K_m값의 변화없이 티로시나아제의 V_{max}값은 농도 의존적으로 감소하였다. 따라서 7-플로로엑콜 (화합물 3)은 머쉬룸 티로시나아제에 대해 비경쟁적 저해제로 작용하는 것으로 나타났다.

[0084] **실험예 4 : 감태 유래 플로로탄닌 화합물의 멜라닌 생합성 저해활성 분석**

[0085] 본 발명에서, B16F10 흑색종 세포에서 멜라닌 생합성에 대한 감태에서 분리한 플로로탄닌의 효과를 조사하였다. 화합물들의 세포독성을 MTT법을 이용하여 측정하였다. 도 2에 도시한 바와 같이, 화합물들은 12.5 내지 100 μM의 농도 범위에서 흑색종 세포에 대해 어떠한 세포독성도 나타나지 않았다.

[0086] 우선, 본 발명자들은 B16F10 세포에서 IBMX로 유도된 멜라닌 생성에 대한 25 μM 농도 화합물들의 저해효과를 조사하였다 (도 3 참조).

[0087] IBMX는 잘 알려진 멜라닌 생성 촉진제로서, 강력한 cAMP 포스포디에스테라아제 저해제이며, cAMP를 증가시킨다. cAMP는 멜라닌 합성의 조절에서 핵심 전달자로 알려져 있다. 흑색종 세포에 한번 처리한 후, 멜라닌 생성이 유의적으로 증가하였다고 나타난 바 있다.

[0088] 화합물들 중 7-플로로엑콜 만이 IBMX로 유도된 멜라닌 합성에 대해 유의적인 저해효과를 나타내었다. 따라서 IBMX로 유도된 멜라닌 생성에 대한 7-플로로엑콜 (화합물 3)의 저해효과를 12.5 내지 100 μM 농도 범위에서 조사하였다. 7-플로로엑콜을 처리한 세포에서의 멜라닌 함량은 IBMX-처리군과 비교하여 12.5 μM에서 90.6%, 25 μM에서 67.8%, 50 μM에서 57.2%, 100 μM에서 51.5%로 농도 의존적으로 유의적인 감소를 나타냈다 (도 4 참조). 본 발명의 결과를 바탕으로, 멜라닌 생성에 대한 7-플로로엑콜의 저해효과는 티로시나아제의 저해에 기인한다.

[0089] 본 발명에서는 7-플로로엑콜이 머쉬룸 티로시나아제 및 흑색종 세포에서 멜라닌의 합성에 대해 유의적인 저해효과를 나타내었다는 사실을 밝혔다. 7-플로로엑콜은 종래 대황 (*Eisenia bicyclis*) 및 곰피 (*Ecklonia stolonifera*)에서 분리된 바 있으며, 항산화, 항당뇨 합병증 및 엔지오텐신-전환 효소 저해효과와 같은 생리활성이 연구된 바 있다.

[0090] 양성 대조군으로 사용된 알부틴 및 코즈산은 피부 미백효과를 가지는 화장품 및 피부의 과다 색소 침착과 관련된 질환의 치료를 위해 사용되는 치료제로서 광범위하게 사용되고 있다. 이들 미백제의 미백작용은 티로시나아제의 활성을 저해하는 능력에 기인하는 것이다. 그러나 최근의 연구에 따르면, 알부틴은 안전성은 높으나 미백효과가 낮고, 코즈산은 강력한 미백효과를 가지나 세포독성, 피부염 및 피부암, 간의 발암화와 같은 심각한 부작용이 알려지고 있다.

[0091] 결론적으로, 본 발명은 감태의 에탄올 추출물 및 그의 성분인 7-플로로엑콜이 머쉬룸 티로시나아제에 대한 강력한 저해효과를 나타내었다. 상기 화합물은 또한 B16F10 흑색종 세포에서 IBMX-유도 멜라닌 합성에 대해 유의적인 저해효과를 나타내었다. 이러한 결과는 감태 유래 7-플로로엑콜이 피부 미백제로서 우수한 후보물질이 될 수 있음을 제시하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0092] 도 1는 7-플로로엑콜의 존재하에 머쉬룸 티로시나아제에 대한 라인위버-버크 플롯을 나타낸 도이다.

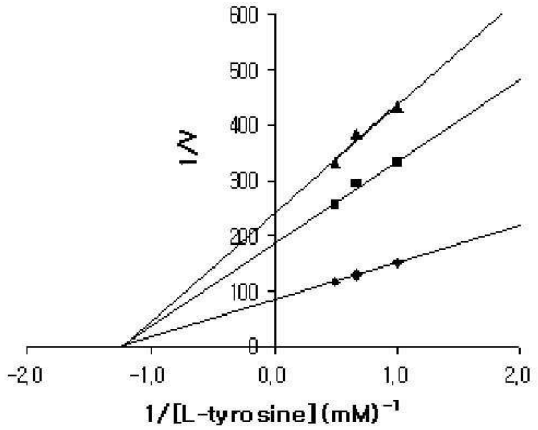
[0093] 도 2은 B16F10 흑색종 세포에서 세포독성에 대한 화합물들의 효과를 나타낸 도이다.

[0094] 도 3은 B16F10 세포에서 IBMX-유도 멜라닌 생성에 대하여 25 μM 농도에서 화합물들의 저해효과를 나타낸 도이다.

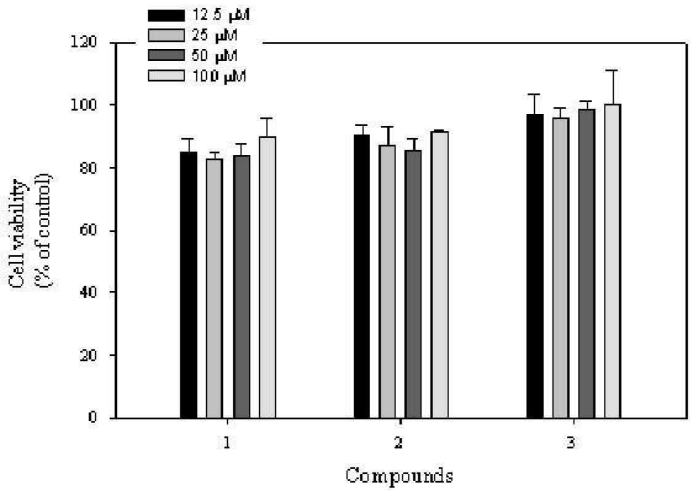
[0095] 도 4는 B16F10 세포에서 IBMX-유도 멜라닌 생성에 대하여 7-플로로엑콜의 저해효과를 나타낸 도이다.

도면

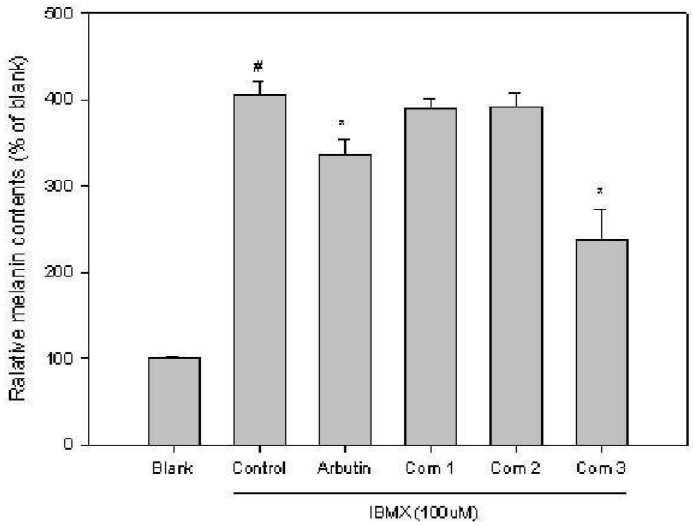
도면1



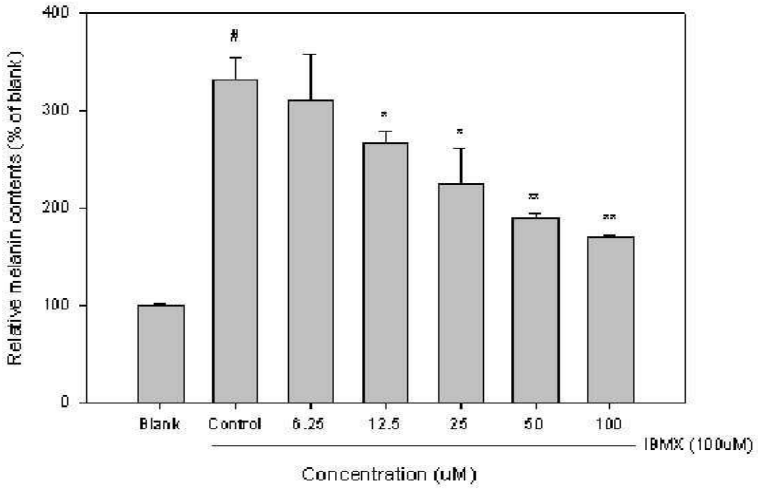
도면2



도면3


Ralative melanin contents (% of blank)
500
400
300
200
100
0
#
*
*
Blank
Control
Arbutin
Com 1
Com 2
Com 3
IBMX(100uM)

도면4


Relative melanin contents (% of blank)
400
300
200
100
0
#
*
*
**
**
Blank
Control
6.25
12.5
25
50
100
IBMX (100uM)
Concentration (uM)