



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월29일  
(11) 등록번호 10-2139405  
(24) 등록일자 2020년07월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 8/97 (2017.01) A61Q 19/02 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 8/97 (2013.01)  
A61Q 19/02 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2017-0083423  
(22) 출원일자 2017년06월30일  
심사청구일자 2018년11월05일  
(65) 공개번호 10-2019-0003013  
(43) 공개일자 2019년01월09일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020090072850 A\*  
KR1020030026663 A  
KR1020070082271 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
배재대학교 산학협력단  
대전광역시 서구 배재로 155-40 (도마동)  
(72) 발명자  
최창원  
대전광역시 서구 도안동로 123, 1701동 1903호 (도안동, 도안리슈빌아파트)  
오성  
대전광역시 서구 동서대로997번길 5-8 (내동)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인이름리온

전체 청구항 수 : 총 4 항

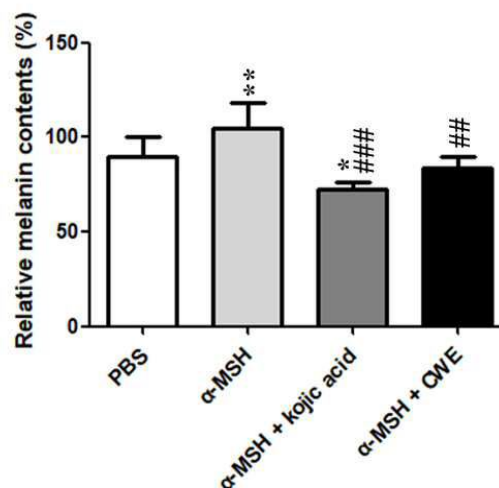
심사관 : 정영선

(54) 발명의 명칭 지황 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 지황의 냉수 추출물을 유효성분으로 하는 피부 미백용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 지황 냉수 추출물을 유효성분으로 하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장품 조성물 및 의약품 조성물을 제공한다. 본 발명의 지황 냉수 추출물은 세포에 대한 독성을 나타내지 않으면서 타이로시나제 활성 억제 효과 및 멜라닌 색소 생성 억제 효과를 나타내므로, 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장품 조성물 및 의약품 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류  
A61K 2800/80 (2013.01)

(72) 발명자  
**김성대**

대전광역시 서구 도산로349번길 22, 404호 (용문동)

**노한별**

대전광역시 서구 배재로91번길 19, 108호 (도마동, 궁전하우스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 315053-3

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 수출전략기술개발

연구과제명 국내 농산 자원을 활용한 할랄 화장품 소재 및 스킨케어 개발

기여율 1/1

주관기관 (주)대덕랩코

연구기간 2016.08.31 ~ 2017.08.30

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

지황(*Rehmannia glutinosa*)의 뿌리 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장품 조성물로서,

상기 지황의 뿌리 냉수 추출물은 지황의 뿌리를 4℃ 이상 40℃ 미만의 냉수로 추출하여 제조한 것을 특징으로 하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장품 조성물.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 지황 냉수 추출물은 타이로시나제의 활성을 억제하고, 멜라닌 색소의 생합성을 저해하는 것을 특징으로 하는, 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장품 조성물.

#### 청구항 5

지황의 뿌리 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 의약품 조성물로서,

상기 지황의 뿌리 냉수 추출물은 지황의 뿌리를 4℃ 이상 40℃ 미만의 냉수로 추출하여 제조한 것을 특징으로 하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 의약품 조성물.

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 지황 냉수 추출물은 타이로시나제의 활성을 억제하고, 멜라닌 색소의 생합성을 저해하는 것을 특징으로 하는, 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 의약품 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 지황(地榆, *Rehmannia glutinosa*) 뿌리의 냉수 추출물을 유효성분으로 하는 피부 미백용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 지황 냉수 추출물을 유효성분으로 하는 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장품 조성물 및 의약품 조성물을 제공한다.

### 배경 기술

[0003] 멜라닌(melanin)은 흑갈색의 생체고분자로서 멜라닌세포(melanocyte)에 생성된 후 멜라노솜(melanosome)의 형태로 세포로부터 분비되어 표피를 구성하는 각질세포(keratinocyte)로 이동한다. 멜라닌 생합성(melanogenesis) 회로는 멜라닌세포에서 특이적으로 발현되는 타이로시나아제(tyrosinase), TRP-1(tyrosinase-related protein

1, DHICA oxidase), TRP-2(tyrosinase-related protein 2, dopachrome tautomerase) 효소들에 의해 조절되는 복합적 생리적 과정에 의해 일어난다.

[0004] 이 중 타이로시나제는 타이로신(tyrosine)을 3,4-디하이드록시-페닐알라닌(3,4-dihydroxy-phenylalanine; DOPA)으로 전환하는 수산화반응과 DOPA를 다시 DOPA퀴논(DOPAquinone)으로 전환하는 산화과정을 촉매한다. 또한, 이와 함께 5,6-디하이드록시인돌(5,6-dihydroxyindole; DHI)을 인돌-퀴논(indole-quinone)으로 전환하는 산화과정을 촉매한다. 티올(thiol)이 결합되면 DOPA퀴논은 DOPA크롬으로 전환되고, 다시 DHI 또는 DHICA(5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)로 전환된다. 또한, 멜라닌 생합성(melanogenesis) 회로에 다른 2가지 요인 중 하나는 TRP-2로서, DOPA크롬을 DHICA로 전환시키는 역할을 수행하며, 다른 하나는 TRP-1으로서 DHICA를 인돌 5,6-퀴논 2-카르복실산으로 전환하는 산화과정을 촉매한다.

[0005] 원래 멜라닌은 자외선(UV)으로부터 피부손상을 방지하는 역할을 하지만, 지나친 멜라닌 생합성은 표피와 진피의 노화를 야기할 뿐만 아니라 모반(nevus), 기미(melasma), 흑자(lentigine), 검버섯(age spot)과 같은 색소 축적을 일으킬 수 있다. 피부의 각질세포가 UV에 노출되면  $\alpha$ -MSH(melanin stimulating hormone)가 생성되어 주변 세포로 분비되고,  $\alpha$ -MSH는 멜라닌세포의 melanocortin-1 수용체에 결합하여 세포 내 cAMP의 양을 증가시키는 아데닐산 고리화효소(adenylate cyclase)의 활성을 유도한다.

[0007] cAMP는 연속적으로 신호전달 단백질인 MITF 전사인자(microphthalmia-associated transcription factor)의 발현 증가를 활성화한다. 따라서 MITF에 의하여 세포 내 멜라닌 생성, 세포증식 및 세포이동과 같은 일련의 세포 반응을 유도하는 여러 유전자들이 활성화된다.

[0008] 당업계에서는 타이로시나제 활성 억제제인 코직산(kojic acid), 알부틴(arbutin) 및 리놀레산(linoleic acid)이 멜라닌 색소 침착을 억제 효과를 나타낼 수 있음이 알려져 있다. 그러나 최근 미백용 화장품에 사용되고 있는 합성 미백제들은 멜라닌세포에 독성을 나타내고 있으며, 다양한 부작용을 야기하고 있어 새로운 타이로시나제 억제제에 대한 개발이 요구되고 있다.

[0010] 지황(地榆, *Rehmannia glutinosa*)은 현삼과에 속하는 쌍떡잎 다년생 초본식물로서 뿌리의 생것을 생지황, 건조시킨 것을 건지황, 찌 후 건조시킨 것을 숙지황이라 한다. 한방 및 민간요법에서는 생지황은 허약체질, 토혈, 코피, 자궁출혈 및 변비 등에 사용하는 것으로 알려졌다. 건지황은 열병으로 인한 갈증과 장기내부의 열로 인한 소갈증에 효과가 있으며, 숙지황은 생리불순, 허약체질, 발육부진, 치매 및 조루증 및 발기부전 등에 사용한다.

[0011] 지황 냉수 추출물에 의한 피부 미백 또는 색소 침착 개선 효과와 관련하여, 지황의 꽃과 상부조직을 이용하여 제조한 메탄올 추출물은 항타이로시나제 활성을 나타내지 않는 것으로 보고되었으나(비특허문헌 1), 숙지황을 70% 에탄올로 추출한 추출물은 타이로시나제 활성을 나타내므로 미백용 화장품 조성물에 사용할 수 있음이 공지된 바 있다(특허문헌 1).

[0013] 본 발명자들은 미백용 화장품 조성물에 사용할 수 있는 안전한 천연 물질을 탐색하던 중, 지황을 냉수 추출한 지황의 냉수 추출물이 세포 독성을 나타내지 않으면서, 동시에 타이로시나제 활성 억제 효과 및 멜라닌 색소 침착 억제 효과를 나타내는 것을 확인하여, 본 발명의 지황 냉수 추출물을 피부 미백용 또는 색소 침착 억제용 화장품 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0015] (특허문헌 0001) KR 10-2013-0037471 A1 (2013.04.16.)

#### 비특허문헌

[0016] (비특허문헌 0001) Park et al., Nat. Product Sci. 2010, Vol. 16, pp. 133-139.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0017] 상술한 바와 같이, 당업계에서는 타이로시나제 활성 억제제인 코직산(kojic acid), 알부틴(arbutin) 및 리놀레산(linoleic acid)이 멜라닌 색소 침착을 억제 효과를 나타낼 수 있음이 알려져 있으나, 최근 미백용 화장품에 사용되고 있는 합성 미백제들은 멜라닌세포에 독성을 나타내고 있으며, 다양한 부작용을 야기하고 있어 새로운 타이로시나제 억제제에 대한 개발이 요구되고 있다.

[0019] 본 발명의 목적은 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0021] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 지황(*Rehmannia glutinosa*)의 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 지황 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 의약품 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 지황 냉수 추출물은 지황을 4℃ 이상 40℃ 미만의 냉수로 추출하여 제조하는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 바람직한 일실시예에서, 상기 지황 냉수 추출물은 타이로시나제의 활성을 억제하고, 멜라닌 색소의 생합성을 저해할 수 있다.

### 발명의 효과

[0026] 따라서, 본 발명은 지황 냉수 추출물을 유효성분으로 하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 지황 냉수 추출물은 세포에 대한 독성을 나타내지 않으면서 타이로시나제 활성 억제 효과 및 멜라닌 색소 생성 억제 효과를 나타내므로, 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장품 조성물 및 의약품 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 지황 냉수 추출물을 농도별(10~500  $\mu\text{g/ml}$ )로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 세포독성이다. 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\*\* $P < 0.001$ )를 나타낸다.

도 2는 L-DOPA를 기질로 사용했을 때 지황 냉수 추출물의 농도별(100~500  $\mu\text{g/ml}$ ) 버섯 타이로시나제 효소활성의 억제 효과(%)를 나타낸다.

도 3은 L-티로신을 기질로 사용했을 때 지황 냉수 추출물의 농도별(100~500  $\mu\text{g/ml}$ ) 버섯 타이로시나제 효소활성의 억제 효과(%)를 나타낸다.

도 4는 지황 냉수 추출물을 50  $\mu\text{g/ml}$  농도로 멜라노마 세포주 B16F10에 처리한 후 측정된 멜라닌 함량을 나타낸다. 기호 \*는 PBS 용액 처리구와의 유의성 있는 차이(\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )를 나타내며, #는  $\alpha$ -MSH 처리구와 유의성 있는 차이(###  $P < 0.001$ )를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0031] 본 발명은 지황(*Rehmannia glutinosa*) 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은 지황 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 의약품 조성물을 제공한다.

[0033] 본 발명의 지황 냉수 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0034] 1) 지황에 추출용매(물)를 가하여 추출하는 단계;

[0035] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[0036] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.

- [0037] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 지황은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 지황은 지황의 뿌리를 지칭한다.
- [0038] 상기 방법에 있어서, 지황 냉수 추출물의 추출 방법으로는 여과법, 냉수 추출, 침지 추출, 환류냉각 추출 및 초음파추출 등 당업계의 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 추출용매는 건조된 지황 분량의 2 내지 20 배 침가하여 추출하는 것이 바람직하다. 본 발명의 지황 냉수 추출물은 추출 용매로서 0℃ 이상 40℃ 미만의 냉수를 사용하는 것이 바람직하고, 구체적으로는 0℃ 내지 20℃의 냉수를 사용하는 것이 보다 바람직하며, 더욱 구체적으로 2℃ 내지 10℃ 미만의 냉수를 사용하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 100 시간인 것이 바람직하며, 구체적으로 24 내지 96 시간이 더욱 바람직하고, 보다 구체적으로 72 시간이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0039] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0040] 본 발명의 지황 냉수 추출물은 타이로시나제의 활성을 억제하고, 멜라닌 색소의 생합성을 저해할 수 있다.
- [0042] 따라서, 본 발명은 지황 냉수 추출물을 유효성분으로 하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 지황 냉수 추출물은 세포에 대한 독성을 나타내지 않으면서 타이로시나제 활성 억제 효과 및 멜라닌 색소 생성 억제 효과를 나타내므로, 피부 미백용 또는 색소 침착 개선용 화장료 조성물 또는 의약외품 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 화장료 조성물은 특히 제한되는 것은 아니나, 피부 외용으로 사용하거나, 경구 섭취할 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물은 지황 냉수 추출물을 유효성분으로 함유하며 피부학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 기초 화장품 조성물(화장수, 크림, 에센스, 클렌징 폼 및 클렌징 워터와 같은 세안제, 팩, 보디오일), 색조 화장품 조성물(화운데이션, 립스틱, 마스크라, 메이크업 베이스), 두발 제품 조성물(샴푸, 린스, 헤어컨디셔너, 헤어젤) 및 비누 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0045] 상기 부형제로는 이에 한정되지는 않으나 예를 들어, 피부연화제, 피부 침투 증강제, 착색제, 방향제, 유화제, 농화제 및 용매를 포함할 수 있다. 또한, 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제 및 보습제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 물성개선을 목적으로 점증제, 무기염류, 합성 고분자 물질 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 화장료 조성물로 세안제 및 비누를 제조하는 경우에는 통상의 세안제 및 비누 베이스에 상기 지황 냉수 추출물을 첨가하여 용이하게 제조할 수 있다. 크림을 제조하는 경우에는 일반적인 수중유적형(O/W)의 크림베이스에 지황 냉수 추출물 또는 이의 염을 첨가하여 제조할 수 있다. 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등과 물성개선을 목적으로 한 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 추가로 첨가할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 화장료 조성물에 함유되는 지황 냉수 추출물의 함량은 이에 한정되지 않지만 전체 조성물 총중량에 대하여 0.001 내지 10 중량%인 것이 바람직하고, 0.01 내지 5중량%인 것이 더욱 바람직하다. 상기 함량이 0.001 중량% 미만에서는 목적하는 피부 미백 또는 색소 침착 개선 효과를 기대할 수 없고, 10중량% 초과에서는 안전성 또는 제형상의 제조에 어려움이 있을 수 있다.
- [0048] 본 발명의 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 의약외품 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 충전제일 수 있다.
- [0051] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

**실시예 1**

- [0053] 지황(Sanguisorba officinalis L.) 냉수 추출물의 제조
- [0054] 본 발명에 사용하기 위하여, 지황 냉수 추출물을 제조하였다.

[0055] 먼저, 건지황의 뿌리를 증류수로 세척하고 건조시킨 후 분쇄기로 잘게 분쇄하였다. 그런 다음, 분쇄한 지황 시료에 10 배 중량의 냉수를 가하고 24 시간 동안 추출한 후 와트만 종이 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 후 그 여액을 65±2℃ 감압 농축하여 초저온냉동고에서 동결한 후 냉동건조기(freeze dryer)로 동결건조하여 최종 추출물로서 지황 냉수 추출물(cold water extract, CWE)를 수득하였다(표 1).

**표 1**

[0057] **지황 냉수 추출물의 수확량**

건지황 뿌리(g)	냉수 추출물의 동결건조 수확량(g)
50.0	13.9

**실시예 2**

[0059] **지황 냉수 추출물의 세포 독성 여부 확인**

[0060] 본 발명의 지황 냉수 추출물이 피부 세포에 대하여 안전성을 나타낼 수 있는지 확인하기 위하여, 세포 독성 여부를 확인하였다.

[0061] 구체적으로, 마우스 유래의 흑색종 세포인 B16F10 세포(ATCC, CRL-6475)를 RPMI 1640 배지(Sigma, USA)에 접종하여 배양하였다. 배지에는 10% 우태아 혈청(FBS; Gibco, USA) 및 100 U/ml 항생제(페니실린-스트렙토마이신)를 첨가하였으며, 실험기간 동안 세포주는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

[0062] 배양한 BF16F10 세포를 96 웰 플레이트에 각각 5×10<sup>4</sup> 세포/웰로 분주하고 24 시간 배양한 후, 상기 [실시예 1]에서 제조한 지황 냉수 추출물을 농도에 맞게 희석하여 첨가한 다음, 다시 동일 환경에서 24 시간 동안 배양하였다. 음성 대조군으로 사용하기 위해, BF16F10 세포에 PBS 용액을 처리하고, 동일 조건으로 배양하였다. 배양 종료 후, Cell Counting Kit-8(CCK-8, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 흡광도 450 nm에서 흡광도를 측정해, 세포 밀도를 확인하였다. 모든 처리구는 3 회 반복 실험하였다. 측정된 흡광도 값을 이용해 하기 [수학식 1]으로 지황 냉수 추출물의 세포 독성을 구하였다.

**수학식 1**

$$\text{세포 독성(\%)} = \frac{1 - \text{처리구 } A_{450nm}}{\text{대조구 } A_{450nm}} \times 100$$

[0064]

[0066] 그 결과, 도 1에서 나타난 바와 같이 BF16F10 멜라노마 세포에서 농도별 냉수추출물의 세포독성을 확인한 결과, 냉수추출물은 400 µg/ml(88.0%) 농도까지 음성대조구인 PBS 처리구(93.3%)와 차이의 유의성은 없었다(P < 0.05)(도 1).

**실시예 3**

[0068] **지황 냉수 추출물의 타이로시나아제(tyrosinase) 활성 억제 효과 확인**

[0069] 본 발명의 지황 냉수 추출물이 유의적인 피부 미백 효과를 나타낼 수 있는지 확인하기 위하여, L-DOPA(L-3,4-dihydroxy-phenylalanine) 및 L-티로신(L-tyrosine)을 기질로 하여 항-타이로시나아제 활성을 측정하였다.

[0070] 이를 위한 대상 효소로서는, 버섯 유래의 타이로시나아제(mushroom tyrosinase; Sigma-Aldrich Co., USA)를 구입하였고, 실험 시에는 333 U/ml를 사용하였다. 타이로시나아제의 기질인 L-DOPA 또는 L-티로신을 10 mM의 농도가 되도록 각각 100 mM 인산염 완충용액(pH 6.8)에 녹여서 준비하였다. 그런 다음, 10 mM L-DOPA 또는 L-티로신 30 µl와; 지황 냉수 추출물 시료 70 µl을 혼합하였다. 상기 지황 냉수 추출물 시료는, 지황 냉수 추출물을 최종 농도를 조절하기 위해 농도별로 희석하여 준비한 것을 사용하였다. 기질 및 지황 냉수 추출물의 혼합물에 타이로시나아제를 가하여 반응을 개시한 다음, 37℃에서 30 분 간 반응시키고, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측

정한 흡광도 값을 통해 하기 [수학식 2]를 이용하여 지황 냉수 추출물의 타이로시나아제 활성 저해율을 계산하였다. 양성 대조군으로는, 지황 냉수 추출물 대신 멜라닌 색소 침착을 억제하는 것으로 알려진 코직산(kojic acid)을 사용하여 동일 방법으로 타이로시나아제 활성 억제효과를 확인하였다.

**수학식 2**

$$\text{타이로시나아제 억제율(\%)} = \left[ 1 - \left\{ \frac{B-C}{A-D} \right\} \right] \times 100$$

[0072]

(상기 수학식에서,

[0073]

A: 효소만 첨가된 반응 용액에서의 흡광도;

[0074]

B: 효소 및 시료가 모두 첨가된 반응 용액에서의 흡광도;

[0075]

C: 시료만 첨가된 반응 용액에서의 흡광도; 및

[0076]

D: 효소 및 시료 모두가 첨가되지 않은 반응 용액에서의 흡광도;를 나타낸다.)

[0077]

[0078] 그 결과, 하기 [표 2], 도 2 및 도 3에서 나타난 바와 같이 L-DOPA를 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 500 µg/ml 농도에서 100% 타이로시나아제 억제 활성을 나타냈고, IC<sub>50</sub>은 385.9 µg/ml로 측정되었다(도 2). 또한, L-티로신을 기질로 사용했을 때 냉수추출물은 500 µg/ml에서 100% 타이로시나아제 억제 활성을 나타냈고, IC<sub>50</sub>은 314.2 µg/ml로 측정되었다(도 3). 비교 대조군인 코직산은 L-DOPA를 기질로 사용했을 때 IC<sub>50</sub>은 34.9 µg/ml로 측정되었고, L-티로신을 기질로 사용했을 때 IC<sub>50</sub>은 46.1 µg/ml로 측정되었다.

**표 2**

**지황 냉수 추출물의 타이로시나아제 억제 활성**

[0080]

기질	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	냉수 추출물	코직산(Kojic acid)
L-DOPA	385.9	34.9
L-tyrosine	314.2	46.1

**실시예 4**

**지황 냉수 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과 확인**

[0082]

[0083] 본 발명의 지황 냉수 추출물이 유의적인 색소 침착 억제 효과를 나타낼 수 있는지 확인하기 위하여, 지황 냉수 추출물을 처리한 세포에서 멜라닌 색소 축적을 유발하고, 이에 따라 생성된 멜라닌 색소를 정량하였다.

[0084]

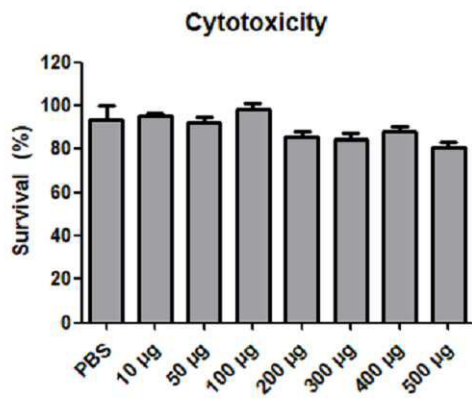
[0084] 먼저, 배양한 BF16F10 세포를 24 웰 플레이트에 각각 5×10<sup>4</sup> 세포/웰의 농도로 100 µl씩 분주하고 24 시간 배양한 후, 100 nM α-MSH 및 50 µg/ml 지황 냉수 추출물을 혼합하여 처리하였다. 음성 대조군으로서는 PBS 용액을 처리하고, 양성 대조군으로서는 α-MSH 만을 처리하였으며, 비교 대조군으로서 α-MSH 및 30 µg/ml 코직산을 병용 처리하였다. 각각의 대조군 또는 실험군에서 시료를 처리하고 48 시간 동안 세포를 배양한 다음, 1N NaOH 200 µl를 처리하고 1 시간 동안 60℃ 항온수조에서 반응시켜 멜라닌을 용해시켰다. 용해 후 배지를 490 nm에서 흡광도 측정하여 멜라닌 색소 생성 수준을 확인하였다. 모든 시료처리는 동일 실험을 3 회 반복하여 수행하였다.

[0085]

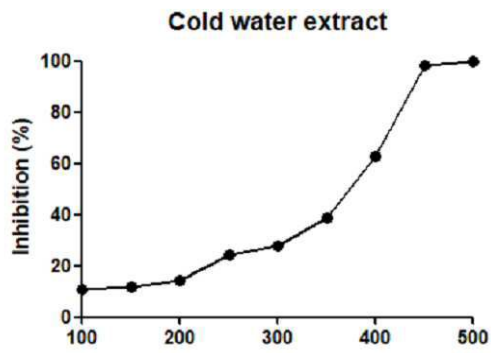
[0085] 그 결과 도 4에서 나타난 바와 같이 B16F10 세포에서 멜라닌 생성률은 PBS 용액 처리구에서 89.7%로 나타났으며 α-MSH 단독 처리구에서 105.1%로 증가하였다. 그러나 α-MSH + 코직산 병용 처리구에서 멜라닌 생합성율은 72.3%로 유의성 있게 감소하였으며, α-MSH + 냉수추출물 병용 처리구에서도 멜라닌 생합성율은 83.5%로 유의성 있게 감소하였다(도 4).

도면

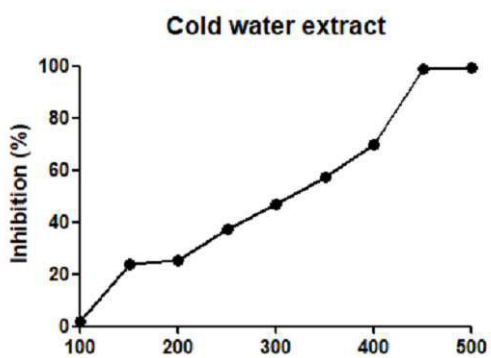
도면1



도면2



도면3



도면4

