



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2013-0035618

(43) 공개일자

2013년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/34 (2006.01)

A61K 8/30 (2006.01)

A61K 8/42 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2011-0100031

(22) 출원일자

2011년09월30일

심사청구일자

2011년09월30일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

국민대학교산학협력단

서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)

(72) 발명자

송규용

대전광역시 유성구 대학로 99, 약학과 (궁동, 충남대학교)

오상택

서울특별시 서초구 반포2동 경남아파트 6동 709호

(74) 대리인

백경업

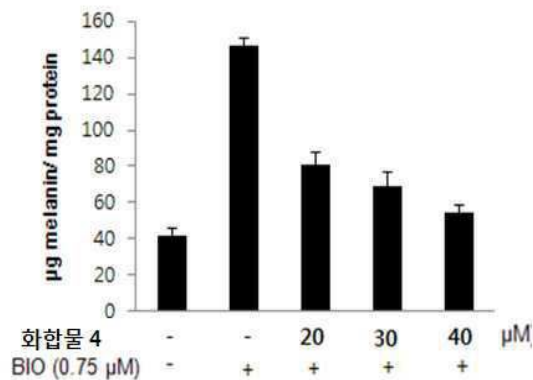
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 신나모일살리실아미드 유도체를 유효성분으로 함유하는 미백용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신나모일살리실아미드 유도체 화합물인 N-[3-(3,4-디하이드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-하이드록시벤즈아마이드를 유효성분으로 함유하는 미백용 조성물 및 이를 이용한 화장료 조성물에 관한 것으로, 상기 신나모일살리실아미드 유도체 화합물은 Wnt/ β -카테닌(Wnt/ β -catenin) 신호전달체계를 저해하고, 티로시네이즈 활성억제 효과가 높아, 멜라닌 생성 억제 효과가 높은 것으로 확인된다.

대표도 - 도3

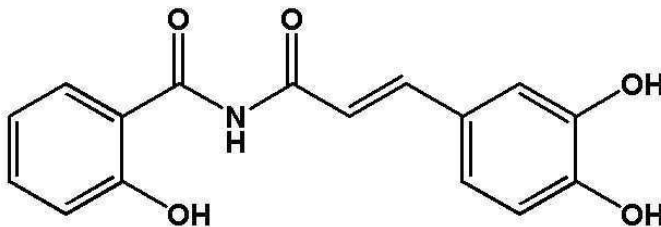


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물인 N-[3-(3,4-디하이드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-하이드록시벤즈아마이드를 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 미백 용 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 화합물은 Wnt/ β -카테닌(Wnt/ β -catenin) 신호전달체계를 저해하는 것을 특징으로 하는 미백용 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항의 미백용 조성물을 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 화장품 조성물은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 팩, 피부접착용 패취 및 피부접착용 겔 중에서 선택되는 1종의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신나모일살리실아미드 유도체로서, N-[3-(3,4-디하이드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-하이드록시벤즈아마이드(N-[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide)를 함유하는 미백용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 멜라닌 합성을 촉진하도록 하는 Wnt/ β -카테닌(Wnt/ β -catenin) 신호전달체계를 저해하는 효과가 있는 신나모일살리실아미드 유도체를 함유하는 미백 조성물 또는 피부 미백 효과가 있는 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 피부의 과색소 침착은 피부의 염증 반응 이후의 체내 호르몬 이상, 유전질환 및 자외선 조사 등의 여러 요인에 의해 발생하며, 주된 요인은 멜라닌 색소 합성 및 분포 이상에 의한 것이다.

[0003] 멜라닌의 형성 과정을 살펴보면, 신경륜(neural crest)으로부터 유래된 멜라닌아세포(melanoblast)가 표피로 이동하여 수지상돌기(dendrite)가 있는 세포인 멜라닌세포(melanocyte)로 분화되고 이곳에서 멜라닌이 형성된다. 멜라닌은 티로시네이스(tyrosinase), TRP1(tyrosinase-related protein 1), DDT(dopachrome delta tautomerase) 효소들의 단계적인 조절에 의해서 티로신(tyrosine)이 도파퀴논(dopaquinone)으로 전환되고, 이후 상기 도파퀴논이 멜라닌으로 전환되며 생성된다(J. Biol. Chem., 272, 503-509, 2007; J. Cell. Biol., 142, 827-835, 1998). 티로시네이스와 TYRP(tyrosinase-related protein) 유전자의 발현에 가장 중요한 전사인자는 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)이며, 이는 멜라닌아세포가 멜라닌세포로 분화 및 활성화

화되면서 유도된다(*Mol. Cell. Biol.*, 18(12), 6930-6938, 1998; *Mol. Cell. Biol.* 18(2): 694-702, 1998). 멜라닌세포의 성장과 증식, 분화를 조절하는 요소들로는 Wnt, 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor[FGF/FGF2]), 골형성 단백질(bone morphogenetic protein[BMP]) 그룹, 간세포 성장 인자(hepatocyte growth factor/scatter factor[HGF/SF]), M/SCF(mast/stem cell factor), 엔도텔린(endothelin), 멜라노트로핀(melanotropin) 등이 있다(*J. Biol. Chem.*, 275, 14013-14016, 2000; *J. Cell. Biol.*, 158, 1079-1087, 2002; *Hum. Mol. Genet.*, 9, 125-132, 2000).

[0004] Wnt는 신호전달 단백질로 배발생 단계에서 줄기세포 조절과 같은 다양한 발생과정에 관여하며, 프리즐레드 수용체(Frizzled receptor) 그룹을 활성화시켜 GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β)를 통하여 β -카테닌을 조절하게 된다 (*Development.*, 127, 861-868, 2000; *Curr. Biol.*, 12, 499-501, 2002). Wnt에 의해 축적된 β -카테닌은 핵 내로 이동한 뒤 LEF/TCF 전사인자(transcription factor)와 결합하여 MITF 유전자 발현을 활성화하고 (*J. Biol. Chem.*, 272, 503-509, 2007) 티로시네이즈의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 본 발명자들은 멜라닌 형성을 촉진하는 Wnt/ β -카테닌 신호전달체계를 저해하는 화합물들을 초고속 스크리닝 시스템을 이용하여 발굴하였고 그 중에서도, 본 발명의 신나모일살리실아미드 유도체인 N-[3-(3,4-디하이드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-하이드록시벤즈아마이드가 멜라닌 생성을 억제한다는 사실을 최초로 밝힘으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

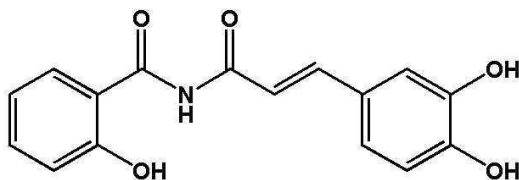
[0006] 본 발명의 목적은 신나모일살리실아미드 유도체인 N-[3-(3,4-디하이드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-하이드록시벤즈아마이드를 유효성분으로 함유하는 미백용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 신나모일살리실아미드 유도체인 N-[3-(3,4-디하이드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-하이드록시벤즈아마이드를 유효성분으로 함유하는 피부 미백 효과가 우수한 화장료 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 하기 화학식 1의 미백 효과가 있는 신나모일살리실아미드 유도체인 N-[3-(3,4-디하이드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-하이드록시벤즈아마이드(N-[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide)에 관한 것을 특징으로 한다.

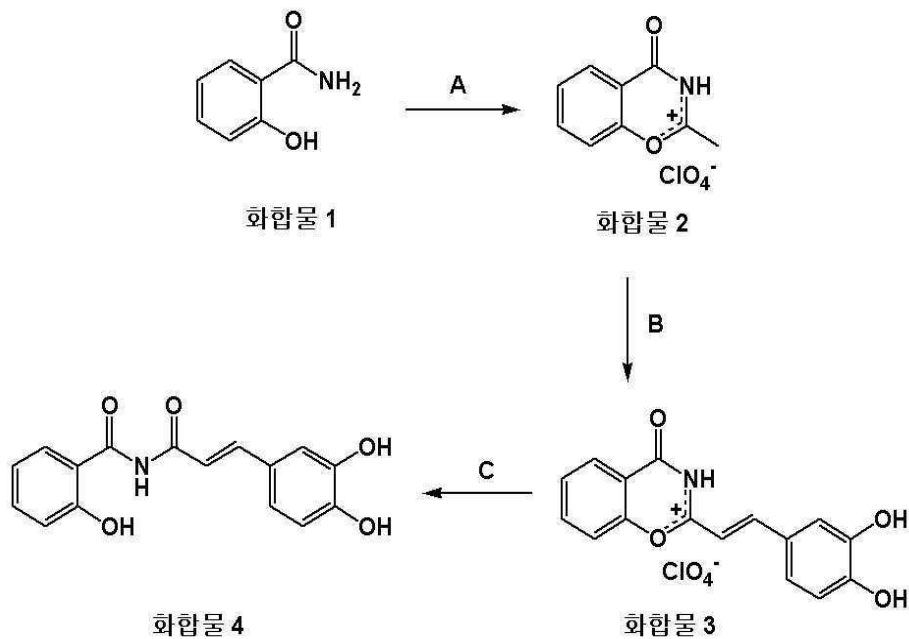
[0009] [화학식 1]



[0010]

[0011] 상기 화학식 1의 화합물은, 당업계에 공지된 합성방법으로 제조가능하며, 일 예로, 하기의 반응식 1에 도시된 방법에 의해 화학적으로 합성될 수 있다.

[0012] [반응식 1]



[0013]

[0014] 상기 반응식 1에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은,

[0015] 살리실아마이드(salicylamide, 화합물 1)와 무수초산(acetic anhydride)을 넣고 70% 과염소산(70% perchloric acid)을 적가하여 교반하고, 이 후, 에테르(ether)를 넣어 추가 교반하여 2-메틸-4H-1,3-벤즈옥사진-4-온늄 과염소산염(2-methyl-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, 화합물 2)을 얻는 단계;

[0016] 상기 2-메틸-4H-1,3-벤즈옥사진-4-온늄 과염소산염(화합물 2)과 3,4-디하이드록시벤즈알데히드(3,4-dihydroxybenzaldehyde)를 넣어 무수초산(acetic anhydride)과 빙초산(glacial acetic acid)으로 용해시킨 후 환류 교반하고, 에테르(ether)를 이용해 여과하여 2-(3,4-디하이드록시스티릴)-4H-1,3-벤즈옥사진-4-온늄 과염소산염(2-(3,4-dihydroxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, 화합물 3)을 얻는 단계; 및,

[0017] 2-(3,4-디하이드록시스티릴)-4H-1,3-벤즈옥사진-4-온늄 과염소산염(화합물 3)을 넣고 3차 증류수를 적가하여 환류 교반한 반응액을 여과하여 얻은 물질을 실리카겔 컬럼으로 분리하여 N-[3-(3,4-디하이드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-하이드록시벤즈아마이드(N-[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide, 화합물 4)를 얻는 단계;

[0018] 를 통하여 합성될 수 있다.

[0019] 또한 상기 화학식 1의 화합물은 귀리(*Avena sativa*, oats)로부터 분리 및 정제될 수 있다. 상기 화합물은 건조된 귀리에 물, 에탄올, 메탄올, 이소프로필알코올, n-부탄올 등의 C1 내지 C4의 저급 알코올, 글리세롤, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜 등의 다가 알코올, 에틸아세테이트, 메틸아세테이트, 벤젠, n-헥산, 디에틸에테르, 디클로로메탄 등의 탄화수소계 용매, 이들 중에서 하나 또는 두 종류 이상을 혼합한 용매 등의 추출용매를 이용하여 추출한 귀리 추출물로부터 분리 및 정제한 화합물일 수 있다. 상기 귀리 추출물을 제조하는 추출 용매는 그 선택에 있어서 특별히 한정되지는 않는다. 또한 상기 귀리 추출물을 헥산과 물의 분배, 디아이온 HP-20 레진과 같은 흡착수지 사용방법, 칼럼 크로마토그래피에 의한 방법 등 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지的方法을 단독 또는 적합하게 조합하여 분획함으로써 본 발명의 화합물을 분리 및 정제할 수 있다.

[0020] 상기 화학식 1의 신나모일살리실아미드 유도체는 피부 미백 효과가 있는 화장료 조성물로 이용될 수 있으며, 상기 화장료 조성물은 그 제형에 특별한 제한을 두지는 않으나, 유연화장수(스킨), 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 팩, 피부접착용 패취 및 피부접착용 겔 중에서 선택되는 1종의 제형을 가질 수 있다.

[0021] 상기 화학식 1의 신나모일살리실아미드 유도체가 함유된 화장료 조성물은 매일 사용할 수 있으며 또한 정해지지 않은 기간 동안에도 사용할 수 있다. 바람직하게는 사용자의 연령, 피부상태 또는 피부타입, 상기 화학식 1의

화합물의 농도에 따라 사용량, 사용횟수 및 기간을 조절할 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 신나모일살리실아미드 유도체인 N-[3-(3,4-디하이드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-하이드록시벤즈아마이드를 함유하는 미백용 조성물 또는 이를 이용한 화장료 조성물에 관한 것으로, 상기 신나모일살리실아미드 유도체는 Wnt/ β -카테닌(Wnt/ β -catenin) 신호전달체계를 저해하고, 티로시네이즈 활성 억제 효과가 높아, 멜라닌 합성을 현저하게 억제함으로써 미백효과가 뛰어난 것으로 확인되었다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 인간 프리즐레드-1(human Frizzled-1) 및 TOPFlash 리포터가 형질발현된 세포에서 본 발명의 화합물 4에 의해 Wnt/ β -카테닌 신호전달이 억제되는 것을 루시퍼레이즈 어세이를 이용하여 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명의 화합물 4에 의해 티로시네이즈와 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)의 발현이 감소되는 것을 나타내는 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 그림이다.

도 3은 본 발명의 화합물 4에 의해 멜라닌 생성이 감소되는 것을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

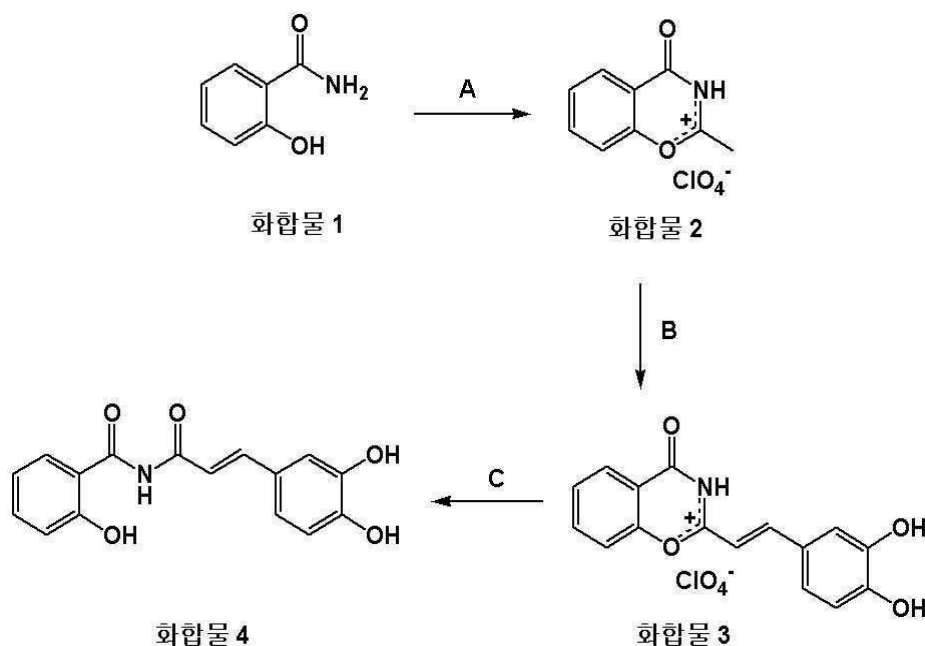
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.

[0025] <실시예 1. 신나모일살리실아미드 유도체의 합성>

[0026] 본 실험에 사용한 분석기기로는 ^1H -NMR(400MHz) 스펙트로미터(spectrometer, JNM-AL 400, JEOL Ltd., Japan), 멜팅 포인터(Melting pointer, Yamako, MD-S3, Japan)를 사용하였다. 각종 시약들은 알드리치사(Aldrich Chemical Co.)의 제품을 사용하였으며 기타 용매는 1급 이상의 시약을 정제하지 않고 사용하였다. 합성한 물질들의 정제를 위하여 실리카겔(Silica gel, Merck, 230-400mesh)을 사용하였다.

[0027] [반응식 1]



[0028]

[0029] 단계 A

[0030] 완전히 건조시킨 500ml 라운드 플라스크에 살리실아미드(화합물 1, salicylamide, 6.85g, 0.05mol)와 무수초산(acetic anhydride, 30ml)을 넣고 70% 과염소산(70% perchloric acid, 5ml, 0.058mol)을 천천히 적가한 후

상온에서 4시간 동안 교반하였다. 이 후, 반응액에 에테르(ether, 200ml)를 넣어 30분 동안 더 교반한 후, 깔대기를 이용해 여과하여 여액은 제거하고 여과용지에 남아 있는 고체인 2-메틸-4H-1,3-벤즈옥사진-4-온늄 과염소산염(2-methyl-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, 화합물 2)을 건조하여 다음 단계에 적용하였다.

[0031] 단계 B

[0032] 100ml 라운드 플라스크에 2-메틸-4H-1,3-벤즈옥사진-4-온늄 과염소산염(2-methyl-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, 화합물 2, 500mg, 1.91mmol)과 3,4-디하이드록시벤즈알데히드(3,4-dihydroxybenzaldehyde, 317mg, 2.29mmol)를 넣고 무수초산(acetic anhydride, 1.5ml)과 빙초산(glacial acetic acid, 2ml)으로 용해시킨 후 히팅 맨틀(heating mantle)을 이용하여 80℃ 상에서 20분 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 방치한 후 에테르(ether)를 이용해 여과하여 여액을 제거한 후 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 2-(3,4-디하이드록시스티릴)-4H-1,3-벤즈옥사진-4-온늄 과염소산염(2-(3,4-dihydroxystyryl)-4H-1,3-benzoxazin-4-onium perchlorate, 화합물 3)을 얻어 다음 단계에 적용하였다.

[0033] 단계 C

[0034] 100ml 라운드 플라스크에 건조한 2-(3,4-디하이드록시스티릴)-4H-1,3-벤즈옥사진-4-온늄 과염소산염(화합물 3)을 넣고 3차 증류수(10ml)를 적가하여 히팅 맨틀을 이용하여 100℃ 상에서 1시간 동안 환류 교반시킨다. 반응액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 여액은 제거하고 여과지 위에 남은 물질을 건조하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼 분리를 통해 다음 물성치를 갖는 N-[3-(3,4-디하이드록시페닐)-1-옥소-2-프로페닐]-2-하이드록시벤즈아마이드(N-[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]-2-hydroxybenzamide, 화합물 4)를 얻어 본 발명의 화합물로 사용하였다.

[0035] 화합물 4의 물리화학적 성질 ;

[0036] ^1H NMR (400MHz, DMSO): δ 11.46(s, NH), 10.87(s, OH), 9.61(s, OH), 9.28(s, OH), 7.87(d, J=7.6Hz, 1H), 7.59(d, J=15.6Hz, 1H), 7.47(t, J=7.6Hz, 1H), 7.27(d, J=15.6Hz, 1H), 7.12(s, 1H), 7.03-6.96(m, 3H), 6.80(d, J=8.4Hz, 1H)

[0037] Yield 35%

[0038] Yellow colored solid

[0039] Rf = 0.21 (Hexane : Ethyl acetate = 1 : 1)

[0040] m.p. 206℃

[0041] <실시예 2. Wnt/ β -카테닌 신호전달 억제>

[0042] Wnt/ β -카테닌 신호전달 억제 효과를 조사하기 위하여 인간 프리즐레드-1(human Frizzled-1, Wnt/ β -카테닌 신호전달을 증폭함) 및 TOPFlash 리포터가 안정적으로 발현되는 HEK293 세포주(human embryonic kidney cell line)를 사용하였다. TOPFlash에는 Wnt/ β -카테닌에 의해 유도되는 TCF/LEF 전사인자에 대한 루시페레이스 리포터가 결합되어 있다. 상기 세포는 TOPFlash 리포터 및 인간 프리즐레드-1 발현 플라스미드를 HEK293 세포에 형질전환하여 제조하였으며, 형질 주입은 제조사의 설명에 따라 리포펙타민 2000(Lipofectamine 2000, Invitrogen)을 이용하여 수행하였다.

[0043] 실시예 1에서 제조한 화합물 4의 Wnt/ β -카테닌 신호전달 억제 효과를 확인하기 위해, 상기 형질전환된 HEK293 세포를 96웰 플레이트(96well plate)에 $1.5 \times 10^5/\text{ml}$ 로 분주하여 배양하였다. HEK293 세포의 배양 배지로는 10% FBS(fetal bovine serum), 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 페니실린(penicillin), 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신(streptomycin)이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 사용하였다.

[0044] 24시간 배양 후에 BIO(6-bromoindirubin-3'-oxime, Wnt/ β -카테닌 신호전달체계를 활성화함) 0.75 μM 을 배지에 첨가하고 실시예 1에서 합성한 화합물 4를 최종 농도가 20, 40, 80, 160 μM 이 되게 첨가하였다. 15시간 후에 TOPFlash 리포터의 활성을 루시페레이스 어레이 키트로 분석하여 도 1에 나타내었다. 루시페레이스 어레이는 듀얼 루시페레이스 키트(Dual Luciferase Assay kit, Promega, Madison, WI)를 사용하였으며, TOPFlash의 활성은 세포 역가(cell titer) 활성으로 표준화(normalize)하여 측정하였다.

[0045] 도 1을 참고하면, BIO를 처리하였을 경우 TOPFlash 리포터의 활성이 증가되었고 본 발명의 화합물 4를 처리하였을 경우 BIO에 의해 활성화된 TOPFlash 리포터의 활성이 농도의존적으로 감소됨을 관찰할 수 있었다. 따라서 본

발명의 화합물 4가 Wnt/ β -카테닌 신호전달체계를 현저하게 저해함을 알 수 있었다.

[0046] <실시예 3. 티로시네이즈 및 MITF 발현 감소 효과 확인>

[0047] 본 발명의 화합물 4가 미백효과가 있는지를 확인하기 위해, B16 멜라노마(melanoma) 세포주에서 세포 내의 티로시네이즈(tyrosinase)와 MITF(microphthalmia-associated transcription factor) 단백질 수준에 미치는 영향을 측정하였다. B16 멜라노마 세포의 배양 배지로는 10% FBS, 120 μ g/ml 페니실린, 200 μ g/ml 스트렙토마이신이 포함된 DMEM을 사용하였다. 이를 위해, B16 멜라노마 세포주를 60mm 플레이트에 2×10^5 /ml로 분주하고 24시간 동안 배양한 후에 본 발명의 화합물 4(20, 40, 80 μ M)를 BIO 0.75 μ M와 함께 처리하였다.

[0048] 72시간 후에, 상기 세포를 수집하여, 세포용해버퍼(50mM Tris-HCl[pH 7.5], 1% Nonidet P-40, 1mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml pepstatin A, 10 μ g/ml aprotinin, 2mM benzamidine, 50mM NaF, 5mM sodium orthovanadate, 150mM NaCl)에 녹여 총단백질을 얻었다. 상기 단백질을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)에서 분리한 후, Hybond-P 멤브레인(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)에 이동시켰다. 상기 멤브레인은 실온에서 1시간 동안 5% 스크림ilk로 블로킹한 후 2시간 동안 각각의 1차 항체에 반응시켰다. 이 후에는 퍼옥시데이즈(oxidase)가 결합된 2차 항체를 반응시켰고, 화학발광시스템(chemiluminescence system, Intron, Seongnam, Korea)을 이용하여 세포내 티로시네이즈와 MITF 단백질 수준을 측정하였고, 상기 결과는 도 2에 나타내었다.

[0049] 도 2에서 확인된 바와 같이, 본 발명의 화합물 4가 B16 멜라노마 세포에서 티로시네이즈와 MITF의 발현을 현저하게 억제함을 알 수 있었다.

[0050] <실시예 4. 멜라닌 형성 저해 효과 확인>

[0051] 본 발명의 화합물 4가 B16 멜라노마 세포주에서 세포 내 멜라닌 형성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 B16 멜라노마 세포주를 60mm 플레이트에 2×10^5 /ml로 분주하고 24시간 동안 배양 후에 본 발명의 화합물 4(20, 30, 40 μ M)를 BIO 0.75 μ M과 함께 처리하였다. 72시간 배양 후, 배지를 제거하고 PBS로 두 번 씻어준 후 RIPA 버퍼(Tris-buffered saline, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100)로 세포를 용해시키고 10,000 $\times$ 에서 10분간 원심분리하여, 상층액을 수거하였다. 상기 상층액에 대해 단백질 정량을 실시하고, 펠렛(pellets)에는 1M의 수산화나트륨 용액을 넣어주고 60 °C에서 2시간 동안 가열시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하여 도 3에 나타내었다.

[0052] 총 멜라닌 양은, 합성 멜라닌을 이용하여 얻은 검정선으로부터 멜라닌 양을 계산하고, 이를 단백질 농도로 보정하였다. 이를 위해 합성 멜라닌(0, 20, 40, 80, 160, 320 μ g)의 흡광도를 405nm에서 측정한 후 검정선을 작성하고 이로부터 측정하고자 하는 멜라닌의 흡광도를 측정하고 이를 검정선에 대입하여 총 멜라닌의 양을 구했다.

[0053] 도 3을 참고하면, B16 멜라노마 세포주에서 본 발명의 화합물 4에 의해 멜라닌 생성이 억제됨을 확인할 수 있었다.

[0054] <실시예 5. 신나모일살리실아미드 유도체의 세포독성 확인>

[0055] 본 발명의 화합물 4의 세포독성 실험은 화장품 관련 법규집 I(2007, 대한화장품협회)에 개시된 MTT 어세이 시험 방법을 참고하여 수행하였다.

[0056] 이를 위해, 먼저, 사람섬유아세포(NHDF cells, normal human dermal fibroblast cells)를 페니실린(100IU/ml), 스트렙토마이신(100 μ g/ml), 10% FBS(fetal bovine serum)를 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에 넣고, 5% CO₂ 조건에서 37°C로 배양하였다. MTT 어세이를 위해, 상기 사람섬유아세포는 96웰 플레이트(96 well plate)에 각 웰당 2×10^4 개로 맞추어 분주하고 24시간 동안 배양한 다음, PBS(phosphate buffered saline)로 세포를 세척하고, 상기 세포에 본 발명의 화합물이 함유된 DMEM 배지(FBS free)를 넣고 이를 48시간 더 배양하였다. 이 후, MTT 용액(0.5% 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)을 첨가하여 1.5시간 동안 배양한 후 ELISA(enzyme-linked immunospecific assay) 측정기로 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 본 발명의 화합물 4의 세포 생존율은 $96.2 \pm 3\%$ 로 확인되어 특별한 세포독성이 없는 것을 알 수 있다.

[0057] <실시예 6. 신나모일살리실아미드 유도체 함유 크림의 제조>

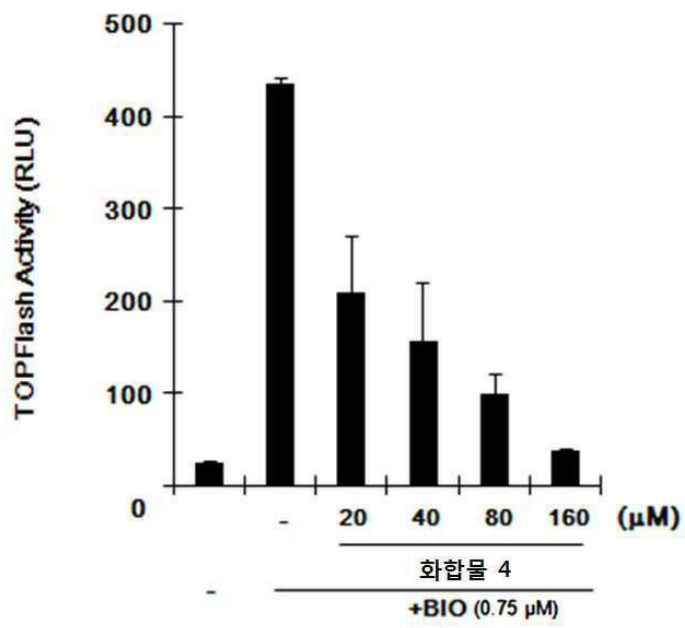
[0058] 하기와 같이 4가지의 화장료 조성물을 제조하여, A, B, C, D 순서로 유화조에서 혼합, 변형하여 크림 100g을 제

조하였다.

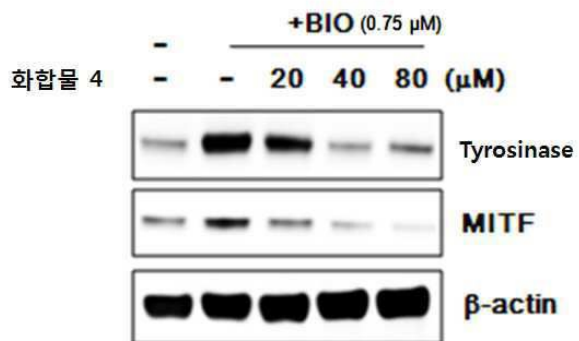
- [0059] 6-1. A상 조성물의 제조
- [0060] 1,3-부틸렌글라이콜 3g
- [0061] 히아루론산 3% 용액(w/v) 5g
- [0062] 카보폴 15g
- [0063] 천연 베타인 2g
- [0064] 글리세린 3g
- [0065] 정제수 46g
- [0066] 6-2. B상 조성물의 제조
- [0067] 식물성 오일 2g
- [0068] 코스몰 3g
- [0069] 라네트오 3g
- [0070] 오일 13g
- [0071] 6-3. C상 조성물의 제조
- [0072] 수산화칼륨 0.1g
- [0073] 정제수 2g
- [0074] 6-4. D상 조성물의 제조
- [0075] 본 발명의 화합물 4의 5% 용액(w/v) 2g
- [0076] 마치현 열수 추출물(자극 완화제)..... 1g
- [0077] 방부제 0.3g
- [0078] 상기 화장료 조성물에 포함된 본 발명의 화합물 4는 정제수 또는 부틸렌글라이콜에 5%(w/v)의 농도로 용해하여 사용하였다.
- [0079] <실시예 7. 신나모일살리실아미드 유도체 함유 화장료의 단기 안정성 확인>
- [0080] 상기 실시예 6에서 제조한 본 발명의 화합물 4를 함유한 크림을 각각 실온, 45℃, 40℃, 4℃, 순환 조건(-4℃ ~40℃)에서 방치하고 시간 경과에 따라 색상의 변화를 총 30일 동안 관찰하였고, 변색, 변취 모두 이상 없이 제품 안정성이 양호함을 알 수 있었다.
- [0081] <실시예 8. 신나모일살리실아미드 유도체 함유 화장료의 인체피부자극 확인>
- [0082] 상기 실시예 6에서 제조한 본 발명의 화합물 4를 함유한 크림을 각각 10명의 자원자를 대상으로 첩포검사를 시행하였으며, 모두 아무런 자극 반응이 없었던 것으로 나타났다.

도면

도면1



도면2



도면3

