(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0015359
(43) 공개일자 2022년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 36/79 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0100827
(22) 출원일자 2021년07월30일
심사청구일자 2021년07월30일
(30) 우선권주장
1020200095440 2020년07월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
김유근
경상남도 진주시 소호로19번길 11, 108동 1303호 (충무공동, 진주혁신도시 중흥에스-클래스 더프라임)
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김유근
경상남도 진주시 소호로19번길 11, 108동 1303호 (충무공동, 진주혁신도시 중흥에스-클래스 더프라임)
이영훈
경상남도 진주시 문산읍 월아산로950번길 13-16
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

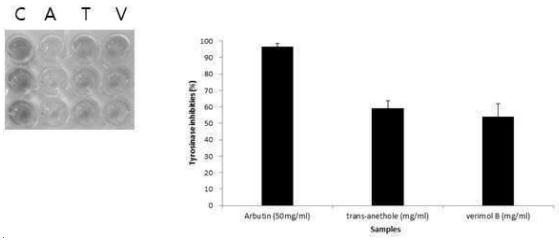
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 미백용 화장료 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 미백용 화장료 조성물; 의약외품 조성물; 피부 색소침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물; 및 피부 색소침착 질환의 예방 또는 완화용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도11



(52) CPC특허분류
A61K 36/79 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
(72) 발명자
이용현
경상남도 진주시 망경북길 58 우림빌라 304호

정은주
경상남도 진주시 동진로 33, 21동 311호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425140741
과제번호	S2635209
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	연구마을 지원사업
연구과제명	팔각회향으로부터 미백활성이 우수한 화장품소재개발 및 이를 이용한 기능성화장품 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	KB코스메틱
연구기간	2018.06.01 ~ 2020.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 용매추출 또는 이산화탄소 초임계추출 (SC-CO2 Gas Extraction System)을 통해 수득한 것인, 화장료 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 용매추출의 추출용매는 n-헥산, 디클로로메탄, 아세톤, 에틸아세테이트, 에탄올 및 물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 화장료 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 화합물은 베리몰 B(Verimol B)인 것인, 화장료 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 미백은 티로시나제 활성 저해에 의한 것인, 화장료 조성물.

청구항 6

팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 피부 미백용 의약외품 조성물.

청구항 7

팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 피부 색소침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 피부 색소침착 질환의 예방 또는 완화용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 미백용 화장료 조성물; 의약외품 조성물; 피부 색소침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물; 및 피부 색소침착 질환의 예방 또는 완화용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 피부의 색을 결정하는 멜라닌 생성에 대한 화학적 작용은 현재까지 여러 논문 등을 통해 많이 보고되고 있는데, 멜라닌 생성세포인 멜라노사이트(melanocyte)가 멜라노좀(melanosome)이라는 세포내 소기관 내에서 자외선으로부터 세포를 보호하는 기능을 가지는 멜라닌을 합성한 후, 상기 멜라닌이 멜라노사이트에서 각질형성세포(keratinocyte)로 이동하는 것으로 알려져 있으며, 이렇게 각질형성세포로 이동된 멜라닌이 피부색을 결정하는 것으로 보고되고 있다.

[0003] 상기 멜라닌 생합성 과정에서 필요한 전구물질은 티로신이라는 아미노산으로, 이 티로신은 디히드록시페닐알라닌(dihydroxyphenylalanine, DOPA)으로 전환되고, 그 후 도파퀴논(dopaquinone)이라는 물질 등을 거쳐 최종적

으로 멜라닌으로 전환된다고 알려져 있다.

[0004] 이와 관련하여, 멜라닌 형성 효소로는 티로시나제(tyrosinase; TYR), 티로시나제 관련 단백질 1(tyrosinase-related protein 1; TRP-1) 및 티로시나제 관련 단백질 2(tyrosinase-related protein 2, TRP-2/DOPA, chrome tautomerase) 등이 알려져 있으며, 상기 멜라닌 형성 효소는 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)라 불리는 전사인자에 의해 조절된다고 알려져 있다. 티로시나제에 의해 합성된 멜라닌은 피부색을 짙게 만드는데, 건강 또는 미용상의 요구로 인해 상기 멜라닌 합성을 억제하여 피부색을 밝게 하려는 피부 미백 방법에 관한 연구가 활발히 진행 중이다.

[0005] 일반적으로 알려진 미백 성분으로서, 티로시나제 효소 활성을 저해하는 알부틴, 코지산(코직산), 아젤라익산, 알로에신, 4-부틸레소시놀, 레스베라트롤, 세라마이드, 스핑고신-1-인산, 스핑고실포스포릴콜린 등과 같은 물질이나, 하이드로퀴논(대한민국 공개특허공보 2016-0014271)등이 있다. 그러나 일부 미백성분들은 피부 적용 시, 자극과 발적 등의 안전성의 문제로 사용량의 제한이 있거나, 효과가 미미하여 실질적인 효과를 기대할 수 없는 문제점이 있다. 특히 하이드로퀴논의 경우 비가역적 백화현상 등의 원치 않는 부작용으로 그 사용이 금지 되었고(European Committee 24th Dir 2000/6/EC), 하이드로퀴논의 구조 유사체인 알부틴 등으로 대체된 바 있다. 이와 같이 미백분야에서는 티로시나제 활성 저해 효과를 보유하여 미백 효과를 지니는 것뿐만 아니라 안정성 확보가 특히 중요하여, 상기와 같은 요건을 모두 충족하는 물질의 개발이 여전히 요구되고 있다.

[0006] 최근에는 라이프 스타일의 변화와 웰빙에 대한 관심과 더불어, 웰빙에 대한 수요가 점차 증가하고 있는 추세이다. 이에 피부 미용 분야에 있어서도 수요자들의 관심이 높아지고 있으며, 관련 피부 미백 제품의 개발도 다양하게 이루어지고 있으나, 그 효능에 대한 실제 소비자들의 신뢰도는 그다지 높지 않은 상황이다. 또한, 최근 자연주의 바람이 불면서 천연 재료로 만든 제품에 대한 선호도가 높아지고 있어, 천연 재료를 이용하는 기술을 기반으로 하는, 화장품 시장이 급격히 증가하고 있는 추세이다. 천연 재료를 이용하여 화장품을 제조하면 천연 재료가 갖는 유효성분의 흡수율과 안전성을 높일 수 있는 장점이 있다.

[0007] 팔각회향(Illicium Verum (Anise) Fruit)은 중국의 광둥(廣東)성, 광시(廣西)성, 푸젠(福建)성, 하이난(海南)성, 인도, 베트남이 원산지로, 붓순나무과(Illiciaceae)의 열매이며 국내에서는 생소한 향신료 중의 하나로서 중국 향신료의 일종이다. 중국이나 한국에서는 팔각(八角)이나 팔각회향(八角茴香)이라고 부르며, 영어로는 스타 아니스(Star Anise)라고 부른다

[0008] 이러한 배경하에, 본 발명의 발명자들은 피부 미백 기능의 화장품의 소재로, 천연 재료를 활용하여 피부에 적용 시 안전성을 확보하면서도, 실질적으로 피부 미백 효능에 도움을 줄 수 있는 물질을 개발하고자 예의 노력한 결과, 팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물의 항산화 효능 및 티로시나제 활성 저해능이 우수하여 뛰어난 미백 효능이 있음을 발견하고, 이를 피부 미백 목적으로 사용할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은 팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 피부 미백용 의약외품 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 피부 색소침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 피부 색소침착 질환의 예방 또는 완화용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0015] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 천연 소재인 팔각회향을 고온 및 가압을 통해 추출한 추출물이 피부에 적용시 안전하면서도 항산화능이 우수하고, 티로시나제 활성 저해능이 뛰어나 미백 효능이 있음을 발견하고, 이를 피부 미백용 조성물에 활용하고자한 기술 사상에 기초한 것이다.

[0017] 본 발명에서 용어, "팔각회향(Illicium Verum (Anise) Fruit)"은 붓순나무과(Illiciaceae)에 속하며 열매를 말린 것이다. 중국이나 한국에서는 팔각(八角)이나 팔각회향(八角茴香)이라고 부르며, 영어로는 스타 아니스(Star Anise)라고 부른다. 취하과로써 대개 8개의 골돌과가 중심으로부터 방사상으로 배열되어 있으며 각 골돌과는 길이 1~2cm, 너비 0.3~0.5cm, 높이 0.6~1cm이다. 바깥 면은 적갈색으로 불규칙한 주름이 있으며 위 끝은 새부리 모양이고 위쪽은 대부분 벌어져 있으며, 안쪽 면은 연한 갈색이고 매끄러우며 광택이 있다.

[0018] 성분은 정유, 세스퀴테르펜(sesquiterpenes), 페닐프로파노이드(phenylpropanoids), 리그난(liganan) 등으로 구성되어 있으며, 특히, 정유성분에는 트랜스-아네톨(trans-anethole), 아니스알데하이드(anisaldehyde), 리모넨(limonene), 에스트라골(estragole), 아니실 아세테이트(anisyl acetate), 페니컬린(feniculin), α-트랜스-베르가모텐(α-trans-bergamotene)(Ghasemi Z, Hassanpour-Ezatti M, Kamalinejas M, Janahmadi M. Fitoterapia. 2011, 82, 750-756.) 등이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 이중 트랜스-아네톨은 항산화제, 항염증치료제, 항 발암성 치료제, 마취제 등으로 사용되고 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 팔각회향은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명에서 용어 "추출물"은 목적하는 물질을 다양한 용매에 침지한 다음, 상온, 저온 또는 가온 상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상성분, 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미한다. 뿐만 아니라, 상기 결과물의 희석액, 이들의 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들의 조정제물, 정제물 등을 모두 포함하는 것으로 포괄적으로 해석될 수 있다.

[0021] 상기 추출물을 추출하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 용매 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.

[0022] 또한, 추출에 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출 용매의 비제한적인 예로는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합 용매 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 추출물은 팔각회향 추출물일 수 있고, 용매추출 또는 이산화탄소 초임계추출 (SC-CO2 Gas Extraction System)을 통해 수득한 것 일 수 있으며, 가압 조건에서 추출하는 것일 수 있다. 상기 “가압”은 압력을 가하는 것을 의미하며, 본 발명에 있어서 상기 가압은 100 bar 내지 200 bar인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 용매추출은 구체적으로, 가속용매추출을 의미할 수 있다.

[0026] 상기 추출물은 추출 후 건조 분말 형태로 제조되어 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 추출 방법을 통해 총 8종의 팔각회향 추출물을 제조하였고, 구체적으로, n-헥산, 디클로로메탄, 아세톤, 에틸아세테이트, 50% 에탄올, 100% 에탄올, 물을 추출 용매로 한 가속용매추출에 의한 추출물 7종과 이산화탄소 초임계추출에 의한 추출물 1종을 제조하였다(도 1).

[0028] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 8종의 추출물의 용매별 수율 및 티로시나제 저해 평가를 통해 50% 에탄올 추출물로 최종 결정하였으며(도 2), 이후 상기 추출물의 건조분말을 무수에탄올에 현탁시키고 원심분리한 상등액을 0.01 내지 0.1 mg/g의 농도 범위에서 티로시나제 활성을 측정한 결과, 0.01 mg/g 농도에서 IC50값이 52.389%임을 확인하였다(도 3).

[0029] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 8종의 추출물을 대상으로 DPPH 라디컬 소거 활성 평가를 통해 50% 에탄

올 추출물에서 가장 우수한 활성을 나타냄을 확인하였고(도 4), 이후 상기 추출물의 건조분말을 무수에탄올에 현탁시키고 원심분리한 상등액을 10 내지 100 mg/g의 농도 범위에서 DPPH 라디컬 소거 활성을 확인한 결과, 40 mg/g 이상의 고농도에서는 양성 대조군과 유사한 수준의 DPPH 라디컬 소거 활성을 나타내었고, 20.0 mg/g 농도에서 양성 대조군인 비타민 C 수용액 (10 mg/ml) 대비 IC50값이 54.15%임을 확인하였다(도 5).

[0030] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, 팔각회향 50% 에탄올 추출물의 세포 독성을 확인한 결과, 0.01 내지 20 mg/ml 전 농도 구간에서 100% 이상 세포 생존율을 확인하였다(도 6).

[0031] 본 발명에서 상기 팔각회향 추출물은 이의 분획물로 제조되어 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명에서 용어, "분획물"은 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.

[0033] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 분획 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 다양한 용매를 처리하여 수행하는 용매 분획법, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 수행하는 한외여과 분획법, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)를 수행하는 크로마토그래피 분획법, 및 이의 조합 등이 될 수 있다. 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 데에 사용되는 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매 등을 사용할 수 있으며, 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 4의 알코올이나, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매, 헥산 또는 디크로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있다. 또한, 구체적으로 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로는 에탄올을 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 팔각회향 추출물의 분획물은 팔각회향 50% 에탄올 추출물의 분획물일 수 있다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 추출물을 MPLC (Isolera, Biotage, US)를 이용하여 극성별로 소분획 10개로 세분화하였고, 분리용 카트리지에 Cosmosil C18 레진을 로딩하여 물과 MeOH을 구배 용출하였다(도 8).

[0036] 본 발명에서 상기 팔각회향 추출물, 이의 분획물은 이들로부터 분리한 화합물을 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 팔각회향 추출물, 이의 분획물로부터 다양한 컬럼을 사용하여 화합물 1 및 2를 분리하였으며(도 9), 상기 화합물은 각각 베리몰 B(Verimol B) 및 트랜스 아네톨(Trans-anethole)임을 확인하였다(도 10).

[0039] 본 발명에서 용어, "미백"은 멜라닌 등의 색소의 과다로 인하여 명도가 감소된 피부의 명도를 증가시키거나 또는 피부의 명도를 일정 수준으로 유지하는 방법, 상기 방법으로 형성된 명도가 증가된 피부 등을 포괄하여 의미하는 것으로서, 구체적으로는 피부 미백을 의미할 수 있다. 상기 "피부 미백"은 티로시나제 활성 저해에 따른 결과로서 이해될 수 있으며, 구체적으로 티로시나제 활성이 저해됨에 따라 멜라닌의 생성이 저해되어 멜라닌의 증가에서 비롯되는 증상, 예컨대 기미, 주근깨 개선으로서 이해될 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에서는, 분리된 화합물 1 및 2의 티로시나제 저해 활성을 측정한 결과, 양성대조군(50 mg/ml 알부틴) 대비 화합물 1 및 2의 티로시나제 저해 활성은 1 mg/ml의 농도에서 각각 54.029% 및 59.243%로서 우수한 티로시나제 저해 활성을 가짐을 확인하였다(도 11).

[0041] 본 발명의 피부 미백용 화장료 조성물은 유효성분인 팔각회향 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물 이외에, 피부 미백 효과를 상승 또는 보강시킬 수 있도록 피부 미백 효과가 있다고 알려진 화합물이나 천연 추출물을 포함할 수 있다. 여기서 미백 효과가 있다고 공지된 화합물이나 천연 추출물로서는 멀캅토숙신산, 멀캅토텍스트란, 테프레논, 디하이드 록시-이소퀴놀린, 인도메타신, 3-하이드록시마늘, 비타민 K, 티아졸리돈, 키누레닌, 레몬 추출물, 오이 추출물, 오디 추출물, 로즈마리 추출물, 아세로라 체리 추출물, 은행 추출물, 제라늄(geranium) 추출물 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명의 화장료 조성물은 팔각회향 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 50 중량%(w/w)로 포함할 수 있고, 구체적으로 0.001 내지 5 중량%(w/w)로 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0043] 본 발명에 있어서, 팔각회향 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물이 조성물 총 중량 대비 0.0001

중량% 미만일 경우 본래 목적으로 하는 활성을 충분하게 달성할 수 없어 바람직하지 못할 수 있고, 15중량%를 초과하는 경우 증가하는 함량만큼 뚜렷한 효과의 증대가 기대되지 않아 비경제적일 수 있다.

[0044] 상기 화장료 조성물은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 팩, 피부접착용 패치, 피부접착용 겔, 파우더, 연고, 페이스트, 젤, 서스펜션, 에멀젼, 스프레이, 미용액 또는 캡슐로 제형화되는 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명의 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면, 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 저급 알콜, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 제형에 따라 다양하다.

[0046] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화아연 또는 이들의 혼합물이 이용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리아미드 파우더 또는 이들의 혼합물이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있다.

[0048] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일이 이용될 수 있으며, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있다.

[0049] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0050] 한편, 본 발명의 제형이 캡슐인 경우에는, 알지네이트(alginate) 캡슐, 아가(agar) 캡슐, 젤라틴(gelatin) 캡슐, 왁스(wax)류 캡슐, 또는 이중 캡슐의 형태로 제형화될 수 있으며, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0051] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 팔각회향 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물 이외에 통상적으로 이용되는 보조제, 예컨대 친수성 또는 친지성 겔화제, 친수성 또는 친지성 활성제, 보존제, 항산화제, 용매, 방향제, 충전제, 차단제, 안료, 흡취제 및 염료 등을 포함할 수 있다.

[0053] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 피부 미백용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0054] 상기 용어, "팔각회향", "추출물", "분획물", "화합물" 및 "피부 미백"은 상기에서 서술한 바와 같다.

[0055] 상기 미백용 의약외품 조성물은 피부에 침착된 멜라닌 색소의 색을 엷게 하는데 도움을 주는 기능을 가질 수 있으며, 티로시나제 활성을 저해함으로써 피부에 멜라닌 색소가 과다 침착하는 것을 방지하여 피부 색소 침착 질환의 발생을 억제함으로써 피부의 미백에 도움을 주는 기능을 가질 수 있다.

[0056] 본 발명의 의약외품 조성물에는 상기 성분 외에 필요에 따라 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제는 본 발명의 효과를 해하지 않는 한 제한되지 않으며, 예를 들어 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 윤활제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.

[0057] 본 발명의 의약외품 조성물은 소독 청결제, 샤워폼, 연고액, 물티슈, 코팅제 등을 예시할 수 있으나 이에 제한되는 것이 아니며, 의약외품의 제제화 방법, 용량, 이용방법, 구성성분 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히 선택될 수 있다.

[0059] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 피부 색소침착 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0060] 상기 용어, "팔각회향", "추출물", "분획물" 및 "화합물"은 상기에서 서술한 바와 같다.

[0061] 본 발령의 용어, "피부 색소침착 질환"은 멜라닌 색소의 합성 증가로 피부에 국소적으로 발생하는 것을 의미할 수 있으며, 구체적으로, 주근깨, 노인성 반점, 간반, 기미, 갈색 또는 흑점, 일광 색소반, 푸른 흑피증(cyanic melasma), 약물 사용 후의 과다색소침착, 임신성 갈색반(gravidic chloasma), 찰상 및 화상을 비롯한 상처 또는 피부염에 의한 과다 색소침착으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 질환일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0062] 본 발명의 용어, "예방"은 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 피부 색소침착 질환의 발병을 억제시키거나 또는 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0063] 본 발명의 용어, "치료"는 상기 약학 조성물의 투여에 의해 피부 색소침착 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0064] 본 발명의 약학 조성물은 임상 투여 시에 경구적, 비경구적으로 투여될 수 있지만, 통상적으로 외용제 제형으로 피부에 국소적으로 직접 투여될 수 있다.

[0065] 본 발명의 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 50 중량%(w/w)로 포함할 수 있고, 구체적으로 0.001 내지 5 중량%(w/w)로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0066] 또한, 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있고, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occuring carrier)를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0067] 또한, 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 경피흡수제, 겔제, 로션제, 연고제, 크림제, 첩부제, 카타플라스마제, 페이스트제, 스프레이, 피부 유화액, 피부 현탁액, 경피 전달성 패치, 약물 함유 붕대 또는 좌제의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 제형화할 경우 통상 사용하는 충진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0069] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 피부 색소침착 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0070] 상기 용어, "팔각회향", "추출물", "분획물", "화합물", "피부 색소침착 질환", "예방" 및 "치료"는 상기에서 서술한 바와 같다.

[0071] 본 발명에서 용어, "개체"는 본 발명의 피부 색소침착 질환을 가지고 있거나 또는 발병한, 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물을 개체에 투여함으로 피부 색소침착 질환의 예방 및 치료 효과를 얻을 수 있다.

[0072] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.

[0073] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0074] 상기 약학 조성물은 목적 또는 필요에 따라 당업계에서 사용되는 통상적인 방법, 투여 경로, 투여량에 따라 적절하게 개체에 투여될 수 있다. 투여 경로의 예로는 경구, 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있으며, 비경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 또한 당업계에 공지된 방법에 따라 적절한 투여량 및 투여 횟수가 선택될 수 있으며, 실제로 투여되는 본 발명의 약학 조성물의 양 및 투여 횟수는 치료하고자 하는 증상의 종류, 투여 경로, 성별, 건강 상태, 식이, 개체의 연령 및 체중, 및 질환의 중증도와 같은 다양한 인자에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0075] 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 혈관 투과성 증가를 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약 물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들면, 상기 팔각회향 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 1일 0.01 내지 500 ㎎/㎏으로, 구체적으로 10 내지 100 ㎎/㎏의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한 번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다

[0076] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0077] 본 발명의 조성물은 피부 색소침착의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용할 수 있고, 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0079] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 피부 색소침착 질환의 예방 또는 완화용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0080] 상기 용어, "팔각회향", "추출물", "분획물", "화합물", "피부 색소침착 질환" 및 "예방"은 상기에서 서술한 바와 같다.

[0081] 본 발명에 따른 팔각회향 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 우수한 티로시나제 저해 활성을 나타내므로, 피부 색소침착 질환의 예방 또는 완화를 목적으로 식품 조성물에 포함될 수 있으며, 상기 식품 조성물은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 색소침착에 의한 피부 질환의 예방 또는 완화에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있다.

[0082] 본 발명에서 용어, "완화"는 일정 이상의 상해적 자극에 의해 유발되는 생체 반응을 감소시켜 비특이적인 전신 증후군을 억제시키는 것을 의미할 수 있다.

[0083] 본 발명의 용어, "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, '기능성'은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 한편, 건강식품은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품은 건강 보조 목적의 식품을 의미하는데, 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다.

[0084] 본 발명의 팔각회향 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 그대로 첨가되거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0085] 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조 시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 구체적으로, 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 또한, 상기 식품 조성물은 방부제, 살균제, 산화방지제, 착색제, 발색제, 표백제, 조미료, 감미료, 향료, 팽창제, 강화제, 유화제, 증점제, 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절

한 양으로 사용될 수 있다.

[0086] 또한, 상기 식품의 제형은 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고 휴대성이 뛰어나므로, 본 발명의 식품은 색소침착에 의한 피부 질환의 예방 또는 완화 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0087] 본 발명의 팔각회향 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 색소침착에 의한 피부 질환의 예방 또는 완화 효과를 나타낼 수 있다면 식품조성물에 다양한 중량%로 포함될 수 있다. 구체적으로 식품 조성물의 총 중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0088] 본 발명의 팔각회향 추출물, 이의 분획물, 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물은 항산화 효능이 우수하고, 티로시나제 활성을 저해하는 효과를 가지므로, 피부 미백 용도로서 안전하고 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0089] 도 1는 추출 용매의 조성, 추출온도, 추출 압력을 다양하게 적용한 총 8종의 팔각회향 추출물을 나타낸 것이다.

도 2은 7종의 팔각회향 추출물(Illicium Verum (Anise) Fruit Extract)의 용매별 티로시나제(tyrosinase) 저해 활성(n=5)을 나타낸 것이다.

도 3은 팔각회향 50% 에탄올 추출물의 농도별(0.01 mg/ml~0.1 mg/ml) 티로시나제 저해 활성(n=5)을 나타낸 것이다.

도 4은 용매별 팔각회향 추출물의 DPPH 라디컬 소거능(n=3)을 나타낸 것이다.

도 5은 팔각회향 50% 에탄올 추출물의 농도별(10 mg/g~100 mg/g) DPPH 라디컬 소거능(n=5)을 나타낸 것이다(C : Control(-), V : 10 mg/g Ascorbic acid, A : 10 mg/g, B : 20 mg/g , C : 30 mg/g, D : 40 mg/g, E : 50 mg/g, F : 60 mg/g, G : 70 mg/g, H : 80 mg/g, I : 90 mg/g, J : 100 mg/g).

도 6은 팔각회향 50% 에탄올 추출물의 피부각질세포인 HaCaT 세포에 대한 세포생존율을 나타낸 것이다.

도 7는 팔각회향 50% 에탄올 추출물 제조 모식도를 나타낸 것이다.

도 8은 팔각회향 50% 에탄올 추출물의 MPLC chromatogram을 나타낸 것이다.

도 9는 팔각회향 50% 에탄올 추출물로부터 화합물 1, 2의 분리를 나타낸 모식도이다.

도 10는 팔각회향 50% 에탄올 추출물로부터 분리한 화합물 1,2의 구조를 나타낸 것이다.

도 11은 팔각회향 추출물로부터 분리한 화합물의 멜라닌 생성 저해 효과를 나타낸 것이다(C: Control, A: 50 mg/ml 알부틴, T: 트랜스-아네톨(Trans-anethole), V: 베리몰 B(Verimol B).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0090] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0092] **실시예 1. 팔각회향으로부터 생리활성성분의 추출**

[0093] **1-1. 실험방법 및 재료**

[0094] 팔각회향으로부터 생리활성을 최대로 나타내는 추출물을 제조하고 이로부터 유용물질을 도출하기 위하여 다양한 추출조건을 적용하여 팔각회향 추출물을 제조하였다. 추출 조건별 생리활성을 비교하고, 동시에 추출 수율을 계산하여 추출물의 경제성을 분석하고자 하였다. 추출에 사용된 팔각회향은 두손애약초(원산지: 베트남)에서 구입

하였고, 건조된 팔각회향을 믹서기로 분쇄하여 분말로 만든 다음 2.38 ㎜체에 통과시킨 후 통과된 시료를 실험에 이용하였다.

[0096] **1-2. 팔각회향 추출물의 제조**

[0097] 추출 용매의 조성, 추출온도, 추출압력 등을 다양하게 적용하여 가속용매추출(Accelated Solvent Extractor)과 이산화탄소 초임계추출 (SC-CO2 Gas Extraction System)을 통해 총 8종의 팔각회향 추출물을 제조하였다(도 1). 가속용매추출은 가압용매추출장치 (Speed Extractor E-916, Buchi)를 이용하였으며, 구체적으로, 추출용 20 ml cell에 fat free quartz sand (0.3 ~ 0.9 ㎜)를 채우고 셀라이트(celite)와 팔각회향 분말을 1:1 동량으로 섞어 총 4 g을 로딩하고 그 위에 fat free quartz sand를 채운 다음 추출을 진행하였다(도 7).

[0098] 팔각회향의 극성별 성분을 용출하기 위하여 n-헥산, 디클로로메탄, 아세톤, 에틸아세테이트를 추출 용매로 30℃에서 15분간 추출하여 4종의 추출물을 제조하였고, 화장품 원료로서 사용될 수 있는 주정인 50% 에탄올과 100% 에탄올을 추출 용매로 하여, 에탄올의 bp점 이하인 70℃에서 15분간 추출하여 2종의 주정 추출물을 제조하였다. 그리고 열수 추출물은 100℃ 온도조건에서 15분간 정제수를 이용하여 추출하였다. 가속용매추출장치로 추출한 7종의 추출물은 100 bar의 압력조건에서 15분간, 각 200 ml의 추출 용매를 가하여 1 cycle로 추출하였고, 하기 표 1에 나타내였다.

표 1

[0099]

No.	Group	Extract solvent	Time (min)	Temperature(℃)	Pressure(bar)
1	유기용매 추출물	*n*-hexane	15	30	100
2		Dichloromethane			
3		Acetone			
4		Ethyl Acetate			
5	주정 추출물	50% EtOH		70	
6		100% EtOH			
7	열수 추출물	DDW		100	

[0101] 초임계추출은 초임계추출장치인 (ISA-SCCO-S-1000-500, 일신)을 이용하였다. 팔각회향 분말 400 g을 초임계추출용 cell에 loading 하고 200 bar의 압력조건에서 1시간동안 1 cycle로 추출하였다.

[0103] **1-3. 주요결과**

[0104] 상기 방법으로 제조한 팔각회향의 추출물에 대하여 색도, 향기, 점도 등을 비교하고, 추출 조건별 추출 수율을 계산하였다.

[0105] 가속용매추출장치로 추출한 추출물의 경우, 유기용매를 추출 용매로 사용했을 때 6.23~8.83%의 상대적으로 낮은 추출 수율을 보였으며, 50% 에탄올 및 100% 에탄올의 주정 추출물은 각각 25.50% 및 28.37%, 열수 추출물의 경우는 28.97%로, 열수 추출물의 추출 수율이 가장 높은 것으로 나타났다(표 2). 다만, 열수 추출물의 경우 혼탁하여 침전물이 발생하였다. 활성 평가시에는 모두 여과를 통하여 시험하였다. 초임계 추출물의 경우 400 g의 팔각회향 분말로부터 총 29 ml의 액상의 추출물을 얻었다.

표 2

[0106]

No.	Extraction Methods	Extract solvent	팔각회향 (g)	추출물 (mg)	수율 (%)
1	가속용매추출	n-hexane	2	124.6	6.23
2		Dichloromethane		175.4	8.77
3		Acetone		176.6	8.83
4		Ethyl acetate		157.0	7.85
5		50% EtOH		510.0	25.50
6		100% EtOH		567.4	28.37
7		DDW		579.4	28.97

8	초임계 추출물	CO2 gas	400	29 (ml)	-

[0108] **실시예 2. 팔각회향의 용매별 8종의 추출물의 활성평가**

[0109] **2-1. 팔각회향 추출물의 *in vitro* 티로시나제 저해 활성 평가**

[0110] 팔각회향 추출물의 미백 활성을 L-티로시나제(tyrosinase) assay를 통해 평가하였다. 티로시나제는 티로신으로부터 멜라닌 색소의 생성을 매개하는 효소로, 티로시나제 효소의 활성을 저해하는 정도를 측정함으로써, 팔각회향 추출물의 멜라닌 생성 억제 활성(미백활성)을 간접적으로 평가하고자 하였다. 실험 방법은 식약처의 가이드라인에 따라 진행하였다.

[0112] 구체적으로, 팔각회향의 용매별 추출물의 동결건조를 통한 건조분말을 무수에탄올에 10 mg/g이 되도록 각각 현탁시킨 후, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 용해되지 않는 펠렛(pellet)은 제거하고 상등액을 회수하였다. 회수된 용매별 상등액의 티로시나제 저해 활성 평가를 위하여 상기에 제시된 방법으로 96-웰 플레이트의 각 웰에 0.1 M Sodium phosphate Buffer(pH 6.5) 220 ul와 용매별 팔각회향 추출물 20 ul, 1.5 mM L-tyrosine solution 40 ul를 순서대로 넣었다. 여기에 1500 U/ml (sigma, USA)의 농도로 제조한 티로시나제 용액을 각 20 ul씩 넣고 37℃에서 15분간 1분 간격으로 3초간 쉐이킹하여 멜라닌 색소가 응집되지 않도록 반응시킨 다음, Microplate spectrophotometer (BIORAD xMarkTM, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로서 티로시나제 효소 대신 0.1 M Sodium phosphate Buffer(pH 6.5)를 가한 것을 블랭크(blank)로 하였고, 팔각회향 추출물 대신 추출물 제조용 무수에탄올을 가한 것을 컨트롤로 하였으며, 팔각회향 추출물 대신 식약처에서 미백 원료로 고시하는 20 mg/g(식약처 기준)의 농도인 알부틴(Arbutin)을 양성대조군(positive control)으로 하였다.

[0113] 하기 계산식에 의해 활성값을 계산한 결과, 전 용매별 시험구에서 50% 이상의 활성을 나타내었으며, 특히 디클로로메탄과 50% 에탄올 추출물에서 가장 우수한 활성인 81.982%, 75.664%를 나타내었다(도 2). 미백 활성의 경우, 50% 에탄올 추출물에 비해 디클로로메탄 추출물이 약 1.08배 높았으나, 추출물의 수율에서는 디클로로메탄 추출물에 비해 50% 에탄올 추출물이 약 1.31배 높아 티로시나제 저해 평가에서는 50% 에탄올 추출물로 최종 결정하여 이후 농도별로 시험을 수행하였다.

[0114] 모든 시험의 시료수는 5개로 설정하였고, 시료의 티로시나제 활성 저해도는 하기와 같이 계산하였다.

[0115] **Inhibition on tyrosinase activity (%) =**

[0116] $$100 - \{(Test - blank)/(Control-blank)\} \times 100$$

[0117] Test: 팔각회향 추출물 처리군의 반응 후 흡광도

[0118] Control: 팔각회향 추출물 대신 무수에탄올 처리군의 반응 후 흡광도

[0119] Blank: 티로시나제 효소 대신 완충액(buffer) 처리군의 반응 후 흡광도

[0121] 팔각회향 50% 에탄올 추출물의 동결건조를 통한 건조분말을 무수에탄올에 100 mg/g이 되도록 현탁시킨 후, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 용해되지 않는 pellet은 제거하고 상등액을 사용하였다. 상등액을 0.01 mg/g ~ 0.1 mg/g의 범위에서 0.02 mg/g 단위로 희석하여 제조하였다. Microplate spectrophotometer (BIORAD xMarkTM, USA)를 이용하여 상기의 티로시나제 저해 활성 평가법으로 측정한 결과, 0.01 mg/g에서 IC50의 범위인 52.389%의 값을 확인하였다(도 3).

[0123] **2-2. 팔각회향 추출물의 항산화력 평가**

[0124] 항산화력 평가를 위한 DPPH 라디컬 소거능 시험은 DPPH (1,1- diphenyl-2-picryl hydrazyl, Sigma, USA)에 의한 전자공여능(electron donating ability, EDA)을 측정하였다.

[0125] 구체적으로, 0.2 mM의 DPPH 용액 0.8 ml에 용매별 팔각회향 추출물(10 mg/g)을 각각 0.2 ml씩 첨가하여 혼합한

다음, 실온과 암실에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화력은 [1-(시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도)]X100의 계산식에 의해 전자공여능(%)를 구하였으며, 대조구는 시료 대신 에탄올을 첨가하였고, 10 mg/g L-ascorbic acid 수용액을 양성대조군으로 하였다.

[0126] 각종 용매별 팔각회향 추출물을 대상으로 DPPH 라디컬 소거활성을 측정한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 디클로로메탄 23.148%, 50% 에탄올 추출물 31.050%, 100% 에탄올 추출물에서 28.224%의 활성을 나타내었으며, 나머지 용매의 추출물에서는 10% 이하의 활성을 나타내었다. 따라서 50% 에탄올 추출물의 농도별 항산화 활성을 검토하고자, 미백 활성 평가에서 사용한 100 mg/g의 50% 에탄올 추출물 시료를 무수에탄올로 10 mg/g~100 mg/g 농도구간으로 10 mg/g 단위로 희석하여 시험을 수행하였다.

[0127] 그 결과 도 5에 나타난 바와 같이, 20 mg/g에서 IC50의 범위인 52.07649%의 결과를 확인할 수 있었다. 이 값의 신뢰성 확보를 위하여 공인기관에 의뢰하여 시험한 결과, 최종 목표치인 비타민 C 수용액(10 mg/ml) 대비 IC50의 범위는 20 mg/ml임을 확인하였다.

[0129] **실시예 3. 팔각회향 추출물의 세포 독성 평가**

[0130] **3-1. 피부각질세포인 HaCaT cells 에 대한 세포 독성 평가**

[0131] 세포배양

[0132] 실험에 사용할 인체 유래 피부 각질세포주인 HaCaT 세포는 DMEM 배지에 10% FBS (Gibco, Rockville, MD, USA), 100 U/ml Penicillin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 ug/ml streptomycin을 첨가한 배지에서 배양하였고, 37℃에서 5% CO_2를 유지하였다.

[0133] 세포독성평가

[0134] HaCaT 세포를 96-well plates ($1X10^4$ cells/well)에 분주하고, 37℃, 5% CO_2 Incubator에서 24시간동안 배양한 후, 팔각회향 추출물을 다양한 농도(0~20 mg/ml in FBS)로 처리하고 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 각 well에 MTT solution (5 mg/ml)을 10% 함유한 배지로 교체한 후, 37℃에서 2시간동안 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고, 대조군과의 비교를 통해 세포생존율을 측정하였다.

[0135] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 팔각회향 추출물의 전 농도에서 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

[0137] **실시예 4. 팔각회향 추출물로부터 유효성분의 분리 및 동정**

[0138] **4-1. 유효성분의 분리를 위한 팔각회향 추출물 제조**

[0139] 팔각회향으로부터 미백활성을 나타내는 기능성물질을 규명하기 위하여 최초 추출물의 제조와 동일한 방법으로 팔각회향 추출물을 제조하였다.

[0140] 구체적으로, 팔각회향 추출물을 제조하기 위하여 가압용매추출장치 (Speed Extractor E-916, Buchi)를 이용하였으며, 추출용 cell (20 ml 용량)에 fat free quartz sand (0.3 ~ 0.9 mm)를 채운 다음 셀라이트와 팔각회향 분말을 1:1로 섞어 총 4 g을 로딩하고 그 위에 fat free quartz sand를 채운 후 추출을 진행하였다. 우수한 티로시나제 저해 활성이 확인된 추출 용매 조건인 50% 에탄올을 추출 용매로 설정하고, 100 bar, 70℃의 조건에서 15분간 추출하여 팔각회향 50% 에탄올 추출물을 제조하였다(도 7).

[0141] 상기 팔각회향 50% 에탄올 추출물은 감압농축장치를 이용하여 용매를 제거한 다음 소량의 에탄올에 녹여 바이얼에 옮긴 다음, 질소농축기를 이용하여 용매를 제거하였다. 건조된 추출물은 -20℃에서 3시간 이상 방치한 후 동결건조기를 이용하여 수분을 완전히 제거하였다.

[0143] **4-2. 팔각회향 추출물로부터 기능성 화합물의 분리**

[0144] MPLC를 이용한 극성별 추출물 분취

[0145] 팔각회향 추출물로부터 티로시나제 저해 활성을 나타내는 기능성 물질을 분리하기 위하여 상기에서 제조한 팔각

회향 50% 에탄올 추출물을 MPLC (Isolera, Biotage, US)를 이용하여 극성별로 10개의 소분획으로 세분화하였다. 분리용 카트리지에 Cosmosil C18 resin을 로딩하고 물과 MeOH을 구배 용출하였다.

[0147] 팔각회향 추출물로부터 화합물 1, 2의 분리 및 정제

[0148] 10개의 소분획 중 소분획 5, 6으로부터 HPLC를 이용하여 화합물 1과 2를 분리하였다(도 9). 다양한 컬럼(Shsheido Capcell Pak, Phenomenex Synergi 4μ RP80A, Thermo Acclaim™ Advantage ±, Phenomenex Gemini 5 μ C18 110A)을 이용하여 각 분획물별 peak resolution을 비교하고, 가장 우수한 resolution을 나타낸 컬럼을 화합물 1과 2의 분리에 각각 사용하였다. 화합물 분리에 사용된 HPLC system은 binary pump (LPG-3400SD)와 diode array detector (DAD-3000)로 구성된 Thermo Scientific DIONEX Ultimate 3000 (Thermo scientific, Germany)을 사용하였다.

[0150] 화합물 1의 분리 및 정제

[0151] 화합물 1의 분리를 위한 HPLC 조건은 아래와 같다. 컬럼은 Shiseido Capcell Pak C18, 4.6X250 mm을 사용하였으며, 물 : MeOH = 55 : 45 (isocratic)을 이동상으로 하고, flow rate 1.0 ml/min으로 50분간 분석하였다. 검출파장은 254 nm으로 설정하였다.

표 3

[0152]

Column	Shiseido Capcell Pak
Flow rate	1.0 ml/min
Injection volume	30 μl (diluted in MeOH)
Mobile phase	45% MeOH (isocratic)

[0154] 화합물 2의 분리 및 정제

[0155] 화합물 2의 분리를 위한 HPLC 조건은 아래와 같다. 컬럼은 Phenomenex Synergi 4μ RP80A, 4.6X250 mm를 사용하였으며, 물 : MeOH = 47 : 53 (isocratic)을 이동상으로 하고, flow rate 1.0 ml/min으로 40분간 분석하였다. 검출파장은 254 nm으로 설정하였다.

표 4

[0156]

Column	Phenomenex Synergi 4μ RP80A
Flow rate	1.0 ml/min
Injection volume	50 μl (diluted in MeOH)
Mobile phase	53% MeOH (isocratic)

[0158] **4-3. 팔각회향으로부터 분리한 화합물 1 및 2의 화학구조 규명**

[0159] 팔각회향으로부터 분리한 화합물 1 및 2의 입체구조를 규명하기 위하여 1H, 13C-NMR 스펙트럼을 통해 분자 내 수소와 탄소의 정보를 얻고, 2D-NMR 실험(COSY, TOCSY, HSQC, HMBC)을 통해 평면구조를 결정하였다. ROESY 실험을 통해 화합물의 3차원적인 구조를 결정하고 MS분석을 통해 화합물의 분자량 및 분자식을 확인하였다. 이후, 문헌치와 비교한 결과, 화합물 1은 베리몰 B(Verimol B)이고, 화합물 2는 트랜스 아네톨(Trans-anethole)임을 확인하였다(도 10).

[0161] **실시예 5. 분리된 화합물의 동정, 팔각회향 추출물에 포함된 함량 분석 및 이의 미백효능 확인**

[0162] **5-1. 분리된 화합물의 동정, 팔각회향 추출물에 포함된 함량 분석**

[0163] 우수한 티로시나제 저해 활성을 나타내는 팔각회향 50% 에탄올 추출물로부터 기능성 성분을 규명하기 위하여, MPLC를 이용하여 소분획으로 분취한 다음 HPLC를 이용한 다양한 컬럼과 용매조건을 설정하여 2종의 기능성 성분을 성공적으로 분리 및 정제하였다. 상술한 바와 같이, 화합물 1은 베리몰 B(Verimol B), 화합물 2는 트랜스 아네톨(Trans-anethole)으로 규명되었으며, 분리한 화합물은 1D, 2D-NMR experiments를 통해 화학구조를 결정하였고, 화합물 1 및 2에 대하여 LC와 GC-MS를 이용하여 함량분석을 실시하였다.

[0164] 화합물 1은 LC를 이용하여 함량분석하였으며, 팔각회향 50% 에탄올 추출물 내 각각 8.901 mg/ml 함유되어 있는 것으로 확인하였고, 화합물 2는 GC를 이용하여 함량분석한 결과, 159.493 mg/ml의 농도로 함유되어 있는 것으로 확인하였다.

[0166] **5-2. 분리된 화합물 1, 2에 대한 티로시나제 저해 활성**

[0167] 분리된 화합물 1 및 2 화합물에 대해 미백 활성 평가를 실시하였다.

[0168] 실시예 2-1의 방법과 같은 방법으로 실시하였으며, 시료의 처리농도는 화합물 1 및 2를 최종 mg/ ml의 농도로, 양성대조구로서 식약처에서 고시하는 알부틴의 최대농도인 50 mg/ml을 사용하였다.

[0169] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, 양성대조구인 50 mg/ml의 알부틴에서는 96.431%, 분리된 화합물 2인 트랜스-아네톨 (1 mg/ml)은 59.243%, 화합물 1인 베리몰 B (1 mg/ml)에서는 54.029%로서 우수한 티로시나제 저해 활성을 확인하였다.

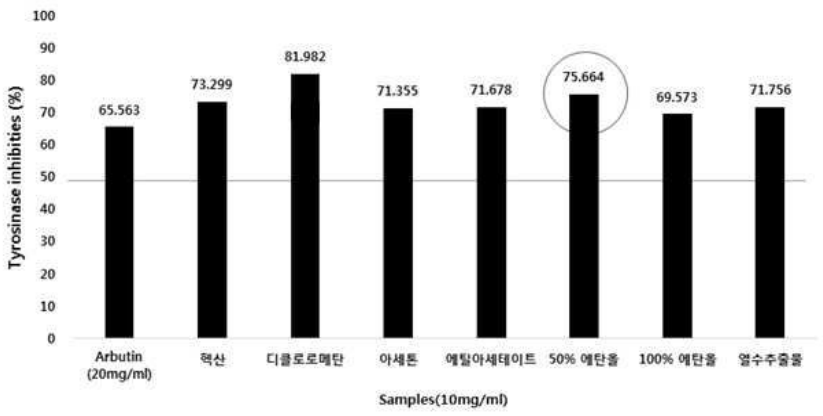
[0171] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

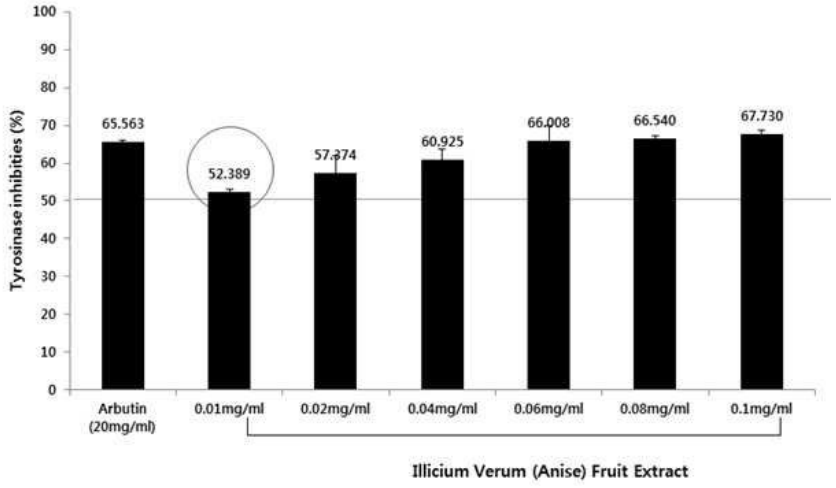
도면1



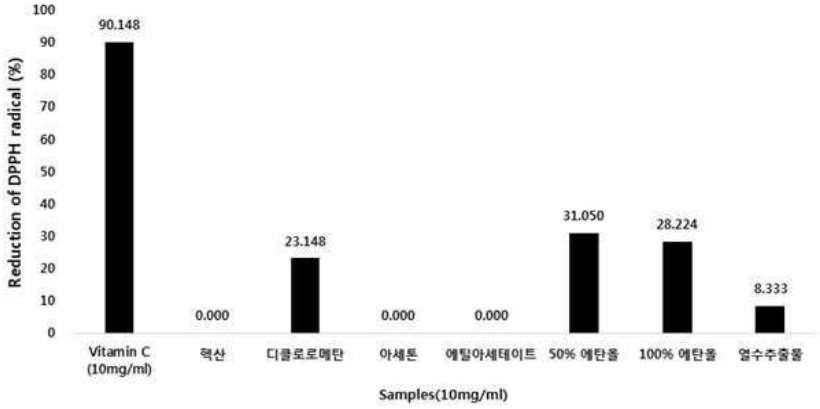
도면2



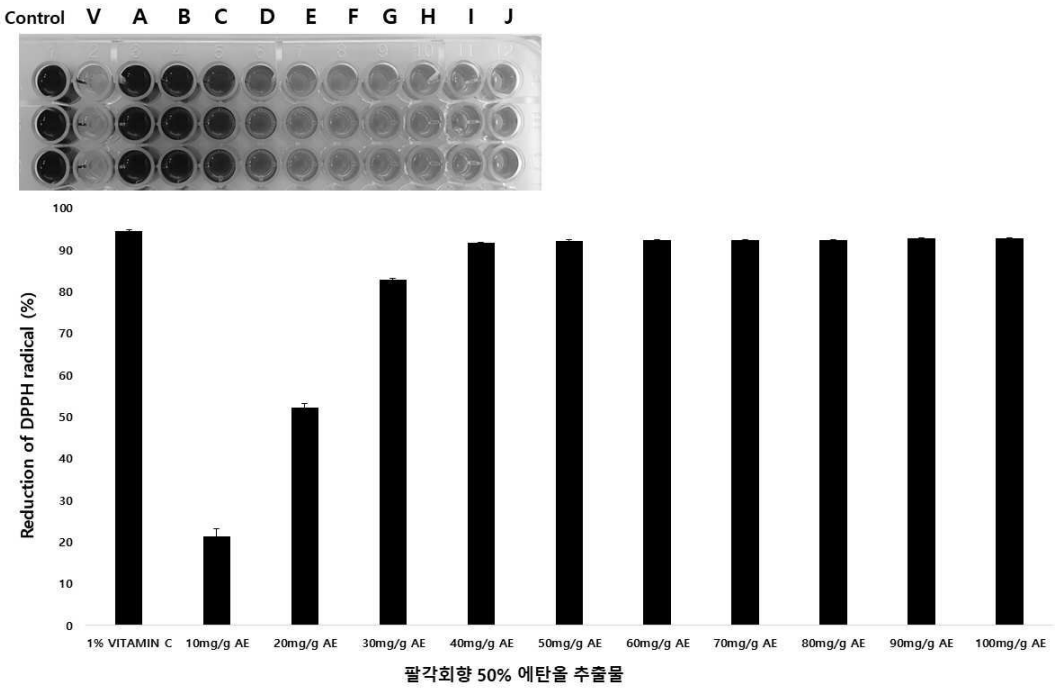
도면3


Tyrosinase inhibities (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
65.563
52.389
57.374
60.925
66.008
66.540
67.730
Arbutin (20mg/ml)
0.01mg/ml
0.02mg/ml
0.04mg/ml
0.06mg/ml
0.08mg/ml
0.1mg/ml
Illicium Verum (Anise) Fruit Extract

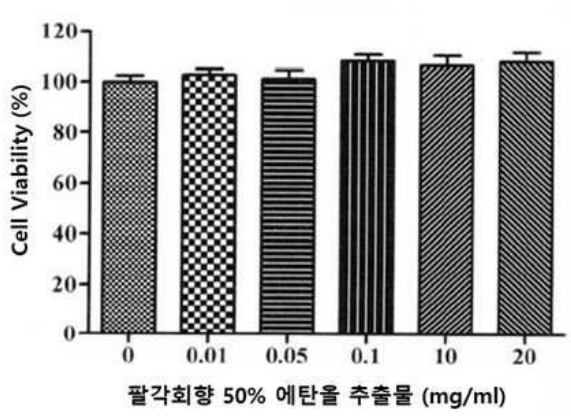
도면4


Reduction of DPPH radical (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
90.148
0.000
23.148
0.000
0.000
31.050
28.224
8.333
Vitamin C (10mg/ml)
핵산
디클로로메탄
아세톤
에틸아세테이트
50% 에탄올
100% 에탄올
열수추출물
Samples(10mg/ml)

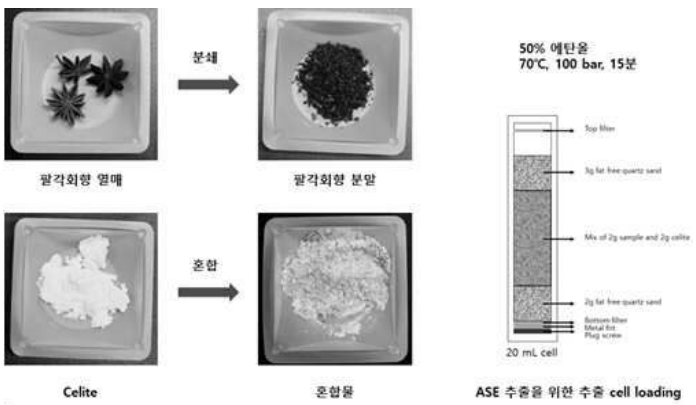
도면5


Control V A B C D E F G H I J
Reduction of DPPH radical (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1% VITAMIN C
10mg/g AE
20mg/g AE
30mg/g AE
40mg/g AE
50mg/g AE
60mg/g AE
70mg/g AE
80mg/g AE
90mg/g AE
100mg/g AE
팔각회향 50% 에탄올 추출물

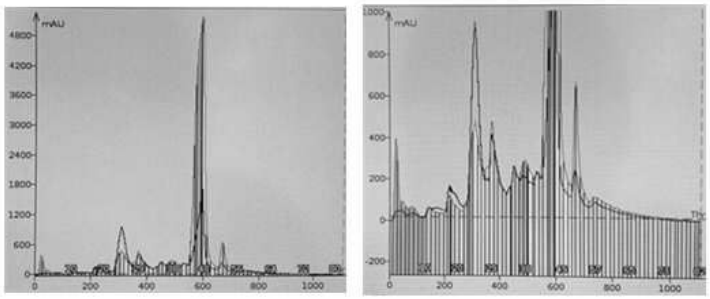
도면6


Cell Viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
0.01
0.05
0.1
10
20
팔각회향 50% 에탄올 추출물 (mg/ml)

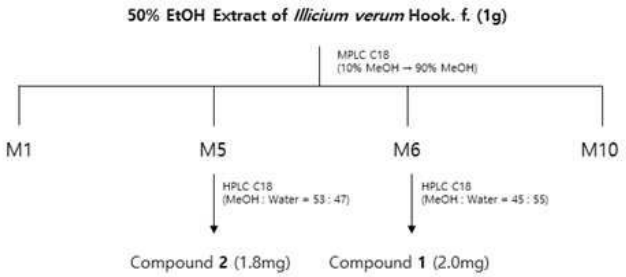
도면7


분쇄
팔각회향 열매
팔각회향 분말
혼합
Celite
혼합물
50% 에탄올
70°C, 100 bar, 15분
20 mL cell
ASE 추출을 위한 추출 cell loading

도면8



도면9



도면10



1
Verimol B

2
trans-anethole

도면11

