

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2018년 5월 11일 (11.05.2018)



(10) 국제공개번호

WO 2018/084671 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 36/282 (2006.01)

A23L 33/10 (2016.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A23L 33/105 (2016.01)

A61K 8/97 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61K 8/60 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/012483

(22) 국제출원일:

2017년 11월 6일 (06.11.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0146994 2016년 11월 4일 (04.11.2016) KR

10-2016-0146995 2016년 11월 4일 (04.11.2016) KR

(71) 출원인:

동신대학교산학협력단 (DONGSHIN

UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION) [KR/KR]; 58245 전라남도 나주시 건재로 185, Jeollanam-do (KR). 광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 61005 광주시 북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR).

(72) 발명자:

임순호 (YIM, Soon Ho); 61258 광주시 북구 서강로54번길 10 104동 1701호, Gwangju (KR). 정다운 (JUNG, Da-Woon); 61005 광주시 북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR). 윌리엄다런 (R. WILLIAMS, Darren); 61005 광주시 북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR).

(74) 대리인:

특허법인 지원 (G1 IP LAW FIRM); 08502 서울시 금천구 가산디지털1로 196, 303호, Seoul (KR).

(81) 지정국

(별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국

(별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

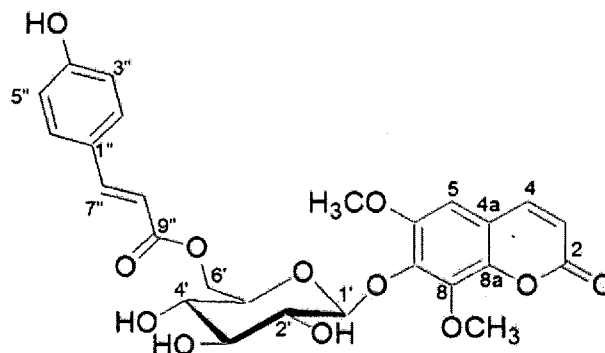
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING PIGMENTATION DISORDERS

(54) 발명의 명칭: 색소 질환의 예방 또는 치료용 조성물

【도 1a】



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating pigmentation disorders, the composition enabling the prevention or treatment of pigmentation disorders caused by hypopigmentation or hyperpigmentation of the skin.

(57) 요약서: 본 발명은 색소 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 피부의 저색소침착(hypopigmentation) 또는 과대색소침착(hyperpigmentation)에 기인하는 색소 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.



WO 2018/084671 A1

명세서

발명의 명칭: 색소 질환의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 색소 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 피부의 저색소침착(hypopigmentation) 또는 과대색소침착(hyperpigmentation)에 기인하는 색소 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인간 피부는 다양한 외부 환경적 스트레스에 노출되는 장기로, 자외선(UVR) 등에 의한 잠재적 손상을 방어하기 위하여 다양한 메커니즘이 존재한다. 이러한 방어 메커니즘으로는 DNA 손상 메커니즘, 카탈레이즈 및 과산화물 제거효소와 같은 다양한 효소, 및 피부 색소 침착을 포함한다. 이러한 요소 중에는, 색소 침착이 가장 중요한 광-보호적인 요소에 해당한다. 티로시네이즈 효소(tyrosinase)는 멜라닌 색소의 합성 경로에서 두가지의 속도 제한적인 반응을 촉진시키므로 색소 침착에 중요한 조절자로 작용한다. 이러한 속도 제한적인 반응으로는 1) 3,4-디히드록시페닐알라닌(3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA)를 생성하기 위한 티로신 히드록실화와, 2) 도파퀴논(dopaquinone)을 생성하기 위한 DOPA 산화 공정이 있다.
- [3] 저색소 침착(hypopigmentation)은 멜라닌 부족으로 발생하는 것으로, 발병 시 피부암 발생율이 70배 이상 증가한다. 유전적 저색소 침착은 알비노(albinism)와 같은 질환을 발생시킨다. 또한, 저색소 침착된 병변은 노출된 피부를 시각적으로 보기에 흉하게 만들어 심리사회학적 문제 또한 발생시킨다. 멜라닌 생합성을 상향 조절할 수 있는 작은 분자들이 저색소 침착 질환을 치료하고 UV-유도된 피부 손상을 감소시키는 데에 잠재적인 물질로 연구되고 있다. 이에, 다양한 광보호적 속성을 가진 색소 침착 촉진 물질로, 예를 들어, 디아실글리세롤(diacylglycerols), 3-이소뷰틸-1-메틸크산틴(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX) 및 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide, DMSO)가 개발되었다. 하지만, 이들 화합물은 종양 형성을 촉진하는 경향의 심각한 부작용이 문제되고 있다. 따라서, 최근에는 색소 침착 효과가 더 뛰어나지만 독성이 없고 경제적으로 유효한 물질의 개발이 요구되고 있다.
- [4] 한편, 멜라닌 합성 과정에서 조절 장애가 발생하면 이는 색소의 과다한 침착을 초래하고, 기미(melasma), 검버섯(age spots) 및 일광성 각화증(solar keratosis)와 같은 질환을 유발한다. 또한, 화장품 업계에서 피부 색깔의 개선은 오래 전부터 요구되어 왔고, 다양한 미백 제품이 전세계적으로 판매되고 있다. 이러한 미백 제품 또는 치료제들은 하이드로퀴논, 레티노이드 및 티로시네이즈 억제제 등을 포함하고 있는데, 이들은 돌연변이, 독성 및 조직 흑갈병(ochronosis, blue-black

hyperpigmentation of skin) 등의 부작용이 문제되고 있다. 따라서, 최근에는 부작용을 일으키지 않고 피부 독성이 적으면서 피부 미백 효과가 뛰어난 치료제 혹은 화장품에 대한 연구 및 개발이 지속적으로 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 일 목적은 멜라닌 형성 촉진 효과가 뛰어나 저색소 침착에 기인한 다양한 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 약학 조성물을 제공하고자 한다.
- [6] 본 발명의 다른 목적은 피부 색소 침착 억제 효과가 뛰어나 과다색소침착에 기인한 다양한 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 약학 조성물을 제공하고자 한다.
- [7] 본 발명의 또 다른 목적은 색소 질환을 예방 또는 개선할 수 있는 화장료 또는 식품 조성물을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

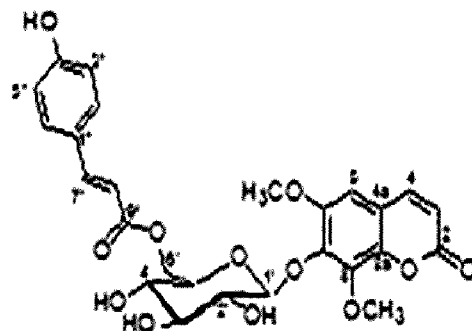
- [8] 본 발명의 발명자들은 사철쭉(*Artemisia capillaris* Thunberg)의 추출물, 그 중에서도 특히 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드(isofraxidin 7-*O*-(6'-*O*-*p*-coumaroyl)-β-glucopyranoside)가 멜라닌 세포에서 멜라닌 형성을 촉진하는 효과가 뛰어난 것을 발견하여 본 발명에 이르게 되었다.
- [9] 또한, 본 발명의 발명자들은 사철쭉(*Artemisia capillaris* Thunberg)의 추출물, 그 중에서도 특히 4,5-*O*-디카페오일퀸산(4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid)이 멜라닌 세포에서 색소 침착 억제 효과가 우수한 것을 발견하여 본 발명에 이르게 되었다.
- [10] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 사철쭉(*Artemisia capillaris* Thunberg)의 추출물을 유효 성분으로 포함하는, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [11] 본 발명에서 상기 사철쭉 추출물은 멜라닌 세포에서 멜라닌 형성 촉진 효과가 뛰어난 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드를 다량으로 포함하고 있어 저색소 침착에 기인한 색소 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [12] 또한, 본 발명에서 상기 사철쭉 추출물은 멜라닌 세포에서 색소 침착 억제 효과가 뛰어난 4,5-*O*-디카페오일퀸산을 다량으로 포함하고 있어 과다색소침착에 기인한 색소 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [13] 또한, 본 발명에서 상기 사철쭉은 잎, 열매, 수피, 뿌리 등의 부위를 사용할 수 있으며 바람직하게는 잎을 사용할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [14] 본 발명에서, 상기 사철쭉을 추출하는 방법에 있어 단순한 추출 방법에서부터 지용성 성분까지 추출할 수 있는 모든 방법이 적용될 수 있으며, 추출이 용이하도록 분쇄하여 추출 용매에 의해 추출하고 이를 여과 및 농축하여 얻을 수

있다.

- [15] 추출 용매로는 물, 에탄올, 메탄올, 부탄올, n-헥산, n-헵탄 또는 DMSO 등이 있고 이들 중 2 이상의 용매를 혼합하여 추출 용매로 사용할 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 추출하고자 하는 원료의 양, 추출 방법 등에 따라 당업자가 공지의 방법으로부터 적절히 선택할 수 있다. 추출 시간 및 온도도 추출 효율, 추출 용매 등을 고려하여 당업자가 공지의 방법으로부터 적절히 선택 가능하다. 바람직한 추출 시간은 10분 내지 1시간이며, 바람직한 추출 온도는 40 내지 100°C이다.
- [16] 또한, 상기 추출 방법에 의해 추출된 추출물을 감압 여과 등의 공지의 여과 방법에 의해 여과한 후 증류 등에 의해 농축할 수 있다. 이와 같은 추출, 여과 및 농축 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 따라서 당업자는 이를 적절히 선택하여 은행 추출물을 제조할 수 있다.
- [17] 본 발명에서 상기 사철쭉 추출물의 함량을 특별히 제한하지 않으나, 바람직하게는 10 내지 100 μ g/ml, 또는 20 내지 75 μ g/ml, 또는 25 내지 75 μ g/ml, 또는 25 내지 50 μ g/ml의 농도로 포함될 수 있다. 본 발명에서 상기 사철쭉 추출물이 10 μ g/ml 미만의 양으로 포함되는 경우 색소 침착 억제 효과가 미미할 수 있고, 10 μ g/ml를 초과하는 양으로 포함되는 경우 독성이 문제될 수 있다.
- [18] 또한, 본 발명에서 상기 저색소 침착에 기인한 색소 질환은 멜라닌 세포의 손실이 원인이 되거나, 멜라닌 생성 저해가 원인이 되어 멜라닌 생성이 정상 수준에 이르지 못하여 발생하는 모든 질환일 수 있는데, 예컨대 백반증, 백색증, 탈색소 모반, 백색 비강진, 어루러기, 염증 후 탈색증, 반상 경피증, 부분 백피증, 특발성 적상 저색소증, 또는 점상 백피증 등일 수 있다.
- [19] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드(isofraxidin 7-O-(6'-O-p-coumaroyl)- β -glucopyranoside)를 유효 성분으로 포함하는, 저색소 침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다:

[20] [화학식 1]

[21]



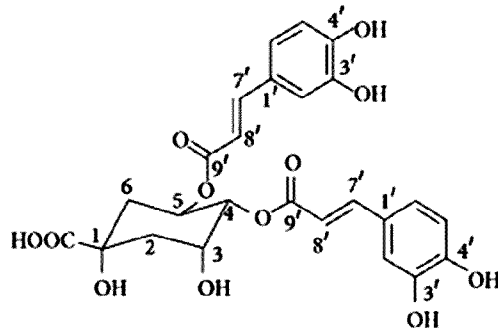
- [22] 본 발명에서 상기 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드는 본 발명의 사철쭉 추출물로부터 분리한

것일 수 있으나, 일반적인 합성 방법에 의하여 합성할 수 있고, 혹은 시중에 판매되는 것을 구매하여 사용할 수도 있으며, 그 출처를 특별히 제한하지는 않는다.

- [23] 또한, 본 발명에서 상기 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드의 함량을 특별히 제한하지 않으나, 바람직하게는 10 내지 100μM, 또는 10 내지 50μM, 또는 10 내지 25μM, 또는 12.5 내지 25μM의 농도로 포함될 수 있다. 본 발명에서 상기 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드가 10μM 미만의 양으로 포함되는 경우 멜라닌 항상 촉진 효과가 미미할 수 있고, 100μM를 초과하는 양으로 포함되는 경우 독성이 문제될 수 있다.
- [24] 본 발명에서 상기 색소 질환은 저색소 침착에 기인한 질환으로, 멜라닌 세포의 손실이 원인이 되거나, 멜라닌 생성 저해가 원인이 되어 멜라닌 생성이 정상 수준에 이르지 못하여 발생하는 모든 질환일 수 있는데, 예컨대 백반증, 백색증, 탈색소 모반, 백색 비강진, 어루러기, 염증후 탈색증, 반상 경피증, 부분 백피증, 특발성 적상 저색소증, 또는 점상 백피증 등일 수 있다.
- [25] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 하기 화학식 2로 표시되는 4,5-*O*-디카페오일퀸산(4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid)을 유효 성분으로 포함하는, 과다색소침착에 기인한 피부 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다:

[26] [화학식 2]

[27]



- [28] 본 발명에서 상기 4,5-*O*-디카페오일퀸산은 본 발명의 사철쭉 추출물로부터 분리한 것일 수 있으나, 일반적인 합성 방법에 의하여 합성할 수 있고, 혹은 시중에 판매되는 것을 구매하여 사용할 수도 있으며, 그 출처를 특별히 제한하지는 않는다.
- [29] 또한, 본 발명에서 상기 4,5-*O*-디카페오일퀸산의 함량을 특별히 제한하지 않으나, 바람직하게는 5 내지 100μM, 또는 5 내지 50μM, 또는 5 내지 25μM, 또는 6.25 내지 25μM의 농도로 포함될 수 있다. 본 발명에서 상기 4,5-*O*-디카페오일퀸산이 5μM 미만의 양으로 포함되는 경우 색소 침착 억제 효과가 미미할 수 있고, 100μM를 초과하는 양으로 포함되는 경우 독성이 문제될

수 있다.

- [30] 본 발명에서 상기 피부 색소 질환은 과다색소침착에 기인한 질환으로, 피부 또는 손발톱의 특정 부위에서 멜라닌의 과도한 증가에 의해 다른 부위에 비해 검거나 어둡게 되는 질환을 의미한다. 바람직하게는 상기 피부 색소 질환은 기미, 주근깨, 노인성 색소반, 잡티, 모반 또는 일광흑색증(solar lentigines) 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [31] 한편, 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학 조성물을 이용하여 저색소 침착에 기인한 색소 질환의 증상을 차단하거나, 그 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [32] 또한, 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학 조성물을 이용하여 저색소 침착에 기인한 색소 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [33] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [34] 본 발명의 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [35] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [36] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가

바람직하다.

- [37] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [38] 본 발명의 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.
- [39] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 사철쭉의 추출물을 유효 성분으로 포함하는, 저색소 침착 또는 과다색소침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [40] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드를 유효 성분으로 포함하는, 저색소 침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [41] 본 발명의 화장료 조성물에서 상기 사철쭉 추출물 및 상기 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드에 관한 설명은 상기 약학 조성물에서 기재한 바와 중복되어, 이하 그 구체적인 기재를 생략한다.
- [42] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 4,5-*O*-디카페오일퀸산을 유효 성분으로 포함하는, 과다색소침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [43] 본 발명의 화장료 조성물에서 상기 사철쭉의 추출물 및 4,5-*O*-디카페오일퀸산에 관한 설명은 상기 약학 조성물에서 기재한 바와 중복되어 이하 그 구체적인 기재를 생략한다.
- [44] 한편, 본 발명에서, "개선"은 본 발명의 약학 조성물을 이용하여 저색소 침착에 기인한 색소 질환의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [45] 본 발명에서 화장료 조성물은 화장수, 영양로션, 영양에센스, 마사지 크림, 미용목욕물첨가제, 바디로션, 바디밀크, 배스오일, 베이비오일, 베이비파우더, 샤워젤, 샤워크림, 선스크린로션, 선스크린크림, 선텐크림, 스킨로션, 스킨크림, 자외선차단용 화장품, 크렌징밀크, 탈모제{화장용}, 페이스 및 바디로션, 페이스 및 바디크림, 피부미백크림, 핸드로션, 헤어로션, 화장용크림, 자스민오일, 목욕비누, 물비누, 미용비누, 샴푸, 손세정제(핸드클리너), 약용비누{비의료용}, 크림비누, 페이스 워시, 전신 세정제, 두피 세정제, 헤어린스, 화장비누,

치아미백용 겔, 치약 등의 형태로 제조될 수 있다. 이를 위해 본 발명의 조성물은 화장료 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 용매나, 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

- [46] 본 발명의 화장료 조성물 내에 더 추가될 수 있는 용매의 종류는 특별히 한정하지 않으나, 예를 들어, 물, 식염수, DMSO 또는 이들의 조합을 사용할 수 있고, 담체, 부형제 또는 희석제로는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알콜, 지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제(humectant), 증점제, 항산화제, 점도 안정화제, 킬레이팅제, 완충제, 저급 알콜 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 필요에 따라 미백제, 보습제, 비타민, 자외선 차단제, 향수, 염료, 향생제, 항박테리아제, 항진균제를 포함할 수 있다.
- [47] 상기 오일로서는 수소화 식물성유, 피마자유, 면실유, 올리브유, 야자인유, 호호바유, 아보카도유가 이용될 수 있으며, 왁스로는 밀랍, 경랍, 카르나우바, 칸텔릴라, 몬탄, 세레신, 액체 파라핀, 라놀린이 이용될 수 있다.
- [48] 지방산으로는 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레산이 이용될 수 있고, 지방산 알콜로는 세틸 알콜, 옥틸 도데칸올, 올레일 알콜, 판텐올, 라놀린 알콜, 스테아릴 알콜, 헥사데칸올이 이용될 수 있으며 지방산 에스테르로는 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 부틸 스테아레이트가 이용될 수 있다. 계면 활성제로는 당업계에 알려진 양이온 계면활성제, 음이온 계면활성제 및 비이온성 계면활성제가 사용가능하며 가능한 한 천연물 유래의 계면활성제가 바람직하다.
- [49] 그 외에도 화장품 분야에서 널리 알려진 흡습제, 증점제, 항산화제 등을 포함할 수 있으며, 이들의 종류와 양은 당업계에 공지된 바에 따른다.
- [50] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 사철쭉의 추출물을 유효 성분으로 포함하는, 저색소 침착 또는 과다색소침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [51] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드를 유효 성분으로 포함하는, 저색소 침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [52] 본 발명의 식품 조성물에서 상기 사철쭉 추출물 및 상기 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드에 관한 설명은 상기 약학 조성물에서 기재한 바와 중복되어, 이하 그 구체적인 기재를 생략한다.
- [53] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 4,5-O-디카페오일퀸산을 유효 성분으로 포함하는, 과다색소침착에 기인한 색소 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [54] 본 발명의 식품 조성물에서 상기 사철쭉의 추출물 및 4,5-O-디카페오일퀸산에 관한 설명은 상기 약학 조성물에서 기재한 바와 중복되어 이하 그 구체적인 기제는 생략한다.
- [55] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물은 각종 식품류, 예를

들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없는 식물추출물로 구성된 것이므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

- [56] 본 발명의 조성물이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있다.
- [57] 여기서, 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등을 들 수 있다.
- [58] 그 외 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [59] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

- [60] 본 발명에서 제공하는 조성물은 인체에 독성을 일으키지 않으면서도 멜라닌 형성 촉진 효과가 뛰어나 저색소 침착에 기인한 다양한 질환을 효과적으로 예방, 개선 및 치료할 수 있다.
- [61] 또한, 본 발명에서 제공하는 조성물은 멜라닌 색소에서 멜라닌 합성을 효과적으로 억제하여 피부 미백 효과가 뛰어나며 과다색소침착에 기인한 기미, 주근깨, 노인성 색소반, 잡티, 모반 또는 일광흑색증(solar lentigines) 등의 색소 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [62] 도 1의 (a)는 사철쭉 추출물로부터 분리된 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드의 화학 구조를 도시한 것이다.
- [63] 도 1의 (b)는 사철쭉 추출물로부터 분리된 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드에서 중요 HMBC 상관 관계를 도시한 것이다.
- [64] 도 1의 (c)는 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드의 280nm에서 HPLC크로마토그램 결과를 나타낸 것이다.

- [65] 도 1의 (d)는 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드의 적외선(IR) 스펙트럼 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [66] 도 1의 (e)는 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드의 흡수 자외선(UV) 스펙트럼 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [67] 도 2의 (a)는 B16-F10 멜라닌 세포에 아젤라산(AZ), 이소프락시딘(isofraxidin) 또는 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드(Compound 1)의 처리 후 세포 이미지를 디지털 카메라(100X 확대)로 촬영한 사진을 나타낸 것이다(스케일 바=20 μ m).
- [68] 도 2의 (b)는 B16-F10 멜라닌 세포에 아젤라산, 이소프락시딘 또는 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드의 처리 후 세포의 펠렛 모습을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.
- [69] 도 2의 (c)는 B16-F10 멜라닌 세포에 아젤라산, 이소프락시딘 또는 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드의 처리 후 세포 내 멜라닌 함량의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [70] 도 2의 (d)는 B16-F10 멜라닌 세포에 아젤라산, 이소프락시딘 또는 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드의 처리 후 티로시네이즈 활성의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [71] 도 3은 B16-F10 멜라닌 세포에 이소프락시딘, 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드, 포스콜린(forskolin) 또는 IBMX 처리 후 미처리 대조군 대비 세포 외로 분비되는 멜라닌의 함량의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [72] 도 4의 (a)는 B16-F10 멜라닌 세포에 이소프락시딘, 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드 또는 IBMX 처리 후 MIFT 발현 수준의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [73] 도 4의 (b)는 B16-F10 멜라닌 세포에 이소프락시딘, 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드 또는 IBMX 처리 후 TRP-1 발현 수준의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [74] 도 4의 (c)는 B16-F10 멜라닌 세포에 이소프락시딘, 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드 또는 IBMX 처리 후 티로시네이즈 발현 수준의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [75] 도 5는 멜라닌 세포에 티로신; 티로시네이즈; 티로신 및 티로시네이즈; 티로시네이즈, 티로신 및 이소프락시딘; 티로시네이즈, 티로신 및 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드;를 처리한 후 490nm에서 흡광도의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [76] 도 6은 제브라피쉬 배아에 PTU를 농도 별로 처리한 후 입체 현미경(100X 확대)으로 촬영한 사진을 그래프로 나타낸 것이다(스케일 바=20 μ m).
- [77] 도 7은 제브라피쉬 배아에 PTU, 이소프락시딘, 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드를 농도를 달리하며 처리한 후 심박동 수의

변화를 그래프로 나타낸 것이다.

- [78] 도 8의 (a)는 제브라피쉬 배아에 PTU, 이소프락시딘 또는 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드를 농도를 달리하며 처리한 후 입체 현미경(100X 확대)으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다(스케일 바=20 μ m).
- [79] 도 8의 (b)는 제브라피쉬 배아에 PTU, 이소프락시딘 또는 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드를 농도를 달리하며 처리한 후 멜라닌 함량의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [80] 도 8의 (c)는 제브라피쉬 배아에 PTU, 이소프락시딘 또는 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드를 농도를 달리하며 처리한 후 티로시네이즈 활성의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [81] 도 9의 (a)는 제브라피쉬 배아에 PTU 또는 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드를 농도를 달리하며 처리한 후 멜라닌 세포 수의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [82] 도 9의 (b)는 제브라피쉬 배아에 PTU 또는 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드를 농도를 달리하며 처리한 후 멜라닌 세포의 면적의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [83] 도 10의 (a)는 B16-F10 멜라닌 세포에 아젤라산(AZ), 사철쭉 추출물(A.capillaris), ACMF09 분획물 및 4,5-O-디카페오일퀸산(4,5-diCQA)을 48시간 동안 처리한 후 위상차 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다(스케일 바=20 μ m).
- [84] 도 10의 (b)는 B16-F10 멜라닌 세포에 아젤라산, 사철쭉 추출물, ACMF09 분획물 및 4,5-O-디카페오일퀸산을 처리한 후 세포 펠렛의 모습을 나타낸 것이다.
- [85] 도 10의 (c)는 B16-F10 멜라닌 세포에 아젤라산, 사철쭉 추출물, ACMF09 분획물 및 4,5-O-디카페오일퀸산을 처리한 후 세포 내 멜라닌 함량의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [86] 도 10의 (d)는 B16-F10 멜라닌 세포에 아젤라산, 사철쭉 추출물, ACMF09 분획물 및 4,5-O-디카페오일퀸산을 처리한 후 티로시네이즈 활성의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [87] 도 11의 (a)는 사철쭉 추출물로부터 분리된 4,5-O-디카페오일퀸산의 화학 구조를 도시한 것이다.
- [88] 도 11의 (b)는 사철쭉 추출물로부터 분리된 4,5-O-디카페오일퀸산의 HPLC크로마토그램 결과를 나타낸 것이다.
- [89] 도 12는 B16-F10 멜라닌 세포에 AZ, ACMF09 분획물 또는 4,5-O-디카페오일퀸산의 처리 후 무세포 시스템에서 티로시네이즈 활성의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [90] 도 13은 B16-F10 멜라닌 세포에 AZ, ACMF09 분획물 또는 4,5-O-디카페오일퀸산의 처리 후 MITF, 티로시네이즈 및 TRP-1의 mRNA 발현

수준의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

- [91] 도 14의 (a)는 제브라피쉬 배아에 PTU, 사철쭉 추출물, ACMF09 분획물 또는 4,5-O-디카페오일퀸산을 처리한 후 입체 현미경(100X 확대)으로 촬영한 사진을 나타낸 것이다(스케일 바=20 μ m).
- [92] 도 14의 (b)는 제브라피쉬 배아에 PTU, 사철쭉 추출물, ACMF09 분획물 또는 4,5-O-디카페오일퀸산을 농도를 달리하며 처리한 후 멜라닌 함량의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [93] 도 14의 (c)는 제브라피쉬 배아에 PTU, 사철쭉 추출물, ACMF09 분획물 또는 4,5-O-디카페오일퀸산을 농도를 달리하며 처리한 후 티로시네이즈 활성의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [94] 도 15의 (a)는 제브라피쉬 배아에 PTU 또는 4,5-O-디카페오일퀸산을 농도를 달리하며 처리한 후 멜라닌 세포 수의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [95] 도 15의 (b)는 제브라피쉬 배아에 PTU 또는 4,5-O-디카페오일퀸산을 농도를 달리하며 처리한 후 멜라닌 세포의 면적의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- [96] 도 16은 B16-F10 멜라닌 세포에 아젤라산, 사철쭉 추출물, ACMF09 분획물 또는 4,5-O-디카페오일퀸산을 농도를 달리하며 처리한 후 세포 생존율의 변화를 그래프로 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [97] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[98]

[99] 실시예 1

- [100] 실시예 1은 사철쭉 추출물의 멜라닌 형성 활성을 알아보기 위하여 실시하였다.

[101]

[102] 일반적인 실험 공정

- [103] 시각적 회전은 JASCO DIP-1000 디지털 편광계로 측정하였다. UV 스펙트라는 JASCO V-530 UV/Vis 분광 광도계(Jasco Corp., Japan)를 이용하여 얻었고, IR 스펙트라는 JASCO FT/IR-300E 분광 광도계(Jasco Corp., Japan)를 이용하여 얻었다. ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트라는 Varian VNMRs 600 MHz NMR 분광 광도계(Varian, Inc., USA)를 이용하여 CD_3OD (tetramethylsilane(TMS)를 국제적 기준으로 사용함.)로 1D 및 2D NMR 실험에서 기록하였다. 화학적 이동(δ)은 백만분율(ppm)으로 나타내었고, 커플링 상수(J)는 Hz로 나타내었다. 무게 스펙트라는 JMS-700(Jeol, Japan) 및 Varion 1200, Platform II(Varian, USA) 분광 광도계를 이용하여 측정하였다. 고분해 질량(ESI-MS) 및 LCMS/MS 스펙트라는 Flight 질량 분광 광도계의 Water Synapt High Definition Mass Spectrometry/Time로 네거티브 전자분무 이온 모드(negative electrospray ion

mode)를 이용하여 측정하였다.

[104]

[105] 식물의 준비

[106] 동신대학교(나주, 대한민국) 임순호 교수님으로부터 사철쭉(*Astemisia capillaris* Thunberg)의 잎 및 줄기를 확보하였다.

[107]

[108] 시약의 준비

[109] IBMX, 포스콜린(forskolin), 페닐티오우레아(PTU), NaOH, DMSO(dimethyl sulfoxide), L-DOPA(3,4-dihydroxyphenylalanine), 카페인 분말, 스타우로스포르린(staurosporine), CellLytic™ 버퍼 및 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 Sigma(St Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 이소프락시딘(isofraxidin)은 ChemFacesBiochemical(Hubei, China)로부터 구입하였다.

[110]

[111] 세포 배양

[112] 무린(murine) 흑색종(melanoma) B16-F10 세포를 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)로부터 얻었다. 이를 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신 혼합(Gibco, USA)으로 보충된 DMEM 배지에서 배양하였다. 배양된 세포는 5% CO₂ 배양기에서 37°C 및 가습 조건 하에서 유지시켰다.

[113]

[114] B16-F10 멜라닌 세포에서 멜라닌 함량의 측정

[115] 멜라닌 세포를 6-웰 플레이트에 2 X 10⁵ cells/well의 밀도로 접종하고, 24시간 뒤에 화합물로 48시간 동안 처리하였다. 멜라닌 세포를 인산 완충 생리 식염수(PBS)로 세척하고 4°C에서 CellLytic 버퍼로 용해시켰다. 세포 추출물은 4°C에서 13,000rpm으로 10분 동안 회전시켰다. 남겨진 펠렛은 멜라닌 분석을 위하여 에탄올:에테르(1:1)로 2번 세척하였고, 80°C에서 10% DMSO에서 1N NaOH 200 μ l에 용해시켰다. 이후 얻어진 용액의 100 μ l 앨리쿼트(aliquot)에 대하여 마이크로플레이트 리더(VersaMax™; Molecular Devices Corporation, California, USA)를 이용하여 400nm에서 흡광도를 측정하였다.

[116]

[117] 배양 배지로 분비된 멜라닌의 측정

[118] B16-F10 멜라닌 세포를 24-웰 플레이트에 500 μ l 배양 배지를 이용하여 5 X 10⁴ cells/well의 밀도로 접종하였다. 24시간 후 배양 배지를 보충하고 세포를 화합물로 60시간 동안 처리하였다. 배양 배지를 회수하여 멜라닌의 수준을 마이크로플레이트 리더(VersaMax™; Molecular Devices Corporation, California, USA)를 이용하여 475nm에서 흡광도를 측정하였다.

[119]

[120] 멜라닌 세포에서 티로시네이즈 활성의 측정

[121] B16-F10 멜라닌 세포를 6-웰 플레이트에 2×10^5 cells/well의 밀도로 접종하였다. 24시간 후 멜라닌 세포에 화합물을 48시간 동안 처리하였다. 세포를 PBS로 세척하고 4°C에서 CellLytic 버퍼로 용해시켰다. 세포 추출물은 4°C에서 13,000rpm으로 10분 동안 회전시켰다. 단백질 농도는 브래드포드 어쎬이(Bradford assay)를 이용하여 조정되었고, 40 μ g 단백질을 포함하는 100 μ l 세포 용해물은 96-웰 플레이트로 이송시켰다. 이후, 5mM L-DOPA 100 μ l를 첨가한 뒤 37°C에서 60분 동안 배양하였다. 마이크로플레이트 리더를 이용하여 475nm에서 도파크롬(dopachrome) 형성을 측정하였다.

[122]

[123] 버섯형 티로시네이즈(mushroom tyrosinase) 분석

[124] 버섯형 티로시네이즈 효소를 50mM 포타슘 인산염 버퍼(pH 6.5)에 500units/ml의 농도로 용해시켰다. 50mM 포타슘 인산염의 550 μ l 및 티로시네이즈 용액 50 μ l를 마이크로튜브 튜브에 적절한 부피로 혼합시킨 뒤, 상온에서 5분 동안 배양하였다. 1.5mM L-티로신 100 μ l를 용액에 첨가한 뒤 96-웰 플레이트에 로딩하였다. 마이크로플레이트 리더를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하여 반응 혼합물에서 생성된 도파크롬의 양을 결정하였다.

[125]

[126] 사철쭉(A. cappilaris Thunberg) 추출물의 HPLC-기반 활성 프로파일링

[127] 사철쭉 잎 및 줄기의 건조 분말을 100% 메탄올로 추출한 뒤 메탄올 추출물(6g)을 생산하기 위하여 진공에서 농축하였다. Agilent HP1100 시리즈에서 YMC-PAC Pro C18(10mm, 250mm, 5 μ m) 컬럼을 이용하여 MeCN 및 0.1% HCOOH를 포함하는 H₂O 농도 구배 시스템에서 HPLC를 수행하였다. 단, 상기 Agilent HP1100 시리즈는 디개서(degasser), 2차 믹싱 펌프(binary mixing pump), 컬럼 오븐(column oven) 및 DAD 감지기로 구성된다. 활성 프로파일링을 위하여 MeOH 추출물의 일부(6g)를 반제조용 HPLC(Agilent 1100 Series, USA)에서, 0.1% HCOOH/20% MeCN을 포함하는 80% H₂O로 시작하여 0.1% HCOOH/60% MeCN을 포함하는 40% H₂O의 구배로 50분 동안 분별시켰다. 이동상은 6.0ml/min의 유동 속도로 이동하였고, 용출액은 280nm에서 탐지하였다. 총 23 분획물을 획득하였고, 각 분획물 별 멜라닌 세포에서 색소 침착에 대한 생물학적 활성을 평가하였다. 그 결과 ACMF09 분획물을 선택하여, 추가적인 분리를 위하여 RP-18 컬럼에서 H₂O-MeOH가 60:40(v:v)으로 시작한 구배 하에서 분리시켜 50분 동안 일정하게 유지시켰다. 구배 시스템은 이후 0:100으로 감소하였고, 정제된 화합물(2mg)을 얻기 위하여 20분 동안 일정하게 유지시켰다.

[128]

[129] 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드(isofraxidin 7-O-(6'-O-p-coumaroyl)- β -glucopyranoside)의 H-NMR 결과

[130] 상기 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드는 갈색

무정형 분말로, UV, IR, ^1H 및 ^{13}C NMR 데이터는 다음과 같고, 특히 ^1H 및 ^{13}C NMR 데이터는 하기 표 1에 나타내었다(600MHz, 메탄올- d_4): UV λ_{max} (H_2O) ($\log \epsilon$) 300, 304, 322 nm; IR (KBr) λ_{max} : 3500, 1675, 1011 cm^{-1} ; ^1H NMR (in CD_3OD , 600 MHz) δ 7.64 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 7.37 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7''), 7.32 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2''/H-6''), 6.90 (1H, s, H-5), 6.80 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3''/H-5''), 6.16 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 6.10 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8''), 5.20 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 4.39 (1H, dd, $J = 11.4, 7.2$ Hz, H-6'), 4.34 (1H, dd, $J = 11.4, 2.0$ Hz, H-6'), 3.99 (3H, s, 8-OMe), 3.88 (3H, s, 6-OMe), 3.55 (1H, dd, $J = 9.0, 7.5$ Hz, H-2'), 3.50 (1H, m, H-5'), 3.47 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-3'), 3.40 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-4'); ^{13}C NMR (in CD_3OD , 125 MHz) δ 168.7 (C-9), 162.7 (C-2), 161.5 (C-4''), 151.8 (C-6), 146.5 (C-7''), 145.7 (C-4), 144.0 (C-8a), 143.1 (C-7), 142.7 (C-8), 131.3 (C-2''/C-6''), 127.1 (C-1''), 117.1 (C-3''/C-5''), 116.9 (C-4a), 115.7 (C-3), 114.9 (C-8''), 105.9 (C-5), 103.9 (C-1'), 77.9 (C-3'), 75.9 (C-5'), 75.7 (C-2'), 72.2 (C-4'), 64.4 (C-6'), 62.5 (8-OMe), 57.2 (6-OMe); HRESI-MS m/z 529.1346 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$).

[131]

[132] [표 1]

Position	δ_H (J in Hz)	δ_C	HMBC ^a
2	-	162.7	
3	6.16 1H, d (9.6)	115.7	C-2, 4a
4	7.64 1H, d (9.6)	145.7	C-2, 5
4a	-	116.9	
5	6.90 1H, s	105.9	C-4, 6, 7, 8a
6	-	151.8	
7	-	143.1	
8	-	142.7	
8a	-	144.0	
1'	5.20 1H, d (7.5)	103.9	C-7
2'	3.55 1H, dd (7.5, 9.0)	75.7	C-1', 3',
3'	3.47 1H, t (9.0)	77.9	C-2', 4'
4'	3.40 (1H, t, 9.0)	72.2	C-3', 5'
5'	3.50 1H, m	75.9	C-4'
6'	4.39 1H, dd (11.4, 7.2)4.34 1H, dd (11.4, 2.0)	64.4	C-4', 5'
1	-	127.1	
2/6	7.32 2H, d (8.7)	131.3	C-4
3/5	6.80 2H, d (8.7)	117.1	C-1, 4
4	-	161.5	
7	7.37 1H, d (15.9)	146.5	C-1, 2/6, 9
8	6.10 1H, d (15.9)	114.9	C-7, 9
9	-	168.7	
6-OMe	3.88 3H, s	57.2	C-6
8-OMe	3.99 3H, s	62.5	C-8

[133]

[134]

[135] 정량적 실시간 PCR 분석(Quantitative Real-Time PCR analysis)

[136] B16-F10 멜라닌 세포에 이소프락시딘(isofraxidin), 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p

-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드 및 IBMX로 48시간 동안 처리하였다. TRI-Solution™을 이용하여 총 RNA를 추출한 뒤 NanoDrop 2000 분광광도계(NanoDrop Technologies)를 이용하여 정량화하였다. AccuPower PCR 프리믹스(Bioneer)를 이용하여 1 μ g RNA로부터 cDNA를 합성하였다. Power SYBT Green PCR 마스터 믹스(Applied Biosystems)를 이용하여 MITF 유전자, 티로시네이즈 유전자 및 TRP-1의 mRNA 발현량을 측정하였다. mRNA 수준은 β -액틴으로 정규화하였고, 배수 변화(fold change)는 $\Delta\Delta CT$ 방법을 이용하여 계산하였다. 프라이머 서열은 다음과 같다: 마우스 티로시네이즈 정방향 5'-TACTTGGAACAAGCCAGTCGTATC-3', 역방향 5'-ATAGCCTACTGCTAAGCC CAGAGA-3'; 마우스 TRP-1 정방향 5'-AAACCCATTTGTCTCCCAA-TGA-3', 역방향 5'-CGTTTTCACGCG-GAAGGT A-3'; 마우스 MITF 정방향 5'-GGACTTTCCTTATCCCATCCA-3', 역방향 5'-GCCGAGGTTGTTGGTAAAG-GT-3'. PCR 수행 조건은 95°C에서 2분간 수행 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 1분 및 72°C에서 1분으로 40 사이클을 수행하고, 72°C에서 마지막 30초 확장(extension)하는 반응을 수행하였다. 데이터는 Stepone™ 소프트웨어 v2.3(Applied Biosystems)를 이용하여 분석하였다.

[137]

[138] 세포 생존율을 위한 MTT 분석

[139] B16-F10 멜라닌 세포를 96-웰 플레이트에 5 X 10³cells/well의 농도로 12시간 동안 접종하였다. 세포에 사출숙 추출물 또는 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드를 48시간 동안 처리하였다. 이후, MTT 분석법을 이용해 세포의 생존율을 평가하였다.

[140]

[141] 제브라피쉬의 유지

[142] 성인 제브라피쉬(*Danio rerio*)를 일반 상점(롯데마트, 대한민국)에서 구매하였다. 5L 아크릴 탱크 각각에 10~15마리의 제브라피쉬를 가두고 하기 조건을 유지하였다: 28.5°C, 14/10시간의 낮/밤 주기. 하루에 2번씩 7일 동안 제브라피쉬에게 먹이로 살아있는 브라인 쉬림프(brine shrimp)(*Artemia salina*)를 공급하였다. 아침 9시 30분에 빛으로 주기를 바꾸어 주어 유도한 자연적 산란으로부터 배아(embryos)를 얻었다. 배아의 확보는 30분 이내에 이루어졌다.

[143]

[144] 제브라피쉬를 이용한 테스트 화합물의 표현형 기반 평가(phenotype-based evaluation)

[145] 제브라피쉬의 배아를 100m²의 패트리디쉬 당 70~80 배아의 밀도로 하여 패트리디쉬의 배아 배지에 유지하였다. 동시 발생된 배아를 회수하여 파이펫을 이용해 96-웰 플레이트의 각 웰당 3개의 배아를 분배하였다. 단, 상기 웰마다 5mM NaCl, 0.17mM KCl, 0.33mM CaCl₂H₂O, 0.33mM MgSO₄7H₂O를 포함하는

배아 배지 200 μ l를 웰에 주입하였다. 사철쭉 추출물 또는 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드를 0.1% DMSO에 용해시킨 뒤 배아 배지에 9 내지 72hpf의 양으로 첨가하였다(63 시간 노출). 테스트 화합물의 고른 분포를 위하여 때때로 저어주고, 24시간 마다 배지를 교체하였다. 모든 실험에서 투명한 제브라피쉬를 형성하기 위하여 75 μ M PTU를 사용하였다. 몸 색소의 표현형 기반 평가는 72hpf에서 수행하였다. 겸자(forcep)를 이용하여 배아의 장막을 제거하고, 트리카인 메탄설포네이트 용액을 이용하여 마취시킨 뒤, 3% 메틸 셀룰로오스에 고정시켰다. 스테레오마이크로스코피(LEICA DFC425C)를 이용하여 제브라피쉬의 색소화에 대한 효과를 관찰하였다. Image J 프로그램(National Institutes of Health, USA)를 이용하여 멜라닌 색소 지역을 측정하였다.

[146]

[147] 제브라피쉬에서 멜라닌 함량 및 티로시네이즈 활성 평가

[148] 대략 40마리의 제브라피쉬 배아에 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드를 9 내지 48hpf로 처리한 뒤 CellLytic 버퍼를 이용하여 초음파 처리를 하였다(pulse on: 10 s, pulse off: 5 s, 8 min in 150 μ L buffer). 용해물을 13,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하고 단백질은 브래드포드 어쎬이(Bradford assay)를 이용하여 정량화하였다. 총 단백질 250 μ g을 포함하는 용해 버퍼 100 μ l를 96-웰 플레이트로 이송시킨 뒤 5mM의 L-3,4-디하이드록시페닐알라닌(L-DOPA) 100 μ l를 첨가하였다. 대조군 웰에는 100 μ l 용해 버퍼 및 100 μ l 5mM L-DOPA를 포함하였다. 37°C에서 60분 동안 배양시킨 후 마이크로플레이트 리더를 이용하여 475nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 흡광 값에서 블랭크(blank)를 제거하고, 최종 활성은 물 대조군에 대한 퍼센티지로 표현하였다. 제브라피쉬에서 멜라닌 함량은 하기 방법을 이용하여 측정하였다. 구체적으로, 단백질 추출물을 티로시네이즈 어쎬이로 동일한 방법론을 이용하여 48hpf에서 준비하였다. 원심분리 후 펠렛을 회수하여 200 μ l 1N NaOH에 10% DMSO와 함께 60분 동안 용해시킨 뒤 볼텍싱하였다. 흡광도는 마이크로플레이트 리더를 이용하여 475nm에서 측정하였다.

[149]

[150] 제브라피쉬의 심박동수 측정

[151] 화합물의 독성을 평가하기 위하여 48hpf에서 심방과 심실의 심박수를 측정하였다. Zeiss Stemi 2000-C 스테레오마이크로스코피를 이용하여 3분 동안 심방과 심실 수축의 횟수를 측정하고 녹화하였다. 그 결과는 분당 평균 심박수로 나타내었다.

[152]

[153] 멜라닌 세포 계수 분석

[154] 멜라닌 세포를 계수하기 위하여, 배아를 실내 전등에 노출시켜 멜라닌 세포 내 멜라닌의 수축을 유도하였다. 배아를 4% 파라포름알데하이드에 고정시킨 뒤 스테레오마이크로스코피를 사용하여 이미지화하였다. 배아의 헤드 영역 내

멜라닌 세포의 수를 측정하였다.

[155]

[156] 통계적 분석

[157] 데이터는 통계적으로 Student's t-test로 평가하였다. $P < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 평가하였다. 모든 데이터는 3번의 독립된 실험에서 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.

[158]

[159] 사철쭉 추출물로부터 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-
-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드의 분리 및 정제

[160] HPLC 결과 얻어진 23 분획물을 B16-F10 멜라닌 세포에 처리하여 티로시네이즈 활성 및 멜라닌 함량을 측정하여 멜라닌 합성을 조절하는 신규 화합물을 발견하였다. 두 분획물, ACMF09 및 ACMF13을 처리한 경우 멜라닌 세포에서 멜라닌 함량 및 티로시네이즈 활성이 현저히 감소하였다. 특히 분획물 ACMF09를 처리한 경우 티로시네이즈 활성이 더욱 감소하였다. 이에 실리카 겔 컬럼 및 역-상 HPLC 컬럼을 이용하여 ACMF09(69.3mg)을 추가로 분별하였다. HPLC 분리에 사용된 선형 구배 용매 조건은 물-메탄올 60:40 $\rightarrow$ 60:40(50분) $\rightarrow$ 0:100(20분)으로 총 70분 동안 6.0ml/min의 유동 속도로 280nm에서 탐지하였다. 그 결과 ACMF09로부터 2가지 종류의 화합물을 획득하였다(2.0mg 및 7.2mg). 7.2mg의 화합물은 티로시네이즈 활성을 감소시키는 4,5-O-디카페올퀸산이었다. 한편, 분획물 ACMF09로부터 준비된 역-상 HPLC를 이용하여 2.0mg 화합물을 정제하였다(도 1(a) 및 1(b)). 도 1(c)는 54.429분의 머무름 시간(retention time)을 유지하여 추출된 화합물의 크로마토그램(chromatogram)을 나타낸 것이다. ESI-MS 탐지기를 사용하여 얻어진 보충 정보에 기반하여 화합물을 정의하였다. 분광 분석(spectroscopic analysis, ^1H NMR)을 이용하여 분리물의 구조를 확인하였다. 도 1(d) 및 1(e)는 정제된 화합물의 IR 및 UV 스펙트럼을 나타낸 것이다. 화합물은 옅은 갈색의 무정형 분말이다. 음성 이온 모드(m/z 529.1346 [M-H] $^-$; calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$)로부터 얻어진 화합물의 HREI-MS 스펙트라를 기반으로 할 때 상기 화합물의 분자식은 $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$ 으로 확인되었다. 화합물은 300, 304 ALC 322nm에서 UV를 흡수하는 것으로 확인되었고, 하이드록시기(3500cm^{-1}) 및 카보닐기(1675cm^{-1})와 일치하는 부분에서 IR 흡수 밴드를 확인할 수 있었다. 화합물의 1D NMR 스펙트라는 쿠마린 모이어티, p-쿠마로일 모이어티, 및 β -글루코피라노스 단위의 신호를 나타내었다. 화합물은 δ_{H} 7.64에서 두 더블릿(doublets)을 보였고, δ_{C} 162.7 (C-2)에서 쿠마린 모이어티에 의한 카보닐 에스터를 보였다. 또한, 두 축의 수소 사이에서 인접한 커플링 상수($J = 9.0$ Hz)와 함께 δ_{H} 3.40 ~ 3.55에서 히드록실 메틴 신호를 포함하는 δ_{H} 5.20 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1') 아노머 신호로부터 하나의 β -글루코피라노스 단위의 존재를 확인할 수 있었다. p-쿠마로일 모이어티의 신호들은 δ_{H} 7.32 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2"/H-6") 및 6.80 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3"/H-5")의 대칭적인 더블릿과, δ_{H} 7.37

(1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7") 및 6.10 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8")에서 트랜스-배열을 보이는 양자 더블렛으로 확인할 수 있었다. δ_c 161.5 (C-4") 및 127.1 (C-1")에서 두 방향족 탄소 신호는 두 대칭적인 더블렛 양자 신호 및 HMBC(hetero nuclear multiple bond connectivity) 스펙트럼에서 p-쿠마로일 모이어티의 트랜스-배열과 함께 양자 더블렛과 연관된 것으로 보였다. 또한, 넓은 범위의 HMBC 상관관계는 아노머 양자(H-1')와 δ_c 143.1 (C-7)에서 산소화된 방향족 탄소 사이, δ_H 3.88 (3H, s) 및 C-6 탄소에서 메톡시 양자 신호와 δ_H 3.99 (3H, s)에서 C-8 방향족 탄소에서 메톡시 양자 사이에서 관찰되었다(도 1(b)). 게다가 δ_H 4.39, 4.43 (H-6') 및 δ_c 64.4 (C-6')에서 하향 이동된 두 산소화된 메틸렌 신호로부터 p-쿠마로일 모이어티의 카보닐 에스터가 글루코스 단위의 C-6'에 부착된 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통하여 ACMF09로부터 2.0mg의 양으로 분리된 화합물이 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드(isofraxidin 7-O-(6'-O-p-coumaroyl)- β -glucopyranoside)임을 알 수 있었다.

[161]

[162] B16-F10 멜라닌 세포에서 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드의 멜라닌 형성 효과

[163] 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드가 멜라닌 형성을 조절하는지 확인하기 위하여, B16-F10 멜라닌 세포에서 상기 화합물과 그 상위 개념의 화합물인 이소프락시딘 (isofraxidin, 7-hydroxy-6,8-dimethoxycoumarin)의 멜라닌 형성 효과를 확인하였다. 멜라닌 억제제인 아젤라산(azelaic acid, AZ)을 대조군으로 사용하였다. B16-F10 멜라닌 세포에 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드(Compound 1)를 처리한 경우 멜라닌 형성이 자극되는 것을 볼 수 있었다(도 2(a) 및 2(b)). 또한, 상기 화합물은 용량의존적으로 멜라닌 형성을 현저히 증가시키는 것을 볼 수 있었다(도 2(c)). 게다가, 멜라닌 세포에서 티로시네이즈 활성 또한 용량 의존적으로 촉진되는 것을 볼 수 있었다(도 2(d)). 뿐만 아니라, 이소프락시딘 또한 B16-F10 세포에서 멜라닌 형성량을 현저히 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(도 2(c) 및 2(d)).

[164] 일반적으로 B16-F10 세포에 멜라닌 화합물을 처리하는 경우 배양 배지로 멜라닌의 분비가 증가하는 것으로 알려져 있었다. 본 실험에서 또한 멜라닌 세포에 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드(Compound 1)을 처리하자 일반적인 색소침착 유도제로 알려진 IBMX와 동등한 수준으로 멜라닌 분비량이 증가한 것을 볼 수 있었고, 그 증가량은 이소프락시딘이나 포스콜린(Forskolin)을 처리한 경우보다 현저히 큰 것을 볼 수 있었다(도 3).

[165]

[166] 멜라닌 세포에서 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드의 MITF 및 티로시네이즈의 발현량의 상향 조절 효과

[167] 멜라닌 형성과 관련된 3가지 조절 유전자로는 소안구 연관 전사 인자(microphthalmia-associated transcription factor, MITF), 티로시네이즈-관련

단백질-1(tyrosinase-related protein-1, TRP-1) 및 티로시네이즈가 있다. B16-F10 멜라닌 세포에 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드를 48시간 동안 처리하자 MITF 및 티로시네이즈의 발현량이 미처리한 경우나 이소프락시딘을 처리한 경우에 비하여 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 4(a) 내지 4(c)).

[168]

[169] 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드의 버섯형 티로시네이즈 활성 증가 효과

[170] 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드이 멜라닌 세포에서 색소 침착을 증가시키는 메커니즘을 확인하기 위하여, 무세포 버섯형 티로시네이즈 어썰이를 사용하였다. 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드를 처리하고 15분 배양시킨 후 티로시네이즈 활성이 현저히 증가하였으나, 이소프락시딘을 처리한 경우 티로시네이즈 활성에 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다(도 5).

[171]

[172] 제브라피쉬 피부 색소침착, 멜라닌 함량 및 티로시네이즈 활성에 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드의 효과

[173] 생체 내(in vivo)에서 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드가 색소 침착에 미치는 효과를 평가하기 위하여, 색소 침착의 신규 조절자를 확인하기에 적절한, 제브라피쉬 유생 모델(zebrafish larvae system)을 사용하였다. 제브라피쉬 시스템을 색소 침착의 생체 내 변화를 확인하기 위한 모델로 사용할 수 있는 지 평가하기 위하여 티로시네이즈 억제제로 알려진 페닐티오우레아(phenylthiourea, PTU)를 사용하였다. 상기 PTU는 용량 의존적으로 멜라닌 형성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 6).

[174]

또한, 본 실험에서 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드가 포유동물에 독성을 유발하는지 확인하기 위하여서도 제브라피쉬 유생 시스템을 이용하였다. 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드의 안전성과 유효 농도를 확인하기 위하여 상기 화합물을 처리한 제브라피쉬 배아에서 독성의 표지자인 치사율과 심장 박동수를 평가하였다. 제브라피쉬 배아에 PTU 75μM과, 이소프락시딘 및 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드 각각을 12.5μM 또는 25μM으로 처리하여도 미처리한 경우와 비교하여 심장 박동수에 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다(도 7). 또한, 9hpf 배아에 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드를 처리한 경우, 미처리한 경우와 동등한 수준으로 90% 이상의 배아가 생존한 것을 볼 수 있었다.

[175]

이러한 독성 데이터를 기반으로 하여, 제브라피쉬에서 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드가 색소 침착에 미치는 효과를 12.5μM 및

25 μ M의 농도로 평가하였다(도 8(a)). 구체적으로, 9hpf 제브라피쉬 배아 40마리에 75 μ M PTU를 처리하거나, 이소프락시딘 또는 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드 각각을 12.5 μ M 또는 25 μ M의 농도로 처리하였다. 그 결과, 이소프락시딘 및 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드를 처리한 경우 멜라닌 형성량이 증가하였고, 특히 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드를 처리한 경우 이소프락시딘을 처리한 경우보다 증가량이 더 높은 것을 볼 수 있었다(도 8(a) 및 8(b)).

- [176] 한편, 상기한 화합물들을 처리한 제브라피쉬 유생에서 티로시네이즈 활성 또한 평가하였다. 그 결과, 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드를 12.5 μ M 및 25 μ M의 농도로 처리한 경우 이소프락시딘 또는 PTU를 처리한 경우보다 티로시네이즈 활성이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 8(c)).

[177]

- [178] 제브라피쉬 멜라닌 세포의 색소 침착에 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드이 미치는 효과

- [179] 멜라닌 세포의 색소 침착에 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드이 미치는 효과를 확인하기 위하여, 상기 화합물을 처리하거나 미처리한 제브라피쉬 피부에서 멜라닌 세포의 형성(development)을 측정하였다. 제브라피쉬의 멜라닌 세포는 대략 25hpf에서 멜라닌 싹세포로부터 발전되고, 60hpf에서 유생 색소 패턴이 형성된다. 제브라피쉬 배아에 이소프락시딘 또는 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드를 처리하자 미처리한 대조군에 비하여 멜라닌 세포의 수가 증가한 것을 볼 수 있었고(도 9(a)), 멜라닌 세포 면적 또한 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 9(b)).

[180]

- [181] 실시예 2

- [182] 실시예 2는 사철쭉 추출물의 멜라닌 형성 억제 활성을 알아보기 위하여 실시하였다.

[183]

- [184] 시약의 준비

- [185] PTU, NaOH, DMSO(dimethyl sulfoxide), L-DOPA(3,4-dihydroxyphenylalanine), CellLytic™ 버퍼, 버섯 티로시나제, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 및 트리카인 메탄설포네이트 용액(tricaine methanesulfonate solution)은 Sigma(St Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, L-티로신은 Duchefa Biochemie(Haarlem, Netherland)로부터 구입하였다. 모든 실험 화합물은 DMSO에 용해한 뒤 사용 전까지 -20°C에서 빛으로부터 보호하여 저장하였다. HPLC 그레이트 용액,

아세토니트릴 및 메탄올은 Merck(Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다.

[186]

[187] 식물의 준비

[188] 실시예 1의 식물의 준비와 동일하다.

[189]

[190] 세포 배양

[191] 뮤린(murine) 흑색종(melanoma) B16-F10 세포를 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)로부터 얻었다. 이를 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신 혼합(Gibco, USA)으로 보충된 DMEM 배지에서 배양하였다. 배양된 세포는 5% CO₂ 배양기에서 37°C 및 가습 조건 하에서 유지시켰다.

[192]

[193] B16-F10 멜라닌 세포에서 멜라닌 함량의 측정

[194] 멜라닌 세포를 인산 완충 생리 식염수(PBS)로 세척하고 4°C에서 CellLytic 버퍼로 용해시켰다. 세포 추출물은 4°C에서 13,000rpm으로 10분 동안 회전시켰다. 남겨진 펠렛은 멜라닌 분석을 위하여 에탄올:에테르(1:1)로 2번 세척하였고, 80°C에서 10% DMSO에서 1N NaOH 200 μ l에 용해시켰다. 이후 얻어진 용액의 100 μ l 앨리쿼트(aliquot)에 대하여 마이크로플레이트 리더(VersaMax™; Molecular Devices Corporation, California, USA)를 이용하여 400nm에서 흡광도를 측정하였다.

[195]

[196] 인-비트로 티로시네이즈(tyrosinase) 활성의 측정

[197] B16-F10 멜라닌 세포를 6-웰 플레이트에 2 X 10⁵ cells/well의 밀도로 접종하였다. 멜라닌 세포에 4,5-O-디카페오일퀸산(4,5-O-dicaffeoylquinic acid)을 48시간 동안 처리하였다. 이후, 멜라닌 세포를 용해 버퍼로 용해시킨 뒤 13,000rpm에서 10분 동안 원심 분리하였다. 같은 양의 단백질(250 μ g)을 포함하는 각 용해물을 96-웰 플레이트에 넣은 뒤, 각각의 웰에 5mM L-DOPA 100 μ l를 첨가하였다. 37°C에서 60분 동안 배양시킨 뒤, 마이크로플레이트 리더를 이용하여 475nm에서 도파크롬(dopachrome) 형성을 측정하였다.

[198]

[199] 사철쭉(A. capillaris Thunberg) 추출물의 HPLC-기반 활성 프로파일링

[200] 사철쭉 잎 및 줄기의 건조 분말을 100% 메탄올로 추출한 뒤 메탄올 추출물(6g)을 생산하기 위하여 진공에서 농축하였다. Agilent HP1100 시리즈에서 YMC-PAC Pro C18(10mm, 250mm, 5 μ m) 컬럼을 이용하여 MeCN 및 0.1% HCOOH를 포함하는 H₂O 농도 구배 시스템에서 HPLC를 수행하였다. 단, 상기 Agilent HP1100 시리즈는 디개서(degasser), 2차 믹싱 펌프(binary mixing pump), 컬럼 오븐(column oven) 및 DAD 감지기로 구성된다. 활성 프로파일링을 위하여 MeOG 추출물의 일부(6g)를 반제조용 HPLC(Agilent 1100 Series, USA)에서,

아세트니트릴(MeCN) 및 0.1% 포름산을 포함하는 물로 이루어진 구배 용리 시스템(gradient eluent system)으로, 즉 20% MeCN 부터 60% MeCN을 이용하여 50분 동안 분별시켰다. 이동상은 6.0ml/min의 유동 속도로 이동하였고, 용출액은 280nm에서 탐지하였다. 총 23 분획물을 획득하였고, 농축되어 각 생물학적 활성을 평가하였다. 잠재적인 생활성 화합물을 획득하기 위하여, 멜라닌 합성을 억제하는 기반 하에서 ACMF09 분획을 선택하였다. 이후 추가적인 성분 분리를 위하여 ACMF09 분획을 RP-18 컬럼에서 H₂O-MeOH가 60:40(v:v)으로 시작한 구배 하에서 분리시켜 50분 동안 일정하게 유지시켰다. 구배 시스템은 이후 0:100으로 감소하였고, 정제된 화합물(7.2mg)을 얻기 위하여 20분 동안 일정하게 유지시켰다.

[201]

[202] 4,5-O-디카페오일퀸산의 H-NMR 결과

[203] ¹H-NMR (in CD₃OD, 600MHz) δ 7.59(1H, d, =15.9Hz, H-7' or H-7"), 7.51(1H, d, = 15.9Hz, H-7' or H-7"), 7.02(1H, d, = 1.8Hz, H-2' or H-2"), 7.00 (1H, d, = 1.8Hz, H-2' or H-2"), 6.92 (1H, dd, = 8.1, 1.8Hz, H-6' or H-6"), 6.90(1H, dd, = 8.1, 1.8Hz, H-6' or H-6"), 6.75 (1H, d, = 8.1Hz, H-5' or H-5"), 6.74 (1H, d, = 8.1Hz, H-5' or H-5"), 6.28(1H, d, = 15.9Hz, H-8' or H-8"), 6.19(1H, d, = 15.9Hz, H-8' or H-8"), 5.62(1H, brs, H-5), 5.11(1H, brs, H-4), 4.37(1H, brs, H-3), 2.40(2H, H-6), 1.99(2H, m, H-2); ¹³C-NMR(in CD₃OD, 125MHz) 168.7(C-9' or 9"), 168.4(C-9' or 9"), 149.8(C-4' or 4"), 147.8 (C-7' or 7"), 147.7(C-7' or 7"), 146.9(C-3' or 3"), 146.8(C-3' or 3"), 127.8(C-1' or 1"), 127.7(C-1' or 1"), 123.3(C-6' or 6"), 116.6(C-5' or 5"), 115.3(C-2' or 2"), 115.2(C-2' or 2"), 114.8 (C-8' or 8"), 117.7 (C-8' or 8"), 75.8 (C-1), 75.7 (C-2), 69.8 (C-3), 68.6 (C-5), 39.7 (C-6), 38.5 (C-14); ESI-MS m/z 515.1 [M-H]⁻ (C₂₅H₂₄O₁₂).

[204]

[205] 버섯 티로시네이즈(mushroom tyrosinase) 분석

[206] 버섯 티로시네이즈 효소를 50mM 포타슘 인산염 버퍼(pH 6.5)에 500units/ml의 농도로 용해시켰다. 50mM 포타슘 인산염의 550μl 및 티로시네이즈 용액 50μl를 마이크로튜브 튜브에 적절한 부피로 혼합시킨 뒤, 상온에서 5분 동안 배양하였다. 1.5mM L-티로신 100μl를 용액에 첨가한 뒤 96-웰 플레이트에 로딩하였다. 마이크로플레이트 리더를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하여 반응 혼합물에서 생성된 도파크롬의 양을 결정하였다.

[207]

[208] 정량적 실시간 PCR 분석(Quantitative Real-Time PCR analysis)

[209] B16-F10 멜라닌 세포에 아젤라산(Azelaic acid, AZ) 또는 4,5-O-디카페오일퀸산으로 48시간 동안 처리하였다. TRI-Solution™을 이용하여 총 RNA를 추출한 뒤 NanoDrop 2000 분광 광도계(NanoDrop Technologies)를 이용하여 정량화하였다. AccuPower PCR 프리믹스(Bioneer)를 이용하여 1μg RNA로부터 cDNA를 합성하였다. Power SYBT Green PCR 마스터 믹스(Applied

Biosystems)를 이용하여 MITF 유전자, 티로시네이즈 유전자 및 TRP-1의 mRNA 발현량을 측정하였다. mRNA 수준은 β -액틴으로 정규화하였고, 배수 변화(fold change)는 $\Delta\Delta CT$ 방법을 이용하여 계산하였다. 프라이머 서열은 다음과 같다: 마우스 티로시네이즈 정방향 5'-TACTTGGAACAAGCCAGTCGTATC-3', 역방향 5'-ATAGCCTACTGCTAAGCC CAGAGA-3'; 마우스 TRP-1 정방향 5'-AAACCCATTTGTCTCCCAA-TGA-3', 역방향 5'-CGTTTTCCAACGG-GAAGGT A-3'; 마우스 MITF 정방향 5'-GGACTTTCCCTTATCCCATCCA-3', 역방향 5'-GCCGAGGTTGTTGGTAAAG-GT-3'. PCR 수행 조건은 95°C에서 2분간 수행 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 1분 및 72°C에서 1분으로 40 사이클을 수행하고, 72°C에서 마지막 30초 연장(extension)하는 반응을 수행하였다. 데이터는 SteponeTM 소프트웨어 v2.3(Applied Biosystems)를 이용하여 분석하였다.

[210]

[211] 부모 제브라피쉬의 근원 및 유지(Origin and Maintenance of Parental Zebrafish)

[212] 성인 제브라피쉬를 상업 판매자로부터 구입한 뒤 5L 아크릴 탱크 각각에 10~15마리의 제브라피쉬를 가두고 하기 조건을 유지하였다: 28.5°C, 14/10시간의 낮/밤 주기. 하루에 2번씩 7일 동안 제브라피쉬에게 먹이로 살아있는 브라인 쉬림프(brine shrimp)(Artemia salina)를 공급하였다. 아침 9시 30분에 빛으로 주기를 바꾸어 주어 유도한 자연적 산란으로부터 배아(embryos)를 얻었다. 배아의 확보는 30분 이내에 이루어졌다.

[213]

[214] 제브라피쉬를 이용한 테스트 화합물의 표현형 기반 평가(phenotype-based evaluation)

[215] 제브라피쉬의 배아를 100m²의 패트리디쉬 당 70~80 배아의 밀도로 하여 패트리디쉬의 배아 배지에 유지하였다. 동시 발생된 배아를 회수하여 파이펫을 이용해 96-웰 플레이트의 각 웰당 3개의 배아를 분배하였다. 단, 상기 웰마다 5mM NaCl, 0.17mM KCl, 0.33mM CaCl₂·H₂O, 0.33mM MgSO₄·7H₂O를 포함하는 배아 배지 200 μ l를 웰에 주입하였다. 사철쭉 추출물을 0.1% DMSO에 용해시킨 뒤 배아 배지에 9 내지 72hpf의 양으로 첨가하였다(63 시간 노출). 테스트 화합물의 고른 분포를 위하여 때때로 저어주고, 24시간 마다 배지를 교체하였다. 모든 실험에서 투명한 제브라피쉬를 형성하기 위하여 75 μ M PTU를 사용하였다. 몸 색소의 표현형 기반 평가는 72hpf에서 수행하였다. 겸자(forcep)를 이용하여 배아의 장막을 제거하고, 트리카인 메탄설포네이트 용액을 이용하여 마취시킨 뒤, 3% 메틸 셀룰로오스에 고정시켰다. 스테레오마이크로스코피(LEICA DFC425C)를 이용하여 제브라피쉬의 색소화에 대한 효과를 관찰하였다. Image J 프로그램(National Institutes of Health, USA)를 이용하여 멜라닌 색소 지역을 측정하였다.

[216]

- [217] 제브라피쉬에서 멜라닌 함량 및 티로시네이즈 활성 평가
- [218] 대략 40마리의 제브라피쉬 배아에 PTU, 사철쭉 추출물, ACMF09 분획 또는 4,5-O-디카페오일퀸산을 9 내지 48hpf로 처리한 뒤 CellLytic 버퍼를 이용하여 초음파 처리를 하였다. 멜라닌 수준을 측정하기 위하여 400nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다. 티로시네이즈 활성을 평가하기 위하여, 총 단백질 250 μ g을 포함하는 용해 버퍼 100 μ l를 96-웰 플레이트로 이송시킨 뒤 5mM의 L-3,4-디하이드록시페닐알라닌(L-DOPA) 100 μ l를 첨가하였다. 대조군 웰에는 100 μ l 용해 버퍼 및 100 μ l 5mM L-DOPA를 포함하였다. 37°C에서 60분 동안 배양시킨 후 마이크로플레이트 리더를 이용하여 475nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 흡광 값에서 블랭크(blank)를 제거하고, 최종 활성은 물 대조군에 대한 퍼센티지로 표현하였다. PTU-처리된 배아를 양성 대조군으로 사용하였다.
- [219]
- [220] 멜라닌 세포 계수 분석
- [221] 멜라닌 세포를 계수하기 위하여, 배아를 실내 전등에 노출시켜 멜라닌 세포 내 멜라닌의 수축을 유도하였다. 배아를 4% 파라포름알데하이드에 고정시킨 뒤 스테레오마이크로스코피를 사용하여 이미지화하였다. 배아의 헤드 영역 내 멜라닌 세포의 수를 측정하였다.
- [222]
- [223] 배아 심박수의 측정
- [224] 화합물의 독성을 평가하기 위하여 48hpf에서 심방과 심실의 심박수를 측정하였다. 스테레오마이크로스코피를 이용하여 3분 동안 심방과 심실 수축의 횟수를 측정하고 녹화하였다. 그 결과는 분당 평균 심박수로 나타내었다.
- [225]
- [226] 세포 생존율을 위한 MTT 분석
- [227] B16-F10 멜라닌 세포를 96-웰 플레이트에 5 X 10³cells/well의 농도로 12시간 동안 접종하였다. 세포에 아젤라산, 사철쭉 추출물, ACMF09 분획 또는 4,5-O-디카페오일퀸산을 48시간 동안 처리하였다. 이후, MTT 분석법을 이용해 세포의 생존율을 평가하였다.
- [228]
- [229] 통계적 분석
- [230] 데이터는 통계적으로 Student's t-test로 평가하였다. P<0.05인 경우 통계적으로 유의한 것으로 평가하였다. 모든 데이터는 3번의 독립된 실험에서 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.
- [231]
- [232] 멜라닌 세포 기반 스크리닝 시스템을 이용한 색소 침착의 조절 활성을 위한 사철쭉 스크리닝
- [233] 뮤린의 멜라닌 세포를 사용하여 사철쭉의 멜라닌 형성 조절 활성을 확인하기 위하여 사철쭉의 지상부(aerial parts)의 메탄올 추출물을 스크리닝 하였다.

멜라닌 색소에 사철쭉 추출물을 25 μ g/ml 및 50 μ g/ml의 다른 농도로 48시간 동안 처리하였다. B16-F10 멜라닌 세포에 사철쭉 추출물을 처리하자, 미처리한 세포에 비하여 시각적으로 덜 어둡게 보였다. 이를 통해 세포의 멜라닌 형성이 감소된 것을 알 수 있었다(도 10(a)). 이는 처리된 세포 펠렛의 약하게 색깔있는 조추출물(crude extracts)을 관찰하여 재차 확인할 수 있었다(도 10(b)). 사철쭉 추출물을 50 μ g/ml 및 25 μ g/ml의 농도로 처리하자 미처리한 경우에 비하여 멜라닌 형성률이 91.92 $\pm$ 8.88% 및 85.81 $\pm$ 10.12%로 감소한 것을 볼 수 있었다(도 10(c)). 멜라닌 양 및 티로시네이즈 활성에 사철쭉이 미치는 영향을 평가하기 위하여, 티로시네이즈 억제제로 알려진 아젤라산을 양성 대조군으로 사용하였다. 비록 이전 연구에서 아젤라산이 40mM 및 20mM의 농도에서 유효한 것으로 보고된 바 있지만(Journal of Biomedical Science, vol. 17, supplement 1, article S45, 2010), 상기한 농도로 48시간 동안 처리하는 경우 B16-F10 멜라닌 세포의 50% 이상에 즉각적인 분리가 관찰되었다. 또한, 5mM 아젤라산 처리는 멜라닌 세포에 독성을 부여하지 않고 멜라닌 함량을 15~20% 감소시키는 것을 볼 수 있었다(도 10(a) 내지 10(c)). 그 후에, 사철쭉의 티로시네이즈 억제 활성을 평가한 결과, 사철쭉 추출물을 25 μ g/ml 또는 50 μ g/ml의 농도로 멜라닌 세포에 48시간 동안 처리하였을 때에 비하여 티로시네이즈 활성이 87.82 $\pm$ 0.065% 및 75.68 $\pm$ 0.68%로 감소한 것을 볼 수 있었다(도 10(d)).

[234]

[235] 사철쭉 추출물로부터 항-멜라닌 형성 화합물의 분리

[236] 사철쭉 추출물로부터 멜라닌 형성을 억제하는 화합물을 분리하기 위하여 고성능 액체 크로마토그래피(High performance liquid chromatography, HPLC)를 수행하였다. 활동 안내 분리(activity-guided separation)를 통해 사철쭉 추출물로부터 다양한 무게의 23 분획물(fractions)을 분리하였다. 분획물들을 회수하여 건조시킨 뒤 DMSO에 용해시키고 같은 농도에서 멜라닌 형성 억제 활성을 평가하였다. 4가지 분획물(ACMF09, ACMF13, ACMF14 및 ACMF23)은 모두 멜라닌 형성 억제 활성을 보였다. 이에, 제브라피쉬 배아를 이용하여 이들 4가지 분획물의 색소침착 억제 활성을 확인하였다. ACMF09 분획은 뛰어난 멜라닌 형성 억제 효과를 보여, 포유동물의 멜라닌 세포에서 분석용으로 선별하였다. 멜라닌 세포에서 ACMF09 분획은 색소 침착을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(도 10(a) 및 10(b)). 게다가 상기 ACMF09 분획은 멜라닌 형성과 티로시네이즈 활성을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 10(c) 및 10(d)). 잠재적인 멜라닌 형성 조절 화합물을 분리하기 위하여, ACMF09 분획을 실리카 겔 컬럼 및 역상 HPLC 컬럼에서 분류하였다. HPLC 분리에 적용된 선형 구배 용매 조건은 H₂O-메탄올이고, 60:40으로 시작하였으며, 50분 동안 일정하게 유지되었다. 그후 구배 시스템은 0:100으로 감소되었고, 20분 동안 일정하게 유지되었다. 이동상은 6.0ml/min의 이동 속도로 이송되었고, 용출액은 280nm에서 검출되었다. 그 결과, ¹H-NMR 및 ESI-MS 탐지 분석을 통하여

4,5-O-디카페오일퀸산(4,5-O-dicaffeoylquinic acid, 4,5-diCQA)를 분리하였다(도 11(a) 및 11(b)). 상기 화합물은 노란색의 무정형 파우더로 관찰되었다. 280nm의 UV에서 하나의 점만 관찰되었다. ^1H - 및 ^{13}C -NMR 스펙트라를 통하여 상기 화합물에 두 카페오일 모이어티가 존재함을 알 수 있었다; 6개의 방향족 양성자들 [δ_{H} 7.02 (1H, d, = 1.8Hz, H-2' or H-2''), 7.00 (1H, d, = 1.8Hz, H-2' or H-2''), 6.92 (1H, dd, = 8.1, 1.8Hz, H-6' or H-6''), 6.90 (1H, dd, = 8.1, 1.8Hz, H-6' or H-6''), 6.75 (1H, d, = 8.1Hz, H-5' or H-5''), 6.74 (1H, d, = 8.1Hz, H-5' or H-5'')], 트랜스 더블렛(trans doublets) [δ_{H} 7.59 (1H, d, = 15.9Hz, H-7' or H-7''), 7.51 (1H, d, = 15.9Hz, H-7' or H-7''), 6.28 (1H, d, = 15.9Hz, H-8' or H-8''), 6.19 (1H, d, = 15.9Hz, H-8' or H-8'')], 두개의 카르복실 그룹(δ_{C} 168.7 및 168.4) 및 3개의 하이드록시 그룹(δ_{C} 149.8, 146.9 및 146.8). ^1H - 및 ^{13}C -NMR 스펙트라를 통하여 상기 화합물에 퀸산 모이어티가 존재함을 알 수 있었다; [δ_{H} 5.62 (1H, brs, H-5), 5.11 (1H, brs, H-4), 4.37 (1H, brs, H-3), 2.40 (2H, H-6), 1.99 (2H, m, H-2)]. 화합물의 LC/UV/MS 프로파일을 통하여 328nm, 292nm 및 245nm에서 UV 흡수 밴드와 m/z 515.11에서 ESI-MS[M-H] $^-$ 피크를 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통하여 상기 화합물의 구조가 4,5-O-디카페오일퀸산임을 알 수 있었다(Food Chemistry, vol. 120, no. 1, pp. 134-139, 2010). 포유동물의 멜라닌 세포에서 4,5-O-디카페오일퀸산의 색소 침착에 대한 효과를 확인한 결과, 현미경 검사를 통하여 상기 화합물로 처리한 경우 멜라닌 세포의 색소 침착이 감소된 것을 확인할 수 있었다(도 10(a)). 상기 화합물이 처리된 세포 펠렛은 미처리된 대조군에 비하여 색이 현저히 밝아진 것을 볼 수 있었다(도 10(b)). 정량적 분석 결과, 상기 화합물이 멜라닌 세포에서 멜라닌 수준을 감소시키는 것을 볼 수 있었다(도 10(c)). 또한, 상기 화합물을 멜라닌 세포에 50 μM 로 처리하자 티로시네이즈 활성이 감소된 것을 볼 수 있었다(도 10(d)).

[237]

[238] 무세포(cell-free) 시스템에서 ACMF09 분획 및 4,5-O-디카페오일퀸산의 버섯 티로시네이즈 활성화에 대한 효과

[239] 4,5-O-디카페오일퀸산이 티로시네이즈 효소의 활성을 직접적으로 억제하는지 확인하기 위하여, 무세포 버섯 티로시네이즈 어쎄이를 사용하였다. 그 결과, 4,5-O-디카페오일퀸산이 용량 의존적으로 버섯 티로시네이즈를 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 12). 50 μM 의 농도에 있어서, 4,5-O-디카페오일퀸산을 처리한 경우, 미처리한 경우에 비하여 효소의 활성을 32% 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 양성 대조군(5mM AZ)은 효소 활성을 77% 감소하는 것을 볼 수 있었다.

[240]

[241] MITE, 티로시네이즈 및 TRP-1의 발현에 대한 4,5-O-디카페오일퀸산의 효과

[242] 4,5-O-디카페오일퀸산의 색소 침착 억제 효과의 가능한 메커니즘을 확인하기 위하여, 멜라닌 형성과 관련된 3가지 조절 유전자로, 소안구 연관 전사

인자(microphthalmia-associated transcription factor, MITF), 티로시네이즈-관련 단백질-1(tyrosinase-related protein-1, TRP-1) 및 티로시네이즈의 발현 수준을 정량적 실시간 PCR을 이용하여 확인하였다. 도 4에서 보는 바와 같이, 티로시네이즈의 mRNA 수준은 4,5-O-디카페오일퀸산의 처리 여부와 관계가 없는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, 상기 화합물의 처리로 인하여 TRP-1의 발현이 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다.

[243]

[244] 제브라피쉬 척추동물 모델 시스템에서 사철쭉 추출물, ACMF09 및 4,5-O-디카페오일퀸산의 색소 침착 억제 효과

[245] 제브라피쉬는 색소침착 관련 주목받는 동물 모델이다(Seminars in Cell and Developmental Biology, vol. 20, no.1, pp. 90-104, 2009). 제브라피쉬 유생 기반 인비보 시스템에서 사철쭉 메탄을 추출물과 ACMF09 활성 분획물을 실험하였다. 잘 알려진 색소 침착 억제제로, 1-페닐 2-티오우레아(1-phenyl 2-thiourea, PTU)는 티로시네이즈 활성을 억제하는데, 이를 양성 대조군으로 사용하였다. 하지만, 28 체절 단계(28-somite stage)에서 PTU는 120hpf에서 부화를 늦추고 치명적 영향을 미칠 수 있다. 이에, PTU의 농도를 달리하면서(25, 50, 75, 100 및 200 μ M) 제브라피쉬의 색소침착에 대한 효과를 확인하였다. 그 결과, PTU를 75 μ M의 농도로 처리한 경우 치명성이나 기형 발생의 악영향 없이 제브라피쉬의 색소침착을 감소시키는 것을 볼 수 있었다.

[246] 사철쭉 메탄을 추출물(A.capillaris), ACMF09 분획 및 4,5-O-디카페오일퀸산은 제브라피쉬에서 색소 침착을 억제하는 것을 볼 수 있었다(도 14(a)). 또한, 배아의 머리 부분에서는 멜라닌 세포의 수축으로 탈색소(depigmentation)이 관찰되었다(도 14(a)). 또한, 사철쭉 추출물, ACMF09 분획물 및 4,5-O-디카페오일퀸산은 제브라피쉬 배아에서 용량 의존적으로 멜라닌의 합성을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(도 14(b)). 게다가, 티로시네이즈 활성에 대한 부분적 억제도 확인할 수 있었고(도 14(c)), 이를 통해 제브라피쉬에서 멜라닌의 형성은 세포의 티로시네이즈 활성이 부분적으로 억제됨으로써 감소되는 것을 알 수 있었다.

[247]

[248] 제브라피쉬 유생 머리 부분의 멜라닌 세포 생존에 대한 4,5-O-디카페오일퀸산의 효과

[249] 제브라피쉬 배아에서 멜라닌 세포는 대략 24hpf에서 멜라닌을 형성하기 시작한다. 60hpf에서 색소 침착의 패턴을 형성하는 대략 머리, 몸통, 꼬리 및 난황낭에는 대략 460개의 멜라닌 세포가 존재한다. 전체 배아의 머리 지역에서 멜라닌 세포를 시각화하였다. 9hpf 유생을 25 μ M의 4,5-O-디카페오일퀸산과 함께 배양한 결과, 멜라닌 세포의 수가 미처리한 배아에서보다 감소한 것을 볼 수 있었다(도 15(a)). 4,5-O-디카페오일퀸산 12.5 μ M의 용량에서는 멜라닌 세포의 수에 영향을 미치지 않는 것을 볼 수 있었다. 하지만, 4,5-O-디카페오일퀸산을

처리한 용량 모두에서 멜라닌 세포의 면적이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. 예를 들면, 4,5-O-디카페오일퀸산을 25 μ M의 용량으로 처리한 경우 멜라닌 세포의 면적이 미처리한 배아와 비교하여 4배 감소한 것을 볼 수 있었다(도 15(b)).

[250]

[251] 인-비트로(In-vitro) 및 인-비보(In-vivo)에서 사철쭉 추출물, ACMF09 분획물 및 4,5-O-디카페오일퀸산의 독성 평가

[252] 멜라닌 형성에서 4,5-O-디카페오일퀸산의 효과를 확인하기 위하여, B16-F10 멜라닌 세포에 4,5-O-디카페오일퀸산을 다양한 농도로 처리한 뒤 MTT 어ッセ이를 이용하여 세포 독성을 평가하였다. 도 16에서 보는 바와 같이, 4,5-O-디카페오일퀸산을 처리하여도 미처리 대조군과 비교하였을 때 세포 생존율이 변하지 않은 것을 볼 수 있었다. 이를 통하여 사철쭉 추출물로부터 분리된 화합물, 4,5-O-디카페오일퀸산은 B16-F10 멜라닌 세포에 세포 독성이 없음을 알 수 있었다. 제브라피쉬에서 사철쭉 추출물, ACMF09 분획물 및 4,5-O-디카페오일퀸산의 잠재적 독성을 확인하기 위하여, 24hpf, 48hpf 및 72hpf에서 외형적 기형, 배아 사망률 및 심장박동수 장애를 관찰하였지만, 그 어떠한 외형적 및 생리학적 변화를 관찰할 수 없었다.

[253]

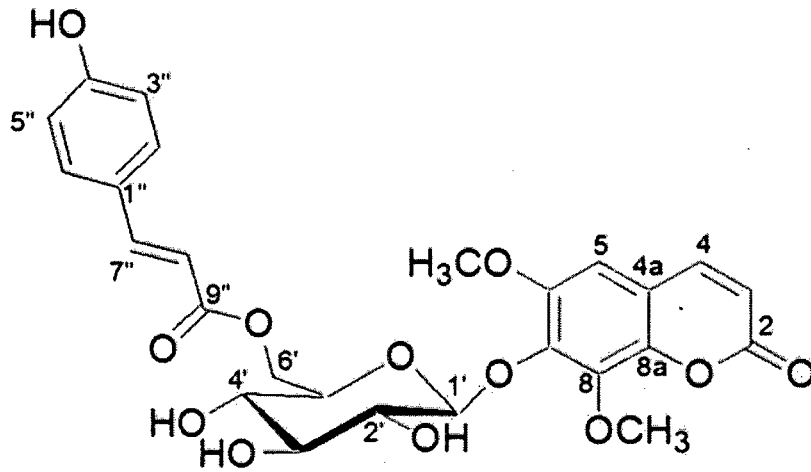
청구범위

- [청구항 1] 사철쭉(*Artemisia capillaris* Thunberg)의 추출물을 유효 성분으로 포함하는, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 사철쭉 추출물은 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드(isofraxidin 7-*O*-(6'-*O*-*p*-coumaroyl)- β -glucopyranoside)를 유효 성분으로 포함하는, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 사철쭉 추출물은 4,5-*O*-디카페오일퀸산(4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid)을 유효 성분으로 포함하는, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 사철쭉은 사철쭉의 잎, 열매, 수피 및 뿌리 중 1종 이상인, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 사철쭉 추출물은 추출 용매를 이용하여 사철쭉으로부터 추출된 것인, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 추출 용매는 물, 에탄올, 메탄올, 부탄올, *n*-헥산, *n*-헵탄 및 DMSO로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 색소 질환은 백반증, 백색증, 탈색소 모반, 백색 비강진, 어루러기, 염증후 탈색증, 반상 경피증, 부분 백피증, 특발성 적상 저색소증 및 점상 백피증으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 저색소 침착에 기인한 색소 질환인, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 사철쭉 추출물은 10 내지 100 μ g/ml의 농도로 포함되는, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 색소 질환은 기미, 주근깨, 노인성 색소반, 잡티, 모반 및 일광흑색증(solar lentigines)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 과다색소침착에 기인한 색소 질환인, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 10] 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드(isofraxidin 7-*O*-(6'-*O*-*p*-coumaroyl)- β -glucopyranoside)를 유효 성분으로 포함하는, 색소

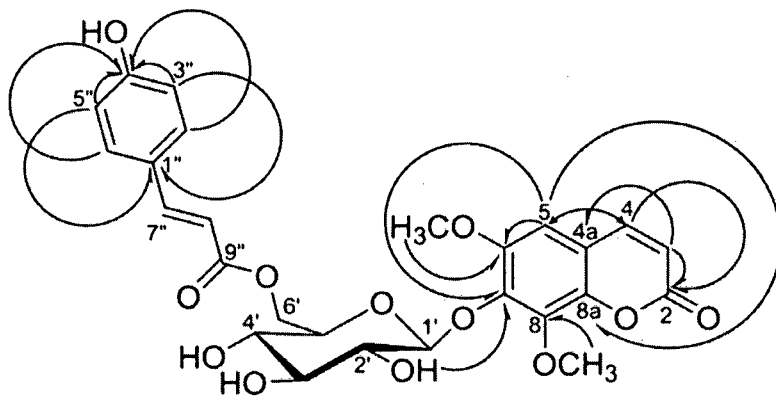
- 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드는 10 내지 100 μ M의 농도로 포함되는, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 12] 제10항에 있어서,
상기 색소 질환은 백반증, 백색증, 탈색소 모반, 백색 비강진, 어루러기, 염증후 탈색증, 반상 경피증, 부분 백피증, 특발성 적상 저색소증 및 점상 백피증으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 저색소 침착에 기인한 색소 질환인, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 13] 4,5-*O*-디카페오일퀸산(4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid)을 유효 성분으로 포함하는, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 4,5-*O*-디카페오일퀸산은 5 내지 100 μ M의 농도로 포함되는, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 색소 질환은 기미, 주근깨, 노인성 색소반, 잡티, 모반 및 일광흑색증(solar lentigines)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 과다색소침착에 기인한 색소 질환인, 색소 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 16] 사철쭉(*Artemisia capillaris* Thunberg)의 추출물을 유효 성분으로 포함하는, 색소 질환의 예방 또는 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 17] 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드(isofraxidin 7-*O*-(6'-*O*-*p*-coumaroyl)- β -glucopyranoside)를 유효 성분으로 포함하는, 색소 질환의 예방 또는 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 18] 4,5-*O*-디카페오일퀸산(4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid)을 유효 성분으로 포함하는, 색소 질환의 예방 또는 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 19] 사철쭉(*Artemisia capillaris* Thunberg)의 추출물을 유효 성분으로 포함하는, 색소 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 20] 이소프락시딘 7-*O*-(6'-*O*-*p*-쿠마로일)- β -글루코피라노사이드(isofraxidin 7-*O*-(6'-*O*-*p*-coumaroyl)- β -glucopyranoside)를 유효 성분으로 포함하는, 색소 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 21] 4,5-*O*-디카페오일퀸산(4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid)을 유효 성분으로 포함하는, 색소 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

【도면】

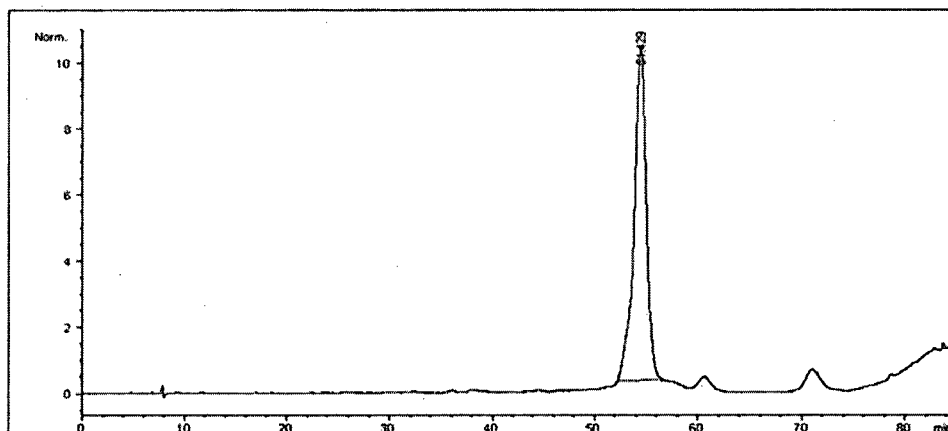
【도 1a】



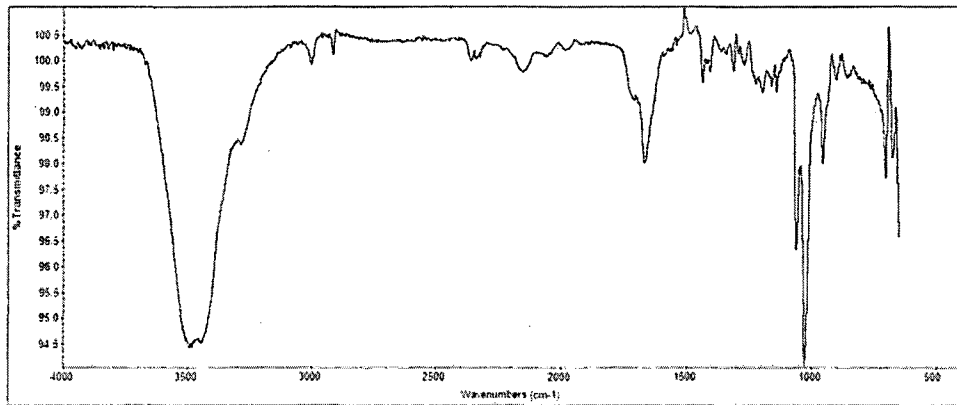
【도 1b】



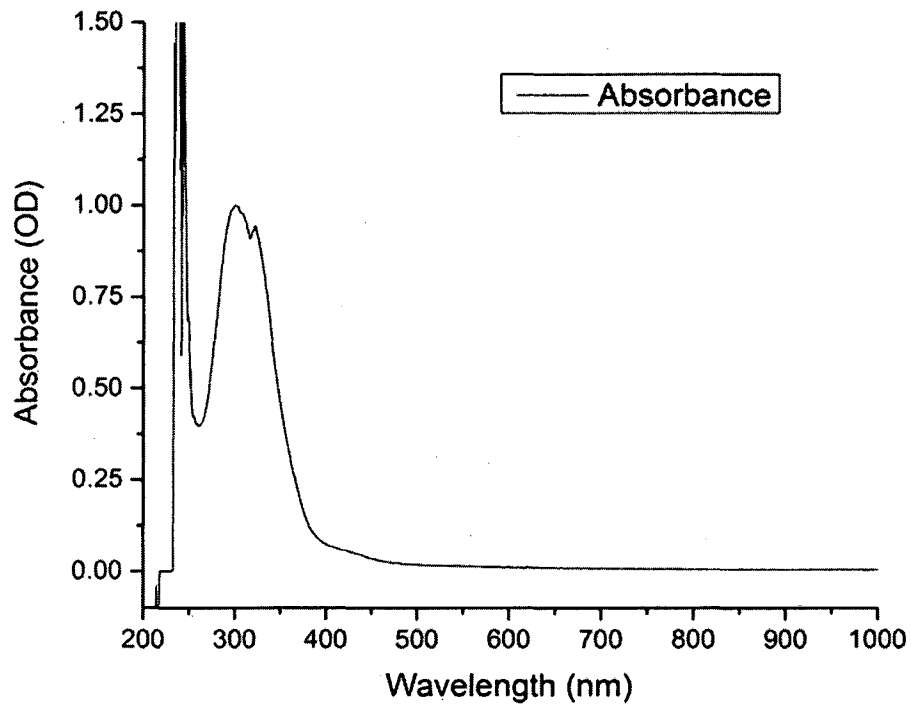
【도 1c】



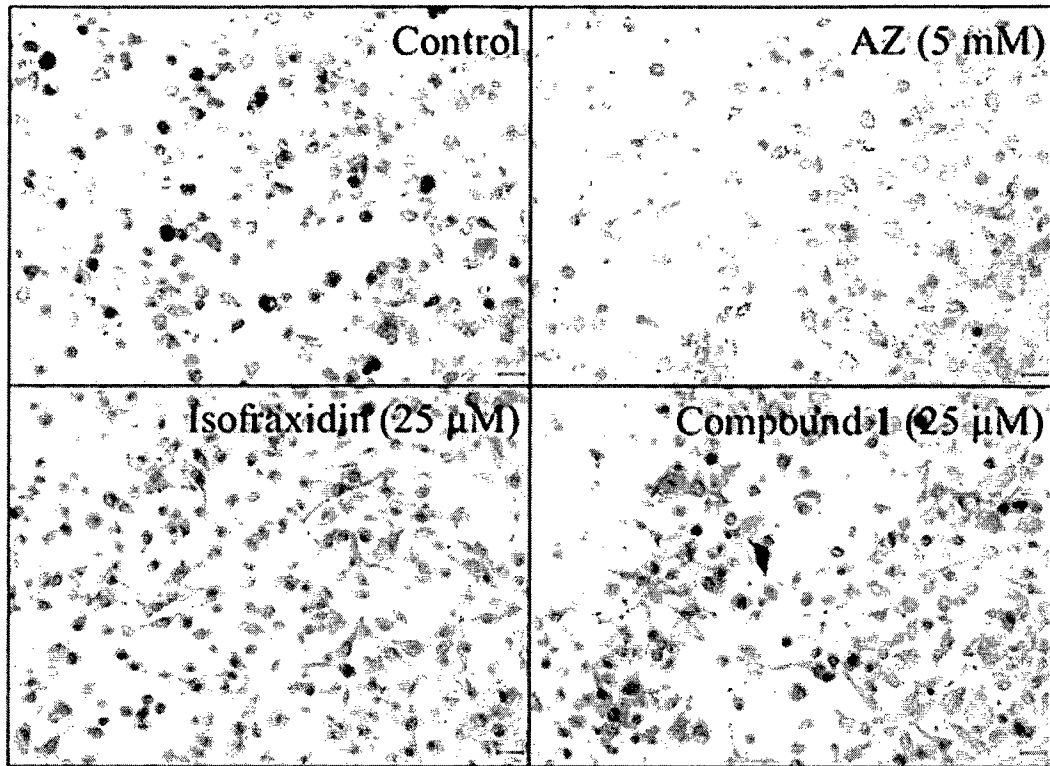
【도 1d】



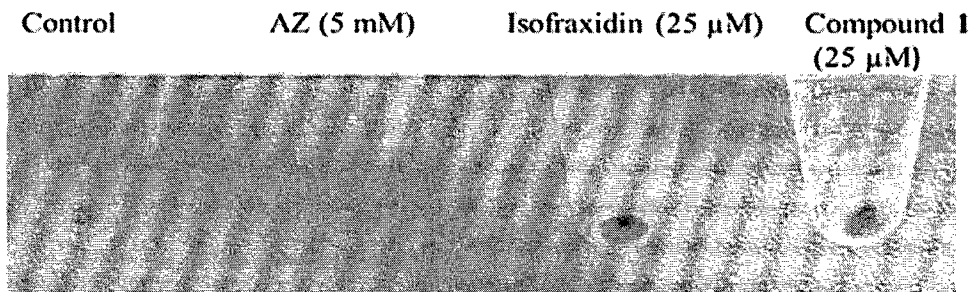
【도 1e】



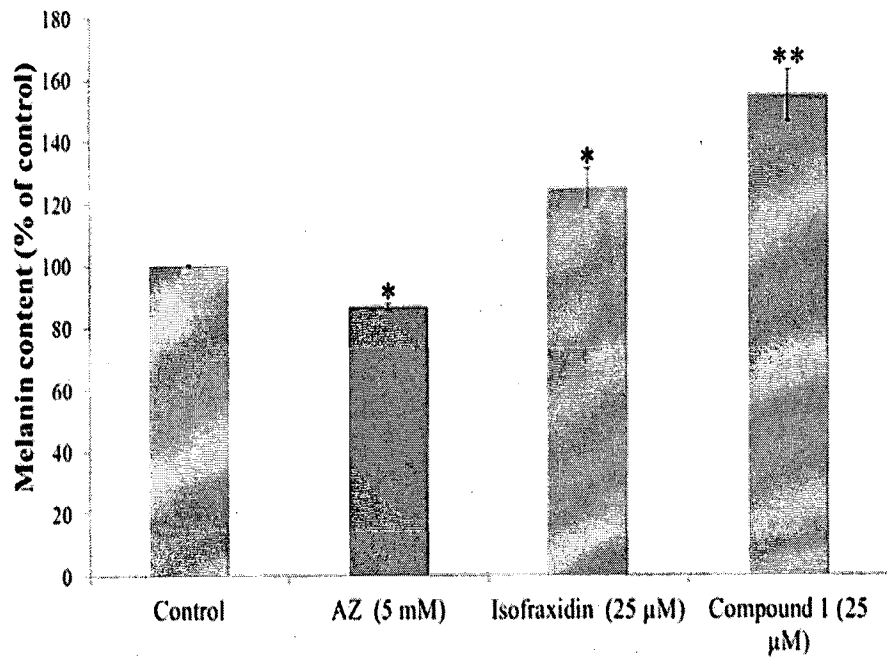
【도 2a】



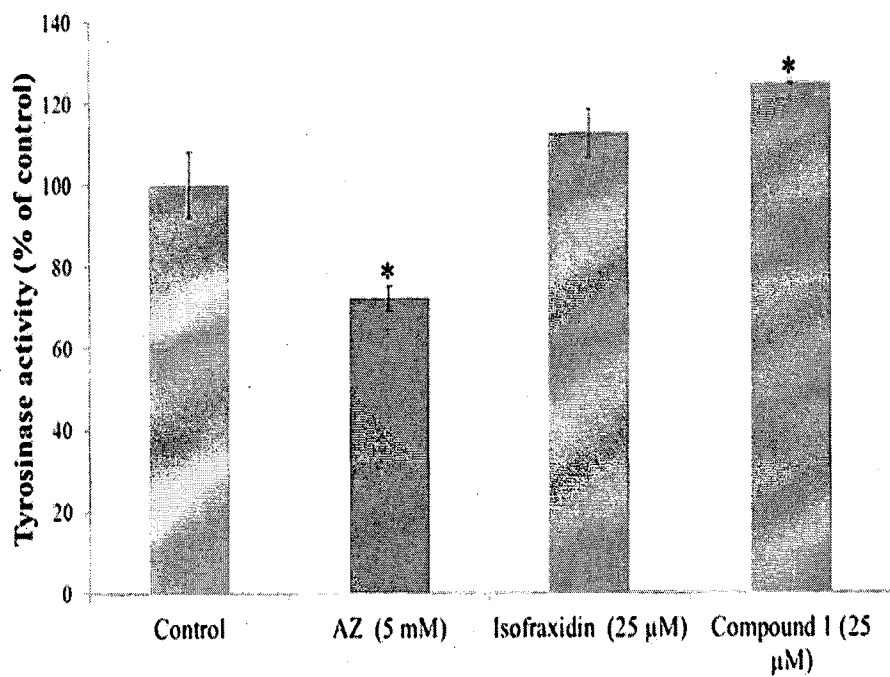
【도 2b】



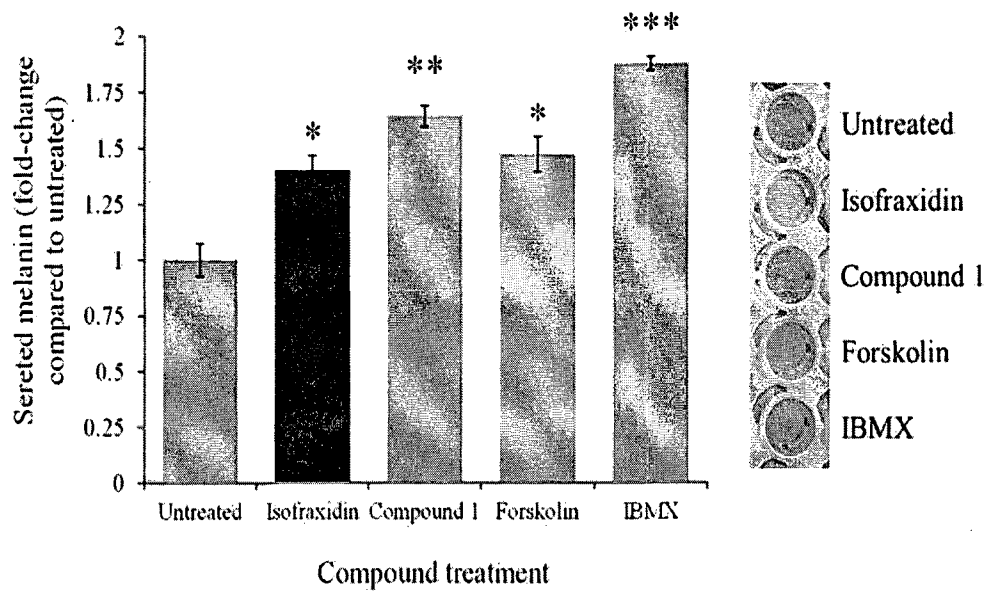
【도 2c】



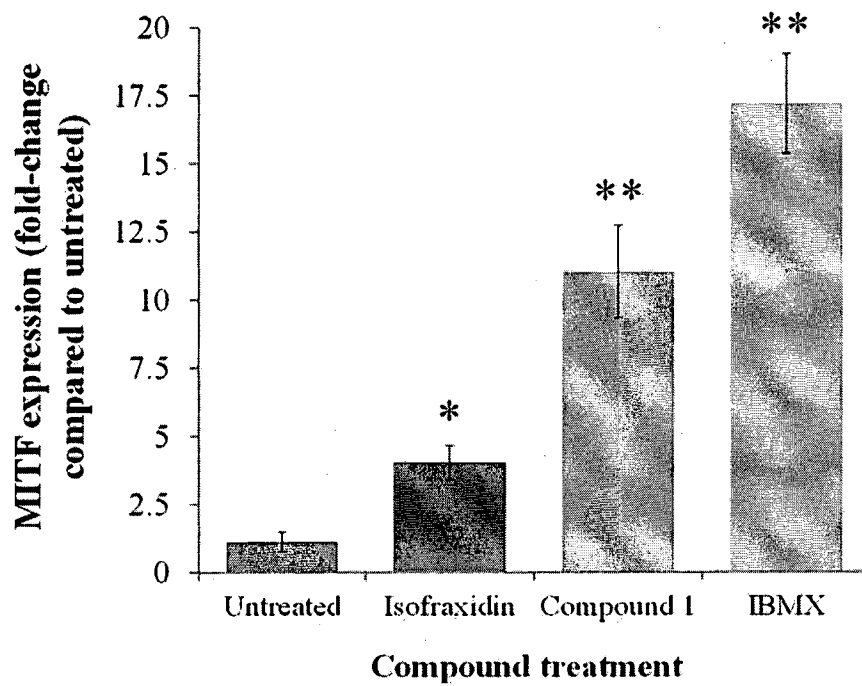
【도 2d】



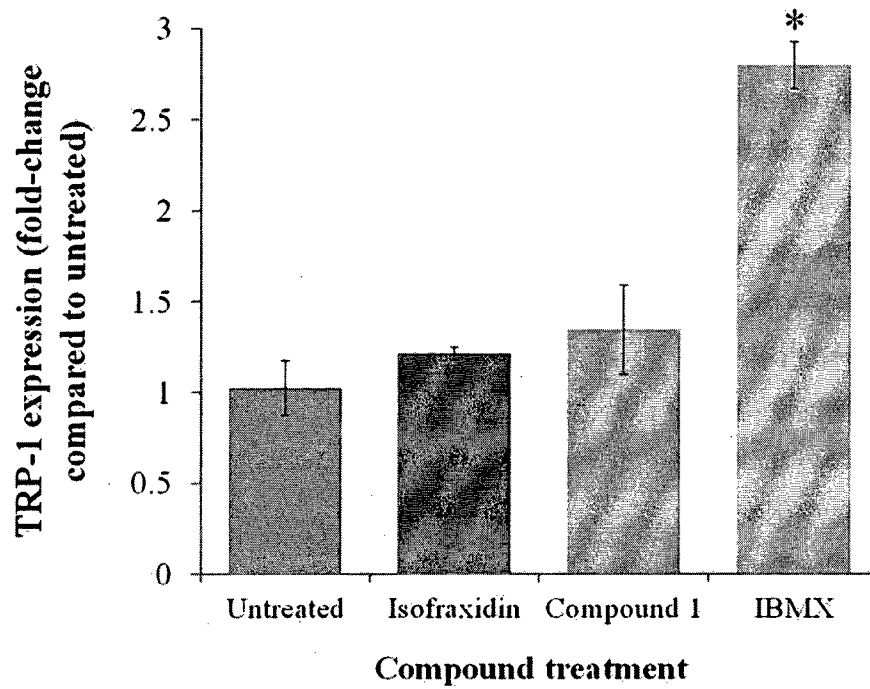
【도 3】



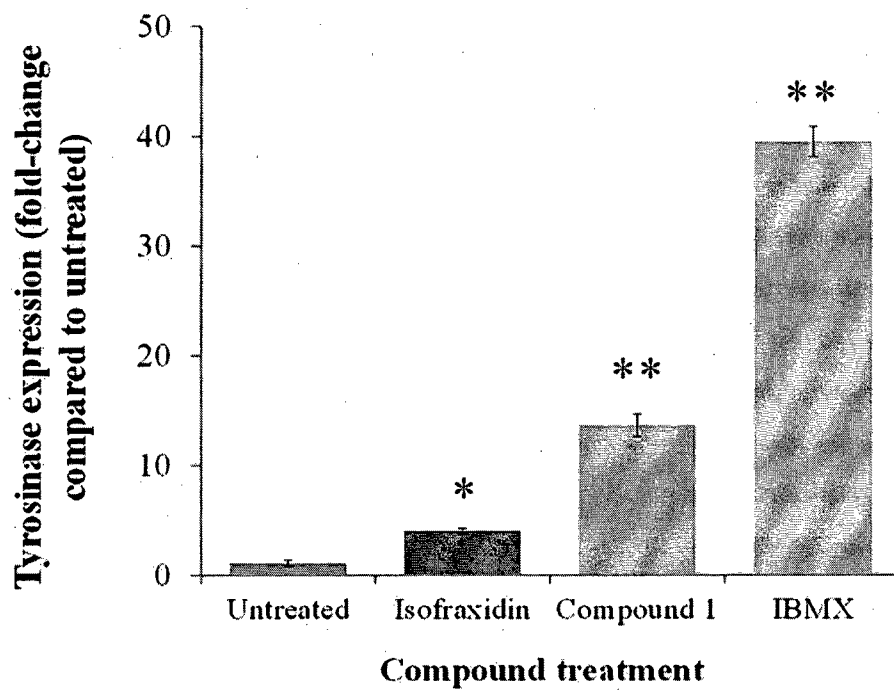
【도 4a】



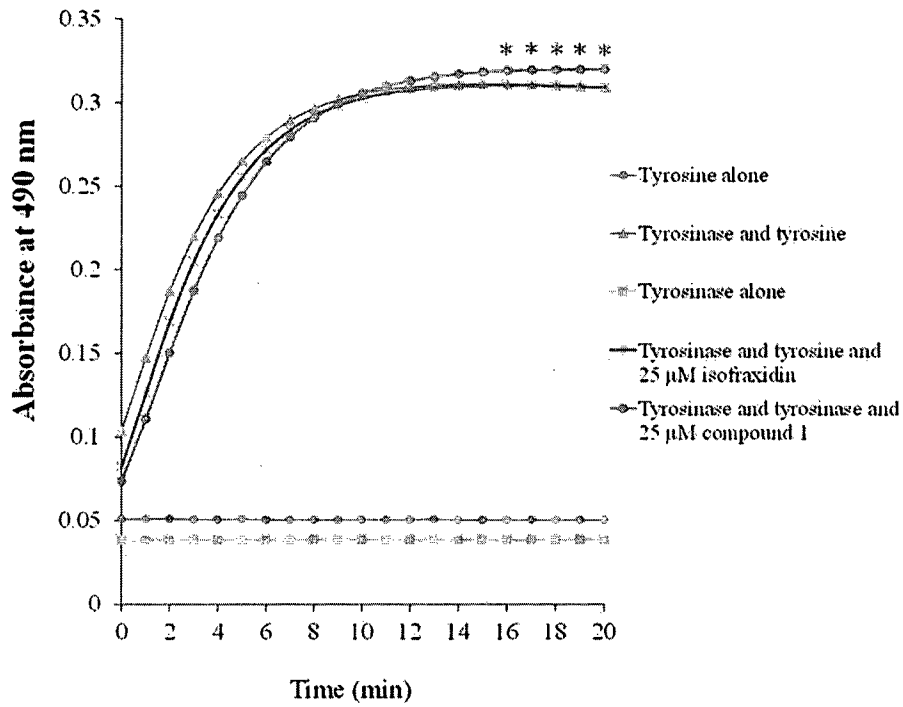
【도 4b】



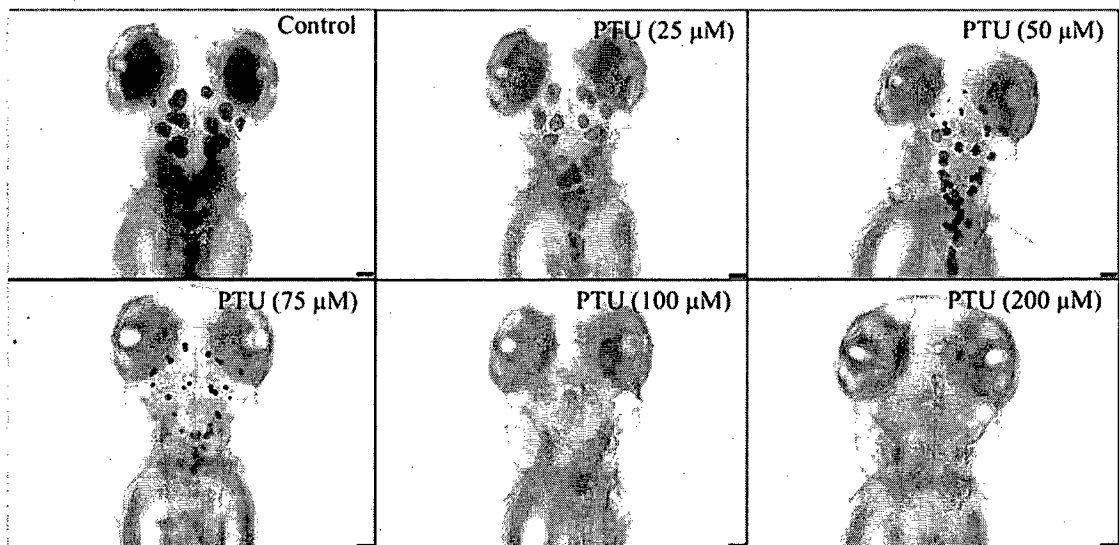
【도 4c】



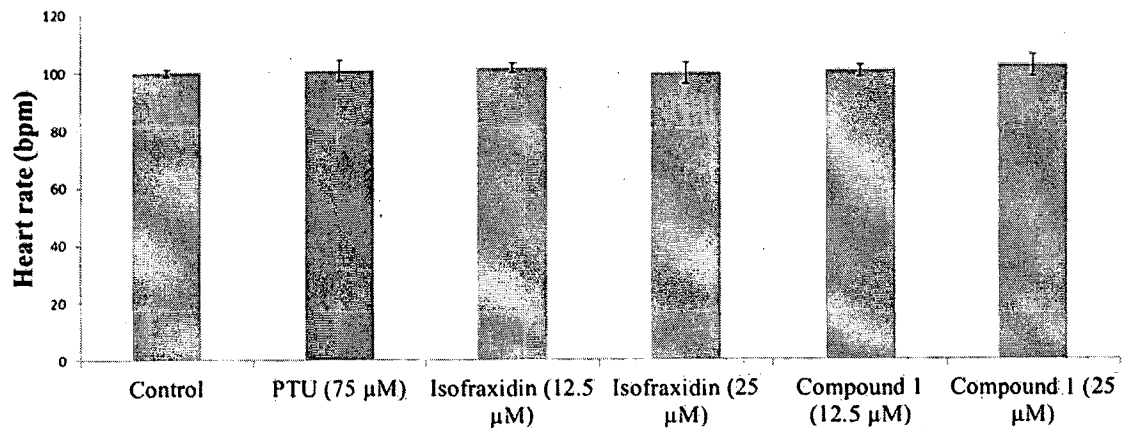
【도 5】



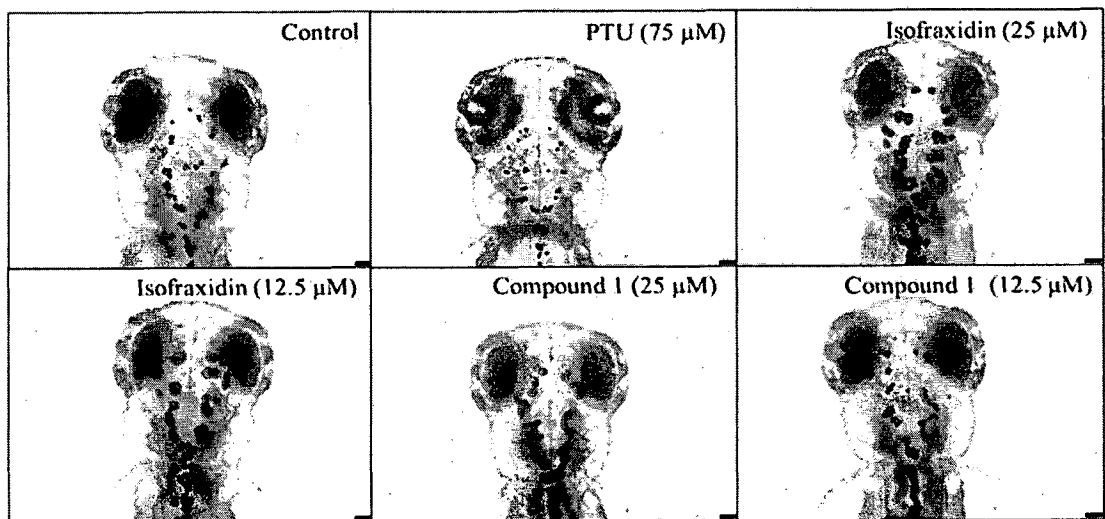
【도 6】



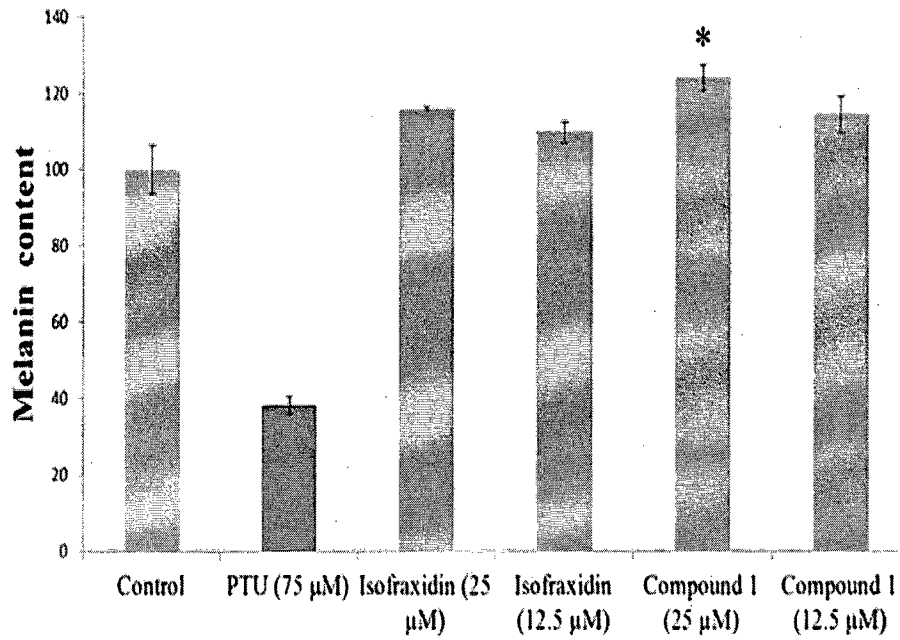
【도 7】



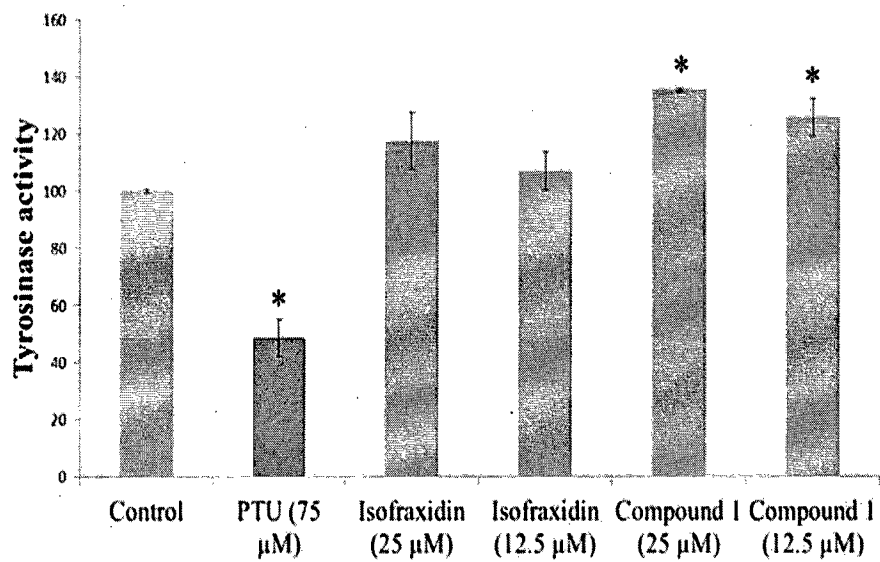
【도 8a】



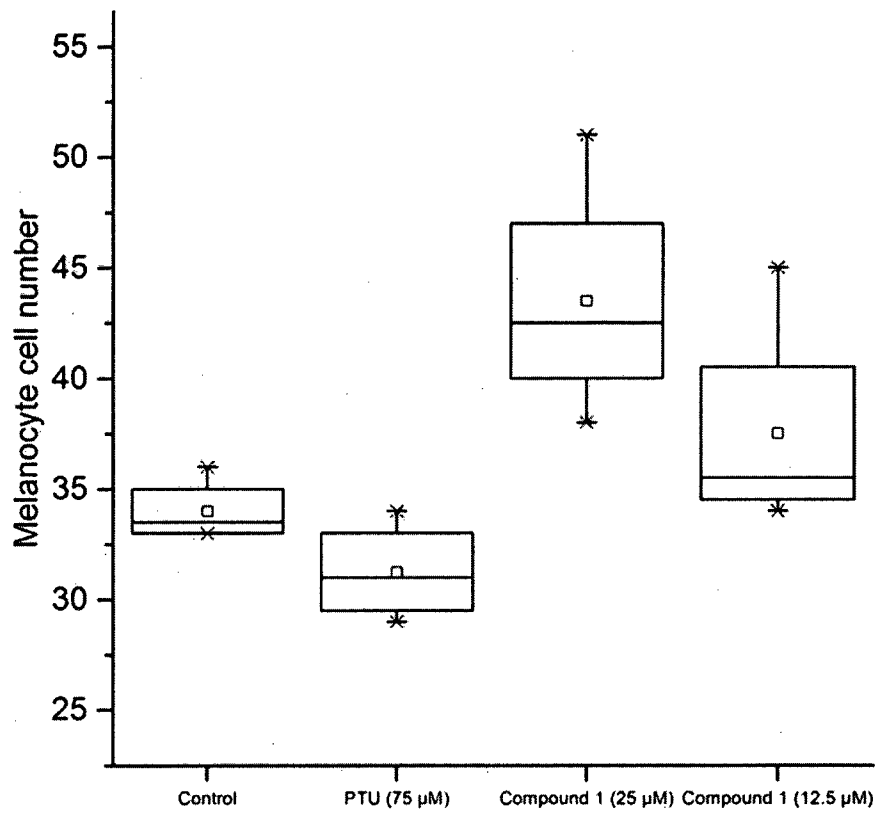
【도 8b】



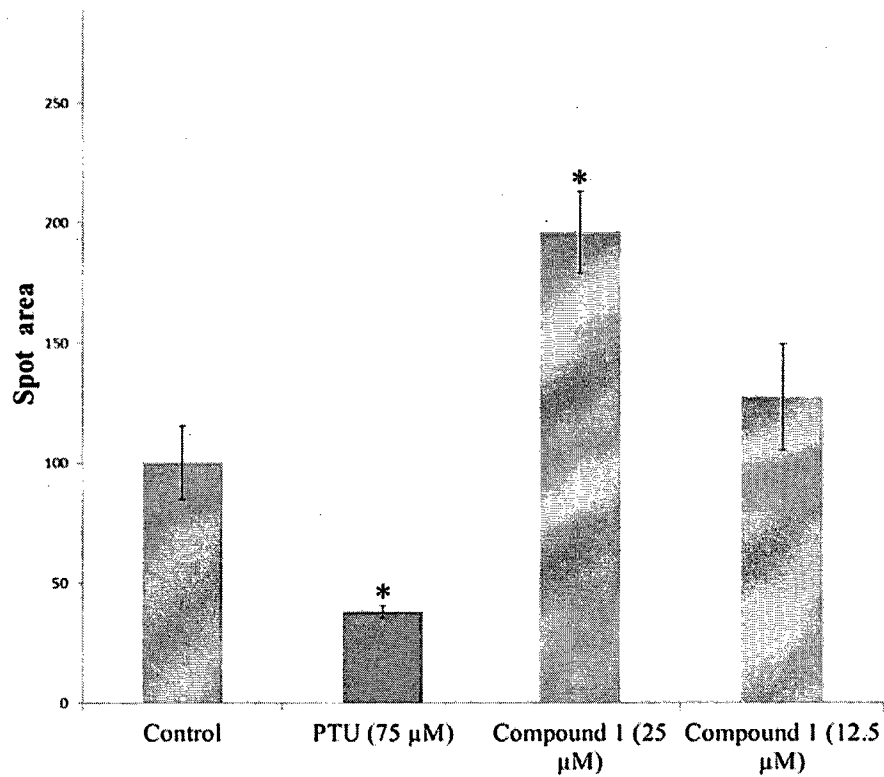
【도 8c】



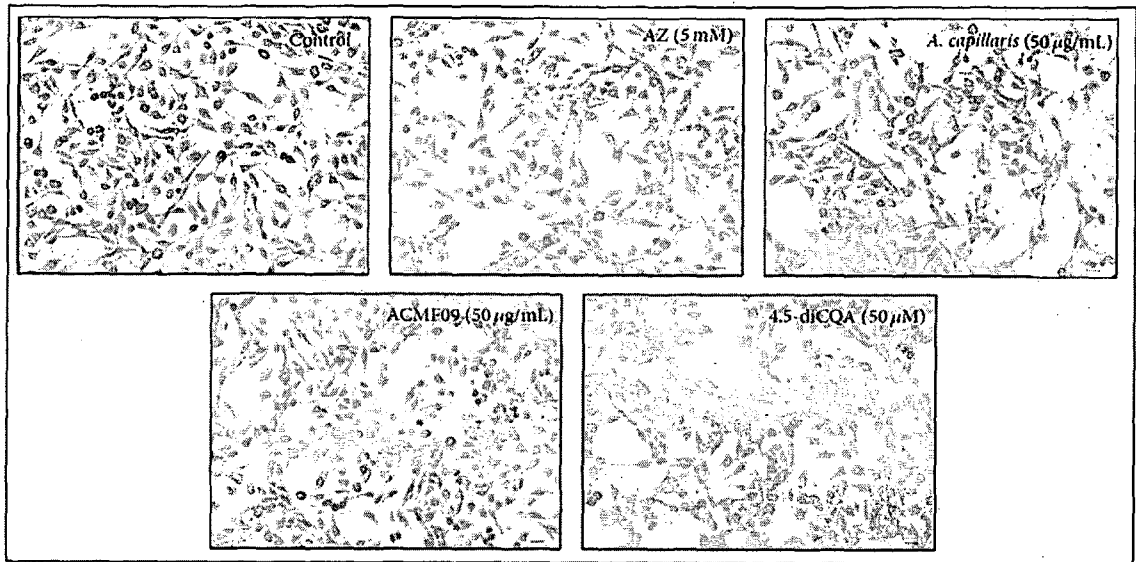
【도 9a】



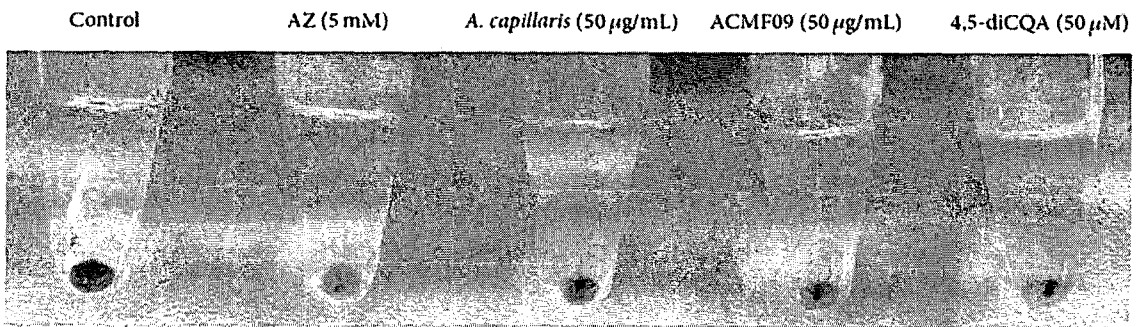
【도 9b】



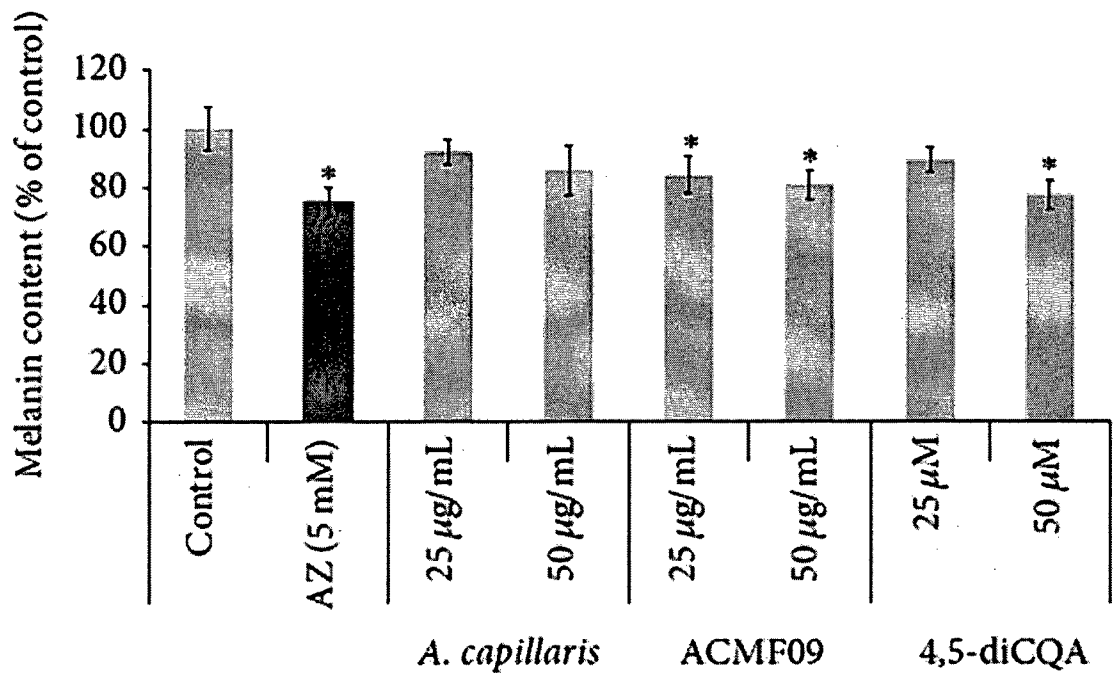
【도 10a】



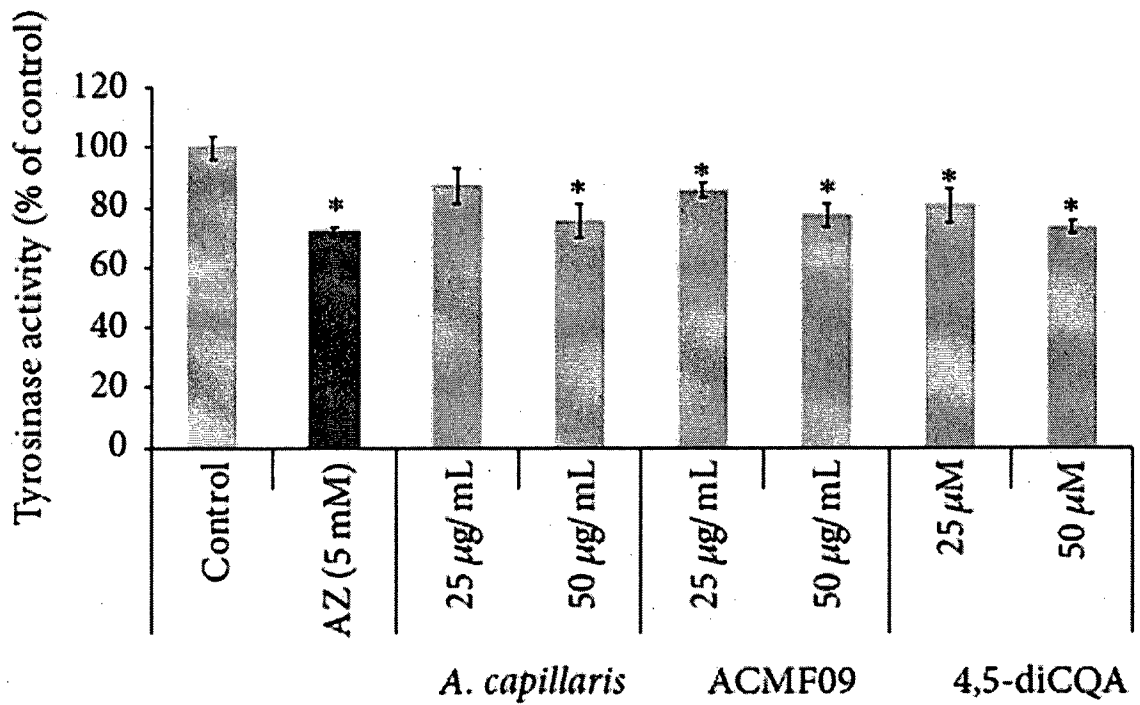
【도 10b】



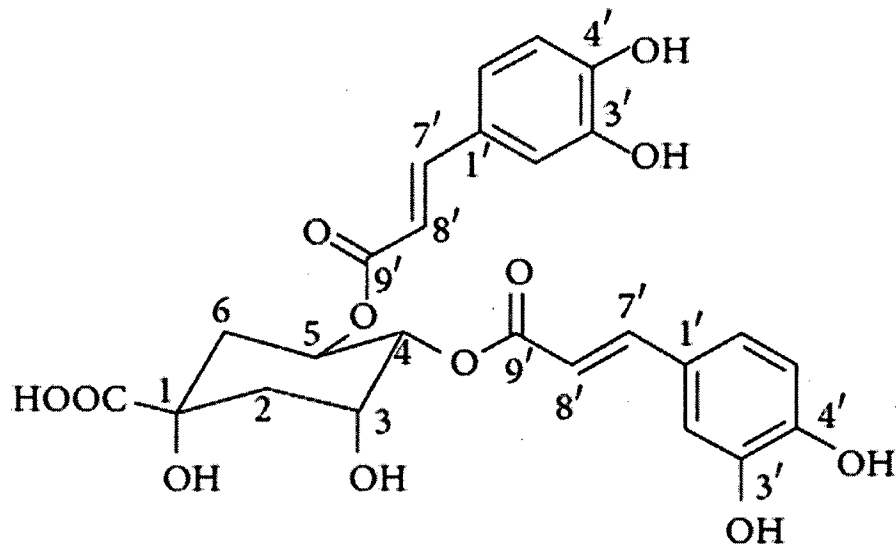
【도 10c】



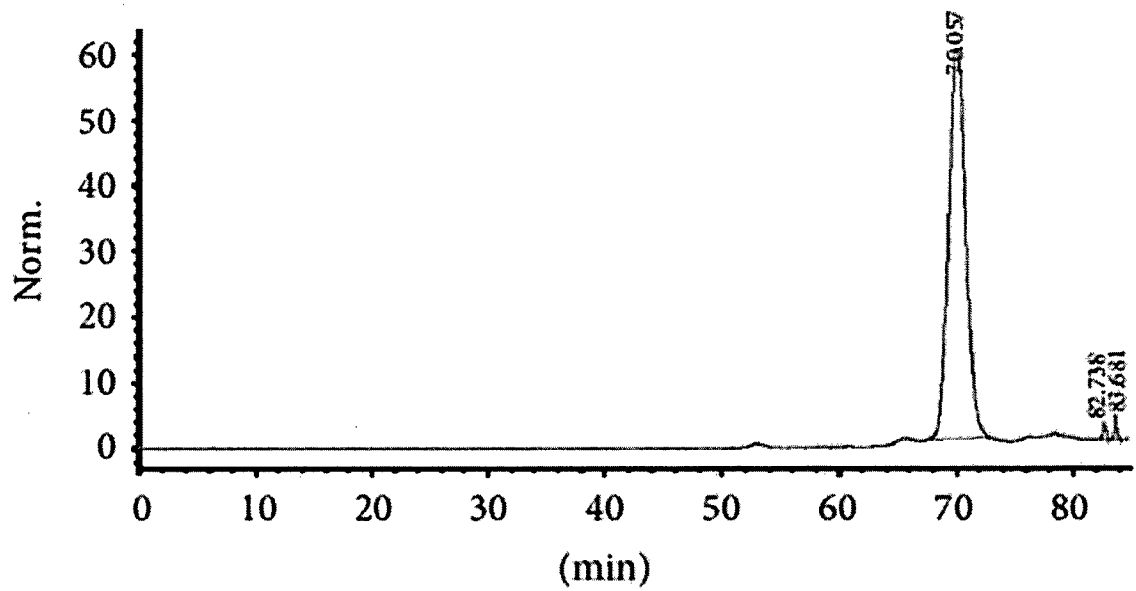
【도 10d】



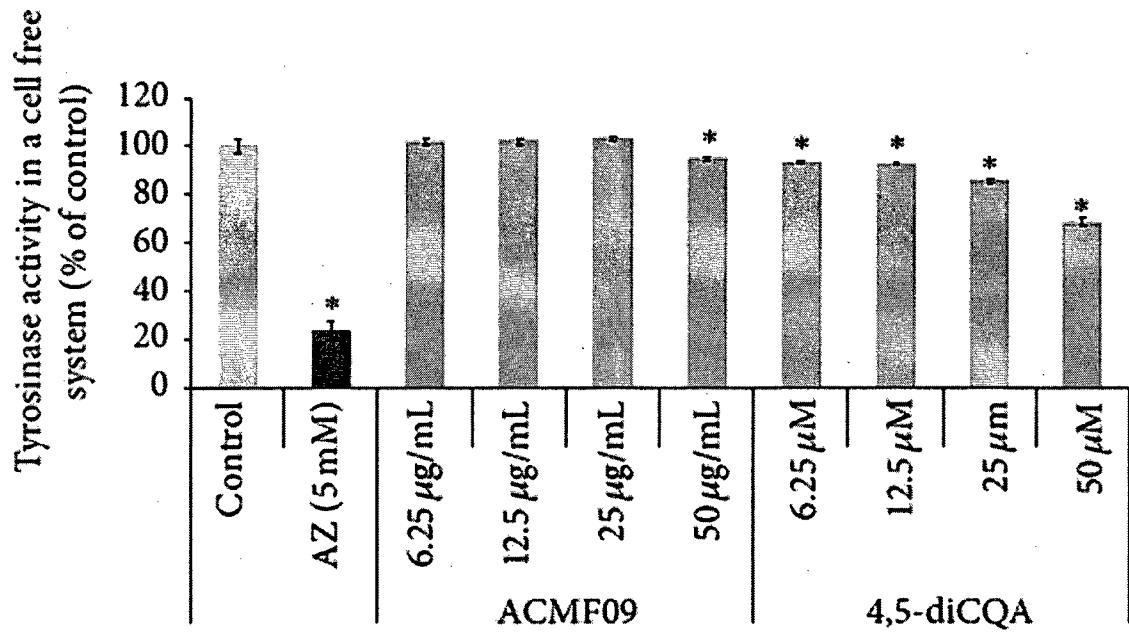
【도 11a】



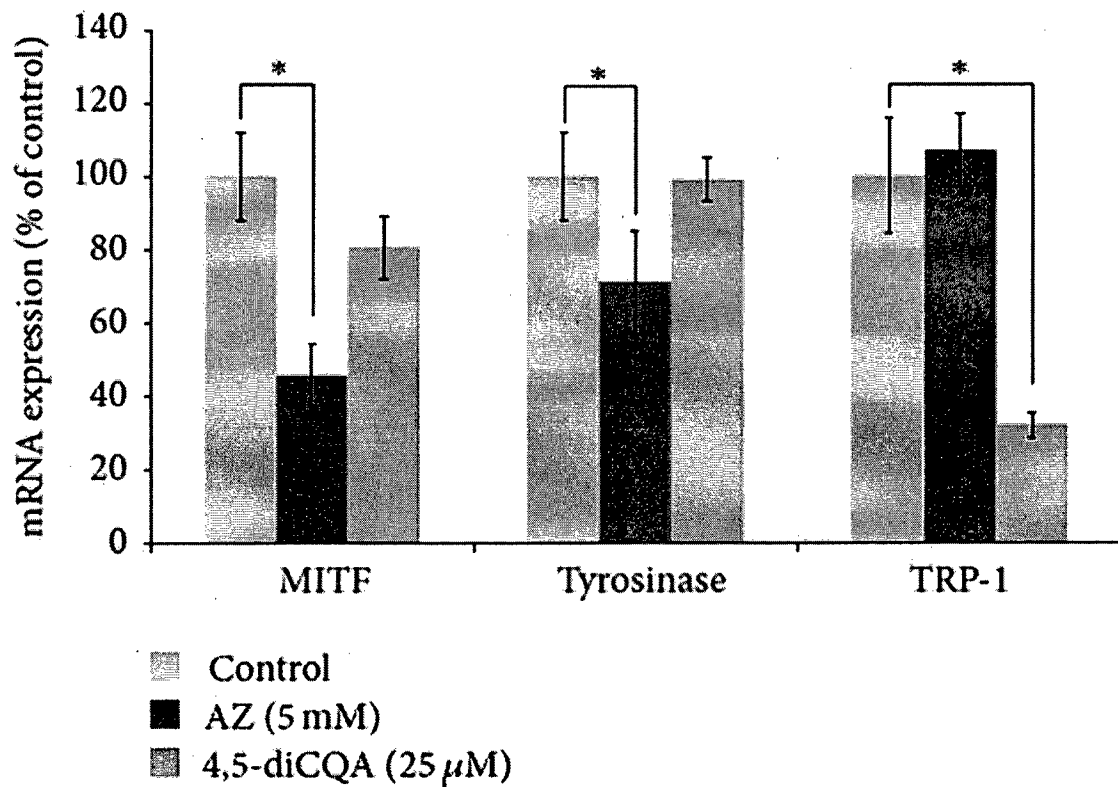
【도 11b】



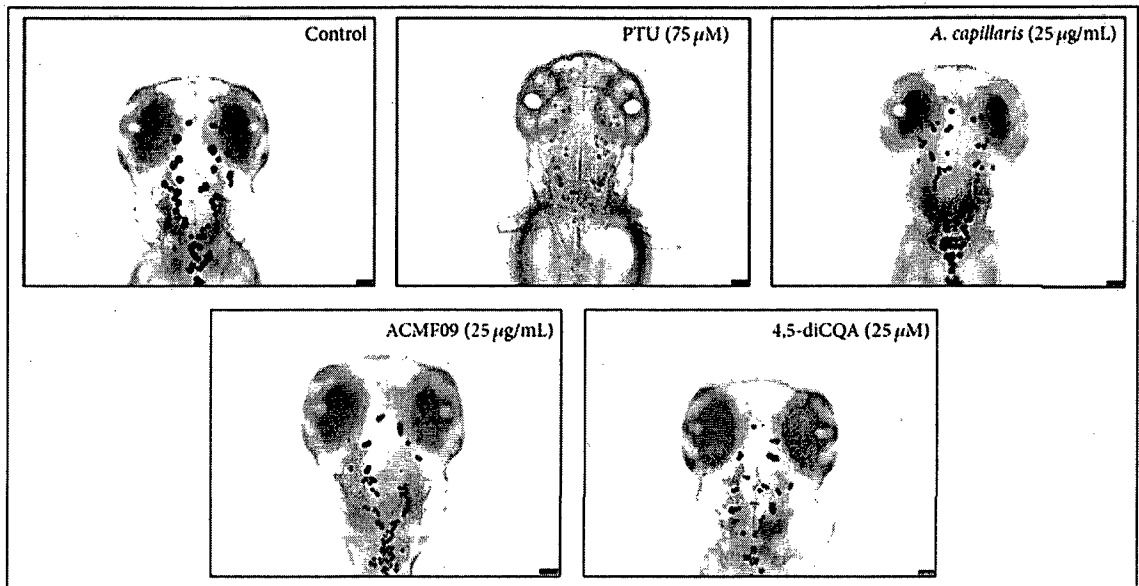
【도 12】



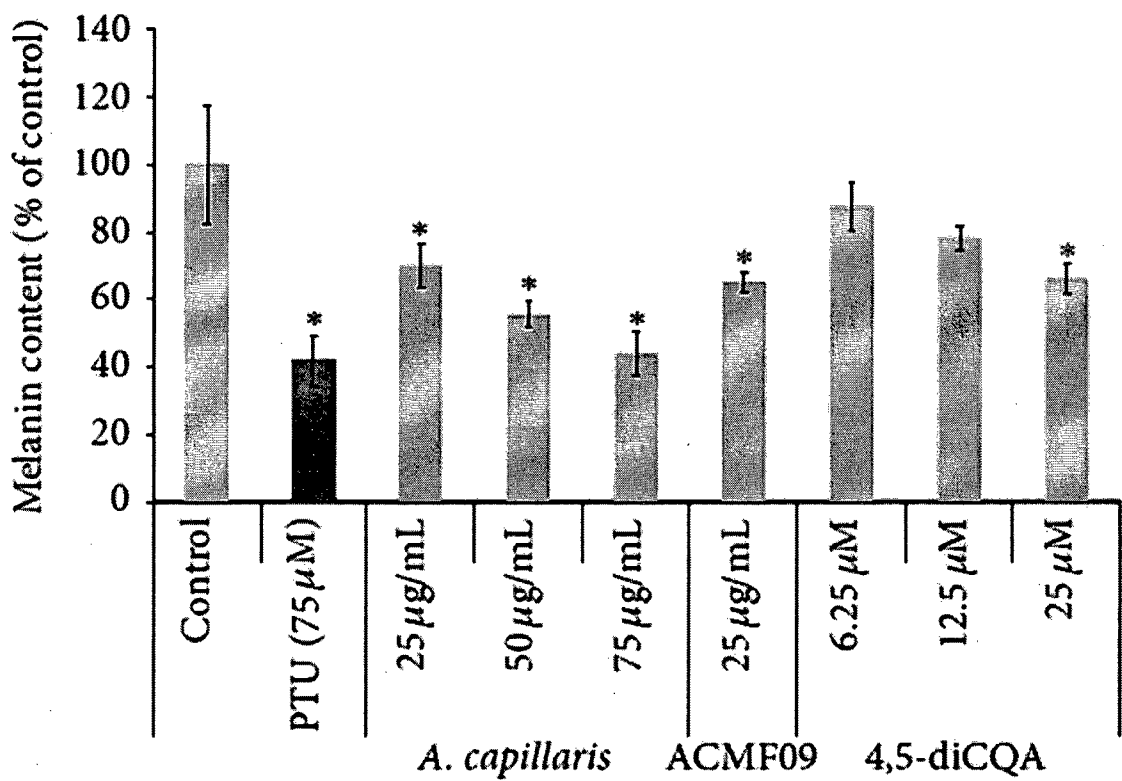
【도 13】



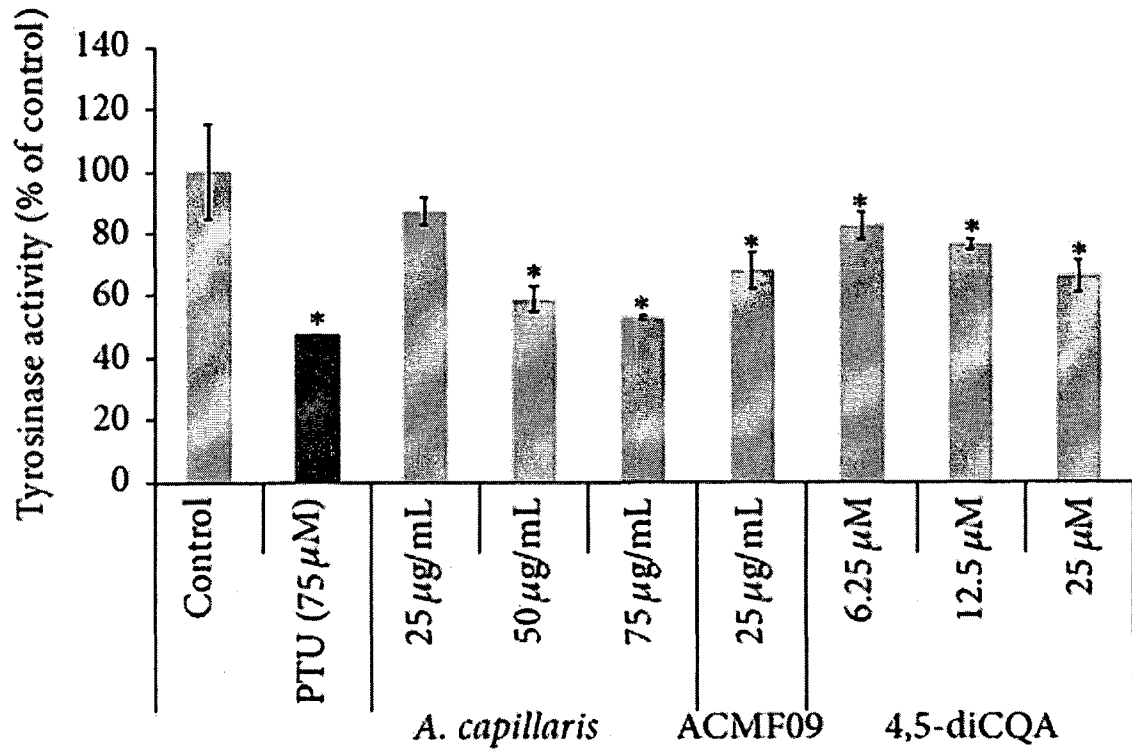
【도 14a】



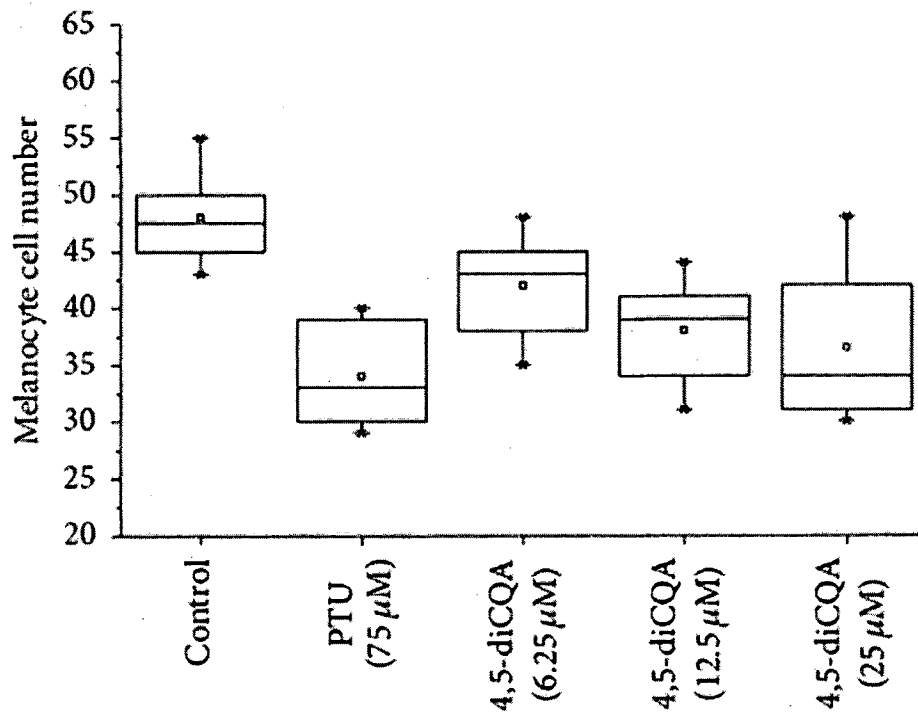
【도 14b】



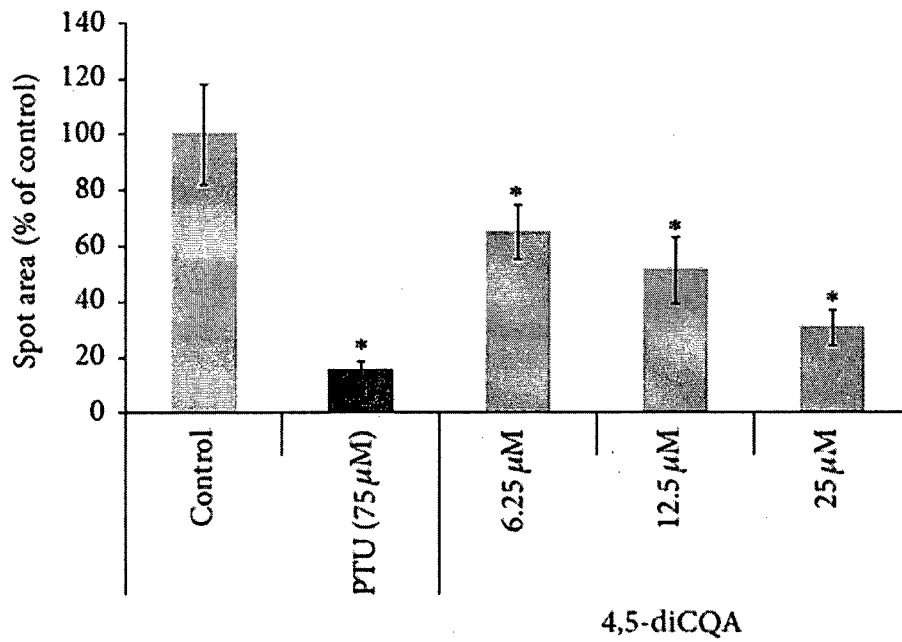
【도 14c】



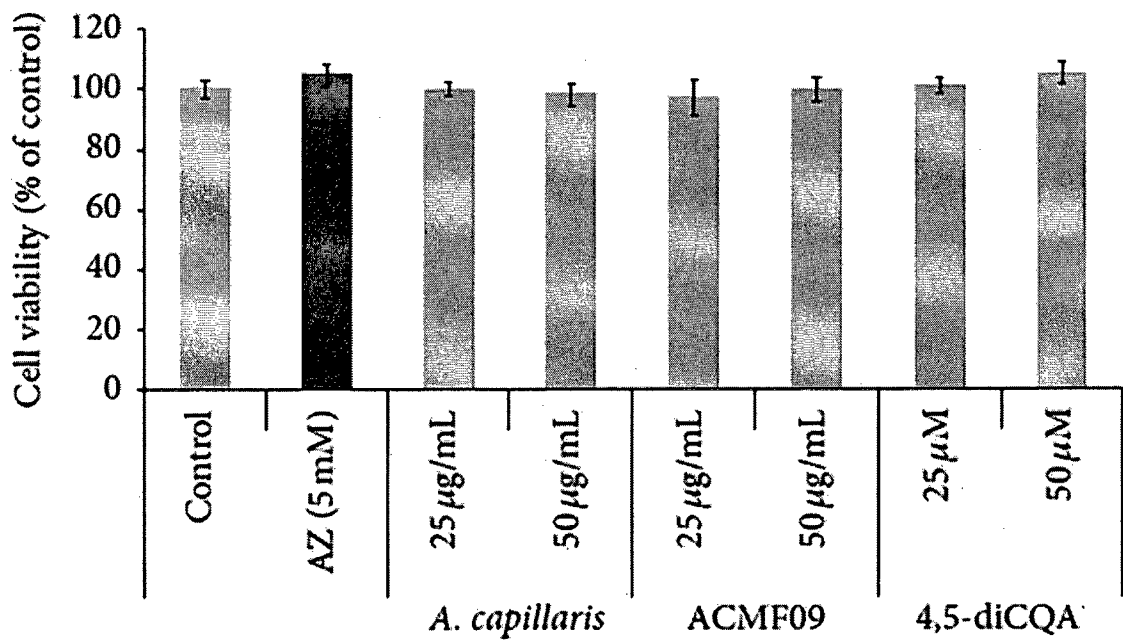
【도 15a】



【도 15b】



【도 16】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/012483

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/282(2006.01)i, A61K 31/7048(2006.01)i, A61K 8/97(2006.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A23L 33/105(2016.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/282; A61K 9/00; A61K 8/30; A61K 36/704; A61P 17/00; A61K 8/97; A23L 1/30; A61K 36/9066; A61K 8/36; A61K 31/7048; A61K 8/60; A23L 33/10; A23L 33/105; A61Q 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Artemisia capillaris Thunberg extract, hyperpigmentation, hypopigmentation, isofraxidin 7-O-(6'-O-p-coumaroyl)- β -glucopyranoside, 4,5-O-dicaffeoylquinic acid, melanin development, pigmentation suppression

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2016-0008100 A (MYONGJI UNIVERSITY INDUSTRY AND ACADEMIA COOPERATION FOUNDATION) 21 January 2016 See abstract; paragraphs [0004], [0011]-[0020], [0055]; example 1; experimental examples 3, 4; and claims 1-4, 16, 17.	1-6,8,9,16,19
A		7,10-15,17,18,20,21
Y	CN 101926857 A (WANG, X.) 29 December 2010 See abstract; and claim 1.	1-8,16,19
Y	CN 103191368 A (ZHANG, X.) 10 July 2013 See abstract; and claim 1.	1-8,16,19
X	KR 10-2014-0033815 A (RNS CO., LTD.) 19 March 2014 See abstract; paragraphs [0012]-[0015]; experimental example 1; and claims 1, 2, 4.	13-15,18,21
X	TABASSUM, N. et al., "Isolation of 4,5-O-dicaffeoylquinic Acid as a Pigmentation Inhibitor Occurring in Artemisia Capillaris Thunberg and Its Validation in Vivo", Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016, vol. 2016, thesis no. 7823541, inner pages 1-11 (Online publication date: 26 July 2016) See abstract; pages 2-4, 9; and figures 1, 2, 5.	1-6,8,9,13-16,18,19,21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 FEBRUARY 2018 (05.02.2018)

Date of mailing of the international search report

05 FEBRUARY 2018 (05.02.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/012483

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	YIM, S.-H. et al., "Isolation and Characterization of Isofraxidin 7-O-(6'-O-p-coumaroyl)-β-glucopyranoside from <i>Artemisia Capillaris</i> Thunberg: A Novel, Nontoxic Hyperpigmentation Agent that Is Effective in Vivo", Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017, vol. 2017, thesis no. 1401279, inner pages 1-12 (Publication date: 24 May 2017) See abstract; pages 2, 4, 5-11; and figures 1-8.	1-8,10-12,16,17,19 ,20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/012483

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0008100 A	21/01/2016	NONE	
CN 101926857 A	29/12/2010	CN 101926857 B	31/12/2014
CN 103191368 A	10/07/2013	CN 103191368 B	12/03/2014
KR 10-2014-0033815 A	19/03/2014	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/282(2006.01)i, A61K 31/7048(2006.01)i, A61K 8/97(2006.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A23L 33/105(2016.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/282; A61K 9/00; A61K 8/30; A61K 36/704; A61P 17/00; A61K 8/97; A23L 1/30; A61K 36/9066; A61K 8/36; A61K 31/7048; A61K 8/60; A23L 33/10; A23L 33/105; A61Q 19/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 사철쭉 추출물, 과다색소침착, 저색소 침착, 이소프락시딘 7-O-(6'-O-p-쿠마로일)-β-글루코피라노사이드, 4,5-O-디카페오일퀴닌산, 멜라닌 형성, 색소 침착 억제

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2016-0008100 A (명지대학교 산학협력단) 2016.01.21 요약; 단락 [0004], [0011]-[0020], [0055]; 실시예 1; 실험예 3, 4; 및 청구항 1-4, 16, 17 참조.	1-6, 8, 9, 16, 19
A		7, 10-15, 17, 18, 20, 21
Y	CN 101926857 A (WANG, X.) 2010.12.29 요약; 및 청구항 1 참조.	1-8, 16, 19
Y	CN 103191368 A (ZHANG, X.) 2013.07.10 요약; 및 청구항 1 참조.	1-8, 16, 19
X	KR 10-2014-0033815 A (주식회사 알엔에스) 2014.03.19 요약; 단락 [0012]-[0015]; 실험예 1; 및 청구항 1, 2, 4 참조.	13-15, 18, 21
X	TABASSUM, N. 등, "Isolation of 4,5-O-dicaffeoylquinic acid as a pigmentation inhibitor occurring in Artemisia capillaris Thunberg and its validation in vivo", Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016, 2016권, 논문 번호 7823541, 내부 페이지 1-11 (온라인 공개일 2016.07.26) 요약; 페이지 2-4, 9; 및 도면 1, 2, 5 참조.	1-6, 8, 9, 13-16, 18, 19, 21

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 02월 05일 (05.02.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 02월 05일 (05.02.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이기철

전화번호 +82-42-481-3353



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	YIM, S.-H. 등, "Isolation and characterization of isofraxidin 7-O-(6'-O-p-coumaroyl)-β-glucopyranoside from <i>Artemisia capillaris</i> Thunberg: A novel, nontoxic hyperpigmentation agent that is effective in vivo", Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017, 2017권, 논문 번호 1401279, 내부페이지 1-12 (공개일 2017.05.24) 요약; 페이지 2, 4, 5-11; 및 도면 1-8 참조.	1-8, 10-12, 16, 17, 19, 20

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0008100 A	2016/01/21	없음	
CN 101926857 A	2010/12/29	CN 101926857 B	2014/12/31
CN 103191368 A	2013/07/10	CN 103191368 B	2014/03/12
KR 10-2014-0033815 A	2014/03/19	없음	