



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0056487
(43) 공개일자 2014년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/44 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0119677
(22) 출원일자 2012년10월26일
심사청구일자 2012년10월26일

(71) 출원인
재단법인 한국한방산업진흥원
경상북도 경산시 화랑로 94 (갑제동)
(주)코스메랩
서울특별시 강남구 삼성로95길 31, 세진빌딩 5층
(삼성동, 마루빌딩)

(72) 발명자
손준호
대구 수성구 달구벌대로641길 31, 101동 1108호
(매호동, 매호화성파크드림)
박대순
대구 수성구 동대구로 59, F동 3201호 (두산동,
대우트림프월드수성)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
신동인

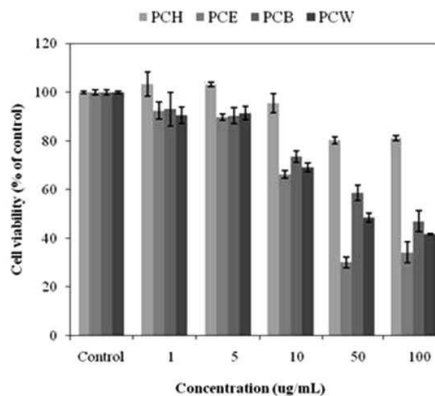
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 감꼭지(柿滯) 추출물 또는 이로부터 분리된 트리폴린을 유효성분으로 함유하는 미백 및 피부 주름의 예방 및 치료용 피부외용 조성물

(57) 요약

본 발명은 감꼭지 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물은 미백효능과 관련된 티로시나제 효소 및 멜라닌 합성 실험에서 강력한 미백활성을 나타냈을뿐만 아니라, 주름생성과 관련된 프로콜라겐 type I 생합성과 MMP-1 활성, TIMP-1의 활성 등에 강력한 억제활성을 나타내 미백 및 주름개선용 약학 및 화장품 조성물로 유용하다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

황주영

경북 포항시 북구 삼호로203번길 9, (항구동)

김동희

대구 달서구 야외음악당로7길 68, (성당동)

황은영

대구광역시 수성구 수성1가 삼화맨션 111호

박혜진

대구 수성구 달구벌대로496길 72, 101동 1402호 (범어동, 두레맨션)

박진영

경기 성남시 분당구 장미로 55, 111동 101호 (야탑동, 장미마을아파트)

김지향

경북 경산시 백천길 29, 101동 207호 (백천동, 경산2차운성타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	B0012302
부처명	지식경제부
연구사업명	지역연고산업육성사업
연구과제명	경북화장품산업육성사업
기여율	1/1
주관기관	(재)한국한방산업진흥원
연구기간	2010.07.01 ~ 2013.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

감쪽지 추출물 또는 이로부터 분리된 트리폴린 화합물을 유효성분으로 함유하는 미백 및 피부 주름의 치료 및 예방을 위한 피부외용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 제형임을 특징으로 하는 피부외용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 추출물은 조추출물, 극성용매 가용 추출물 및 또는 비극성용매 가용추출물인 피부외용 약학 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 조추출물은 정제수를 포함한 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용한 추출물인 피부외용 약학 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 비극성 용매 가용 추출물은 에틸아세테이트, 클로로포름, 헥산, 디클로로메탄에 가용한 추출물인 피부외용 약학 조성물.

청구항 6

제 3항에 있어서,

상기 극성 용매 가용 추출물은 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜, 또는 이들의 혼합용매에 가용한 추출물인 피부외용 약학 조성물.

청구항 7

감쪽지 추출물 또는 이로부터 분리된 트리폴린 화합물을 유효성분으로 함유하는 미백 및 피부 주름의 예방 및 개선을 위한 화장료 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 팩의 제형임을 특징으로 하는 화장료 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 감쪽지(*Persimmon calyx*) 추출물로부터 분리된 트리폴린을 유효성분으로 함유하는 미백 및 피부 주름의 예방 및 치료용 피부외용 약학조성물 또는 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] [문헌 1] Chin, J.E. and Kim, K.C. 2005. Effect of chestnut bark extracts on tyrosinase gene expression. *Kor. J. Sanitation*. 20:10-16.
- [0003] [문헌 2] Gilcrest, B. A. 1990. Skin aging and photoaging. *Dermatol. Nurs.*, 2:79-82.
- [0004] [문헌 3] Ha, T. Y. 2006. Development of functional food materials for healthy life. *Kor. J. Crop. Sci.* 51:26-39.
- [0005] [문헌 4] Huang, C., Ma, W. Y., Dawson, M. I., Rincon, M., Flavell, R. A. and Dong, Z. 1997. Blocking activator protein-1 activity, but not activation retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:5826-5830.
- [0006] [문헌 5] Seo, E. J., E. S. Hong, M. H. Choi, K. S. Kim and S. J. Lee. 2010. Antioxidant and skin whitening effects of *Ramnusyoshinoi* Extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 42:750-754.
- [0007] [문헌 6] Kim, H.J., Park, T. S. Jung, M.S. and Son, J.H. 2011. Study on the antioxidant and anti-inflammatory activities of sarcocarp and calyx of persimmon (cheongdo bansi). *J. Appl. Biol. Chem.* 54:71-78.
- [0008] [문헌 7] Choi, B. W., B.H. Lee, K.J. Kang, E.S. Lee, and N.H. Lee. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Korean J. Pharmacogn.* 29, 237-242.
- [0009] [문헌 8] Tomohiro, I., and F. Yukio. 2005. Hot water extracts from *Adzuki beans* (*vigna angularis*) stimulate not only melanogenesis in cultured mouse B16 melanoma cells but also pigmentation of hair color in C3H mice. *Bio Sci. Biotechnol. Biochem.* 69, 873-882.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 오늘날 사람들은 사회활동의 증가, 환경오염에 따른 오존층 파괴로 인하여 유해 자외선에 장기적으로 노출되고 있다. 이에 건강한 피부를 유지하고자 하는 목적에 따라 많은 미용 기능성 화장품이 개발되어 피부 주름형성 예방 및 완화와 개선을 위한 연구와 색소 침착을 방지하는 피부 미백용 소재 개발이 활발히 진행되고 있다(1).
- [0011] 피부의 노화는 시간의 흐름에 따라 호르몬 분비의 감소와 세포들의 기능과 활성이 저하되어 생체 구성 단백질들의 생합성이 감소하여 생기는 내재적 노화 과정과 공기, 약물, 자외선에 의해 피부가 얇아지며, 주름이 증가되어 탄력이 감소하는 외재적 요인에 의한 노화과정으로 나누어진다. 특히 자외선(UV=ultraviolet)은 각종 피부 트러블을 유발시키고 기미, 주근깨, 피부 색소 침착 등의 노화 현상을 촉진 및 피부암 등 여러 가지 피부 질환의 원인이 되기도 하며, 피부조직의 교원질 중 탄력섬유인 콜라겐과 엘라스틴을 분해하여 피부 탄력이 떨어지고 주름을 유발시켜 표면을 거칠게 한다(2,3).
- [0012] 콜라겐, 엘라스틴, 피브린, 넥틴 및 라미닌 등 진피의 세포 외 기질은 대부분 섬유아세포(fibroblast)에서 만들어지며 세포 밖으로 분비된 후 3중 나선구조형태인 콜라겐이 만들어진다. 콜라겐은 피부에 강도와 장력을 부여함으로써, 외부의 자극이나 힘으로부터 피부를 보호하는 역할을 하며 콜라겐의 감소는 피부의 노화와 매우 밀접한 관계를 가지고 있다. 생체 내에서 콜라겐과 같은 세포외 기질의 합성과 분해는 적절하게 조절되나 노화가 진행되면서 그 합성이 감소하고, 피부가 자외선에 노출되면 다양한 기질 단백질 분해 효소인 matrix metalloproteinase (MMP)의 발현이 촉진된다. Fisher 등은 UV 조사에도 피부내의 MMP 활성이 증가되며, 증가된 MMP들이 진피층의 콜라겐을 붕괴시킴으로써, 피부 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보고한 바 있다(4).
- [0013] 색소침착의 원인이 되는 멜라닌(melanin)은 자연계에 널리 존재하는 생체 고분자 물질로 인간의 피부 색깔을 결정짓는 색소로 알려져 있으며 자외선이나 자유 라디칼로부터 피부가 손상되는 것을 방지하는 역할을 담당하고 있다. 이 색소는 멜라닌형성세포 내에 위치하는 멜라노솜(melanosome)에 의해 만들어지며 형성된 멜라닌은 각질

형성세포로 이동하여 피부 상피층에 축적되어 색소침착 현상이 나타난다. 멜라닌 합성은 아미노산의 하나인 티로신을 기질로 티로시나아제에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 거쳐 도파 퀴논으로 전환되고 자동산화반응과 효소반응으로 도파 크롬을 거쳐 흑갈색의 공동합체인 멜라닌이 생성하게 된다. 특히 티로시나아제 효소는 멜라노사이트에서 멜라닌 색소의 합성에서 주요 핵심 효소로, 절대적으로 필요한 것으로 알려져 있고(5),

[0014] 최근에는 이와 같은 효소를 억제하여 멜라닌 합성 저해를 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0015] 감꼭지는 말하며 기침과 천식, 만성기관지염 치료, 딸꾹질 멈춤, 야뇨증, 혈압강화작용에 효과적이라고 알려져 있다(6).

[0016] 그러나, 상기 문헌의 어디에도 감꼭지 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물의 주름개선 및 미백 효과에 관한 연구는 아직 개시되거나 보고된 바가 없다.

[0017] 따라서 본 연구에서는 감꼭지 추출물로부터 유효성분을 분리 및 동정하고, 이의 주름개선 및 미백효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 감꼭지 추출물 또는 이로부터 분리된 트리폴린 화합물을 유효성분으로 함유하는 미백 및 피부 주름의 치료 및 예방을 위한 피부외용 약학조성물을 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은 감꼭지 추출물 또는 이로부터 분리된 트리폴린 화합물을 유효성분으로 함유하는 미백 및 피부 주름의 예방 및 개선을 위한 화장료 조성물을 제공한다.

[0020] 상기 감꼭지 추출물은 피부외용 약학조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%으로 포함함을 특징으로 한다.

[0021] 상기 약학 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 제형을 포함한다.

[0022] 또한, 상기 화장료 조성물은 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 팩의 제형을 포함한다.

[0023] 본원에서 정의되는 감꼭지는 바람직하게는, 한국산 감꼭지, 보다 바람직하게는 경북 영천지역 재배산 감의 감꼭지임을 특징으로 한다.

[0024] 상기 감꼭지 추출물을 함유한 약학조성물은 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%로 사용이 가능하다.

[0025] 본원에서 정의되는 상기 추출물은 조추출물, 극성용매 가용 추출물 및 또는 비극성용매가용추출물을 포함한다.

[0026] 상기 조추출물은 정제수를 포함한 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 30 내지 90% 물 및 에탄올 혼합용매에 가용한 추출물을 포함한다.

[0027] 상기 비극성 용매 가용 추출물은 에틸아세테이트, 클로로포름, 헥산, 디클로로메탄과 같은 비극성 용매, 바람직하게는 에틸아세테이트에 가용한 추출물을 포함한다.

[0028] 상기 극성 용매 가용 추출물은 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜, 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 부탄올에 가용한 추출물을 포함한다.

[0029] 본 발명의 추출물을 분리하는 방법은 하기와 같다.

[0030] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0031] 본 발명의 추출물은, 건조된 감꼭지를 분쇄기로 분쇄한 후, 상기 분쇄물의 약 1배 내지 20배, 바람직하게는 약 1배 내지 15배의 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜, 아세톤, 클로로포름, 메틸렌클로리드, 헥산 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 30 내지 90% 물 및 에탄올 혼합용매를 가하여 12시간 내지 1주일, 바람직하게는 24시간 내지 72시간 동안, 10℃ 내지 100℃, 바람직하게는 30℃ 내지 70℃에서 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출 등의 추출방법, 바람직하게는, 냉침 추출법을 수행하여 추출물을 수득하는 제 1단계; 상기에서 얻은 추출물을 여과포로 여과하고 필터 여과하여 여과물을 얻는 제 2단계의 제조공정을 통하여 본 발명의 조추출물을 수득할 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명의 극성용매 또는 비극성용매 가용 추출물은 상기에서 얻은 조추출물에 물을 가한 후, n-헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸 아세테이트 및 부탄올을 이용한 통상적인 분획과정을 수행하여 n-헥산, 클로로포름, 에

틸 아세테이트 등의 비극성 용매에 가용한 비극성 용매 가용 추출 분획물; 및 부탄올, 물 등의 극성용매에 가용한 극성용매 가용 추출 분획물을 수득할 수 있다.

- [0033] 본 발명은 상기의 제조공정으로 얻어진 감꼭지 추출물 또는 이로부터 분리된 트리폴린 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 주름의 예방 및 치료용 피부외용 약학조성물 또는 화장료 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 감꼭지 추출물을 함유하는 피부외용 약학조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용제 형태의 약학조성물로 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 감꼭지 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 감꼭지 추출물 또는 이로부터 분리된 트리폴린(trifolin)은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 감꼭지 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물은 미백효능과 관련된 티로시나제 효소 및 멜라닌 합성 실험에서 강력한 미백활성을 나타냈을뿐만 아니라, 주름생성과 관련된 프로콜라겐 type I 생합성과 MMP-1 활성, TIMP-1의 활성 등에 강력한 억제활성을 나타내 본 발명의 감꼭지 추출물 및 이로부터 분리한 트리폴린은 미백 및 주름개선용 약학 및 화장료 조성물로 유용함을 확인하였다.
- [0037] 또한, 본 발명의 감꼭지 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물은 미백 및 주름개선용 효과를 갖는 화장품 및 세안제 등에 다양하게 이용될 수 있다.
- [0038] 본 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 맛사지크림, 에센스, 팩 등과 같은 화장품류와 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 미용액 등이 있다.
- [0039] 본 발명의 화장료는 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스펅고 지질 및 해초 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 조성물을 포함한다.
- [0040] 수용성 비타민으로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B6, 피리독신, 엽산피리독신, 비타민 B12, 판토텐산, 니코틴산, 니코틴산아미드, 엽산, 비타민 C, 비타민 H 등을 들 수 있으며, 그들의 염 (티아민염산염, 아스코르빈산나트륨염 등)이나 유도체 (아스코르빈산-2-인산나트륨염, 아스코르빈산-2-인산마그네슘염 등)도 본 발명에서 사용할 수 있는 수용성 비타민에 포함된다. 수용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 수득할 수 있다.
- [0041] 유용성 비타민으로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 비타민 A, 카로틴, 비타민 D2, 비타민 D3, 비타민 E (d1-알과 토코페롤, d-알과 토코페롤, d-알과 토코페롤) 등을 들 수 있으며, 그들의 유도체 (팔미틴산아스코르빈, 스테아르산아스코르빈, 디팔미틴산아스코르빈, 아세트산 d1-알과 토코페롤, 니코틴산 d1-알과 토코페롤비타민 E, d1-판토텐일알코올, D-판토텐일알코올, 판토텐일에틸에테르 등) 등도 본 발명에서 사용되는 유용성 비타민에 포함된다. 유용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 취득할 수 있다.
- [0042] 고분자 펩티드로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 콜라겐, 가수 분해 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴, 가수 분해 엘라스틴, 케라틴 등을 들 수 있다. 고분자 펩티드는 미생물의 배양액으로부터의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 정제 취득할 수 있으며, 또는 통상 돼지나 소 등의 진피, 누에의 견섬유 등의 천연물로부터 정제하여 사용할 수 있다.
- [0043] 고분자 다당으로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 히드록시에틸셀룰로오스, 크산탄검, 히알루론산나트륨, 콘드로이틴 황산 또는 그 염 (나트륨염 등) 등을 들 수 있다. 예를 들어, 콘드로이틴 황산 또는 그 염 등은 통상 포유동물이나 어류로부터 정제하여 사용할 수 있다.
- [0044] 스펅고 지질로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 세라미드, 피토스핑고신, 스펅고당지질 등을 들 수 있다. 스펅고 지질은 통상 포유류, 어류, 패류, 효모 또는 식물 등으로부터 통상의 방법에 의해 정제하거나 화학 합성법에 의해 취득할 수 있다.

- [0045] 해초 엑기스로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 갈조 엑기스, 홍조 엑기스, 녹조 엑기스 등을 들 수 있으며, 또, 이들의 해초 엑기스로부터 정제된 칼라기난, 아르긴산, 아르긴산나트륨, 아르긴산칼륨 등도 본 발명에서 사용되는 해초 엑기스에 포함된다. 해초 엑기스는 해초로부터 통상의 방법에 의해 정제하여 취득할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 화장료에는 상기 필수 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분을 배합해도 된다.
- [0047] 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다.
- [0048] 유지 성분으로서는 에스테르계 유지, 탄화수소계 유지, 실리콘계 유지, 불소계 유지, 동물 유지, 식물 유지 등을 들 수 있다.
- [0049] 에스테르계 유지로서는 트리2-에틸헥산산글리세릴, 2-에틸헥산산세틸, 미리스틴산이소프로필, 미리스틴산부틸, 팔미틴산이소프로필, 스테아르산에틸, 팔미틴산옥틸, 이소스테아르산이소세틸, 스테아르산부틸, 리놀레산에틸, 리놀레산이소프로필, 올레인산에틸, 미리스틴산이소세틸, 미리스틴산이소스테아릴, 팔미틴산이소스테아릴, 미리스틴산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 세바신산디에틸, 아디핀산디이소프로필, 네오펜탄산이소알킬, 트리(카프릴, 카프린산)글리세릴, 트리2-에틸헥산산트리메틸올프로판, 트라이소스테아르산트리메틸올프로판, 테트라2-에틸헥산산펜타에릴리슬리톨, 카프릴산세틸, 라우린산데실, 라우린산헥실, 미리스틴산데실, 미리스틴산미리스틸, 미리스틴산세틸, 스테아르산스테아릴, 올레인산데실, 리시노올레인산세틸, 라우린산이소스테아릴, 미리스틴산이소트리데실, 팔미틴산이소세틸, 스테아르산옥틸, 스테아르산이소세틸, 올레인산이소데실, 올레인산옥틸도데실, 리놀레산옥틸도데실, 이소스테아르산이소프로필, 2-에틸헥산산세토스테아릴, 2-에틸헥산산스테아릴, 이소스테아르산헥실, 디옥탄산에틸렌글리콜, 디올레인산에틸렌글리콜, 디카프린산프로필렌글리콜, 디(카프릴, 카프린산)프로필렌글리콜, 디카프릴산프로필렌글리콜, 디카프린산네오펜틸글리콜, 디옥탄산네오펜틸글리콜, 트리카프릴산글리세릴, 트리온데실산글리세릴, 트라이소팔미틴산글리세릴, 트라이소스테아르산글리세릴, 네오펜탄산옥틸도데실, 옥탄산이소스테아릴, 이소노난산옥틸, 네오펜탄산헥실데실, 네오펜탄산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 이소스테아르산이소스테아릴, 이소스테아르산옥틸데실, 폴리글리세린올레인산에스테르, 폴리글리세린이소스테아르산에스테르, 시트르산트라이소세틸, 시트르산트라이소알킬, 시트르산트라이소옥틸, 락트산라우릴, 락트산미리스틸, 락트산세틸, 락트산옥틸데실, 시트르산트리에틸, 시트르산아세틸트리에틸, 시트르산아세틸트리부틸, 시트르산트리옥틸, 말산디이소스테아릴, 히드록시스테아르산 2-에틸헥실, 숙신산디2-에틸헥실, 아디핀산디이소부틸, 세바신산디이소프로필, 세바신산디옥틸, 스테아르산콜레스테릴, 이소스테아르산콜레스테릴, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 올레인산콜레스테릴, 올레인산디히드로콜레스테릴, 이소스테아르산피트스테릴, 올레인산피트스테릴, 12-스테알로일히드록시스테아르산이소세틸, 12-스테알로일히드록시스테아르산스테아릴, 12-스테알로일히드록시스테아르산이소스테아릴 등의 에스테르계 등을 들 수 있다.
- [0050] 탄화 수소계 유지로서는 스쿠알렌, 유동 파라핀, 알파-올레핀올리고머, 이소파라핀, 세레신, 파라핀, 유동 이소파라핀, 폴리부텐, 마이크로크리스탈린왁스, 왁셀린 등의 탄화 수소계 유지 등을 들 수 있다.
- [0051] 실리콘계 유지로서는 폴리메틸실리콘, 메틸페닐실리콘, 메틸시클로폴리실록산, 옥타메틸폴리실록산, 데카메틸폴리실록산, 도데카메틸시클로실록산, 디메틸실록산·메틸세틸옥시실록산 공중합체, 디메틸실록산·메틸스테알록시실록산 공중합체, 알킬 변성 실리콘유, 아미노 변성 실리콘유 등을 들 수 있다.
- [0052] 불소계 유지로서는 퍼플루오로폴리에테르 등을 들 수 있다.
- [0053] 동물 또는 식물 유지로서는 아보카도유, 아르몬드유, 올리브유, 참깨유, 쌀겨유, 새플라워유, 대두유, 옥수수유, 유채유, 행인(杏仁)유, 팜핵유, 팜유, 피마자유, 해바라기유, 포도종자유, 면실유, 야자유, 쿠쿠이너트유, 소맥배아유, 쌀 배아유, 시아버터, 월견초유, 마케데미아너트유, 메도흙유, 난황유, 우지(牛脂), 마유, 밍크유, 오렌지라피유, 호호바유, 캔데리리왁스, 카르나바왁스, 액상 라놀린, 경화피마자유 등의 동물 또는 식물 유지를 들 수 있다.
- [0054] 보습제로서는 수용성 저분자 보습제, 지용성 분자 보습제, 수용성 고분자, 지용성 고분자 등을 들 수 있다.
- [0055] 수용성 저분자 보습제로서는 세린, 글루타민, 솔비톨, 만니톨, 피롤리돈-카르복실산나트륨, 글리세린, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜B(중합도 n = 2 이상), 폴리프로필렌글리콜(중합도

n = 2 이상), 폴리글리세린B(중합도 n = 2 이상), 락트산, 락트산염 등을 들 수 있다.

- [0056] 지용성 저분자 보습제로서는 콜레스테롤, 콜레스테롤에스테르 등을 들 수 있다.
- [0057] 수용성 고분자로서는 카르복시비닐폴리머, 폴리아스파라긴산염, 트라가칸트, 크산탄검, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 수용성 키틴, 키토산, 텍스트린 등을 들 수 있다.
- [0058] 지용성 고분자로서는 폴리비닐피롤리돈·에이코센 공중합체, 폴리비닐피롤리돈·헥사데센 공중합체, 니트로셀룰로오스, 텍스트린지방산에스테르, 고분자 실리콘 등을 들 수 있다.
- [0059] 에몰리엔트제로서는 장쇄아실글루타민산콜레스테릴에스테르, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 12-히드록시스테아르산, 스테아르산, 로진산, 라놀린지방산콜레스테릴에스테르 등을 들 수 있다.
- [0060] 계면 활성제로서는 비이온성 계면 활성제, 음이온성 계면 활성제, 양이온성 계면 활성제, 양성 계면 활성제 등을 들 수 있다.
- [0061] 비이온성 계면 활성제로서는 자기 유화형 모노스테아르산글리세린, 프로필렌글리콜지방산에스테르, 글리세린지방산에스테르, 폴리글리세린지방산에스테르, 솔비탄지방산에스테르, POE (폴리옥시에틸렌)솔비탄지방산에스테르, POE 솔비트지방산에스테르, POE 글리세린지방산에스테르, POE 알킬에테르, POE 지방산에스테르, POE 경화피마자유, POE 피마자유, POE·POP (폴리옥시에틸렌·폴리옥시프로필렌) 공중합체, POE·POP 알킬에테르, 폴리에테르변성실리콘, 라우린산알카놀아미드, 알킬아민옥시드, 수소첨가대두인지질 등을 들 수 있다.
- [0062] 음이온성 계면 활성제로서는 지방산비누, 알파-아실술포산염, 알킬술포산염, 알킬알릴술포산염, 알킬나프탈렌술포산염, 알킬황산염, POE 알킬에테르황산염, 알킬아미드황산염, 알킬인산염, POE 알킬인산염, 알킬아미드인산염, 알킬로일알킬타우린염, N-아실아미노산염, POE 알킬에테르카르복실산염, 알킬술포숙신산염, 알킬술포아세트산나트륨, 아실화 가수분해 콜라겐펩티드염, 퍼플루오로알킬인산에스테르 등을 들 수 있다.
- [0063] 양이온성 계면 활성제로서는 염화알킬트리메틸암모늄, 염화스테아릴트리메틸암모늄, 브롬화스테아릴트리메틸암모늄, 염화세토스테아릴트리메틸암모늄, 염화디스테아릴디메틸암모늄, 염화스테아릴디메틸벤질암모늄, 브롬화베헤닐트리메틸암모늄, 염화벤잘코늄, 스테아르산디에틸아미노에틸아미드, 스테아르산디메틸아미노프로필아미드, 라놀린 유도체 제 4급 암모늄염 등을 들 수 있다.
- [0064] 양성 계면 활성제로서는 카르복시베타인형, 아미드베타인형, 술포베타인형, 히드록시술포베타인형, 아미드술포베타인형, 포스포베타인형, 아미노카르복실산염형, 이미다졸린 유도체형, 아미드아민형 등의 양성 계면 활성제 등을 들 수 있다.
- [0065] 유기 및 무기 안료로서는 규산, 무수규산, 규산마그네슘, 탭크, 세리사이트, 마이카, 카올린, 벵갈라, 클레이, 벤토나이트, 티탄피막운모, 옥시염화비스무트, 산화지르코늄, 산화마그네슘, 산화아연, 산화티탄, 산화알루미늄, 황산칼슘, 황산바륨, 황산마그네슘, 탄산칼슘, 탄산마그네슘, 산화철, 군청, 산화크롬, 수산화크롬, 칼라민 및 이들의 복합체등의 무기 안료 ; 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리우레탄, 비닐수지, 요소수지, 페놀수지, 불소수지, 규소수지, 아크릴수지, 멜라민수지, 에폭시수지, 폴리카보네이트수지, 디비닐벤젠·스티렌 공중합체, 실크파우더, 셀룰로오스, CI 피그먼트옐로우, CI 피그먼트옐로우, CI 피그먼트옐로우 등의 유기 안료 및 이들의 무기 안료와 유기 안료의 복합 안료 등을 들 수 있다.
- [0066] 유기 분체로서는 스테아르산칼슘 등의 금속비누; 세틸린산아연나트륨, 라우릴린산아연, 라우릴린산칼슘 등의 알킬인산금속염; N-라우로일-베타-알라닌칼슘, N-라우로일-베타-알라닌아연, N-라우로일글리신칼슘 등의 아실아미노산 다가금속염; N-라우로일-타우린칼슘, N-팔미토일-타우린칼슘 등의 아미드술포산 다가금속염; N-엡실론-라우로일-L-리진, N-엡실론-팔미토일리진, N-알파-파리토일올니틴, N-알파-라우로일아르기닌, N-알파-경화우리지방산아실아르기닌 등의 N-아실염기성아미노산; N-라우로일글리실글리신 등의 N-아실폴리펩티드; 알파-아미노카프릴산, 알파-아미노라우린산 등의 알파-아미노지방산; 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 나일론, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리스티렌, 디비닐벤젠·스티렌 공중합체, 사불화에틸렌 등을 들 수 있다.
- [0067] 자외선 흡수제로서는 파라아미노벤조산, 파라아미노벤조산에틸, 파라아미노벤조산아밀, 파라아미노벤조산옥틸, 살리실산에틸렌글리콜, 살리신산페닐, 살리신산옥틸, 살리신산벤질, 살리신산부틸페닐, 살리신산호모멘틸, 계피산벤질, 파라메톡시계피산-2-에톡시에틸, 파라메톡시계피산옥틸, 디파라메톡시계피산모노-2-에틸헥산글리세린, 파라메톡시계피산이소프로필, 디이소프로필·디이소프로필계피산에스테르 혼합물, 우로카닌산, 우로카닌산에틸,

히드록시메톡시벤조페논, 히드록시메톡시벤조페논술폰산 및 그 염, 디히드록시메톡시벤조페논, 디히드록시메톡시벤조페논디술폰산나트륨, 디히드록시벤조페논, 테트라히드록시벤조페논, 4-*tert*-부틸-4'-메톡시디벤조일메탄, 2,4,6-트리아닐리노-*p*-(카르보-2'-에틸헥실-1'-옥시)-1,3,5-트리아진, 2-(2-히드록시-5-메틸페닐)벤조트리아졸 등을 들 수 있다.

- [0068] 살균제로서는 히노키티올, 트리클로산, 트리클로로히드록시디페닐에테르, 크로르헥시딘글루콘산염, 페녹시에탄올, 레조르신, 이소프로필메틸페놀, 아줄렌, 살리칠산, 진크필리티온, 염화벤잘코늄, 감광소 301호, 모노니트로파이어콜나트륨, 운데시렌산 등을 들 수 있다.
- [0069] 산화 방지제로서는 부틸히드록시아니솔, 갈릭산프로필, 엘리스르빈산 등을 들 수 있다.
- [0070] pH 조정제로서는 시트르산, 시트르산나트륨, 말산, 말산나트륨, 프말산, 프말산나트륨, 숙신산, 숙신산나트륨, 수산화나트륨, 인산일수소나트륨 등을 들 수 있다.
- [0071] 알코올로서는 세틸알코올 등의 고급 알코올을 들 수 있다.
- [0072] 또한, 이외에 첨가해도 되는 배합 성분은 이에 한정되는 것은 아니며, 또, 상기 어느 성분도 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 배합 가능하지만, 총중량에 대하여 바람직하게는 0.01-5 %중량, 보다 바람직하게는 0.01-3% 중량으로 배합된다.
- [0073] 본 발명의 화장료는 용액, 유화물, 점성형 혼합물 등의 형상을 취할 수 있다.
- [0074] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 감쪽지 추출물외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함한다.
- [0075] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 용액, 크림, 화장수, 팩, 파운데이션, 로션, 미용액, 모발화장료 등을 들 수 있다.
- [0076] 구체적으로, 본 발명의 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저의 제형을 포함한다.
- [0077] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 진분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리이미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0079] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0080] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0081] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설소숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아מיד, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0082] 본 발명의 감꼭지 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물은 미백효능과 관련된 티로시나제 효소 및 멜라닌 합성 실험에서 강력한 미백활성을 나타냈을뿐만 아니라, 주름생성과 관련된 프로콜라겐 type I 생합성과 MMP-1 활성, TIMP-1의 활성 등에 강력한 억제활성을 나타내 미백 및 주름개선용 약학 및 화장품료 조성물로 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0083] 도 1은 감꼭지 추출물의 유효성분의 분리 및 정제 모식도이며;
- 도 2는 분리된 트리폴린의 화학 구조를 나타낸 도이며;
- 도 3은 감꼭지 용매 분획물의 B16F10 세포에 관한 세포생존율 측정 결과이며;
- 도 4는 감꼭지 용매 분획물의 CCD986sk 세포에 관한 세포생존율 측정 결과이며;
- 도 5는 트리폴린의 B16F10 세포에 관한 세포생존율 측정 결과이며;
- 도 6은 트리폴린의 CCD986sk 세포에 관한 세포 생존율 측정 결과이며;
- 도 7은 감꼭지 용매별 분획물의 tyrosinase 활성 측정 결과이며;
- 도 8은 감꼭지 용매별 분획물의 melanin 생합성 측정 결과이며;
- 도 9은 감꼭지 에틸아세테이트 분획물의 tyrosinase 발현양 측정 결과이며;
- 도 10은 감꼭지 에틸아세테이트 분획물의 TRP-1 발현양 측정 결과이며;
- 도 11은 감꼭지 에틸아세테이트 분획물의 TRP-2 발현양 측정 결과이며;
- 도 12은 트리폴린의 tyrosinase 활성 측정 결과이며;
- 도 13은 트리폴린의 멜라닌 생합성 측정 결과이며;
- 도 14은 트리폴린의 tyrosinase 및 TRP-1 발현 양상 측정 결과이며;
- 도 15는 감꼭지 용매별 분획물의 콜라겐 생합성 측정 결과이며;
- 도 16는 감꼭지 에틸아세테이트 분획물의 MMP-3 발현 양상 측정 결과이며;
- 도 17는 트리폴린의 콜라겐 생합성 측정 결과이며;
- 도 18는 트리폴린의 MMP-1 활성 측정 결과이며;
- 도 19는 트리폴린의 TIMP-1 활성 측정 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0084] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예, 참고예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0085] 실시예 1. 시료 추출

[0086] (주)휴먼허브에서 구입한 감꼭지 5 kg를 분쇄기를 이용하여 잘게 파쇄한 후 70% 에탄올 3 L에 상온에서 3일간 3회 반복 추출한 뒤, 감압농축기(N-1000SW, Eylea, Japan)를 이용하여 에탄올을 제거하여 농축한 조추출물 약 420.6 g(이하 pc-70e)라 함)을 얻었다.

[0087] 이를 물에 현탁하여 이후 용매추출법(solvent extraction method)을 이용하여 극성도가 낮은 n-hexane으로 추출한 후, 다시 ethyl acetate (EtOAc)와 butyl alcohol (BuOH)용매로 순차적으로 추출하였다. 각 용매 추출 분획을 감압 농축하여 n-hexane 가용분획(약 12.6 g, 이하 pc-hex라 함), EtOAc분획(약 50.5 g, 이하 pc-eto라 함), BuOH 분획(약 203.6 g, 이하 pc-buo라 함), H₂O 가용 분획(143.7 g, 이하 pc-wat라 함)을 각각 얻었다.

[0088] 실시예 2. 활성물질 분리

- [0089] 상기 실시예 1의 EtOAc 분획물에 대해 활성-추적 분리법(activity-guided isolation)을 수행하여 활성물질의 분리 정제를 실시하였다(도 1).
- [0090] Ethyl acetate 가용 분획물 중 수용성 분획만을 필터하여 diaion HP-20 (MeOH 60%, (Mitsubishi Chemical Co)) 및 sephadex LH-20 (MeOH 50% (25~100 μ m, pharmacia Fine Chemical Co. Ltd))의 조건으로 분리 후에 prep-LC(Waters, Eschborn, Germany) MeOH 40%, ODS, 5 μ m, Φ 2 x 25 cm)로 정제하여 하기 물성치를 나타내는 순수한 노란색의 분말의 화합물 A를 얻었고 이를 트리폴린(trifolin)으로 동정하였다(도 2).
- [0091] TLC Rf= 0.60 (silica gel 60 RP-18 F254 plate; MeOH 30%, 254nm)
- [0092] $^1\text{H-NMR}$ (CD3OD, 400MHz) δ 7.05(d, J=8.0 Hz), 6.82(d, J=8.8Hz), 6.75(d, J=1.6 Hz), 6.65(dd, J=2.0, 8.4 Hz), 6.61(d, J=2.03-2.67(dd, =1.6 Hz), 6.59(d, J=1.6 Hz), 4.86(d, J=4.0), 4.18(dd, J=4.0, J=4.8Hz), 4.69(q, J=14.0), 3.84(d, J=0.8), 3.79(s), 3.75(s), 3.71-3.68(m), 3.49-3.46(m), 3.41-3.39(m), 3.35-3.31(m), 3.30-2.85(m), 2.83-2.67(dd, J=1.0, 5.2 Hz), 2.57-2.55(m),
- [0093] $^{13}\text{C-NMR}$ (CD3OD, 100MHz) δ 181.23, 149.49, 149.31, 145.69, 133.08, 131.56, 121.81, 120.92, 116.70, 113.64, 112.45, 111.91, 76.99, 76.66, 73.74, 71.73, 70.16, 61.34, 55.53, 55.34, 46.40, 41.32, 37.72, 34.23
- [0094] **참고예 1. 실험 준비**
- [0095] 콜라겐 생합성 측정에 사용된 시약은 프로콜라겐 type I C-peptide EIA kit (MK101, Takara bio, Japan)을 구입하여 사용하였고, MMP-1과 TIMP-1을 측정하기 위해 사용한 kit는 Amersham Bioscience(RPN2610, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. Tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 Sigma Chemical Co. (T0157, St.Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 본 연구에 사용한 human fibroblast세포로 CCD986sk는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양에 사용한 시약은 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), 0.25% trypsin, 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin(100U/mL)은 hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하여 배양하였다. 세포 생존률 측정에 사용된 시약은 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (M2003, St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한, 미백효능을 측정하기 위해 티로시나아제 활성측정에 사용된 시약 L-DOPA는 Sigma Chemical Co. (D9628, St.Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 본 연구에 사용한 melanoma세포로 B16F10은 ATCC에서 구입하여 사용하였다.
- [0096] **실험예 1. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정**
- [0097] 상기 실시예에서 얻은 시료의 세포생존율을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Carmichael J, Defraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 47: 936-942.)
- [0098] 참고예 1의 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well이 되게 180 μ L 씩 분주하고, 시료를 농도 별로 조제하여 20 μ L 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 20 μ L를 첨가하여 3시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 후에 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 하기 수학적 1에 따라 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

수학식 1

$$\text{세포 생존률(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

[0099]

[0100]

상기 실험 결과, 감꼭지 분획물에 대한 B16F10세포와 CCD986sk 세포에 대한 감꼭지 추출물, 분획물을 농도별로 처리한 후 세포생존율을 측정된 결과, 5 µg/mL 이상의 농도에서 독성을 보여 1, 5 µg/mL 농도로 실험을 진행하였다(도 3 및 도 4).

[0101]

감꼭지에서 분리한 trifolin을 각 세포의 증식에 미치는 영향을 알아본 결과는 도 5 및 도 6과 같다. CCD986나 세포에 대한 trifolin을 1, 5, 10 µM에서 시험한 결과, 90% 이상의 생존율이 관찰된 1, 5 µM의 농도에서 실험을 진행하였고, B16F10 세포에 대해 trifolin을 1, 5, 10 µM의 농도를 처리하여 실험을 진행하였다.

[0102]

실험예 2. 티로시나아제 활성 측정

[0103]

상기 실시예에서 얻은 시료의 티로시나아제 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(7).

[0104]

B16F10 멜라노마 세포(melanoma cell)를 6 well에 5×10^4 cell이 되도록 접종하여 배양하고, 24시간 뒤 각 well에 시료를 48시간 동안 처리한다. 처리 후 PBS로 2회 세척한 후에 각 well의 세포에 lysis buffer(1% triton X-100, 0.1 M Sodium phosphate buffer, 50 mM PMSF, pH 6.8)를 가하였다. 얼음 위에서 세포를 파괴시키고 원심 분리한 후 상층액만 따로 모아 효소용액으로 사용하였다. L-DOPA를 2 mg/mL 농도로 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 기질을 준비하고 기질 160 µL 에 효소용액 40 µL 를 가하고 37°C에서 1시간 가온하고 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정된 후 하기 수학식 2에 따라 효소활성 억제율을 계산하였다.

수학식 2

$$\text{효소활성 억제율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \right) \times 100$$

[0105]

[0106]

티로시나아제의 활성은 멜라노솨에서 멜라닌이 생성되게 하는 효소로써 피부노화 촉진 및 색소 침착 등의 문제를 야기시킬 수 있다(8). 미백효능을 나타낸 감꼭지의 70% EtOH추출물을 유기 용매 별로 순차 추출하여 활성을 관찰하였을 때, EtOAc 분획물이 대조군에 비해 tyrosinase와 melanin 생합성량이 감소하였다(도 7 및 도 8). 미백효능이 있는 EtOAc 분획물을 western blot을 이용하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현 양상을 측정된 결과, 감꼭지 EtOAc 분획물 5 µg/mL에서 tyrosinase 발현이 무첨가군 보다 42% 저해하였고, kojic acid는 40% 로 거의 비슷하게 억제되었다(도 9, 도 10 및 도 11 참조).

[0107]

이와 같은 결과를 바탕으로 EtOAc에서 분리된 trifolin첨가 하였을 때 tyrosinase 활성 측정 결과, 시료의 처리 농도가 높아질수록 티로시나아제 활성이 억제됨을 확인할 수 있었다(도 12 참조).

[0108]

Trifolin 첨가에 따라 10 µM의 농도에서 11%의 활성 억제가 관찰되었다. α-MSH는 tyrosinase의 활성을 자극시키는 호르몬으로 멜라닌 합성에 관여하는 tyrosinase, TRP-1에 작용하여 eumelanin을 합성에 깊이 관여하고 있다.

[0109]

이 중 TRP-1은 tyrosinase related protein 으로 알려져 있는 단백질로서 DHICA(5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)를 흑갈색을 나타내는 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화하는 효소로서 TRP-1 발현을 억제하면 미백효과를 기대할 수 있다.

[0110]

Trifolin의 멜라닌 생성 억제 효과를 분석하기 위해 tyrosinase, TRP-1의 유전자발현 양상을 관찰하였다(도 13

및 도 14 참조). 이때 세포의 여러 조건에서도 발현 정도가 차이가 없는 house keeping gene인 GAPDH를 loading control로 사용하였다. Tyrosianse에 관한 trifolin은 10 μM의 농도에서 2% 저해하였고, TRP-1은 발현에는 영향을 미치지 않았다.

[0111] **실험예 3. 멜라닌 생합성 활성 측정**

[0112] 상기 실시예에서 얻은 시료의 피부 멜라노마 세포로부터의 멜라닌 생합성 저해 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 수행하였다.

[0113] DMEM 배지로 배양된 멜라노마 세포를 100 mm 배양 디쉬(culture dish)에 2×10^6 cell/dish가 되게 분주하고 24시간 배양 후 시료를 농도별로 조제하여 2 mL 첨가하고, 48시간 후에 인산완충액(pH7.4)으로 세척하였다. 그 다음 0.25M trypsin-EDTA 용액으로 세포를 탈착한 후 수확한 세포를 1×10^6 세포 당 1 mL의 5% TCA로 처리하고, 2,500rpm으로 2회 원심분리한 후 분리된 melanin을 인산완충액으로 세척한 뒤 ether : ethanol (1:3) 1 mL를 가하여 2회 원심분리 한 후 ether 1 mL로 세척 건조시켰다. 건조된 melanin에 1N NaOH를 1 mL 가하여 80°C에서 1시간 반응시킨 후 분광 광도계 405nm에서 흡광도를 측정하였다. Melanin 생합성 저해는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

[0114] 피부 흑화는 피부에 존재하는 멜라노사이트가 UV 노출 등의 외부적 환경에 대응하여 멜라닌의 생성이 증가한다. 멜라닌 생합성으로 인한 색소 침착을 치유하기 위해 멜라닌 생성을 억제하는 하이드로퀴논 등의 페놀 유도체나, 아스코르빈산과 그 유도체 및 코직산, 알부틴, 락틴산, 글루코사민 등이 개발되었으나, 피부 저자극성이나 안정성에 문제가 있어 극히 제한된 양만 사용되고 있다. 감쪽지의 용매별 분획물의 멜라닌 생합성 측정을 확인한 결과(도 8), EtOAC layer > hexane layer > BuOH layer > water layer 순으로 활성을 보였으며, EtOAC 분획물에서 분리된 Trifolin의 멜라닌 합성을 확인한 결과, 10 로 처리하였을 때 멜라닌 합성이 대조군에 비해 18% 억제되는 효과를 관찰하였다(도 13참조).

[0115] **실험예 4. 프로콜라겐 type-I 생합성 측정**

[0116] 상기 실시예에서 얻은 시료의 프로콜라겐 type-I 생합성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 수행하였다.

[0117] 세포(ATCC)를 1×10^4 cells/well 농도로 96well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 첨가하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이렇게 실험한 세포의 배양액을 모아 실험에 사용하였다. 세포 배양액 내 콜라겐 생합성 정도는 프로콜라겐 type-IC peptide(PIP) EIA kit (Takara Bio, Japan)을 사용하여 프로펩티드의 양을 측정하였다.

[0118] 진피층은 90%가 콜라겐으로 구성되어 있어 콜라겐의 감소는 피부노화와 밀접한 관계를 가지고 있다. 특히 진피층에는 콜라겐 type I, III, IV, V가 가장 많고, type V는 type I과 III은 혼합물 형태로 존재하며 이들은 프로콜라겐이라는 전구물질의 형태로 합성된다. 프로콜라겐은 아미노 말단과 카르복시 말단에 프로펩티드라는 펩티드 염기서열을 포함한다. 프로펩티드는 소포체내에서 프로콜라겐 분자의 접힘을 도와줌과 동시에 콜라겐 중합 반응이 일어날 때 콜라겐 분자로부터 절단, 분리된다고 알려져 있다. 그래서 프로펩티드의 양을 측정함으로써, 세포 내에서의 콜라겐 생합성 정도를 파악할 수 있다. 주름개선 활성을 나타낸 감쪽지의 70% EtOH 추출물을 유기 용매 별로 순차 추출하여 활성을 관찰하였을 때, EtOAC 분획물이 대조군에 비해 콜라겐 생합성량이 증가하였다(도 15). 추출물과 분획물의 콜라겐 생합성 측정 결과를 바탕으로 각종 column chromatography를 이용한 activity-guided isolation을 수행하였다. 감쪽지 추출물로부터 분리된 trifolin을 처리하여 배양했을 때 콜라겐 생합성량을 조사한 결과는 (도 17)과 같다. 실험 결과 trifolin의 경우 5 μM의 농도에서 시료를 처리하지 않는 군에 비해 약 37% 유의차 있게 증가한 것을 확인 하여 콜라겐 생합성능력이 뛰어난 것으로 확인하였다.

[0119] **실험예 5. MMP-1 저해활성 측정**

[0120] 상기 실시예에서 얻은 시료의 MMP-1 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 수행하였다.

[0121] 세포(ATCC)를 1×10^4 cells/well 농도로 96 well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 첨가하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이때 MMP-1의 활성을 높이기 위하여 TNF- α 를 10 ng/mL의 농도로 첨가하였다. 세포의 배양액을 수거하여 실험에 사용하였으며 Gross B.E. 등의 방법에 따라 키트(matrix metalloproteinase-1 biotrack activity assay kit(RPN2610, NJ, USA)을 이용하여 측정하였다.

[0122] 체내에서 생성되는 수종의 MMPs 가운데 MMP-1은 콜라겐에 특이적으로 작용하는 protease로서 MMP-1의 활성을 억제하여 콜라겐의 분해를 감소시키면, 피부조직의 탄력을 유지하고 주름생성을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0123] 감쪽지로부터 분리된 trifolin을 처리하였을 때 MMP-1의 농도를 측정한 결과는 도 18과 같다. TNF- α 를 처리한 군이 처리하지 않은 군에 비해 37%의 MMP-1을 생산하여 TNF- α 를 처리함으로써 MMP-1양이 활성화됨을 확인할 수 있었다. Trifolin의 경우 5 M의 농도에서 대조군에 비해 MMP-1 활성을 32% 저해시키는 것을 확인하였다.

[0124] **실험예 6. TIMP-1 저해활성 측정**

[0125] 상기 실시예에서 얻은 시료의 TIMP-1 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 수행하였다

[0126] 세포(ATCC)를 1×10^4 cells/well 농도로 96well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 첨가하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이때 MMP-1의 활성을 높이기 위하여 TNF- α 를 10 ng/mL의 농도로 첨가하였다. 세포의 배양액을 수거하여 실험에 사용하였으며 키트(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 biotrack activity assay kit(RPN2611, NJ, USA)을 이용하여 측정하였다.

[0127] TIMP(tissue inhibitor of metalloprotease)는 세포의 기질금속단백질 분해효소(MMP)의 활성이 억제되는 것으로 알려져 있다. Trifolin의 TIMP-1활성을 측정한 결과는 도 19과 같다. TNF- α 에 의해 활성화된 세포에 비해 자극 시키지 않은 세포에서는 TIMP-1이 145% 증가하여 TIMP-1의 활성이 증가하였고, 5 M의 농도에서 185%로 증가함을 관찰하였다. 양성 대조군으로 사용한 EGCG의 경우 5 M의 농도에서 159% 증가하여 trifolin이 EGCG보다 TIMP-1 활성을 증가시키는 것을 확인하였다.

[0128] **실험예 7. Western blot을 통한 단백질의 발현 측정**

[0129] 상기 실시예에서 얻은 시료의 Western blot을 통한 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 수행하였다.

[0130] 세포(ATCC)를 6 well에 1×10^5 cells/well에 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 각 cell에 시료를 농도별로 48시간 동안 처리한다. 48시간 배양한 후 PBS로 세척하였다. Lysis buffer 50 μ L를 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리하여(12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 20min) 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 BCA(bicinchoninic acid) kit assay로 정량하였으며, 20 μ g의 단백질을 10%의 SDS-PAGE를 이용하여 전기영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 PVDF membrane에 옮긴 다음 400 mV에서 2시간 transfer하였다. Transfer가 끝난 membrane은 5% skim milk로 1시간 동안 blocking을 한 뒤 1차 antibody를 3% skim milk로 1:1000 희석하여 사용하고 overnight한다. tris-buffered saline 및 tween 20 (TBST)로 3번 세척한 뒤 2차 antibody를 3% skim milk로 1:1000비로 희석하여 1시간 동안 붙이고 TBST로 3번 세척한 뒤 키트(enhanced chemiluminescence(ECL) kit; Milipore, Germany)를 이용하여 발현 양상을 측정하였다. Band density는 Gel doc(Amersham Pharmacia, England)을 이용하여 확인하였다.

[0131] 상기 실험 결과, 각 분획물에 대해 피부노화와 관련이 있는 프로콜라겐 type-1 synthesis을 측정한 결과, EtOAC 분획층이 활성이 가장 우수하였고 (도 15) 이를 토대로 MMP-3의 단백질 발현 측정을 시행한 결과, 양성 대조군인 EGCG보다 강한 활성을 보였다 (도 16). 또한, 미백효능을 측정을 위해 tyrosinase와 melanin을 측정한 결과 (도 12 및 도 13), 주름 효능 결과와 마찬가지로 EtOAC 분획물이 효과가 가장 뛰어났고, 이를 western blot을 이용하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2를 측정한 결과(도 9, 도 10, 및 도 11), 5 μ g/mL의 농도에서 kojic acid와 비슷한 효능이 관찰되었다. 감쪽지 추출물에서 분리한 trifolin의 경우 대조군에 비해 프로콜라겐 type I 합성과 MMP-1 저해활성, TIMP-1의 활성 결과가 우수하였다. 이와 같은 결과를 통해 감쪽지 추출물 및 이로부터 분리한 트리폴린을 이용하여 미백 및 주름개선 소재로 개발할 수 있을 것으로 사료 된다.

[0132] 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0133] 이하, 본 발명의 제형예로서 크림, 마사지크림, 로션, 스킨로션, 에센스, 팩, 클렌징폼의 제형을 예시하고 있으나, 본 발명의 화장품 조성물을 포함하는 제형은 이에 한정되는 것은 아니다.

[0134] **제형예 1. 크림조성물**

[0135] 유상과 수상을 각각 75 ℃로 가열 혼합한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	1.0
2	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	1.0
3	친유형 모노스테아린산 글리세린	2.5
4	마이크로 스탈린 납	2.0
5	파라옥시안식향산메틸	0.2
6	파라옥시안식향산프로필	0.1
7	밀납	2.0
8	모노스테아린산 폴리에틸렌글리콜	2.0
9	모노스테아린산 소르비탄	1.0
10	트리 (카프릴, 카프린산) 글리세린	5.0
11	액상 리놀린	5.0
12	미리스틴산 옥틸도데실	8.0
13	스쿠알란	8.0
14	농글리세린	5.0
15	1,3-부틸렌글리콜	5.0
16	알란토인	0.1
17	pc-70e	10.0
18	향료	미량
19	황색4호	미량
20	정제수	잔량

[0136]

[0137] **제형예 2. 마사지크림 조성물**

[0138] 유상과 수상을 각각 75 °C로 가열 용해 혼합한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	2.0
2	친유형 모노스테아린산 글리세린	2.5
3	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	1.5
4	파라옥시안식 향산메틸	0.2
5	파라옥시안식 향산프로필	0.1
6	바셀린	3.5
7	모노스테아린산 폴리에틸렌글리콜	3.5
8	세스퀴올레인산 소르비탄	1.8
9	유동 파라핀	35.0
10	트리 (카프릴, 카프린산) 글리세린	3.0
11	옥틸도데칸올	5.0
12	스쿠알렌	2.0
13	농글리세린	5.0
14	pc-hex	5.0
15	히아루로닉애씨드추출물	1.0
16	향료	미량
17	정제수	잔량

[0139]

[0140] 제형예 3. 로션 조성물

[0141] 유상과 수상을 각각 75 °C로 가열 혼합 유화한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	2.0
2	스테아린산	1.0
3	친유형 모노스테아린산 글리세린	1.0
4	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	2.0
5	바셀린	1.0
6	모노스테아린산 폴리에틸렌글리콜	1.5
7	세스퀴올레인산 소르비탄	1.0
8	유동 파라핀	5.0
9	스쿠알렌	5.0
10	파라옥시안식향산프로필	0.2
11	파라옥시안식향산메틸	0.2
12	농글리세린	5.0
13	pc-eto	15.0
14	트리에탄올아민	0.5
15	카르복시비닐폴리머	0.2
16	향료	미량
17	정제수	잔량

[0142]

[0143] 제형예 4. 스킨로션 조성물

[0144] 수상과 에탄올상을 각각 제조 혼합한 후 여과한다.

번호	원료명	중량 %
1	글리세린	2.0
2	1,3-부틸렌글리콜	2.0
3	구연산	0.01
4	에탄올	15.0
5	폴리옥시에틸렌경화피마자유	1.0
6	pc-buo	25.0
7	향료	미량
8	위치하젤추출물	1.0
9	정제수	잔량

[0145]

[0146] 제형예 5. 에센스 조성물

[0147] 수상과 에탄올상을 각각 제조 혼합한 후 여과한다.

번호	원료명	중량 %
1	농글리세린	15.0
2	1,3-부틸렌글리콜	5.0
3	알란토인	0.1
4	에탄올	7.0
5	파라옥시안식향산메틸	0.15
6	트리에탄올아민	0.15
7	폴리옥시에틸렌경화피마자유	1.0
8	초산토코페롤	0.5
9	카르복시비닐폴리머	0.15
10	pc-wat	30.0
11	향료	미량
12	정제수	잔량

[0148]

[0149] 제형예 6. 팩 조성물

[0150] 수상과 에탄올상을 각각 분산 용해하여 혼합시킨 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	폴리비닐알코올	15.0
2	카르복시메틸셀룰로오스나트륨	0.3
3	농글리세린	3.0
4	알란토인	0.1
5	에틸렌디아민테트라초산디나트륨	0.01
6	폴리에틸렌글리콜	1.0
7	에탄올	6.0
8	파라옥시안식향산메틸	0.15
9	타라옥시안식향산프로필	0.05
10	디엘판테놀	0.1
11	폴리옥시에틸렌 (12) 노닐페닐에테르	0.5
12	pc-70e	45.0
13	향료	미량
14	정제수	잔량

[0151]

[0152] 제형예 7. 클렌징폼 조성물

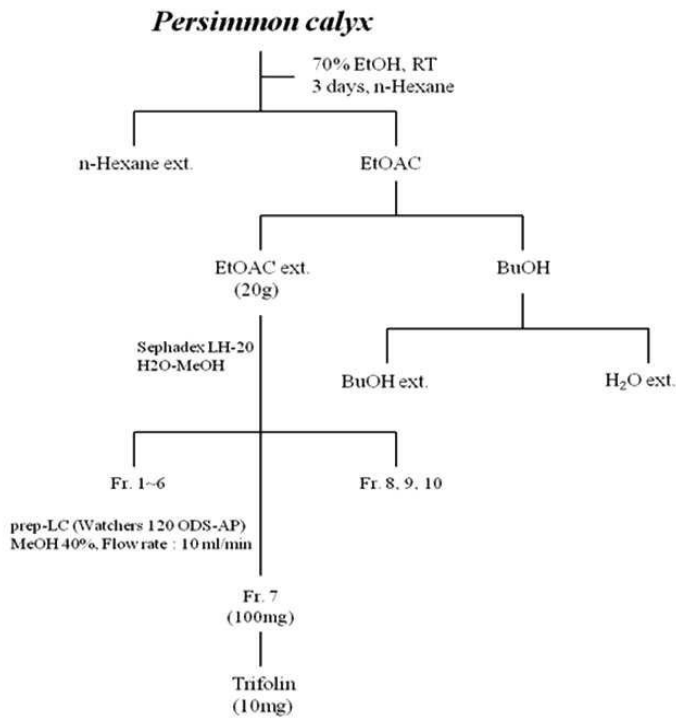
[0153] 수상과 오일상을 각각 분산 용해하여 혼합 검화한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	스테아린산	6.5
2	미리스틴산	28.0
3	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	3.0
4	프로필렌 글리콜	5.0
5	농글리세린	10.0
6	수산화나트륨	7.0
7	에틸렌디아민테트라초산나트륨	0.1
8	태반 추출물	0.5
9	pc-hex	15.0
10	향료	미량
11	정제수	잔량

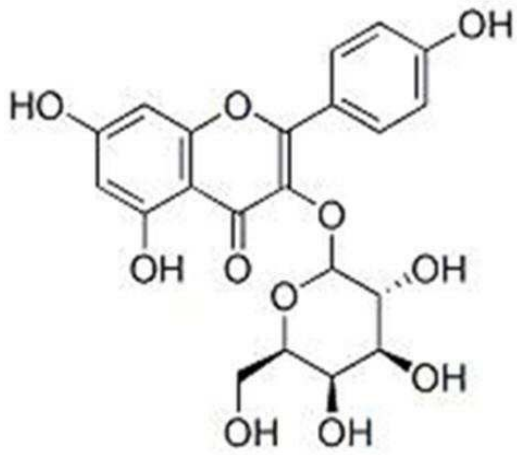
[0154]

도면

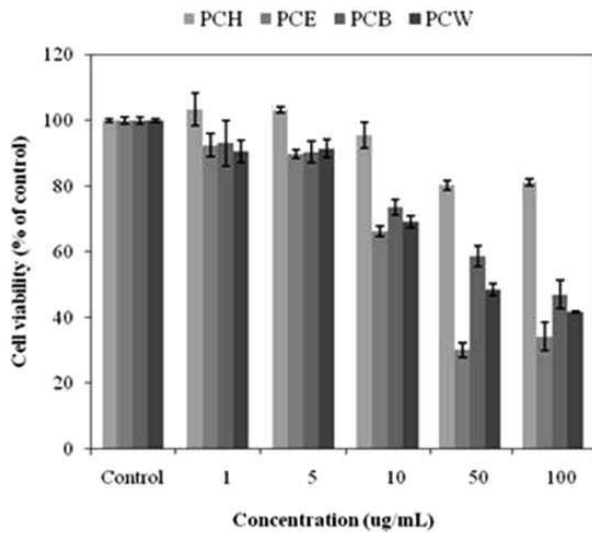
도면1



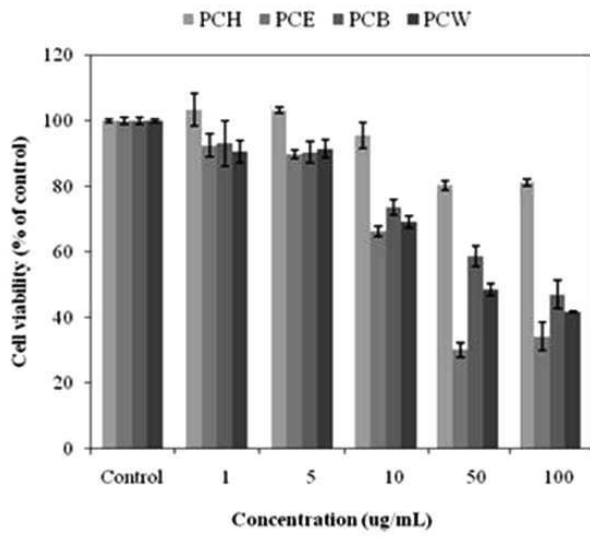
도면2



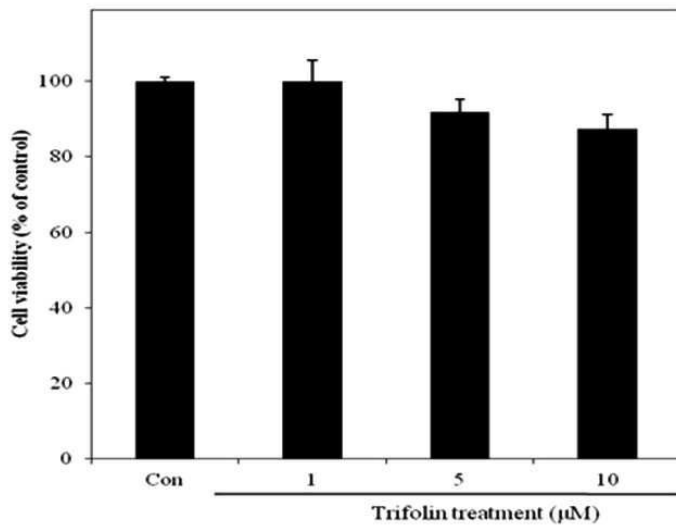
도면3



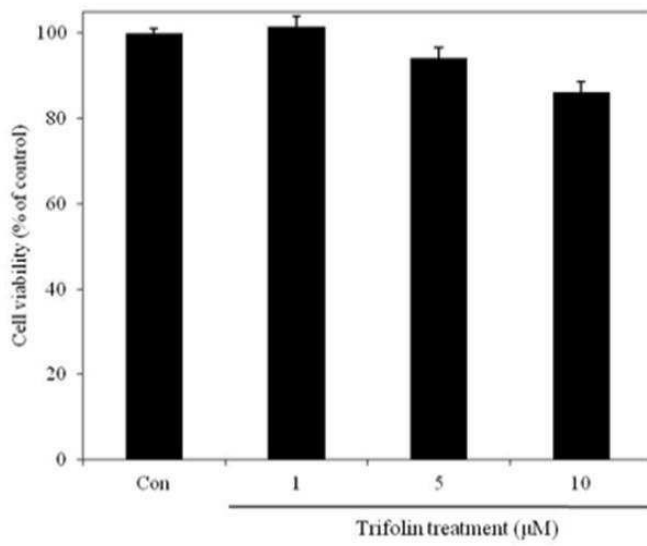
도면4



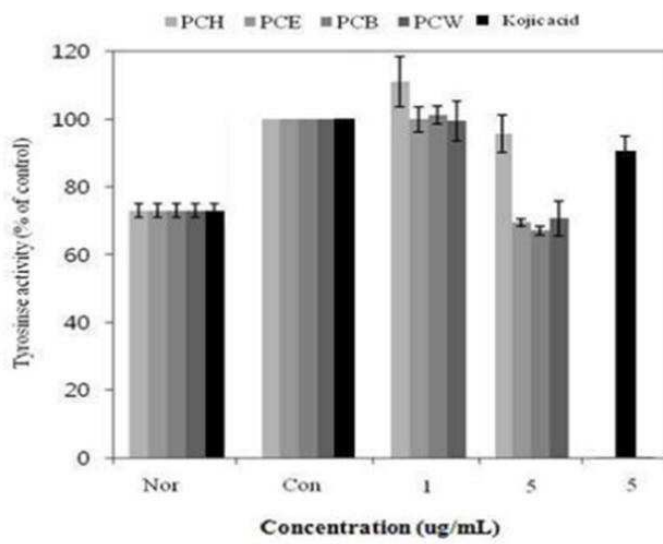
도면5



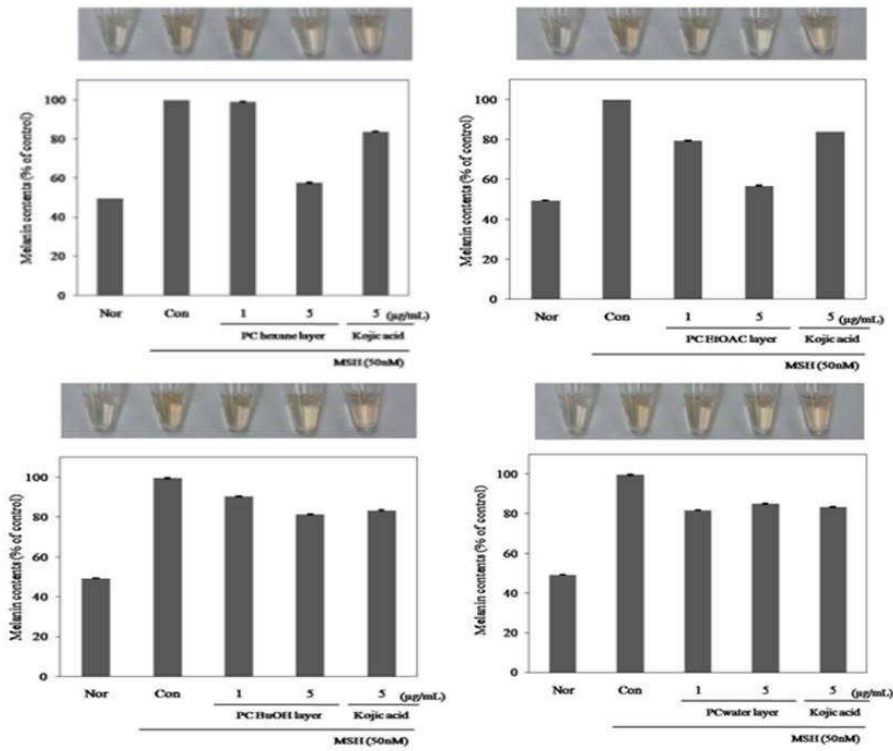
도면6



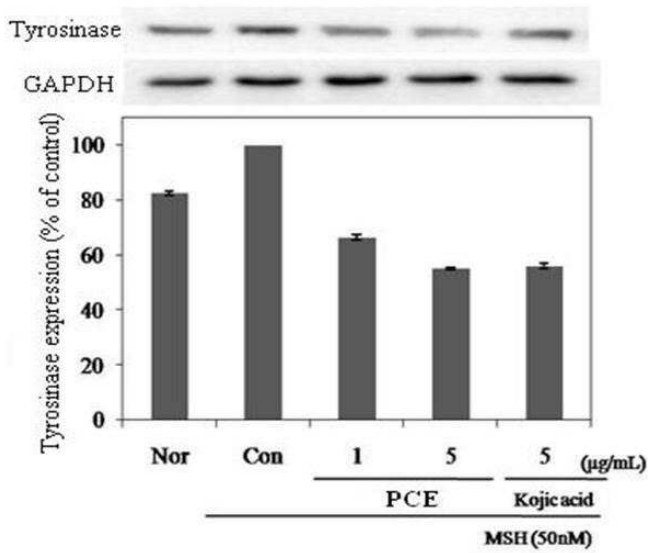
도면7



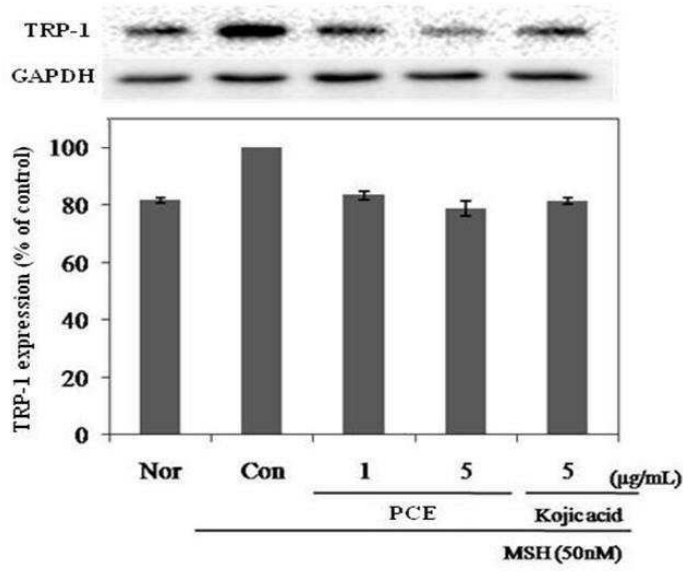
도면8



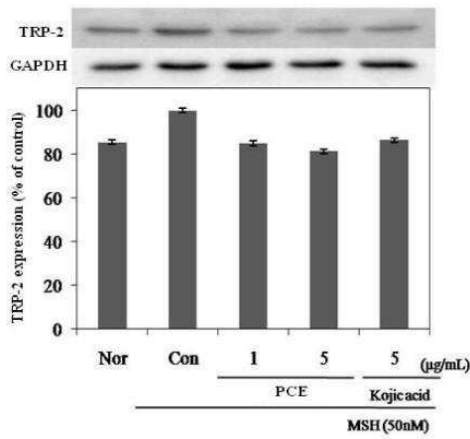
도면9



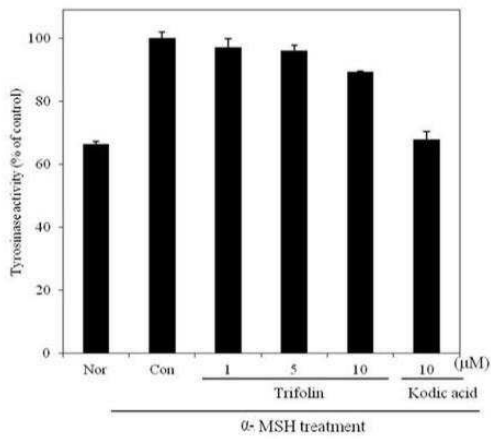
도면10



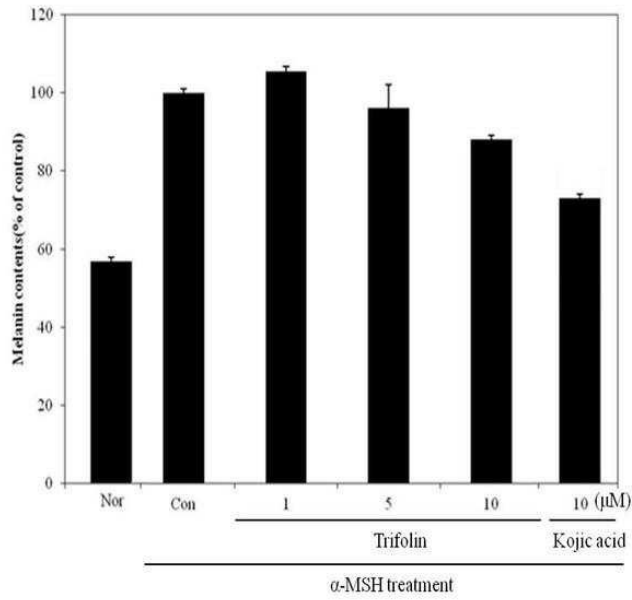
도면11



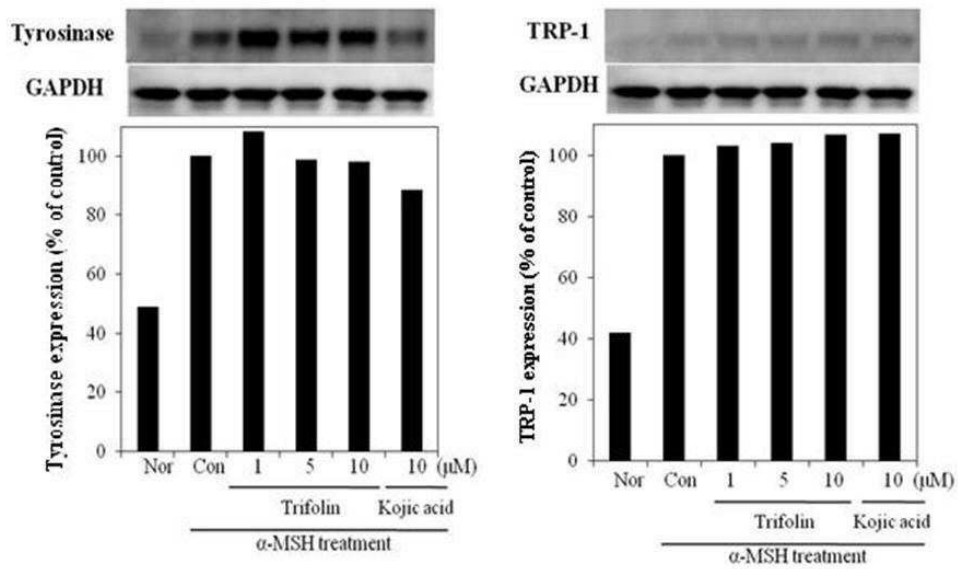
도면12



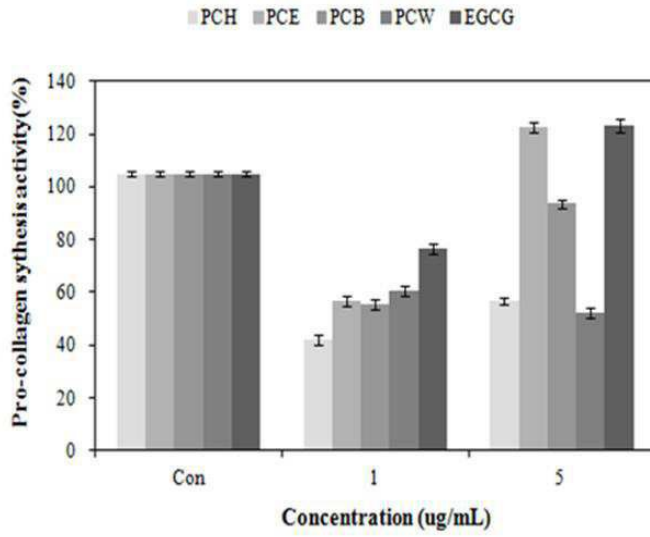
도면13



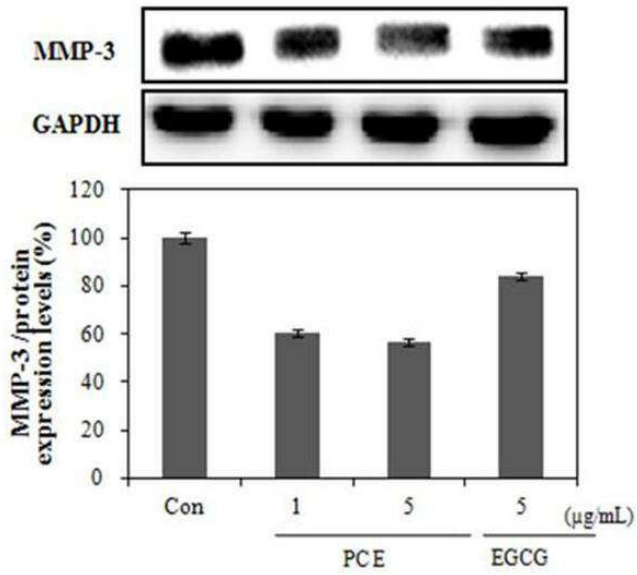
도면14



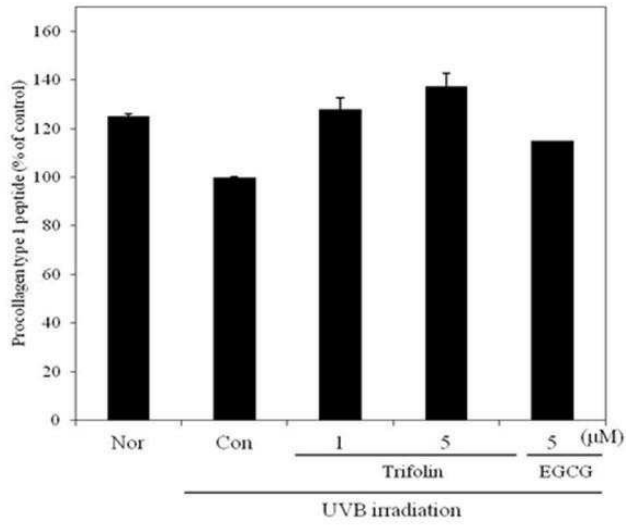
도면15



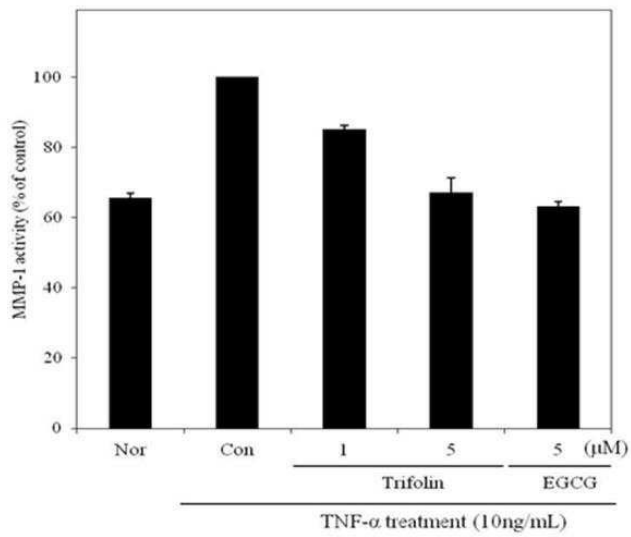
도면16



도면17



도면18



도면19

