

발간등록번호

11-1541000-000516-01

보안과제(), 일반과제 (O)

107081-03

갈매나무목 식물의 부산물을 이용한 미백화장료의 개발
(Development of Skin Whitening Materials using Plant Byproducts)

한국식품연구원

농림수산식품자료실



0005106

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “갈매나무목 식물의 부산물을 이용한 미백화장료의 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 5 월 29 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 최 상 윤

연 구 원 : 이 영 철

연 구 원 : 김 성 수

연 구 원 : 김 경 탁

연 구 원 : 노 정 해

연 구 원 : 홍 희 도

연 구 원 : 김 영 찬

연 구 원 : 조 장 원

연 구 원 : 이 영 경

연 구 원 : 이 연 미

협동연구기관명 : 세명대학교

협동연구책임자 : 이 평 재

협동연구기관명 : (주)더마프로

협동연구책임자 : 고 재 숙

위탁연구기관명 : (주)커머스플래닛

요 약 문

I. 제 목

갈매나무목 식물의 부산물을 이용한 미백화장료의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 우리나라를 비롯한 중국 등 동양권의 소득 수준 향상과 더불어 피부미용에 대한 수요가 급격히 급증하고 있다. 특히 동양권에서는 흰 피부를 아름다움의 상징으로 여기고 있어 우수한 미백제에 대한 요구가 증대되어 이의 개발이 시급한 실정이다. 현재까지의 미백제의 개발은 서구의 기술력에 의하여 주도 되어져 많은 화학합성미백제가 출시되었고 kojic acid, arbutin, vitamin C 유도체 등이 대표적인 경우이다. 그러나 kojic acid의 경우 최근에는 장기 사용시 간암을 유발할 수 있다는 보고가 있었고 arbutin과 vitamin C 역시 안정성 및 효능이 만족스럽지 못한 실정이다. 미백활성물질의 부작용 등이 발표되어짐에 따라 최근에는 천연유래 화장원료에 대한 관심이 높아져 이를 이용한 화장품이 경쟁적으로 출시되고 있으나 그 재료가 한정되고 과학적인 효능 검정이 부족하여 한계에 다다르고 있다. 이러한 실정에서 활용되지 않고 있는 국내천연자원을 이용하여 과학적으로 미백효능을 검증하고 미백원료로 개발할 수 있다면 이와 연관된 농가의 소득원 제고에 크게 기여할 것으로 예측되며 나아가 국내 미백 화장료 시장의 외국계 회사의 잠식도 막을 수 있을 것으로 기대된다.

따라서 본 연구는 매년 막대한 양이 버려지고 있는 갈매나무목 포도과의 식물부산물의 *In vitro*, 멜라닌 생성세포, *In vivo*, 인체실험을 통한 피부미백활성 검정 및 그 유효성분 탐색과 함량분석을 통한 새로운 미백원료로서의 기반구축과 인체피부 자극성 등의 독성검정을 거쳐 이를 이용한 미백화장원료를 개발하여 화장품에 적용코자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 포도과 식물의 부산물의 수집 및 추출원료제조
- 선별된 자원의 미백활성을 *in vitro*, 멜라닌 생성세포를 이용하여 세부검정
- 단백질 발현량 측정 등 미백활성기전 규명
- 멜라닌 생합성 저해 활성단일성분의 도출
- 활성성분을 고함유 하는 포도과 식물 부산물 유래원료의 제조
- Brown guinea pig 피부에서의 미백효과 검증
- GLP 동물독성시험
- 인체피부에서의 원료의 자극성 평가
- 개발원료의 색도, 용해도 등을 고려한 화장품 적용시험
- 개발원료를 이용한 화장 시제품의 제조

- 인체피부에서의 시제품의 자극성 및 미백효능 검정

IV. 연구개발결과

캠벨, 네오마스캇, MBA 품종의 포도를 껍질, 과육, 덩굴, 씨로 나누고 80% 에탄올로 추출하여 미백관련활성을 측정된 결과 캠벨 덩굴, 네오마스캇 덩굴 추출물과 세품종의 씨 추출물이 우수한 tyrosinase 억제활성, melan-a 세포에서의 멜라닌생성억제활성, 자외선 차단효과 등을 나타내었다. 특히 캠벨 덩굴, 네오마스캇 덩굴 추출물은 새로운 미백원료로 씨 추출물보다 세포독성이 적은 장점을 가지고 있었다.

캠벨덩굴과 네오마스캇 덩굴 추출물에는 gallic acid, catechin, epicatechin, myricetin, resveratrol, quercetin, kaemperol 이 함유되어 있었으며 씨 추출물에는 gallic acid, catechin, epicatechin, myricetin 4 종만이 높은 함량으로 함유되어 있었다. 또한 우수한 소재로 도출된 포도덩굴 추출물로부터 활성추적을 통해 procyanidin B2 를 분리, 동정하였다. 포도씨와 포도덩굴 추출물, procyanidin B2 를 melanoma cell 에 처리한 결과 tyrosinase 발현량은 줄이나 MITF의 발현량에는 영향을 주지 않았고 포도덩굴 추출물은 TRP-2의 발현량을 감소시켰다.

우수소재로 도출된 네오마스캇 포도덩굴 추출물을 1% 용액으로 제조하여 GLP 기준 동물독성시험결과 단회투여 독성, 안점막 자극, 피부자극, 피부감작성, 광독성, 광감작성 시험에서 모두 안전한 것으로 판명되었고 인체피부 일차자극시험에서도 저자극성을 나타내었다. Brown guinea pig 의 등 부분에 자외선-B 으로 피부색소 과침착을 유도하고 네오마스캇 포도덩굴 추출물을 1 일 2 회 총 8 주간 도포한 결과 농도의존적인 피부색완화효과를 확인할 수 있었고 실험기간동안 피부발적 등의 이상징후는 관찰되지 않았다.

포도덩굴추출물의 색도 및 용해도를 고려하여 화장시제품을 제조하여 시험한 결과 인체피부 일차자극시험에서 저자극성이었고 인체피부 미백효력시험에서 사용전에 비하여 사용 2주후부터 유의한 미백효과를 나타내었다. 본 연구에서 도출된 포도덩굴소재는 우수한 안전성 및 효능을 갖고 있으며 CTFA의 국제화장품원료로 등록되어 제품사용에 문제가 없어 활용성이 높은 우수소재로 판단된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구의 결과는 특허출원 '피부미백용 화장품 조성물'(출원번호 10-2008-0079279) 되었고 3건의 학술논문이 게재되었거나 게재승인 되었으며 개발원료를 첨가하여 제조된 미백화장품 시제품 제조가 완료되었음. 참여기업으로의 기술이전이 예기치 않은 기업합병으로 인한 대기업 분류로 인하여 기술료의 급격한 증가로 인해 현실적으로 어려워진 면이 있어 타 중소기업과의 기술이전 추진 후 사업화할 예정이다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Development of Skin Whitening Materials using Plant Byproducts

II. R&D Purposes and Necessities

In recent times the demand for skin care has been increasing rapidly along with the rise in incomes in certain Asian countries including China and Korea. White skin is regarded as a symbol of beauty, particularly in the Asian region, and the need for excellent whitening agents has increased, thereby triggering the immediate development of such products. The development of whitening agents has so far been led by the technology of other advanced countries, and many chemically synthesized whitening agents such as kojic acid, arbutin, and vitamin C derivatives are on the market. However, in the case of kojic acid, it has recently been reported that its long-term use could induce liver cancer, while arbutin and vitamin C have also shown unsatisfactory stability and efficacy. As the adverse effects of whitening active substances are announced, interest in naturally induced cosmetic ingredients has increased greatly, and cosmetics products using such ingredients are figuring competitively in the market, although the limitation of their ingredients and the lack of scientific testing of their efficacy have reached the limit. In such circumstances, it is expected that the scientific verification of whitening efficacy and the development of whitening ingredients using hitherto unexploited domestic natural resources will greatly contribute to improving the income of the related agricultural households as well as prevent foreign companies from eating into the domestic whitening agents market.

Thus, this study was performed to investigate the whitening activity of the side products of the family Vitaceae, which have been discarded in enormous amount each year, through melanin biosynthesis, animal and human experiments, and to develop and apply the ingredients for whitening cosmetics using such side products of the grapes after testing for active ingredients, total content analysis, and toxicity tests such as human skin irritation.

III. Details and Scope of R&D

- Collecting byproducts of the Vitaceae family and manufacturing extraction ingredients
- *In vitro* assessment of the whitening activity of selected resources using melanocytes
- Investigation of the mechanism of whitening activity including the measurement of

protein expression

- Derivation of a melanin biosynthesis-inhibiting single active ingredient
- Manufacture of raw materials from the byproducts of the Vitaceae family, including high amounts of active ingredients
- Verification of the whitening effect on brown guinea pig skin
- GLP animal toxicity test
- Evaluation of ingredients' capacity to irritate human skin
- Application test of cosmetic products considering the degree of color and the solubility of the developed ingredients
- Manufacture of a cosmetic prototype using the developed ingredients
- Irritation and whitening efficacy testing of the prototype on human skin

IV. Results of R&D

Campbell, Neo Muscat, and MBA grapes were divided into skin, flesh, vine, and seed parts, extracted with 80% ethanol; and their whitening-related activities were then measured. The vine extract of the Campbell and Neo Muscat grapes and the seed extracts of the above three types of grapes showed excellent tyrosinase inhibitory activity, melanin biosynthesis inhibitory activity in melan-a cells, and a UV light blocking effect. In particular, the vine extracts of the Campbell and Neo Muscat grapes are new whitening ingredients and show the advantage of having less cytotoxicity than seed extract.

The vine extracts of the Campbell and Neo Muscat grapes contained gallic acid, catechin, epicatechin, myricetin, resveratrol, quercetin, and kaempferol, while the seed extract contained high amounts of gallic acid, catechin, epicatechin, and myricetin. Also, procyanidin B2 was separated and identified through an activity-guided test from the vine extract derived from excellent materials. Treatment of melanoma cells with the grape seed, grape vine extract, and procyanidin B2 decreased the amount of tyrosinase expression but did not affect MITF expression, while the vine extract decreased TRP-2 expression.

The Neo Muscat vine extract (derived from excellent materials) was manufactured as a 1% solution and assessed for the GLP standard animal toxicity test, which showed that it was safe for single administration toxicity, eye irritation, skin irritation, skin sensitization, phototoxicity, and photosensitization, and also showed low irritation in the primary irritation test conducted on human skin. The Neo Muscat vine extract was administered twice a day for 8 weeks to the UV-B induced hyper-pigmented backs of brown guinea pigs, and showed a concentration-dependent de-pigmenting effect without any abnormal signs such as flare during the experimental period.

The application test of the cosmetic products, which considered the degree of color and the solubility of the grape vine extract, showed low irritation in the primary irritation test conducted on human skin and a significant whitening effect in the human skin whitening effectiveness test. The grape vine ingredients derived for this study showed excellent

safety and efficacy, and are considered to be excellent materials with high applicability. As such, it is thought that they could be registered as CTFA international cosmetic ingredients without any problems.

V. Research outcome & utilization plan

The results of this study have been applied to patent 'cosmetic composition for whitening' (application No. 10-2008-0079279) and published or approved for publication in two scientific papers. The production of a prototype for whitening cosmetics has been completed by adding the developed ingredients, so it could be commercialized for the market after technology transfer to the small & medium companies.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Summary	5
Contents	8
Chap. 1. Outline of research project	11
1. Objective	11
2. Significance	11
3. Scope	12
Chap. 2. Present state	14
Chap. 3. Methods and Results of Project	15
1. Preparation of the grape samples	15
2. Measurement of Depigmenting Activities	16
3. Isolation and analysis of a Active Ingredient	25
4. Western immunoblotting analysis	50
5. Depigmenting Activities on in Brown Guinea Pig Skin	59
6. GLP standard animal toxicity test	61
7. Primary irritation test conducted on human skin	86
8. Prototype cosmetic products	91
9. Human skin whitening effectiveness test	97
10. Discussion	109
Chap. 4. Attainment and Contribution	111
Chap. 5. Achievements and Proposal for Application	112
Chap. 6. Information from Abroad Related to This Project	113
Chap. 7. References	114

목 차

요약문	3
Summary	5
Contents	8
목차	9
제 1 장. 연구개발과제의 개요	11
제 1 절. 연구개발의 목적	11
제 2 절. 연구개발의 필요성	11
제 3 절. 연구개발의 범위	12
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	14
제 3 장. 연구개발 수행내용 및 결과	15
제 1 절. 시료의 조제	15
제 2 절. 제조된 포도 부산물 시료의 활성측정	16
제 3 절. 활성성분의 규명	25
제 4 절. 분자수준에서 미백 활성 기전 규명	50
제 5 절. Brown guinea pig 피부에서의 피부색소 억제활성측정	59
제 6 절. 원료의 동물독성시험	61
제 7 절. 원료의 인체피부 안전성 시험	86
제 8 절. 시제품의 제조	91
제 9 절. 시제품의 인체피부안전성 및 미백효능 검정	97
제 10 절. 고 찰	109
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야의 기여도	111

제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획	112
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	113
제 7 장. 참고문헌	114

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적

매년 막대한 양이 버려지고 있는 갈매나무목 포도과 식물부산물의 *In vitro*, 멜라닌 생성세포 실험, 동물실험, 인체실험을 통한 피부미백활성 검정 및 그 유효성분 탐색과 함량분석을 통한 새로운 미백원료로써의 기반구축과 인체 피부 자극성 등의 독성검정을 거쳐 이를 이용한 미백 화장원료를 개발하여 화장품에 적용코자 한다. 본 연구의 의의는 버려지는 천연자원인 포도과 식물 부산물의 부가가치 창출 이외에도 최근 국내에 천연물을 이용한 화장료 시장이 급속히 팽창하고 있는 추세에서 기존의 과학적인 근거가 부족한 이미지 위주의 화장료를 탈피하여 과학적이고 체계적인 연구를 통한 실질적 효과를 나타낼 수 있는 천연미백원료를 개발한다면 국내 농산천연자원을 이용하여 서구와 일본 업체에 대항하여 날로 성장 중인 국내시장 잠식을 막을 수 있는 기술력 및 경쟁력을 선점한다는 면에서도 큰 의의를 가질 수 있을 것이다.

또한 본 연구는 포도과 식물의 부산물인 덩굴 등을 이용하여 미백화장원료로 개발을 추진함으로써 새로운 가치를 부여하고자 하는 것으로 포도농가의 소득증대 및 국내관련산업의 발전 등의 큰 경제적 파급효과를 가질 것으로 기대된다.

제 2 절. 연구개발의 필요성

피부의 흑화는 피부세포내에 존재하는 멜라닌 생성세포(melanocyte)에서 UV등의 외부자극에 의해 생성된 멜라닌이 각질형성세포 (keratinocyte)로 전달되어 피부 표피층에 축적되어 일어나게 된다. 멜라닌은 피부를 보호하는 역할을 하나 이의 과생성은 기미, 주근깨, 반점 등을 일으켜 사회적 부작용을 초래한다.

최근 우리나라를 비롯한 중국 등 동양권의 소득 수준 향상과 더불어 피부미용에 대한 수요가 급격히 급증하고 있다. 화장품 공업 협회의 자료에 의하면 기초, 메이크업, 두발용등을 모두 합친 2004 년 국내 화장품 시장의 규모는 3조 4,500 억원 정도이며 그 중 기능성 화장품이 차지하는 것은 4,800 억원이다. 기능성 화장품 중에서 미백화장품은 자외선 차단제에 이어 두 번째로 시장규모가 크며 2003 년 1,280 억원 규모에서 2004 년 1,480 억원으로 급신장세를 보이고 있다. 이는 1997 년의 100 억 정도의 시장 규모에서 약 15 배 성장한 수치이며 사회적 요구와 소득의 향상으로 앞으로도 무한한 성장 잠재력을 가지고 있는 것으로 추정된다. 특히 동양권에서는 흰 피부를 아름다움의 상징으로 여기고 있어 우수한 미백소재에 대한 요구가 증대되어 이의 개발이 시급한 실정이다. 현재까지의 미백소재의 개발은 서구의 기술력에 의하여 주도 되어져 많은 화학합성 미백물질이 출시되었고 kojic acid, arbutin, vitamin C 유도체 등이 대표적인 경우이다. 그러나 kojic acid의 경우는 *in vitro* 상의 tyrosinase 억제효과에 비해 세포상이나 *in vivo* 상의 멜라닌 생성억제효과가 미비한 실정이며 또한 최근에는 장기 사용시 간암을 유발할 수 있다는 보고가 있었다. 또한 arbutin 및 vitamin C 역시 안정성 및 효능이 만족스럽지 못한 실정이다. 전 세계적으로 미백소재의 개발에 대한 경쟁이 치열히 진행되고 있으

나 주요 고객층이 동양권이라는 점에서 현지정서와 사회적 흐름 등에 대한 정보습득 면에서 유리한 위치에 있는 국내에서도 충분히 비교우위의 기술력을 가질 수 있는 경쟁력이 있는 분야라 할 수 있다. 최근 미백활성물질의 부작용 등이 발표되어짐에 따라 그 대체 원료로 여러 천연물 추출물을 이용한 기능성 미백화장품에 대한 연구가 활발히 진행되어져 상백피나 천화분 추출물 등이 미백 천연원료로써 사용되고 있으나 그 효능이나 독성에 대한 확실한 검증이 충분치 못하고 아직까지 임상적 효과가 만족스럽지 못하여 새로운 대체 원료의 개발이 필요하다.

최근에는 천연유래 화장원료에 대한 관심이 높아져 이를 이용한 화장품이 경쟁적으로 출시되고 있으나 그 재료가 한정되고 과학적인 효능 검정이 부족하여 한계에 다다르고 있다. 또한 포도과 식물의 부산물은 국내 과실주 제조 등 가공품의 증가와 함께 생성량이 증대되고 있으며 이의 이용방안의 개발이 필요한 자원이다. 따라서 포도과 식물의 부산물을 이용한 미백화장료가 개발된다면 여러 가지로 경제·산업적인 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 판단되며 이와 연관된 농가의 소득원 제고에 크게 기여할 뿐만 아니라 나아가 국내 미백 화장료 시장의 외국계 회사의 잠식도 막을 수 있을 것으로 기대된다.

제 3 절. 연구의 범위

국내 생산량이 연간 40 만톤에 이르는 포도과 식물의 부산물은 대부분 버려지거나 비료 및 동물사료 등으로 단순 사용되고 있는 실정이다. 최근에는 포도씨의 항산화 효과가 알려지면서 이를 이용한 활용연구가 시작되고 있으며 포도씨유 등의 제품이 출시된 바 있으나 보다 다양한 포도부산물 이용방안에 대한 연구가 필요한 실정이다. 또한 포도씨에 비하여 생성되는 양이 막대한 포도덩굴 및 껍질 등의 활용방안연구는 아직까지 극히 미비한 상태이다.

포도의 부산물에 함유되어있는 것으로 알려진 성분 중 대표적인 것으로는 resveratrol 을 들 수 있다. Resveratrol 은 항심장혈관질환과 관련된 "French Paradox"의 활성성분으로 보고되어져 있으며 이밖에도 항산화 활성, 항암활성 등이 보고되어 있다. 특히 최근에는 tyrosinase 활성억제 효능이 보고되었으며 resveratrol의 화학구조에 하나의 hydroxyl기를 더 갖고 있는 oxyresveratrol은 IC₅₀ 가 1 uM인 강력한 tyrosinase inhibitor로 발표되었다. 한편, 포도씨에는 hyaluronic acid, proanthocyanidin등이 존재하는 것으로 보고되어져 있으며 특히 2003년 *pigment cell research*에 실린 보고에 따르면 카테킨 중합체인 proanthocyanidin은 tyrosinase 활성억제, 멜라닌생성세포 성장억제 등의 미백효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서 매년 막대한 양이 버려지고 있는 포도과 식물 부산물을 이용하여 미백화장원료를 개발하는 것은 높은 성공가능성을 가지는 것으로 판단되며 유용자원으로써 새로운 부가가치를 창출하여 활용할 수 있을 것으로 예상된다.

구체적인 연구범위는 다음과 같다.

- 포도과 식물의 부산물의 수집 및 추출원료제조
- 선별된 자원의 미백활성을 *in vitro*, 멜라닌 생성세포를 이용하여 세부검정
- 단백질 발현량 측정 등 미백활성기전 규명

- 멜라닌 생합성 저해 활성단일성분의 도출
- 활성성분을 고함유 하는 포도과 식물 부산물 유래원료의 제조
- Brown guinea pig 피부에서의 미백효과 검증
- GLP 동물독성시험 (단회독성, 안점막, 피부자극성, 피부감작성, 광독성, 광감작성)
- 인체피부에서의 원료의 자극성 평가
- 개발원료의 색도, 용해도 등을 고려한 화장품 적용시험
- 개발원료를 이용한 화장품 시제품의 제조
- 인체피부에서의 시제품의 자극성 및 미백효능 검증

제 2 장 국내외 기술개발 현황

세계적으로 천연물을 이용한 화장품이 지속적으로 출시되고 있으나 주로 이미지에 의존하여 실질적인 효과에 대한 과학적 검증이 불충분하며 높은 가격의 문제점이 있다. 또한 포도과 식물 부산물을 이용한 것으로는 피부재생 용도로 포도씨 추출물을 이용한 것이 있으나 아직 드문 실정이며 미백의 용도로는 활용되지 않았고 특히 포도씨 이외의 다른 포도 부산물에 대한 것 연구는 미비함

국내·외의 관련 연구개발 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
엘지생활건강	청포도 추출물을 주요성분으로한 기초 화장품	보습, 탄력개선용으로 사용됨
엘리자베스 아덴	포도씨 추출물을 이용한 피부보호 및 재생용팩	노화방지용으로 시판중
한국화장품	산삼배양근(국내 천연물)을 이용한 화장품 개발	제품으로 시판됨. 높은 가격 및 기능성의 검증이 미흡한 문제가 있음

본 연구과제내용과 직, 간접적으로 관련된 특허를 검색한 결과 1999년 4월 ‘Extract from grape seed and its use’의 제목으로 일본특허가 1건 검색되었으며 그 내용은 포도씨 추출물의 tyrosinase억제활성을 측정하여 이것이 항노화, 피부보호효과, 미백효과의 용도로 사용될 수도 있다고 제시하였으며 2005년 3월 ‘피부미백효능이 있는 적포도 추출물’의 제목으로 출원되어 2006년 공개된 1건의 국내특허는 적포도 자체를 고온으로 처리 후 tyrosinase억제활성을 측정하여 이것을 피부미백을 목적으로 이용할 수 있다고 하였다.

그러나 이들 2건의 특허는 포도씨와 고온 처리된 포도전체를 대상으로 하고 있어 본 과제의 주재료인 씨 이외의 포도의 덩굴 및 껍질과는 다르며 활성 측정방법도 단순히 tyrosinase활성 억제도에 의존하여 구체적인 미백활성이 검증이 되어 있지 않아 과학적 근거의 한계가 있는 실정이다. 또한 1999년 5월 국내특허출원된 것으로 ‘포도추출물을 함유한 미백화장료 조성물’에서는 포도과육, 포도씨 또는 포도껍질 추출물의 tyrosinase 활성억제도 및 인체 피부육안평가를 하여 이를 이용한 미백화장료를 제공할 수 있다고 하였으나 인체실험 등에서 과학적인 근거를 제시하지 못하여 등록 거절된 바 있다.

본 연구의 결과로 도출된 포도덩굴 추출물은 CTFA의 원료규격집에 등재가 되어 화장품사용에 문제가 없을 뿐만 아니라 국내 생산량도 매우 많으며 독성이 적고 미백활성이 우수한 원료로써 현재까지 개발되어진 국내 천연미백자원과 비교할 때 손색이 없는 것으로 판단된다. 특히 아직까지 관련된 특허 및 논문이 발표된바 없는 신규원료로 높은 경쟁력을 갖추고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 시료조제 (1 세부)

1. 포도재료

본 연구에서는 우리나라에서 많이 생산되는 품종 중 캠벨(Campbell early), 네오마스캇(Neo Muscat, 청포도), MBA(Muscat Bailey A, 머루포도)의 3 가지 품종의 포도를 선발하여 실험에 사용하였다. 캠벨은 2007년 7월 말 경상북도 김천시에서 수확된 특급을, 네오마스캇은 2007년 7월 말 경상남도 함안군에서 수확된 특급을 12 kg 씩 구입하여 사용하였고 MBA는 수확시기가 다른 품종에 비해 늦어 2007년 9월 중순에 경상북도 영천시에서 수확된 특급을 12 kg 구입하여 시료로 사용하였다 (Fig. 1).



캠벨(Campbell early)

네오마스캇(Neo Muscat)

MBA(Muscat Bailey A.)

Fig. 1. Photographs of three kinds of grape used in this study.

2. 포도부산물시료의 추출

수집된 시료는 증류수로 세척 후 껍질, 과육, 덩굴, 씨를 각각 분리하여 물기를 제거하고 잘게 분쇄한 후 향후 상품화를 고려하여 추출용매로 80% 에탄올을 사용하여 1 시간씩 3 회 반복하여 상온에서 초음파를 이용하여 추출하였다. 얻어진 추출액은 여과지로 여과하고 회전 감압 농축기를 이용하여 완전 농축시켜 포도의 품종 및 부위별 추출물을 제조하였고 -20°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다. 각각의 시료의 중량과 추출수율은 Table 1, 2와 같다.

Table 1. Weights of skin, flesh, seed and vine obtained from 12 kg of total grape

	skin	flesh	vine	seed
Campbell early	2.96 kg	3.00 kg	0.25 kg	0.35 kg
Neo Muscat	2.00 kg	2.10 kg	0.29 kg	0.27 kg
Muscat Bailey A.	2.00 kg	4.03 kg	0.24 kg	0.40 kg

Table 2. Yields of 80% ethanol extracts

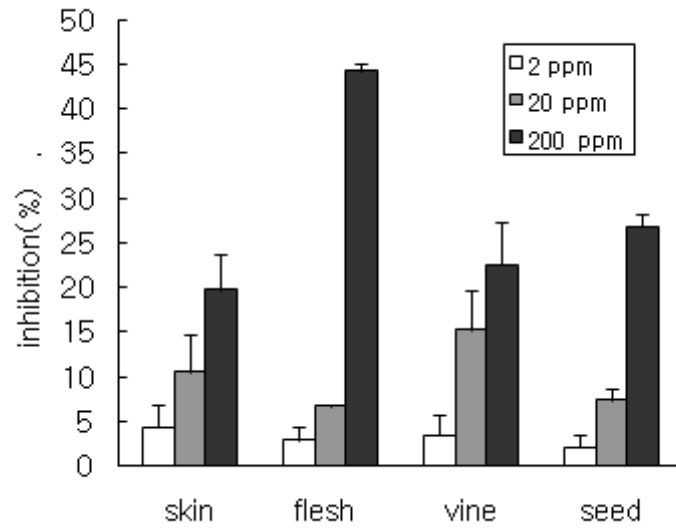
	skin	flesh	vine	seed
Campbell early	3.87%	5.34%	5.54%	5.62%
Neo Muscat	5.73%	3.80%	6.88%	11.17%
Muscat Bailey A.	8.82%	2.53%	7.07%	4.32%

Each value represents the % in materials

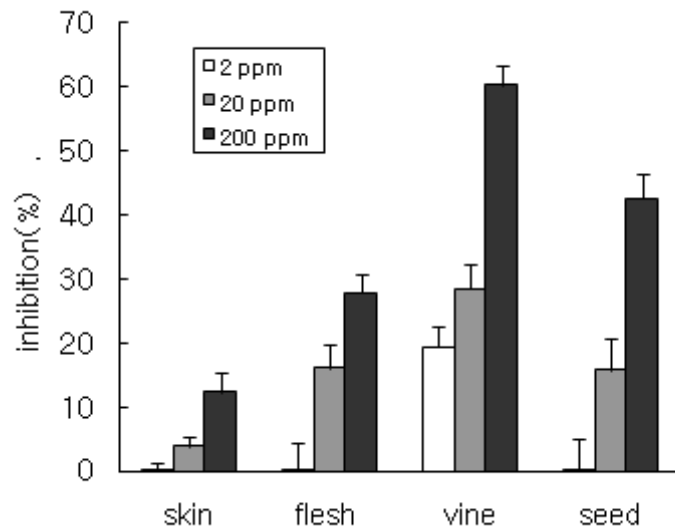
제 2 절. 제조된 포도 부산물 시료의 활성측정 (제 1세부)

1. Tyrosinase 활성 억제도

멜라닌 생합성 과정의 초기에 주요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 8.0 mM L-dopa (67 mM phosphate buffer, pH 6.8 에 녹임) 120 μ l 와 메탄올에 녹인 여러 농도의 검색시료 40 μ l 를 96-well microplate에 넣고 mushroom tyrosinase (125 U/ml) 40 μ l 를 가한 후 생성된 dopachrome의 양을 492 nm 에서의 흡수도를 측정하여 검정하였다. 각 포도 부산물 시료의 tyrosinase 억제도 측정 결과는 Fig. 2 과 같다.



Campbell early



Neo Muscat

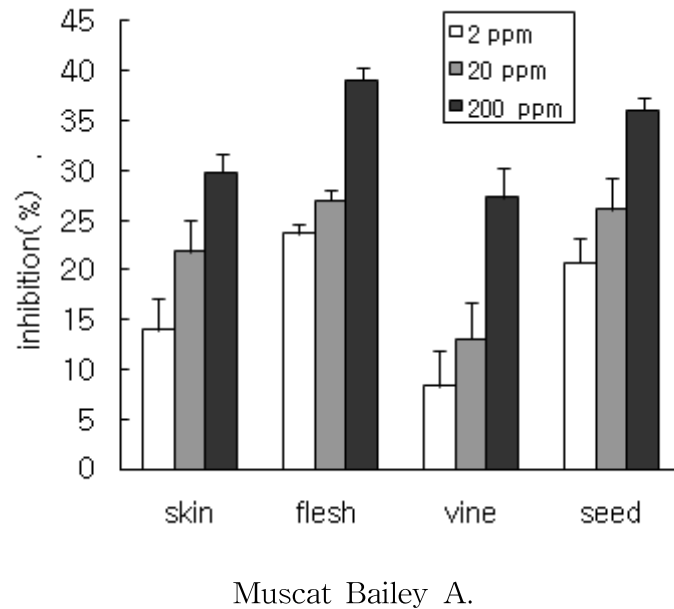


Fig. 2. Mushroom tyrosinase inhibitory effects of various grape 80% ethanol extracts

미백활성이 보고되어 있는 campbell early 씨 추출물에 비교하여 볼 때 campbell early 품종에서는 과육이 더 우수한 tyrosinase 활성억제도를 나타내었다. Neo Muscat 품종에서는 덩굴 추출물이 200 ppm에서 60.3%의 억제활성을 나타내었고 이것은 모든 품종 및 부위별 포도 추출물 시료 중 가장 우수하였다. 또한 MBA 품종은 모든 부위에서 유사한 억제활성을 나타내었으며 특히 껍질은 다른 품종의 껍질 추출물에 비하여 높은 tyrosinase 억제활성을 보였다.

2. 멜라닌 생성세포에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성에 미치는 영향

피부의 색은 주로 melanin에 의하여 결정되며 melanin의 생성은 피부의 표피와 진피사이에 존재하는 멜라닌 생성세포의 melanosome에서 이루어진다. 제조된 각각의 포도부산물 시료가 mouse 유래의 멜라닌 생성 세포인 melan-a 세포주에서 세포의 생존율과 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 측정하기 위해 10% fetal bovine serum 과 1% penicillin-streptomycin, 200 nM의 phorbol-12 myristate 13-acetate 가 함유된 RPMI 1640 배지로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하여 EtOH / H₂O = 6 / 4 용액에 녹인 각각의 시료를 1 ug/ml, 10 ug/ml, 100 ug/ml의 농도로 3일간 처리한 결과 Neo Muscat 덩굴, campbell 덩굴 추출물을 500 ppm 처리시 큰 세포사멸을 일으키지 않으면서 세포생존율 대비 20% 이상의 멜라닌 생성량을 감소 시켰다. 또한 씨 추출물은 세가지 품종 모두에서 500 ppm 처리시 9 ~ 20.4%의 멜라닌생성억제 활성을 나타내었으나 동일 농도에서 높은 세포독성을 나타내었다 (Fig. 3 ~ Fig. 5)

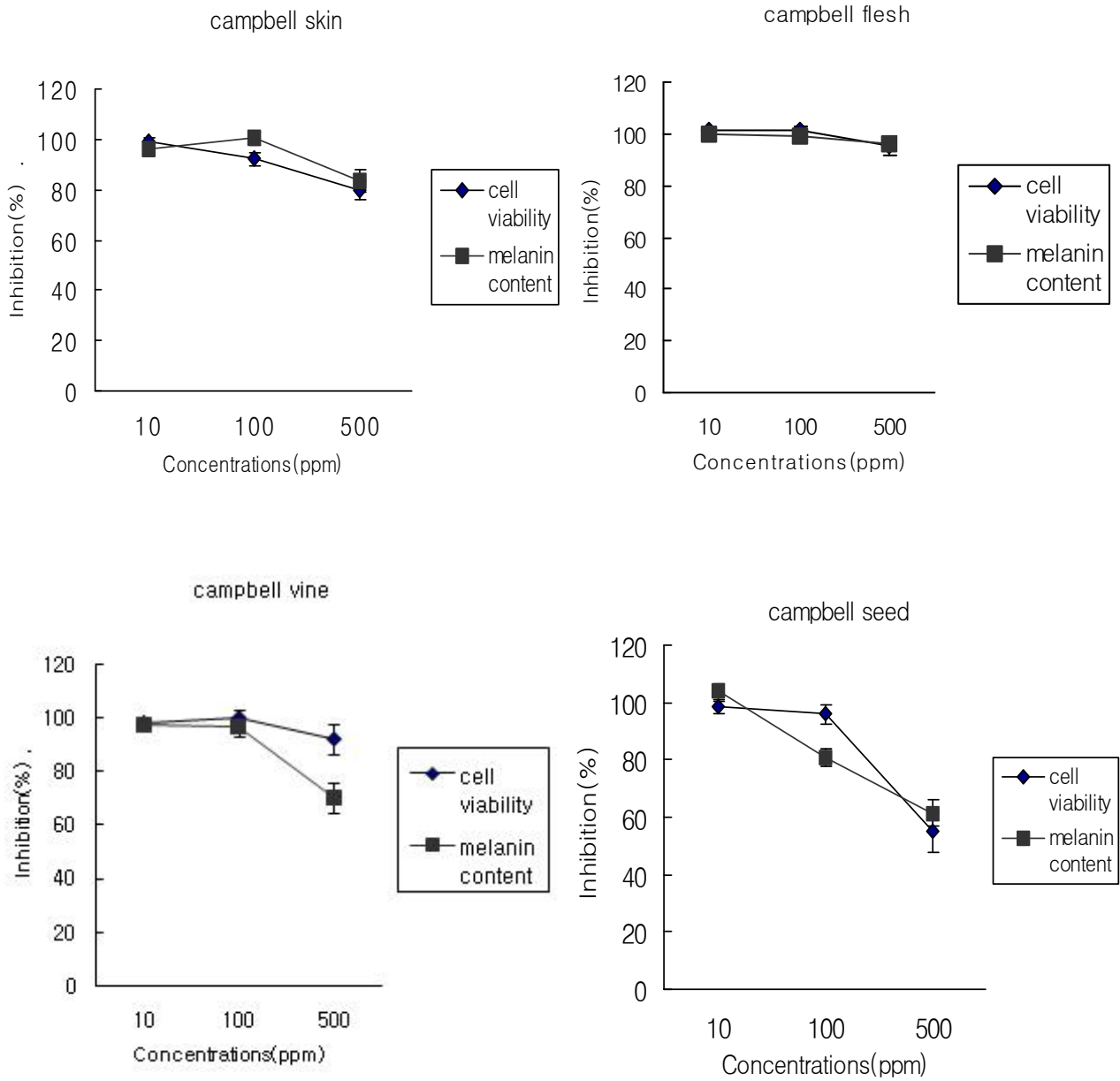


Fig. 3. Effects of campbell early extracts on cell growth and melanin production in melan-a cells.

After 3 days. Viability and melanin content of vehicle was set to 100%.

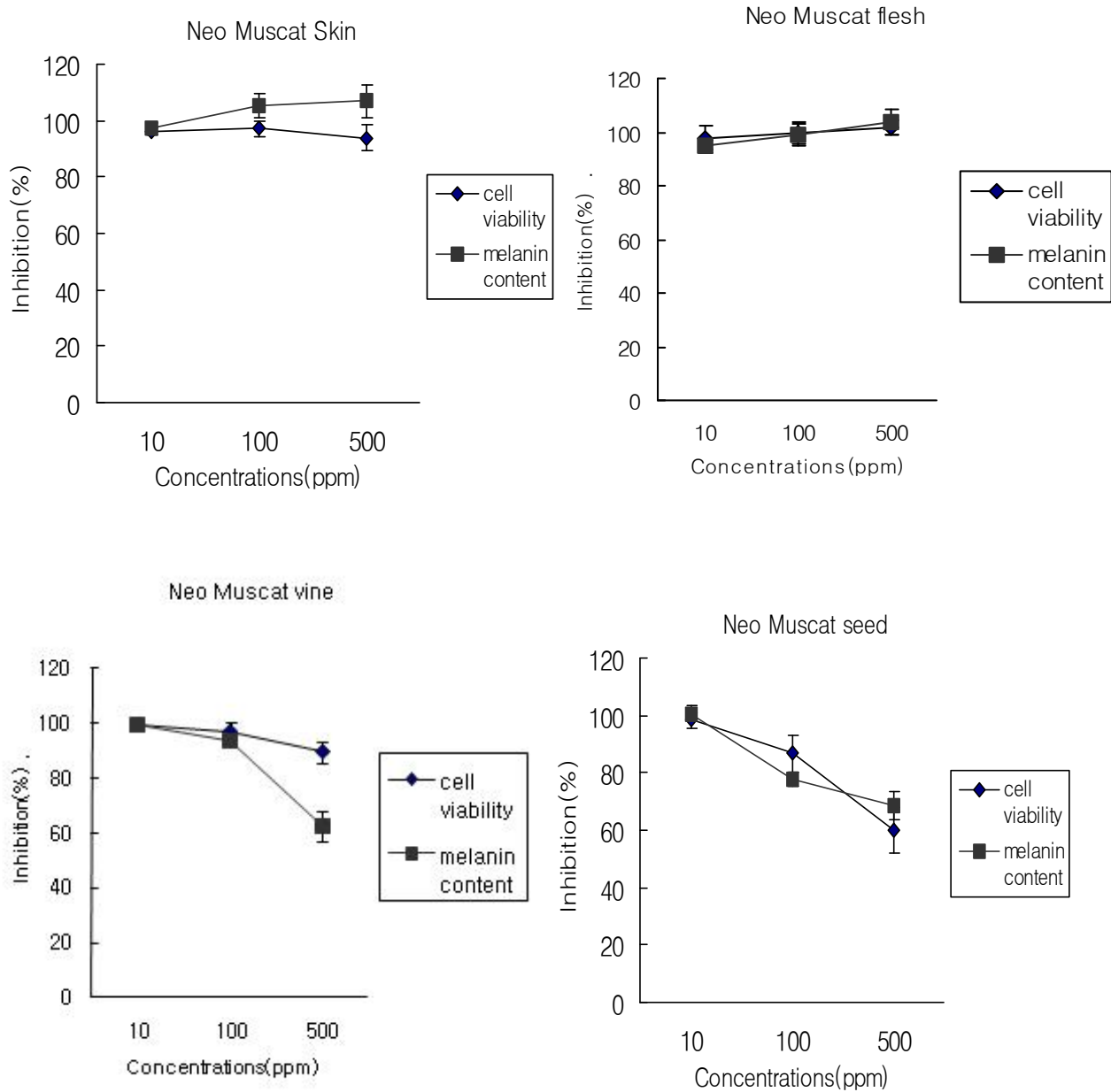


Fig. 4. Effects of Neo muscat extracts on cell growth and melanin production in melan-a cells.

After 3 days. Viability and melanin content of vehicle was set to 100%.

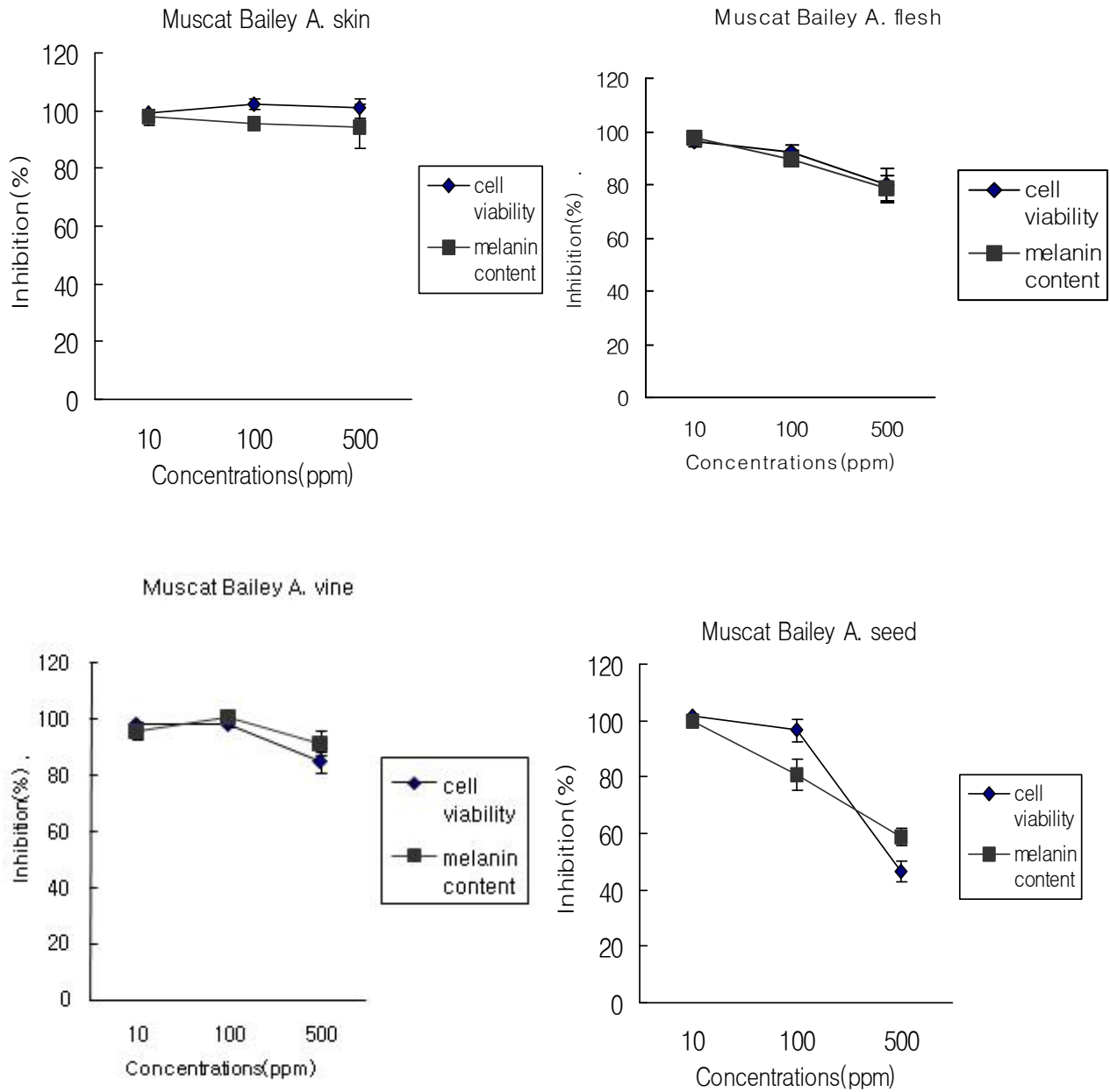


Fig. 5. Effects of muscat bailey A extracts on cell growth and melanin production in melan-a cells.

After 3 days. Viability and melanin content of vehicle was set to 100%.

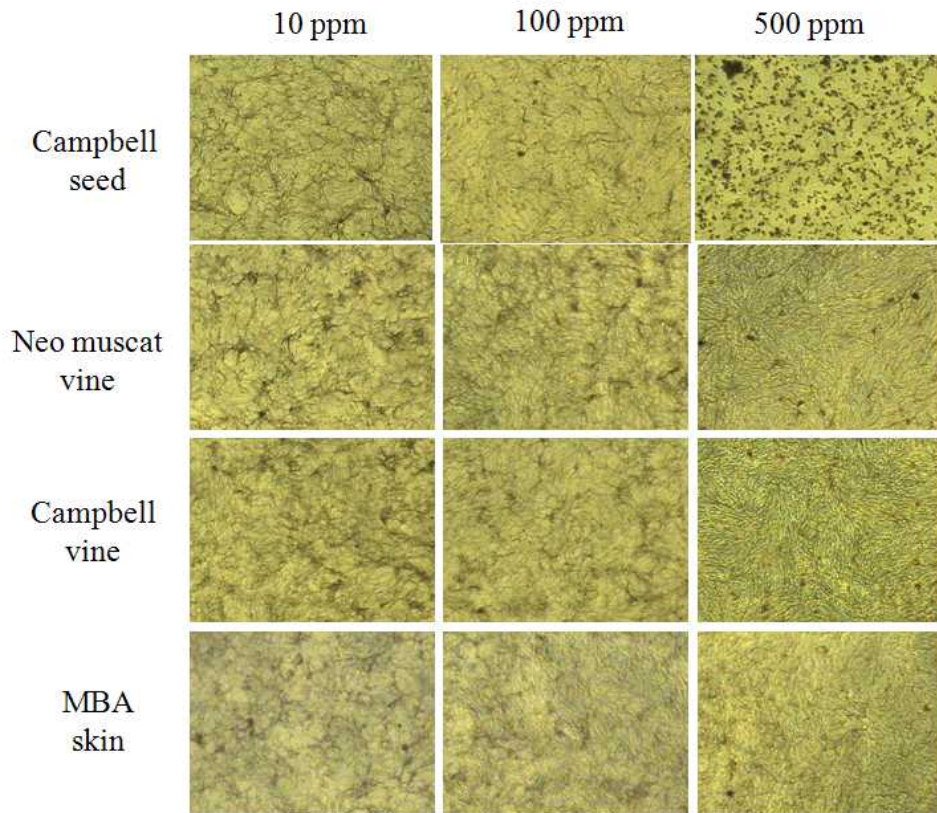


Fig. 6. Morphological changes of Melan-a cells (after three days).

3. Melan-a 세포 생성 tyrosinase 활성에 대한 억제효과 측정

세포에서 melanin 생성억제 활성을 보인 켈벨 및 네오마스캇 덩굴 추출물 및 씨 추출물이 세포 내에 직접적으로 존재하는 tyrosinase의 활성을 저해하는지 여부를 확인하기 위하여 melan-a 세포를 위의 세포배양방법과 동일하게 가득 키운 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 lysis buffer (67 mM sodium phosphate buffer, 1% Triton X-100, 0.1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride)를 첨가한 후 세포를 수집하여 ultra sonication 하였다. 이를 1 시간 동안 방치한 후 12,500 rpm에서 20 분간 원심분리 하여 얻어진 상층액을 단백질 정량하여 효소용액으로 사용하였다.

덩굴 추출물을 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가하여 melan-a tyrosinase 활성억제도를 측정한 결과 대조군인 켈벨씨 추출물 보다는 저해도가 낮으나 농도 의존적으로 저해도가 높아지는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 7). 이 결과로 볼 때 melan-a 세포주에서의 neo muscat 덩굴, campbell 덩굴 추출물에 의한 멜라닌 생성 감소효과는 세포에서 생성된 tyrosinase의 활성억제에 의한 것이 주요한 원인중의 하나로 판단된다.

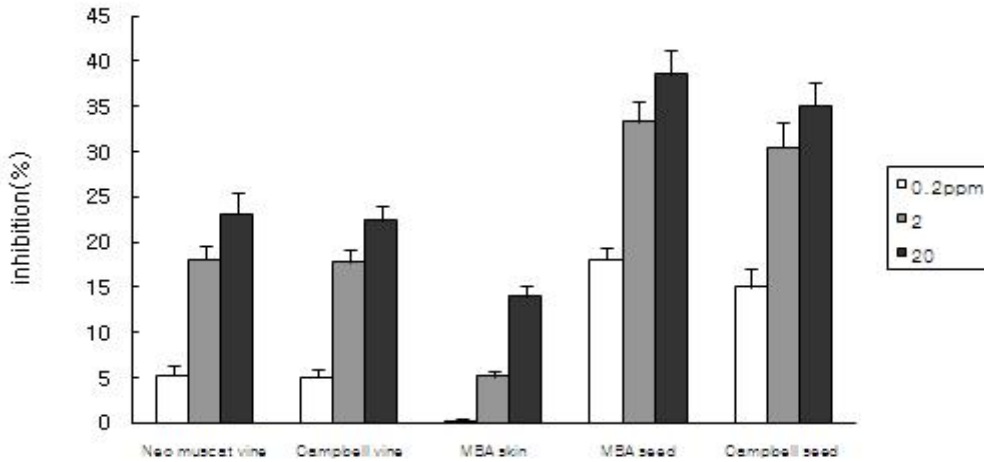
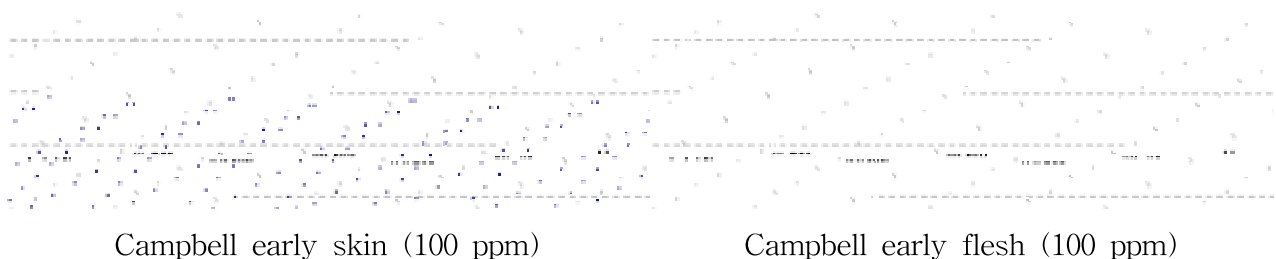


Fig. 7. Cell extracted tyrosinase inhibitory effects of various grape 80% ethanol extracts

4. UV 흡수도 측정

자외선은 피부의 색소 과생성에 가장 주요한 원인으로 알려져 있다. 자외선 영역 중 UV-A (350-370 nm) 는 파장이 길어 피부 진피층 까지 침투 할 수 있으며 즉시형 색소침착을 일으킨다. 반면 UV-B 영역은 UV-A에 비해 파장이 짧아 피부 깊숙이 침투하지 않지만 에너지가 높아 일광화상을 유발시키며 노출 후 72 시간 이후부터 색소침착이 나타나는 지연형 색소침착을 일으킨다. 포도 추출물 시료들을 메탄올에 녹여 200-500 nm 영역의 흡수도를 측정한 결과 씨 추출물이 자외선 B 영역에서 특징적인 흡수를 나타내었으며 품종으로는 캠벨과 네오마스카트 이 UV-B 영역의 자외선을 특징적으로 흡수하는 것을 확인하였다. 따라서 이들 시료는 피부에 도포시 UV-B 영역의 자외선을 차단하여 일광화상 및 지연형 색소침착을 막는 효과를 기대할 수 있는 것으로 판단된다. 또한 덩굴 추출물에서도 약한 흡수도를 나타냄을 관찰할 수 있었고 과육 및 껍질 추출물은 자외선 흡수를 나타내지 않았다.



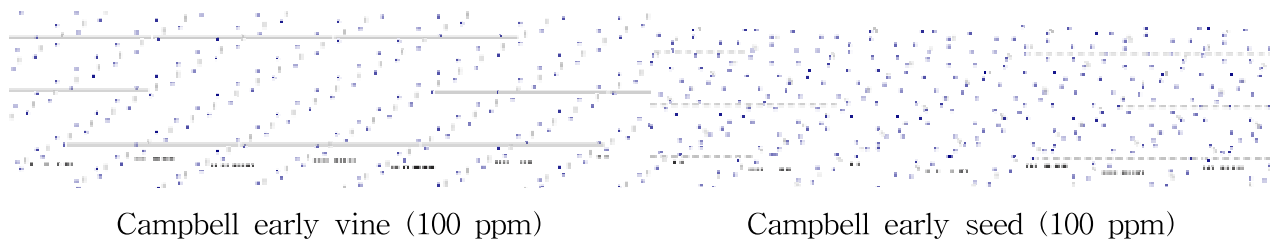


Fig. 8. Absorption abilities of campbell early extracts at UV-A (350-370 nm) and UV-B (270-290 nm) region

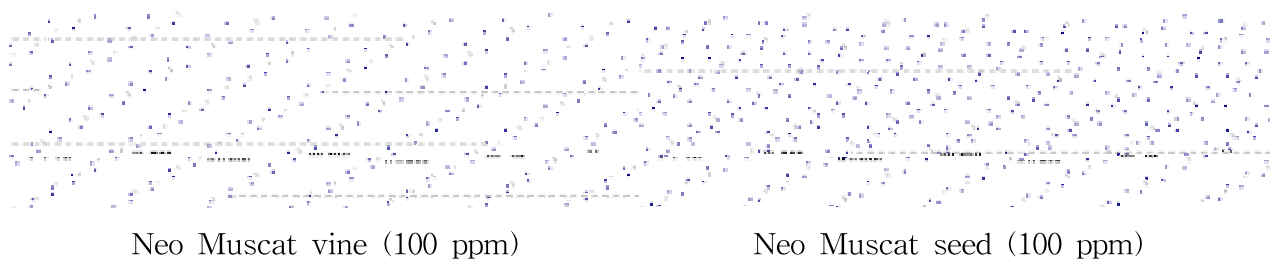
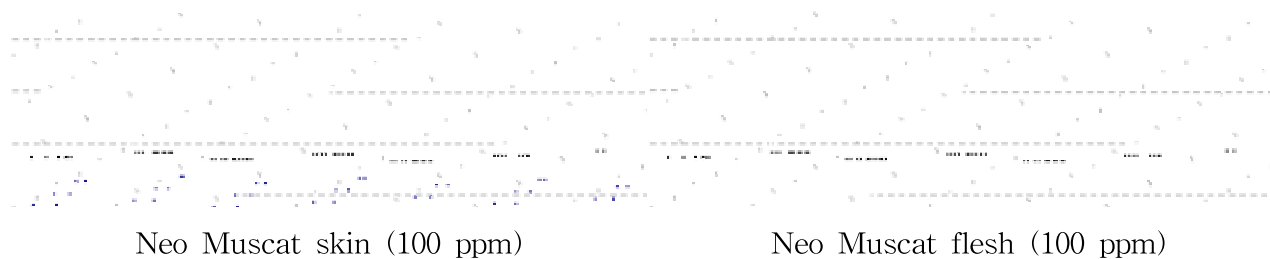


Fig. 9. Absorption abilities of neo muscat extracts at UV-A (350-370 nm) and UV-B (270-290 nm) region.

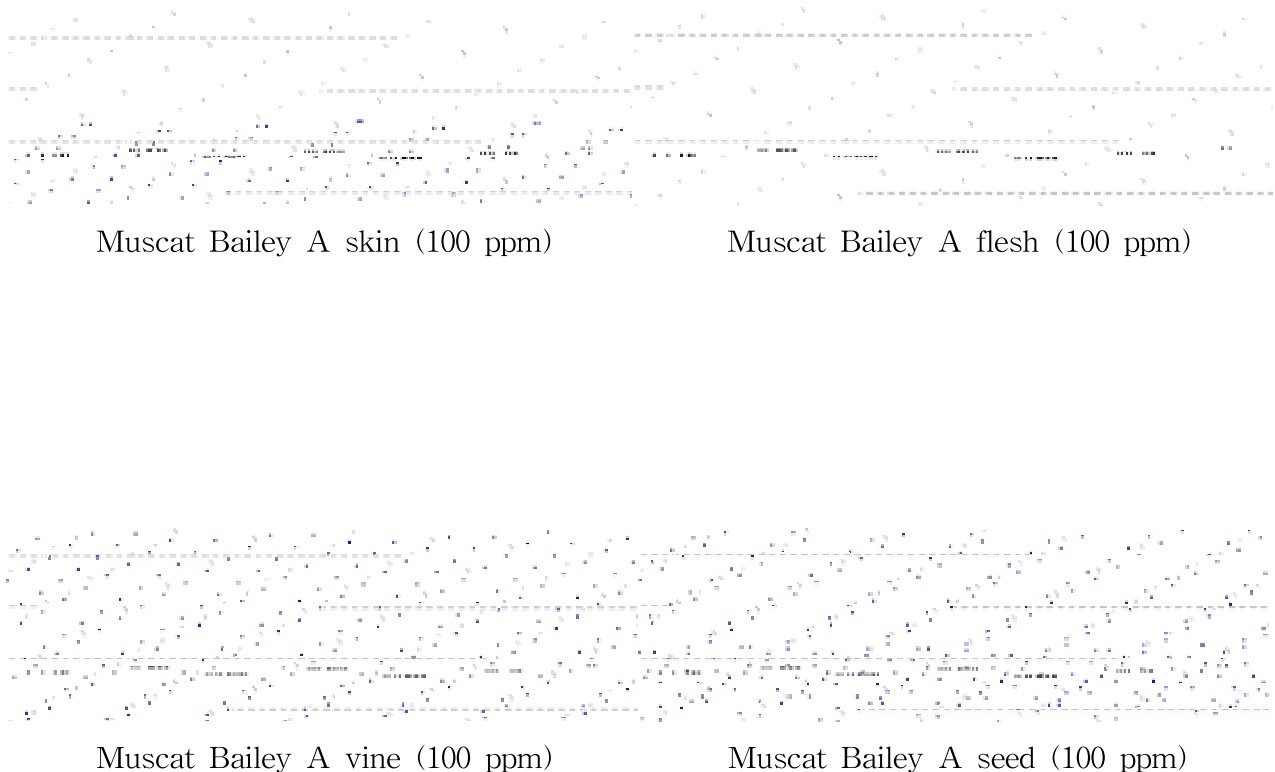


Fig. 10. Absorption abilities of extracts at UV-A (350-370 nm) and UV-B (270-290 nm) region.

제 3 절. 활성성분의 규명 (제 1세부)

1. Flavonoid 성분의 정량

앞서 제조된 포도 시료의 flavonoid 함량을 TLC로 확인 후 HPLC를 이용하여 정량한 결과는 와 같다. 문헌조사를 통하여 선발한 7 종의 flavonoid (catechin, epicatechin, kaempferol, quercetin, gallic acid, myricetin, resveratrol) 를 메탄올에 녹여 정량기준물질로 사용하였다. TLC는 silica gel F60 254 plate(Merk)를 사용하여 Chloroform/MeOH = 7/3 용매로 전개하여 성분을 확인 하였고 HPLC는 Jasco Co. (Japan) 의 분석용 liquid chromatography를 사용하였고 Bondpack C18 (4 um, 300 × 3.9 mm) column 을 이용하여 이동상은 2% acetic acid가 함유된 water 와 0.5% acetic acid 가 함유된 50% acetonitrile 을 gradient를 주어 0.8 ml/min의 속도로 용출하였다. Column의 온도는

40°C로 유지 하였으며 시료의 검출은 280 nm에서 측정하였다. 시료액은 완전 농축된 포도추출 물을 10 mg/ml로 메탄올에 녹인 후 0.45 um syringe filter (Millipore)로 여과하여 제조하였고 이를 분석용 시료로 사용하였다. 모든 시료는 3회 반복 실험하여 평균치를 산출하였고 표준물질과의 co-injection을 실시하여 peak의 일치를 확인하였다 (Fig. 13-15).

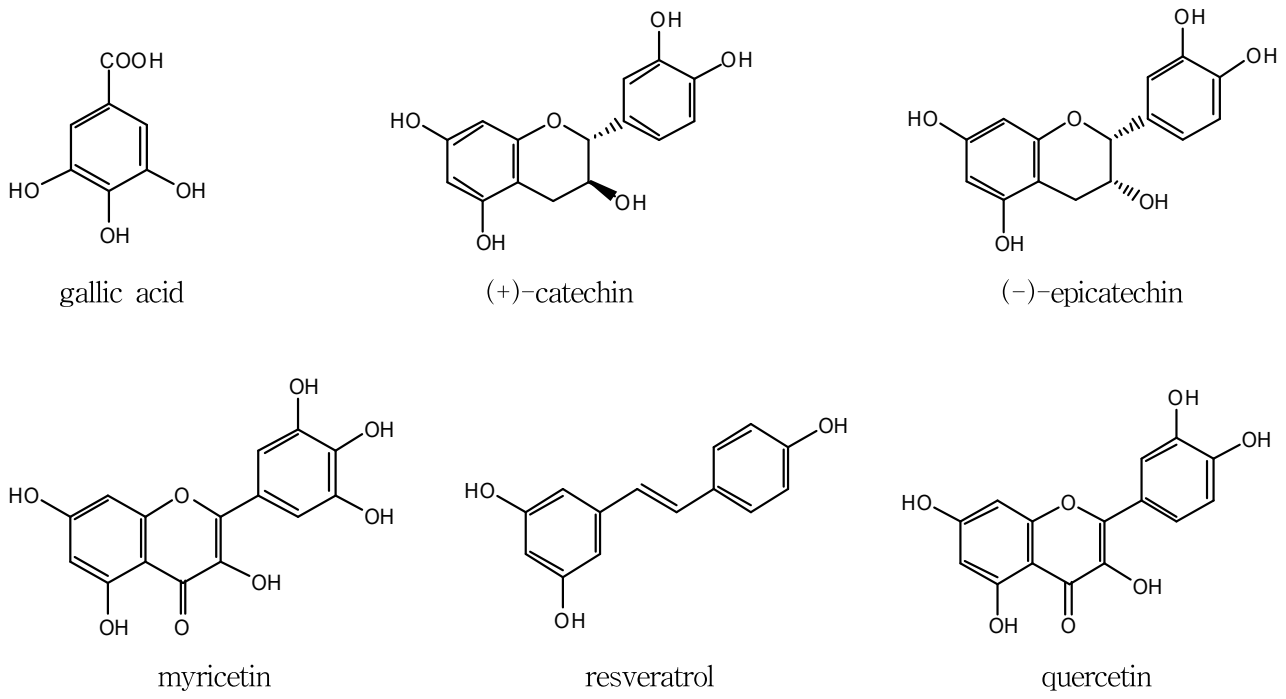
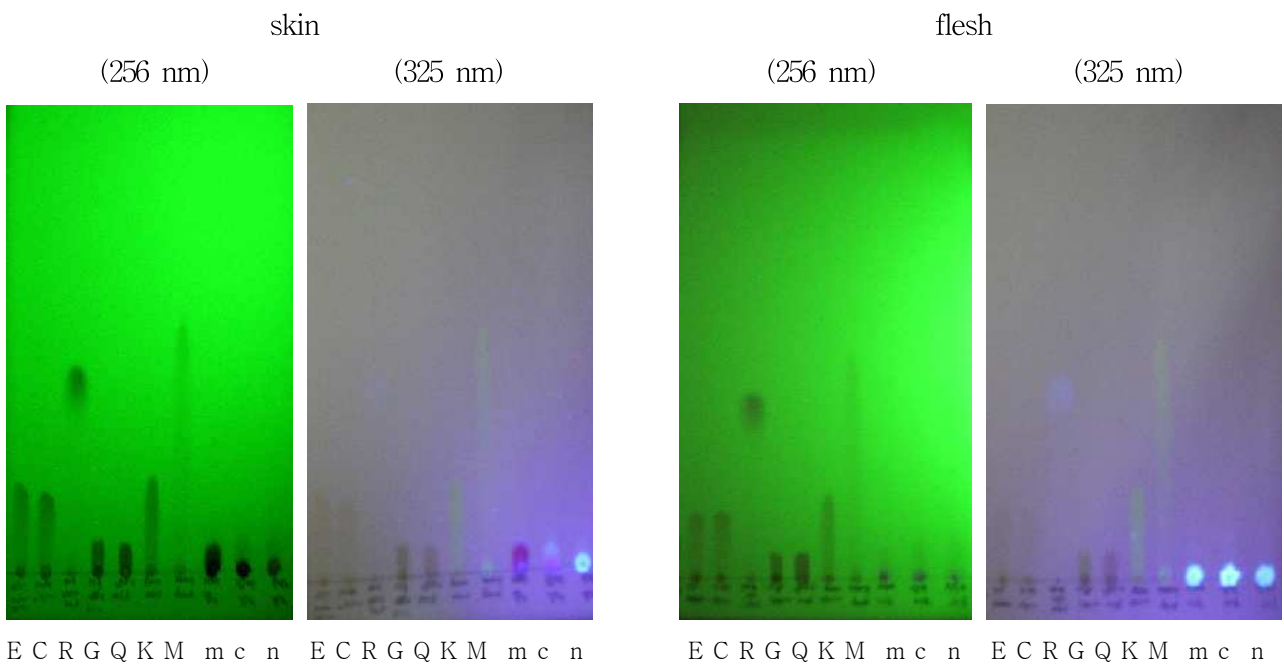


Fig. 11. Chemical structure of flavonoids in grape samples



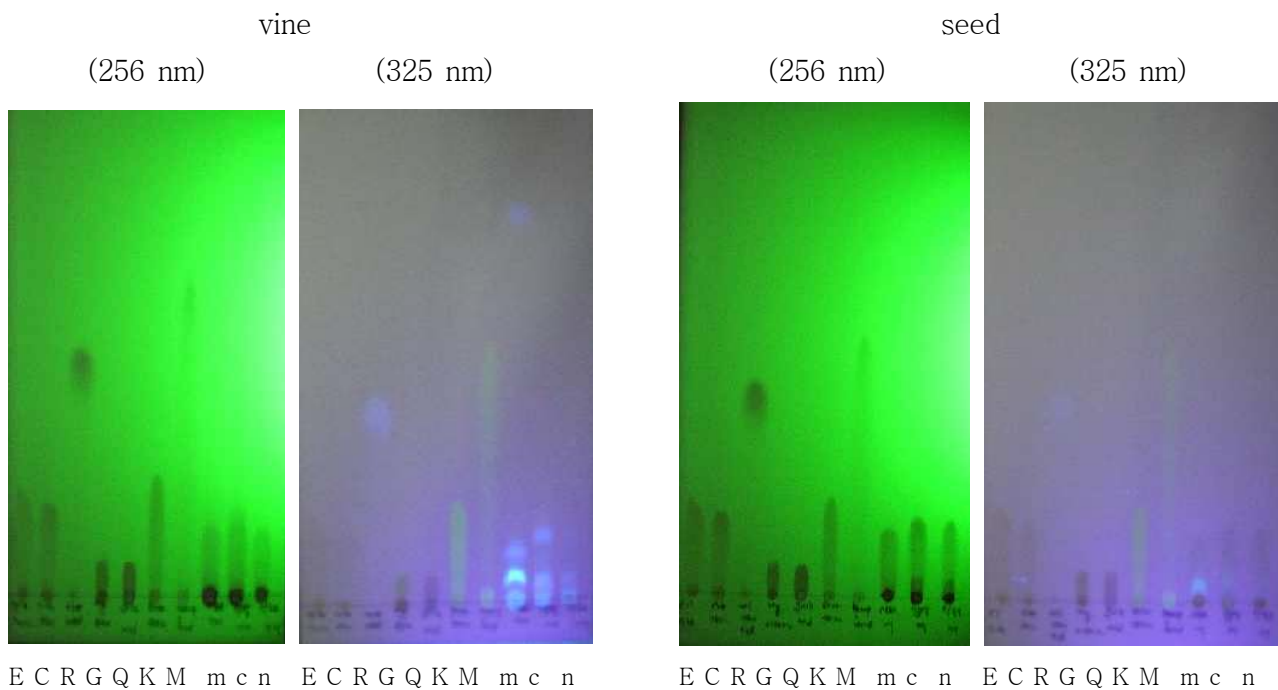
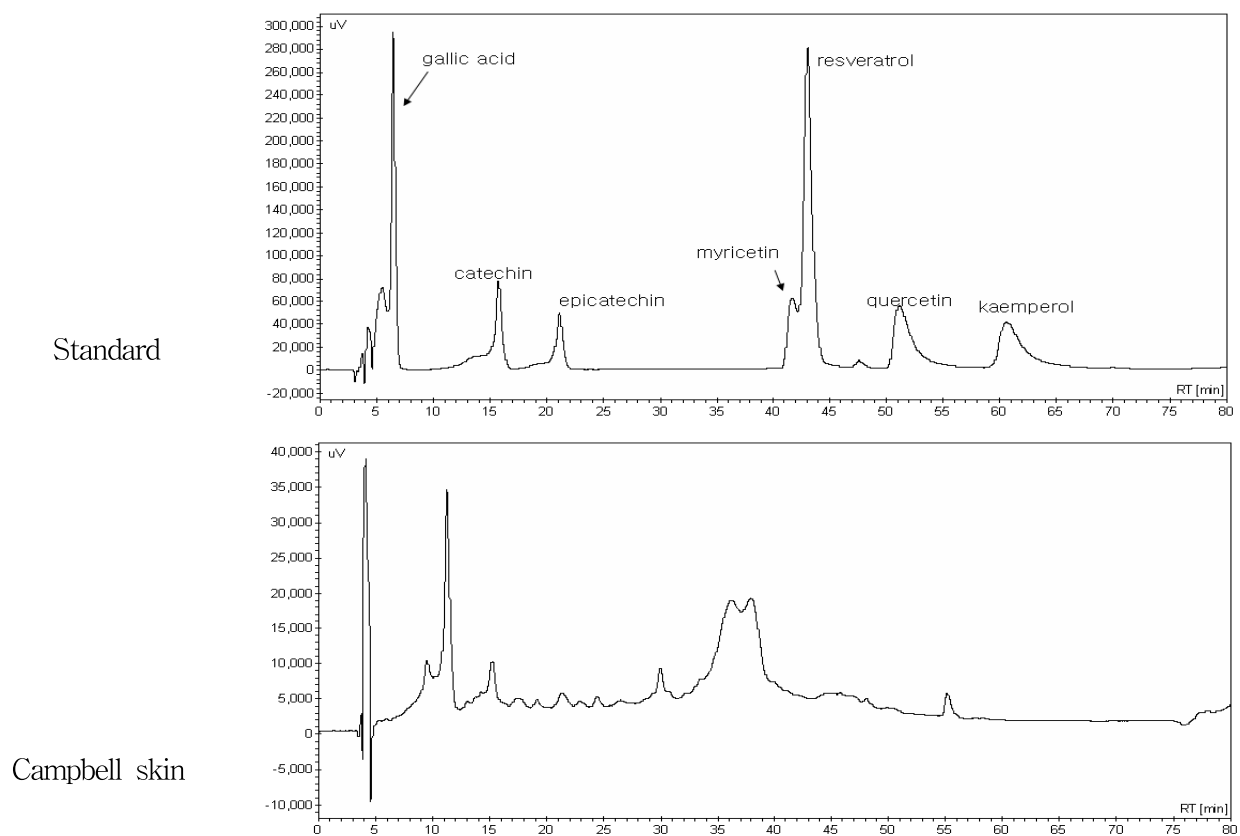


Fig. 12. TLC of flavonoids and grape samples.

E: epicatechin, C: catechin, R: resveratrol, G: gallic acid, Q: quercetin, K: Kaemperol, M: myricetin, m: MBA grape, c: campbell grape, n: neo muscat grape.



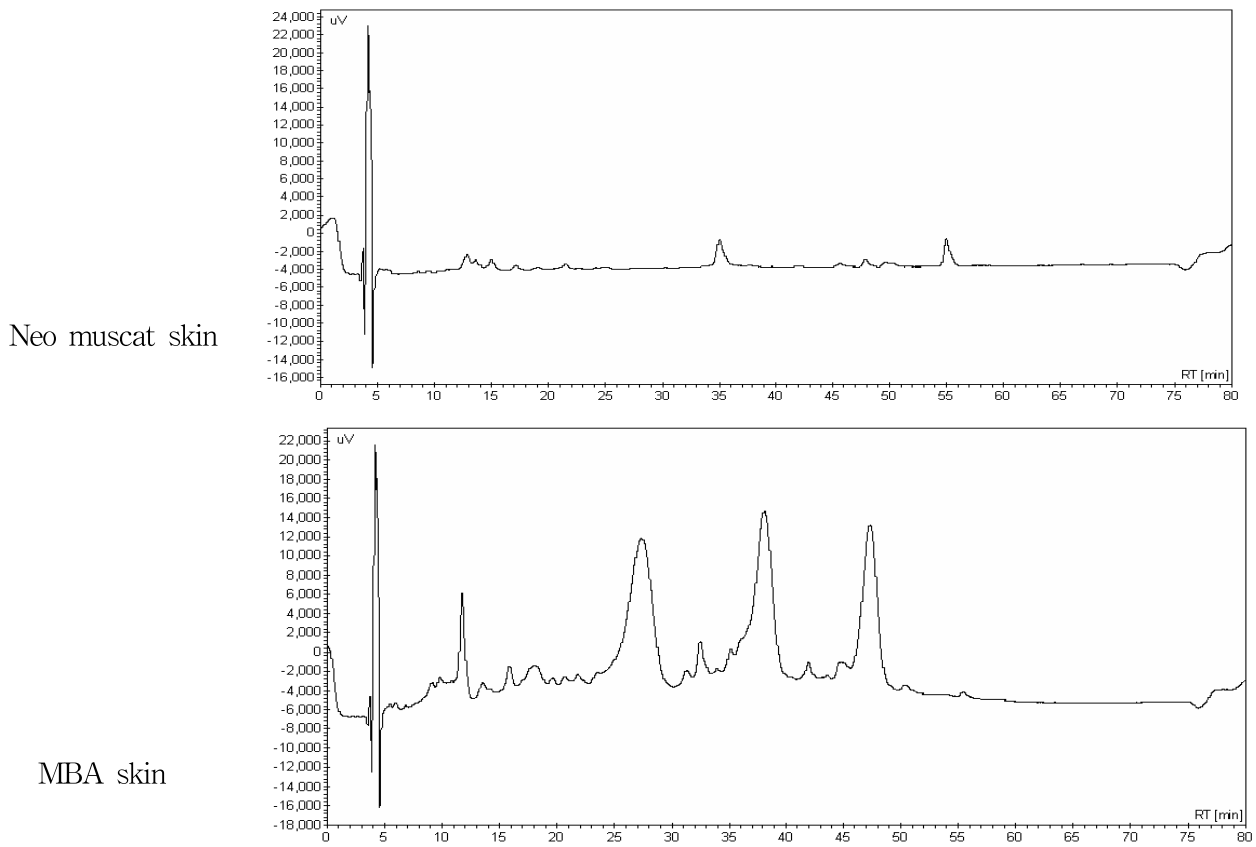
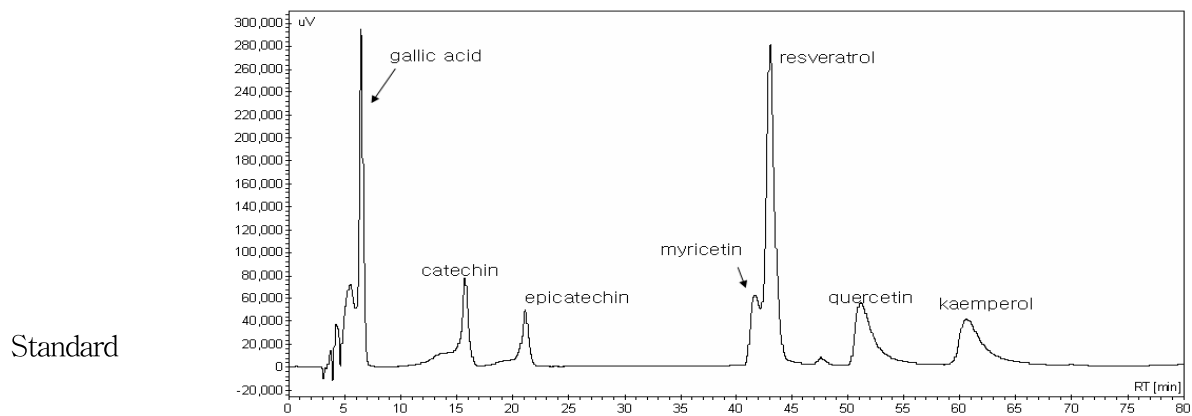
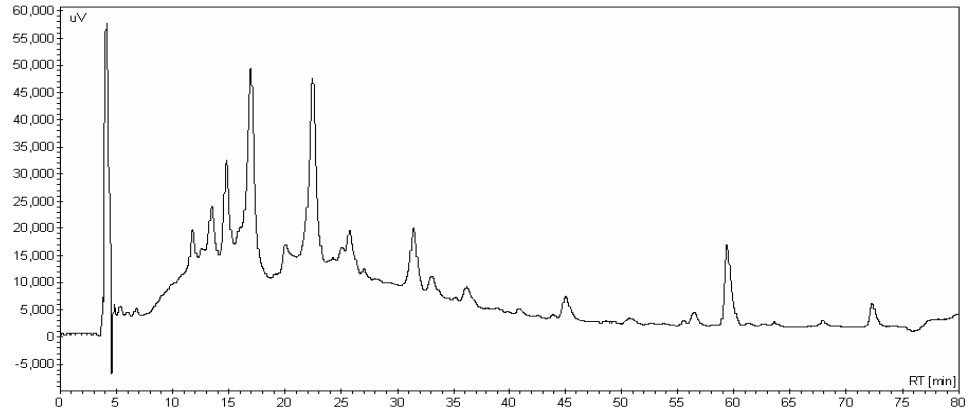


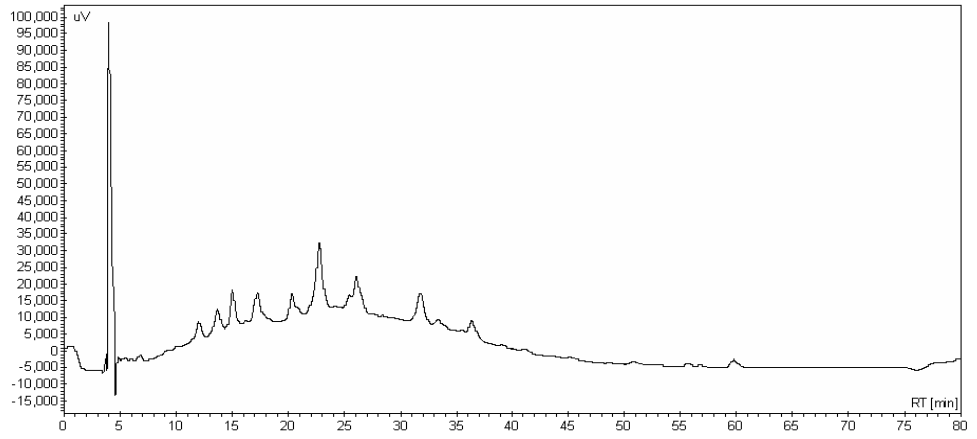
Fig. 13. HPLC chromatogram of three kinds of grape skin extracts.



Campbell vine



Neo muscat vine



MBA vine

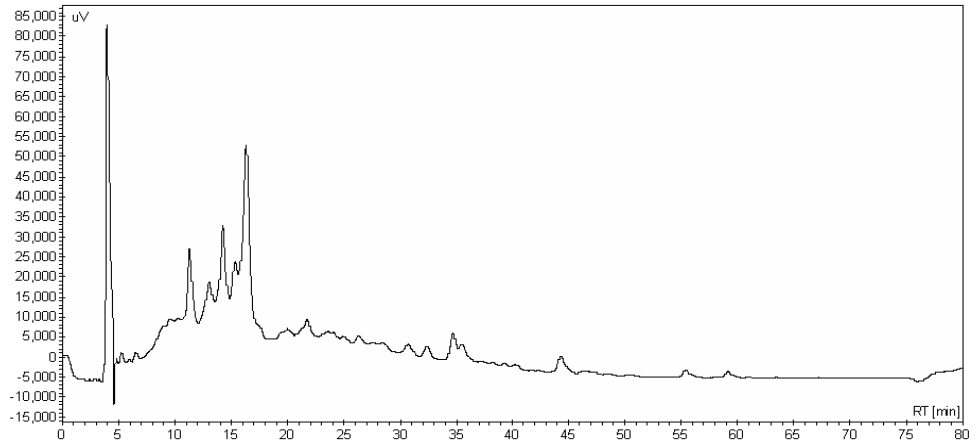


Fig. 14. HPLC chromatogram of three kinds of grape vine extracts.

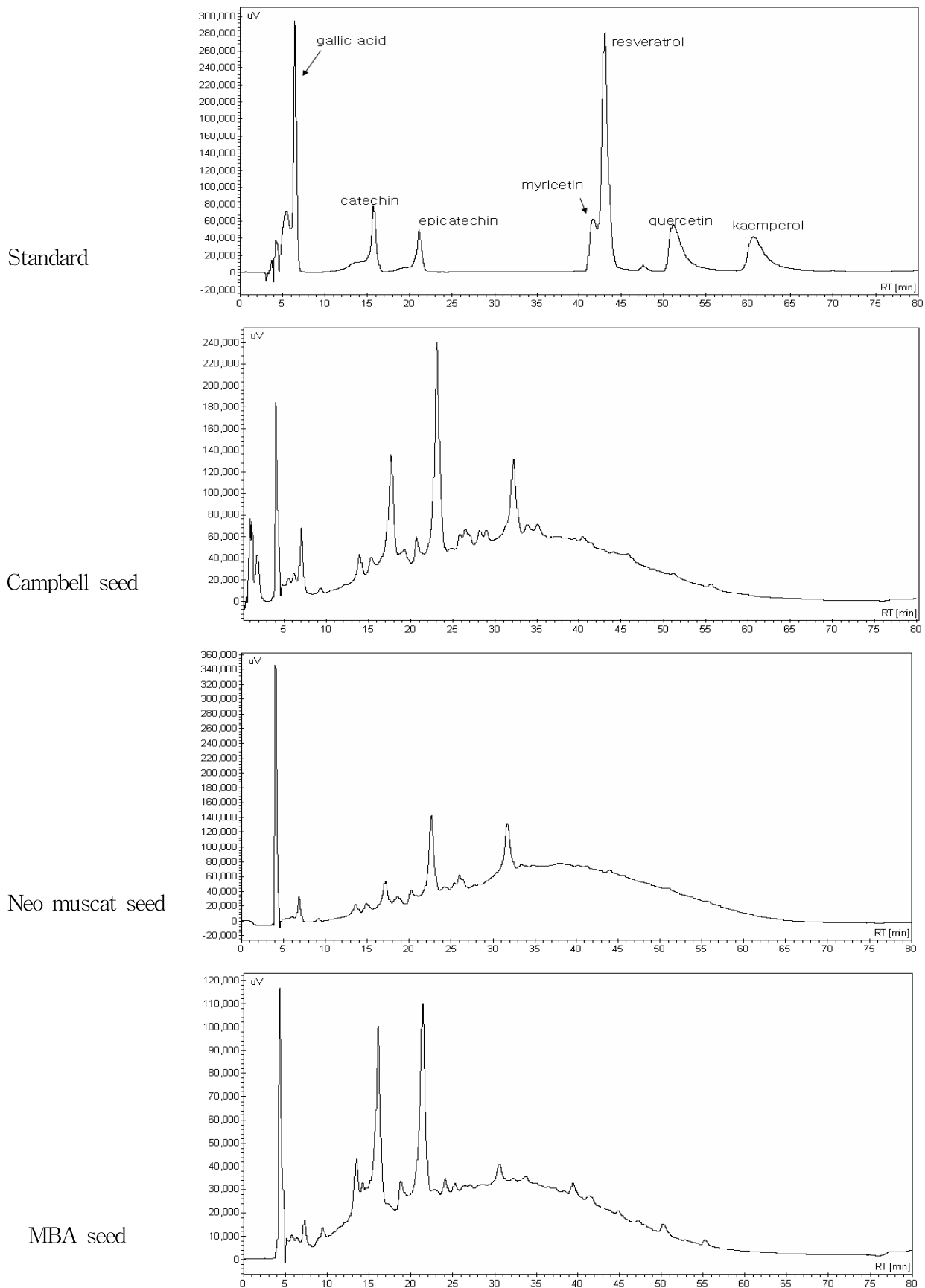


Fig. 15. HPLC chromatogram of three kinds of grape seed extracts.

Table 3. Quantitative analysis of flavonoids in various grape sample

	gallic acid	catechin	epicatechin	myricetin	resveratrol	quercetin	kaemperol
campbell skin	0.005	0.076	0.059	-	0.003	-	-
neo muscat skin	0.004	0.007	0.011	-	0.002	-	-
MBA skin	0.003	0.031	0.025	-	0.007	-	-
campbell flesh	-	-	-	-	-	-	-
neo muscat flesh	-	-	-	-	-	-	-
MBA flesh	-	-	-	-	-	-	-
campbell vine	0.025	0.282	0.787	0.010	0.020	0.015	0.184
neo muscat vine	0.040	0.182	0.527	0.014	0.002	0.018	0.026
MBA vine	0.021	0.350	0.231	-	0.019	-	-
campbell seed	0.384	2.055	4.642	-	0.020	0.016	-
neo muscat seed	0.195	0.568	2.886	0.080	-	-	-
MBA seed	0.094	1.093	2.375	0.075	-	-	-

Each value represents % in 80% ethanol extracts (w/w).

기준물질인 gallic acid, catechin, epicatechin, myricetin, resveratrol, quercetin, kaempferol 등을 위의 기술된 조건에 따라 용출시켰을 때 각각 6.5, 15.8, 21.1, 41.7, 43.0, 51.1, 60.6 분에서 검출되었다. 포도시료는 부위에 따라 씨에는 높은 함량의 gallic acid, catechin, epicatechin이 함유되어 있었으며 덩굴은 여러종류의 flavonoid가 고루 함유되어 있었고, 껍질과 과육에는 상대적으로 적은 함량이 검출되었다. 품종별 함량은 성분에 따라 차이가 있으나 전체적으로 campbell, neo muscat, muscat bailey A(MBA)의 순으로 높은 함량을 보였다 (Table. 3).

2. Anthocyanin 성분의 정량

포도의 대표적인 색소성분인 anthocyanin 성분 중 cyanidin, peonidin, pelagonidin, malvidin의 껍질내 함량을 TLC로 확인 후 HPLC를 이용하여 정량한 결과는 Table 4와 같다. TLC는 silica gel F60 254 plate(Merk)를 사용하여 n-BuOH/glacial acetic acid/water = 40/10/20 의 위층 용매로 전개하여 성분을 확인 하였고 HPLC는 Jasco Co. (Japan) system을 이용하여 Bondpack C18 (4 um,

300 × 3.9 mm) Column 을 이용하여 이동상은 10% formic acid가 함유된 water 와 10% formic acid 가 함유된 acetonitrile 을 gradient를 주어 1.7 ml/min의 속도로 용출하였다. Column의 온도는 40℃로 유지 하였으며 시료의 검출은 530 nm에서 측정하였다. 시료액은 완전 농축된 포도껍질 추출물을 10 mg/ml로 메탄올에 녹인 후 0.45 um syringe filter (Millipore) 로 여과하여 제조하였고 이를 분석용 시료로 사용하였다. 모든 시료는 3 회 반복 실험하여 평균치를 산출하였고 표준물질과의 co-injection을 실시하여 peak의 일치를 확인하였다.

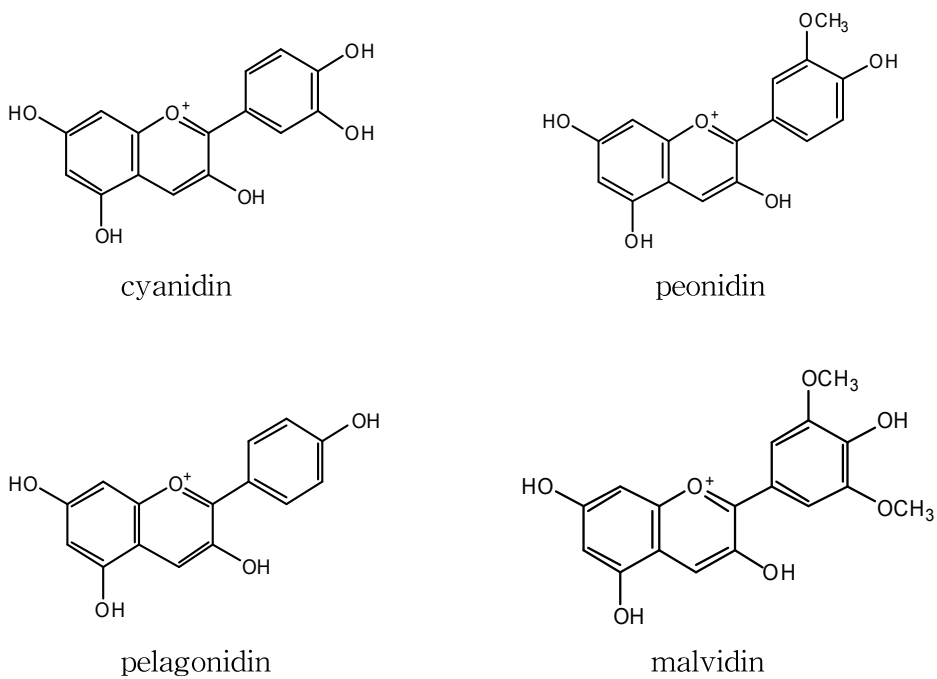


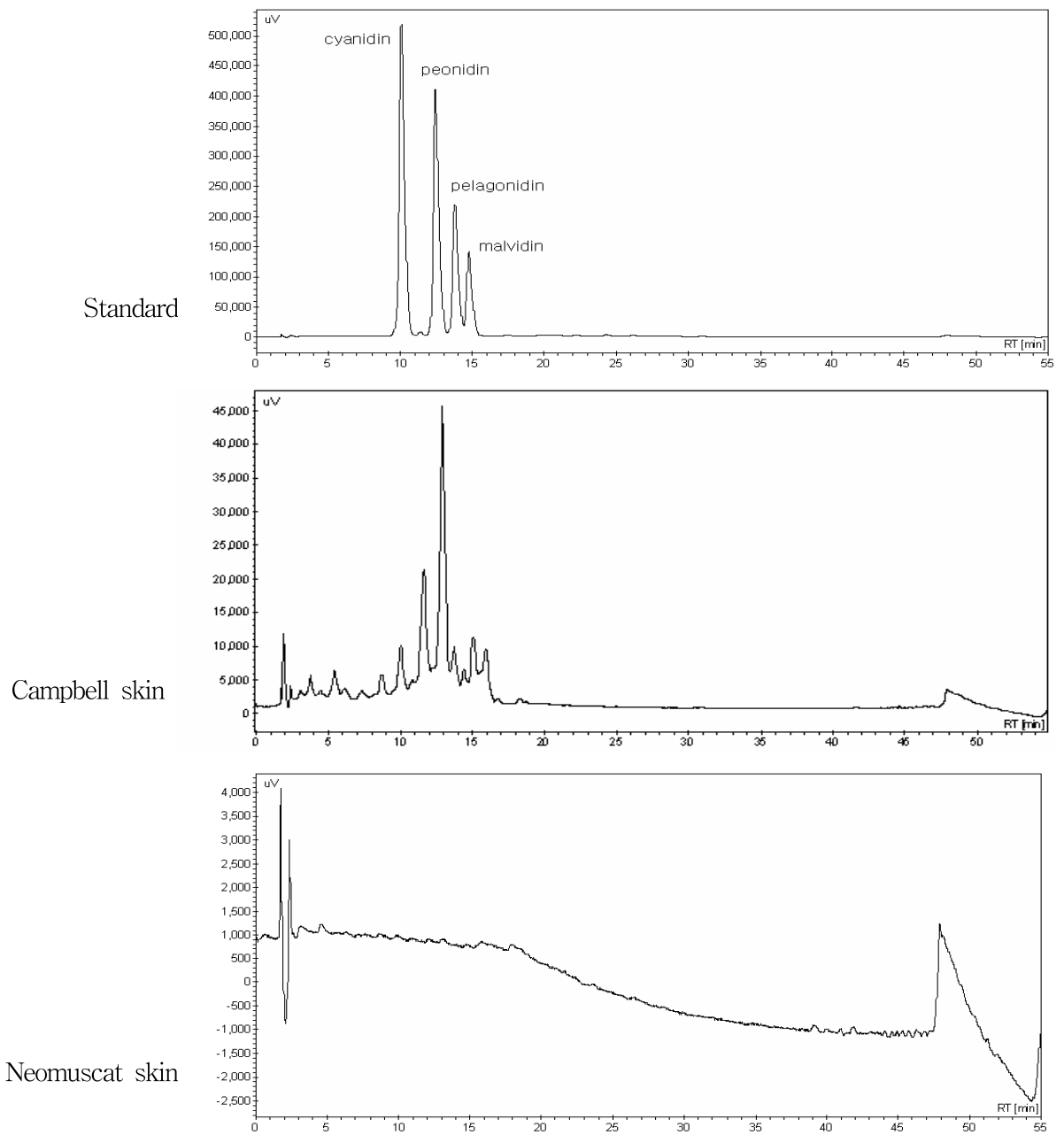
Fig. 16. Chemical structure of Anthocyanins in grape skin samples



Pel Peo Cya Mal M C N

Fig. 17. TLC of Anthocyanins and grape skin samples.

Pel: Pelargonidin, Peo: Peonidin, Cya: Cyanidin, Mal: Malvidin M: MBA grape skin, C: campbell grape skin, N: neo muscat grape skin.



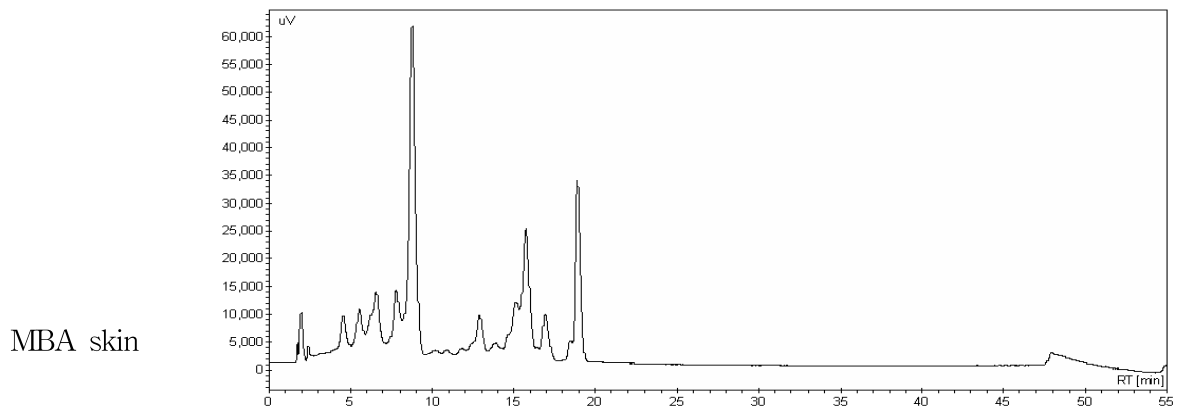


Fig. 18. HPLC chromatogram of three kinds of grape skin extracts.

Table 4. Quantitative analysis of anthocyanin in various grape skin sample

	cyanidin	peonidin	pelagonidin	malvidin
campbell skin	0.048	0.002	0.082	0.153
neo muscat skin	-	-	-	-
MBA skin	0.017	0.006	0.051	0.108

Each value represents % in 80% ethanol extracts (w/w).

포도껍질의 색소성분인 anthocyanin 성분을 정량한 결과 cyanidin, pelagonidin, malvidin은 campbell 품종에서 peonidin은 MBA 품종에서 가장 높은 함량을 보였으며 neo muscat 품종에서는 검출되지 않았다. (Table 4)

3. 정량된 성분의 tyrosinase 억제효과

앞서 정량된 flavonoid 7 종과 anthocyanin 4 종의 mushroom tyrosinase 활성억제 효과를 측정한 결과는 Fig. 19, 20와 같다. Kojic acid는 positive control로 쓰여 졌으며 활성의 측정방법은 위에서 기술한 포도 추출물의 활성측정방법과 동일하게 실시하였다.

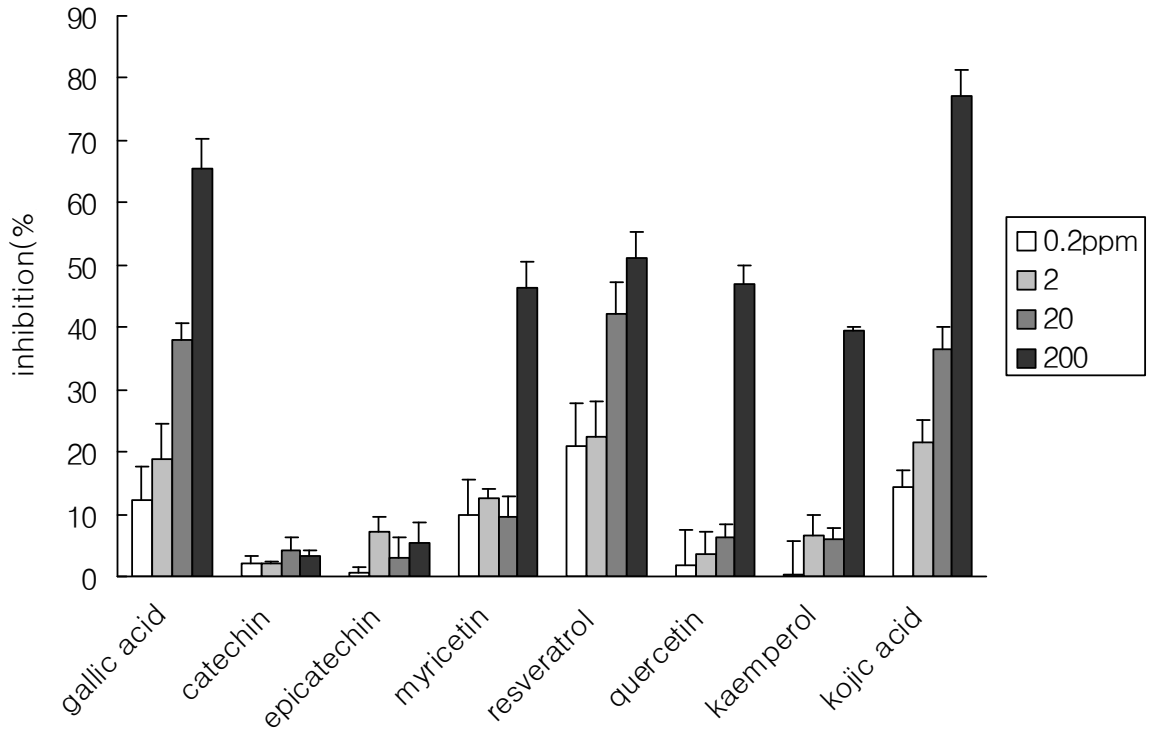


Fig. 19. Tyrosinase inhibitory effects of flavonoids in grape samples.

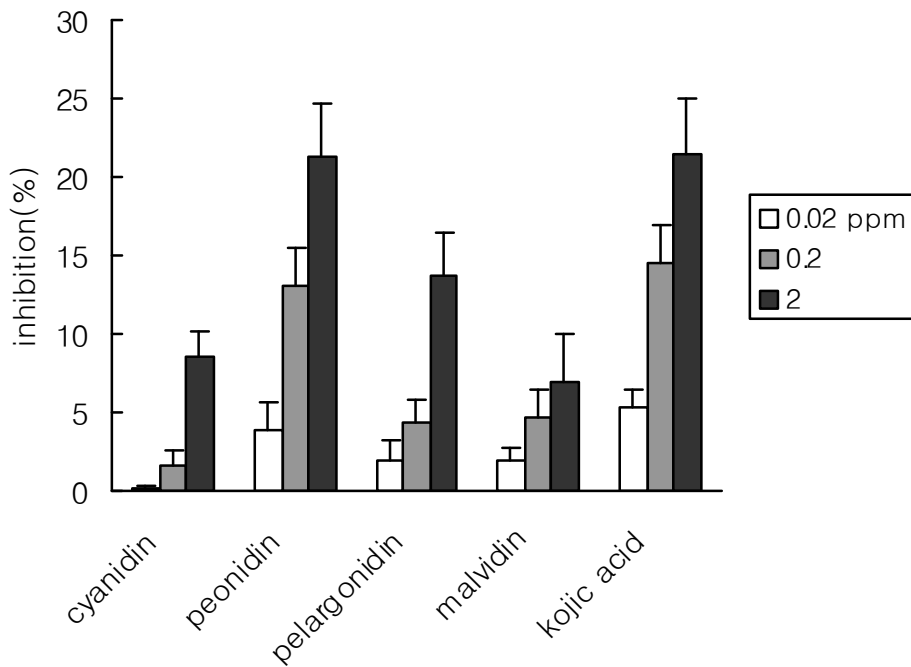
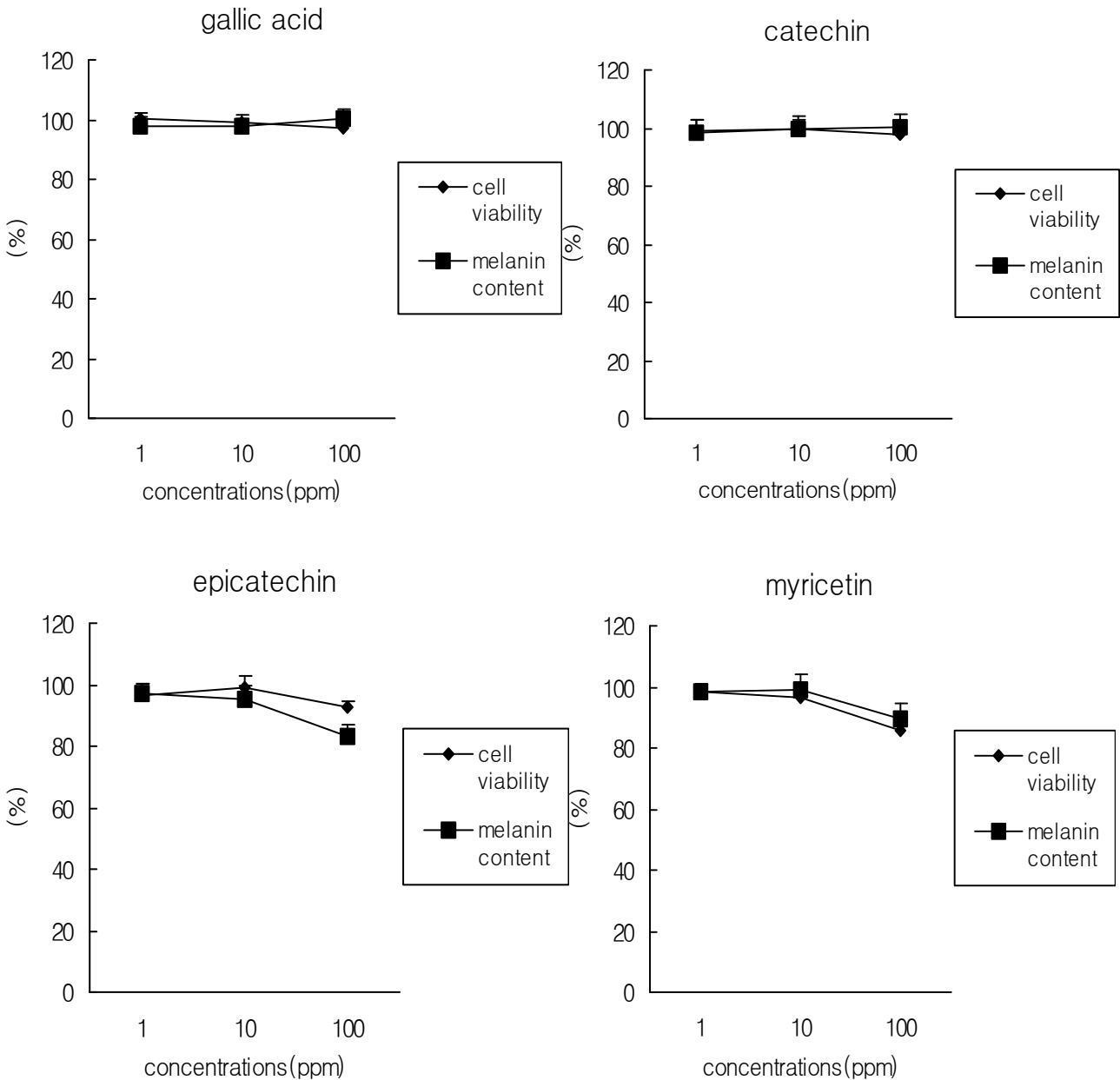


Fig. 20. Tyrosinase inhibitory effects of anthocyanins in grape skin samples.

7 종의 flavonoid 중 resveratrol, gallic acid가 가장 높은 tyrosinase 억제활성을 나타내었으며 myricetin, quercetin, kaemperol 은 200 ppm 이상에서 약 40% 정도의 억제활성을 나타내었고 catechin과 epicatechin은 활성을 나타내지 않았다. 또한 껍질에 함유된 anthocyanin은 색소의 흡광도 때문에 2 ppm 이하의 저농도에서만 측정을 실시하였고 peonidine이 낮은 농도인 2 ppm 에서 20% 이상의 tyrosinase활성을 저해하여 우수한 저해활성을 나타냄을 확인하였다.

4. 정량된 성분이 멜라닌 생성세포에서의 세포 생존율 및 멜라닌 생성량에 미치는 영향

앞서 정량된 flavonoid 7 종과 anthocyanin 4 종을 melan-a 세포에 3 일간 처리한 결과 flavonoid 중에서는 epicatechin, resveratrol, quercetin이 100 ppm 에서 세포생존을 대비 멜라닌 생성량 감소효과를 나타냈으며 anthocyanin 중에서는 peonidin 과 pelagonidin이 큰 세포독성 없이 멜라닌 생성량을 농도 의존적으로 감소시키는 활성을 나타내었다.



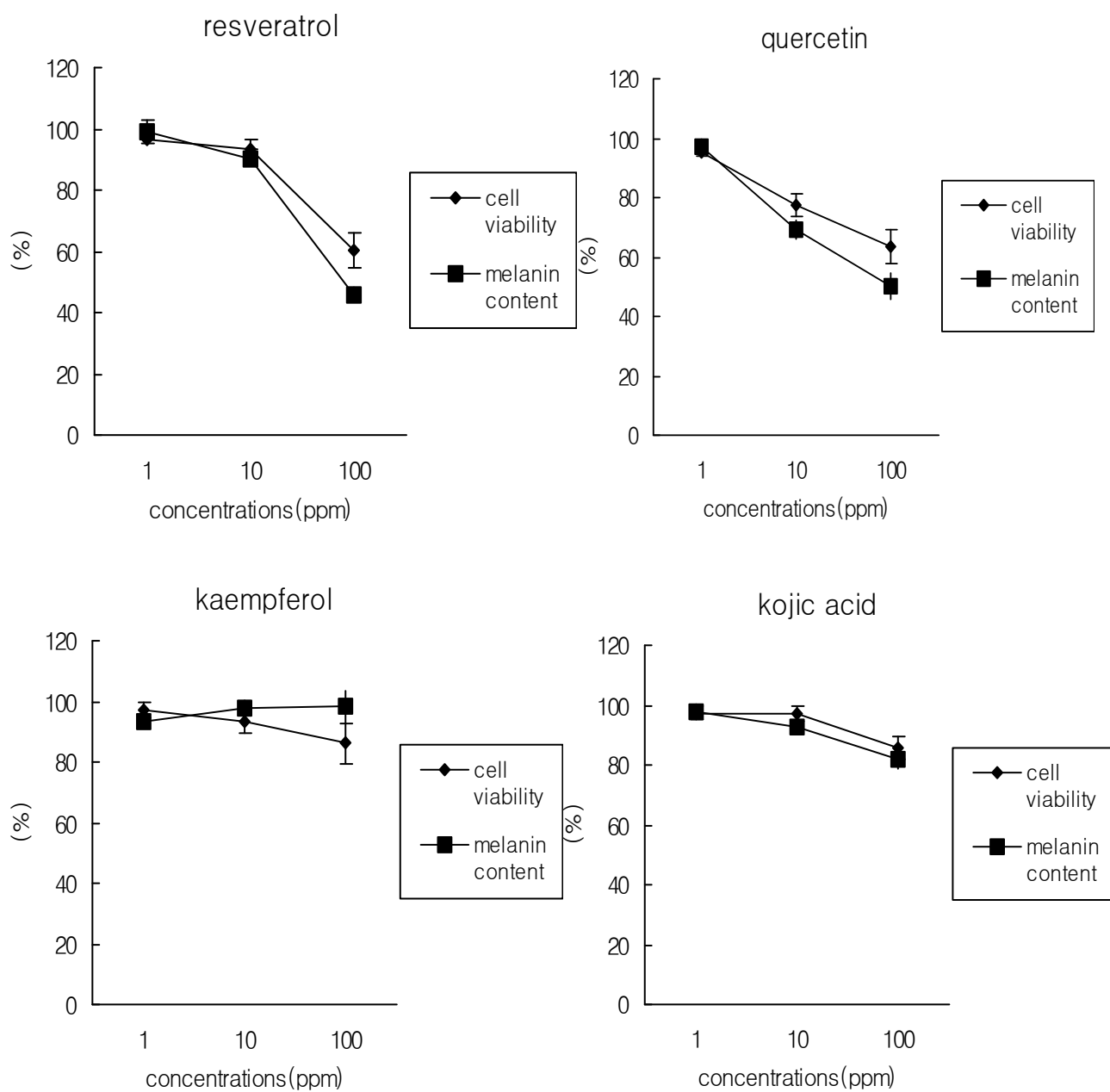


Fig. 21. Effects of flavonoids on cell growth and melanin production in melan-a cells. After 3 days. Viability and melanin content of vehicle was set to 100%.

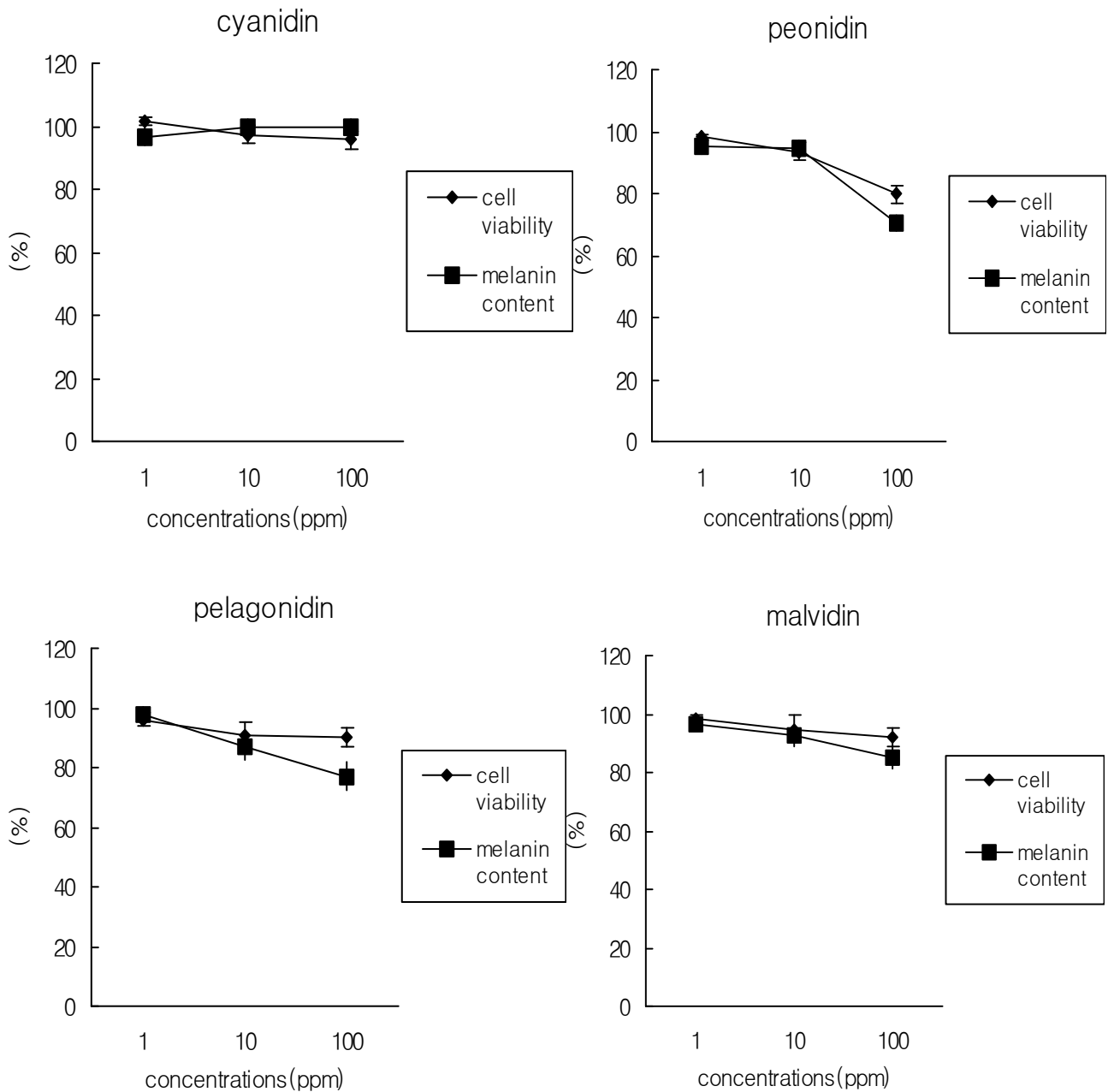


Fig. 22. Effects of anthocyanin on cell growth and melanin production in melan-a cells. After 3 days. Viability and melanin content of vehicle was set to 100%.

5. 포도성분의 melan-a 세포 생성 tyrosinase 활성에 미치는 효과 측정

melan-a 세포에서 멜라닌 생성억제 활성을 보인 포도성분이 멜라닌 생성 세포에서 직접 생성된 tyrosinase를 추출하여 활성 억제도를 측정한 결과는 Fig. 23, 24 와 같다.

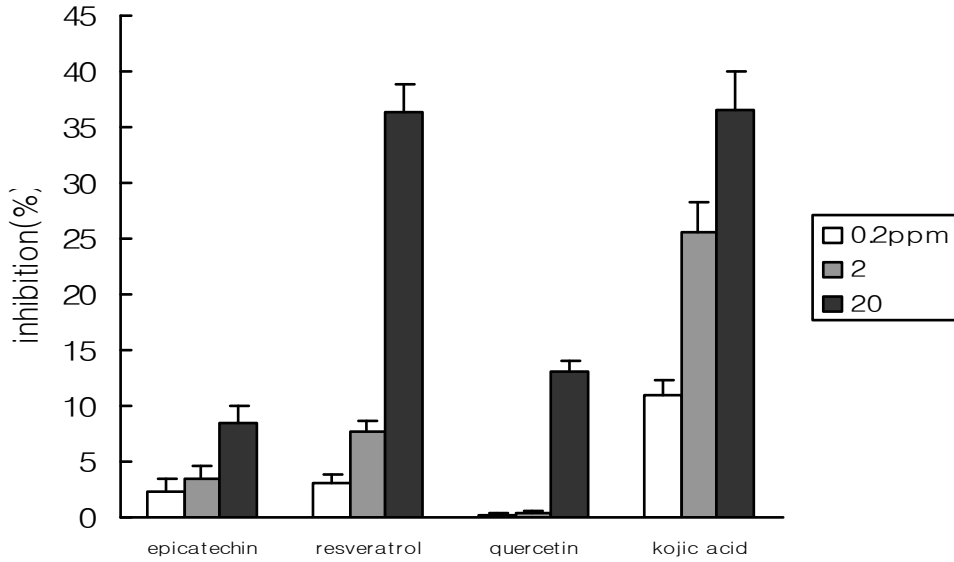


Fig. 23. Cell extracted tyrosinase inhibitory effects of flavonoids in grape samples.

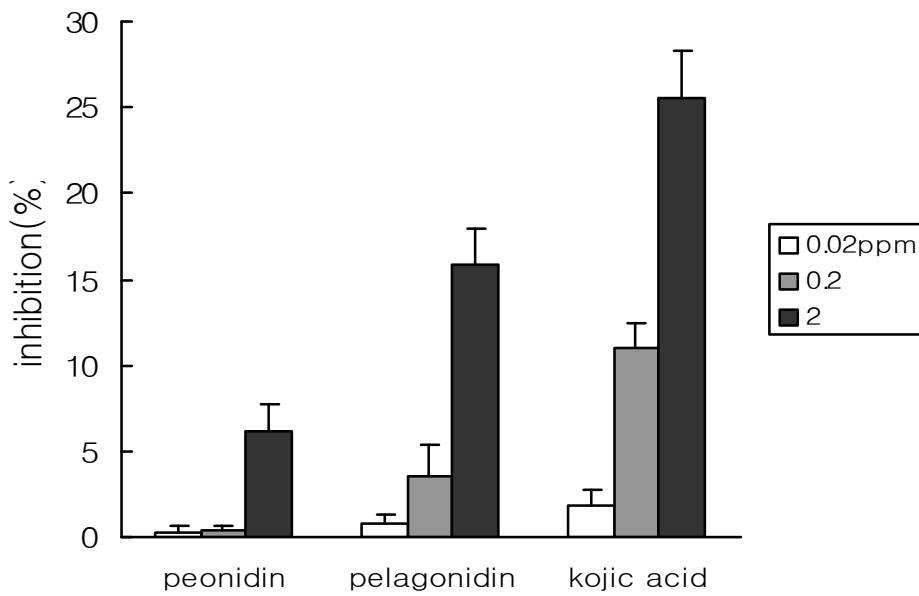


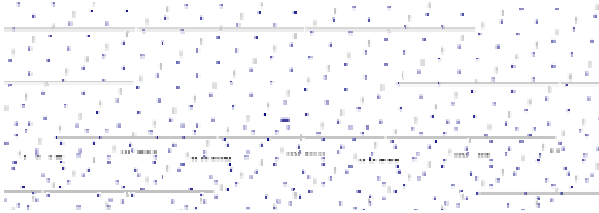
Fig. 24. Cell extracted tyrosinase inhibitory effects of anthocyanins in grape samples.

이 결과에 따르면 앞서의 mushroom tyrosinase 활성억제효과 보다는 다소 낮은 경향을 나타내었으나 전체적으로 농도의존적인 세포유래 tyrosinase 억제활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

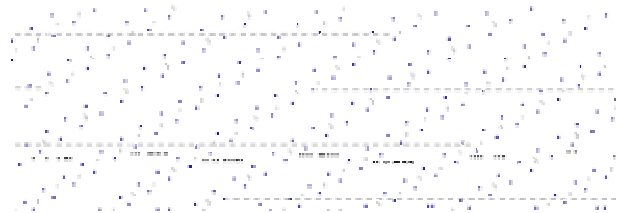
6. 포도성분의 UV 차단효과 측정

멜라닌 과생성의 주요한 원인인 자외선 영역에서 각각의 포도성분의 흡수도를 10 ppm 농도로 메탄올에 녹여 측정한 결과 gallic acid, catechin, epicatechin 이 UV-B 영역인 270-290 nm 사이에서 흡수도를 나타내었으며 anthocyanidin 성분인 cyanidin, peonidin, pelargonidin,

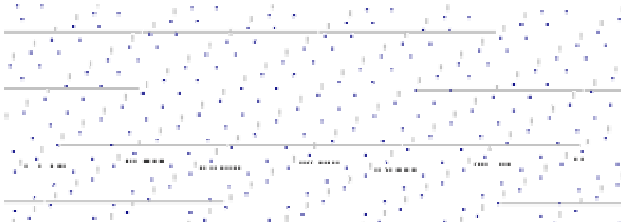
malvidin 역시 UV-B 영역에서 약한 흡수도를 나타내었다 (Fig. 25, 26).



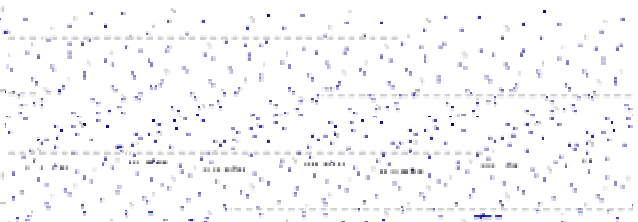
gallic acid (10 ppm)



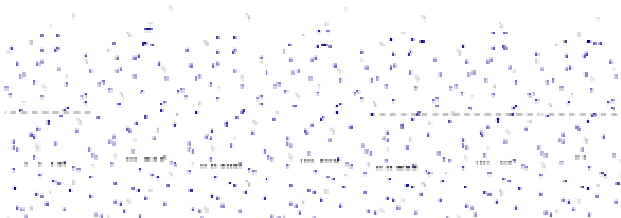
catechin (10 ppm)



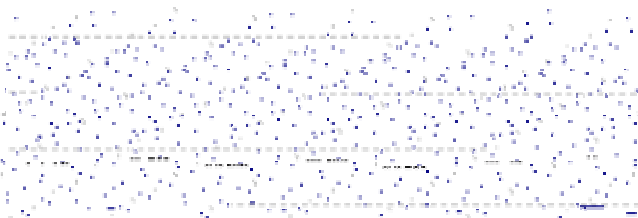
epicatechin (10 ppm)



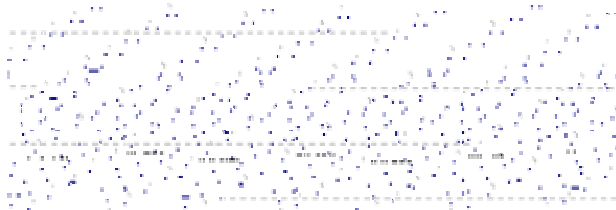
myricetin (10 ppm)



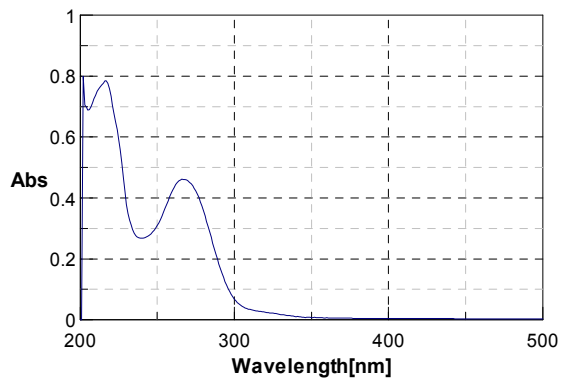
resveratrol (10 ppm)



quercetin (10 ppm)

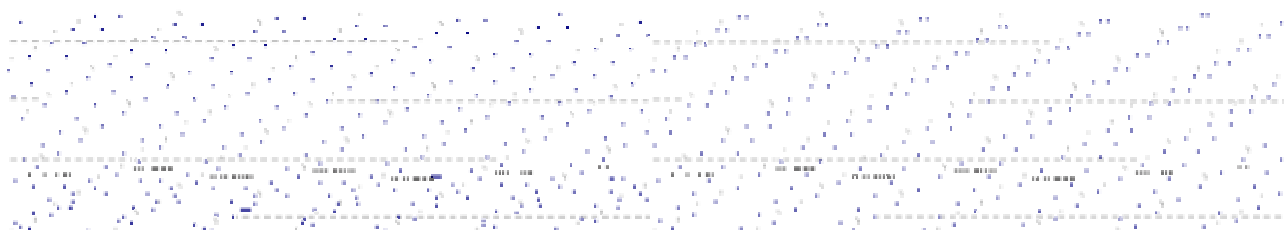


kaemperol (10 ppm)



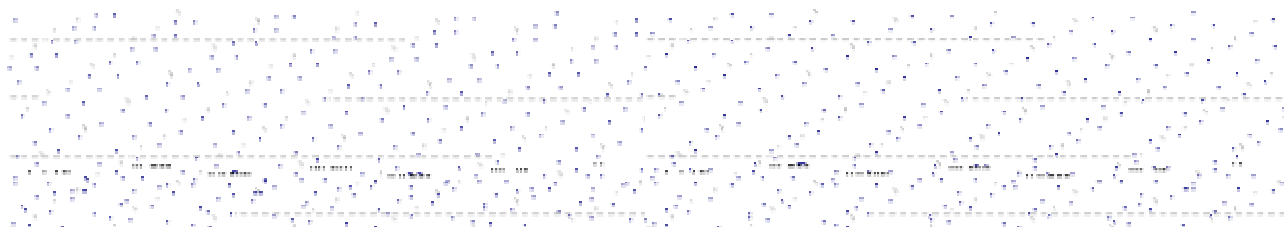
kojic acid (10 ppm)

Fig. 25. Absorption abilities of flavonoids at UV-A (350–370 nm) and UV-B (270–290 nm) region. Kojic acid was used as references material.



cyanidin (10 ppm)

peonidin (10 ppm)



pelagonodin (10 ppm)

malvidin (10 ppm)

Fig. 26. Absorption abilities of anthocyanin at UV-A (350-370 nm) and UV-B (270-290 nm) region.

7. 활성물질의 분리 및 구조동정

네오마스캇 덩굴 추출물 2 g을 메탄올 용매로 silica gel column chromatography 하여 5개의 분획(분획1-5)을 얻었으며 활성추적법을 사용하여 이중 분획 2를 다시 sephadex LH-20 column chromatography를 반복 실시하고 최종 prep HPLC 정제를 통하여 6 mg의 compound 1을 분리하였다. 분리된 compound 1의 구조동정을 위하여 CD₃OD에 녹인 후 500 MHz ¹H-NMR, 125 MHz ¹³C-NMR, HMQC, HMBC, COSY 분석 및 FAB-Mass분석을 실시하였으며 분석결과 탄소 30 개 및 수소 26 개를 가진 C₃₀H₂₆O₁₂ 분자량 579의 procyanidin B2로 구명되었다 (Fig. 27- 34).

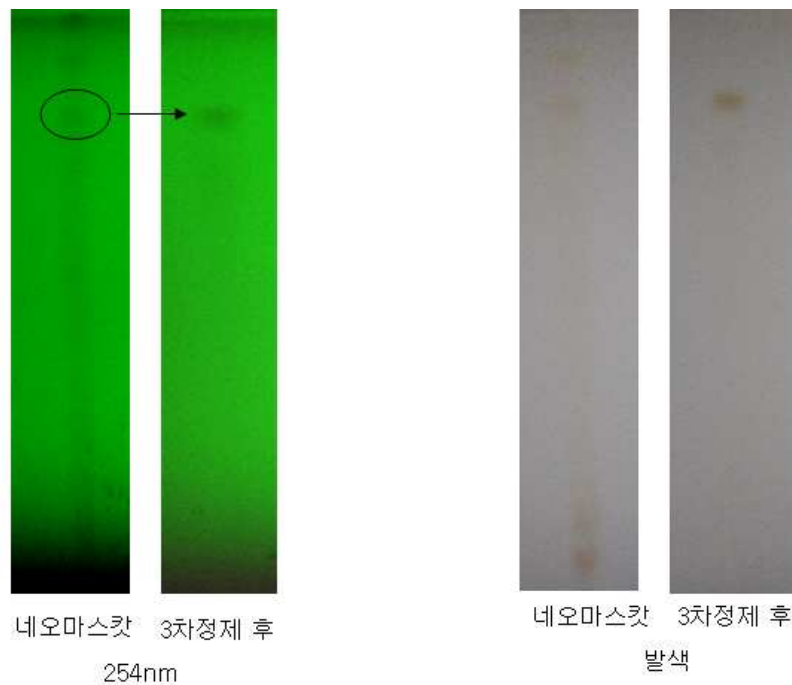


Fig. 27. TLC analysis of neo muscat extract and compound 1.

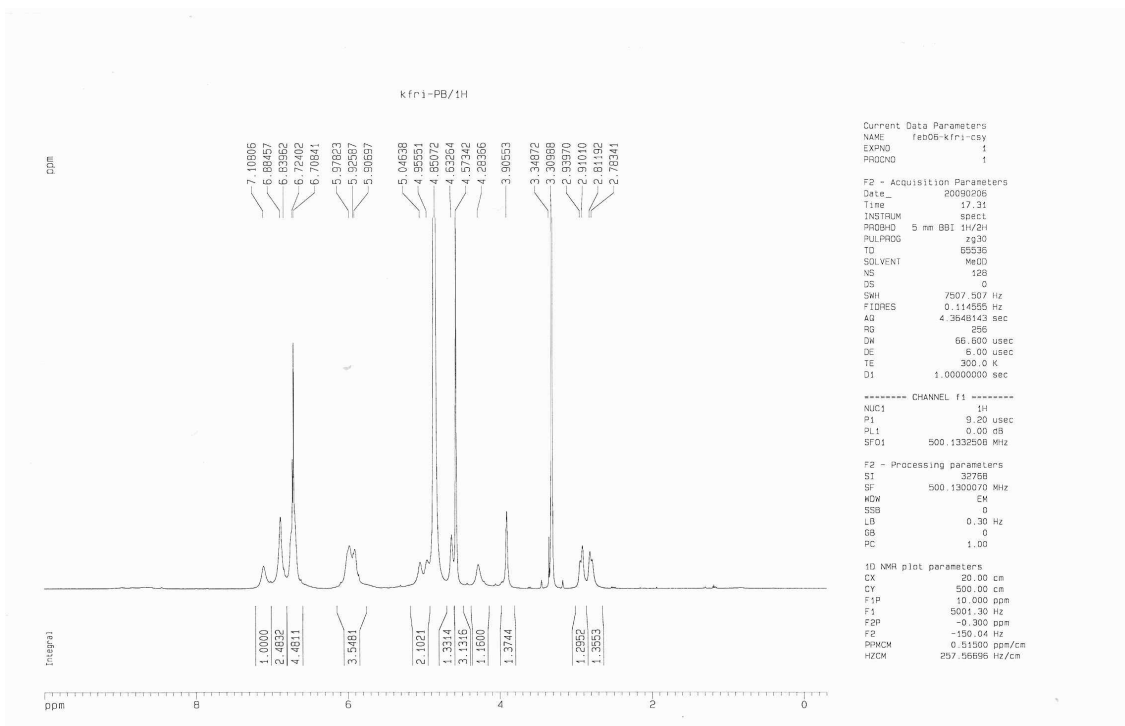


Fig. 28. ^1H -NMR of compound 1 (500 MHz, CD_3OD)

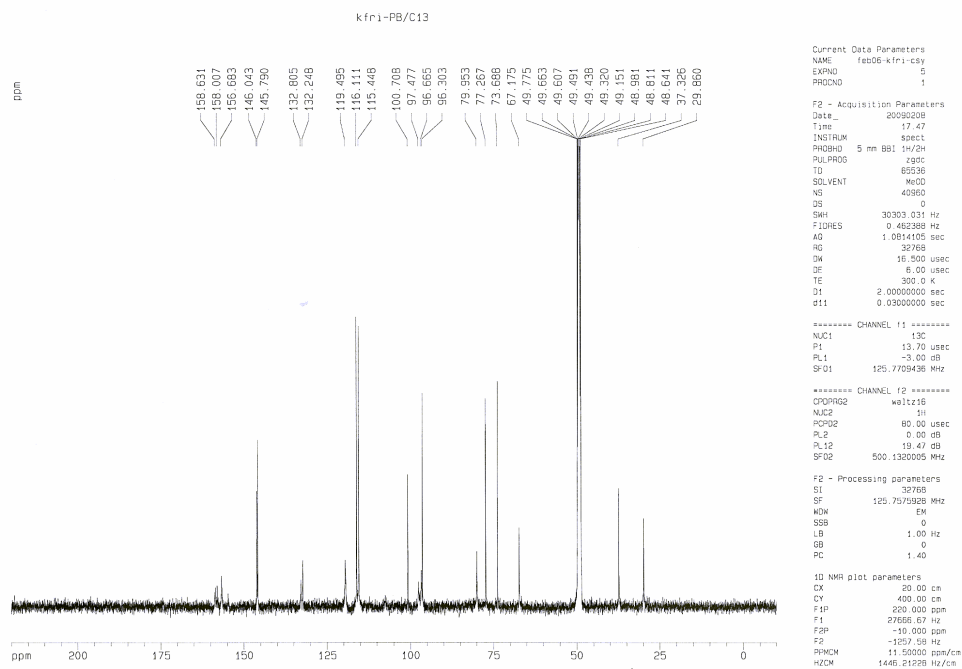


Fig. 29. ^{13}C -NMR of compound 1 (125 MHz, CD_3OD)

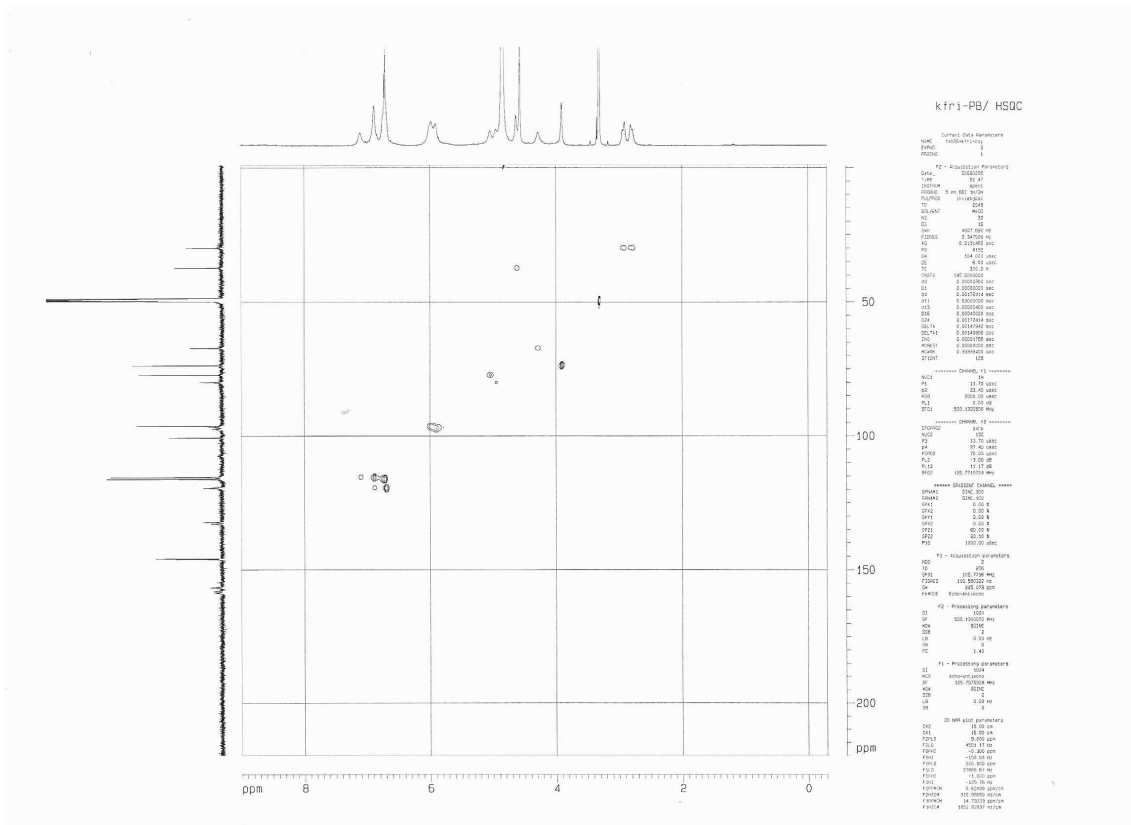


Fig. 30. HMQC analysis of compound 1

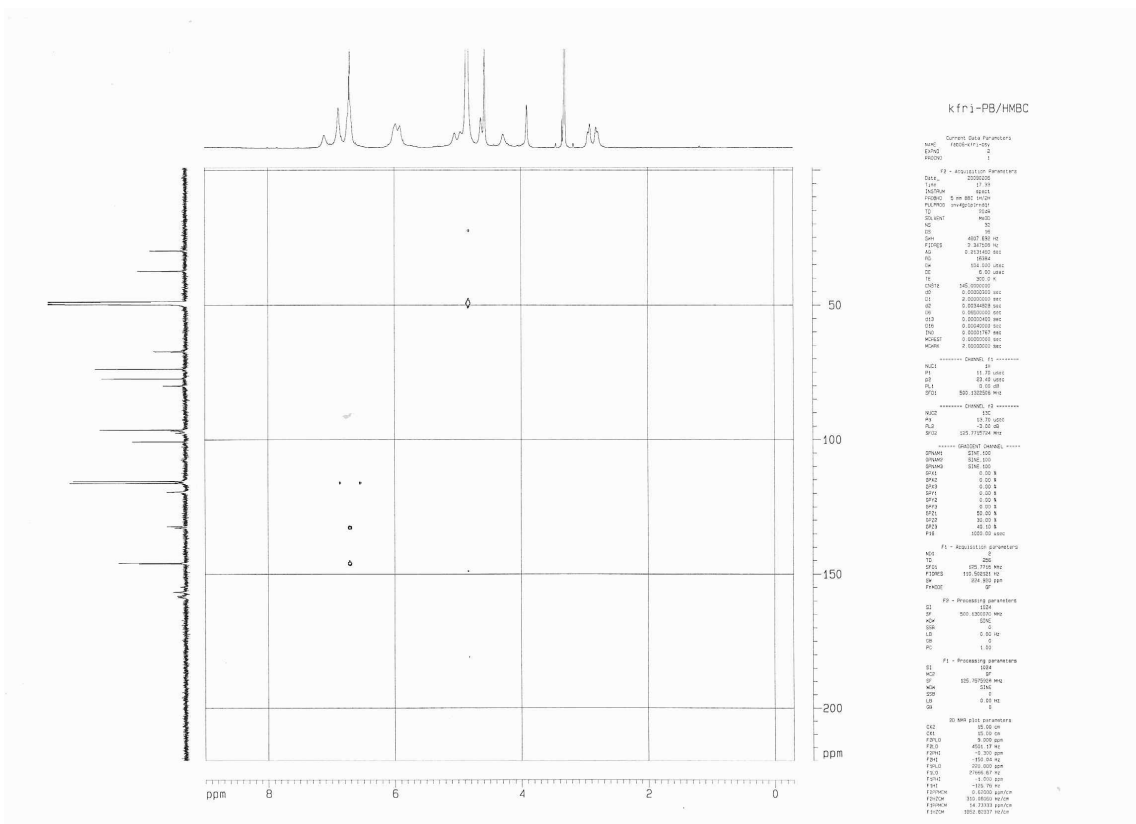


Fig. 31. HMBC analysis of compound 1

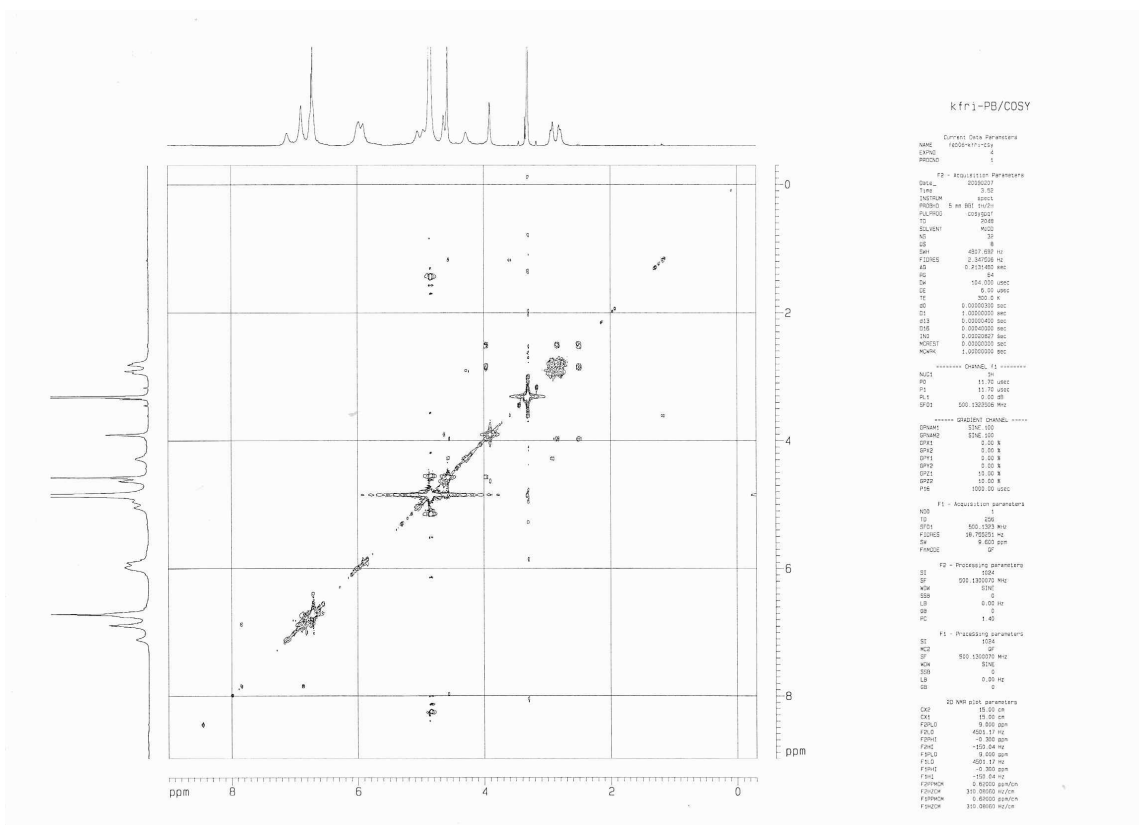


Fig. 32. COSY analysis of compound 1

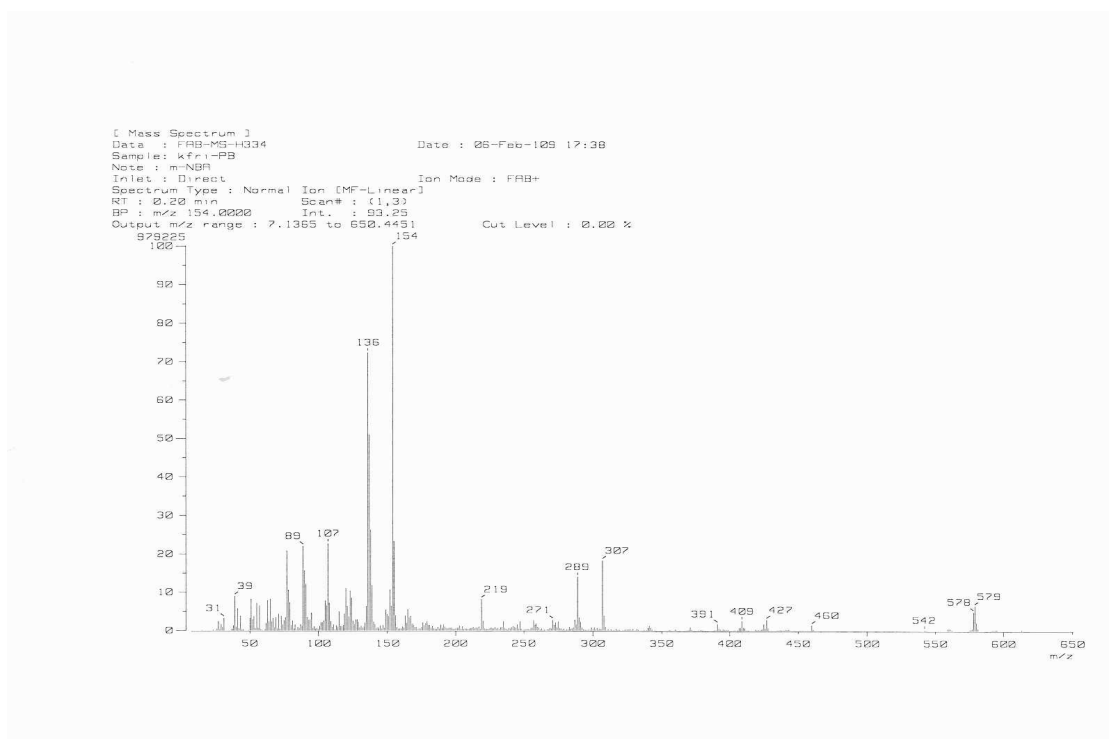


Fig. 33. FAB-mass analysis of compound 1 (positive)

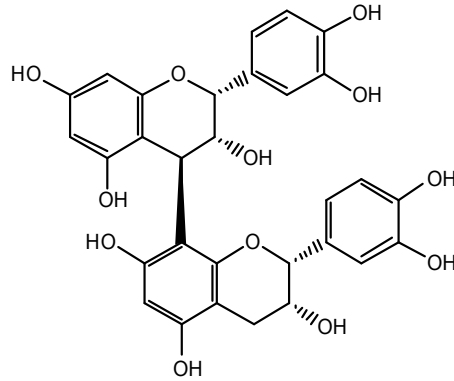


Fig. 34. Chemical structure of compound 1

8. 분리성분의 멜라닌 억제활성 검증

네오마스캇 포도덩굴로부터 분리, 동정 되어진 procyanidin B2 의 멜라닌 생성억제활성을 검증하기 위하여 mushroom 유래 및 동물세포유래 tyrosinase 억제활성, 자외선 차단도, 멜라닌 생성세포에서의 세포생존율 및 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 측정한 결과 procyanidin B2는 20 ppm에서 mushroom 유래 tyrosinase 활성을 25.3% 억제시켰으며 멜라닌 생성세포 유래 tyrosinase 활성은 17.9% 억제하였다(Fig. 35, 36). 이는 활성기준물질인 kojic acid의 활성보다 낮지만 농도의존적으로 tyrosinase 활성을 제해함을 확인할 수 있었다. 멜라닌 생성세포로부터 tyrosinase 를 추출하는 방법은 melan-a 세포를 가득 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 lysis buffer (67 mM sodium phosphate buffer, 1% Triton X-100, 0.1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride)를 첨가하였다. 세포를 수집하여 ultra sonication 하였고 이를 1 시간 동안 방치한 후 12,500 rpm에서 20 분간 원심분리 하여 얻어진 상층액을 단백질 정량하여 효소용액으로 사용하였다.

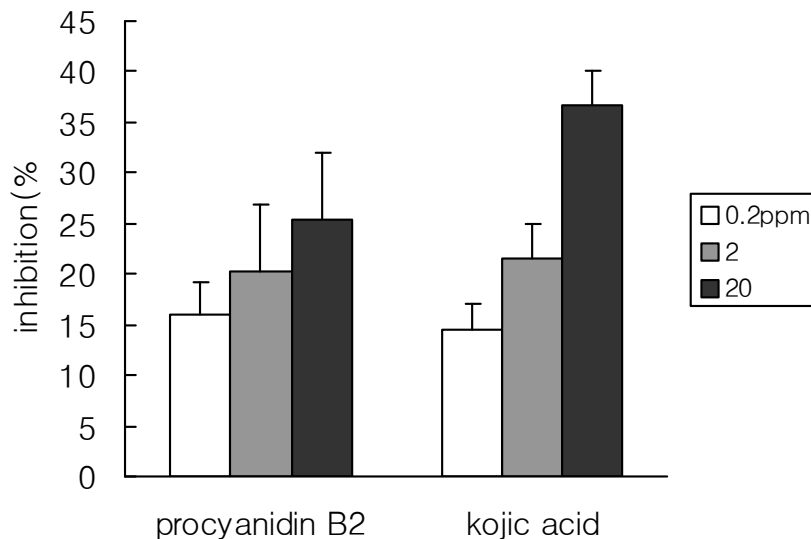


Fig. 35. Inhibitory effects of procyanidin B2 on mushroom tyrosinase

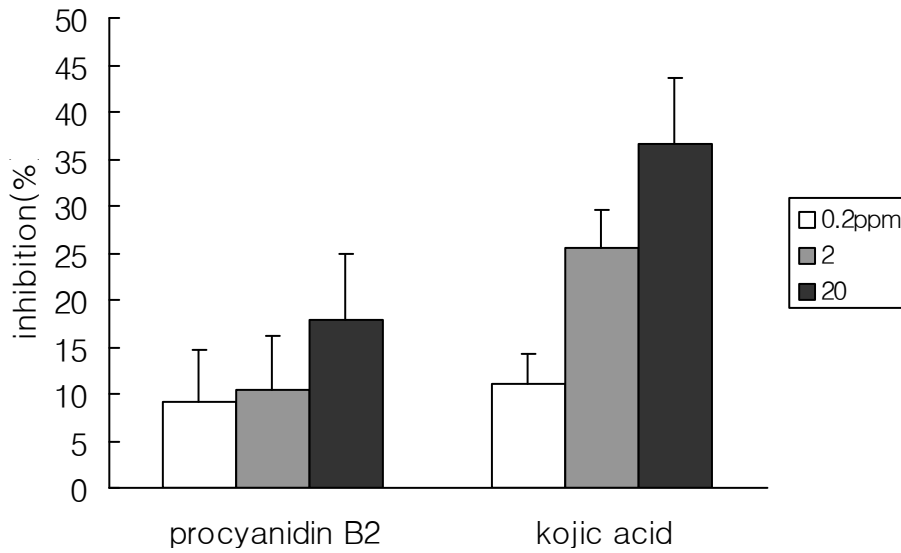


Fig. 36. Inhibitory effects of procyanidin B2 on melan-a cell extracted tyrosinase

Procyanidin B2 가 멜라닌 생성세포의 생존율 및 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 측정하기 위해 100 mm culture dish에 약 5×10^5 개의 melan-a 세포가 포함된 세포현탁액을 seeding한 후 10% FBS, 1% PS 200 nm TPA가 함유된 RPMI 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양시켰다. 다시 24 well plate에 10⁵ cells/well의 농도로 배양된 세포를 접종하고 well당 990 μl의 배지를 매일 갈아주면서 각각의 농도로 70% 에탄올에 녹인 procyanidin B2 용액 10 ul 를 3 일간 처리한 후 세포생존율 및 멜라닌 생성량을 측정하였다. 세포생존율은 배지제거 후 PBS로 washing하고 crystal violet (crystal violet 0.1%, 10% EtOH, 나머지 PBS)를 200 μl 첨가하고 5 분간 상온에서 배양하여 살아있는 세포를 염색하였다. 이를 세척 후 EtOH 1 ml를 첨가하여 상온에서 10 분간 shaking한 후 590 nm에서 UV 흡수도를 측정하여 세포생존율을 결정하였다. 또한 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배지 제거 후 PBS로 washing하고 1 N NaOH를 가하여 멜라닌을 녹인 후 400 nm 에서 UV 흡수도를 측정하였다.

Procyanidin B2를 3 일간 melan-a 세포에 처리한 후의 측정결과 100 ppm 농도에서 8.3%의 세포사멸만을 보이면서 38.9%의 멜라닌 생성량을 감소시켜 30.6%의 세포생존율 대비 멜라닌 억제활성을 나타내었다. 한편 기준물질인 Kojic acid는 100 ppm 농도에서 4%의 세포생존율 대비 멜라닌 억제활성을 나타내어 Procyanidin B2의 활성이 월등히 높았다 (Fig. 37).

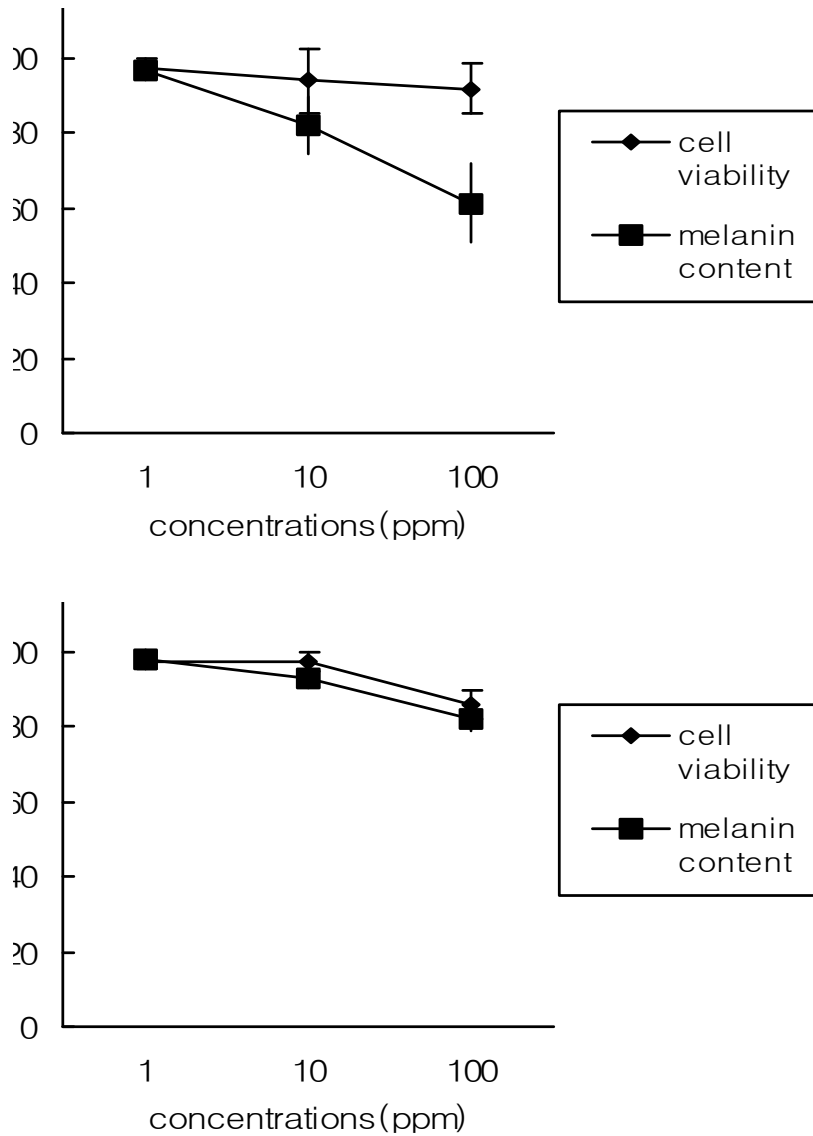
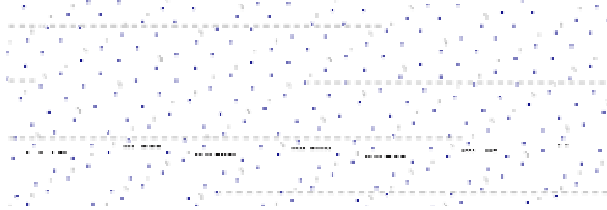
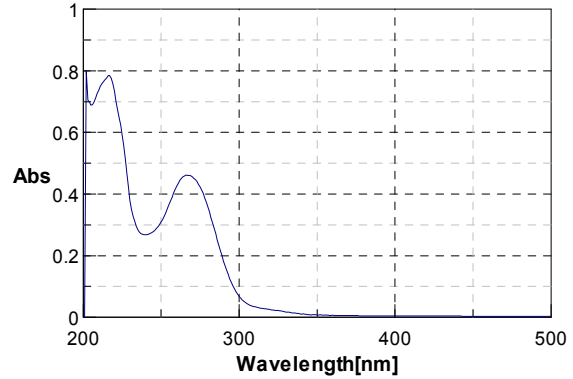


Fig. 37. Effects of procyanidin B2 on cell growth and melanin production in melan-a cells. After 3 days. Viability and melanin content of vehicle was set to 100%.

피부의 색소 과생성에 가장 주요한 원인인 자외선 영역 중 UV-A (350-370 nm) 는 파장이 길어 피부 진피층 까지 침투 할 수 있으며 즉시형 색소침착을 일으킨다. 반면 UV-B (270-290nm) 영역은 UV-A에 비해 파장이 짧아 피부 깊숙이 침투하지 않지만 에너지가 높아 일광화상을 유발시키며 노출 후 72 시간 이후부터 색소침착이 나타나는 지연형 색소침착을 일으킨다. Procyanidin B2를 메탄올에 녹여 200-500 nm 영역의 흡수도를 측정한 결과 비록 kojic acid에 비하여 낮지만 자외선 B 영역에서의 흡수를 나타내어 피부에 도포시 UV-B 영역의 자외선을 차단하여 일광화상 및 지연형 색소침착을 막는 효과를 기대할 수 있는 것으로 판단된다 (Fig. 38).



Procyanidin B2 (10 ppm)

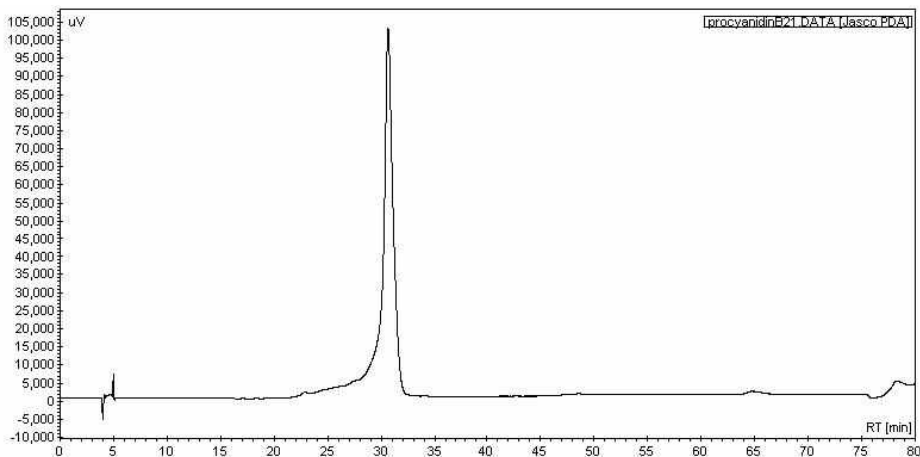


Kojic acid (10 ppm)

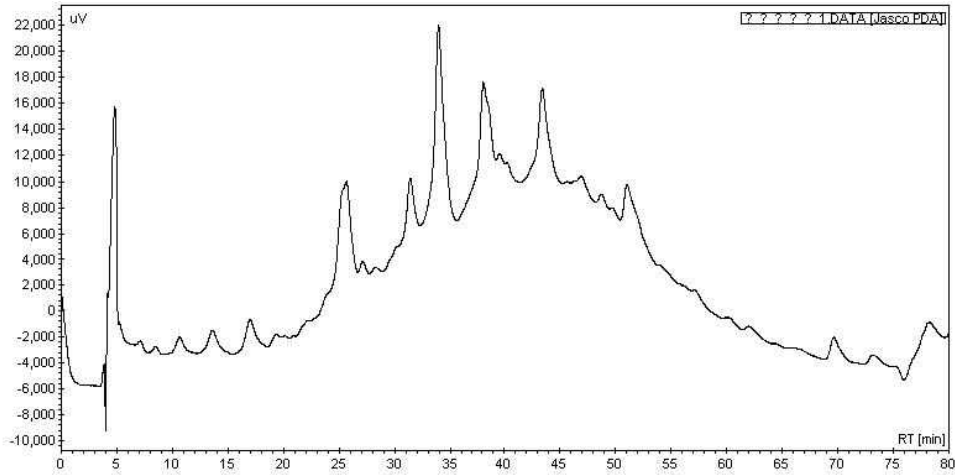
Fig. 38. Absorption abilities of procyanidin B2 at UV-A (350-370 nm) and UV-B (270-290 nm) region

9. 활성성분 함량정량

네오마스캇 포도덩굴내 procyanidin B2 함량을 HPLC를 이용하여 정량하였다. HPLC는 Jasco Co. (Japan) 의 분석용 liquid chromatography를 사용하였고 Bondpack C18 (4 um, 300 × 3.9 mm) Column 을 이용하여 이동상은 2% acetic acid가 함유된 water(용매A) 와 0.5% acetic acid 가 함유된 50% acetonitrile(용매B)를 초기 용매A 100%에서 70 분 후 용매A 55%로 gradient를 주어 0.8 ml/min의 속도로 용출하였다. Column의 온도는 40°C로 유지 하였으며 시료의 검출은 280 nm에서 측정하였다. 시료액은 완전 농축된 네오마스캇 포도 덩굴 추출물을 10 mg/ml로 메탄올에 녹인 후 0.45 um syringe filter (Millipore)로 여과하여 제조하였고 Procyanidin B2 는 메탄올에 녹여 사용하였다. 분석결과 Procyanidin B2 는 30.6 분에 검출되었고 정량결과 네오마스캇 포도덩굴 추출물은 0.201%의 procyanidin B2를 함유하고 있었다.



Procyanidin B2 (500 ppm)



네오마스카트 덩굴 추출물 (10 mg/ml)

Fig. 39. HPLC chromatogram of neo muscat vine extracts.

Table 5. Procyanidin B2 content in neo muscat vine extract.

네오마스카트 덩굴 추출물	procyanidin B2 함유량	procyanidin B2 함량
10 mg	20.1 ug	0.201%

제 4 절. 분자수준에서 미백 활성 기전 규명 (제 2세부)

1. α -MSH 로 자극한 B-16 세포에서 시료의 melanin 생성 억제

B-16 cell은 mouse 유래 melanocyte 로서 외부 자극에 의해 Tyrosinase의 발현이 늘어나며 따라서 melanin 합성을 증가 시킨다. 본 실험에서는 α -MSH로 자극한 B-16 cell에 포도 부산물 시료 (캠벨, MBA, 청포도의 껍질, 씨, 덩굴)와 Procyanidin B2를 처리하여 α -MSH에 의해 늘어난 melanin 합성 저해 정도를 측정하여 미백 화장품의 원료로 개발 가능성이 있는 시료를 선발 하고자 하였다.

가. Cell culture and sample treatment

B-16 cell은 DMEM 배지에서 10% FBS와 1% antibiotics에서 배양하였다. 배양조건은 37°C 에서 5% CO₂ 조건이었다. cell이 confluent 하게 자라게 되면 24 well plate에 1 x 10⁵ cell/well 농도로 분주하였다. 24시간동안 안정화 시킨 후에 α -MSH 와 sample을 처리하였다. sample은 한국식품연구원에서 제조한 sample을 분양받아 사용하였다. α -MSH는 최종 농도가 10 -100 nM이 되도록 하였으며 sample은 최종농도가 포도추출물 (1, 50, 100 μ g/ml), Procyanidin B1 (1, 5, 10, 20 μ M) 및 B2 (1, 5, 10, 20, 50 μ M)가 되도록 하였다. sample은 stock solution 농도

가 20 mg/ml (10% DMSO)이었으며 cell에 처리할 때 DMSO는 최대농도가 0.05% 였다. DMSO 0.05 %는 cell viability와 Melanin 생성에 아무런 영향을 주지 않았다. 3 일간 cell을 방치하였으며 처리 후 3 일간 매일 α -MSH와 sample을 새로 처리 하였다.

나. Cell viability and Melanin measurement

Cell viability는 MTT assay 방법을 이용하였으며, melanin 생성은 배지 제거 후에 PBS로 washing 하여준 후에 1 N NaOH 1 ml를 가하여서 melanin을 녹인 후에 400 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

Sample의 Melanin 생성 억제가 Sample의 독성으로 인한 것인지 알아보기 위해 cell viability와 melanin 생성 억제 정도를 Table 6 에 같이 표시 하였다. 씨에서는 MBA 품종이 껍질에서는 캬멜이 세포 생존율 대비 melanin 생성 억제 효과가 좋은 것으로 나타났다 (Fig. 40-42). 3종의 껍질에서는 세포 독성을 보이지 않았으며 Melanin 생성 억제 또한 보이지 않았다. 3종의 씨에서는 캬멜, 청포도 품종이 100 μ g/ml에서 독성을 보여 원료로서 적당치 않다고 보인다. 캬멜과 청포도 씨 sample은 50 μ g/ml에서 각각 control 대비 $48.80 \pm 9.30\%$ 와 $39.65 \pm 10.93\%$ 의 세포 생존율을 보여 높은 독성을 보였으나 MBA 씨 sample은 control 대비 90.43 ± 11.27 의 세포 생존율을 보이면서 Melanin 생성을 50% 가까이 줄이는 효과를 보여 약간의 세포 독성을 보이는 하나 세포 독성을 통한 melanin 생성 억제 라기 보다 다른 mechanism 으로 melanin 생성을 억제하는 것으로 생각되어 melanin 생성 억제 신호 mechanism을 연구하기 위한 sample로 결정하였다. 3종의 sample 중 덩굴은 MBA를 제외한 캬멜과 청포도 덩굴에서 melanin 생성을 억제하는 결과를 볼 수 있었다. 캬멜과 청포도의 덩굴 sample은 10 과 50 μ g/ml 농도에서는 세포 독성과 melanin 생성 억제 효과 모두를 볼 수 없었으나 100 μ g/ml에서 캬멜 sample은 96.23 ± 12.15 % 의 생존율과 control 대비 melanin 생성 $51.21 \pm 16.26\%$ 를 보였고 청포도 sample은 $93.62 \pm 10.29\%$ 생존율에 control 대비 melanin 생성 $60.84 \pm 4.16\%$ 를 보였다. 이는 캬멜과 청포도 덩굴이 미백 화장품 원료로서 가능성을 가지고 있다고 본다. 캬멜 및 청포도 덩굴 sample을 melanin 생성 억제 mechanism 연구의 후보로 선택하였다. 껍질에 있어서는 캬멜, MBA, 청포도 sample 모두 melanin 생성 억제 효과를 확인할 수 없었으나 씨에서는 MBA 품종이 덩굴에서는 청포도와 캬멜 품종이 미백과 관련되어 주요한 연구 대상이 될 것이다. Procyanidin B1의 경우 해당 농도까지 멜라닌 생성 억제 및 cell viability에 미치는 영향이 미비 하였다. Procyanidin B2의 경우 20 μ M에서 약간의 melanin 억제 효과를 보여 그 농도를 50 μ M까지 처리했을 때 눈에 띄게 melanin 생성함을 보였다. 다만 해당 농도에서 procyanidin B2가 cell의 생존에 약간 영향을 주는 것으로 보였으나 이는 cell 생존에 영향을 주어 melanin 생성을 억제 했다고 보다 procyanidin B2 자체의 melanin 생성 억제 효과로 판단 하였다 (Fig. 43).

Table 6. 포도시료의 α -MSH 로 자극한 B-16 세포에서의 cell viability와 melanin 생성 억제 효과

sample		Concentration (ug/ml)	Melanin contents (% of control)	Cell viability (% of control)
Skin	캠벨	10	90.23 ± 1.57	102.95 ± 2.77
		50	100.16 ± 2.23	99.88 ± 4.14
		100	103.74 ± 0.61	92.23 ± 3.33
	MBA	10	96.86 ± 1.76	102.38 ± 1.06
		50	99.09 ± 0.71	103.13 ± 2.60
		100	102.87 ± 2.72	101.24 ± 1.57
	청포도	10	95.20 ± 1.90	97.95 ± 4.38
		50	95.92 ± 2.59	97.61 ± 4.23
		100	100.66 ± 1.94	98.18 ± 6.88
Seed	캠벨	10	93.57 ± 2.54	98.19 ± 6.20
		50	15.45 ± 8.16	48.80 ± 9.30
		100	18.75 ± 3.06	22.97 ± 3.92
	MBA	10	98.79 ± 2.41	100.93 ± 2.23
		50	51.62 ± 20.47	90.43 ± 11.27
		100	32.17 ± 15.91	62.26 ± 15.47
	청포도	10	79.48 ± 5.91	100.86 ± 0.96
		50	9.38 ± 3.99	39.65 ± 10.93
		100	2.54 ± 0.83	15.41 ± 0.07
Vine	캠벨	10	112.64 ± 4.99	105.67 ± 5.70
		50	119.18 ± 4.29	103.92 ± 2.87
		100	51.21 ± 16.26	96.23 ± 12.15
	MBA	10	105.89 ± 3.40	102.64 ± 1.07
		50	108.31 ± 7.80	100.58 ± 5.14
		100	81.86 ± 24.60	91.45 ± 15.85
	청포도	10	101.09 ± 3.87	104.89 ± 6.80
		50	93.64 ± 5.53	105.28 ± 7.98
		100	60.84 ± 4.16	93.62 ± 10.29

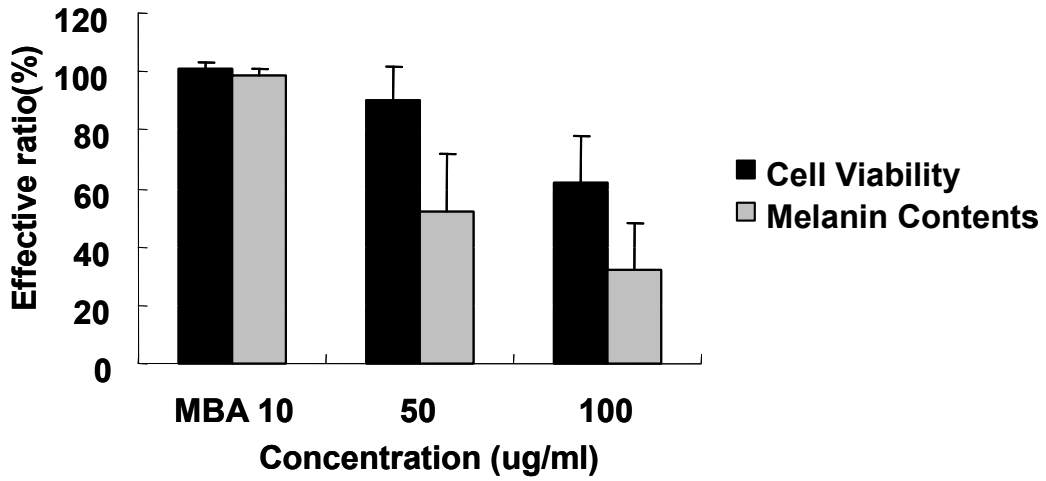


Fig. 40. MBA 씨 sample의 농도별 세포 생존율 및 melanin 생성 억제

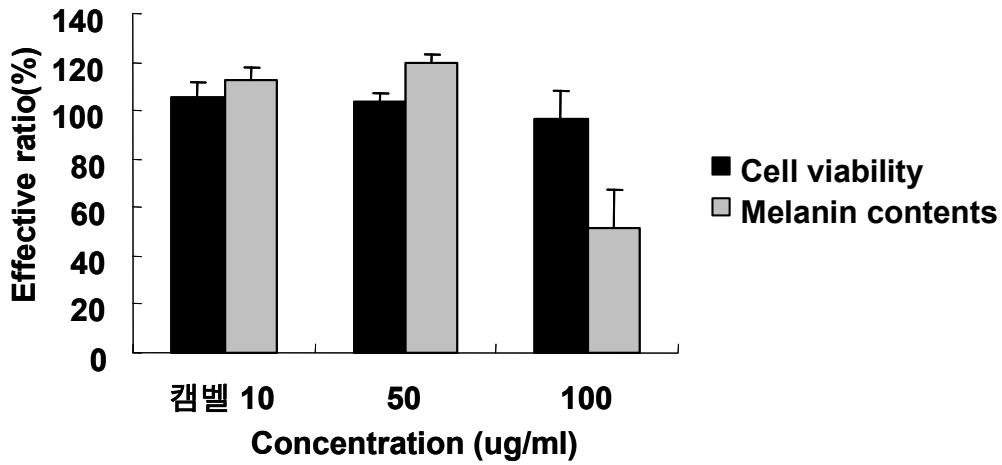


Fig. 41. 캠펬 덩굴 sample의 농도별 세포 생존율 및 melanin 생성 억제

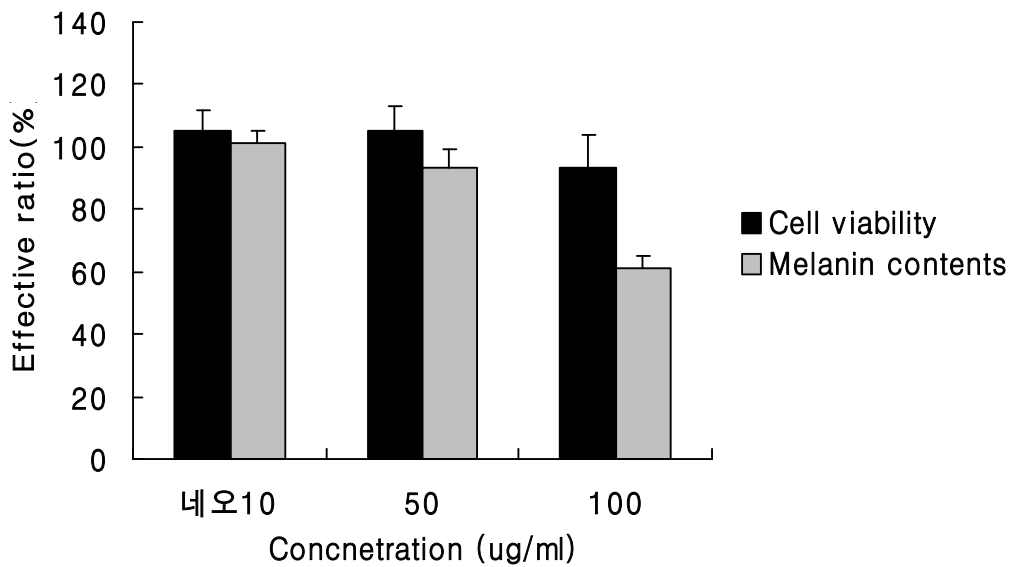


Fig. 42. 청포도 덩굴 sample의 농도별 세포 생존율 및 melanin 생성 억제

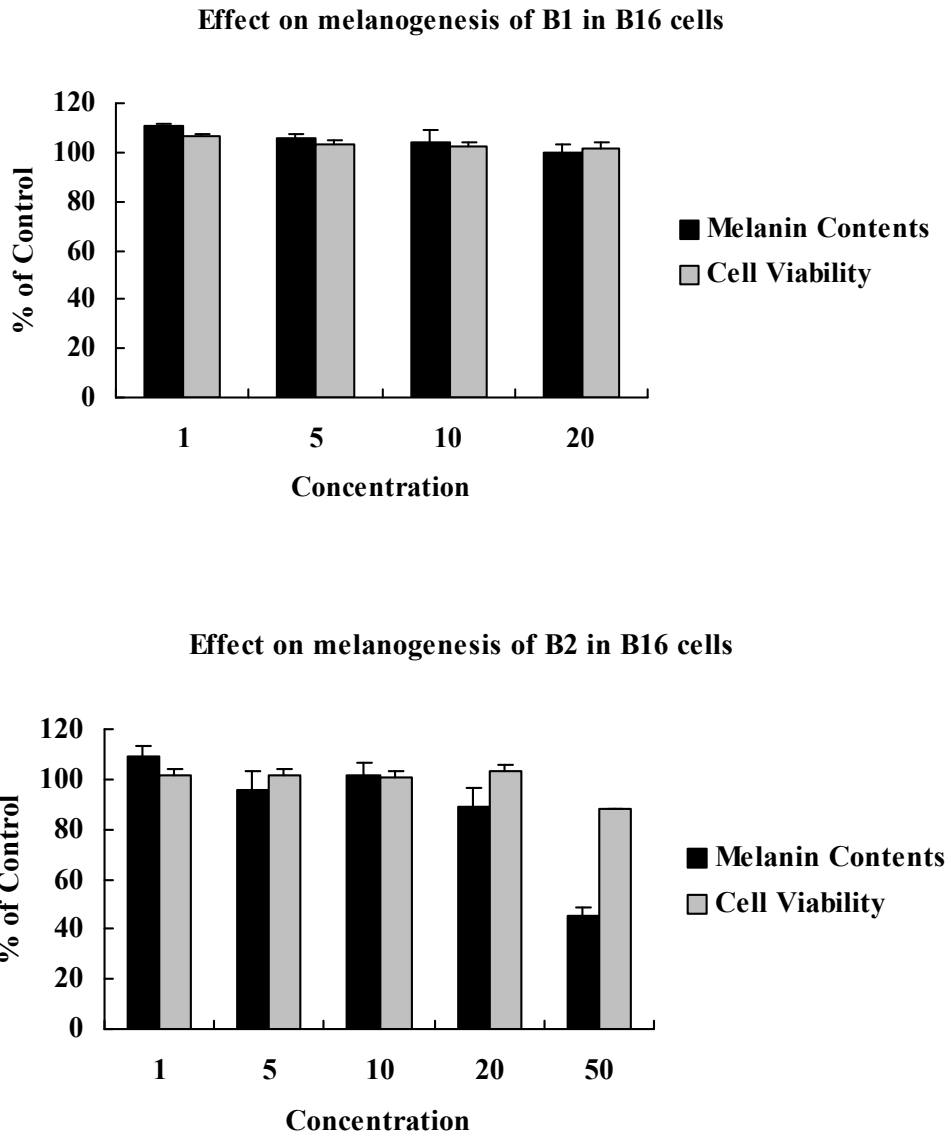


Fig. 43. Procyanidin B1, B2의 α -MSH 로 자극한 B-16 세포에서의 cell viability와 melanin 생성 억제 효과

2. 포도 부산물 시료의 melanin 생성 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

melanin 생성 억제와 관련된 단백질의 발현 정도를 관찰하기 위해 western blotting 실험을 실시하였다.

가. Cell culture and Sample treatment

Cell 배양 조건은 1. 가. 와 같다. western blotting에 사용할 protein을 얻기 위해 cell을 100 cm^2 culture dish에서 배양하였고 α -MSH (10 -100 nM)과 MBA 씨 추출물 (10, 25, 50 μ

g/ml), 네오마스캇 덩굴 추출물 (10, 50 µg/ml), procyanidin B2 (20, 50 µM) 처리하였다. DMSO 조건은 1. 가. 와 같다. 100 µg/ml 농도는 세포 독성이 강하여 본 실험에서는 제외하였다. sample 처리 조건은 두 가지로 나누어서 실시하였다. 먼저 α-MSH와 sample 처리 후 3일간 매일 α-MSH와 sample을 새로 처리한 군 (Fig. 44) 과 처리 후 다음날 하루만 α-MSH와 sample을 갈아 주고 나머지 이틀은 방치한 군 (Fig. 45)으로 나누어 western blotting을 실시하였다.

나. Western blotting

배지를 걷어 낸 후에 PBS로 washing 해준 후에 Trypsin을 처리하여 세포를 걷어내었다. 원심분리로 세포를 모은 후에 2차례 PBS로 washing을 하였다. Lysis buffer를 넣고 30분간 ice에서 방치 한 후에 13,000 rpm에서 원심분리 한 후 상층액을 걷어 내어 단백질 시료로 사용하였다. 정량을 통해 각 샘플 처리군 80 µg의 단백질을 10% polyacrylamide gel에 전기영동하였다. nitrocellulose 막에 blotting 시킨 후에 5% skim milk로 blocking 해주었다. primary antibody 와 함께 배양한 후에 secondary antibody에 배양하고 ECL kit를 이용하여 band를 확인하였다.

처리 조건을 달리 해 주어도 결과에는 크게 영향을 주지 않음을 확인하였다. Fig. 44 과 Fig. 45에서 보여지듯 α-MSH 처리 후 Tyrosinase의 발현량은 증가 하였고 MBA 씨 sample을 처리 후 농도의존적으로 Tyrosinase 발현량이 감소함을 확인하였다. Fig. 44에서 MITF의 발현량은 농도에 의존적으로 발현량이 줄지 않았는데 특히 α-MSH 만 처리 후에도 늘지 않음을 확인 하였다. 이는 기존 논문의 결과와 다른 것으로 다시 확인해야 할 western 결과이다. 재미있는 결과는 Fig. 44과 Fig. 45에서 확인 하듯이 Trp 1의 단백질 발현량이 늘었다는 점이다. Trp 2의 발현량 증가는 다시 확인하여야 하나 Trp 1 단백질의 발현량은 눈에 띄게 늘어는데 이 점도 기존의 α-MSH 처리 시 Trp 1, 2 단백질이 늘어난다는 결과에서 벗어난다는 점에서 눈에 띈다. 또한 네오마스캇 덩굴 추출물 및 Procyanidin 처리 시 농도 의존적으로 Tyrosinase 발현량이 감소하는 것으로 생각된다. Procyanidin B₂를 대상으로 TRP-1, TRP-2, MITF 의 발현량을 western blotting을 통해 확인하였다 (Fig. 46, 47). Fig. 47에서 MITF의 발현량은 농도에 의존적으로 발현량이 줄지 않았으며 포도씨에서의 결과와 다르게 Trp 1의 단백질 발현량은 변화가 없었으나 Trp 2의 발현량은 줄어드는 결과가 관찰되었다.

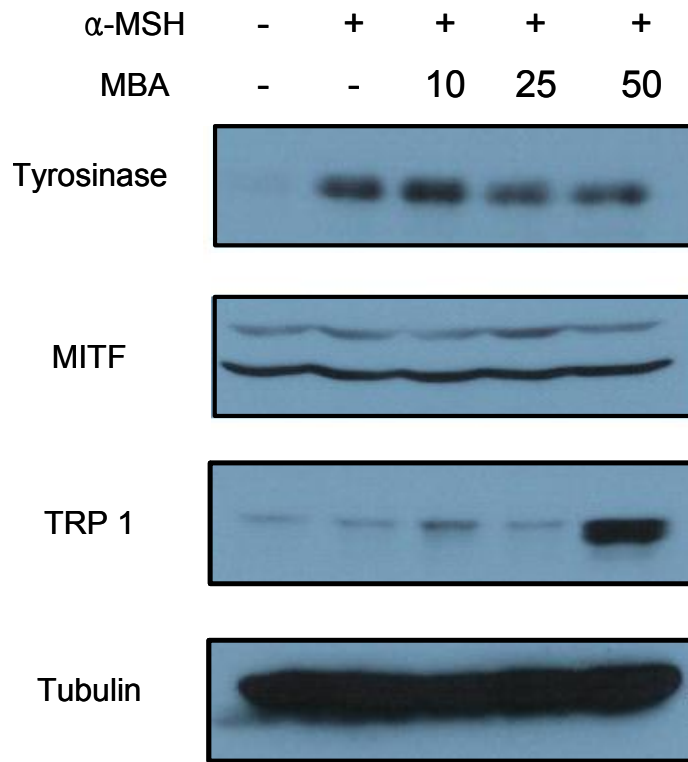


Fig. 44. α -MSH (10 nM)과 MBA 씨 sample (10, 25, 50 μ g/ml) 처리 후 3 일 간 매일 배지를 갈아 준 실험에서 Tyrosinase, MITF, TRP 1, Tubulin 단백질의 발현을 western blotting을 통해 확인 하였다. Tyrosinase의 발현은 sample의 농도 의존적으로 줄어드는 것을 확인하였고 TRP 1 단백질은 50 μ g/ml에서 확연하게 그 단백질 발현량이 증가하였다.

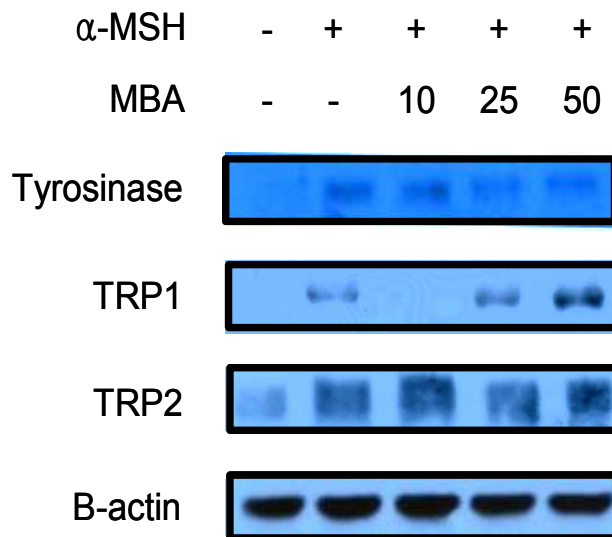


Fig. 45. α -MSH (10 nM)과 MBA 씨 sample (10, 25, 50 μ g/ml) 처리 후 다음날 하루 만 배지

를 갈아주고 나머지 일 수는 방치한 실험에서 Tyrosinase, TRP 1, 2, β -actin 단백질의 발현을 western blotting을 통해 확인 하였다. Tyrosinase의 발현은 sample의 농도 의존적으로 줄어드는 것을 확인 하였으며 TRP 1 단백질은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 확연하게 그 단백질 발현량이 증가하였다.

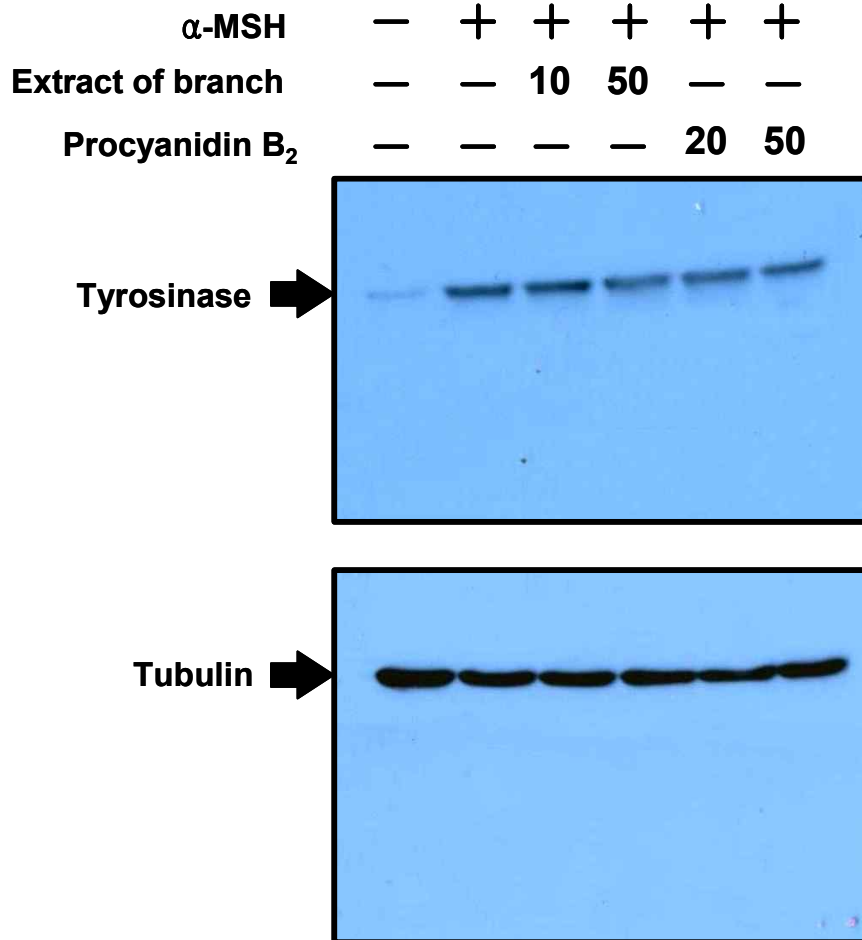


Fig. 46. α -MSH (100 nM)과 네오마스캇 덩굴 추출물 (10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Procyanidin B₂ (20, 50 μM) 처리 후 3일 간 매일 배지를 갈아 준 실험에서 Tyrosinase 단백질의 발현을 western blotting을 통해 확인 하였다. Tyrosinase의 발현은 sample의 농도 의존적으로 줄어드는 것으로 판단된다.

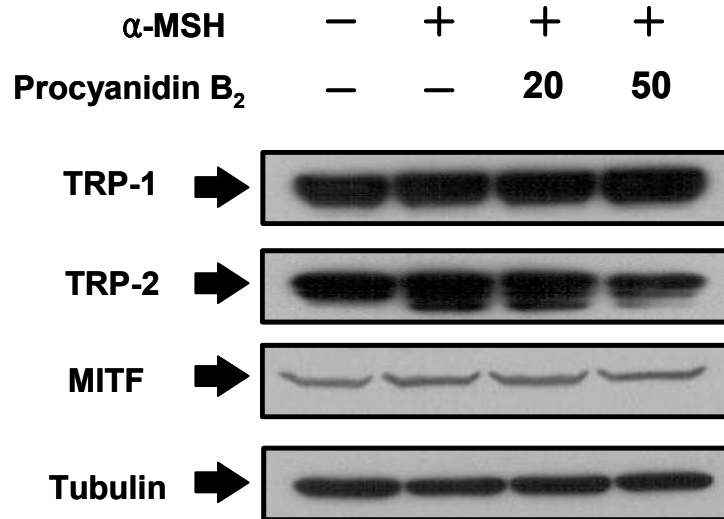


Fig. 47. α -MSH (100 nM)과 Procyanidin B₂ (20, 50 μ M) 처리 후 3일 간 매일 배지를 갈아 준 실험에서 Trp-1, Trp-2, MITF 단백질의 발현을 western blotting을 통해 확인 하였다.

B-16 cell에서 α -MSH 처리 후 Tyrosinase 발현량이 증가하는 signal pathway는 그림-5 와 같이 정리 될 수 있다. α -MSH의 처리는 세포내에서 cAMP 량의 증가를 가져오며 이는 CREB의 인산화를 증가시켜 MITF의 발현량을 증가 시키고 다시 MITF는 전사인자로서 Tyrosinase, TRP1, 2의 발현량을 증가시킨다. 이는 melanin의 생성량을 증가 시킨다. 이와 별도로 α -MSH는 ERK을 활성화 시키는 pathway를 통해 MITF의 분해를 가속시키기도 하는데 이는 세포에서 melanin 생성량을 조절하는 하나의 mechanism으로 이해되고 있다. 이 둘 모두는 MITF의 발현량과 관련된 pathway이며 MITF의 DNA binding affinity를 조절하여 Tyrosinase 발현량을 조절하는 과정이 밝혀졌다. α -MSH가 PI3Kinase의 Akt 인산화를 저해 함으로서 연속적으로 GSK3 β 의 인산화를 저해하고 탈인산화된 GSK3 β 가 MITF를 인산화 시킴으로서 tyrosinase의 M-box binding affinity를 증강시켜 Tyrosinase 단백질 발현을 늘리는 과정이다. MBA 씨 추출물, 네오마스캇 덩굴 추출물이나 Procyanidin B₂ 모두의 경우 Tyrosinase 발현량은 억제함을 볼 수 있었으나 MITF 발현량에는 아무런 영향을 주지 못하였다. 배양조건 및 세포의 상태에 따라 α -MSH에 의한 MITF 발현이 달라 질 수 있겠으나 MITF의 발현에 변화 없이 Tyrosinase 발현이 sample에 의해 줄었다는 것은 sample이 CREB의 인산화 및 Erk의 활성화 보다 PI3K의 활성화에 관련 할 수 있다는 것을 의미한다. 즉 α -MSH에 의한 PI3K 저해효과를 PI3K 활성화를 통해 상쇄시키는 pathway를 생각해 볼 수 있을 것이다. 이상의 결과는 MBA 씨 추출물, 네오마스캇 덩굴 추출물이나 Procyanidin B₂의 melanin 생성 억제 기전이 비슷하다는 의미이나 Procyanidin B₂는 포도씨의 경우와는 다르게 Trp-2의 발현은 줄어드는 것으로 관찰되어 다른 점도 있으리라 예상해 본다.

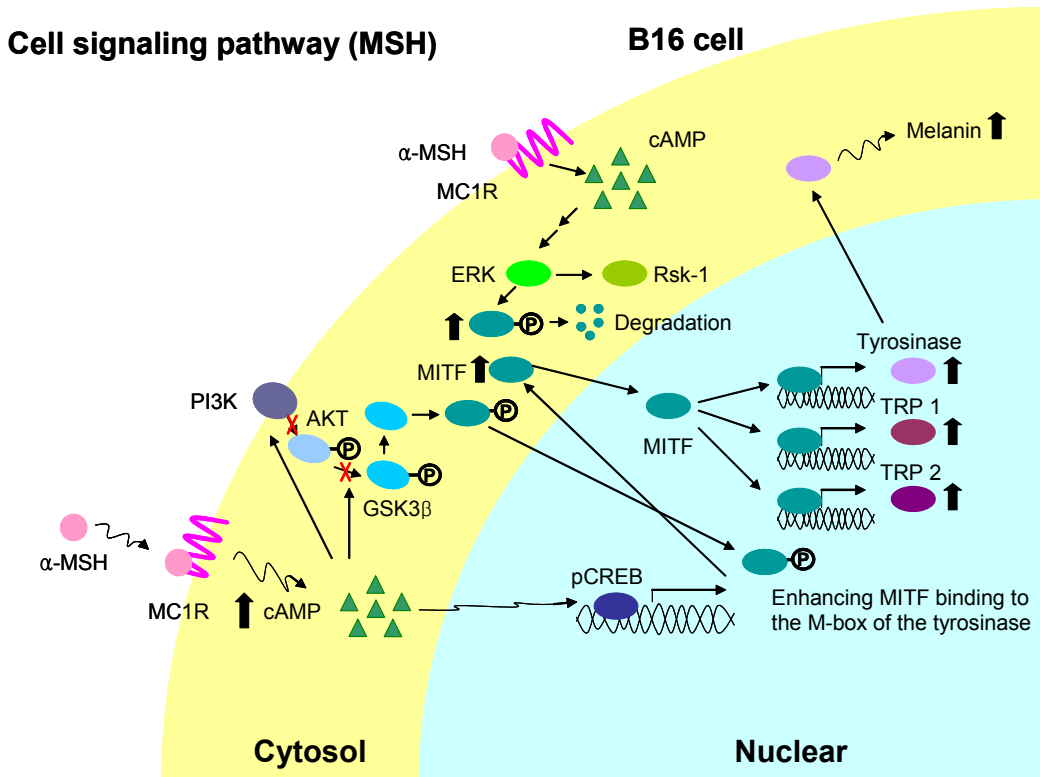


Figure 48. B-16 세포에 α -MSH 처리 후 Tyrosinase 증가 및 melanin 생성의 증가

제 5 절. Brown guinea pig 피부에서의 피부색소 억제활성측정 (제 1 세부)

1. 실험동물

500 g 내외의 brown guinea pig 암컷 3 마리를 중앙실험동물로부터 구입하여 항온항습이 유지되는 동물사육실에 충분한 양의 물과 사료, 양배추를 공급하면서 일주일간 적응시킨 후 사용하였다.

2. 피부 과색소침착 유도

Brown guinea pig 등 부분의 털을 제모 후 실험동물을 고정시키고 제모된 등 부분 피부에 sankyo denki (일본)사의 UV-B lamp (280-320 nm)를 이용하여 500 mJ의 UV-B 영역의 자외선을 조사하였고 이후 일주일 간격으로 제모 후 UV-B 조사를 총 2 회 추가 실시하여 피부흑화를 유도하였다 (Fig. 49).

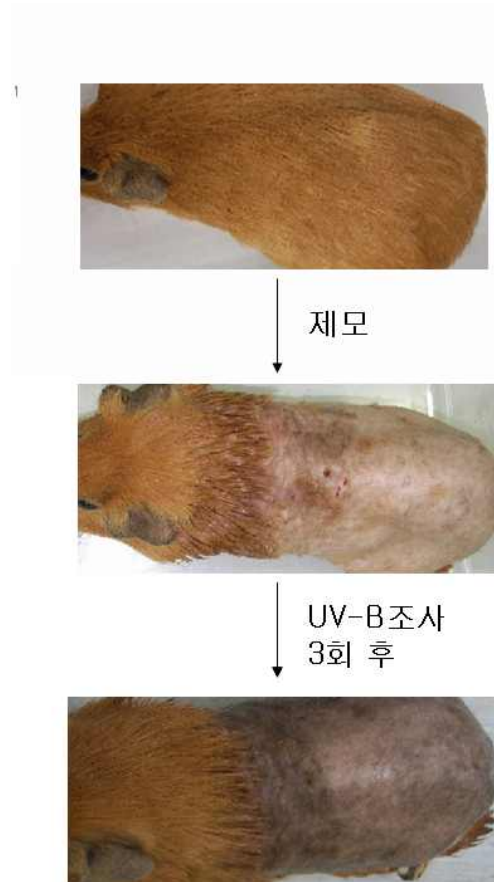


Fig. 49. UV-B induced hyperpigmentation in brown guinea pig skin

3. 피부색소억제효과 측정

마지막 자외선 조사 다음날부터 피부흑화가 유도된 등부분 피부를 2 cm² 크기로 각각 구역을 나누어 네오마스캇 덩굴 시료와 활성비교군으로의 kojic acid를 20 ul (2%, 1% 용액, 70% 에탄올에 녹임)를 피부세척 후 1 일 2 회 도포하였고 피부색의 변화 및 발적, 부종 등 이상반응 여부를 관찰하였다. 도포 8 주후의 피부색의 변화사진은 Fig. 50 과 같으며 CR-200 chromameter (Minolta co. Japan)로 측정한 L값의 변화량은 Fig. 51 에 나타내었다.



Fig. 50. Representative photographs showing the depigmenting effects of Neo Muscat vine extracts

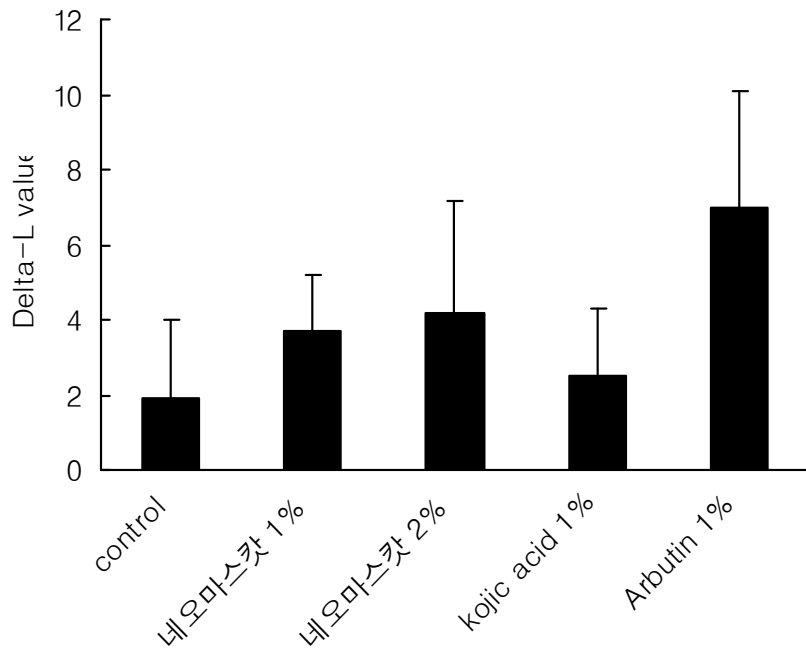


Fig. 51. Changes of L-value after 8 weeks applications of neo muscat vine extracts.

도포결과 네오마스캇 덩굴 추출물은 피부에 도포시 UV-B로 유도된 brown guinea pig 피부의 색소과침착을 농도의존적으로 완화시켰으며 모든 실험기간동안 홍반, 발적, 부종 등의 이상 징후는 관찰되지 않았다.

제 6 절. 원료의 동물독성시험 (GLP기준, 한국화학시험연구원 의뢰, 1,2,3세부)

원료의 화장품관련 동물에서의 안전성 테스트 6 항목 (단회투여독성, 안점막자극, 피부자극, 피부감작성, 광감작성)을 GLP 독성평가기관인 한국화학시험연구원에 의뢰하여 실시한 결과요약은 다음과 같다.

1. 시험물질 및 대조물질 (부형제)

가. 시험물질

시 험 물 질 명 : 네오마스캇 포도가지추출물 1% 용액

제 조 원 : 한국식품연구원

공 급 원 : 한국식품연구원

제 조 일 : 추출물- 2008년 08월 28일, 용액- 2008년 12월 12일

입 수 일 : 2008년 12월 17일

입 수 량 : 500 mL

외관 및 색상 : 연한 갈색용액

보관 유효 기간 : 용액제조일로부터 6개월 이내 권장

보관 조건 : 냉장(4℃)

특이사항 : 에탄올/증류수(80/20) 용매를 사용하여 추출 후 완전농축하여 추출물을 제조하였고, 이를 증류수에 1%(W/W, 10 mg/mL) 농도로 녹여 시험시료를 제조하였음.

2. 안전성 테스트

가 단회투여독성테스트

본 시험은 SD 랫드를 이용하여 네오마스캇 포도 가지 추출물 1% 용액을 단회 경구 투여 시 나타나는 독성 반응을 평가하기 위하여 실시하였다.

본 시험은 한국화학시험연구원의 실험동물의 사용과 관리에 관한 규정 (2006.12.1 동물윤리위원회 개정고시)를 준수하여 실시하였다.

(1) 시험물질의 투여 경로 및 방법

시험물질인 네오마스캇 포도 가지 추출물 1% 용액의 경구 투여 시 나타나는 독성증상을 알아보기 위하여 경구 경로를 선택하여 투여하고, 투여 전 날 절식 시킨 실험동물에 경구투여용 주사기(존데)를 이용하여 위내에 1회 강제 투여하였다.

(2) 관찰항목

- 일반증상 관찰

전 동물에 대하여 매일 1회 이상 증상관찰을 실시하였다. 단 투여 당일에는 투여 후 6시간까지는 매 시간마다 관찰하였다. 일반 증상관찰은 투여 후 14일까지 실시하였다.

- 체중측정

체중은 입수시, 균분리시, 시험물질투여 개시 직전, 투여 개시 후 7일과 14일째에 측정하였다.

- 부검시 육안적 소견

투여 후 14일째 모든 생존동물의 외관 검사를 실시한 다음 부검하여 육안적으로 장기를 검사하였다.

(3) 통계처리

본 시험에서는 체중데이터에 대한 분산의 동질성을 비교하기 위하여 SPSS 통계프로그램을 이용하여 F 검정을 실시하였고, 분산의 동질성이 인정되어 Student t test를 실시하였다.

(4) 결과요약

네오마스캇 포도 가지 추출물 1% 용액에 대한 단회 경구투여 독성시험을 의약품 등의 독성시험기준 (식품의약품안전청 고시 제 2005-60호)에 따라 SD 랫드를 사용하여 시험물질의 투여량을 2 000 mg/kg B.W. 로 설정하여 암·수 각각에 대해 1회 경구 투여 한 후 2주간 사망율, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과는 다음과 같다.

- 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.

- 일반증상 관찰결과 모든 시험물질 투여에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
- 생존동물에 대한 체중측정 결과 대조군과 시험군(투여군)간의 체중 증체량의 유의적인 차이는 인정되지 않았다
- 생존동물의 부검 소견 결과 모든 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 네오마스캇 포도 가지 추출물 1% 용액의 투여량을 2 000 mg/kg B.W.로 정하여 투여한 결과 사망동물 및 이상소견 관찰 동물이 없었으며, 체중증감 및 부검소견 결과에서도 특이할 만한 이상소견이 관찰되지 않아 네오마스캇 포도 가지 추출물 1% 용액에 대한 개략의 치사량은 암·수 모두 2 000 mg/kg B.W. 이상으로 사료된다.

Table. 7. Body weights

Group	Dose (mg/kg)	Sex	Day(s) after treatment			
			0	7	14	
G1	0	Male	Mean±S.D.	208.0±6.4	294.7±7.6	356.2±9.8
			N	5	5	5
		Female	Mean±S.D.	156.7±3.4	196.6±6.5	211.6±8.0
			N	5	5	5
G2	2 000	Male	Mean±S.D.	206.3±8.5	300.1±2.7	352.5±21.8
			N	5	5	5
		Female	Mean±S.D.	156.6±4.6	195.9±9.5	216.5±11.6
			N	5	5	5

N: Animal numbers

나. 안점막자극시험

본 시험은 시험물질을 토끼의 안구에 적용하여 안점막 자극반응을 평가하기 위하여 실시되었다. New Zealand White 토끼는 안점막자극시험 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 많은 기초자료가 축적되어 있기 때문에 결과에 대한 분석이 용이하여 선택되었다. 본 시험은 한국화학시험연구원의 실험동물의 사용과 관리에 관한 규정(2006.12.1 동물윤리위원회 개정고시)을 준수하여 실시되었다.

(1) 시험물질 투여 및 방법

시험동물 9 마리를 각각 보정한 후 우측 눈에 시험물질 0.1 mL을 직접 점안하고 좌측 눈은 대조로 하여 무처리 하였다. 점안 후 시험물질의 누출방지를 위해 상하 안검을 잡고 약 1 초간 폐안시켰다. 그 중 3마리는 시험물질을 처리하고 20~30 초 후에 우안과 좌안을 멸균증류수 20 mL 정도를 사용하여 1분여간 충분히 세척하였다.

(2) 투여횟수 및 투여기간

투여횟수는 1회 적용하였다.

(3) 관찰항목 및 검사항목

- 일반증상관찰

시험물질 적용 후 7일째까지 일반증상의 변화, 증독증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

- 체중측정

체중은 입수시, 시험물질 적용직전, 적용 후 1일 및 7일째에 개체별 체중을 측정하였다.

- 적용부위의 관찰

시험물질 적용 후 1, 2, 3, 4 및 7일째에 각막, 홍채, 결막의 자극성 유무를 관찰하였다.

- 부검소견 및 병리학적검사

시험물질 투여 후 빈사 및 사망동물이 발생되지 않았으므로 부검 및 병리조직검사는 실시하지 않았다.

- 안자극 반응의 평가 및 자극성의 판정

안점막자극반응의 평가는 안구병변의 등급기준에 따라 실시하였다. 결과에 대한 자극성의 정도 판정은 각각의 판정일 각 마리 총점 [0 ~ 110점 범위, 개체별안자극지수(The Individual Index of Ocular Irritation, I.I.O.I.)의 합을 마리수로 나눈 평균 값인 평균안자극지수(Mean Index of Ocular Irritation, M.I.O.I.)와 관찰기간 중 M.I.O.I.의 최대값인 급성안자극지수(The Index of Ocular Irritation, I.A.O.I.)를 구하여 안자극 판정표의 기준에 따라 판정하였다.

(4) 결과요약

시험물질에 대한 안점막자극성을 평가하기 위하여 9마리의 New Zealand White계 암컷 토끼의 결막낭 내에 시험물질 0.1 ml을 1회 처치한 후 7일 동안의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 안점막자극성을 평가하였다.

시험기간 중 일반증상 및 체중변화에서 시험물질의 적용에 의한 이상소견 및 사망동물은 관찰되지 않았으며, 비세척군과 세척군에서 시험물질 적용 후 적용부의 국소자극성을 관찰한 결과 비세척군의 1개체에서 미약한 발적만이 관찰되어, 비세척군의 급성안자극지수(A.O.I.)는 "0.33"로 산출되어 무자극물(None Irritant)로 평가되었다. 또한 세척군의 경우 자극성이 관찰되지 않아 무자극물(None Irritant)로 평가되었다.

New Zealand White계 암컷 토끼에 대한 시험물질의 안점막 적용은 비세척군과 세척군의 급성안자극지수(A.O.I.)가 각각 "0.33"과 "0.00"인 무자극물(None irritant)로 판단된다.



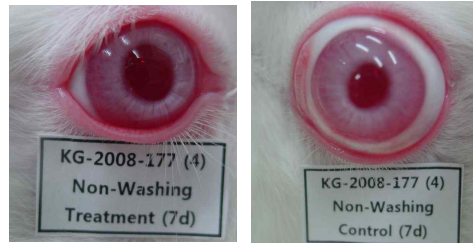


Fig. 52. Eye photographs of no-washing group at 7 days after application of test article

다. 피부자극시험

본 시험은 New Zealand White계 토끼에서 시험물질의 피부 자극성 반응을 검사하기 위해 실시되었다. 토끼는 피부자극시험 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며, 비교할 많은 기초자료가 축적되어 있어 결과에 대한 분석이 용이하여 선택되었다. 본 시험은 한국화학시험연구원의 실험동물의 사용과 관리에 관한 규정(2006.12.1 동물윤리위원회 개정고시)을 준수하여 실시되었다.

(1) 시험방법

시험물질의 적용은 24시간 전에 제모를 실시하여 다음의 그림과 같이 처치구획 및 대조구획으로 구분하였다. 2개소의 찰과피부는 18G 주사침을 이용하여, 각질층은 손상되나 진피는 손상되지 않도록 피가 나지 않을 정도로 [#]형 찰과상을 입혀서 만들었다. 시험물질은 시험동물 당 찰과부위 2개소와 비찰과부위 2개소로 하여 상부의 찰과부위 1개소와 비찰과부위 1개소에 각각 0.5 mL씩을 1회 도포하였고, 하부의 무처치대조구획에는 멸균증류수를 도포하였다. 도포 후 처치구획을 멸균 거어즈로 덮은 후 비자극성 테이프(Tegaderm, 3M)로 잘 고정하여 24시간 동안 노출시켰다. 시험물질 노출시간 종료 시 남아있는 시험물질은 멸균증류수를 이용해 도포부위를 부드럽게 세정하였다.

(2) 관찰 및 검사항목

- 일반증상관찰

시험물질 적용 후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

- 체중 측정

실험동물 입수 시, 시험물질 적용직전, 적용 후 24시간 및 72시간째에 개체별 체중을 측정하였다.

- 적용부위 관찰

시험물질 도포 후 24 및 72시간에 홍반, 가피형성 및 부종 등의 자극성 유무를 관찰하였다.

- 피부 반응의 평가 및 자극성의 판정

자극에 대한 피부반응 정도는 아래의 피부반응 평가에 준하여 실시하고 피부반응 평점표에 따라 1차피부자극 지수를 산출하였다.

(3) 결과요약

New Zealand White계 암컷 토끼에 대한 네오마스캇 포도 가지 추출물 1% 용액의 피부자극성을 조사하기 위하여 시험물질은 토끼 등부위의 찰과 및 비찰과 부위에 적용하였다.

시험물질과 대조물질은 토끼 등부위에 24시간동안 폐쇄접포로 적용하였으며 적용 종료 후 48시간 동안의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 피부자극성을 평가한 결과는 다음과 같았다.

- 일반증상 관찰 시 특이한 임상증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 시험물질 적용직전, 적용 종료직후 및 종료 후 48시간째에 개체별 체중 측정에서 특이한 변화는 관찰되지 않았다.
- 시험물질 투여 종료 후 적용부의 국소자극성을 관찰한 결과, 시험동물의 시험물질 적용한 부위에서 일차피부자극지수(P.I.)는 0.04로 산출되었다.

이상의 결과로 New Zealand White계 토끼에 대한 시험물질의 피부자극성은 비자극성 물질 (None irritant)인 것으로 평가되었다.

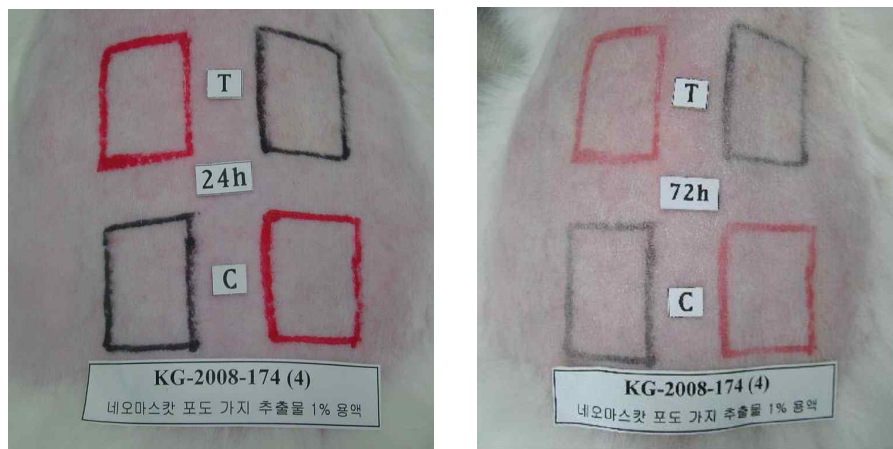


Fig. 53. Skin observed at 24 and 72 hours after application of test article

라. 피부감작성시험

본 시험은 기니픽에서 시험물질의 피부 감작성의 정도를 평가하기 위해 실시하였다. 본 시험은 “의약품등의 독성시험기준 (식품의약품안전청고시 제2005-60호) 및 OECD Guideline for testing of chemicals, Section 4, TG 406 “Skin Sensitisation (adopted 17th July 1992)”과 한국화학시험연구원의 실험동물의 사용과 관리에 관한 규정(2006.12.1 동물윤리위원회 개정고시)을 준수하여 실시하였다.

(1) 시험물질 및 대조물질

(가) 음성대조물질 : 멸균증류수

(나) 양성대조물질 : DNCB; 1,chloro-2,4-dinitrobenzene (sigma)

(다) 시약: FCA : Freund's Complete Adjuvant (sigma)

White Vaseline (puretest® USA)

Sodium Lauryl Sulfate (sigma)
Ethanol (MERCK)
Corn oil (sigma)

(2) 시험물질의 조제

(가) 시험물질: 시험물질은 감작유도 및 감작야기시 멸균증류수를 이용하여 해당 농도를 조제하였다.

(나) 양성대조물질: DNCB를 감작유도시에는 Corn Oil, 감작야기시에는 80% 에탄올에 용해하여 0.1% 농도로 조제하여 사용하였다.

(3) 시험계

(가) 동물종(계통): Male, Albino guinea pig (Dunkin Hartley) :{Sam: (DH) fBR}

(나) 공급원: 샘타코 바이오 코리아 (경기도 오산시 서량동 77-1)

(다) 구입동물수(성별), 주령 및 체중범위: 30마리 (수컷) 5주령, 309.1 ~ 336.4 g

(라) 투여시 동물수(성별), 주령 및 체중범위: 20마리 (수컷) 6주령, 386.2 ~ 434.1 g

(4) 사육환경

(가) 동물사육실 : 기니픽사육실 1

① 환경:

본 시험의 환경은 온도 22.4 ~ 23.6°C, 상대습도 53.9 ~ 62.9%, 환기횟수 10~15회/hr, 조명 시간 12시간 (오전8시~오후8시), 조도 200~300 Lux의 기니픽 사육실에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

② 사육환경 모니터링:

시험기간 중 동물실의 온·습도는 자동 측정기에 의하여 매 30분마다 측정 되었으며, 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정되었다. 동물실의 환경 측정결과 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

③ 사육상자, 사료 및 음용수:

기니픽 사육상자(700 x 500 x 220 mm, (주)대중기기산업)를 사용하였고, 사료는 실험동물용 기니픽용 고품사료 ((주)퓨리나코리아 (경기도 평택시 장당동 85-1))를, 물은 자외선 살균 처리된 음용수를 자유섭취 시켰다. 사료중의 오염물질은 사료공급자로부터 받은 오염물질 분석 자료를 검토하였으며, 음용수에 대하여 본 한국화학시험연구원에서 오염물질의 검사를 실시한 결과 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

(4) 예비시험

(가) 피내주사

피내 주사시 시험물질의 농도를 결정하기 위해 네오마스캇 포도 가지 추출물 1%와 0.5%(v/v)을 각 농도별 2마리의 기니픽에 피내주사(0.1mL)한 후 24시간에 주사부위를 관찰한 결과, 피부괴사 등의 피부반응이 관찰되지 않아 감작 유도시 1% 용액을 주사하였다.

(나) 1차 피부자극(폐쇄접포)

감작 유도 및 야기에 사용되는 시험물질의 농도를 결정하기 위해 네오마스캇 포도 가지 추출물 1%, 0.5%, 0.25% 용액을 각 농도별 2마리의 기니픽에 1차 피부자극시험을 실시하였다. 그 결과 1%의 농도에서 자극성이 관찰되지 않아 감작 유도와 야기에 1% 용액을 적용하였다.

Table 8. 시험군의 구성(본시험)

군	동물 번호	동물수	감작유도단계		감작 야기단계
			1차(피내주사) ¹⁾	2차(폐쇄접포)	
1군	1101 ~ 1110	10	① FCA:멸균증류수 = 1:1	네오마스캇 포도가지 추출 물 1% 용액	네오마스캇 포도가지 추출 물 1% 용액
			② 감작 시험물질 농도		
			③ 감작시험물질:FCA= 1:1		
2군	1201 ~ 1205	5	① FCA:멸균증류수 = 1:1	멸균증류수	멸균증류수
			② 멸균증류수		
			③ 멸균증류수:FCA = 1:1		
3군	1301 ~ 1305	5	① FCA:멸균증류수 = 1:1	0.1% DNCB	0.1% DNCB
			② 0.1% DNCB		
			③ FCA:0.1% DNCB = 1:1		

(5) 처치방법

(가) 1차 감작유도(피내주사) : 0일

투여 전날 기니픽의 등부위 털을 제모기로 제모(4 × 6 cm)한 후, 각 시험군에 해당하는 감작 유도 물질을 0.1 mL씩 등부위 피부의 중앙선 양쪽의 3쌍에 피내 주사하였다.

(6) 관찰 항목

(가) 일반증상관찰

모든 동물에 대하여 매일 일반증상의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유·무를 관찰하였다.

(나) 체중측정

모든 동물에 대하여 입수시와 군분리시에 체중을 측정하였고, 1차 감작유도 후 주 1회 체중을 측정하였다.

(다) 적용부위의 관찰

감작야기(폐쇄접포 제거) 종료 후 24시간과 48시간에 적용부위를 [피부반응 평가기준]에 따라

관찰하였다.

Table 9. 피부반응 평가기준

점 수	증 상
0	육안적으로 변화 없음
1	산재성의 부분적인 홍반
2	중등도의 전반적인 홍반
3	강도의 홍반 및 부종

Table 10. 피부감작성 평가기준

감작율(%)	등 급	분 류
0~8	I	매우 약함
9~28	II	약 함
29~64	III	보 통
65~80	IV	강 함
81~100	V	매우 강함

(7) 자료의 통계처리

체중 자료에 대해서는 분산의 동질성을 비교하기 위한 Levene's test를 실시하고, 분산의 동질성이 인정된 경우 one way ANOVA test를 실시하였다. 사후검정으로 Dunnett 검정을 실시하였다. 모든 통계분석은 SPSS통계 프로그램 (Ver 10.0)을 이용하여 수행하였다.

(8) 결과(Results)

(가) 일반증상 및 사망률

전 시험기간 동안 모든 동물에서 어떠한 일반증상이나 빈사 및 폐사 동물은 관찰되지 않았다.

Table 11. Mortality and clinical signs(Group Summary)

Group	Sex	No. of Animal	Induction phase	Challenge phase	Mortality (dead/total)	Clinical Signs
G1	Male	10	Test Material	Test Material	0 % (0/10)	No Abnormality Detected
G2	Male	5	Control Material	Control Material	0 % (0/5)	No Abnormality Detected
G3	Male	5	0.1% DNCB in corn oil	0.1% DNCB in 80% EtOH	0 % (0/5)	No Abnormality Detected

(나) 체중변화

시험기간 동안 대조군과 비교했을 때 통계적 유의성있는 체중변화는 관찰되지 않았다.

Table 12. Body weights

Group		Weeks			
		1	2	3	4
G1	Mean	403.28	466.19	525.33	582.19
	S.D.	14.37	23.10	33.15	40.92
	N	10	10	10	10
G2	Mean	407.17	450.09	501.96	555.90
	S.D.	18.71	9.30	8.36	5.62
	N	5	5	5	5
G3	Mean	409.90	467.81	514.23	574.92
	S.D.	10.35	13.98	18.21	26.35
	N	5	5	5	5

N : Number of Animal

(다) 적용부위의 관찰

야기 종료 후 24시간과 48시간의 피부반응을 평가한 결과, 시험군 및 음성대조군에서 홍반 및 부종 등의 피부반응을 유발하지 않아 감각지수 및 빈도지수가 각각 “0”과 “0%”로 산출되었다. 또한 양성대조군에서는 강도의 홍반 및 부종 등의 피부반응이 관찰되어 감각지수는 야기 종료 후 24시간 및 48시간에 각각 “3.0” 및 “2.6”, 빈도지수는 “100%”로 산출되었다.

Table 13. Evaluation of skin response

Group	No. of Animal	Time of observation	Score of skin response				Mean Score	Sensitization Rate (%)
			0	1	2	3		
G1	10	24	10	0	0	0	0	0
		48	10	0	0	0	0	0
G2	5	24	5	0	0	0	0	0
		48	5	0	0	0	0	0
G3	5	24	0	0	0	5	3.0	100
		48	0	0	2	3	2.6	100

(10) 고찰 및 결론(Discussion and Conclusion)

Hartley계 수컷 기니픽에 대한 네오마스캇 포도 가지 추출물 1% 용액의 알러지 유·무를 평가하기 위하여 피부감작성시험을 수행하였다. 시험기간 동안 시험동물의 사망률, 일반증상, 체중 변화 및 야기 후 피부 반응을 평가하였다.

모든 시험군의 동물은 시험기간 중 사망동물 및 이상증상은 관찰되지 않았고, 체중측정 결과에 있어서도 정상적인 체중증가를 보였다. 야기 종료 후 24시간과 48시간에 피부반응을 관찰한 결과에서도 시험군과 음성대조군에서는 홍반 및 부종 등의 피부반응이 관찰되지 않아 감작지수와 빈도지수는 각각 “0”과 “0%”로 산출되었다. 반면, 양성대조군에서는 강도의 홍반 및 부종 등의 피부반응이 관찰되어 감작지수는 24시간과 48시간에 각각 “3.0”과 “2.6”, 빈도지수는 “100%”로 산출되었다.

이상의 결과로 부터 Hartley계 수컷 기니픽에 대한 네오마스캇 포도 가지 추출물 1% 용액은 피부감작성이 매우 약한 물질인 것으로 판단된다.

마. 광독성 시험

본 시험은 수컷 기니픽에서 네오마스캇 포도덩굴 추출물의 자외선에 의한 광독성 유·무에 대해 평가하기 위하여 실시하였다.

본 시험은 한국화학시험연구원의 실험동물의 사용과 관리에 관한 규정 (2009.12.21 동물윤리위원회 개정고시)을 준수하여 실시하였다.

(1) 시험물질 및 대조물질

(가) 시험물질

물 질 명 : 네오마스캇 포도덩굴 추출물1% 용액
 제 조 원 : 한국식품연구원
 공 급 원 : 한국식품연구원
 입 수 량 : 150 ml
 외 관 및 성 상 : 연한 갈색용액
 순 도 : 식물추출물 1%
 보 관 조 건 : 냉동 (-15℃)
 유효기간(제조 후) : 6 개월

(나) 음성대조물질 (부형제)

명 칭 : 멸균증류수
 제 조 사 : 대한약품공업(주)
 로 트 번 호 : E5IAK21

(다) 양성대조물질

명 칭 : 8-Methoxypsoralen (8-MOP)
 C A S N O . : 298-81-7
 제 조 사 : Sigma-Aldrich Corporation
 로 트 번 호 : 083K1124

(라) 기타

명 칭 : Acetone
 C A S N O . : 67-64-1
 제 조 사 : Sigma-Aldrich Corporation
 로 트 번 호 : 30896PK

(2) 시험물질 조제

시험물질은 일차피부자극시험 수행시 시험물질 그대로를 100 %로 하고, 공비 2로 하여 50 % (v/v), 25 % (v/v) 및 12.5 % (v/v) 등 4 개 농도를 멸균증류수에 희석하여 사용하였다. 본 시험 수행시에는 시험물질 그대로인 100 % 농도를 이용하였다. 양성대조물질은 8-MOP를 Acetone에 1 % (w/v)의 농도로 용해하여 조제하였다.

(3) 시험물질 분석

시험의뢰자와 협의하여 시험물질 및 투여액의 농도, 안정성 및 균질성에 대한 분석은 별도로 시행하지 않았다.

(4) 시험계

계통 및 종 : Sam:DH-기니픽
 공급원 : (주)샘타코 바이오 코리아 (경기도 오산시 서량동 77-1)
 구입시 성별 (동물 수) : 수컷 (10 마리)

구입시 동물 주령 및 체중범위 : 5 주령, 수컷 299.90 g ~ 309.19 g
투여시 성별 (동물 수) : 수컷 (6 마리)
투여시 동물 주령 및 체중범위 : 6 주령, 수컷 374.04 g ~ 388.90 g

(5) 사육환경

(가) 환경조건

본 시험의 환경은 온도 (20 ± 3) °C, 상대습도 (50 ± 20) %, 환기횟수 15 회/시간, 조명시간 12 시간 (오전 8시~오후 8시), 조도 (150 ~ 300) Lux의 사육환경으로 설정된 동물사육실에서 사료와 음용수를 급여하여, 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

(나) 사육환경 모니터링

시험기간 중 동물실의 온·습도는 자동 온습도 측정기에 의하여 매 30 분마다 측정되었으며, 조도 등의 환경조건은 정기적(분기당 1회)으로 측정하였다. 동물실의 환경 측정결과 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

(다) 사육조건

순화 및 시험기간 중 기니픽사육실내 스텐인레스제 사육상자 [700(W) × 475(D) × 200(H)mm, 대종기기]에 3 마리씩 넣어 사육하였다.

(라) 사료 및 물

사료는 0.01 % 아스코르빈산이 함유된 실험동물용 기니픽사료 {(주)카길애그리퓨리나, 전북 군산시 소룡동 56-4}를, 물은 UV 조사된 여과수를 사용하여 자유섭취 시켰다.

(마) 사료 및 물 중의 오염물질 확인

사료의 오염물질은 사료 제조업체의 정기적 검사에 따른 사료 성적서를 사료공급자로부터 받아 확인하였고, 물의 오염물질은 한국화학시험연구원 안전성평가본부 표준작업수순서(SOPs)에 따른 정기적 검사를 통해 확인한 결과 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

(6) 예비시험(일차 피부자극 시험)

(가) 투여용량의 설정

시험물질의 투여용량은 의뢰자 측에서 제공한 액상인 시험물질 그대로를 하고, 공비를 2로 하여 50 % (v/v), 25 % (v/v) 및 12.5 % (v/v)의 총 4 단계 농도를 멸균 증류수에 희석하여 설정하였다.

(나) 예비시험 결과

2 마리의 기니픽을 이용해 일차 피부자극 시험을 수행한 결과, 100 % 농도에서 피부반응이 관찰되지 않아 본 시험의 시험물질 투여농도를 100 %로 선정하였다.

(7) 본 시험

(가)제모

6 마리의 동물을 선택하여 시험실시 24 시간 전에 등 부위의 털을 7 cm × 5 cm 크기로 제모하였다.

(나) 시험물질 적용

각 동물의 등 부위에 1.5 cm×1.5 cm의 구획으로 양쪽 3 부위(시험물질, 음성대조물질, 양성대조물질)씩 6 부위를 정하여 각 시험물질을 20 uL씩 도포하였다. 30 분간 개방 첩포한 후, 우측구획을 광차단 부위로 하고, 좌측을 광조사 부위로 하였다.

(다) 자외선 조사

도포 30 분 후에 동물의 우측부위를 알루미늄 호일로 차광한 후, 비자극성 테이프 (Tegarderm, 3M, USA)로 고정하고 Guinea-pig restrainers(Research Corproation, Canada) 각각에 한 마리씩 넣었다. 이후, 자외선 조사 장치(Tyler Research Corproation, Canada)을 이용하여 UVA (320 ~ 420 nm)의 최종 에너지가 15 J/cm²가 되도록 UV dosimeter (Tyler Research Corproation, Canada)를 이용하여 광량을 측정하고, 계산된 일정한 시간 동안 조사하였다.

(라) 관찰 항목

① 일반증상 관찰

모든 동물에 대하여 매일 일반증상의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유무를 매일 1 회씩 관찰하였다.

② 체중측정

체중은 동물 입수시, 시험물질 투여 당일, 투여일 1 일 및 3 일째에 각각 측정하였다.

③ 적용부위의 관찰

자외선 조사 후, 24, 48 및 72 시간째에 “3.9 항”에 따라 피부 반응을 관찰하여 광독성의 유무를 판정한 후, 기록하였다.

(마) 결과의 평가

① 피부반응의 평가

피부반응의 평가는 “[Table 14] 피부반응 평가표”에 따라 홍반과 부종을 각각 0 에서 4 까지 하여 그 합계로 반응을 평가하였다. 평가한 후, 24, 48, 72 시간 후에 각각 판정하였을 때 가장 높은 수치의 합계에 대한 평균으로 피부자극 지수(irritation index)를 구하였다.

피부자극 지수(Irritation Index)

= (∑Max. score of erythema and eschar+∑ Max. score of edema)/animal number

[Table 14] 피부반응 평가표

등 급	점 수
홍반과 가피형성	

- 홍반이 전혀 없음	0
- 아주 가벼운 홍반	1
- 분명한 홍반	2
- 약간 심한 홍반	3
- 심한 홍반 및 부종	4
<hr/>	
- 총 가능한 등급의 합	4
<hr/>	
부종 형성	
- 부종이 전혀 없음	0
- 아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
- 경증의 부종(뚜렷하게 부어올라서 변여부가 구별될 경우)	2
- 중증의 부종(약 1 mm 정도 부어 올랐을 경우)	3
- 심한 부종(1mm 이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 경우)	4
<hr/>	
- 총 가능한 등급의 합	4

② 광독성 평가

광독성의 유무는 평가시 광독성 지수(Phototoxic index) 값이 0.6 이상인 경우에 광독성이 있다고 판정하였다. 이 값을 근거로 하여 시험물질의 광감작성 정도를 “[표 15] 광독성의 판정기준”에 따라 구분하였다.

광독성 지수(Phototoxic Index)

$$= \text{Irritation index of UV irritation site} - \text{Irritation index of non irritation site}$$

[Table 15] 광독성의 판정기준

광독성 지수	판정기준
0.0	None irritating
0.1 ~ 0.5	Practically non irritating
0.6 ~ 1.5	Minimally irritating
1.6 ~ 3.0	Mildly irritating
3.1 ~ 5.0	Moderately irritating
5.1 ~ 6.5	Severely irritating
6.6 ~ 8.0	Extremely irritating

(8) 결과 (Results)

(가) 사망률 및 일반증상 (Table 16)

시험기간 동안 시험물질 투여군 및 음성대조군 동물에서 어떠한 일반증상이나 빈사 및 폐사 동물은 관찰되지 않았다.

Table 16 . Mortality and clinical signs

Animal No.	Day(s) after treatment				Mortality (dead/total)
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	
1	NAD	NAD	NAD	NAD	0/6
2	NAD	NAD	NAD	NAD	
3	NAD	NAD	NAD	NAD	
4	NAD	NAD	NAD	NAD	
5	NAD	NAD	NAD	NAD	
6	NAD	NAD	NAD	NAD	

(나) 체중변화 (Table 17)

시험기간 중 체중변화에 있어서는 모든 시험동물에서 정상적인 체중 증가가 관찰되었다.

Table 17. Body weights

Animal No.	Treatment day	3 day after treatment
1	374.23	410.76
2	383.78	386.07
3	374.04	366.25
4	384.67	379.81
5	376.99	402.32
6	388.90	415.55
Mean	374.04	393.46
S.D.	388.90	19.22

(다) 적용부위의 관찰 및 평가 (Table 18)

UV 조사 후, 24, 48 및 72 시간에 UV 조사영역과 비조사영역의 피부반응을 관찰한 결과, 시험물질을 처리한 구획에서는 홍반, 가피 및 부종 등의 어떠한 피부반응도 관찰되지 않았고, 광독성(Phototoxic index)는 “0”으로 나타나 광독성을 유발하지 않는 물질로 평가되었다.

반면, 양성대조물질인 1 % (w/v) 8-MOP를 처리한 구획은 UV 조사 후, 24 시간부터 72 시간까지 홍반 및 부종이 관찰되어 광독성지수가 각각“2.83”, “1.83”, “0.7”으로 평가되어 mildly

phototoxic한 물질로 평가되었다.

Table 18. Evaluation of phototoxic test

Test materials	Animal No.	UV-irradiation site						Non-irradiation site						Phototoxic index ^{a)}			
		24hr		48hr		72hr		24hr		48hr		72hr		24h	48h	72h	
		E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	r	r	r	
네오마스 캣 포도덩굴 추출물 1% 용액	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Irritation index ^{b)}	0		0		0		0		0		0		0	0	0	
Distilled water (Negative control)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Irritation index ^{b)}	0		0		0		0		0		0		0	0	0	
1% 8-MOP (Positive control)	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	
	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	
	3	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	4	3	2	
	4	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	
	5	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	
	6	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	
	Irritation index ^{b)}	2.83		1.83		0.7		0		0		0		2.83	1.83	0.7	

^{a)} ; Irritation index of UV irradiation site - Irritation of non irradiation site

^{b)} ; (\sum Max. score of erythema and eschar+ \sum Max. score of edema)/animal number

E ; Erytherma & Eschar

O ; Oedema

(9) 고찰 및 결론 (Discussion & Conclusion)

기니픽에 대한 네오마스캇 포도 덩굴 추출물 1 % 용액의 광독성을 조사하기 위하여 시험 물질을 도포한 후, UV를 조사한 다음 사망률, 일반증상 및 체중변화와 24, 48 및 72 시간째의 피부반응을 평가하였다.

시험기간 중, 사망동물 및 이상증상은 관찰되지 않았고, 체중측정 결과에 있어서도 정상적인 체중증가를 보였다. 본 시험물질 노출 종료 후, UV 조사영역과 비조사영역의 피부반응을 평가한 결과, 홍반, 가피 및 부종 등의 어떠한 피부반응도 관찰되지 않아, 광독성 지수 (Phototoxic Index)는 “0”으로 산출되었다. 반면, 양성대조물질인 1 % (w/v) 8-MOP를 처리한 구획은 UV 조사 후, 24, 48 및 72 시간에 홍반 및 부종이 관찰되어 광독성지수 (Phototoxic Index)가 “2.83”, “1.83”, “0.7”으로 평가되었다.

이상의 결과로 기니픽에 대한 네오마스캇 포도 덩굴 추출물 1% 용액의 광독성을 UV를 조사하여 평가시, 홍반, 가피 및 부종 등의 피부반응을 유발하지 않았으므로, 본 시험물질은 광독성을 유발하지 않는 물질로 평가된다.

바. 광감작성 시험

본 시험은 기니피기에서 네오마스캇 포도덩굴 추출물 1% 용액의 광감작성의 정도를 검사하기 위해 실시하였다.

본 시험은 한국화학시험연구원의 실험동물의 사용과 관리에 관한 규정 (2009-12-21 동물윤리위원회 개정고시)을 준수하여 실시하였다.

(1) 시험물질 및 대조물질

(가) 시험물질

시험물질명	: 네오마스캇 포도덩굴 추출물 1% 용액
제조원	: 한국식품연구원
공급원	: 한국식품연구원
입수량	: 150 mL
외관 및 색상	: 연한 갈색용액
순도	: 식물추출물 1 %
보관조건	: 냉동(-15℃)
유효기간(제조후)	: 6개월

(나) 음성대조물질 (부형제)

명 칭 : 멸균 증류수
제 조 사 : 대한약품공업(주)
로 트 번 호 : 41HBK08

(다) 양성대조물질

명 칭 : Chlorpromazine hydrochloride
Cas No. : 69-09-0
제 조 사 : Sigma-Aldrich Corporation
로 트 번 호 : C8138

(라) 기타

명 칭 : Acetone
Cas No. : 67-64-1
제 조 사 : Sigma-Aldrich Corporation
로 트 번 호 : 534064

명 칭 : 1,3-Butanediol
Cas No. : 107-88-0
제 조 사 : Sigma-Aldrich Corporation
로 트 번 호 : 309443

(2) 시험물질 조제

일차피부자극시험 수행 시 시험물질 그대로를 최고투여농도 투여용액으로 한 후, 멸균생리식염수를 이용하여 희석하여 단계별로 조제하였다. 본 시험은 시험물질 그대로를 이용하여 감작유도 및 감작야기시 사용하였다. 양성대조물질인 Chlorpromazine은 Acetone과 1,3-Butanediol을 3:7의 비율로 혼합한 혼합액을 이용하여 감작시에는 1 %, 야기시에는 0.1 %의 농도로 조제하였다.

(3) 시험물질 분석

시험의뢰자와 협의하여 시험물질 및 투여액의 농도, 안정성 및 균질성에 대한 분석은 별도로 시행하지 않았다.

(4) 시험계

동물실 번호: 기니픽 사육실 1
계통 및 종 : Sam:DH-기니픽
공급원 : (주)샘타코 바이오 코리아 (경기도 오산시 서량동 77-1)
구입시 성별 (동물수) : 수컷 (예비시험- 5 마리, 본 시험- 20 마리)

구입시 동물 주령 및 체중범위 : 5 주령, 252.40 ~ 259.50 g (예비시험)
234.65 ~ 243.99 g (본 시험)
투여시 성별 (동물수) : 수컷 (예비시험- 4 마리, 본 시험 15 마리)
투여시 동물 주령 및 체중범위 : 6 주령, 수컷 276.99 g ~ 298.57 g

(5) 사육환경

(가) 환경

본 시험의 환경은 온도 (20 ± 3) °C, 상대습도 (50 ± 20) %, 환기횟수 10 회/시간, 조명시간 12시간 (오전 8 시~오후 8 시), 조도 (150 ~ 300) Lux의 사육환경으로 설정된 동물사육실에서 사료와 음용수를 급여하여, 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

(나) 사육환경 모니터링

시험기간 중 동물실의 온·습도는 자동 측정기에 의하여 매 30 분 마다 측정 되었으며, 조도 등의 환경조건은 해당 표준작업수순서(SOP)에 따라 정기적으로 측정되었다. 동물실의 환경 측정결과 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

(다) 사육조건

순화 및 시험기간 중 기니픽 사육실내 스텐인레스제 사육상자 [700(W)×475(D)×200(H)mm, 대종기기]에 5 마리씩 넣어 사육하였다.

(라) 사료 및 물

사료는 0.01 % 아스코르빈산 함유된 실험동물용 기니픽사료 {(주)카길에그리퓨리나, 전북 군산시 소룡동 56-4)}를, 물은 UV 조사된 여과수를 사용하여 자유섭취 시켰다.

(마) 사료 및 물 중의 오염물질 확인

사료의 오염물질은 사료 제조업체의 정기적 검사에 따른 사료 성적서를 사료공급자로부터 받아 확인하였고, 물의 오염물질은 본 연구원의 해당 표준작업수순서(SOP)에 따른 정기적 검사를 통해 확인한 결과 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

(6) 예비시험(일차 피부자극 시험)

(가) 시험물질의 투여용량

시험물질의 투여용량은 의뢰자 측에서 제공한 시험물질 그대로를 100 %로 하고, 공비를 2로 하여 12.5 % (v/v), 6.25 % (v/v) 및 3.125 % (v/v)의 총 4 단계 농도를 설정하였다.

(나) 감각유도 및 감각유발 농도

농도 당 1 마리의 기니픽을 이용해 일차 피부자극 시험을 수행한 결과, 100 % 농도에서 피부반응이 관찰되지 않아 감각유도 및 야기 농도를 100 %로 선정하였다.

(7) 본 시험

(가) 시험군의 구성

시험군	성	동물번호	감작유도	감작유발
1군	수컷	1101-1120	100 % 시험물질	100 % 시험물질
2군	수컷	1201-1210	멸균증류수	멸균증류수
3군	수컷	1310-1310	1% Chlorpromazine	0.1% Chlorpromazine

(나) 감작유도 (0, 2, 5, 7, 9, 12 일)

기니픽의 견상갑 부위의 털을 제모기로 제모한 후, FCA(Freund's Complet Adjuvant)와 주사용 멸균생리식염수를 1:1로 섞은 유화액 0.1 mL을 2cm×2cm 크기의 4 군데 모서리에 나누어 피내주사한 후, 시험물질의 흡수목적으로 피내주사부위를 stripping 하였다.

이 후, 2cm×2cm 크기의 패취에 시험물질 0.5 mL을 적용하고, 비자극성 테이프 (Tegarderm, 3M)로 고정하여 2 시간 동안 폐쇄칩포를 하였다. 폐쇄칩포 후, 자외선 조사 장치(Tyler Research Corproation, Canada)을 이용하여 UVA(320 ~ 420 nm)의 최종 에너지가 10J/cm²가 되도록 UV dosimeter(Tyler Research Corproation)를 이용하여 광량을 측정하고, 계산된 일정한 시간동안 조사하였다.

이러한 과정을 1 일 1 회, 주 3 회씩 2 주에 걸쳐 총 6 회 실시하였다. 이때, FCA 유화액은 1 회에만 실시하였다. 음성대조군 및 양성대조군은 실험물질 투여군과 동일하게 실시하였다.

(다) 감작야기 (26 일)

최종 감작유도 14 일 후, 감작유도 부위의 아래쪽 부위를 제모한 후, 좌우 2 개소 위치에 각 시험물질을 2 시간 동안 칩포를 하였다. 칩포 후, 왼쪽부위는 조사부위로, 오른쪽 부위는 비조사 부위로 하고, 오른쪽 부위는 알루미늄 호일로 차광하였다. 이 후, 감작유도와 동일하게 UVA(320 ~ 420 nm)의 최종 에너지가 10J/cm²가 되도록 UV dosimeter(Tyler Research Corproation, Canada)를 이용하여 광량을 측정하고, 계산된 일정한 시간동안 조사하였다. 음성대조군 및 양성대조군은 실험물질 투여군과 동일하게 실시하였다.

(라) 관찰 항목

①일반증상 관찰

모든 동물에 대하여 매일 일반증상의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유무를 매일 1 회씩 관찰하였다.

②체중측정

모든 동물에 대하여 입수시, 군분리시 및 1 차 유도부터 종료시까지 매주 1 회 측정하였다.

③적용부위의 평가

감작야기 자외선 조사 후, 24, 48 및 72 시간 후에 적용부위의 피부를 육안으로 관찰하여 3.10 항에 따라서 평가하였다.

④피부반응 및 감작성의 평가

⑤피부반응

피부반응은 “[Table 19] 피부반응 평가표”에 따라 홍반과 부종을 각각 0에서 4까지 하여 그 합계로 반응을 평가한다. 피부자극 지수(irritation index)는 광조사 부위와 비조사 부위 각각의 홍반과 가피 및 부종 평가치 합계의 평균으로 아래와 같이 구하였다.

피부자극 지수(Irritation Index)

$$= (\sum \text{Score of erythema and eschar} + \sum \text{Score of edema}) / \text{animal number}$$

[Table 19] 피부반응 평가표

등 급	점 수
홍반과 가피형성	
- 홍반이 전혀 없음	0
- 아주 가벼운 홍반	1
- 분명한 홍반	2
- 약간 심한 홍반	3
- 심한 홍반 및 부종	4
- 총 가능한 등급의 합	4
부종 형성	
- 부종이 전혀 없음	0
- 아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
- 경증의 부종(뚜렷하게 부어올라서 변여부가 구별될 경우)	2
- 중증의 부종(약 1mm 정도 부어 올랐을 경우)	3
- 심한 부종(1mm 이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 경우)	4
- 총 가능한 등급의 합	4

⑥광감작성 지수

광감작성 지수는 광조사 부위의 피부자극 지수와 비조사 부위의 피부자극 지수를 뺀 값으로 아래와 같이 구하고, 광감작성 지수 범위에 따라 광감작성의 유무를 판정하였다.

광감작성 지수(Photosensitization Index)

$$= \text{Irritation index of UV irritation site} - \text{Irritation index of non irritation site}$$

[Table 20] 광감작성의 판정기준

광감작성 지수	판정기준
0.1 ~ 0.5	Practically non-irritating (자극이 거의 없음)
0.6 ~ 1.2	Minimally irritating(미약하게 자극이 있음)
1.3 ~ 2.5	Severely irritating (분명하게 자극이 있음)
2.6 ~ 5.0	Extremely irritating (심한 자극이 있음)

(마) 자료의 통계처리 (Statistics of data)

체중 data는 평균과 표준편차로 표현하였고, 결과에 대한 해석은 SPSS 통계프로그램(ver. 10.1)을 이용하여 대조군과의 student's test를 통해 유의성 검증을 실시하였다.

(8) 결과 (Results)

(가) 사망률 및 일반증상 (Table 21)

시험기간 동안 모든 시험군의 동물에서 어떠한 일반증상이나 빈사 및 폐사 동물은 관찰되지 않았다. 다만, 음성대조군의 1 개체가 투여 후 1차 감작유도 후 27 일째에 우측 앞다리가 케이지 하단에 끼인채 빈사상태로 발견되어 안락사 조치하였다.

Table 21. Mortality and clinical signs

Group	Sex	Number of animal	Induction phase	Challenge phase	Mortality (dead/total)	Clinical signs
G1	Male	5	100 % Test material	100 % Test material	0 % (0/5)	NAD
G2	Male	5	Sterile distilled water	Sterile distilled water	20 % ^a (1/5)	NAD Moribund ^a
G3	Male	5	Sterile distilled water	Sterile distilled water	0 % (0/5)	NAD

NAD: No Abnormalities Detected

^a : One animal was found with right forelimb caught in bottom of the cage on 27th days after 1st induction treatment and was euthanized (animal number: 1204).

(나) 체중변화 (Table 22)

시험기간 중 체중변화에 있어서는 모든 시험동물에서 정상적인 체중 증가가 관찰되었다.

Table 22. Body weights

Group		Days after treatment				
		-1 ^a	6	13	20	27
G1	Mean	289.17	325.75	380.57	440.07	501.03
	S.D	6.28	13.86	17.18	17.28	23.61
	N	5	5	5	5	5
G2	Mean	288.01	336.53	388.34	432.94	476.08
	S.D	7.54	16.01	27.89	23.30	38.31
	N	5	5	5	5	4 ^b
G3	Mean	287.24	327.75	368.64	433.38	471.38
	S.D	7.34	9.03	6.79	9.90	22.97
	N	5	5	5	5	5

^a : Body weight of animal allocation, N : No. of Animal

^b : One animal was found with right forelimb caught in bottom of the cage on 27th days after treatment and was euthanized (animal number: 1204).

(다) 적용부위의 관찰 및 평가 (Table 23)

감작야기 자외선 조사 후, 24 시간, 48 시간 및 72 시간의 자외선 조사영역과 비조사 영역의 피부반응을 관찰한 결과, 시험물질 투여군 및 음성대조군에서 홍반 및 부종 등의 피부반응을 유발하지 않아 광감작성지수는 각각 '0'과 '0'으로 산출되었다. 반면, 양성대조군에서는 홍반 등의 피부반응이 관찰되어 광감작성지수(Photosensitization Index)가 24 시간, 48 시간 및 72 시간에 각각 '1.6', '1.2' 및 '1.0'으로 평가되었다.

Table 23. Evaluation of photosensitization test

Test materials	Animal No.	UV-irradiation site						Non-irradiation site						Phototoxic index ^{a)}		
		24hr		48hr		72hr		24hr		48hr		72hr		24h	48h	72h
		E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	E	O	r	r	r
네오마스 캣 포도덩굴 추출물 1% 용액	1101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Irritation index ^{b)}	0		0		0		0		0		0		0	0	0
Sterile distilled water (Negative control)	1201	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1202	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1203	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1204	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	1205	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Irritation index ^{b)}	0		0		0		0		0		0		0	0	0
1% 8-MOP (Positive control)	1301	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	1302	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	1303	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1
	1304	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1
	1305	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	Irritation index ^{b)}	1.6		1.2		1.0		0		0		0		1.6	1.2	1.0

^{a)} ; Irritation index of UV irradiation site - Irritation of non irradiation site

^{b)} ; (\sum score of erythema and eschar+ \sum score of edema)/animal number

E ; Erytherma & Eschar, O ; Oedema, NA ; Not applicated

(9) 고찰 및 결론 (Discussion & Conclusion)

기니픽에 대한 네오마스캣 포도 덩굴 추출물 1 % 용액의 광감작용을 평가하였으며, 시험 기간 동안 시험동물의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 피부반응을 관찰 조사하였다.

모든 시험군의 동물은 시험기간 중 사망동물 및 이상증상이 관찰되지 않았으며, 체중측정 결과에 있어서 정상적인 체중증가를 보였다. 다만, 음성대조군의 1 개체는 케이지 하단에 우측 앞다리가 끼인채 빈사상태로 관찰되어 안락사 조치하였다.

감작야기 야기 종료 후, 24 시간, 48 시간 및 72 시간에 피부반응을 관찰한 결과에서도 시험군 및 음성대조군에서 홍반 및 부종 등의 피부반응이 관찰되지 않아 광감작지수는 각각 '0'과 '0'로 산출되었다. 0.1 %의 농도를 acetone과 1,3-butanediol 3:7의 비율로 혼합한 혼합액에 용해시킨 Chlorpromazine를 이용해 야기하였던 양성대조군에서는 홍반 등의 피부반응이 관찰되어 광감작성지수(Photosensitization Index)는 야기 종료 후, 24 시간, 48 시간 및 72 시간에 각각 '1.6' '1.2' 및 '1.0'으로 산출되었다.

이상의 결과로 기니픽에 대한 네오마스캣 포도 덩굴 추출물 1 % 용액의 광감작용을 UV 를 조사하여 평가시, 홍반 및 부종 등의 피부반응을 유발하지 않으므로, 본 시험물질은 광감작용을 유발하지 않는 물질로 평가된다.

제 7 절. 원료의 인체피부 안전성 시험 (제 3세부)

본 시험은 원료의 인체피부에 대한 일차자극 유무를 확인하고자 시행 하였다.

1. 시험 물질

Table 24. Name of test materials supplied from sponsor

번호*	시험 물질 명	제조코드	시료형태	시험 농도
31	네오마스캣 포도가지 추출물 2.0%	Kfri-csy-01	추출물	2.0% in D.W.
32	네오마스캣 포도가지 추출물 1.5%	Kfri-csy-02	..	1.5% in D.W.
33	네오마스캣 포도가지 추출물 1.0%	Kfri-csy-03	..	1.0% in D.W.
34	네오마스캣 포도가지 추출물 0.5%	Kfri-csy-04	..	0.5% in D.W.
35	네오마스캣 포도가지 추출물 0.2%	Kfri-csy-05	..	0.2% in D.W.
36	캠벨 포도 가지 추출물 1.0%	Kfri-csy-06	..	1.0% in D.W.
44	Squalane (negative control)	-	-	-

번호*: 시험물질 도포 순서

2. 시험 방법

가. 시험 대상자

피험자 선정기준 및 제외기준에 부합되는 18-60세의 여성 지원자 30명 이상을 대상으로 실시하였다. 각각의 지원자들은 세부적인 사항에 따른다는 서면 동의서에 서명을 하였으며, 숫자로 된 고유 번호를 부여 받았다.

(1) 선정 기준

다음에 기술된 조건에 부합하는 지원자를 시험 대상군으로 선정한다.

- 18-60세의 여성으로 피험자 제외기준에 포함되지 않는 자
- 피부 질환이 없는 건강한 자
- 시험에 앞서 시험의 목적, 내용 등에 대해 충분히 설명을 듣고 자발적으로 서면 동의서에 서명한 자
- 시험기간 동안 실험에서 요구하는 사항에 잘 협조하고 이상한 증상이 있으면 즉시 연락을 할 의향이 있는 자

(2) 제외 기준

다음에 기술된 항목에 해당되는 지원자는 시험 대상군에서 제외한다.

- 임신 중이거나 수유 중 또는 6개월 이내에 임신을 계획하고 있는 여성
- 시험 부위에 문신, 흉터, 화상 등이 있어서 scoring을 방해하는 경우
- 감염성 피부 질환이 있는 자
- 시험의 목적에 방해되는 피부 질환을 앓고 있는 경우
- 약물 치료가 피부반응에 영향을 주거나 과거력이 있는 경우
- 화장품, 의약품 또는 일상적인 광 노출에 자극이 심하거나 알러지가 있는 자
- 피임제, 항히스타민제, 소염제를 복용하고 있는 자
- 동시에 다른 시험에 참여하고 있는 경우
- 이전의 시험에 참여하고 충분한 시간이 경과하지 않은 경우

(3) 제한 사항

- 피험자는 첩포를 붙이고 있는 동안 시험부위(등)에 물이 닿지 않도록 하였다.
- 신체의 치료를 위한 약을 복용하거나 사용하는 경우 시험 담당자에게 통지 하도록 하였다.

(4) 시험 대상자의 수 및 산출 근거

피험자 수는 기능성 화장품 등의 심사에 관한 규정(제2008-17호)의 [별표 1] 독성시험법 7항

(1)인체 첩포 시험방법에 근거하여 30명 이상을 선정하여 시행 하였다.

(5) 시험 중지 및 탈락 기준

본 시험과정 중 시험일정을 준수하지 않는 피험자의 경우는 계속적 참여의사를 물어 중단여부를 결정하였으며, 기타 부작용, 추적관찰 불가능 및 프로토콜을 어기는 일이 발생하였을 때는 시험을 중단토록 하였다.

- 피험자가 임상시험 참여동의를 철회한 경우
- 시험 중 시험물질에 의한 부작용이 심각한 경우
- 갑작스런 사고나 질환의 병발 현상으로 시험의 진행이 불가능한 경우
- 기타 시험자의 판단에 의해 시험수행에 지장이 있다고 생각되는 경우

나. 시험 재료

IQ Ultra™ chamber: Chemotechnique Diagnostics AB (Sweden)

Micropore tape: 3M / Medical-Surgical Division

Microman (M250): Gilson, France

Marking pen: Skin marker Slim (Sweden)

다. 시험 방법

- 시험 부위는 70% ethanol로 세척한 뒤 건조시켰다.
- 시험 물질 6종은 distilled water에 차례대로 각각 2.0%, 1.5%, 1.0%, 0.5%, 0.2%, 1.0%로 희석하여 적용하였다.
- 준비된 시험 물질 20 μ l를 IQ Ultra™ chamber 내에 부착 후 시험 부위인 등 부위에 얹어 micropore tape으로 고정시켰다.
- 철폐는 48시간 동안 도포하며, 철폐를 제거한 후에는 skin marker로 시험 부위를 표시하고 30분, 24시간 후에 각 시험 부위를 관찰하였다.

라. 판정 기준

관찰은 철폐 제거 30분 후와 24시간 후에 행하며 피부 반응은 Frosch & Kligman과 The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association (CTFA) guideline을 반영한 다음의 기준에 따라 평가하였다(Table 25, Fig 54).

Table 25. Recording of patch test reactions

기호	Grade	판정 기준
+	1	Slight erythema, either spotty or diffuse
++	2	Moderate uniform erythema
+++	3	Intense erythema with edema
++++	4	Intense erythema with edema & vesicles

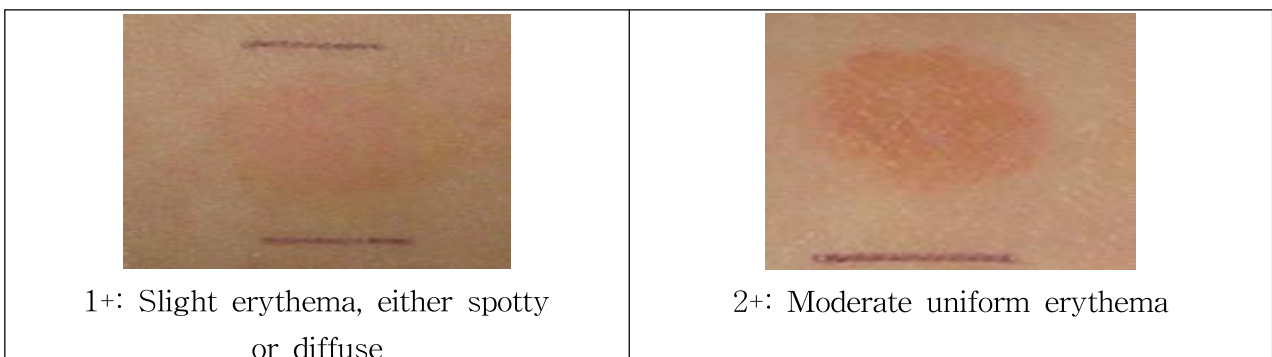




Fig. 54. Clinical standard photographs of visual assessment for human patch test

마. 결과 계산 방법

48시간 및 72시간의 평균 반응도를 비교하였으며, 각 물질에 대한 평균 반응도를 기준으로 하여 그 결과를 판정하였다.

Grade × No. of Responders

$$\text{Mean} = \frac{\sum \text{Grade} \times \text{No. of Responders}}{4 \text{ (Maximum grade)} \times n \text{ (Total Subjects)}} \times 100 \times 1/2$$

3. 시험 결과

가. 시험 대상자

시험 대상자 총 33명이 참여하였으나, 1명이 탈락하여 최종 32명의 피험자가 시험의 전 과정에 참여하였다. 피험자의 평균 연령은 39.94±6.81 세였으며, 최고연령은 49세, 최저 연령은 20세였다. 시험 대상자들의 피부특성은 설문에 의해 조사되었으며, 그 결과는 다음과 같다(Table 26)

Table 26. Skin characteristics of volunteers (n=32)

피부 특성	빈도 (수)	비율 (%)
건성 피부	8	25.00
중건성 피부	13	40.63
중성 피부	7	21.88
중지성 피부	2	6.25
지성 피부	2	6.25
문제성 피부	0	0.00
기타 피부 질환	1	3.13
자극 감수성	3	9.38
따가움 감수성	1	3.13
화장품부작용 (1년 이내)	0	0.00

광민감성	0	0.00
유아습진, 아토피 경험	0	0.00
당기는 느낌	7	21.88

나. 결과

시험물질 6종에서 아무런 피부 반응도 관찰되지 않았다 (Table 27).

Table 27. Results of human skin primary irritation test (n=32)

번호*	시험 물질 명	No. of responder	48hrs			72hrs			반응도		
			1+	2+	3+	1+	2+	3+	48h	72h	Mean
38	네오마스캇 포도가지 추출물 2.0%	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
39	네오마스캇 포도가지 추출물 1.5%	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
40	네오마스캇 포도가지 추출물 1.0%	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
41	네오마스캇 포도가지 추출물 0.5%	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
42	네오마스캇 포도가지 추출물 0.2%	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
43	캠벨 포도 가지 추출물 1.0%	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
44	Squalane (negative control)	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

번호*: 시험물질 도포 순서

4. 결론

본 시험물질 총 6종은 인체 피부 일차자극 측면에서 저자극 범주의 물질로 판단된다.

제 8 절. 시제품의 제조 (제 1세부 및 위탁)

1. 원료의 대량제조

우수한 소재로 선발된 네오마스캇 포도덩굴을 실험에 사용하였다 (Fig. 55). 네오마스캇 포도덩굴은 2009년 9월 초에 충청북도 천안시에서 39.08 kg을 수집하여 증류수로 세척하고 파쇄한 후 추출용매로 80% 에탄올을 사용하여 상온에서 1 시간씩 3 회 반복하여 교반추출하였다. 얻어진 추출액은 여과지로 여과하고 50°C 에서 회전 감압 농축기를 이용하여 농축시킨 후 동결 건조하여 2.06 kg의 갈색가루형태의 덩굴추출물을 얻었고 (Fig. 56), 추출수율은 Table 12와 같다.



Fig. 55. Photograph of grape vine



Fig. 56. Photograph of freeze-dried grape vine extract

Table. 12. Yield of freeze-dried grape vine extract

네오마스캇 포도덩굴	동결건조 추출물	수율
39.08 kg	2.06 kg	5.3%

2. 원료의 용해도 시험

포도덩굴 추출물 원료의 화장품 용매 6종 (1,2-propanediol, diethylene glycol(colorless),

diethylene glycol, dipropylene glycol, 1,3-butandiol, glycerol)에 대한 용해도를 시험하였다. 포도덩굴 추출물을 1% 와 0.5% 농도로 각각 용해하여 본 결과 1,2-propanediol, diethylene glycol(colorless), diethylene glycol에서의 용해도가 높았으며 특히 1,2-propanediol에서의 용해도가 가장 우수하였다.

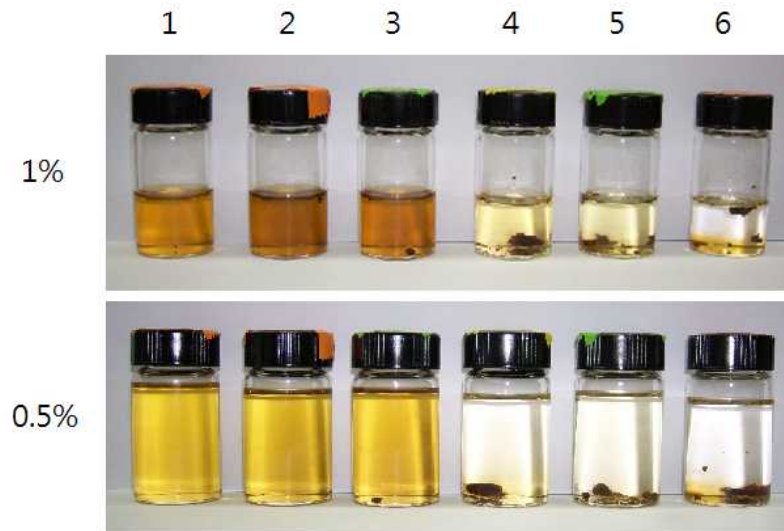


Fig. 57. Solubility of grape vine extract

1: 1,2-propanediol, 2: diethylene glycol(colorless), 3: diethylene glycol, 4: dipropylene glycol, 5: 1,3-butandiol, glycerol

3. 보관기간 및 온도에 따른 색도변화 검정

용해도 실험에서 우수한 용매로 선정된 1,2-propanediol 을 사용하여 0.5% 포도덩굴 용액을 제조하여 온도와 시간에 따른 색도의 변화를 관찰하였다. 제조된 0.5% 포도덩굴 용액은 10 일 간 4°C, 상온, 37°C, 50°C 에 각각 보관하면서 2 일에 한번씩 색차계를 이용하여 색도변화를 측정한 결과 L-수치상 보관온도가 높고 시간이 길어질수록 색의 변화가 높게 나타났으나 50°C에 보관된 용액을 제외한 4°C, 상온, 37°C 보관용액은 육안상의 커다란 색도변화가 나타나지는 않았다.

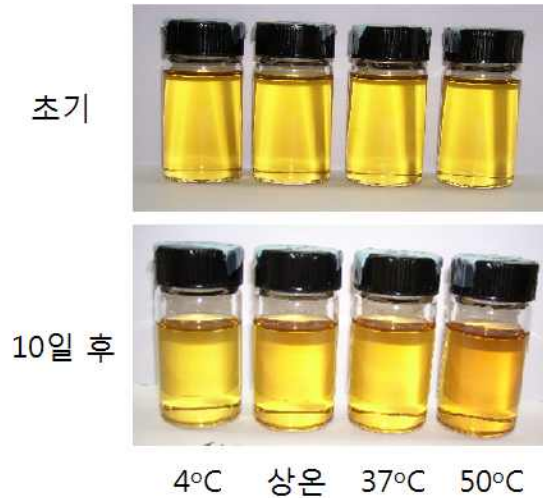


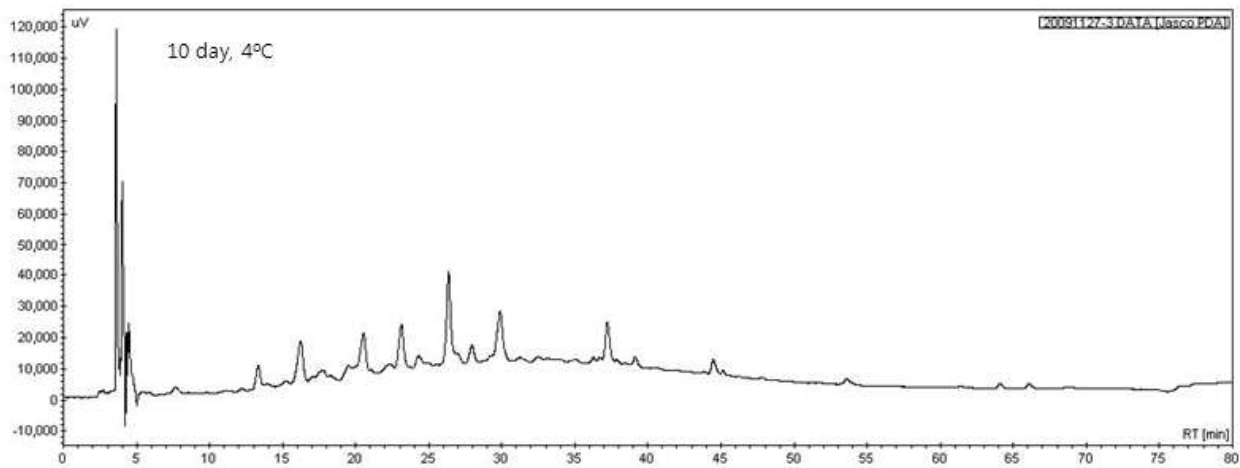
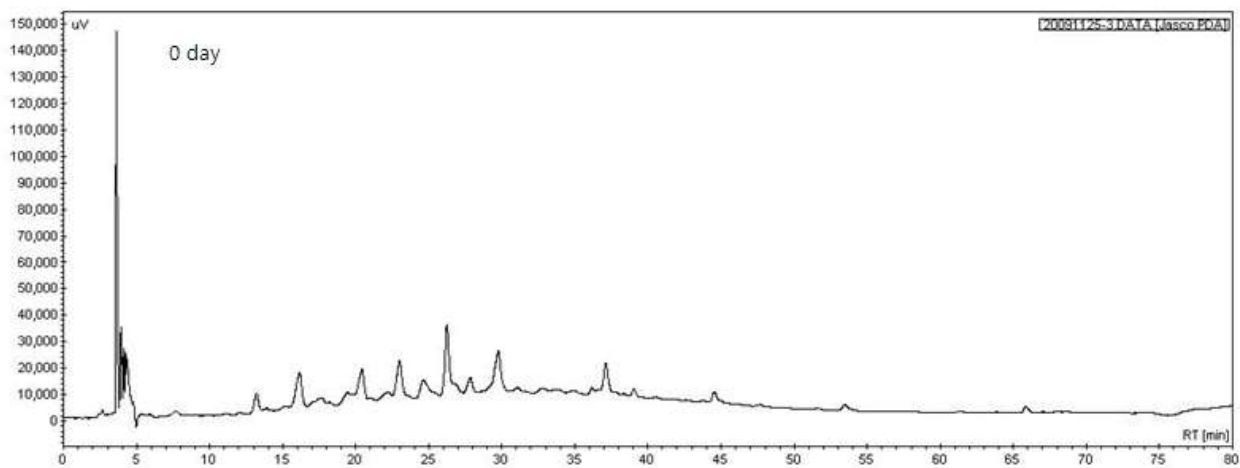
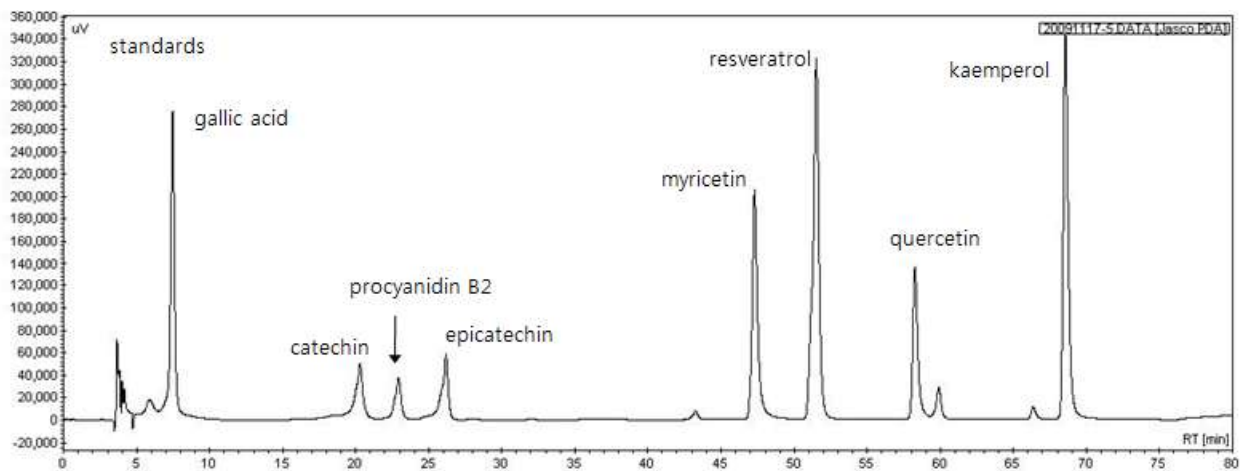
Fig. 58. Color changes of grape vine extract solvent(in 1,2-propanediol)

Table. 13. L-value of grape vine extract solvent(in 1,2-propanediol)

sample	온도(°C)	L	a	b
0.5% 포도덩굴용액 (초기)	4	30.42	-4.38	8.03
	상온	31.66	-4.65	8.12
	37	31.41	-4.59	8.13
	50	30.4	-4.36	8.15
0.5% 포도덩굴용액 (10일 후)	4	27.9	-2.3	7.87
	상온	21.03	-0.6	8.86
	37	18.12	-1.55	6.85
	50	13.84	-0.25	8.03

4. 보관기간 및 온도에 따른 활성성분변화 검정

포도덩굴 추출물을 0.5% 농도로 1,2-propanediol에 녹인 후 10 일간 4°C, 상온, 37°C, 50°C 보관하면서 온도와 시간에 따른 활성성분의 함량변화를 HPLC를 이용하여 측정하였다. 분석조건은 Bondpack C18 (4 um, 300 × 3.9 mm) Column 을 이용하여 이동상은 2% acetic acid가 함유된 water 와 0.5% acetic acid 가 함유된 50% acetonitrile 을 gradient를 주어 0.8 ml/min 의 속도로 용출하였다. Column의 온도는 40°C로 유지 하였으며 시료의 검출은 280 nm에서 측정하였다. Gallic acid, catechin, epicatechin, myricetin, resveratrol, quercetin, kaempferol, procyanidine B2 함량정량결과는 Fig. 59 및 Table 14. 에 나타내었으며 procyanidine B2가 37°C 이상의 온도에서 보관시 소폭 감소하는 경향을 나타내었으나 대부분의 성분이 보관온도 및 기간에 따른 큰 변화는 없었다.



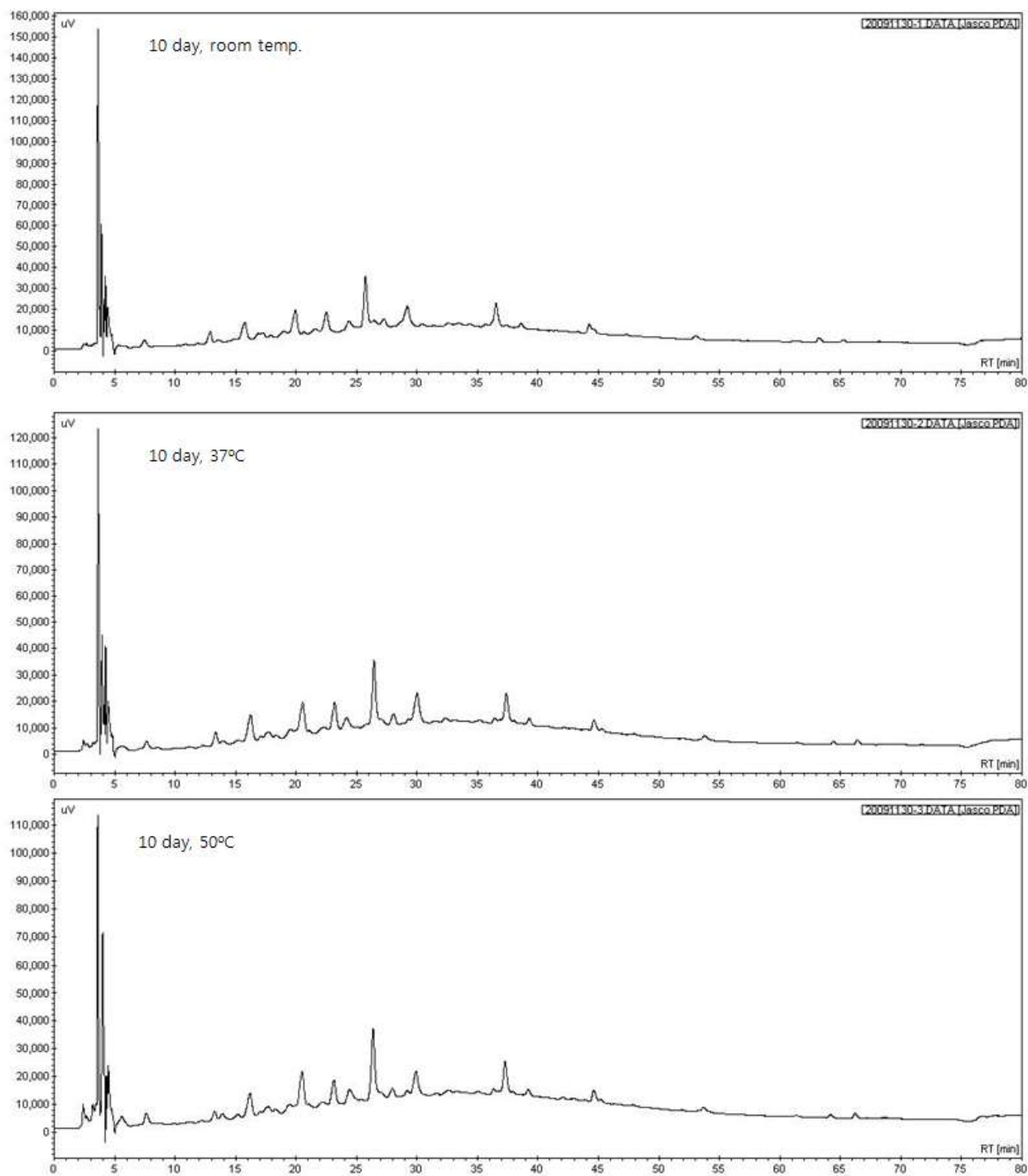


Fig. 59. HPLC chromatography of grape vine extract solvent (in 1,2-propanediol)

Table. 14. Quantitative analysis of ingredients in 0.5% grape vine extract solvent ($\mu\text{g/ml}$)

		gallic acid	catechin	procyanidin B2	epicatechin	myricetin	resveratrol
0 day	-	4.42	30.52	61.42	54.32	0.28	0.12
5 day	4°C	8.12	33.75	51.34	53.34	0.22	0.10
	RT	1.96	37.18	65.83	67.66	0.24	0.07
	37°C	9.73	32.43	35.80	41.17	0.28	0.09
	50°C	3.89	29.73	35.79	35.50	0.30	0.08
10 day	4°C	6.48	31.46	43.55	34.94	0.31	0.07
	RT	2.02	28.19	41.12	40.54	0.35	0.06
	37°C	3.68	26.38	28.59	29.60	0.16	0.09
	50°C	3.79	28.62	28.86	38.80	0.27	0.08

5. 시제품의 제조

제조된 포도덩굴 추출물을 일부 첨가하여 에멀전을 제조하였고 디자인은 Fig 60. 과 같다. 시제품의 전성분은 포도덩굴추출물, 정제수, 부틸렌글라이콜, 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드, 글리세린, 디메치콘, 베타인, 알부틴, 행인오일, 마치현추출물, 디메치콘/비닐디메치콘크로스폴리머, 디에톡시에칠석시네이트, 소듐라우레스설페이트, 카바이/뿌리/줄기추출물, 감초추출물, 백지추출물, 작약추출물, 지실추출물, 천궁추출물, 칩뿌리추출물, 현호색추출물, 보리씨추출물, 석류씨추출물, 연꽃씨추출물, 오이씨추출물, 인삼씨추출물, 하이드로제네이티드레시틴, 수용성콜라겐, 알로에베라잎즙, 목화열매수, 에톡시디글라이콜, 소듐폴리아크릴레이트, C18-21알칸, 트리테세스-6, 비사볼올, 잔탄검, 우릴글루코사이드, 소듐하이알루로네이트, 폴리글리세릴-2디폴리하이드록시스테아레이트, 아르간트리커넬오일, 알란토인, 디소듐이디티에이, 디카프릴릴카보네이트, 소듐메타바이설페이트, 슈크로오스디스테아레이트, 세라마이드3, 나이아신아마이드, 아세틸글루코사민, 마데카소사이드, 아스코빌글루코사이드, 마카다미아씨오일, 보리지씨오일, 서양유채씨오일, 스위트아몬드오일, 해바라기씨오일, 탈크, 디메치콘/메치콘코폴리머, 디메치콘올, 셀룰로오스, 향료, 메칠파라벤, 페녹시에탄올, 프로필파라벤, 부틸파라벤, 에칠파라벤으로 구성하였다.



Fig. 60. Design of cosmetic prototype-product

제 9 절. 시제품의 인체피부안전성 및 미백효능 검정 (제 3세부)

본 시험은 화장품의 인체 피부에 대한 일차자극 유무를 확인 하고자 시행 하였다.

1. 시제품의 인체 피부에 대한 일차자극 시험

가. 시험 물질

Table 15. Name of tested materials supplied from sponsor

번호*	시험 물질 명	유효성분	성상	시험 농도
25	싸이닉 화이트 에멀전 (SCINIC White emulsion) -시험제품	-포도씨 추출물 -포도덩굴 추출물 -알부틴	에멀전	As is
26	싸이닉 화이트 에멀전 (SCINIC White emulsion) -대조제품		에멀전	As is
28	Squalane (negative control)			As is

번호*: 시험물질 도포 순서

나. 시험 물질

(1) 시험 대상자

피험자 선정기준 및 제외기준에 부합되는 18세 ~ 60세의 남성 또는 여성 30명 이상을

대상으로 실시하였다.

각각의 지원자들은 세부적인 사항에 따른다는 서면 동의서에 서명을 하였으며, 숫자로 된 고유 번호를 부여하였다.

다. 선정 기준

다음 기술된 조건에 부합되는 지원자를 시험 대상군으로 선정한다.

- (1) 18세 ~ 60세의 남녀로 피부 질환이 없는 건강한 자
- (2) 시험에 앞서 시험의 목적, 내용 등에 대해 충분히 설명을 듣고 자발적으로 서면 동의서에 서명한 지원자
- (3) 시험기간 동안 실험에서 요구하는 사항에 잘 협조하고 이상한 증상이 있으면 즉시 연락을 할 의향이 있는 자
- (4) 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 지원자

라. 제외 기준

다음 기술된 항목에 해당되는 지원자는 시험 대상군에서 제외한다.

- (1) 임신 중이거나 수유 중 또는 6개월 이내에 임신을 계획하고 있는 여성
- (2) 시험 부위에 문신, 흉터, 화상 등이 있어서 scoring을 방해하는 경우
- (3) 감염성 피부 질환 또는 기타 시험의 목적에 방해되는 피부질환이 있는 경우
- (4) 현재 치료중인 약물이 피부반응에 영향을 주는 경우
- (5) 화장품, 의약품 또는 일상적인 광 노출에 자극이 심하거나 알러지가 있는 자
- (6) 아토피성 피부를 가진 자
- (7) 피임제, 항히스타민제, 소염제를 복용하고 있는 자
- (8) 모공각화증 또는 피부 묘기증이 있는 경우
- (9) 첩포용 테이프에 자극이나 알러지가 심한 자
- (10) 동시에 다른 시험에 참여하고 있는 경우
- (11) 이전의 동일 시험에 참여하고 4주 이상 경과하지 않은 경우
- (12) 기타 위의 사항들 외에 임상시험 책임자의 판단으로 임상시험이 곤란하다고 판단되는 경우

마. 제한 사항

- (1) 피험자는 첩포를 붙이고 있는 동안 시험부위(등)에 물이 닿지 않도록 하였다.
- (2) 신체의 치료를 위한 약을 복용하거나 사용하는 경우 시험 담당자에게 통지하도록 하였다.

바. 시험 대상자 수 및 산출 근거

피험자 수는 기능성 화장품 등의 심사에 관한 규정¹²⁾의[별표 1] 독성시험법 7항 (1)인체 첩포 시험방법에 근거하여 30명 이상을 선정하여 시행 하였다.

사. 시험 중지 및 탈락 기준

본 시험과정 중 시험 일정을 준수하지 않는 피험자의 경우는 계속적 참여의사를 물어

중단여부를 결정하였으며, 기타 부작용, 추적관찰 불가능 및 프로토콜을 어기는 일이 발생하였을 때는 시험을 중단토록 하였다.

- (1) 피험자가 임상시험 참여동의를 철회한 경우
- (2) 시험 중 시험물질에 의한 부작용이 심각한 경우
- (3) 갑작스런 사고나 질환의 병발 현상으로 시험의 진행이 불가능한 경우
- (4) 기타 시험자의 판단에 의해 시험수행에 지장이 있다고 생각되는 경우

자. 시험 재료

IQ chamber: Chemotechnique Diagnostics AB (Sweden)

Micropore tape: 3M / Medical-Surgical Division

Microman (M250): Gilson, France

Marking pen: Skin marker Slim (Sweden)

차. 시험 방법

- (1) 시험 부위는 70% ethanol로 세척한 뒤 건조시켰다.
- (2) 시험물질은 의뢰사에서 제공한 상태 그대로 적용하였다.
- (3) 시험물질 20 μ l를 IQ chamber 내에 적하시킨 후 시험부위인 등 부위에 얹어 micropore tape으로 고정시켰다.
- (4) 첩포는 48시간 동안 도포하며, 첩포를 제거한 후에는 skin marker로 시험 부위를 표시하고 30분, 24시간 후에 각 시험 부위를 관찰하였다.

파. 판정 기준

관찰은 첩포 제거 30분 후와 24시간 후에 행하며 피부 반응은 Frosch & Kligman¹⁾과 The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association (CTFA) guideline^{2,4)}을 반영한 다음의 기준에 따라 평가하였다(Table 2).

Table 16. Recording of patch test reactions

기호	Grade	판정 기준
+	1	Slight erythema,either spotty or diffuse
++	2	Moderate uniform erythema
+++	3	Intense erythema with edema
++++	4	Intense erythema with edema & vesicles

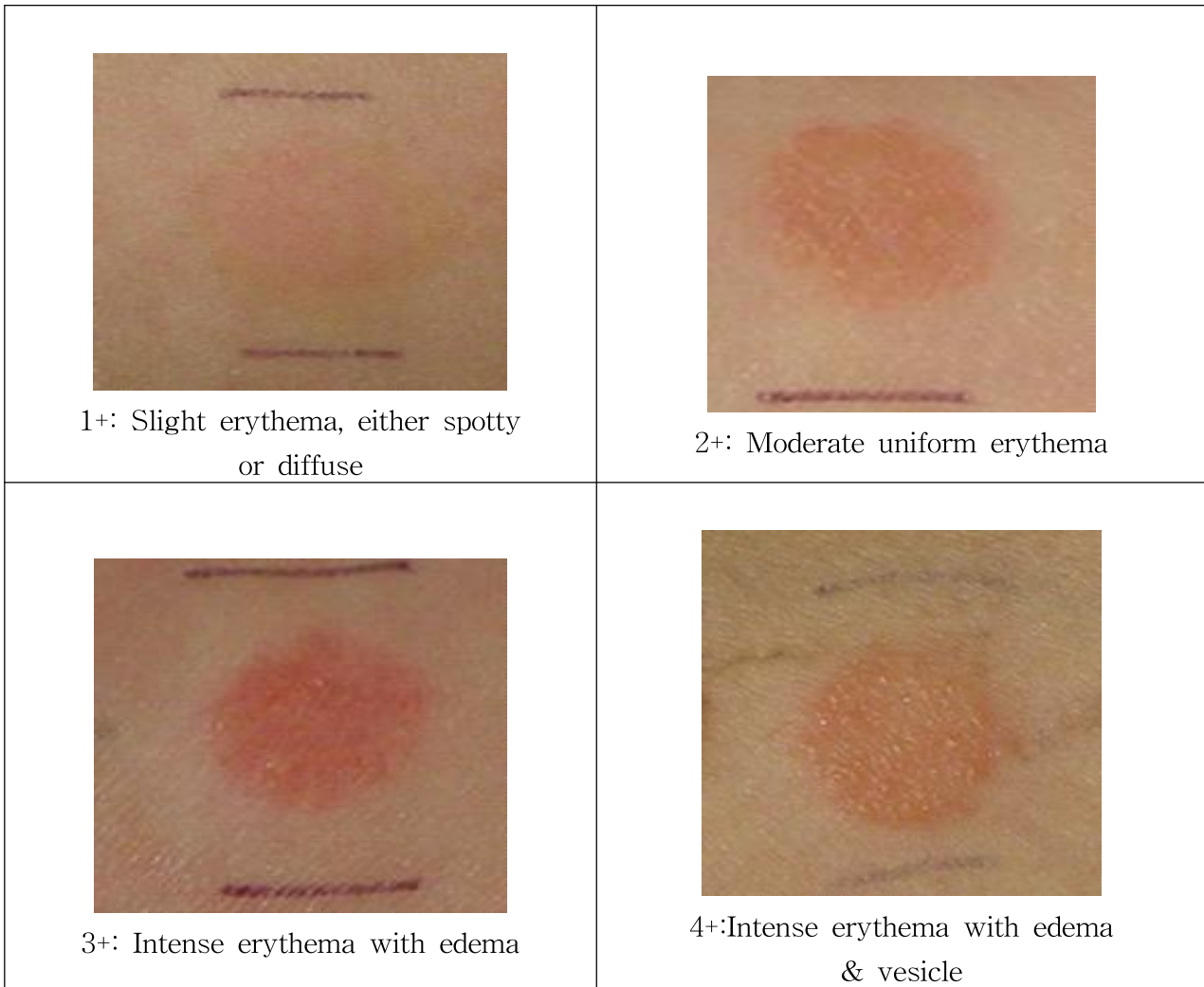


Fig. 61. Clinical standard photographs of visual assessment for human patch test

카. 결과 계산 방법

48시간 및 72시간의 평균 반응도를 비교하였고, 각 물질에 대한 평균 반응도를 기준으로 하여 그 결과를 판정하였다.

$$\text{Mean} = \frac{\sum (\text{Grade} \times \text{No. of Responders})}{4 (\text{Maximum grade}) \times n(\text{Total Subjects})} \times 100 \times 1/2$$

타. 시험 결과

(1) 시험 대상자

시험 대상자 총 31명이 본 시험의 전 과정에 참여하였다. 피험자들의 평균 연령은 37.8 ± 6.4 세였으며, 최고 연령자는 50세, 최저 연령자는 25세였다. 시험 대상자 들의 피부특성은 설문에 의해 조사되었으며, 그 결과는 다음과 같다 (Table 17).

Table 17. Skin characteristics of volunteers

(n=31)

피부 특성	빈도 (수)	비율 (%)
건성 피부	11	35.48
중건성 피부	15	48.39
중성 피부	1	3.23
중지성 피부	3	9.68
지성 피부	1	3.23
문제성 피부	0	0.00
기타 피부 질환	0	0.00
자극 감수성	4	12.90
따가움 감수성	0	0.00
화장품부작용 (1년 이내)	0	0.00
광 민감성	0	0.00
유아습진, 아토피 경험	0	0.00
당기는 느낌	7	22.58

(2) 결과

본 시험물질에서는 아무런 피부반응도 관찰되지 않았다(Table 18).

Table 18. Results of human skin primary irritation test

(n=31)

번호 *	시험 물질명	No. of respo nder	48hr			72hr			반응도		
			1+	2+	3+	1+	2+	3+	48h	72h	Me an
25	싸이닉 화이트 에멀전 (SCINIC White emulsion) -시험제품	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
26	싸이닉 화이트 에멀전(SCINIC White emulsion) -대조제품	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
28	Squalane (negative control)	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

번호*: 시험물질 도포 순서

파. 결론

본 시험물질은 인체 피부 일차자극 측면에서 저자극 범주의 물질로 판단된다.

2. 시제품의 인체 피부에 대한 미백효능 시험

가. 시험 제품

- (1). 제품명: 싸이닉 화이트 에멀전
- (2). 제품의 보관: 실온보관
- (3). 제품의 유효성분: 포도씨 추출물, 포도덩굴 추출물, 알부틴
- (4). 제품의 사용방법: 8주 동안 1일 2회 아침, 저녁으로 제품 A, B를 각 시험부위에 바르고 충분히 흡수시킨다. 피험자는 block randomization을 통해 두 그룹으로 나누어 A그룹은 위로부터 제품 A, 제품 B 순으로 바르게 하고, B그룹은 위로부터 제품 B, 제품 A 순으로 바르게 하였다.

나. 시험 방법

본 시험은 병력조사 및 피부상태 진단을 통해 시험목적에 적합한 피험자를 선정하였다. 선정된 피험자의 전박 부위에 자외선 조사 후 MED를 결정하고 MED의 3~5.5배에 해당하는 자외선을 전박 2부위에 조사하여 인공적으로 색소침착을 유발시켰다. 색소침착 부위에 8주간 제품A와 제품B를 1일 2회 바르도록 하였다. 제품사용 전과 제품사용 2주, 4주, 6주, 8주 후 시점에서 육안평가를 통해 피부색 변화를 관찰하고 사진촬영을 실시하였다. 또한 Mexameter MX 18 (C+K, Germany)와 Spectrophotometer CM-2500d (Minolta, Japan)를 이용한 기기측정과 설문에 의한 피부 미백효과를 평가하였고, 시험자의 관찰 및 질의응답을 통해 피부 안전성을 평가하였다.

다. 통계 분석

모든 데이터의 통계적 유의성은 SPSS Package Program 11.5을 이용하였으며, 동일 피험자에 게서 반복 측정된 데이터에 존재하는 상호의존성(교호작용)을 고려하기 위해 반복측정 분산분석법(Repeated Measures ANOVA)을 적용하였다. 각 시점별 군간 비교는 제품사용 전의 값을 보정하여 비교하는 공분산분석(ANCOVA)을 이용하였고, 시점별 전후 비교는 RM ANOVA를 이용하여 확인하였다.

라. 시험 결과

(1). 피험자 특성

총21명의 여성 피험자가 본 시험에 참여하여 시험 종료 시까지 전 과정을 성실히 수행하였다. 시험에 참여한 피험자 특징과 피부특성을 분석해 보면 다음과 같다(Table 19).

Table 19. Skin characteristics of volunteers (n=21)

Item	Classification	Frequency (n)	Percentage (%)
광 피부 타입 (Fitzpatrick skin type)	I	0	0.00
	II	0	0.00
	III	16	76.19
	IV	5	23.81
연 령	20대	2	9.52
	30대	5	23.81
	40대	14	66.67

(2). 피부 미백효과

(가). Mexameter MX 18을 이용한 멜라닌 지수 측정

시험군과 대조군의 제품사용 전과 사용 2주, 4주, 6주, 8주 후 시점에서 멜라닌 지수 측정을 통해 피부색 개선 정도를 평가하였다.

각 시점별로 측정된 시험군과 대조군의 멜라닌 지수 값을 RM ANOVA를 이용하여 분석하였다(Table 20,21 Fig. 62).

Table 20. Melanin index of control group and test group

Group	Week	N	Mean ^{**}	SEM	SD
대조군	0주	21	221.75	8.35	38.26
	2주	21	209.86	7.87	36.07
	4주	21	202.36	7.75	35.50
	6주	21	198.05	7.50	34.36
	8주	21	191.24	7.46	34.16
시험군	0주	21	225.43	8.11	37.17
	2주	21	210.36	7.41	33.95
	4주	21	203.94	7.60	34.81
	6주	21	199.10	7.45	34.15
	8주	21	190.37	7.08	32.44

※멜라닌 측정값은 감소할수록 피부 미백효과를 보임.

Table 21. Statistical evaluations of melanin index by RM ANOVA

Hotelling's Trace	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
GROUP	0.006	0.124	1.000	20.000	0.729
WEEKS	5.997	25.486	4.000	17.000	0.000*
GROUP * WEEKS	0.358	1.521	4.000	17.000	0.240

*Significantly different at $p < 0.05$.

Table 21의 Group*Week(군간*주간변화)에서 볼 수 있듯이 교호작용이 존재하지는 않으나 시점별(Week) 멜라닌값에 유의한 차이가 있음을 알 수 있다. 따라서 각 시점별 군간 차이를 알아보기 위해 ANCOVA를 이용하여 분석하였으며, 또한 시험군과 대조군의 각 시점별 전후 변화는 RM ANOVA를 이용하여 통계적 유의성을 확인하였다(Table 22, 23).

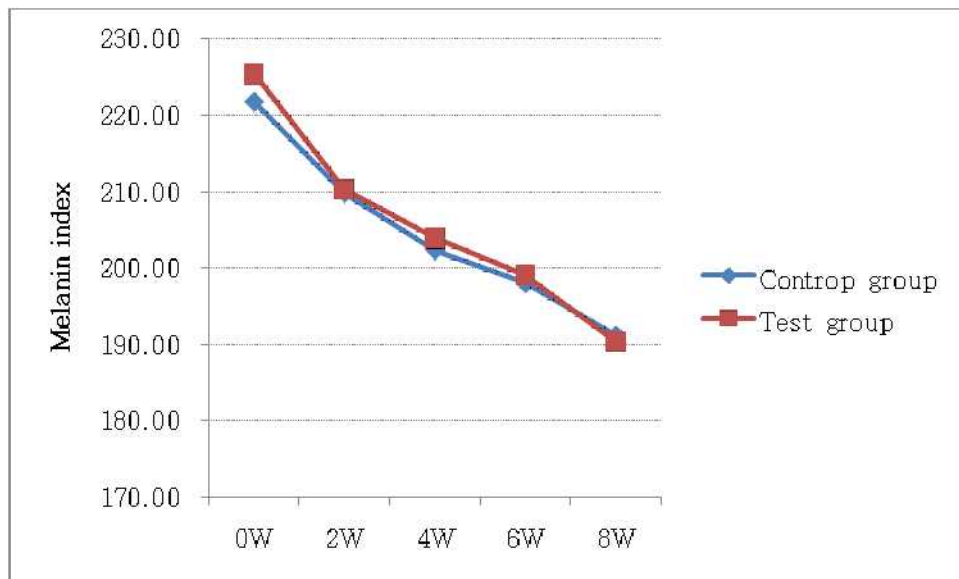


Fig. 62 Melanin index of control group and test group
* $p < 0.05$ vs. before treatment (0W).

① 각 시점별 군간 비교

분석결과 각 평가시점에서 시험군과 대조군 간에 멜라닌 값의 유의한 차이는 없었다(Table 22).

Table 22. Comparison of melanin index on control and test group

Group	Week	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	<i>p</i> -value*
시험군 vs. 대조군	2주	83.931	1	83.931	1.398	0.244
	4주	31.856	1	31.856	0.375	0.544
	6주	48.021	1	48.021	0.438	0.512
	8주	157.561	1	157.561	0.955	0.335

*Significantly different at $p < 0.05$ compared with control group.

※ 각 시점별 군간 변화량은 ANCOVA를 적용, 0주차 값을 보정하여 분석하였음.

② 각 시점별 전후 변화 분석

분석결과 시험군과 대조군 모두 제품사용 전과 비교시 사용 2주 후부터 8주 후 시점까지 유의한 피부 미백효과를 보였다($p < 0.05$, Table 23).

Table 23. Changes of melanin index in control group and test group comparing with each time point of after treatment against before treatment

Group	Week	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	<i>p</i> -value	<i>p</i> -value Bonferroni
대조군	2주 vs. 0주	2967.625	1	2967.625	56.170	0.000	0.000*
	4주 vs. 0주	7888.048	1	7888.048	81.245	0.000	0.000*
	6주 vs. 0주	11792.646	1	11792.646	80.209	0.000	0.000*
	8주 vs. 0주	19545.621	1	19545.621	82.821	0.000	0.000*
시험군	2주 vs. 0주	4764.984	1	4764.984	53.448	0.000	0.000*
	4주 vs. 0주	9699.941	1	9699.941	99.995	0.000	0.000*
	6주 vs. 0주	14561.807	1	14561.807	123.162	0.000	0.000*
	8주 vs. 0주	25816.080	1	25816.080	142.215	0.000	0.000*

*Significantly different at $p < 0.05$ compared with before use.

(나). Spectrophotometer CM-2500d를 이용한 피부색 측정

제품사용 전과 사용 2주, 4주, 6주, 8주 후 시점에서 Spectrophotometer CM-2500d를 이용하여 각 시점별 L*, a*, b* 값을 측정하였다.

- L*: Luminance parameters (명도인자 밝기)
- a*: Chrominance parameters (색채인자 green-to-red)
- b*: Chrominance parameters (색채인자 blue-to-yellow)

각 시점별로 측정된 시험군과 대조군의 L* 값을 RM ANOVA를 이용하여 분석하였다(Table 24, 25, Fig. 63).

Table 24. L*(brightness) value by Spectrophotometer

Group	Week	N	Mean [*]	SEM	SD
대조군	0주	21	59.65	0.49	2.25
	2주	21	60.49	0.49	2.24
	4주	21	61.09	0.46	2.12
	6주	21	61.78	0.40	1.83
	8주	21	62.37	0.45	2.04
시험군	0주	21	59.54	0.46	2.11
	2주	21	60.43	0.47	2.17
	4주	21	61.15	0.47	2.15
	6주	21	61.84	0.44	2.02
	8주	21	62.59	0.46	2.11

※ 피부색(L*) 측정값은 증가할수록 피부 미백효과를 보임.

Table 25. Statistical evaluations of L*(brightness) value by RM ANOVA

Hotelling's Trace	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
GROUP	0.001	0.029	1.000	20.000	0.866
WEEKS	11.887	50.518	4.000	17.000	0.000*
GROUP * WEEKS	0.410	1.743	4.000	17.000	0.187

*Significantly different at $p < 0.05$.

Table 25의 Group*Week (군간*주간변화)에서 볼 수 있듯이 교호작용이 존재하지는 않으나 시점별(Week)로 L* 값에 유의한 차이가 있음을 알 수 있다. 각 시점별 군간 차이를 알아보기 위해 ANCOVA를 이용하여 분석하였으며, 또한 시험군과 대조군의 각 시점별 전후 변화는 RM ANOVA를 이용하여 통계적 유의성을 확인하였다(Table 26).

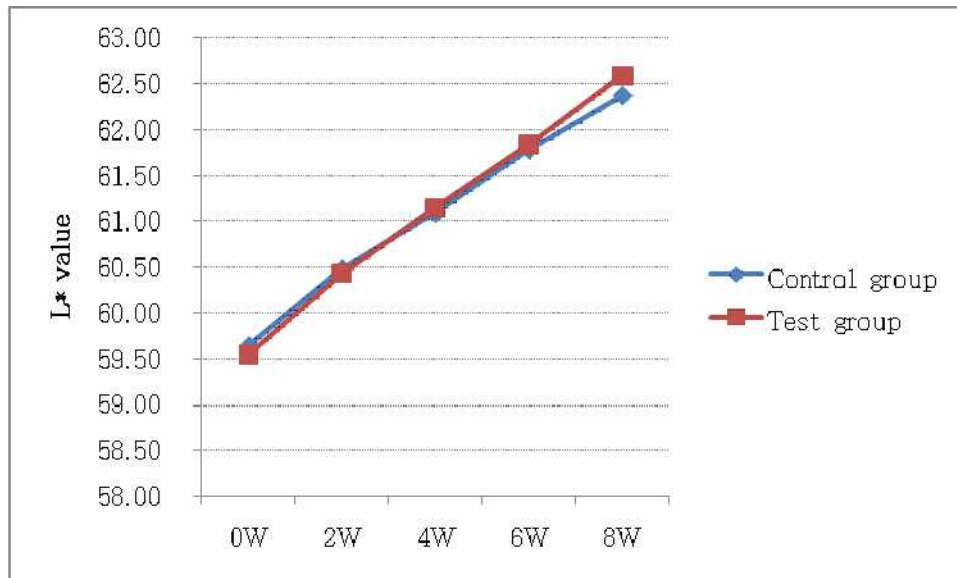


Fig. 63. L* value of control group and test group
 * $p < 0.05$ vs. before treatment (0W).

① 각 시점별 군간 비교

분석결과 각 평가시점에서 시험군과 대조군 간에 피부 밝기의 유의한 차이는 없었다($p < 0.05$, Table 26).

Table 26. Comparison of L* value on control and test group

Group	Week	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
시험군 vs. 대조군	2주	0.021	1	0.021	0.048	0.828
	4주	0.246	1	0.246	0.601	0.443
	6주	0.192	1	0.192	0.280	0.600
	8주	0.957	1	0.957	1.045	0.313

*Significantly different at $p < 0.05$ compared with control group.

※ 각 시점별 군간 변화량은 ANCOVA를 적용, 0주차 값을 보정하여 분석하였음.

② 각 시점별 전후 변화 분석

분석결과 시험군과 대조군 모두 제품사용 전과 비교시 사용 2주 후부터 8주 후 시점까지 유의한 피부 미백효과를 보였다($p < 0.05$, Table 27).

Table 27. Changes of L* values on control group and test group before and after treatment

Group	Week	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Sig. Bonferroni
대조군	2주 vs. 0주	14.784	1	14.784	26.399	0.000	0.000*
	4주 vs. 0주	43.863	1	43.863	133.089	0.000	0.000*
	6주 vs. 0주	95.958	1	95.958	124.216	0.000	0.000*
	8주 vs. 0주	156.020	1	156.020	134.445	0.000	0.000*
시험군	2주 vs. 0주	16.510	1	16.510	56.391	0.000	0.000*
	4주 vs. 0주	54.080	1	54.080	106.736	0.000	0.000*
	6주 vs. 0주	110.401	1	110.401	118.269	0.000	0.000*
	8주 vs. 0주	194.439	1	194.439	232.462	0.000	0.000*

*Significantly different at $p < 0.05$ compared with before use.

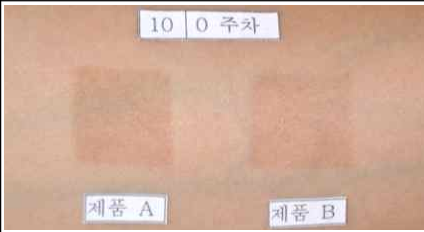

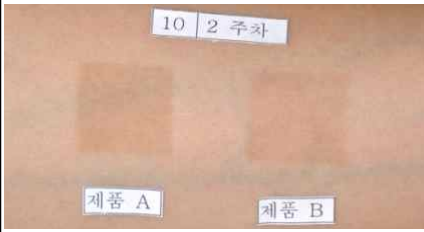


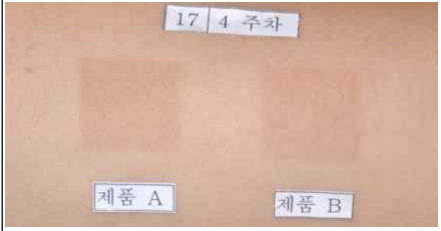




Week	#10	#17
0W		
2W		
4W		
6W		
8W		

Fig. 64 Change images of skin color (Digital camera, Subject No.10, 17)

제 10 절. 고찰

캠벨, 네오마스캇(청포도), MBA(머루포도) 품종의 포도를 껍질, 과육, 덩굴, 씨로 나누어 80%에탄올로 추출하여 미백관련활성을 측정하고, 캠벨덩굴, 네오마스캇 덩굴 추출물과 세품종의 씨 추출물이 우수한 tyrosinase 억제활성, melan-a 세포에서의 색소생성억제활성, 자외선 차단효과 등을 나타내었다. 특히 캠벨덩굴, 네오마스캇 덩굴 추출물은 아직까지 보고나 특허출원된 바 없는 새로운 미백원료로 씨 추출물보다 세포독성이 적은 장점을 가지고 있었다. 한편 다른 포도시료는 유의적인 효과를 나타내지 않았으나 MBA포도 껍질에서 tyrosinase 억제효과와 melan-a 세포에서의 멜라닌 감소효과를 관찰할 수 있었다. 이들의 활성성분을 구명하기 위하여 HPLC를 이용하여 7종의 flavonoid의 함량을 정량한 결과 캠벨덩굴

과 MBA덩굴 추출물에는 gallic acid, catechin, epicatechin, myricetin, resveratrol, quercetin, kaempferol 이 모두 함유되어 있었으며 씨 추출물에는 gallic acid, catechin, epicatechin, myricetin 4 종만이 높은 함량으로 함유되어 있었다. 이들 성분의 미백활성을 검정한 결과 epicatechin, resveratrol, quercetin이 melan-a 세포에서 멜라닌 생합성을 감소시킴을 확인 하였고 따라서 이들이 포도덩굴의 미백활성에 기여하는 것으로 판단된다. 또한 우수한 소재로 도출된 포도덩굴 추출물로부터 세포에서의 활성추적법을 이용하여 추가적인 활성물질을 정제하고 구조분석하여 procyanidin B2 임을 구명하였고 이의 tyrosinase 억제활성, melan-a 세포에서의 색소생성억제활성, 자외선 차단효과를 검정하였으며 검정결과 melan-a 세포에서 kojic acid보다 우수한 멜라닌억제효과를 나타냄을 확인하였다. 이 성분은 tyrosinase 억제활성이 kojic acid 보다 낮아 다른 색소억제기전이 있는 것으로 추정되며 네오마스캇 덩굴내 함량을 정량하여 이 물질이 포도덩굴의 미백활성에 기여함을 확인하였다. 포도껍질에 대하여는 4 종의 anthocyanidin 성분 (cyanidin, peonidin, pelargonidin, malvidin)을 정량하여 함량 및 활성을 확인하였다.

MBA 씨 추출물, 네오마스캇 덩굴 추출물이나 procyanidin B₂ 모두의 경우 α-MSH 처리된 B-16 cell에서 tyrosinase 발현량은 억제함을 볼 수 있었으나 MITF 발현량에는 아무런 영향을 주지 못하였다. 배양조건 및 세포의 상태에 따라 α-MSH에 의한 MITF 발현이 달라 질 수 있겠으나 MITF의 발현에 변화 없이 tyrosinase 발현이 sample에 의해 줄었다는 것은 sample이 CREB의 인산화 및 Erk의 활성화 보다 PI3K의 활성화에 관련 할 수 있다는 것을 의미한다. 즉 α-MSH에 의한 PI3K 저해효과를 PI3K 활성화를 통해 상쇄시키는 pathway를 생각해 볼 수 있을 것이다. 이상의 결과는 MBA 씨 추출물, 네오마스캇 덩굴 추출물이나 procyanidin B₂의 melanin 생성 억제 기전이 비슷하다는 의미이나 procyanidin B₂는 포도씨의 경우와는 다르게 Trp-2의 발현은 줄어드는 것으로 관찰되었다.

Brown guinea pig 의 등 부분에 자외선-B 으로 피부색소과침착을 유도하고 네오마스캇 포도덩굴 추출물을 1 일 2 회 총 8 주간 도포한 결과 농도의존적인 피부색완화효과를 확인할 수 있었고 실험기간동안 피부발적 등의 이상징후는 관찰되지 않았다. 또한 포도덩굴 추출물을 1%로 증류수에 녹여 GLP 기관인 한국화학시험 연구원에 독성테스트를 의뢰한 결과 단회투여독성, 안점막자극, 피부자극, 피부감작성, 광독성, 광감작성의 6가지 테스트 모두에서 독성, 자극성 및 감작성이 없었다. 또한 인체피부 일차자극시험 결과 포도덩굴 추출물이 1%와 2% 함유된 증류수 용액 모두에서 자극성이 낮은 소재로 판별되었다.

본 연구의 결과 우수한 미백 화장품 소재로 도출된 포도덩굴 추출물의 용해도 시험 결과 1,2-propanediol에 높은 용해도를 나타냈고 10 일간 4°C, 상온, 37°C, 50°C 보관하면서 온도와 시간에 따른 색도와 활성성분의 함량변화를 측정된 결과 L-수치상 보관온도가 높고 기간이 길어질수록 색의 변화가 높게 나타났으나 50°C에 보관된 용액을 제외한 4°C, 상온, 37°C 보관용액은 육안상의 커다란 색도변화가 나타나지는 않았다. 또한 gallic acid, catechin, epicatechin, myricetin, resveratrol, quercetin, kaempferol, procyanidine B₂ 함량정량결과는 procyanidine B₂가 37°C 이상의 온도에서 보관시 소폭 감소하는 경향을 나타내었으나 대부분의 성분이 보관온도 및 시간에 따른 큰 변화는 없었다.

제조된 포도덩굴 추출물을 첨가하여 에멀전을 제조하였고 이의 인체피부 일차자극시험 결과 자극성이 낮은 소재로 판별되었고 인체피부 미백효능 평가결과 사용전에 비하여 사용 2 주후부터 유의적인 피부 미백효과를 나타내었다.

따라서 본 연구개발을 통하여 개발된 포도덩굴소재 및 이를 첨가한 화장품은 피부독성 및 자극성이 낮고 유의적인 미백효능을 나타내어 미백화장품으로써의 우수한 결과를 나타내었다.

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연도	세부연구개발 목표	달성도	관련분야의 기술발전에의 기여도
1차 년도	2007	포도과 식물 부산물의 미백활성 검정	100%	포도부산물로부터 우수활성을 검정, 도출하여 새로운 미백천연자원 확보
		활성성분의 규명	100%	활성추적법을 이용한 성분 분리 및 동정을 통한 활성성분 규명
		추출물 등의 분자수준에서 미백 활성 기전 규명	100%	활성기전경로의 규명 및 학술논문 게재
2차 년도	2008	<i>In vivo</i> 효능검정 등 구체적 미백활성평가	100%	포도덩굴자원의 brown guinea pig 피부색소억제 활성 검정을 통한 피부부작용 및 유효성 여부 판별
		활성성분유도체 탐색	100%	우수활성성분 도출 및 정량 완료
		활성성분등의 분자수준에서 미백 활성 기전 규명	100%	활성물질의 피부색소억제 기전 규명으로 과학적기반 확립
		인체피부 안전성 확인	100%	안전성 확보를 위한 인체 피부 자극성 여부 확인
3차 년도	2009	활성성분 고함유 미백원료제조 및 적용시험	100%	개발된 새로운 화장품원료의 제조 및 화장품적용을 위한 용해도, 색도제형시험 완료
		인체에서의 미백효능평가	100%	개발시제품의 인체 피부색소 억제에 대한 효과 검정
		시제품의 제조 및 제품개발	100%	개발원료를 첨가하여 미백화장품 신제품제조
최종		포도과 식물 부산물의 미백활성 검정 및 우수자원 도출	100%	우수미백활성자원 검색 및 도출 완료
		포도과 식물 부산물 유래 미백 활성물질 규명	100%	활성단일성분 규명 및 원료내 함량정량
		미백활성기전 규명	100%	활성경로의 추적 및 규명을 통한 과학적 기반 확립
		인체에서의 안정성 및 활성검정	100%	개발 원료 및 시제품의 인체에서의 일차피부자극성 및 활성 여부 검정
		포도과 식물 부산물을 이용한 미백화장료 개발	100%	도출원료를 이용한 새로운 미백제품개발로 관련분야의 국내경쟁력 상승

제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

* 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

본 연구를 통해 개발된 원료를 첨가한 미백화장품 시제품 제조시험이 완료 되어 참여기업인 (주)필리오에 유상기술이전 후 전국적인 규모의 인터넷 쇼핑몰을 통하여 판매할 예정이었으나 최근 (주)커머스플래닛으로 합병되어 예기치 않게 대기업으로 분류됨. 이에 따른 기술료의 급격한 증가로 인하여 특허등록 후 타 중소기업으로의 기술이전을 적극 추진하고자함.

* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

본 연구를 통하여 개발된 포도 부산물 미백원료는 특허출원을 완료 하였고 (피부미백용 화장품 조성물 10-2008-0079279) 의 논문 실적으로는 학술논문게재 2건 (머루포도 씨 추출물의 α -Melanin Stimulating Hormone으로 자극한 B16세포에서 melanin 생성억제 효과, Korean J. Plant Res 등) 게재승인 1건 (Inhibitory Effects of Neo Muscat Grape Vine Extracts on Melanin Biosynthesis. JKABC(SCIE), 투고 1건 (Comparison of Anthocyanin and Phenolic Ingredient Contents in Different Varieties of Vitis vinifera, Korean J. Plant Res.) 있다. 또한 활성성분과 관련된 내용을 논문작성중에 있으며 SCI급 논문에 투고할 예정이다.

* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

상품화 연구까지 진행되어 당장의 추가연구는 필요치 않고 향후 원료의 개량 및 미백화장품의 고급화 등에 대한 연구에 활용될 수 있을 것으로 판단되며 개발원료를 활용한 새로운 화장품 제조시에는 제형에 대한 추가연구가 필요함.

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

최근 미국 FDA가 피부색소조절물질인 hydroquinone에 대한 사용허용유지여부에 대한 검토에 들어간 것으로 알려지면서 hydroquinone를 대체할 스킨 라이트닝 원료의 수요가 크게 증가될 것으로 예상된다. 여기에 천연물에 대한 관심증대에 따라 천연화장품시장이 확대되고 있으며 특히 유럽시장의 경우 무 화학 화장품에 대한 소비자들의 높은 수요와 이에 따른 공급 증가로 2010 년 천연 화장품 시장 수익은 20 억 유로를 달성할 것으로 예상된다. 또한 미국의 천연 및 오가닉 제품 시장 규모는 43 억 달러이며 2010 년에는 66 억 달러로 2 년간 약 50%의 성장률을 보일 것으로 예측되어 대체화장품으로 여겨지던 천연화장품이 화장품시장의 주력상품으로 바뀌고 있다.

제 7 장. 참고문헌

- Abdel-Malek, Z., V.B. Swope, I. Suzuki, C. Akcali, M.D. Harriger, S.T. Boyce, K. Urabe and V.J. Hearing. 1995. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:1789-1793.
- Anastasiadi, M., Chorianopulos, N. G., Nychas, G. E., and Haroutounian, S.A. 2009. Antilisterial Activities of Polyphenol-Rich Extracts of Grapes and Vinification Byproducts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57: 457-463.
- Cho, Y. J., Kim, J. E., Chun, H. S., Kim, C. T., Kim, S. S., and Kim, C. J. 2003. Contents of Resveratrol in Different Parts of Grapes. *Korean Journal of Food Science and Technology* 35: 306-308.
- Falchi, M., Bertelli, A., Scalzo, R., Morassut, M., Morelli, R., Das, S., Cui, J., and Das, D. 2006. Comparison of Cardio-protective Abilities between the Flesh and Skin of Grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54: 6613-6622.
- Fournand, D., Vicensm, A., Sidhoum, L., Souquet, J., Moutounet, M., and Cheynier, V. 2006. Accumulation and Extraactability of Grape Skin Tannins and Anthocyanins at Different Advanced Physiological Stages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54: 7331-7338.
- Han JY, Sung J, Kim DJ, Jeong HS, and Lee JS (2008) Inhibitory Effects of Methanol Extract and Its Fractions from Grape Seeds on Mushroom Tyrosinase. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37, 1679-1683.
- Heo JC, Woo SU, Kweon MA, Kim BB, Lee SH, Lee JM, Choi JU, Chung SK, and Lee SH (2007) Analysis of Immunomodulating Activities in Methanol Extracts from Several Kinds of Grapes. *Korean J Food Preserv* 14, 419-424.
- Hosoi, J., E. Abe, T. Suda and T. Kuroki. 1985. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 45:1474-1478.
- Hwang, E. Y., and Choi, S. Y. 2006. Quantitative Analysis of Phenolic Compounds in Different Parts of Panax ginseng C.A. Meyer and Their Inhibitory Effect on Melanin Biosynthesis. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 14: 148-152.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., and Sebastiani, L. 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and analysis* 21: 589-598.
- Jang, J.Y., J.H. Lee, B.W. Kang, K.T. Chung, Y.H. Choi and B.T. Choi. 2008. Dichloromethane fraction of Cimicifuga heracleifolia decreases the level of melanin synthesis by activating the ERK or AKT signaling pathway in B16F10 cells. *Exp. Dermatol.* 18:232-237.
- Kammerer, D., Claus A., Carle, R., and Schieber, A. 2006. Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal*

- of Agriculture and Food Chemistry. 52: 4360–4367.
- Kar, P., D. Laight, K.M. Shaw and M.H. Cumming. 2006. Flavonoid-rich grape seed extracts: a new approach in high cardiovascular risk patients?. *Int. J. Clin. Pract.* 60:1484–1492.
- Katiyar SK (2008) Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: inhibition of oxidative stress and protection of immune system. *Mol Nutr Food Res* 52, 71–76.
- Kim, D.S., Y.M. Jeong, I.K. Park, H.G. Hahn, H.K. Lee, S.B. Kwon, J.H. Jeong, S.J. Yang, U.D. Sohn and K.C. Park. 2007. A New 2-Imino-1,3-thiazoline Derivative, KHG22394, Inhibits Melanin Synthesis in Mouse B16 Melanoma Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 30:180–183.
- Kim, Y., Kim, R., Choi, H. D., and Choi, I. W. 2009. Optimization of the Alcoholic Fermentation of Concentrated Grape Juice Using Response Surface Methodology. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition.* 38: 116–120.
- Lee, J., E. Jung, J. Lee, S. Huh, Y.C. Boo, C.G. Hyun, Y.S. Kim and D. Park. 2007. Mechanism of melanogenesis inhibition by 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *Br. J. Dermatol.* 157:242–248.
- Lee P (2009) Inhibitory Effects of Muscat Bailey A Seed Extract on Melanin Production in α -Melanin Stimulating Hormone-stimulated B16 Cells. *Korean J Plant Res* 22, 477–482.
- Lee, Y. C., Hwang, H. J., and Oh, S. S. 2002. Antioxidative Properties of Grape Seed Extract. *Food Engineering Progress.* 6: 165–171.
- Luque-Rodriguez, J. M., Luque de Castro, M. D., and Perez-Juan, P. 2007. Dynamic Superheated Liquid Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from the Red Grape Skins of Wine-making Residues Bioresource Technology. 98: 2705–2713.
- Maeda, K., T. Naitou, K. Umishio, T. Fukukara and A. Motoyama. 2007. A Novel Melanin Inhibitor: Hydroperoxy Traxastane-Type Triterpene from Flowers of *Arnica montana*. *Biol. Pharm. Bull.* 30:873–879.
- Ministry of Agriculture and Forestry. 2007. Agricultural and Forestry Statistical Yearbook, Republic of Korea.
- Miyagi Y., K. Miwa and H. Inoue. 1997. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *Am. J. Cardiol.* 80:1627–31.
- Miyamura, Y., S.G. Coelho, R. Wolber, S.A. Miller, K. Wakamatsu, B.Z. Zmudzka, S. Ito, C. Smuda, T. Passeron, W. Choi, J. Batzer, Y. Yamaguchi, J.Z. Beer and V.J. Hearing. 2006. Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment. Cell Res.* 20:2–13.
- Oh Y.S., J.H. Lee, S.H. Yoon, C.H. Oh, D.S. Choi, E. Choe and M.Y. Jung. 2008. Characterization and Quantification of Anthocyanins in Grape Juices Obtained from the Grapes Cultivated in Korea by HPLC/DAD, HPLC/MS, and HPLC/MS/MS. *J. Food Sci.* 73:378–389.
- Ohguchi, K., Y. Akao and Y. Nozawa. 2005. Involvement of calpain in melanogenesis of mouse B16 melanoma cells. *Mol. Cell. Biochem.* 275:103–107.
- Park, S. J., Lee, H. Y., and Oh, D. H. 2003. The Free-Radical Scavenging Effect of Seed

- and Skin Extracts from Campbell Early Grape (*Vitis labruscana* B.), *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 32: 115-118.
- Park, S. J., and Oh, D. H. 2003. The Free-Radical Scavenging Effect of Seed and Skin Extracts of Black Olympia Grapes. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 35: 121-124.
- Park, S. J., Park, B. K., Lee, H. Y., and Oh, D. H. 2002. The Biological Activities of Ethanol Extracts and Fractions of Black Olympia Grapes. *Korean Journal of Food Preservation*. 9: 338-344.
- Park, Y. S., Heo, J. Y., Kim, I. J., Heo, S. J., Kim, K. H., Jeong, B. C., and Park, S. M. 2005. Growth and Fruit Characteristics of *Vitis amurensis* Rupr., Collected in Gangwondo. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 13: 226-233.
- Schwahn, D.J., W. Xu, A.B. Herrin, E.S. Bales and E.E. Medrano. 2001. Tyrosine levels regulate the melanogenic response to alpha-melanocyte-stimulating hormone in human melanocyte: Implications for pigmentation and proliferation. *Pigment. Cell Res*. 14:32-39.
- Shin HJ, Kang BS, Ahn JB, and Kim B (2007) Isolation and Purification of Resveratrol from a Grape Twig. *Korean J Biotechnol Bioeng* **22**, 351-355.
- Solano, F., S. Briganti, M. Picardo and G. Ghanem. 2006. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res*. 19:550-571.
- Suzuki, I., R.D. Cone, S. Im, J. Nordlund and Z.A. Abdelmalkek. 1996. Binding of Melanotropic Hormones to the Melanocortin Receptor MC1R on Human Melanocytes 韓資植誌 *Korean J. Plant Res*. 22(5) : 477-482(2009)
- Terra X, Valls J, Vitrac X, Merrillon JM, Arola L, Ardevol A, Blade C, Fernandez-Larrea J, Pujadas G, Salvado J, and Blay M (2007) Grape-seed procyanidins act as anti-inflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFkB signaling pathway. *J Agric Food Chem* **55**, 4357-4365.
- Vian, M. A., Tomao, V., Coulomb, P. O., Lacombe, J. M., and Dangles, O. 2006. Comparison of Anthocyanin Composition During Ripening of Syrah Grapes Grown Using Organic or Conventional Agricultural Practices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54: 5230-5235.
- Vitseva, O., S. Varghese, S. Chakrabarti, J.D. Folts and J.E. Freedman. 2005. Grapeseed and skin extracts inhibits platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 46:445-451.
- Yamakoshi J, Otsuka F, Sano A, Tokutake S, Saito M, Kikuchi M, and Kubota Y (2003) Lightening Effect on Ultraviolet-Induced Pigmentation of Guinea Pig Skin by Oral Administration of a Proanthocyanidin-Rich Extract from Grape Seeds. *Pigment Cell Res*. **16**, 629-638.
- Yamakoshi J, Sano A, Tokutake S, Saito M, Kikuchi M, Kubota Y, Kawachi Y, and Otsuka F (2004) Oral Intake of Proanthocyanidin-Rich Extract from Grape Seeds Improves Chloasma. *Phytother Res* **18**, 895-899.

- Yamaguchi, Y., M. Brenner and V.J. Hearing. 2007. The Regulation of Skin Pigmentation. *J. Biol. Chem.* 282:27557-27561.
- Yilmaz, Y., and Toledo, R. 2004. Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 52: 255-260.
- Yoo, M. A., Chung, H. K., and Kang, M. H. 2004. Optimal Methods of Extracting Antioxidant Compounds from the Coats of Grape Dregs. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 36: 134-140.
- Zi SX, Ma HJ, Li Y, Liu W, Yang QQ, Zhao G, and Lian S (2009) Oligomeric proanthocyanidins from grape seeds effectively inhibit ultraviolet-induced melanogenesis of human melanocytes in vitro. *Int J Mol Med* **23**, 197-204.