	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0092398 (43) 공개일자 2011년08월18일
<hr/>		
(51) Int. Cl. <i>A61K 8/97</i> (2006.01) <i>A61Q 19/02</i> (2006.01) <i>A61Q 19/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0011786 (22) 출원일자 2010년02월09일 심사청구일자 2010년02월09일	(71) 출원인 재단법인 제주테크노파크 제주특별자치도 제주시 아라일동 4-8 (72) 발명자 현창구 제주특별자치도 제주시 일도2동 삼화아파트 나동 106호 윤원중 제주특별자치도 제주시 노형동 1047-10 (뒷면에 계속) (74) 대리인 강경찬	

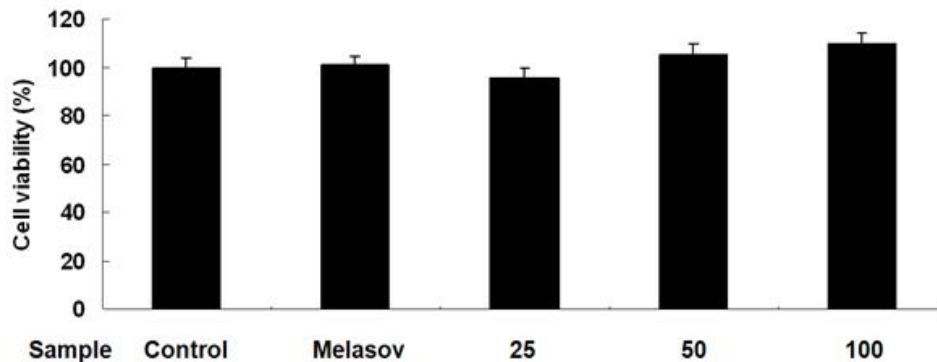
전체 청구항 수 : 총 4 항

#### (54) 섬오갈피 근피 성분인 아칸토산을 이용한 피부 미백제 조성물

##### (57) 요약

본 발명은 섬오갈피 근피의 주요 성분인 아칸토산을 이용한 피부 미백제 조성물을 개시한다. 본 발명의 피부 미백제 조성물에 유효성분으로 포함되는 아칸토산은 멜라노마 세포인 B16F10에 처리되었을 때 멜라닌 생성을 억제하고, 멜라닌의 생성에 관여하는 주요 효소인 티로시나아제, TRP-1 및 TRP-2의 생성을 억제할 뿐만 아니라, 이들 단백질의 발현을 촉진하는 전사인자인 MIFT의 활성을 저해한다.

##### 대표도 - 도1



(72) 발명자

**김민진**

제주특별자치도 제주시 용담동 138-11번지

**이육재**

충청북도 청주시 흥덕구 개신동 개신푸르지오아파트 408동 504호

**이남호**

제주 제주시 아라2동 1148번지 프로빌아파트 104동 202호

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

섬오갈피 근피 추출물 또는 아칸토산을 유효성분으로 포함하는 피부 미백제 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 피부 미백제 조성물은 화장품 조성물인 것을 특징으로 하는 피부 미백제 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 피부 미백제 조성물은 비누 조성물인 것을 특징으로 하는 피부 미백제 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 피부 미백제 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 피부 미백제 조성물.

## 명 세 서

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 섬오갈피 근피 성분인 아칸토산을 이용한 피부 미백제 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 피부 미백이 멜라닌 색소와 직접적으로 관련되어 있다는 것은 널리 알려진 사실이다. 멜라닌은 자외선을 차단하여 진피 이하의 피부 기관을 보호해주는 동시에, 피부 생체 내에 생겨난 자유 라디칼 등에 의한 피부내 단백질과 유전자들의 손상을 보호해 주는 유용한 역할을 하지만, 멜라닌이 필요 이상으로 많이 생기게 되면 피부 노화를 가져오며 기미나 주근깨 등과 같은 과색소침착증을 유발한다.

[0003] 멜라닌 합성은 멜라노솜 내에 존재하는 티로시나제 및 티로시나제 관련 단백질의 작용에 의하여 이루어진다. 구체적으로 티로시나제(tyrosinase)에 의하여 티로신(tyrosine)이 산화되어 도파(DOPA, 3,4-dihydroxyphenylalanine)로, 이어 도파옥시다제(dopaoxidase)의 작용으로 도파가 다시 산화되어 도파퀴논(dopaquinone)으로 바뀐 후, 티로시나제 관련 단백질(tyrosinase related protein)인 TRP-1(5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase)과 TRP-2(dopachrome tautomerase)의 작용에 의하여 멜라닌을 생성한다.

[0004] 티로시나제, TRP-1 및 TRP-2는 전사인자 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)에 의해 발현이 촉진된다(DS Kim, et al., J Cell Sci. 2003;116:1699-706).

[0005] 따라서 티로시나제, TRP-1, TRP-2, MITF의 발현이 저해될 경우 미백 효과를 기대할 수 있다.

[0006] 한국 특허 제0864174호(인삼, 당귀, 감초 등의 복합생약추출물), 한국 특허 제0679275호(새발 추출물), 한국 공개특허 제2008-0022315호(비롱 추출물) 등이 미백 효과로서 티로시나제, MITF, TRP-1 및 TRP-2의 발현 저해 활성을 개시하고 있다.

[0007] 한편 아칸토산은 민간약으로 신경통, 중풍, 요통 등에 사용되어 온 제주도 자생 식물인 섬오갈피(*Acanthopanax koreanum*)의 근피(根皮)에 다량 함유된 성분으로, 패혈증, 관절염, 염증, 간경변, 규폐증, 간기능 보전, 진통 소염 작용 등이 있는 것으로 알려져 있다(Kim, Y. H. et al., J. Nat. Pro., 51, 1080(1988); Kang, H. S. et

al., Mediat. Inflamm., 7, 257(1998); Lee, Y. S. et al., J. Appl. Pharmacol., 9, 176-182(2001); Kang, H. S. et al., Cell. Immunol., 170, 212-221(1996)).

[0008] 본 발명은 섬오갈피 근피 성분인 아칸토산의 티로시나제, MITF, TRP-1 및 TRP-2의 발현 저해 활성 등을 개시한다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 섬오갈피 근피 성분인 아칸토산을 이용한 피부 미백제 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 구체적인 목적인 이하에서 제시될 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자는 하기 실시예에서 확인되는 바와 같이, 섬오갈피 근피 성분인 아칸토산을 멜라노마 세포인 B16F10에 처리하였을 때, 멜라닌 생성이 억제됨과 함께, 티로시나제, MITF, TRP-1 및 TRP-2의 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다.

[0012] 본 발명의 피부 미백제 조성물은 상기 실험 결과에 기초하여 제공되는 것이다.

[0013] 따라서 본 발명의 피부 미백제 조성물은 섬오갈피 근피 추출물 또는 아칸토산을 유효성분으로 포함함을 특징으로 한다.

[0014] 전술하였지만, 아칸토산은 섬오갈피의 근피의 주요 성분이다(Kim, Y. H. et al., J. Nat. Pro., 51, 1080(1988)) 그러므로 아래의 실시예가 섬오갈피 추출물이 명시적으로 멜라닌 생성 억제 활성을 개시하고 있지 않더라도, 당업자의 통상의 능력에 비추어 볼 때 섬오갈피 근피 추출물이 이러한 멜라닌 생성 억제 활성을 가질 것임은 자명하다.

[0015] 본 명세서에서 "섬오갈피 근피 추출물"은 추출 방법을 불문하고 추출 대상인 섬오갈피 근피를 증류수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름, 메틸렌 클로라이드, 또는 이들의 혼합 용매에 침지시켜 추출하여 얻어진 조추출물과 그 조추출물을 상기 열거된 용매로 분획된 추출물을 포함하는 의미로서 이해된다. 추출 방법을 불문하므로, 추출 대상을 추출 용매에 침지시키는 단계를 통하여 추출되는 한, 추출 방법은 냉침, 환류, 가온, 초음파 방사 등 임의의 방식이 모두 적용될 수 있다. 분획된 추출물의 경우 상기 조추출물을 특정 용매에 현탁시킨 후 다른 극성의 용매와 혼합·정제시켜 얻은 분획물, 상기 조추출물을 소수성 또는 친수성 레진이 충전된 칼럼에 흡착시킨 후 상기 용매를 이동상으로 하여 얻은 분획물을 포함하는 의미이다. 상기 추출물의 의미에는 추출 용매가 제거된 농축된 액상의 추출물 또는 고형상의 추출물이 포함된다.

[0016] 또한 본 명세서에서, "피부 미백"은 멜라닌의 생성이 저해됨에 따른 결과로서 이해되는데, 구체적으로는 멜라닌의 생성에 의한 증상, 예컨대 기미, 주근깨, 피부노화 등의 예방, 발현 지연 또는 치료를 의미한다.

[0017] 또한 본 명세서에서, "유효성분"의 의미는 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.

[0018] 본 발명의 피부 미백제 조성물은 유효성분인 아칸토산 또는 섬오갈피 근피 추출물 이외에, 피부 미백 효과를 상승 또는 보강시킬 수 있도록 피부 미백 효과가 있다고 이미 알려진 여타의 공지된 화합물이나 식물 추출물을 포함할 수 있으며, 나아가 앞으로 밝혀질 피부 미백 효과를 갖는 화합물이나 식물 추출물을 포함할 수 있다.

[0019] 여기서 상기 여타의 화합물이나 식물 추출물로서는 멸캅토숙신산, 멸캅토텍스트란, 테프레논, 디하이드록시-이소퀴놀린, 인도메타신, 3-하이드록시마늘, 비타민 K, 티아졸리돈, 키누레닌, 레몬 추출물, 오이 추출물, 오디 추출물, 감초 추출물, 로즈마리 추출물, 아세로라 체리 추출물, 은행 추출물, 카롭(carob) 추출물, 제라늄(geranium) 추출물, 허브 추출물 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 위 예시된 바의 화합물 또는 식물 추출물은 본 발명의 피부 미백제 조성물에 그 유효성분인 섬오갈피 근피 추출물 또는 아칸토산과 함께 하나 이상 포함될 수 있다.

[0021] 한편 본 발명의 피부 미백제 조성물에 있어서, 그 유효성분은 용도, 제형(화장품, 비누, 연고 등) 등에 따라 그것의 인체への 독성을 미치지 않는 범위 내에서 임의의 양으로 포함될 수 있는데, 구체적으로 조성물 전체 중량

에 비하여 0.05 중량 % 내지 15.00 중량 %로 포함될 수 있다.

- [0022] 본 발명의 피부 미백제 조성물은 구체적인 양태에 있어서, 화장품 조성물로서 파악될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 피부 미백제 조성물이 화장품 조성물로서 파악될 경우, 그 화장품 조성물은 다양한 형태로 제조될 수 있는데, 예컨대, 에멀전, 로션, 크림(수중유적형, 유중수적형, 다중상), 용액, 현탁액(무수 및 수계), 무수 생성물(오일 및 글리콜계), 젤, 마스크, 팩, 분말 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 피부 미백제 화장품 조성물은 그 유효성분을 포함하는 이외에 화장품 제제에 있어서 수용 가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [0025] 여기서 "화장품 제제에 있어서 수용 가능한 담체"란 화장품 제제에 포함될 수 있는 이미 공지되어 사용되고 있는 화합물 또는 조성물이거나 앞으로 개발될 화합물 또는 조성물로서 피부와의 접촉 시 인체가 적응 가능한 이상의 독성, 불안정성 또는 자극성이 없는 것을 말한다.
- [0026] 상기 담체는 본 발명의 피부 미백제 화장품 조성물에 그것의 전체 중량에 대하여 약 1 중량 % 내지 약 99.99 중량 %, 바람직하게는 조성물의 중량의 약 50 중량% 내지 약 99 중량 %로 포함될 수 있다.
- [0027] 그러나 상기 비율은 본 발명의 화장품의 제조되는 기술한 바의 형태에 따라 또 그것의 구체적인 적용 부위(얼굴이나 손)나 그것의 바람직한 적용량 등에 따라 달라지는 것이기 때문에, 상기 비율은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.
- [0028] 한편 상기 담체로서는 알코올, 오일, 계면활성제, 지방산, 실리콘 오일, 습윤제, 보습제, 점성 변형제, 유제, 안정제, 자외선 차단제, 발색제, 향료 등이 예시될 수 있다.
- [0029] 상기 담체로서 사용될 수 있는 알코올, 오일, 계면활성제, 지방산, 실리콘 오일, 습윤제, 보습제, 점성 변형제, 유제, 안정제, 자외선 차단제, 발색제, 향료의 성분들은 이미 당업계에 공지되어 있기 때문에 당업자라면 적절한 해당 물질/조성물을 선택하여 사용할 수 있다.
- [0030] 한편, 본 발명의 피부 미백 조성물은 다른 구체적인 양태에 있어서 약제학적 조성물로 파악될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 피부 미백제 조성물이 약제학적 조성물로 파악될 경우, 그 약리 효과는 멜라닌의 증가에서 비롯되는 질병에 대한 치료 또는 예방 효과로서 파악될 수 있으며, 상기 피부 미백은 상기 질병의 치료 또는 예방의 결과로서 이해될 수 있다.
- [0032] 상기 멜라닌의 증가에서 비롯되는 질병으로서는 기미, 주근깨, 피부 노화 등을 의미한다.
- [0033] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분을 포함하는 이외에 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 등을 포함하여, 경구용 제형(정제, 현탁액, 과립, 에멀전, 캡슐, 시럽 등), 비경구형 제형(멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액), 국소형 제형(용액, 크림, 연고, 젤, 로션, 패치) 등으로 제조될 수 있다.
- [0034] 상기에서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(처방) 대상이 적응 가능한 이상의 독성(충분히 낮은 독성)을 지니지 않는다는 의미이다.
- [0035] 약제학적으로 허용되는 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 전분(예컨대 옥수수 전분, 감자 전분 등), 셀룰로오스, 그것의 유도체(예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸셀룰로오스 등), 맥아, 젤라틴, 탈크, 고체 윤활제(예컨대 스테아르산, 스테아르산 마그네슘 등), 황산 칼슘, 식물성 기름(예컨대 땅콩 기름, 면실유, 참기름, 올리브유 등), 폴리올(예컨대 프로필렌 글리콜, 글리세린 등), 알긴산, 유화제(예컨대 TWEENS), 습윤제(예컨대 라우릴 황산 나트륨), 착색제, 풍미제, 정제화제, 안정화제, 항산화제, 보존제, 물, 식염수, 인산염 완충 용액 등을 들 수 있다. 이러한 담체는 본 발명의 약제학적 조성물의 제형에 따라 적당한 것을 하나 이상 선택하여 사용할 수 있다.
- [0036] 부형제도 본 발명의 약제학적 조성물의 제형에 따라 적합한 것을 선택하여 사용할 수 있는데, 예컨대 본 발명의 약제학적 조성물이 수성 현탁제로 제조될 경우에 적합한 부형제로서는 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 히드로프로필메틸셀룰로오스, 알긴산 나트륨, 폴리비닐피롤리돈 등의 현탁제나 분산제 등을 들 수 있다. 주사액으로 제조되는 경우 적합한 부형제로서는 링거액, 등장 염화나트륨 등을 들 수 있다.
- [0037] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으나, 통상적으로는 외용제 제형으로 피부에 국소적으로 직접 투여될 것이다.
- [0038] 본 발명의 약제학적 조성물은 그 1일 투여량이 통상 0.001 ~ 150 mg/kg 체중 범위이고, 1회 또는 수회로 나누어

투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중, 환자의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되는 것이므로 상기 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 아니 된다.

[0039] 본 발명의 피부 미백제 조성물은 또 다른 구체적인 양태에 있어 비누 조성물로서 파악될 수 있다.

[0040] 본 발명의 피부 미백제 조성물이 비누 조성물로서 파악될 경우에, 본 발명의 비누 조성물은 비누 기재에 홍해삼 추출물을 포함하여 제조될 수 있으며, 첨가제로서 피부 보습제, 유화제, 경수연화제 등을 포함하여 제조될 수 있다.

[0041] 상기 비누 기재로서는 야자유, 팜유, 대두유, 파마자유, 올리브유, 팜핵류 등의 식물유지 또는 우지, 돈지, 양지, 어유 등의 동물유지 등이 사용될 수 있고, 상기 피부 보습제로서는 글리세린, 에리트리톨, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 펜틸렌글리콜, 헥실글리콜, 이소프로필미리스테이트, 실리콘 유도체, 알로에베라, 솔비톨 등이 사용될 수 있으며, 상기 유화제로서는 천연오일, 왁스 지방알콜, 탄화수소류, 천연식물 추출물 등이 사용될 수 있으며, 상기 경수연화제로서는 테트라소듐 이디티에이 등이 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 비누 조성물은 또한 첨가제로서 향균제, 분산제, 거품억제제, 용매, 물때 방지제, 부식 방지제, 향료, 색소, 금속이온 봉쇄제, 산화방지제, 방부제 등을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명의 비누 조성물에 있어서, 비누 기재나 첨가제는 당업계에 일반적으로 사용되고 있는 함량으로 포함될 수 있는데, 비누 기재는 일반적으로 비누 조성물의 전체의 함량을 기준으로 하였을 때 99.9 중량 % 내지 50 중량 %로 첨가될 수 있으며, 첨가제는 1 중량 % 내지 20 중량 %로 첨가될 수 있다.

### 발명의 효과

[0044] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 아칸토산 또는 섬오갈피 근피 추출물을 이용한 피부 미백제 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명의 피부 미백제 조성물은 화장품 조성물 또는 비누 조성물로 제품화되어 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 아칸토산이 멜라노마 세포인 B16F10에 대해 세포독성을 보이지 않음을 보여주는 MTT assay 결과이다.

도 2는 아칸토산이 마우스 멜라노마 세포인 B16F10에 처리되었을 때 농도-의존적으로 멜라닌의 생성을 저해함을 보여주는 결과이다.

도 3은 아칸토산이 마우스 멜라노마 세포인 B16F10에 처리되었을 때 농도-의존적으로 티로시나아제 생성을 저해함을 보여주는 결과이다.

도 4는 아칸토산이 마우스 멜라노마 세포인 B16F10에 처리되었을 때 농도 의존적으로 멜라닌 생성에 관여하는 단백질인 티로시나아제, TRP-1, TRP-2 및 MIFT의 생성을 저해함을 보여주는 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하 본 발명의 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0047] <실시예 1> 세포 배양

[0048] 마우스 멜라노마 세포인 B16F10 세포는 penicillin-streptomycin 100 units/ml과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지 (GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 4일에 한 번씩 계대배양을 시행하였다.

[0049] <실시예 2> 세포독성 평가

[0050] 아칸토산이 B16F10 세포의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포독성을 평가하였다. B16F10 세포 ( $2 \times 10^4$  cells/ml)를 96 well plate에 접종하고, 18시간 전 배양 후 아칸토산(25, 50 and 100  $\mu$ M)을 처리하여 3일 동안 37℃, 10% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다. 여기에 PBS 2 mg/ml의 농도로 제조한 MTT 용액 200  $\mu$ l를 첨가하고 동일한 배양 조건으로 4 시간을 배양하였다. 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 200  $\mu$ l를 가하여 세포를 완전히 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라솔브(melasolv)(40  $\mu$ M)를 양성 대조군

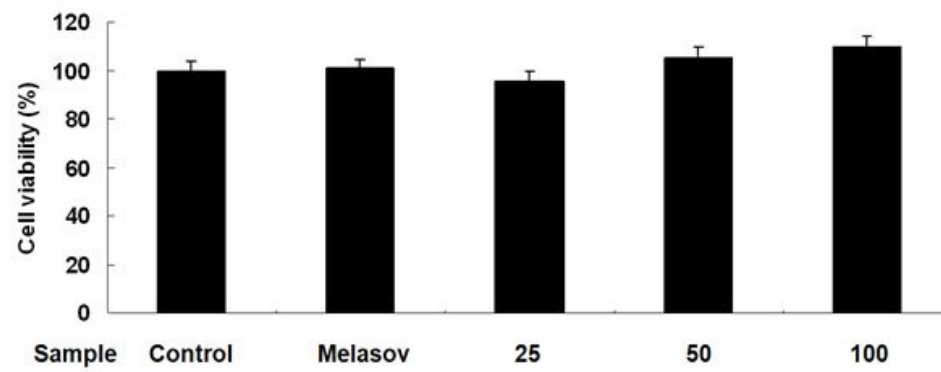


으로 사용하였다.

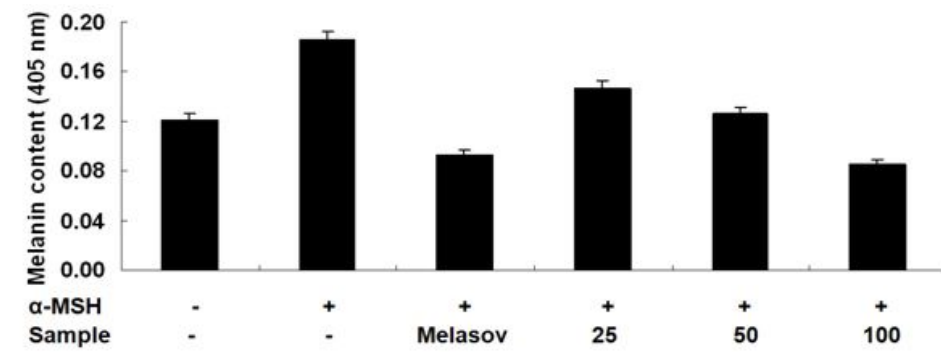
- [0051] 결과를 <도 1>에 나타내었는데, <도 1>를 참조하여 보면 아칸토산은 무처리군인 음성대조군과 비교할 때 세포 독성을 보이지 않음을 알 수 있다.
- [0052] <실시예 3> 멜라닌 합성 저해율 측정
- [0053] B16F10 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여  $1 \times 10^5$  cells/ml로 조절한 후 6 well plate에 접종하고, 18시간 전 배양 후 아칸토산(25, 50 and 100  $\mu$ M) 또는 멜라솔브(melasolv)(40  $\mu$ M)를 멜라닌 형성 자극제인  $\alpha$ -MSH(50 nM)와 함께 처리하여 3일간 37°C, 10% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다. 3일 후 Plate의 배지를 제거 후 PBS를 이용하여 2번 세척하였다. 세척된 세포를 수확하여 1 N NaOH를 첨가하여 세포를 완전히 녹인 후 405 nm에서 ELISA로 측정하였다.
- [0054] 결과를 <도 2>에 나타내었는데, <도 2>의 결과를 보면 아칸토산이 농도-의존적으로 멜라닌의 생성을 저해함을 알 수 있다.
- [0055] <실시예 4> 세포내 티로시나아제 생성 저해율 측정
- [0056] B16F10 세포를 6 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/ml로 접종하고, 18시간 전 배양 후 아칸토산(25, 50 and 100  $\mu$ M) 또는 멜라솔브(melasolv)(40  $\mu$ M)를 멜라닌 형성 자극제인  $\alpha$ -MSH(50 nM)와 함께 처리하여 3일간 배양하였다. 3일 후 Plate의 배지를 제거 후 PBS를 이용하여 2번 세척하였고, 1% Triton X-100을 500uL 넣고 cell scraper로 세포를 수거하였다. 수거된 세포는 -70°C에서 급속 냉동시킨 후 해동시켰으며 이와 같은 방법을 3번 반복하여 세포막을 파괴하였다. 15000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상층액을 취하여 10 nM L-DOPA와 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8)를 첨가하여 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰으며 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0057] 결과를 <도 3>에 나타내었다. <도 3>를 보면 아칸토산이 <도 2>의 결과와 유사한 경향을 보이며 농도-의존적으로 티로시나아제 생성을 저해함을 알 수 있다.
- [0058] <실시예 5> 미백 활성 관련 단백질의 발현 양상 분석 실험
- [0059] B16F10 세포를 6 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/ml로 접종하고, 18시간 전 배양 후 아칸토산(25, 50 and 100  $\mu$ M) 또는 멜라솔브(melasolv)(40  $\mu$ M)를 멜라닌 형성 자극제인  $\alpha$ -MSH(50 nM)와 함께 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 2~3회 PBS로 세척 한 후 1 ml의 lysis buffer을 첨가하여 30분간 lysis 시킨 후 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 20~30  $\mu$ g의 lysate를 8~12% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (0.1% Tween 20 + TBS) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. 단백질의 발현 양을 검토했기 위한 항체로는 Tyrosinase, MITF, TRP-1 그리고 TRP-2 (Santa Cruz, CA, USA; 1:200 dilution)를 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG (Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시킨 후, TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1~3분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광시키고  $\beta$ -액틴과 비교하여 단백질의 발현 정도를 비교하였다.
- [0060] 결과를 <도 4>에 나타내었는데, 대체로 농도 의존적으로 멜라닌 생성에 관여하는 단백질인 티로시나아제, TRP-1, TRP-2 및 MITF를 저해함을 알 수 있다.

도면

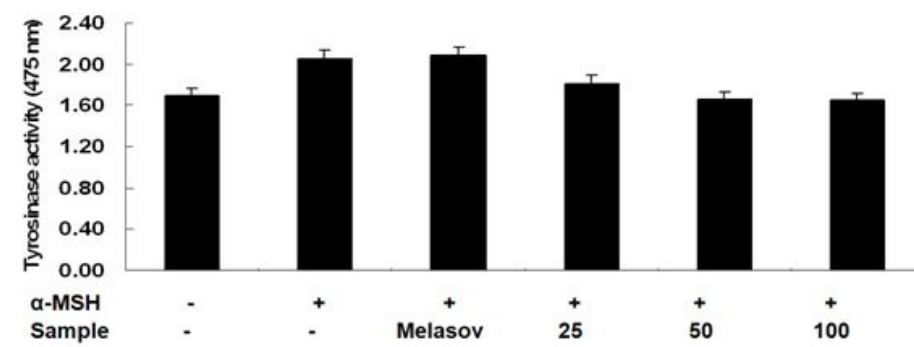
도면1



도면2



도면3





도면4

