



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0045981
(43) 공개일자 2016년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/34 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0140682

(22) 출원일자 2014년10월17일

심사청구일자 2014년10월17일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

백남인

경기 화성시 동탄중앙로 51, 629동 901호 (반송동, 동탄나루마을한화꿈에그린아파트)

조진경

경기 수원시 영통구 반달로 56, 205호 (영통동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 대아

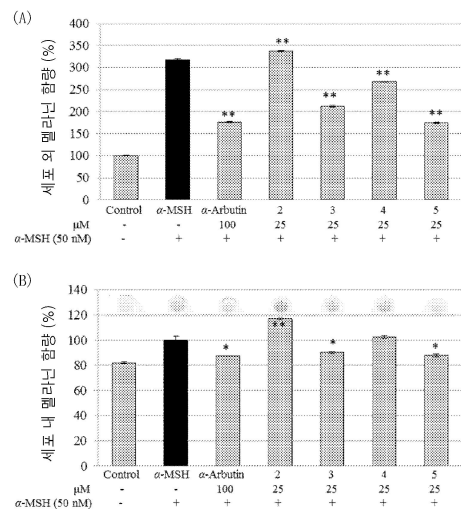
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **벼 뿌리 유래 페놀 화합물들을 포함하는 미백 조성물**

(57) 요약

본 발명은 메틸 트랜스-페룰레이트, 트랜스-p-쿠마린산 메틸 에스터, N-벤조일트립타민 및 N-(트랜스-시나모일)트립타민로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 페놀계 화합물 또는 그 허용가능한 염을 포함하는 미백 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

정락훈

경기 화성시 새강3길 3-1, 301호 (반송동)

차병주

경기 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 생명과학대학
106호 (서천동, 경희대학교)

김지영

서울특별시 서초구 나루터로4길 28, 306동 1204호
(잠원동, 신반포아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009574

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린 21사업

연구과제명 벼 지상부와 뿌리 신규 폴리페놀 화합물을 이용한 미백 및 항염증 화장품 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

메틸 트랜스-페룰레이트, 트랜스-p-쿠마린산 메틸 에스터, N-벤조일트립타민 및 N-(트랜스-시나모일)트립타민으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 페놀계 화합물 또는 그 허용가능한 염을 포함하는 미백 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 페놀계 화합물은 베타 유래인 것을 특징으로 하는 미백 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

멜라로마 세포의 세포 내 멜라닌 분비를 억제하는 것을 특징으로 하는 미백 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

멜라로마 세포의 세포 외 멜라닌 분비를 억제하는 것을 특징으로 하는 미백 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 미백 조성물은 화장품 조성물인 것을 특징으로 하는 미백 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 미백 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 미백 조성물.

청구항 7

베타 뿌리 추출물을 포함하며, 상기 베타 뿌리 추출물은 메틸 트랜스-페룰레이트, 트랜스-p-쿠마린산 메틸 에스터, N-벤조일트립타민 및 N-(트랜스-시나모일)트립타민으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 페놀계 화합물을 포함하는 미백 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 벼 뿌리 추출물은 벼 뿌리를 유기용매로 추출하거나, 유기용매로 추출한 후 분획하여 제조하는 것을 특징으로 하는 미백 조성물.

청구항 9

제 7항에 있어서,

멜라로마 세포의 세포 내 멜라닌 분비를 억제하는 것을 특징으로 하는 미백 조성물.

청구항 10

제 7항에 있어서,

멜라로마 세포의 세포 외 멜라닌 분비를 억제하는 것을 특징으로 하는 미백 조성물.

청구항 11

제 7항에 있어서,

상기 미백 조성물은 화장품 조성물인 것을 특징으로 하는 미백 조성물.

청구항 12

제 7항에 있어서,

상기 미백 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 미백 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 벼 뿌리 유래 페놀 화합물들을 포함하는 미백 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 벼(*Oryza sativa spp japonica*)은 사람의 식량으로 흔히 사용되는 대중적인 식량작물이다. 벼는 좁은 타원형 잎이 1.8m 높이에 이르며, 길이는 0.5-1.0m으로 자란다. 꽃은 5월에 피고 황록색이다. 9월에 익는 둥근 낱알은 암록색이다. 벼는 머리카락모양의 많은 뿌리로 구성된 수염 뿌리계를 가지고 있다. 벼는 항산화 활성(Chi, H.Y., Lee, C.H., Kim, K.H., Kim, S.L., & Chung, I.M. (2006). Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity with H4IIE cells of three different rice grain varieties. *European Food Res. Technol.* 225, 887-893), 항암 활성(Koide, T., Kamei, H., Hashimoto, Y., Kojima, T., & Hasegawa, M. (1996). Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. *Cancer Biother. Radio.* 11, 273-277), 항균 활성 (Cho, J.Y., Moon, J.H., Seon, K.Y., & Park, K.H. (1998). Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2273-2276) 등의 활성이 있는 것으로 보고되고 있다. 그러나 지금까지의 연구들은 대부분 곡물인 쌀에 대한 것으로, 벼의 뿌리에 대한 파이토케미칼 또는 생물학적인 연구에 대해 보고된 것이 거의 없다.

[0003] 본 발명자들은 벼 뿌리에 대하여 연구하던 중 벼 뿌리로부터 특정 페닐 화합물들을 분리하고, 이들의 미백 활성을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 미백 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은,

[0006] 메틸 트랜스-페룰레이트, 트랜스-p-쿠마린산 메틸 에스터, N-벤조일트립타민 및 N-(트랜스-시나모일)트립타민로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 페놀계 화합물 또는 그 허용가능한 염을 포함하는 미백 조성물을 제공한다.

[0007] 또한 본 발명은 벼 뿌리 추출물을 포함하는 미백 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명의 미백 조성물은 멜라닌 생성 및 분비 억제능이 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 화합물 1 내지 5의 처리 시 세포 생존능을 나타낸다.

도 2는 α -MSH-자극된 B16-F10 세포의 멜라닌 양에 대한 화합물 2 내지 5의 영향을 나타낸다. α -알부틴과 비교하였으며, 분비된 멜라닌 양 (A)과 세포 내 멜라닌 양(B)을 측정하였다. (A) 배지를 모아 마이크로플레이트 리더 450nm 에서 측정하였다. (B) 농축 후, 세포 펠렛을 1N NaOH에 용해시키고 마이크로플레이트 리더 450nm 에서 측정하였다. 데이터를 3회 반복 측정의 평균±표준편차로 나타내었다. 테스트 그룹 사이의 통계적 유의성을 Student's t-test (*P<0.05)로 결정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 메틸 트랜스-페룰레이트, 트랜스-p-쿠마린산 메틸 에스터, N-벤조일트립타민 및 N-(트랜스-시나모일)트립타민로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 페놀계 화합물 또는 그 허용가능한 염을 포함하는 미백 조성물에 대한 것이다.

[0011] 또한 본 발명은 벼 뿌리 추출물을 포함하는 미백 조성물에 대한 것이다.

[0012] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0013] 벼 뿌리

[0014] 본 발명의 벼 뿌리는 벼의 뿌리부이다. 상기 벼는 바람직하게는 자포니카 품종이고, 더욱 바람직하게는 오리자 사티바 spp 자포니카(*Oryza sativa* spp *japonica*)이다.

[0015] 벼 뿌리 추출물

[0016] 본 발명의 벼 뿌리 추출물은 벼 뿌리를 유기용매로 추출하거나, 유기용매로 추출한 후 분획하여 제조한다. 상기 유기용매는 물, 알코올, 에틸아세테이트, 클로로포름 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 알코

올은 탄소수 5 이하의 저가 알코올일 수 있으며, 바람직하게는 탄소수 4 이하의 저가 알코올이다.

[0017] 본 발명의 벼 뿌리 추출물은 메틸 트랜스-페룰레이트, 트랜스-p-쿠마린산 메틸 에스터, N-벤조일트립타민 및 N-(트랜스-시나모일)트립타민으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 페놀계 화합물 또는 그 허용 가능한 염을 포함한다.

[0018] 또한 본 발명의 벼 뿌리 추출물은 투여 시 개체 내 멜라닌 생산 및 분비를 억제한다. 바람직하게는 본 발명의 벼 뿌리 추출물은 멜라로마 세포의 세포 내 및/또는 세포 외 공간에의 멜라닌 분비를 억제한다.

[0019] 페놀계 화합물 또는 그 허용가능한 염

[0020] 본 발명의 페놀계 화합물은 메틸 트랜스-페룰레이트, 트랜스-p-쿠마린산 메틸 에스터, N-벤조일트립타민 및 N-(트랜스-시나모일)트립타민으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상이다. 상기 페놀계 화합물은 천연물로부터 분리되거나 합성하여 준비할 수 있으며, 바람직하게는 벼 유래이고, 더욱 바람직하게는 벼 뿌리로부터 분리한다.

[0021] 본 발명의 페놀계 화합물은 투여 시 개체 내 멜라닌 생산 및 분비를 억제한다. 바람직하게는 본 발명의 벼 뿌리 추출물은 멜라로마 세포의 세포 내 및/또는 세포 외 공간에의 멜라닌 분비를 억제한다.

[0022] 미백용 조성물

[0023] 본 발명의 미백용 조성물은 피부 미백용 조성물이다. 본 발명의 피부 미백용 조성물은 화장품 조성물, 약학적 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다.

[0024] 화장료 조성물

[0025] 본 발명의 피부 미백용 조성물은 화장품 조성물일 수 있다. 본 발명의 화장품 조성물은 미백(화이트닝), 피부 톤의 균일화, 잡티 완화, 브라이트닝 등의 효능을 갖는다.

[0026] 본 발명의 화장품 조성물은, 당업계의 통상적으로 제조되는 어떠한 제형에도 제조될 수 있으며 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 화장품 조성물은 유연화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 스프레이 또는 파우더 제형으로 제조될 수도 있다.

[0027] 약학적 조성물

[0028] 본 발명의 약학적 조성물은 전체적 또는 부분적인 멜라닌 이상 과다에 의한 색소 질환 또는 멜라닌 세포 이상 증식에 의한 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물일 수 있다. 상기 멜라닌 이상 과다에 의한 색소 질환 또는 멜라닌 세포 이상 증식에 의한 질환은 악성흑색종, 색소 침착, 기미, 주근깨, 흑자, 기미, 주근깨, 잡티, 오타 모반, 밀크반점, 피부염증 후의 피부흑화 및 노인성 색소반점으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0029] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물 100 중량부에 대하여 본 발명의 본 발명의 페놀계 화합물 또는 이들의 염, 또는 벼 뿌리 추출물을 0.001 내지 99.99 중량부 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.001 내지 30 중량부 포함할 수 있다. 더욱 바람직하게는 본 발명의 약학적 조성물은 조성물 100 중량부에 대하여 본 발명의 페놀계

화합물 또는 이들의 염, 또는 베타 뿌리 추출물을 0.001 내지 20 중량부 포함할 수 있다. 그러나 이는 투약자의 필요에 따라 증감할 수 있으며, 식생활, 영양 상태, 병의 진행 정도 등 상황에 따라 적절히 증감할 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명의 화합물을 약학적으로 허용되는 담체와 함께 적합한 형태로 제형화 될 수 있다. ‘약학적으로 허용되는’이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.

[0030] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 바람직한 약제학적 제제는 정제, 경질 또는 연질 캡슐제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제가 있으며 이들 약제학적 제제는 약제학적으로 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제 등과 같은 비경구 투여용 제제로 사용되는 것 역시 바람직하다.

[0031] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 용량은, 환자의 상태, 연령, 성별 및 합병증 등의 다양한 요인에 따라 전문가에 의해 결정될 수 있지만 일반적으로는 성인 1kg 당 0.1mg 내지 10g, 바람직하게는 10 mg 내지 5g의 용량으로 투여될 수 있다. 또, 단위 체형당 상기 약학적 조성물의 1일 용량 또는 이의 1/2, 1/3 또는 1/4의 용량이 함유되도록 하며, 하루 1 내지 6 회 투여될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0032] 식품 조성물

[0033] 본 발명의 식품은 건강보조식품, 건강기능식품, 기능성 식품 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 천연식품, 가공식품, 환자식품, 일반적인 식자재 등에 본 발명의 화합물을 첨가하는 것도 포함된다.

[0034] 본 발명의 식품 조성물은, 상기 본 발명의 페놀계 화합물 또는 이들의 염, 또는 베타 뿌리 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 페놀계 화합물 또는 이들의 염, 또는 베타 뿌리 추출물은, 식품 또는 음료의 제조 시에 식품 또는 음료의 원료 100 중량부에 대하여 0.001 내지 99.99 중량부, 바람직하게는 0.001 내지 30 중량부 첨가될 수 있다. 상기 본 발명의 페놀계 화합물 또는 이들의 염, 또는 베타 뿌리 추출물의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 상기 성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0035] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캡슐제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제의 형태로 이용될 수 있으며, 이들 제제는 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.

[0036] 상기 화합물 또는 본 발명의 항염증 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 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, 기타 영양제 등을 들 수 있으나 이들 종류의 식품으로 제한되는 것은 아니다.

- [0037] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0038] <재료 및 방법>
- [0039] 벼의 뿌리를 2011년 11월 강화군(인천)에서 확보하였고, 밀양 농촌진흥청 국립식량과학원 기능성작물자원개발부의 조준현박사가 이를 확인하였다. 상기 벼 뿌리를 이용하여 하기 실험들을 수행하였다.
- [0040] 선광도(optical rotation)는 JASCO P-1010 디지털 선광측정기(Jasco, 도쿄, 일본)로 측정하였다. 적외선분광분석(IR spectra)는 Perkin Elmer사의 Spectrum One FT-IR spectrometer(Buckinghamshire, 영국)를 이용하였다. EI-MS는 JEOL사의 JMSAX-700 질량분석기(mass spectrometer, 도쿄, 일본)로 수행하였다. ¹H NMR (400 MHz), ¹³C NMR(100 MHz), 2D NMR 스펙트럼은 Varian사의 Unity Inova AS-400 FT-NMR 분석기(Palo Alto, CA, USA)로 확인하였다. 녹는점은 Fisher-John의 현미경이 있는 녹는점장치를 통해 확인하였고 확인된 값을 보정하지 않았다. 실리카겔 (SiO₂, 이산화규소) (Kiesel gel 60, 머크, Darmstadt, 독일) 과 octadecyl SiO₂ (ODS) (LiChroprep RP-18, 40-60 μm, 머크) 수지를 칼럼 크로마토그래피(c.c)에 이용하였다. TLC analysis (박층크로마토그래피)를 Kiesel gel 60 F254 and RP-18 F254s (Merck) plates로 수행하였다. TLC의 점들은 Spectroline ENF-240 C/F UV lamp (Spectronics Corporation, Westbury, NY, USA)로 감지하였다.
- [0041] 고체 추출 및 용매분별을 위한 유기용매는 첫 번째 시약으로 대정화학 (서울, 한국)에서 공급하였다. 화합물을 100% DMSO (시그마 알드리치)에 녹였다. 세포배양배지에 포함되는 DMEM, FBS, 페니실린- 스트렙토마이신, 트립신-EDTA 은 Hyclone 사(Logan, UT, USA)에서 구입하였다. DPBS는 WELGENE(Daegu, Korea)에서 구입하였다
- [0042] 멜라노마 세포 배양
- [0043] 멜라노마 세포는 하기와 같이 배양하여 이용하였다. 먼저, 마우스 유래 B16-F10 멜라노마 세포를 한국세포주은행(LCLB, Korea)에서 확보하여 10% FBS, 페니실린(100units/ml), 스트렙토마이신(100 μg/ml) 을 보충한 DMEM 배지 및 37 °C, 5% CO₂/air 상에서 배양하였다. 세포를 1mM EDTA 및 0.25% 트립신이 포함된 PBS로 37°C에서 2분간 반응하여 수확하였다.
- [0044] B16-F10 멜라노마 세포에서의 멜라닌 양 결정
- [0045] 멜라닌 양을 이전에 만들어진 방법(Huang, Y.C., Liu, K.C., Chiou, Y.L., Yang, C.H., Chen, T.H., Li, T.T., & Liu, L.L. (2013). Fenofibrate suppresses melanogenesis in B16-F10 melanoma cells via activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. Chem. Biol. Interact. 205, 157-164.)으로 측정하였으나 약간 변형하였다. 요약하자면, 세포를 샘플과 함께 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지상에서 페놀-레드 없이 3일간 처리하였다. 배지를 모아 100μl씩 96 홀 홈 판에 넣고 각 홀의 흡광도를 마이크로플레이트 리더 450nm에서 측정하였다. 원심 분리한 후 세포 펠렛을 1N NaOH 140 μl에 녹여 80 °C 에서 30분간 방치한 후, 16,000g 에서 30분간 다시 원심분리 하였고, 상등액의 흡광도를 마이크로플레이트 리더 450nm에서 측정하였다.
- [0046] EX-CyTox에 의한 세포 생존능
- [0047] B16-F10 멜라노마 세포를 바닥이 평평한 96홀 홈판 (96 well plate)에 4x10³ cells/well 수로 심었다. 37 °C에서 24시간 후, 기존 배지를 적당한 농도로 희석한 화합물이 들어있는 배지로 교체하였다. 48시간 후, 화합물이 들어있던 배지를 10% EX-CyTox(Daeil Lab Service, Korea)를 넣은 배지로 교체하였다. 37 °C에서 2시간 동안 배양하고, microplate reader의 450nm 파장에서 세포 증식을 관찰하였고 모든 측정은 3회 반복 수행하였다. 각 처리에 있어서의 세포독성효과를 처리하지 않은 대조군 세포에 대한 세포 생존율로 나타내었으며 이를 [(A450

nm 처리세포)/(A450 nm 처리하지 않은 세포)] × 100으로 나타내었다.

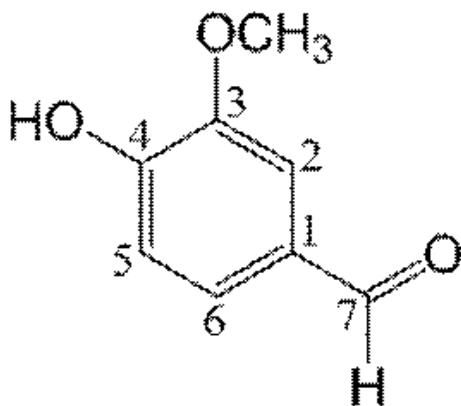
[0048] <실험예 1> 버 뿌리의 추출 및 페닐화합물의 분리

[0049] 버의 건조된 뿌리 (8.35kg)을 80% 메탄올(280L × 3) 로 실온에서 12시간 동안 추출하였다. 추출물을 여과지로 여과시키고 회전진공농축기로 농축하여 갈색잔여물 284g을 얻었다. 잔여물을 4L의 물에 현탁시키고 순차적으로 EtOAc(에틸아세테이트) (4 L × 6)과 n-BuOH(부탄올) (3.2 L × 3)으로 분획한 후, EtOAc (ORE, 38 g), n-BuOH (ORB, 26 g), 및 H₂O의 추출물을 얻었다.

[0050] EtOAc 분획 (ORE, 38g)을 SiO₂ c.c (11.5 × 13.0 cm) 에 주입하여 n-hexane-EtOAc (7:1, 8 L → 5:1, 7 L → 3:1, 17 L → 1:1, 10 L) 와 CHCl₃-MeOH (17:1, 4 L → 15:1, 7 L → 12:1, 3 L → 9:1, 7 L → 6:1, 2 L → 3:1, 4 L → 1:1, 6 L) 로 용출하여 32분획을 얻었다 (ORE-1 에서 ORE-32). ORE-10 (1.3 g, Ve/Vt 0.13 내지 0.17)을 ODS c.c. (4.5 × 8.0 cm)에 적용하고 acetone-acetonitrile-H₂O (2:2:7, 3.0 L)로 용출하여, 18개의 분획을 얻었다 (ORE-10-1 내지 ORE-10-18). ORE-10-6 (250 mg, Ve/Vt 0.06 내지 0.11)을 SiO₂ c.c. (3.4 × 11.0 cm) 에 적용하여 CHCl₃-MeOH (38:1, 1.5L)로 용출하고, 12 개의 분획을 얻어 (ORE-10-6-1 내지 ORE-10-6-12) and 최종적으로 화합물 1[ORE-10-6-3, 57 mg, Ve/Vt 0.21 내지 0.29, TLC (SiO₂ F254) Rf 0.55, CHCl₃-MeOH = 23:1]과 화합물 2 [ORE-10-6-8, 132 mg, Ve/Vt 0.63 to 0.71, TLC (SiO₂ F254) Rf 0.40, CHCl₃-MeOH = 23:1]를 확보하였다. ORE-12 (692 mg, Ve/Vt 0.19 내지 0.21)을 ODS c.c. (4.0 × 8.0 cm) 으로 분리하여 acetone-acetonitrile-H₂O (1:1:4, 1.0 L → 1:1:2, 1.0 L) 로 용출하고 25개 분획을 얻었다. (ORE-12-1 내지 ORE-12-25). ORE-12-2 (18 mg, Ve/Vt 0.02 to 0.05)을 SiO₂ c.c. (2.0 × 13.0 cm)로 분리하여 CHCl₃-MeOH (45:1, 0.7 L)로 용출하고 7개의 분획을 얻었으며 (ORE-12-2-1 내지 ORE-12-2-7) 최종적으로 화합물 3[ORE-12-2-2, 2.7 mg, Ve/Vt 0.15 내지 0.25, TLC (SiO₂ F254) Rf 0.55, CHCl₃-MeOH = 19:1]을 확보하였다. ORE-17 (177 mg, Ve/Vt 0.29 내지 0.34) ODS c.c. (3.0 × 6.0 cm) 을 수행하고 acetone-acetonitrile-H₂O (1:1:4, 1.2 L)로 용출하여, 12개의 분획을 얻었고(ORE-17-1 내지 ORE-17-12) 그리고 화합물 4 [ORE-17-5, 5.4 mg, Ve/Vt 0.20 내지 0.34, TLC (RP-18 F254s) Rf 0.33, acetone-acetonitrile-H₂O = 2:2:3]를 확보하였다. ORE-20 (596 mg, Ve/Vt 0.34 to 0.41)를 ODS c.c. (3.0 × 5.0 cm) 을 수행하고 acetone-acetonitrile-H₂O (2:2:7, 1.8 L)로 용출하여, 17 개 분획을 얻었고 (ORE-20-1 내지 ORE-20-17) 최종적으로 화합물 5 [ORE-20-6, 19 mg, Ve/Vt 0.33 to 0.39, TLC (RP-18 F254s) Rf 0.23, acetone-acetonitrile-H₂O = 2:2:3]를 확보하였다.

[0051] 상기 화합물 1 내지 5의 구조는 하기와 같다.

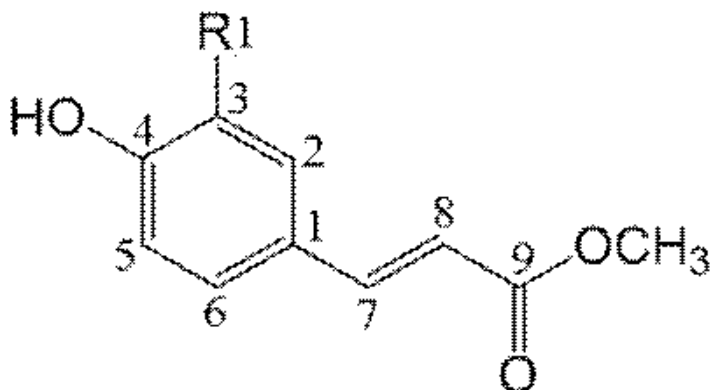
[0052] <화학식 1>



[0053]

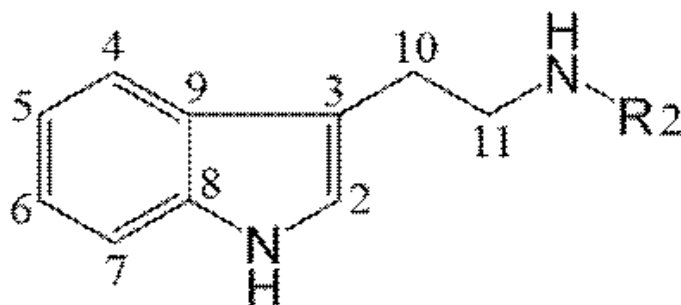
	화합물 명칭
화합물 1	바닐린(Vanillin)

<화학식 2>



	R1	화합물 명칭
화합물 2	OCH ₃	메틸 트랜스-페룰레이트 (Methyl <i>trans</i> -ferulate)
화합물 3	H	트랜스-p-쿠마린산 메틸 에스터 (<i>trans</i> -p-Coumaric acid methyl ester)

<화학식 3>



	R2	화합물 명칭
화합물 4	Benzoyl	N-벤조일트립타민 (N-Benzoyltryptamine)
화합물 5	<i>trans</i> -cinnamoyl	N-(트랜스-시나모일)트립타민 (N-(<i>trans</i> -Cinnamoyl)tryptamine)

상기 NMR, MS, 및 IR 스펙트럼 결과는 하기와 같다.

화합물 1

바닐린(Vanillin): 흰색 고형물 (MeOH); m.p. 80-81 °C; EI/MS m/z 152 [M]⁺, 151, 137, 123, 81; IR (CaF₂,

ν , cm^{-1}) 3192, 1669; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ H) 9.80 (1H, s, H-aldehyde), 7.41 (1H, dd, J = 8.0, 2.4 Hz, H-6), 7.39 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2), 7.02 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 3.94 (3H, s, 3-OCH₃). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ C) 190.8 (C-aldehyde), 151.6 (C-4), 147.1 (C-3), 129.8 (C-1), 127.6 (C-6), 114.3 (C-2), 108.7 (C-5), 56.1 (3-OCH₃).

[0064] 화합물 2

[0065] 메틸 트랜스 페룰레이트(Methyl trans-ferulate): 흰색 결정 (MeOH); m.p. 68 °C; ESI/MS m/z 209 $[\text{M}+\text{H}]^+$; IR (KBr, ν , cm^{-1}) 3395, 1693; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ H) 7.58 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 7.02 (1H, dd, J = 8.4, 2.0 Hz, H-6), 6.97 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 6.87 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 6.25 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-8), 3.86 (3H, s, 3-OCH₃), 3.76 (3H, s, 9-OCH₃). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ C) 167.7 (C-9), 147.9 (C-4), 146.7 (C-3), 144.9 (C-7), 126.7 (C-1), 122.9 (C-6), 114.9 (C-8), 114.7 (C-5), 109.3 (C-2), 55.8 (3-OCH₃), 51.5 (9-OCH₃).

[0066] 화합물 3

[0067] 트랜스-p-쿠마린산 메틸 에스터(trans-p-Coumaric acid methyl ester): 무색(Colorless) 고형 (MeOH); m.p. 139-140 °C; EI/MS m/z 178 $[\text{M}]^+$, 147, 119, 91, 65; IR (CaF_2 , ν , cm^{-1}) 3357, 3028, 1694, 1642, 1606, 1517, 1445, 1172, 834; ^1H NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ H) 8.17 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-7), 7.85 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2, 6), 7.41 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 5), 6.83 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-8), 4.03 (3H, s, 9-OCH₃). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ C) 167.2 (C-9), 160.9 (C-4), 144.7 (C-7), 130.1 (C-2, 6), 125.5 (C-1), 116.3 (C-3, 5), 114.3 (C-8), 50.7 (9-OCH₃).

[0068] 화합물 4

[0069] N-벤조일트립타민(N-Benzoyltryptamine): 흰색 결정 (MeOH); m.p. 131 °C; EI/MS m/z 264 $[\text{M}]^+$, 143, 121, 105; IR (KBr, ν , cm^{-1}) 3407, 3308, 1649, 1484; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ H) 7.64 (2H, d, J = 7.6 Hz, H-2', 6'), 7.63 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-4), 7.44 (1H, dd, J = 7.6, 7.6 Hz, H-4'), 7.36 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-7), 7.35 (2H, dd, J = 7.6, 7.6 Hz, H-3', 5'), 7.20 (1H, dd, J = 7.6, 7.6 Hz, H-6), 7.11 (1H, dd, J = 7.6, 7.6 Hz, H-5), 7.06 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 3.79 (1H, q, J = 6.4 Hz, H-11), 3.08 (1H, t, J = 6.4 Hz, H-10). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ C) 167.4 (C-7'), 136.4 (C-8), 134.6 (C-1'), 131.3 (C-4'), 128.4 (C-3', 5'), 127.3 (C-9), 126.8 (C-2', 6'), 122.3 (C-2), 122.1 (C-6), 119.5 (C-4), 118.7 (C-5), 113.0 (C-3), 111.3 (C-7), 40.2 (C-11), 25.3 (C-10).

[0070] 화합물 5

[0071] N-(트랜스-시나모일)트립타민(N-(trans-Cinnamoyl)tryptamine): 흰색 결정 (MeOH); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ H) 7.60 (1H, dd, J = 8.0, 1.2 Hz, H-4), 7.58 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-7'), 7.42 (2H, m, H-2', 6'), 7.36 (1H, dd, J = 8.0, 1.2 Hz, H-7), 7.31 (3H, m, H-3', 4', 5'), 7.18 (1H, ddd, J = 8.0, 8.0, 1.2 Hz, H-6), 7.10 (1H, ddd, J = 8.0, 8.0, 1.2 Hz, H-5), 7.03 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2), 6.27 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-8'), 3.71 (1H, q, J = 6.8 Hz, H-11), 3.02 (1H, t, J = 6.8 Hz, H-10). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ C) 165.9 (C-9'), 140.8 (C-7'), 136.4 (C-8), 134.7 (C-1'), 129.5 (C-4'), 128.7 (C-3', 5'), 127.7 (C-2', 6'), 127.3 (C-9), 122.2 (C-2), 122.1 (C-6), 120.7 (C-8'), 119.4 (C-5), 118.7 (C-4), 112.8 (C-3), 111.3 (C-7), 39.9 (C-11), 25.2 (C-10).

[0072] <실험예 2> RRLC-ESI-MS-MS를 이용한 화합물 1 내지 5의 정량분석

[0073] 상기 EtOAc 분획을 MeOH(16.5mg/ml)에 녹이고 0.2 μ m 주사기필터에 여과하였다. Agilent 6410B triple quadrupole LC-MS system (Agilent Corporation, MA, USA) 으로 분석하였는데 이 시스템은 양이온화나 음이온화 모드 에서 사용 가능한 an electrospray ionization (ESI) interface 를 가지는 a triple quadrupole MS analyzer 에 연결된 Agilent 1200 RRLC system (Agilent Co.)으로 구성되어 있다. 상기 LC 분석은 Agilent Eclipse Plus C18 column (1.8 μ m, 100 x 2.1 mm)으로 30 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. 이동상(mobile phase)은 (A) water (0.1% formic acid) 및 (B) acetonitrile (0.1% formic acid) 로 하였고 B의 농도 구배는 0-5 분(min)에서 30-30%, 5-20 분(min)에서 30-45%, 20-21 분에서 45-60%, 21-30 분에서 60-60%, 30-31 분에서 60-100%, 31-35 분에서 100-100%, 35-37 분에서 100-30%, 그리고 37-40 분에서 30-30% 이다. 용매의 유량은 0.4 ml/분 이고 광 다이오드 어레이 검출기 225 nm에서 측정하였다. 칼럼 온도를 30 $^{\circ}$ C에서 유지하였고, 샘플 주입량은 5 μ L였다. 다음은 양성모드에서 ESI 인터페이스의 최적 작동 매개변수이다: 유량 10 L/분; 건조가스온도 350 $^{\circ}$ C; 분무압 40 psi; 모세관 전압 4000 V. RRLC-ESI-MS-MS를 이용한 화합물 1 내지 5의 분석 결과는 하기 표 1과 같다.

표 1

화합물들	RT (min)	UVmax	Precursor ion [M+H] (m/z)	Product ion (m/z)
화합물1 (vanillin)	3.3	226,278,309	153	125, 93, 65
화합물 2 (methyl <i>trans</i> -ferulate)	9.1	324,218,235	209	177, 145, 117, 89
화합물 3 (<i>trans</i> - <i>p</i> -coumaric acid methyl ester)	8.3	310,227,211	179	147, 119, 91, 65
화합물 4 (<i>N</i> -benzoyltryptamine)	16.4	223	265	144, 105, 77
화합물 5 (<i>N</i> -(<i>trans</i> -cinnamoyl) Tryptamine)	21.3	218,272	291	144, 131, 103

[0074]

[0075] <실험예 3> 세포독성

[0076] B16-F10 멜라노마 세포상에서 화합물 1 내지 5의 세포독성을 확인하기 위해, WST-1 [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (Wako Pure Chem., Osaka, Japan)] 분석 방법으로 세포 생존능(cell viability)을 측정하였다. 각 화합물들을 3.125 내지 50 μ M으로 세포에 4일간 처리하였다. 그리고 1시간 동안 배양한 후, 세포 생존능을 마이크로 플레이트 리더 450nm에서 측정하였다. 데이터를 3회 반복 측정의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 테스트 그룹 사이의 통계적 유의성을 Student's t-test (*P<0.05)로 결정하였다.

[0077] 그 결과, 화합물 2 내지 화합물 5들은 98% 이상의 세포 생존능을 보였으며, 화합물 1은 50 μ M 에서 86%의 세포 생존능을 보였다(도 1).

[0078] <실험예 4> 미백 활성

[0079] 배지로 분비되는 그리고 세포내의 멜라닌의 형성에 있어 화합물 2 내지 5가 미치는 영향을 평가하였다. α -알부

틴(Arbutin)을 양성 대조군으로 이용하였는데 그 이유는 α -알부틴이 강력한 멜라닌 합성 환원활성을 갖기 때문이다(Funayama, M., Arakawa, H., Yamamoto, R., Nishino, T., Shin, T., & Murao, S. (1995). Effects of alpha- and beta-arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 143-144.; Chakraborty, A.K., Funasaka, Y., Komoto, M., & Ichihashi, M. (1998). Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. Pigment Cell Research 11, 206-212). 세포를 25 μ M의 화합물 2 내지 5 및 100 μ M α -알부틴에 4일간 노출시켰다. 그 후 배지와 세포 내 공간으로 분비된 멜라닌의 양을 각기 측정하였다.

[0080] 그 결과, 화합물 3 내지 5에 의하여 배지와 세포 내 공간으로 분비된 멜라닌 양이 감소한 것이 확인되었다. (도 2). α -알부틴 자극된 B16-F10 세포들에서 세포 멜라닌 함량에 대한 화합물 2 내지 5의 페닐 화합물들의 효과는 하기 도 2 및 표 2와 같다. α -알부틴(arbutin)은 양성 대조군으로 사용되었다. 배지로 분비된 멜라닌 양에 있어서 화합물 3과 화합물 5는 α -Arbutin (100 μ M)과 유사한 억제활성을 보였고(각각 IC₅₀ 17.7 및 19.6 μ M), 화합물 4는 다음으로 높은 억제 활성을 나타내었다. 세포 내 공간 멜라닌 양에 있어서, 화합물 3과 화합물 5는 α -알부틴과 유사한 억제활성을 보였다. 총 멜라닌 함량은 하기 표 2와 같다.

표 2

	대조군	α -MSH (50 nM)	α - Arbutin (100 μ M)	화합물 2 (25 μ M)	화합물 3 (25 μ M)	화합물 4 (25 μ M)	화합물 5 (25 μ M)
총 멜라닌 함 량(%)	100.00	244.50	150.12	265.03	174.33	214.67	149.63

[0081]

[0082] 또한, 화합물 3과 화합물 5의 버섯의 tyrosinase 활성에 대한 억제력을 측정해본 결과, 이들 화합물들은 여기서도 미백 효능을 갖는 것이 확인되었고, IC₅₀ value가 각각 0.48 및 0.26 μ M으로 높은 억제력을 나타내었다.

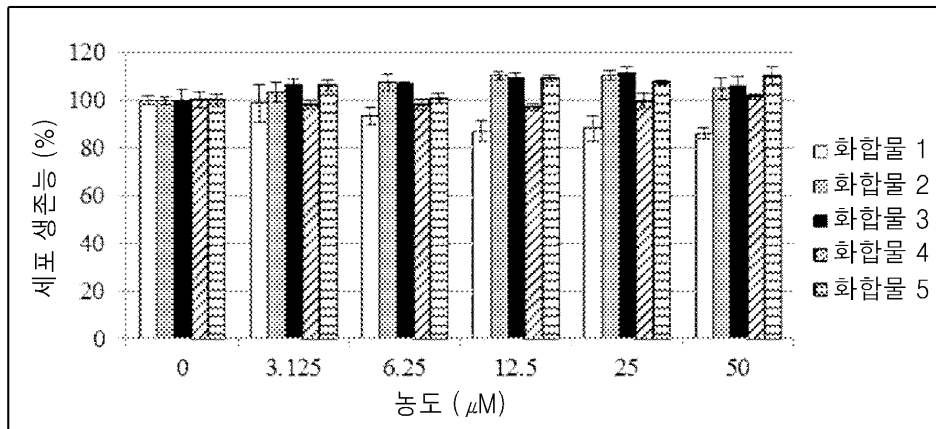
[0083] <실험예 7> 벼 뿌리 내 화합물 1 내지 5의 함량

[0084] 벼의 뿌리에 있는 화합물 1 내지 5의 함량을 LCMSMS 실험으로 평가하였다.

[0085] 그 결과, 이들 화합물들의 농도는 벼 뿌리 건조 중량 kg 당 1.18 (화합물 1), 10.98 (화합물 2), 8.32 (화합물 3), 2.81 (화합물 4), 및 0.62 (화합물5) mg로 확인되었다.

도면

도면1



도면2

