creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000265546

2016 년 02 월
박사학위논문

폴리페놀의 물리, 화학, 생물학적 특성을 이용한 효과적인 미백성분의 개발

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

최 문 희

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

폴리페놀의 물리, 화학, 생물학적 특성을 이용한 효과적인 미백성분의 개발

Physico-chemical and biological approaches for the development of effective whitening agents using polyphenols

2016년 02월 25일

조선대학교 대학원

화학공학과

최 문 희

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

폴리페놀의 물리, 화학, 생물학적 특성을 이용한 효과적인 미백성분의 개발

지도교수 신 현 재

이 논문을 공학 박사학위신청 논문으로 제출함

2015년 10월

조선대학교 대학원

화학공학과

최 문 희

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

최문희의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 이 중 헌 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이 재 욱 (인)

위 원 조선대학교 교 수 기 성 환 (인)

위 원 ㈜칼라핑크알앤디 연구소장 이 태 호 (인)

위 원 조선대학교 교 수 신 현 재 (인)

2015 년 12 월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Contents

List of Tables V

List of Figures VII

ABSTRACT XI

Chapter 1. Research background 1

1.1. Research Objectives 1

1.1.1. Cosmetic 1

1.1.2. Anti-aging 3

1.1.3. Anti-oxidant 6

1.1.4. Anti-melanogenesis 8

1.1.5. Whitening cosmetic 11

1.2. Polyphenol 17

1.2.1. Flavonoids 18

1.2.2. Physiological function of flavonoid 18

1.2.3. Quercetin 21

1.2.4. Anthocyanin 22

1.2.5. Cyanidin-3-*o*-galactoside (C3G) 23

1.2.6. *Aronia melanocarpa* 24

Chapter 2. Determination of anti-oxidant 26

2.1. Introduction 26

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.2. Mateials and methods 28

2.2.1. Preparation of Onion skin extracts 28

2.2.2. Preparation of *Aronia melanocarpa* anthocyanin extracts 28

2.2.3. HPLC analysis 30

2.2.4. Determination of total phenolic and total anthocyanin content of *Aronia melanocarpa* extracts 30

2.3. Results and discussion 32

2.3.1. HPLC analysis of extracts from *Aronia melanocarpa* 32

2.3.2. Total polyphenols and Total anthocyanin contents of extracts from *Aronia melanocarpa* 32

2.3.3. Statistical analysis 33

2.4. *In vitro* antioxidant 41

2.4.1. Oxygen radical 41

2.4.2. Definition and classification of anti-oxidants 41

2.4.3. DPPH assay 42

2.4.4. ABTS Assay 44

2.4.5. ORAC Assay 44

2.4.6. SOD assay 47

2.4.7. Catalase assay 48

2.5. Results and discussion 49

2.5.1. DPPH radical scavenging and ABTS radical scavenging activity of Quercetin and *Aronia melanocarpa* extracts 49

2.5.3. SOD activity of *Aronia melanocarpa* extracts 52

2.5.2. Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) activity of *Aronia melanocarpa* extracts 55

2.5.4. Catalase activity of *Aronia melanocapa* extracts 59

2.5.5. Statistical analysis 62

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.6. *In vivo* antioxidant Activity of Zebrafish 63

2.6.1. Introduction 63

2.6.2. Experimental zebrafish 66

2.6.3. Anti-oxidant effect of in zebrafish from *Allium cepa* skin extracts (onin skin)66

2.6.4. Anti-oxidant effect of in zebrafish from C3G 67

Chapter 3. Determination of anti-melanogenesis activities of onion skin extracts and *Aronia melanocarpa extracts* 73

3.1. Introduction 73

3.2. Mushroom tyrosinase inhibition 76

3.3. Cell Culture (B16F10) 77

3.4. Measurement of cellular Melanin Content 77

3.5. MTT Assay 78

3.6. Western blot analysis 79

3.7. Results and discussion 80

3.7.1. Effect of mushroom tyrosinase inhibition by Quercetin and *Aronia melanocarpa* extracts 80

3.7.2. Measurement of cytotoxicity of Quercetin and Aronia extracts in B16F10 melanoma cells. 83

3.7.3. Mesasurement of melanin contents of Aronia extracts 86

3.7.4. Western blot analysis in B16F10 cells 89

3.7.5. Statistical analysis 95

3.7.6. Effect of Quercetin and on pigmentation of zebrafish 95

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Chapter 4. Synthesis of quercetin derivatives 102

4.1. Introduction 102

4.2. Synthesis of quercetin 104

4.3. S_N2 reaction 107

4.4. Synthesis of quercetin derivatives results 112

4.5. Statistical analysis 113

4.6. Synthesis of quercetin derivatives anti-melanogenesis acitivy 134

4.7. Statistical analysis 136

Overall conclusions and Future Aspects 146

References 149

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Tables

Table 1. Cyanidin composition of Aronia extracts ·····29

Table 2. Total polyphenol and total anthocyanin contents of Aronia extracts ·····34

Table 3. HPLC quantitative analysis results of Aronia extracts ·····36

Table 4. Selected anthocyanidins and their substitutions·····38

Table 5. Total polyphenol and total anthocyanin contents ·····40

Table 6. Type of reactive oxygen species ·····46

Table 7. Literature summary of increase or decrease in melanogenesis with *in vitro* assay by quercetin and its derivatives ····· 106

Table 8. Information of reactants (quercetin, 4-Nitrobenzyl bromide, Na_2CO_3, and DMSO) ····· 114

Table 9. Information of loading solvents and test tube numbers ····· 114

Table 10. Information of loading solvents and test tube numbers ····· 115

Table 11. Information of reactants (quercetin, Benzyl bromide, Na2CO3, and DMSO) · 116

Table 12. Information of loading solvents and test tube numbers ····· 117

Table 13. Information of samples and test tube numbers ····· 118

Table 14. Information of reactants (quercetin, 4-Bromophenethyl bromide, Na_2CO_3, and DMSO) ····· 119

Table 15. Information of loading solvents and test tube numbers ····· 120

Table 16. Information of samples and test tube numbers ····· 121

Table 17. Information of reactants (quercetin, 4-Methylphenethyl bromide, Na_2CO_3, and DMSO) ····· 122

Table 18. Information of loading solvents and test tube numbers ····· 123

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 19. Information of samples and test tube numbers ····· 124

Table 20. Information of reactants (quercetin, (s)-(+)-Citronellyl bromide, Na_2CO_3, and DMSO) ····· 125

Table 21. Information of loading solvents and test tube numbers ····· 126

Table 22. Information of samples and test tube numbers ····· 127

Table 23. Information of reactants (quercetin, 1-Bromo-2-methylpropane, Na2CO3, and DMSO) ····· 128

Table 25. Information of samples and test tube numbers ····· 130

Table 26. Information of reactants (quercetin, oleyl bromide, Na2CO3, and DMSO) ··· 131

Table 27. Information of loading solvents and test tube numbers ····· 132

Table 28. Information of samples and test tube numbers ····· 133

Table 29. Information of synthesized substrate, its chemical structure, open column numbering, TLC bands, and DPPH of EXP 1-7 ····· 137

Table 30. Cell viability in B16F10 after samples (10 µg/mL and 50 µg/mL) treatment by MTT assay for 24 hrs ····· 139

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Figures

Fig. 1. Mechanism of melanogenesis. ·····13

Fig. 2. Schematic representation of melanin synthetic pathways. ·····14

Fig. 3. Known natural (A), synthetic (B), and new natural compounds (C). ·····15

Fig. 4. Signal transduction pathway of melanin formulation. ·····16

Fig. 5. Isolation diagram of anthocyanin from Aronia. ·····35

Fig. 6. HPLC analysis results of Cyanidin-3-galactoside (A), Antocyanin (B), Domestic Aronia (C), and Foreign Aronia (D). ·····37

Fig. 7. Classification of polyphenols. ·····39

Fig. 8. DPPH radical scavenging effect of aronia extracts and polyphenols. ·····50

Fig. 9. ABTS radical scavenging effect of aronia extracts and polyphenols. ·····51

Fig. 10. The reaction principle of SOD. ·····53

Fig. 11. Superoxide dismutase activity of polyphenols. ·····54

Fig. 12. Relative luminescence intensity as increased in trolox concentration for 30 min. 56

Fig. 13. Net luminescence intensity as increased in trolox concentration at 30 min. ·····57

Fig. 14. Net luminescence intensity as increases in polyphenols concentration at 30 min. 58

Fig. 15. Calibration curve of absorbance intensity at 520 nm wavelength vs. Hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration. ·····60

Fig. 16. Catalase activities (%) of polyphenols according its concentration. ·····61

Fig. 17. Internal organ development in zebrafish[151]. ·····65

Fig. 18. Fluorescent counting (%) of zebrafish after treatment of *Allium cepa* skin extract (onion skin). ·····69

Fig. 19. Fluorescence images of anti-oxidant effect in zebrafish from *Allium cepa* skin extract (onion skin). ·····70

Fig. 20. Fluorescence images of anti-oxidant effect in zebrafish from C3G. ·····71

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Fig. 21. Fluorescent counting (%) of zebrafish after treatment of C3G. ·····72

Fig. 22. Structure of melanocyte in skin.·····74

Fig. 23. Chemical reaction-based melanin formantion mechanisms. ·····75

Fig. 24. L-tyrosine standard curve of tyrosinase inhibition detection.·····81

Fig. 25. Inhibitory effect of mushroom tyrosinase from aronia extracts.·····82

Fig. 26. Effect of Quercetin and Aronia extracts on cytotoxicity. ·····84

Fig. 27. Relative cell viability of SSE on B16 melanoma cells by aronia extracts. ·····85

Fig. 28. Melanin contents standard curve. ·····87

Fig. 29. Effect of aronia extracts on melanin content. ·····88

Fig. 30. Inhibitory effect of Quercetin on the Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and Actin in expression B16F10 cells. ·····90

Fig. 31. Inhibitory effect of *Aronia* extract on the Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and Actin in expression B16F10 cells. ·····91

Fig. 32. Inhibitory effect of Quercetin and *Aronia* extract on the MITF, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and Actin in expression B16F10 cells.·····92

Fig. 33. Inhibitory effect of C3G on the Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and Actin in expression B16F10 cells. ·····93

Fig. 34. Inhibitory effect of C3G and *Aronia* extract on the Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and Actin in expression B16F10 cells. ·····94

Fig. 35. Pheno-type based dechorionated 9 hpf and embryo after treatments of PTU and Arbutin. ·····96

Fig. 36. Flowchart of pigment induction by alpha-MSH in zebrafish. ·····97

Fig. 37. Photograph of 96-well for the treatment of quercetin according to its concentration. ·····98

Fig. 38. Optical microscopic imagesof alpha-MSH induced zebrafish after treatment of quercetin according to its concentration. ·····99

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Fig. 39. Effect of quercetin in pigment area of zebrafish . ····· 100

Fig. 40. Effect of quercetin in tyrosinase activity in zebrafish. ····· 101

Fig. 41. R1 and R2 substituted quercetin derivatives (a) and rutin compound (b). ····· 105

Fig. 42. Mechanism of S_N2 reaction. ····· 108

Fig. 43. Photograph of S_N2 quercetin reactor. ····· 109

Fig. 44. Fractionations of pre-treated open column. ·····111

Fig. 45. TLC bands of open column fractionations of nucleophile 4-Nitrobenzyl bromide reacted with quercetin. Note that 'Q' is marked quercetin. ····· 115

Fig. 46. TLC bands of synthesized quercetin derivatives after reaction for 4.5, 5.5, 11, and 6.6 hr. ····· 117

Fig. 47. TLC bands of open column fractionations of nucleophile benzyl bromide reacted with quercetin. Note that 'Q' is marked quercetin. ····· 118

Fig. 48. TLC bands of synthesized quercetin derivatives after reaction for 3.5, 4.5, 11, and 20.5 hr. ····· 120

Fig. 49. TLC bands of open column fractionations of nucleophile 4-Bromophenethyl bromide reacted with quercetin. Note that 'Q' is marked quercetin. ····· 121

Fig. 50. TLC bands of synthesized quercetin derivatives after reaction for 5, 6, 22, and 28 hr. ····· 123

Fig. 51. TLC bands of open column fractionations of nucleophile 4-Methylphenethyl bromide reacted with quercetin. Note that 'Q' is marked quercetin. ····· 124

Fig. 52. TLC bands of synthesized quercetin derivatives after reaction for 4, 15, 21, and 24 hr. ····· 126

Fig. 53. TLC bands of open column fractionations of nucleophile (s)-(+)-Citronellyl bromide reacted with quercetin. Note that 'Q' is marked quercetin. ····· 127

Fig. 54. TLC bands of synthesized quercetin derivatives after reaction for 4, 15, and 21 hr. ····· 129

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 24. Information of loading solvents and test tube numbers ····· 129

Fig. 55. TLC bands of open column fractionations of nucleophile 1-Bromo-2-methylpropane reacted with quercetin. Note that 'Q' is marked quercetin. ····· 130

Fig. 56. TLC bands of synthesized quercetin derivatives after reaction for 23 and 30 hr. 132

Fig. 57. TLC bands of open column fractionations of nucleophile oleyl bromide reacted with quercetin. Note that 'Q' is marked quercetin. ····· 133

Fig. 58. Tyrosinase inhibition results of quercetin derivatives. ····· 138

Fig. 59. Western blot bands of 1 μM α-MSH induction after 4-4 sample treatment. ····· 140

Fig. 60. Optical microscopic images of treatment of 4-4 sample (a), after 1 μM **α**-MSH induction for 40 hrs (b), 10 μg/L (c) and 50 μg/mL (d) of 4-4 sample treatment. ····· 141

Fig. 61. Western blot bands of 1 μM α-MSH induction after 6-3 sample treatment. ····· 142

Fig. 62. Optical microscopic images of treatment of 6-3 sample (a), after 1 μM α-MSH induction for 40 hrs (b), 10 μg/L (c) and 50 μg/mL (d) of 6-3 sample treatment. ····· 143

Fig. 63. Western blot bands of 1 μM α-MSH induction after 7-3 sample treatment. ····· 144

Fig. 64. Optical microscopic images of treatment of 7-3 sample (a), after 1 μM α-MSH induction for 40 hrs (b), 10 μg/L (c) and 50 μg/mL (d) of 7-3 sample treatment. ····· 145

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Research and development of functional cosmetics using natural resources are highly demanding in academics and industrial sectors due to increase in interest of skin health and personal beauty. Among various natural resources showing antioxidant activity, phenolic compounds (known as polyphenols) have been frequently utilized as cosmetic ingredients. Particularly, quercetin as a model polyphenol compound has been well known to be a strong antioxidant as well as anti-whitening agent in many literatures. Some researchers addressed that quercetin enhanced melanin biosynthesis and showed toxicity in skin cells and others did not. Therefore, an efficacy of quercetin for a cosmetic ingredient is still debating and the role of it needs to be further investigated by suitable materials and methods.

In order to show whether quercetin is suitable as anti-melanogenic agent or not, firstly, the toxicity test of quercetin and its derivatives has been performed using various cell lines and zebrafish models before anti-melanogenesis study. The synthesis of quercetin derivatives was done to reduce toxicity of quercetin and to increase anti-melanogenesis activity. Several quercetin derivatives have been synthesized by S_N2 reaction with quercetin and appropriate reagents, then their cytotoxicities and anti-melanogenesis activities were investigated. In addition to quercetin and its derivatives, a cyanidin-3-*o*-galactoside (C3G) in extracts of aronia berry (known as chokeberry) has been examined for its activity because of strong antioxidant activity and little literature of C3G.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

In this study, some assays about cytotoxicity and anti-melanogenesis for quercetin, quercetin derivatives, aronia extracts, and C3G were done in B16F10 melanoma cells with and without induction of melanin formation after α–melanocyte stimulating hormone (MSH) treatment. Cytotoxic concentration levels of quercetin, quercetin derivatives, aronia extracts, and C3G were > 10 μM, > 50 μg/mL, > 50 μg/mL, and > 50 μM, respectively. Importantly, mushroom inhibitory tyrosinase assay in *in-vitro* cell free system showed anti-melanogenic effect while in *in-vitro* B16F10 melanoma cell system it did not.

Mortality rate (%) of quercetin in *in-vivo* zebrafish displayed about 8-12% in all conditions and tyrosinase activity increased with quercetin concentration. Moreover, melanin formation was promoted in 10-200 μmol/L range. Therefore, it is believed that quercetin is not a good whitening agent. Next, quercetin derivatives were successfully prepared using seven substrates. Among them, oleyl bromide-substituted quercetin exhibited low cytotoxic concentration level at > 50 μM, which is five-fold less toxic compared to original quercetin. Expressions of tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) and TRP-2 were considered to be inhibited in *in vitro* B16F10 melanoma cells.

Total polyphenol contents of aronia extracts were analyzed to be 115.23 mg/g as gallic acid equivalent. The total anthocyanin contents were measured to be 4.19 mg/g as C3G equivalent. Antioxidant assay for DPPH and ABTS radical scavenging activity showed IC_{50} value of 9.63 μg/mL and 42.20 μg/mL,

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

respectively. While, IC_{50} value in ORAC assay was 140.25 µM TE/mL. The IC_{50} values of SOD and catalase activity assay were 28.25 µg/mL and 25.52 µg/mL, respectively. Cytotoxic concentration level of aronia extracts in B16F10 melanoma cells was > 100 µg/mL and protein expression variations in tyrosinase and TRP-1 were negligible but TRP-2 expression was moderately inhibited by the extracts. For C3G compound, cytotoxic concentration level of C3G was > 50 µM. Expression levels in tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 were decreased which implies potential skin whitening agents. Mortality rate (%) of C3G in *in vivo* zebrafish was from 100 µmol/L. At 30-100 µmol/L concentration range, the antioxidant activity levels were dose-dependently increased but it was gradually decreased again up to 200 µmol/L. For anti-melanogenesis assay using *in vivo* zebrafish model with C3G of 10-100 µmol/L range, it showed skin whitening effect but at > 150 µmol/L, it did not show the effect.

Based on the results from *in vitro* and *in vivo* assay using quercetin derivatives and C3G summary, these compounds could be used for potential skin-whitening agents in functional cosmetics. Purification and structure elucidation of the synthesized quercetin derivatives are under way and future clinical trials should be done to launch it in the market.

Key words: Anti-melanogenesis, Anti-oxidant, Cyanidin-3-*O*-galactoside, Polyphenol, Quercetin, Quercetin Derivatives, Zebrafish

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Chapter 1. Research background

1.1. Research Objectives

1.1.1. Cosmetic

고대 인류사회에서부터 시작한 화장품 문화는 인간의 미적 욕구를 충족시키는 동시에 신체적, 정신적인 안정에 기여해 왔으며, 인류의 역사와 함께 발전을 거듭해 왔다. 인류가 최초로 사용한 화장품은 향료이며, 인류문명의 발전과 더불어 향료는 각 나라의 지형, 기후조건, 생활방식의 차이에 따라 각기 다른 양상으로 발전해 오고 있다. 화장품 산업은 기술 집약적인 고부가가치 산업으로써, 그 시대의 문화와 트렌드를 반영한다. 화장품은 건강한 피부에 사용하는 제품으로서 피부에 대한 안전성, 효능, 사용 편의성을 갖추어야 하며, 색채 효과에 의한 미적 기능, 피부의 청결, 보호, 보습, 유연, 노화억제, 심리적 안정감 등도 함께 고려되어야 한다[1]. 최근 화장품의 사용 목적은 단순히 아름다움을 추구하는 것에 국한되지 않고 피부에 효능을 부여하는 기능성 제품들에 초점이 맞추어져 있으며, 소비자의 요구에 따라 일반적인 보습 기능보다는 피부의 문제를 개선 시킬 수 있는 기능성 제품들이 화장품 산업의 주류를 이룬다. 또한 기능성 제품의 안전성에 대한 소비자의 요구의 증대로 천연 및 유기농 화장품의 관심이 증대되고 있으며, 인체에 부작용이 없는 천연 소재를 이용한 기능성 화장품의 연구 개발이 절실히 요구되고 있는 시점이다. 현재 우리나라에서 정한 기능성 화장품(미백, 주름개선, 자외선) 중 피부 주름개선이나 자외선 차단제의 연구와 제품개발은 국내외에서 활발하게 진행되고 있으나, 기능성 화장품 중에서 제품의 수요가 가장 많은 피부 미백제에 대한 기술과 제품개발은 매우 미비한 실정이다. 국내에서 사용하고 있는 대표적 천연 미백 소재로는 코직산(kojic acid), 알부틴(arbutin), 비타민C (ascorbic acid, vit C), 루시놀(rucinol)등이 있으며, 식품의약품안전청에 고시된 미백기능 화장품의 원료는 닥나무 추출물, arbutin, 에틸아스코르빌에테르(ethyl ascorbyl ether), 유용성 감초 추출물이 있다[2]. 이러한 천연 미백소재의 제품화를 위해서는 멜라닌(melanin) 생성 억제 기능성 확인과 메커니즘(mechanism) 규명이 필수적이며 이러한 과정을 통해서 기능성 화장품 시장의 선점과 수익 창출 효과를 기대할 수 있다. 최근에는 기능성, 유기농 등과

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

같은 전형적인 웰빙(well-being) 소재를 비롯하여 누에 등의 곤충에서도 새로운 소재들이 발굴되고 있으며, 기능성 화장품을 한 단계 더 발전시켜 코스메슈티컬(cosmeceutical)이라 불리는 화장품 시장이 등장하였다[3]. Cosmeceutical이라는 신조어는 독일의 피부과학자 Dr. Kligman이 최초로 제안하였으며, 화장품(cosmetics)과 의약품(pharmaceutical)의 합성어로 약용화장품을 의미한다[4]. 현재 국내 cosmeceutical 시장 규모(5000억원 대)는 화장품 시장(약 17조원)의 3% 수준이지만 성장 가능성은 일반 기능성 화장품 시장보다 훨씬 더 높다는 평가를 받고 있으며, 세계 cosmeceutical 시장은 일반 기능성 화장품 시장보다 2배 이상 빠르게 증가하고 있는 추세이다[5]. 이는 기능성 화장품의 일반적인 기능 이외에 치료 효과가 더해져 소비자의 수요가 급증하는 것이며, 향후 우리나라 화장품 산업의 발전 방향성을 제시한다. 현재 화장품 산업은 글로벌화의 가속으로 경쟁 환경은 하루가 다르게 변모하고 있으며, 브랜드숍의 성장과 진동 화장품의 강세, 한류열풍으로 시작된 K-뷰티산업 그리고 헬스, 뷰티 스토어 경쟁으로 이어지고 있다. 과거 한 두 가지의 성공적인 제품으로 화장품 시장을 석권하면서 안주했던 화장품 기업들도 급속하게 변화하는 화장품의 트렌드에 맞춰 천연소재를 기반으로 한 약용 화장품에 주력하고 있다. 이렇듯 화장품은 사람의 피부를 건강하고 아름답게 가꾸는데 없어서는 안 될 존재가 되었으며, 피부에 직접 적용하여 사용하는 것이기 때문에 무엇보다 원료의 안전성이 중요하다고 할 수 있다. 화장품의 원료에서 문제가 생기는 경우는 원료자체가 위험하거나, 원료 속의 불순물이 잔존하여 피부에 문제를 일으키는 경우, 또는 원료를 만드는 과정에서 부산물이 생겨나거나 제품 내에서 원료들간의 상호작용으로 유해한 물질이 형성 되는 경우이다. 천연물의 경우 많은 성분들이 복합되어 있기 때문에 독성이 있을 수 있어 사용에 유의해야 하지만 방향족 화합물 같이 피부에 유해한 화학적인 원료보다는 피부에 적용하였을 때 보다 안전한 천연물의 소재가 화장품의 원료적인 측면에서 보다 바람직하다고 할 수 있다. 현재 우리나라의 천연화장품 및 기능성 화장품의 효능에 대한 소비자의 만족도는 그리 높지 않은 상태이다. 따라서 소비자가 만족할만한 기능성 화장성품의 개발이 필요하며, 이를 위해서는 피부 생리활성물질의 개발 및 이를 효과적으로 전달할 수 있는 적절하고 안전한 제형이 개발이 수반 되어야 할 것이다. 기능성 화장품을 개발하기 위해서는

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

크게 두 가지 방향에서의 접근이 필요하다고 할 수 있다.

첫째, 피부과학을 통한 생리적 mechanism에 관한 연구가 필수적이며, 둘째, 효능이 한 단계 높은 새로운 소재의 개발이다. 이와 같은 방법에는 피부과학, 약학, 생명과학 분야에서 이미 효능이 알려진 물질을 도입하는 방법과 천연물로부터 유용성분을 추출, 정제하여 효능을 검증하는 방법, 완전히 새로운 신소재 개발 및 유도체의 합성 등이 있다. 본 연구에서는 기능성 미백 화장품의 관한 최근의 연구 동향을 토대로 최근 화장품 산업의 트렌드에 맞춰 피부에 안전하게 적용할 수 있는 천연 polyphenol의 효능과 미백기전에 대한 메커니즘을 밝히고자 하였으며, polyphenol의 유도체의 합성을 통해 항산화 활성 및 미백 기능을 검증하고 향후 천연 미백소재 화장품 개발에 기초 자료로 사용하고자 한다.

1.1.2. Anti-aging

현재 인류는 과학의 진보와 함께 의학, 경제, 문화의 발달로 인해 평균 수명 100세 이상의 고령화 시대에 접어들었다. 인간의 수명이 연장 됨에 따라 건강한 삶에 대한 중요성과 더불어 젊고 아름다움 외모를 중요시 하는 경향이 증대되고 있다. 젊음과 아름다움을 추구하는 anti-aging은 사회적 트렌드를 넘어 화장품 산업의 화두로 떠오르고 있으며, 여기에 삶의 질 개선을 중시하는 정부의 정책과 바이오, 의료기술 혁신이 더해지면서 제품 및 서비스의 품질도 발전을 거듭하고 있다. Anti-aging의 용어를 풀이해 보면 노화방지의 의미로써, 몸과 마음이 늙는 속도를 늦추어 준다는 뜻이다. 노화는 나이가 들면서 신체의 구조와 기능이 점진적으로 저하되고 질병과 사망에 대한 감수성이 급격히 증가하면서 쇠약해지는 과정이다[6]. 노화를 설명하는 많은 가설 중 가장 설득력 있는 가설은 Harman (1956)에 의해 제안된 이론이며, free radical에 의한 연속적인 유해반응의 결과로 노화과정이 진행된다고 하는 가설이다[7]. 이후 reactive oxygen species (ROS)가 세포 구성 성분의 산화적 손상을 축적시키는 원인임이 밝혀졌고, 이를 바탕으로 산화 스트레스 가설(oxidative stress theory)이 제안되었다[8]. 생체 내 산화적 스트레스는 ROS의 과도한 생리적 이용 가능성으로 정의되며, 이는 인체의 활성산소 및 질소의 생성계와 제거계의 불균형의 결과로써, 기능적 변화와 병리적 상태를 초래한다[9]. 인체의 활성산소 및 질소의 생성계와

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제거계의 균형이 주요한 역할을 하며, 이러한 균형을 깨뜨리는 주요 기전으로 노화의 분자 염증 가설이 주목 받고 있다[10]. 노화과정에서 세포 내 redox balance의 파괴와 함께 여러 가지 요인에 의해 활성산소 및 질소가 축적되어 세포괴사나 조직파손이 일어나고, redox-sensitive transcription factors의 활성화로 인해 수많은 pro-inflammatory mediators (cytokines, chemokines, nuclear factor-kappa B (NF-κB), inducible nitric oxide synthase (iNOS))가 생성된다. ROS와 reactive nitrogen species (RNS)는 감염이나 염증반응에서 이물질을 제거하는데 중요한 역할을 하지만 과다 생성되어 축적되면 이들의 파괴적 성향으로 인해 염증과 활성산소 및 활성질소 생성이 지속적으로 증폭되고, 세포의 항상성 유지에 문제를 일으켜, 노화 및 암, 심장혈관 질환, 관절염, 퇴행성 신경 질환 등의 노인성 질환을 초래하게 된다[11]. 이러한 노화 관련 병리의 공통 요인으로, 특히 RNS와 ROS간의 상호작용이 여러 가지 병리적 현상을 일으키는데 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 최근 이들 RNS의 생리적 역할에 대한 관심이 높아지고 있다. RNS에는 nitric oxide (NO), nitrogen dioxide (NO_2), peroxynitrite (NO_3^-), alkyl peroxynitrite (ROONO) 등이 있으며, 특히 NO와 superoxide anion (O_2^-)과의 반응으로 생성되는 대사산물인 $ONOO^-$는 전구체보다 훨씬 강력한 반응성으로 광범위한 생체 분자의 산화적 손상 및 mitochondria 손상을 야기 시킨다[12]. 따라서 강력한 ROS 및 RNS를 제거할 수 있는 항산화 방어 체계가 노화 및 노화 관련 질환의 예방에 중요한 역할을 할 것이다. 또한 각종 질병 및 노화 등에 활성산소 및 과산화물이 직접적인 원인으로 작용한다는 사실이 밝혀지면서 노화 억제 및 질병과 관련된 항산화제에 대한 연구가 활발해지고 있다[13]. 노화 방지에 효과가 있는 물질 중 가장 대표적인 것은 vit E 및 vit C이며, 이들이 가지는 항산화 활성으로 인해 여러 생물의 수명이 연장되었음이 밝혀졌다[14]. 또한 polyphenol 화합물이 천연 항산화제로 널리 알려져 다양한 식물을 대상으로 항산화 활성과 기능성 소재로써의 활용에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다[15]. 합성 알레르기를 비롯하여 각종 질환을 일으킬 수 있는 합성 항산화 소재보다는 인체에 적용했을 때 보다 안전하고 강한 활성을 지닌 신규 천연 항산화제의 개발에 대한 관심이 증가하고 있다[16]. 본 연구는 polyphenol 화합물 중 강력한 항산화제로 알려져 있으나 독성으로 인해 논란의 중심에 있는 물질인 quercetin (3,5,7,3,4-pentahydroxyflavone)과 아

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

직 검증이 되지 않은 cyanidin-3-*o*-galactoside (C3G)의 생리활성과 anti-aging 효과에 대해 검증하고 mechanism을 밝히고자 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1.1.3. Anti-oxidant

Free radical은 생체 내에서 자연적으로 생성되거나, UV 조사, 흡연, 환경 오염 물질을 비롯한 각종 화학물질의 노출에 의해 생성된다. 이러한 free radical은 노화 및 뇌혈관 질환, 심혈관계 질환, 암과 같은 만성 질환의 원인이 되며, 피부의 노화를 가져다 준다. 피부노화는 크게 내인성 노화와 외인성 노화로 나눌 수 있는데, 외인성 노화 중 가장 큰 원인은 자외선의 과다노출이다[17]. 자외선은 파장에 따라 UVC (200 ~ 280 nm), UVB (280 ~ 320nm), UVA (320 ~ 400 nm)로 나뉘어 지는데 UVC는 파장이 짧아 대부분 오존층에 흡수되며, 주로 피부에는 UVB와 UVA가 직접적인 영향을 준다. UVB의 경우 표피의 단백질 및 DNA 염기들이 UVB 파장 영역을 대부분 흡수하기 때문에 표피의 손상을 일으키며, UVA의 경우는 장파장으로 표피에서 파장을 거의 흡수하지 않기 때문에 진피까지 도달하여 피부손상과 함께 피부 색소침착을 일으킨다[18]. 이렇듯 피부가 자외선에 노출되면 생체 내 포르피린 (porphyrin), 리보플라빈(riboflavin)에 의한 자외선의 흡수로 ROS가 생성된다. ROS는 일반적인 삼중항 상태의 산소($^3O_2$)보다 반응성이 커서 인체 내의 성분들을 산화시키는 물질로 일중항산소($^1O_2$), 과산화수소(H_2O_2)와 같은 비라디칼종과 수퍼옥사이드 라디칼($\cdot O_2^-$), 하이드록실 라디칼(·OH)과 같은 산소 중심의 라디칼, 생체 성분과 ROS와의 반응에서 유래된 과산화 라디칼(ROO·), 알콕실 라디칼(RO·), 히드로과산화물(ROOH) 등이 포함된다. 이러한 ROS는 고에너지 복사선, 광증감 반응 및 효소 반응을 거쳐 생성되어 피부 세포에 산화적 스트레스를 유발시키고 콜라겐 및 엘라스틴 분자의 절단 및 손상을 일으켜 주름생성을 유도하며, DNA 손상 및 활성에 영향을 주어 melanin 세포의 증식과 melanin 합성을 증가시킨다[19]. ROS로부터 산화적 손상을 방지하기 위해 생체 방어기구로서 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화 효소와 vit E, vit C, glutathione 등과 같은 항산화 물질이 존재하지만 피부는 직접적인 환경요인들과 접촉하고 있기 때문에 산화적 스트레스에 항상 노출되어 생체 내의 항산화성 방어망의 불균형이 일어나 과산화지질 및 산화 생성물이 축적되고 피부노화가 촉진된다[20]. 따라서 활성산소를 제거할 수 있는 항산화제를 사용하면 피부 자체의 항산화 네트워크를 회복시켜 피부조직을 보호하고 색소침착과 같은 피부노화를 늦출 수 있다. 피부에 각종 질환을 유발시킬 수 있다고 알려져 있

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

는 합성 항산화제보다는 인체에 안전하고 항산화가 효과가 뛰어난 천연 항산화제의 연구 개발이 절실히 요구되고 있는 시점이다. 현재까지 가장 널리 쓰이고 있는 butylated hydroxyanisole (BHA)나 butylated hydroxytoluene (BHT)와 같은 합성 항산화제는 vit E, vit C와 같은 천연 항산화제에 비해 저렴한 가격과 높은 항산화능 등의 장점이 있지만, 발암성 등의 독성을 야기한다는 일부 연구 결과로 인해 천연 항산화제에 대한 요구가 증대되고 있다. 천연 항산화제는 비타민(vitamin)류 외에 페놀성 화합물(phenolic compounds)과 플라보노이드(flavonoids)를 포함한 식물체 유래 천연물, 토코페놀(tocophenol)류 그리고 저분자 물질(micromolecules)인 향기 성분들을 포함한다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1.1.4. Anti-melanogenesis

피부는 인체의 가장 외층에 위치하며 물리적인 장벽을 형성하여 물리적, 화학적, 생물학적 자극으로부터 신체를 보호한다. Melanin은 동물의 피부나 눈에 존재 하는 페놀류의 생물고분자 물질로 흑색 또는 갈색의 검은 색소와 단백질 복합체를 형성하며 인종에 따라 eumelanin, pheomelanin, mixed melanin, neuromelanin의 4가지 형태를 갖고 있다[21]. Melanin은 피부 내 침투한 일정량의 ultra violet (UV)을 흡수하여 유해한 자외선이 피부 내부로 침투되는 것을 차단하여 인체를 보호한다[22]. 동·식물, 미생물 등의 생육이나 발달에 필수적이지 않지만, 환경 적응에 대한 경쟁력과 생존력을 높여주는 역할을 한다. 또한 melanin은 아민, 금속이온 등과 같은 세포 독성물질에 대한 제거제로 작용하며, 세포를 보호하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다[23]. 최근 오존층이 파괴되고 지표면에 도달하는 자외선(UVB)량이 증가함에 따라 피부에 침투하여 피부의 노화나, 피부암 등의 원인이 되고 있으며, 이와 함께 melanin 색소가 침착 되어 기미, 주근깨와 같은 피부 질환이 증가하고 있다. 또한 자외선에 노출됨으로써, ROS가 생성되며, 이와 함께 광산화적인 손상을 입게 된다[24]. ROS는 생체세포에서 정상적인 세포 작용 혹은 성장 조절 및 세포 사이의 신호와 관련된 작용이 이루어지는 동안에 효소 반응의 중간 생성물로써, 지속적으로 형성된다[25]. 자외선에 의해 증가된 ROS는 cytokines 성장 인자 및 다른 염증성 인자의 생성을 촉진시켜 섬유아세포(fibroblast cell)를 자극하여 melanin 생성을 증가시키고, 이와 같이 생성된 melanin의 생성량과 분포도가 피부의 색을 결정하는 주요 요인이 된다[26]. Melanin은 표피 기저층에 존재하는 색소세포(melanocyte)안에 존재하는 melanosome에서 알칼리 난용성인 흑색의 eumelanin과 알칼리 가용성인 적색의 pheomelanin의 혼합물로 생합성 된다. UV에 의해 항진된 melanocyte는 유사분열이 촉진되어 활성화 상태가 되며, 활성화가 상태의 melanocyte에서는 tyrosinase의 합성이 촉진되고 melanin의 생성이 항진되어 수지상 돌기를 통해 표피세포(epidermal cell) 쪽으로 이동하게 된다. Epidermal cell에 이동되어 melanin이 피부 표피에 누적되어 있는 상태를 hyperpigmentation이라고 한다.

Melanin의 생합성은 melanocyte의 소기관인 melanosome에서 cascade반응으로 일어나며, tyrosine을 기질로 한다. Melanosome은 melanocyte의 수지상 돌기를 통해 각질형

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

성세포(keratinocyte)로 수송되어 각화과정에 의해 피부 외층으로 이동하게 된다[27]. Melanin 형성의 주효소인 tyrosinase는 rate-limiting step인 tyrosine에서 L-3,4-dihydroxyphenylamine (DOPA)로의 전환과 이후 DOPA quinone으로의 전환을 매개한다[28]. Melanosome은 melanocyte의 수상돌기를 통해 주변에 위치한 keratinocyte로 이동하게 되므로 melanocyte와 keratinocyte 같은 melanin unit을 갖게 된다[29]. Melanin은 생체 내 cysteine 과 glutathione이 존재할 때 효소의 작용에 따라 eumelanin과 pheomelanin으로 분류되며, 이들의 형성 비율에 따라 피부, 눈동자, 머리카락 등의 색이 결정된다[30]. Tyrosinase는 L-tyrosine에서 DOPA로의 전환과 이후 L-DOPA를 산화시켜 DOPA quinone을 거쳐, DOPA chrome으로 hydroxylation 되는 것을 매개한다[31]. 산소가 존재할 때는 DOPA chrome이 decarboxylation 되어 5,6-dihyroxyindole (DHI)이 되며 빠르게 oxidation되어 indole-5,6-quinone이 된 후 eumelanin이 형성된다[32]. Eumelanin 형성과 함께 pheomelanin 합성도 이루어진다. Pheomelanin은 glutathione 또는 cysteine이 DOPA quinone과 결합하여 alanyl-hydroxyl-benzothiazine subunit을 형성하여 합성된다[33]. Melanin 생합성에 관한 메커니즘은 Fig. 1에 나타내었다. 또한 피부암을 연구하는 기존의 연구에서 DOPA chrome 이 DHI로 전환되는 경로 외에 5,7-dihydroxyindole carboxylic acid (DHICA)로 전환 되는 새로운 경로가 존재한다는 사실이 밝혀졌다[34]. DOPA chrome에서 DHICA를 거쳐 melanin을 합성하는 경로는 세포가 독성이 있는 생성 중간 대사물질로부터 자신을 보호하기 위한 파생 경로로 추정되고 있다[35]. Melanosome 내에서 일어나는 일련의 melanin 합성 과정에는 적어도 3개의 효소가 관여하는데, tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1), tyrosinase-related protein 2 (TRP-2)가 이에 해당한다. 이 중 tyrosinase는 rate-limiting step에 관여하며 가장 핵심이 되는 효소이다[36]. Tyrosinase는 melanogenesis의 속도결정 단계인 초기 반응에 관여하는 효소로 생합성 경로에서 서로 다른 세 반응을 촉매한다. Tyrosine에서 DOPA로의 hydroxylation, DOPA에서 DOPA quinone으로의 산화반응, DHI의 탈수화 반응이 이에 해당한다. DOPA는 첫 번째와 세 번째 반응에서 cofactor로 작용한다[37]. DOPA와 tyrosinase의 정확한 상호작용 부위는 밝혀져 있지 않으나, *in vitro* kinetic 연구들에 의하면 서로 다른 두 개의 binding site가 있는 것으로 알려져 있다. Tyrosinase에 cofactor가 결합하게 되면 tyrosinase의 conformation 변화를 유도해 결국

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

에는 기질에 대한 효소의 친화력을 증가시킨다[38]. Tyrosinase의 활성을 위해서는 촉매 활성 자리에 있는 histidine 잔기에 2개의 구리 이온이 결합하여야 한다[39]. 또한 Tyrosinase는 type I membrane glycoprotein으로서 사람은 7개의 glycosylation site를 가지고 있다[40]. Glycoprotein을 생성하는 glycosylation 과정은 asparagine의 side chain에 있는 NH_2기[41]에 당을 붙이는 N-linked glycosylation 과정과 serine이나 threonine의 side chain에 있는 OH기에 당을 붙이는 *o*-linked glycosylation 과정으로 나뉘는데[42], 이중 tyrosinase는 N-linked glycosylation 과정에 의해 만들어진다. 단백질의 N-linked glycosylation은 endoplasmic reticulum (ER)에서 단백질 합성 번역과 함께 일어나며, glycan unit의 절반은 ER막의 바깥인 세포질 안쪽에서 만들어지고, 이후 나머지 절반은 ER 내에서 만들어져 단백질로 전이된다[43]. ER에서 이런 합성 과정은 oligosaccharide의 말단 끝에 존재하는 mannose에서 3개의 glucose를 α-glucosidase I과 II가 끊어줌으로써 시작되게 된다. Tyrosinase의 glucose trimming 과정은 castanospermine (CS) 또는 deoxynojirimycin (DNJ), N-butyl-deoxynojirimycin (NBDNJ)과 같은 α-glucosidase에 의해서 저해된다. 이때 tyrosinase가 급속하게 folding 되어 copper가 없는 불활성화된 형태가 생성되어 melanosome으로 이동하게 된다[40]. 이와 같이 α-glucosidase는 결과적으로 melanin의 합성을 저해한다고 알려져 있으며, 현재 미백제로 가장 많이 사용되는 L-tyrosine의 저해제는 arbutin이다[44]. 또한 kojic acid는 tyrosinase 활성 부위의 copper를 chelating하여 tyrosine에서 DOPA로 그리고 DOPA에서 DOPA quinone으로 진행되는 과정을 저해한다는 것이 보고되었다[45]. 최근 melanin 색소침착을 억제하기 위해 melanin 생합성의 속도결정 단계에 관여하는 tyrosinase 저해제들이 연구되고 있는데 현재 미백 화장품으로 사용되는 tyrosinase 저해제들은 하이드로퀴논(hydroquinone), 코직산(kojic acid), 알부틴(arbutin), 아젤릭산(azelaic acid), 아스코르빈산(ascorbic acid; vit C), BHT (dibutylated hydroxytoluene) 등이다. 그러나 이와 같은 합성 미백제는 가격도 저렴하고 우수한 항산화 효과를 나타내지만 과다 사용시 질병을 유발하는 등 안전성에 문제점이 있는 것으로 보고되고 있어 사용량을 규제하고 있다[46]. 이에 따라 피부에 적용 했을 때 세포독성이 낮고 melanin 생합성 저해활성이 높은 항산화제 및 피부 미백제의 소재 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 본 연구에서는 기존의 연구에서 미백 기능에 대해 논란이 제기

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

된 quercetin의 미백기능을 규명하고 현재까지 미백 활성이 보고되어 있지 않은 C3G의 *in vivo, in vitro* 실험을 통해 미백활성에 대한 메커니즘을 밝히고 새로운 미백 소재로써의 가능성에 대해 조사하였다.

1.1.5. Whitening cosmetic

미백 화장품이란 피부의 과도한 melanin 색소의 침착을 방지하거나 피부에 이미 침착되어 검게 변한 피부의 색을 옅게 하고, 기미나 주근깨와 같은 피부 질환 생성을 억제 함으로써 피부의 미백에 도움을 줄 수 있는 기능성 화장품을 말한다[2, 47]. 현재 미백 제품을 개발하기 위해서는 고시 원료 제품에 적용하거나 새로운 미백 원료를 개발하여 제품에 적용하여 식약처의 인증을 거쳐야 미백 기능성 화장품이라 표기할 수 있다. 식약처 인증 미백 기능성 원료는 닥나무 추출물 2%, arbutin 2%, ethyl ascorbyl ether 2%, 유용성 감초 추출물 2% 등이 있다. Melanin 합성에 가장 큰 영향을 주는 것은 UV이며, 그 외에 신체 내/외부적인 요인으로 발생하는 melanin 세포자극호르몬(melanocyte stimulating hormone, MSH)이 있으며, 갑상선 호르몬과 같은 기타 호르몬, 유전적인 소인, 환경요인, 식품, 의약품에 의해서도 발생한다[48]. Melanin은 외부적으로 UV에 대해 방어역할을 하며, 인체 내에서는 아민, 유리기, 금속이온에 의해 발생하는 독성 물질에 대해 세포를 보호하는 기능을 갖고 있다. 그러나 과잉 생산이 되면, 기미, 주근깨 등의 색소 침착 등의 심미적인 문제와 더불어 피부 노화를 촉진하며, 피부암을 유발하기도 한다.

미백화장품을 크게 두 가지의 범주로 구분해 보면 melanin의 색소 침착을 미리 예방하여 색소 침착을 방지하는 것과, 이미 생성된 melanin을 환원시키는 것이다. 첫째, tyrosinase의 활성 억제, 둘째, melanin 생성 억제 및 melanin 생성 관련 유전자 억제, 셋째, 생성된 melanin 배출 촉진, 넷째 melanocyte와 keratinocyte의 커뮤니케이션 억제 등이다[49]. 지금까지 미백제의 기능은 melanin 생성 초기단계에서 tyrosinase 활성 억제와 melanin 배출 촉진을 위한 각질제거가 주류를 이루었다. 그러나 최근에는 미백 효과를 극대화 시키기 위해 여러 가지 상호보완적인 방법을 사용하는 추세이다. 그러나 기존 연구들은 대부분 melanin 생합성의 주요 효소인 tyrosinase의 저해능을 평가하는 방법과 melanoma cell을 이용한 melanin 합성 평가에 대한 *in*

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

vitro 실험이 의존해 왔으며, 미백효과 검증에 반듯이 필요한 *in vivo* 실험은 미흡한 편이다. 최근 미용분야의 동물 실험의 제한에 따라 기존의 동물 실험법을 대체할만한 방법들의 요구가 증대되고 있다. 제브라피쉬(Zebrafish)는 투명한 피부를 통해 색소 생성 여부가 관찰되며, 배아 발생과정에서 일어나는 cellular process의 변화를 외부에서 직접 관찰할 수 있으며, 배아 발생 후 48시간 내에 실험 결과를 확인할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 새로운 미백제 탐색 방법으로 zebrafish 모델을 이용한 색소 침착 저해능을 검증하고자 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

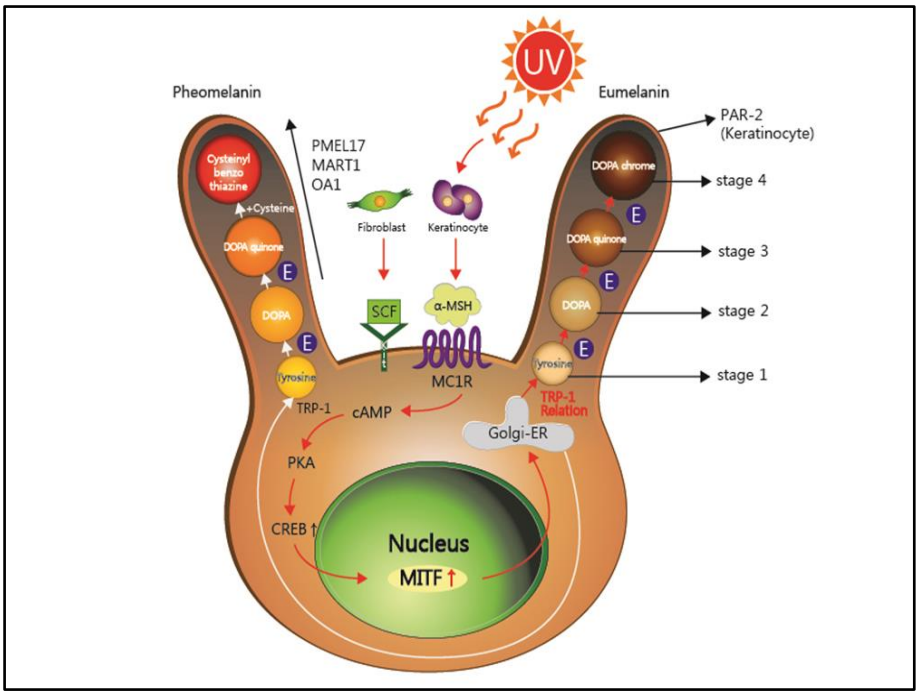


Fig. 1. Mechanism of melanogenesis.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

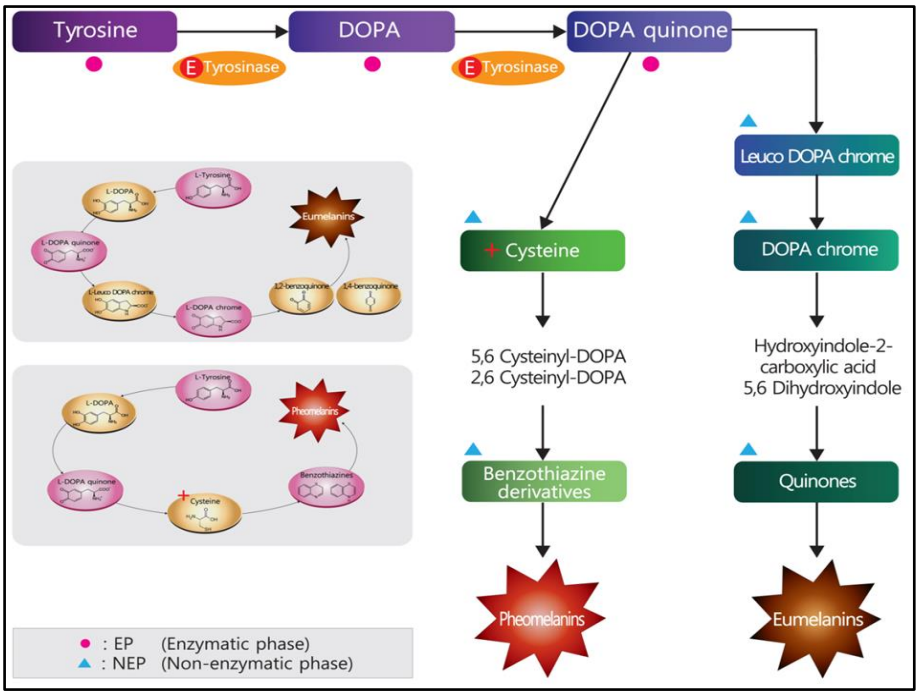


Fig. 2. Schematic representation of melanin synthetic pathways.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

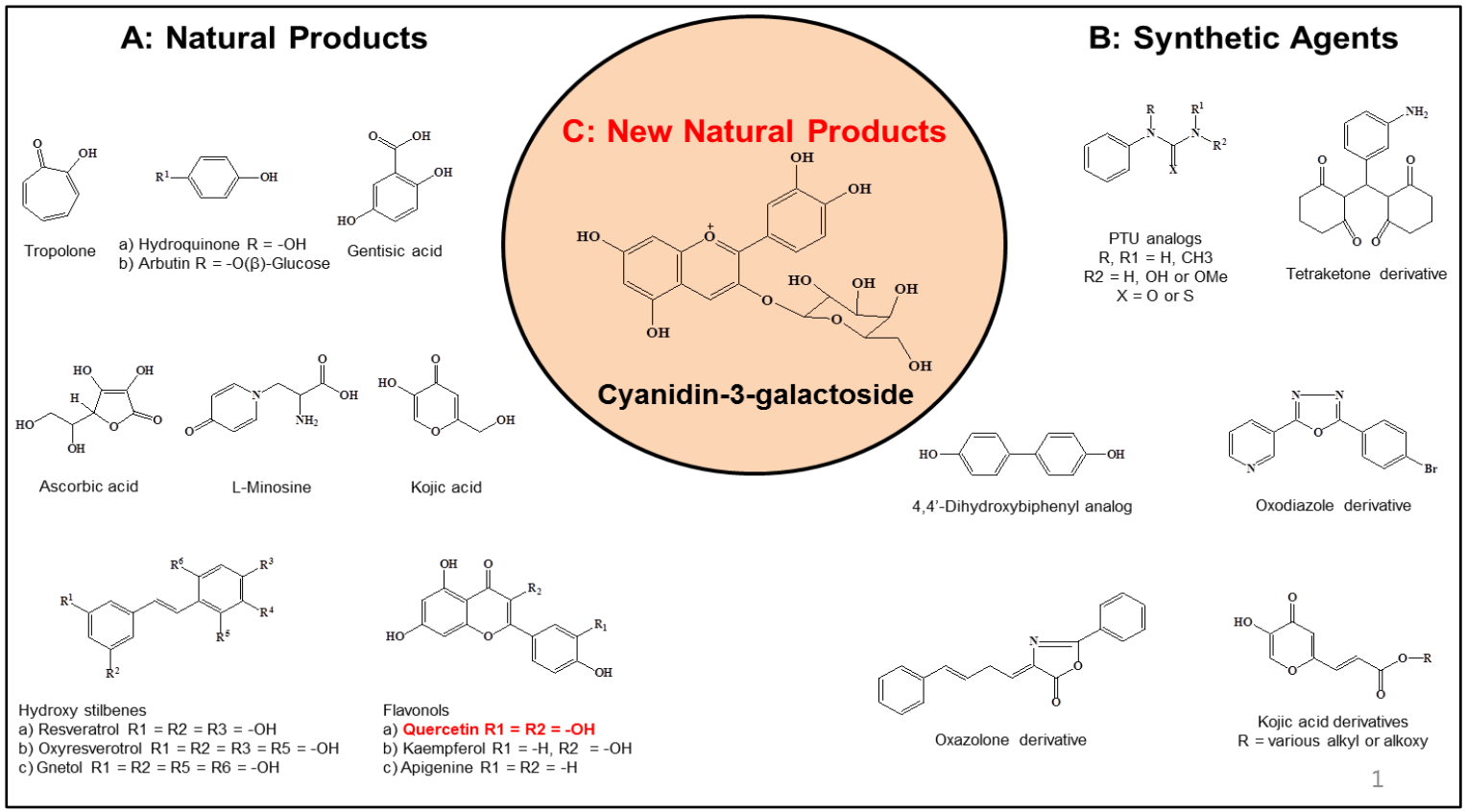


Fig. 3. Known natural (A), synthetic (B), and new natural compounds (C).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

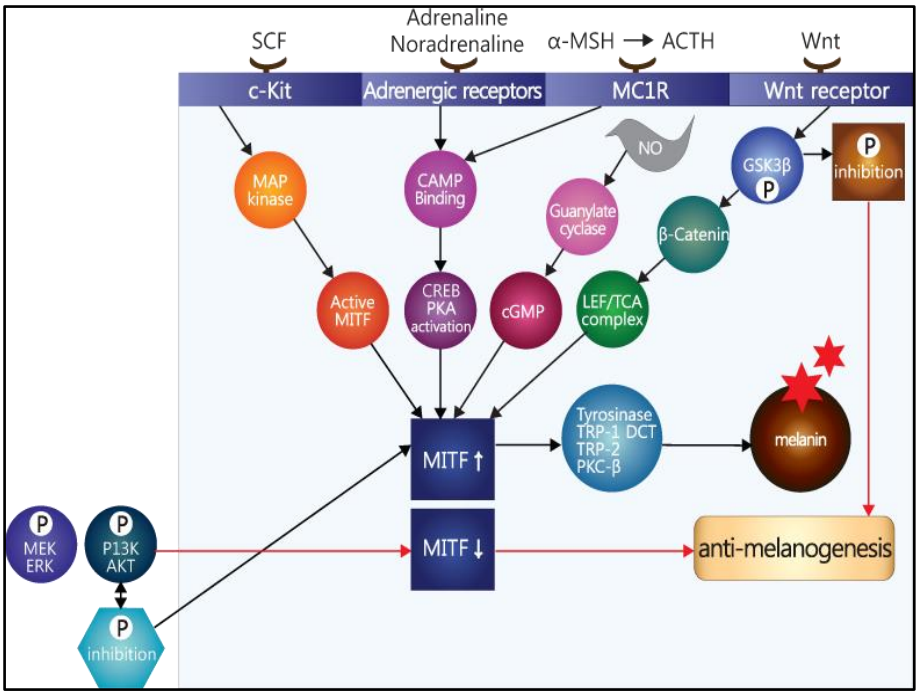


Fig. 4. Signal transduction pathway of melanin formulation.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1.2. Polyphenol

최근 과일이나 채소에 함유 되어있는 polyphenol 화합물이 사람이나 동물에게 건강을 증진(health promoting functions)시키는 효과가 있음이 밝혀지고 있다. Polyphenol은 활성산소를 제거하고 지질과산화에 의한 생체의 순환기능 장애와 노화 등을 억제하는 항산화 기능을 가지고 있으므로 각종 질환의 예방과 치료에 이용되고 있으며, 최근 역학 조사의 결과에서는 과일이나 야채를 많이 섭취하는 사람일수록 심혈관계질환이나 암의 발생율 및 순환기계의 질환이 감소한다는 것이 알려졌다[50]. Polyphenol은 산화적 DNA 손상, 비정상적 세포증식, 세포의 돌연변이, 세포간 정보전달 등을 억제하고 발암과 관련된 과정에서 항암효과를 가지며 단백질과 결합하여 신체 대사에 관여하는 효소활성을 변화시키거나 화학물질의 독성 제거를 위한 유전자 발현을 촉진시키는 작용을 한다[51]. Polyphenol은 화학적으로 benzene ring에 hydroxyl group을 한 개 또는 그 이상 가진 화합물로써, 페놀성 고리 및 다른 구조적 요소의 개수에 따라 여러 가지로 나눌 수 있는데 탄소 골격에 따라 flavonoid, phenolic acid, stilbene, 그리고 lignan으로 나누어진다[52]. Polyphenol은 현재까지 8000개 이상의 구조가 알려져 있으며, 중합체 및 올리고머 등으로 중합이 되는데, 이 때 flavonoid의 올리고머 형태는 ‘tannin’ 이라고 부르고 중합된 tannin (proanthocyanidins 또는 procyanidins)과 가수분해 가능한 tannin으로 분류된다[51, 53]. Polyphenol에 존재하는 다수의 OH기는 여러 화합물과 쉽게 결합하는 특성을 가지고 있어 항산화 효과 및 항암, 항염 효과가 뛰어나다[51, 54]. Flavonoid는 polyphenol에 속하는 성분으로, flavonoid의 C6-C3-C6를 기본 골격으로 하며 노란색 내지는 담황색을 나타내는 페놀계 화합물의 총칭으로 polyphenol과 같이 채소류와 식물의 잎, 꽃, 과실, 줄기 및 뿌리 등 거의 모든 부위에 함유되어 있을 뿐 아니라 곡물, 과실류 등에도 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[55]. Flavonoid는 ROS를 효과적으로 제거하여 항산화능이 높다고 알려져 있으며 polyphenol과 마찬가지로 항바이러스, 항염증, 항암 효과가 있는 것으로 알려져 있다[56]. 최근 polyphenol, flavonoid가 가지는 다양한 생리활성 기능을 확인하고 식품 및 화장품 등 새로운 천연 소재의 자원을 발굴하고자 다양한 식물자원의 polyphenol과 flavonoid의 함량 분석 및 그 효능에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[57].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1.2.1. Flavonoids

Flavonoid 생합성은 식물 이차대사의 산물이며 현재까지 약 4,500종류 이상의 서로 다른 flavonoid계 화합물이 분리되었다[58]. 식물의 잎, 줄기, 열매, 뿌리, 종자, 꽃 등 모든 부위에 분포하는 것으로 알려졌으며, 생장과 발육, 미생물과 해충에 대한 방어, 인간에 대한 약리적 효과 (항균, 항바이러스, 항알레르기, 항염증), 강력한 항산화 활성 등으로 인체에 무척 유익한 물질로 알려져 있다[59]. Phenylpropanoid 유래의 pcoumaroyl-CoA와 acetate 유래의 malonyl-CoA 세 분자를 전구물질로 하여 합성되며 구조적 특징으로 C6-C3-C6의 골격상을 가진다[60]. Pyran과 관련된 2개의 phenyl 환을 각각 환 A와 B로 표시하는데, 주로 여러 당류와 ether 결합에 의한 배당체의 형태로 존재하는 경우가 많다[60-61]. 고등식물의 flavonoid는 6가지의 주요 subgroup, chalcone, flavone, flavanol, flavan 3,4-diol(leucoanthocyanidin), proanthocyanidin으로 구분되며, 넓은 의미로는 anthocyanin도 포함한다. 일반적으로 자외선 쪽의 흡수파장을 가지므로 무색으로 나타나지만, flavone과 flavonol은 2, 3 탄소위치에 2중 결합이 있어 노란색을 나타낸다.현재까지 가장 광범위하게 연구되어 온 이차대사 분야 중 하나인 flavonoid는 다양한 분포와 기능에 대한 많은 정보가 밝혀져 있으므로, 앞으로 분자생물학적 수준의 화학, 유전학, 효소학 연구를 위한 모델로서 주목 받고 있다[45, 62]. 식물의 다양한 부위에 존재하는 flavonoid는 식물의 정상적인 성장, 분화뿐만 아니라 착색에 관여하기도 하며 식물의 생화학, 물리, 생태에 있어서 많은 기능을 한다. 즉, UV에 대한 방어, 병원 미생물 또는 해충에 대한 회피, 화분 임성과 발아유전자의 활성화 그리고 식물 생장과 효소활성을 조절하는 기능을 가진다[63]. 또한 식물의 착색은 꽃가루 수분과 종자의 전파를 위하여 유리할 뿐만 아니라, 인간에게 미적인 가치를 부여하기도 한다. 더불어 다양한 식물 유래의 flavonoid 대사 구조유전자와 조절 유전자들이 밝혀져 화훼산업, 특히 작물의 영양분 증대 등 대사공학적인 측면에서도 매우 다양한 연구가 이루어지고 있다[45, 58, 61].

1.2.2. Physiological function of flavonoid

Flavonoid 생합성 경로는 여러 대사물질들, 즉 chalcone, flavonone, isoflavonoid,

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

flavone, flavonol, leucoanthocyanidin (flavan-3,4-diol), catechin, anthocyanin 등으로 이루어져 있다(Fig. 1). 꽃이나 과실의 착색은 pelargonidin-3-*o*-glucoside (오렌지색, 분홍색, 빨간색), cyanidin 3-*o*-glucoside (자홍색, 진홍색), 그리고 delphinidin-3-*o*-glucoside (자주색, 푸른색) 등 액포에 집적되는데 기인하며 flavonoid (flavonol, flavone, chalcone, aurone)도 색깔을 결정하는데 영향을 미치게 된다[64]. 따라서 flavonoid 생합성 관련 효소들이나 유전자를 조작하는 연구들이 주로 페튜니아 (*Petunia hybrida*)의 착색 조절 연구를 중심으로 이루어져 왔으며 또한 다양한 flavonoid가 건강보호 및 약리적 이용 측면에서도 광범위하게 연구되어 그 효과가 규명되고 있다[65]. 합성의 첫 단계로서 chalcone synthase (CHS)에 의하여 acetate 유래의 malonyl-CoA 세 분자와 phenylpropanoid 유래의 p-coumaroyl-CoA 한 분자로부터 한 분자의 tetrahydroxychalcone이 생성된다. 약 42 kDa의 dimeric polyketidesynthase인 CHS는 cofactor를 필요로 하지 않으며, 동일한 작용을 하는 NADPH 의존형 reductase에 의하여 6-deoxychalcone (isoliquiritigenin)이 생성되기도 한다[66]. 이들 2종류의 chalcone은 종에 따라서 aurones (flavonoids subclass)으로 전환되기도 한다. 또한 stilbene synthase (STS)에 의하여 pcoumaroyl-CoA와 malonyl-CoA로부터 stilbene (resveratrol)이 합성되는데, 주로 포도(*Vitis vinifera*), 땅콩(*Arachis hypogaea*), 소나무(*Pinus sylvestris*) 등에 존재하며 심장병을 감소시키는 효과가 보고되고 있다[67]. 노란색의 tetrahydroxychalcone은 chalcone isomerase (CHI)에 의한 입체 특이적인 ring closure isomerization 단계를 거쳐 무색의 naringenin이 되는데 일부는 liquiritigenin이 되기도 한다. Flavone은 두과 작물과 근류 박테리아 간의 상호관계에서 질소 고정을 촉진시키는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있으며, 그 중 포도 유래의 naringenin은 면역기능을 증가시키는 효과가 보고되었다[68]. 이들 flavanones (naringenin, eridiotyol, pentahydroxy flavanone)는 C-2-C-3 이중결합으로 flavones (apigenin, leuteolin, tricetin)와 flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) 그리고 3-위치의 hydroxylation으로 dihydroflavonols (dihydrokaempferol, dihydroquercetin, dihydromyricetin)이 된다. Naringenin은 flavone synthase (FNS)에 의하여 C-2/C-3 위치에서 dehydration되어 apigenin (flavones)이 되는데, 종에 따라 다양한 효소 형태를 가진다[69]. 즉, 파슬리 (*Petroselinum crispum*) 세포 배양에서는 α-ketoglutarate-dependent dioxygenase (FNS I)에

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

의해 flavone 형성이 촉매 되나 Antirrhinum 꽃에서는 NADPH-dependent FNS II에 의하여 촉매 된다. 또한 naringenin은 반드시 Fe^{2+}를 필요로 하는 *α*-ketoglutarate-dependent dioxygenase인 flavanone 3-hydroxylase (F3H)에 의하여 stereospecific 3-hydroxylation (또는 3′-hydroxylated analog)되어 dihydrokaempferol (dihydroflavonol)을 형성한다. dihydrokaempferol은 flavonoid 3′-hydroxylase (F3′H)에 의하여 dihydroquercetin이 되거나 flavonoid 3′, 5′-hydroxylase (F3′5′H)에 의하여 dihydromyricetin이 된다[70]. Dihydroquercetin은 F3′5′H에 의하여 dihydromyricetin이 되기도 한다. 최근 암예방을 위하여 주목 받고 있는 isoflavonoid 합성은 isoflavone synthase (IFS)에 의해 flavanone (naringenin, liquiritigenin)에서 C-2에서 C-3로의 aryl 이동 및 hydroxylation이 촉매 되어 2-hydroxyisoflavanones (2-HIS)이 합성된 후, 2-hydroxyisoflavanone dehydratase (IFD)에 의하여 dehydration 되어 genistein과 diadzein이 합성된다[71]. Naringenin은 NADPH-dependent cytochrome P450 monooxygenase와 관련 있는 특정 hydroxylation으로 직접 dihydroquercetin이 된 후, *α*-ketoglutarate-dependent dioxygenase인 flavonol synthase (FLS)에 의한 C-2-C-3 이중 결합의 형성으로 quercetin (flavonol)이 되며, 적포도주 내 quercetin의 항혈전 효과가 보고된 바 있다[69, 72] .또한 dihydroquercetin은 NADPH-dependent dihydroflavonol reductase (DFR)에 의하여 환원되어 leucocyanidin (flavan-3, 4-diol 또는 leucoanthocyanidin)이 된다. Leucoanthocyanidin은 종 또는 조직 특이적인 효소적 전환을 거쳐 구조적으로 다양한 flavonoid를 만든다. 꽃잎에서 무색의 leucoanthocyanidin (leucopelargonidin, leucocyanidin, leucodelphinidin)은 *α*-ketoglutarate-dependent dioxygenase인 anthocyanidin synthase (ANS)에 의하여 anthocyanin (cyanidin, pelargonidin, delphinidin)이 된 후 UDP-glucose-flavonoid 3-*o*-glucosyltransferase (FGT)에 의하여 적색, 자색, 청색 등의 색을 띄는 anthocyanin (cyanidin 3-*o*-glucoside, pelargonidin-3-*o*-glucoside, delphinidin-3-*o*-glucoside)이 합성된다. 이때 B 환의 hydroxylation 형태에 의하여 anthocyanin 종류가 결정되며, 4번 위치에 hydroxyl 기를 가지는 자색 또는 적색의 cyanidin을 기본 색소로 두 개의 가변적 위치에서의 hydroxylation에 따라서 빨간색 및 오렌지색의 pelargonidin 색소 또는 자주색 및 파란색의 delphinidin 색소가 합성된다[73]. 또한 leucoanthocyanidins은 leucoanthocyanidin reductase (LCR)에 의하여 catechin이 되며, catechin은 항암효과, 면

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

역력증가, 항혈전, 항뇌졸증, 항산화 등 다양한 기능이 규명되었다[74].

1.2.3. Quercetin

Flavonoid류 물질 중 quercetin은 식물성 식품에 존재하는 양과 섭취되는 양으로 볼 때 flavonoid의 대표적 물질이라고 할 수 있다[75]. Quercetin은 주요 flavonol 의 일종으로 4,000종에 가까운 flavonoid 중의 하나이며, 적포도주나 양파, 녹차, 사과, 베리, 은행잎, 브로콜리 등의 식품에 풍부하다[59, 76]. 이와 같은 식품군 중에서 quercetin이 가장 함유되어 있는 것은 양파이며, 특히 양파껍질에 다량 함유되어 있다[77]. 양파에 존재하는 flavonoid는 크게 anthocyanin과 flavonol로 나뉘는데, anthocyanin은 적색 양파의 주요 색소이며 total flavonoid의 10% (39~240 mg/kg FW.)를 차지한다[78]. 또한 적색 양파껍질의 anthocyanin은 *α*-tocopherol 보다 lipid peroxidation 저해에 효과적인 것이 밝혀졌으며, flavonol은 황색 양파의 껍질의 주요 색소이며 25개 이상의 다른 종류의 flavonol이 양파에서 동정되었다[79]. 양파의 건물 중 약 80% 가량이 fructan, glucose, fructose 및 sucrose 등의 당으로 구성되어 있으며, fructan이라고 불리는 fructooligo saccharides가 양파의 주요 탄수화물이다[80]. 양파의 대표 유기산은 glutamic acid (325 mg/100 g)이며, 그 외에도 citric acid (48.5 mg/100 g)와 malic acid (43.6 mg/100 g) 등이 보고 되었다[81]. Quercetin은 식물 내에, 주로 당과 결합하여 quercetin glucoside 형태로 많이 존재하고, quercetin-4′-glucoside와 quercetin-3,4′-diglucoside가 전체 flavonoid의 80%정도를 차지한다[82]. Quercetin은 *in vivo* 및 *in vitro* 연구에서 다양한 약리 효과가 증명되었으며, 대표적인 기능으로는 free radical을 소거하여 *tert*-butyl hydroperoxide와 같은 유해물질에 의해 발생하는 돌연변이를 억제하는 기전이 보고 되었다[83]. 또한 quercetin은 강력한 항산화제로 직접 free radical을 제거하고, xanthine oxidase와 lipid peroxidation을 억제하여 항산화 방어 체계를 향상시킨다고 알려져 있다[84]. 이러한 효과와 효능에 의거해 많은 나라에서 quercetin을 혈관 보호제 및 종합비타민제와 한약의 재료로 사용하고 있으나 체내 흡수율에 대한 보고는 정확하게 규명된 바가 없다. 피부 미백에 관한 연구로는 tyrosinase 저해활성 실험과 elastase 활성 저해작용, lipase 활성 저해작용, 피지선으로부터의 피지분비 조절작용 등 다양한 생리활성을 비롯하여, 높은 수준의 항산화 및 melanin 생합성 저해능이

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

보고 되었으나, 기존의 연구에서 quercetin은 100 μg/ml 낮은 농도에서도 cell toxicity 가 있음이 밝혀져 높은 항산화능이 있음에도 불구하고 기능성 소재로써, 제품의 안정성에 대한 부분에 문제가 있다고 할 수 있다. 또한 기존의 연구에서 항산화능에 대해 일치하는 보고가 많으나, 피부 미백 기능에 대한 연구에서는 찬, 반 논란의 여지가 있으며, 현재 동물 모델을 이용한 *in vivo* 실험이나 clinical trial에서 피부 미백 기능에 대한 연구는 조사된 바가 없다. 따라서, 본 연구에서는 논란의 중심에 있는 quercetin의 항산화능과 피부미백기능과 독성에 대한 최소 농도 범위를 평가하고 *in vivo* 실험을 통해 피부 친화적이고 안정적인 피부 미백 소재로써의 가능성에 대해 조사 하였다.

1.2.4. Anthocyanin

안토시아닌(Anthocyanin)은 꽃이나 과일 등 식물이 갖고 있는 빨간색, 보라색, 파란색등의 색소를 말하며, 수소 이온 농도에 따라 각각 다른 색깔을 띄게 된다[85]. 현재까지 수천의 식물 종으로부터 약 4,500종류 이상의 서로 다른 flavonoid계 phenol화합물이 분리되어 왔으며, 식물의 생장과 발육, 미생물과 해충에 대한 방어, 인간에 대한 약리적 효과 (항균, 항바이러스, 항알레르기, 항염증), 강력한 항산화 활성이 알려져 있다[60-61, 86]. Phenylpropanoid 유래의 pcoumaroyl-CoA와 acetate 유래의 malonyl-CoA 세 분자를 전구물질로 하여 합성되며 구조적 특징으로 C6-C3-C6의 골격상을 가진다. Pyran과 관련된 2개의 phenyl 환을 각각 환 A와 B로 표시하는데, 주로 여러 당류와 ether 결합에 의한 배당체의 형태로 존재하는 경우가 많다. 고등식물의 flavonoid들은 6가지의 주요 subgroup, 즉, chalcone, flavone, flavanol, flavan 3,4-diol (leucoanthocyanidin), proanthocyanidin으로 구분되며, 넓은 의미로는 anthocyanin도 포함한다[87]. 일반적으로 자외선 쪽의 흡수파장을 가지므로 무색으로 나타나지만, flavone과 flavonol은 2, 3탄소위치에 2중 결합이 있어 노란색을 나타낸다. 현재까지 가장 광범위하게 연구되어 온 이차대사 분야 중하나인 flavonoid는 다양한 분포와 기능에 대한 많은 정보가 밝혀져 있어 화학, 유전학, 효소학 연구를 위한 모델로서 주목 받고 있다. Anthocyanin의 대표적인 색소인 cyanidin 3-*o*-glucoside는 산화적인 스트레스에 강한 것으로 보고됨에 따라 항산화, 항암 및 항염증과 관련된 연구가 활

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

발히 진행되고 있다[88]. 이와 같이 anthocyanin은 구조에 결합에 따라 여러 가지 형태로 나뉘어지며, 강한 자외선, 저온, 고습 등의 가혹 조건 에서 고농도의 anthocyanin을 생성하게 되는데, 식물이 강한 자외선에 노출되면 세포핵의 DNA가 파괴되므로 식물표면 또는 중간층에 자외선 흡수 물질인 anthocyanin을 생성시켜 스스로 보호하는 자기 방어 시스템 (self-dependence system)을 갖춰야 하기 때문이다.

1.2.5. Cyanidin-3-*o*-galactoside (C3G)

각종 과일과 채소에 함유된 anthocyanin 색소 중 이미 알려져 있는 3가지 색소는 delphinidin-3-*o*-glucoside, cyanidin 3-*o*-glucoside 및 petunidin-3-*o*-glucoside 성분이다[89]. 이와 같은 3가지 성분은 전체 anthocyanin 성분의 93~95%의 비율을 차지하고 있으며, delphinidin-3-glucoside 성분은 식품 부패균인 사카로미세스 세레비시아 (*Sacchromyces cerevisiae*) 균에 대한 항균작용 및 유방암 억제 효과 등이 있다고 알려져 있다[90]. 또한 cyanidin 3-*o*-glucoside 성분은 다른 anthocyanin에 비해 가장 연구가 많이 이루어진 색소로 각종 항암작용, 위장보호, 염증억제, 항산화 작용 및 궤양 예방 등의 효과가 있다. 특히 이들 anthocyanin은 몸 속 소화기관을 거치는 과정에서 분자구조 중 당이 분리되어 anthocyanidin으로 변하는데, 이러한 구조는 인체에 더 강력한 생리 활성 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[91]. Anthocyanin의 다양한 생리 활성 기능이 알려지면서 최근에는 합성 착색료를 대신 음료나 식품에 첨가하는 천연색소로도 실용화되고 있다. 최근 농진청에서는 검정콩에서 anthocyanin을 새롭게 분리, 동정 하였는데 검정콩 씨껍질을 40% 메탄올 수용액으로 추출해 고성능 액체 크로마토그래피(High performance liquid chromatography)를 이용하여 분석을 하였다. 그 결과 기존 3가지 성분 외에 많은 anthocyanin이 존재한다는 사실을 확인하였으며, 역상 칼럼크로마토그래피(Reverse-Phase chromatography) 분리법을 사용하여 기존 3가지 anthocyanin 외에 3가지 성분(cyaniding-3-*o*-galactoside, pelargonidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside)을 우선적으로 순수 분리했다. 또한 catechin-cyanidin-3-glucoside, delphinidin-3-*o*-galactoside, cyanidin-3-*o*-galactoside, pelargonidin-3-*o*-glucoside의 성분을 확인 하였다. 이렇듯 C3G는 cyanidin 구성 성분 중 가장 높은 함량을 가지고 있지만 영양성분 조사 및 항산화, 항염, 항암 활성에 대한 연구가 대부분이며,

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

현재 미백활성에 대한 연구는 매우 미흡하다. 따라서 본 연구에서는 천연물인 의 항산화 활성 및 미백효과를 확인하고 아직 규명되지 않은 aronia extracts 안의 C3G 성분의 항산화 활성 및 미백활성에 대해 조사하여 천연 미백소재개발의 기초 자료로 활용하고자 한다.

1.2.6. *Aronia melanocarpa*

아로니아(*Aronia melanocarpa*)는 장미과에 속하는 베리(berry)류로 북아메리카 등지에서 자생하며(Tanaka *et al, 0000)*, 학명에 따라 Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*), Red chokeberry (*Aronia arbutifolia*) 및 Purple chokeberry (*Aronia prunifolia)*로 나누어진다[92]. 내한성이 강해 폴란드나 러시아 북부 등지에서 잘 자라며, 주요 생산지는 폴란드이다. Aronia는 2007년 국내에 처음 도입되어 현재 충북 옥천, 강원 원주 등지에서 소규모로 재배하기 시작하여 현재 의령, 단양 등으로 확산되어 농촌 소득 증대와 경쟁력 향상에 유익을 주고 있다. 병충해에도 강해 농약을 사용하지 않는다는 특징이 있으며, 늦여름에서 가을까지 열리는 aronia 열매는 당도가 높지만 tannin 성분의 떫은 맛이 강해 생과로 이용하기 보다는 여러 가지 다양한 형태의 가공식품으로 활용되고 있다. Aronia에 대한 연구는 1930년도 러시아 식물학자인 Ivan Michurin 교수가 aronia의 과즙을 이용하여 다양한 음료와 와인 등으로 활용하면서 다양한 생리 활성 기능이 조사 되었다[93]. 이후 폴란드의 임업 연구소는 1978년 aronia를 도입하고 묘목연구와 함께 다양한 임상실험을 통해 상업적인 재배를 본격적으로 시작하였으며, 1993년 이후 폴란드 정부는 국영 회사인 아그로팜(Agropharm. S. A)사와 함께 aronia의 성분과 기능 및 효과에 대해서 연구를 통해 aronia berry 주스를 출시하였다. 이와 같은 현상으로 독일, 핀란드, 네덜란드, 덴마크 등 유럽 지역에 aronia베리의 수요가 급증하게 되었고, 최근 우리나라에서는 슈퍼푸드에 속한다는 의미로 super berry라고도 불리고 있다. Aronia 열매는 검은 적자색을 띄며, 조성은 수분 84.36%, 탄수화물 14.37%, 지질 0.14%, 단백질 0.7%, 회분 0.44%를 함유하고 있다[92, 94]. Aronia 의 과육과 껍질에는 phenol성 식물 화합물인 polyphenol 화합물, flavonoid, anthocyanin 등의 생리활성물질이 함유되어 있다. 가장 함량이 높은 성분은 anthocyanin과 Procyanidin이며, anthocyanin 함량은 100 g당 1,480 mg

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

proanthocyanin 함량은 100 g 당 664 mg으로 조사 되었으며, cyanin 계열 중에서 C3G의 함량이 가장 높은 것으로 보고 되었다[64, 95]. 주요 anthocyanin은 cyanidin-3-*o*-arabinoside, cyanidin-3-*o*-arabinoside, cyanidin-3-*o*-xyloside이며, R1 위치에 붙는 당 종류에 따라 분류된다[96]. 이러한 anthocyanin은 일반적으로 phenyl group 중의 OH기가 증가하면 청색이 진해지고, methoxyl group이 증가하면 OH기보다 전자 공여능이 크기 때문에 bathochromic shift 현상이 더 크게 일어나 빨간색이 진해지는 경향이 있다[97]. 현재 국내에서 연구된 aronia의 기능성에 관한 보고로는 항당뇨 효과, 항염증 효과, 면역조절 기능활성, 위 보호 효과 등이 있으며, 시력개선 등에 대한 효능도 보고가 되었다[98]. 또한 aronia의 polyphenol 성분에 대한 radical 소거활성, 항산화 효과에 대한 연구가 활발히 이루어져 있으며[99], 대장암 세포주, 자궁암 세포주에 대한 종양 억제활성에 대한 연구도 이루어지고 있다[88a, 100]. 당뇨 유발 쥐 및 고지혈증 유발 쥐에게 aronia juice를 투여하여 혈당 및 지질 저해 효과 및 심혈관질환 저해 효과가 확인되었으며, 콜레스테롤 혈증을 가진 사람이 aronia juice섭취를 하였을 경우 동맥질환 개선에 효과가 있는 것으로 조사 되었다[101]. aronia의 화장품 소재에 관한 연구로는 aronia 열매 및 잎 추출물의 항산화 활성에 대한 연구가 있으며[102], aronia로부터 분리한 anthocyanin의 생리활성 연구에서는 항산화 활성, 항암 활성과 함께 MMP-1 (Matrix metallopeptidase) 발현 저해능이 보고 되었다. 또한 aronia extracts의 anthocyanin 색소를 천연 염모제로써의 적용 가능성에 대한 연구가 진행 되었으며[103], aronia liposome을 제조하여 시간 경과와 외부 환경에 따른 저장 기간의 안정성에 대한 연구가 진행 된 바 있다. 그러나 현재 aronia extracts의 미백 활성에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이며, aronia extracts 자체의 미백 연구는 보고 된 사례가 있으나 aronia extracts의 어떤 성분이 미백성분을 나타내는지 규명된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 aronia extracts을 분리하고 분석 결과를 기반으로 aronia extracts의 미백활성에 대해 조사하고 천연 미백소재로써 활용 가능성에 대해 검토하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Chapter 2. Determination of anti-oxidant

2.1. Introduction

양파(*Allium cepa*)는 다양한 약리학적 성분들을 함유하고 있는 천연 식물소재로써, 항산화 활성이 높아 식품 및 미용향장 소재로 주목 받고 있다. 백합과에 속하는 다년생 식물로 우리나라에서는 고추, 마늘 등과 더불어 대표적인 향신료로 쓰이고 있다. 양파는 수분이 85 ~ 90%, 탄수화물 6.8 ~ 10.0%로 조성은 과당(fructose)이 가장 많고, 포도당(glucose)와 설탕(sucrose)이 포함되어 있으며, 다당류로는 갈락토스(galactose), 아라비노스(aravinose), 람노스(rhamnose) 등이 포함되어 있다[104]. 특히 양파껍질에는 다량의 quercetin이 포함되어 있다. Quercetin은 polyphenol 중에서 flavonoids 계열, flavolnols에 해당된다. flavonoid는 식물성 polyphenol 화합물로써, 지금까지 자연계에는 약 4,000여 flavonoid glucosides가 존재 하는 것으로 알려져 있다. 양파껍질에 관한 연구로는 flavonoids 배당체의 항산화 활성이 있으며, 양파의 성분에 대한 연구로는 육질과 껍질의 총 flavonoids 함량에 대한 연구가 있다[105]. 기존의 연구에서 양파의 과육으로부터 quercetin, diglycoside, ritin, isorhammentin glucoside 등을 분획, 분리하여 보고하였으며, 대부분의 연구에서 양파의 flavonol 중 53% 이상이 quercetin이라고 보고하였다[106]. 또한 flavonoid의 농도는 양파 속 보다는 껍질이나 잎 부분이 더 높다는 연구 결과를 보고하였다[107].

붉은색소 계열의 베리류에 많이 포함되어 있는 anthocyanin은 물에 쉽게 용해되는 수용성의 성질을 갖고 있어 식품과 화장품에 응용하는 것이 비교적 용이하다. anthocyanin 색소의 불안정성은 flavylium 양이온 구조에 기인하는 것으로 색소를 안정화시키기 위해서는 flavylium ring의 hydration을 억제하여야 한다[108]. Anthocyanin 색소의 안정성은 pH, 온도, 빛, 효소, 산소, 당류, 유기산, 금속이온, 공존하는 색소 등에 의해 영향을 받는다[109]. Anthocyanin 색소는 pH 2.0 정도의 산성 용액에서 안정한 flavylium 이온으로 존재하여 적색을 나타내나 pH 5.0 이상의 중성 또는 알칼리 용액에서는 quinoidal base가 우세한 구조로 전환되면서 불안정한 청색을 나타낸다[110]. 이와 같이 양파 속에 포함되어 있는 quercetin과 베리류에 다량 포함되어 있는 anthocyanin계 C3G는 우리 몸에 강력한 항산화제로 작용한다. 항산화제는 인체 내

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

에 자연적으로 존재하는 것과 외부에서 투여해 주는 것으로 나눌 수 있다. 인체 내에 자연적으로 존재하는 항산화제로는 SOD, glutathione, peroxidase 등의 효소와 uric acid, biliruvin 등이 있으며 외부에서 투여해 주는 것으로 vit E, C, β-carotene 이 있으며 minerals 중에는 selenium이 대표적이다. 그 밖에도 melatonin 같은 hormone, 녹차에 많이 들어 있는 flavonoid 성분과 적포도주에 들어 있는 polyphenol, 벌집을 구성하는 성분의 하나인 propolis 등이 대표적인 항산화제라고 할 수 있다. 이들 항산화제들은 활성산소의 독작용을 제거하여 생체를 보호하고 있으며 항산화 물질이 활성산소를 적절하게 제거하지 못할 경우 축적되는 활성산소에 의해 인체는 각종 질병이나 노화가 가속화 되는 것이다. 이와 같은 항산화 물질들은 산화적 손상을 방지하며, lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 염증반응계에서 ROS의 조절에 관여한다. 또한 면역계에서 pro-inflammatory 활성제의 활성을 저해하여 인체를 다양한 질병으로부터 보호한다고 알려져 있다[111].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.2. Mateials and methods

2.2.1. Preparation of Onion skin extracts

본 실험에서 사용한 양파는 전남 무안군에서 2015년에 생산된 것을 광주 동구 Y마트에서 구입하여 사용하였다. 양파껍질을 3번 세척하고 불순물을 제거한 뒤 10등분으로 세절하여 상온에서 5일 동안 자연건조 후 사용하였다. 건조된 양파껍질 100 g을 80% ethanol 10 L에 담금 추출 한 뒤 회전식 증류장치(Rotavapor R11, BUCHI, SWTZER, Korea)를 사용하여 농축하고 4℃에 냉장 보관하여 사용하였다.

2.2.2. Preparation of *Aronia melanocarpa* anthocyanin extracts

본 실험에 사용한 aronia는 생물과 건물의 2가지 형태로 공급을 받아 실험하였다. Aronia (*Aronia melanocarpa*, 2015년산)는 전남 곡성에서 재배, 수확된 것을 구입하였으며, 이물질은 제거하고 세척하여 착즙기(HVS-STF14, Hurom, Korea)를 이용하여 착즙 후 12,000 rpm에서 7분간 원심분리하고 상등액을 취하여 filtration (Sartorius 0.45 μm) 한 뒤 동결 건조하여 사용하였다. 동결 건조된 aronia에서 anthocyanin 성분을 추출하기 위해 Oszmianski[112]의 실험방법을 변형하여 추출하였다. 실험방법은 aronia 5 g을 액화질소를 가하면서 powder 형태로 grinding 한 뒤 80% ethanol에 0.1% HCl 50 mL씩 넣어 2번 담금 추출하였으며, 다시 80% methanol 50 mL을 가하여 담금 추출하고 0.45 μm Millipore 필터를 사용하여 filtering 하였다. Filtering된 extracts의 solvent를 evaporation (Rotavapor R11, BUCHI, SWTZER, Korea)하여 물층 만 수거하였다. 수거한 물층에 petroleum ether 25 mL을 가하여 불필요한 비극성 화합물을 제거한 뒤 상분리 된 petroleum ether 층을 분리하여 제거한 다음 물층에 ethyl acetate 25 mL씩 3번 가하여 담금 추출하여 flavonoid 화합물을 제거하였다. 최종적으로 상분리 된 ethyl acetate 층을 분리하여 제거한 다음 evaporation 하고 formic acid (HCOOH)를 가하여 만든 pH 2 증류수를 50 mL 가한 후 filtering하여 사용하였으며, extracts의 조성은 Fig. 5.에 나타내었다. 건물 상태의 aronia extracts은 폴란드(Poland)산으로 국내 수입원 ㈜ 팬아시아에서 구입하여 사용하였으며, 조성은 Table 1에 나타내었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. Cyanidin composition of Aronia extracts

No.	Time	Peak name	Area (%)
1	10.95	Cya-3.Gal	66.43
2	12.93	Cya-3.Glu	3.08
3	15.12	Cya-3.Arab	26.10
4	18.79	Cya-3.Xyl	4.15
5	25.41	-	0.24
	Total		100

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.2.3. HPLC analysis

본 실험에서는 생물 상태의 국내산 aronia extracts의 anthocyanin 부분과 수입산 건물 상태의 aronia extracts의 농도를 조사하기 위해 HPLC를 통하여 분석, 정량하였다. Column은 PRONTOSIL 120-5-C18 SH (250×4.6 mm, 5.0 μm particle size)을 사용하였으며, 이동상은 A: 10% formic acid in water (10:90, v/v), B: formic acid:ACN:Water (10:60:30, v/v/v)로 사용하였다. Gradient 조건은 0-10 min 40%, 10-25 min 50%, 25-26 min 100%, 26-30 min 0%, 2분 정도 흘러준 뒤에 다시 처음 상태로 복귀하였다. 이동상의 유속은 1.0 mL/min이었고, 시료는 20 μL를 주입 하였으며, total run time은 40 min, 546 nm에서 흡광값을 측정하였다. 표준물질은 cyanidin-3-galactoside(Sigma, USA), cyaniding 3-*o*-glucoside를 사용하였다.

2.2.4. Determination of total phenolic and total anthocyanin content of *Aronia melanocarpa* extracts

Aronia는 일반적으로 수분 84.66%, 조단백 0.7%, 조지방 0.14%, 회분 0.44%를 함유하고 있다. Aronia에 함유되어 있는 페놀성 물질은 주로 anthocyanin이며, 항산화 및 항암 작용을 하는 것으로 알려져 있다[113]. Aronia의 anthocyanin 함량은 자연계의 수 많은 식물들 중에 매우 높은 편에 속하며, 다른 베리류 중 가장 높은 anthocyanin 함량과 항산화 활성을 보여준다[114]. 검은콩, 옥수수의 씨눈에는 aronia 보다 높은 anthocyanin이 함유되어 있다고 보고 되었으나 추출하는 방법과 가공 등의 범용적인 차원에서 aronia의 활용성이 매우 높다[98c]. 특히 flavonoid의 한 종류인 anthocyanin 색소가 다량 함유되어 있어 심장병 예방, 항암, 항염증 예방에 대한 효능이 알려져 있다. 본 실험에서 총 polyphenol의 측정 방법은 Sluis[115]의 방법을 변형하여 사용하였으며, 2 M folin-ciocalteu phenol 시약(Sigma-aldrich, USA)을 10배 희석하여 밀싹 extracts과 2% Na_2CO_3 수용액(2:98, w/v)을 각각 1:1:1 비율로 섞어서 암실에서 30분 동안 반응시켰다[115]. UV-spectrophotometer를 이용하여 750 nm 파장에서 흡광값을 측정하였다. 기준 물질로는 gallic acid와 quercetin을 사용하여 gallic acid equivalent (GAE)의 양과 quercetin equivalent (QUE)의 양으로 표시 하였다. Anthocyanin은 cyanidin 계열이며, chrysan-themine으로 물에 쉽게 용해 되는 수용성이다. 따라서 화장품에 응용하는 것이 비교적 용이하며, 특히 화장품 제형을 만들 때 천연 색소로써의 가능성이 높다. 그러나 anthocyanin은 다른 색소 성분에 비해 다양한 가공 및

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

저장조건에서 매우 불안정한 것으로 알려져 있다. Aronia에 함유 되어있는 주요 anthocyanin은 cyanidin-3-*o*-galctoside, cyaniding 3-*o*-glucoside, cyanidin-3-*o*-arbinoside, cyanidin-3-*o*-xyloside 등이다[116]. Anthocyanin은 anthocyanidin의 배당체로써 가수분해 시키면 aglycon인 anthocyanidin과 glucose으로 분해된다. Anthocyanin과 결합할 수 있는 당은 glucose, galactose, xylose, arabinose, rhammose 등이며, 결합을 통해 monoside, vioside, trioside 등으로 구성된다. 당고리에 방향족 또는 비방향족 유기산이 결합되며, 결합 방법 및 위치에 따라 수백 종이 존재한다[85]. Aronia는 현존하는 베리류 중 anthocyanin 함량이 높다고 알려져 있으며, 여러 가지 베리류 중에서 항산화 활성이 매우 높은 것으로 보고 되어 화장품에 적용했을 때 매우 유용한 소재이다. 본 실험에서 총 anthocyanin 함량 측정은 Lee 등[117]의 방법을 변형하여 사용하였으며, 시료 0.1 g에 pH 1.0 buffer (0.2 M KCl + 0.2 M HCl)과 pH 4.5 buffer (0.2 M potassium phosphate + 0.1 M citric acid)를 각각 2 mL 혼합한 다음 분광광도계(S-3100, Sinco, Korea)를 사용하여 520 nm와 700 nm에서 흡광값을 측정하였으며, total anthocyanin 함량은 C3G를 기준으로 계산하였다.

$$\mathrm{A} = (A_{510} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH\ 4.5}$$

$$\text{Total anthocyanin contents (mg/100 g)} = \frac{A \times MW \times DF \times 1{,}000}{\varepsilon \times l}$$

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.3. Results and discussion

2.3.1. HPLC analysis of extracts from *Aronia melanocarpa*

Aronia 색소는 유기산의 처리 종류에 따라 안정성이 다르며, 주로 색소 분석을 할 때는 citric acid, tartaric acid, malic acid, formic acid 및 ascorbic acid의 등을 사용한다[118]. 본 실험에서는 formic acid 사용하여 HPLC 분석을 하였으며, 실험 결과 수입산 aronia의 C3G 함량은 250 μg/mL의 농도에서 48.75 μg/mL로 검출되었다. Cyanidin 3-*o*-glucoside는 동일 농도에서 22.73 μg/mL, 국내산 aronia extracts에서 분리한 anthocyanin은 농도 4 mg/mL에서 18.26 μg/mL로 검출되었다. 주입량 20 μL을 기준으로 보았을 때 국내산보다 수입산의 C3G 함량이 약 4배가량 높다는 것을 확인할 수 있었으며, cyaniding 3-*o*-glucoside의 함량도 함께 정량 평가를 하였는데 실험 농도가 낮아 국내산 aronia와 anthocyanin은 검출되지 않았고 수입산 aronia는 250 μg/mL 의 농도에서 8.76 μg/mL으로 확인되었다(Table 3). 이와 같은 결과는 선행 논문에서 aronia에서 anthocyanin과 procyanidins을 추출하여 항산화능을 확인했을 때 C3G의 함량이 가장 높았던 결과와 일치한다[119]. Aronia 열매에서 anthocyanin을 분리한 다른 연구에서 다른 선행 연구에서 C3G는 anthocyanin 전체 면적의 64.5% 확인되었으며[120], 대사성 증후군 장애의 치료를 위해 aronia의 anthocyanin을 분리하였는데 하루 투여량은 110 mg으로 제시하였고, 이때 추출한 aronia의 C3G의 함량은 4.03 mg으로 다른 anthocyanin 함량을 비교해 보았을 때 50% 이상으로 가장 높게 추출되었다[121]. 이와 같이 추출조건이나 aronia의 열매의 생육 조건에 따라 C3G의 함량에 변화가 있지만 aronia에서 anthocyanin 부분의 함량이 가장 높은 것은 C3G로 확인되었다.

2.3.2. Total polyphenols and Total anthocyanin contents of extracts from *Aronia melanocarpa*

건물 형태의 수입산 aronia extracts과 생물 형태의 국내산 aronia extracts, 생물 형태의 국내산 aronia extracts에서 분리한 anthocyanin의 총 polyphenol 함량과 anthocyanin 함량을 조사하였다. 실험결과 aronia의 total polyphenol 함량을 분석한 결과, 건물 형태의 수입산 aronia extracts 0.1 mg/mL은 gallic acid equivalent (GAE) 0.115 mg/mL에 해당되었고, 동일 농도에서 생물 형태의 국내산 aronia extracts은 0.093 mg/mL, 국내산 aronia extracts

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

anthocyanin은 gallic acid 0.022 mg/mL에 해당하였으며, 실험 결과는 Table 1에 나타내었다. Total anthocyanin 함량은 cyaniding-3-*o*-galactoside equivalent (C3GE) 기준으로 하였으며, 건물 형태의 수입산 aronia extracts 0.1 mg/mL의 농도에서 4.195 mg/mL, 생물 형태의 국내산 aronia extracts은 2.986 mg/mL, 국내산 aronia extracts anthocyanin은 0.0569 mg/mL이었다. 이와 같은 결과는 Wangensteen 등[87]이 품종이 다른 4종의 aronia 80% ethanol extracts의 anthocyanin 조성을 비교했을 때 *Aronia melanocarpa* cultivar Moskva가 2.52 mg/mL, *Aronia melanocarpa* cultivar Hugin이 2.49 mg/mL이었던 결과와 유사하다. 또한 50% methanol 추출을 통해 aronia의 anthocyanin 함량을 구했을 때 C3G가 3.64 mg/mL으로 조사되었고, Hwang 등[122]은 국내산 aronia를 70% ethanol로 추출한 결과 anthocyanin 함량은 93.0 mg/mL으로 보고하였다. 실험 농도가 본 실험의 10배인 것을 감안하였을 때 본 실험보다 약 2배 이상 높은 anthocyanin 함량이 조사되었다. 이와 같이 aronia의 anthocyanin 함량은 aronia의 품종과 추출 시 용매 처리 방법에 따라 다르다는 것을 확인할 수 있으며, 착즙이나 열수추출보다는 용매에 의한 추출 방법이 anthocyanin 함량을 높일 수 있어 시료 확보 차원에서 용이하다고 할 수 있다.

2.3.3. Statistical analysis

실험 결과는 3번 반복 실험 후(SPSS version 22)를 이용하여 통계처리 하였으며, 실험에 의해 얻어진 값들의 평균±표준편차로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검증은 t-Test를 사용하였으며, $p<0.05$ 수준에서 검정하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. Total polyphenol and total anthocyanin contents of Aronia extracts

Sample (dry condition)	Total polyphenol (GAE* mg/g)	Total polyphenol (QUE* mg/g)	Total anthocyanin (C3GE* mg/g)
Aronia (Imported)	115.23±0.69	91.36±0.94	4.195±1.17
Aronia (Domestic)	93.56±1.36	58.36±0.24	2.986±0.44
Anthocyanin (Extract)	22.29±1.24	8.23±1.36	0.569±0.78

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

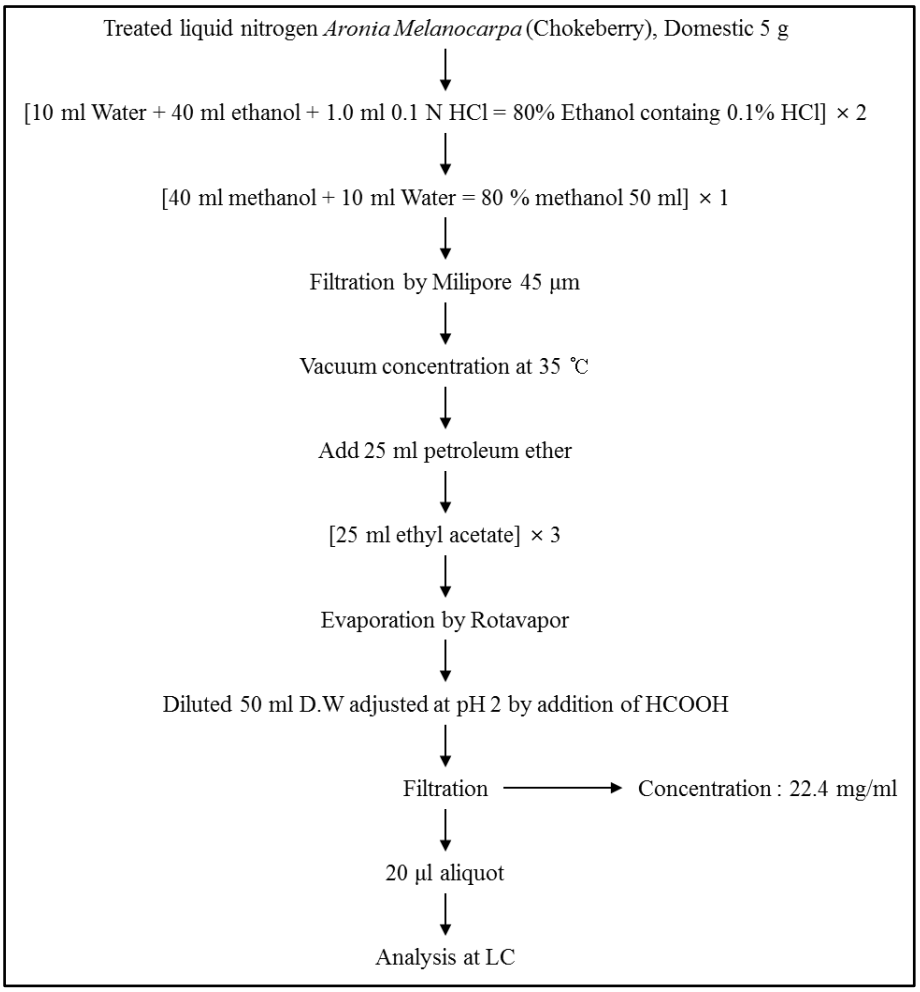


Fig. 5. Isolation diagram of anthocyanin from Aronia.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. HPLC quantitative analysis results of Aronia extracts

Samples	Anthocyanin	A. Extract (D)	A. Extract (F)
Concentration	22.4 μg/mL	250 μg/mL	250 μg/mL
Cyanidin-3-galactoside	18.26 μg/mL	22.73 μg/mL	48.75 μg/mL
Cyanidin-3-glucoside	-	-	8.76 μg/mL

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

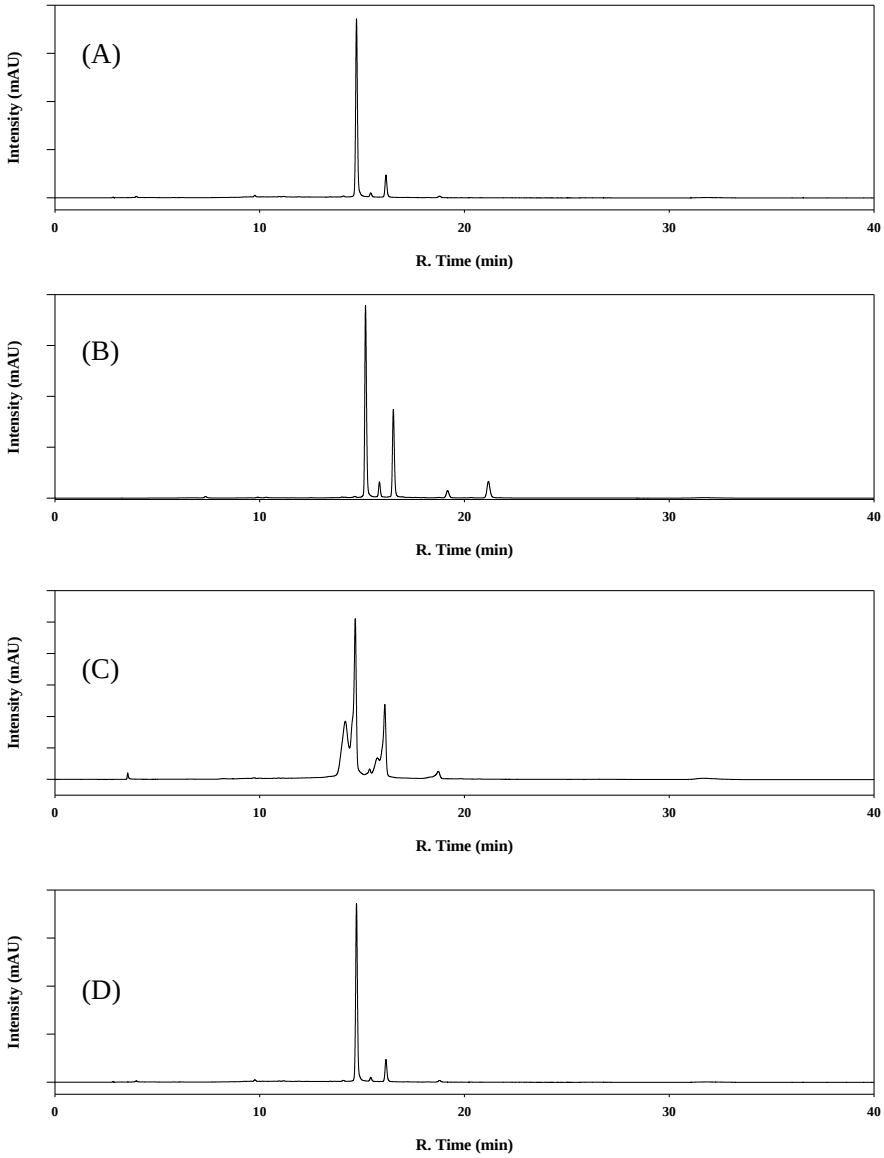
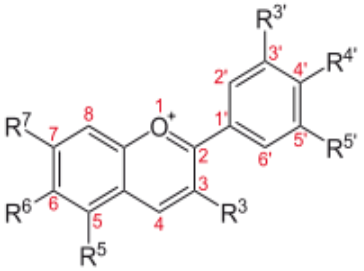


Fig. 6. HPLC analysis results of Cyanidin-3-galactoside (A), Antocyanin (B), Domestic Aronia (C), and Foreign Aronia (D).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. Selected anthocyanidins and their substitutions



Anthocyanidins	R_3'	R_4'	R_5'	R_3	R_5	R_6	R_7
Aurantinidin	−H	−OH	−H	−OH	−OH	−OH	−OH
Cyanidin	−OH	−OH	−H	−OH	−OH	−H	−OH
Delphinidin	−OH	−OH	−OH	−OH	−OH	−H	−OH
Europinidin	−OCH3	−OH	−OH	−OH	−OC3	−H	−OH
Pelargonidin	−H	−OH	−H	−OH	−OH	−H	−OH
Malvidin	−OCH3	−OH	−OCH3	−OH	−OH	−H	−OH
Peonidin	−OCH3	−OH	−H	−OH	−OH	−H	−OH
Petunidin	−OH	−OH	−OCH3	−OH	−OH	−H	−OH
Rosinidin	−OCH3	−OH	−H	−OH	−OH	−H	−OCH3

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

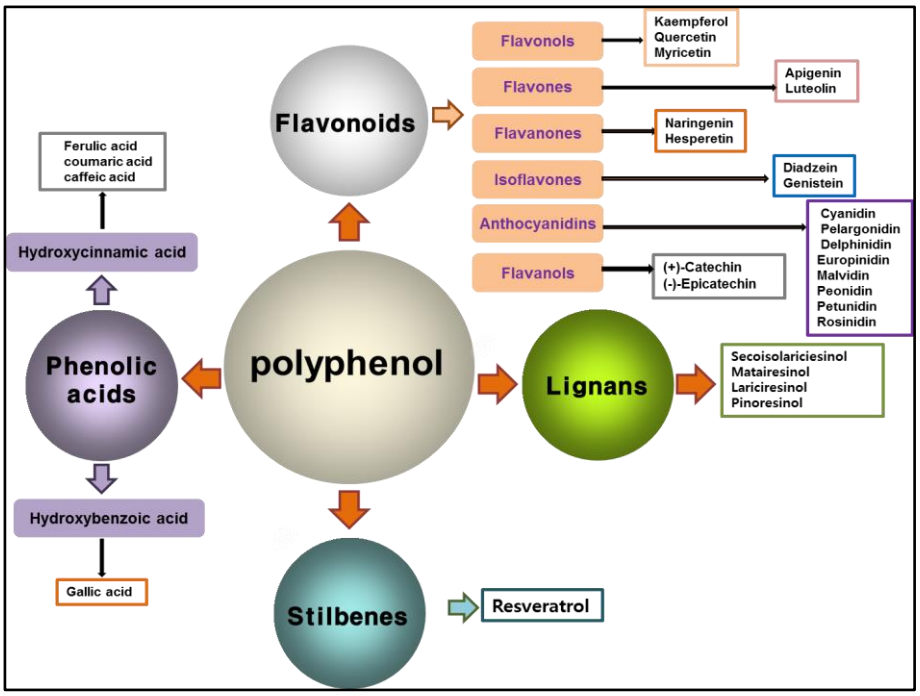


Fig. 7. Classification of polyphenols.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 5. Total polyphenol and total anthocyanin contents

Sample (dry condition)	Total polyphenol (GAE* mg/g)	Total polyphenol (QUE* mg/g)	Total anthocyanin (C3GE* mg/g)
Aronia(Foreign)	115.23±0.69	91.36±0.94	4.195±1.17
Aronia(Domestic)	93.56±1.36	58.36±0.24	2.986±0.44
Anthocyanin(extract)	22.29±1.24	8.23±1.36	0.569±0.78

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.4. *In vitro* antioxidant

2.4.1. Oxygen radical

활성산소는 산소라디칼(oxygen radical) 및 산소라디칼로부터 파생된 여러 가지 산소 화합물들을 통칭하며, 모두 다 반응성이 높다는 특징이 있다[123]. Free radical이란 제일 바깥쪽 전자각에 짝 지어지지 않은 전자(unpaired electron)를 포함하며 강한 반응성을 나타내는 특징이 있다[124]. 이들은 탐식 작용, 프로스타글란딘(prostaglandin)합성과 같은 생리적 과정뿐만 아니라 수많은 효소 촉매반응의 중간물질로서 중요한 역할을 하고 있다. 또한 홀수 상태의 전자는 안정화되려는 고유의 특성 때문에 인체 내의 세포를 공격하여 전자를 빼앗고 상대적으로 공격을 당한 세포는 산화되어 여러 가지 기능을 상실하게 된다. Free radical의 종류는 질소라디칼(nitrogen radical), 지질라디칼(lipid radical), 산소라디칼(oxygen radical) 등이 있으며, 이와 같은 free radical 중에 생체 내에서 가장 많이 발생하는 것은 산소라디칼이다[124]. 주요 산소라디칼로는 superoxide (O_2^-), hydroxyl (•OH), perhydroxyl (HO_2•), alkoxy (RO•), peroxy (ROO•) radical 등이 있다. 그 외 radical은 아니지만 반응성이 강한 산소종으로 과산화수소(H_2O_2)와 singlet oxygen이 있다[125]. Singlet oxygen은 분자 산소와는 달이 외각의 전자 2개의 spin 방향이 서로 반대로 되어 있어 불안정하다. 이와 같은 여러 가지 ROS 중에서 hydroxyl radical과 singlet oxygen이 수용액 중에서 가장 강한 반응성을 나타낸다. 활성산소는 생체 내의 다양한 반응에서 발생하며 이때 철이나 구리 같은 전이금속이온이 이들의 발생을 촉진시킨다[126]. 또한 활성산소는 여러 가지 반응을 통하여 서로 전환되는데 아래와 같은 반응이 대표적인 예이다.

$$2O^{2-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O^2 \quad \text{— Dismutation 반응}$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \text{•}OH + OH^- \quad \text{— Fenton 반응}$$

2.4.2. Definition and classification of anti-oxidants

항산화제는 산소나 기타 다른 물질에 의해 형성된 free radical의 산화 반응 억제물질을 말한다. 생물학적인 측면에서 보았을 때 생체 내에서 산화성 스트레스로 인해

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

생성되는 산화 물질의 산화 억제 기능을 위해 방어하는 물질 또는 효소이다. 항산화제는 크게 효소계와 비효소계로 분류할 수 있으며, 유전인자에 의해 생성되는 단백질 효소와 화학물질의 차이로 구분한다[127]. 효소는 생체 내에서 발생하는 화학 분자들을 억제하는 기능을 가지고 있으며, 우리는 외부로부터 산화 방지에 필요한 항산화 물질을 섭취하기도 한다. 호기성 생물은 다양한 전자전달 부위에서 이탈 또는 자가 산화 반응을 통해 생성되는 산소라디칼에 대한 방어 mechanism을 가지고 있으며, 산소라디칼을 생성하는 여러 인자와 세포를 방어하기 위한 균형을 갖는다. 항산화제는 크게 3가지 종류로 구별할 수 있는데 첫 번째는 수용성 환원제, 두 번째는 지용성 비타민, 세 번째는 항산화 효소이다[101b]. ROS에 의한 산화적 스트레스에 관한 연구 방법은 주로 한 종류의 항산화 물질 또는 효소 활성의 분석이나 다른 스트레스에 대한 반응 등을 평가하는 방법이다. 식용 가능한 물질들은 양이나 정도의 차이가 있지만 대부분 항산화 활성을 갖는 물질이나 효소가 존재하고 있다. 항산화 물질의 항산화 활성을 평가하는 방법에는 DPPH, ABTS, Hydroxyl radical의 소거능을 확인하는 방법이 있으며, 생체 내의 산화성 물질을 제거할 수 있는 효소적인 측면에서 SOD, CAT, GSH 등의 활성을 측정하는 방법이 있다.

2.4.3. DPPH assay

체내에서 발생하는 산화 반응은 노화의 원인이 되며 세포의 변이를 유발해 암세포를 생성한다고 알려져 있다[123]. 항산화 작용은 free radical의 생성을 막을 수 있다면 체내의 산화를 예방한다고 할 수 있으며, 간접적으로 노화와 암을 예방한다고 할 수 있다[75]. DPPH 측정법은 천연물의 수용성 또는 유기용매 extracts의 항산화 활성 측정법으로써 가장 보편으로 알려진 방법이다. DPPH는 radical 상태에서 보라색을 띄고, 환원이 되면 노란색의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H)으로 변환된다[128]. 안정한 라디칼인 DPPH는 산화 방지 물질로부터 전자 혹은 수소를 제공받으면 non-radical로 전환된다[129]. DPPH 측정법은 천연물의 수용성 혹은 유기용매 extracts의 항산화 활성 측정법으로 널리 사용하는 방법이다[130].

$$DPPH\bullet + AH \rightarrow DPPH\text{–}H + A\bullet$$

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

$$DPPH\bullet + R\bullet \rightarrow DPPH\text{–}R$$

본 실험에서는 항산화 활성 측정 방법 중 Blois의 방법에 따라 측정하였다[131]. 먼저 95% ethanol에 용해시킨 0.1 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma, USA) 800 μL와 각 실험군 200 μL을 E.P. tube에 넣고 3 min 동안 voltexing하여 암실에서 30 min 반응 시켰다. 남아 있는 radical의 농도를 UV-Visible spectrophotometer (SCINCO, Seoul, Korea)를 사용하여 517 nm에서 측정하였다 positive control으로는 C3G (Sigma, USA), quercetin (Sigma, USA)을 사용하였고, 실험 농도 범위는 5 ~ 100 μg/mL로 측정하였다. 실험군인 aronia extracts과 onion skin extracts의 실험 농도 범위는 25 ~ 500 μg/mL이었다. DPPH에 대한 소거능(IC50)은 용매만을 사용한 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 농도로 나타내었다. 항산화능은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광값을 구하여 다음 식과 같이 백분율로 표시하였다.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{absorbance\ of\ control - absorbance\ of\ sample}{absorbance\ of\ control} \times 100$$

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.4.4. ABTS Assay

ABTS assay는 항산화능이 있는 물질이 있을 때 ABTS•$^{+}$이 항산화 물질에 의해 산화가 억제되는 것에 기인하여 개발된 방법이다. 실험 원리는 ABTS와 potassium persulfate가 반응하여 파랑 또는 녹색의 ABTS•$^{+}$을 형성하게 되며 415 nm, 645 nm, 734 nm에서 최대 파장을 흡수한다[123, 132]. 본 실험에서는 ABTS (2, 2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolone-6-sulfonic acid) radical 소거능은 Valery[133]등의 방법을 변형하여 측정하였다. 실험 방법은 증류수에 용해한 7 mM의 ABTS potassium persulfate 2.45 mM을 1:1로 넣어 흡광값이 0.70±0.02이 되도록 PBS (pH 7.4)로 희석하였다. 12-16 h 동안 암소에 방치하고 radical stock solution은 희석된 용액 800 μL에 농도별로 제조된 sample 200 μL씩을 가하여 15 min 동안 방치 후 720 nm에서 흡광값을 측정하였다. 양성 대조군으로는 gallic acid (Sigma, USA), quercetin (Sigma, USA), ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하였고, 농도범위 0.025 ~ 0.5 mg/mL에서 측정하였다. Extracts의 ABTS에 대한 소거능(IC_{50})은 용매만을 사용한 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 농도로 나타내었다. 항산화능은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광값을 구하여 다음 식과 같이 백분율로 표시하였다.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{absorbance\ of\ control - absorbance\ of\ sample}{absorbance\ of\ control} \times 100$$

2.4.5. ORAC Assay

ORAC assay는 항산화력 측정 방법중의 하나로 reaction 과정을 buffer와 sample, FL (fluorescein disodium) solution을 mix 한 후 radical generator인 AAPH (2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride)를 첨가함으로써 반응이 시작된다[134]. 실험원리는 APPH에 의하여 FL decay 반응이 억제됨을 이용하여 측정한다. 샘플과 buffer는 15분 동안 pre-incubation하며 혼합된 반응액을 37℃로 평형시켜 형광분광광도계를 사용하여 형광의 감소 과정을 60분 동안 2분 간격으로 형광이 95% 감소될 때까지 진행하였고 측정은 excitation 590 nm에서 실시하였다. Radical 소거 활성은 trolox를 표준물질로 사용하여 trolox standard curve로부터 산출하였으며, aronia extracts을

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

각 농도별로 희석하여 75 mM phosphate buffer에 녹여 peroxy radical의 생성과 소멸에 의한 fluorescent의 감소율을 ELISA (Biochrome EZ400, Korea)로 측정하여 ORAC value를 측정하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 6. Type of reactive oxygen species

Free radicals		Non radicals	
Hydroxyl radical	OH•	Hydrogen peroxide	H_2O_2
Superoxide radical	O_2••	Singlet oxygen	O_2
Nitric oxide radical	NO•	Hypochlorous acid	HOCl
Lipid peroxyl radical	LOO•	Ozone	O_3

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.4.6. SOD assay

Hydrogen peroxide, superoxide, hydroxyl radical 같은 ROS는 모든 호기성 생물들의 산소 대사산물이다. ROS가 생성되는 것은 mitochondria 전자 전달계의 에너지 생성 과정의 결과로써, virus 또는 bacteria 같은 미생물에 대항하기 위한 방편이라고 할 수 있다. 또한 cytochrome p450 system과 관련된 대사 과정 등에서 발생되며, UV, ioniaing radiation, redox chemicals 등의 환경적인 요인에 의해서도 발생된다. 활성산소의 공격을 차단, 또는 감소시키는 인체 내 자동 방어 기전을 항산화 기전이라 하며, 이러한 항산화 방어 기전을 수행하기 위한 특수한 기능을 가진 물질은 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화 효소와 vit E, β-carotene, uric acid, glutathione, thioredoxin 등의 저분자량의 항산화 물질로 구분된다. 대부분의 활성 산소들은 이와 같은 항산화 물질들의 작용에 의해 중화되지만 이런 방어 시스템을 능가할 만큼의 지나친 스트레스는 lipids, proteins, DNA와 같은 생체 분자들에 손상을 입히게 된다. SOD는 인체 내에서 생성되는 가장 강력한 항산화 작용을 가진 효소로서 방어 효과가 가장 높은 것으로 알려져 있다. SOD radical scavenging activity 측정은 19160 SOD determination kit (sigma, USA)을 사용하였으며, assay 방법은 xanthine-xanthine oxidase system을 nitroblue tetrazolium (NBT)로 발색시킨 SOD Kit를 이용하여 측정하는데, SOD Kit의 원리는 xanthine에 xanthine-oxidase가 작용하면 O_2^-가 생성되고 생성된 O_2^-는 공존하는 NBT를 환원시켜 발색반응을 나타내지만 생성된 O_2^-는 제거능을 가진 물질로 인하여 발색이 저해되는 원리이다. 반응조건은 완충액 19 mL에 기질 1 mL (WST solution)을 섞은 다음 희석용 완충액 25 mL에 효소 용액 15 μL 섞어 37℃의 incubator에서 15분 반응시킨 후 560 nm에서 ELISA reader (UVM-340)를 사용하여 흡광도를 측정하였으며, 항산화 활성 측정은 다음의 식과 같이 계산하였다.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{absorbance\ of\ control - absorbance\ of\ sample}{absorbance\ of\ control} \times 100$$

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.4.7. Catalase assay

Catalase는 호기성 세포의 과산화소체(peroxisome)에 존재하며, H_2O_2를 분해하여 O_2와 H_2O를 만들어 낸다. Catalase는 세포에서 발견되는 가장 효율적인 효소로써 catalase 한 분자는 초당 수백만 분자의 H_2O_2를 중화 시킨다. Catalase는 매우 견고하고 안정된 구조를 취하고 있기 때문에 다른 효소에 비해 온도에 의한 변성이나 산도에 대한 저항성, 단백질 분해에 대한 저항력이 있다. 본 실험에서는 catalase의 활성을 측정하기 위해 catalase activity colorimetric fluorometric assay kit (Bio vision, USA)을 사용하였으며, 실험 방법은 96 well plate 각각에 assay buffer 100 μL, methanol 30 μL, 1000배로 희석한 각각의 실험 샘플을 20 μL 넣고, 각 well에 hydrogen peroxide 20 μL를 넣은 후 20분간 shaker에서 반응시켰다. 20분 후 각각의 well에 potassium hydroxide 30 μL, Catalase purpled 30 μL를 넣은 뒤 실온에서 10분간 shaker에서 반응시켰다. 다시 10분 후에 각각의 well에 Catalase potassium periodate 10 μL를 넣고 실온에서 5분간 shaker에서 반응시킨 후 microplate reader (Bio-Rad)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.5. Results and discussion

2.5.1. DPPH radical scavenging and ABTS radical scavenging activity of Quercetin and *Aronia melanocarpa* extracts

Methanol에 용해시킨 0.1 mM DPPH 용액 0.8 mL과 C3G, quercetin, gallic acid, aronia extracts 0.2 mL을 vortex를 이용하여 5초간 진탕 한 뒤 암소에서 15분간 반응한 후 microplate reader (ELISA UVM-340)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 결과는 Fig. 8에 나타내었다. C3G IC_{50}값은 42.92 μg/mL, quercetin의 IC_{50}값은 63.31 μg/mL, gallic acid의 IC_{50}값은 60.00 μg/mL, aronia extracts (F)의 IC_{50} 154.93 μg/mL이었다. Aronia extracts (F)의 항산화능은 flavonoids와 polyphenols 계열 성분에 의해 나타나는 것으로 판단되며, 추후 각 성분의 표준물질을 이용하여 항산화능과 정확한 기전을 규명할 필요가 있다. ABTS 항산화 실험 결과는 Fig. 9에 나타내었으며, C3G IC_{50} 값은 36.98 μg/mL, quercetin의 IC_{50}값은 38.47 μg/mL, gallic acid의 IC_{50} 값은 42.35 μg/mL, aronia extracts (F) IC_{50} 값은 97.99 μg/mL이었다. ABTS radical scavenging 결과는 앞서 실험한 DPPH radical scavenging 보다 약간 높은 항산화 활성을 나타내었는데 이것은 ABTS 항산화 활성 측정 방법이 친수성 성분과 소수성 성분의 radical 소거 활성을 모두 측정할 수 있기 때문에 친수성 시료 측정 방법에 적합한 DPPH 항산화 실험 결과보다 높은 항산화능을 보이는 것으로 생각된다. 이와 같은 결과로 볼 때 aronia extracts은 인체에 매우 유용한 천연 항산화 소재로서 가능성이 있다고 판단되며, 추후 aronia의 추출 방법을 달리하여 항산화 활성을 확인할 필요가 있다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

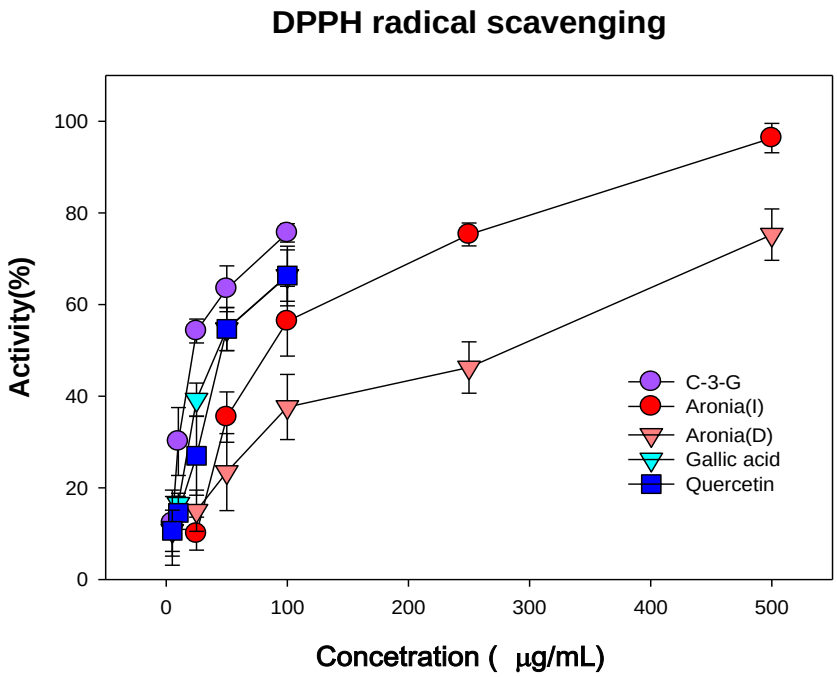


Fig. 8. DPPH radical scavenging effect of aronia extracts and polyphenols.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

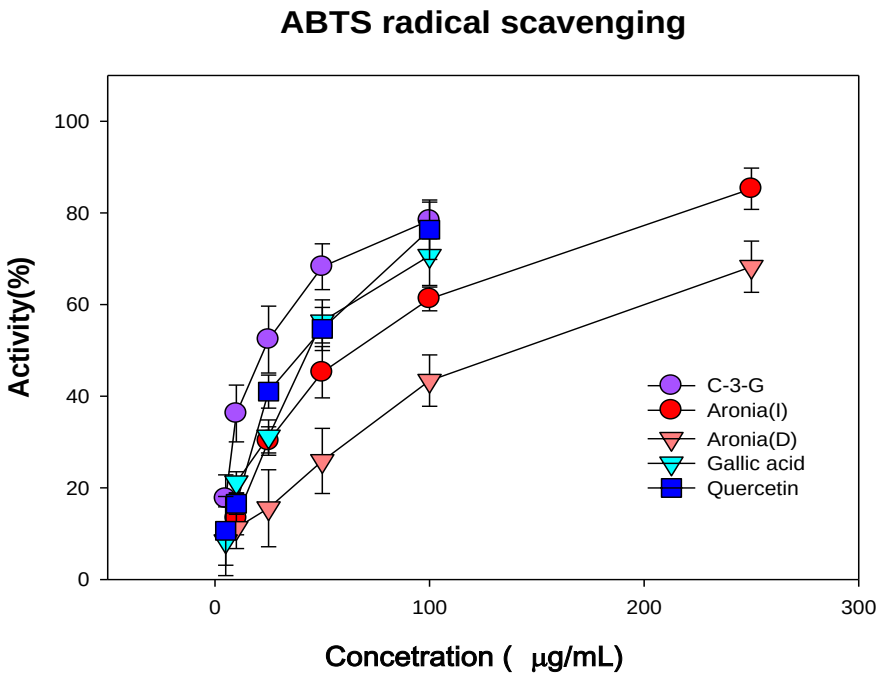


Fig. 9. ABTS radical scavenging effect of aronia extracts and polyphenols.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.5.2. SOD activity of *Aronia melanocarpa* extracts

Superoxide radical (O_2^-•) 은 전자 환원에 의한 반응성이 매우 강하여 세포 독성을 일으켜 각종 질병과 암을 유발하고 피부를 노화시킨다[135]. 인체 내에서는 superoxide radical을 제거하기 위하여 SOD가 분비되어 세포에 유해한 superoxide radical을 과산화수소(H_2O_2)와 정상상태의 산소로 전환시켜주는 반응($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 하는 것으로 알려져 있으며, SOD에 의해 생성된 H_2O_2는 생체 조직을 산화시키기도 하고 peroxidase나 catalase에 의하여 인체에 무해한 물 분자와 산소 분자로 전환된다[136]. SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로 주로 phytochemicals에 속하는 것으로 보고되어 있다[137].

C3G, quercetin, gallic acid, aronia extracts 대한 superoxide anion (O_2^-•) 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 11에 나타내었다. Superoxide anion 소거 활성에 대한 C3G IC_{50}값은 28.25 μg/mL으로 확인되었으며, quercetin은 48.84 μg/mL, aronia와 양파껍질 extracts은 각각 125.27 μg/mL, 272.69 μg/mL를 나타내었다. Aronia와 양파껍질 extracts은 천연물 기준으로 매우 높은 항산화 활성을 나타내었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

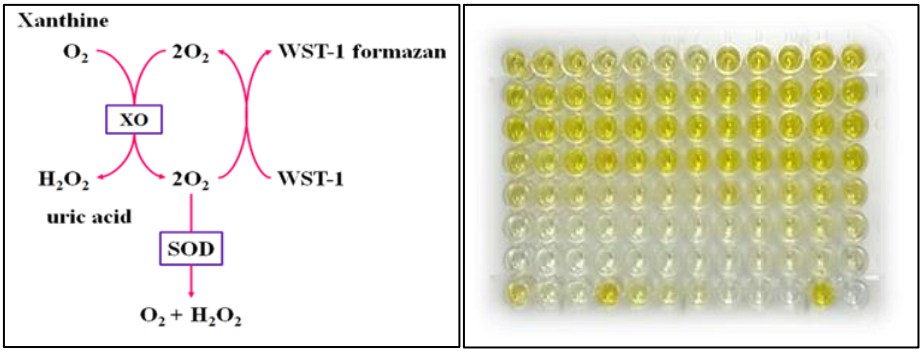


Fig. 10. The reaction principle of SOD.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

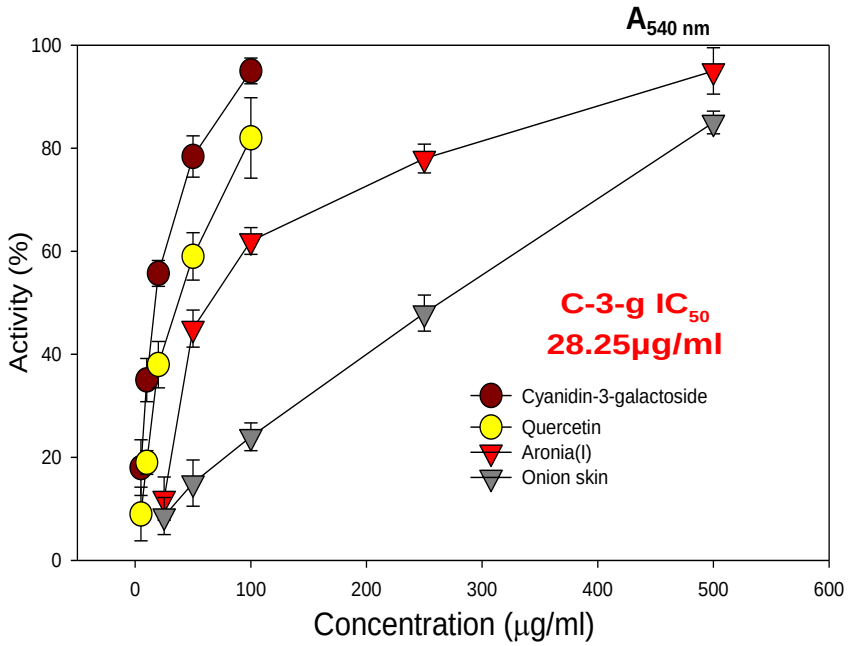


Fig. 11. Superoxide dismutase activity of polyphenols.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.5.3. Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) activity of *Aronia melanocarpa* extracts

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay는 수소 전자의 전달에 의한 환원력을 측정하는 방법으로 식물 내에 친수성 및 소수성 성분과 모두 반응하기 때문에 응용 범위가 넓으며 항산화 측정에 매우 적합하다[138]. ORAC value는 Ou [139] 등 의 실험 방법을 응용하여 평가하였다. 본 실험에서 사용한 시료 및 표준물질의 희석과 시약의 제조는 75 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하였다. 실험 직전 AAPH (150 mM)는 37℃에서 15분간 정치하여 활성화한 뒤, 96-well plate에 희석된 착즙액 25 μL와 fluorescein (40 nM) 150 μL를 혼합하고 측정 직전에 AAPH (150 mM) 25 μL를 첨가하였다. 혼합액은 ELISA (UVM-340)를 사용하여 485 nm에서 전자를 여기 후 535 nm에서 방출되는 조건으로 37℃에서 90분간 3분마다 fluorescence의 감소율을 측정하였다. 결과값은 착즙액 첨가와 blank의 area undercurve (Net AUC) 값을 나타낸 후 trolox를 이용하여 작성한 검량선에 대입하여 나타내었다. ORAC assay를 통하여 항산화를 측정한 결과 C3G, quercetin, aronia extract 모두 14±0.25 μM TE/mL으로 높은 ORAC 수치를 나타내었으며, positive control으로 사용한 Trolox의 ORAC 지수는 14±0.14 μM TE/mL이었다. Aronia extracts가 천연물인 것을 감안했을 때 positive control과 비슷한 수준의 항산화 활성을 나타낸다는 것은 매우 높은 항산화 활성을 갖고 있음을 의미한다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

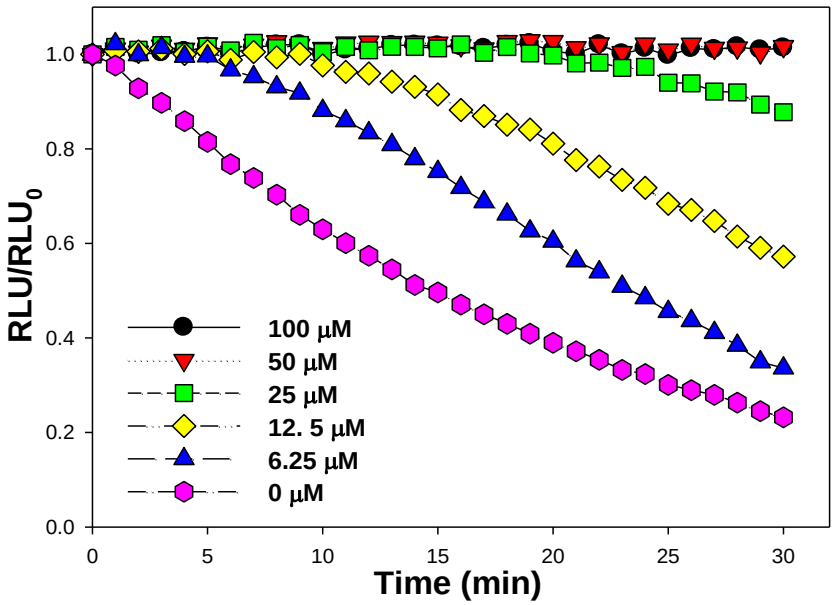


Fig. 12. Relative luminescence intensity as increased in trolox concentration for 30 min.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

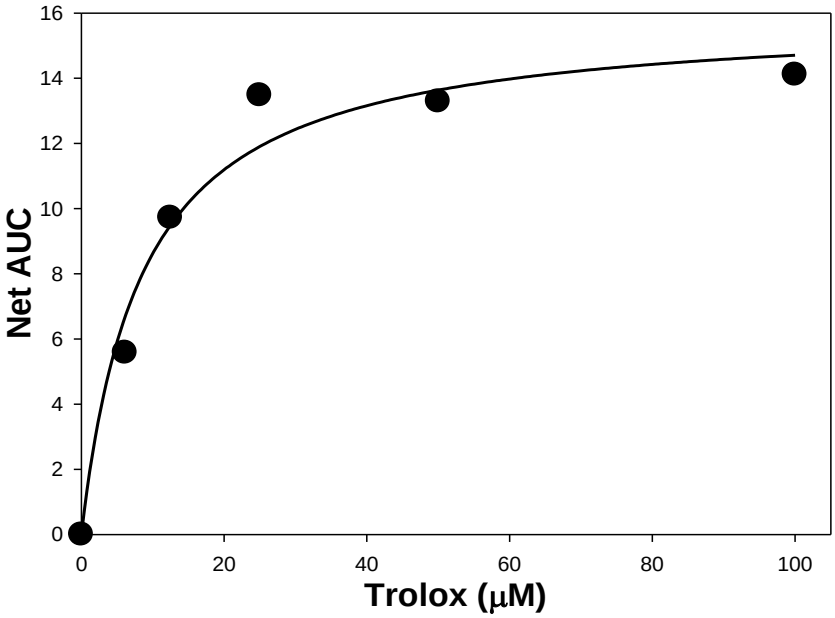


Fig. 13. Net luminescence intensity as increased in trolox concentration at 30 min.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

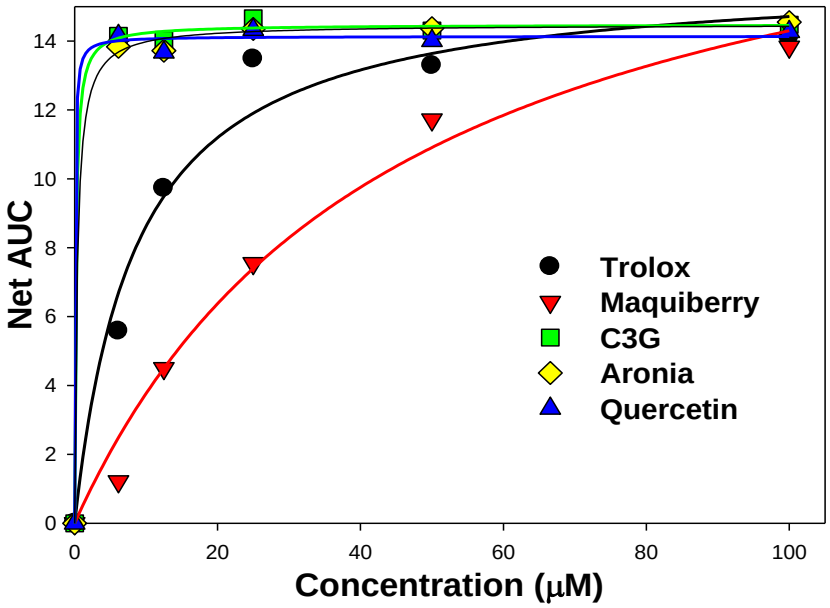


Fig. 14. Net luminescence intensity as increases in polyphenols concentration at 30 min.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.5.4. Catalase activity of *Aronia melanocapa* extracts

Catalase는 인체 내에서 생성된 H_2O_2를 H_2O로 분해하는 효소이다. SOD에 의해서 환원된 H_2O_2뿐만 아니라 peroxisome의 효소, mitochondria의 전자전달계, xanthine oxidase에 의해 생성된 H_2O_2를 분해 함으로써 인체를 보호하는 역할을 한다. 본 실험에서는 Catalase assay kit (CAT 100)을 사용하여 항산화 활성을 측정하였다. 실험결과 aronia extracts (F)의 IC_{50} 값은 25.52 μg/mL, aronia extracts (D)는 45.48 μg/mL으로 측정되었다. 선행연구에서 aronia 열매 및 잎의 extracts 또는 분획의 항산화 활성을 확인하였는데 aronia 열매와 잎 extracts의 경우 50% 에탄올 extracts의 활성산소 소거 활성은 각각 25.00 μg/mL 및 37.27 μg/mL, 에틸아세테이트 분획은 각각 2.86 μg/mL 및 8.38 μg/mL, 아글리콘 분획은 각각 1.80 μg/mL 및 3.38 μg/mL을 나타내었으며, aronia 열매의 아글리콘 분획은 비교 물질로 사용된 L-ascorbic acid (OSC50 = 1.50 μg/mL)와 유사한 항산화 활성을 보고하였다[102]. 또 다른 선행 연구에서는 aronia anthocyanin 분획에서 높은 항산화 활성을 보고하였으며, 기타 베리류(acai berry, blue berry, cranberry, black currant)보다 2배 이상의 높은 항산화 활성을 보고하였다[140]. 이와 같은 결과로 보았을 때 aronia extracts를 적절한 방법과 농도로 사용한다면 피부에 안전하고 노화를 방지하는 천연 항산화제의 응용이 가능할 것으로 판단된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

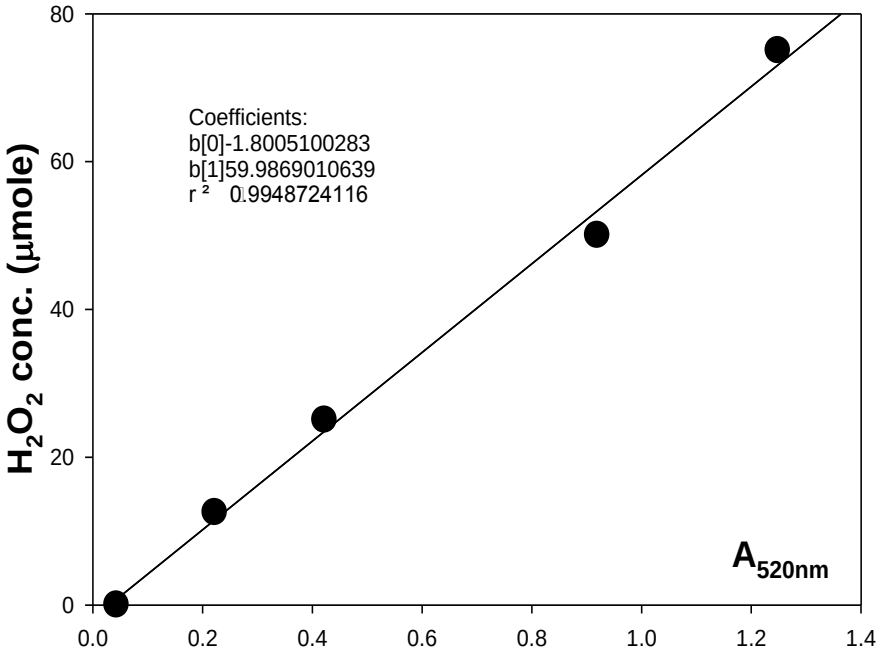


Fig. 15. Calibration curve of absorbance intensity at 520 nm wavelength vs. Hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

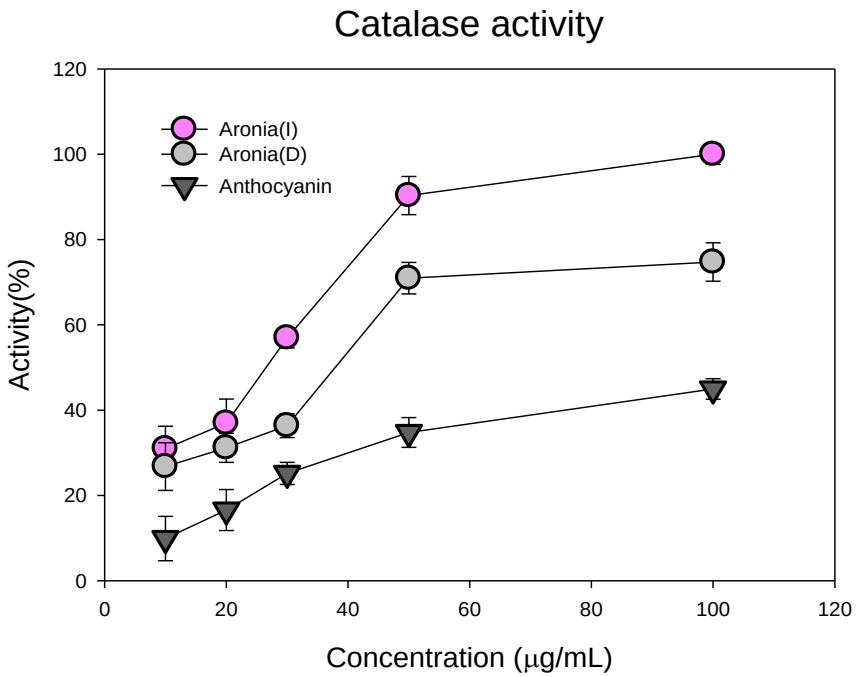


Fig. 16. Catalase activities (%) of polyphenols according its concentration.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.5.5. Statistical analysis

실험 결과는 3번 반복 실험 후 SPSS version 22를 이용하여 통계처리 하였으며, 실험에 의해 얻어진 값들의 평균 ±표준편차로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검증은 t-Test를 사용하였으며, $p<0.05$ 수준에서 검정하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.6. *In vivo* antioxidant Activity of Zebrafish

2.6.1. Introduction

Zebrafish는 인간의 유전자 정보와 organ system이 매우 비슷한 척추동물이다[141]. 사람의 유전자와 크기 및 수가 비슷하고 유전자 및 단백질 간의 상동성이 높으며, 신경계 및 각종 기관형성 과정이 사람과 유사하기 때문에 인체의 각종 질병 연구를 위한 동물모델로서 세계적으로 다양한 연구에 사용되고 있다[142]. Zebrafish는 선충이나 초파리에서 가능했던 생체 내에서의 세포생물학적인 실험이나 대규모 유전학적인 연구가 가능하다는 장점이 있다. 또한 zebrafish는 발생 중의 배아가 투명하며 체외에서 발생이 이루어지기 때문에 조직 특이적으로 형광을 발현하면 각종 장기를 구성하는 특정 세포들의 형성 및 이동이나 분화 과정을 생체 내에서 직접 관찰할 수 있기 때문에 *in vivo* imaging을 이용한 중추신경계 형성 및 각종 기관형성과 분화과정 연구에 많은 장점들을 가지고 있다[143]. 동물모델로서 zebrafish가 가지는 장점은 마우스와 비슷한 수명(2년 정도)을 갖는다는 것과 생후 3개월이면 번식이 가능하다. 암컷은 일주일 간격으로 100-500개의 알을 낳을 수 있고, 체외수정을 하고 발생 중의 배아가 투명하기 때문에 일반 해부현미경 관찰로 발생의 모든 과정을 관찰할 수 있다[144]. 또한 발생이 매우 빨라 초기 세포분열은 대장균(20분)보다 빠른 15분 간격으로 진행되며, 발생 6시간째 gastrulation이 시작되어 발생 10시간째에 마치고, 12시간이 지나면 눈의 형태가 형성된다[145]. 수정 후 24시간이 지나면 심장의 박동과 혈액순환을 관찰할 수 있다. Zebrafish는 허파를 제외하고는 간, 췌장, 그리고 지라, 흉선 등 면역계를 포함한 대부분의 기관을 가지며(Fig.17), 특히 돌연변이 연구에서 밝혀지는 여러 결과들이 인간의 유전질환과 매우 유사한 것으로 밝혀지고 있다. Zebrafish가 가지는 이러한 장점들로 인하여 세계적으로 많은 연구자들에 의하여 신경계, 혈관계, 심장, 간, 면역계 등의 각종 기관 발달 관련 연구가 이루어지고 있다. 이러한 동물 모델로서의 장점들 때문에 zebrafish로 전환하는 연구자들이 급격히 증가하고 있는 실정이다[146].

천연물질이나 그로부터 추출된 성분들의 유용성은 물질을 분리하여 그 구조를 정확히 분석하는 것이 선행되어야 하며, 그 성분의 생리 활성이 있는지를 *in vitro* 또는 *in vivo* 실험으로 천연성분으로써의 가치를 확인하고 이후에 사람에게 적용하는

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

임상실험(clinical trial) 단계를 거쳐야 하기 때문에 많은 시간과 노력, 비용이 요구되고 있다. *In vivo* 동물 모델 실험에서 사용되고 있는 mouse는 유전학적으로나, 생리적 유사성이 사람과 매우 유사하여 포유동물 모델로서 가장 많이 사용되어 왔지만, 마우스를 이용한 대단위의 screening은 연구 방법의 한계와 비용의 문제가 발생한다[141, 147]. 그 외에 *C. elegans*나 drosophila가 유전학적으로 가장 많이 연구된 실험동물로서 *in vivo* screening에 사용되어 왔지만, 이들 모델은 무척추동물로서 유연관계에서 사람과 차이가 많아 제약이 많이 따른다. 이와 같은 동물모델들과 비교하여 zebrafish는 drug screening을 위한 *in vivo* assay에서 많은 장점들을 가지고 있다. 첫째, mouse에 비해 많은 수의 개체 수의 유지가 용이하며, 둘째, 통계적인 자료를 만들기가 쉬어 재현성이 뛰어나다. 또한 embryo가 투명하기 때문에 *in vivo* 상에서의 organogenesis를 관찰하기가 쉬우며, 쉽게 visual screening이 가능하다[148]. 이외에도 zebrafish 배아의 크기는 약 5 mm로 작아서 96 well plate와 같은 작은 size의 공간으로도 assay가 가능하기 때문에 물질을 최소한으로 사용하여 저렴한 경비로 많은 수의 chemical들을 확인할 수 있는 장점이 있다[146]. 특히 zebrafish는 사람에 존재하는 대부분의 장기들을 가지고 있으며, 다양한 mutagenesis 방법을 통하여 다수의 동물모델이 개발되어 있고, 또한 유전자의 유사성이 drosophila나 *C. elegans*에 비하여 매우 높기 때문에 최근에는 zebrafish를 이용하여 다양한 연구에서 *in vivo* drug screening이 진행되고 있으며, 피부가 투명하여 관찰이 용이하므로 최근 미백 연구에서도 시도되고 있다[141, 146]. 본 실험에서는 강력한 항산화 활성 효과를 갖고 있으나, 미백효과에 대해 논란의 여지가 많은 quercetin과 천연물 상태에서quercetin 을 다량 함유하고 있는 양파껍질 추출물(onion skin extracts을 zebrafish)를 이용하여 항산화 활성과 미백 효과를 검증하고자 하였다.

또한 새로운 천연 미백 소재를 개발하기 위해 최근 슈퍼푸드로 알려진 aronia와 aronia 속에 포함되어 있는 anthocyanin 성분 중의 하나인 C3G의 항산화 활성을 확인하고 현재 미백 효과가 보고된 바 없는 C3G의 미백 효과 검증을 통해 천연 미백 소재로서의 가능성을 제시하고자 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

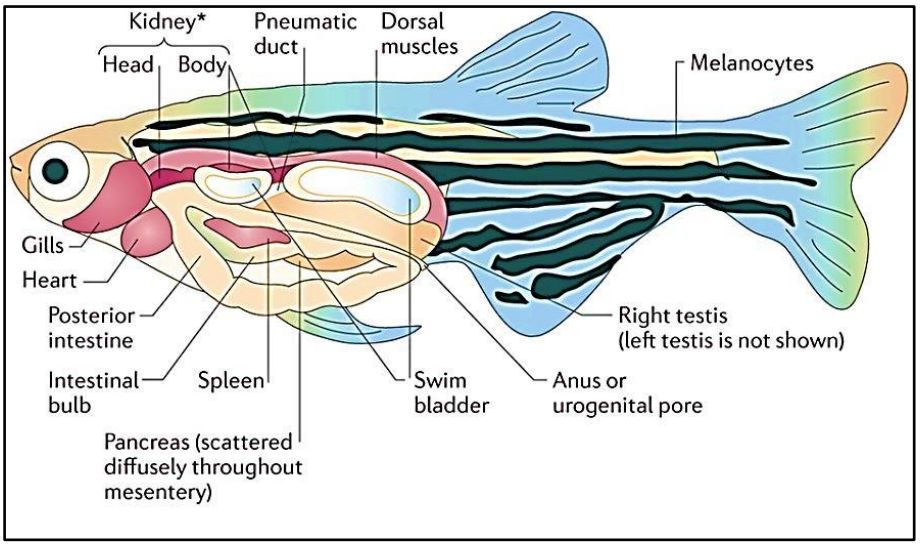


Fig. 17. Internal organ development in zebrafish[151].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.6.2. Experimental zebrafish

Zebrafish는 transgenic model (Havard Medical school male & female)로써, 성숙된 zebrafish 암수를 알 채취 전날 알 채취용 수조에 넣고 14:10 시간의 낮과 밤의 주기로 28.5℃의 수온을 유지, 폐쇄 순환 여과 시스템을 갖춘 수조에서 수정한 뒤 다음날 광주기 시기 1~2시간 이후에 알을 채취하였다. 수정된 알은 zebrafish embryo medium에 넣고 24시간 발생시킨 후, zebrafish skin cell에 damage를 주기 위해 metronidazole (MT)을 1000 mM로 처리한 후 각 샘플을 농도별로 처리하였다. 실험 샘플을 농도별로 희석하여 72시간 후 zebrafish embryo를 washing 하였다. Washing 한 embryo를 medium으로 옮기고 0.1% (v/v) tricaine anaesthetic를 사용하여 마취 후 488 nm에서 현미경(Olympus SZX16, Tokyo, Japan)으로 항산화 활성 정도를 fluorescent spot을 counting하여 확인하였다.

2.6.3. Anti-oxidant effect of in zebrafish from *Allium cepa* skin extracts (onin skin)

양파껍질 extracts의 항산화 활성을 fluorescent counting 값으로 측정하였다. Zebrafish에 MT를 처리하게 되면 skin cell에 damage를 주게 되고 damage를 입은 skin cell의 fluorescent rate가 감소하게 된다. 이 상태에서 항산화 활성이 있는 물질을 처리하게 되면 fluorescent rate가 증가하게 되고 이와 같은 방법으로 항산화 활성을 평가할 수 있다. 본 실험에서는 MT를 1000 mM 농도로 처리 후 양파껍질 extracts을 DMSO에 희석하여 30~100 μg/mL의 농도로 실험하였다. positive control으로는 vit C (Ascorbic acid) 100 μg/mL을 사용하였으며, 실험 결과 양파껍질 extracts은 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하는 경향을 보였고 positive control인 vit C는 100 μg/mL의 농도에서 100% fluorescent rate를 나타내었다. 양파껍질 extracts은 vit C와 동일한 농도에서 항산화 활성의 fluorescent rate가 120%으로 확인되었으며, positive control으로 사용한 vit C 보다 20% 정도 더 높은 항산화 활성을 보여주었다. 이와 같은 높은 항산화 활성은 양파껍질에 다량 함유되어 있는 quercetin 성분으로 추정되며 추후 단일물질(quercetin)의 항산화능을 확인할 필요가 있다. Zebrafish를 이용한 다른 항산화 실험에서 셀레늄(selenium) 섭취 시 산화 스트레스에 대한 항산화 활성을 보고하였는데

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

zebrafish에 고함량의 selenium을 식이 처리하였을 때 산화, 환원 반응의 균형을 조절하고 항암효과가 있음이 밝혀진 selenoprotein의 단백질 발현에 영향을 주지 않는다고 하였다[149]. Zebrafish를 이용한 다른 연구에서 flavonoids는 flavone보다 낮은 toxicities 높은 항산화 활성이 있음을 보고하였는데 toxicity 농도 범위는 LD_{50} > 100 ppm이라고 보고하였다[150]. 또한 quercetin 과 rutin을 zebrafish에 50 mg/kg으로 injection 시켰을 때 항산화 효과와 함께 알츠하이머 예방효과가 있음이 보고되었다[151]. 다른 연구에서는 갈색 해조류에서 dieckol 성분을 분리하여 zebrafish에 UVB를 조사하였을 때 UV에 대한 매우 높은 skin damage 방지 효과에 대해 보고하였다[152]. 이와 같은 결과를 보았을 때 drug screening을 위한 *in vivo* assay로 zebrafish를 활용하는 것은 *in vivo* 실험에서 매우 유용하다고 생각되며, 아직까지 밝혀지지 않은 다른 종류의 polyphenol 항산화 활성과 mineral 등 다른 유용성분들에 대해서 조사할 필요가 있다.

2.6.4. Anti-oxidant effect of in zebrafish from C3G

Fertilization 시킨 배아를 24-well plate에 1 well 당 zebrafish embryo를 10마리씩 medium에 놓고 24시간 배양 시킨 후 MT를 1000 mM로 처리하였다. C3G는 각각 의 농도(10, 30, 50, 100, 150, 200 μmol/L)로 처리하였고 positive control으로 NAC (N-acetyl-L-cystenin)를 사용하였다. 실험 결과 C3G 30 μg/mL ~ 100 μg/mL 농도에서는 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하였으나, 150 ~ 200 μg/mL 의 농도에서는 항산화 활성이 감소하였다. 이와 같은 이유는 C3G의 toxicity 때문으로 생각되며, 본 연구에서 toxicity range를 조사하기 위해 실험했던 zebrafish mortality data와 비교해 보았을 때 C3G의 *in vitro* 실험의 안전한 농도 범위는 100 μg/mL 이하로 판단된다. 다른 선행 연구에서 grape skin (GS)과 *acai puree*의 항산화 활성과 zebrafish를 20 mg/day/fish의 조건으로 intake 시켰을 때 콜레스테롤 감소 효과에 대해 보고를 하였다[153]. 기존의 문헌들을 조사를 해보면 *in vivo* 실험에서 zebrafish를 이용한 실험들은 대부분 식이를 통한 연구가 대부분이며, 본 실험과 같은 방법으로 항산화 활성을 연구는 사례한 경우는 매우 드물다. 또한 cyanidin의 분류 물질 중에서 C3G의 생리 활성에 대한 연구가 매우 미흡하므로 추후 여러 가지 기초연구들과 함께 단일 물질의 분리

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

를 통한 다양한 mechanism의 규명이 필요할 것으로 생각된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

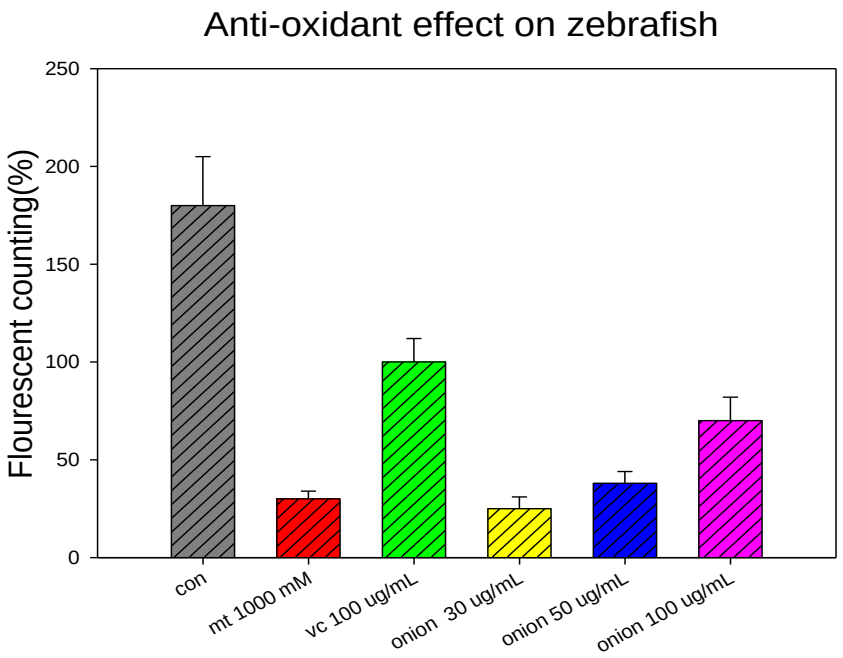


Fig. 18. Fluorescent counting (%) of zebrafish after treatment of *Allium cepa* skin extract (onion skin).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

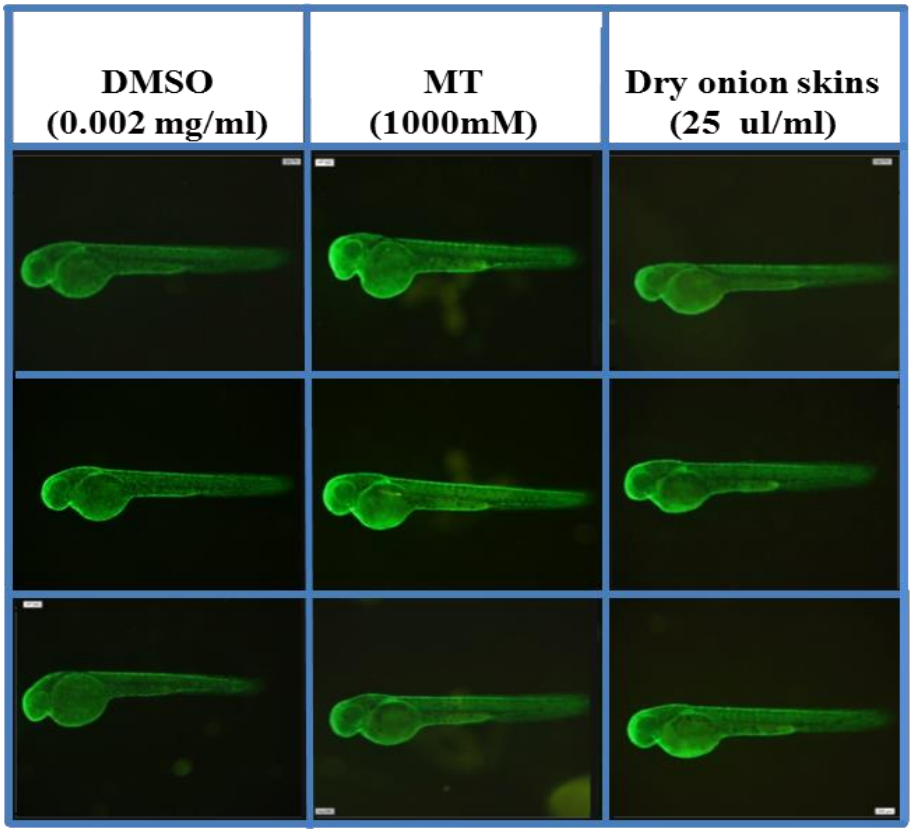


Fig. 19. Fluorescence images of anti-oxidant effect in zebrafish from *Allium cepa* skin extract (onion skin).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

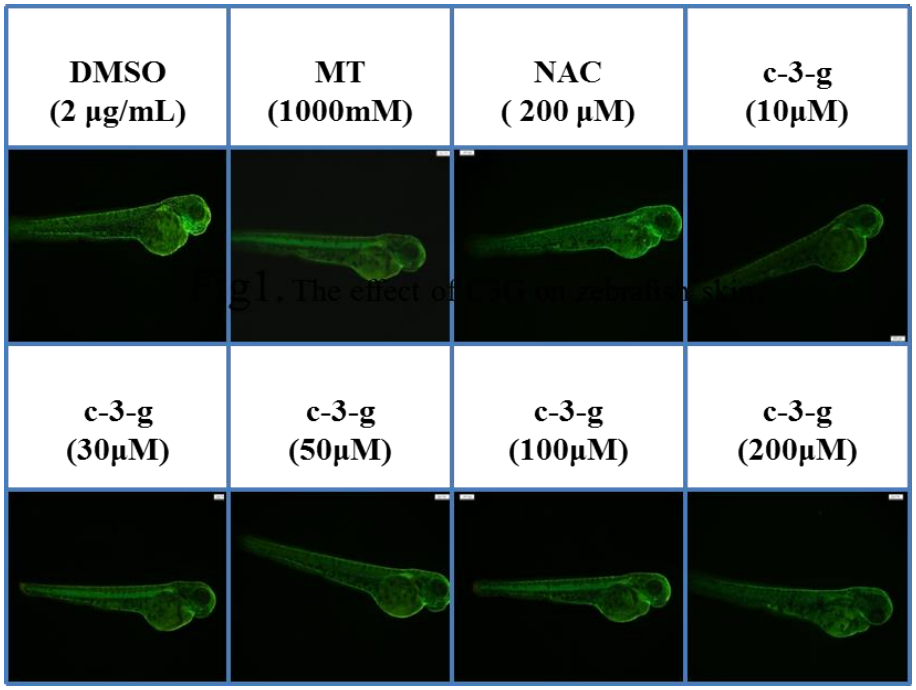


Fig. 20. Fluorescence images of anti-oxidant effect in zebrafish from C3G.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

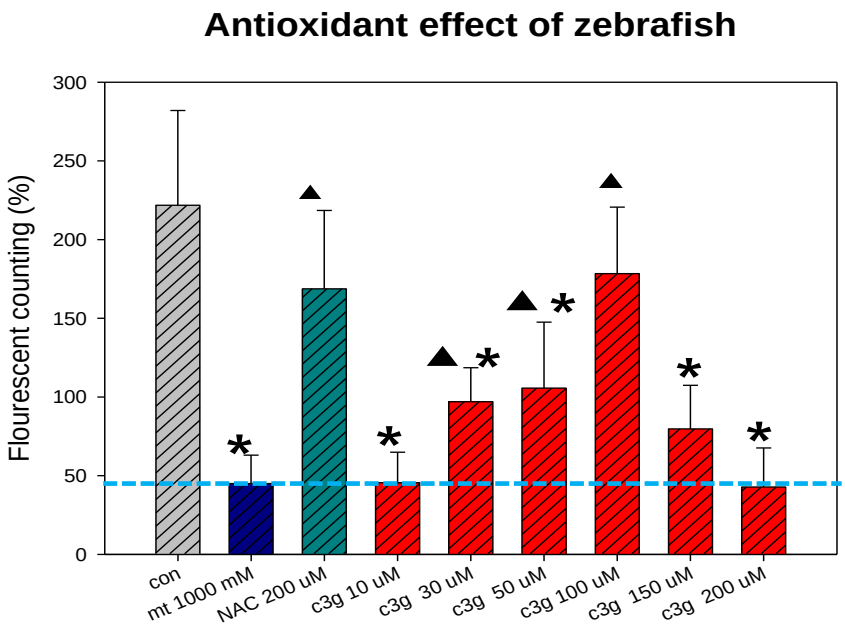


Fig. 21. Fluorescent counting (%) of zebrafish after treatment of C3G.

**** P<0.01 vs. control, ▲P<0.05 vs. MT, ▲▲P<0.01 vs. MT**

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Chapter 3. Determination of anti-melanogenesis activities of onion skin extracts and *Aronia melanocarpa extracts*

3.1. Introduction

Melanosome 안에서 생기는 melanin 합성 과정에는 3개 이상의 효소가 관여하며, 합성에 관여하는 주요한 효소는 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1), tyrosinase-related protein 2 (TRP-2)이다. 이 중 tyrosinase는 rate-limiting step에 관여하는 효소로써, melanin 합성 과정에서 가장 핵심이 되는 효소이다[21]. Tyrosinase는 melanogenesis의 속도결정 단계인 초기 반응에 관여하는 효소로 생합성 경로에서 서로 다른 세 반응을 촉매 한다. 첫 번째 반응은 Tyrosine에서 DOPA로의 hydoxylation, 두 번째 반응은 DOPA가 산화되어 DOPA quinone으로 전환되며, 세 번째는 다시 산화되어 DHI의 탈수화 반응을 일으킨다. DOPA는 첫 번째와 세 번째 반응에서 cofactor로 작용하며[154], DOPA와 tyrosinase의 정확한 상호작용 부위는 밝혀져 있지 않으나 서로 다른 두 개의 binding site가 있는 것으로 보고되었다. Tyrosinase에 cofactor가 결합하게 되면 tyrosinase의 conformation 변화를 유도하게 되며 기질에 대한 효소의 친화력을 증가시킨다[155]. Tyrosinase의 활성을 위해서는 촉매 활성 자리에 있는 histidine 잔기에 2개의 구리 이온이 결합되어야 하고, tyrosinase-related proteins인 TRP-1과 TRP-2는 melaningenesis 과정에서 매우 중요한 역할을 한다[156]. TRP-1과 TRP-2는 tyrosinase와 약 40%의 아미노산 homology를 공유하며, TRP-1은 melanosomal 막에 존재하여 transmembrane protein을 glycosylation 시킨다. 또한 Mouse의 TRP-1이 tyrosinase의 안전성과 피부의 pigmentation을 증가시킨다고 알려져 있으나, melanogenesis에서 TRP-1의 작용은 아직 정확히 규명되지 않았다[157]. 또한 human TRP-1은 Mouse TRP-1과 달리 fibroblast에 transfected TRP-1 실험을 통해 DHICA oxidase 활성을 띄지 않는 것으로 밝혀졌다[156a]. TRP-2는 tyrosinase와 같은 glycoprotein이다. TRP-2가 정상적인 기능을 하기 위해서는 이 단백질의 glycosylation이 필요하다[158].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

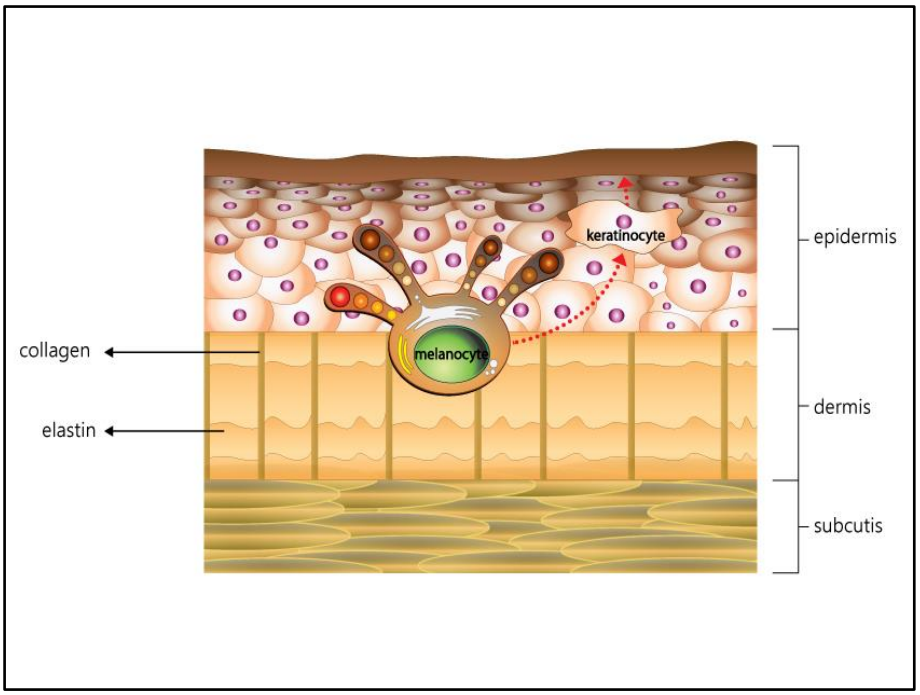


Fig. 22. Structure of melanocyte in skin.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

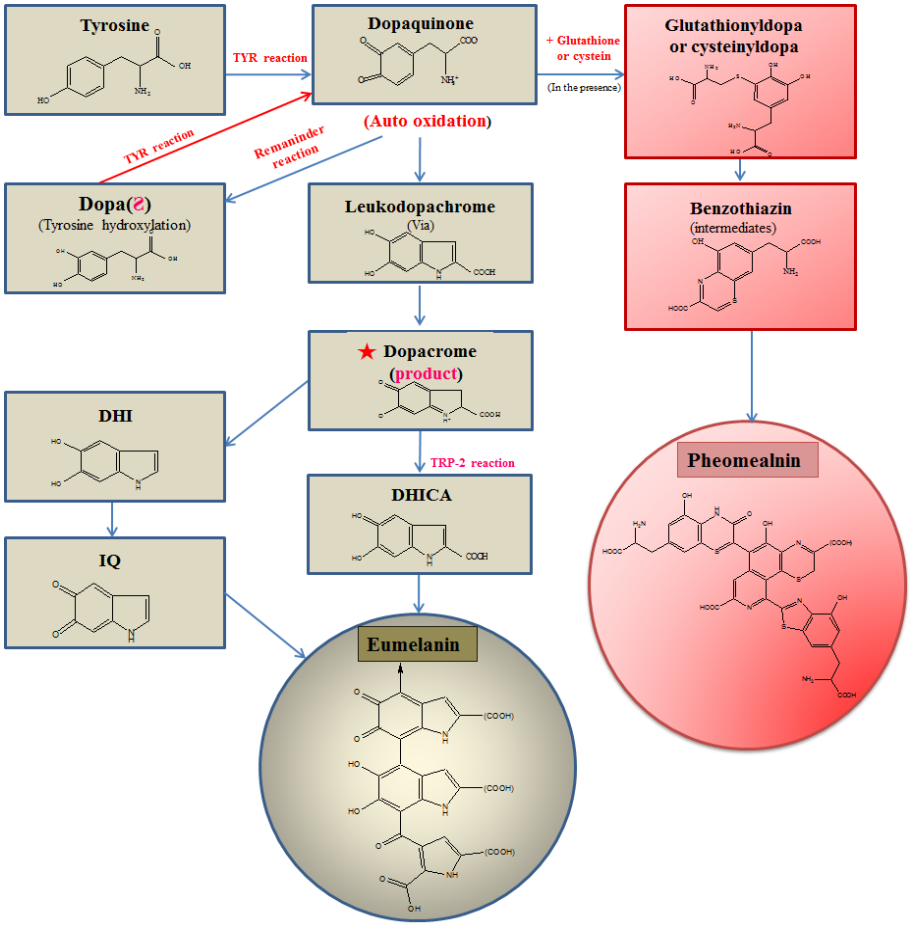


Fig. 23. Chemical reaction-based melanin formantion mechanisms.

Melanin synthesis pathway regulated by tyrosinase, tyrosinasefamily protein TRP1 and TRP2. Tyrosinase catalyzes the first tworate-limiting steps in melanin synthesis of tyrosine hydroxylationto DOPA and DOPA oxidation to DOPAquinone, and also theoxidation of the downstream intermediate DHI to indo-5,6-quinone and DHICA to indole-5,6-quinnone carboxylic acid. TRP1and TRP2 catalyze the oxidation of DHICA to indole-5,6-quinone carboxylic acid and tautomerization of DOPAchrome to DHICA.[159]

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3.2. Mushroom tyrosinase inhibition

Aronia extracts의 미백 효과를 확인하기 위해 1차 적으로 mushroom tyrosinase activity를 측정하였다. 실험 방법은 tyrosinase 활성에 의해 L-DOPA가 DOPA chrome으로 변하는 원리를 이용한 것이며, 본 실험에서는 Xie[76]의 방법을 변형하여 실험을 진행하였다. 실험 방법은 E.P. tube에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) 220 μL 와 50 ~ 1000 μg/mL 농도로 제조된 블루베리 추출액 20 μL, L-tyrosine (Sigma, USA) 1.5 mM 40 μL, 1500 unit로 제조한 mushroom tyrosinase (Sigma, USA) 20 μL을 넣고 37℃에서 15 min 간 반응 시켰다. 반응이 끝난 후 tyrosinase에 의해 DOPA로부터 형성되는 DOPA chrome의 양을 490 nm 에서 측정하였다. Positive control로 arbutin과 ascorbic acid를 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3.3. Cell Culture (B16F10)

B16F10 mouse 세포는 한국세포주은행에서 분양 받았으며, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, USA), 0.2 % sodium bicarbontate를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma, USA)를 배지로 사용하였고, 37℃ 온도에서 5% CO_2 상태로 배양하였으며, 세포가 바닥 면적의 80% 정도까지 자란 상태에서 계대 배양하여 실험을 진행하였다. 세포는 10% FBS, 50 U/mL 페니실린 및 50 μg/mL streptomycin이 함유된 DMEM에서 37℃ 및 5% CO_2조건 하에 배양하였다.

3.4. Measurement of cellular Melanin Content

B16F10 세포를 96 well plate에 1 x 10^5 cells/well 농도로 분주하고 24 h 후에 1 μM α-MSH와 aronia extracts를 각 농도별(10 μg/mL ~ 50 μg/mL)로 각각 처리하였으며, 72 h이 지난 후 melanin 생성을 확인하고 세포를 PBS로 세척하였다. 세포를 수확하고 10,000 rpm에서 5 min 간 원심분리하고 생성된 pellet에 1 N NaOH를 넣고 60℃에서 1 h 동안 방치하여 용해시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. melanin 함량은 무처리군의 흡광도와 비교하였으며, 양성대조군으로는 arbutin을 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3.5. MTT Assay

B16F10 cell suspension을 96-well에 $1x10^5$ cells/well 농도로 100 μL씩 분주하여 배양기에서 24시간 동안 안정화를 시킨 후 시료를 농도 별로 단독 혹은 다른 항산화제들과 함께 병용 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. Vistica[160]의 방법에 따라 2.5 mg/mL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 well당 50 μL 씩 넣어 4시간 동안 배양기에 방치한다. 이후 상등액을 제거하고 DMSO를 well당 100 μL 씩 가하고 1분간 shaking하여 formazan을 완전히 용해시킨 후 ELISA Bio-Tek instrument Inc (Winooski, VT, USA)을 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험에 사용한 MTT, DMSO는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 96 well plate는 Nunc (Roskild, Denmark)에서, 0.2 μM syringe filter는 Nalgene® (Rochester, NY, USA)에서 구입해 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3.6. Western blot analysis

B16F10 cell suspension을 100 π tissue culture dish에 각 well 당 1x10^5 cells/well로 가한 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화시킨 후, 약물을 농도 별로 처리한다. 배양이 끝난 세포를 2~3회 PBS로 세척 후 lysis buffer를 첨가해 cell을 lysis 시킨 후 14,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. Protein의 정량은 Bradford법을 이용해 측정하였다. 25 μg의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE)로 변성 분리하고, 이를 polyvinyildene difluoride (PVDF) membrane에 transfer하였다. Membrane을 blocking 시킨 후, 2.5% nonfat dry milk가 함유된 Tris-buffered saline with 0.2% Tween-20 (TBST)에 1차 항체를 넣고 상온에서 1시간 혹은 4℃에서 24시간 반응 시켰다. 1차 항체와 반응시킨 membrane을 TBST로 3회 세척하고 2차 항체와 상온에서 1시간 반응시킨 뒤에 TBST로 3회 세척하여 ECL advance detection system으로 각 band의 양상을 확인하였다. 30% acrylamide, 2-mercaptoethanol, non-fat dry milk, N, N, N'N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), bovine serum albumin은 Bio-Rad (Hercules, CA, USA), RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, with 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% sodiumdeoxycholate, and 0.1% SDS), Tween-20, tris[hydroxyl-methyl]aminomethane (Tris), glycine, ammonium persulfate는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), protease inhibitor cocktail과 phosphotase inhibitor cocktail은 Roche (Indianapolis, IN, USA), polyvinylidene difluoride (PVDF) transfer membranes은 Millipore (Billerica, MA), ECL advance detection system은 Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ, USA)에서 구입하였다. Mini-Protein tetra cell casting module, Semi-dry transfer kit, Electrophoresis power supply는 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)에서 centrifuge는 Hanil Science Industrial Co. (Incheon, South Korea)에서, LAS-3000 imaging system은 Fujifilm (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 각 물질의 Western blot으로 단백질 발현 측정을 알아보기 위해 β-actin (Cell signaling), tyrosinase (Santa Cruz), TRP-1 (Santa Cruz), TRP-2 (Santa Cruz), MITF (SantaCruz), Anti-Rabbit-HRP (Cell signaling), Anti-Mouse-HRP (Santa Cruz)을 구입하여 실험에 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3.7. Results and discussion

3.7.1. Effect of mushroom tyrosinase inhibition by Quercetin and *Aronia melanocarpa* extracts

Tyrosinase는 melanin 합성에 있어서 핵심적인 역할을 하는 효소로서 melanin 합성의 출발 물질인 tyrosine을 DOPA quinone으로 전환하기 때문에 tyrosinase의 활성 유무에 따라서 melanin 생성이 결정 된다[28, 161]. 본 실험에서 quercetin 의 tyrosinase inhibion IC_{50} 값은 86.35 μg/mL로 측정되었으며, 양성대조군(positive control)으로 사용한 ascorbic acid과 arbutin의 IC_{50} 값은 각각 17.96 μg/mL과 101.65 μg/mL로 측정 되었다. Aronia extract의 IC_{50} 값은 168.93 μg/mL 으로 측정 되었으며, 이와 같은 결과는 positive control으로 사용한 quercetin, ascorbic acid, arbutin보다는 낮은 저해활성을 나타내지만 실험시료가 천연물이라는 점을 감안했을 때 매우 높은 tyrosinase 저해활성이라고 볼 수 있다. 일반적으로 식물들이 갖고 있는 페놀류 화합물은 높은 항산화 활성을 갖기 때문에, tyrosinase에 의한 가역적 산화반응을 억제시켜 미백 기능을 하는 것으로 알려져 있다[162]. 또한 페놀류 화합물은 tyrosinase의 기질인 tyrosine과 구조적으로 유사하여 tyrosinase의 활성을 저해한다고 알려져 있다[163]. 효소반응에서 경쟁적 저해제(competitive inhibitor)는 기질과 그 형태가 매우 유사하여 효소의 활성부위에 기질과 경쟁적으로 결합을 하게 되며, aronia extracts에 포함되어 있는 각종 polyphenols이 tyrosinase를 저해하여 미백활성을 나타내는 것으로 추정된다. 추후 aronia extracts의 tyrosinase related protein과 mRNA의 발현량 측정을 통해 melanin 생성 억제 활성에 관한 분자생물학적 수준의 연구가 필요하다고 생각된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

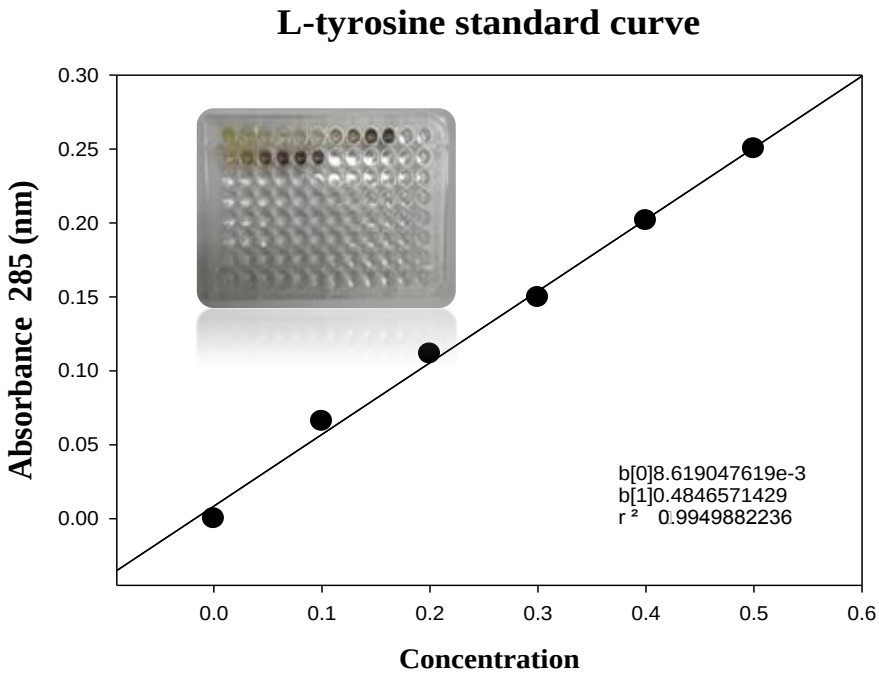


Fig. 24. L-tyrosine standard curve of tyrosinase inhibition detection.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

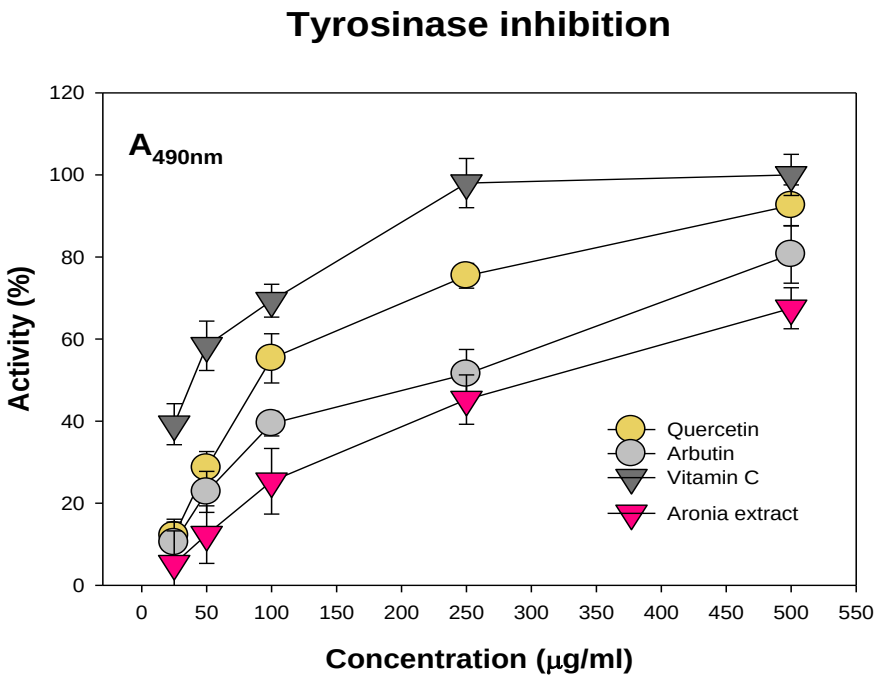


Fig. 25. Inhibitory effect of mushroom tyrosinase from aronia extracts.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3.7.2. Measurement of cytotoxicity of Quercetin and Aronia extracts in B16F10 melanoma cells.

Quercetin과 aronia extracts의 독성의 정도를 확인 하기 위해 B16F10 melanoma cells을 이용하여 48시간 시료 처리 후 세포 생존율을 측정하였다. Quercetin은 10 ~ 50 μM의 농도 범위에서 농도 별로 측정 한 결과 세포 생존율은 <10 μM 에서 90% ~ 109%이었다. 이와 같은 결과는 Nagata (2004)[164]의 연구에서 quercetin의 세포 생존율의 범위 <20 μM 보다는 높은 독성을 나타내었다. 대부분의 기존 연구들을 보면 quercetin의 세포 생존율의 범위는 <10 μM로 조사 되었으며, 이와 같은 결과들은 quercetin이 매우 toxic한 물질임을 시사한다. Aronia extracts의 세포 독성 평가에서 안전한 농도 범위는 10 ~ 25 μg/mL로 조사 되었으며, quercetin 보다 독성이 없는 것으로 나타났다. Thani (2012)[165]의 연구에서 aronia extracts의 세포 독성 평가 농도 범위는 30 ~ 60 μg/mL이라고 하였으며, Rooprai (2016)[166]의 연구에서 aronia extract의 독성 평가 범위는 <1 μg/mL에서 안전하다고 하였다. 본 연구의 결과 aronia extract의 안전한 농도 범위는 <30 μg/mL 으로 조사되었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

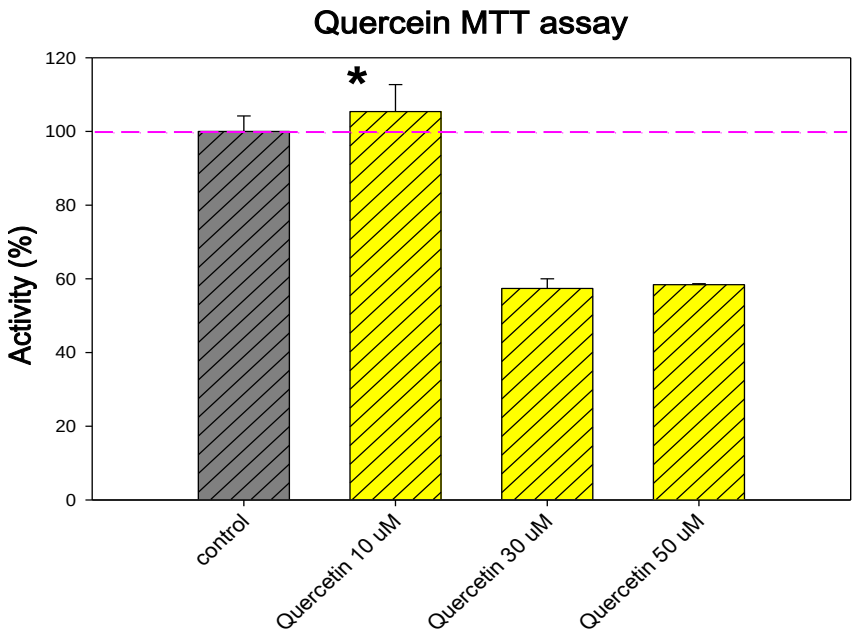


Fig. 26. Effect of Quercetin and Aronia extracts on cytotoxicity.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

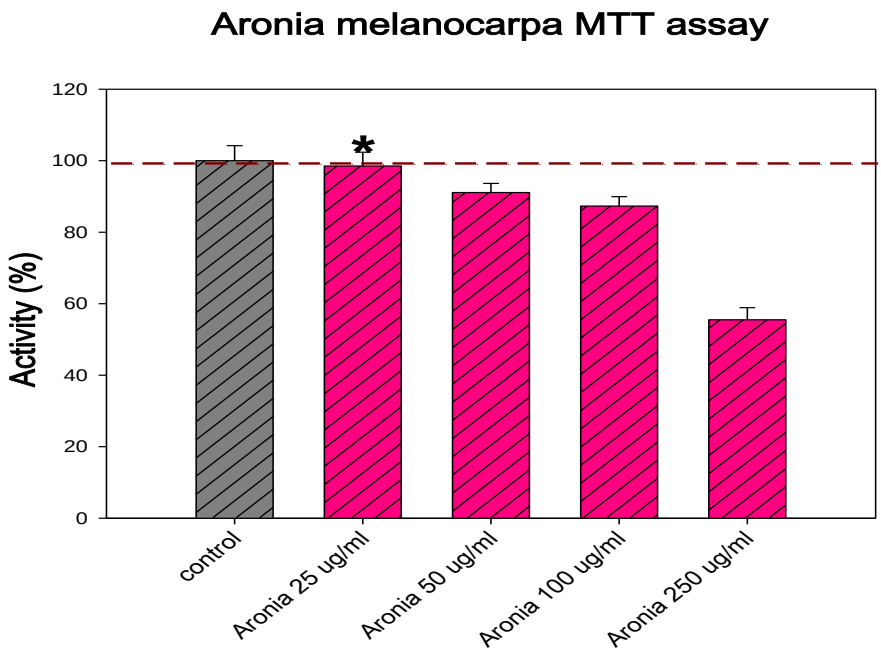


Fig. 27. Relative cell viability of SSE on B16 melanoma cells by aronia extracts.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3.7.3. Mesasurement of melanin contents of Aronia extracts

Melanin 생합성에 관여하는 주요 인자로는 tyrosinase, DOPA chrome conversion fator (DCF), prostaglandin (PG), interferon (IFN), melanocyte stimulation hormone (MSH), vitamin D3, histamine 등이 있다[167]. 미용학적 측면에서 보았을 때 melanin 생성은 심미적인 문제의 요인이 되므로 melanin 형성을 저해하고 피부에 적용하였을 때 안전하고 효과적인 미백 소재의 개발은 무척 중요하다. Aronia extracts의 melanin 생성 억제활성을 확인하기 위해 B16F10 cell에 α-MSH 1 μM을 처리하여 melanin 생성을 유도한 후 (Fig.28) 각각의 농도(10 ~ 200 μg/mL)로 처리한 결과 농도 의존적으로 melanin 양이 감소함을 확인하였다. 이와 같은 결과는 양성대조군인 ascorbic acid보다는 낮은 결과이지만 실험시료가 천연물이라는 점을 감안했을 때 비교적 높은 melanin 생성 저해 활성이라고 할 수 있다. Aronia 열매와 잎에는 anthocyanin 성분이 다량으로 포함되어 있는데 이러한 anthocyanin 색소가 tyrosinase 활성을 저해하고 melanin 생성을 억제 한다는 연구 결과가 보고 되어있다[168]. 현재 aronia에 관한 연구로는 영양성분 분석 및 항산화 활성에 관한 연구가 대부분이며 미백활성에 대한 연구는 매우 미흡하다. Aronia extracts의 여러 가지 지표성분들의 미백활성 검증을 통해 천연 화장품 소재로서의 가능성에 대해 검토할 필요가 있다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

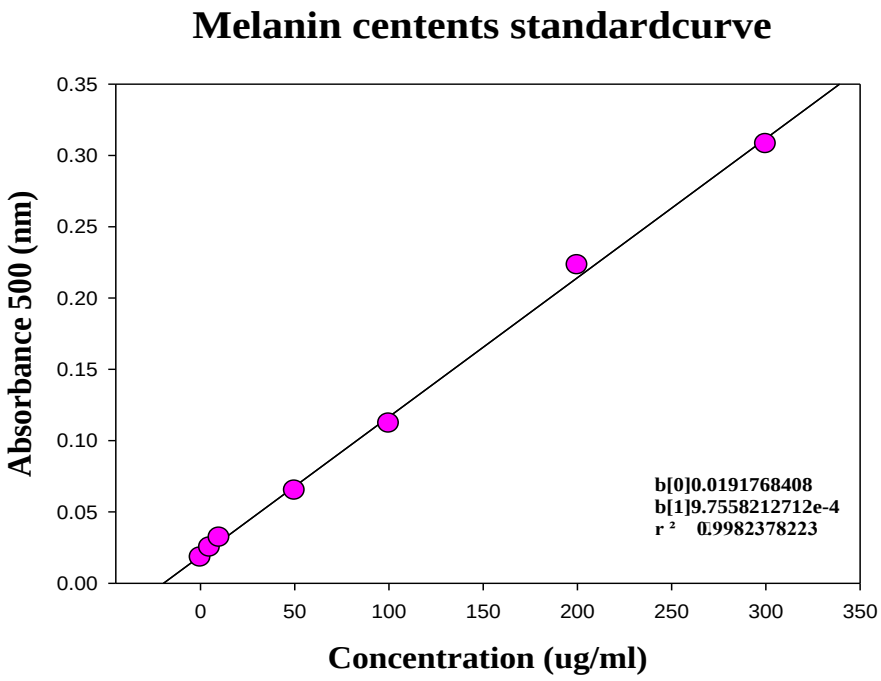


Fig. 28. Melanin contents standard curve.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

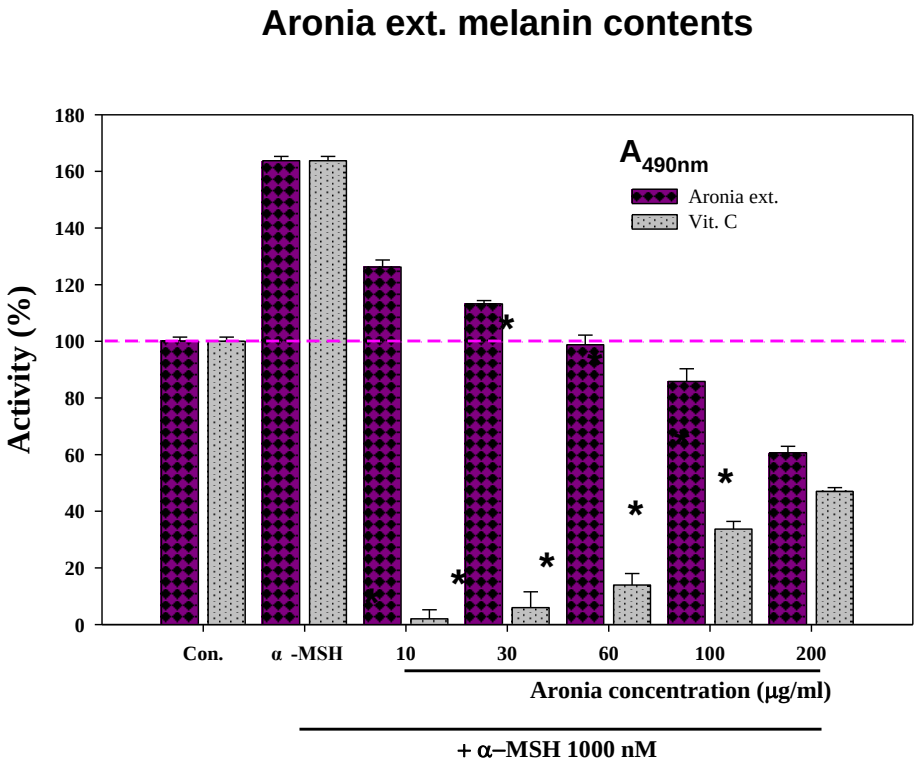


Fig. 29. Effect of aronia extracts on melanin content.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3.7.4. Western blot analysis in B16F10 cells

피부의 기저층에 존재하는 melanin은 melanin 생성세포 내 소기관인 melanosome에서 합성되며, melanosome은 멜라닌 합성 시 중요한 효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등을 함유하고 있다[169]. 피부가 UV에 노출되면 세포내의 α-MSH의 생성이 증가하고, α-MSH은 melanin cell의 특이 수용체인 melanocortin receptor(MC1R)과 결합하여 하위 신호를 전달하게 되며, adenylate cyclase를 활성화시켜 cAMP를 증가 시킨다. 이때 cAMP PKA와 cAMP의 response element binding 단백질인 CREB를 phosphorylation 시켜 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현을 증가 시킨다. Melanin 생성의 다른 경로는 MAPK의 경로가 있으며, ERK는 membrano-to-nucleus 신호를 통해 세포의 증식과 분화에 관여하고 ERK의 활성은 MITF의 serine 73을 phosphorylation 시켜 MITF의 발현이 감소하면 tyrosinase의 전사가 저해 된다고 알려져 있다[170]. Melanin 합성의 또 다른 경로는 NO pathway가 있으며, 체내에서 NO가 생성되면 guanulate cyclase가 활성화 되고 cGMP가 증가하게 되고 MITF 또한 증가하게 된다[171]. 이외에도 Wnt pathway와 extracellular의 경로 이외에 아직 밝혀지지 않은 몇 가지 경로가 더 존재할 것으로 예상되며, 신호전달 mechanism 규명이 필요할 것으로 생각된다(Fig. 4). 본 실험에서는 B16F10 cell에 α-MSH로 자극을 주고 melanin 양이 증가된 상태에서 quercetin과 aronia extract, C3G 의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현 양상을 조사하였다. 실험결과 quercetin에서 단백질 발현량은 감소하지 않았고, aronia extracts 10 μg/mL에서 TRP-2가 약간 감소하였다. Aronia extracts와 지표성분인 C3G의 단백질 발현량을 조사하였으며, 결과는 aronia extracts 중 단일 compound인 C3G의 미백활성이 더 높은 것으로 확인되었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

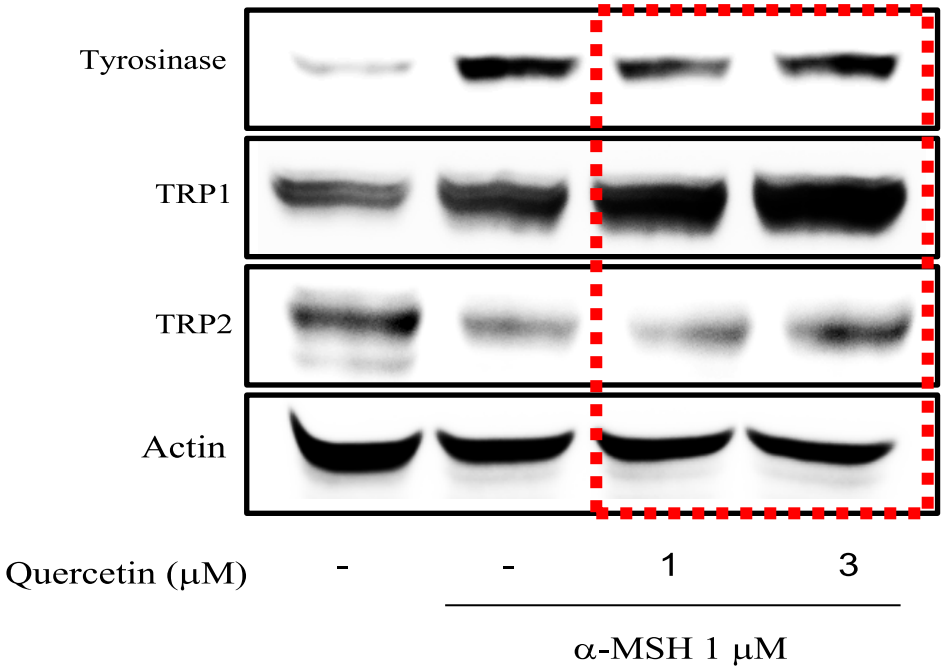


Fig. 30. Inhibitory effect of Quercetin on the Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and Actin in expression B16F10 cells.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

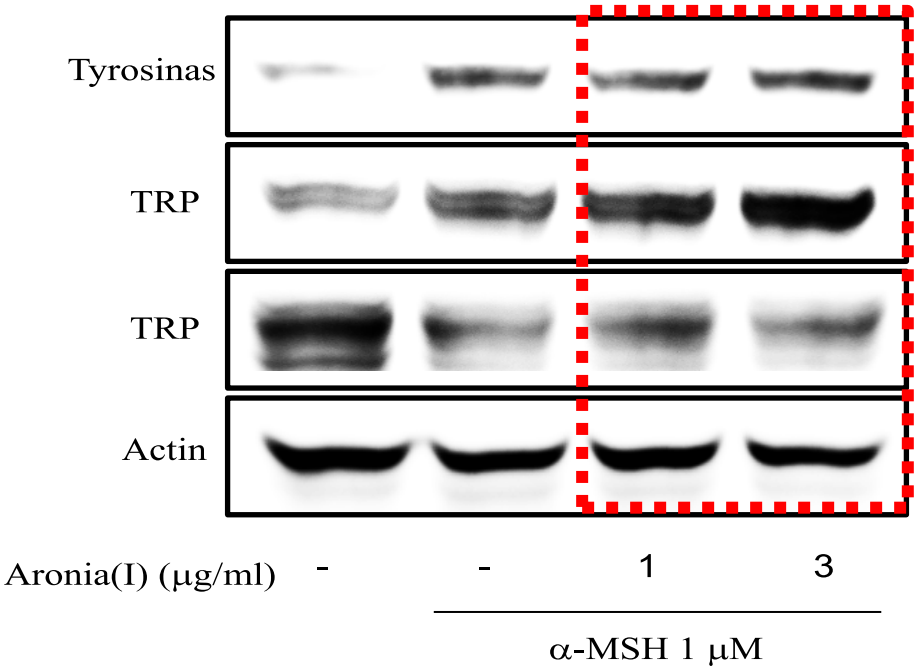


Fig. 31. Inhibitory effect of *Aronia* extract on the Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and Actin in expression B16F10 cells.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

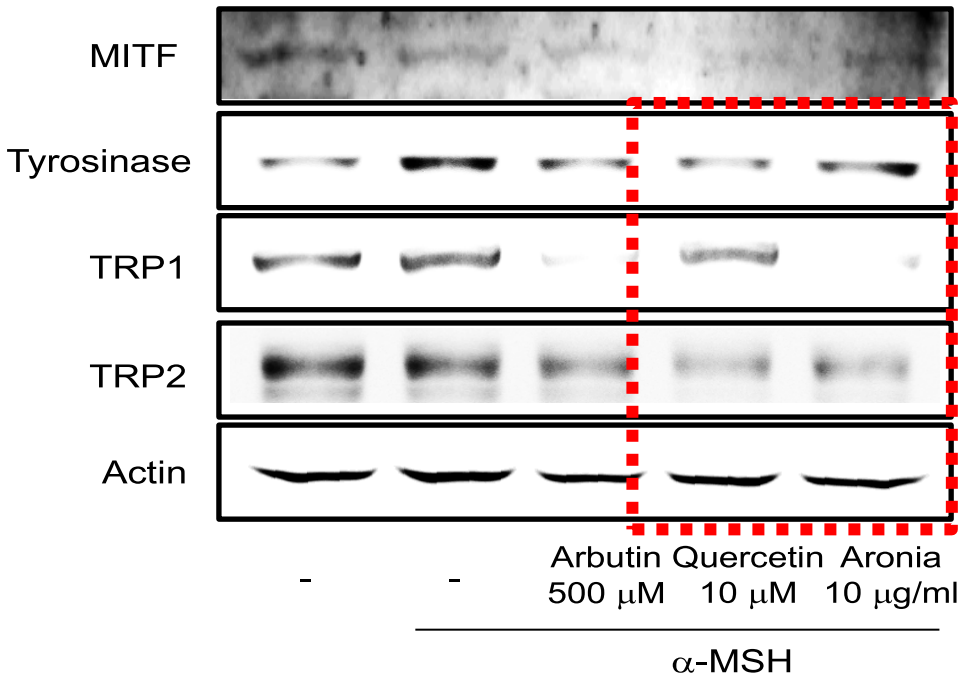


Fig. 32. Inhibitory effect of Quercetin and *Aronia* extract on the MITF, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and Actin in expression B16F10 cells.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

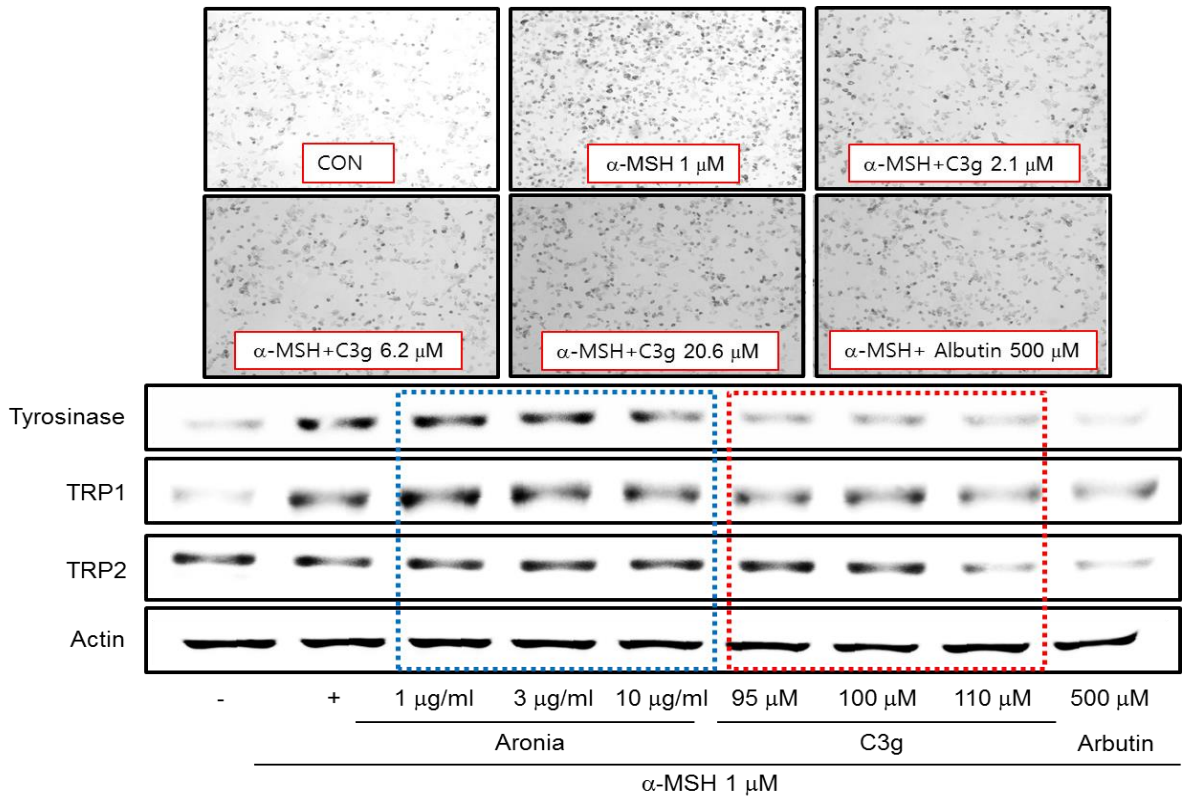


Fig. 33. Inhibitory effect of C3G on the Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and Actin in expression B16F10 cells.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

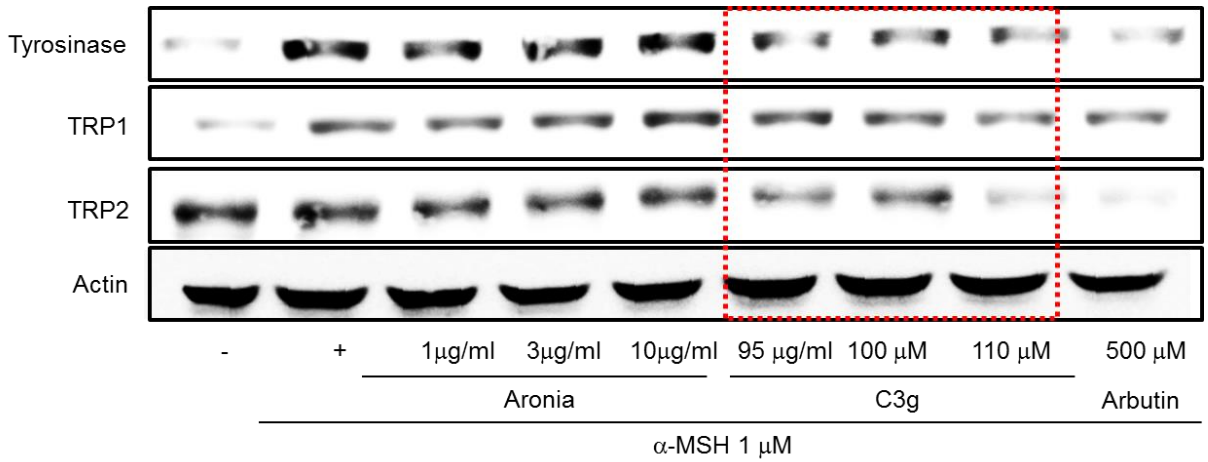


Fig. 34. Inhibitory effect of C3G and *Aronia* extract on the Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and Actin in expression B16F10 cells.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3.7.5. Statistical analysis

실험 결과는 3번 반복실험 후 (SPSS version 22)를 이용하여 통계처리 하였으며, 실험에 의해 얻어진 값들의 평균을±표준편차로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검증은 t-Test 사용하였으며, $p<0.05$ 수준에서 검정하였다.

3.7.6. Effect of Quercetin and on pigmentation of zebrafish

Quercetin을 각 농도별(2~30 μM)의 농도로 zebrafish embryo에 처리 후 48시간 후에 melanin 생합성 억제활성을 control군과 비교하였다. 색소 침착 저해활성을 조사한 결과 positive control로 사용한 PTU 0.2 mM 처리군에서는 control (DMSO 0.1%)에 비해 강력한 미백활성이 나타났다. Quercetin의 농도범위는 mortality 결과를 바탕으로 생존 가능한 농도(2~ 30 μM)로 처리하였으며, 실험한 농도 전체의 범위에서 미백효과는 나타나지 않았으며, 농도가 높아질수록 독성으로 인해 오히려 melanin이 증가하는 경향을 보였다. Zebrafish 내에서 tyrosinase의 활성을 비교하였는데 농도 의존적으로 tyrosinase 활성이 증가하였다. Quercetin에 관한 기존의 연구결과들은 대부분 *in vitro* cell 실험들이 대부분이며, 몇몇 연구자들은 미백효과가 있음을 보고하였고, 다른 연구자들은 반대로 melanin 증가에 대해 보고하였다. Quercetin에 대한 기존의 *in vivo* 실험에서 C3H/HeN Jel mouse 피부에 quercetin을 처리했을 때 tyrosinase protein과 TRP-2가 증가하고 hair follicle 색깔이 검게 변했다는 연구가 있다[172]. 본 연구결과 quercetin은 항산화 활성은 매우 높지만 *in vitro* cell 실험의 경우 10 μM 이하의 낮은 농도에서도 독성이 나타나며, *in vivo* zebrafish 실험에서는 30 μM 에서 mortality rate가 20% 이하로 나타나 독성이 매우 강한 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과를 보았을 때 quercetin은 미백성분으로는 적합하지 않다는 결론을 내렸다. 반면 aronia extracts는 농도 50 μM 에서 mortality rate가 20%로 확인되었으며, tyrosinase 활성이 100 μM 이상에서 감소하였으므로, 미백활성이 있다 해도 zebrafish의 mortality rate를 감안하였을 때 미백제로 사용하려면 50 μM 이하의 농도 범위로 제한되어야 한다. 따라서 다른 *in vivo* 실험이나 clinical trails을 통해 농도 범위를 확인할 필요가 있으며, aronia 속의 단일물질인 C3G의 미백활성에 대한 연구가 필요하다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

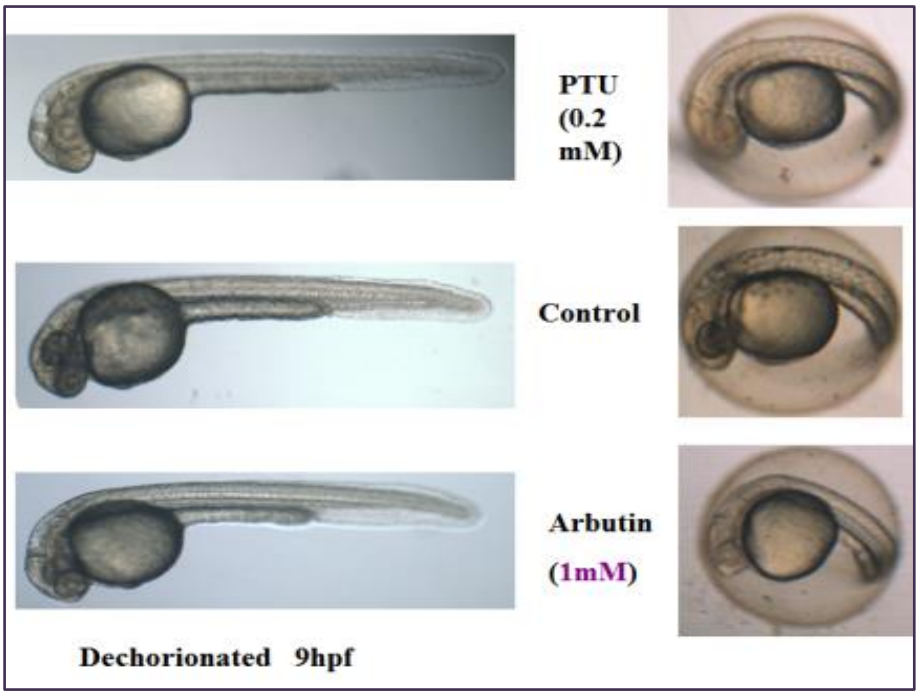


Fig. 35. Pheno-type based dechorionated 9 hpf and embryo after treatments of PTU and Arbutin.

Chemical

Arbutin was purchased from TCI (Tokyo, Japan); PTU, C3G, Quercetin were purchased from Sigma (St Louis, USA). Vc was purchased from Beijing Dingguo Changsheng Biotechnology Co.LTD (Beijing, China)

PTU (1-phenyl-2-thiourea) is a well known tyrosinase inhibitor used routinely to inhibit pigment production in zebrafish.

Zebrafish embryos

The AB line zebrafish used in this study were from Drug screening Platform of Shandong Academy of Sciences and were maintained following the standard procedures (Westerfield 1995). Embryos were obtained from natural spawning that was induced at the morning by turning on the light. Colletion of embryos was completed with 30 min. After being rinsed several times, the clean embryos were cultured at 28.5 ℃.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

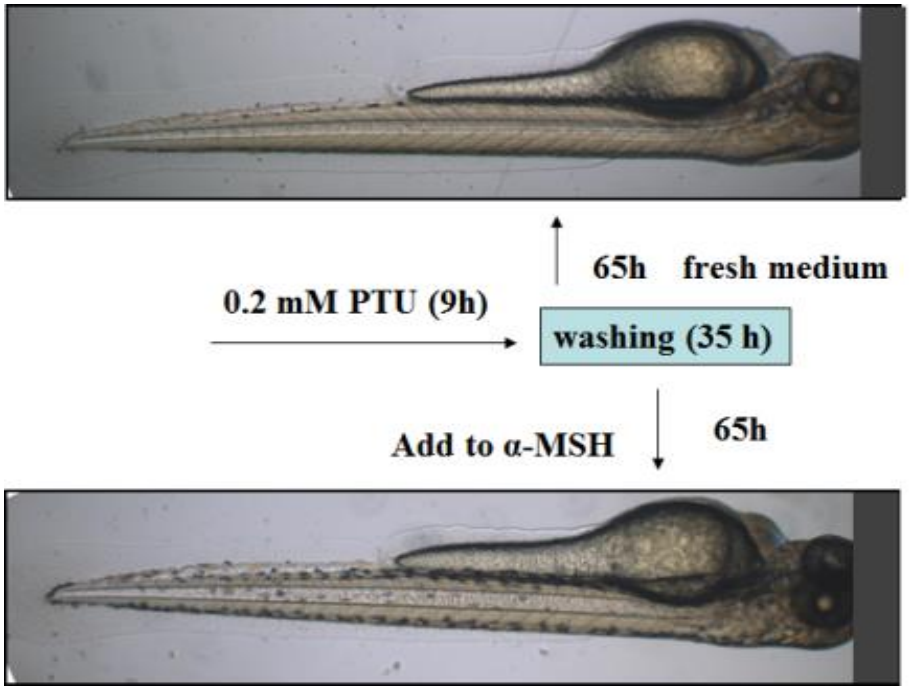


Fig. 36. Flowchart of pigment induction by alpha-MSH in zebrafish.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

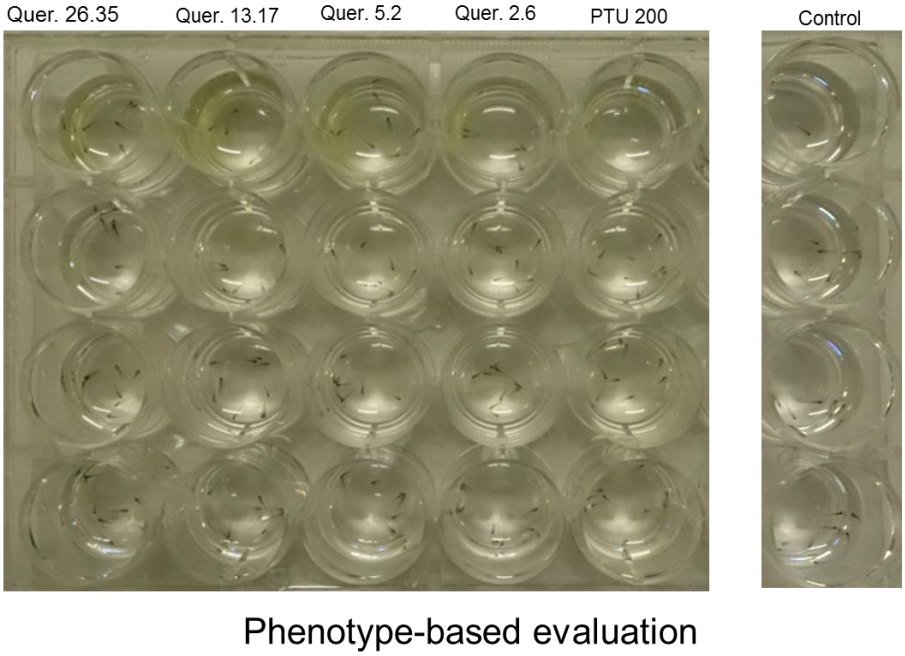


Fig. 37. Photograph of 96-well for the treatment of quercetin according to its concentration.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

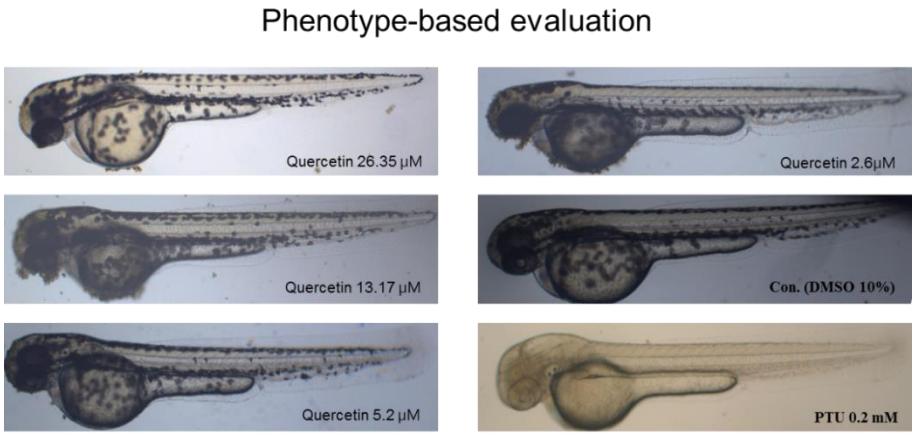


Fig. 38. Optical microscopic imagesof alpha-MSH induced zebrafish after treatment of quercetin according to its concentration.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

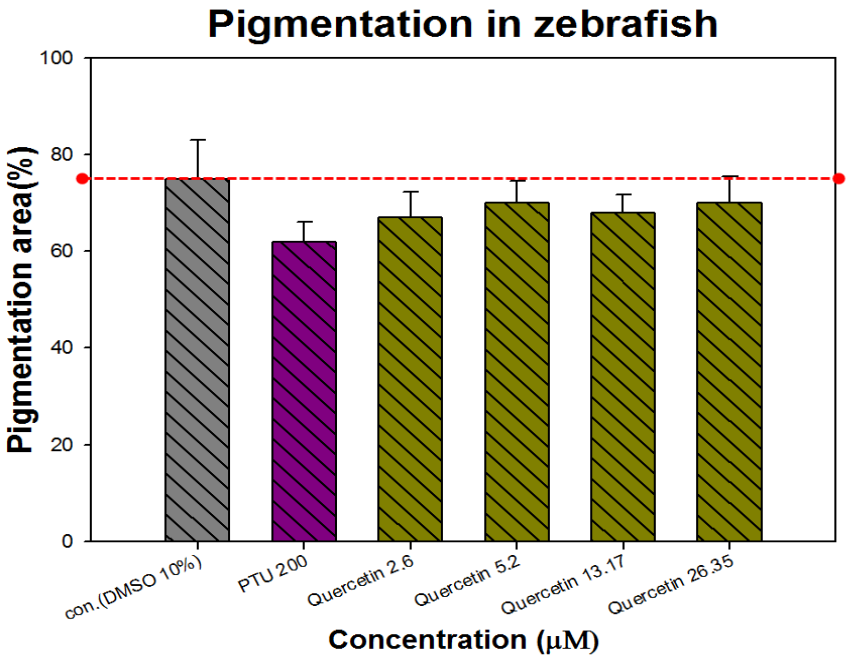


Fig. 39. Effect of quercetin in pigment area of zebrafish .

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

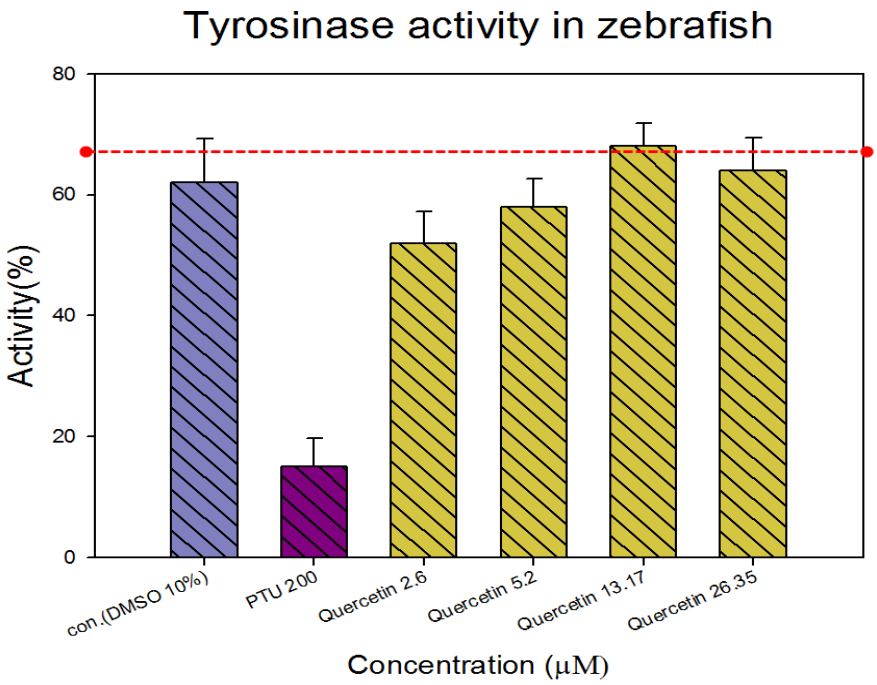


Fig. 40. Effect of quercetin in tyrosinase activity in zebrafish.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Chapter 4. Synthesis of quercetin derivatives

4.1. Introduction

과학기술의 발달에 따라 최근 미백 활성의 다양한 mechanisim 규명이 이루어 지고 있으며, 미백 기능성 소재의 경우에는 주로 tyrosinase 활성을 저해하는 성분들이 주류를 이루고 있다. 최근 들어 UV 또는 염증을 비롯한 외부 자극으로부터 melanocyte의 신호 전달을 차단하거나, tyrosinase를 합성하는 유전자의 발현을 억제하는 연구가 활발하게 진행 되고 있다. 미백에 효과가 있는 성분들은 주로 부작용을 동반하는 경우가 흔하며, 이에 따라 천연 식물에서 유용성분들을 추출하려는 연구가 일반적이다. 천연 식물의 성분이 절대적으로 안전한 것은 아니지만, 합성된 물질보다는 안전성 측면에서 비교적 문제가 될 가능성은 훨씬 적다고 할 수 있다. 그러나 비타민이나 효소 같은 물질은 미백 효과가 매우 뛰어나지만 안정성의 확보가 어려워 제품화 할 경우 여러 가지 문제가 발생한다. 따라서 인체에 적용 했을 때 세포 독성이 높지 않는 범위 내에서 미백 효과가 있는 물질의 화학적 처리를 통하여 안정과 안전성을 높일 수 있는 유도체의 개발은 매우 중요하다. 일반적으로 미백 효과를 보인다고 알려진 천연 항산화제인 polyphenols, flavonoids, flavanols, stilbens, terpenes (carotenoids 및 essential oils 포함)류는 식물 extracts과 화합물 형태로 제형을 만들면 활성과 안정성 및 시너지 효과를 가진 화장품 제품을 만들 수 있다[173]. 대표적인 사용 화장품으로 quercetin[174], kojic acid, resveratrol이 제형 성분으로 포함되어있다. Quercetin은 주요 flavonoid 화합물로 과일과 채소 등에서 높은 함량을 나타내며, vit C의 기능을 향상시키고 흡수를 높여주며 free radical의 산화로부터 보호해준다. 최근에는 quercetin을 이용하여 활발한 연구가 진행되고 있으며, 그 연구 사례를 들어보면 quercetin에 acetate, propionate, palmitate와 같은 작용기를 결합시켜 그 활성을 측정해본 결과 전구체보다 뛰어난 활성이 나타남을 확인 할 수 있는 연구결과가 보고되었다[175]. 그러나 미백 소재로 잘 알려진 quercetin에 대해 현재까지의 연구의 동향을 조사해 보면 아직도 미백 효과에 대한 이견이 많다. 기존의 연구에서 Arung [176], Kim [177], Nakashima [178]는 quercetin과 quercetin 유도체가 미백 효과가 있다고 보고를 하고 있으며, 반면에 Yamauchi는 quercetin이 melanogenesis를 자극 하는

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

물질이라는 연구 결과를 보고 하였다[179]. 최근 연구 동향을 살펴보면 quercetin에 분포하는 OH 기능기의 역할이 미백효과와 어떤 상관성이 있는지에 대한 관심이 증폭되고 있다. Quercetin은 일반적으로 R_1과 R_2 위치에 서로 다른 기능기가 있음에 따라, quercetin, rutin, quercitrin, kaempferol, isorhamnetin으로 이루어 진다[180]. Quercetin 유도체로서 각기 다른 항산화능을 가지며, 식용 메밀에 많이 함유하고 있는 루틴(rutin)의 경우, R_2 (C3) 위치에 rutinose기가 달려있는 형태이다. 본 연구에서는 OH기가 총 5개 존재하는 quercetin에 7가지의 다른 기능기를 S_N2 반응을 이용하여 치환하였다. 새로 합성된 quercetin 유도체를 B16F10 cell을 이용하여 세포독성 평가 및 미백평가를 하였으며, 이러한 기능들이 quercetin 유도체에서 어떤 기능기에 의한 미백 효과인지에 대한 기작을 예측하고자 하였다. 또한 quercetin 유도체 합성을 통해 독성을 낮추고 미백 기능을 높여 새로운 미백소재로써의 가능성에 대해 검토 하였다.

Collection @ chosun

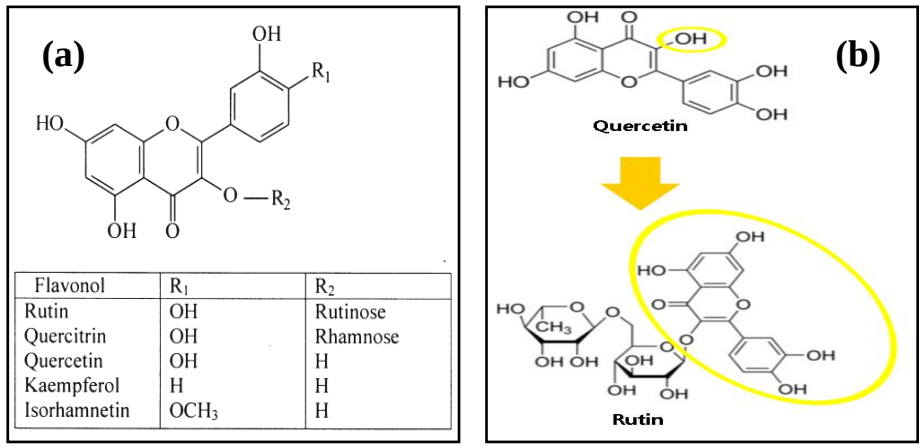
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4.2. Synthesis of quercetin

식품, 및 화장품의 원료로써, 자연에서 얻을 수 있는 천연물은 한계가 있고 자원으로써 한계가 있다. 천연물 유도체의 합성은 이러한 문제점에 대한 대안이며, 유도체의 합성을 통해 여러 가지 생리활성을 갖고 있는 천연물의 대량화와 함께 안정성을 확보할 수 있다. 현재 전 세계적으로 천연물 자원을 대상으로 하는 유도체의 신약개발이 진행되고 있으며, 다양한 분야에서 경쟁적으로 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서는 quercetin의 독성을 낮추고 미백효과를 높이기 위해 총 7가지의 친핵체(4-Nitrobenzyl bromide, Benzyl bromide,4-Bromophenethyl bromide, 4-Methylphenethyl bromide, (s)-(+)-Citronellyl bromide, 1-Bromo-2-Methylpropane, Oleyl bromide)를 사용하여 quercetin의 치환반응을 수행하였다. 대표적으로 치환이 용이한 bromide leaving기를 가진 물질로 선택하였으며, quercetin에 각각 따로 7가지 중 1가지의 친핵체 물질과 반응을 시켰다. 모든 반응에서 촉매로는 Na_2CO_3 (Sigma Aldrich, USA)를 사용하였고 용매로는 DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma Aldrich, USA)를 사용하였다. 당량비에 있어서는, quercetin에는 -OH기가 5개가 붙어있으므로 반응 할 수 있는 자리를 고려하여 quercetin 1당량당 친핵체 물질과 Na_2CO_3는 각각 1.2 당량 또는 1.5 당량 씩 넣어주었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



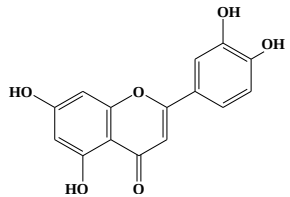
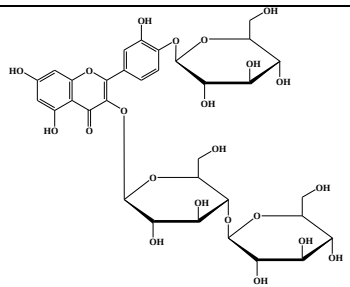
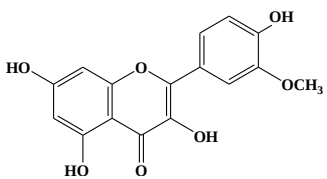
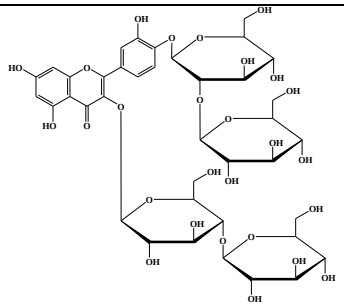
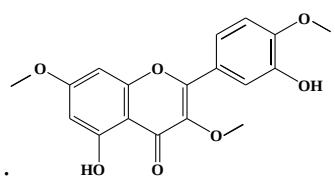
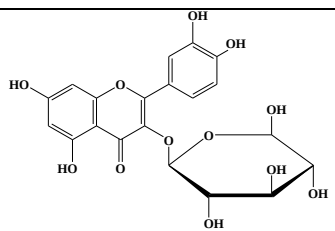
Flavonol	R_1	R_2
Rutin	OH	Rutinose
Quercitrin	OH	Rhamnose
Quercetin	OH	H
Kaempferol	H	H
Isorhamnetin	OCH_3	H

Fig. 41. R1 and R2 substituted quercetin derivatives (a) and rutin compound (b).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 7. Literature summary of increase or decrease in melanogenesis with *in vitro* assay by quercetin and its derivatives

Derivatives structure	Synthesis compounds	Derivatives structure	Synthesis compounds
	Taxifolin and Luteolin An *et. al.*, (2008)[181].		4'-*O*-*β*-D-glucopyranosyl-quercetin-3-*O*-*β*-D-glucopyranosyl-(1 → 4)- *β*-D-glucopyranoside Yamauchi *et. al.*, (2013)[183]
	3-*O*-methyl quercetin Yamauchi *et. al.*, (2014)[182]		4'-*O*-*β*-D-glucopyranosyl-(1 → 2) -*β*-D-glucopyranosyl-quercetin-3-*O*-*β*-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-*β*-D-glucopyranoside Yamauchi *et. al.*, (2013)[183]
	3',4',7-*O*-trimethyl quercetin Yamauchi *et. al.*, (2014)[182]		Quercetin glucosides Gómez-Cordovés *et. al.*,(2001)[184]

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4.3. S_N2 reaction

친핵성 치환반응(nucleophilic substitution reaction)은 유기화학반응의 핵심반응이다. Nucleophilic은 비공유 전자쌍을 가지고 있는 분자나 음이온을 말하며, 루이스 염기라고 할 수 있다[185]. H_2O 같은 중성물질도 nucleophile이 될 수 있으며, 강염기인 OH- leaving group은 치환반응에서 대체 되는 그룹으로써 떠날 때 안정적인 약염기가 되며, halogen이 가장 흔하다[186]. 친핵성 치환 반응은 반응 mechanism에 따라 S_N1과 S_N2 반응으로 나뉘며, S_N1 반응은 leaving group이 먼저 떠나서 cabocation 이 intermediate로 형성되고 그 후에 nucleophile이 intermediate를 접근해서 최종 물질이 형성된다. S_N2 반응은 유기화학에서 치환반응의 한 종류로써 이분자성 친핵성 치환반응(bimolecular nucleophilic substitution)을 말한다[187]. S_N2 반응에 영향을 줄 수 있는 변수로는 크게 4가지로써, 용매의 종류, 이탈기의 종류, 친핵체의 종류와 농도, 반응 기질의 종류와 농도가 있으며, 상황에 따라 S_N1 반응과 경쟁관계가 될 수도 있다. S_N2 반응에서의 생성물은 반응물이 카이랄한 경우 그 카이랄성이 뒤집히게 된다. 전이상태를 살펴보면 평면삼각형 구조의 양쪽에 친핵체(nucleophile)와 이탈기(leaving group)이 수직하게 붙어있는 구조인데, 친핵체와 이탈기가 중심 carbon을 두고 자리를 차지하려는 경쟁적 반응이 일어나게 된다. 따라서 S_N2반응이 일어나게 되면 R/S configuration에 변화가 생기게 된다[188]. S_N1 반응은 carbocation이 안정화 된 경우와 용매가 극성인 경우, 친핵체가 약한 경우에 잘 일어나며, S_N2 반응은 친전자성 탄소가 입체장애가 없는 경우, 친핵체가 강한 경우, 용매가 aprotic인 경우 잘 일어난다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

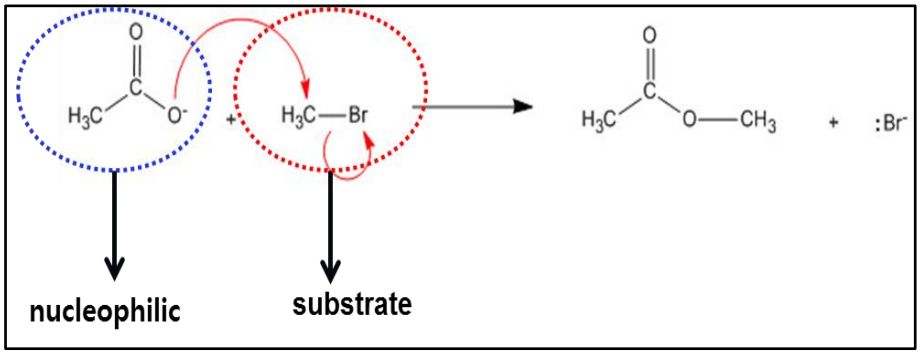


Fig. 41. Mechanism of S_N2 reaction.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Fig. 42. Photograph of S_N2 quercetin reactor.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Silica oil을 채운 bath를 hot plate위에 올려놓은 후 silica oil의 온도를 측정할 수 있도록 온도계를 설치한다. 그 다음 100 mL 용량의 two-neck round-bottom flask에 quercetin, 친핵체 물질, Na_2CO_3, DMSO 를 넣어준 후 hot plate의 RPM과 온도를 조절해 magnetic stirring 해가며 반응을 진행하였다. 반응이 진행되고 있는 도중에 한 방울 정도 샘플링하여 1.5 mL E.P. tube에 담은 후, NH_4Cl 수용액을 0.5 mL 및 ethylacetate (EtOAc) 0.5 mL를 혼합하여 상등액을 취해 thin layer chromatography (TLC)를 이용하여 분석하였다. TLC에서 대조군으로 quercetin도 함께 전개하여 생성물 유무를 확인하였고, 반응의 완결 기준을 TLC 상의 quercetin 밴드가 완전히 없어지거나 희미하게 나올 때까지로 진행하였다. TLC 용매로는 hexane:EtOAc (7:3) + formic acid (1.0%) 용매를 이용하였다. 반응이 종료되면, work up 과정을 통해 시료를 전처리 하였다. 합성이 완료된 시료를 분별깔때기에 담은 후, EtOAc 100 mL과 NH_4Cl 수용액을 40 mL을 넣어 준 후 분별깔때기 뚜껑을 덮은 후 격하게 흔들고 층이 분리되면 하등액은 버렸다. 남은 상등액에 NH_4Cl 수용액을 40 mL을 넣어 격하게 흔든 후 하등액은 버림으로써 반응에 사용된 Na_2CO_3를 제거하였다. NaCl 수용액 40 mL도 위와 같은 방법으로 2번 반복한 후 마지막으로 남은 용액을 받아서 anhydrous $MgSO_4$를 넣어 물기를 제거하였다. 유리필터를 이용해 필터 한 후, 농축하여 시료 전처리를 완료하였다. 전처리가 완료된 시료의 양 중에서 반 정도를 open column을 사용하여 분리하였다. Column 전개용매는 TLC 찍었을 때 가장 높은 밴드가 TLC판의 70% 정도로 위치할 때의 용매로 선택하였다. Column을 내리기 전 silica에 전개용매를 부어 잘 저어준 후 2시간 정도 후부터 column 분리를 시작하였고, 이때 전개용매는 비극성부터 극성 순서대로 진행하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Fig. 43. Fractionations of pre-treated open column.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4.4. Synthesis of quercetin derivatives results

Column을 내려서 분획 별로 유리관에 받은 후, TLC를 진행하여 물질을 동정한 후, 같은 물질끼리 합하여 농축시켰다. 농축 후 Speed vac (MaxiVac, Neutec, USA)을 이용해 최종적으로 농축하였다. Silica oil의 온도는 42℃를 유지시키면서 2시간 정도 진행하다가 200℃에 도달하면 반응을 멈추었다 (Fig. 44). 유리관 1, 2, 15~23번은 TLC 상에서 band가 관찰되지 않아 추가로 농축을 진행하지 않았다.

Quercetin syn EXP ①: Quercetin syn EXP ①-4은 quercetin으로 추정 되었으며, quercetin synthesis EXP ①-2에서 뚜렷한 밴드의 이동이 관찰되었다.

Quercetin syn EXP ②: 느린 반응을 보여 5시간 30분 째에 benzyl bromide와 Na_2CO_3를 1.2 당량 씩 더 넣어주었으며, quercetin syn EXP ②-1과 ②-2에서 뚜렷한 밴드의 이동이 관찰되었다.

Quercetin syn EXP ③: 마찬가지로 느린 반응을 보여 4시간 째에 4-bromophenethyl bromide와 Na_2CO_3를 1당량씩 더 넣어주었으며, 6시간 째에 4-bromophenethyl bromide와 Na_2CO_3를 1당량씩 더 넣어주었다. Quercetin syn EXP ③-1에서 뚜렷한 밴드의 이동이 관찰되었다.

Quercetin syn EXP ④: Quercetin syn EXP ④-7는 quercetin으로 추정되며, quercetin syn EXP ④-1과 ④-3에서 뚜렷한 밴드의 이동이 관찰되었다.

Quercetin syn EXP ⑤: 역시 반응이 느려 8시간 째에 1-Bromo-2-methylpropane와 Na_2CO_3를 1.5 당량 씩 더 넣어주었다. EXP ⑤-1과 ⑤-5에서 뚜렷한 밴드의 이동이 관찰되었다.

Quercetin syn EXP ⑥: Quercetin syn EXP ⑥-6은 quercetin으로 추정되며 quercetin syn EXP ⑥-2에서 뚜렷한 밴드의 이동이 관찰되었다.

Quercetin syn EXP ⑦: Quercetin syn EXP ⑦-1과 ⑦-5에서 뚜렷한 밴드의 이동이 관찰되었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4.5. Statistical analysis

실험 결과는 3번 반복실험 후 (SPSS version 22)를 이용하여 통계처리 하였으며, 실험에 의해 얻어진 값들의 평균을±표준편차로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검증은 t-Test 사용하였으며, $p<0.05$ 수준에서 검정하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 8. Information of reactants (quercetin, 4-Nitrobenzyl bromide, Na_2CO_3, and DMSO)

Quercetin syn EXP ①	Molecular Weight (g/mol)	Equivalent (eq)	Using weight
Quercetin	302.24	1	0.5 g
4-Nitrobenzyl bromide	216.03	1.2	0.42885 g
Na_2CO_3	105.99	1.2	0.2104 g
DMSO			15 ml

Table 9. Information of loading solvents and test tube numbers

Loading solvent	Test tube no.
Hexane:EtOAc (7:3)	1~13
Hexane:EtOAc (5:5)	14~23

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

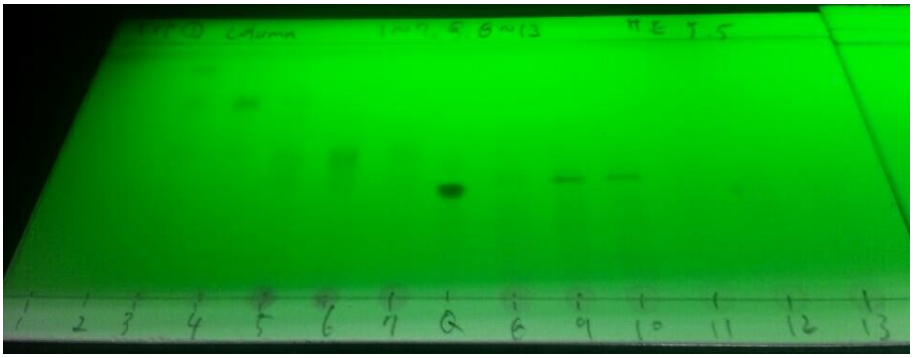


Fig. 44. TLC bands of open column fractionations of nucleophile 4-Nitrobenzyl bromide reacted with quercetin. Note that 'Q' is marked quercetin.

Table 10. Information of loading solvents and test tube numbers

Label	Test tube no.
Quercetin syn EXP ①-1	3
Quercetin syn EXP ①-2	4
Quercetin syn EXP ①-3	5~7
Quercetin syn EXP ①-4	8~10
Quercetin syn EXP ①-5	11~14

Collection @ chosun

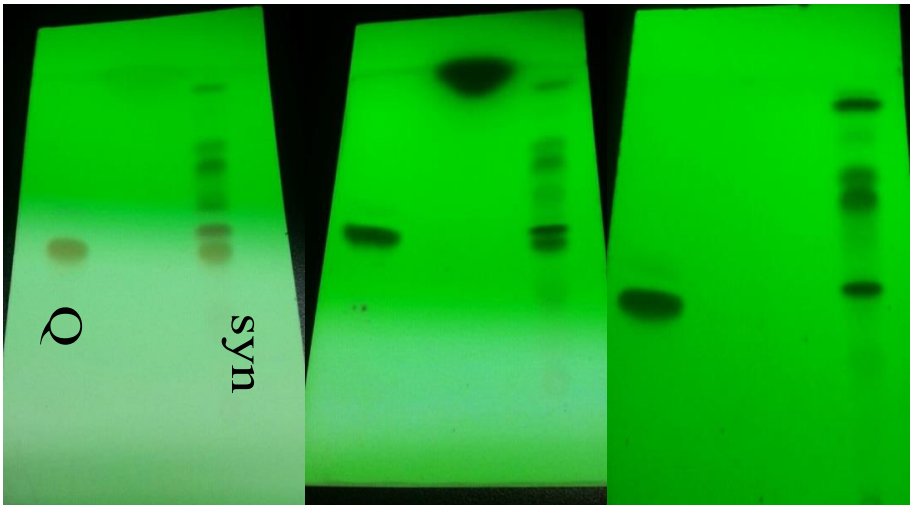
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 11. Information of reactants (quercetin, Benzyl bromide, Na2CO3, and DMSO)

Quercetin syn EXP ②	Molecular Weight (g/mol)	Equivalent (eq)	Using weight
Quercetin	302.24	1	0.5 g
Benzyl bromide	171.03	1.2	236 μl
Na_2CO_3	105.99	1.2	0.2104 g
DMSO			15 ml

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



After 4.5 hr After 5.5 hr After 6.6 hr

Fig. 45. TLC bands of synthesized quercetin derivatives after reaction for 4.5, 5.5, 11, and 6.6 hr.

Table 12. Information of loading solvents and test tube numbers

Loading solvent	Test tube no.
Hexane:EtOAc (8:2)	1~9
Hexane:EtOAc (7:3)	10~13
Hexane:EtOAc (5:5)	14~15
Hexane:EtOAc (3:7)	16~17
Hexane:EtOAc (0:10)	18~21

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

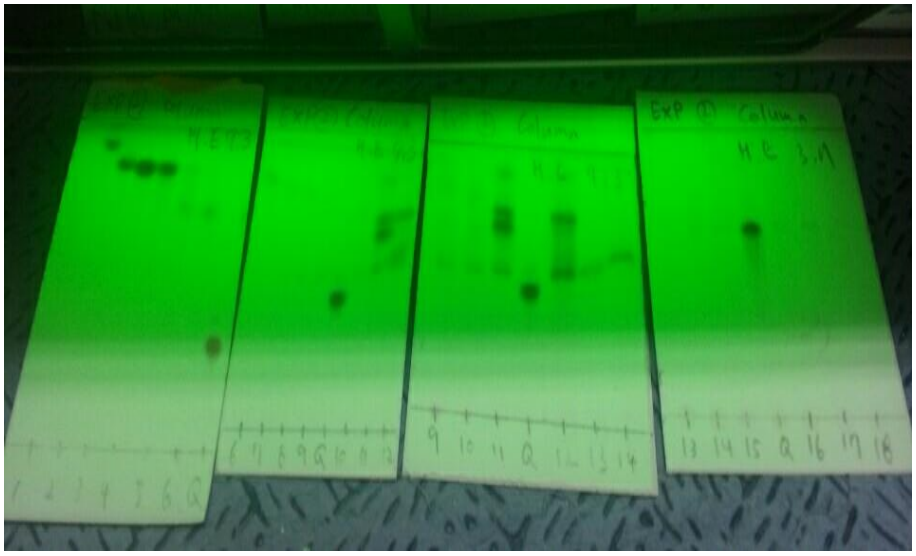


Fig. 46. TLC bands of open column fractionations of nucleophile benzyl bromide reacted with quercetin. Note that 'Q' is marked quercetin.

Table 13. Information of samples and test tube numbers

Label	Test tube no.
Quercetin syn EXP ②-1	1
Quercetin syn EXP ②-2	2~4
Quercetin syn EXP ②-3	5~10
Quercetin syn EXP ②-4	11
Quercetin syn EXP ②-5	12
Quercetin syn EXP ②-6	13~21

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

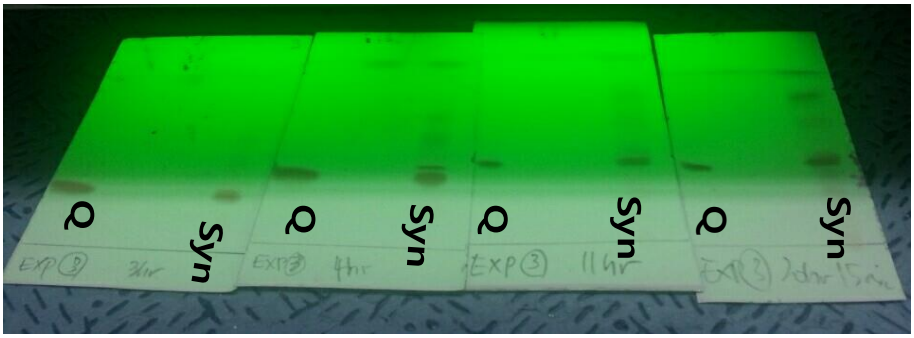
Table 14. Information of reactants (quercetin, 4-Bromophenethyl bromide, Na_2CO_3, and DMSO)

Quercetin syn EXP ③	Molecular Weight (g/mol)	Equivalent (eq)	Using weight
Quercetin	302.24	1	0.5 g
4-Bromophenethyl bromide	263.96	1.2	303 μl
Na_2CO_3	105.99	1.2	0.2104 g
DMSO			15 ml

.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



After 3 hr 30 min | After 4 hr 30 min | After 11 hr | After 20 hr 30 min

Fig. 47. TLC bands of synthesized quercetin derivatives after reaction for 3.5, 4.5, 11, and 20.5 hr.

Table 15. Information of loading solvents and test tube numbers

Loading solvent	Test tube no.
Hexane:EtOAc (7:3)	1~2
Hexane:EtOAc (5:5)	3~7
Hexane:EtOAc (3:7)	8~9
Hexane:EtOAc (0:10)	10~15

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

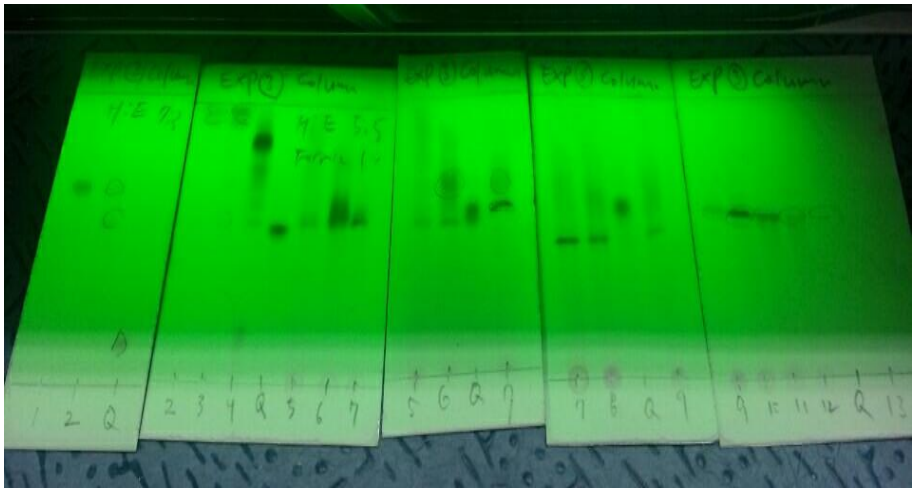


Fig. 48. TLC bands of open column fractionations of nucleophile 4-Bromophenethyl bromide reacted with quercetin. Note that 'Q' is marked quercetin.

Table 16. Information of samples and test tube numbers

Labeling	Test tube no.
Quercetin syn EXP ③-1	1
Quercetin syn EXP ③-2	2,3
Quercetin syn EXP③-3	4,5
Quercetin syn EXP ③-4	6,7
Quercetin syn EXP ③-5	8~12

Collection @ chosun

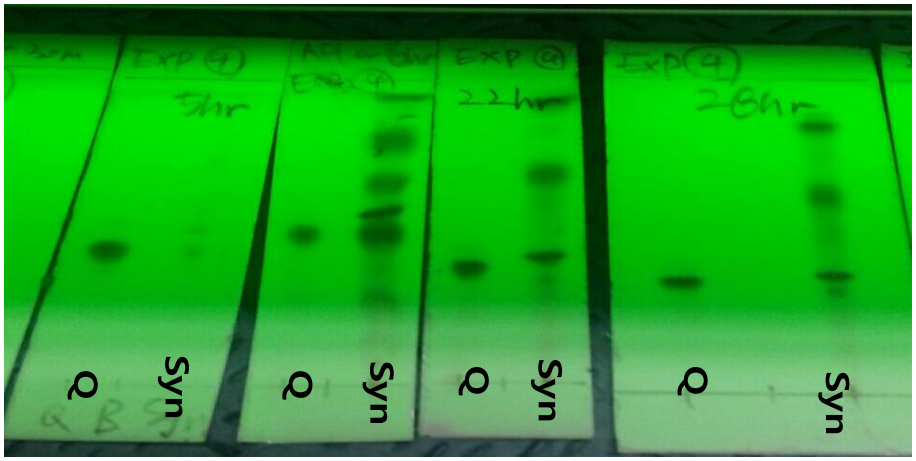
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 17. Information of reactants (quercetin, 4-Methylphenethyl bromide, Na_2CO_3, and DMSO)

Quercetin syn EXP ④	Molecular Weight (g/mol)	Equivalent (eq)	Using weight
Quercetin	302.24	1	0.5 g
4-Methylphenethyl bromide	199.09	1.5	3,783 μl
Na_2CO_3	105.99	1.5	0.2630 g
DMSO			11 ml

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



After 5 hr | After 6 hr | After 22 hr | After 28 hr

Fig. 49. TLC bands of synthesized quercetin derivatives after reaction for 5, 6, 22, and 28 hr.

Table 18. Information of loading solvents and test tube numbers

Loading solvent	Test tube no.
Hexane:EtOAc 8:2	1
Hexane:EtOAc 7:3	2~7
Hexane:EtOAc 5:5	8,9
Hexane:EtOAc 3:7	10,11
EtOAc 10	12~15

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

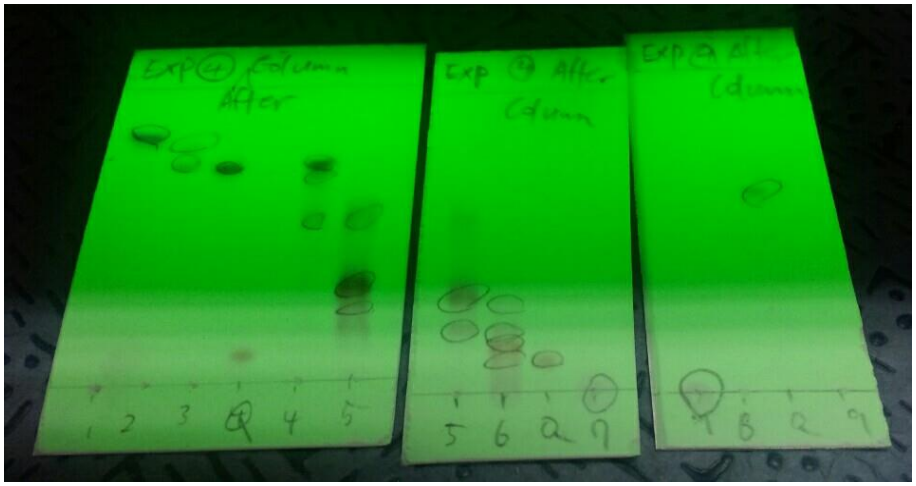


Fig. 50. TLC bands of open column fractionations of nucleophile 4-Methylphenethyl bromide reacted with quercetin. Note that 'Q' is marked quercetin.

Table 19. Information of samples and test tube numbers

Label	Test tube no.
Quercetin syn EXP ④-1	1
Quercetin syn EXP ④-2	2
Quercetin syn EXP ④-3	3
Quercetin syn EXP ④-4	4
Quercetin syn EXP ④-5	5~6
Quercetin syn EXP ④-6	7

Collection @ chosun

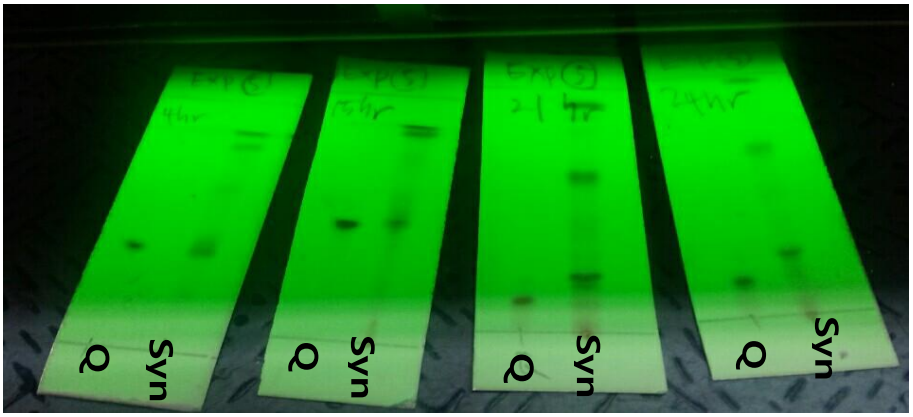
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 20. Information of reactants (quercetin, (s)-(+)-Citronellyl bromide, Na_2CO_3, and DMSO)

Quercetin syn EXP ⑤	Molecular Weight (g/mol)	Equivalent (eq)	Using weight
Quercetin	302.24	1	0.5 g
(s)-(+)-Citronellyl bromide	219.16	1.5	4,899 µl
Na_2CO_3	105.99	1.5	0.2630 g
DMSO			11 ml

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



After 4 hr | After 15 hr | After 21 hr | After 24 hr

Fig. 51. TLC bands of synthesized quercetin derivatives after reaction for 4, 15, 21, and 24 hr.

Table 21. Information of loading solvents and test tube numbers

Loading solvent	Test tube no.
Hexane:EtOAc 8:2	1~4
Hexane:EtOAc 7:3	5~6
Hexane:EtOAc 5:5	7
Hexane:EtOAc 3:7	8~10
EtOAc 10	11~12

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

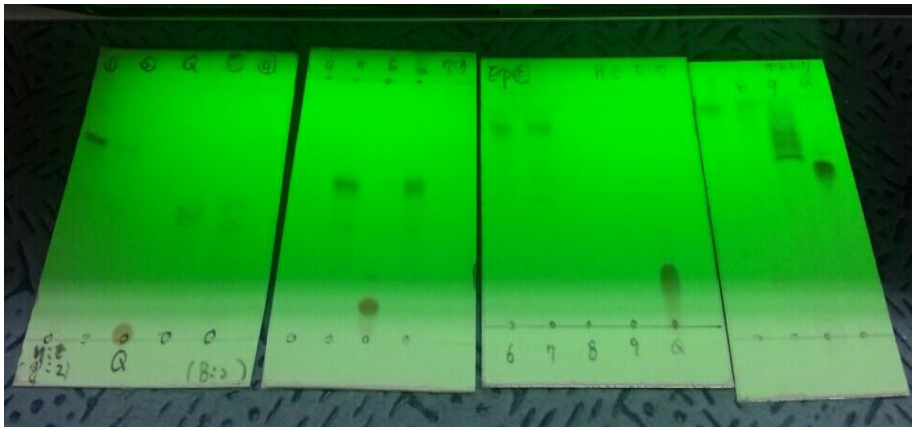


Fig. 52. TLC bands of open column fractionations of nucleophile (s)-(+)-Citronellyl bromide reacted with quercetin. Note that 'Q' is marked quercetin.

Table 22. Information of samples and test tube numbers

Label	Test tube no.
Quercetin syn EXP ⑤-1	1,2
Quercetin syn EXP ⑤-2	4
Quercetin syn EXP ⑤-3	4
Quercetin syn EXP ⑤-4	5~7
Quercetin syn EXP ⑤-5	8
Quercetin syn EXP ⑤-6	9

Collection @ chosun

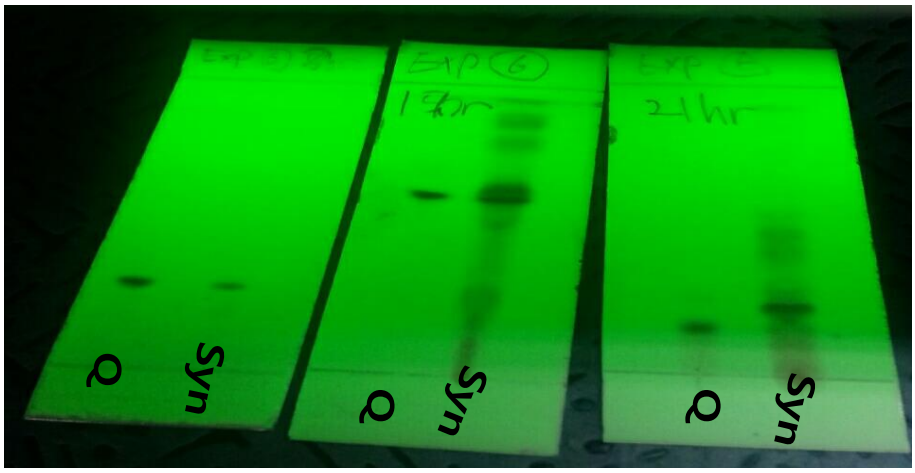
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 23. Information of reactants (quercetin, 1-Bromo-2-methylpropane, Na2CO3, and DMSO)

Quercetin syn EXP ⑥	Molecular Weight (g/mol)	Equivalent (eq)	Using weight
Quercetin	302.24	1	0.5 g
1-Bromo-2-methylpropane	137.02	1.5	2,699 μl
Na_2CO_3	105.99	1.5	0.2630 g
DMSO			12 ml

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



After 4 hr | After 15 hr | After 21 hr

Fig. 53. TLC bands of synthesized quercetin derivatives after reaction for 4, 15, and 21 hr.

Table 24. Information of loading solvents and test tube numbers

Loading solvent	Test tube no.
Hexane:EtOAc (7:3)	1~2
Hexane:EtOAc (5:5)	3~6
Hexane:EtOAc (3:7)	7~8
EtOAc (0:10)	9~10

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

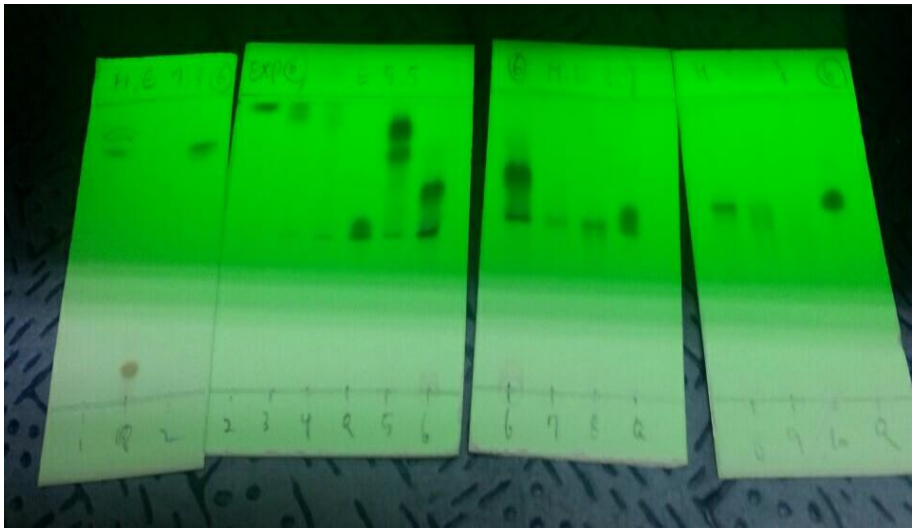


Fig. 54. TLC bands of open column fractionations of nucleophile 1-Bromo-2-methylpropane reacted with quercetin. Note that 'Q' is marked quercetin.

Table 25. Information of samples and test tube numbers

Label	Test tube no.
Quercetin syn EXP ⑥-1	1
Quercetin syn EXP ⑥-2	2
Quercetin syn EXP ⑥-3	3,4
Quercetin syn EXP ⑥-4	5
Quercetin syn EXP ⑥-5	6
Quercetin syn EXP ⑥-6	7,8,9

Collection @ chosun

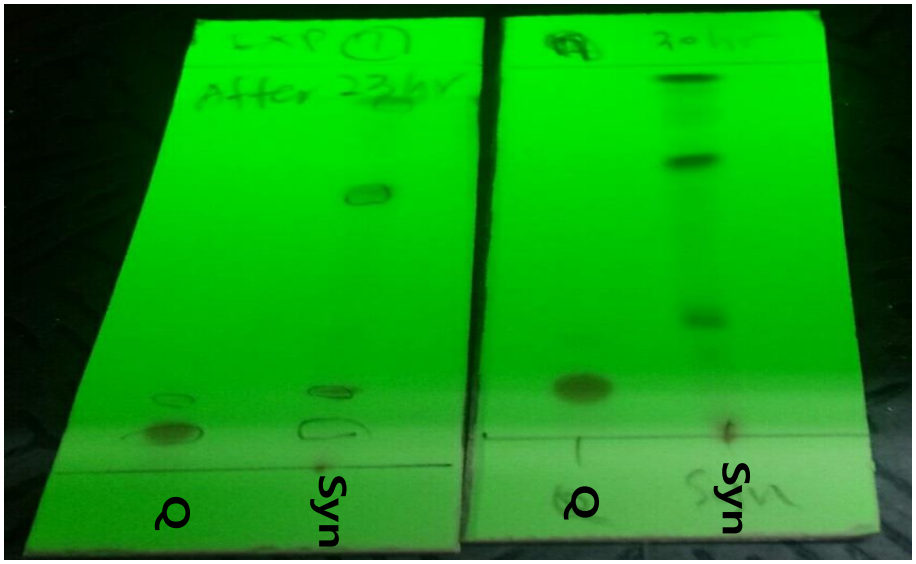
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 26. Information of reactants (quercetin, oleyl bromide, Na2CO3, and DMSO)

Quercetin syn EXP ⑦	Molecular Weight (g/mol)	Equivalent (eq)	Using weight
Quercetin	302.24	1	0.5 g
Oleyl bromide	331.37	1.5	8,256 µl
Na_2CO_3	105.99	1.5	0.2630 g
DMSO			12 ml

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



After 23 hr | After 30 hr

Fig. 55. TLC bands of synthesized quercetin derivatives after reaction for 23 and 30 hr.

Table 27. Information of loading solvents and test tube numbers

Loading solvent	Test tube no.
Hexane:EtOAc (8:2)	1~5
Hexane:EtOAc (7:3)	6~9
Hexane:EtOAc (5:5)	10~11
Hexane:EtOAc (3:7)	12~15

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

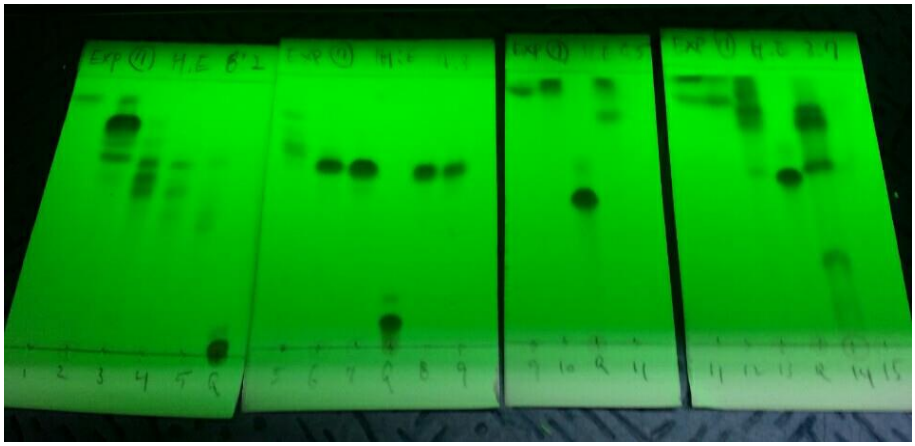


Fig. 56. TLC bands of open column fractionations of nucleophile oleyl bromide reacted with quercetin. Note that 'Q' is marked quercetin.

Table 28. Information of samples and test tube numbers

Label	Test tube no.
Quercetin syn EXP ⑦-1	1
Quercetin syn EXP ⑦-2	2
Quercetin syn EXP ⑦-3	3
Quercetin syn EXP ⑦-4	4,5
Quercetin syn EXP ⑦-5	6~10
Quercetin syn EXP ⑦-6	11,12
Quercetin syn EXP ⑦-7	13,14

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4.6. Synthesis of quercetin derivatives anti-melanogenesis acitivy

총 7가지 물질(EXP ① 4-Nitrobenzyl bromide, EXP ② Benzyl bromide, EXP ③ 4-Bromophenethyl bromide, EXP ④ 4-Methylphenethyl bromide, EXP ⑤ (s)-(+)-Citronellyl bromide, EXP ⑥ 1-Bromo-2-methylpropane, EXP ⑦ Oleyl bromide)로 합성한 뒤 1차로 open column으로 물질을 38 가지 fraction으로 분리하고 DPPH assay를 통해 항산화 활성이 있는 물질을 1차 선택하였다. 실험결과 EXP ②에서는 3,4,5번의 항산화 활성이 확인 되었고, EXP ③에서는 2,3,4,5번이 확인되었다. EXP ③, EXP ④에서는 4,5,6번 fraction의 항산화 활성이 확인되었으며, EXP ⑥에서는 3,4,5번의 항산화 활성이, EXP ⑦에서는 3,4,5,6,7의 항산화 활성을 확인하였다. 합성된 quercetin derivatives의 미백 활성을 확인하기 위해 1차적으로 cell free system tyrosinase 저해활성을 평가하였는데 EXP ④-4와, EXP ⑥-3, EXP ⑦-3의 저해 활성이 높은 것으로 확인되어 B16F10 cell의 세포독성과 미백활성을 평가하였다. 준비한 시료를 농도별로 처리하고 24시간 후 측정을 하였으며, 실험결과 cell toxicity의 안전한 농도범위는 10~50 μg/mL로 확인되었다. ③-2번과 ⑦-4번에서 생존률이 유지되기는 하지만 morphology 변화가 관찰되어 ③-2번과 ⑦-4번 분획샘플은 배제하였다. Cell 실험결과 α-MSH의 ④-4번을 10 μg/mL와 50 μg/mL의 2가지로 농도로 처리하였을 때, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 밴드가 강도가 control에 비해 상대적으로 약해졌음을 확인할 수 있었다. α-MSH의 ⑥-3번의 10 μg/mL을 처리한 샘플에서는 melanin 형성 단백질 밴드의 변화는 나타나지 않았으며, 50 μg/mL 처리한 군에서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 밴드가 확실하게 감소 하였다. 또한 현미경으로 morphology를 관찰하였을때 ⑥-3번의 50 μg/mL을 처리한 샘플에서는 cell density가 조금 줄어들었음을 확인할 수 있었다. α-MSH 40 hrs 의 50 μg/mL의 ⑦-3번 샘플에서는 10μg/mL과 50 μg/mL 농도 모두에서 melanin 형성 단백질 밴드가 가장 확실하게 감소 하였으며, morphology의 변화도 관찰되지 않았다. 따라서 3가지 실험군(EXP ④-4, ⑥-3, ⑦-3) 중에서 저농도(10 μg/mL)와 고농도(50 μg/mL) 모두에서 미백효과가 뛰어나고 morphology의 변화가 없어 비교적 안전한 물질인 EXP ⑦-3이 미백 성분으로써 가능성이 있다고 판단된다. Quercetin의 미백활성을 높이기 위한 기존의 논문에서 Yamauchi는 quercetin에 3-*o*-methyl을 치환시켜 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, P38 MAPK의 단백질 발현이 감소

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

함을 보고 하였으며, 다른 연구에서는 3', 4', 7-*O*-trimethyl 을 치환시켜 MITF, p-p38 MAPK의 발현을 감소되는 것을 확인하였다[182]. 본 실험에서는 methylphenethyl bromide, 1-bromo-2-methylpropane, oleyl bromide을 사용하여 치환반응을 시켰을 때 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현이 감소하는 것을 확인 하였다. 다른 논문에서는 4'-O-β-D-glucopyranosyl-quercetin-3-O-β-D-16glucopyranosyl-(1 → 4)-β-D-glucopyranoside와 같은 glucose를 치환시켜 cell toxicity를 낮추었으나, 미백활성은 나타나지 않았음을 보고 하였고[183] Gómez(2001)는 glucosides를 치환하여 Tyrosinase의 발현이 감소함을 보고하였다[184]. 이와 같이 quercetin은 치환반응을 통해 신규 derivatives를 만들면 toxicity level을 낮추거나 미백 활성을 높일 수 있다. 본 실험에서 미백활성이 있음이 밝혀진 3가지 합성물질은 추후 HPLC를 통해 단일 물질로 분리하고 NMR을 이용한 구조분석을 통해 신규 물질에 대한 검증이 필요할 것으로 생각된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

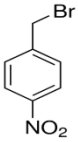
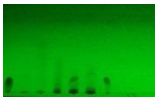
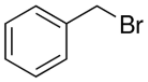
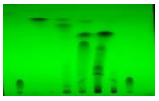
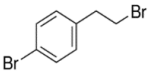
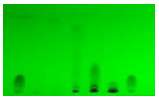
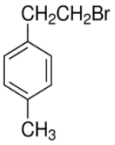
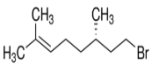
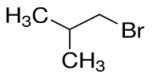
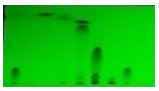
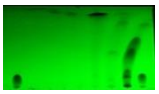
4.7. Statistical analysis

실험 결과는 3번 반복실험 후 (SPSS version 22)를 이용하여 통계처리 하였으며, 실험에 의해 얻어진 값들의 평균을±표준편차로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검증은 t-Test 사용하였으며, $p<0.05$ 수준에서 검정하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 29. Information of synthesized substrate, its chemical structure, open column numbering, TLC bands, and DPPH of EXP 1-7

Sample	Synthesis Subtrate	Structure	Open column	TLC	DPPH
EXP ①	4-Nitrobenzyl bromide				-
EXP ②	Benzyl bromide				3,4,5
EXP ③	4-Bromophenethyl bromide				2,3,4,5
EXP ④	4-Methylphenethyl bromide				4,5,6
EXP ⑤	(s)-(+)-Citronellyl bromide				4,5,6
EXP ⑥	1-Bromo-2-methylpropane				3,4,5
EXP ⑦	Oleyl bromide				3,4,5,6,7

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

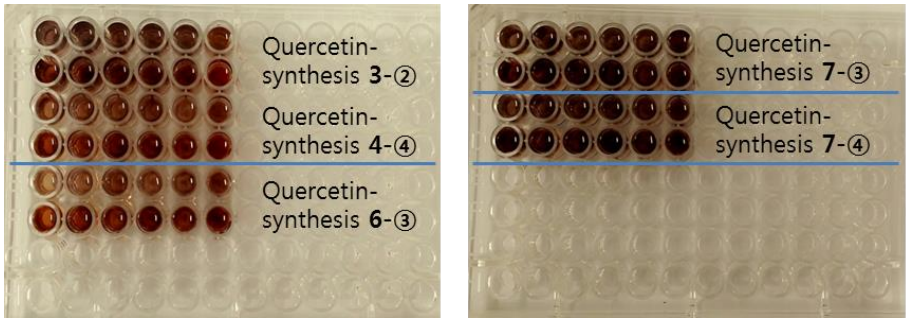
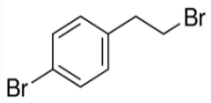
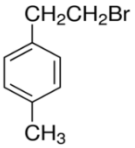
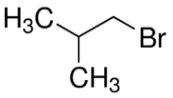
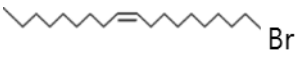
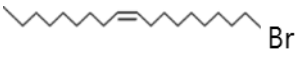


Fig. 57. Tyrosinase inhibition results of quercetin derivatives.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 30. Cell viability in B16F10 after samples (10 μg/mL and 50 μg/mL) treatment by MTT assay for 24 hrs

Sample	substrate	structure	IC_{50} (μg/ml)
3-①	4-Bromophenethyl bromide		748
4-④	4-Methylphenethyl bromide		625
6-③	1-Bromo-2-methylpropane		245
7-③	Oleyl bromide		485
7-④	Oleyl bromide		840

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

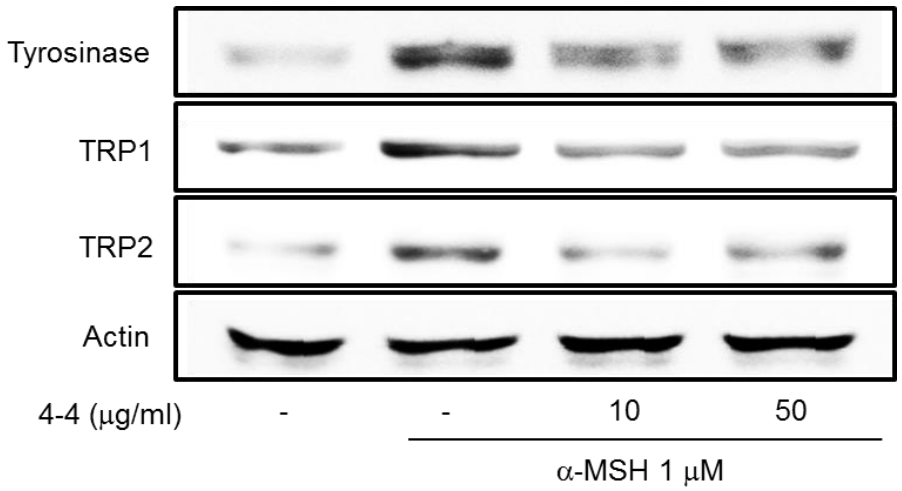


Fig. 58. Western blot bands of 1 μM α-MSH induction after 4-4 sample treatment.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

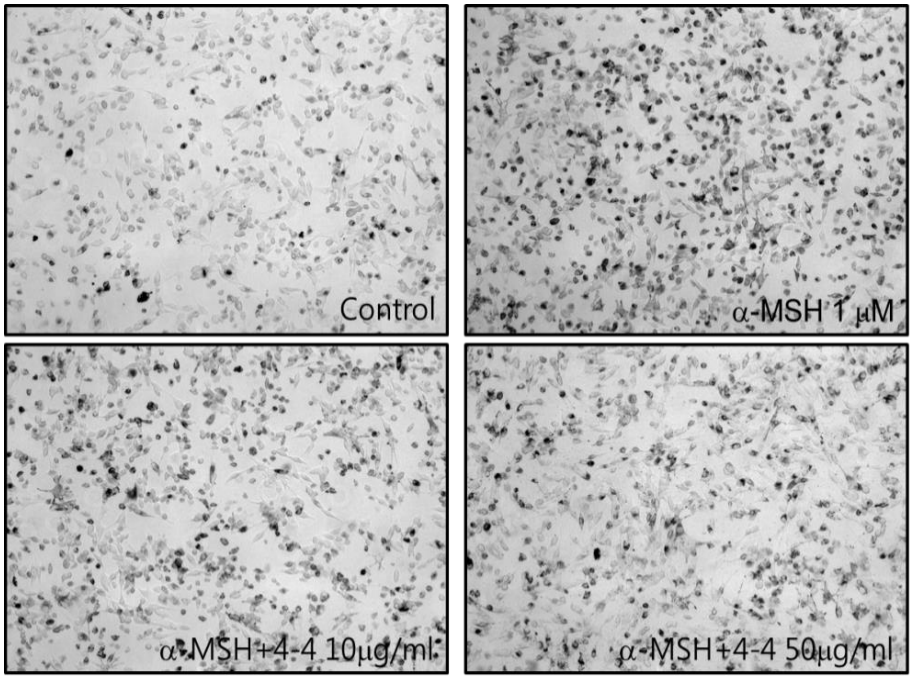
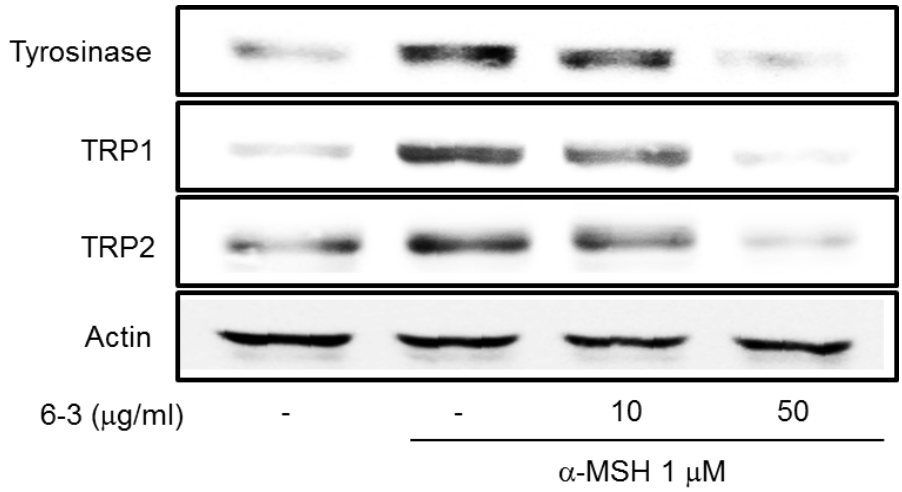


Fig. 59. Optical microscopic images of treatment of 4-4 sample (a), after 1 μM α-MSH induction for 40 hrs (b), 10 μg/L (c) and 50 μg/mL (d) of 4-4 sample treatment.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



.

Fig. 60. Western blot bands of 1 μM α-MSH induction after 6-3 sample treatment.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

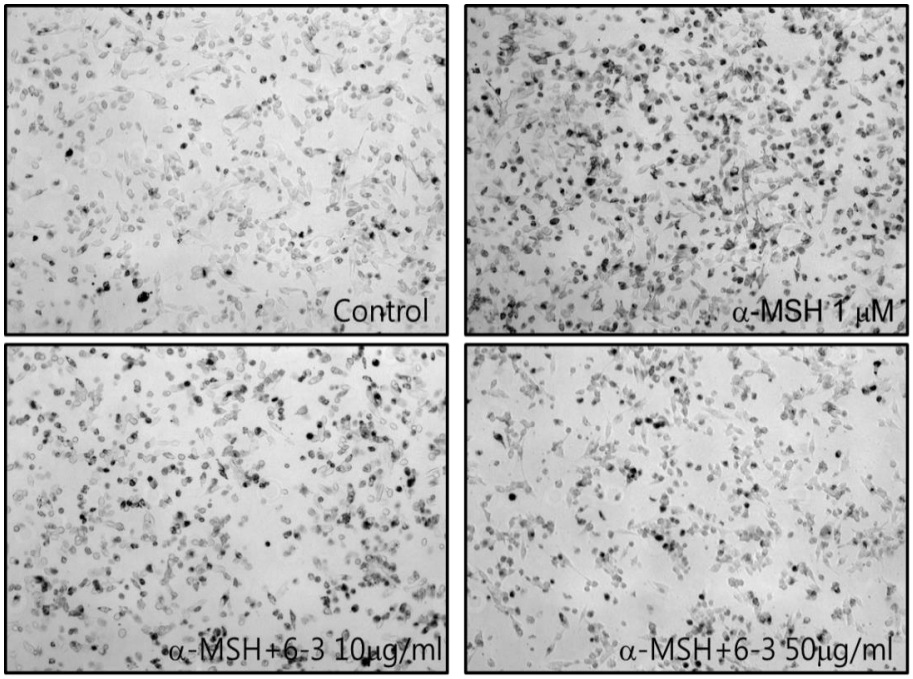


Fig. 61. Optical microscopic images of treatment of 6-3 sample (a), after 1 μM α-MSH induction for 40 hrs (b), 10 μg/L (c) and 50 μg/mL (d) of 6-3 sample treatment.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

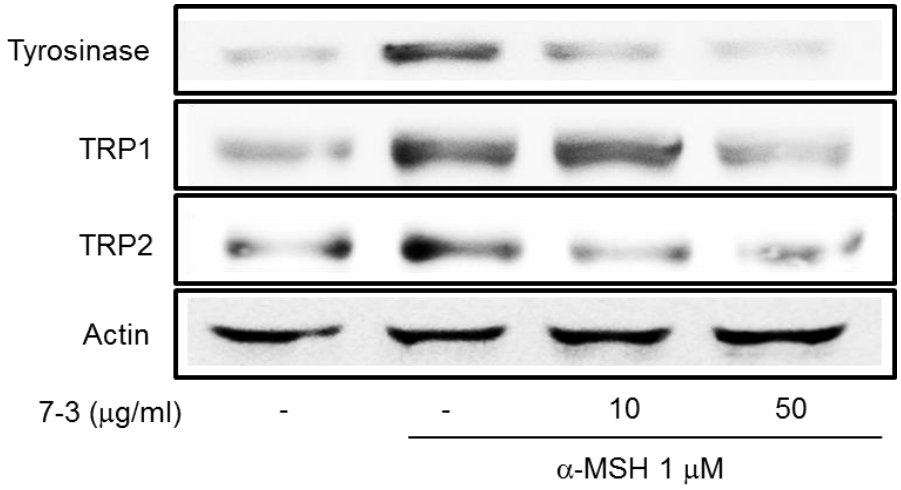


Fig. 62. Western blot bands of 1 μM α-MSH induction after 7-3 sample treatment.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

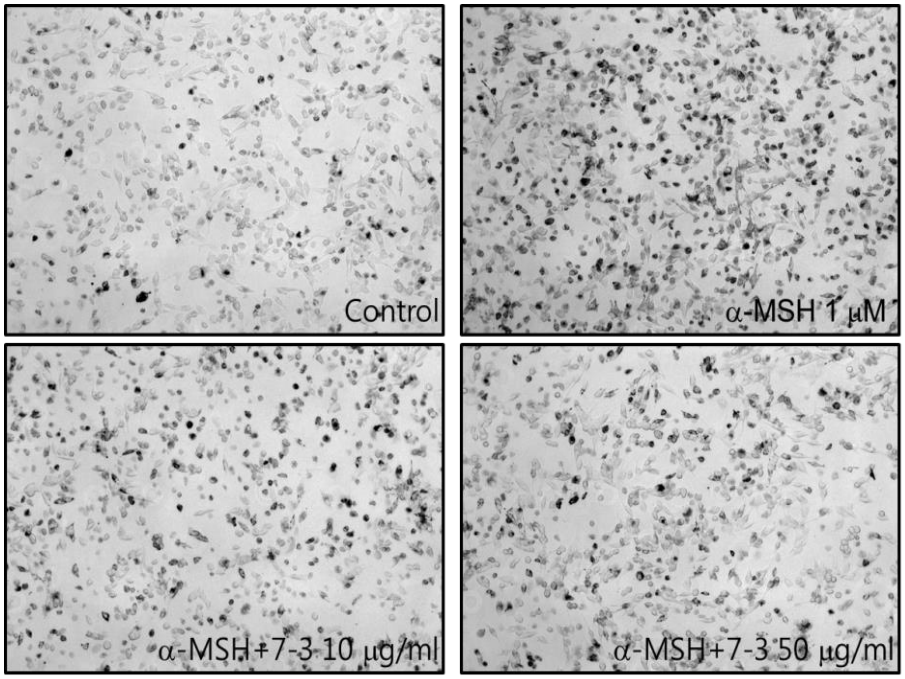


Fig. 63. Optical microscopic images of treatment of 7-3 sample (a), after 1 μM α-MSH induction for 40 hrs (b), 10 μg/L (c) and 50 μg/mL (d) of 7-3 sample treatment.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Overall conclusions and Future Aspects

화장품의 사용 목적은 단순히 아름다움을 추구하는 것에 국한되지 않고 피부에 효능을 부여하는 기능성 제품들에 초점이 맞추어져 있으며, 이에 따라 인체에 부작용이 없는 안전한 천연 소재를 이용한 기능성 화장품의 연구 개발이 절실히 요구되고 있다. Polyphenol 화합물은 천연 항산화제로 널리 알려져 기능성 화장품 소재로서의 가능성에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. Polyphenol 화합물 중 quercetin은 강력한 항산화 활성과 함께 일부 연구에서 미백효과가 있음이 보고 되었으나 매우 toxic하여 화장품 소재로써 의문이 제기되며, 몇몇 연구자들은 오히려 melanin 형성을 증가시킨다고 보고 하였다. 본 연구에서는 논란의 중심에 있는 quercetin의 toxicity revel을 조사하고 zebrafish를 이용한 *in vivo* 실험을 통해 미백효과를 검증하고자 하였다. 또한 quercetin의 toxicity level을 낮추고 미백효과를 높일 수 있는 물질을 개발하고자 quercetin을 여러 가지 기질로 합성하고, 새로 합성된 신규 물질의 독성평가와 미백효과를 평가하였다. 또한 polyphenol 화합물 중에서 새로운 미백소재를 개발하고자 강력한 항산화 활성으로 super food라고 불리는 aronia를 선택하여 미백소재로서의 가능성에 대해 검토하였으며, aronia의 성분 중에서 가장 높은 함량을 가지고 있는 C3G의 천연 미백 소재로서의 가능성에 대해 조사하였다. quercetin, quercetin derivatives, aronia extracts, C3G의 독성과 미백평가를 하기 위해 B16F10 melanoma cell에 MTT assay를 실시하였고 α-MSH 처리하여 melanin 생성을 유도하여 미백효과를 평가하였다.

1. Quercetin의 toxicity level은 >10 μM, quercetin derivatives은 >50 μg/mL, aronia extracts 는 >50 μg/mL , C3G는 >50 μM 이었다.
2. Quercetin은 *in vitro* cell free system mushroom tyrosinase 저해 실험에서는 미백효과가 있었으나, B16F10 melanoma cell을 이용한 *in vitro* 실험에서는 미백효과가 나타나지 않았다.
3. Zebrafish를 이용한 *in vivo* 실험에서 quercetin의 mortality rate는 >200 μM로 확인 되었으며, zebrafish 안의 tyrosinase 활성이 증가하고 실험한 전체 농도

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(10~200 μM)에서 melanin 형성이 모두 증가되는 경향을 보였다. 따라서 quercetin은 미백 소재로서 적절하지 않는 것으로 판단 되어 다른 물질과의 합성을 통해 미백소재로서의 가능성을 검토하였다.

4. 합성을 시도한 7가지 quercetin derivatives 중에서 oleyl bromide를 기질로 사용한 물질은 ≥50 μM으로 quercetin 보다 약 5배 정도 낮은 독성을 나타냈으며, B16F10 melanoma cell 을 이용한 *in vitro* 실험에서 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2 의 발현량을 모두 억제하여 미백 소재로서의 가능성을 확인하였다.

5. Aronia extracts (F)의 total polyphenol contents는 표준물질 gallic acid를 기준으로 115.23 mg/g으로 확인되었으며, total anthocyanin contents는 C3G 기준으로 4.19 mg/g이었다. DPPH radical scavenging IC_{50}는 69. 63 μg/mL, ABTS radical scavenging IC_{50}는 42. 20 μg/mL으로 조사되었다.

6. SOD activity IC_{50}는 28. 25 μg/mL, catalase activity의 25.52 μg/mL로 조사되었고, ORAC value는 14 ±0.25 μM TE/mL로 높은 항산화 활성을 나타내었다.

7. B16F10 melanoma cell을 이용한 *in vitro* 실험에서 aronia extract의 toxicity level은 >100 μg/mL이었으며, Tyrosinase와 TRP-1의 단백질 발현량의 변화는 없었고, TRP-2 의 발현량은 약간 억제하는 경향을 보였다.

8. C3G의 toxic level 은 >50 μM으로 확인되었고, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 의 발현량이 모두 감소하여 미백소재로써의 가능성을 확인하였다.

9. *In vivo* zebrafish 실험결과 C3G의 mortality rate는 >100 μM이었으며, 30~50 μM 의 농도에서는 항산화 활성이 증가하였고, >150 μM의 농도에서는 오히려 항산화 활성이 감소하였다.

10. Zebrafish를 이용한 미백실험에서 aronia extracts 는 10 ~ 100 μM의 농도에서 미백효과가 나타났으며, >150 μM의 농도에서는 미백효과가 나타나지 않았다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

이러한 연구결과들을 보았을 때 본 실험에서 합성한 quercetin derivatives와 미백소재로써 가능성이 연구되지 않았던 C3G는 기능성 천연미백소재로써의 가능성이 매우 높은 것으로 생각되며, 추후 zebrafish 를 통해 C3G 단일물질의 미백효과에 대해 검증할 필요가 있다. 또한 quercetin derivatives의 단일 물질을 분리하고 NMR을 이용한 구조 분석을 통해 합성된 물질의 효능을 규명할 필요가 있으며, clinical trial을 시행하여 미백효과를 증명할 필요가 있다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

References

1. Saha, R., Cosmeceuticals and herbal drugs: practical uses. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2012,** *3* (1), 59-65.

2. Kim, Y. H.; Kim, G. W.; Bae, S. G.; Lee, J. H.; Lee, D. G.; Shin, J. C. Whitening cosmetic composition containing natural whitening complex. KR2015113513A, 2015.

3. Tirlapur, U. K.; Mulholland, W. J.; Bellhouse, B. J.; Kendall, M.; Cornhill, J. F.; Cui, Z., Femtosecond two-photon high-resolution 3D imaging, spatial-volume rendering and microspectral characterization of immunolocalized MHC-II and mLangerin/CD207 antigens in the mouse epidermis. *Microsc. Res. Tech.* **2006,** *69* (10), 767-775.

4. Kaur, I. P.; Agrawal, R., Nanotechnology: a new paradigm in cosmeceuticals. *Recent Pat. Drug Delivery Formulation* **2007,** *1* (2), 171-182.

5. Thomas, N. V.; Kim, S.-K., Beneficial effects of marine algal compounds in cosmeceuticals. *Mar. Drugs* **2013,** *11*, 146-164.

6. Terenin, A. N., Photochemical processes in aromatic compounds. *Acta Physicochim. URSS* **1943,** *18*, 210-41.

7. Petropoulos, I.; Friguet, B., Maintenance of proteins and aging: the role of oxidized protein repair. *Free Radical Res.* **2006,** *40* (12), 1269-1276.

8. Gragnani, A.; MacCornick, S.; Chominski, V.; Ribeiro de Noronha, S. M.; Correa de Noronha, S. A. A.; Ferreira, L. M., Review of major theories of skin aging. *Adv. Aging Res.* **2014,** *3* (4), 265-284, 21 pp.

9. Tosato, M.; Zamboni, V.; Ferrini, A.; Cesari, M., The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clinical Interventions in Aging* **2007,** *2* (3), 401-412.

10. Aagaard, L.; Rossi, J. J., RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Advanced drug delivery reviews* **2007,** *59* (2), 75-86.

11. Kim, H. Y.; Cho, Y. J.; Yamabe, N.; Cho, E. J., Free radical scavenging activity and protective effect from cellular oxidative stress of active compound from eggplant (Solanum molongena L.). *Nongop Kwahak Yongu (Chungnam Taehakkyo)* **2011,** *38* (4), 625-629.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

12. Halliwell, B.; Whiteman, M., Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology* **2004,** *142* (2), 231-255.

13. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telser, J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2007,** *39* (1), 44-84.

14. Boucher, O.; Randall, D.; Artaxo, P.; Bretherton, C.; Feingold, G.; Forster, P.; Kerminen, V.-M.; Kondo, Y.; Liao, H.; Lohmann, U., Clouds and aerosols. In *Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press: 2013; pp 571-657.

15. Cai, Y.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H., Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life sciences* **2004,** *74* (17), 2157-2184.

16. Radovits, T.; Seres, L.; Gerő, D.; Lin, L.-n.; Beller, C. J.; Chen, S.-H.; Zotkina, J.; Berger, I.; Groves, J. T.; Szabó, C., The peroxynitrite decomposition catalyst FP15 improves ageing-associated cardiac and vascular dysfunction. *Mechanisms of ageing and development* **2007,** *128* (2), 173-181.

17. Yaar, M.; Gilchrest, B. A., Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *British Journal of Dermatology* **2007,** *157* (5), 874-887.

18. Scharffetter–Kochanek, K.; Brenneisen, P.; Wenk, J.; Herrmann, G.; Ma, W.; Kuhr, L.; Meewes, C.; Wlaschek, M., Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Experimental Gerontology* **2000,** *35* (3), 307-316.

19. Jha, S.; Kirshner, R. P.; Challis, P.; Garnavich, P. M.; Matheson, T.; Soderberg, A. M.; Graves, G. J.; Hicken, M.; Alves, J. F.; Arce, H. G., UBVRI light curves of 44 type Ia supernovae. *The Astronomical Journal* **2006,** *131* (1), 527.

20. Kim, K. S.; Zhao, Y.; Jang, H.; Lee, S. Y.; Kim, J. M.; Kim, K. S.; Ahn, J.-H.; Kim, P.; Choi, J.-Y.; Hong, B. H., Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes. *Nature* **2009,** *457* (7230), 706-710.

21. Meredith, P.; Sarna, T., The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigm. Cell Res.* **2006,** *19* (6), 572-594.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

22. Gillespie, J. P.; Kanost, M. R.; Trenczek, T., Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* **1997,** *42*, 611-643.

23. Matsumoto, M.; Hara, H.; Chiji, H.; Kasai, T., Gastroprotective Effect of Red Pigments in Black Chokeberry Fruit (Aronia melanocarpa Elliot) on Acute Gastric Hemorrhagic Lesions in Rats. *J. Agric. Food Chem.* **2004,** *52* (8), 2226-2229.

24. Cho, J. Y.; Park, S.-C.; Kim, T.-W.; Kim, K.-S.; Song, J.-C.; Kim, S.-K.; Lee, H.-M.; Sung, H.-J.; Park, H.-J.; Song, Y.-B., Radical scavenging and anti-inflammatory activity of extracts from Opuntia humifusa Raf. *Journal of pharmacy and pharmacology* **2006,** *58* (1), 113-120.

25. Walsh, T.; King, M.-C., Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer cell* **2007,** *11* (2), 103-105.

26. Lin, J. Y.; Fisher, D. E., Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature (London, U. K.)* **2007,** *445* (7130), 843-850.

27. Pinto, D.; Pagnamenta, A. T.; Klei, L.; Anney, R.; Merico, D.; Regan, R.; Conroy, J.; Magalhaes, T. R.; Correia, C.; Abrahams, B. S., Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* **2010,** *466* (7304), 368-372.

28. An, S. M.; Koh, J.-S.; Boo, Y. C., Inhibition of melanogenesis by tyrosinase siRNA in human melanocytes. *BMB Rep.* **2009,** *42* (3), 178-183.

29. Ciciliot, S.; Schiaffino, S., Regeneration of mammalian skeletal muscle: basic mechanisms and clinical implications. *Current pharmaceutical design* **2010,** *16* (8), 906-914.

30. van Geel, B.; Buurman, J.; Brinkkemper, O.; Schelvis, J.; Aptroot, A.; van Reenen, G.; Hakbijl, T., Environmental reconstruction of a Roman Period settlement site in Uitgeest (The Netherlands), with special reference to coprophilous fungi. *Journal of Archaeological Science* **2003,** *30* (7), 873-883.

31. Hauser, J. E.; Kadekaro, A. L.; Kavanagh, R. J.; Wakamatsu, K.; Terzieva, S.; Schwemberger, S.; Babcock, G.; Rao, M.; Ito, S.; Abdel-Malek, Z. A., Melanin content and MC1R function independently affect UVR-induced DNA damage in cultured human melanocytes. *Pigment cell research* **2006,** *19* (4), 303-314.

32. Slominski, A.; Tobin, D. J.; Shibahara, S.; Wortsman, J., Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological reviews* **2004,** *84* (4), 1155-1228.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

33. Olivares, C.; Solano, F., New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment cell & melanoma research* **2009,** *22* (6), 750-760.

34. ORLOW, S. J.; OSBER, M. P.; PAWELEK, J. M., Synthesis and Characterization of Melanins From Dihydroxyindole-2-Carboxylic Acid and Dihydroxyindole. *Pigment cell research* **1992,** *5* (3), 113-121.

35. Baum, C. M.; Weissman, I. L.; Tsukamoto, A. S.; Buckle, A.-M.; Peault, B., Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992,** *89* (7), 2804-2808.

36. Zou, J.; Beermann, F.; Wang, J.; Kawakami, K.; Wei, X., The Fugu tyrp1 promoter directs specific GFP expression in zebrafish: tools to study the RPE and the neural crest-derived melanophores. *Pigment cell research* **2006,** *19* (6), 615-627.

37. Tripathi, R.; Hearing, V.; Urabe, K.; Aroca, P.; Spritz, R., Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry* **1992,** *267* (33), 23707-23712.

38. Hearing, V. J.; Nicholson, J. M.; Montague, P. M.; Ekel, T. M.; Tomecki, K. J., Mammalian tyrosinase. Structural and functional interrelationship of isozymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* **1978,** *522* (2), 327-339.

39. Lerch, K., Protein and active-site structure of tyrosinase. *Progress in clinical and biological research* **1988,** *256*, 85.

40. Branza-Nichita, N.; Negroiu, G.; Petrescu, A. J.; Garman, E. F.; Platt, F. M.; Wormald, M. R.; Dwek, R. A.; Petrescu, S. M., Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. *Journal of Biological Chemistry* **2000,** *275* (11), 8169-8175.

41. (a) 양은순; 황재성; 최현정; 홍란희; 강상모, 제니스테인의 멜라닌 생성 억제 및 In vivo 미백 효과. *Kor. J. Microbio. Biotechnol* **2008,** *36* (1), 72-81; (b) Kornfeld, R.; Kornfeld, S., Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry* **1985,** *54* (1), 631-664.

42. Goochee, C., Bioprocess factors affecting glycoprotein oligosaccharide structure. *Developments in biological standardization* **1991,** *76*, 95-104.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

43. Kornfeld, R., andS. Kornfeld. 1985. Assembly of asparaginelinked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem 54*, 631.

44. Maeda, K.; Fukuda, M., Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1996,** *276* (2), 765-769.

45. Kim, H. R.; Lee, H. J.; Choi, Y. J.; Park, Y. J.; Woo, Y.; Kim, S. J.; Park, M. H.; Lee, H. W.; Chun, P.; Chung, H. Y.; Moon, H. R., Benzylidene-linked thiohydantoin derivatives as inhibitors of tyrosinase and melanogenesis: importance of the β-phenyl-α,β-unsaturated carbonyl functionality. *MedChemComm* **2014,** *5* (9), 1410-1417.

46. Millhorn, D. E.; Eldridge, F. L.; Waldrop, R. G., Prolonged stimulation for respiration by endogenous central serotonin. *Respiration physiology* **1980,** *42* (3), 171-188.

47. Lee, H. S.; Baek, H. G.; Cho, I. S.; Ryu, G. S.; Jin, Y. G. Cosmetic compositions containing natural products with skin-whitening and wrinkle-preventing activities. KR2012097903A, 2012.

48. Kyrou, C. D.; Simpson, S. E.; Ptchelintsev, D.; Martin, D. M.; Teal, J. Skin whitening composition with hypopigmenting component and antioxidant. WO9955352A1, 1999.

49. Parvez, S.; Kang, M.; Chung, H.-S.; Bae, H., Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytotherapy Research* **2007,** *21* (9), 805-816.

50. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* **1995,** *28* (1), 25-30.

51. Campanella, L.; Bonanni, A.; Finotti, E.; Tomassetti, M., Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. *Biosensors and Bioelectronics* **2004,** *19* (7), 641-651.

52. Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry* **2002,** *13* (10), 572-584.

53. Fernandez-Pachon, M.; Villano, D.; Troncoso, A.; Garcia-Parrilla, M.; Silva, A.; Garcia, R.; Cooper, I.; Franz, R.; Losada, P., Bibliography of analytical, nutritional and clinical methods. *Food Chemistry* **2007,** *103*, 1069-1074.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

54. Firuzi, O.; Lacanna, A.; Petrucci, R.; Marrosu, G.; Saso, L., Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2005,** *1721* (1), 174-184.

55. Griffin, S. P.; Bhagooli, R., Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **2004,** *302* (2), 201-211.

56. Miller, N. J.; Rice-Evans, C. A., Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS•+ radical cation assay. *Free radical research* **1997,** *26* (3), 195-199.

57. Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A., A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science* **1993,** *84*, 407-407.

58. Di Ferdinando, M.; Brunetti, C.; Agati, G.; Tattini, M., Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environ. Exp. Bot.* **2014,** *103*, 107-116.

59. Das, N. P.; Pereira, T. A., Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure-activity relationships. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1990,** *67* (4), 255-8.

60. Brunetti, C.; Guidi, L.; Sebastiani, F.; Tattini, M., Isoprenoids and phenylpropanoids are key components of the antioxidant defense system of plants facing severe excess light stress. *Environ. Exp. Bot.* **2015,** *119*, 54-62.

61. Fellenberg, C.; Vogt, T., Evolutionarily conserved phenylpropanoid pattern on angiosperm pollen. *Trends Plant Sci.* **2015,** *20* (4), 212-218.

62. Kabeya, L. M.; de Marchi, A. A.; Kanashiro, A.; Lopes, N. P.; da Silva, C. H. T. P.; Pupo, M. T.; Lucisano-Valim, Y. M., Inhibition of horseradish peroxidase catalytic activity by new 3-phenylcoumarin derivatives: Synthesis and structure–activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007,** *15* (3), 1516-1524.

63. Inostroza-Blancheteau, C.; Reyes-Diaz, M.; Arellano, A.; Latsague, M.; Acevedo, P.; Loyola, R.; Arce-Johnson, P.; Alberdi, M., Effects of UV-B radiation on anatomical characteristics, phenolic compounds and gene expression of the phenylpropanoid pathway in highbush blueberry leaves. *Plant Physiol. Biochem. (Issy-les-Moulineaux, Fr.)* **2014,** *85*, 85-95.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

64. Bräunlich, M.; Slimestad, R.; Wangensteen, H.; Brede, C.; Malterud, K.; Barsett, H., Extracts, Anthocyanins and Procyanidins from Aronia melanocarpa as Radical Scavengers and Enzyme Inhibitors. *Nutrients* **2013,** *5* (3), 663.

65. Winkel-Shirley, B., It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant physiology* **2001,** *127* (4), 1399-1404.

66. Winkel-Shirley, B., Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant physiology* **2001,** *126* (2), 485-493.

67. Saslowsky, D.; Winkel-Shirley, B., Localization of flavonoid enzymes in Arabidopsis roots. *The Plant Journal* **2001,** *27* (1), 37-48.

68. Garg, N.; Singla, P., Naringenin- and Funneliformis mosseae-Mediated Alterations in Redox State Synchronize Antioxidant Network to Alleviate Oxidative Stress in Cicer arietinum L. Genotypes Under Salt Stress. *J. Plant Growth Regul.* **2015,** *34* (3), 595-610.

69. Park, J.-S.; Kim, J.-B.; Kim, K.-H.; Ha, S.-H.; Han, B.-S.; Kim, Y.-H., Flavonoid Biosynthesis: Biochemistry and Metabolic Engineering. *Journal of Plant Biotechnology* **2002,** *29* (4), 265-275.

70. Brugliera, F.; Barri-Rewell, G.; Holton, T. A.; Mason, J. G., Isolation and characterization of a flavonoid 3′-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of Petunia hybrida. *The Plant Journal* **1999,** *19* (4), 441-451.

71. Hakamatsuka, T.; Mori, K.; Ishida, S.; Ebizuka, Y.; Sankawa, U., Purification of 2-Hydroxyisoflavanone Dehydratase from the Cell Cultures of Pueraria Lobata in Honour of Professor GH Neil Towers 75TH Birthday. *Phytochemistry* **1998,** *49* (2), 497-505.

72. Downey, M. O.; Harvey, J. S.; Robinson, S. P., Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (Vitis vinifera L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2003,** *9* (2), 110-121.

73. (a) Nakajima, J.-i.; Tanaka, Y.; Yamazaki, M.; Saito, K., Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **2001,** *276* (28), 25797-25803; (b) Halbwirth, H.; Kahl, S.; Jäger, W.; Reznicek, G.; Forkmann, G.; Stich, K., Synthesis of (14 C)-labeled 5-deoxyflavonoids and their application in the study of dihydroflavonol/leucoanthocyanidin interconversion by dihydroflavonol 4-reductase. *Plant Science* **2006,** *170* (3), 587-595.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

74. Eungwanichayapant, P.; Popluechai, S., Accumulation of catechins in tea in relation to accumulation of mRNA from genes involved in catechin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **2009,** *47* (2), 94-97.

75. Areias, F. M.; Rego, A. C.; Oliveira, C. R.; Seabra, R. M., Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe2+-induced oxidative stress in cultured retinal cells. *Biochem. Pharmacol.* **2001,** *62* (1), 111-118.

76. XieXie, L.-P.; Chen, Q.-X.; Huang, H.; Wang, H.-Z.; Zhang, R.-Q., Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry (Moscow, Russ. Fed.)* **2003,** *68* (4), 487-491.

77. Arung, E. T.; Furuta, S.; Ishikawa, H.; Kusuma, I. W.; Shimizu, K.; Kondo, R., Anti-melanogenesis properties of quercetin- and its derivative-rich extract from Allium cepa. *Food Chem.* **2010,** *124* (3), 1024-1028.

78. Suh, H.; Lee, J.; Cho, J.; Kim, Y.; Chung, S., Radical scavenging compounds in onion skin. *Food Research International* **1999,** *32* (10), 659-664.

79. Afanas' ev, I. B.; Dcrozhko, A. I.; Brodskii, A. V.; Kostyuk, V. A.; Potapovitch, A. I., Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology* **1989,** *38* (11), 1763-1769.

80. Jaime, L.; Martínez, F.; Martín-Cabrejas, M. A.; Molla, E.; López-Andréu, F. J.; Waldron, K. W.; Esteban, R. M., Study of total fructan and fructooligosaccharide content in different onion tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2001,** *81* (2), 177-182.

81. Arai, Y.; Watanabe, S.; Kimira, M.; Shimoi, K.; Mochizuki, R.; Kinae, N., Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *The Journal of nutrition* **2000,** *130* (9), 2243-2250.

82. Day, A. J.; Gee, J. M.; DuPont, M. S.; Johnson, I. T.; Williamson, G., Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4′-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical pharmacology* **2003,** *65* (7), 1199-1206.

83. Lin, W.-L.; Wang, C.-J.; Tsai, Y.-Y.; Liu, C.-L.; Hwang, J.-M.; Tseng, T.-H., Inhibitory effect of esculetin on oxidative damage induced by t-butyl hydroperoxide in rat liver. *Archives of toxicology* **2000,** *74* (8), 467-472.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

84. Laughton, M. J.; Halliwell, B.; Evans, P. J.; Robin, J.; Hoult, S., Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin: effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochemical pharmacology* **1989,** *38* (17), 2859-2865.

85. Castaneda-Ovando, A.; Pacheco-Hernandez, M. d. L.; Paez-Hernandez, M. E.; Rodriguez, J. A.; Galan-Vidal, C. A., Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* **2009,** *113* (4), 859-871.

86. Chen, P.-N.; Chu, S.-C.; Chiou, H.-L.; Chiang, C.-L.; Yang, S.-F.; Hsieh, Y.-S., Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. *Nutr. Cancer* **2005,** *53* (2), 232-243.

87. Wangensteen, H.; Braunlich, M.; Nikolic, V.; Malterud, K. E.; Slimestad, R.; Barsett, H., Anthocyanins, proanthocyanidins and total phenolics in four cultivars of aronia: Antioxidant and enzyme inhibitory effects. *J. Funct. Foods* **2014,** *7*, 746-752.

88. (a) Dai, J.; Mumper, R. J., Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **2010,** *15* (10), 7313-7352; (b) Xu, M.; Bower, K. A.; Wang, S.; Frank, J. A.; Chen, G.; Ding, M.; Wang, S.; Shi, X.; Ke, Z.; Luo, J., Cyanidin-3-glucoside inhibits ethanol-induced invasion of breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Molecular cancer* **2010,** *9* (1), 285.

89. Wang, L.-S.; Stoner, G. D., Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer letters* **2008,** *269* (2), 281-290.

90. Vasserot, Y.; Caillet, S.; Maujean, A., Study of anthocyanin adsorption by yeast lees. Effect of some physicochemical parameters. *American Journal of Enology and Viticulture* **1997,** *48* (4), 433-437.

91. Brouillard, R., *Chemical structure of anthocyanins*. Academic Press: New York: 1982; Vol. 1.

92. Ohgami, K.; Ilieva, I.; Shiratori, K.; Koyama, Y.; Jin, X.-H.; Yoshida, K.; Kase, S.; Kitaichi, N.; Suzuki, Y.; Tanaka, T., Anti-inflammatory effects of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Investigative ophthalmology & visual science* **2005,** *46* (1), 275-281.

93. Kask, K., Large-fruited black chokeberry (Aronia melanocarpa). *Fruit varieties journal (USA)* **1987**.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

94. OSZMIANSKI, J.; SAPIS, J. C., Anthocyanins in fruits of Aronia melanocarpa (chokeberry). *Journal of Food Science* **1988,** *53* (4), 1241-1242.

95. Oprea, E.; Manolescu, B. N.; Farcasanu, I. C.; Mladin, P.; Mihele, D., Studies concerning antioxidant and hypoglycaemic activity of Aronia melanocarpa fruits. *Farmacia (Bucharest, Rom.)* **2014,** *62* (2), 254-263.

96. Appel, K.; Meiser, P.; Millan, E.; Collado, J. A.; Rose, T.; Gras, C. C.; Carle, R.; Munoz, E., Chokeberry (Aronia melanocarpa (Michx.) Elliot) concentrate inhibits NF-κB and synergizes with selenium to inhibit the release of pro-inflammatory mediators in macrophages. *Fitoterapia* **2015**, Ahead of Print.

97. Durge, A. V.; Sarkar, S.; Singhal, R. S., Stability of anthocyanins as pre-extrusion colouring of rice extrudates. *Food Research International* **2013,** *50* (2), 641-646.

98. (a) Ochmian, I.; Oszmiański, J.; Skupień, K., Chemical composition, phenolics, and firmness of small black fruits. *Journal of Applied Botany and Food Quality* **2012,** *83* (1), 64-69; (b) Kim, J. Y.; Do, Y.; Im, R.-Y.; Kim, G.-Y.; Joo, G.-J., Use of large web-based data to identify public interest and trends related to endangered species. *Biodiversity and Conservation* **2014,** *23* (12), 2961-2984; (c) Zheng, W.; Wang, S. Y., Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J Agric Food Chem* **2003,** *51* (2), 502-9.

99. Zadernowski, R.; Naczk, M.; Nesterowicz, J., Phenolic acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005,** *53* (6), 2118-2124.

100. Aggarwal, B. B.; Shishodia, S., Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology* **2006,** *71* (10), 1397-1421.

101. (a) Slimestad, R.; Torskangerpoll, K.; Nateland, H. S.; Johannessen, T.; Giske, N. H., Flavonoids from black chokeberries, Aronia melanocarpa. *Journal of Food Composition and Analysis* **2005,** *18* (1), 61-68; (b) Denev, P. N.; Kratchanov, C. G.; Ciz, M.; Lojek, A.; Kratchanova, M. G., Bioavailability and Antioxidant Activity of Black Chokeberry (Aronia melanocarpa) Polyphenols: in vitro and in vivo Evidences and Possible Mechanisms of Action: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2012,** *11* (5), 471-489.

102. 이혜미; 공봉주; 권순식; 김경진; 김해수; 전소하; 하지훈; 김진숙; 박수남, 아로니아 베리 열매 및 잎 추출물의 항산화 활성. *大韓化粧品學會誌* **2013,** *39* (4), 337-345.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

103. 김주영; 성기운; 황인욱; 정신교, 국내 적포도주스의 항산화능과 색도의 상관성. *한국식품영양과학회지* **2015,** *44* (8), 1206-1211.

104. Singh, B. N.; Singh, B.; Singh, R.; Prakash, D.; Dhakarey, R.; Upadhyay, G.; Singh, H., Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of Moringa oleifera. *Food and Chemical Toxicology* **2009,** *47* (6), 1109-1116.

105. Škerget, M.; Majhenič, L.; Bezjak, M.; Knez, Ž., Antioxidant, radical scavenging and antimicrobial activities of red onion (Allium cepa L) skin and edible part extracts. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **2009,** *23* (4), 435-444.

106. Ra, K.-S.; Suh, H.-J.; Chung, S.-H.; Son, J.-Y., Antioxidant activity of solvent extract from onion skin. *Korean Journal of Food Science and Technology* **1997,** *29* (3), 595-600.

107. Herrmann, K., Flavonols and flavones in food plants: a review†. *International Journal of Food Science & Technology* **1976,** *11* (5), 433-448.

108. Wu, X.; Prior, R. L., Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *Journal of agricultural and food chemistry* **2005,** *53* (7), 2589-2599.

109. Wang, H.; Cao, G.; Prior, R. L., Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997,** *45* (2), 304-309.

110. 황은선; 기경남, 아로니아 (Aronia melancocarpa) 유래 안토시아닌 색소의 안정성. *한국식품과학회지* **2013,** *45* (4), 416-421.

111. Basu, A.; Rhone, M.; Lyons, T. J., Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutr Rev* **2010,** *68* (3), 168-77.

112. Oszmianski, J.; Sapis, J. C., Anthocyanins in fruits of Aronia melanocarpa (chokeberry). *J. Food Sci.* **1988,** *53* (4), 1241-2.

113. Maatta-Riihinen, K. R.; Kamal-Eldin, A.; Mattila, P. H.; Gonzalez-Paramas, A. M.; Torronen, A. R., Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *J Agric Food Chem* **2004,** *52* (14), 4477-86.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

114. Wu, X.; Gu, L.; Prior, R. L.; McKay, S., Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* **2004,** *52* (26), 7846-56.

115. van der Sluis, A. A.; Dekker, M.; de Jager, A.; Jongen, W. M. F., Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple: Effect of Cultivar, Harvest Year, and Storage Conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2001,** *49* (8), 3606-3613.

116. Oszmianski, J.; Wojdylo, A., Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* **2005,** *221* (6), 809-813.

117. Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E., Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J. AOAC Int.* **2005,** *88* (5), 1269-1278.

118. Yun Jum, P.; Hyun Ju, K.; Buk Gu, H., 꽃베고니아 'Red'에서 에탄올로 추출한 안토시아닌 색소의 안정성. *FLOWER RESEARCH JOURNAL* **2006,** *14* (3), 203-210.

119. Battaini, G.; Monzani, E.; Casella, L.; Santagostini, L.; Pagliarin, R., Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. *JBIC* **2000,** *5* (2), 262-268.

120. Oszmianski, J. A. N.; Sapis, J. C., Anthocyanins in Fruits of Aronia Melanocarpa (Chokeberry). *Journal of Food Science* **1988,** *53* (4), 1241-1242.

121. Vlachojannis, C.; Zimmermann, B. F.; Chrubasik-Hausmann, S., Quantification of Anthocyanins in Elderberry and Chokeberry Dietary Supplements. *Phytother. Res.* **2015,** *29* (4), 561-565.

122. Hwang, S. J.; Yoon, W. B.; Lee, O.-H.; Cha, S. J.; Kim, J. D., Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food Chem.* **2014,** *146*, 71-77.

123. Beckman, K. B.; Ames, B. N., The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews* **1998,** *78* (2), 547-581.

124. Abe, Y.; Tamiya, G.; Nakamura, T.; Hozumi, Y.; Suzuki, T., Association of melanogenesis genes with skin color variation among Japanese females. *J. Dermatol. Sci.* **2013,** *69* (2), 167-172.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

125. Aruoma, O. I., Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2003,** *523-524*, 9-20.

126. Aroh, B. C.; Volkis, B.; Mathew, S.; Ristvey, A. G.; Volkis, V. V. In *Effect of nitrogen treatment on the antioxidant capacity of Aronia melanocarpa grown in Maryland*, American Chemical Society: 2012; pp AGFD-139.

127. Ratnam, D. V.; Ankola, D. D.; Bhardwaj, V.; Sahana, D. K.; Kumar, M. N. V. R., Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J. Controlled Release* **2006,** *113* (3), 189-207.

128. Mishra, K.; Ojha, H.; Chaudhury, N. K., Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH[rad] assay: A critical review and results. *Food Chem.* **2012,** *130* (4), 1036-1043.

129. Ruginǎ, D.; Diaconeasa, Z.; Coman, C.; Bunea, A.; Socaciu, C.; Pintea, A., Chokeberry Anthocyanin Extract as Pancreatic β-Cell Protectors in Two Models of Induced Oxidative Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2015,** *2015*.

130. Schaich, K. M.; Tian, X.; Xie, J., Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *J. Funct. Foods* **2015,** *14*, 111-125.

131.Blois, M. S., Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **1958,** *181* (4617), 1199-1200.

132. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol. (London)* **1995,** *28* (1), 25-30.

133. Blois 1958Dembitsky, V. M.; Poovarodom, S.; Leontowicz, H.; Leontowicz, M.; Vearasilp, S.; Trakhtenberg, S.; Gorinstein, S., The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Res. Int.* **2011,** *44* (7), 1671-1701.

134. Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M. A method for assaying the antioxidant capacity of a sample. WO2003071266A1, 2003.

135. Shin, D.-B.; Lee, D.-W.; Yang, R.; Kim, J.-A., Antioxidative properties and flavonoids contents of matured Citrus peel extracts. *Food Sci. Biotechnol.* **2006,** *15* (3), 357-362.

136. Pietta, P. G., Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* **2000,** *63* (7), 1035-42.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

137. Kesba, H. H.; El-Beltagi, H. S., Biochemical changes in grape rootstocks resulted from humic acid treatments in relation to nematode infection. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2012,** *2* (4), 287-293.

138. Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Prior, R. L., High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* **2002,** *50* (16), 4437-4444.

139. Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001,** *49* (10), 4619-4626.

140. 임정대; 차환수; 정명근; 최리나; 최덕주; 윤예리, 아로니아 추출물 및 아로니아 안토시아닌분획의 항산화 활성 효과. *한국식품조리과학회지* **2014,** *30* (5), 573-578.

141. Finn, J.; Hui, M.; Li, V.; Lorenzi, V.; de la Paz, N.; Cheng, S. H.; Lai-Chan, L.; Schlenk, D., Effects of propranolol on heart rate and development in Japanese medaka (Oryzias latipes) and zebrafish (Danio rerio). *Aquat. Toxicol.* **2012,** *122-123*, 214-221.

142. Huang, X.; Nguyen, A. T.; Li, Z.; Emelyanov, A.; Parinov, S.; Gong, Z., One step forward: The use of transgenic zebrafish tumor model in drug screens. *Birth Defects Res., Part C* **2011,** *93* (2), 173-181.

143. He, Q.; Liu, K.; Wang, S.; Hou, H.; Yuan, Y.; Wang, X., Toxicity induced by emodin on zebrafish embryos. *Drug Chem. Toxicol. (1977)* **2012,** *35* (2), 149-154.

144. Mukhopadhyay, D.; Chattopadhyay, A., Induction of Oxidative Stress and Related Transcriptional Effects of Sodium Fluoride in Female Zebrafish Liver. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2014,** *93* (1), 64-70.

145.Chen, Y.-H.; Yang, Z.-S.; Wen, C.-C.; Chang, Y.-S.; Wang, B.-C.; Hsiao, C.-A.; Shih, T.-L., Evaluation of the structure-activity relationship of flavonoids as antioxidants and toxicants of zebrafish larvae. *Food Chem.* **2012,** *134* (2), 717-724.

146. Kim, K.-N.; Yang, H.-M.; Kang, S.-M.; Ahn, G.; Roh, S. W.; Lee, W.; Kim, D.; Jeon, Y.-J., Whitening effect of octaphlorethol A isolated from Ishige foliacea in an in vivo zebrafish model. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2015,** *25* (4), 448-451.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

147. Herrling, T.; Jung, K.; Fuchs, J., The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2008,** *69* (5), 1429-1435.

148. Choi, T.-Y.; Kim, J.-H.; Ko, D. H.; Kim, C.-H.; Hwang, J.-S.; Ahn, S.; Kim, S. Y.; Kim, C.-D.; Lee, J.-H.; Yoon, T.-J., Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigm. Cell Res.* **2007,** *20* (2), 120-127.

149. White, R.; Rose, K.; Zon, L., Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. *Nat Rev Cancer* **2013,** *13* (9), 624-636.

150.Chen, Y.-H.; Yang, Z.-S.; Wen, C.-C.; Chang, Y.-S.; Wang, B.-C.; Hsiao, C.-A.; Shih, T.-L., Evaluation of the structure–activity relationship of flavonoids as antioxidants and toxicants of zebrafish larvae. *Food Chemistry* **2012,** *134* (2), 717-724.

151. Richetti, S. K.; Blank, M.; Capiotti, K. M.; Piato, A. L.; Bogo, M. R.; Vianna, M. R.; Bonan, C. D., Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behavioural Brain Research* **2011,** *217* (1), 10-15.

152. Ko, S.-C.; Cha, S.-H.; Heo, S.-J.; Lee, S.-H.; Kang, S.-M.; Jeon, Y.-J., Protective effect of Ecklonia cava on UVB-induced oxidative stress: in vitro and in vivo zebrafish model. *J Appl Phycol* **2011,** *23* (4), 697-708.

153. Kim, J.-Y.; Hong, J.-H.; Jung, H. K.; Jeong, Y. S.; Cho, K.-H., Grape skin and loquat leaf extracts and acai puree have potent anti-atherosclerotic and anti-diabetic activity in vitro and in vivo in hypercholesterolemic zebrafish. *Int. J. Mol. Med.* **2012,** *30* (3), 606-614.

154. Hearing, V. J., Jr.; Ekel, T. M.; Montague, P. M.; Hearing, E. D.; Nicholson, J. M., Mammalian tyrosinase: isolation by a simple new procedure and characterization of its steric requirements for cofactor activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **1978,** *185* (2), 407-18.

155. Hearing, V. J.; Tsukamoto, K., Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J* **1991,** *5* (14), 2902-9.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

156. (a) Kobayashi, T.; Urabe, K.; Winder, A.; Jimenez-Cervantes, C.; Imokawa, G.; Brewington, T.; Solano, F.; Garcia-Borron, J. C.; Hearing, V. J., Tyrosinase related protein 1 (Trp1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J.* **1994,** *13* (24), 5818-25; (b) Su, T.-R.; Lin, J.-J.; Tsai, C.-C.; Huang, T.-K.; Yang, Z.-Y.; Wu, M.-O.; Zheng, Y.-Q.; Su, C.-C.; Wu, Y.-J., Inhibition of melanogenesis by gallic acid: possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/β-catenin signaling pathways in B16F10 cells. *Int J Mol Sci* **2013,** *14* (10), 20443-58; (c) d'Ischia, M.; Napolitano, A.; Ball, V.; Chen, C.-T.; Buehler, M. J., Polydopamine and Eumelanin: From Structure-Property Relationships to a Unified Tailoring Strategy. *Acc. Chem. Res.* **2014,** *47* (12), 3541-3550.

157. Sanchez-Ferrer, A.; Rodriguez-Lopez, J. N.; Garcia-Canovas, F.; Garcia-Carmona, F., Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1995,** *1247* (1), 1-11.

158. Tsukamoto, K.; Jackson, I. J.; Urabe, K.; Montague, P. M.; Hearing, V. J., A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *EMBO J.* **1992,** *11* (2), 519-26.

159. Wang, N.; Hebert, D. N., Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life. *Pigm. Cell Res.* **2006,** *19* (1), 3-18.

160. Vistica, D. T.; Skehan, P.; Scudiero, D.; Monks, A.; Pittman, A.; Boyd, M. R., Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* **1991,** *51* (10), 2515-20.

161. Hwang, J.-M.; Kuo, H.-C.; Lin, C.-T.; Kao, E.-S., Inhibitory effect of liposome-encapsulated anthocyanin on melanogenesis in human melanocytes. *Pharm. Biol. (London, U. K.)* **2013,** *51* (8), 941-947.

162. 최연선; 최태부, B16F10 mouse melanoma 세포에서 삼채 (Allium hookeri) 추출물의 멜라닌 형성 억제 효과에 관한 연구. *대한피부미용학회지* **2014,** *12* (2), 163-168.

163. Boissy, R. E.; Manga, P., On the etiology of contact/occupational vitiligo. *Pigment Cell Research* **2004,** *17* (3), 208-214.

164. Nagata, H.; Takekoshi, S.; Takeyama, R.; Homma, T.; Osamura, R. Y., Quercetin enhances melanogenesis by increasing the activity and synthesis of tyrosinase in human melanoma cells and in normal human melanocytes. *Pigm. Cell Res.* **2004,** *17* (1), 66-73.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

165. Arnold, J.; McLeod, N.; Thani-Gasalam, R.; Rashid, P., Overactive bladder syndrome: management and treatment options. *Australian family physician* **2012,** *41* (11), 878.

166. Rooprai, H.; Ashkan, K.; Brazil, L.; Selway, R.; Lodhi, R.; Aitchison, K.; Gullan, R.; Beaney, R., Role of a Combination of Seven Micronutrients in the Management of Glioblastoma Multiforme. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* **2015,** *27* (6), 370.

167. Imokawa, G.; Mishima, Y., Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glycosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer research* **1982,** *42* (5), 1994-2002.

168. Aramwit, P.; Bang, N.; Srichana, T., The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. *Food research international* **2010,** *43* (4), 1093-1097.

169. Moon, E.; Kim, A.-J.; Kim, S. Y., Sarsasapogenin Increases Melanin Synthesis via Induction of Tyrosinase and Microphthalmia-Associated Transcription Factor Expression in Melan-a Cells. *Biomolecules & therapeutics* **2012,** *20* (3), 340.

170. Liang, C.-H.; Chou, T.-H.; Ding, H.-Y., Inhibition of melanogensis by a novel origanoside from Origanum vulgare. *J. Dermatol. Sci.* **2010,** *57* (3), 170-177.

171. Kadekaro, A. L.; Kavanagh, R.; Kanto, H.; Terzieva, S.; Hauser, J.; Kobayashi, N.; Schwemberger, S.; Cornelius, J.; Babcock, G.; Shertzer, H. G.; Scott, G.; Abdel-Malek, Z. A., α-Melanocortin and endothelin-1 activate antiapoptotic pathways and reduce DNA damage in human melanocytes. *Cancer Res.* **2005,** *65* (10), 4292-4299.

172. Takekoshi, S.; Matsuzaki, K.; Kitatani, K., Quercetin stimulates melanogenesis in hair follicle melanocyte of the mouse. *Tokai J. Exp. Clin. Med* **2013,** *38*, 129-134.

173. Kusumawati, I.; Indrayanto, G., Chapter 15 - Natural Antioxidants in Cosmetics. In *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta ur, R., Ed. Elsevier: 2013; Vol. Volume 40, pp 485-505.

174. Chondrogianni, N.; Kapeta, S.; Chinou, I.; Vassilatou, K.; Papassideri, I.; Gonos, E. S., Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. *Experimental Gerontology* **2010,** *45* (10), 763-771.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

175. Saija, A.; Tomaino, A.; Trombetta, D.; Pellegrino, M. L.; Tita, B.; Messina, C.; Bonina, F. P.; Rocco, C.; Nicolosi, G.; Castelli, F., 'In vitro'antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* **2003,** *56* (2), 167-174.

176. Arung, E. T.; Furuta, S.; Ishikawa, H.; Kusuma, I. W.; Shimizu, K.; Kondo, R., Anti-melanogenesis properties of quercetin- and its derivative-rich extract from Allium cepa. *Food Chemistry* **2011,** *124* (3), 1024-1028.

177. Kim, Y. J., Hyperin and quercetin modulate oxidative stress-induced melanogenesis. *Biological & pharmaceutical bulletin* **2012,** *35* (11), 2023-7.

178. Nakashima, S.; Matsuda, H.; Oda, Y.; Nakamura, S.; Xu, F.; Yoshikawa, M., Melanogenesis inhibitors from the desert plant Anastatica hierochuntica in B16 melanoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010,** *18* (6), 2337-2345.

179. (a) Yamauchi, K.; Mitsunaga, T.; Batubara, I., Synthesis of quercetin glycosides and their melanogenesis stimulatory activity in B16 melanoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014,** *22* (3), 937-944; (b) Yamauchi, K.; Mitsunaga, T.; Inagaki, M.; Suzuki, T., Synthesized quercetin derivatives stimulate melanogenesis in B16 melanoma cells by influencing the expression of melanin biosynthesis proteins MITF and p38 MAPK. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014,** *22* (13), 3331-3340.

180. Dubber, M. J.; Kanfer, I., High-performance liquid chromatographic determination of selected flavonols in Ginkgo biloba solid oral dosage forms. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* **2004,** *7* (3), 303-9.

181. An, S. M.; Kim, H. J.; Kim, J.-E.; Boo, Y. C., Flavonoids, taxifolin and luteolin attenuate cellular melanogenesis despite increasing tyrosinase protein levels. *Phytother. Res.* **2008,** *22* (9), 1200-1207.

182. Yamauchi, K.; Mitsunaga, T.; Inagaki, M.; Suzuki, T., Synthesized quercetin derivatives stimulate melanogenesis in B16 melanoma cells by influencing the expression of melanin biosynthesis proteins MITF and p38 MAPK. *Bioorg. Med. Chem.* **2014,** *22* (13), 3331-3340.

183. Yamauchi, K.; Mitsunaga, T.; Batubara, I., Novel quercetin glucosides from Helminthostachys zeylanica root and acceleratory activity of melanin biosynthesis. *J. Nat. Med.* **2013,** *67* (2), 369-374.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

184. Gomez-Cordoves, C.; Bartolome, B.; Vieira, W.; Virador, V. M., Effects of Wine Phenolics and Sorghum Tannins on Tyrosinase Activity and Growth of Melanoma Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2001,** *49* (3), 1620-1624.

185. Borzilleri, R. M.; Zheng, X.; Schmidt, R. J.; Johnson, J. A.; Kim, S.-H.; DiMarco, J. D.; Fairchild, C. R.; Gougoutas, J. Z.; Lee, F. Y.; Long, B. H., A novel application of a Pd (0)-catalyzed nucleophilic substitution reaction to the regio-and stereoselective synthesis of lactam analogues of the epothilone natural products. *Journal of the American Chemical Society* **2000,** *122* (37), 8890-8897.

186. Westaway, K. C.; Ali, S. F., Isotope effects in nucleophilic substitution reactions. III. The effect of changing the leaving group on transition state structure in SN2 reactions. *Canadian Journal of Chemistry* **1979,** *57* (11), 1354-1367.

187. Miller, J.; Parker, A. J., Dipolar Aprotic Solvents in Bimolecular Aromatic Nucleophilic Substitution Reactions1. *Journal of the American Chemical Society* **1961,** *83* (1), 117-123.

188. Kennedy, V. S., *Estuarine Comparisons: Proceedings of the Sixth Biennial International Estuarine Research Conference, Gleneden Beach, Oregon, November 1-6, 1981*. Elsevier: 2013.

Collection @ chosun