(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월03일
(11) 등록번호 10-2083970
(24) 등록일자 2020년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) *A61K 8/60* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A61K 8/602 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0157204
(22) 출원일자 2018년12월07일
심사청구일자 2018년12월07일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110001538 A
권정화 등, "천사의 나팔 꽃으로부터 신규 phenolic compound의 분리 및 구조동정", 한국약용작물학회 심포지엄 및 추계학술발표회, pp.237-238 (2014.)
YU, YANG 등, "Monoterpenoids from the fruit of Gardenia jasminoides", Helvetica Chimica Acta, 93권, pp. 763-771 (2010.)

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
백남인
경기도 화성시 동탄순환대로21길 53 1306동 403호(청계동, 롯데캐슬 알바트로스)
김형근
경기도 용인시 기흥구 흥덕4로16번길 10 303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한일

전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 윤미란

(54) 발명의 명칭 **천사의 나팔꽃 유래 모노테르펜 글리코시드 화합물을 포함하는 피부 미백용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 천사의 나팔꽃(*Brugmansia arborea*) 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화학식 1 내지 3으로 표시되는 화합물 중 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 조성물로서, 피부 미백용 화장료 조성물 및 피부 미백용 의약외품 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2

Compds	% inhibition	IC_{50}, μM[c]
Kojic acid	92.5 ± 0.53[a]	28.6 ± 0.61[a]
1	51.8 ± 1.13[a]	156.5 ± 1.84[a]
2	40.8 ± 0.37[a]	198.2 ± 1.48[a]
3	42.4 ± 0.65[a]	191.0 ± 0.99[a]
BAFE	76.4 ± 0.60[b]	68.0 ± 0.79[b]
BAFB	87.5 ± 0.28[b]	59.3 ± 0.87[b]

(52) CPC특허분류
A61Q 19/02 (2013.01)
A61K 2800/782 (2013.01)
(72) 발명자
오현지
경기도 수원시 팔달구 고화로9번길 31 베네스트빌 601호(매산로2가)
오은지
경상북도 포항시 남구 청암로 77 포항공과대학 생명과학관 210호

명 세 서

청구범위

청구항 1

천사의 나팔꽃(*Brugmansia arborea*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는, 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜 또는 이들의 혼합 용매로 추출되는, 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올은 메탄올인, 피부 미백용 화장료 조성물.

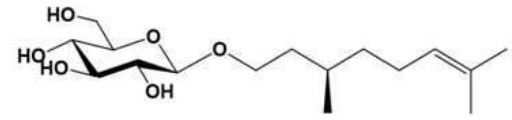
청구항 4

제1항에 있어서, 상기 분획물은 에틸아세테이트 또는 n-부탄올 분획물인, 피부 미백용 화장료 조성물.

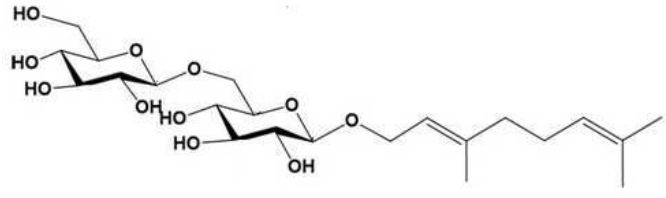
청구항 5

하기 화학식 1 내지 3으로 표시되는 화합물 중 어느 하나 또는 이의 화장품학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는, 피부 미백용 화장료 조성물.

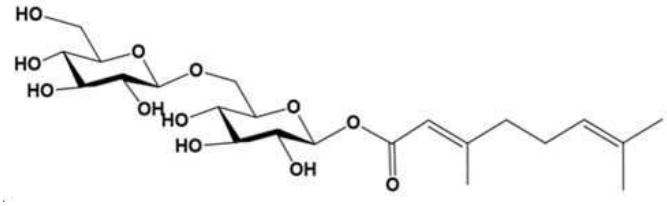
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 티로시나제 활성을 억제하여 피부 미백 효능을 나타내는 것인, 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 용액, 외용연고, 크림, 폼, 영양화장수, 유연화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업베이스, 파운데이션, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선크림, 선오일, 현탁액, 유탁액, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌싱, 패취 및 스프레이로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형을 갖는 것인, 피부 미백용 화장료 조성물.

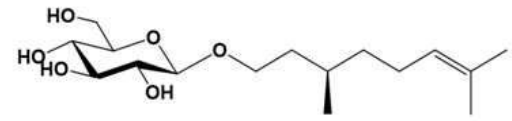
청구항 8

천사의 나팔꽃(Brugmansia arborea) 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는, 피부 미백용 의약외품 조성물.

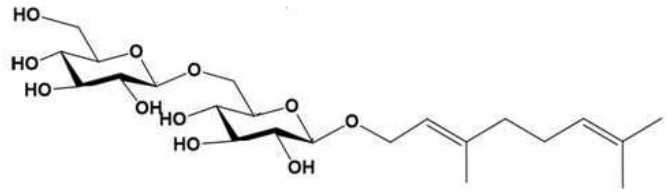
청구항 9

하기 화학식 1 내지 3으로 표시되는 화합물 중 어느 하나 또는 이의 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는, 피부 미백용 의약외품 조성물.

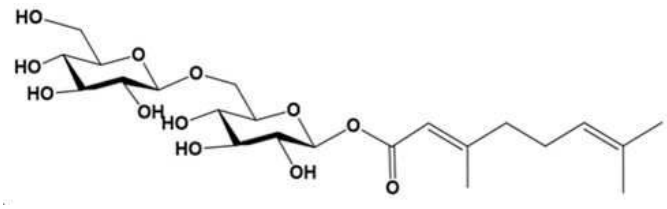
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 10

제9항에 있어서, 상기 의약외품은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충진제,

마스크, 연고제, 필터충진제, 피부 외용제, 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제 및 겔제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 피부 미백용 의약외품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 천사의 나팔꽃(*Brugmansia arborea*) 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이로부터 유래된 화학식 1 내지 3으로 표시되는 모노테르펜 글리코시드(monoterpene glycoside) 화합물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 조성물로서, 피부 미백용 화장료 조성물 및 피부 미백용 의약외품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 생활수준의 향상 및 미용지향의 증가에 따라 건강한 피부를 유지하기 위한 기능성 화장품에 대한 관심과 수요가 증가하고 있다. 기능성 화장품의 경우, 미백, 보습, 주름개선 및 자외선 차단이 주요한 목적이며, 특히 피부 미백에 관해 고효능, 저자극 원료 및 안정성을 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0004] 사람의 피부색은 주로 멜라닌, 카로틴 및 헤모글로빈의 양에 의해서 결정되는데, 멜라닌이 가장 결정적인 요인이다. 멜라닌은 피부 기저층에 존재하는 멜라닌 세포에서 합성되며 주변 각질 세포로 전이되어 사람의 피부색을 나타낸다. 멜라닌이 비정상적으로 적으면 피부 병변이 유발되고, 과잉으로 많으면 기미, 잡티 등을 형성하는 것으로 알려져 있다. 멜라닌은 아미노산인 티로신(tyrosine)에 티로시나제(tyrosinase)가 작용함으로써, 티로시나제는 자외선에 의해 더욱 활성화되므로 햇빛을 많이 받게 되면 피부가 검게 변하게 된다. 따라서 피부 미백을 위해 티로시나제의 활성 억제의 효과가 있는 물질을 배합하여 피부 미백용 제제을 만들고 있다.

[0005] 그러나, 대부분 사용되고 있는 피부 미백용 제제인 아스코르빈산(ascorbic acid), 알부틴(arbutin) 및 코직산(kojic acid) 등은 피부 자극 또는 제형 안정성 등의 부작용으로 제한된 양만 사용되고 있다. 따라서 상대적으로 부작용이 적은 천연, 유기농 및 식물 추출물로부터 유래한 미백 활성이 있는 화합물을 필요로 한다.

[0006] 한편, 천사의 나팔꽃(*Brugmansia Arborea*)은 가지과 독말풀속에 속하는 꽃피는 상록 관목으로, 관상용 또는 진통제, 충혈완화제, 천식치료 등을 위한 약제로 사용되고 있다. 천사의 나팔꽃의 주요 성분인 알칼로이드(alkaloid)는 항콜린제 활성을 나타내는 것으로 보고되었다(Roses OE et al., Isolation and identification of tropane alkaloids in species of the genus *Brugmansia* (*Solanaceae*). Farmaceutica Baonaerense, 6, 167-174 (1987)). 이러한 약제학적 활성이 있음에도, 천사의 나팔꽃의 화학적 성분 및 이의 생물학적 활성에 관한 연구는 거의 없었다.

[0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 천연 원료 유래의 화학적 피부 미백 제제를 찾고자 예의 노력한 결과, 천사의 나팔꽃의 분획물로부터 모노테르펜 글라이코사이드(monoterpene glycoside) 화합물 3종을 분리 및 동정하였으며, 상기 화합물 시트로넬롤 *O*-β-D-글루코피라노사이드(citronellol *O*-β-D-glucopyranoside)(화합물 1), 자스미노시드 N(jasminoside N)(화합물 2) 또는 자스미노시드 P(jasminoside P)(화합물 3)가 멜라닌 생성에 관여하는 효소인 티로시나제(tyrosinase)의 활성을 억제하는 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 천사의 나팔꽃 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화학식 1 내지 3으로 표시되는 화합물 중 어느 하나를 포함하는 피부 미백용 조성물로서, 피부 미백용 화장료 조성물 및 의약외품 조성물을 제공하는 것이다.

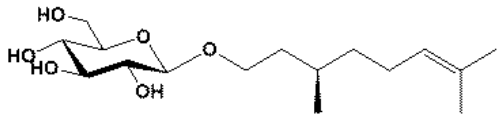
과제의 해결 수단

[0011] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0013] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 천사의 나팔꽃(*Brugmansia arborea*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는, 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

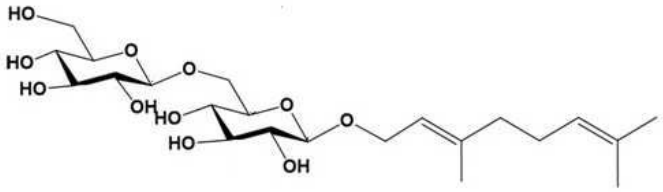
[0014] 또한, 본 발명의 다른 양태는 하기 화학식 1 내지 3으로 표시되는 화합물(이하, 각각 '화합물 1 내지 화합물 3') 중 어느 하나 또는 이의 화장품학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는, 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0015] [화학식 1]



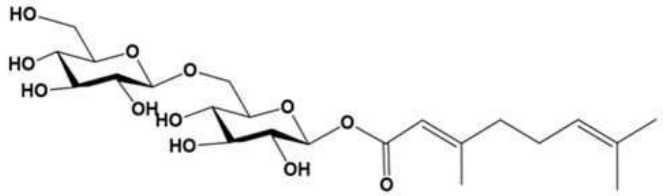
[0016]

[0018] [화학식 2]



[0019]

[0021] [화학식 3]



[0022]

[0024] 본 발명은 천사의 나팔꽃에서 최초로 화합물 1 내지 3을 분리 및 동정하였고, 특히 화합물 2 및 3은 기존에, 치자나무(*Gardenia jasminoides*) 열매에서만 분리되었다. 시트로넬롤 *O*-β-D-글루코피라노사이드(화합물 1)의 미백효과는 보고된 바 없고, 화합물 2 및 3의 피부 미백 효과 또한 알려진 바 없으며, 상기 화합물 및 이를 포함하는 천사의 나팔꽃 추출물의 피부 미백 효과는 본 발명에서 최초로 확인하였다.

[0025] 즉, 본 발명은 천사의 나팔꽃 추출물 및 분획물 뿐만 아니라, 이로부터 분리 및 동정된 화합물 1 내지 3을 비롯한 화합물이 멜라닌 생성에 관여하는 효소인 티로시나제(tyrosinase)의 활성을 억제하는 피부 미백용 조성물의 유효성분이라는 기술사상에 기초하며, 이는 본 발명자들에 의하여 최초로 규명된 것이다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에서, 천사의 나팔꽃의 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물, 구체적으로 천사의 나팔꽃의 에틸아세테이트 분획물, n-부탄올 분획물, 또는 화합물 1 내지 3은 티로시나제 효소의 활성을 억제하는 것을 확인하였는바, 상기 분획물 또는 화합물은 피부 미백 효과를 갖는다.

[0028] 본 발명에서 "천사의 나팔꽃(*Brugmansia arborea*, Angel Trumpet)"은 독말풀속 가지과 상록저목(Solanaceae)에 속하는 쌍떡잎식물로, 진통제, 항류머티스제, 외상치료제, 충혈완화제 또는 진정제로 사용된다고 알려져 있으나, 피부 미백 효과에 대해서는 전혀 보고된 바가 없다. 상기 천사의 나팔꽃은 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 자연에서 재배된 것을 사용할 수 있다. 구체적으로 천사의 나팔꽃의 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 등을 제한 없이 사용할 수 있고, 보다 구체적으로 천사의 나팔꽃의 꽃을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에서 "추출물"은 상기 천사의 나팔꽃을 추출 처리하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.

[0030] 본 발명에서 상기 추출물을 추출하는데 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출 용매의 비제한적인 예로는 물; 메탄올,

에탄올, 프로필알코올, 부틸알코올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올; 글리세린, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등의 다가 알코올; 및 메틸아세테이트, 에틸아세테이트, 아세톤, 벤젠, 헥산, 디에틸에테르, 디클로로메탄 등의 탄화수소계 용매; 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 구체적으로 메탄올을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명에서 상기 추출물을 추출하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.

[0032] 본 발명에서 "분획물"은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서는 상기 천사의 나팔꽃 추출물을 용매 분획법, 한외여과 분획법, 크로마토그래피 분획법 등의 다양한 방법으로 분획한 결과물 등을 포함하며, 보다 구체적으로 상기 천사의 나팔꽃 추출물의 에틸아세테이트 분획물 또는 n-부탄올 분획물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에서, 천사의 나팔꽃의 말린 꽃(900g, 건조중량)을 80% 메탄올로 실온에서 추출 및 여과하고, 감압 및 증발시켜 추출물을 수득하였으며, 상기 추출물로부터 물, 에틸아세테이트(EtOAc) 및 n-부탄올(n-BuOH) 분획물을 수득하였다. 천사의 나팔꽃의 말린 꽃의 n-부탄올 분획물 및 에틸아세테이트 분획물은 티로시나제 효소의 활성 억제에 대해 현저히 우수한 효과를 나타내고, 이러한 결과는 상기 분획물은 피부 미백용 조성물로 사용 가능함을 확인하였다. 아울러, 상기 에틸아세테이트 분획물로부터 화합물 1을 분리 및 동정하였으며, n-부탄올 분획물로부터 화합물 2 및 화합물 3을 분리 및 동정하여 각각의 화합물의 티로시나제 효소의 활성 저해 효과를 확인하였다.

[0034] 이외에도, 본 발명의 천사의 나팔꽃 추출물 또는 분획물 유래의 화합물은 다른 천연 공급원으로부터 분리된 것일 수 있고, 당업계에 공지된 방법을 통해 화학적으로 합성하거나 시판되는 물질일 수 있으며, 이를 포함하여 입수 경로에 관계없이 본 발명에서 사용할 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, "허용 가능한 염"은 화합물 1 내지 3 중 어느 하나가 다른 물질과 결합한 염의 형태인 것으로, 화합물 1 내지 3과 비슷한 활성을 나타낼 수 있는 물질을 의미한다.

[0037] 본 발명에서 "미백"은 멜라닌의 합성을 저해하여 멜라닌의 피부 침착을 억제하거나 방지하여 피부를 하얗게 하는 작용을 의미한다.

[0038] 상기 멜라닌은 흑갈색의 알갱이의 색소로서, 멜라닌 세포 내 멜라노솜이라는 세포 소기관에 의해 만들어진다. 멜라닌은 피부, 털, 눈 등에 존재하며, 멜라닌의 양에 따라 피부색이 결정되는데, 멜라닌의 양이 많을수록 검은 피부색을 띤다. 상기 멜라닌의 생합성은 티로시나제에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다.

[0039] 본 발명에서, 상기 미백은 티로시나제 활성 억제에 의해 달성되는 것일 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 천사의 나팔꽃 추출물 및 분획물, 이로부터 유래한 화합물 1 내지 3의 농도 의존적인 티로시나제 효소의 활성 저해 효과를 확인하였다(도 2).

[0041] 본 발명의 "개선"은 피부 미백 개선에 있어서 티로시나제 활성을 저해하여, 멜라닌 합성을 억제하는 피부 미백의 효능을 증대시키는 모든 행위를 의미한다.

[0043] 본 발명에 있어서, "화장료 조성물"은 용액, 외용연고, 크림, 폼, 영양화장수, 유연화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업베이스, 파운데이션, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선크림, 선오일, 현탁액, 유탁액, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 패취 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 본 발명의 상기 화장료 조성물은 일반 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 저급 알코올, 중점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다. 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산

화아연 또는 이들의 혼합물이 이용될 수 있다.

[0046] 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.

[0047] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일이 있으며, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0048] 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.

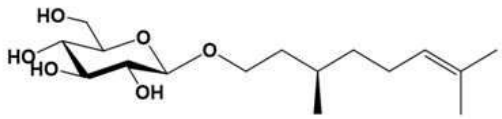
[0049] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속 염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알콜, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있다.

[0050] 본 발명의 조성물에는 피부 미백 기능을 갖는 물질을 1종 이상 추가로 포함할 수 있다.

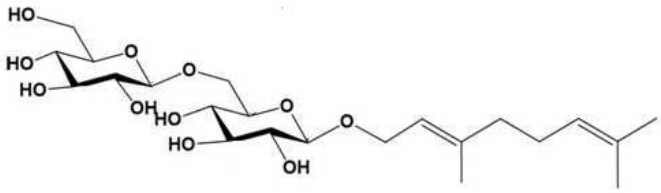
[0052] 본 발명의 다른 양태는 천사의 나팔꽃(*Brugmansia arborea*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는, 피부 미백용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0054] 또한, 본 발명의 다른 양태는 하기 화학식 1 내지 3으로 표시되는 화합물 중 1종 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는, 피부 미백용 의약외품 조성물을 제공한다.

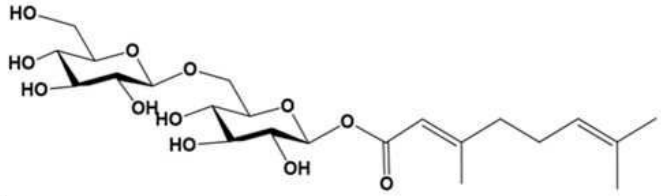
[0055] [화학식 1]

[0056] 

[0058] [화학식 2]

[0059] 

[0061] [화학식 3]

[0062] 

[0064] 본 발명에 있어서, 천사의 나팔꽃, 추출물, 분획물, 화합물 1 내지 3, 피부 미백 및 개선은 상기에서 설명한 바와 같다.

[0066] 본 발명에서 "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 의한 의약품의 용도로 사

용되는 물품을 제외한 것으로, 사람동물에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함될 수 있다.

[0067] 상기 의약외품 조성물은 특별히 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충진제, 마스크, 연고제 또는 필터충진제일 수 있다. 또한, 상기 의약외품 조성물은 피부 외용제 및 개인위생용품을 포함할 수 있다. 상기 피부 외용제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젤의 형태로 제조되어 사용될 수 있으며, 상기 개인위생용품은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 비누, 화장품, 물티슈, 휴지, 샴푸, 피부 크림, 얼굴 크림, 치약, 립스틱, 향수, 메이크업, 파운데이션, 볼터치, 마스카라, 아이섀도우, 선스크린 로션, 모발 손질 제품, 에어프레쉬너 겔, 세정 겔 등이 될 수 있다.

발명의 효과

[0069] 본 발명의 천사의 나팔꽃 추출물 또는 이의 분획물, 및 이로부터 분리한 화학식 1 내지 3으로 표시되는 화합물은 피부의 멜라닌 색소의 합성에 관여하는 티로시나제 효소의 활성을 저해함으로써, 피부 미백의 개선 효과를 지닌 화장료 조성물 및 의약외품 조성물 등으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0071] 도 1은 본 발명에서 천사의 나팔꽃으로부터 분리한 모노테르펜 글라이코시드(monoterpene glycoside) 화합물 1 내지 3(시트로넬롤 *O*-β-D-글루코피라노사이드(화합물 1), 자스미노시드 N(화합물 2), 자스미노시드 P(화합물 3))의 화학적 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 천사의 나팔꽃에서 분리한 모노테르펜 글라이코시드 화합물 1 내지 3, 에틸아세테이트 분획물 및 n-부탄올 분획물을 머쉬룸 티로시나제(mushroom tyrosinase)와 반응시킨 후 생성된 도파크롬을 475nm에서 측정하여 머쉬룸 티로시나제의 활성 억제율을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[0074] **실시예 1: 재료, 시약 및 기기**

[0076] **1-1: 식물 재료**

[0077] 본 실시예에서 사용한 천사의 나팔꽃(*Brugmansia arborea*)의 말린 꽃은 2014년 6월에 한국 포천시의 허브 농장에서 수집하였고, 표본 시료(KHU2014-0623)는 경희대학교 천연물 화학 (Natural Product Chemistry) 실험실에 보관되어 있다.

[0079] **1-2: 시약 및 기기**

[0080] 컬럼 크로마토그래피(Column chromatography (CC))용 실리카겔(silica gel (SiO_2))은 Kiesel gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany)을, 옥타데실 실리카겔(octadecyl silicagel (ODS))은 LiChroprep RP-18 (Merck)을 사용하였다. 박층 크로마토그래피(Thin layer chromatograpy (TLC))는 Kieselgel 60 F_{254} 및 RP-18 F_{254S} (Merck)를 사용하여 수행하였고, 화합물은 Spectroline Model ENF-240 C/F (Spectronics Corporation, Westbury, NY, USA) UV 램프 및 10% H_2SO_4 용액을 사용하여 검출하였다. 핵 자기 공명(Nuclear magnetic resonance (NMR)) 스펙트럼은 400 MHz FT-NMR 스펙트로미터(Varian Inova AS 400 (Palo Alto, CA, USA))으로 측정하였고, 적외선(Infrared (IR)) 스펙트럼은 Perkin model 599B (Waltham, MA, USA)로 측정하였다. 팹-질량분석(Fast atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS))은 JEOL JMS-700 (Tokyo, Japan)으로 기록하였다. UV lamp는 Spectroline (Model ENF-240 C/F, Spectronics Corporation, Westbusy, NY, USA)을 사용하여 측정하였다.

[0082] **실시예 2: 천사의 나팔꽃 추출물 및 분획물의 제조**

[0083]

[0084] 건조한 천사의 나팔꽃의 꽃 (900g)을 80% 메탄올 (MeOH, 27.0L X 3)로 실온에서 24시간 동안 추출하였

다. 추출물을 여과지를 통해 여과하고 감압 하에 증발시켜 160g의 추출물을 수득하였다.

[0085] 수득한 메탄올 추출물을 물 (1L)에 현탁시키고, 에틸아세테이트 (EtOAc, 1L X 3) 및 n-부탄올 (n-BuOH, 0.6L X 3)로 연속하여 추출하였다. 각 층을 농축시켜 에틸아세테이트 분획물 (BAFE, 12g), n-부탄올 분획물 (BAFB, 16g) 및 물 분획물 (BAFW, 132g)을 수득하였다.

[0087] **실시예 3: 천사의 나팔꽃의 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물 및 n-부탄올 분획물로부터 화합물의 분리 및 동정**

[0088]

[0089] **3-1: 천사의 나팔꽃의 에틸아세테이트 분획물로부터 화합물 1의 분리**

[0090] 상기 실시예 2의 에틸아세테이트 분획물 (BAFE, 12g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CC)(ϕ7.0cm X 15cm)에 적용시키고, n-헥산(hexane)-에틸아세테이트(EtOAc) (4 : 1 → 2 : 1 → 1 : 1, 각각 2.0L) 및 클로로포름($CHCl_3$)-메탄올(MeOH)-물(H_2O) (50 : 3 : 1 → 36 : 3 : 1 → 25 : 3 : 1 → 18 : 3 : 1 →? 12 : 3 : 1 → 9 : 3 : 1 → 7 : 3 : 1 → 6 : 4 : 1, 각각 1.5L)로 용출시켜, 16개의 분획물 (BAFE-1 내지 BAFE-16)을 수득하였다.

[0091] 분획물 BAFE-10 (966 mg, 용출 부피/총 부피(V_e/V_t) 0.649-0.718)을 ODS CC(ϕ4.5 X 10cm)에 적용시키고 아세톤(Acetone)-물 (1 : 2 → 1 : 1, 각각 3.7L)로 용출시켜 분리한 결과 16개의 분획물(BAFE-10-1 내지 BAFE-10-16)을 수득하였다. 이 중, 분획물 BAFE-10-15 (102.0mg, V_e/V_t 0.736-0.990)를 실리카겔 CC(ϕ3.2cm X 12cm)에 적용시키고 클로로포름-메탄올-물 (24 : 3 : 1, 1.3L)로 용출시켜, 14개의 분획물 (BAFE-10-15-1 내지 BAFE-10-15-14)을 수득하였다.

[0092] 분획물 BAFE-10-9 (27 mg, V_e/V_t 0.385-0.500)를 실리카겔 CC(ϕ1.7cm X 6cm)에 적용시키고 클로로포름-메탄올-물 (27 : 3 : 1, 240 mL)로 용출시켜, 12개의 분획물(BAFE-10-15-9-1 내지 BAFE-10-15-9-12) 및 정제된 화합물 1 (시트로넬롤 *O*-β-D-글루코피라노사이드 (citronellol *O*-β-D-glucopyranoside), BAFE-10-15-9-6, 6.5 mg, V_e/V_t 0.163-0.188, TLC [SiO_2 F_{254}] R_f 0.54, 클로로포름-메탄올-물 = 10 : 3 : 10)을 수득하였다.

[0094] **3-2: 천사의 나팔꽃의 n-부탄올 분획물로부터 화합물 2 및 3의 분리**

[0095] n-부탄올 분획물(16 g)을 실리카겔 CC(ϕ7.0cm X 13.0cm)에 적용시키고 클로로포름-메탄올-물 (12 : 3 : 1 → 9 : 3 : 1 → 6 : 4 : 1, 각각 12.0L)로 용출시켜, 14개의 분획물 (BAFB-1 내지 BAFB-14)을 수득하였다. 분획물 BAFB-9 (1.2 g, V_e/V_t 0.163-0.225)를 실리카겔 CC(ϕ4.0cm X 15cm)에 적용시키고 클로로포름-메탄올-물 (10 : 3 : 1, 3.2 L)로 용출시켜, 14개의 분획물 (BAFB-9-1 내지 BAFB-9-14)을 수득하였다. 분획물 BAFB-9-8 (488.0 mg, Ve/Vt 0.308-0.607)을 실리카겔 CC(ϕ3.5cm X 15cm)에 적용시키고 에틸아세테이트-n-부탄올-물 (22 : 3 : 1, 2.8 L)로 용출시켜 분리한 결과, 17개의 분획물 (BAFB-9-8-1 내지 BAFB-9-8-17)을 수득하였다. 분획물 BAFB-9-8-14 (60.0 mg, Ve/Vt 0.587-0.806)을 ODS CC (1.5 cm X 5 cm)에 적용시키고, 메탄올-물(1:1, 150 mL)로 11개의 분획물 (BAFB-9-8-14-1 내지 BAFB-9-8-14-11) 및 정제된 화합물 2 (자스미노시드 N (jasminoside N), BAFB-9-8-14-4, 14.3 mg, Ve/Vt 0.100-0.120, TLC [SiO_2 F_{254}] R_f 0.58, 에틸아세테이트-n-부탄올-물 = 4 : 5 : 1)을 수득하였다.

[0096] 분획물 BAFB-14 (3.0 g, Ve/Vt 0.471-0.496)을 ODS CC (ϕ4.5cm X 7.0cm)에 적용시키고 메탄올-물 (1 : 2, 3.2 L)로 용출시켜, 8개의 분획물 (BAFB-14-1 내지 BAFB-14-8)을 수득하였다. 분획물 BAFB-14-6 (344.0 mg, Ve/Vt 0.209-0.672)을 SiO_2 CC (3.0 cm X 18.0 cm)에 적용시키고, 에틸아세테이트-n-부탄올-물 (16:3:1, 6.8 L)로 용출시켜 분리한 결과 17개의 분획물 (BAFB-14-6-1 내지 BAFB-14-6-17) 및 화합물 3 (자스미노시드 P(jasminoside P), BAFB-14-6-15, 5.5 mg, Ve/Vt 0.949-0.962, TLC [SiO_2 F_{254}] R_f 0.35, 에틸아세테이트-n-부탄올-물 = 4 : 5 : 1)을 수득하였다.

[0098] **3-3: 분리된 화합물 1 내지 3의 동정**

[0099] 상기 실시예 3-1 및 3-2에서 수득한 화합물 1 내지 3을 대상으로 NMR, IR 및 FAB-MS 분석을 수행하여, 각 화합물의 구조를 동정하였다.

[0101] 화합물 1을 분석한 결과는 다음과 같다.

[0102] - 황색 비정질 파우더(yellow amorphous powder)

[0103] - CH_3OH

[0104] - 음성 FAB-MS *m/z* 317 $[M - H]^-$

[0105] - IR (KBr, *v*) 3325, 2879, 1678 cm^{-1}

[0106] - ^1H-NMR 및 ^{13}C-NMR

[0108] 분석 결과, 화합물 1은 시트로넬롤 *O*-β-D-글루코피라노사이드(citronellol *O*-β-D-glucopyranoside)임을 확인하였다. 천사의 나팔꽃에서는 처음으로 분리 및 동정되었다.

[0110] 화합물 2를 분석한 결과는 다음과 같다.

[0111] - 황색 비정질 파우더(yellow amorphous powder)

[0112] - CH_3OH

[0113] - 양성 FAB-MS *m/z* 479 $[M + H]^+$

[0114] - IR (KBr, *v*) 3200, 1600 cm^{-1}

[0115] - ^1H-NMR and ^{13}C-NMR

[0117] 분석 결과, 화합물 2는 자스미노시드 N(jasminoside N, geraniol *O*-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside)임을 확인하였다. 천사의 나팔꽃에서는 처음으로 분리 및 동정되었다.

[0119] 화합물 3을 분석한 결과는 다음과 같다.

[0120] - 황색 비정질 파우더(yellow amorphous powder)

[0121] - CH_3OH

[0122] - 양성 FAB-MS *m/z* 493 $[M + H]^+$

[0123] - IR (KBr, *v*) 3200, 1725, 1600 cm^{-1}

[0124] - ^1H-NMR and ^{13}C-NMR

[0126] 분석 결과, 화합물 3은 자스미노시드 P(jasminoside P, 3,7-dimethyl-2,6-nonadien-1-oic acid *O*-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside)임을 확인하였다.

[0128] **실시예 4: 천사의 나팔꽃의 분획물 및 화합물 1 내지 3의 미백 효과 분석**

[0130] **4-1: 티로시나제 저해 분석(trysinase inhibition assay) - 재료 및 방법**

[0131] 머쉬룸 티로시나제(mushroom tyrosinase (EC 1.14.18.1)(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA))를 사용하여 시험관 내(in vitro) 생물분석을 수행하였다. L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)는 기질로 사용되었고, 효소의 활성도는 30° C 에서 UV-vis spectrophotometer(Spectro UV-Vis Double beam; UVD-3500, Labomed, Inc., Los Angeles, CA, USA)를 사용하여, 도파크롬(dopachrome)의 생성을 475 nm에서 측정하여 모니터링하였다.

[0132] 모든 시료는 에탄올(EtOH)에 용해되었고, 희석 후 실험에 사용되었다. 200 mL 의 2.7 mM L-DOPA (Km = 180 μM) 수용액을 2687 mL의 0.25 M 인산완충액 (pH 6.8)과 혼합한 후, 100 μL의 시료용액 및 머쉬룸 티로시나제 (144 유닛)의 인산완충액의 13 μL을 첨가하였다. 분석은 3회 수행되었다. 50% 활성 감소를 유발하는 저해농도(IC_{50})는 하기의 방정식에 실험값을 대입함으로써 수득된다.

[0134] 활성도 (%) = $100[1/(1 + ([I]/IC_{50}))]$

[0136] 여기서, [*I*]는 저해 농도이다.

[0137] 또한 시험결과의 비교를 위해 양성대조구로 동일 농도의 코직산(Kojic acid)을 사용하였다.

[0139] **4-2: 천사의 나팔꽃의 분획물 및 화합물 1 내지 3 - 티로시나제 효소 활성의 저해 효과**

[0140] 실시예 2 및 3에서 제조한 천사의 나팔꽃 분획물 및 이로부터 분리한 화합물 1 내지 3의 티로시나제 효소 저해 효과를 확인하기 위해, 머쉬룸 티로시나제를 사용하여 각각의 분획물(BAFE 및 BAFB) 및 분리된 화합물 1 내지 3을, 분획물 100 μg/mL 및 화합물 200 μM의 농도로 처리하고, 효소저해활성을 측정하였다.

[0141] 양성 대조군으로 화합물 1 내지 3과 동일 농도인 200 μM의 코직산(Kojic acid)을 사용하였고, 코직산의 저해율(%)인 92.5 ± 0.53와 비교한 결과, 화합물 1은 51.8 ± 1.13 %, 화합물 2는 40.8 ± 0.37 % 및 화합물 3은 42.4 ± 0.65 %의 저해율을 보임을 확인하였다. 양성 대조군보다는 낮은 비율이지만, 티로시나제 효소 활성을 저해하는 것을 확인하였다. 화합물 중 가장 효과가 있는 것은 화합물 1(51.8 ± 1.13 %의 티로시나제 저해율)이었다.

[0142] 분획물의 경우, 에틸아세테이트 분획물(BAFE)은 76.4 ± 0.60 %, n-부탄올 분획물(BAFB)은 87.5 ± 0.28 %로 화합물 1 내지 3보다 더 높은 티로시나제 효소 저해율을 보였다.

[0143] IC_{50} 값은 50%로 효소 활성의 저해를 유발하는 농도이다. 에틸아세테이트 분획물(BAFE)의 IC_{50} 값은 68.03 μg/ml, n-부탄올 분획물(BAFB)의 IC_{50} 값은 59.27 μg/ml 로 유의한 티로시나제 활성 저해를 나타내었고, 화합물 1 내지 3 또한 티로시나제 활성 저해를 나타내었다(화합물 1: IC_{50}=156.5 μM, 화합물 2: IC_{50}=198.2 μM, 화합물 3: IC_{50}=191.0 μM)(도 2).

[0144]

[0145] **4-3: 티로시나제 효소 활성 억제 확인 - 피부 미백 효과**

[0146] 상기 실시예 4-2를 통해 천사의 나팔꽃 분획물 (BAFE 및 BAFB) 및 이로부터 추출한 화합물 1 내지 3(시트로넬롤 *O*-β-D-글루코피라노사이드; 자스미노시드 N; 및 자스미노시드 P)의 티로시나제 효소의 활성을 저해하는 것을 확인하였다.

[0147] 티로시나제는 티로신(tyrosine)을 퀴논(quinine) 및 인돌퀴논(indolequinone) 화합물 등의 여러 중간체를 거쳐 멜라닌을 합성하는 주된 효소이다. 티로시나제는 포유 동물뿐만 아니라 하등 동물, 식물 혹은 곰팡이 등에도 존재하는 것으로 알려져 있다. 특히, 피부 멜라닌 세포 내의 티로시나제로부터 생성되는 멜라닌은 결국 각질층으로 전이되어 피부를 암화시켜 기미, 주근깨와 같은 색소침착을 야기함으로 티로시나제 활성을 억제할 수 있는 물질에 대해 피부 미백과 관련한 화장료 및 의약외품 등으로 중요하게 여겨지고 있다. 따라서 상기 천사의 나팔꽃 추출물, 분획물 및 이로부터 분리한 화합물 1 내지 3의 티로시나제 저해 활성에 유의한 효과를 통해 피부 미백의 용도로 화장료 및 의약외품 등으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0149] **4-4: 통계 분석**

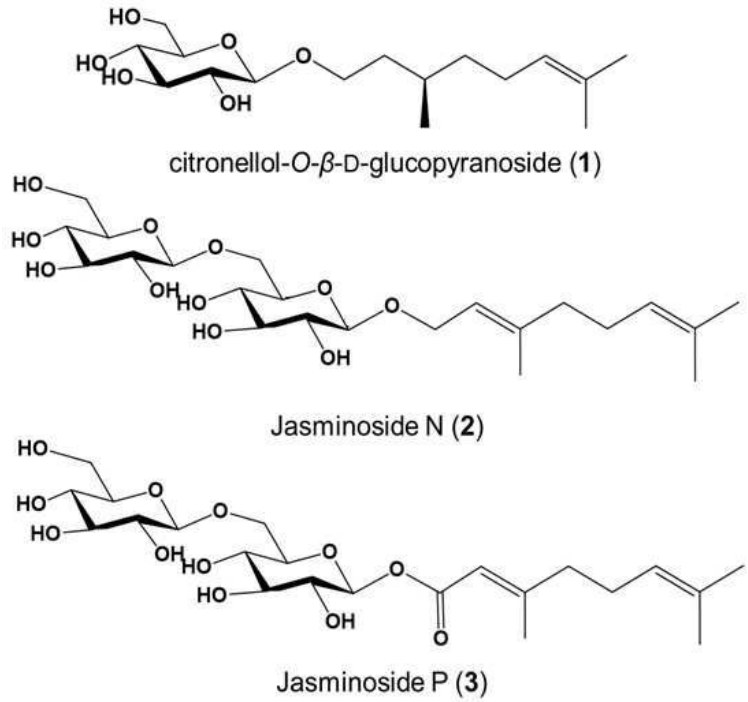
[0150] 각 실험은 적어도 세 번씩 반복적으로 수행하였고, 천사의 나팔꽃 분획물 및 이로부터 추출한 화합물 1 내지 3의 티로시나제 효소 활성의 저해 효과가 있음을 확인하였다.

[0152] 이상의 실험 결과로부터, 본 발명자들은 천사의 나팔꽃 또는 이의 분획물, 그리고 이로부터 유래한 화합물 1 내지 3이 티로시나제 저해를 통해 미백 효과를 가질 수 있음을 확인하였다.

[0154] 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

Compds	% inhibition	IC_{50}, μM[c]
Kojic acid	92.5 ± 0.53[a]	28.6 ± 0.61[a]
1	51.8 ± 1.13[a]	156.5 ± 1.84[a]
2	40.8 ± 0.37[a]	198.2 ± 1.48[a]
3	42.4 ± 0.65[a]	191.0 ± 0.99[a]
BAFE	76.4 ± 0.60[b]	68.0 ± 0.79[b]
BAFB	87.5 ± 0.28[b]	59.3 ± 0.87[b]