



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년11월20일
(11) 등록번호 10-1570346
(24) 등록일자 2015년11월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/41 (2006.01) A61K 8/30 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-0092815(분할)
(22) 출원일자 2013년08월05일
심사청구일자 2013년08월05일
(65) 공개번호 10-2014-0104886
(43) 공개일자 2014년08월29일
(62) 원출원 특허 10-2013-0016795
원출원일자 2013년02월18일
심사청구일자 2013년02월18일
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020050091116 A*
US20070183996 A1*
Areej Mohammad Al-Taweel et al., Molecules, 17, pp2675-2682, 2012*
박수남, 대한화장품학회지, 25(2), pp77-127, 1999*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
주식회사 내추럴솔루션
인천광역시 남동구 능허대로 729, 504호 (고잔동)
- (72) 발명자
장문식
경기도 수원시 장안구 금당로39번길 34, 조원주공
아파트 214동 804호 (조원동)
정육순
서울 송파구 올림픽로 435, 312동 2003호 (신천동, 파크리오)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
이덕록

전체 청구항 수 : 총 4 항

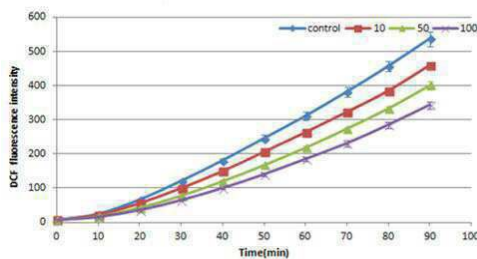
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 N-feruloyltyramine을 함유하는 항산화, 항염증 및 주름 개선용 화장품 및 건강기능식품 조성물

(57) 요약

본 발명은 항염 또는 항주름 활성을 가지는 구기자 나무가지 추출물과 그의 분획물 및 상기 구기자 나무가지 추출물로부터 유효성분들을 분리정제동정하여 이들을 유효성분으로 함유하는 항산화, 항노화, 항염 또는 항주름 활성을 갖는 화장품 또는 건강기능식품 조성물을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도12



(72) 발명자

엄선영

경기 수원시 권선구 동수원로145번길 24, 201동
1201호 (권선동, 수원아이파크시티2단지)

문미연

제주 제주시 진군3길 15-34, 301호 (노형동)

임준환

제주 제주시 비룡1길 5, (용담일동)

김영훈

서울 서초구 서초중앙로24길 43, 104동 801호 (서
초동, 유원아파트)

이하연

경기 성남시 중원구 금빛로59번길 17, 401호 (금광
동, 와이드빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S2063192

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업청

연구사업명 융복합기술개발사업

연구과제명 친환경 구기자를 이용한 유기농 기능성 원료 개발

기여율 1/1

주관기관 중소기업기술정보진흥원

연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

구기자나무 가지 줄기분말의 에탄올 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차적으로 용매 분획하여 얻은 클로로포름 분획물을 유효성분으로 함유하는 향염 및 피부 주름 개선 기능성 화장품 조성물.

청구항 2

구기자나무 가지 줄기분말의 에탄올 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차적으로 용매 분획하여 얻은 클로로포름 분획물을 유효성분으로 함유하는 향염 기능성 식품 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 조성물은 캡셀제, 환제, 과립제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가지는 것을 특징으로 하는 향염 기능성 식품 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 조성물은 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것이 특징인 향염 기능성 식품 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 N-feruloyltyramine을 함유하는 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 구기자 나무가지 추출물, 이의 분획물 또는 구기자 나무가지 추출물 유래 유기화합물을 유효성분으로 함유하는 향산화, 향염증 및 주름 개선용 화장품 및 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 화장품산업은 지속적으로 성장하고 있는 산업으로 특히 기능성 화장품의 성장이 눈에 띄게 높아지고 있다. 상기 기능성 화장품 중에서도 피부노화 개선 및 주름개선용 기능성 화장품 시장은 성장률이 가장 높게 나타나는 분야이고 이에 따라서 피부노화, 향산화, 주름개선용 기능성 화장품의 소재 개발도 활발하게 이루어지고 있는 실정이다.

[0003] 국민의 경제적 수준이 향상되고 양보다는 질을 추구하는 소비형태의 변화에 따라 안전성에 대한 소비자의 관심이 높아지면서 천연물을 원료를 사용하고, 합성 소재의 사용은 최소화한 화장품에 대한 수요가 빠른 속도로 증가하고 이로 인하여 상기 피부노화, 향산화, 주름개선용 기능성 화장품 소재의 개발은 화학성분보다 천연물 소재를 중심으로 이루어지고 있으며 이러한 천연물 소재를 유효성분으로 함유한 기능성 화장품의 이미지는 소비자에게 매우 친환경적으로 각인되고 있다.

[0004] 그러나, 천연물 소재는 재배, 보관에 따라 성분 및 품질의 동질성 확보가 어렵고, 그 결과 유효성분의 함량이 균일하지 않을 수 있으며, 유효성분 또는 약리작용 성분이 불분명하다는 단점이 있다.

[0005] 따라서 기능성 화장품의 천연물소재 개발에 있어 무엇보다 중요한 것은 천연물 또는 천연추출물에 함유된 여러 성분들 중에 효과가 검증된 단일화합물을 동정하고, 그 유효성분의 효능을 검증함으로써 상기 유효성분을 함유

하는 화장료 조성물의 개발이 시급한 실정이다.

[0006] 구기자는 가지과의 구기자속의 목본식물로 우리나라를 비롯한 중국, 대만, 일본, 유럽 등지에 자생하거나 재배되고 있는 생약재이다. 구기자는 열매, 잎, 뿌리를 부위별로 이용하며, 상기 구기자 열매, 잎, 뿌리 등에는 베타인(betaine), 루틴(rutin), 쿠코아민 A(kukoamine A), 베타시토스테롤(-sitosterol)과 같은 기능성 성분이 다량 함유되어 있다. 그 밖에도 비타민 A, B1, B2, C 칼슘, 인, 철, 아연, 니코티닉산(nicotinic acid) 등 영양분을 풍부하게 함유하고 있다.

[0007] 대한민국 공개특허 제10-2004-0095948호에는 구기엽 열수추출물의 체중감량효과에 대해서 개시하고 있으며, 또 대한민국 공개특허 제10-2004-0095947호에는 구기엽 분말과 인삼 분말을 혼합하여 체중감량 효과를 증대시키는 조성물에 관한 내용을 개시하고 있다. 그러나 상기 문헌들에는 구기자 나무가지 추출물 또는 이로부터 분리된 특정 단일 화합물을 포함하는 항산화, 항염증 또는 주름개선용 기능성 화장품 조성물에 대해서는 암시되거나 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 화장품산업은 지속적으로 성장하고 있는 산업으로 특히 기능성 화장품의 성장이 눈에 띄게 높아지고 있다. 상기 기능성 화장품 중에서도 피부노화 개선 및 주름개선용 기능성 화장품 시장은 성장률이 가장 높게 나타나는 분야이고 이에 따라서 피부노화, 항산화, 주름개선용 기능성 화장품의 소재 개발도 활발하게 이루어지고 있는 실정이다.

[0009] 국민의 경제적 수준이 향상되고 양보다는 질을 추구하는 소비형태의 변화에 따라 안전성에 대한 소비자의 관심이 높아지면서 천연물을 원료를 사용하고, 합성 소재의 사용은 최소화한 화장품에 대한 수요가 빠른 속도로 증가하고 이로 인하여 상기 피부노화, 항산화, 주름개선용 기능성 화장품 소재의 개발은 화학성분보다 천연물 소재를 중심으로 이루어지고 있으며 이러한 천연물 소재를 유효성분으로 함유한 기능성 화장품의 이미지는 소비자에게 매우 친환경적으로 각인되고 있다.

[0010] 그러나, 천연물 소재는 재배, 보관에 따라 성분 및 품질의 동질성 확보가 어렵고, 그 결과 유효성분의 함량이 균일하지 않을 수 있으며, 유효성분 또는 약리작용 성분이 불분명하다는 단점이 있다.

[0011] 따라서 기능성 화장품의 천연물소재 개발에 있어 무엇보다 중요한 것은 천연물 또는 천연추출물에 함유된 여러 성분들 중에 효과가 검증된 단일화합물을 동정하고, 그 유효성분의 효능을 검증함으로써 상기 유효성분을 함유하는 화장료 조성물의 개발이 시급한 실정이다.

[0012] 구기자는 가지과의 구기자속의 목본식물로 우리나라를 비롯한 중국, 대만, 일본, 유럽 등지에 자생하거나 재배되고 있는 생약재이다. 구기자는 열매, 잎, 뿌리를 부위별로 이용하며, 상기 구기자 열매, 잎, 뿌리 등에는 베타인(betaine), 루틴(rutin), 쿠코아민 A(kukoamine A), 베타시토스테롤(-sitosterol)과 같은 기능성 성분이 다량 함유되어 있다. 그 밖에도 비타민 A, B1, B2, C 칼슘, 인, 철, 아연, 니코티닉산(nicotinic acid) 등 영양분을 풍부하게 함유하고 있다.

[0013] 대한민국 공개특허 제10-2004-0095948호에는 구기엽 열수추출물의 체중감량효과에 대해서 개시하고 있으며, 또 대한민국 공개특허 제10-2004-0095947호에는 구기엽 분말과 인삼 분말을 혼합하여 체중감량 효과를 증대시키는 조성물에 관한 내용을 개시하고 있다. 그러나 상기 문헌들에는 구기자 나무가지 추출물 또는 이로부터 분리된 특정 단일 화합물을 포함하는 항산화, 항염증 또는 주름개선용 기능성 화장품 조성물에 대해서는 암시되거나 개시된 바 없다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 상기 목적은, 구기자 나무가지 에탄올추출물을 수득하고 이로부터 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 유기용매분획을 수행하는 단계와; 상기 단계에서 수득한 구기 나무가지 에탄올추출물, 헥산, 클로로

포름, 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물의 성분분석을 수행하고 이로부터 유효활성물질을 분리정제동정하는 단계와; 상기 각 단계들에서 수득한 구기자 나무가지 에탄올 추출물, 클로로포름 분획물 및 유효활성물질의 항산화, 항노화, 항염 및 항주름 활성을 측정하는 단계를 통하여 달성하였다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 항염 또는 항주름 활성을 가지는 구기자 나무가지 추출물과 이의 분획물 및 이를 유효성분으로 함유하는 항산화, 항노화, 항염 또는 항주름 활성을 갖는 화장품 또는 건강기능식품 조성물을 제공하는 효과가 있다.

[0016] 이 밖에도 구기자 나무가지 추출물로부터 항염 또는 항주름 활성을 갖는 유효성분들을 분리정제동정하여 이를 유효성분으로 함유하는 항산화, 항노화, 항염 또는 항주름 활성을 갖는 화장품 또는 건강기능식품 조성물을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명 구기자 나무가지 추출물과 그의 용매분획물 및 그로부터 유래된 유기화합물 1의 분리정제동정의 전체 과정을 도식화한 그림도이다.

도 2는 본 발명 구기자 나무가지 에탄올 추출물의 HPLC 분석 결과 그래프이다.

도 3은 본 발명 구기자 나무가지 클로로포름 분획물의 HPLC 분석 결과 그래프이다.

도 4는 본 발명 구기자 나무가지 에틸아세테이트 분획물의 HPLC 분석 결과 그래프이다.

도 5는 본 발명 구기자 나무가지 유래의 유기화합물 1의 HPLC 분석 결과 그래프이다.

도 6은 본 발명 구기자 나무가지 유래의 유기화합물 1의 ¹H- NMR 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명 구기자 나무가지 유래의 유기화합물 1의 ¹³C- NMR 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명 구기자 나무가지 유래의 유기화합물 2의 분리정제동정의 전체 과정을 도식화한 그림도이다.

도 9는 본 발명 구기자 나무가지 유래의 유기화합물 2의 HPLC 분석 결과 그래프이다.

도 10은 본 발명 구기자 나무가지 유래의 유기화합물 2의 ¹H- NMR 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 11은 본 발명 구기자 나무가지 유래의 유기화합물 2의 ¹³C- NMR 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 12는 본 발명 구기자 나무가지 추출물의 DCFH-DA를 측정한 결과 그래프이다.

도 13은 본 발명 구기자 나무가지 추출물의 항염 효과를 측정한 결과 그래프이다.

도 14는 본 발명 구기자 나무가지 클로로포름 분획물의 항염 효과를 측정한 결과 그래프이다.

도 15는 본 발명 구기자 나무가지 유래의 유기화합물 1의 항염 효과를 측정한 결과 그래프이다.

도 16은 본 발명 구기자 나무가지 추출물의 콜라겐합성 증대효과를 측정한 결과 그래프이다.

도 17은 본 발명 구기자 나무가지 클로로포름 분획물의 콜라겐합성 증대효과를 측정한 결과 그래프이다.

도 18은 본 발명 구기자 나무가지 유래의 유기화합물 1의 콜라겐합성 증대효과를 측정한 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명에 따르면 구기자 나무가지 추출물은 물, 에탄올, 메탄올, 부틸렌글리콜, 프로판디올 또는 이들의 혼합 용매에 의해 추출된 것일 수 있으며, 바람직하게는 60% 에탄올로 추출한 것이다. 또, 상기 추출물은 추출에 의해 수득되는 추출액, 추출액의 회석액 또는 농축액, 추출액의 분획물, 추출액을 건조하여 수득되는 건조물 또는 추출액의 조정제물 또는 정제물일 수 있다.

[0019] 또, 본 발명에 있어서 구기자 나무가지 추출하는 시간 및 온도는 특별하게 제한되지 않으나, 바람직하게는 실온에서 4시간씩 3회 추출한다.

- [0020] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 스프레이인 경우에는 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 다이메틸 에테르와 같은 추진제를 추가로 함유할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용된다.
- [0024] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정질 셀룰로오스 등이 이용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 제형이 계면활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트 등이 이용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 화장료 조성물은 1일에 1회 내지 수회에 걸쳐 얼굴 등에 도포하여 사용할 수 있다.
- [0027] 본 발명은 본 발명에 따라 제조된 구기자 나무가지 추출물, 이의 분획물 또는 구기자 나무가지 유래 유기화합물을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품 조성물을 제공한다. 상기 추출물, 이의 분획물 또는 구기자 나무가지 유래 유기화합물은 바람직하게 건강기능식품 조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 99 중량%를 함유하는 것으로 한다.
- [0028] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0029] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0030] 상기 "식품 첨가물 공전"에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.
- [0031] 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질캡슐에 생약 추출물에 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 생약 추출물에 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡셀기에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0032] 환 형태의 건강기능식품은 생약 추출물에 부형제, 결합제, 봉해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의 외부를 입힐 수도 있다.
- [0033] 과립형태의 건강기능식품은 상기 생약 추출물에 부형제, 결합제, 봉해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다. 본원 발명의 상기 부형제, 결합제, 봉해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).

[0034] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예를 들어 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이므로, 이에 따라 본 발명의 권리범위가 한정되는 것은 아니다.

[0035] <실시예 1> 본 발명 구기자나무 추출물의 제조 및 이로부터 향염 또는 향주름 활성 물질의 분리동정

[0036] 구기자나무 줄기 추출물로부터 향염 또는 향주름 효과가 있는 단일화합물을 분리동정하기 위하여 건조된 구기자나무줄기를 청양군에서 채집하여 실험에 사용하였다.

[0037] 제조예 1: 본 발명 구기자나무 가지 추출물 제조

[0038] 상기 건조한 구기자나무 줄기를 분쇄하여 분말화 하였고, 상기 구기자나무 줄기 분말 1kg을 10배의 60% 에탄올로 3일 동안 실온에서 추출한 다음 여과하여 얻은 여과액을 감압농축하여 본 발명 구기자나무 줄기 추출물을 제조한 다음 본 발명 구기자나무 가지추출물의 향염 및 향주름 활성검정용 및 유효성분 분리동정을 위한 공시재료로 사용하였다.

[0039] 제조예 2: 본 발명 구기자나무 가지 추출물 분획물

[0040] 상기 제조예 1에 따라 제조된 본 발명 구기자나무 가지 추출물을 도 1에 도식한 바와 같이 헥산(Haxane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol)의 순서로 순차적으로 용매분획하여 각각의 분획물을 수득하였다. 상기 분획물 중에서 클로로포름 분획물을 본 발명 구기자나무 가지추출물의 향염 및 향주름 활성검정용 및 유효성분 분리동정을 위한 공시재료로 사용하였다.

[0041] 실험예 1: 본 발명 구기자나무 가지 추출물 및 그 분획물의 HPLC 분석

[0042] 상기 제조예 1 내지 제조예 2에 따라 수득한 본 발명 구기자나무 가지 에탄올추출물, 클로로포름 분획물 및 에틸아세테이트 분획물의 성분 분석은 HPLC(Waters2695)를 통하여 수행하였다.

[0043] 분석컬럼은 ODS 컬럼(Kromasil 4.5 X 150mm, 5um)을 이용하였고 전개용매로는 정제수와 메탄올을 50분 분석 시간동안 100:0 에서 0: 100 (v/v) 혼합비로 점진적으로 변화시켜 분석하였다. 전개용매 유속은 1 mL/min, 컬럼온도는 40, 시료주입량은 10ug/mL농도의 상기 추출물 및 분획물들을 10uL씩 각각 주입하고 검출 파장은 318nm로 하여 분석하였다. 분석 HPLC 컬럼크로마토그램은 도 2 내지 5에 나타났다.

[0044] 실험결과 도 2에 나타난 바와 같이 25분에 검출되는 본 발명 구기자나무 가지 에탄올추출물의 주요성분은 도 3에 나타난 바와 같이 상기 제조예 2에 따라 분획된 클로로포름 분획물로 이행되었고, 그외 나머지 성분들은 에틸아세테이트 분획물로 이행되었음을 확인하였다.

[0045] 실험예 2: 본 발명 유기화합물 1의 분리 동정

[0046] 상기 실험예 1의 분석결과에 따라 본 발명 구기자나무 가지 에탄올 추출물의 주성분을 분리하기 위하여 상기 제조예 2에 따라 분획한 클로로포름분획물 190 mg을 도 1에 도식화한 바와 같이 고정상은 실리카겔 컬럼크로마토그래피(Silica gel, Merck, Silica gel 60, 70~230 mesh ASTM, Lot NO. 1.07734.1000)로 하고 이동상은 클로로포름:메탄올(v/v) 9:1, 7:1, 6:1 혼합비율로 각각 혼합한 용매로하여 극성별로 용출하여 분획하였다.

[0047] 상기 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 통하여 수득한 분획물 각각을 TLC 플레이트에 점적하고 전개한 다음 순도 높게 분리된 7번 분획물을 수득하였고 이를 유기화합물 1이라 하였다. 상기에서 수득한 분획물의 유기화합물 1은 HPLC, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 분석을 통하여 구조동정하였다.

[0048] HPLC분석 조건은 시료를 제외하고는 상기 실험예 1의 분석조건과 동일하였으며 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 분석을 위하여 상기에서 수득한 본 발명 유기화합물 1을 NMR용매 CD₃OD에 용해하여 400 MHz NMR 기기를 이용하여 ¹H-NMR 및

¹³C-NMR 스펙트럼을 얻었고 그 스펙트럼을 하기 [표 1]과 같이 정리하였다.

【표 1】 본 발명 화학식 1의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 스펙트럼의 화학적 이동거리

탄소 번호	유기화합물 1		
	H (int, multi, J Hz)	C (ppm)	HMBC
1		128.1	7, 5
2	7.07 (1H, <i>d</i> , 2.0)	111.3	7, 6
3		149.6	6
4		149.1	5, -OCH3
5	6.79 (1H, <i>d</i> , 8.2)	116.3	
6	6.99 (1H, <i>dd</i> , 2.0, 8.2)	123.1	7
7	7.42 (1H, <i>d</i> , 15.5)	141.9	6
8	6.38 (1H, <i>d</i> , 15.5)	118.6	7
9		169.0	7, 8'
1		131.1	2'&6', 3'&5', 8'
2 & 5	7.04 (2H, <i>d</i> , 8.4)	130.6	7'
3 & 6	6.71 (2H, <i>d</i> , 8.4)	116.2	
4		155.6	2'&6', 3'&5'
7'	2.74 (2H, <i>t</i> , 7.4)	35.7	8', 2'&6'
8'	3.46 (2H, <i>t</i> , 7.4)	42.4	7'
-OCH3	3.86 (3H, <i>s</i>)	56.3	

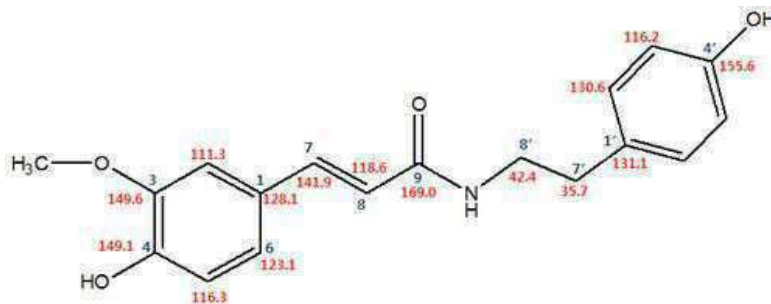
[0049]

[0050]

실험결과 도 5에 나타난 바와 같이 본 발명 유기화합물 1은 순도높게 분리되었고 도 6 내지 도 7의 NMR 스펙트럼 및 상기 [표 1]에 나타난 바와 같이 ¹H NMR, ¹³C NMR의 결과로부터 유기화합물 1의 구조가 하기 화학식 1과 같이 결정되었다. 화학구조를 근거로 참고문헌 검색을 실시한 결과 유기화합물 1은 하기 화학식 1로 나타나는 페닐프로파노이드 아미드 계열의 N-feruloyltyramine임이 확인되었다.

[0051]

<화학식 1>



[0052]

[0053]

실험예 3: 본 발명 유기화합물 2의 분리 동정

[0054]

상기 실험예 1의 분석결과에 따라 본 발명 구기자나무 가지 에틸아세테이트 분획물로부터 주성분을 분리하기 위하여 상기 제조예 2에 따라 분획한 에틸아세테이트분획물을 고정상은 실리카겔 컬럼크로마토그래피(Silica gel,

Merck, Silica gel 60, 70-230 mesh ASTM, Lot NO. 1.07734.1000)로 하고 이동상은 클로로포름:메탄올을 85:15(v/v) 혼합비율로 혼합한 용매로하여 극성별로 용출하여 분획하였고 이중 22 내지 29 분획물에서 순수한 유기화합물 2를 정제하였다.

[0055] 상기에서 수득한 본 발명 유기화합물 2는 HPLC, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 분석을 통하여 구조동정하였다.

[0056] HPLC분석 조건은 시료를 제외하고는 상기 실험예 1의 분석조건과 동일하였으며 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 분석을 위하여 상기에서 수득한 본 발명 유기화합물 2를 NMR용매 CD₃OD에 용해하여 400 MHz NMR 기기를 이용하여 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 스펙트럼을 얻었고 그 스펙트럼을 하기 [표 2]과 같이 정리하였다.

【표 2】 본 발명 화학식 2의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 스펙트럼의 화학적 이동거리

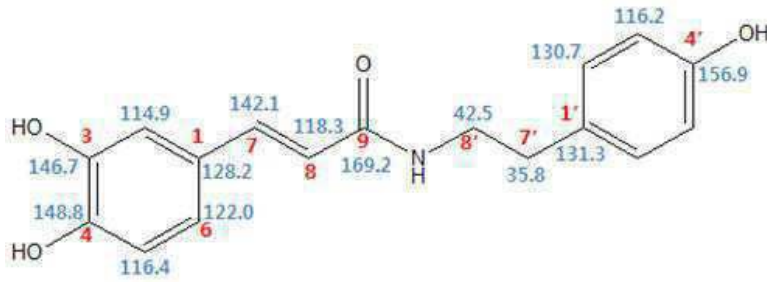
탄소번호	유기화합물 2	
	H (int, multi, J Hz)	C (ppm)
1		128.2
2	6.98 (1H, <i>d</i> , 2.0)	114.9
3		146.7
4		148.8
5	6.74 (1H, <i>d</i> , 8.2)	116.4
6	6.88 (1H, <i>dd</i> , 2.0, 8.2)	122.0
7	7.36 (1H, <i>d</i> , 15.8)	142.1
8	6.31 (1H, <i>d</i> , 15.8)	118.3
9		169.2
1		131.3
2 & 5	7.04 (2H, <i>d</i> , 8.2)	130.7
3 & 6	6.70 (2H, <i>d</i> , 8.2)	116.2
4		156.9
7'	2.73 (2H, <i>t</i> , 7.7)	35.8
8'	3.45 (2H, <i>t</i> , 7.7)	42.5

[0057]

[0058] 실험결과 도 9에 나타난 바와 같이 본 발명 유기화합물 2는 순도높게 분리되었고 도 10 내지 도 11의 NMR 스펙트럼 및 상기 [표 2]에 나타난 바와 같이 유기화합물 2는 상기 유기화합물 1과 유사한 스펙트럼이 관찰되는데 유기화합물 1에서의 δ 3.86인 methoxy proton이 관찰되지 않았다.

[0059] 따라서 본 발명 유기화합물 2는 상기 유기화합물 1과 같은 골격에 methoxy기가 hydroxy(-OH)로 치환된 형태인 trans-N-caffeoyltyramine으로 밝혀졌으며 화학적 구조는 하기 화학식 2와 같다.

[0060] <화학식 2>



[0061]

[0062] <실시예 2> 본 발명 유기화합물 1 및 유기화합물 2의 기능성 평가

[0063] 실험예 4: 본 발명 구기자나무 가지 추출물의 DCFH-DA(2',7'-dichloro fluorescein-diacetate)를 이용한 항산화 활성검정

[0064] 세포에서의 에너지 생산에서는 미토콘드리아 호흡에 의한 부산물인 반응성 산소기 (ROS, reactive oxygen species)의 생성이 수반되며 이것은 단백질, 지방 및 핵산에 손상을 가져온다.

[0065] 이러한 손상으로부터 세포 자체를 보호하기 위해 세포 내의 방어체계가 작동을 하지만 유리 라디칼의 생성과 항산화 체계의 균형이 깨어지면 산화스트레스가 세포에 작용하게 되어 신체노화를 비롯한 각종 성인병과 암의 주요 원인으로 작용한다.

[0066] 따라서, 피부친화적이고 안정적인 식물을 원료로 항산화제 개발을 위해, 세포 내에 형성된 활성산소의 양을 측정하여 추출물에 대한 항산화능을 평가한다. DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescein-diacetate)를 이용한 fluorimetric assay가 대표적인 평가법으로 DCFH-DA는 비극성분자로 용이하게 세포 내로 들어갈 수 있으며 세포 내의 esterase에 의해 비형광성 극성분자인 DCFH으로 분리된 후 세포 내의 활성산소에 의해 산화되면 형광성 DCF(2',7'-dichlorofluorescein)로 전환되게 되고 이를 fluorometer로 측정하는 방법이다.

[0067] 피부 섬유아세포(HDFn)를 DMEM (10 % 혈청 첨가, 1 % 항생제 포함) 배지에 현탁하여 37℃, 5 % CO₂ 배양기에서 배양하고 대수기에서 성장하는 세포를 주로 실험에 사용하였다. Well당 약 1 x 10⁵ 세포 수가 되도록 96 well에 각각 접종한 후에 상기 제조예 1에 따라 수득한 구기자나무 가지 에탄올 추출물을 농도별로 각각 처리한 다음 37℃, 5 % CO₂배양기에서 20분간 배양하였다. 그 다음, 산화스트레스 유발 물질인 H₂O₂ 1mM을 첨가하고, DCFH-DA(stock 20 mM) 20 M를 가한 후 excitation 485 nm, emission 535 nm조건으로 spectrofluorophotometer로 측정한다음 37℃에서 90분 동안 측정하였다. 시료를 넣지 않고 활성 산소종 (Reactive oxygen species)의 형성만을 측정할 것을 대조군으로 정하고, 본 발명 구기자 나무가지 에탄올 추출물을 넣어 활성 산소종을 소거시키는 시료 처리군과 비교하여 활성 산소종 저해율을 하기 계산식 1에 따라 구하고 모든 실험은 3번 반복실험하였다.

[0068] 계산식 1

$$\text{활성 산소종저해율(\%)} = \frac{\text{대조군OD} - \text{시료처리군OD}}{\text{대조군OD}} \times 100$$

[0069]

[0070] 실험결과 도 12에 나타낸 바와 같이 본 발명 구기자나무 가지 에탄올 추출물 10, 50, 100ug/mL의 농도로 각각 세포에 처리하였을 때 농도의존적인 활성이 나타났으며 특히 100ug/mL농도로 처리한 실험구에서는 활성산소의 농도를 36.23% 감소시키는 우수한 효과를 확인할 수 있었다.

[0071] 실험예 5: 본 발명 구기자나무 에탄올 추출물, 클로로포름 분획물 및 유기화합물 1의 항염 활성검정

[0072] 염증의 발현 기전에는 다양한 매개체가 관여하고 있으며, 그 병의 원인도 다양하다. 대식세포에 endotoxin으로 알려져 있는 LPS(lipopolysachride)를 처리하면, iNOS(inducible NOS)발현에 의해 NO 생합성이 증가하며 염증

반응이 유도된다. NO는 많은 세포들이 분비하는 병리적인 2차 신호전달 물질이며, COX의 활성을 조절하고 염증 반응에 상승적으로 작용한다. Raw 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 NOS에 의해 생성되는 NO를 측정함으로써 추출물의 염증반응 억제 효과를 판정할 수 있다.

[0073] Mouse macrophage cell인 RAW 264.7 세포에 염증 유발 물질인 LPS를 인위적으로 처리한 후 염증 억제 효과가 있는지를 평가하였다. 96 well plate에 well 당 2×10^5 cell이 되도록 분주한 다음, 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 Overnight 배양한 다음, 새로운 배지로 교환해주고, LPS 1ug/mL를 처리하고 동시에 상기 제조예 1 내지 2에 따라 수득한 구기자나무 가지 에탄올 추출물, 구기자 가지 클로로포름 분획물 및 본 발명 유기화합물 1을 농도별로 1ug/mL 내지 100ug/mL 범위의 농도별로 투여하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지 상층액을 취해 13,000 rpm에서 3분 동안 원심 분리하여 상등액만 모은 후, Griess reagent 시약과 1:1로 반응시키고, 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0074] 실험결과 도 13에 나타난 바와 같이 본 발명 구기자나무 가지 에탄올 추출물 을 10, 50, 100 ug/mL의 농도로 각각 RAW 264.7 세포에 처리하였을 때 5, 20, 40 %의 항염활성을 각각 확인할 수 있었으며, 상기 모든 농도에서 세포독성은 나타나지 않았다.

[0075] 본 발명 구기자 가지 클로로포름 분획물도 도 14에 나타난 바와 같이 10, 50, 100 ug/mL의 농도에서 각각 20, 82.5, 98%의 우수한 항염활성을 확인할 수 있었으며, 상기 모든 농도에서 세포독성은 나타나지 않았다. 따라서 구기자 나무가지 에탄올 추출물보다 이로부터 클로로포름으로 용매분획한 분획물의 항염활성이 현저하게 증가한 것을 알 수 있었다.

[0076] 본 발명 구기자 가지 클로로포름 분획물로부터 분리한 본 발명 유기화합물 1의 항염활성은 도 15에 나타난 바와 같이 10, 50, 100 ug/mL의 농도에서 각각 20, 70, 85%의 항염활성을 확인할 수 있었으며, 상기 모든 농도에서 세포독성은 나타나지 않았다.

[0077] 실험예 6: 본 발명 구기자나무 에탄올 추출물, 클로로포름 분획물 및 유기화합물 1의 콜라겐합성 증대효과 검증

[0078] 피부 섬유아세포(HDFn)를 48 웰 플레이트에 5×10^4 cells/well의 농도로 배양 배지 0.3 mL로 접종하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 24시간 지난 이후 추출물을 농도별로 포함한 새로운 배지로 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 이후 배양액을 모아서 enzymes-linked immunoassay kit (Takara사)를 이용하여 콜라겐 전구체의 C-말단의 양을 측정하였다. 또한, 콜라겐 용액 640 ng/mL을 이용하여 콜라겐 농도 0 ng-640 ng 사이의 standard curve를 얻어 배지에 있는 콜라겐 양을 계산하였다.

[0079] 실험결과 도 16에 나타난 바와 같이 본 발명 구기자나무 가지 에탄올 추출물 을 10, 50, 100 ug/mL의 농도로 처리하였을 때 각각 5, 22, 40 %씩 콜라겐 생성이 우수하게 증가됨을 확인할 수 있었으며, 상기 모든 농도에서 세포독성은 나타나지 않았다.

[0080] 본 발명 구기자 가지 클로로포름 분획물도 도 17에 나타난 바와 같이 10, 50, 100 ug/mL의 농도에서 각각 2, 15, 23%씩 콜라겐 생성이 증가됨을 확인할 수 있었으며, 상기 모든 농도에서 세포독성은 나타나지 않았다. 그러나 구기자 나무가지 에탄올 추출물보다 이로부터 클로로포름으로 용매 분획한 분획물의 콜라겐 생합성 증대 효과가 더 증가하지는 않았다.

[0081] 본 발명 구기자 가지 클로로포름 분획물로부터 분리한 본 발명 유기화합물 1의 콜라겐 생합성 증대 효과는 도 18에 나타난 바와 같이 10, 50, 100 ug/mL의 농도에서 각각 20, 30, 40%씩 우수한 콜라겐 생성 증대 효과를 확인할 수 있었고, 상기 모든 농도에서 세포독성은 나타나지 않았다.

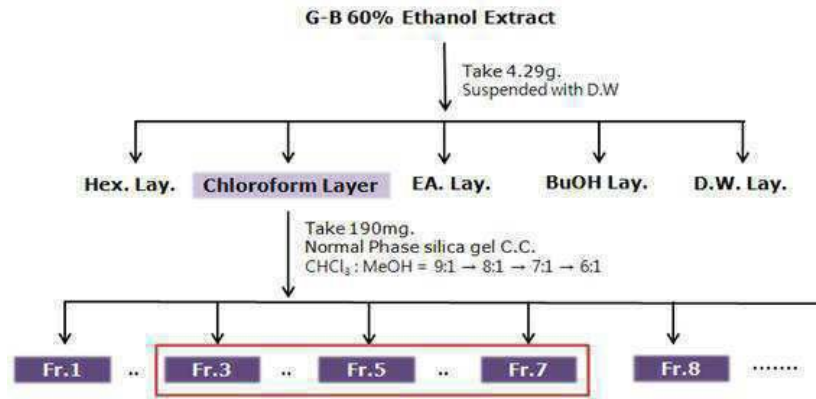
산업상 이용가능성

[0082] 이상 설명한 바와 같이 본 발명은 항염 또는 항주름 활성을 가지는 구기자 나무가지 추출물과 이의 분획물 그리고 구기자 나무가지 추출물로부터 유효성분들을 분리정제동정하여 이들을 유효성분으로 함유하는 향산화, 향노

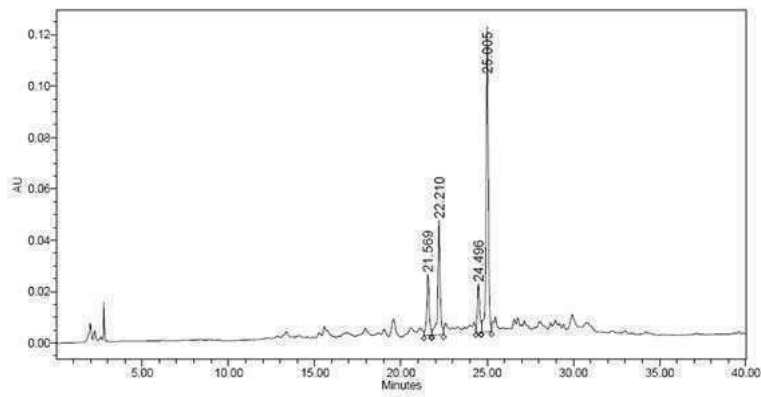
화, 항염 또는 항주름 활성을 갖는 화장료 또는 기능성건강식품 조성물을 제공하는 효과가 있으므로 화장료 또는 식의약 소재산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면

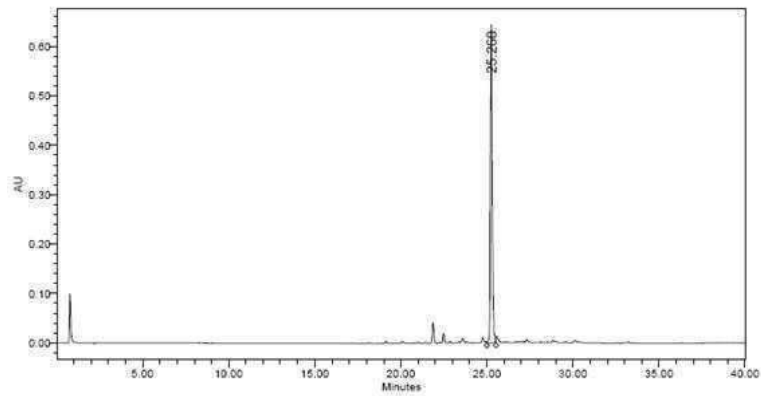
도면1



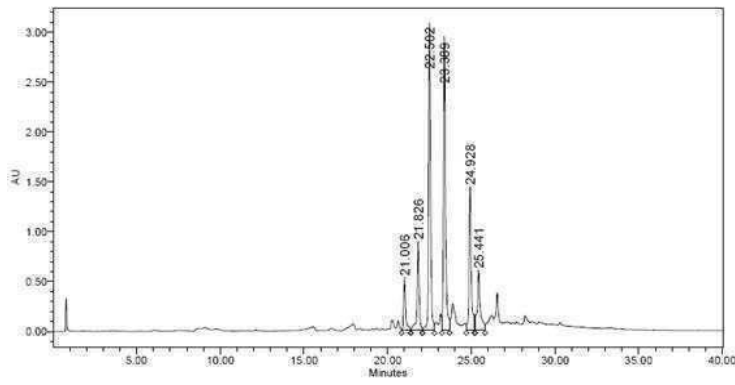
도면2



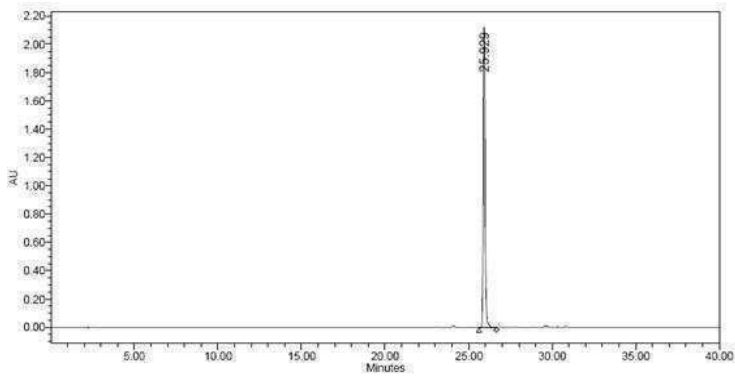
도면3



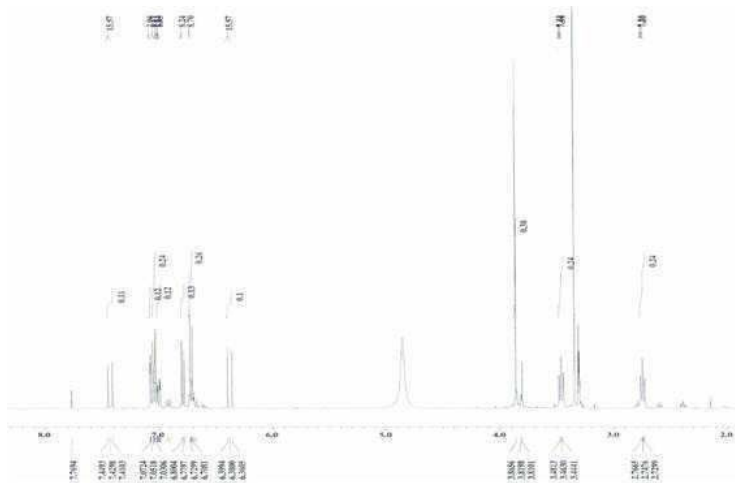
도면4



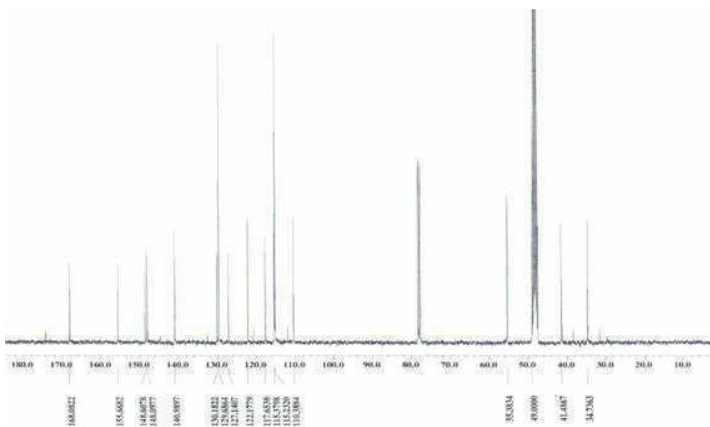
도면5



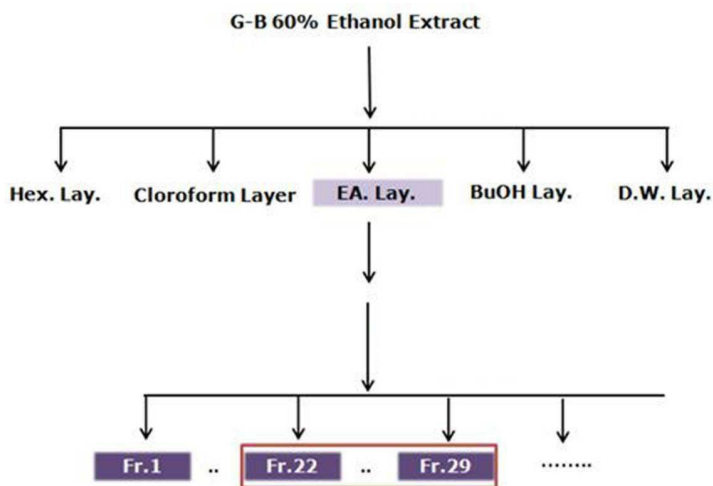
도면6



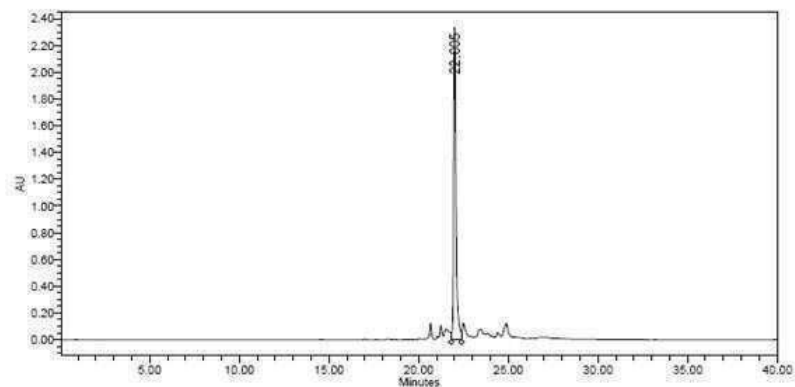
도면7



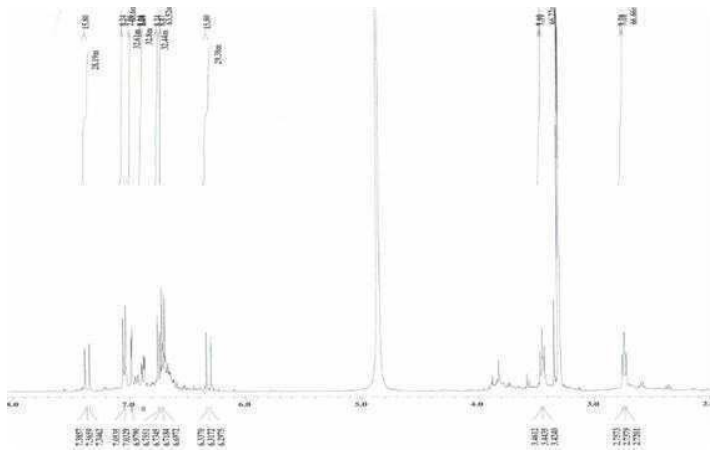
도면8



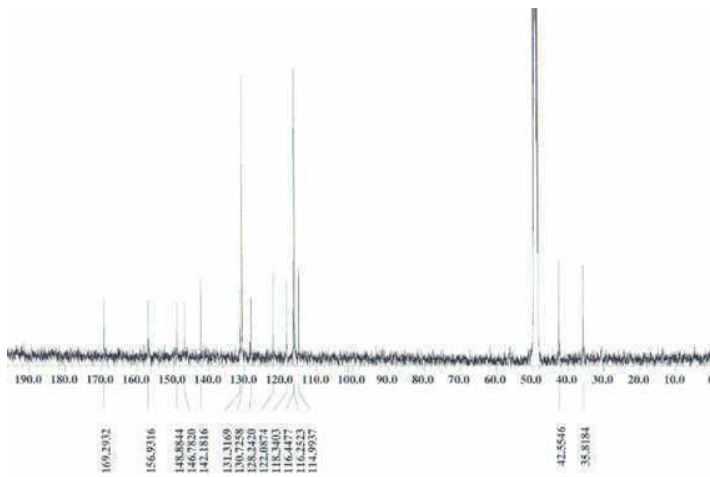
도면9



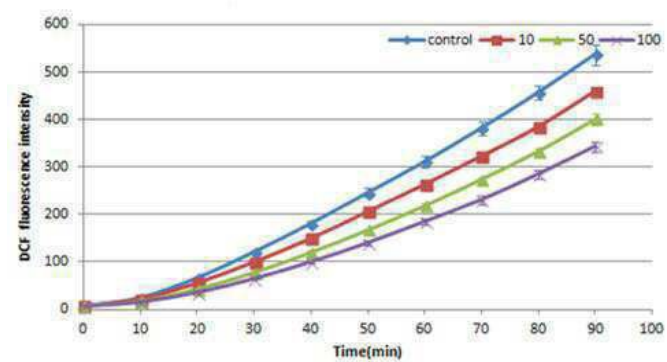
도면10



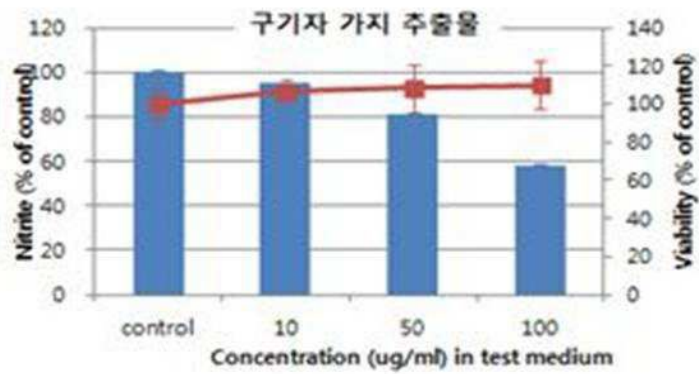
도면11



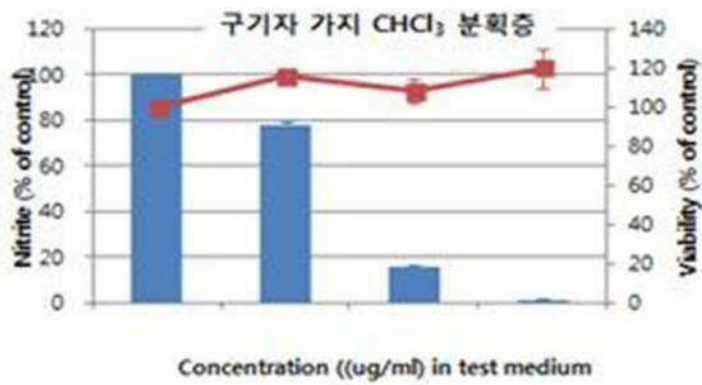
도면12



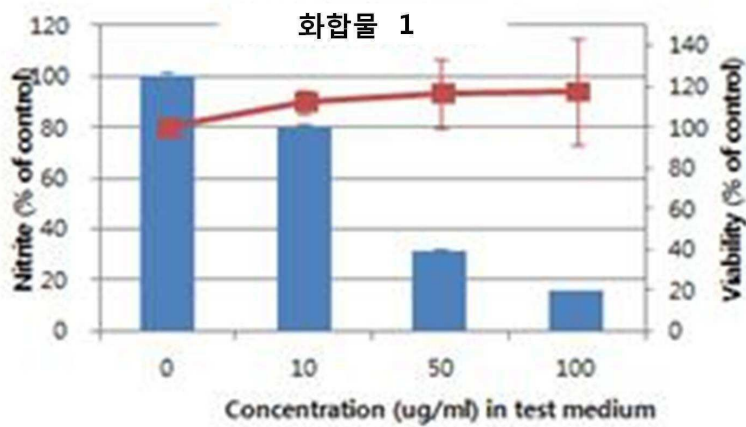
도면13



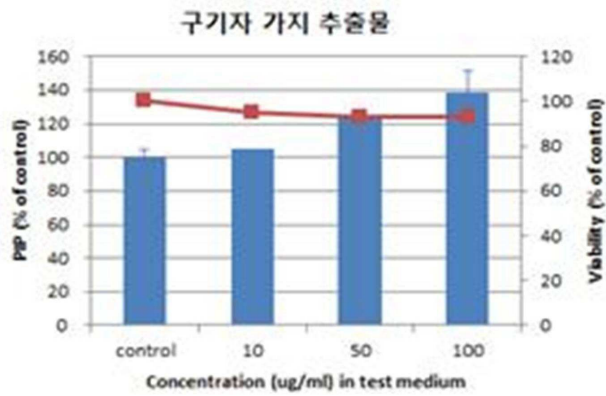
도면14



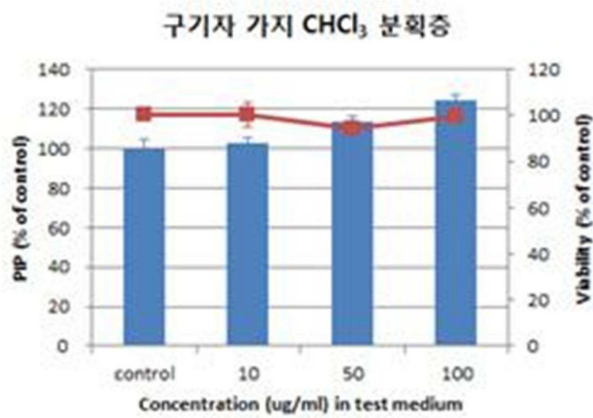
도면15



도면16



도면17



도면18

