

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0097568 (43) 공개일자 2012년09월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/7048 (2006.01) A61K 36/906 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1	
(21) 출원번호 10-2011-0016849	(72) 발명자 이광원	
(22) 출원일자 2011년02월25일 심사청구일자 2011년02월25일	경기도 성남시 분당구 양현로 220, 1104동 1901호 (이매동, 이매촌) 홍충의 서울특별시 동대문구 안암로20가길 13, 1층 (제기동) 이현아 경기도 성남시 분당구 수내로 74, 102동 1302호 (수내동, 양지마을)	
	(74) 대리인 김선애	

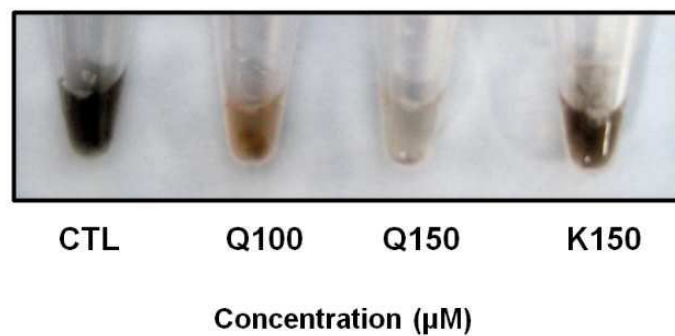
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **생강나무로부터 분리한 퀴세틴-3-O-알파-람노사이드를 포함하는 피부미백 및 피부톤 개선용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 생강나무로부터 분리한 퀴세틴-3-O-알파-람노사이드를 포함하는 피부미백 및 피부톤 개선용 조성물에 관한 발명이다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

퀴세틴-3-0-알파-람노사이드를 포함하는 피부 미백 또는 피부톤 개선용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 화장료 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 기능성 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드는 생강나무로부터 용매 추출된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 용매는 물, 탄소 수 1 내지 4의 저급 알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군 중에서 선택된 것을 용매인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 추출은 70% 에탄올을 용매로 사용하여 추출된 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드는 조성물 총 중량에 대하여 0.001~50 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

생강나무로부터 물, 탄소 수 1 내지 4의 저급 알코올 및 이들의 혼합용매로 추출하고, 그 추출물로부터 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드를 분리하는 단계를 포함하는 생강나무로부터 피부 미백 및 피부톤 개선용 조성물을 제조하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 생강나무로부터 분리한 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드(퀴세트린, 퀴시트린)를 포함하는 피부미백 및 피부톤 개선용 조성물에 관한 발명이다.

배경기술

[0002] 멜라닌은 피부와 눈, 그리고 머리 색깔에 주요 역할을 하는 일종의 생물학적 색소이다. 멜라닌은 멜라노사이트와 같은 특정 색소 세포에 의해 생성되며 멜라노솜에 들어있다. 멜라노사이트는 피부 기저층에 모여 있다. 멜라닌은 자외선 차단에 주요한 역할을 한다. 그러나, 멜라닌의 과도한 축적은 멜라즈마와 같은 과색소침착, 염증성 색소침착 그리고 일광흑자를 야기한다. 피부의 멜라닌 함량의 차이는 여러가지 이유에 의해 야기되는데, 이는 타이로시네이즈의 합성과 소멸, 멜라노솜안의 타이로시네이즈의 활성화, 멜라노솜의 멜라니제이션과 합성 속도, 멜라노솜의 크기와 케라티노사이트로 전이되는 멜라노솜의 효율에 의해서이다. 멜라닌의 합성은 도파퀸으로 산화되는 DOPA에서 타이로신의 하이드로실레이션의 과정으로 개시된다. 멜라닌 합성은 타이로신

네이즈와 타이로시네이즈 연관 단백질들인 TRP1과 TRP2의 효소 활성을 통해 일어난다. 이것은 주로 타이로시네이즈의 발현에 의해 조절된다. 멜라노게네시스속의 속도 결정 효소인 타이로시네이즈는 멜라노게네시스의 결정적 역할을 한다. 마이크로프탈미아 연합 전이 요소(MITF) 또한 색소화, 증식 그리고 멜라노사이트의 생존에 포함되어있다. 게다가, MITF는 티로시네이즈 프로모터 활성을 촉진하며, 이는 MITF가 멜라노게네시스의 중요한 전이 조절자라는 것을 나타낸다. 세포의 신호조절 카이네이즈는 세포의 증식과 분화 조절에 결정적인 역할을 한다. 최근 보고서에 ERK 반응의 억제가 멜라노게네시스를 유도한다는 것은 ERK 신호가 멜라노게네시스에 관여된다는 것을 제시한다.

[0003] 피부 미백에 효과적이라고 알려진 물질로는 비타민 C, 상백피 추출물, 코지산(kojic acid), 알부틴(arbutin), 감초 추출물, 하이드로퀴논(hydroquinone) 등이 있다. 코지산은 우수한 미백효과를 가지고 있으나 발암성 물질로 밝혀져 실험 외에는 화장품 성분으로 사용이 금지되어 있으며, 하이드로퀴논은 멜라노사이트(melanocyte)에 대한 독성이 있고, 생체내실험(in vivo test) 결과 영구 탈색의 위험성이 있으며 발암물질로도 알려져 국내에서 화장품 성분으로 수입이 금지된 상태이다. 상기와 같이 공지된 화학물질은 미백 효과는 있더라도 피부에 대한 독성 내지 부작용의 문제가 수반되어 그 이용에는 한계가 있는 실정이다. 따라서 최근에는 피부에 대한 부작용을 최소화 할 수 있는 천연물 유래의 피부 미백 및 피부톤 개선 성분을 개발하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0004] 생강나무(*Lindera obtusiloba* BL.)는 우리나라, 일본, 중국 등의 동아시아 지역에 분포하는 쌍떡잎식물 미나리아재비목 녹나무과의 낙엽관목이며, 그 꽃은 관상용으로, 가지와 잎, 열매는 식용으로 이용되고 있다. 생강과 같은 유사한 향을 가지고 있어 우리나라에서는 생강나무라고 불리고 있다. 또한 새싹과 잎은 전통적으로 요리나 차로써 이용되고 있으며, 가지와 나무 껍질은 약용으로도 이용되며, 타박상의 어혈과 산후에 몸이 붓고 팔다리가 아픈 증세 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 민간에서는 간 질환, 기침, 두통, 복통, 산후 몸조리와 거담제 치료등으로 사용되어 왔다. 최근 연구결과에 따르면 퀴세틴은 생강나무 잎으로부터 추출 및 분리한 단일 화합물질로서, *t*-BHP에 의해 유도된 세포 독성에 대하여 강력한 간 보호 활성과 항산화능을 가지고 있는 것으로 확인하였다. 그러나 생강나무와 그로부터 분리된 퀴세틴-3-O-알파-람노사이드의 피부 미백 과 피부톤 개선과 관련된 효능에 대해서는 현재까지 연구되거나 알려진 바 없다.

[0005] 본 발명자들은 부작용이 전혀 없고 안전성이 확보되면서도 우수한 피부 미백 및 피부톤개선 효과를 나타내는 소재를 천연물로부터 개발하고자 연구를 거듭하였으며, 그 결과, 우리나라 전역에 다량 서식하나 크게 활용되지 못하고 있었던 생강나무와 그로부터 분리된 퀴세틴-3-O-알파-람노사이드를 원료로 하는 우수한 피부 미백 및 피부톤개선 효능을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 독성 및 부작용이 전혀 없으면서도 우수한 효능을 나타내는 피부 미백 및/또는 피부톤 개선을 위한 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 퀴세틴-3-O-알파-람노사이드를 포함하는 피부 미백 또는 피부톤 개선용 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 조성물은 화장료 조성물 약학 조성물 또는 기능성 식품 조성물인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0009] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 퀴세틴-3-O-알파-람노사이드는 생강나무로부터 용매 추출된 것이 바람직하나 기타 다른 천연물 또는 화학합성에 의하여도 제조될 수 있다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 용매는 물, 탄소 수 1 내지 4의 저급 알코올 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군 중에서 선택된 것이 바람직하고, 상기 추출은 70% 에탄올을 용매로 사용하여 추출된 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 퀴세틴-3-O-알파-람노사이드는 조성물 총 중량에 대하여 0.001~50 중량%로 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0012] 또한 본 발명은 생강나무로부터 물, 탄소 수 1 내지 4의 저급 알코올 및 이들의 혼합용매로 추출하고, 그 추

출물로부터 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드를 분리하는 단계를 포함하는 생강나무로부터 피부 미백 및 피부톤 개선용 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

- [0013] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0014] 본 발명은 생강나무로부터 분리된 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드를 포함하는 피부 미백 및/또는 피부톤 개선용 화장료 조성물 또는 기능성 식품 조성물이나 약학 조성물 등의 형태를 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [0015] 본 발명은 생강나무와 그로부터 분리된 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드를 포함하는 피부 미백 및/또는 피부톤 개선용 조성물을 제공하며, 보다 구체적으로 생강나무와 그로부터 분리된 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드를 포함하는 화장료 조성물 또는 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드의 분리 등에 대해서는 본 발명자의 대한민국 특허출원번호 10-2009-0052025에 상세히 기재되어 있다.
- [0017] 본 발명의 조성물을 타이로시네이즈 저해효과, 멜라노마 세포에서 타이로시네이즈 저해효과, 멜라닌 함유량의 감소, 멜라닌 생성에 관여하는 단백질의 발현 저해효과가 확인되었다. 따라서 본 발명에 따른 생강나무와 그로부터 분리된 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드를 포함하는 조성물은 피부에 직접 적용하는 화장료 조성물 또는 경구 투여하는 기능성 식품 조성물로서 우수한 피부 미백 및 피부톤 개선 효과를 나타낼 수 있다.
- [0018] 본 발명의 조성물이 화장료 조성물인 경우, 화장료 조성물에 포함되는 성분은 생강나무 와 그로부터 분리된 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예를 들어 향산화제, 안정화제, 용제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다. 또한 상기 화장료 조성물은 그 효과를 증진시키기 위해 피부 흡수 촉진제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 또는 스프레이 등으로 제형화 될 수 있다. 보다 상세하게는 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0020] 본 발명에 따른 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드는 화장료 총 중량에 대해 0.001~50 중량%의 양으로 첨가되어 사용될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 또한 본 발명의 조성물은 기능성 식품일 수 있다. 본 발명의 기능성 식품 조성물에 포함되는 성분은 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드 이외에 식품에 통상적으로 이용되는 첨가제를 포함하며, 예를 들어 착향제, 산미제, 보존제, 감미제, 산화방지제, 안정제, 착색제 및 영양강화제 등을 포함할 수 있다.
- [0022] 물론, 본 발명에 따른 조성물은 주사제와 같은 약물이나 알약, 또는 가루약, 환이나 캡슐, 과립 형태의 약의 형태로 제형화될 수도 있다.
- [0023] 본 발명에 따른 생강나무와 그로부터 분리된 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드는 식품 총 중량에 대해 1~20 중량%의 양으로 첨가되어 사용될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 이하에서는 본 발명을 실시예 및 실험예를 들어 구체적으로 서술하나, 이는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명이 이로써 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따른 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드를 포함하는 조성물은 천연물을 원료로 하여 피부에 대한 독성 내지 부작용의 문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라 우수한 피부 미백 및 피부톤 개선 효과를 나타낸다. 본 발명의 미백 효과 및 피부톤 개선 효과는 항산화 효과, 타이로시네이즈 저해효과, 멜라노마 세포에서 타이로시네이즈 저해효과, 멜라닌 함유량의 감소, 멜라닌 생성에 관여하는 단백질의 발현 저해 등의 작용을 통하여 확인된다. 따라서 본 발명에 따른 생강나무와 그로부터 분리된 퀴세틴-3-0-알파-람노사이드를 포함하는 조성물은 부작용이 전혀 없고 뛰어난 효능의 피부 미백효과 또는 피부톤 개선 효과를 나타내는 화장료 조성물 또는 기능성 식품 조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 합성 멜라닌의 스탠다드 곡선을 나타낸 그래프로, B16F10 멜라노마 세포에서 멜라닌 함량을 측정하기

위해 합성 멜라닌을 표준품으로 사용하여 스탠다드 곡선 작성하고, 광학밀도는 475nm에서 측정하였다.

도 2는 퀴세틴-3-O-알파-람노사이드(퀴세트린, 퀴시트린)의 항멜라노제닉 효과를 나타낸 그림이다.

도 2의 (A)는 퀴세트린의 머쉬룸 타이로시네이즈 저해활성에 관한 것으로, 머쉬룸 타이로시네이즈 혼합액, 1 mM L-3,4-다이하이드록실 알라닌 (DOPA: 도파), 50 mM 포스페이트 버퍼 (pH 6.5)를 37℃에서 30분간 반응. 흡광도는 475 nm에서 측정. 코직산은 포지티브 컨트롤로 사용.

도 2의 (B)는 B16F10 멜라노마 세포에서 퀴세트린의 타이로시네이즈 저해활성에 관한 것으로, 각 샘플을 세포와 3일간 반응 후 세포를 0.1% Triton X-100이 첨가된 0.1M 소듐 포스페이트로 4℃에서 20분 동안 용해시킨다. 세포에서 용출된 타이로시네이즈는 L-도파와 혼합한 후 475nm에서 타이로시네이즈의 활성을 측정한다. 타이로시네이즈의 활성은 수치화하여 계산 후 아무것도 처리하지 않은 컨트롤(CTL) 그룹과 비교하였다.

도 2의 (C)는 퀴세트린에 의한 멜라닌 함량 측정에 관한 것으로, 퀴세트린을 세포에 3일동안 반응 후 0.1 N NaOH로 세포를 용해 시켰다. 세포 용해물에서 멜라닌 함량의 측정은 스펙트로포토미터로 측정하였다. 각 값은 아무것도 처리하지 않은 컨트롤 그룹과 비교하여 나타내었다.*p < 0.01 and **p < 0.05 vs 컨트롤. CTL; 컨트롤 그룹, Q; 퀴세트린, K; 코직산을 나타낸다.

도 3은 B16F10 멜라노마 세포에서 멜라닌 합성에 미치는 퀴세트린의 효과 사진이다.

도 4는 B16F10 멜라노마 세포에서 타이로시네이즈의 발현과 연관이 있는 단백질 레벨에서의 퀴세트린 효과를 나타낸 그림.

도 4의 (A)는 B16F10 세포에서 phospho-extracellular signal-regulated kinase (P-ERK), microphthalmia-associated transcription factor (MITF), and Tyrosinase의 단백질발현 레벨에 미치는 퀴세트린 효과에 관한 것으로, 세포는 100 μM 과 150 μM의 퀴세트린과 반응 후 anti-P-ERK, anti-MITF, 및 anti-tyrosinase를 이용한 웨스턴 블럭법으로 분석하였다. ERK 와 α-tubulin은 로딩컨트롤로 사용하였다. CTL; 컨트롤을 나타내고,

도 4의 (B)는 멜라닌 생성 억제에 연계된 MEK 단백질 발현을 저해하는 물질인 PD98059 처리에 따른 B16F10 세포에서 멜라닌 함량 측정한 그림으로, 세포에서 퀴세트린과 10 μM PD98059를 3일 동안 반응 후 세포는 0.1 N NaOH로 용해시켰다. 멜라닌 함량은 스펙트로포토메타로 475nm에서 측정하였다. *p < 0.05 vs 컨트롤 그룹. CTL; 처리하지 않은 그룹, Q ; 퀴세트린, K ; 코직산을 나타내며,

도 4의 (C)는 멜라닌 생성 억제에 연계된 MEK 단백질발현을 억제시키는 물질인 PD98059 처리에 따른 B16F10 세포에서 P-ERK(24시간), MITF(72시간), 타이로시네이즈(72시간)의 단백질발현 레벨에 미치는 퀴세트린 효과를 나타낸 그림으로, 세포는 PD98059를 선 처리 후 100 μM and 150 μM의 퀴세트린을 처리하고 anti-P-ERK, anti-MITF, anti-tyrosinase를 이용한 웨스턴 블럭법으로 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기재된 것으로서 본 발명은 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0028] 제조예 1: 생강나무(Lindera obtusiloba Blume)로부터 피부미백 활성물질의 추출·분리 및 정제-에탄올 용매 사용

[0029] 건조된 생강나무(Lindera obtusiloba Blume) 500g을 70% 에탄올 5 L를 이용하여 3시간 동안 환류냉각 추출하여 얻은 후 7,500 rpm, 30 min, 4℃에서 원심분리하여 상등액을 얻었다. 원심분리된 상등액에 남아 있을지 모르는 불용성 물질을 제거하기 위하여 재차 상등액을 whatman No. 42 여과하였다. 여과된 상등액을 감압증류한 다음 동결건조를 통하여 분말 형태의 생강나무(Lindera obtusiloba Blume) 70% 에탄올 추출물(LOE)을 얻었다. 이렇게 얻어진 LOE를 물에 녹인 뒤 순차적으로 유기용매의 극성도를 달리하며 hexane(LOE-H), chloroform(LOE-C), ethylacetate (LOE-E), butanol(LOE-B), water(LOE-W) 획분으로 극성에 따라 일차적 분리를 하였다. 피부미백 활성이 가장 높은 LOE-E를 연속적으로 vacuum liquid chromatography에 흡착시킨 후 <D.W. :methanol> 혼합용출액의 농도를 달리하여 5개의 획분을 얻은 뒤, 역시 피부미백 활성이 가장 높은 <50% D.W. :50% methanol> 획분(LOE-E-2)을 재차 Prep HPLC를 이용하여 생강나무(Lindera obtusiloba Blume)의 항산화 및 간 보호 기능물질인 퀴세틴-3-O-α-람노사이드(퀴시트린)를 분리하였다.

[0030] 제조예 2: 생강나무(Lindera obtusiloba Blume)로부터 피부미백 활성물질의 추출·분리 및 정제-메탄올 용매

사용

- [0031] 건조된 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume) 500g을 100% 메탄올 5 L를 이용하여 3시간 동안 환류냉각 추출하여 얻은 후 7,500 rpm, 30 min, 4℃에서 원심분리하여 상등액을 얻었다. 원심분리된 상등액에 남아 있을지 모르는 불용성 물질을 제거하기 위하여 재차 상등액을 whatman No. 42 여과하였다. 여과된 상등액을 감압증류한 다음 동결건조를 통하여 분말 형태의 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume) 100% 메탄올 추출물(LOE)을 얻었다.
- [0032] 이렇게 얻어진 LOE를 물에 녹인 뒤 순차적으로 유기용매의 극성도를 달리하며 hexane(LOE-H), chloroform(LOEC), ethylacetate (LOE-E), butanol(LOE-B), water(LOE-W) 획분으로 극성에 따라 일차적 분리를 하였다. 피부미백 활성이 가장 높은 LOE-E를 연속적으로 silica gel column chromatography에 흡착 시킨 후 <ethyl acetate :methanol> 혼합용출액의 농도를 달리하여 11개의 획분을 얻은 뒤, 역시 피부미백 활성이 가장 높은 <100% ethyl acetate. : 0% methanol> 획분(LOE-E-0)을 재차 Sephadex LH-20 resin를 이용한 column 정제를(용
- [0033] 매는 methanol과 D.W.를 사용)하여 생강나무(*Lindera obtusiloba* Blume)의 피부미백 기능물질인 퀴세틴-3-O- α -람노사이드(퀴세트린, LOE-E-0-II)를 분리하였다.
- [0034] 실시예 1: 퀴세틴-3-O-알파-람노사이드(퀴세트린, 퀴시트린)의 DPPH 라디칼 제거효과와 철이온 환원력(FRAP)을 통한 항산화 효과
- [0035] 항산화능은 DPPH 라디칼 소거능력시험과 철이온 환원력을 통해 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능력시험의 경우, 각 농도 별로 희석한 퀴세트린과 에탄올에 용해한 200 μ M DPPH 용액을 96 well에 37 ℃에서 30분 동안 반응시켜 517 nm에서 마이크로플레이트 리더를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 철이온 환원력은 10 mM TPTZ와 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 0.3 M 아세트이트 버퍼에 용해시킨 FRAP 시험액을 각 농도 별로 희석한 퀴세트린과 5분 동안 반응시켜 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 포지티브 컨트롤은 아스코르브산을 사용하였다.
- [0036] DPPH 라디칼 소거능력시험 결과, 퀴세트린의 SC_{50} 값은 36.73 ± 0.44 mM으로 아스코르브산의 45.89 ± 0.46 mM와 비교했을 때, 더 높은 항산화력을 가지고 있었다. 또한 FRAP 분석 결과에서도 마찬가지로 퀴세트린이 12.87 ± 0.53 (mole $\text{FeSO}_4/0.1$ M 퀴세트린)으로 0.022 ± 0.01 (mole $\text{FeSO}_4/0.1$ M 아스코르브산) 아스코르브산보다 유의적인 차이를 보이며 더 높은 항산화력을 가진 것으로 나타났다. 이를 토대로 퀴세트린은 항산화 능력이 기존에 알려진 어떤 항산화물질보다 더 높은, 우수한 항산화물질임을 알 수 있으며 이를 바탕으로 피부미백 및 피부톤 개선 효과가 있음을 추론할 수 있다.

표 1

	50% DPPH제거 농도 (mM)	철이온 환원력 (mol $\text{FeSO}_4/0.1$ M sample)
아스코르브산	45.89 ± 0.46	0.022 ± 0.01
퀴세트린	$36.73 \pm 0.44^*$	$12.87 \pm 0.53^*$

*p<0.001vs 아스코르브산

- [0037]
- [0038] 표 1은 퀴세틴-3-O-알파-람노사이드(퀴세트린, 퀴시트린)의 DPPH 라디칼 제거효과와 철이온 환원력(FRAP)을 통한 항산화 효과를 나타낸 표이다.
- [0039] 실시예 2: 퀴세틴-3-O-알파-람노사이드(퀴세트린, 퀴시트린)의 항멜라노제닉 효과
- [0040] 멜라닌 함량은 표준곡선과의 비교를 통해서 분석한다. 멜라닌의 표준곡선은 도 1에서 보는바와 같이 합성한 멜라닌 표준품을 31.25, 62.5, 125, 250 μ g/mL로 희석한다. 흡광도는 475nm에서 측정한다.

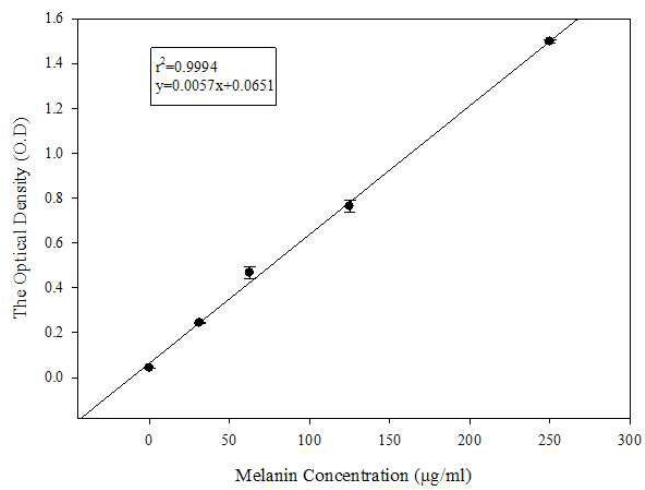
- [0041] 상관계수는 $r^2=0.9994$ 로 좋은 직선모양을 보여주므로 우수한 멜라닌 표준곡선을 그렸으며, 앞으로의 B16F10 세포에서 멜라닌 함량을 우수하게 측정할 수 있는 표준곡선으로 사용할 수 있다.
- [0042] 퀴세트린의 머쉬룸(버섯) 타이로시네이즈 저해활성
- [0043] 타이로시네이즈 저해 활성은 측정은 20 μ L의 머쉬룸(버섯) 타이로시네이즈(1000 units)를 각 샘플과 10 mM L-DOPA 용액, 20 mM 소듐 포스페이트 버퍼(pH 6.5)를 혼합하여 총 150 μ L 부피로 만들어 37 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 반응시켜 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0044] 퀴세트린의 농도를 5, 50, 500 μ M로 증가시켰을 때 타이로시네이즈 활성이 90.19, 87.45, 84.39 %로 감소하는 것으로 보아 퀴세트린은 타이로시네이즈 저해 활성이 있으며, 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인하였다. 이를 통해 퀴세트린은 피부미백 및 피부톤 개선 효과가 있음을 시험관 실험을 통하여 확인하였다.
- [0045] B16F10 멜라노마 세포에서 퀴세트린의 타이로시네이즈 저해활성
- [0046] 마우스 멜라노마 세포주인 B16F10을 사용하였으며, 배지는 10 % FBS와 페니실린-스트렙토마이신(100U/mL)을 넣은 DMEM을 사용하여 37 $^{\circ}$ C 5 % CO₂ 배양기에 배양하였다. 6 well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 24시간 동안 배양하여 최종 농도가 100, 150 μ M이 되도록 퀴세트린과 코직산을 처리하여 3일 동안 배양하였다. 배양 후, 찬 PBS로 배지를 2회 워싱한 후, 1 % Triton X-100과 0.1 M 소듐 포스페이트 버퍼(pH 6.8)에 4 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 용해하였다. 이 세포용출물을 10,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 90 μ L의 상층액을 10 mM L-DOPA와 반응시켜 475 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 단백질 정량은 브래드포드법으로 수행하였다.
- [0047] 타이로시네이즈 활성은 광학 밀도에 의해 측정되었다. 컨트롤군의 타이로시네이즈 활성을 100%로 추정함으로써, 100 μ M과 150 μ M의 퀴세트린을 처리한 후 각각 12%와 17.6%로 농도의존적으로 감소하는 결과를 보여주었다. 150 μ M quercetrin 처리군과 컨트롤군 사이에 중요한 차이가 있었다. 게다가, 포지티브 컨트롤인 코직산을 동일한 농도로 처리하였을 때 활성은 10.14%와 13.85%로 감소되었다. 위 결과로 퀴세트린은 세포 수준에서 타이로시네이즈 저해 활성이 있으며, 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인하였다. 또한 기존에 우수한 피부미백 및 피부톤 개선 효과가 있는 물질로 알려진 코직산보다 더 우수한 타이로시네이즈 저해 활성 효과를 나타냈다. 이를 통해 퀴세트린은 피부미백 및 피부톤 개선 효과가 있음을 타이로시네이즈 저해활성을 세포 실험을 통하여 확인하였다.
- [0048] 퀴세트린에 의한 멜라닌 함량 측정
- [0049] 6 well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 24시간 동안 배양하여 최종 농도가 100, 150 μ M이 되도록 퀴세트린과 코직산을 처리하여 3일 동안 각각 배양하였다. 배양한 세포를 0.1 N NaOH에 용해시켜 100 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 가열하여 475 nm에서 멜라닌의 양을 측정하였다.
- [0050] 포지티브 컨트롤인 코직산과 비교하여 퀴세트린 처리에 따른 멜라닌 함량은 도 2에서 보여준다. 컨트롤군의 멜라닌 함량을 100%로 가정했을 때, 멜라닌 함량은 각각 100 μ M과 150 μ M 퀴세트린 처리군에서 95.31%와 47.29%로 감소하였다. 이러한 퀴세트린의 패턴과 같이, 코직산 또한 각각의 같은 농도에서 89.81%와 58.62%로 감소하였다. 위 결과로 퀴세트린은 세포 수준에서 멜라닌 생성 저해 활성이 있으며, 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인하였다. 또한 기존에 우수한 피부미백 및 피부톤 개선 효과가 있는 물질로 알려진 코직산보다 더 우수한 멜라닌 생성 저해 활성 효과를 나타냈다. 이를 통해 퀴세트린은 피부미백 및 피부톤 개선 효과가 있음을 멜라닌 함량을 통한 세포 실험을 통하여 확인하였다.
- [0051] 실시예 3:B16F10 멜라노마 세포에서 멜라닌 합성에 미치는 퀴세트린의 효과
- [0052] B16F10 멜라노마 세포에 100 μ M 과 150 μ M 농도의 퀴세트린을 3일 동안 반응 후 0.1 N NaOH로 세포를 용해시켰다. 세포 용출물을 100 $^{\circ}$ C에서 30분간 끓인 후 수용액층을 사진으로 현상하였다.
- [0053] 사진에서 보는 바와 같이 아무것도 처리하지 않은 컨트롤군에서는 검은색이 진함을 알 수 있으며, 여기에 퀴세틴을 처리한 군에서는 농도 의존적으로 흑색이 감소하는, 즉 미백 및 톤 감소효과가 있음을 눈으로 확인할 수 있다. 또한 기존에 우수한 피부미백 및 피부톤 개선 효과가 있는 물질로 알려진 코직산보다 같은 농도에서 더 우수한 감소 효과가 있는 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 퀴세트린은 피부미백 및 피부톤 개선 효과가 있음을 사진 현상을 통해 눈으로 직접 확인하였다.
- [0054] B16F10 세포에서 phospho-extracellular signal-regulated kinase (P-ERK), microphthalmia-associated

transcription factor (MITF), 및 Tyrosinase의 단백질발현 레벨에 미치는 퀴세트린 효과

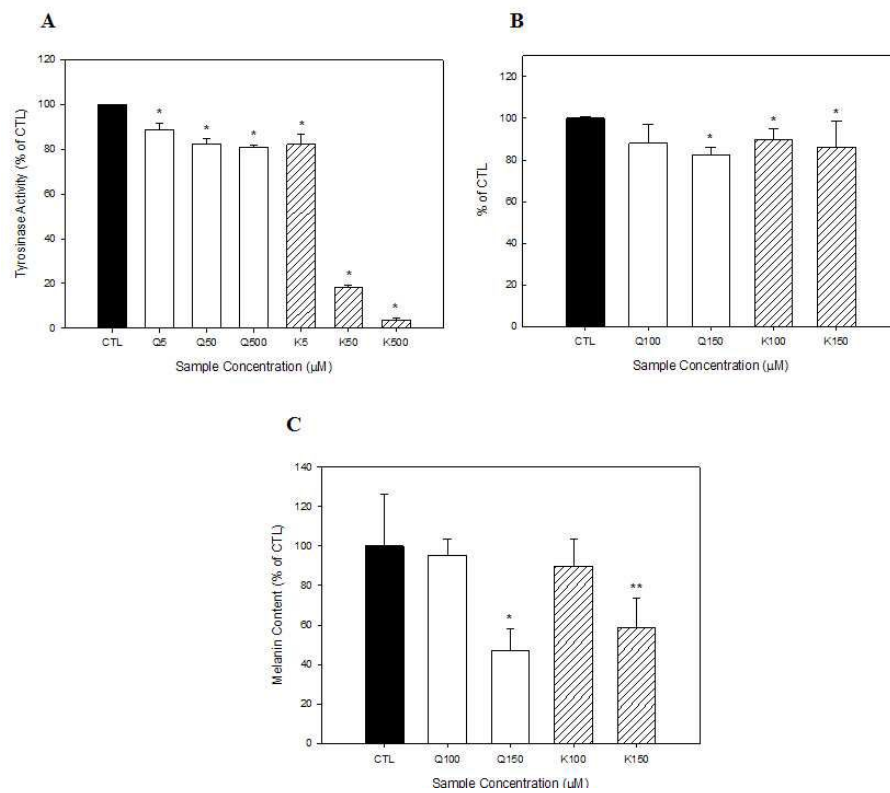
- [0055] 멜라닌 생성과정의 메커니즘을 추적하기 위하여 웨스턴 블롯법을 이용하여 P-ERK, MITF, 타이로시네이즈 단백질 발현양을 분석하였다.
- [0056] 세포에서의 타이로시네이즈 활성이 감소함으로써 퀴세트린이 멜라닌 함량을 감소시킨다는 것을 확인한 이전의 결과로부터 우리는 웨스턴 블롯 분석법을 사용하여 멜라닌 생성과 관련이 깊은 세포의 P-ERK, MITF 그리고 타이로시네이즈 단백질 수준을 연구하였다. 도 4의 A에서 보는 바와 같이 퀴세트린을 처리하였을 때 P-ERK 단백질 수준은 포지티브 컨트롤인 코직산과 아무것도 처리하지 않은 컨트롤보다 24시간 후에 많이 증가한 것을 확인했다. MITF 단백질 수준은 시간이 점차 지나가면서 점진적으로 감소했으며, 타이로시네이즈 또한 퀴세트린 처리 후 시간이 지나면서 급격히 감소하는 것으로 보아 타이로시네이즈 단백질의 수준을 막아준다는 것을 확인하였다. 이 결과로 멜라닌 형성은 ERK, MITF 그리고 타이로시네이즈 반응 경로를 통해 발현된다는 것을 확인 했으며, 기존에 우수한 피부미백 및 피부톤 개선 효과가 있는 물질로 알려진 코직산보다 멜라닌 생성관련 단백질발현 저해 활성이 더 우수한 효과를 나타냈다. 이를 통해 퀴세트린은 피부미백 및 피부톤 개선 효과가 있음을 멜라닌 생성 경로에 연계된 단백질발현 분석 실험을 통하여 확인하였다.
- [0057] 멜라닌 생성 억제에 연계된 MEK 단백질 발현을 저해하는 물질인 PD98059 처리에 따른 B16F10 세포에서 멜라닌 함량 측정
- [0058] 6 well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 24시간 동안 배양하여 최종 농도가 150 μ M이 되도록 퀴세트린과 코직산을 처리하여 3일 동안 각각 배양하였다. 또한 여기에 멜라닌 생성억제와 관련이 깊은 MEK 신호와 같은 특정 신호를 막는 물질인 PD98059를 처리하여 상대적으로 멜라닌 함량을 늘리는 실험을 병행하였다. 이렇게 배양한 세포를 0.1 N NaOH에 용해시켜 100 $^{\circ}$ C에서 30분동안 가열하여 475 nm에서 멜라닌의 양을 측정하였다.
- [0059] 미백과 관련된 MEK 단백질발현을 억제하기 위해 PD98059를 처리하고 멜라닌 함량을 측정했다. 일반세포에 100 μ M과 150 μ M의 퀴세트린과 코지산을 처리하였을 때는 멜라닌 생성량을 줄였지만(퀴세트린이 코직산보다 우수하게 감소) PD98059를 처리 하였을때 각 군들은 멜라닌 함량이 상당히 증가되었는데 이는 멜라닌 형성이 MEK 반응 경로를 포함한다고 설명된다.
- [0060] 멜라닌 생성 억제에 연계된 MEK 단백질발현을 억제시키는 물질인 PD98059 처리에 따른 B16F10 세포에서 P-ERK(24시간), MITF(72시간), 타이로시네이즈(72시간)의 단백질발현 레벨에 미치는 퀴세트린 효과
- [0061] 단백질 수준에서 퀴세트린에 의해 영향을 받는 멜라닌 형성 신호를 찾기 위해서, 본 연구진은 멜라닌 생성 억제 단백질인 MEK 신호와 같은 특정 신호를 막는 물질인 PD98059를 처리하는 실험을 병행했다. 간단히 말해, 세포는 6 well plate에 한 well 당 7×10^4 개의 세포가 밀집되도록 seeding하였다. 하루 뒤, 배지를 교체해주고, 10 μ M PD98059는 전처리를 해주었다. 그리고 나서, 1시간 뒤, 시료는 3일동안 처리했고 웨스턴 블롯법을 이용하여 P-ERK, MITF, 타이로시네이즈 단백질 발현 양을 분석하였다.
- [0062] MEK 단백질발현을 막아준 후에 단백질발현 수준을 확인하기 위해서 웨스턴 블롯 분석법을 시행하였다. 위에서 언급했듯이 phospho-ERK는 24시간 후에 가장 활성화되었고, MITF와 타이로시네이즈는 72시간 후에 가장 활성화 되었다. 이것이 본 연구진이 24시간과 72시간 같이 특정한 시간을 선택한 이유이다. 퀴세트린 처리시 ERK, MITF, 타이로시네이즈 단백질 발현을 통하여 피부 미백 및 피부톤 개선효과가 있음을 확인하고, 기존에 우수한 피부미백 및 피부톤 개선물질로 알려진 코직산보다 더 높은 피부미백 및 피부톤 개선을 확인하였다. 그러나 멜라닌 생성억제 단백질로 알려진 MEK의 억제 물질인 PD98059를 처리 하였을 시 ERK, MITF, 타이로시네이즈 단백질 발현이 컨트롤군, 퀴세트린, 코직산 처리군에서 모두 유의적 차가 나지 않음을 확인 하였다. 이를 통해 퀴세트린은 멜라닌 생성과 관련된 경로인 MEK와 ERK 통로에 관여한다는 것을 확인 함과 동시에 퀴세트린의 피부미백 및 피부톤 개선효과를 확인하였다. 이를 통해 퀴세트린은 피부 미백 및 피부톤 개선 효과가 있음을 미백과 관계된 단백질발현을 억제하는 실험을 통해서도 재차 확인하여 피부 미백 및 피부톤 개선 효과가 있음을 확인하였다.

도면

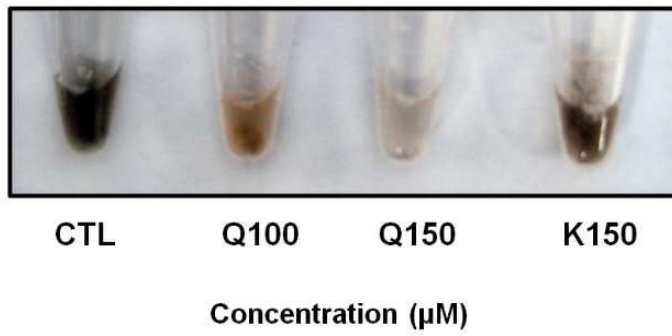
도면1



도면2



도면3



도면4

