

보안과제(), 일반과제()

과제번호 : 106072-3

**한방 약용작물을 이용한 미백기능성 소재개발
및 제품화에 관한 연구**
(Development of whitening cosmetics by
using oriental herb)

동 의 대 학 교

농림수산식품자료실



0017695

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “한방 약용작물을 이용한 미백기능성 소재 개발 및 제품화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009 년 4월 일

주관연구기관명 : 동의대학교

주관연구책임자 : 정 경 태

세부연구책임자 : 최 영 현

연 구 원 : 최 병 태

연 구 원 : 박 정 애

연 구 원 : 배 현 주

연 구 원 : 예 정 숙

연 구 원 : 장 지 연

연 구 원 : 신 동 역

협동연구기관명:(주)아마란스화장품

협동연구책임자 : 강 환 열

요 약 문

I. 제 목

한방 약용작물을 이용한 미백 기능성 소재개발 및 제품화

II. 연구개발의 목표

본 연구는 한의학의 문헌 및 임상 자료를 바탕으로 국내 한방 약용작물 대상으로 미백 기능성을 가진 작물을 탐색하고 이를 이용한 새로운 천연물 유래 미백 소재를 개발하여 제품화함으로써 한방 약용작물에 대한 새로운 수요창출 및 시장개척에 목표를 두고 있음. 이는 부작용 없는 천연물 유래의 소재에 대한 관심을 고조시켜 제한된 소비구조를 가진 약용작물에 대한 새로운 수요창출 및 제품화는 물론 농가 재배작물의 선택 폭을 넓히는데 기여하고자 하는데 있음. 이를 위하여 한방에서 피부 관련 약재 31종을 선별하여 아래와 같은 세부 목표를 두어 수행함.

- ◎ Tyrosianse, melanin 생성 억제율 검정을 통한 유용 소재 스크린
- ◎ 소재의 분리를 위한 추출법확립 및 화학적 특성 분석
- ◎ melanin 형성에 대한 유용소재의 작용성 및 기전연구
- ◎ 미백 기능성 소재의 화장품 적합시험을 통한 효능 및 안전성 검증
- ◎ 제품화를 위한 대량추출법 확립, 제형상의 안정성 확보
- ◎ 미백 기능성 소재의 유효성 평가 확립을 통한 미백 기능성 화장품 시제품 개발

III. 연구개발 내용 및 범위

한방 약용작물을 대상으로 미백기능성 소재의 스크린을 통한 유용 소재 도출 및 화학적 특성 분석, 소재에 대한 기전연구, 화장품로서의 적합성을 판정을 통한 제품화를 아래의 범위에서 시행함.

1. 한방의 서지학 및 임상적에 근거에 따라 한방약용작물 선별

- ◎ 동의보감 및 본초강목을 중심으로 피부관련 한방 약재 선별
- ◎ 한방의 서지학 및 임상적 약재의 현대적 미백 기능 보유 검증

2. 미백 기능성 스크린을 통한 소재 도출 및 분리 방법 확립

- ◎ 비세포계를 이용한 tyrosinase 활성 검사
- ◎ 세포계를 이용한 melanin 생성 및 tyrosinase 활성 저해 분석
- ◎ 유기용매와 chromatography를 통한 미백 기능 소재 분리
- ◎ 유용 후보 소재에 대한 구조분석을 포함한 화학적 특성 분석

3. 유용 소재에 대한 기전 연구

- ◎ 세포계를 통한 MC1R관련 단백질활성 및 안정성 검사
- ◎ 세포계를 이용한 MSH에 의한 melanin합성 및 tyrosinase 활성 분석
- ◎ 세포계를 이용한 MAPK 신호전달 활성 분석
- ◎ 실험동물을 이용한 mealnin생성 억제 및 면역조직화학적 분석

4. 원료의 대량 생산 방법 및 화장품 조성 확립

- ◎ 미백신소재의 화장품 원료 허가
- ◎ 원료의 대량생산 방법에 따른 추출물의 원료 시험
- ◎ 원료의 물성, 안전성, 안정성 검사
- ◎ 미백 신소재의 화장품 원료 허가 (미국 CTFA)를 위한 실험
- ◎ 미국 FDA 등록을 위한 시험

IV. 연구개발결과

1. 미백기능 함유 한방약용작물 선별

동의보감 및 본초 강목을 중심으로 약재 특성과 처방을 중심으로 피부 관련 한약재 31종을 선별하고 정통적인 한약 추출법인 열수 추출법을 사용하여 추출물을 획득하여 미백 기능성을 확인하였음. 미백 기능성은 비세포계와 세포계를 함께 사용하였으나 현재 주목 받고 있는 대사조절형 미백소재 탐색을 위하여 B16F10 세포계를 이용하여 melanin 생성 및 tyrosinase 활성을 중심으로 탐색하였음.

약용작물 31종을 대상으로 B16F10 세포계의 melanin 생성 및 tyrosinase 활성 분석과 함께 미백 기능성이 알려진 arbutin과 비교하여 확인함으로써 후보 약용작물로 길경, 사삼, 울금, 세신, 감송향, 토사자, 승마 등 7종 약용작물을 선별하였음.

2. 유기용매 및 chromatography을 이용한 분획에 대한 효능

1차 선별된 약용작물 중 승마를 제외한 6종에 대하여 일차 열수 추출물을 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획으로 분리하였으며 승마는 물, 80% 및 100% 메탄올 추출물을 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 순으로 분획 추출물을 제조하였음. 사삼에 대한 효능은 미비하였으며 감송향은 낮은 농도에서 세포독성을 나타내어 제외하였으며 길경, 세신, 감송향, 울금은 에틸아세테이트분획이 토사자는 물분획에서 효능이 높게 나타났음. 이에 비해 승마는 물과 메탄올에 대한 디클로로메탄, 에틸아세테이트 분획에서 높은 효과를 나타내며 특히 디클로로메탄 분획에서의 효능이 매우 높게 나타났음.

유용작물간의 비교에서 승마가 가장 높은 효과를 나타내어 상품화에 있어 주종 약용작물로 선별하였으며 다음으로 효능이 뛰어난 울금 및 세신을 포함하였음.

나아가 길경, 세신, 감송향, 울금은 에틸아세테이트 분획 및 토사자는 물 분획에 대하여 ODS open column chromatography을 통해 7 분획으로 정제도를 높였으며 이에 대한 효능을 재차 검정하였음. 7 분획에 대한 효능 검정 결과 울금 80% MeOH ODS 분획 (분획5), 세신 60% MeOH ODS 분획 (분획 4) 그리고 승마의 디클로로메탄 분획은 차기 ODS 분획에 비해 높게 나타나 이들을 유효 소재로 선별하였음.

3. LC/MS을 이용한 구조 분석

상품화에 있어 주종 약용작물로 선별된 승마에 대한 유용 소재의 구조 분석을 위해 물, 80% 및 100% MeOH 추출 후 hexane, dichloromethane, ethylacetate, 물로 분획을 하였으며, 이 중 효과가 높은 dichloromethane 분획을 이 훨씬 높은 저해활성을 나타냈었음. 따라서, dichloromethane 분획을 ODS open column chromatography에 적용하여 다시 6 분획을 획득하였음. 이 중 분획2(F2)가 가장 높은 78% tyrosinase 활성 저해를 나타내어 F2를 LC/MS를 이용하여 동정하였음. 결과, 승마추출물의 미백활성 성분은 트리테르펜

(triterpene)을 주요 성분으로 하는 3가지의 혼합물이 주성분인 것으로 밝혀졌음.

4. 미백 효능 기전 연구

미백 기능성 소재에 대한 기전 연구는 승마, 울금, 세신을 중심으로 살펴 보았으며 주로 멜라닌생성에 관여하는 신호전달 조절 가능성에 대해 살펴 보았음.

4-1. 승마의 디클로로메탄 분획물에 대한 기전 연구

승마의 디클로로메탄 분획물을 처리하여 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2 그리고 이들 발현의 주요 전사인자인 MITF 발현을 살펴 보았음. 승마 추출물은 tyrosinases나 TRP-1의 발현을 제어하는 주요한 전사인자인 MITF의 발현을 감소되는 것으로 관찰되었음. 이는 tyrosinases나 TRP-1 발현을 제어하는 전사인자인 MITF의 붕괴를 유발함으로써 멜라닌합성을 감소시키는 ERK/MEK 신호 활성화에 의함을 확인하였음. 나아가 ERK경로의 저해제인 PD98059를 디클로로메탄 분획물과 함께 처리하면 멜라닌 합성 억제효과가 회복되는 것으로 보아 승마 디클로로메탄 분획물이 ERK활성을 유도함으로써 멜라닌 생성이 저해하는 것을 재확인 하였음.

4-2. 울금의 80% MeOH ODS 분획에 대한 기전연구

80% MeOH ODS 분획을 사용하여 멜라닌 생합성에 관련된 단백질 발현과의 연관성을 확인하기 위하여 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현 변화를 관찰하였음. 80% MeOH ODS 분획은 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현을 저해하는 것으로 나타나 MITF 발현을 저해함으로써 멜라닌 생성을 저해되는 것으로 생각되었음. 이들 기전을 알아보기위해 멜라닌 합성에 관여하는 ERK/MEK 신호와 PI3K/Akt 신호 전달의 관여 여부를 조사하였음. 울금 분획은 ERK/MEK신호와 PI3K/Akt 신호의 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과 인산화된 ERK1/2, MEK, Akt의 발현이 증가하여 6시간째에 가장 높은 값을 나타내었으며 48시간까지 지속되는 것을 확인 하였음. 이로부터 울금 분획은 ERK/MEK 또는 PI3K/Akt 두 가지 경로를 통해 멜라닌 합성에 영향을 주는 것으로 보였음. 이를 확인 하기 위해 ERK/MEK 신호전달의 선택적 저해제인

PD98059와 Akt신호 저해제인 LY294002를 처리하여 조사한 결과 두 저해제 모두에 의해 울금 분획의 저해효과가 회복되는 것으로 보아 두 경로 모두 관여하는 것으로 생각됨.

4-3. 세신의 60% MeOH ODS 분획에 대한 기전연구

세신 60% MeOH ODS 분획이 티로시네이즈활성 억제율이 가장 높아 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF의 발현을 본 결과 울금과 유사한 저해하고 신호전달 분자 인산화를 유도하였으나, 승마와 울금 분획과는 달리, 처리한 후 30분에서 60분에 인산화된 ERK1/2, MEK, Akt의 단백질이 최고에 달해 빠른 반응 나타내었음. 그리고 p38 MAPK 에 대한 관여 여부를 조사하였으나 이들 신호전달계는 관여 하지 않았음.

4-4. 동물실험을 통한 효능 검증

피부조직에 대한 미백소재의 영향을 조사하기 위해 실험동물인 기니피그를 이용한 실험을 진행하였음. 털을 제거한 실험동물 배부에 자외선 B를 조사한 후 승마를 중심으로 제작된 시제품을 피부 도포후 착색정도를 측정하였음. Arbutin 2% 결과와 비슷하게 승마추출물 2% 처리군이 10일째 ($P < 0.05$)와 24일째 ($P < 0.01$)에서 유의성을 보였으며, 조직화학적 검색 결과도 대조군에 비해 멜라닌 색소 침착이 완화되는 것으로 확인되어 본 연구에서 개발된 화장품 원료가 arbutin과 유사한 미백 효과가 있다고 생각됨.

5. 미백 기능 천연물 함유 미백화장품 시제품 개발

원료의 대량 생산 방법 개발을 위하여 억제 활성이 우수한 승마, 세신, 울금으로부터 유효성분 대량 추출을 위하여 초임계, 초음파, 열수 추출 방법을 검증하여 대량 추출의 가능성을 확인하였음. 각 방법에 따라 획득한 추출시료에 대한 tyrosinase 활성억제 효과를 전술한 동일한 방법으로 확인하여 최적의 추출 방법을 검증한 결과, 추출시료 중 초음파 추출분획은 100배 정도 희석하여도 약 45%의 억제활성도를 나타내어 대량 추출 방법을 초음파추출로 선정하였음. 추출물 내에 유효성분이 고농도로 존재하여 산업화의 발판을 마련하였다고 생각됨.

그리고 초음파 방법으로 추출한 추출물이 화장품 원료서의 적합성을 조사하였음.

외견상의 색상, 굴절율, 비중, pH, 중금속 등과 같은 물리화학적 성질과, 세균 및 진균수 시험의 미생물 시험을 한 결과 적합한 것으로 나타남.

본 연구결과로 선정된 승마, 세신, 울금이 혼합된 추출물을 AD Whitening Complex로 명명하고, CTFA (Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, 미국화장품협회, 2009년부터 personal care products council로 변경. www.personalcarecouncil.org 의 ICID (International Cosmetic Ingredient Dictionary)에 등재한 후, 추출물에 대한 시험규격을 표준화함.

6. 원료의 대량생산 방법에 따른 추출물의 원료 시험

시제품용 원료 조성을 선정한 후 피부안전성 시험과 피부미백효능효과시험을 미국 FDA 시험기관에 의뢰하였으며, 피부안전성 시험에 대하여 총 75명의 지원자가 시험에 참가하였으며 이중 시험 기간 동안 어떠한 부작용도 보고되지 않았다는 결과를 통보 받음.

V. 연구개발에 따른 기대성과

◎ 화장품 소재는 다국적 기업에 의해 90% 이상, 화장료의 경우 30% 이상을 수입에 의존하고 있어 본 개발에 의해 얻어진 신소재 및 완제품은 수입대체 효과를 가져 올 것임.

◎ 미백 기능성 소재는 기미, 주근깨 등의 과색소 침착, 백반증, 백피증 등과 같은 피부 결함 등 다양한 피부관련 증상에 적용 가능성은 매우 높아 파생 상품 유발 효과가 클 것임.

◎ 소득 증대에 따른 미용관련 제품 중 미백기능성 소재에 대한 관심이 증대하고 있어 신 미백 기능성 소재 개발은 제한된 소비구조를 가진 한방 약용작물에 대한 새로운 수요 창출이 가능할 것임.

◎ 한방 약용작물에 대한 정보의 현대적 활용은 한방 약용작물을 이용한 한방바이오 연구의 새로운 영역 창출함과 동시에 산업화에 기여할 것임.

◎ 한방 약용작물에 대한 신 수요창출은 재배농가의 소득증대로 이어지며 한정된 소비구조 및 저가 수입품에 의해 재배 의미가 상실된 약용작물에 대한 재배 가능성에 기여 할 것임.

SUMMARY

I . TITLE

Development of whitening cosmetics by using oriental herb.

II . GOAL OF RESEARCH DEVELOPMENT

The goal for research development is creating a new demand and market places by the development of natural whitening materials and the resulting product after screening the medicinal plants based on literature and clinical data of oriental medicine. 31 species of oriental medicine plants, which are skin-related, were selected for the following goals.

- ◎ Screening for natural whitening materials by conducting assay of tyrosianse activity inhibition and melanin reduction.
- ◎ Conduct purification and chemical characterization analysis of natural whitening materials.
- ◎ Investigation for mechanism of natural whitening materials how to inhibit tyrosianse activity and melanin synthesis.
- ◎ Investigation for the efficacy and safety of natural whitening materials as cosmetic materials.
- ◎ The whitening efficacy of medicinal plants based on

functionality and mechanism are analyzed.

- ◎ The final goal is to establish the validity of the assessment of the whitening materials and to develop whitening cosmetics after the stability test of formulated prototype and proof of bulk production possibility.
- ◎ To create new demand for the medicinal plants with limited consumption by drawing attention on natural products without the side effects that have has greater efficacy than the existing materials.

III. SCOPE OF RESEARCH DEVELOPMENT

We have screened many species of the whitening functional plants based on literature and clinical data of oriental medicine and analyzed the whitening efficacy of medicinal plants based on functionality and mechanism.

1. Screening medicinal plants with whitening function based on the bibliographic and clinical data of Oriental medicine.

- ◎ Selection of skin-related medicinal plant.
- ◎ Functional analysis of skin-related medicinal plant.

2. Separation and Purification Methods for components with whitening function from medicinal plants.

- ◎ In vitro tyrosinase enzyme inhibition assay.
- ◎ In vivo assay for reduction of melanin synthesis and tyrosinase inhibition.
- ◎ Organic solvent fractionation and chromatography separation of components with whitening function.

◎ Structural analysis and chemical characterization of the

whitening functional compounds.

3. Mechanism study of the whitening functional compounds.

- ⊙ In vivo study of MC1R-related proteins.
- ⊙ In vivo study of reduction of melanin synthesis and tyrosinase inhibition by MSH.
- ⊙ Study of the whitening functional compounds targeting MAPK signaling pathway.
- ⊙ In vivo study with lab animals for reduction of melanin synthesis and immunocytochemistry analysis.

4. Method for bulk production of raw materials and Formulation of whitening cosmetics.

- ⊙ Registration of new whitening cosmetics materials to USA CTFA.
- ⊙ The examination of the extracts which are obtained by different method for bulk production of raw materials.
- ⊙ Properties of materials, safety, and reliability tests.
- ⊙ Experiments of new whitening cosmetics materials for registration to USA CTFA.
- ⊙ The tests for USA FDA registration.
- ⊙ Production of a prototype for sales.

IV. RESULTS OF RESEARCH DEVELOPMENT

1. Screening the medicinal plants with whitening function.

The skin-related 31 species of medicinal plants were selected for primary screening to seek whitening materials based on the Donguibogam, the Bonchogangmok and prescription of oriental medicine. Hot water extraction method, a traditional extraction method of oriental medicine, was utilized to obtain primary

extracts to begin. whitening function was assayed by in vitro as well in vivo. For in vivo, B16F10 cell line was adapted for melanin synthesis and tyrosinase activity assay. Among 31 species gilgyeong, sasam, woollgum, sesin, gamsonghyang, tosaja, seven species were primarily selected based on melanin synthesis and tyrosinase activity in B16F10 cells.

2. Whitening effect of organic solvent and ODS chromatography fractions.

Six selected medicinal plants after primary screening were extracted with hot water followed by ethylacetate, butanol and water fractionation, sequentially. Seungma was extracted with hot water or 80% methanol or 100% methanol followed by hexane, dichloromethane, ethylacetate, sequentially. Sasam was excluded by neglectable function, Gamsonhyang was also excluded by cell toxicity at low concentration. Ethylacetate fractions of gilgyung, sesin and water fraction of tosaja showed whitening effect. In contrast, Suengma showed whitening effect in ethylacetate and dichloromethane fractions of water and methanol extracts, especially, dichloromethane fraction showed greater whitening effect.

Among them Suengma was selected as a major medicinal plant for cosmetic material source followed by woolgum and sesin.

Ethylacetate fractions of gilgyung, sesin, gamsonghyang and water fraction of tosaja were applied to ODS open column chromatography to improve purification. Seven frationations were obtained by ODS open column chromatography. Fraction 5 of woolgum, fraction 4 of sesin showed high whitening effect.

3. Identification of whitening functional compounds by LC/MS chromatography

To obtain whitening functional compounds intensive study was focused on Suengma. Because dichloromethane fraction of 100% MeOH extract showed maximum tyrosinase activity inhibition it was applied to ODS open column chromatography, resulting 6 fractions. Fraction 2 (F2) showed 78% tyrosinase activity inhibition. F2 was applied to LC/MS chromatography to identify compounds. The results showed 3 major compounds belong to triterpene in F2.

4. Mechanism study of whitening effect

Mechanism studies of whitening effect of Suengma, woolgum and sesin were focused on signaling pathways of melanin synthesis.

4-1. Mechanism study of dichloromethane fraction of suengma.

Dichloromethane fraction was treated to B16F10 cells. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, and transcription factor, MITF, which regulates tyrosinase, TRP-1, were analyzed. Dichloromethane fraction decreased expression of MITF. ERK/MEK, which induces MITF degradation and consequently reduces melanin synthesis was activated by dichloromethane fraction. PD98059, specific inhibitor for ERK signaling pathway, in the presence of dichloromethane fraction suppressed melanin synthesis inhibition of dichloromethane fraction indicating that dichloromethane fraction influences ERK signaling pathway.

4-2. Mechanism study of 80% MeOH fraction from ODS of woolgum.

80% MeOH fraction was treated to B16F10 cells. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, and transcription factor, MITF, which regulates tyrosinase, TRP-1, were analyzed.

80% MeOH fraction also decreased expression of MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2. While, phosphorylated ERK1/2, MEK, Akt were increased after 80% MeOH fraction treatment and reached maximum level at 6 hr-post treatment. Phosphorylated ERK1/2, MEK, Akt were observed until 48 hr. These results indicated that 80% MeOH fraction decreases melanin synthesis via activating both ERK/MEK and/or PI3K/Akt. Data with specific inhibitor PD98059 for ERK/MEK signaling and specific inhibitor LY294002 for PI3K/Akt signaling also confirmed both ERK/MEK and PI3K/Akt involved.

4-3. Mechanism study of 60% MeOH fraction from ODS of sesin.

Most data with 60% MeOH fraction were similar to those from woolgum. However, in contrast to fractions of suengma and woolgum, 60% MeOH fraction treatment induced phosphorylation of ERK1/2, MEK, Akt within 30 min after treatment. At 60 min phosphorylation reached maximum. p38 MAPK seemed not to be involved.

4-4. Animal study for whitening effect.

Lab animal, guinea pigs were used for whitening effect on skin tissue. After shaving, abdominal area was UVB illuminated. The cream containing the extract by supercritical extraction method was applied to the area. Pigmentation was then measured. The cream containing 2% extract showed similar results with a creaming containing 2% arbutin and the results of 10 days and 24 days showed significance at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. Histochemical results also showed reduction of melanin pigmentation in the animal group with the cream containing 2% extract when compared with control group. These data altogether suggested that prototype cream has whitening effect similar to arbutin.

5. Prototype development of whitening cosmetics containing

natural whitening materials.

We examined supercritical, ultrasound, thermal extraction methods to develop extraction method for whitening functional compound from medicinal plants. Extracts from each extraction methods assayed for tyrosinase activity inhibition function. The best method was ultrasound method because the extract by ultrasound method showed app. 45% inhibition even after 100 fold dilution. The way to industrialization appeared to be developed due to presence of high amount of functional materials in the extract.

The extract by ultrasound method was tested for cosmetic materials. Physicochemical characteristics such as appearance, refractive index, weight, pH, heavy metals and microbiological tests such as bacteria and fungi tests approved the extract.

We registered new whitening cosmetics materials, AD Whitening Complex, to USA CTFA (Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, USA) and standardized the formulation.

6. The examination of the extracts, as cosmetic materials, which are obtained by different method for bulk production of raw materials.

Registration of new whitening cosmetics materials to USA CTFA. After determination of material composition for prototype a prototype sample was applied to the USA FDA test agency for the efficacy of skin whitening and skin safety test. A total of 75 volunteers participated in the test for skin safety tests. We were reported that none of the volunteers appealed any side effects.

V. EXPECTATIONS BASED ON RESEARCH AND DEVELOPMENT

- ◎ Development of new whitening compounds will bring import replacement, currently depending on the multinational companies in more than 90% and imported materials in more than 30% of cosmetics.
- ◎ New whitening compounds may lead to Development of multifunction, new types, and time-saving products to meet welbing industry.
- ◎ Whitening compounds can be utilized to produce other products because whitening functional compounds are applicable to freckles, vitiligo, and related skin symptoms.
- ◎ New whitening compounds will create new demand for medicinal plants which may be not consuming much because of increased interest in the whitening beauty-related products and material development.
- ◎ Application of Oriental medicine to evidence-based medicine will dominate the world market via combining the Oriental medicine with BT technology and the creation of the new added-value products.
- ◎ Utilization of information about medicinal plants to modern biotechnology takes advantage of the creation of new areas of Oriental medicine research and Oriental medicine industry.
- ◎ Demand for new medicinal plants will create culture expansion of those plants and the income increase of the growers.

CONTENTS

Submission	1
Abstract	2
SUMMARY	9
CONTENTS	17
CHAPTER 1. OUTLINE OF RESEARCH DEVELOPMENT THEME...	23
PART 1. PURPOSE AND NEED OF RESEARCH DEVELOPMENT.....	23
1. PURPOSE OF RESEARCH DEVELOPMENT	23
2. NEED OF RESEARCH DEVELOPMENT	23
PART 2. SCOPE OF RESEARCH DEVELOPMENT.....	31
CHAPTER 2. CURRENT STATUS OF DOMESTIC AND FOREIGN TECHNIQUE DEVELOPMENT	33
PART 1. CURRENT STATUS AND TROUBLESOME OF DOMESTIC TECHNIQUE DEVELOPMENT	33
PART 2. CURRENT STATUS AND TROUBLESOME OF FOREIGN TECHNIQUE DEVELOPMENT	34
CHAPTER 3. CONTENTS AND RESULTS OF RESEARCH DEVELOPMENT	35

PART 1. THEORETICAL AND EXPERIMENTAL APPROACHES	35
PART 2. RESEARCH CONTENTS AND RESULTS	36
CHAPTER 4. CONTRIBUTION TO THE GOALS AND RELATED FIELDS	140
PART 1. ANNUAL RESEARCH GOALS AND EVALUATION CHECKPOINTS	140
PART 2. THE ACHIEVEMENT OF RESEARCH AND DEVELOPMENT GOALS AND SELF-EVALUATION FOR RESEARCH AN DEVELOPMENT GOAL	143
CHAPTER 5. THE ACHIEVEMENT AND UTILIZATION OF RESEARCH AND DEVELOPMENT	145
PART 1. PUBLICATION ACHIEVEMENT	145
1. PAPER PUBLICATIONS	145
2. PATENTS	147
3. UTILIZATION / TRAINING OF RESEARCHERS	149
PART 2. PLAN FOR UTILIZATION OF ACHIEVEMENT.....	150
CHAPTER 6. INFORMATION OF FOREIGN TECHNIQUE DEVELOPMENT	153
CHAPTER 7. REFERENCES.....	155
APPENDIX	

목 차

제출문.....	1
요약문.....	2
SUMMARY.....	9
CONTENTS.....	17
목차.....	19
제1장 연구개발과제의 개요.....	23
제1절 연구개발의 목적·필요성.....	23
1. 연구개발의 목적.....	23
2. 연구개발의 필요성.....	23
가. 기술적 측면.....	24
나. 경제·산업적 측면.....	27
다. 사회·문화적 측면.....	31
제2절 연구개발의 범위.....	32
제2장 국내외 기술개발현황.....	33
제1절 국내관련기술의 현황 및 문제점.....	33
제2절 국외관련기술의 현황 및 문제점.....	34
제3장 연구개발 수행 내용 및 결과.....	35

제1절 이론적 · 실험적 접근방법.....	35
제2절 연구내용 및 결과.....	36
1. 한방 약용작물 유래 미백소재의 일차적 효능검정과 기전연구.....	36
가. 서지학적 고증에 의한 미백관련 약용작물 도출 및 일차 열수추출의 수득율.....	36
나. 세포계를 이용한 melanin합성 및 세포외 melanin분비량에 의한 일차 효능 선별.....	39
2. Melanin합성 억제 소재 분리와 효능 기전연구.....	44
가. ODS open column chromatography를 이용한 분획.....	44
나. ODS 분획의 세포계를 이용한 melanin합성 및 세포외 melanin 분비량에 의한 일차 효능 선별.....	51
다. 승마로부터 미백소재의 추출방법.....	63
라. ODS open column chromatography를 이용한 디클로로메탄 추출물의 분획.....	76
3. 울금 추출물의 미백 기능성 및 기전연구.....	80
가. 울금의 미백 기능성 성분 추출.....	80
나. B16F10세포계에서 울금 분획의 세포성장 저해율.....	81
다. 세포내 멜라닌생성에 미치는 영향.....	81
라. Tyrosinase 활성에 미치는 영향.....	83
마. 울금 5 (80% MeOH, PPC) 분획의 세포독성.....	84
바. PPC의 멜라닌 합성 및 tyrosinase 활성 억제.....	84
사. PPC의 멜라닌 생합성경로에 관련된 단백질 발현저해 효과.....	86
아. PPC의 멜라닌 생합성경로에 관련된 신호전달 단백질 발현 효과.....	86
자. PPC에 의한 멜라닌 생합성 저해에 따른 신호전달 선택적 저해제의 효과.....	88
4. 세신 추출물의 미백 기능성 및 기전연구.....	91
가. 세신의 미백 기능성 성분 추출.....	91
나. B16F10세포계에서 세신 분획의 세포성장 저해율.....	92
다. 세포내 멜라닌생성 및 티로시네이즈활성에 미치는 영향.....	93
라. 세신 4 (60% MeOH, PPC) 분획의 세포독성.....	94
마. 세신 4의 멜라닌 합성 및 tyrosinase 활성 억제.....	94
바. 세신 4에 의한 멜라닌 생합성경로에 관련된 단백질 발현저해 효과...	95
사. 세신 4의 멜라닌 생합성경로에 관련된 신호전달 단백질 발현	

저해효과.....	96
제 3 절 미백 화장품 시제품 제작을 위한 제형 확립.....	97
1. 한방약용작물의 원료화.....	97
가. 한방약용작물로부터 유효성분 추출.....	97
2. 초음파 추출물에 대한 각 원료의 점검.....	100
가. 승마 추출물.....	101
나. 세신 추출물.....	102
다. 울금 추출물.....	103
3. 혼합 한방약용 작물의 열수 및 초음파 추출물에 대한 시험.....	104
가. Tyrosinase 저해 활성 측정.....	104
나. 세포내 멜라닌 합성 저해 활성 측정.....	105
다. 초음파추출 혼합액의 물성 점검.....	106
라. 초음파추출 혼합액의 피부첨포 시험.....	107
마. CTFA 원료 등재용 자료.....	110
4. 제품 제형 실험.....	110
가. 제품에 대한 주관적 소비자 품평.....	110
나. 제형의 개선 실험.....	111
5. 원료의 규격화.....	117
가. 원료의 규격.....	117
나. 원료 등재 사항.....	118
다. 원료의 안정성 시험.....	118
라. 원료의 안전성 시험.....	118
6. 제품화 실험.....	120
가. 제형의 방부력 시험.....	120
나. 처방 안정도 시험.....	121
다. 제품의 안전성 시험.....	123
라. 제품에서의 효능효과 시험.....	124
마. 조직화학적 및 면역조직화학적 관찰.....	127
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	140
제1절 연도별 연구목표 및 평가 착안점.....	140
1. 연구개발의 목표.....	140
2. 평가의 착안점 및 기준.....	141

제2절 연구개발 목표의 달성도 및 목표달성도에 대한 자체평가.....	143
1. 연구개발 목표의 달성도.....	143
2. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가.....	144
제5장 연구개발성과 및 성과활용계획.....	145
제1절 논문게재 성과.....	145
1. 논문게재성과.....	145
2. 특허 성과.....	147
3. 학술대회 발표.....	149
4. 미국 FDA 승인을 위한 시험.....	149
5. 인력활용/양성 성과.....	149
제2절 성과활용 방안.....	150
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	153
제 7장 참고문헌.....	155

부 록

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적, 필요성

1. 연구개발의 목적

한의학의 문헌 및 임상 자료를 바탕으로 국내 한방 약용작물 대상으로 미백 가능성을 가진 작물을 탐색하고 이를 이용한 새로운 천연물 유래 미백 소재를 개발하여 제품화함으로써 한방 약용작물에 대한 새로운 수요창출 및 시장개척에 목표를 둬.

2. 연구개발의 필요성

- ◎ 현대 전통의학에 대한 관심 고조 및 난치성·생활습관성 질환에 대한 한방 접근 범위 확대됨에 따른 한방 약용작물의 수요가 증대하고 있으며 한의학적 氣味論에 따른 새로운 기능성 소재 개발과 상품화는 약용작물에 대한 새로운 수요 창출이 가능함.
- ◎ 산업화로 인한 환경오염은 일반생활의 장애를 초래하며 특히 인체 보호막으로서 피부 질환이 증가 및 삶의 질 향상은 피부 관련 미용과 질환 완화 치료 소재에 대한 수요가 폭발적으로 증가하며 이러한 효능을 가진 천연물 소재 관심 증가하고 있음.
- ◎ 한의학과 BT기술의 접목을 통한 한방 약용작물을 이용한 미백 기능성 소재 개발은 한방 약용작물을 이용한 연구 및 개발 영역에 대한 인프라 구축은 물론 국제적 우위를 점하는 한의학과 더불어 국내 시장과 해외 시장개척에 유리함.
- ◎ 피부 관련 소재 특히 미백 소재는 대부분 수입에 의존 하고 있어 국내산 소재 수급이 긴급하며 한방 약용식물을 이용한 새로운 고부가가치 제품 창출을 통해 제한된 소비구조를 가진 한방 약용작물의 판로 개척과 재배농가의 수익증대가

요구됨.

- ◎ 이미 기능성화장품으로 다음과 같은 식물추출물이 원료로 사용되고 있음 : Hamamelidis, Lithospermum 추출물, Peppermint oil, Thyme 추출물, Borage seed oil, Oriental bittersweet 추출물, Tamarind 열매추출물, Pine bark 추출물(프랑스에서 생산되는 유명브랜드 Pycnogenol 제품), Anthocyanin, Ginkgo flavone 등. 이상의 제품들은 식물성 원료의 일부에 지나지 않음.
- ◎ 미국의 2000년도 《식물 화장품원료 Reference handbook》에 수록된 기능성화장품 식물 원료는 1000여종에 이르고 있어 식물 원료에 의한 약물성화장품의 개발전망은 매우 밝다고 할 수 있음.(참고자료: 2007.06.11 의약경제보)
- ◎ 따라서 한방약용작물의 원료화를 위한 연구는 더 늦기 전에 반드시 필요하다고 판단됨

가. 기술적 측면

(1) 미백 기능성 소재개발에 대한 논의

- ◎ 안전성 위주의 화장품 개발 동향은 현대 가치관 다양화와 개성화가 두드러지면서 미백, 보습, 세포재생, 주름개선 등의 성분을 함유한 기능성 화장품의 개발로 이어지고 있으며 특히 미백 기능성 화장품의 개발은 melanocyte내 melanin의 생성을 억제하는 것과 멜라닌세포 자극물질을 조절하는 것, 멜라닌의 분해 및 배출을 촉진키는 것 등의 세 가지 방향으로 이뤄지고 있음
- ◎ 피부 melanin합성증가와 기저층 melanocyte의 수적 증가는 기미, 주근깨와 같은 이상을 일으키며 양방 의학에서는 hydroquinone과 retinoic acid 등의 피부 복합제제를 사용하거나 레이저 또는 박피술 등의 외과적인 치료방법을 이용하고 있으나 치료효과가 일시적이거나 여러 부작용을 유발하고 이에 대한 새로운 접근이 필요함

- ◎ Tyrosinase 저해제로 잘 알려진 4-hydroxyanisole, 5-hydroxyindole 및 hydroquinone 등은 강력한 멜라닌 생합성 저해활성을 보이지만 색소세포의 변성 또는 치사를 일으키고 세포본래의 기능을 손상시키는 등의 부작용을 나타내며, kojic acid, arbutin 등은 이미 상품화 되어 화장품, 식품 등에 미백제로 사용되고 있으나 안전성에 문제점이 있는 것으로 나타남
- ◎ 현재까지 안정성을 고려한 천연물 유래 미백 기능성 소재는 상지, 닥나무, 반하, 상황버섯 추출물 등 민간처방 또는 한의학에서 경험적으로 사용이 되어져 왔던 몇 가지 한방 약용작물에 한정되어 있어 광범위한 탐색작업이 요구됨
- ◎ 열수 및 각종 용매를 이용한 복합추출물의 미백기능성 탐구는 또 다른 부작용을 나타낼 수 있다는 우려와 함께 알부틴 (arbutin)과 같은 유효한 단일물질과 비교하여 그 효과가 감소할 수 있다는 문제점이 노출되고 있음
- ◎ 기능성화장품 신소재 창출과 사업화를 이룩하기 위해서는 신소재의 도출과 함께 도출된 신소재의 화학적 물리적 안정성과 피부침투성을 증대시킬 수 있는 새로운 제형개발에 필수적인 유변학적 물성평가 그리고 신소재의 유용성 (efficacy) 및 안전성 (safety)을 규명하는 연구가 복합적으로 이루어질 수 있는 기술기반 구축이 필수적임

(2) 미백 기전에 대한 논의

- ◎ 신체의 가장 바깥부분에 위치하는 표피는 기저층, 유극층, 각질층의 순으로 배열되며 다양한 세포 종류 중 melanocyte는 모발색과 피부색을 결정지으며 페놀류의 생체고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체인 melanin을 합성하고 분비하여, 자외선 등의 외부 스트레스 등으로부터 피부를 보호하는 작용함
- ◎ Melanin의 과잉 생산은 기미, 주근깨와 같은 피부 질환을 초래하며, 심한 경우 피부암의 유발과도 관련이 있는 것으로 보고되어 있어 melanin의 과잉생산을 억제하는 방향으로 미백 효과를 나타내는 소재 개발하려는 경향이 강하며 대체로 tyrosinase의 활성을 제어, 억제하는 세포내 신호전달계를 제어하는 방향으로 진행되고 있음

- ◎ Melanin합성에 대한 세포내 신호전달 기전은 매우 다양한 요인에 의해 영향을 받으나 이중 가장 중요한 요인은 MC1R을 통한 세포내 활성화 변화이며, 특히 MITF가 중심적 위치를 가지며 CREB/CBP를 통한 MITF활성을 통해 tyrosinase-related proteins (TRPs; tyrosinase, TRP-1, TRP-1)활성을 통한 melanin합성이 가장 주요한 요인으로 보여 짐
- ◎ 자외선은 nitro oxide를 생성하여 피부조직의 melanocyte내에서 구성효소인 tyrosinase와 TRP-1의 분비를 증가시켜 멜라닌 색소의 생성을 촉진하며, 생성된 멜라닌 색소들은 keratinocyte로 이동되어 기미와 주근깨를 비롯한 피부 색소 침착을 유발함
- ◎ 멜라닌 합성에 영향을 주는 신호전달물질 TRPs 관련 단백질의 활성을 저해시키는 기전을 가진 천연 소재도출 세포독성이 낮은 안정성이 보장된 신 소재 개발이 가능하며 생체내 melanin관련 대사의 기초 연구 뿐만 아니라 멜라닌 생성 저해제의 대체물질로 활용될 수 있을 것 임.

(3). 한의학적 관점에서 해결 방안

- ◎ 한방에서 얼굴에 나타나는 여러 피부결함 [피부 발진, 분자(粉刺), 주근깨, 기미, 검정 사마귀 등]의 치료시 피부미용 및 질환에 응용된 단일 및 복합소재를 주로 사용하며 구체적인 방법으로 경구복용과 세면용으로 활용하여 백옥 같은 얼굴 상태를 유지하는 것을 이상으로 삼았음.
- ◎ 한방의 연구는 어혈을 풀고 혈액순환을 촉진시키는 약재를 이용한 미용 미백실험, 고온다습한 인체의 내부 환경을 청소하여 염증을 제거하는 약재를 이용한 미용 미백 실험이 있으며, 한편으로는 문제성 피부인 기미, 주근깨 등을 직접 치료하는 미용 미백 약재를 활용하는 실험 등이 있어 활용의 폭이 넓음.
- ◎ 기존 한방 임상에서 우수한 미용 미백 효과를 나타내고 있는 한방 천연물 복합소재를 대상으로 melanin합성의 신호전달체계에 미치는 영향을 검증함으로써, 피부 미백 물질을 개발함과 동시에 기미, 주근깨 등의 과색소 침착, 백반증, 백피증 등과 같은 피부 결함에 대한 활용도 가능함.

- ◎ 한의학적 관점에서 미용 미백의 직접적인 효과를 나타내는 재료로는 주로 녹두, 백지, 백급, 백렴, 백강잠, 백부자, 천화분 등 많으며 이들을 복합적으로 사용하여 더욱 우수한 효과를 나타내고 있음.

(나) 경제·산업적 측면

(1) 국내 약용작물 이용에 대한 산업적 관점

- ◎ 한방 약용작물로부터 생리활성물질을 탐색하여 기능성 식품 및 식의약으로 개발하고자하는 연구는 오랜 역사를 가지고 있으며 특히 동양권 한의학에서 체계적이고 광범위하게 약용자원으로 활용해 왔기 때문에 기록이 풍부하게 축적되어 있으나 이에 대한 심도 있는 성분과 효능 분석을 통한 활용도는 떨어짐.
- ◎ 한방 약용작물에 대한 신약개발의 연구와 투자는 활성화되고 있으나 대체로 메커니즘 구명 등의 연구에 치중한 면이 많으며 다양한 약용작물의 이용에 관한 기술은 미비하여 제한된 약용작물의 생산, 유통, 개발 구조를 가지고 있음.
- ◎ 한방 약용작물에 관한 정확한 분자생물학적 기전과 더불어 이를 활용한 다양한 제품 생산은 한의학과 BT 기술을 접목한 synergy 효과를 극대화하여 산업의 성장 잠재력이 대단히 크며 21세기 산업으로 각광 받고 있는 기능성 미용소재 산업에 대한 영역 개척이 가능함.
- ◎ 한방약용작물을 이용한 미용 소재 개발을 위한 안전성과 유효성을 확보하고, 문헌적으로만 통용되는 약용작물의 효능을 검증하여 EBM (Evidence-Based Medicines)를 실현함으로써 한국전통의약의 산업화를 통한 수요 증대.

(2) 국내·외 경제·산업적 측면

- ◎ 전 세계적으로 화장품 개발은 선진국에 의해 주도되고 있으며 세계시장은 미국, 일본, 브라질, 프랑스가 상위를 점유하고 있음. 또한 세계 화장품 시장은 최근 3년 동안에도 꾸준히 증가 추세에 있음. 이에 한국정부도 화장품산업 육성책을 개발하여 화장품산업육성을 지원하고 있음(보건복지가족부 보도자료, 2009.2.14)

표 1-1. 세계 화장품시장 규모 및 국가별 순위

(단위 : 10억불, %)

순위	2006년			2007년			2008년(E)		
	국가	금액	점유율	국가	금액	점유율	국가	금액	점유율
1	미국	50.2	18.6	미국	51.0	18.4	미국	51.9	18.1
2	일본	29.8	11	일본	30.4	11.0	일본	31.1	10.9
3	브라질	18.2	6.8	브라질	21.0	7.5	브라질	24.1	8.4
4	프랑스	14.1	5.20	프랑스	15.3	5.5	프랑스	16.5	5.8
5	독일	13.6	5	독일	15.3	5.3	독일	15.3	5.3
6	영국	12.9	4.8	영국	13.7	4.9	영국	14.6	5.1
7	중국	11.7	4.3	중국	12.8	4.6	중국	14.1	4.9
8	이탈리아	10.0	3.7	이탈리아	10.7	3.8	이탈리아	11.4	4.0
9	러시아	8.5	3.1	러시아	9.8	3.5	러시아	11.3	4.0
10	스페인	7.8	2.9	스페인	8.7	3.1	스페인	9.7	3.4
11	멕시코	7.2	2.7	멕시코	7.4	2.7	멕시코	7.7	2.7
12	대한민국	5.9	2.2	대한민국	6.3	2.3	대한민국	6.8	2.4
13	캐나다	5.5	2	캐나다	6.0	2.2	캐나다	6.5	2.3
14	인도	4.0	1.5	인도	4.2	1.5	인도	4.5	1.6
	total		269.6		277.9			286.5	

* 자료 : Euro-monitor(2007), 2008년도는 추정치

* 금액기준 : 유통가격 기준

- ◎ 천연물은 미국 FDA가 승인한 것이 120종으로 시장규모는 약 10조 달러에 이르고 있으며 한의학의 발상지인 중국의 경우는 의약품을 세 가지로 분류하여 순수한 단일성분, 활성분획 그리고 조엑스 등으로 나누고 있으며 이중 조엑스가 의약품으로 허가를 받아 국민 보건 체계를 천연물(한약재)에 상당히 의존하고 있음.
- ◎ 화장품 산업은 정밀화학 산업에서 의약 다음으로 시장규모가 큰 사업으로 2002년 화장품 세계시장은 1천억불에 달하는 고부가가치의 지식기반 산업의 하나이며 기능성 화장품을 포함한 전체 화장품 세계시장규모는 2000년 1,008억 달러, 2003년 1,240억 달러이며 2006년 1,430억 달러로 전망되고 있음.
- ◎ 기능성 화장품 시장은 화장품 전체시장의 약 1/5 수준이나 기능성 화장품의 기술적 유용성과 삶의 질 향상에 대한 소비자 인식이 증가하고 있으며 국내 화장품의 전체 시장 규모가 2002년부터 2005년까지 연평균 증가율은 경제 불황의 여파로 답보상태이나 2006년에서 2013년까지는 10%대의 시장증가가 예측됨.
- ◎ 기능성화장품의 국내시장에서 조차 외국산 유명 화장품의 점유율이 점차 증가하고 있을 뿐 아니라 국내 화장품 원료의 80% 이상이 수입에 의존하고 있으며 공격적 마케팅과 강한 제품력에 기반을 둔 해외 화장품 업체들에 의해 잠식되고 있음.

표 1-2. 국내 수출수입 실적

(단위: 천달러, %)

연도	수출		수입		무역수지
	수출금액	전년대비 증감율	수입금액	전년대비 증감율	
1996년	46,068	42.74	318,971	53.53	-272,903
1997년	69,456	50.77	303,538	- 4.84	-234,082
1998년	57,611	-17.05	134,167	- 55.80	-76,556
1999년	66,856	16.05	210,946	57.23	-144,090
2000년	102,927	53.95	331,386	57.10	-228,459
2001년	117,918	14.56	444,777	34.22	-326,859
2002년	140,970	19.55	555,639	24.93	-414,669
2003년	171,899	21.94	543,807	- 2.13	-371,908
2004년	251,195	46.13	538,887	- 0.90	-287,692
2005년	264,645	5.35	589,076	9.31	-324,431
2006년	280,311	5.92	685,327	16.34	-405,016
2007년	304,067	8.47	751,823	9.70	-447,756

* 자료: 관세청 수출입 통계 (2008)

- ◎ 화장품의 전체 시장규모는 생물과학과 피부과학 등 화장품 효능의 원천기술의 진보에 따라 혁신기술의 제품 구현과 더불어 중국, 러시아, 인도 등 거대 잠재 시장의 확대에 6% 대의 성장이 예상됨으로 이를 선점할 수 있는 제품의 개발이 필요함.
- ◎ 기능성화장품에서 가장 중요한 원천기술인 피부에 생리활성 효과가 있는 신소재 창출은 부가가치가 매우 큰 산업으로 현재 선진국에서도 경쟁적으로 연구되고 있으며 미래에 국가경제에 크게 이바지할 가능성이 높아 국내에서도 국가적으로

적극 육성해야 할 산업분야임.

- ◎ 국내 화이트닝 크림의 판매동향 : 2003년 9%, 2004년 9%, 2005년 6%, 2006년 12%, 2007년 14%로 증가세를 보이고 있음(대한화장품협회).

(다) 사회·문화적 측면

- ◎ 생활패턴 변화와 소득증대로 인하여 다양한 질환에 대해 양방적 접근보다 한의학적 접근이 부작용이 없으며 삶의 질을 배려한 접근이 각광을 받고 있으며 예방의학적인 연구와 더불어 천연물을 이용한 소재 개발 및 이용에 대한 국민적 관심 및 이해가 높아 짐.
- ◎ 소득증대와 고령화의 영향으로 2020년경에는 국내 의료비 지출 규모는 GDP 대비 7% 이상으로 증가할 전망이다, 이는 단순한 질병치료가 아닌 미용 등 삶의 질 향상과 연계된 수요 증가가 함께 이루어져 시장의 양호한 성장을 지속할 것이며 이에 대한 한의학적 역할은 더욱 증대되어 약용작물에 대한 국민적 관심이 증대 할 것 임.

제2절 연구개발의 범위

연구개발의 목표	연구범위	연구개발의 내용
미백기능 함유 한방약용작물 선별	<ul style="list-style-type: none"> - 한방의 서지학 및 임상적 근거에 따라 한방약용작물 선별 	<ul style="list-style-type: none"> - 동의보감 및 본초강목을 중심으로 피부관련 한방 약재 선별 - 한방의 서지학 및 임상적 약재의 현대적 미백 기능 보유 검증
한방약용작물로부터 미백 기능 소재 도출	<ul style="list-style-type: none"> - 미백 기능성 검정과 병행하여 미백 기능 소재 도출 - 미백 기능 소재 분리 방법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 멜라닌 형성에 관여 하는 Tyrosinase 효소 활성 저해 기능 분석으로 소재 선별 - 멜라닌 합성 세포를 이용한 세포내 멜라닌 생성 저해 및 Tyrosinase 효소 활성 저해 분석으로 소재 선별 - 용매와 chromatography를 통한 미백 기능 소재 분리
미백 효능 기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 세포계를 이용한 미백효과 기전 검사와 실험동물 이용 안정성 검사 	<ul style="list-style-type: none"> - 세포계를 이용한 세포 내 melanin합성 저해와 tyrosinase 활성 저해 분석 - melanin 합성 신호경로에 미백 소재 작용 분석 - 실험동물을 이용한 색소침착 및 mealnin생성억제 효과
미백 기능 천연물 함유 미백화장품 시제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 원료의 대량 생산 방법 개발 - 화장품 조성 확립 - 미백신소재의 화장품 원료 허가 	<ul style="list-style-type: none"> - 원료의 대량생산 방법에 따른 추출물의 원료 시험 - 원료의 물성, 안전성, 안정성 검사 - 미백신소재의 화장품 원료 허가 (미국 CTFA)를 위한 실험 - 미국 FDA 등록을 위한 시험

제2장 국내외 기술개발 현황

- ◎ 21세기는 경제 사회적 구조뿐만 아니라 미용소재와 관련된 수급환경이 급변하고 있어 한방 약용작물을 이용한 천연 소재에 대한 국민적 욕구 또한 거세어지며 대내외적 환경변화는 학문간 접목에 의한 새로운 시장 창출이 이루어 질 것임.
- ◎ 예견되는 화장품의 환경변화는 과학기술과 산업의 눈부신 발달로 유전자 재조합이나 세포배양 등 첨단 유전공학기술 제품은 물론 각종 신물질이나 신소재를 활용한 화장품의 개발이 폭발적으로 증가할 것임.
- ◎ 전통의학 연구가 왕성하게 이루어지는 중국에서 한방 약용작물 및 이를 이용한 복합 소재에 대한 다양한 제품이 개발되고 있으나 생산 방법 및 유통 경로에 대한 법률적 미비로 부작용 및 변질에 대한 문제가 빈번함.
- ◎ 일본에서 메이지유신 이래 한방에 대한 전통성이 결여되어 있으며 현재 Kampo Medicine이라 불리는 한방은 단일제제나 수종이내의 복합제제를 중심으로 이루어지고 있어 효능성 및 개발의 여지가 매우 좁음.
- ◎ 동양권에서 특히 한국은 한의학적 전통이 뿌리 깊은 나라로 다양한 문헌적, 임상적 자료를 보유하고 있어 약용작물을 이용한 소재개발 및 제품화는 국제적 경쟁력에 있어 우위를 점하고 있음.

제1절 국내 관련 기술의 현황과 문제점

- ◎ 환경오염에 의한 피부질환과는 별개로 생활수준의 향상과 더불어 피부의 미용 및 미백에 대한 사회적인 관심 증대되고 있음.
- ◎ 여성의 경우, 안면의 문제성 피부로 인한 대인기피 및 사회적 적응이 약화되는 경향이 두드러짐으로 이에 대한 근본적인 예방 또는 치료 전략이 필요함.
- ◎ 화학 합성제에 대한 부작용의 이유로 자연 천연물질, 특히 한방 약용작물을 이

용한 미용 및 미백 물질을 개발하여 상품화하고 있음.

- ◎ 한의학적 원리에 입각한 한방 바이오 상품의 연구 및 개발이 증진되고 있으며 이러한 현상은 세계적인 추세로 확대되고 있음.
- ◎ 천연물을 이용한 미용 미백 물질의 개발은 효능소재에 대한 인위적 합성 또는 유도체로 대체하려는 노력에서 이뤄지고 있으나 한방 약용작물의 신소재에 대한 연구는 드뭄.

제2절 국외 관련 기술의 현황과 문제점

- ◎ 소득증대와 노령화 사회로 진행됨에 따라 기능성 화장품 및 식품에 대한 관심이 높아지고 있으며 특히 화장품은 2000년대에 들어서면서 피부 주름완화 및 제거, 피부 미백 등 분야에 많은 관심이 쏟아지고 있음.
- ◎ 기능성 화장품 및 식품에 대한 개발은 현재 각 업체에 집중적으로 진행하고 있으며 소비 자들도 환경오염에 의한 피부질환과는 별개로 피부의 미용 및 미백에 대한 사회적인 관심 증대되고 있음.
- ◎ 기존 연구는 tyrosinase활성억제를 중심으로 연구되어 왔지만 최근에는 tyrosinase 활성 억제, 항산화력, tyrosinase합성조절, melanogenesis 조절물질 등의 개발이 시도되고 있음.
- ◎ 화학 합성제에 대한 부작용으로 자연 천연물질, 특히 한방 천연물질을 이용한 미용 및 미백 소재를 개발하여 한의학적 원리에 입각한 한방바이오 상품화하고자 하는 연구와 개발이 증진되고 있으며 세계적인 추세로 확대되고 있음.
- ◎ 선진국에 비해 높은 경쟁력을 가진 한의학의 관점에서 피부 미용 및 미백에 효과가 있을 것으로 사료되는 한방 제제들을 서지학적 또는 임상적인 경험에 의해 분류하여 화학합성물질에 의해 야기되는 문제점을 해결할 수 있는 천연 소재 연구가 필요하나 아직 초기단계 수준임.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 이론적, 실험적 접근방법

연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
B16F10 melanoma세포계를 이용하여 melanogenesis를 통한 melanin 형성 저해에 대한 소재의 효능 및 연구	<ul style="list-style-type: none"> - B16F10 melanoma세포 배양 - Hosoi 등의 방법에 의한 melanin양 측정 - 세포외 분비 melanin 양 측정 - Matinez-Esparza 방법에 의한 tyrosinase 활성 측정
멜라닌 형성 관련 효소인 TRPs (Tyrosinas, TRP-1, 및 TRP-2) 및 MITF 관련 단백질 발현에 대한 연구	<ul style="list-style-type: none"> - B16F10 melanoma 세포 배양 - Western blot analysis - MITF 관련 단백질 발현 - ERK 및 Akt의 phosphorylation - ERK 및 Akt inhibitor 의 영향
B16F10 melanoma 세포계에 대한 미백 소재의 독성검사	<ul style="list-style-type: none"> - 세포형태 관찰 - Hematometer를 이용한 세포 생존율 - MTT assay 의한 세포성장 측정
In vitro assay를 이용한 미백기능성 후보물질 대량 탐색	<ul style="list-style-type: none"> - Mushroom tyrosinase를 이용한 in vitro enzyme assay
유효성분 추출물질의 분리	<ul style="list-style-type: none"> - ODS open column chromatography를 이용한 분획 - Mushroom tyrosinase활성 저해 검사 - 세포계에서의 melanin 합성량 저해 검사 - 세포계에서의 Tyrosinase 활성 저해 검사
도출 소재 및 분획물에 대한 화장품료로서의 자격요건 검증	<ul style="list-style-type: none"> - 원료추출방법 탐색 : 열수, 초임계 및 초음파 추출

	<ul style="list-style-type: none"> - 추출물의 원료적합 검사 - 추출물의 tyrosinase 활성 및 melanin 생성억제효과 - 추출물을 포함한 시제품의 안전성, 안정성 검사 - 제품제형시험 - 미백신소재의 화장품 원료 허가 (미국 CTFA)를 위한 실험 - 미국 FDA 등록을 위한 시험
--	---

제2절 연구내용 및 결과

1. 한방 약용작물 유래 미백소재의 일차적 효능검정과 기전연구

가. 서지학적 고증에 의한 미백관련 약용작물 도출 및 일차 열수추출의 수득율

◎ 동의보감 및 본초강목을 중심으로 약재 특성과 처방을 참고하여 피부 관련 한 약재 31종을 선별하였으며 약재선별을 위한 추출법은 정통적인 한약 추출법인 열수 추출법을 사용하였음. 약재 100 g을 증류수 2,000 ml에 넣어 90℃에서 2시간 동안 열수 추출하여, 3,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 침전물을 제거하고 pore size가 0.45 μm 인 여과지로 부유물을 제거한 다음 동결건조 함. 시료로 사용하기 위해 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium을 이용하여 100 mg/ml의 농도가 되도록 함.

◎ 피부 관련 약용작물의 생약명, 사용부위, 효능 및 수득률은 아래 표 3-1과 같 음.

표 3-1. 피부 관련 약용작물의 관련 효능 및 수득률

No.	韓藥名	생약명	사용부위	한약 효능	수득률(%)	표본번호
1	天花粉	Trichosanthes kirilowii	뿌리	열을 내리고 진액을 내	1.875	PT06-01
2	藿香	Agastache rugosa	초	위장, 당뇨, 혈압, 노화 방지, 피부질환, 암 예방	8.800	PT06-02
3	桔梗	Platycodon Radix	뿌리	중추억제작용, 진정, 진통, 해열. 항염증작용	33.470	PT06-03
4	益母草	Leonurus sibiricus	초	산후 지혈 및 복통, 혈압강하, 이뇨, 진정, 진통	9.500	PT06-04
5	烏梅	Prunus mume	과실	항균작용, 기침, 설사, 소갈에 사용	19.800	PT06-05
6	桑枝	Morus bombycis	가지	부종제거, 관절에 작용	7.000	PT06-06
7	蘿蔔子	Traphanum sativum	씨	담(痰)제거, 소화증진	10.500	PT06-07
8	杏仁	Prunus armeniaca	씨	기침, 천식, 변비에 사용	1.900	PT06-08
9	五香	Saussurea lappa	뿌리	복통, 구토, 설사에 사용, 항균작용	15.900	PT06-09
10	藁本	Angelica tenuissima	뿌리	항염증 작용, 항균작용, 두통에 사용	12.460	PT06-10
11	防風	Ledebouria seselioides	뿌리	해열작용	14.700	PT06-11
12	菟絲子	Cuscuta semen	씨	간과 신장을 보	9.845	PT06-12
13	沙參	Adenophora Radix	뿌리	피부진균 억제작용, 거담작용, 용혈, 강심작용	29.470	PT06-13
14	鬱金	Curcuma Rhizoma	뿌리	담즙분비 촉진, 담석 제거, 혈액순환을 도움	11.570	PT06-14
15	細辛	Asiasari Radix	뿌리 및 뿌리줄기	후두염, 비염등에 사용, 해열, 진통, 진정작용	14.390	PT06-15
16	甘松香	Nardostach	뿌리 및	복통, 기미, 검버섯,	11.775	PT06-16

		ys chinensis	뿌리줄기	영양장애 부스럼, 치 질 등		
17	敗醬草	Patrinia scabiosaefo lia	뿌리	간세포 재생 촉진 및 변성 방어, 항균작용	14.900	PT06-17
18	人蔘	Panax ginseng	뿌리	항암면역효과, 항스트 레스	7.800	PT06-18
19	金櫻子	Rosa laevigata	과실, 화탁	강장, 강정, 수렴, 항 균작용	14.770	PT06-19
20	白鮮皮	Dictamnus dasycarpus	뿌리껍질	해열작용, 피부진균억 제작용	14.260	PT06-20
21	金銀花	Loniceraja ponica	꽃	소화성궤양 예방 및 항균작용	18.000	PT06-21
22	射干	Belamcand a chinensis	뿌리줄기	거담, 진해, 해열, 해 독, 소염작용	8.600	PT06-22
23	麻黃	Ephedra sinica	땅윗줄기	발한, 해열, 진해, 이 뇨제	7.700	PT06-23
24	玄蔘	Scrophulari a buergriana	뿌리	혈압강하	40.200	PT06-24
25	升麻	Cimicifuga heracleifol ia	뿌리줄기	해열, 항염증작용	11.100	PT06-25
26	浮萍草	Spirodela polyrhiza	全草	수종, 두드러기, 암종, 가려움증에 처방	3.030	PT06-26
27	常山	Dichroae Radix	뿌리	해열작용	10.100	PT06-27
28	白芷	Angelica dahurica	뿌리	진균억제작용	20.000	PT06-28
29	白附子	Anconitum koreanum	母根, 子根	진정진통작용	25.000	PT06-29
30	白花蛇 舌草	Oldenlandi a diffusa	全草	해독, 항균, 소염작용	4.500	PT06-30
31	砂仁	Amomum xanthioides	과실	소화불량, 토사, 복통 등에 효능	8.500	PT06-31

나. 세포계를 이용한 melanin합성 및 세포외 melanin분비량에 의한 일차 효능 선별

- ◎ 일반적으로 미백소재의 탐색은 짧은 시간 내 다량의 소재를 탐색할 수 있다는 용이성에 의해 비세포계의 mushroom tyrosinase활성을 조사하고 있으나 이는 생체내의 작용이 제한적인 단점이 있음.
- ◎ 본 연구에서는 비록 많은 시간과 노력이 소요되더라도 첫 단계에서 B16F10 세포계를 이용하여 melanin 생성량 및 세포외 melanin 량은 3일 배양하여 측정하였으며 tyrosinase활성은 5일간 배양하여 조사하였으며 편의상 hemocytometer를 이용하여 세포를 개수 한 후 정상군과 비교하여 저해율을 구하였음.

표 3-2. 약용작물 열수 추출물에 의한 B16F10세포계의 melanin생성 저해율

	Control (mg/ml)	(-) α -MSH (ug/ml)	(+) α -MSH (ug/ml)	저해율
Control	0	268.1	637.6	100
Arbutin	0.1	240.4	370.4	41.9
PT06-01	0.1	280.6	500.1	21.6
	0.5	32.4	33.4	94.8
PT06-02	0.5	151.3	341.9	46.4
	1.0	286.6	731.1	-14.7
PT06-03	1.0	208.3	465.9	26.9
	2.0	41.5	77.1	87.9
PT06-04	1.0	259.6	399.2	37.4
PT06-05	1.0	345.1	626.1	1.8
PT06-06	1.0	312.5	452.9	29.0
PT06-07	1.0	285.7	546.4	14.3
PT06-08	1.0	370.1	691.8	-8.5
PT06-09	1.0	288.4	693.7	-8.8
PT06-10	1.0	256.0	510.1	20.0
PT06-11	1.0	234.5	484.7	24.0
PT06-12	1.0	200.8	388.0	39.1
PT06-13	0.5	289.8	525.4	17.6
	1.0	340.4	431.0	32.4
PT06-14	0.5	191.3	503.7	21.0
	1.0	216.5	478.8	24.9

PT06-15	1.0	246.0	528.2	17.1
	2.0	172.0	271.3	57.5
PT06-16	0.2	186.4	454.2	28.8
	0.5	144.0	151.8	76.2
	1.0	29.4	44.3	93.1
PT06-17	1.0	225.5	518.5	18.7
PT06-18	1.0	277.6	624.5	2.0
PT06-19	0.5	330.7	582.6	8.6
	1.0	277.6	326.7	48.8
PT06-20	1.0	230.6	249.4	60.9
PT06-21	1.0	261.6	240.6	62.3
PT06-22	0.5	390.6	399.8	37.3
	1.0	208.1	248.4	61.0
PT06-23	0.5	532.0	668.1	-4.8
	1.0	253.6	370.1	41.9
PT06-24	1.0	287.3	771.9	-21.1
PT06-25	0.1	503.7	682.5	-7.1
	0.5	420.2	511.4	19.8
	1.0	351.1	272.2	57.3
PT06-26	1.0	555.8	619.3	2.9
PT06-27	1.0	498.4	449.9	29.4
PT06-28	0.5	247.5	765.2	-20.0
	1.0	206.3	657.5	-3.1
	2.0	276.4	816.2	-28.0
PT06-29	0.5	204.8	657.5	-3.1
	1.0	286.8	617.8	3.1
	2.0	186.2	549.8	13.8
PT06-30	1.0	355.9	431.7	32.3
PT06-31	0.5	216.8	521.6	18.2
	1.0	152.4	161.1	74.7

표 3-3. 약용작물 열수 추출물에 의한 B16F10세포계의 세포외 melanin생성

	Control (mg/ml)	(-) α -MSH(%)	(+) α -MSH(%)	%of (+) α -MSH
Control	0	100.0	2215.0	100
Arbutin	0.1	97.8	1852.3	83.6
PT06-01	0.1	72.9	3155.2	142.4

	0.5	49.9	684.8	30.9
PT06-02	0.5	131.6	3085.4	139.3
	1.0	224.3	8132.1	367.1
PT06-03	1.0	171.5	7456.6	336.6
	2.0	48.4	1021.9	46.1
PT06-04	1.0	135.8	1978.9	89.3
PT06-05	1.0	119.2	2602.7	117.5
PT06-06	1.0	121.8	1957.9	88.4
PT06-07	1.0	104.4	2749.4	124.1
PT06-08	1.0	96.5	2647.2	119.5
PT06-09	1.0	135.0	2954.5	133.4
PT06-10	1.0	110.1	2430.0	109.7
PT06-11	1.0	122.0	2257.8	101.9
PT06-12	1.0	149.9	2978.4	134.5
PT06-13	0.5	96.7	2011.0	90.8
	1.0	95.1	1947.2	87.9
PT06-14	0.5	92.0	2379.9	107.4
	1.0	106.3	2398.5	108.3
PT06-15	1.0	250.5	7836.9	353.8
	2.0	214.4	3014.0	136.1
PT06-16	0.2	124.9	1165.5	52.6
	0.5	134.5	1581.7	71.4
	1.0	165.7	2190.0	98.9
PT06-17	1.0	129.0	2756.9	124.5
PT06-18	1.0	107.4	2267.4	102.4
PT06-19	0.5	162.2	2971.9	134.2
	1.0	332.2	7375.7	333.0
PT06-20	1.0	164.6	4543.6	205.1
PT06-21	1.0	389.2	5807.5	262.2
PT06-22	0.5	107.4	2211.5	99.8
	1.0	195.9	2608.3	117.8
PT06-23	0.5	170.4	3160.7	142.7
	1.0	292.5	5148.4	232.4
PT06-24	1.0	185.3	3452.7	155.9
PT06-25	0.1	123.7	2365.3	106.8
	0.5	161.1	2742.9	123.8
	1.0	416.2	3645.0	164.6

PT06-26	1.0	227.2	4005.1	180.8
PT06-27	1.0	145.6	3176.5	143.4
PT06-28	0.5	189.6	3793.1	171.2
	1.0	300.0	3000.0	135.4
	2.0	430.0	5172.4	233.5
PT06-29	0.5	150.0	2733.6	123.4
	1.0	200.0	2768.2	125.0
	2.0	400.0	2148.8	97.0
PT06-30	1.0	208.8	3818.1	172.4
PT06-31	0.5	89.9	1372.5	62.0
	1.0	159.3	2151.2	97.1

◎ B16F10세포계에서 약용작물 추출물에 의한 melanin생성 저해율로 보아 광향, 길경, 익모초, 상지, 고본, 방풍, 토사자, 사삼, 울금, 세신, 감송향, 사인 등이 두드러진 효능을 보여 이들에 대한 세포계내 tyrosinase활성 저해를 추가적으로 살펴 봄.

표 3-4. 약용작물 열수 추출물에 의한 B16F10세포계의 tyrosinase활성 저해율

	Control (mg/ml)	(-) α -MSH(%)	(+) α -MSH(%)	%of (+) α -MSH
Control	0	100.0	515.0	100.0
Arbutin	0.1	120.0	259.5	50.4
PT06-02	1.0	166.0	495.2	96.2
PT06-03	2.0	102.1	571.2	110.9
PT06-04	1.0	89.4	518.3	100.6
PT06-06	1.0	119.1	538.1	104.5
PT06-10	1.0	123.4	449.0	87.2
PT06-11	1.0	110.6	505.1	98.1
PT06-12	1.0	127.7	435.8	84.6
PT06-13	0.5	40.0	366.2	71.1
	1.0	0.0	206.0	40.0
PT06-14	0.5	88.9	591.8	114.9
	1.0	92.1	367.9	71.4
PT06-15	1.0	101.9	543.0	105.4
	2.0	174.5	350.0	68.0
PT06-16	0.2	80.9	42.9	8.3

	0.5	34.0	168.4	32.7
PT06-31	0.5	77.8	453.0	88.0
	1.0	127.7	353.3	68.6

◎ Tyrosinase활성 저해에 두드러진 효능을 나타내는 후보 약용작물 중 약리 성분 및 세포독성에 대한 데이터, 국내 농가 재배나 채취 가능한 종으로 중심으로 길경, 울금, 세신, 감송향, 토사자, 사인, 승마 등을 선별함.

(3) 앞의 실험결과를 바탕으로 선별한 한방약용작물이 멜라닌 합성 과정에 관여하는 tyrosinase-related proteins (TRPs; tyrosinase, TRP-1, TRP-2)에 직접적인 영향을 분자수준에서 알아보았으며, 실험결과는 대체적으로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 발현을 억제하는 것으로 나타났음.

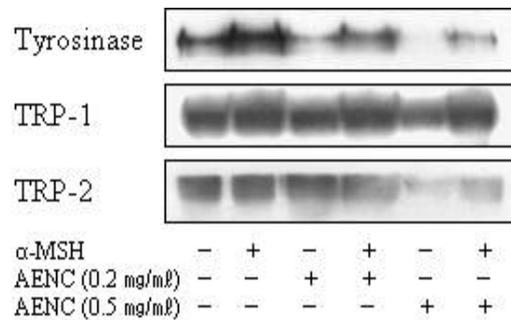


그림 3-1. 감송향의 멜라닌합성 저해 기능

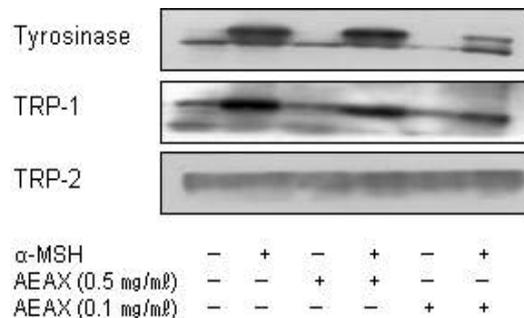


그림 3-2. 사인의 멜라닌합성 저해 기능

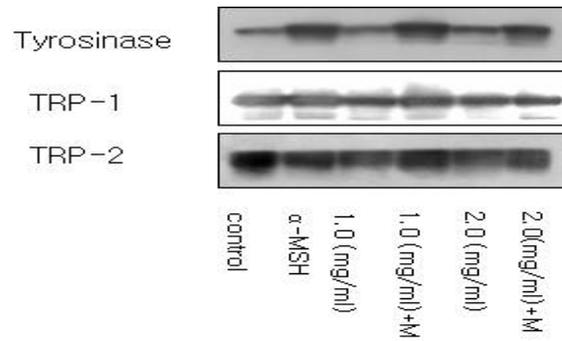


그림 3-3. 세신의 멜라닌합성 저해 기능

2. Melanin합성 억제 소재 분리와 효능 기전연구

미백 기능성 소재 추출을 위한 방법으로 열수 추출과 유기용매 분획법을 채택하였음. 각각의 유기용매 분획에 대해 미백 효능성을 검정하였으며, 미백 효능성이 높은 유기용매 분획은 ODS open column chromatography를 사용하여 소재의 정제도를 향상시켰음.

가. ODS open column chromatography를 이용한 분획

미백활성을 나타내는 약용작물의 EtOAc층을 감압 증류하여 반고형 조추출물을 얻음. 조추출물 중 일부를 소량의 증류수에 녹인 후 ODS open column chromatography를 이용하여 여러 개의 분획 (fraction)으로 나눔. 컬럼은 유리필터 컬럼 66×200 mm (내경×길이), 고정상은 ODS (YMC gel silica, 50 μm, YMC CO. LTD.)를 사용하고, 용리액은 100% 증류수에서 시작하여 메탄올을 20%씩 증가시켜 사용하였으며, 100% 메탄올 이후에는 dichloromethane으로 잔류물질을 세척함. 이와 같이 하여 얻은 7개의 분획 (각 2 L)을 감압농축하고 동결 건조시켜 건조무게를 측정하였음.

(1) 각 약용작물의 분획 과정과 수득물

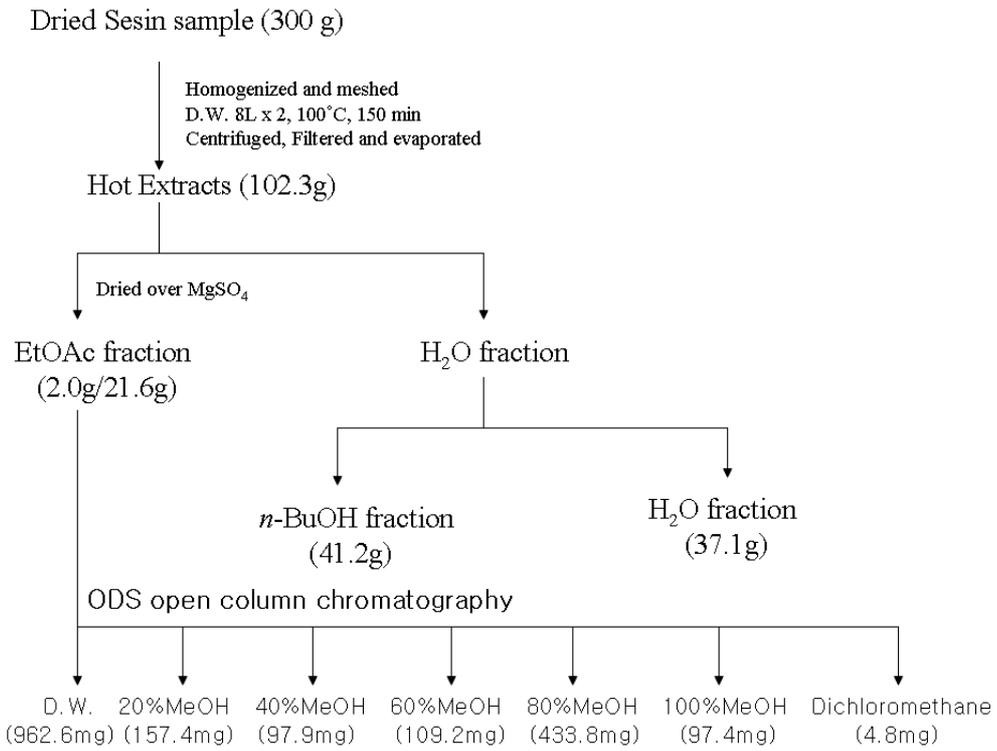


그림 3-4. 세신 분획 과정

표 3-5. 세신의 ODS open column chromatography를 이용한 분획

Samples				Dry weight (mg)	EtoAc층에 대한 수득률 (%)	
①	WC34 (세신)	Hot Ex.	EtOAc	ODS-D.W.	962.6	48.1
②		Hot Ex.	EtOAc	ODS-20%MeOH	157.4	7.9
③		Hot Ex.	EtOAc	ODS-40% MeOH	97.9	4.9
④		Hot Ex.	EtOAc	ODS-60% MeOH	109.2	5.5
⑤		Hot Ex.	EtOAc	ODS-80% MeOH	433.8	21.7
⑥		Hot Ex.	EtOAc	ODS-100% MeOH	97.4	4.9
⑦		Hot Ex.	EtOAc	ODS-M.C. (dichloromethane)	4.8	0.2

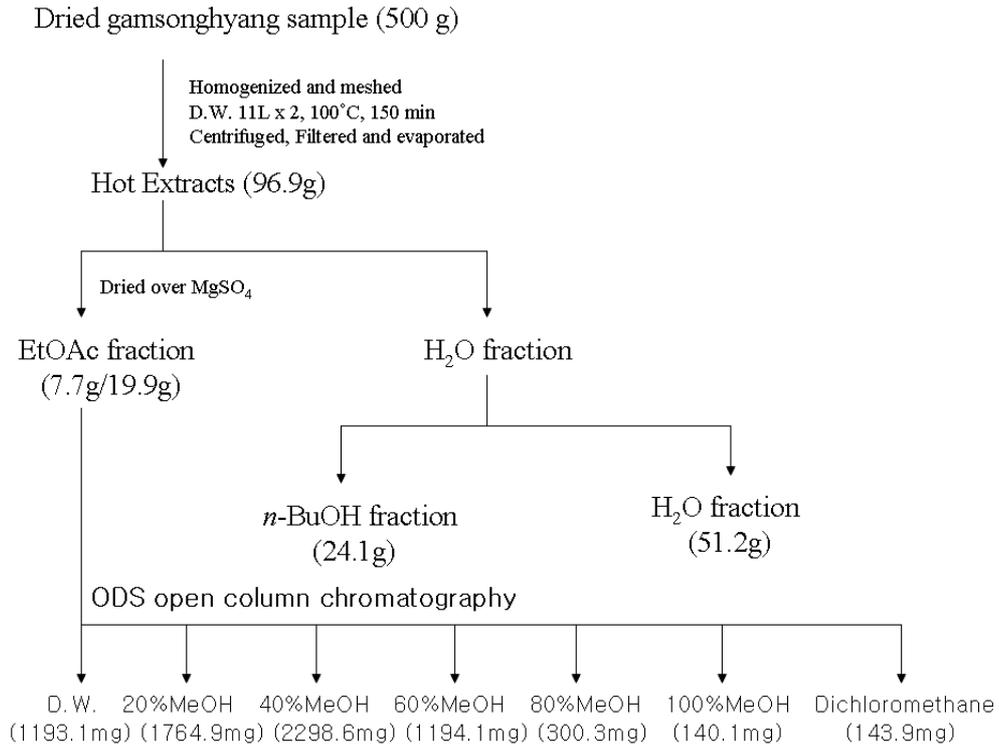


그림 3-5. 감송향 분획 과정

표 3-6. 감송향의 ODS open column chromatography를 이용한 분획

Samples				Dry weight (mg)	EtoAc층에 수득률 (%)	
①	WC35 (감송향)	Hot Ex.	EtOAc	ODS-D.W.	1193.1	15.5
②		Hot Ex.	EtOAc	ODS-20% MeOH	1764.9	22.9
③		Hot Ex.	EtOAc	ODS-40% MeOH	2298.6	29.9
④		Hot Ex.	EtOAc	ODS-60% MeOH	1194.1	15.5
⑤		Hot Ex.	EtOAc	ODS-80% MeOH	300.3	3.9
⑥		Hot Ex.	EtOAc	ODS-100% MeOH	140.1	1.8
⑦		Hot Ex.	EtOAc	ODS-M.C.(dichloromethane)	143.9	1.9

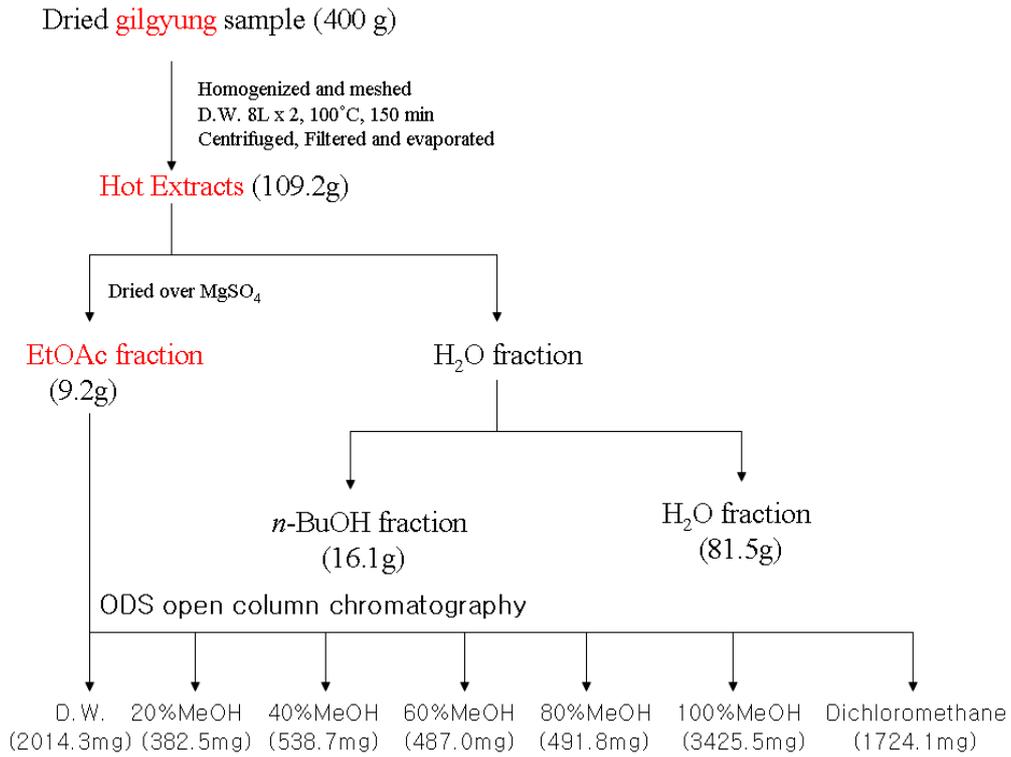


그림 3-5. 길경 분획 과정

표 3-7. 길경의 ODS open column chromatography를 이용한 분획

Samples				Dry weight (mg)	EtoAc층에 대한 수득률(%)	
①	WC31 (길경)	Hot Ex.	EtOAc	ODS-D.W.	2014.3	21.9
②		Hot Ex.	EtOAc	ODS-20% MeOH	382.5	4.2
③		Hot Ex.	EtOAc	ODS-40% MeOH	538.7	5.8
④		Hot Ex.	EtOAc	ODS-60% MeOH	487.0	5.3
⑤		Hot Ex.	EtOAc	ODS-80% MeOH	491.8	5.3
⑥		Hot Ex.	EtOAc	ODS-100% MeOH	3425.5	37.2
⑦		Hot Ex.	EtOAc	ODS-M.C. (dichloromethane)	1724.1	19.7

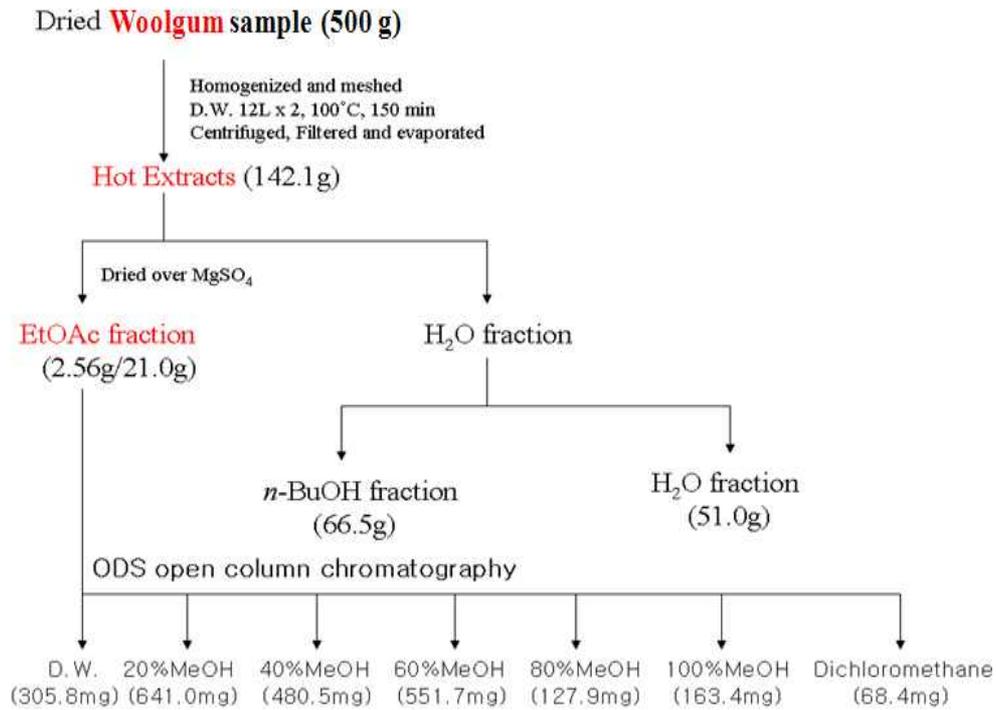


그림 3-7. 울금 분획 과정

표 3-8. 울금의 ODS open column chromatography를 이용한 분획

Samples				Dry weight (mg)	EtoAc층에 대한 수득률 (%)	
①	WC33 (울금)	Hot Ex.	EtOAc	ODS-D.W.	305.8	11.9
②		Hot Ex.	EtOAc	ODS-20% MeOH	641.0	25.0
③		Hot Ex.	EtOAc	ODS-40% MeOH	480.5	18.8
④		Hot Ex.	EtOAc	ODS-60% MeOH	551.7	21.6
⑤		Hot Ex.	EtOAc	ODS-80% MeOH	127.9	5.0
⑥		Hot Ex.	EtOAc	ODS-100% MeOH	163.4	6.4
⑦		Hot Ex.	EtOAc	ODS-M.C. (dichloromethane)	68.4	2.7

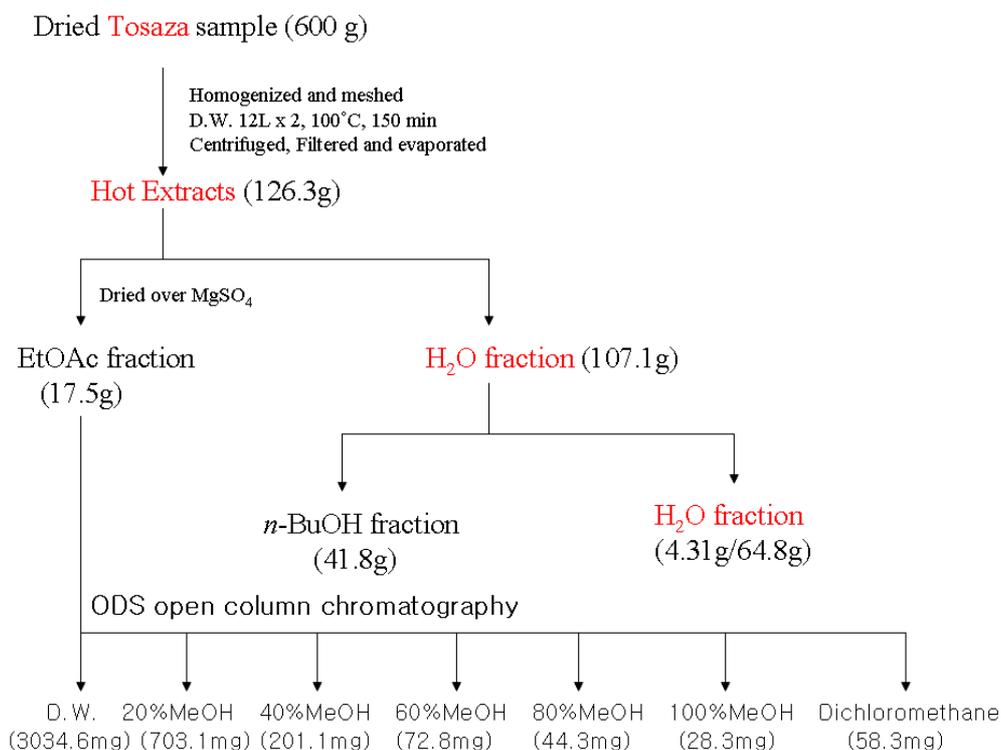


그림 3-8. 토사자 분획 과정

표 3-9. 토사자의 ODS open column chromatography를 이용한 분획

Samples				Dry weight (mg)	EtoAc층에 대한 수득률 (%)	
①	WC36 (토사자)	Hot Ex.	EtOAc	ODS-D.W.	3034.6	17.3
②		Hot Ex.	EtOAc	ODS-20% MeOH	703.1	4.0
③		Hot Ex.	EtOAc	ODS-40% MeOH	201.1	1.1
④		Hot Ex.	EtOAc	ODS-60% MeOH	72.8	0.4
⑤		Hot Ex.	EtOAc	ODS-80% MeOH	44.3	0.3
⑥		Hot Ex.	EtOAc	ODS-100% MeOH	28.3	0.2
⑦		Hot Ex.	EtOAc	ODS-M.C. (dichloromethane)	58.3	0.3

(2) ODS 분획의 in vitro tyrosinase inhibition 활성 조사

Mushroom tyrosinase를 이용한 in vitro enzyme assay 방법을 적용시킨 시스템으로 유효성분 추출물질을 조사하여 미백기능성 후보물질을 탐색함. [buffer (PBS pH 6.8 50 mM), 40 μ l Tyrosinase (60 u/ml), 40 μ l sample (0.5 mg/ml)를 RT 5 min 배양, 40 μ l tyrosine (0.1 mg/ml)로 37 $^{\circ}$ C 30min 배양 후 490 nm 측정을 3회 이상 행한 후 그 평균치를 비교함] : Mushroom tyrosinase 활성 억제에 대한 영향을 알아보기 위해 0.1 mg/ml의 동일한 농도로 처리하여 스크린 한 결과는 아래와 같음. 두드러진 분획은 관찰되지 않으며 울금 3분획, 세신 4분획, 감송향 1분획이 다소 나은 결과를 보였음.

표 3-10. Effect of Octadesyl silane Fractions on Tyrosinase Inhibition

약제명/분획	1	2	3	4	5	6	7
길경	-	-	-	2.72	4.76	4.76	-
울금	-	3.38	35.14	20.27	16.89	4.05	-
세신	-	20.26	28.76	31.21	24.20	7.01	-
감송향	33.16	25.51	28.06	30.61	14.80	10.20	4.59
토사자	-	2.74	13.01	-	-	-	3.42

활성이 다소 높은 분획 시료를 농도 별로 tyrosinase 활성저해를 조사하였음.

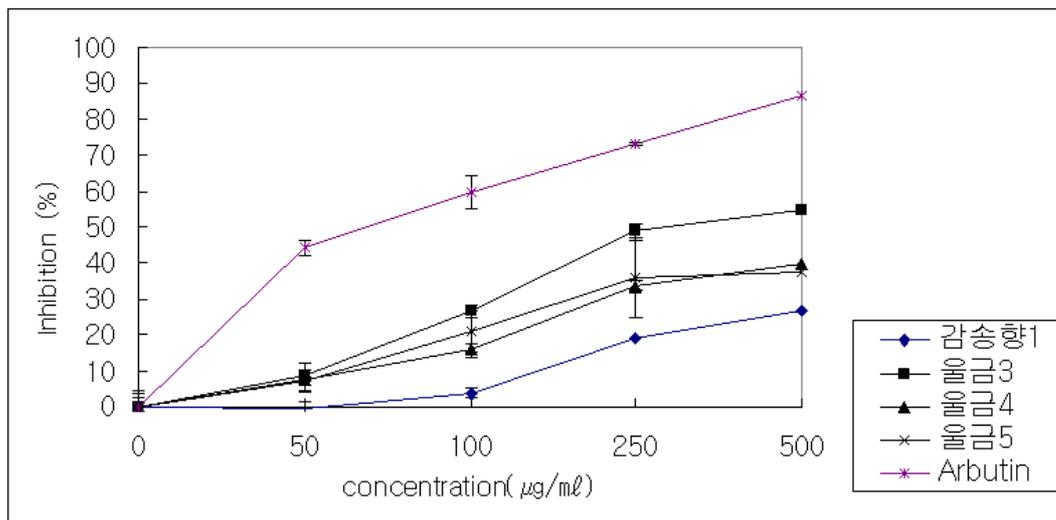


그림 3-9. ODS 분획의 농도에 따른 Tyrosinase Inhibition

나. ODS 분획의 세포계를 이용한 melanin합성 및 세포의 melanin분비량에 의한 일차 효능 선별

일반적으로 미백소재의 탐색은 짧은 시간 내 다량의 소재를 탐색할 수 있다는 용이성에 의해 비세포계의 mushroom tyrosinase활성을 조사하고 있으나 이는 생체내의 작용이 제한적인 단점이 있어 세포계를 이용한 미백기능성의 판정이 필수적이어 아래와 같이 B16F10세포계를 이용한 미백기능성을 살펴 봄.

(1) 추출물에 대한 세포독성 검사

후보물질을 배지에 희석하여 처리한 후 3일 경과 후 배지를 제거하고 MTT assay를 통해 세포독성을 살펴 봄. ODS open column chromatography를 이용한 7분획을 길경, 울금, 세신, 토사자는 1, 5, 10, 30 및 50 ug 등의 범위에서 처리하였고 감송향은 0.01, 0.03, 0.05, 0.01, 0.1, 0.3 0.5 및 1.0 ug 등의 범위 농도로 처리하였음. 결과로 보아 길경 및 세신은 10 ug/ml 농도에서 울금 및 토사자는 5 ug/ml 농도에서, 감송향은 2분획이 0.3 ug/ml 나머지 1 ug/ml농도 이하에서 세포독성이 약함을 알 수 있음.

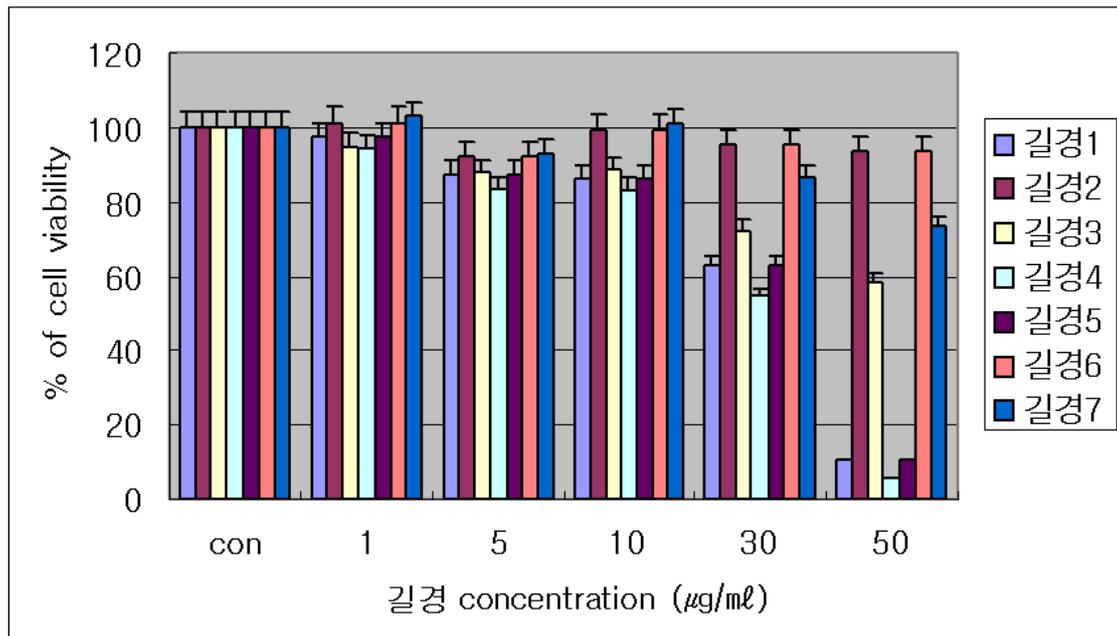


그림 3-10. 감송향 ODS 분획의 세포 독성 검사

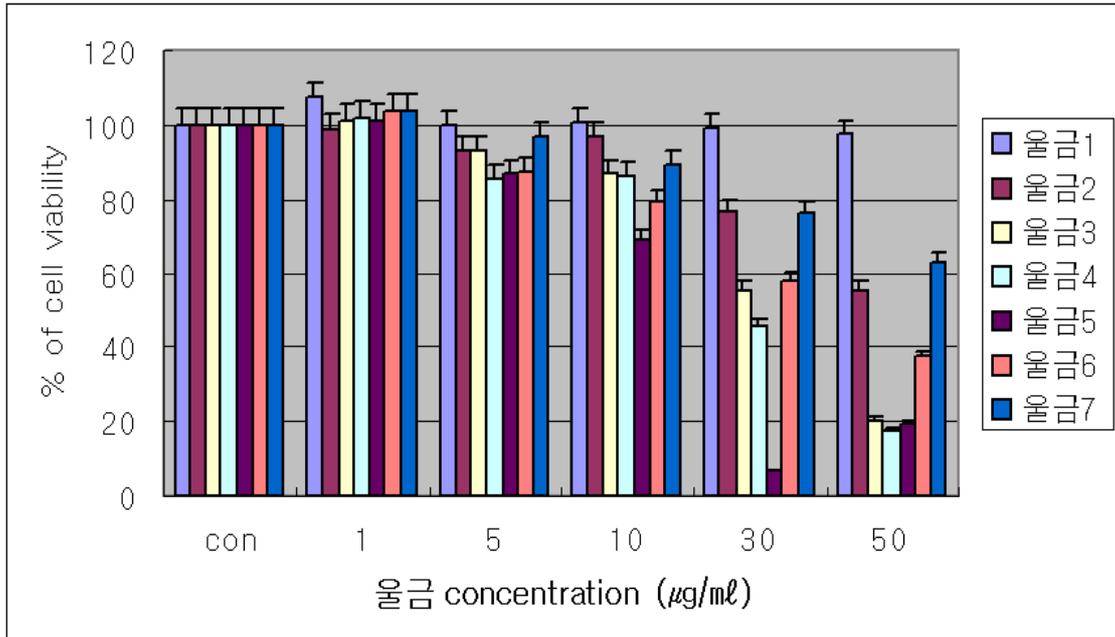


그림 3-11. 올금 ODS 분획의 세포 독성 검사

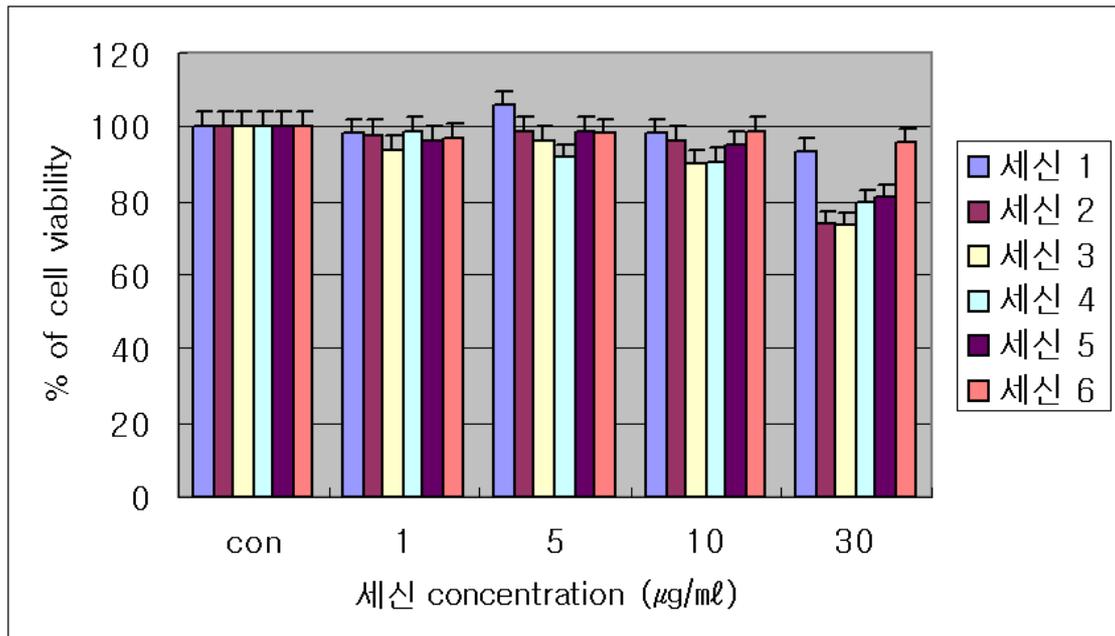


그림 3-12. 세신 ODS 분획의 세포 독성 검사

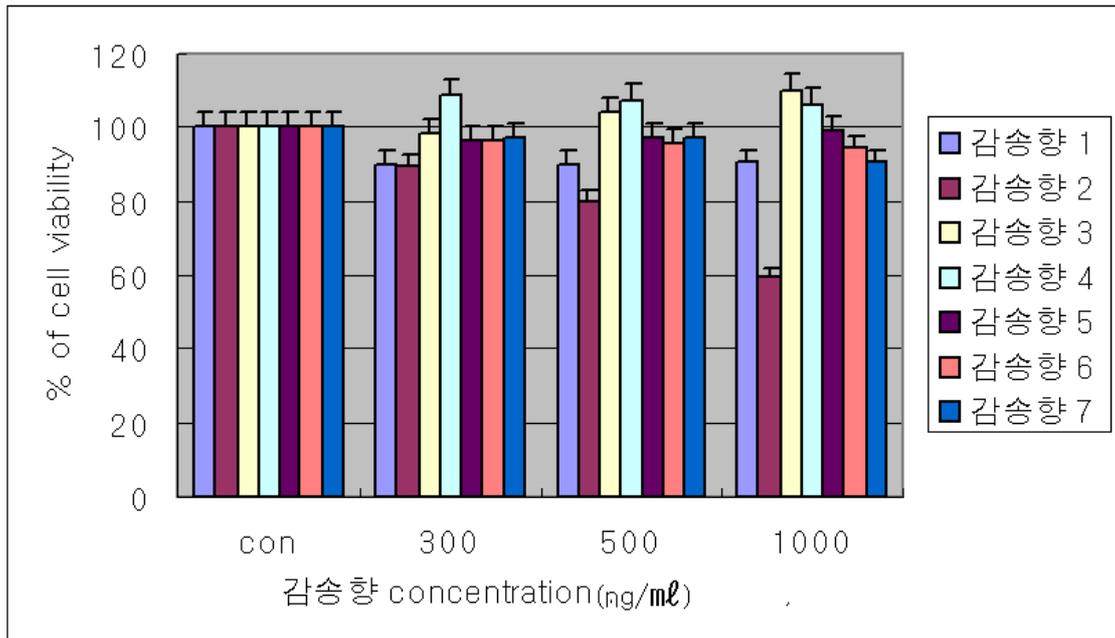


그림 3-13. 감송향 ODS 분획의 세포 독성 검사

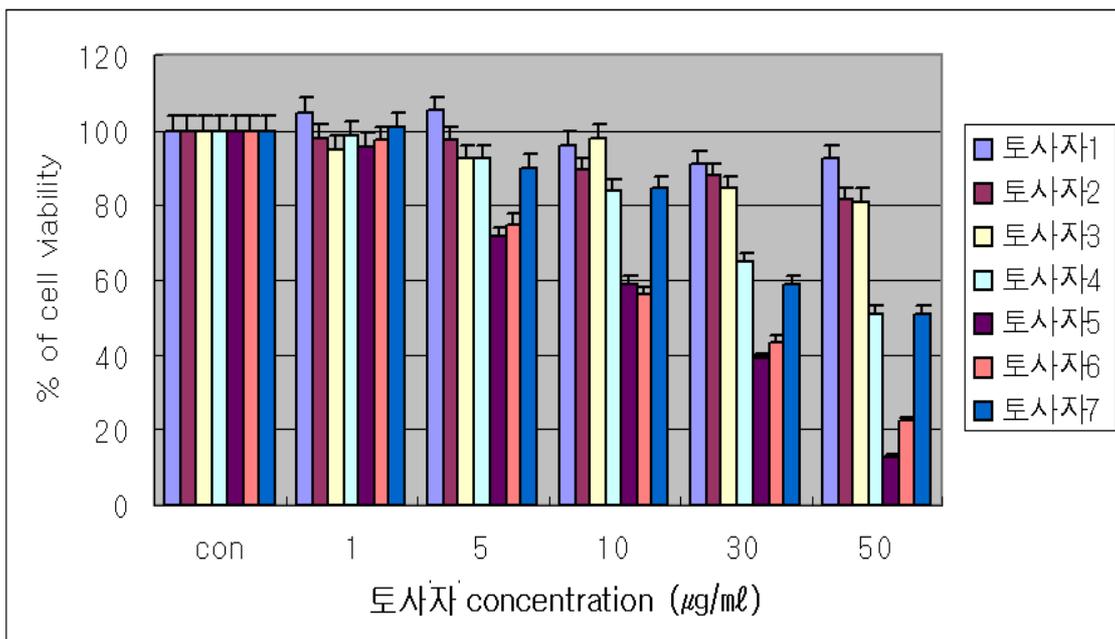


그림 3-14. 토사자 ODS 분획의 세포 독성 검사

(2) 세포내 멜라닌생성에 미치는 영향

멜라닌생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 arbutin을 50 ug/ml의 농도로 처리하고 실험군과 같은 조건으로 배양하여 대조군으로 사용하였음. MTT 결과에 의한 세포성장에 저해를 주지는 않는 농도로 처리한 결과 멜라닌 생성에는 길경의 4분획, 울금의 2분획, 세신의 4분획, 감송향의 3분획, 토사자의 5분획이 저해 효과를 보였음.

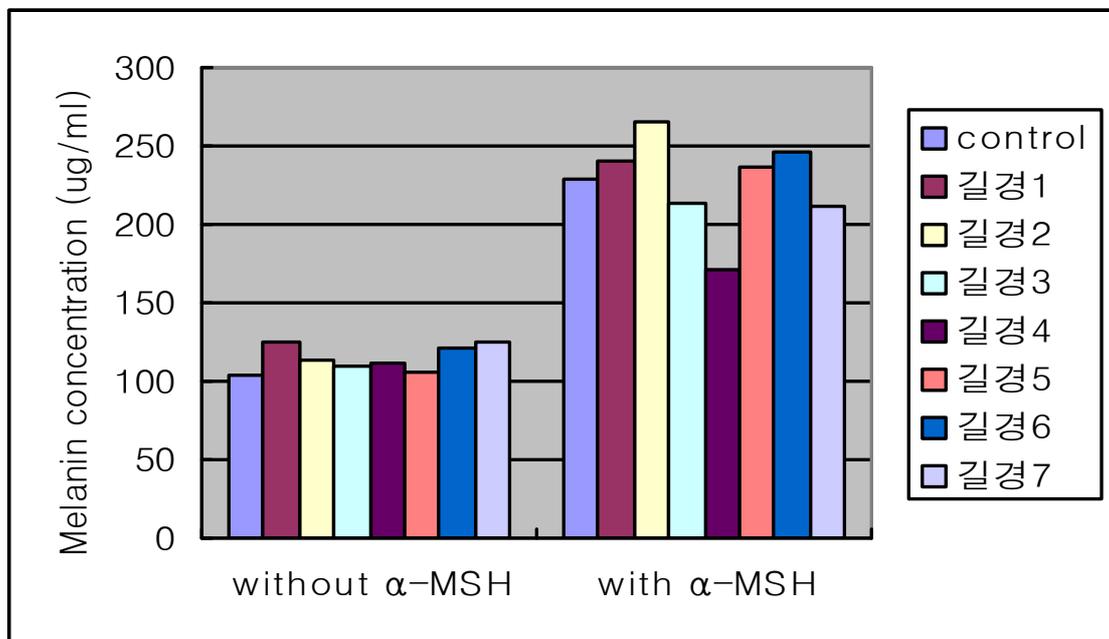


그림 3-15. 길경 분획의 melanin 합성 저해 효과

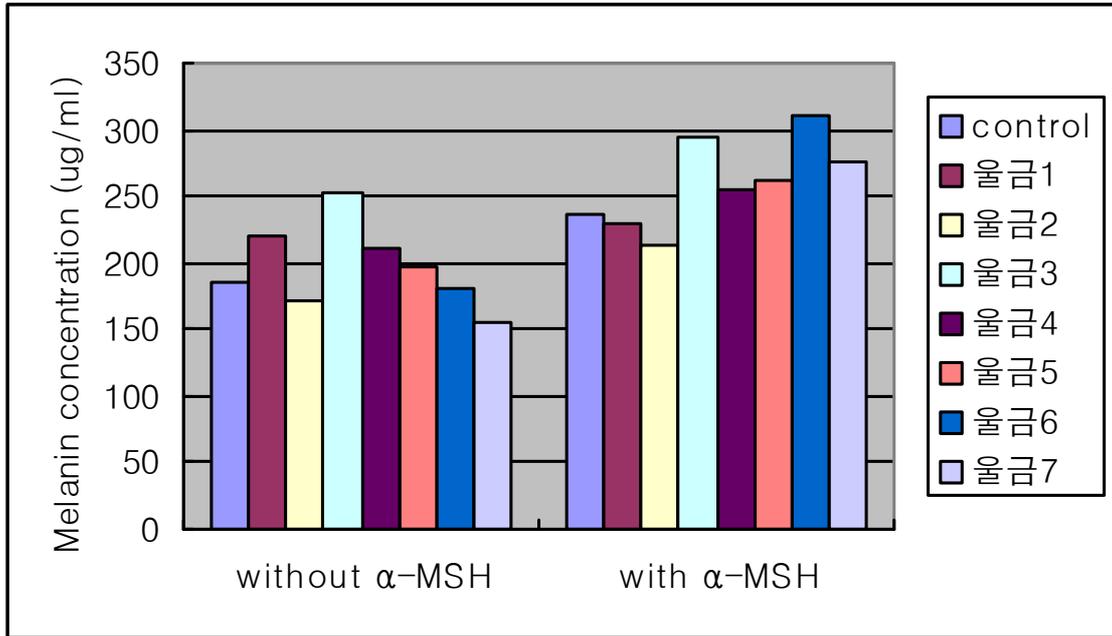


그림 3-16. 올금 분획의 melanin 합성 저해 효과

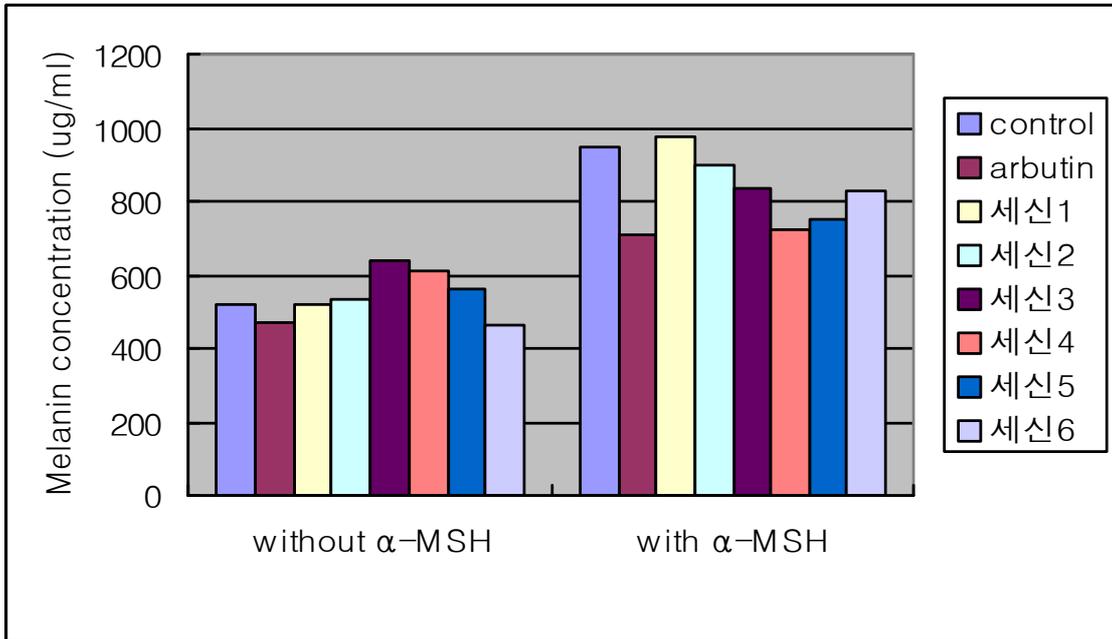


그림 3-17. 세신 분획의 melanin 합성 저해 효과

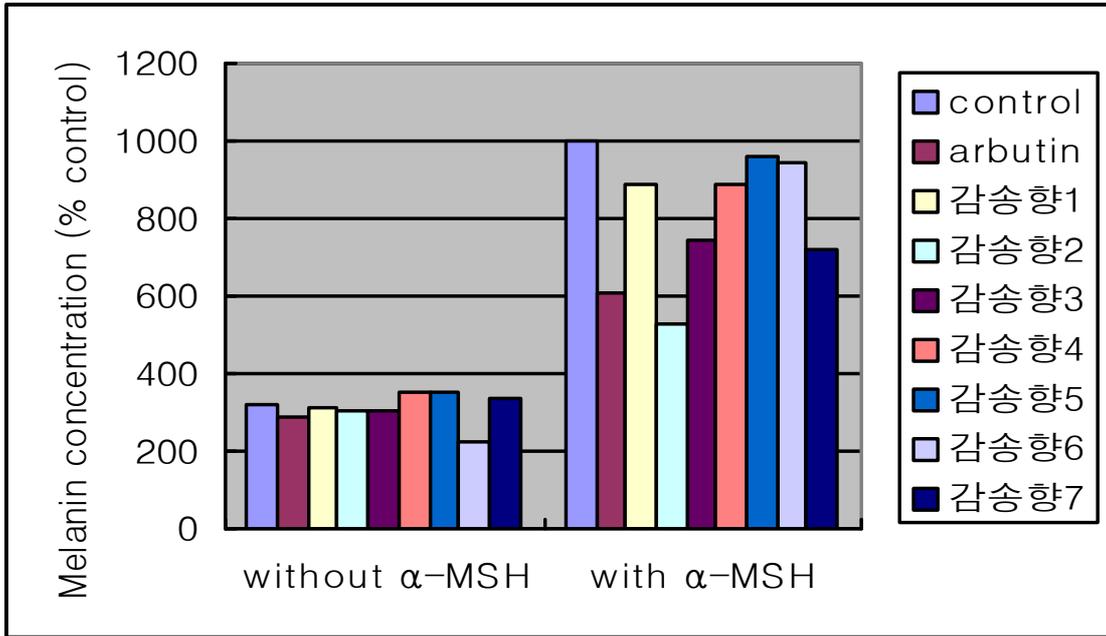


그림 3-18. 감송향 분획의 melanin 합성 저해 효과

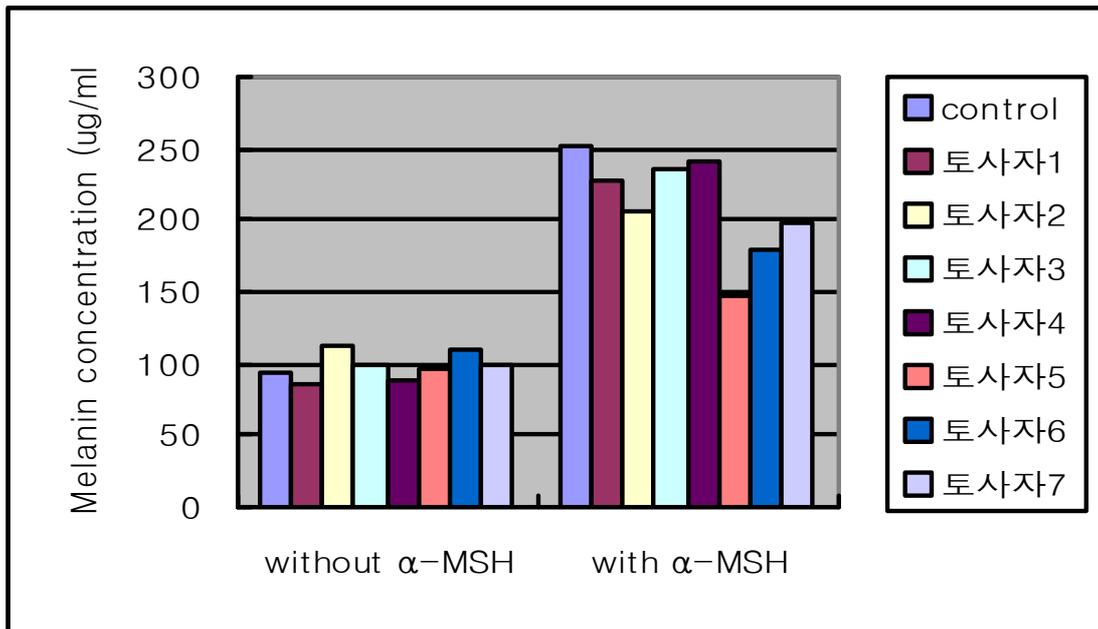


그림 3-19. 토사자 분획의 melanin 합성 저해 효과

(3) 세포외 멜라닌 양에 미치는 영향

세포외 분비된 멜라닌양은 각 추출물에서 현저한 영향을 주지 않으나 감송향 3분획이 특히 낮은 값을 보여 주었음.

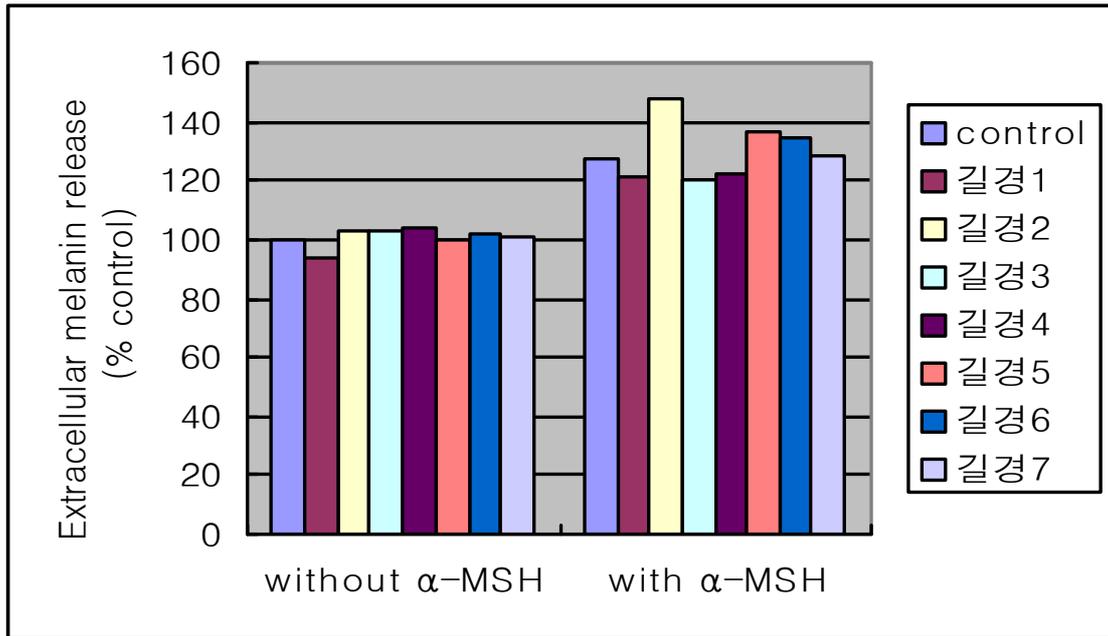


그림 3-20. 감송향 분획의 세포외 melanin 량 저해 효과

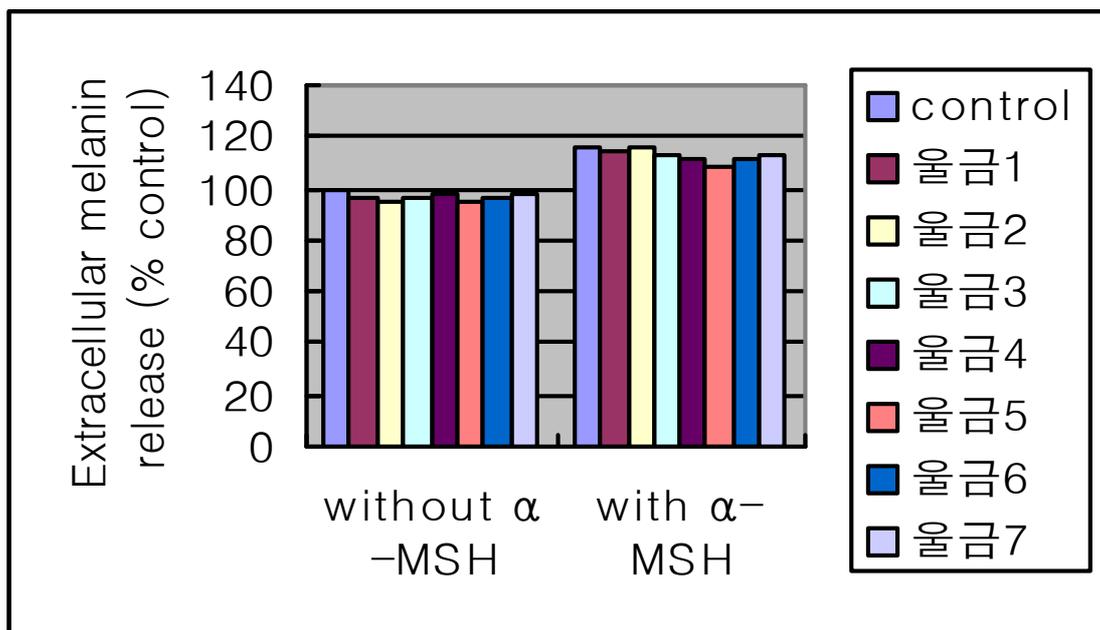


그림 3-21. 울금 분획의 세포외 melanin 량 저해 효과

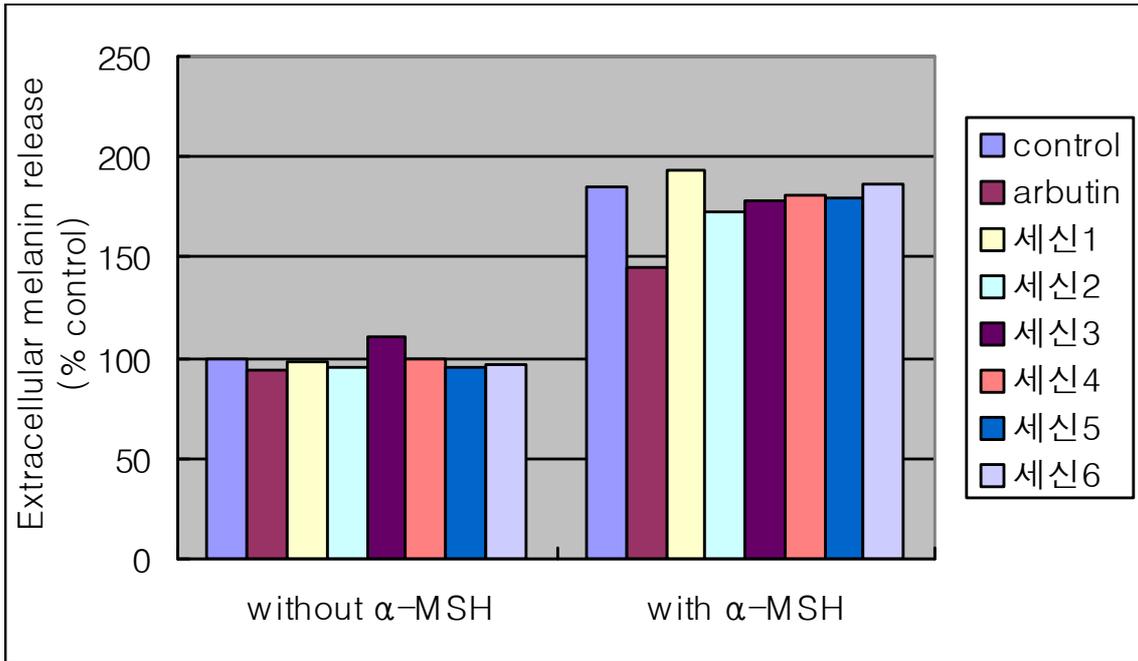


그림 3-22. 세신 분획의 세포외 melanin 량 저해 효과

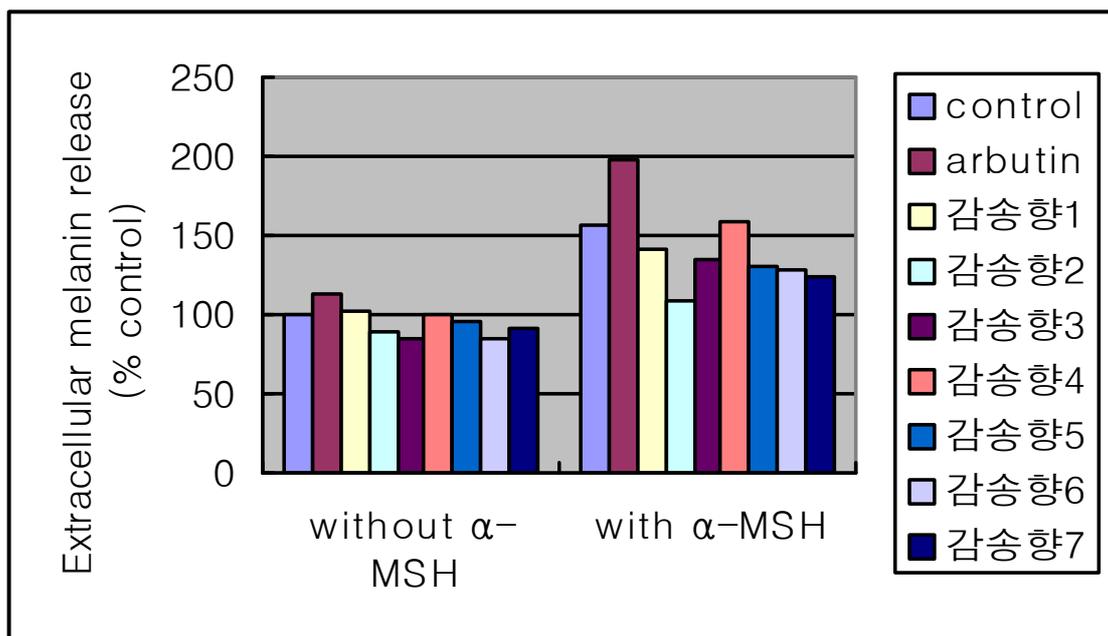


그림 3-23. 감송향 분획의 세포외 melanin 량 저해 효과

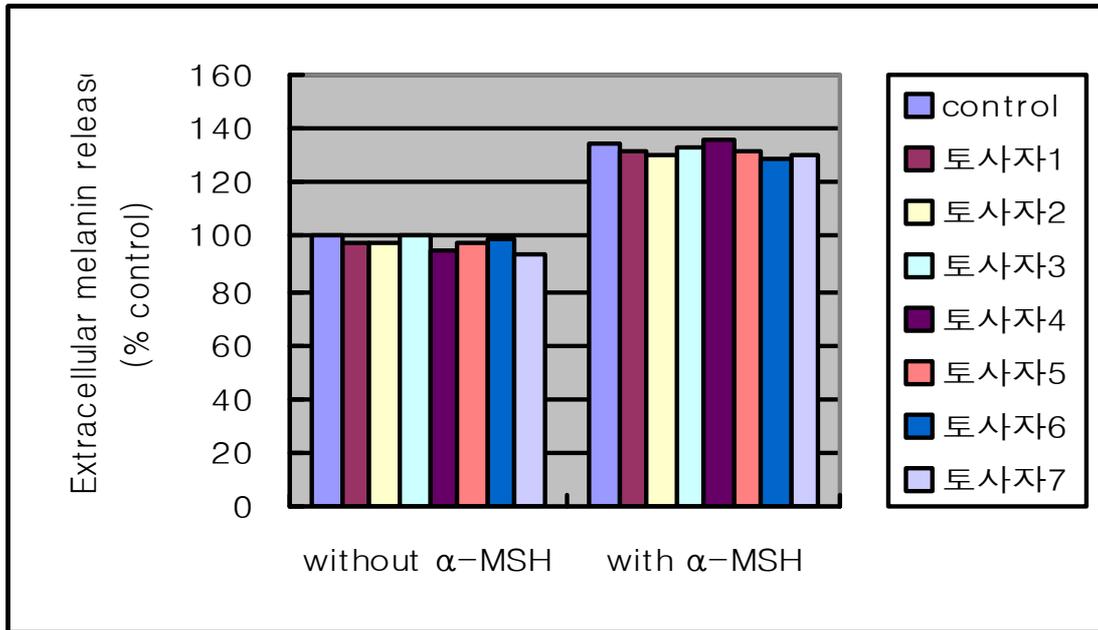


그림 3-24. 토사자 분획의 세포외 melanin 량 저해 효과

(4) 세포내 Tyrosinase 활성화에 미치는 영향

멜라닌생성에 관해 조사한 동일한 농도의 분획물과 α -MSH를 함께 처리한 후 2일간 배양하여 tyrosinase활성도를 측정한 결과 감송향 1 및 2분획, 토사자의 5 및 6분획이 낮은 tyrosinase활성을 보였다.

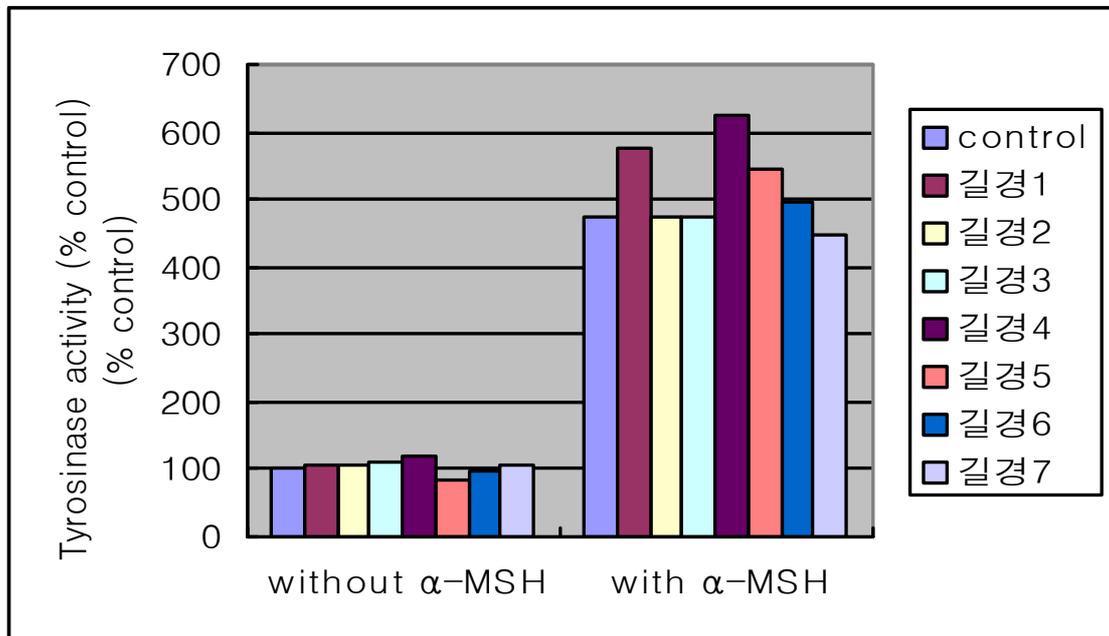


그림 3-25. 길경 분획의 세포 Tyrosinase 활성 저해 효과

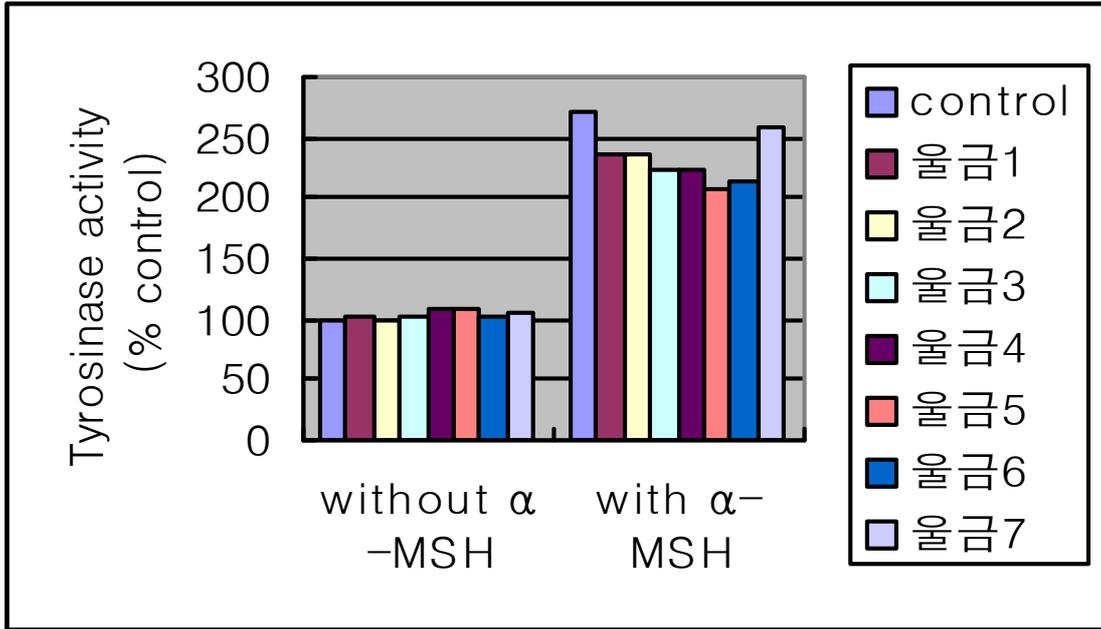


그림 3-26. 올금 분획의 세포 Tyrosinase 활성 저해 효과

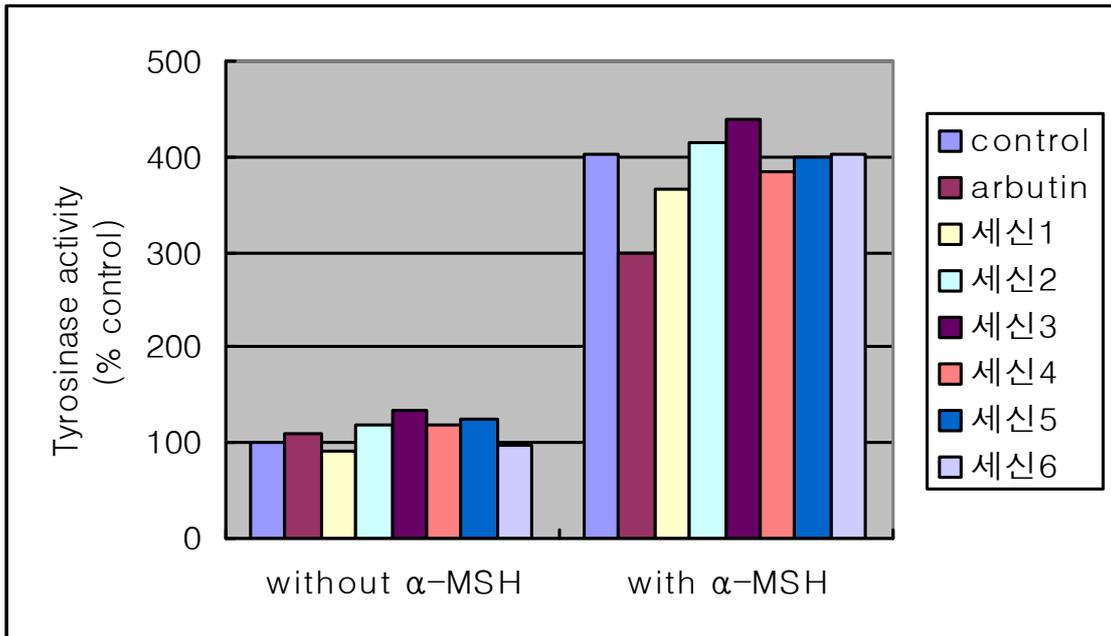


그림 3-27. 세신 분획의 세포 Tyrosinase 활성 저해 효과

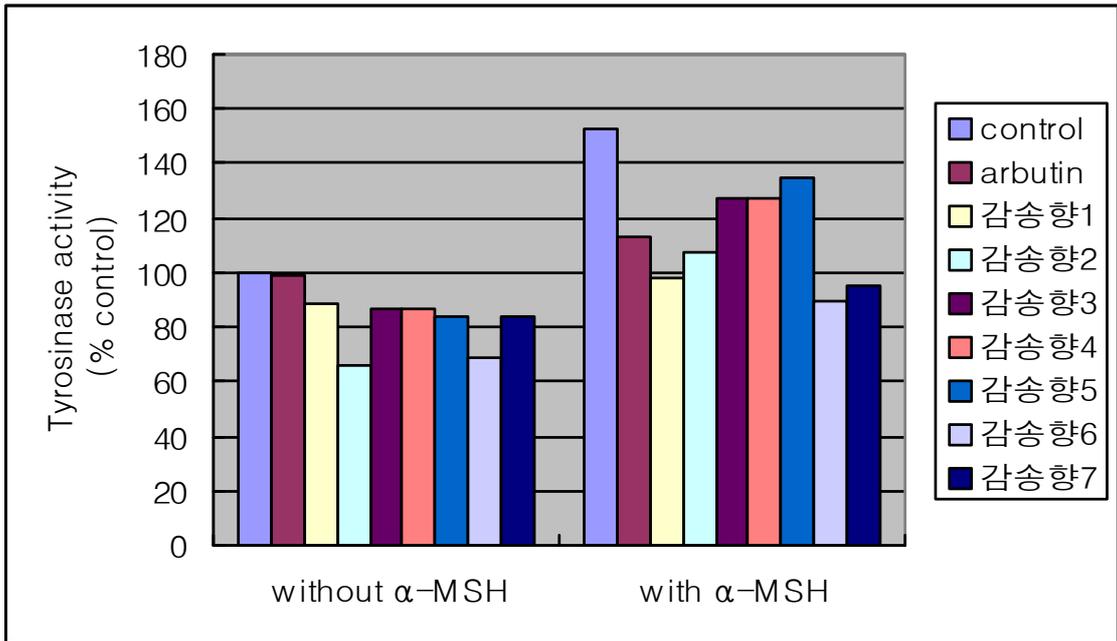


그림 3-28. 감송향 분획의 세포 Tyrosinase 활성 저해 효과

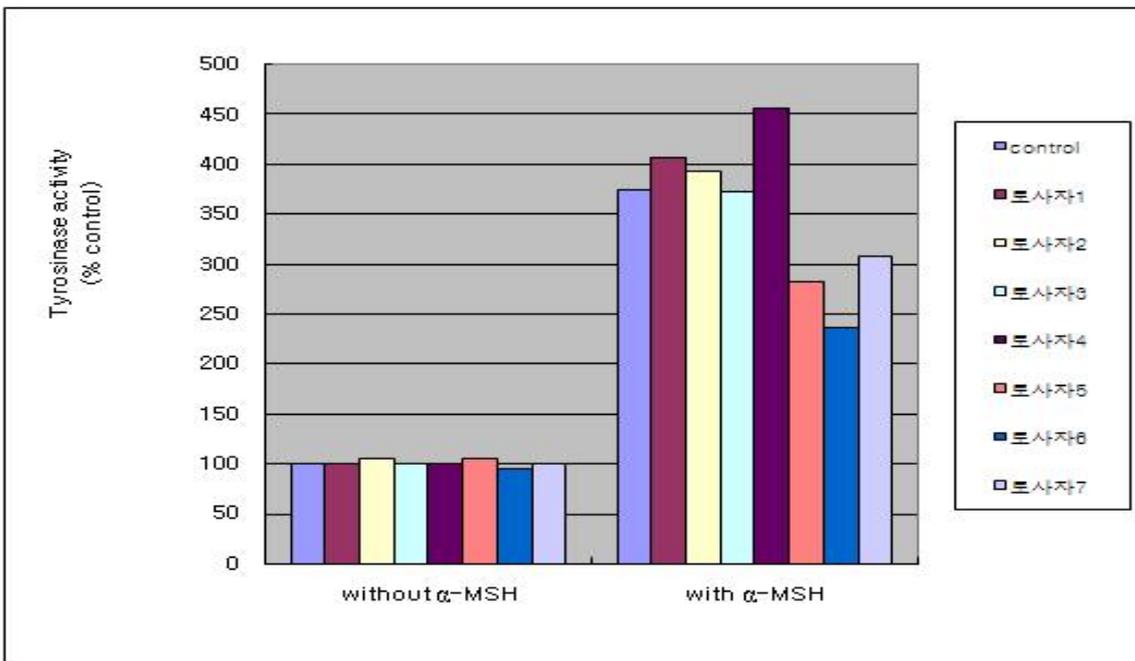


그림 3-29. 토사자 분획의 세포 Tyrosinase 활성 저해 효과

다. 승마로부터 미백소재의 추출방법

약용작물 승마는 미백소재의 분리 및 구조 분석의 과정을 거쳤음으로 별도 기재 함. 승마(건조중량, 30g)를 세절한 후 초기 추출 용매로 물(300 ml) 또는 80% 메탄올(300 ml) 또는 100% 메탄올(300 ml)로 각각 3시간 동안 환류시키고 실온까지 냉각시킨 후 여과지를 이용하여 감압 여과하였음. 상기와 같은 방법으로 3회 실시하여 얻어진 여과액(300 ml × 3회)을 40℃에서 감압 농축하여 각각의 물 추출물, 80% 메탄올 추출물 및 100% 메탄올 추출물을 얻었음. 상기에서 제조된 물추출물 및 80% 메탄올 추출물에는 50% 메탄올을 가하여 재용해하고, 100% 메탄올 추출물에는 95% 메탄올 용액을 가하여 재용해 하였음. 각각의 용매 추출물을 동량의 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트의 순으로 용매 분획 후 40℃에서 감압 농축하여 각 용매 분획추출물을 제조하였음.

그림 3-30은 대표적으로 승마추출물의 메탄올 분획 단계를 나타내었고 표 3-11과 표 3-12는 각각 승마의 건조중량 30g 당 각 용매별 수득량 및 수득율과 각 용매 추출물의 추가 용매분획추출물의 수득량 및 수득율을 나타내었음.

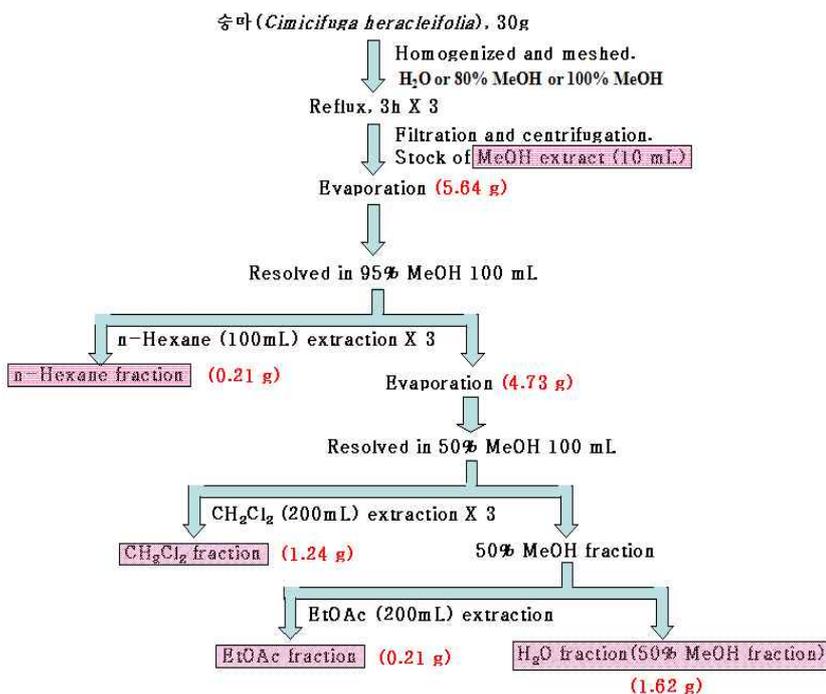


그림 3-30. 승마로부터 유효성분 추출 scheme

표 3-11. 승마의 각 추출 용매별 수득량 및 수득률

1차 추출용매	수득량(g)	수득율(%)
물	8.53	28.4
80% 메탄올	8.91	29.7
100% 메탄올	5.64	18.8

표 3-12. 1차 추출용매의 분획 추출용매의 수득량 및 수득률

1차 추출용매	분획 추출용매	수득량 (g)	수득율 (%)
물	헥산	0.04	0.1
	디클로로메탄	0.30	1.0
	에틸아세테이트	0.50	1.7
	물	4.50	15.0
80% 메탄올	헥산	0.33	1.1
	디클로로메탄	1.17	3.9
	에틸아세테이트	1.26	4.2
	물	5.49	18.3
100% 메탄올	헥산	0.21	4.0
	디클로로메탄	1.24	4.1
	에틸아세테이트	0.21	0.7
	물	1.62	5.4

(1) In vitro Tyrosinase 활성 억제

50 mM 인산완충용액(pH 7.2) 120 ul에 100ug/ml 농도 tyrosine 40 ul 와 60 unit tyrosinase 40 ul를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 tyrosinase 활성을 측정하였으며(T, total tyrosinase 활성), 이때 승마 추출 시료액을 각각의 농도별로 상기의 반응액에 추가로 첨가하여 반응시켜 tyrosinase 활성이 감소되는 (R, 감소된 tyrosinase 활성) 추출 시료액에 대하여 다음의 계산식을 적용하여 억제율(I, %)로 나타내었음. 각 추출용매 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 tyrosinase 억제율을 조사한 결과는 다음과 같음. 각 추출 분획물을 농도별로 실험한 결과는 표 3-13과 같으며 물, 80% 메탄올, 100% 메탄올 추출물에서 각각 디클로로메탄 분획물이 높은 활성억제 효과를 나타내었음.

표 3-13. 농도별 Tyrosinase 저해율 결과 (단위: %)

1차 추출용매	분획 추출용매	핵산	에틸아세테이트	디클로로메탄
물	500 μ g/ml	미약	39.89 \pm 2	85.84 \pm 0.7
	250 μ g/ml	미약	38.46 \pm 1.2	90.43 \pm 2.6
	100 μ g/ml	미약	33.11 \pm 0.5	86.44 \pm 4.1
	50 μ g/ml	미약	21.21 \pm 1	80.27 \pm 1.8
80%메탄올	500 μ g/ml	미약	52.27 \pm 2.4	90.96 \pm 0.5
	250 μ g/ml	미약	49.42 \pm 2.8	90.14 \pm 2.2
	100 μ g/ml	미약	39.83 \pm 2.1	88.70 \pm 0.6
	50 μ g/ml	미약	29.54 \pm 2.5	85.26 \pm 1.9
100%메탄올	500 μ g/ml	43.37 \pm 3.4	65.45 \pm 0.7	92.22 \pm 1.2
	250 μ g/ml	40.06 \pm 7.0	65.66 \pm 3.9	91.25 \pm 0.7
	100 μ g/ml	22.44 \pm 3.3	62.06 \pm 5.4	89.97 \pm 1.2
	50 μ g/ml	17.63 \pm 2.0	53.45 \pm 5.6	86.70 \pm 1.8

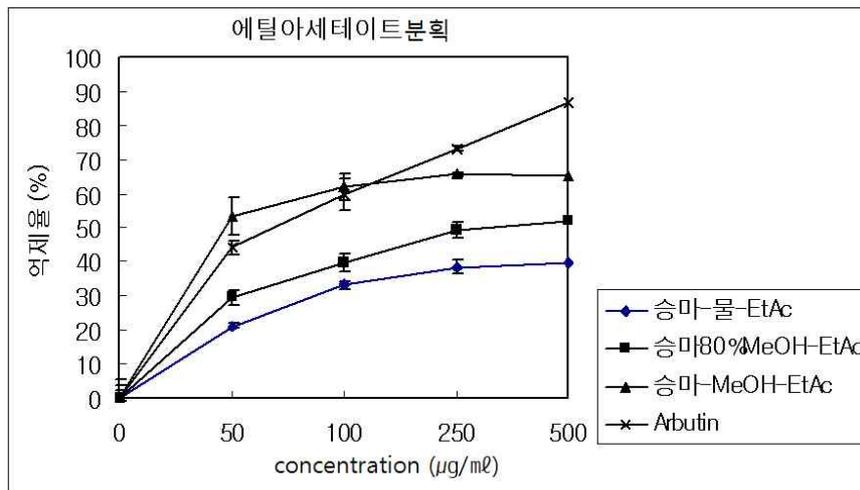


그림 3-31. 각 용매 추출물의 에틸아세테이트 분획 및 알부틴의 활성억제율 비교

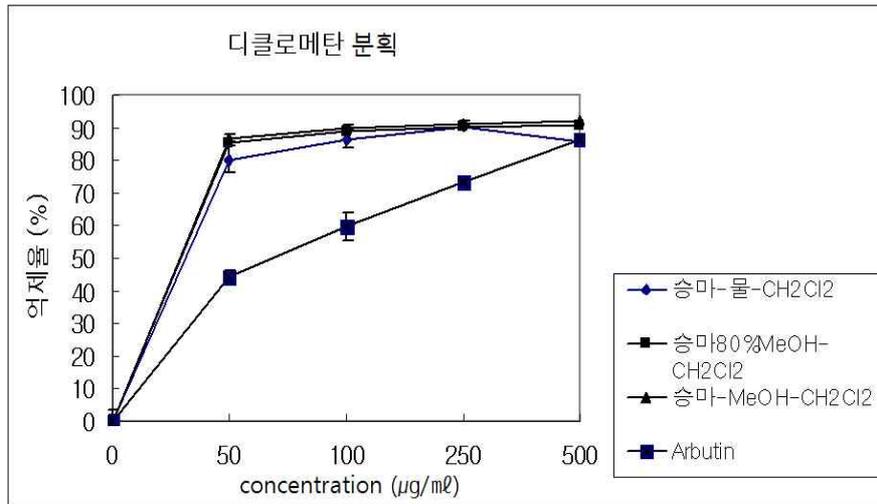


그림 3-32. 각 용매 추출물의 디클로메탄 분획 및 알부틴의 활성억제율 비교

(2) B16F10 세포계에서의 승마의 미백기능성 검사

(가) 승마 추출물의 세포성장 저해율

승마 추출물의 세포처리 가능 농도를 알아보기 위해 B16F10 세포 성장에 대한 승마 추출물의 영향을 MTT assay로 알아 본 결과 아래와 같음. 각 추출물에서 10 µg/ml의 농도가 세포 성장에 저해를 주지 않았으며 세포형태의 관찰에서도 α-MSH를 단독으로 처리한 세포의 경우에 멜라닌세포의 특징적인 형태인 수지상 세포돌기가 관찰되었으며, 이러한 현상은 승마 추출물로 처리한 군에서도 관찰되어 형태적 변화를 보여 주지 않았음.

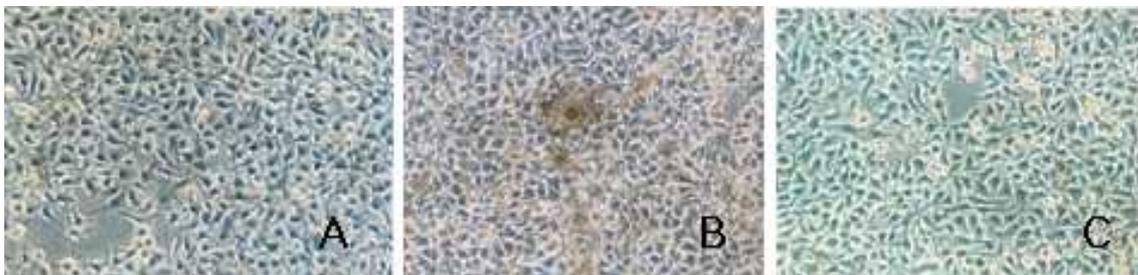


그림 3-33. 승마 추출물처리에 대한 B16F10세포의 형태적 변화.

A; 정상군 B; 대조군(α-MSH처리군) C; 승마추출물처리군

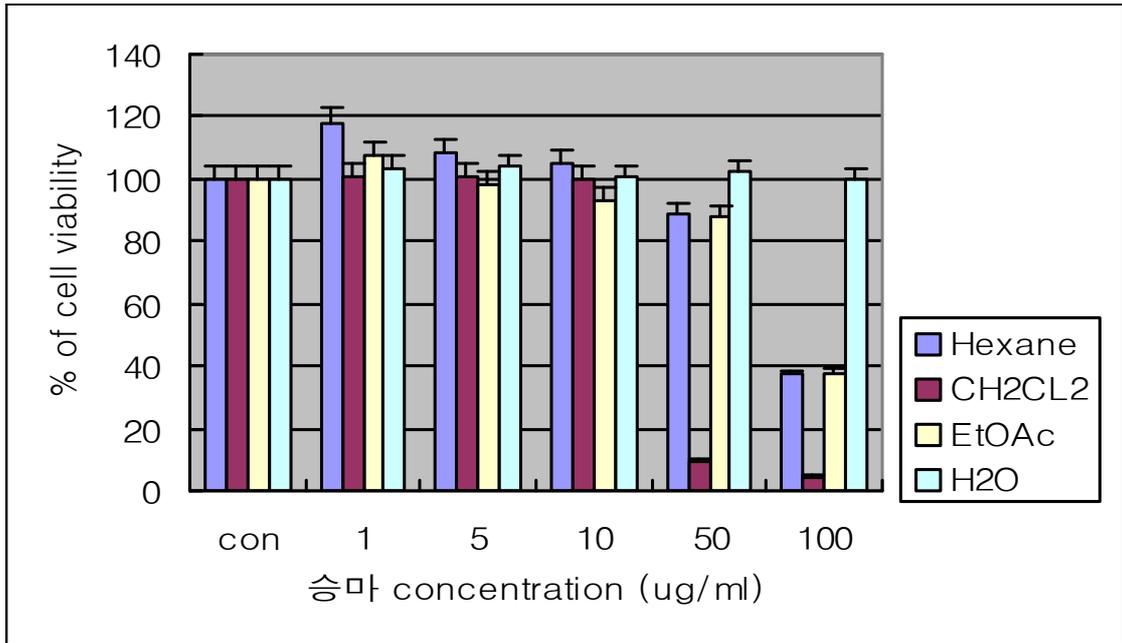


그림 3-34. 물 추출물 각 분획의 B16F10 세포에 대한 성장 저해율

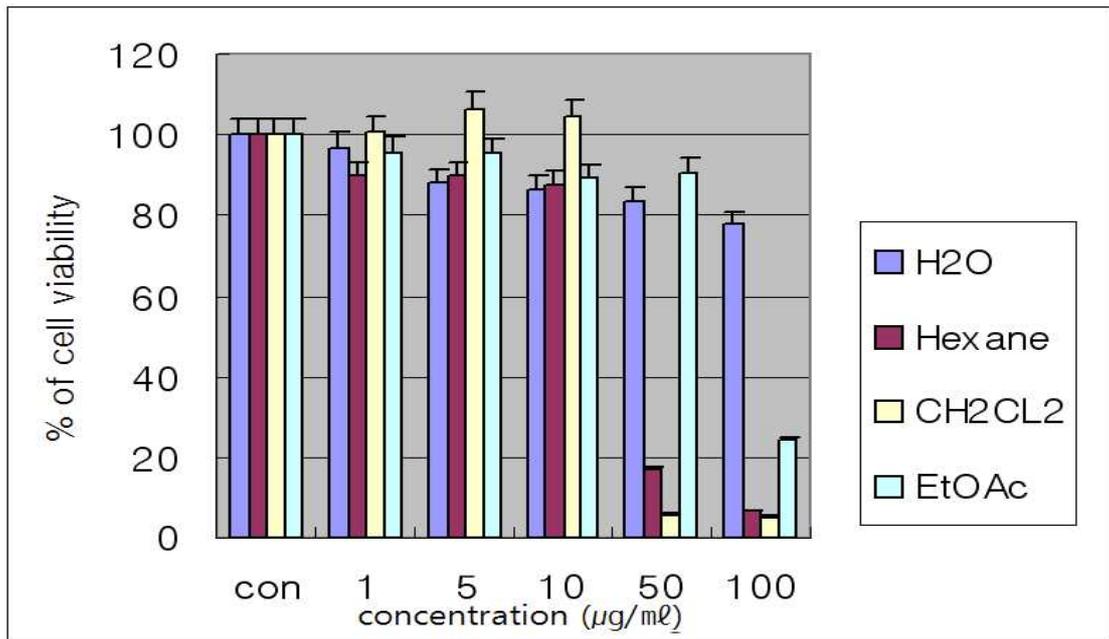


그림 3-35. 80% MeOH 각 분획의 B16F10 세포에 대한 성장 저해율

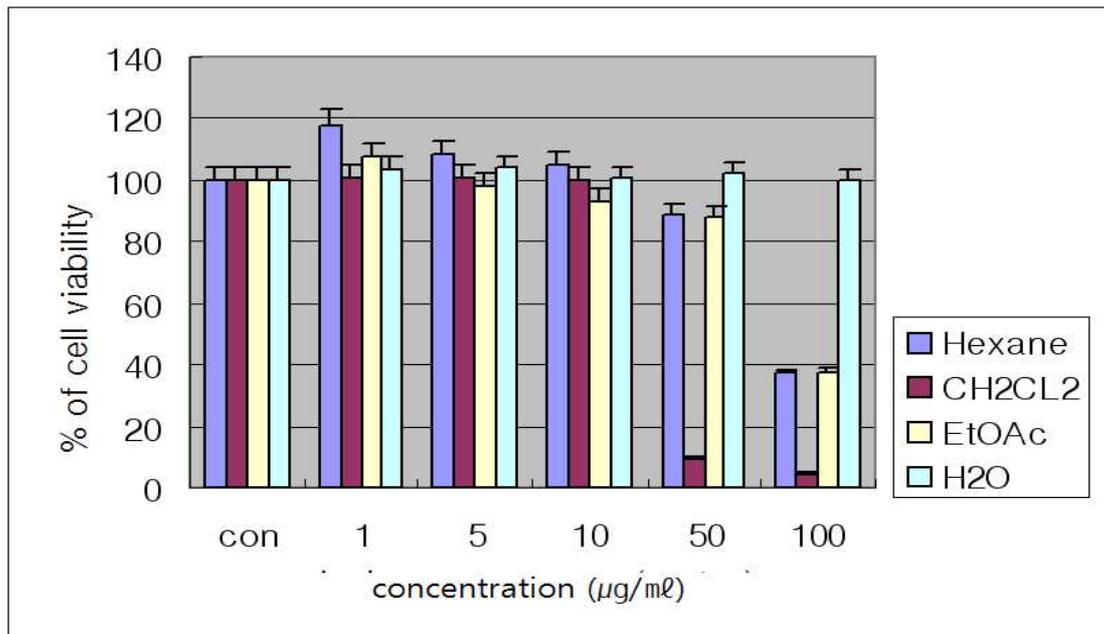


그림 3-36. 100% MeOH 각 분획의 B16F10 세포에 대한 성장 저해율

(나) 승마 추출물의 세포내 멜라닌생성에 미치는 영향

B16F10세포내 멜라닌생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 승마 추출물 각 분획을 처리하여 5일간 배양한 결과는 표 3-14와 같으며 모든 추출물 중 디클로로메탄 분획의 억제율이 가장 높았음.

표 3-14. 세포내 멜라닌생성에 미치는 영향

추출용매	농도	헥산	디클로로메탄	에틸아세테이트	물
물	10 µg/ml	미약	25.0	8.3	4.2
80% 메탄올	10 µg/ml	미약	21.2	미약	미약
100% 메탄올	10 µg/ml	10.6	26.5	13.6	13.3

(다) 세포외 멜라닌생성에 미치는 영향

승마 추출물과 α-MSH를 처리한 다음 5일간 배양 후 배양액을 취하여 세포외로 분비되는 멜라닌 양을 조사한 결과 아래와 같음.

표 3-15. 세포외 멜라닌분비에 미치는 영향

추출용매	농도	헥산	디클로로메탄	에틸아세테이트	물
물	10 $\mu\text{g/ml}$	5.7	23.7	28.8	21.2
80% 메탄올	10 $\mu\text{g/ml}$	21.1	30.9	14.1	8.0
100% 메탄올	10 $\mu\text{g/ml}$	24.0	42.4	11.3	25.8

(라) Tyrosinase 활성에 미치는 영향

세포성장에 영향을 주지 않는 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 승마 추출물과 α -MSH를 함께 처리한 후 2일간 배양하여 tyrosinase 활성도를 측정한 결과 α -MSH에 의해 유도된 tyrosinase 활성은 승마 추출물에 의해 아래와 같은 억제율을 보이며 특히 100% 메탄올의 디클로로메탄의 억제율이 가장 현저하였음.

표 3-16. 승마 추출물의 B16F10 세포내 티로시네이즈활성 억제율 (단위 : %)

추출용매티로시네이즈활성	농도	헥산	디클로로메탄	에틸아세테이트	물
물	10 $\mu\text{g/ml}$	8.6	23.3	29.8	32.7
80% 메탄올	10 $\mu\text{g/ml}$	23.3	35.7	40.9	34.3
100% 메탄올	10 $\mu\text{g/ml}$	36.3	46.8	33.4	30.6

(마) 100% 메탄올의 디클로로메탄의 추출물의 효능

승마 추출물 중 100% 메탄올의 디클로로메탄의 억제율이 가장 높았음. 보다 정확한 검정을 위해 추가적인 반복 실험한 결과 아래와 같이 높은 억제율을 보이며 이 중 특히 100% 메탄올의 디클로로메탄이 가장 현저한 효과를 보였음.

표 3-17. 100% 메탄올의 디클로로메탄 분획 억제 효과

농도	Tyrosinase	세포내 멜라닌	세포외멜라닌
물1	9.9 \pm 0.2	48.3 \pm 10.4	26.5 \pm 6.0
80% 메탄올	16.0 \pm 1.5	24.6 \pm 7.4	24.1 \pm 10.3
100% 메탄올	24.4 \pm 3.1	58.5 \pm 0.4	1.2 \pm 0.8

(3) ODS column 분획의 세포내 미백 기능

(가) ODS column 분획에 대한 세포독성

100% 메탄올의 디클로로메탄 분획물을 ODS column에 걸어서 얻어진 분획 1-6 샘플의 B16F10 세포에 처리 가능한 농도를 MTT assay로 알아본 결과는 아래와 같았음.

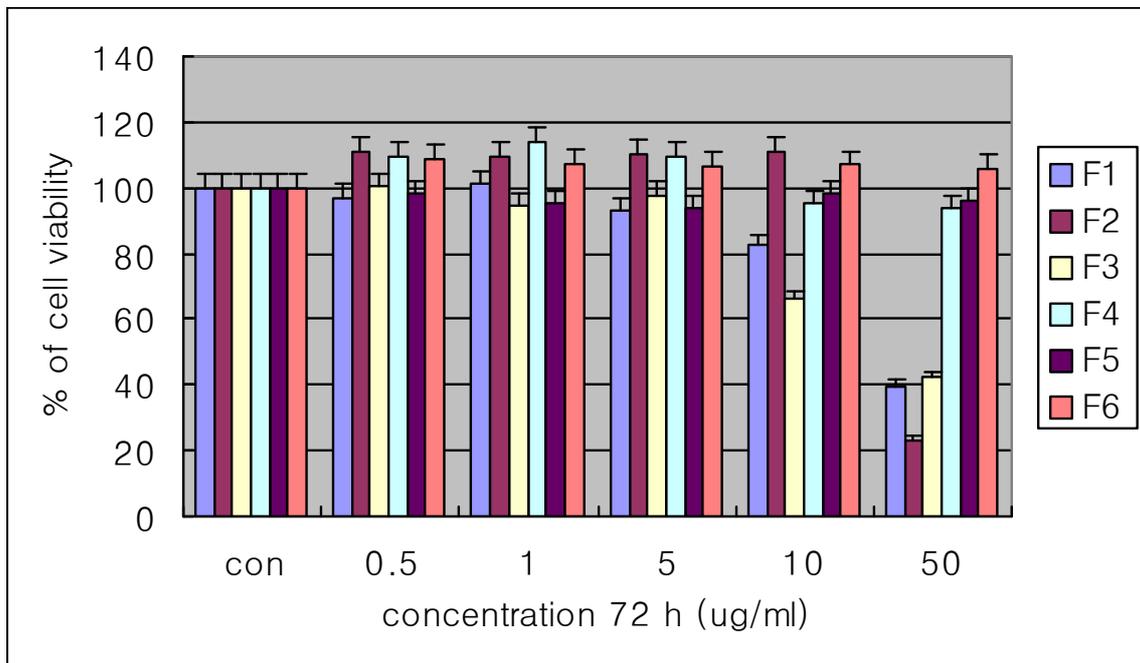


그림 3-37. ODS column 분획물의 B16F10 세포 성장 저해율

(나) ODS column 분획에 대한 미백기능성

모든 분획에서 세포성장에 저해를 주지 않는 5 µg/ml 농도로 세포에 처리하였을 때 저해를 주지 않는 효과를 살펴보았음. ODS column에 의해 얻어진 분획 1-6을 5 µg/ml 농도로 B16F10 세포에 처리하여 얻어진 결과는 표 3-18과 같으며 다양한 분획에서 tyrosinase 활성 억제 및 멜라닌생성 저해를 보였음.

표 3-18. ODS column 분획물 및 arbutin의 B16F10 세포계 내 tyrosinase 및 멜라닌생성 억제율 (단위: %)

분획	농도	Tyrosinase 활성	세포내멜라닌	세포외멜라닌
분획1	5 $\mu\text{g/ml}$	21.7 \pm 9.7	17.5 \pm 1.5	5.6 \pm 1.5
분획2	5 $\mu\text{g/ml}$	2.8 \pm 0.1	25.1 \pm 6.8	13.8 \pm 2.7
분획3	5 $\mu\text{g/ml}$	4.0 \pm 0.2	17.2 \pm 2.5	14.3 \pm 4.0
분획4	5 $\mu\text{g/ml}$	미약	47.2 \pm 9.6	19.4 \pm 6.7
분획5	5 $\mu\text{g/ml}$	8.0 \pm 2.6	35.1 \pm 16.7	17.9 \pm 6.3
분획6	5 $\mu\text{g/ml}$	21.7 \pm 10.4	39.1 \pm 10.0	14.3 \pm 5.9
Arbutin	50 $\mu\text{g/ml}$	26.5 \pm 5.1	42.9 \pm 0.8	25.3 \pm 2.6

F16F10 세포계에서의 승마 추출물의 tyrosinase 활성 억제 및 멜라닌생성저해 기능에 대한 객관적 비교 실험을 위해 미백기능성 화장품에 사용되고 있는 알부틴을 동일 세포계에 처리한 결과와 비교하였을 때 승마의 ODS column 분획물이 알부틴에 비해 매우 낮은 농도에서 tyrosinase 활성 억제 및 멜라닌생성 저해를 보여 미백 기능성 화장료로서의 효능을 갖춘 것으로 보여짐.

(4) 세포계내 100% 메탄올의 디클로로메탄의 MITF 관련 signal에 미치는 영향

승마(Cimicifugae rhizoma)추출물의 처리에 의한 B16 melanoma 세포의 멜라닌 합성감소 및 tyrosinase 활성도 억제와 연관된 기전 해석을 위하여 Western blotting을 통해 멜라닌 생성의 주 효소인 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2의 활성을 관찰하였음.

(가) MITF, tyrosinase와 TRP-1, TRP-2의 단백질 발현에 미치는 영향

승마의 디클로로메탄추출물을 처리하여 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2의 단백질 발현을 살펴 보았음. 아래와 같이 현저히 감소함을 확인할 수 있었으며, 특히 tyrosinases나 TRP-1의 발현을 제어하는 주요한 전사인자인 MITF의 발현이 감소되는 것을 관찰하였음. 이상의 결과는 승마의 디클로로메탄추출물에 의한 B16 melanoma 세포의 멜라닌 합성 억제결과와 매우 잘 일치함을 보여주었음.

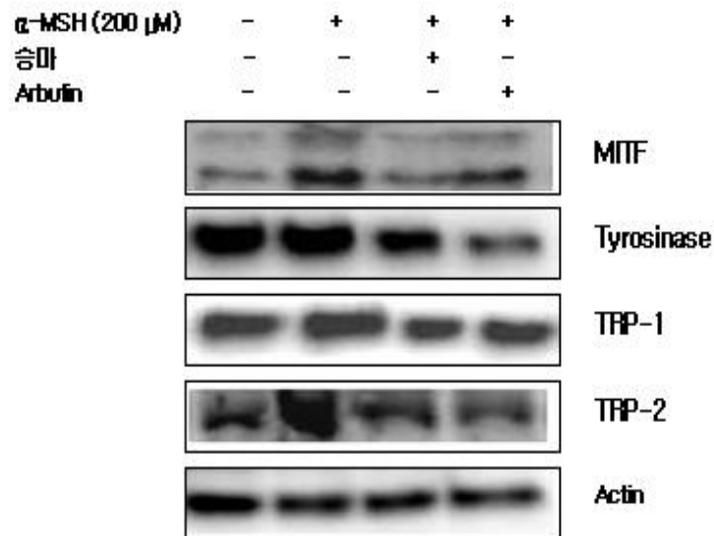


그림 3-38. 승마 디클로로메탄 분획의 TPRs 관련 단백질에 미치는 영향

(나) ERK-1/2의 활성화에 미치는 영향

최근 신호전달 경로 중에서 ERK 활성화가 tyrosinases나 TRP-1의 발현을 제어하는 주요한 전사인자인 MITF의 붕괴를 유발함으로써 멜라닌합성을 감소시키는 것으로 알려져 왔음. 따라서 승마추출물에 의한 ERK-1/2의 활성화를 조사하기 위하여 다양한 시간별로 추출물을 처리하여 ERK-1/2의 활성화를 측정하였음. 결과는 아래와 같이 ERK-1/2의 활성화가 6시간대로 지연되어짐을 확인하였음. 또한 상위 신호전달경로인 MEK 경로의 활성화와 또 다른 신호전달 경로인 Akt 활성화가 동일 시간대에서 활성화됨을 확인하였음.

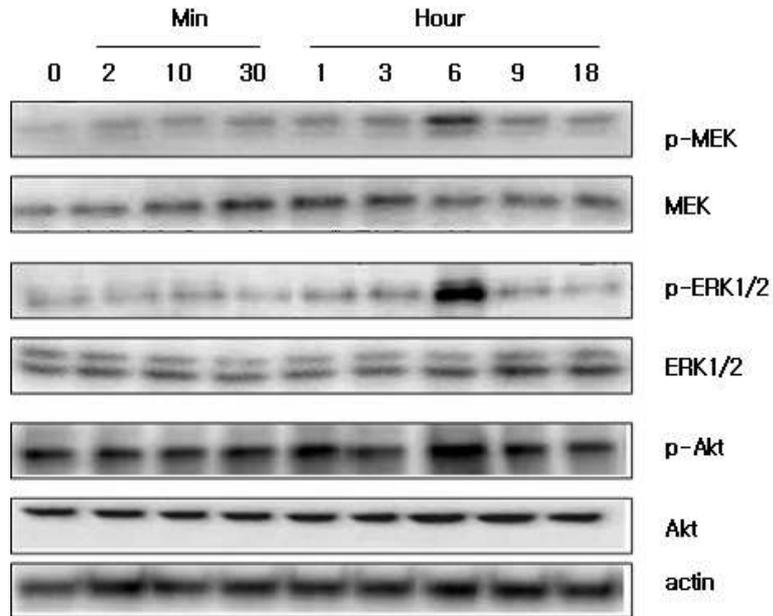
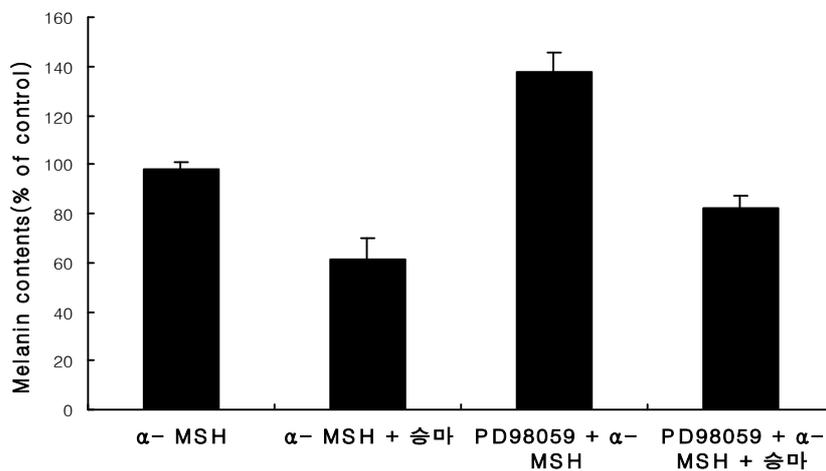


그림 3-39. 승마 디클로로메탄 분획의 멜라닌 합성 억제 단백질에 미치는 영향

(다) ERK 및 Akt 경로 저해제의 영향

관찰된 ERK-1/2의 활성화와 Akt 활성이 승마추출물에 의한 멜라닌 합성 억제 결과와 연관되는지를 확인하기 위하여 각각 ERK경로의 저해제인 PD98059와 Akt 경로 저해제인 LY294002를 사용하여 추출물에 의한 멜라닌 합성 억제효과가 회복되는지를 관찰하였음. 결과 아래에서 보는 바와 같이 PD98059와 LY294002 두 저해제에 의하여 추출물에 의한 멜라닌 합성 억제효과가 회복되는 것을 멜라닌 합성량과 tyrosinase 활성도로 확인할 수 있었음



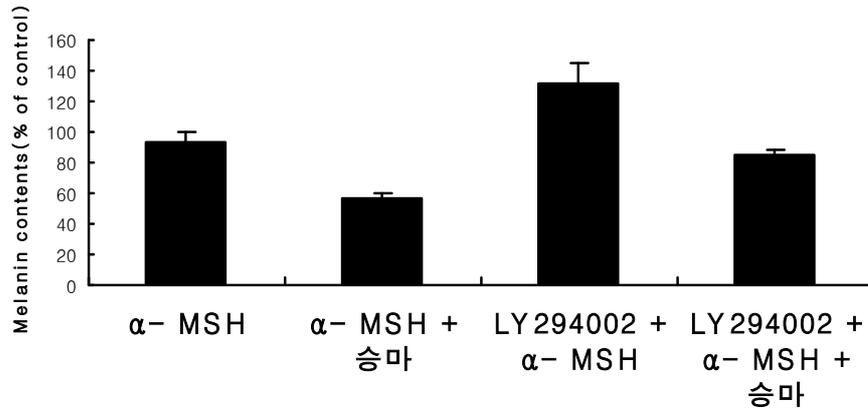


그림 3-40. ERK경로의 저해제인 PD98059와 Akt 경로 저해제인 LY294002에 의한 승마 디클로로메탄 분획의 멜라닌생성억제에 미치는 영향

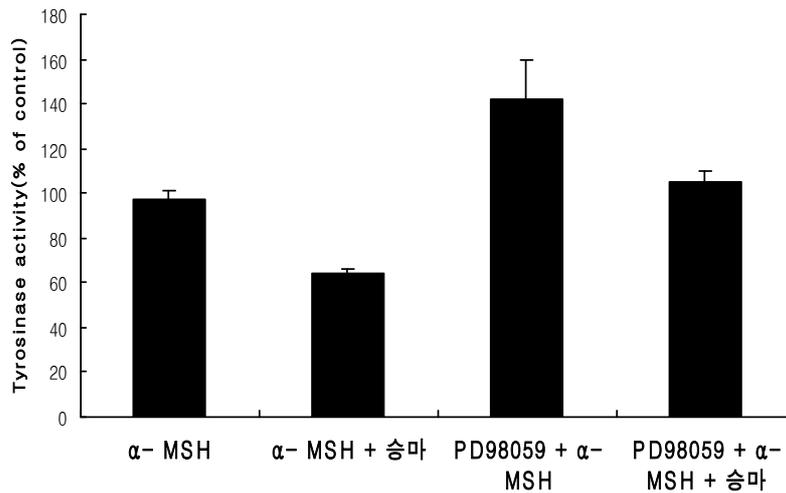
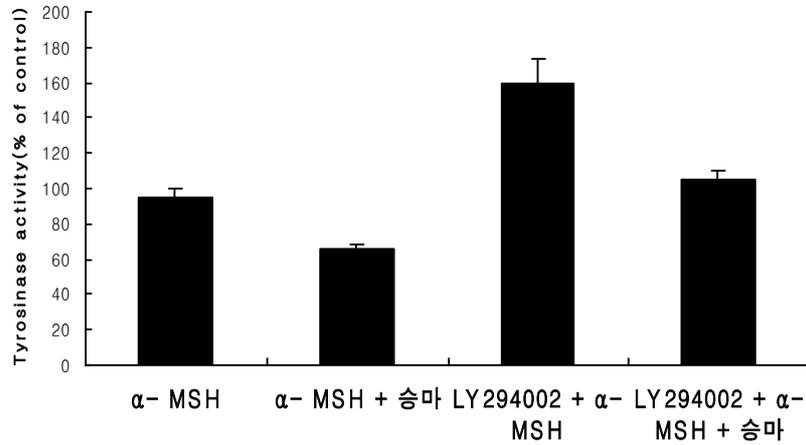


그림 3-41. ERK경로 저해제 PD98059와 Akt 경로 저해제 LY294002에 의한 승마 디클로로메탄 분획의 Tyrosinase 활성억제에 미치는 영향

또한 PD98059와 LY294002 두 차단제에 의하여 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2의 단백질 발현이 회복되는지를 확인하였으며 PD98059 차단제에 의하여 ERK-1/2의 활성화가 감소하였음. 따라서 이러한 결과는 승마추출물에 의한 ERK-1/2와 Akt의 활성화는 기존의 ERK 활성이 멜라닌 생성조절과 연관되어져 있다는 보고와 일치하는 것으로 보여짐.

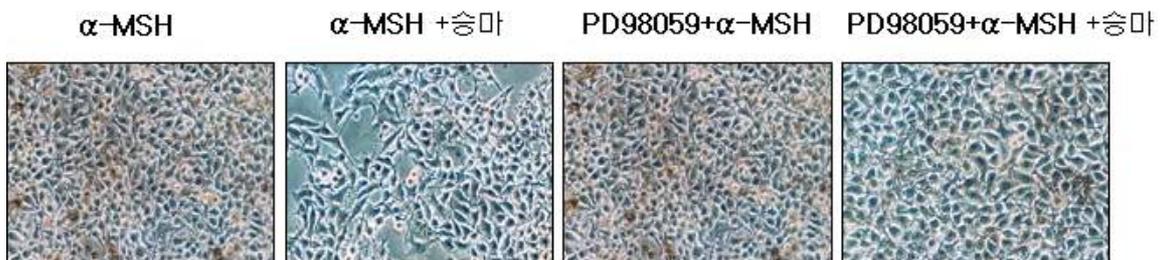


그림 3-42. 승마 디클로로메탄 분획 및 ERK경로의 저해제인 PD98059이 B16F10세포에 미치는 영향

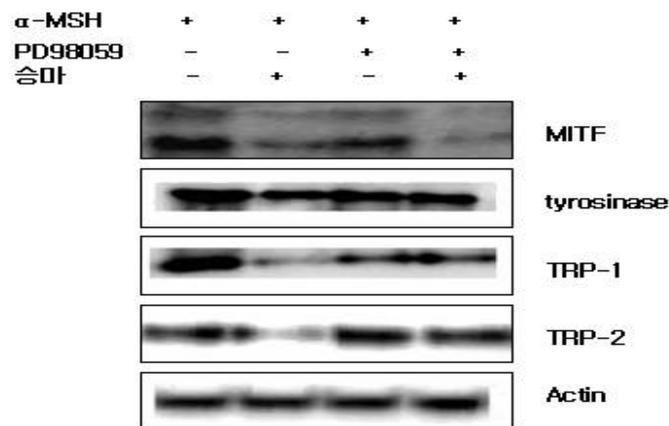


그림 3-43. ERK경로 저해제 PD98059가 승마 디클로로메탄 분획의 MITF관련 단백질 발현에 미치는 영향

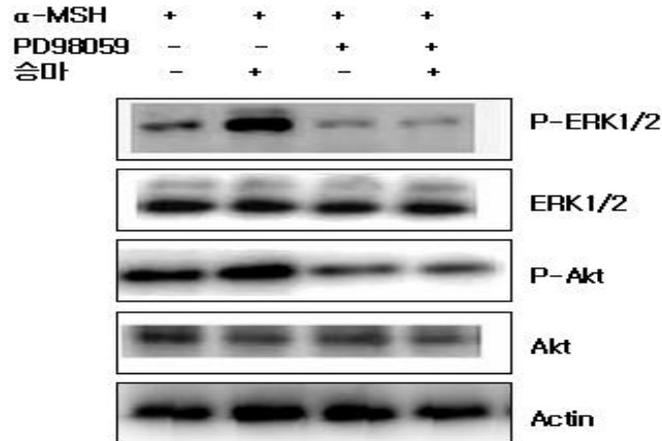


그림 3-44. ERK경로 저해제 PD98059가 승마 디클로로메탄 분획의 Erk 및 Akt 관련 단백질 발현에 미치는 영향

멜라닌 세포의 멜라닌화가 발생하는 주요 기전은 멜라닌 세포의 증식, 멜라닌소체의 합성증가 및 tyrosinase활성도의 증가 등에 의해 이루어짐. 연구의 결과를 종합해 볼 때 B16 melanoma 세포에 승마추출물을 처리 하였을 때 α -MSH 만을 단독처리한 대조군에 비하여 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성이 모두 감소하는 경향을 보여 줌. 이는 B16F10 melanoma 세포에 승마추출물을 처리하게 되면 세포의 성장이 억제되면서 세포분화가 유도되고, 티로신 물질대사의 주요 효소로서 작용하는 tyrosinase 활성도를 감소시킴으로서 최종산물인 멜라닌의 합성이 감소, 억제되는 것으로 사료됨. 또한 승마추출물에 의한 멜라닌 합성 억제효과가 기존에 알려진 ERK 신호전달 경로와 연관되어져 있음을 확인할 수 있었음. 따라서 승마의 디클로로메탄추출물에 함유된 활성물질의 분리 및 구조를 밝히고 활성물질에 의해 멜라닌 생성의 반응경로를 규명하는 연구가 진행된다면 승마추출물이 피부 미백제 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료됨.

라. ODS open column chromatography를 이용한 디클로로메탄 추출물의 분획

가장 강한 미백활성을 나타낸 100% 메탄올 추출물의 디클로로메탄 용매 추출물을 ODS open column chromatography를 실시하여 6개의 분획 (fraction)으로 분리하였음. 컬럼은 유리필터 컬럼 25×200 mm (내경×길이), 고정상은 MERCK RF-18을 사용하였고 용리액은 메탄올:물=9:1(v/v)을 사용하였음. 얻어진 6개의 분획 (각 2 L)을 감압농축하고 미백 활성을 측정하였음.

그림 3-45는 ODS open column chromatography로 분리한 6개의 분획물의 TLC(Thin Layer chromatography)를 나타내었음.



승마 MeOH추출물중 디클로로메탄 분획층
 전개용매 : 메탄올:물=9:1
 발색시약 : 동-인산
 발색온도 : 100℃

그림 3-45. 승마 디클로로메탄 분획물의 TLC

표 3-19. ODS column 분획의 Tyrosinase 활성 억제율 (단위: %)

	분획1	분획2	분획3	분획4	분획5	분획6
100% 메탄올의 디클로로메탄	72.16	78.35	43.30	17.53	12.37	4.12

(1) LC/MS를 이용한 미백활성성분의 동정

ODS column에서 획득한 6개의 분획물중 가장 강한 미백활성을 나타낸 F2의

미백활성성분을 LC/MS를 이용하여 동정하였음. 그 결과, 승마추출물의 미백활성 성분은 트리테르펜(triterpene)을 주요 성분으로 하는 3가지의 혼합물이 주성분인 것으로 밝혀졌음. 이들 3가지의 트리테르펜의 LC/MS 스펙트럼과 구조를 각각 그림 3-46과 그림 3-47에 나타내었음. LC/MS의 측정조건은 그림 3-48에 나타내었음.

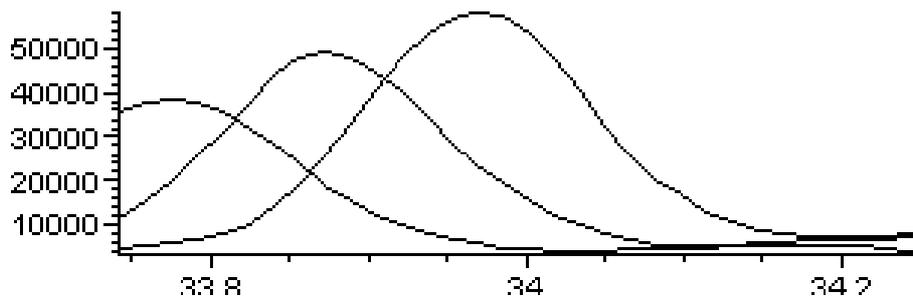
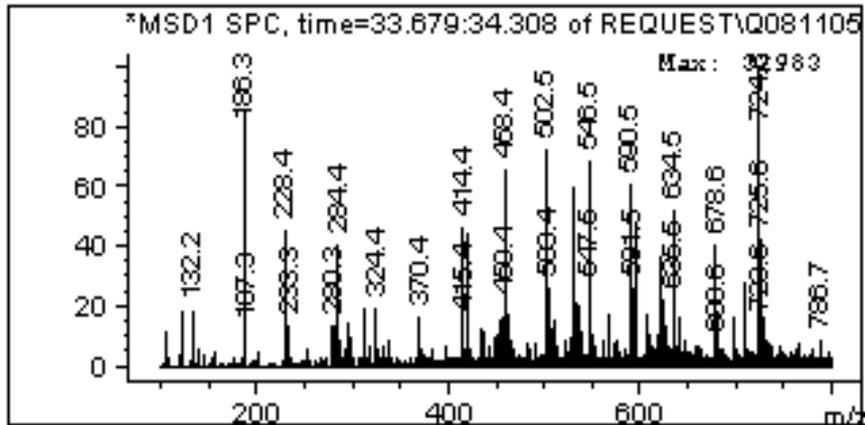


그림 3-46. 승마 디클로로메탄 분획물의 TLC

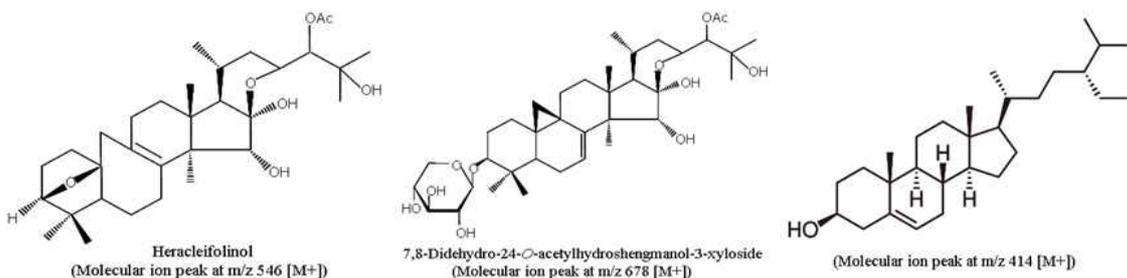


그림 3-47. 승마 ODS 분획 2에 함유된 3종류 트리테르펜(triterpene)의 분자구조

```

Instrument Conditions : At Start           At Stop
Pressure             : 72.2              21.1 bar
Flow                 : 0.500             0.500 ml/min

Solvent Description  :
PMPL, Solvent A     : ACN
PMPL, Solvent B     : 10 mM Ammonium acetate
=====
MSD parameters
Tune file name      : C:\HPCHEM\1\1946DTUN\atunes.tun
Ionization mode     : API-ES

MSD Instrument Conditions : At Start           At Stop
Quad Temp           : 99              99 C
Gas Temp            : 350             350 C
RoughVac            : 3              3 Torr
HighVac             : 6.9E-006       6.9E-006 Torr
CapCur             : 0.0E-001       0.0E-001 nA
ChamCur            : 0.0E-001       0.0E-001 uA
DryingGas           : 9              9 l/min
Neb Pres            : 35              35 psig
TurbolSpd           : 99             99 %
Turbo2Spd           : 98             98 %
TurbolPwr           : 102            101 W
Turbo2Pwr           : 19             19 W
RF Drive            : 0.0E-001       0.0E-001 %
Qd TpDrv            : 9              11 %
Gas ToDrv           : 23             23 %
Neb PrDrv           : 46             46 %
Gas FlDrv           : 60             60 %
DelaySens           : 0.0E-001       0.0E-001 V
Aux Inbut           : 0.0E-001       0.0E-001 V
Other Det           : 0.0E-001       0.0E-001 V
=====
MSD tuning (calibration) parameters

Ionization polarity : Positive
Skim1                : 20 V
Skim2                : Not Applicable
Ion Energy           : 5.0 V
Lens1                : 2.7 V
Lens2                : Not Applicable
Iris                 : 400 V
HED                  : 10000 V
Width Gain           : 44
Width Offset         : Variable
                    Mass      : Value
                    -----
                    118.08    : -261
                    622.03    : -233
                    922.01    : -261
                    1521.97   : -288
                    2121.93   : -261
                    -----

Mass Gain            : 5.65
Mass Offset          : 0.496
Quad DC              : 0.00 V
Octopole Peak        : 300 V
Octopole Knee        : 309 Da
Lens2DC              : Variable
                    Mass      : Value
                    -----
                    50.00     : 0.5
                    100.00    : 1.0
                    350.00    : 2.0
                    1000.00   : 4.0

```

그림 3-48. 승마 ODS 분획 2의 LC/MS 측정조건

3. 울금 추출물의 미백 기능성 및 기전연구

가. 울금의 미백 기능성 성분 추출

울금에 대한 생물학적 검정을 통한 분획법은 용해제 분획 (solvent partitioning)과 ODS open column chromatography를 이용하여 부분적으로 분리 정제하였음. 울금 건조중량 500 g에 12 L의 증류수를 넣고 2시간 30분씩 2번 재탕하여 4000 rpm에서 20 분씩 원심분리한 후, 0.2 μ m 여과지로 여과하여 40 $^{\circ}$ C에서 감압농축 하여 농축물을 얻었음. 이 건조농축물 (142.1g) 전체를 증류수에 현탁 시킨 다음 에틸아세테이트 (EtOAc), 부탄올 (n-BuOH), 증류수의 순서로 각각 분획화하여 각각 21.0 g, 66.5 g 51.0 g을 얻었음. 이중 미백활성을 나타낸 에틸아세테이트 층을 감압 증류하여 반고형 조추출물 얻었음. 에틸아세테이트 분획 중 2.56 g을 소량의 증류수에 녹인 후 ODS open column chromatography를 이용하여 여러 개의 분획으로 나누었음. 칼럼은 유리필터 컬럼 50 X 183 mm (내경X길이), 고정상은 ODS (YMC gel silica, 50 μ m, YMC CO., LTD.)를 사용하고, 용리액은 100 % 증류수에서 시작하여 메탄올을 20%, 씩 증가시켜 사용하였음. 100 % 메탄올 이후에는 dichloromethane으로 잔류물질을 세척하였음. 이와 같이 하여 얻은 7 개의 분획을 감압농축하고 동결 건조시켜 건조무게를 측정한 후, 활성 실험을 실시하였음.

표 3-20. 울금의 ODS open column chromatography를 이용한 분획

분획	EtOAc	D.W	20% MeOH	40% MeOH	60% MeOH	80% MeOH	100% MeOH	Dichloromethane
추출양	2.56g	305.8 mg	641 mg	480.5 mg	551.7 mg	127.9 mg	163.4 mg	68.4 mg

나. B16F10세포계에서 울금 분획의 세포성장 저해율

울금의 ODS column 7 분획에 대한 세포처리 가능 농도를 알아보기 위해 D.W.에서 dichloromethane 분획을 임의적으로 울금 1-7로 기재한 후, 세포 성장에 대한 영향을 MTT assay로 알아 본 결과 아래와 같았음. 대부분의 분획이 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 세포 성장에 저해를 주지 않은 것으로 보아 기능성에 대한 검정도 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 살펴 보았음.

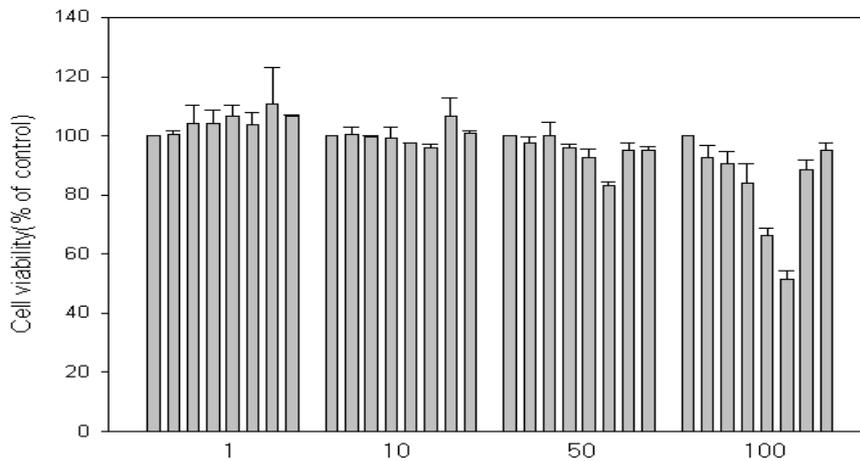


그림 3-49. 울금 ODS 1-7분획 MTT Assay

다. 세포내 멜라닌생성에 미치는 영향

B16F10세포계내 멜라닌생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 울금 분획을 처리하여 5일간 배양한 결과는 울금 5번의 억제율이 가장 높았으며 이를 확정하기 위하여 인접 분획인 울금 5, 6, 7에 대한 재 실험한 결과에서도 울금 5가 가장 높은 효과를 나타내었음.

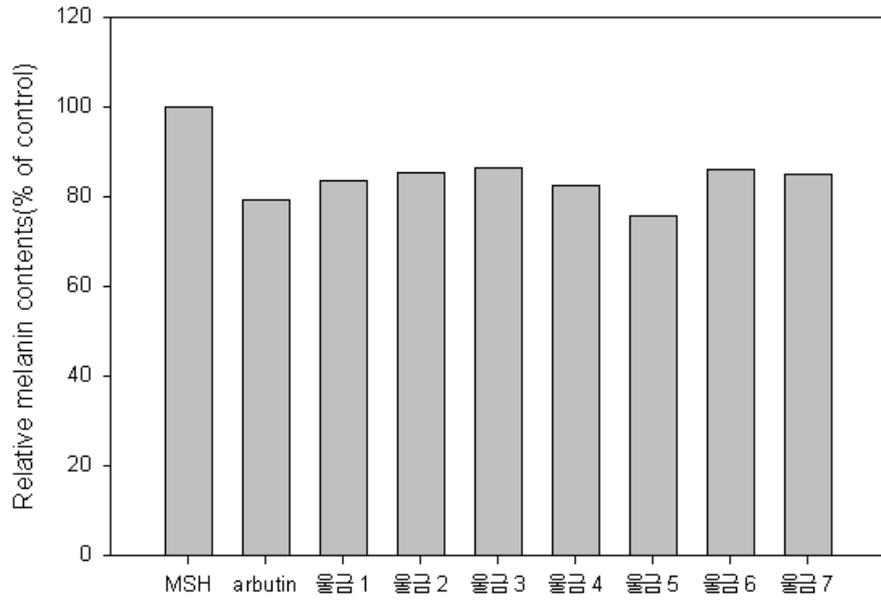


그림 3-50. 올금 분획의 melanin 합성 저해 효과

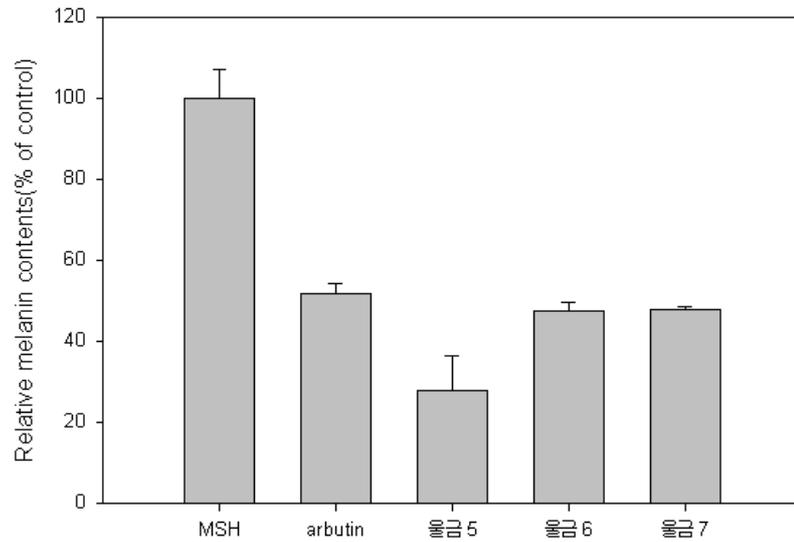


그림 3-51. 올금 분획 5-7의 melanin 합성 저해 효과

라. Tyrosinase 활성화에 미치는 영향

세포성장에 영향을 주지 않는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 울금 분획과 α -MSH를 함께 처리한 후 2일간 배양하여 tyrosinase 활성도를 측정한 결과 α -MSH에 의해 유도된 tyrosinase 활성화는 울금 5번의 억제율이 가장 현저하였으며 이를 울금 5-7에 이르는 분획을 재실험 함으로서 검정하였음.

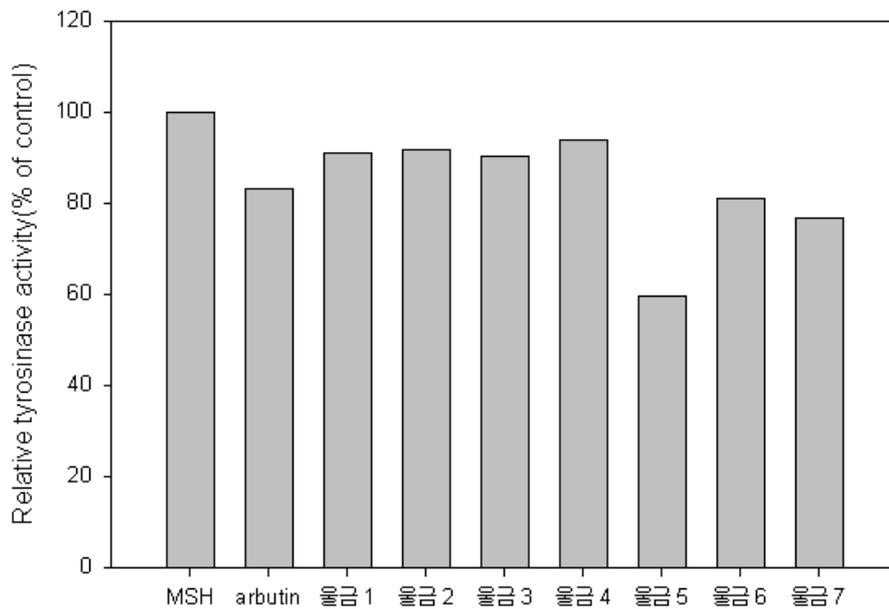


그림 3-52. 울금 분획의 세포 내 Tyrosine 활성화 저해 효과

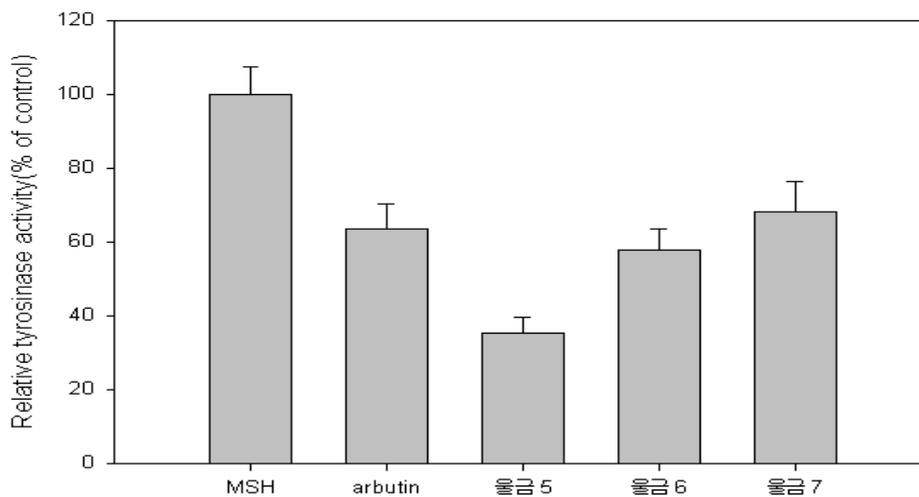


그림 3-53. 울금 분획 5-7의 세포 내 Tyrosine 활성화 저해 효과

마. 울금 5 (80% MeOH, PPC) 분획의 세포독성

멜라닌생성과 tyrosinase 활성 조절에 가장 높은 효과를 보이는 울금 5 분획 (80% MeOH)을 PPC로 명명하여 이에 대한 기능성 검정을 시행하였음. PPC에 대한 MTT assay를 위해 다양한 농도 (1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 결과 1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 처리 시 세포독성에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났음.

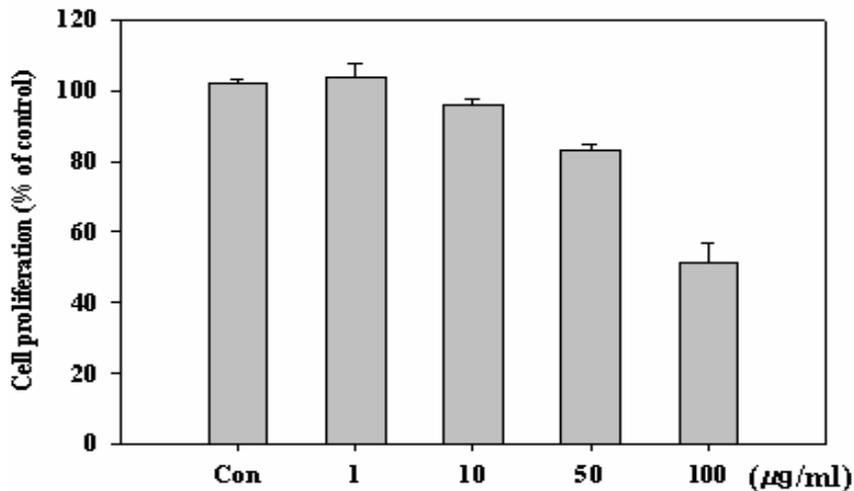


그림 3-54. 울금 분획 5(PPC)의 세포 독성 MTT Assay

바. PPC의 멜라닌 합성 및 tyrosinase 활성 억제

PPC의 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해서 임의의 외부자극인자인 멜라닌 생성을 촉진하는 호르몬인 α -MSH를 처리한 세포에 PPC (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 기능성 대조군으로 알부틴 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하여 비교하여 보았음. 아래에서 보는 바와 같이 PPC는 기능성 대조군인 알부틴보다 세포내 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성을 현저히 감소시켰음.

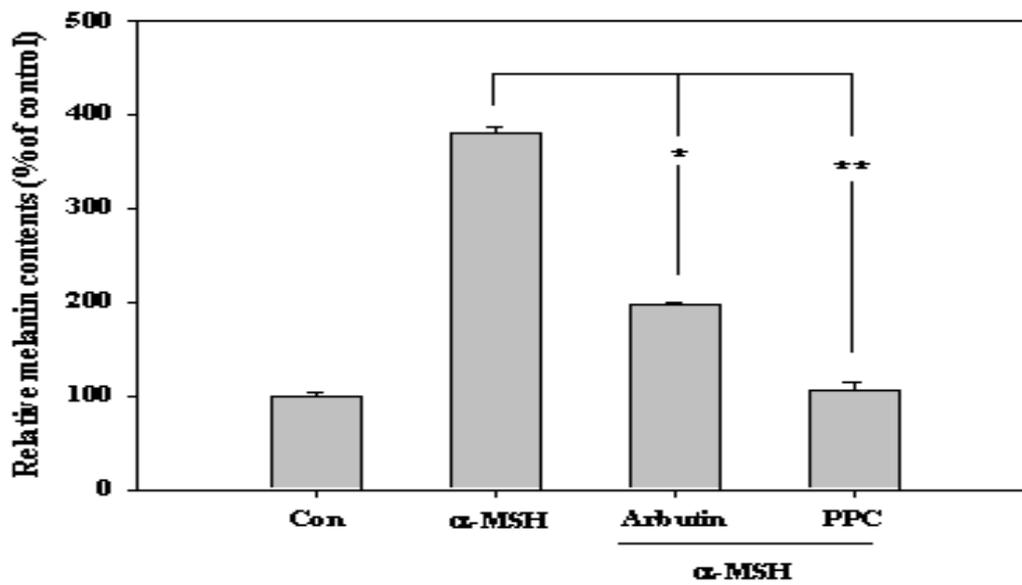


그림 3-55. 울금 분획 5(PPC)의 세포 내 멜라닌 합성 저해

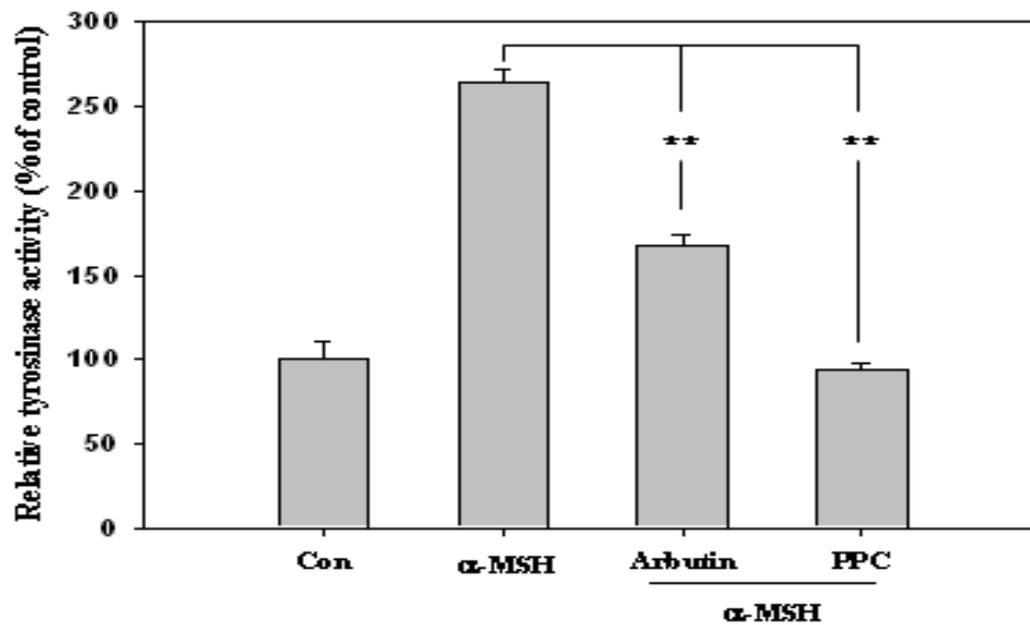


그림 3-56. 울금 분획 5(PPC)의 세포 내 Tyrosinase 활성 저해

사. PPC의 멜라닌 생합성경로에 관련된 단백질 발현저해 효과

PPC가 멜라닌 생합성에 관련된 단백질 발현과의 연관성을 확인하기 위하여 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 항체를 이용하여 각 단백질의 발현 변화를 관찰하였음. 보는바와 같이 α -MSH에 의해 자극된 세포에서 PPC는 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현을 저해하는 것으로 나타났으며, 따라서 PPC는 tyrosinase gene의 전사인자인 MITF의 발현을 저해시킴으로써 멜라닌 생성에 직접적으로 관여하는 효소인 tyrosinase의 발현이 저해되는 것으로 사료됨.

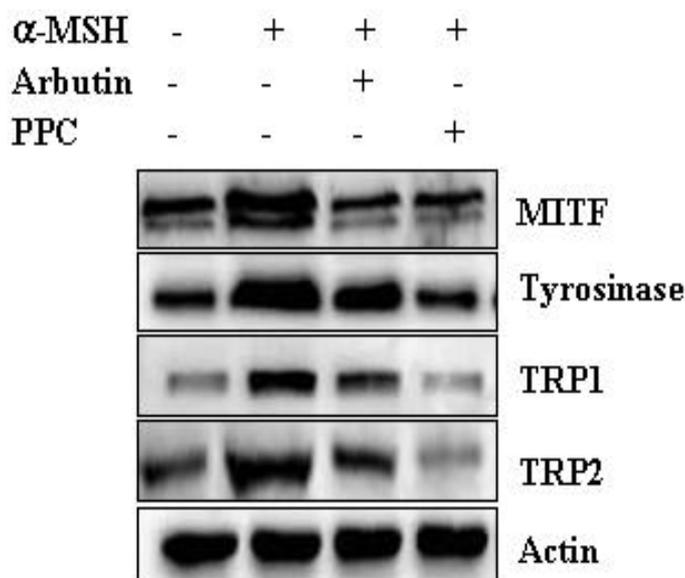


그림 3-57. PPC의 TPRs 관련 단백질에 미치는 영향

아. PPC의 멜라닌 생합성경로에 관련된 신호전달 단백질 발현 효과

멜라닌 합성은 ERK신호와 PI3K/Akt 신호 활성화의 저해에 의해서 향상된다고 보고되고 있음. 본 연구에서 PPC가 ERK신호와 PI3K/Akt 신호의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 phospho-ERK1/2, phospho-MEK (an upstream activator of ERK), phospho-Akt항체를 이용하여 western blot으로 각 신호경로의 활성화형태 단백질의 발현 변화에 대하여 조사하였음. 보는 바와 같이 α -MSH로 자극하여 PPC를 처리한 초기시간에서 활성화형태인 인산화형태의 ERK1/2, MEK, Akt의 단백질 발현이 증가되기 시작하여 6시간째에 가장

높은 단백질 발현을 나타내고 있음. 각 단백질의 활성화가 PPC단독에 의한 결과라는 것을 재확인하기 위하여 serum이 고갈된 B16F10세포에 α -MSH 자극 없이 PPC를 단독 처리하여 보았음. PPC는 같은 시간대에 활성화형태의 ERK1/2, MEK, Akt의 단백질 발현을 증가시키는 것으로 확인 되었음. 이러한 결과는 PPC에 의한 멜라닌 생성억제에는 ERK 나 PI3K/Akt 경로의 활성화가 관여되어 있다는 것을 보여줌.

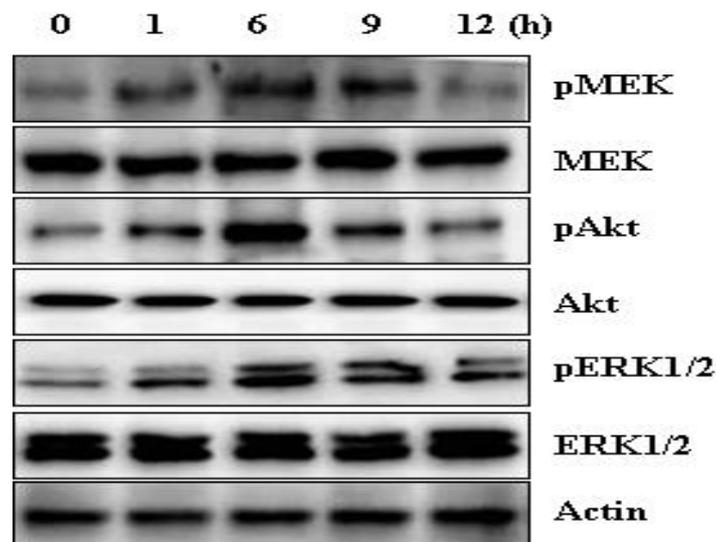
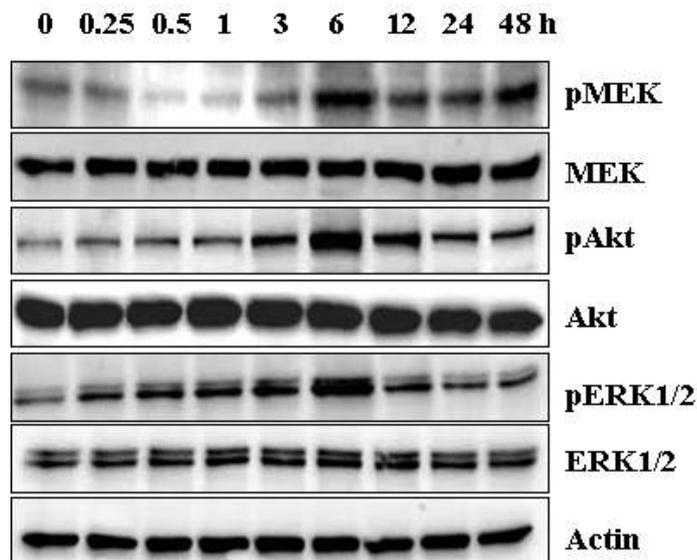


그림 3-58. PPC의 멜라닌 합성 억제 단백질에 미치는 영향

자. PPC에 의한 멜라닌 생합성 저해에 따른 신호전달 선택적 저해제의 효과

PPC의 멜라닌 생합성억제에는 ERK나 PI3K/Akt 신호 활성화가 관여되어 있다는 것을 확인한 후에 ERK 나 PI3K/Akt 두 가지 경로 중 어느 경로를 택해서 신호가 전달되는지 혹은 두 가지 경로 모두 다 택하여 신호가 전달되는지를 확인하기 위해서 저해제를 이용한 실험을 하였음. MEK와 ERK신호전달 선택적 저해제인 PD98059와 Akt신호 저해제인 LY294002를 처리하여 멜라닌 생성 저해효과를 조사하였음.

그림 3-59에서 보는 바와 같이 처리한 PD98059에 α -MSH로 자극하여 PPC를 처리한 경우에는 tyrosinase활성이 매우 증가된 것을 확인 할 수 있었고, 멜라닌 생성에 관련된 단백질의 발현량도 증가 되어 있었으며, PD98059 저해제에 의해 PPC의 저해효과가 감소되어 활성화형태의 MEK와 ERK의 단백질 발현이 감소되는 것으로 나타났음.

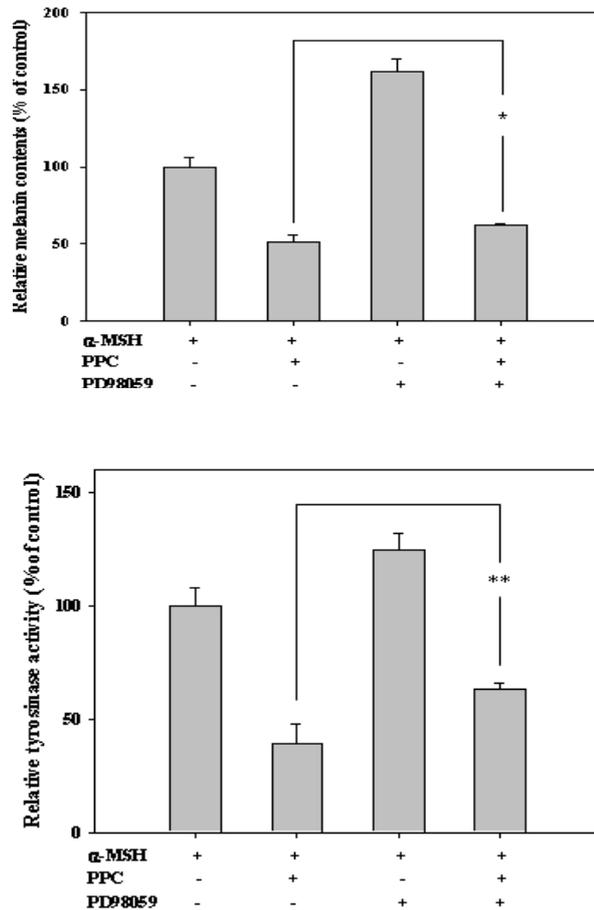
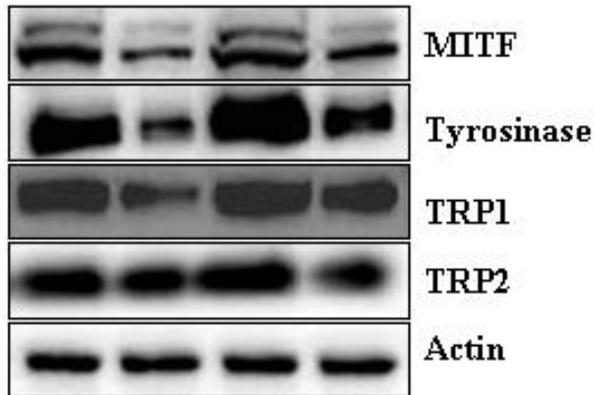


그림 3-59. ERK경로의 저해제인 PD98059에 의한 PPC의 멜라닌 합성 억제 및 Tyrosinase 활성 저해에 미치는 영향

α -MSH	+	+	+	+
PPC	-	+	-	+
PD98059	-	-	+	+



α -MSH	+	+	+	+
PPC	-	+	-	+
PD98059	-	-	+	+

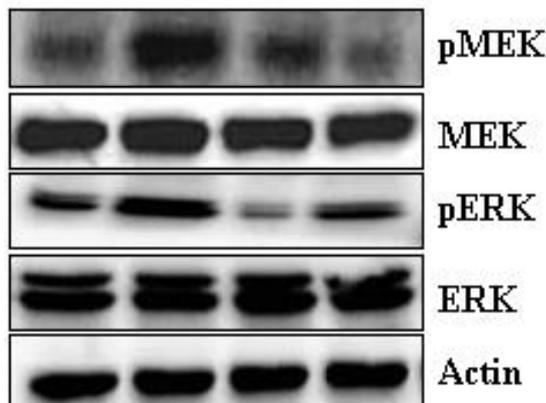


그림 3-60. ERK경로 저해제 PD98059에 의한 PPC의 Erk 및 MEK 활성화에 미치는 영향

LY294002를 처리한 실험에서도 PD98059 실험결과와 같은 결과가 나타났음. 이러한 결과는 PPC에 의해 활성화 된 MEK/ERK나 PI3K/Akt신호전달 경로를 통하여 멜라닌 합성의 억제가 일어나며, 이러한 멜라닌 합성 억제는 tyrosinase 생성에 중요한 전사인자인 MITF와 멜라닌 생합성에 관련된 단백질의 저해에 의해서 조절되는 것으로 보여짐.

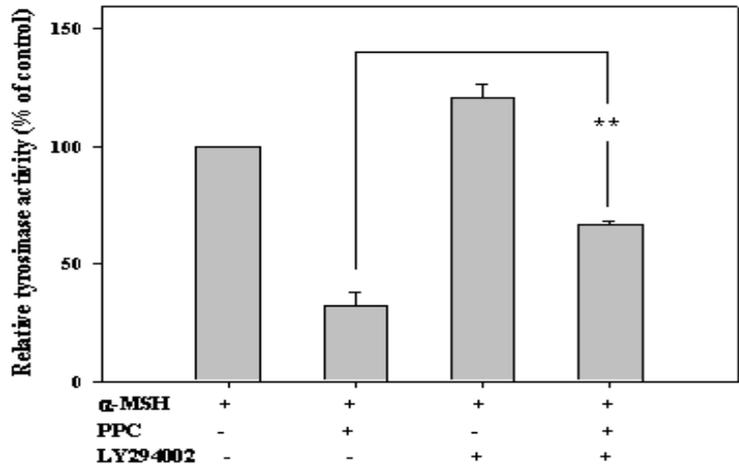
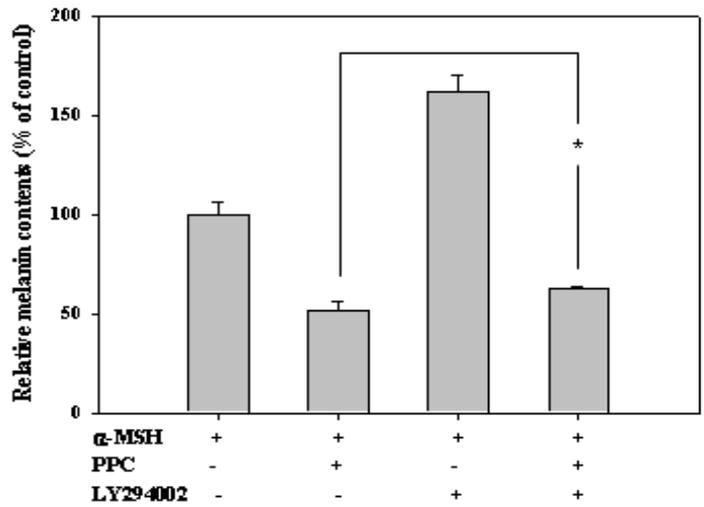


그림 3-61. Akt 경로 저해제 LY294002에 의한 멜라닌 합성 억제 및 Tyrosinase 활성 저해에 미치는 영향

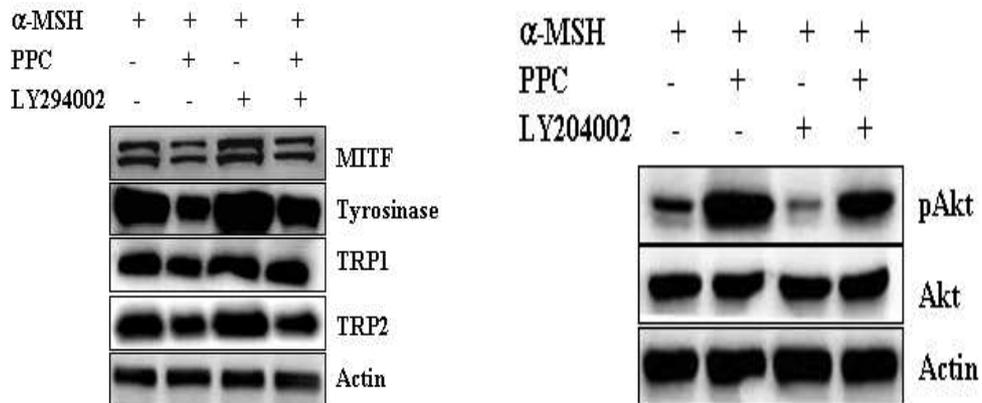


그림 3-62. Akt 경로 저해제 LY294002에 의한 PPC의 TPRs 관련 단백질과 Akt 경로에 미치는 영향

4. 세신 추출물의 미백 기능성 및 기전연구

가. 세신의 미백 기능성 성분 추출

세신의 기능성 검정을 위한 분획법도 울금과 동일한 과정으로 세신 건조중량 300g에 열수 건조농축물 (102.3 g)을 얻었으며 에틸아세테이트 (EtOAc), 부탄올 (BuOH), 증류수의 순서로 각각 분획화 하여 각각 21.6 g, 41.2 g 37.1 g을 얻었음. 이중 미백활성을 나타낸 에틸아세테이트 층을 감압 증류하여 반고형 조추출물 얻었음. 에틸아세테이트 분획 중 2.0 g을 소량의 증류수에 녹인 후 ODS open column chromatography를 이용하여 여러 개의 분획으로 나누었음. 7개의 분획을 감압농축하고 동결 건조 시켜 건조무게를 측정한 후, 활성 실험을 실시하였음.

표 3-21. 세신의 ODS open column chromatography를 이용한 분획

분획	EtOAc	D.W	20% MeOH	40% MeOH	60% MeOH	80% MeOH	100% MeOH	Dichloromethane
추출양	2.0 g	962.6 mg	157.4 mg	97.9 mg	109.2 mg	433.8 mg	97.4 mg	4.8 mg

나. B16F10세포계에서 세신 분획의 세포성장 저해율

세신 ODS column의 7 분획의 세포처리 가능 농도를 알아보기 위해 D.W.에서 dichloromethane 분획을 임의적으로 세신 1-7로 기재한 후 B16F10 세포성장에 대한 영향을 MTT assay로 알아 본 결과 아래와 같음. 아래 그림은 미백 기능의 가능성이 있는 세신 1-5에 대한 MTT 결과로 대부분의 분획은 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 세포 성장에 저해를 주지 않은 것으로 보아 기능성에 대한 검정도 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 살펴보았음.

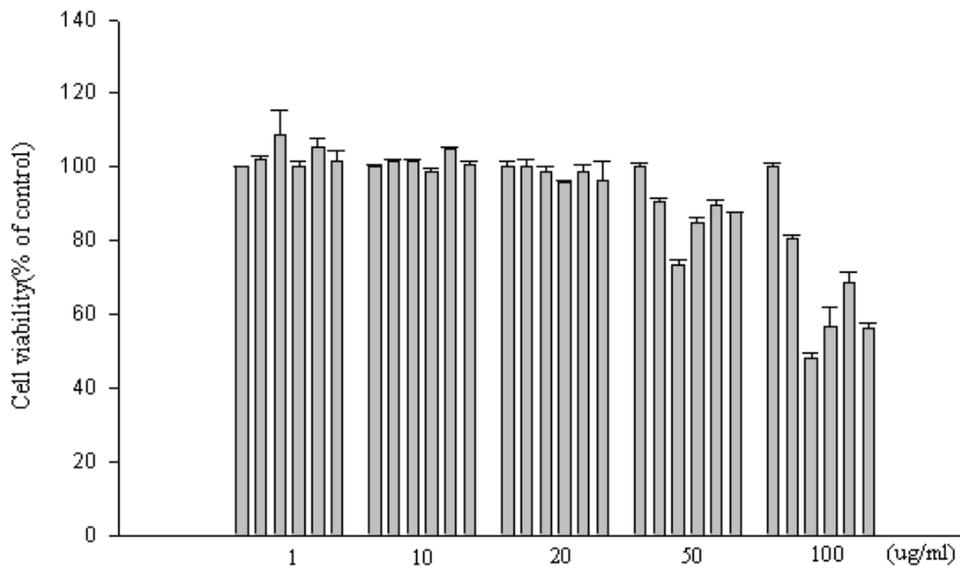


그림 3-63. 세신 ODS 1-7분획 MTT Assay

다. 세포내 멜라닌생성 및 티로시네이즈활성에 미치는 영향

멜라닌생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 세신 분획을 처리하여 5일간 배양하였으며 티로시네이즈활성도는 2일간 배양하여 측정된 결과 세신 4번 (60% MeOH)의 억제율이 가장 높았음.

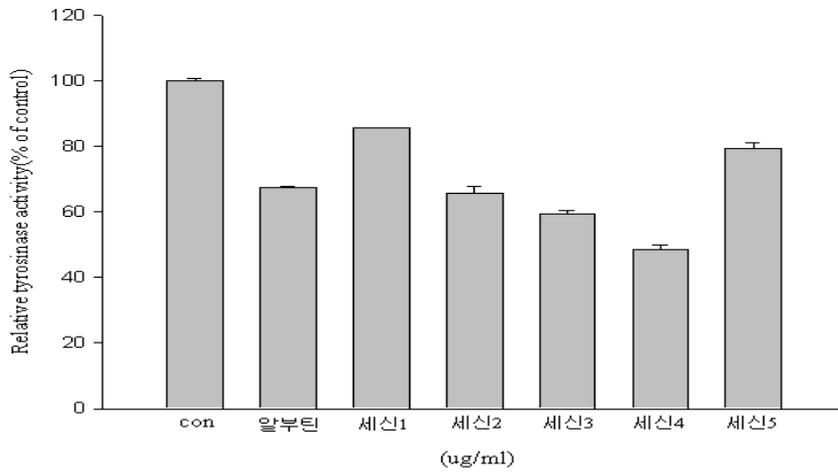


그림 3-64. 세신 분획의 세포 내 Tyrosinase 활성 저해

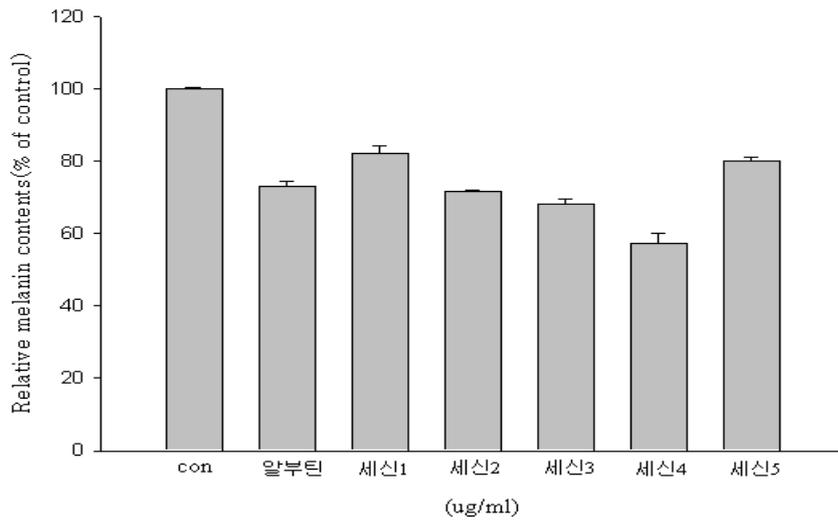


그림 3-65. 세신 분획의 세포 내 멜라닌 합성 저해

라. 세신 4 (60% MeOH, PPC) 분획의 세포독성

세신 4 분획 (60% MeOH)에 대한 기능성 검정을 위해 MTT assay를 통해 다양한 농도(1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리한 결과 1-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 처리 시 세포독성에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

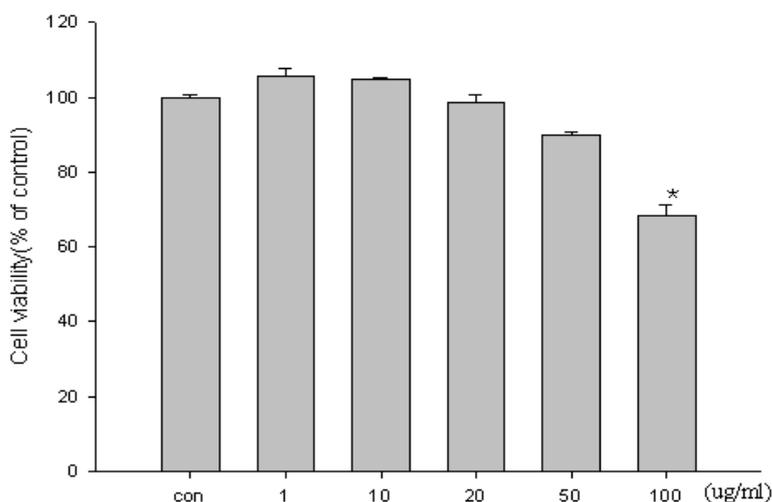


그림 3-66. 세신 4 분획의 세포 독성 MTT Assay

마. 세신 4의 멜라닌 합성 및 tyrosinase 활성 억제

세신 4가 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해서 B16F10세포에 세신 추출물을 농도별로 처리하고 72시간 배양하였음. 세신 4를 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 tyrosinase의 활성이 저해되었으며, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 tyrosinase 활성을 약 60% 저해하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 그리고 세신 4가 멜라닌 합성에 영향을 주는 지를 확인하기 위해서 B16 melanoma 세포에 세신 4를 농도별로 처리하고 5일간 배양하였음. 세포를 수집하여 멜라닌 양을 측정 한 결과 아래에 보는바와 같이 농도에 비례하여 멜라닌 합성이 저해되었음.

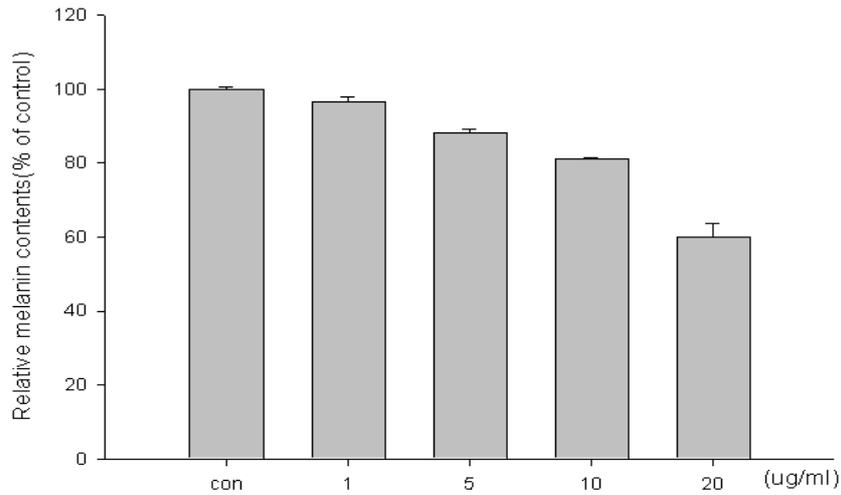


그림 3-67. 세신 4 분획의 세포 내 멜라닌 합성 저해

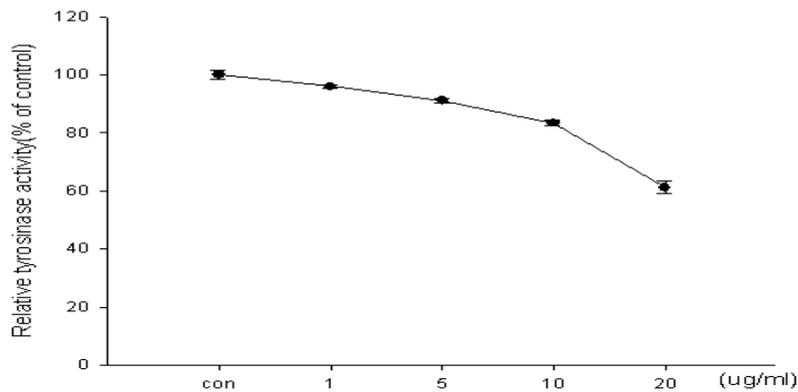


그림 3-68. 세신 4 분획의 세포 내 Tyrosinase 활성 저해

바. 세신 4에 의한 멜라닌 생합성경로에 관련된 단백질 발현저해 효과

세신 4가 멜라닌 합성에 관련된 단백질 발현과 연관성이 있는지를 확인하기 위하여 B16 F10세포에 세신 4 (20 ug/ml)를 처리하고 시간별로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF 단백질의 발현량 변화를 관찰하였음. 보는 바와 같이 B16 melanoma 세포에 세신 4의 처리시간이 지남에 따라 점차 적으로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF의 발현이 저해되는 것으로 나타났음. 따라서, 세신 4는 멜라닌 합성과 연관된 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2의 발현을 저

해하는 것으로 보이며, 세신 4의 이러한 저해는 tyrosinase gene의 전사인자인 MITF의 발현을 저해시킴으로써 멜라닌 생성에 직접적으로 관여하는 효소인 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2의 발현이 저해되는 것으로 사료됨.

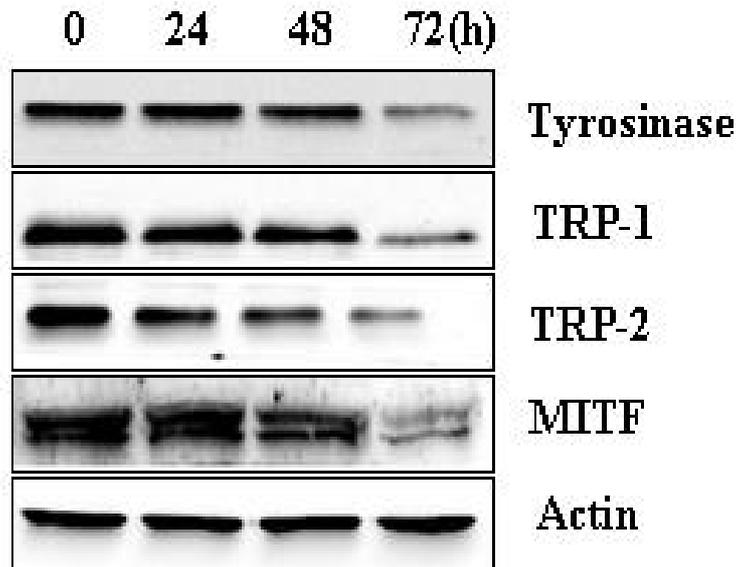


그림 3-69. 세신 4 분획의 TPRs 관련 단백질에 미치는 영향

사. 세신 4의 멜라닌 생합성경로에 관련된 신호전달 단백질 발현 저해효과

세신 4에 의한 멜라닌 합성저해가 ERK신호와 PI3K/Akt 신호의 활성화에 의하여 일어나는지를 알아보기 위하여 phospho-ERK1/2, phospho-MEK (an upstream activator of ERK), phospho-Akt항체를 이용하여 western blot 으로 각 신호경로의 활성화형태 단백질의 발현 변화에 대하여 조사하였음. 보는 바와 같이 세신 4를 처리한 후 초기시간대인 30분에서 1시간대에 ERK1/2, MEK, Akt의 인산화단백질 발현이 증가되는 것을 확인 할 수 있었음. 최근에 p38 MAPK 신호 및 cAMP response element protein (CREB)의 인산화가 MITF의 발현을 유도함으로써 멜라닌 합성이 증가된다는 보고에 따라 세신 4에 의한 멜라닌 합성저해에 p38 MAPK 신호와 CREB의 인산화가 관여하는지를 살펴봄. 초기시간대인 15분에서 1시간대에 CREB의 인산화의 저해가 일어나는 것을 확인할 수 있었으나, p38 신호의 인산화 발현에는 변화가 없는 것으로 나타남. 이

러한 결과는 세신 4에 의한 멜라닌 생성억제에는 p38 MAPK 신호와는 무관하게 ERK나 PI3K/Akt 경로의 활성화에 의함을 보여줌.

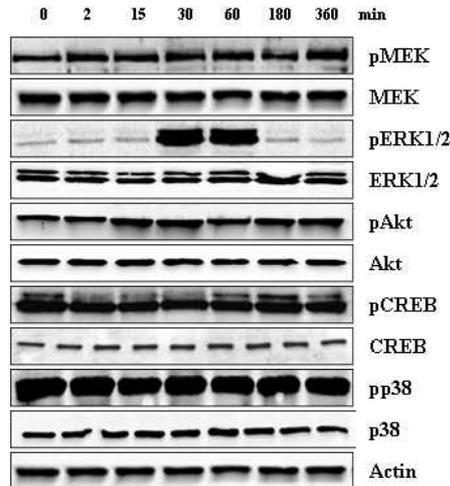


그림 3-70. 세신 4 분획의 멜라닌 합성 억제 단백질에 미치는 영향

제 3 절 미백 화장품 시제품 제작을 위한 제형 확립

1. 한방약용작물의 원료화

가. 한방약용작물로부터 유효성분 추출

(1) 추출방법

억제 활성이 우수한 승마, 세신, 울금으로부터 유효성분 대량 추출을 위하여 화장품의 원료로 사용되는 butylene glycol을 사용하여 초임계, 초음파, 열수 추출을 하여 대량 추출의 가능성을 확인하였음. 각 방법의 자세한 추출 방법은 현재 기업 비밀이므로 생략함.

(2) 추출결과

각 추출시료에 대한 tyrosinase 활성억제 효과를 전술한 동일한 방법으로 확인하였으며, 추출시료 중 초음파 추출분획을 100배 정도 희석하여도 약 45%의 억제활성도를 나타내어 대량 추출 방법을 초음파추출로 선정함. 추출물 내에 유효성분이 고농도로 존재하여 산업화의 발판을 마련하였다고 생각됨.

표 3-22. 승마 초임계 추출물의 Tyrosinase 활성억제

농도	억제효과(%)
1/50	7.14 ± 3.5
1/40	17.75 ± 1.8
1/30	24.32 ± 1.2
1/20	34.41 ± 2.6
1/10	48.08 ± 1.7
1/5	59.57 ± 2.2

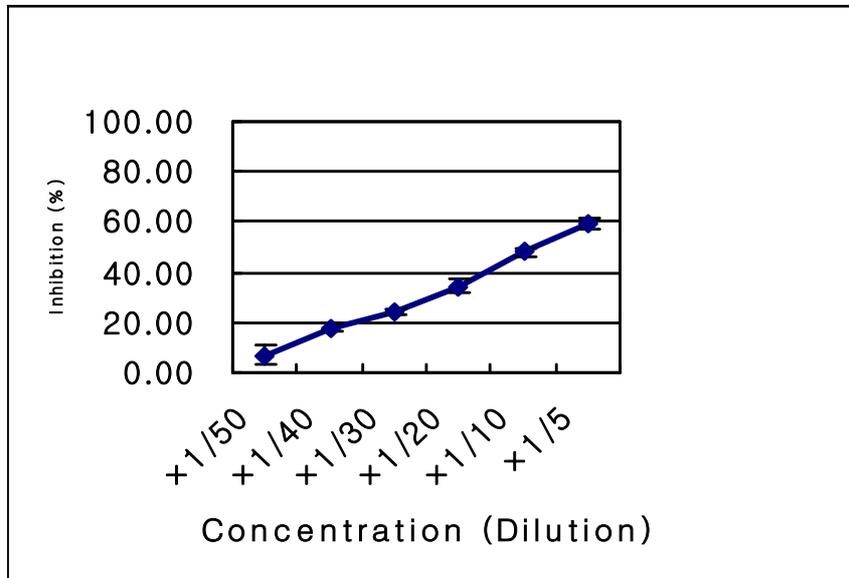


그림 3-71. 승마 초임계 추출분획 Tyrosinase 활성억제 효과

표 3-23. 승마 초음파 추출물의 Tyrosinase 활성억제

농도	억제효과(%)
1/500	13.85 ± 0.6
1/400	18.12 ± 1.3
1/200	27.09 ± 1.0
1/100	44.97 ± 1.4
1/50	72.47 ± 1.1
1/10	94.38 ± 0.3

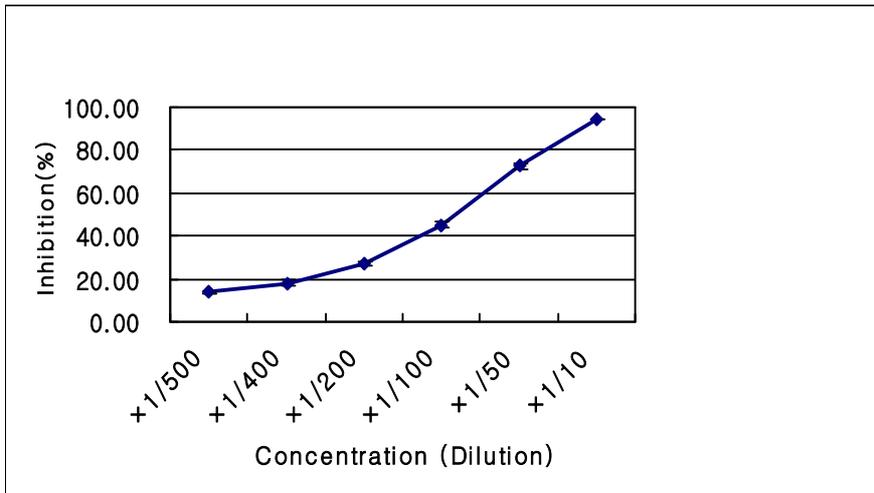


그림 3-72. 승마 초음파 추출분획 Tyrosinase 활성억제 효과

표 3-24. 승마 열수 추출물의 Tyrosinase 활성억제

농도	억제효과(%)
1/50	13.56±1.7
1/40	18.49±3.0
1/30	28.47±2.4
1/20	39.13±0.8
1/10	50.76±2.9
1/5	60.09±1.3

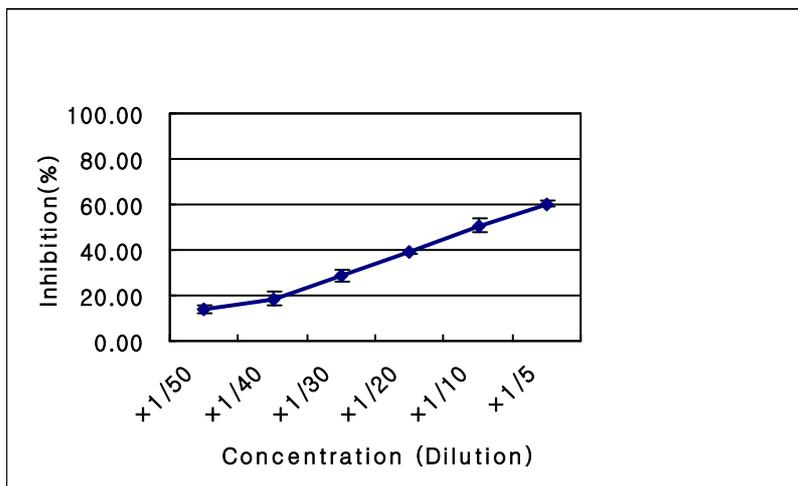


그림 3-73. 승마 열수 추출분획 Tyrosinase 활성억제 효과

2. 초음파 추출물에 대한 각 원료의 점검

- ◎ 외관성상 : 육안, 후각 관찰로 확인되는 내용 기록

- ◎ pH 측정 : pH meter를 표준용액으로 calibration 시킨 후, 전극을 깨끗이 씻어 온도가 보정된 검액에 담그어 2분이 지난 후 측정값을 읽음

- ◎ 비중 측정 : 검액을 잘 흔들어서 섞은 다음 거품이 없어지면 비중부액계를 띄운 후 비중부액계가 정지했을 때 비중의 눈금을 읽음

- ◎ 굴절률 : 검액을 잘 흔들어서 섞은 다음 검액을 일부를 아베굴절계를 사용하여 측정함

- ◎ 건조감량시험법 : 칭량병을 30분간 건조하고 그 무게를 정밀하게 담. 검체를 칭량병에 넣고, 특별한 규정이 없는 한 그 층이 5mm이하가 되도록 편편하게 편 다음 그 무게를 정밀하게 담. 이것을 건조기에 넣고 칭량병 마개를 빼어 옆에 놓고 건조함. 건조한 다음 칭량병의 마개를 다고 건조기에서 꺼내어 무게를 정밀하게 담. 가열하여 건조할 경우에는 데시케이터 속에서 식힌 다음 그 무게를 측정.

- ◎ 미생물 시험방법 : 화장품 미생물 허용기준 및 시험방법의 총 호기성 세균수(세균, 진균) 시험방법에 준해 시험한다. 맞춰 아래와 같이 실험함.
 - 세균수 시험 : 페트리 접시에 레틴 한천 배지(Letheen agar)를 미리 굳힌 배지 표면에 검액 1ml를 넣고 그 위에 멸균 후 45℃ 이하로 식힌 10~20mL의 검출용 한천 배지를 넣어 잘 혼합하고, 35℃에서 48시간 배양함. 이때 30~300 개의 균 집락을 형성한 평판을 취한 다음, 희석배율을 곱하여 이를 세균수로 함.

 - 진균수 시험 : 페트리 접시에 사브로우드 텍스트로즈 한천배지(Sabouraud Dextrose agar)를 미리 굳힌 배지 표면에 검액 1ml를 넣고 검출용 한천 배지를 사용하여 배양온도 28℃에서 3~5일간 배양함. 이때 100개 이하의 균 집락을 형성한 평판을 취한 다음, 희석배율을 곱하여 이를 진균수로 함.

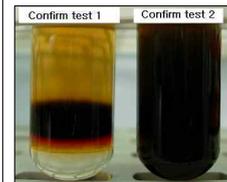
- ◎ 중금속 시험방법 : 화장품 원료 기준 일반 시험법내 중금속 시험법에 준하여 시험함.

가. 승마 추출물

Testing Item	Specification	Results
Appearance	Dark brown liquid	Confirm
pH Value(1->10)	4.0 - 7.0	5.44
Confirm test1	Red brown	Confirm
Confirm test2	Deep dark green	Confirm
Specific Gravity	0.98 - 1.04	1.018
Heavy Metal	≤ 10 ppm	Confirm
Arsenic	≤ 2 ppm	Confirm
Microbes	≤ 100 cfu/ml	Confirm

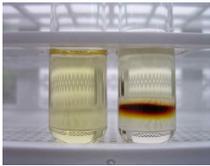
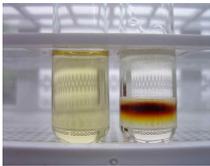
◎확인시험 1: 추출물 1ml에 클로로포름 1ml을 가하여 섞은 후 무수초산 2 ml를 흔들어서 섞은 후 황산 2ml를 유리관 표면에 천천히 가할 때 추출물 수용액은 적갈색을 나타낸다.

◎확인시험 2: 추출물 5ml에 염화제이철(FeCl₃) 시액을 0.5ml 떨어뜨려 방치할 때, 암녹색을 나타낸다.



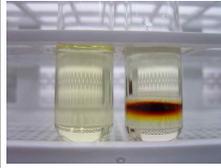
나. 세신 추출물

Testing Item	Specification	Results
Appearance	Yellowish liquid	Confirm
pH Value(1-→10)	5.5±1.0	5.82
Confirm test1	Dark red brown	Confirm
Confirm test2	Dark red brown	Confirm
Specific Gravity	0.98 - 1.04	1.010
Heavy Metal	≤ 10 ppm	Confirm
Arsenic	≤ 2 ppm	Confirm
Microbes	≤ 100 cfu/ml	Confirm

<p>◎확인시험 1: 추출물 1ml에 클로로포름 1ml을 가하여 섞은 후 무수초산 2 ml를 흔들어 섞은 후 황산 2ml를 유리관 표면에 천천히 가할 때 추출물 수용액은 적갈색을 나타낸다.</p>	
<p>◎확인시험 2: 추출물 2ml에 무수초산 2ml을 가하고 황산 2ml을 가할 때 추출물 수용액은 적갈색을 나타낸다.</p>	

다. 울금 추출물

Testing Item	Specification	Results
Appearance	Yellowish liquid	Confirm
pH Value(1-→10)	6.0±1.0	6.14
Confirm test1	Dark red brown	Confirm
Confirm test2	Dark red brown	Confirm
Specific Gravity	0.98 - 1.04	1.016
Heavy Metal	≤ 10 ppm	Confirm
Arsenic	≤ 2 ppm	Confirm
Microbes	≤ 100 cfu/ml	Confirm

<p>◎확인시험 1: 추출물 1ml에 클로로포름 1ml을 가하여 섞은 후 무수초산 2 ml를 흔들어 섞은 후 황산 2ml를 유리관 표면에 천천히 가할 때 추출물 수용액은 적갈색을 나타낸다.</p>	
<p>◎확인시험 2: 추출물 2ml에 무수초산 2ml을 가하고 황산 2ml을 가할 때 추출물 수용액은 적갈색을 나타낸다.</p>	

3. 혼합 한방약용 작물의 열수 및 초음파 추출물에 대한 시험

승마, 세신, 울금에 대한 미백효과가 in vitro와 in vivo에서 우수하다는 결과를 토대로 하여 시제품 생산을 위한 원료로 이들을 혼합하여 사용하기로 하고, 일정 비율로 혼합한 원료를 열수추출과 초음파추출을 통해 얻어진 원료로 미백활성에 대하여 검토하였음.(이하, 초음파추출혼합액을 아마란스 Whitening Complex로 함)

가. Tyrosinase 저해 활성 측정

혼합 초음파추출액을 in vitro에서 tyrosinase 활성억제 실험을 시행하였음.

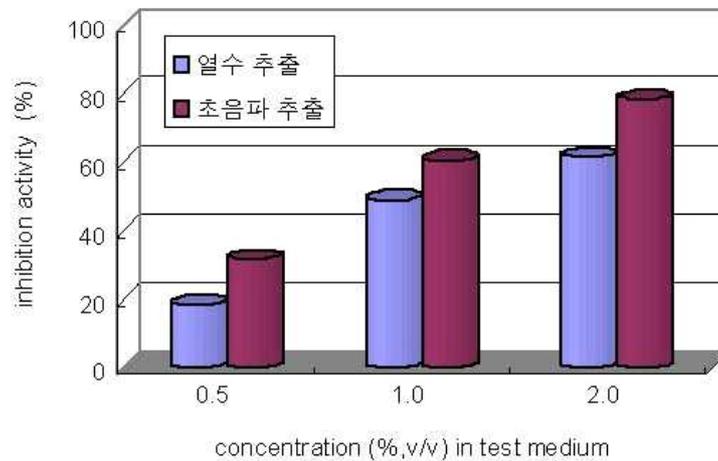


그림 3-74. 아마란스 Whitening Complex의 Tyrosinase 활성억제

표 3-25. 아마란스 Whitening Complex의 Tyrosinase 활성억제 SC50 농도

Sample Name	Tyrosinase 저해 활성 (SC50)	
아마란스 Whitening Complex (열수추출)	12.5	ug/ml
아마란스 Whitening Complex (초음파추출)	8.1	ug/ml
Kojic acid *	24.5	ug/ml

* Kojic acid : Positive control

나. 세포내 멜라닌 합성 저해 활성 측정

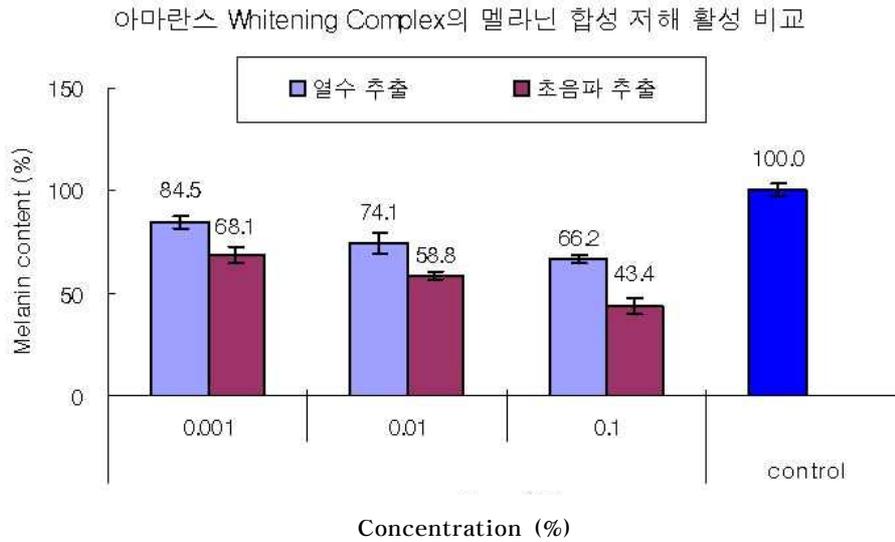


그림 3-75. 아마란스 Whitening Complex의 멜라닌 합성 저해 활성

멜라닌 세포를 이용하여, 열수 및 초음파로 추출한 아마란스 whitening complex의 멜라닌 합성 저해 활성을 측정한 결과, 두 가지 샘플 모두 농도의존적으로 멜라닌 합성을 억제하였으며, 특히, 0.1%의 농도로 처리하였을 때, 초음파 추출을 이용하여 제조한 샘플은 56.6%, 열수 추출을 이용하여 제조한 샘플은 33.8%의 저해 활성을 나타내었음.

다. 초음파추출 혼합액의 물성 점검

Testing Item	Specification	Results
Appearance	Dark red brown liquid	Confirm
pH Value(1-→10)	5.5±1.0	5.36
Confirm test1	Dark red brown	Confirm
Confirm test2	Dark red brown	Confirm
Specific Gravity	0.98 - 1.04	1.020
Heavy Metal	≤ 10 ppm	Confirm
Arsenic	≤ 2 ppm	Confirm
Microbes	≤ 100 cfu/ml	Confirm

<p>◎확인시험 1: 추출물 1ml에 클로로포름 1ml을 가하여 섞은 후 무수초산 2 ml를 흔들어 섞은 후 황산 2ml를 유리관 표면에 천천히 가할 때 추출물 수용액은 적갈색을 나타낸다.</p>	
<p>◎확인시험 2: 추출물 2ml에 무수초산 2ml을 가하고 황산 2ml을 가할 때 추출물 수용액은 적갈색을 나타낸다.</p>	

라. 초음파추출 혼합액의 피부첨포 시험

원료에 대한 안전성을 1차적으로 점검하기 위해, 아마란스 Whitening Complex를 화장품 원료로 사용하기 전에 화장품에 예상 적용 농도별로 피부에 대한 안전성 점검 시험을 실시하였음.

(1) 시험방법

(가) 인원 선발 기준: 아마란스 화장품 임직원 및 화장품 사용 소비자

(나) 시험 방법

오른(원)쪽 팔 안쪽에 Hays 's test Chamber에 원료 0.2g을 이용하여 closed 상태에서 24시간 동안 부착 후 떼어내어 blank와 시험품의 피부반응 (홍반, 부종등)상태를 관찰해 평가하였음. 또한 추출물을 1%, 3%, 5%, 10% 농도로 조정하여 실시하였음.

(2) 시험결과

1차 PATCH TEST 결과 기록서					
접포시간	24시간		판정기준	Draize의 P.I.I법을 기준으로 판정	
판정방법	1차 판정	patch 제거후 30분후	3차 판정	patch 제거후 1일후	
	2차 판정	patch 제거후 2일후	4차 판정	patch 제거후 3일후	
Test 위치	왼팔 안쪽		실험방법	Closed patch test using Haye's test Chamber	
시험제품명	1	2	3	4	5
	무처리	1% 추출물 희석액	3% 추출물 희석액	5% 추출물 희석액	10% 추출물 희석액
실험 결과					
지원자	결 과		비 고		
1	무자극				
2	무자극				
3	무자극				
4	무자극		10% 추출물 희석액에서 가려움		
5	무자극				
6	무자극				
7	무자극				
8	무자극				
9	무자극				
10	무자극				
11	무자극		10% 추출물 희석에서 가벼운 홍반		
12	무자극				
13	무자극				
14	무자극				
15	무자극				
16	무자극				
17	무자극				
18	무자극				
19	무자극				
20	무자극				
비 고					

2회에 걸쳐 시험한 결과, 40명 중 3명에 대해서만 가벼운 증상이 발생하였다.

(3) 지원자 정보

번호	나이	성별	피부 유형
1	38	여	건성
2	27	여	복합성
3	40	남	지성
4	34	남	중성
5	31	여	지성
6	29	여	지성
7	34	남	민감성
8	28	남	지성
9	27	여	건성
10	36	남	건성
11	36	남	민감성
12	31	남	중성
13	50	남	중성
14	27	여	중성
15	40	남	지성
16	35	여	건성
17	36	남	민감성
18	29	여	건성
19	28	여	중성
20	62	여	건성

마. CTFA 원료 등재

상기의 결과를 갖고 미국 화장품 원료 규격집인 ICID에 원료 등재를 진행하였음. 승마, 울금, 세신의 혼합 초음파 추출물로서 제품명은 AD-Whitening Complex로 하였으며, A는 Amarnath Cosmetics의 첫 자이고, D는 Dong-Eui University의 첫 자를 의미함.

요청사항	입력사항
등재 요청 sample의 Trade Name	AD-Whitening Complex
등재 요청 sample의 학명	Cimicifuga heracleifolia Komarov Asiasarum sieboldii F. Maekawa Curcuma longa L.
등재 요청 sample의 효능효과	Skin Whitening Effect Skin Protectants Anti-Oxidant
등재 요청 sample의 제조공정	기업 비밀로 생략함
등재 요청 sample의 최종적 용매	Water, Butylene Glycol

4. 제품 제형 실험

앞의 결과에 따라 제품 제형 Base를 기본으로 하여, 제품에 대한 사용자 품평을 하였으며, 이에 품평결과에 따라 제형을 개선하는 실험을 실시하였음.

가. 제품에 대한 주관적 소비자 품평

제품을 아침, 저녁 하루에 2번씩 적당량을 덜어 품평기간동안 사용한 후 품평서에 맞게 작성하여 점수로 환산하여 계산하였음.

(1) 품질 평가자 : 20명

(2) 품평결과

결과 항목	품 평 내 용																				총계
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1항	4	4	3	5	4	5	4	4	4	3	5	4	4	5	3	4	4	4	3	4	80
2항	3	4	4	4	4	4	5	4	4	5	5	4	4	4	4	5	4	4	4	4	83
3항	4	4	4	3	4	3	4	5	4	4	5	4	4	4	4	4	5	4	4	4	81
4항	3	3	4	2	4	3	4	3	4	3	3	3	4	4	4	4	3	4	4	3	69
5항	5	5	5	5	5	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	96
6항	4	4	4	2	4	3	4	4	4	4	3	4	3	4	5	4	4	4	4	4	76
7항	4	4	3	4	4	4	3	4	2	3	4	3	3	4	4	3	4	4	3	3	70
8항	3	3	4	4	4	4	3	4	4	4	4	3	4	4	3	3	4	4	3	3	72
합계	$(627/20) * 2.5 = 78.375$ (C 등급)																				627

품평 결과 산출	
1.	품평인이 항목별 선정된 번호를 더하여 그 더한 합에 2.5를 곱하여 100%를 기준으로 A, B, C, D, F 등급로 결과를 산출한다. (피부자극 관련 항목은 산출시 자극이 없을 시 5점, 자극이 있을 시 1점으로 계산한다.)
2.	등급 : A 등급(100~90), B 등급(89~80), C 등급(79~70), D 등급(69~60), F 등급(60이하) 만약 A~B등급일 경우, 일부 수정후 제품출시. C 등급일 경우, 개발계획연기 및 재 검토 요망. D~F등급일 경우, 개발정지 및 전반적인 재 검토 요망

(3) 품평 결과의 해석

- 제품에서 베이스취가 있으므로, 향을 첨가하는 것이 좋을 것이라 평가되었음.
- 사용감에 있어, 40대정도에서는 사용하기가 가벼운 느낌을 준다고 평가됨.
- 자극에 대한 부분은 1명의 품평인이 사용후 3일까지는 도포부분이 조금 가려운 증상이 있었다고 함.
- 기본적인 보습력에는 우수하다는 평가를 받음.

나. 제형의 개선 실험

1차적으로 완료했던 크림제형에 대해 품평결과를 토대로 하여 제형의 개선실험을 실시하였으며, 이는 보습력을 보다 강화하고, 사용감과 자극에 대한 문제점을 개선하는데 목적을 두었음.

(1) 2차 제품 안전도 시험

2차 피부 첩포 시험은 자사의 직원을 대상으로 20명의 지원자에게 실시하였으며, 실험방법은 왼쪽팔 안쪽에 각각 샘플이 도포되지 않은 Control과 품질평가에 사용된 제품, 자사에서 생산되어지는 RNCM을 Haye's Test Chamber에 일정량을 도포하여 부착 후 24시간후 Chamber를 떼어낸 후 부착했던 부위의 상태를 3일간 관찰하여 결과를 표시함.

2차 피부 철포 시험 결과				
철포시간	24시간		판정기준	Draize의 P.I.I법을 기준으로 판정
판정방법	1차 판정	patch 제거후 30분후	3차 판정	patch 제거후 1일후
	2차 판정	patch 제거후 2일후	4차 판정	patch 제거후 3일후
Test 위치	왼팔 안쪽	실험방법	Closed patch test using Haye's test Chamber	
시험제품명	1	2	3	
	Control	품평제형	RNCM(자사의 크림)	
실험 결과				
지원자 정보			시험 결과	비 고
성별	연령	피부타입		
여	29	지성	자극없음	
여	28	중성	자극없음	
남	41	지성	자극없음	
남	35	복합성	자극없음	
여	27	지성	자극없음	
여	28	복합성	자극없음	
여	29	복합성	자극없음	
남	41	지성	자극없음	
남	50	중성	자극없음	
남	36	건성	자극없음	
여	28	중건성	자극없음	
남	38	지성	자극없음	
여	39	중성	자극없음	
여	29	지성	자극없음	
여	39	건성	자극없음	
여	29	건성	자극없음	
여	36	건성	자극없음	
여	36	건성	자극없음	
여	27	중성	자극없음	
남	37	건성	자극없음	
비 고				

(2) 개선 제형의 기기적 평가

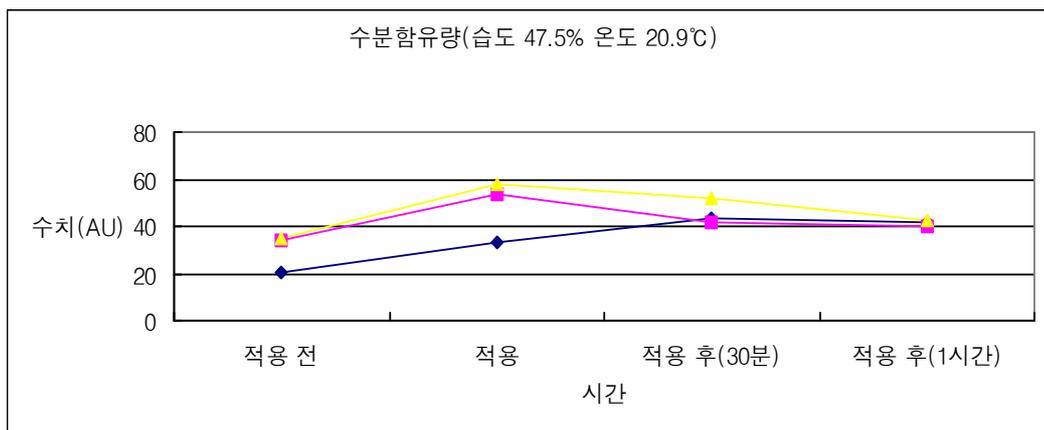
제품을 피부 도포시 수분, 유분의 변화량, 및 피부pH를 측정하기 위해 MPA-5 (Multi Probe Adaptor System, Courage & Khazaka electroni GmbH, Cologne, Germany)를 이용하여, 제품 적용 전과 적용 직후, 적용 30분, 적용 1시간 경과 때의 변화를 측정하였음. 실험대상자는 4

명이며, 25~30세의 연령분포를 갖는 미혼 여성이었으며 측정부위는 팔의 하박부에 표시를 하여 그 지점을 측정하였음.



(가) 수분 측정 방법 및 결과

수분 측정은 Corneometer CM 825(Courage & Khazaka, Germany)을 사용하였으며 피부에서 가장 높은 절연계수를 가지고 있는 수분 함량에 따른 정전용량(capitance)을 측정함으로써, 수분함량의 상대적 크기를 측정하였음. 측정장치는 감지기를 측정부위 피부 표면에 밀착시킨 후 가볍게 누르면 나타나는 수치를 차제 기준의 임의 단위인 AU(Arbitrarary Unit)로 표시하였으며 측정값은 1회 측정값을 사용하였음.

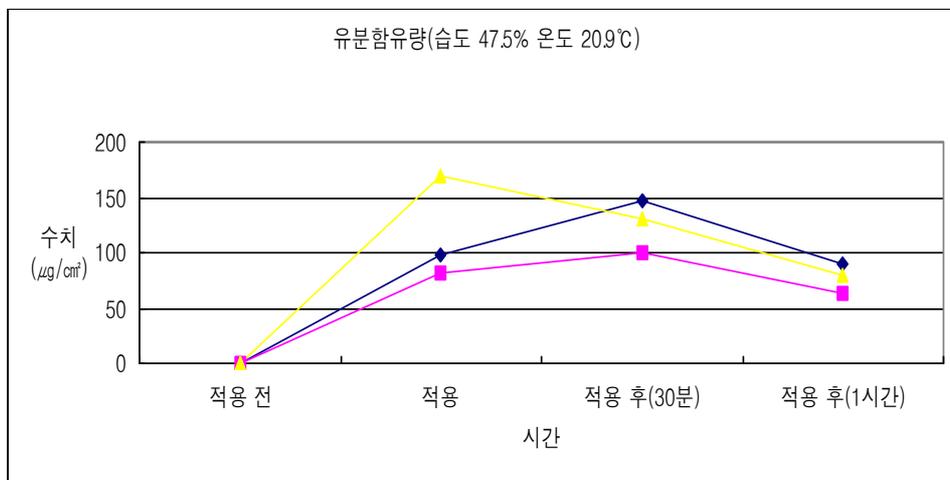


- 제품 적용 시에는 급격하게 수분 함유량이 증가한 것을 볼 수 있고 적용 후 30분, 1시간 뒤에도 큰 차이 없이 수분을 유지하는 것으로 나타났음
- 실험자 1명이 적용 전에는 건성 피부, 2명은 moisturized 피부로 나타났으나 적용 후에는 moisturized, Sufficiently Moisturized로 나타났고

적용 후 30분 후에는 3명은 계속적으로 Sufficiently Moisturized로 유지하고 1시간 뒤에도 Sufficiently Moisturized 상태로 유지 하는 것을 알 수 있음.

(나) 유분 측정 방법 및 결과

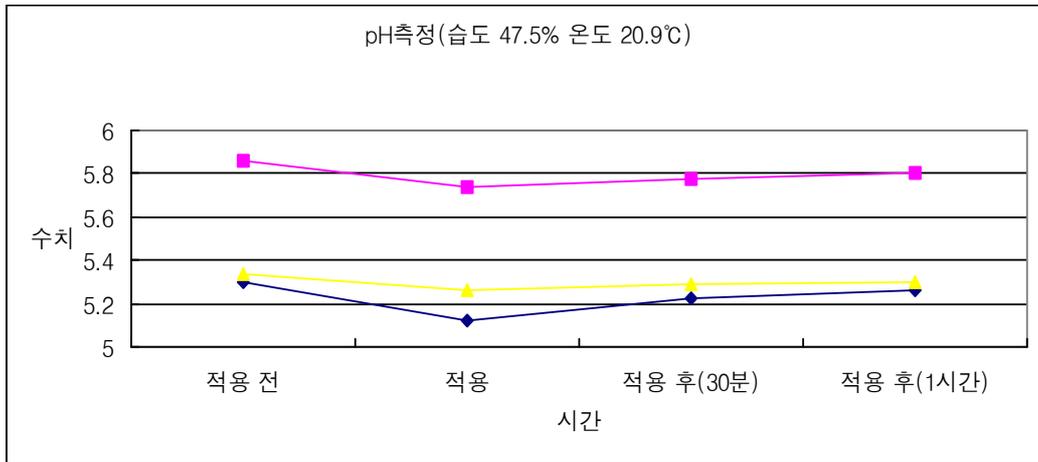
유분 측정은 Sebummeter SM 810(Courage & Khazaka, Germany)을 사용하였음. 측정은 투명 플라스틱 필름이 부착되어 있는 Probe를 피부 표면에 접촉하여 피부를 접촉하여 흡착시킨 후, 빛의 투과하는 정도를 측정하였으며, 피지량의 단위는 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 표시하였다. 측정값은 1회 측정된 값을 사용하였음.



제품 적용 시에는 급격하게 유분 함유량이 증가하였고, 적용 후 30분에는 약간의 유분이 함유되어 있고 1시간 뒤에는 다소 감소하여 Oily 상태로 유지하는 것으로 나타났음. 제품 적용시, 1시간 이상 유분감을 느낄 수 있어 아주 건조한 피부에 적용하는 것이 적합하다고 생각됨.

(다) pH 측정

피부 pH의 측정은 Skin-pH-meter pH 905(Courage & Khazaka, Germany)를 사용하였으며, 측정방법은 pH probe를 측정부위에 접촉시켜 측정하였음. 측정값은 1회 측정값을 사용하였음.



- 적용 전에는 2명이 정상 피부로 나타났고 1명은 알칼리 피부로 나타났으나 제품 적용 후에도 적용 전과 같은 동향으로 나타났음.
- 수치상으로 약간의 pH가 감소하여 알칼리 피부를 정상적인 피부로 도와주는 역할을 한다고도 할 수 있음.

(라) 기기적 평가 사진



5. 원료의 규격화

가. 원료의 규격

승마, 세신, 울금이 혼합된 추출물을 AD Whitening Complex로 명명하고, ICID에 등재한 후, 추출물에 대한 시험규격을 표준화하였음.

Testing Item	Specification
INCI Name	Water (and) Butylene Glycol (and) Asarum Heterotropoides Extract (and) Curcuma Longa (Turmeric) Root Extract (and) Cimicifuga Racemosa Root Extract
Appearance	Dark red brown liquid
pH Value	5.5 ± 1.0
Confirm test1	Dark red brown
Confirm test2	Dark red brown
Specific Gravity	0.98 - 1.04
Heavy Metal	≤ 10 ppm
Arsenic	≤ 2 ppm
Microbes	≤ 100 cfu/ml

이 원료는 세신, 울금, 승마로부터 추출하였음. 제품명: AD Whitening Complex.

확인시험 1: 추출물 1ml에 클로로포름 1ml을 가하여 섞은 후 무수초산 2 ml를 흔들어 섞은 후 황산 2ml를 유리관 표면에 천천히 가할 때 추출물 수용액은 적갈색을 나타냄.

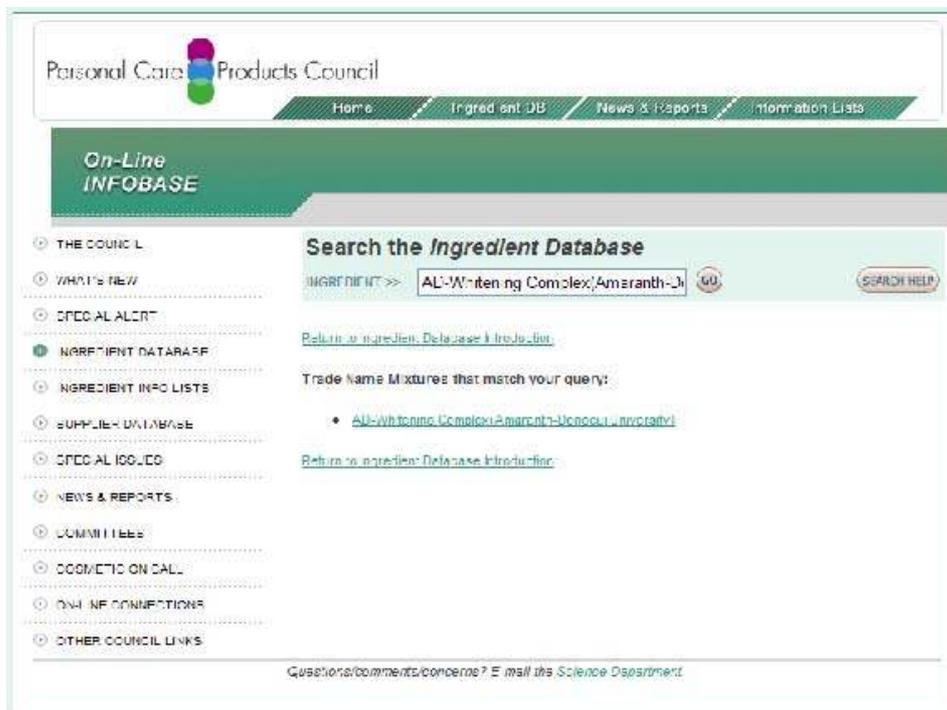


확인시험 2: 추출물 2ml에 무수초산 2ml을 가하고 황산 2ml을 가할 때 추출물 수용액은 적갈색을 나타냄.



나. 원료 등재 사항

승마, 세신, 울금이 혼합된 추출물을 AD Whitening Complex로 명명하고, CTFA (Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, 미국화장품협회, 2009년부터 personal care products council로 변경. www.personalcarecouncil.org)의 ICID (International Cosmetic Ingredient Dictionary)에 등재하였음.



다. 원료의 안정성 시험

AD-Whitening Complex를 각각 100ml 용기에 넣어, 실온, 5℃, 40℃, 50℃에 보관하면서, 30일간 원료의 변화를 시험한 결과 5℃에서만 약간의 침전이 발생하고, 나머지 보관조건에서는 원료의 상태를 유지하였음. 그러므로, 본 원료의 경우, 실온에서 보관하면서 사용해도 무관한 것으로 판단됨.

라. 원료의 안전성 시험

AD-Whitening Complex를 각각 1%, 5%, 10%의 농도로 정제수에 희석하여 15명의 지원자를 대상으로 Patch test를 실시하였음. 피부에 도포한 후, 24시간이 지난 다음, 도포하지 않은 대조군과 도포부위를 30분, 1일, 2

일, 3일간 비교하면서 확인하여, 도포된 피부의 상태를 점검하였으며, 원료에 대한 누적 안전성을 확인하기 위해 2주간 3회간 실시하였으며, 도포된 부위에서는 자극이 발생되지 않았음.

PATCH TEST 결과 기록서						
척포시간	24시간		판정기준		Draize의 P.I.I법을 기준으로 판정	
판정방법	1차 판정		patch 제거후 30분후		3차 판정	patch 제거후 1일후
	2차 판정		patch 제거후 2일후		4차 판정	patch 제거후 3일후
Test 위치	원팔 안쪽		실험방법	Closed patch test using Hays' s test Chamber		
시험제품명	1		2		3	
	ADWC 1%		ADWC 5%		ADWC 10%	
실험 결과						
판정			결과			비 고
지원자	성별	나이	ADWC 1%	ADWC 5%	ADWC 10%	
지원자	성별	나이	ADWC 1%	ADWC 5%	ADWC 10%	
1	여	31	무자극	무자극	무자극	
2	남	44	무자극	무자극	무자극	
3	남	38	무자극	무자극	무자극	
4	남	31	무자극	무자극	무자극	
5	여	30	무자극	무자극	무자극	
6	남	44	무자극	무자극	무자극	
7	남	53	무자극	무자극	무자극	
8	여	31	무자극	무자극	무자극	
9	남	40	무자극	무자극	무자극	
10	남	39	무자극	무자극	무자극	
11	여	38	무자극	무자극	무자극	
12	여	35	무자극	무자극	무자극	
13	남	37	무자극	무자극	무자극	
14	남	29	무자극	무자극	무자극	
15	여	31	무자극	무자극	무자극	
비 고						

6. 제품화 실험

가. 제형의 방부력 시험

화장품의 경우, 제품의 보존기간(2~3년)동안 미생물의 오염 없이 보존할 수 있는지의 여부를 확인하고, 첨가된 방부보존제의 함량이 적당한지를 확인하기 위한 실험을 실시하였음.

(1) 사용균주

균 주 명
<i>Escherichia. coli</i> (ATCC 8739 = KCCM 40271)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027 = KCCM 11802)
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633 = KCCM 11316)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538 = KCCM 40050)
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231 = KCCM 11282)

(2) 시험방법

제조한 크림을 각각 50g씩을 고압 멸균한 광구시약병에 넣어, 균수가 $10^5 \sim 10^6$ cfu/ml 되도록 제품에 넣어 고루 혼합시켜 실온에서 보관하면서 균주 접종 후 즉시, 1주, 2주, 3주, 4주에 측정하여 검출되는 균수를 측정하였으며, 4주 내 모두 사멸하면 적합한 것으로 판단하였음.

(3) 시험결과

표와 같이 4주간의 방부력 시험 결과는 양호한 것으로 나타났으며, *Bacillus subtilis* 의 경우 3주가 될 때까지 완전히 사멸하지 않은 상태였으나, 4주가 되었을 때, 완전히 사멸하는 것으로 나타났음.

균주명		0	1주	2주	3주	4주
<i>Escherichia coli</i>	Cell 수(cell/g)	9.00×10^2	0	0	0	0
	사멸율(%)	0	100	100	100	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cell 수(cell/g)	5.00×10^2	0	0	0	0
	사멸율(%)	0	100	100	100	100
<i>Bacillus subtilis</i>	Cell 수(cell/g)	1.95×10^5	8.60×10^4	4.70×10^4	4.00×10^2	0
	사멸율(%)	0	55.90	75.90	99.79	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cell 수(cell/g)	1.10×10^3	0	0	0	0
	사멸율(%)	0	100	100	100	100
<i>Candida albicans</i>	Cell 수(cell/g)	2.00×10^3	0	0	0	0
	사멸율(%)	0	100	100	100	100

나. 처방 안정도 시험

(1) 실험 방법

AD Whitening Complex를 5% 함유한 제품을 제조하여 100g씩 시험용 Pet용기에 나누어 담은 후, 각각 냉장(5℃), 실온, 40℃, 50℃의 조건에서 8주간 제품의 변화를 관찰하였음. O/W제형의 유화제품의 경우, 유수상의 비가 맞지 않을 경우, 고온에서 유상과 수상이 분리되는 현상을 보이므로, 이를 점검하기 위한 것임. 안정도 시험은 제품의 외관성상, 점도(Brook Field DV-1+ Viscometer S 06, 50rpm, 30sec), pH(Mettler Seven Multi)를 확인하였음. 또한, 원심분리기를 이용하여 30℃에서 15,000rpm으로 20분간 원심분리를 하여, 제품의 분리정도를 확인하였고, 내용물의 일부를 현미경을 통해 유화상태를 확인하였음.

(2) 실험 결과

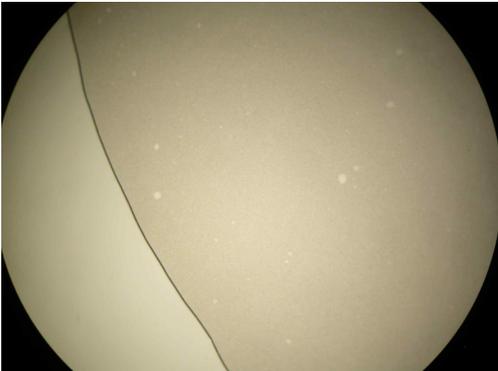
원심분리기를 통해 확인한 안정도는 양호하였으며, 각각 온도별로 보관하면서 점검한 상태를 보면, 4주가 경과하면서, 40℃와 50℃에서 보관한 제품의 경우, 기존의 색상에서 짙어져 갈색으로 변했으며, 냉장에서 보관한 샘플은 실온

보관제품보다 약간 색상이 얼어지는 현상이 나타났으나, 제형이 분리되거나 하는 현상은 나타나지 않았으며, pH의 경우에도 기준값에서 ± 0.5 를 벗어나지 않아, 제품의 안정도는 양호한 것으로 판단됨.

- 온도별 점검사항

		RT.	40℃	50℃	5℃
제조0일	외관성상	얇은 황색의크림상	좌동	좌동	좌동
	점도	10,520	좌동	좌동	좌동
	pH	7.20	좌동	좌동	좌동
제조2주	외관성상	얇은 황색의크림상	좌동	좌동	좌동
	점도	10,120	11,080	10,930	12,020
	pH	7.18	7.48	7.45	7.25
제조4주	외관성상	얇은 황색의크림상	황색의크림상	갈색의크림상	얇은 황색의크림상
	점도	10,890	11,860	12,650	12,080
	pH	7.22	7.46	7.40	7.30
제조6주	외관성상	얇은 황색의크림상	황색의크림상	갈색의크림상	얇은 황색의크림상
	점도	11,305	11,505	11,905	12,305
	pH	7.24	7.42	7.47	7.36
제조8주	외관성상	얇은 황색의크림상	황색의크림상	갈색의크림상	얇은 황색의크림상
	점도	10,980	11,280	11,780	12,980
	pH	7.23	7.44	7.46	7.35

- 유화입자 상태 확인



다. 제품의 안전성 시험

원료시험에서와 같이, AD-Whitening Complex를 5% 함유한 크림을 15 명의 지원자를 대상으로 Patch test를 실시하였음. 피부에 도포한 후, 24시간 이 지난 다음, 도포하지 않은 대조군과 도포부위를 30분, 1일, 2일, 3일간 비교하면서 확인하였으며, 도포된 부위에서는 자극이 발생되지 않았음.

PATCH TEST 결과 기록서				
채포시간	24시간	판정기준	Draize의 P.I.I법을 기준으로 판정	
판정방법	1차 판정	patch 제거후 30분후	3차 판정	patch 제거후 1일후
	2차 판정	patch 제거후 2일후	4차 판정	patch 제거후 3일후
Test 위치	왼팔 안쪽	실험방법	Closed patch test using Haye's test Chamber	
시험제품명	AD-Whitening 함유 크림			
실험 결과				
지원자	판정		결 과	비 고
	나이	성별		
	31	여	무자극	
	44	남	무자극	
	38	남	무자극	
	31	남	무자극	
	30	여	무자극	
	44	남	무자극	
	53	남	무자극	
	31	여	무자극	
	40	남	무자극	
	39	남	무자극	
	38	여	무자극	
	35	여	무자극	
	37	남	무자극	
	29	남	무자극	
	31	여	무자극	
비 고				

라. 제품에서의 효능효과 시험

최종적으로 결정된 처방에 크림베이스, AD-Whitening Complex(ADWC) 2%, 5%, 알부틴 2%, 알부틴2%+AD-Whitening Complex 5%를 함유한 제품에 DPPH 소거능과 Tyrosinase 활성 저해능, Collagenase 활성 저해능에 대해 효능효과를 검토하였음. 실험결과를 토대로, 알부틴 2%와 ADWC 5%를 함유한 제품을 시제품 생산에 사용하기로 하였음.

(1) DPPH Scavenging Activity

활성산소에 의한 피부노화 과정은 지질 과산화, 단백질 산화, DNA 산화, 멜라닌 생성, 결합조직의 절단 및 비정상적인 교차결합들을 포함함. 이들 반응들은 거의 대부분 라디칼 반응으로서, 자동산화반응 과정이 포함됨. 생체 내에서 자동산화반응을 차단시키는 역할은 항산화제가 담당함. 전자를 주는 능력 즉, 환원력이 클수록 강한 항산화제가 됨. 항산화제의 환원력을 측정할 수 있는 시약으로 1,1-diphenyl-2picrylhydrazyl radical(DPPH)가 있으며, DPPH는 화합물 내 질소 중심의 안정화된 구조의 radical로 존재함. 517nm에서 최대 흡수를 나타내며, 환원되면 517nm에서 흡수가 없어짐.

시험결과, ADWC 5%함유 제품의 경우, 크림베이스에 10배가 넘는 49.1%, 알부틴 2%의 약 5배가 넘는 활성을 나타내었음.

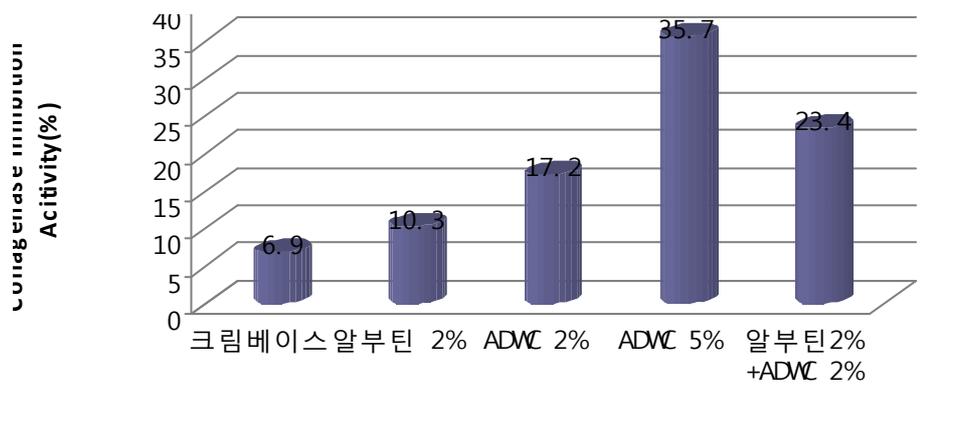


그림 3-76. 아마란스 샤페이 크림 DPPH 소거능

(2) Tyrosinase 활성 저해능 실험

시험결과 알부틴2%와 ADWC 2%가 함유된 제품이 36.4%로 가장 높은 억제활성을 보였으며, 그다음은 ADWC 5%, 알부틴 2%의 순으로 결과가 나타났음.

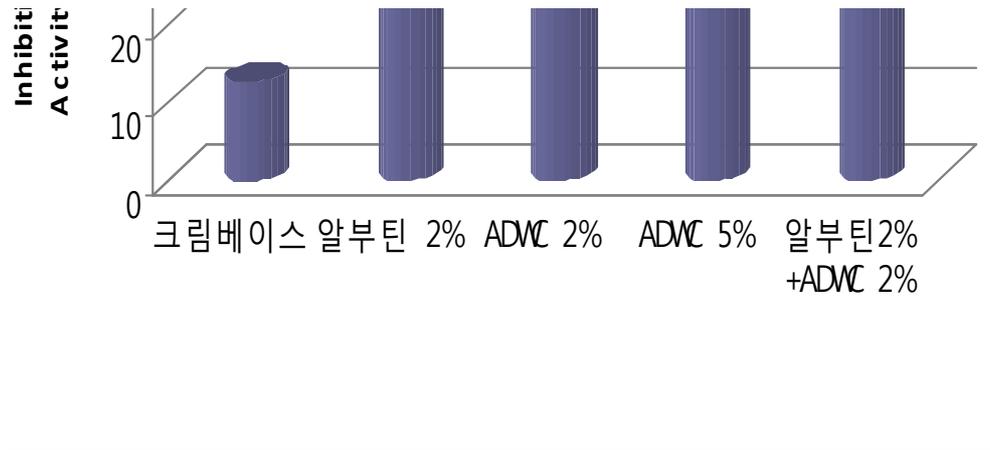


그림 3-77. 아마란스 사이니크림 Tyrosinase 저해능 효과

(3) Collagenase 활성 저해능 실험

콜라겐은 피부 진피를 구성하는 주요 단백질로서 피부구조와 탄력을 유지하는 역할을 하므로 콜라겐의 결핍은 피부주름의 발생원인 중 하나로 간주되고 있음. 이는 콜라겐은 나이가 들면서 생성의 감소를 보이며 분해도 증가되어 피부 진피층의 함몰을 유도하여 피부의 주름을 생성하는 것으로 알려져 있음. 또한 광노화의 원인인 UV에 의해 collagenase와 같은 MMP 발현으로 인하여 collagen의 분해가 증가되어 주름이 나타남. 따라서 각 처방의 피부 주름개선 물질의 효력을 알아보기 위하여 collagenase 활성 저해능력을 실험하였음. Collagenase 활성 저해 실험결과, ADWC 5%함유 제품이 35.7%로 가장 높은 활성을 나타냈었음.

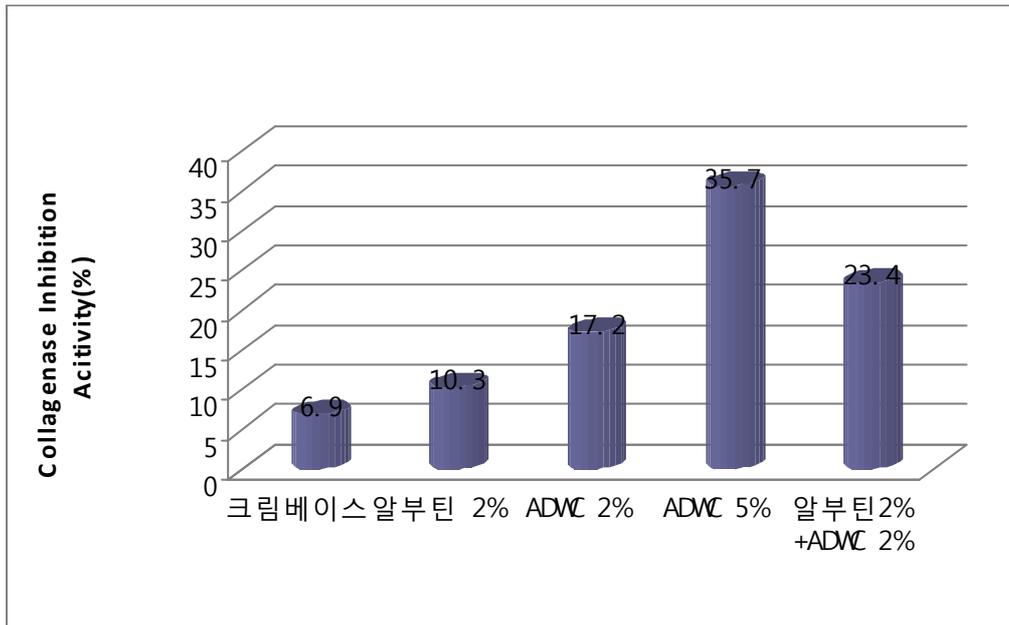


그림 3-78. 아마란스 샤페이 크림 Collagenase 저해능

(4) 실험동물을 이용한 피부착색 저해효과

혼합추출물(ADWC) 2% 및 5%를 함유한 크림제제와 함께 대조군으로 arbutin 2% 함유 크림제제 그리고 base만으로 구성된 제제를 이용하여 기니피그를 이용한 실험을 진행하였음. 체중 400-500 g 정도의 암컷 흰색/갈색 혼합 기니피그를 듀얼바이오텍 (주)로부터 구입하여 2 주간 실험실에서 순화시킨 후 사용하였음. 실험동물을 아무런 처리를 하지 않은 정상군, 크림제제만 처리한 base군, 승마 추출물을 첨가한 ADWC 2% 및 5% 군, 그리고 arbutin 2% 군으로 배정하여 실험을 실시하였음.

기니피그의 배부 피부 털을 제거한 다음 자외선 B (UVB)를 64.8 J/cm² 양으로 이를 간격 3회 조사 후 각 군에 해당하는 시료를 매일 32일간 도포하였음. 시간 경과에 따른 피부의 착색정도를 color reader (CR-10, Konica Minolta)를 통해 UVB 조사 후 3, 6, 10, 17, 24 및 32일째 측정하였음.

피부착색에 대한 결과는 정상군에 비해 base처리군에서 처리일자가 경과함에 따라 낮은 수치를 보이며 이는 ADWC 2%, ADWC 5%, arbutin 2%, 알부틴 2%+ADWC 2%군 모두에서 유사한 결과를 보였음. 이를 base처리군과 기타 처리군을 비교해보면 base에 비해 ADWC 및 arbutin처리군 모두 낮은 피부 착색도를 보이나 유의성을 나타내는 것은 ADWC 2% 6일째 ($p < 0.01$)와 24일째 ($p < 0.05$), 그리고 arbutin 2%, ADWC 2% 처리군의 10일째 ($P < 0.05$)와 24

일째 ($P < 0.01$)에서 유의성을 보여 ADWC가 피부착색 저해효과가 있다고 생각됨.

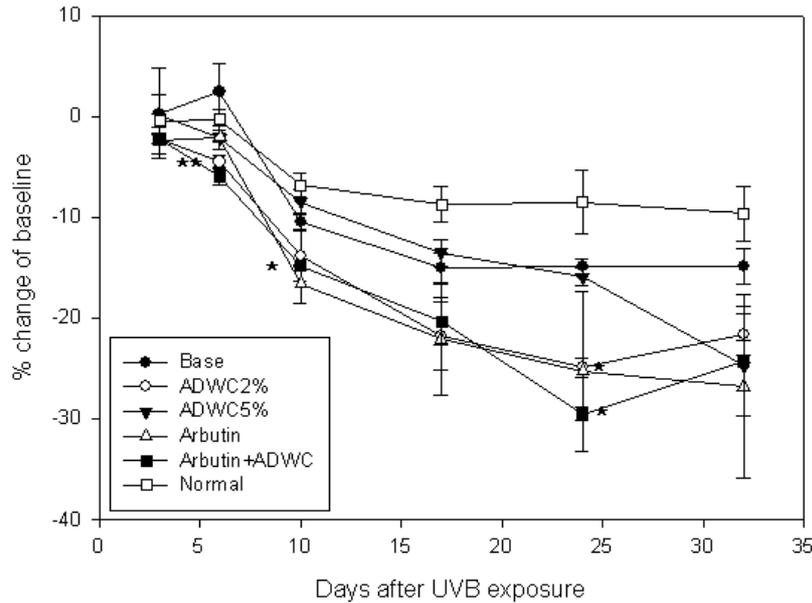


그림 3-79.

마. 조직화학적 및 면역조직화학적 관찰

UVB 조사 32일 후 10% chloral hydrate (350 mg/kg i.p.)로 마취하에 배부의 피부를 절취하여 4% paraformaldehyde에 4°C 12시간 고정하여 10 μm의 파라핀 절편을 얻었음.

피부내 melanin 색소과립의 침적 정도를 관찰하기 위하여 Fontana-Masson 염색을 실시하였고, tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2에 대한 면역반응을 위해 3% methanolic hydrogen peroxide에 30분간 실온에서 처리하여 ABC kit 및 DAB substrate kit (Vector Lab.)로 염색성한 후 염색성을 관찰하였음.

Melanin색소침적을 살펴 보면 UVB를 조사하지 않은 군에서도 표피의 기저층에서 흑색 melanin색소과립을 관찰할수 있었으며 UVB를 조사한 대조군에서는 더욱 현저하여 기저층에서 표피상부에 이르는 종자층, 각질층에서도 많은 흑색 색소과립의 침적이 관찰되었음. 이에 비해 ADWC 및 arbutin 처리군에서는 이들 색소 침적의 정도 가 다소 줄어 들었으며 처리군의 차이는 현저하지 않았음. Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2에 대한 면역조직화학적 검색은 염색 적응성이 낮아 군별 차이를 나타낼 정도는 되지 않았음. 결과적으로 ADWC 처치에 의한 피부 침적정도를 melanin 색소에 대한 조직화학적 방법으로 검정할 수 있었음.

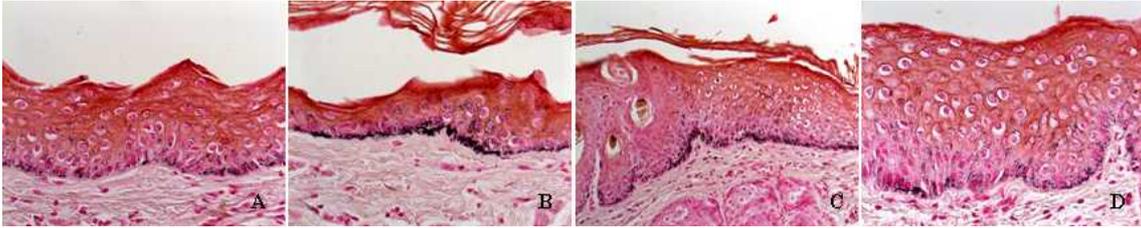


그림 3-80. Fontana-Masson 염색을 통한 멜라닌색소 검정. 정상군에 비해 UVB 조사군에서 많은 멜라닌 색소 침적을 볼 수 있음 이는 ADWC 및 arbutin 처리에 의해 완화 됨을 알 수 있었음. A, 정상군; B, UVB 조사군; C, UVB 조사후 ADWC 2% 처리군; D, UVB 조사후 arbutin 처리군.

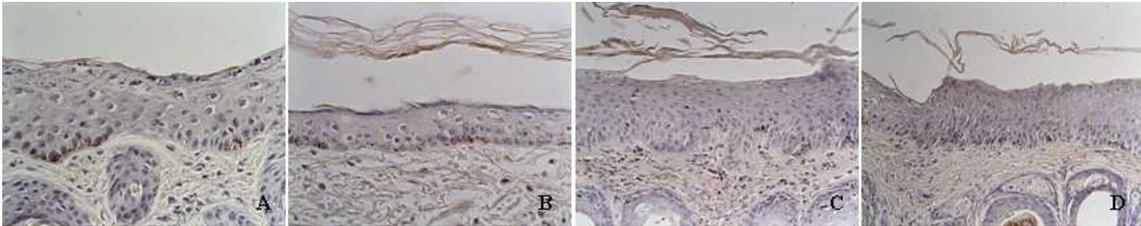


그림 3-81. Tyrosinase에 대한 면역조직화학적 검색. 각 군에서 일부 tyrosinase에 대한 염색성을 보였으나 현저한 차이를 나타낼 정도의 반응 적응성을 보이지 않음. A, 정상군; B, UVB 조사군; C, UVB 조사후 ADWC 2% 처리군; D, UVB 조사후 arbutin 처리군.

시제품 생산

(가) 시제품 제조 공정 내용.

본 기업에서 개발한 제조 공정에 따라 시제품을 생산하였음.

(나) 부자재의 준비

- ① 용기 스티커 : 제품명과 용량 등을 기재할 용기 스티커를 제작하여 시제품 용기의 앞뒤 뒷면에 부착하여 사용하기로 함.

<p style="text-align: center;">Amaranth Shiny Cream 50g Amaranth Cosmetics</p>	<p style="text-align: center;">농림기술개발과제결과 시제품</p> <p style="text-align: center;">아마란스 샤이니 크림</p> <div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center;">   </div>
--	---

- ② 용기 : 화장품 부자재를 판매하는 인터넷 쇼핑몰에서 50g 용량의 용기를 구입하여, 직접 용기 스티커를 부착하여 사용하기로 함.



그림 3-82.

(다) 시제품 생산

시제품을 생산하여 시제품에 대해 1차 사용자 품평을 실시한 후, 미국 FDA에 피부안전성시험과 피부미백효능효과시험을 위해 생산품을 발송하였음.

① 지원자 품평

결과 항목	품 평 내 용																				총계
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1항	4	4	3	5	4	5	4	4	4	3	5	4	4	5	3	4	4	4	3	4	80
2항	3	4	4	4	4	4	5	4	4	5	5	4	4	4	4	5	4	4	4	4	83
3항	4	3	5	4	4	3	4	5	4	4	5	4	4	4	4	4	5	4	4	4	82
4항	3	3	4	2	4	3	4	3	4	3	5	3	5	4	4	4	3	5	5	3	74
5항	4	4	4	4	4	3	4	5	4	4	3	4	3	4	5	4	4	4	4	4	79
6항	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	100
7항	4	4	3	5	4	4	3	4	5	3	4	3	3	4	4	3	4	4	4	3	75
8항	3	3	4	4	5	4	3	4	5	4	4	3	4	4	3	3	4	5	3	3	75
합계	(648/20)*2.5 = 81.0																				648

품평 결과 산출

1. 품평인이 항목별 선정된 번호를 더하여 그 더한 합에 2.5를 곱하여 100%를 기준으로 A, B, C, D, F 등급로 결과를 산출한다.
(피부자극 관련 항목은 산출시 자극이 없을 시 5점, 자극이 있을 시 1점으로 계산한다.)

2. 등급 : A 등급(100~90), B 등급(89~80), C 등급(79~70), D 등급(69~60), F 등급(60이하)
만약 A~B등급일 경우, 일부 수정후 제품출시. C 등급일 경우, 개발계획연기 및 재 검토 요망.
D~F등급일 경우, 개발정지 및 전반적인 재 검토 요망

② FDA 시험의뢰 결과

시제품에 대해, 피부안전성 시험과 피부미백효능효과시험을 미국 FDA 시험기관에 의뢰하였으며, 현재 피부안전성 시험에 대하여 총 75명의 지원자가 시험에 참가하였으며 이중 시험 기간 동안 어떠한 부작용도 보고되지 않았다는 결과를 통보 받았음.



BioScreen®
Testing
Services, Inc.

PRIMARY SKIN IRRITATION EVALUATION

Date: March 19, 2009

Study No.: 09-005B

Sponsor: Amaranth Cosmetics
#1534-2 Songjeon-Dong
Gangseo-Gu Busan, Korea

1.0 Objective:

To determine the primary (acute) irritation potential of a test material after a single application to the skin of human subjects for 48 hours.

2.0 Test Material:

2.1 Test Material Description:

Date Received: February 23, 2009

Received From: Amaranth Cosmetics

Number Of Test Samples Received: 3

Label On Test Samples: Amaranth Shiny Cream

Accession No.: 614994

2.2 Test Material Handling:

Upon arrival at BioScreen Clinical Services (BCS) the test material was assigned a unique laboratory code number and entered into a daily log identifying the lot number, sample description, sponsor, date received and tests requested.

Microbiology • Analytical Chemistry • Clinical Safety & Claims
F.D.A. Registered • California State Certified • D.E.A. Registered
BioScreen® is a registered trademark of BioScreen® Testing Services, Inc.

Samples will be retained for a period of thirty (30) days beyond submission of final report unless otherwise specified by the sponsor.

Sample disposition will be conducted in compliance with appropriate federal, state and local ordinances.

2.3 Test Material Evaluation Prerequisite:

Prior to induction of a human test panel, animal toxicology, microbiology and other in-vivo and/or in-vitro performance data may be required to assess the feasibility of commencement as dictated by an Institutional Review Board (IRB).

3.0 Panel Selection:

3.1 Standards for Inclusion in a Study:

- Individuals who were not currently under a doctor's care.
- Individuals who were free of any dermatological or systemic disorder that would interfere with the results, at the discretion of the Investigator.
- Individuals who were free of any acute or chronic disease that would interfere with or increase the risk on study participation.
- Individuals who completed a preliminary medical history form mandated by BCS and were in general good health.
- Individuals who read, understood and signed an informed consent document relating to the specific type of study.
- Individuals who were able to cooperate with the Investigator and research staff, and were willing to have test materials applied according to the protocol, and complete the full course of the study.

3.2 Standards for Exclusion from a Study:

- Individuals who were under 18 years of age.
- Individuals who were currently under a doctor's care.
- Individuals who were currently taking any medication (topical or systemic) that might mask or interfere with the test results.
- Individuals who had a history of any acute or chronic disease that might interfere with or increase the risk associated with study participation.
- Individuals who were diagnosed with chronic skin allergies.

- Female volunteers who indicated that they were pregnant or nursing.

3.3 Recruitment:

Panel selection was accomplished by advertisements in local periodicals, community bulletin boards, phone solicitation, electronic media or any combination thereof.

3.4 Informed Consent and Medical History Forms:

An informed consent was obtained from each volunteer prior to initiating the study describing reasons for the study, possible adverse effects, associated risks and potential benefits of the treatment and their limits of liability. Panelists signed and dated the informed consent document to indicate their authorization to proceed and acknowledge their understanding of the contents. Each subject was assigned a permanent identification number and completed an extensive medical history form. These forms along with the signed consent forms are available for inspection on the premises of BCS only. [Reference 21 CFR C.A. 1 Part 56, Subpart B]

The parties agree to comply with applicable state and federal privacy laws for the use and disclosure of a subject's personal health information by taking reasonable steps to protect the confidentiality of this information. This obligation shall survive the termination or expiration of this Agreement.

4.0 Population Demographics:

Number of subjects enrolled	75
Number of subjects completing study	73
Age Range	18-62
Sex	
Male	33
Female	40
Fitzpatrick Skin Type*	
1 – always burn, does not tan	6
2 – burn easily, tan slightly	15
3 – burn moderately, tan progressively	5
4 – burn a little, always tan	17
5 – rarely burn, tan intensely	11
6 – never burn, tan very intensely	9

*[Agache P., Hubert P., Measuring the skin. (p. 473, table 48.1) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2004, (p. 473, table 48.1)]

Formatted: Left
Formatted: Left
Formatted: Left
Formatted: Left

5.0 Equipment:

Test materials to be tested under occlusive conditions were placed on an 8-millimeter aluminum chamber (Finn Chamber, Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finland) supported on a sheet of Scanpore[®] (occlusive) tape (Norgesplaster A/S, Kristiansand, Norway), or an equivalent.

Test materials to be tested under semi-occlusive conditions were placed on Curad[™] (Beiersdorf Inc., Connecticut, USA) sensitive skin bandages.

Test materials to be tested in an open-patch were rubbed directly onto skin for approximately one (1) minute.

Approximately 0.02-0.05 mL (in case of liquids) and/or 0.02-0.05 gm (in case of solids) of the test material was used for the study. Liquid test material was dispensed on a 7.5mm paper disk, which fit in the Finn Chamber.

6.0 Procedure:

- Subjects were requested to bathe or wash as usual before arrival at the facility.
- Patches containing the test material were then affixed directly to the skin of the intrascapular regions of the back, to the right or left of the midline and subjects were dismissed with instructions not to wet or expose the test area to direct sunlight.
- Subjects were instructed to remove the patches approximately forty-eight (48) hours after application, i.e., a minimum of one (1) hour prior to test site evaluation.
- Test sites were evaluated by trained laboratory personnel.
- In the event of an adverse reaction, the area of erythema and edema is measured. The edema is estimated by the evaluation of the skin with respect to the contour of the unaffected normal skin.
- Clients will be notified immediately in the case of an adverse reaction and a determination will be made as to treatment program if necessary.

7.0 Scoring:

Scoring scale and definition of symbols shown below are based on the scoring scheme according to the International Contact Dermatitis Research Group scoring scale ^[Rietschel, R.L., Fowler, J.F., Ed., Fisher's Contact Dermatitis (fourth ed.), Baltimore, Williams & Wilkins, 1995] listed below:

- 0** no reaction (negative)
- 1** erythema throughout at least $\frac{3}{4}$ of patch area
- 2** erythema and induration throughout at least $\frac{3}{4}$ of patch area
- 3** erythema, induration and vesicles
- 4** erythema, induration and bullae

- D** Site discontinued
- Dc** Subject discontinued

NOTE: Clinical evaluations are performed by a BCS investigator or designee trained in the clinical evaluation of the skin. Whenever feasible, the same individual will do the scoring of all the subjects throughout the study and will be blinded to the treatment assignments and any previous scores.

8.0 Results:

SUMMARY OF RESULTS

Accession No.: 614994
 Test Material Description: Amaranth Shiny Cream
 Patch Description: Occlusive

Subject Information					Response by Visit	
No.	ID	Sex	Age	Skin Type	0 Hr	48 Hr
1	408	M	58	4	0	0
2	465	M	42	5	0	0
3	473	F	33	4	0	0
4	559	F	40	1	0	0
5	579	F	33	6	0	0
6	690	F	42	4	0	0
7	770	F	55	5	0	0
8	780	M	44	3	0	0
9	785	F	39	4	0	0
10	924	F	45	5	0	0
11	955	M	55	6	0	0
12	965	M	32	2	0	0
13	1008	F	56	6	0	0
14	1094	F	46	6	0	0
15	1398	M	48	3	0	0
16	1537	F	43	4	0	0
17	1659	M	60	2	0	0
18	1747	F	37	4	0	0
19	1763	F	53	6	0	0
20	1838	M	45	2	0	0
21	1882	F	47	5	0	0
22	1973	F	49	5	0	0
23	2016	F	51	1	0	0
24	2086	F	25	2	0	0
25	2135	F	42	4	0	0
26	2539	M	45	6	0	0
27	2632	M	23	5	0	0
28	2773	F	38	2	0	0
29	2776	F	22	3	0	Dc
30	2851	M	48	2	0	0
31	2999	F	33	5	0	0
32	3091	M	54	6	0	0
33	3130	F	59	2	0	0

Subject Information					Response by Visit	
No.	ID	Sex	Age	Skin Type	0 Hr	48 Hr
34	3162	M	46	4	0	0
35	3168	M	48	5	0	0
36	3200	F	48	2	0	0
37	3227	F	57	6	0	0
38	3264	M	59	6	0	0
39	3341	M	19	2	0	0
40	3441	F	51	3	0	0
41	3705	M	55	6	0	0
42	3756	F	47	2	0	0
43	3972	F	50	6	0	0
44	3997	M	51	4	0	0
45	4128	F	21	4	0	0
46	4164	F	40	6	0	0
47	4237	M	44	5	0	0
48	4383	M	47	2	0	0
49	4435	M	48	6	0	0
50	4456	F	44	1	0	0
51	4566	F	28	4	0	0
52	4574	F	36	4	0	0
53	4655	F	48	1	0	0
54	4664	M	41	5	0	0
55	4727	M	48	6	0	0
56	4736	F	32	6	0	0
57	4922	M	45	6	0	0
58	4940	M	36	4	0	0
59	4947	F	31	5	0	0
60	4948	M	24	4	0	0
61	4953	F	22	2	0	0
62	4955	M	29	2	0	0
63	4958	M	19	6	0	0
64	4959	F	34	1	0	0
65	4965	M	18	4	0	0
66	4972	F	62	3	0	0
67	4986	M	55	5	0	Dc
68	4991	F	33	4	0	0
69	5000	M	40	6	0	0
70	5002	M	27	2	0	0
71	5011	M	30	6	0	0
72	5014	F	26	1	0	0

Subject Information					Response by Visit	
No.	ID	Sex	Age	Skin Type	0 Hr	48 Hr
73	5027	F	29	2	0	0
74	5036	F	29	4	0	0
75	5050	M	54	3	0	0

9.0 Evaluation Period:

The study was conducted from March 11, 2009 to March 13, 2009.

10.0 Observation:

No adverse reactions of any kind were reported during the course of this study.

11.0 Study Archives:

All original samples, raw data sheets, technician's notebooks, correspondence files and copies of final reports and remaining specimens will be maintained on premises of BCS in limited access storage files marked "Archive".

12.0 Conclusions:

Under conditions of the study, there were no signs of primary irritation for Amaranth Shiny Cream; Accession No. 614994.



Hemali B. Gunt, Ph.D.
Clinical Manager

Page 8 of 8



Mallyc Murray
Quality Assurance Supervisor

총 75명의 지원자가 시험에 임했으며, 이중 시험 기간 동안 어떠한 부작용도 보고 되지 않았다고 결론지어졌다.

CERTIFICATE OF CONFIRMATION FOR TEST PARAMETERS

Client : Amaranth Cosmetics

1534-2, Songjeong Dong, Gangseo - Gu, Busan, Korea

Project Name : Choi Chan Ki

Sample ID : Amaranth Shiny Cream Accession No. : 614994

U.S. FDA Reg. No. : 2087101 Reporting Date : 03-19-09

Skin Irritation Test - Application (human subjects)

SUMMARY OF RESULTS OF CLINICAL STUDY FOR SINGLE APPLICATION PATCH TEST — SKIN IRRITATION EVALUATION (OCCLUSIVE PATCH)

- This primary purpose of the study was to examine potential skin sensitization of a product, Amaranth Shiny Cream.
- No visible reaction was reported during the course of this study. Under condition of the study, Amaranth Shiny Cream did not demonstrate any identifiable symptoms as a skin irritant.

Note : The above analyses were performed by FDA and California Department of Health Services (DOHS) certified laboratories.

The above test parameters are hereby certified and confirmed.

Sincerely,

Kwanmo, Son

K.M Son, President of Asia Section
EK Science Research International Laboratory Co.
Microbac Laboratories, Inc

March 19, 2009



Amaranth Cosmetic

Amaranth Shiny Cream



SKIN TEST COMPLETED

(HUMAN APPLICATION)

US FDA Registration No. : 2087101

Accession No. : 614994

Study No. : 08-011B

Reporting Date. : 03-19-09

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연도별 연구목표 및 평가 착안점

1. 연구개발의 목표

연구개발의 목표	연구범위	연구개발의 내용
미백기능 함유 한방약용작물 선별	<ul style="list-style-type: none"> - 한방의 서지학 및 임상적에 근거에 따라 한방약용작물 선별 	<ul style="list-style-type: none"> - 동의보감 및 본초강목을 중심으로 피부관련 한방 약재 선별 - 한방의 서지학 및 임상적 약재의 현대적 미백 기능 보유 검정
한방약용작물로부터 미백 기능 소재 도출	<ul style="list-style-type: none"> - 미백 기능성 검정과 병행하여 미백 기능 소재 도출 - 미백 기능 소재 분리 방법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 멜라닌 형성에 관여 하는 Tyrosinase 효소 활성 저해 기능 분석으로 소재 선별 - 멜라닌 합성 세포를 이용한 세포내 멜라닌 생성 저해 및 Tyrosinase 효소 활성 저해 분석으로 소재 선별 - 용매와 chromatography를 통한 미백 기능 소재 분리
미백 효능 기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 세포계를 이용한 미백효과 기전 검사와 실험동물 이용 안정성 검사 	<ul style="list-style-type: none"> - 세포계를 이용한 세포 내 melanin합성 저해와 tyrosinase 활성 저해 분석 - melanin 합성 신호경로에 미백 소재 작용 분석 - 실험동물을 이용한 색소침착 및 mealnin생성억제 효과
미백 기능 천연물 함유 미백화장품 시제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 원료의 대량 생산 방법 개발 - 화장품 조성 확립 - 미백신소재의 화장품 원료 허가 	<ul style="list-style-type: none"> - 원료의 대량생산 방법에 따른 추출물의 원료 시험 - 원료의 물성, 안전성, 안정성 검사 - 미백신소재의 화장품 원료 허가 (미국 CTFA)를 위한 실험 - 미국 FDA 등록을 위한 시험

2. 평가의 착안점 및 기준

구분	연도	세부연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	2006	주관기관 · 한방 약용작물의 선별 · 세포계 이용한 효능검정 · 한방 약용작물로부터 미백 기능성 소재 추출	<ul style="list-style-type: none"> - 한방의 서지학, 임상적 처방을 중심으로 미백효과 약용작물 도출 - 미백 소재에 대한 세포독성 조사 - 한방 유래 미백 소재에 의한 melanin 합성, tyrosinase활성, TRPs 관련 단백질 영향 조사 - 기능성 소재 추출을 위한 일차 추출 방법 개발 - 일차 추출물의 in vitro enzyme assay 및 in vivo cell assay에 의한 미백기능성 후보 개발
		협동기관 · 소재의 제형화 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 일차 추출물의 안정성, 안전성, 유효성에 대한 일차적 연구
2차 년도	2007	주관기관 · 우수 후보 소재의 추출 · 세포계에서 미백 효능 분석, 작용기전 및 독성 검사 · 기능 향진된 미백기능성 소 재 선별	<ul style="list-style-type: none"> - 약용작물로부터 기능성 소재 추출 위한 추출 방법 개발 - 유기용매 분획과 크로마토그래피 방법으로 유효성분 분리 - 세포 내에서 Melanin 생성 및 Tyrosinase 활성 저해 조사 - in vitro enzyme assay 검사 - 미백기능성 화장품 위한 후보 소재 선별
		협동기관 · 안정 피부전달 시스템 제형 확립 · 안정화 제형 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 원료의 대량생산 방법에 따른 추출물의 원료 시험 - 원료의 물성, 안전성, 안정성 검사 - 추출 원료의 기능성 검정
3차 년도	2008	주관기관 · 세포계와 동물 실험을 통한 기전연구 · 미백소재의 분리정제 및 화 합물 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 세포시험을 통한 효능기전 연구 - 멜라닌 생합성 신호전달 관련 단백질 연구를 통한 효능기전 연구 - 실험동물 사용한 신 미백 소재 원료의 멜라닌 피부침착 검사 - 승마를 주 대상으로 미백 소재의 분리 및 특성 조사

		<p>협동기관</p> <ul style="list-style-type: none"> · 시제품 조성 확립 · 미백신소재의 화장품 원료 허가 	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품 조성 확립과 안전성, 안정성 검사 - 미백신소재의 화장품 원료 허가 (미국 CTFA)를 위한 실험 - 미국 FDA 등록을 위한 시험 - 시제품 개발
최종 평가		<p>주관기관</p> <ul style="list-style-type: none"> · 미백기능성 소재 도출 · 미백 효능 및 기전 연구 · 미백기능성 소재 분리 및 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 한방의 서지학적, 임상적 고찰을 통한 후보 소재 도출 - 세포계 및 비세포계를 이용한 효능 검사 - 세포계를 이용한 기전 연구 - 동물실험을 통한 효능 검증 - 약용작물의 미백기능성 소재 후보 도출 - 용매분획과 chromatography를 이용한 미백활성 소재의 분리 및 정제
		<p>협동기관</p> <ul style="list-style-type: none"> · 안정화 제제 및 제형 개발 · 기능성 화장품 시제품 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 효능 향상 및 유지 가능한 안정화 제제와 제형개발 - 미백 기능성 화장품 시제품 개발 - 신 미백 소재의 등록 및 미국 FDA 승인을 위한 시험

제 2절 연구개발 목표의 달성도 및 목표달성도에 대한 자체평가

1. 연구개발 목표의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도(%)
주관기관 · 미백기능성 · 소재 도출 · 미백 효능 및 · 기전 연구 · 미백기능성 소 재 · 분리 및 특성 분석	-한방의 서지학적, 임상적 고찰을 통한 후보 소재 도출 - 세포계 및 미세세포계를 이용한 효능 검사 - 세포계를 이용한 기전 연구 - 동물실험을 통한 효능 검증 - 약용작물의 미백기능성 소재 후보 도출 - 용매분획과 chromatography를 이용한 미백활성 소재의 분리 및 정제	100
협동기관 · 안정화 제제 및 제형 개발 · 기능성 화장품 시제품 개발	- 효능 향상 및 유지 가능한 안정화 제제와 제형개발 - 미백 기능성 화장품 시제품 개발 - 신 미백 소재의 등록 및 미국 FDA 승인을 위한 시험	100

2. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
<ul style="list-style-type: none"> - 한방의 서지학적, 임상적 고찰을 통한 후보 소재 도출 - 세포계 및 비세포계를 이용한 효능 검사 - 세포계를 이용한 기전 연구 - 동물실험을 통한 효능 검증 - 약용작물의 미백기능성 소재 후보 도출 - 용매분획과 chromatography를 이용한 미백활성 소재의 분리 및 정제 	<ul style="list-style-type: none"> - 30여 약용작물 선별하여 미백 기능성 검증 - 미백 기능이 우수한 약용작물 발굴 - 멜라닌 생합성 및 Tyrosinase 효소 저해 검증으로 - 추출된 미백 기능 소재의 멜라닌 생합성 과정 단백질에 작용하는 결과 획득으로 미백 기능 기전을 밝힘 - 실험동물을 사용하여 in vivo에서 분리한 소재가 작용하는 것을 밝혀 산업화의 확고한 근거 확립 - 일련의 분리 과정을 거쳐 얻은 미백 기능 소재의 잠정적인 구조를 분석하였음
<ul style="list-style-type: none"> - 효능 향상 및 유지 가능한 안정화 제제와 제형개발 - 미백 기능성 화장품 시제품 개발 - 신 미백 소재의 미국 CTFA 등록 및 미국 FDA 승인을 위한 시험 	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품 조성 설정과 안전성 검정을거쳐 조성을 확립 - 기능성이 높은 원료를 확보할 수 있는 대량 추출법을 확립 - 본 연구개발 결과로 신 미백 소재를 미국 CTFA 등록하였으며, 미국 FDA 승인을 위한 안전성 시험에서 안전성 확인을 획득 하였음

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 논문게재 성과

1. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2006	Inhibitory Effects of Aqueous Extracts from <i>Nardostachys chinensis</i> on α -Melanocyte Stimulating Hormone-induced Melanogenesis in B16F10 Cells	이수진	최병태	최영현	Integrative Biosciences	10	국외	SCI
2006	한약재 12종의 열수추출물이 α -melanocyte stimulating hormone에 의해 유도된 B16F10 흑색종세포의 멜라닌형성에 미치는 영향	이수진	최병태	최영현, 이용태	동의생리병리학회지	20(5)	국내	
2006	세신 열수 추출물에 의한 Caspase 활성화와 Bcl-2 발현저하에 의한 인체 폐암세포의 Apoptosais 유발	김옥숙	최병태	박철, 정경태, 김기영, 문성기, 이원호, 최병태, 최영현	대한암예방학회지	11(4)	국내	

2007	사인의 열수 추출물이 B16F10 흑색종세포의 멜라닌형성에 미치는 영향	이수진	최병태	예정숙, 이용태, 정경태, 정성운	동의생리병리학회지	21(1)	국내	
2007	Induction of apoptosis by curcumin in human leukemic U937 cells through activation of caspases and upregulation of Fas/FasL expression	박철	최영현	이원호, 최병태	Korean Journal of Genetics	29(2)	국내	SCIE
2008	세신의 열수추출물이 α -melanocyte stimulating hormone에 의해 유도된 B16F10 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향	이준혁	최병태	최영현, 정경태, 강병원, 정성운, 최병태	동의생리병리학회지	22(3)	국내	
2008	Naringenin-induced apoptosis is attenuated by Bcl-2 but restored by the small molecule Bcl-2 inhibitor, HA 14-, in human leukemia U937 cells	진정윤	최영현	박철, 이준혁, 정경태, 권태규, 김지영, 최병태	Toxicology in Vitro	10.	국외	SCI

2009	Partially purified Curcuma longa inhibits alpha-melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis through extracellular signal-regulated kinase or Akt activation-mediated signalling in B16F10 cells	장지연	최병태	이준혁, 정성운, 정경태, 최영현	Experimental Dermatology	10	국외	SCI
2009	Dichloromethane fraction of Cimicifuga heracleifolia decreases the level of melanin synthesis by activating the ERK or AKT signaling pathway in B16F10 cells	장지연	최병태	이준혁, 강병원, 정경태, 최영현	Experimental Dermatology	18	국외	SCI

2. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2007	승마 추출물의 분획추출물을 함유하는 미백화장료와 그의 제조방법	학교법인 동의학원	한국	10-2007-0117510					

3. 학술대회 발표

발표 연도	논문명	저자			학술대회명	국내외 구분
		주저자	교신저 자	공동저 자		
2006	Inhibitory Effects of Aqueous Extracts from <i>Nardostachys chinensis</i> on α -Melanocyte Stimulating Hormone-induced Melanogenesis in B16F10 Cells	이수진	최병태	최영현	Molecular and physoological effects of bioactive food compounds	국외
2006	Effects of Aqueous Extracts from <i>Asiasari Radix</i> on α -melanocyte Stimulating Hermone Induced Melanogenesis in B16F10 Mouse Melanoma Cell	최병태	최영현	정경태	대한해부학회 학술대회	국내
2007	Dichloromethane fraction of <i>Cimicifuga heracleifolia</i> decreases the level of melanon synthesis by activating the ERK or AKT signaling pathway in B16F10 cells	장지연	최병태	이준혁, 강병원, 정경태, 최영현	대한체질인류학회 학술대회	국내
2007	Inhibitory Effects of Medicinal Plant Extract on Tyrosinase Activity	이윤영	정경태	박정애, 최병태, 강병원, 전해영, 박호옥, 정경태	한국생명과학회 학술대회	국내

2007	Effects of Aqueous Extracts from Aiasari Radix A-Melanocyte Stimulating Hormone Induced Melanogenesis In B16F10 Mouse Melanoma Cell	예정숙	최병태	윤말선 ,장지연,최영현, 정경태	대한해부학회 학술대회	국내
2008	D i c h l o r o m e t h a n e fraction of Cimicifuga heracleifolia decreases the level of melanon synthesis by activating the ERK or AKT signaling pathway in B16F10 cells	장지연	최병태	윤말선 ,최영현,정경태	The Asian-Pacific International Congress of Anatomists 8th Iranian Congress of Anatomical Scienced	국외
2008	Inhibitory Effects of Aqueous Extracts from Momum Xanthioides on α - M e l a n o c y t e Stimulating Hormone induced Melanogenesis in B16F10 Cells	이수진	최병태	윤말선 ,최영현	대한해부학회 학술대회	국내

4. 미국 FDA 승인을 위한 시험

- ◎ 본 연구결과로 화장품 원료 등재를 완료하였음.
- ◎ 미국 FDA 승인을 위한 미국 FDA와 California Department of Health Services 에서 원료 안전성에 대한 시험을 종결하였으며, 원료 안전 판정을 획득하였음.

5. 인력활용/양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
		2	4			6			

제 2 절 성과활용 방안

- ◎ 제품화 : 한방 약용작물을 이용한 미백 기능성 화장품 제품화를 통한 고부가 가치창출을 위해 (주)아마란스와 협조하여 기본적 소재 개발은 물론 다양한 제형 변화를 통한 크림, 로션, 팩, 엑기스 등으로 상품화하여 약용작물에 대한 새로운 수요를 창출할 예정임.
- ◎ 다양한 제품개발 기초 제공 : 참여기업인 (주)아마란스에서 한방 미백소재 기능성 화장품을 생산하고 스피드 시대에 부합되는 다기능 제품, 새로운 형태의 제품, 시간 절약형 제품 등으로 사업화하여 국내 및 국외로 매출을 일으키며, 기능성 소재 원료시장에도 적극 참여하여 기능성 원료 수입대체 효과를 일으킴.
- ◎ 신소재에 대한 특허 출원 및 화장품 원료집 등재 : 안전성이 검증되고 안정화된 기능성 소재를 특허 출원하였으며, 또한 CTFA (Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, 미국화장품협회, 2009년부터 personal care products council로 변경)의 ICID (International Cosmetic Ingredient Dictionary, 국제화장품 원료집)에 등재하였음. 현재 미국 FDA 등록을 위한 시험을 실시 중에 있으며, 등록완료와 함께 신제품을 생산할 예정임.
- ◎ 기술이전 : 본 연구결과를 토대로 획득한 특허출원을 근거로 (주)아마란스에 기

술이전을 할 계획임. 기술이전은 한방 약용작물의 신기능성 소재 개발은 기존 수요 형태와는 상이한 신 고부가가치 상품을 개발이 가능하며 이와 유사한 제품의 상품화를 용이하게 할 예정임.

- ◎ 학술발표 : 본 연구결과를 계속적으로 학술대회 등에서 발표하여 한방약용작물의 유용성을 홍보하며, 이를 통해 한방약용작물의 산업화를 촉진하며, 궁극적으로 한방약용작물 재배 농가의 수익 증대를 추구할 예정임.
- ◎ 새로운 수요 및 시장 창출 : 한방 약용작물을 이용한 전통 한약재의 수요와 달리 일반 생활용품으로 접근함으로써 새로운 수요 창출과 새로운 시장 개척.

(1) 기술적 측면

- ◎ 한방 약용작물을 이용한 천연물 유래 미백 기능성 소재 개발 및 제품화는 약용작물을 이용한 기능성 소재의 객관적인 연구 방법 확립에 대한 기초적 자료 제공하며 약용작물에 대한 효능과 기전연구는 한방 약용작물에 대한 임상 활용의 객관성 신뢰성 확보의 근거 마련 함.
- ◎ 다양한 부작용을 나타내는 기존 미백 기능성 소재에 대한 대체 소재 개발 및 안정성 확보하며 이를 이용한 제품화는 새로운 생활 습관 즉 스피드 시대에 부합되는 다기능제품, 시간절약형 제품 등으로 완제하여 사업화 가능함.
- ◎ 국소적으로는 tyrosinase의 발현과 활성조절의 분자생물학적 연구를 통해 새로운 기전을 발견, 확립할 수 있는 계기는 산업 및 경제적 측면에서는 소비자에게 화학 합성제에 비해 부작용 등의 위험성이 줄어들거나 없는 한약재 및 천연물 유래의 기능성 화장품의 기초 개발 자료가 될 수 있으므로 그 파급효과 매우 큼.
- ◎ 화학 합성제에 대한 부작용은 자연 천연물질, 특히 한방 약용작물을 이용한 미용 및 미백 물질을 개발하여 상품화하고자 세계적인 추세가 확대되고 있으며 본 연구의 결과는 한의학적 원리에 입각한 한방 바이오 상품의 연구 및 개발을 증진시킬 것임.

(2) 경제적·산업적 측면

- ◎ 화장품소재의 경우 해외 다국적 그룹에 의해 90% 이상을 수입하고 있으며 화장료의 경우 30%이상을 수입에 의존하고 있는 상황에서 수입대체 효과를 가져옴.

- ◎ 개발한 소재가 한방약용작물임으로 피부에 직접적으로 바를 수 있는 외용제의 개발 뿐만 아니라 복용을 통하여 그 효과를 나타낼 수 있는 음용제 개발도 가능하여 기능성 미백 화장품 시장에서 우위를 차지 할 수 있을 것임.

- ◎ 수요에 한정된 한방 약용작물을 이용한 새로운 부가가치 창출은 재배농가의 소득증대와 신 재배품종에 대한 고려를 가능케 함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- ◎ 노령화에 따른 피부관련 소재에 대한 연구가 광범위하게 진행되고 있으며 특히 천연물 소재에 대한 관심이 높음.
- ◎ 미백 기능성에 있어 기존 tyrosinase 활성조절에 대한 연구가 주를 이루고 왔으나 멜라닌생성 과정을 포함한 표피세포 주기, 세포산 멜라닌색소의 등 다양한 단계를 차단하는 소재에 연구가 이루어 지고 있음.
- ◎ 특히 멜라닌생성 신호전달을 제어함으로써 미백기능성을 나타내는 대사조절형 미백 화장료에 대한 관심이 매우 높음.
- ◎ 멜라닌 생성에 대한 신호전달은 p38 MAPK, ERK/MEK, PI3K/Akt을 중심으로 이루어지며 이들 신호전달의 억제 또는 활성을 통해 보다 효능성이 증대된 화장료 개발할 수 있음.
- ◎ 서구 사회는 생물공정기술을 이용하여 새로운 화장품원료를 생산하고 있으며 기능성화장품에서 더욱 두각을 나타내고 있음.
- ◎ 재조합DNA방법을 이용하여 생산되는 일부 생물공정 제품등이 이미 3세대 기능성화장품으로 응용되고 있음. 특히 Fibroblast 배양액, 인간생장인자 등은 주목할 만한 것임.

제 7 장 참고문헌

1. Agar N, Young A R. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? *Mutat Res* 2005; 571: 121-132.
2. Chakraborty A K, Funasaka Y, Slominski A, Ermak G, Hwang J, Pawelek J M, Ichihashi M. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1313(2): 130-138.
3. Costin G E, Hearing V J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J* 2007; 21 (4): 976-994
4. Eves P C, MacNeil S, Haycock J W. α -Melanocyte stimulating hormone, inflammation and human melanoma. *Peptides* 2006; 27 (2): 444-452.
5. Funasaka Y, Chakraborty A K, Hayashi Y, Komoto M, Ohashi A, Nagahama M, Inoue Y, Pawelek J, Ichihashi M. Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1 α , interleukin-1 β , endothelin-1 and tumour necrosis factor- α . *Br J Dermatol* 1998; 139(2): 216-224.
6. Gao G Z, Nan Z. Korean-Chinese-English Oriental Medical Dictionary, Seoul, Maeil Health Newspaper Co. Ltd., 2001: 1187.
7. Gururaj A E, Belakavadi M, Venkatesh D A, Marm□ D, Salimath B P. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 934-942.

8. Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti F M, Torti S V. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 1631-1652.
9. Huang Y H, Lee T H, Chan K J, Hsu F L, Wu YC, Lee M H. Anemonin is a natural bioactive compound that can regulate tyrosinase-related proteins and mRNA in human melanocytes. *J Dermatol Sci* 2008; 49: 115-123.
10. Kawano M, Matsuyama K, Miyamae Y et al. Antimelanogenesis effect of Tunisian herb *Thymelaea hirsuta* extract on B16 murine melanoma cells. *Exp Dermatol* 2007; 16: 977-984.
11. Khaled M, Larribere L, Bille K et al. Glycogen synthase kinase 3beta is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *J Biol Chem.* 2002; 277: 33690-33697.
12. Kim D S, Park S H, Kwon S B, Park E S, Huh C H, Youn S W, Park K C. Sphingosylphosphorylcholine-induced ERK activation inhibits melanin synthesis in human melanocytes. *Pigment Cell Res* 2006; 19(2): 146-153.
13. Kono M, Dunn I S, Durda P J et al. Role of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of human melanocytic antigen expression. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 779-792.
14. Lee J, Jung K, Kim Y S, Park D. Diosgenin inhibits melanogenesis through the activation of phosphatidylinositol-3-kinase pathway (PI3K) signaling. *Life Sci* 2007; 81: 249-254.

15. Lee K H, Lee W J, Yang S J, Huh J W, Choi J, Hong H N, Hwang O, Cho S W. Inhibitory effects of *Cimicifuga heracleifolia* extract on glutamate formation and glutamate dehydrogenase activity in cultured islets. *Mol Cells* 2004; 17(3): 509-514.
16. Lee Y G, Oh M G. Whitening cosmetic composition containing crude drug extract as effective component. Korean Examined Patent Application 2001. 1020010106527: 1-10.
17. Lin J K. Molecular targets of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007; 595: 227-243.
18. Menon V P, Sudheer A R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 595: 105-125.
19. Noguchi M, Nagai M, Koeda M, Nakayama S, Sakurai N, Takahira M, Kusano G. Vasoactive effects of cimicifugic acids C and D, and fukinolic acid in *cimicifuga* rhizome. *Biol Pharm Bull* 1998; 21(11): 1163-1168.
20. Oka M, Nagai H, Ando H, Fukunaga M, Matsumura M, Araki K, Ogawa W, Miki T, Sakaue M, Tsukamoto K, Konishi H, Kikkawa U, Ichihashi M. Regulation of melanogenesis through phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human G361 melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2000; 115(4): 699-703.
21. Palumbo A, Poli A, Di Cosmo A, d'Ischia M. N-Methyl-D-aspartate receptor stimulation activates tyrosinase and promotes melanin synthesis in the ink gland of the cuttlefish *Sepia officinalis* through the nitric Oxide/cGMP signal transduction pathway. A novel possible role for glutamate as physiologic activator of melanogenesis. *J Biol Chem* 2000; 275(22): 16885-16890.

22. Park S H, Kim D S, Kim W G, Ryoo I J, Lee D H, Huh C H, Youn S W, Yoo I D, Park K C. Terrein: a new melanogenesis inhibitor and its mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(22): 2878-2885.
23. Piao X L, Baek S H, Park M K, Park J H. Tyrosinase-inhibitory furanocoumarin from *Angelica dahurica*. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(7): 1144-1146.
24. Roberts P J, Der C J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007; 26(22): 3291-3310.
25. Roh J S, Han J Y, Kim J H, Hwang J K. Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 1976-1978.
26. Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* 2007; 213(3): 589-602.
27. Shibata M, Yamatake Y, Amagaya Y, Fukushima M. Pharmacological studies on the Chinese crude drug "Shōma". I. Acute toxicity and anti-inflammatory action of *Cimicifuga rhizoma*, *Cimicifuga dahurica* Maxim. *Yakugaku Zasshi*. 1975 ; 95(5): 539-546.
28. Smalley K, Eisen T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. *FEBS Lett* 2000; 476(3): 198-202.

29. Takahira M, Kusano A, Shibano M, Kusano G, Koizumi K, Suzuki R, Kim H S, Wataya Y. Antimalarial activity and nucleoside transport inhibitory activity of the triterpenic constituents of *Cimicifuga* spp. *Biol Pharm Bull* 1998; 21(8): 823-828.
30. Tomita Y, Maeda K, Tagami H. Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation. *Pigment Cell Res* 1992; 5: 357-361.
31. Tsuboi T, Kondoh H, Hiratsuka J, Mishima Y. Enhanced melanogenesis induced by tyrosinase gene-transfer increases boron-uptake and killing effect of boron neutron capture therapy for amelanotic melanoma. *Pigment Cell Res* 1998; 11: 275-282.
32. Yoon H S, Lee S R, Ko H C et al. Involvement of extracellular signal-regulated kinase in nobiletin-induced melanogenesis in murine B16/F10 melanoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71: 1781-1784.