



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0028618
(43) 공개일자 2019년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/77 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 8/9789 (2017.01) A61Q 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/77 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0115419
(22) 출원일자 2017년09월08일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
동아제약 주식회사
서울특별시 동대문구 천호대로 64(용두동)
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대
학교)
(72) 발명자
전준호
경기도 용인시 기흥구 금화로11번길 9 601동 41
4호 (상갈동,금화마을주공6단지아파트)
박형근
경기도 성남시 분당구 수내로 74 105-504
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

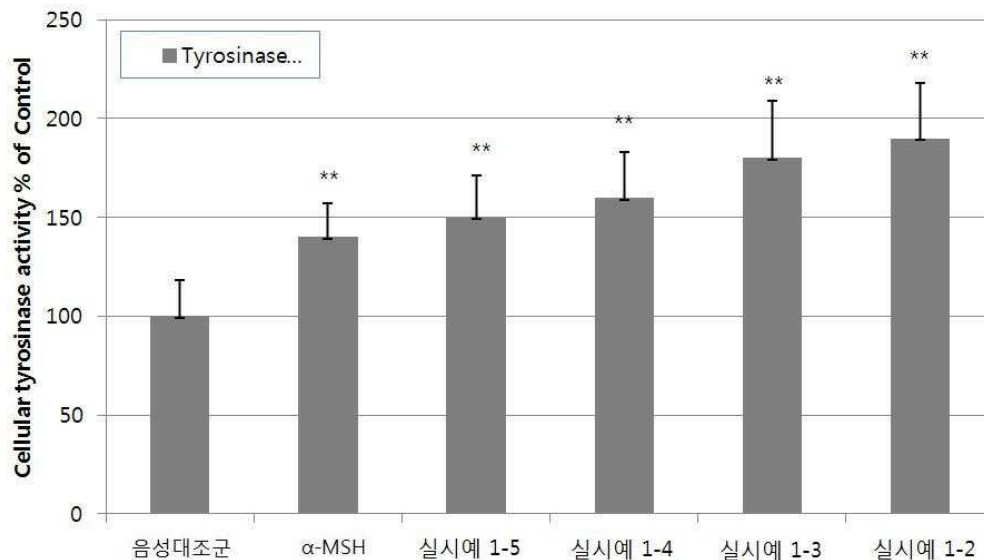
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 용안육 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증 치료 또는 예방용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 용안육(*Longanae Arillus*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증 예방 또는 치료 용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 C₂₋₃ 알코올; 및 C₂₋₃ 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육 추출물 또는 이의 분획물은 멜라노블라스트 세포의 생존율, 멜라노블라스트의 세포분화/멜라닌 함량, 세포 이동을, 티로시나제 활성을 증가시킬 뿐만 아니라, 모발 내 멜라닌 함유량을 현저히 증가시키므로 백모증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)

A61Q 5/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

A61K 2236/333 (2013.01)

A61K 2236/39 (2013.01)

(72) 발명자

유재영

경기도 용인시 기흥구 한보라 1로 91 605동 1502호

김은기

서울특별시 양천구 목동서로 38 (목동, 목동1단지
아파트)131동 506

신정현

인천광역시 연수구 커벤시아대로 130번길, 80 (송
도동, 푸르지오하버뷰) 107동 2504호

이향복

인천광역시 남동구 석산로 35 (간석동, 간석마을풍
람아이원아파트) 108동 2003호

명세서

청구범위

청구항 1

C₂₋₃ 알코올; 및 C₂₋₃ 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육(*Longanae Arillus*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 백모증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

C₂₋₃ 알코올; 및 C₂₋₃ 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육 추출물을 유효성분으로 함유하는 백모증의 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 3

C₂₋₃ 알코올; 및 C₂₋₃ 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육 추출물을 유효성분으로 함유하는 백모증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 C₃ 알코올은 이소프로판올인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 혼합 용액은 C₂₋₃ 알코올을 20 부피% 이상으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

C₂₋₃ 알코올; 및 C₂₋₃ 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육 추출물의 유기 용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

C₂₋₃ 알코올; 및 C₂₋₃ 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육 추출물의 유기 용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 8

C₂₋₃ 알코올; 및 C₂₋₃ 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육 추출물의 유기 용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 유기 용매 분획물은 헥산, 클로로포름 또는 에틸아세테이트로 순차적으로 분획하여 얻은 헥산 분획물, 클로로포름 분획물 및 에틸아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 용안옥(*Longanae Arillus*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증 예방 또는 치료 용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 백모증(白毛症)은 머리카락, 눈썹, 속눈썹 등의 모모(毛母)에 있는 멜라노사이트(melanocyte)에 의해 생성되는 멜라닌(melanine) 감소에 의한 모발의 회백색화·백색화이다. 백모증의 발생기전은 현재까지 알려진 바에 의하면 모낭에서 멜라닌 색소를 형성하는 멜라노사이트의 수가 감소되고, 멜라닌을 주위 각질형성 세포로 이동시키지 못하여 색소의 결핍이 일어나기 때문인 것으로 알려져 있다.

[0005] 모낭(hair follicle)의 위쪽은 표피(epidermis)에서 관 형상을 한 함입된 형태로 진피의 깊은 층까지 뻗어있다. 모낭의 아래쪽 또는 모구(hair bulb)는 모유두(papilla)에 위치하는 함입부를 포함한다. 모구의 아래쪽에 위치한 모유두 주변은 증식도(degree of proliferation)가 높은 기질 세포들(matrix cell)이 분포하는 지역이다. 이러한 세포들은 모발을 구성하게 되는 각질화된 세포들의 전구체(precursors)이다. 이러한 전구체들이 증식한 결과로 만들어진 세포들은 모구에서 수직적으로 이동하고 차츰 모구의 위쪽 부분이 각질화되고, 각질화된 세포들이 모여서 모간(hair stalk)을 형성한다.

[0007] 또한, 머리카락(head hair)과 체모(bodily hair)의 색은 어느 정도는 두 개의 멜라닌 그룹의 양과 비율에 기초한다; 유멜라닌(umelanins(갈색 및 검은색 색소)) 및 페오멜라닌(pheomelanins(붉은색과 노란색 색소)). 머리카락과 체모의 색소 침착은 모낭의 모구에 멜라노사이트가 존재해야 한다. 멜라노사이트에서 생성된 멜라닌은 착색된 모발 또는 체모 가닥을 만드는 모간을 형성하기 위하여 케라티노사이트(keratinocytes)로 전달된다. 이러한 구조는 "모낭 색소침착 단위(follicular pigmentation unit)"로 알려져 있다.

[0009] 나아가, 포유류에서 멜라닌 생성은 적어도 세 개의 효소인 티로시나아제(tyrosinase), 도파크롬 토토머라아제(DOPAchrome tautomerase(TRP-2)) 및 DHICA 산화효소(DHICAoxidase (TRP-1))가 관여하며, 이러한 세 개 효소의 활성화는 멜라닌 생합성이 최고로 활성화되기 위해 필수적인 것으로 알려져 있다.

[0010] 먼저, 상기 티로시나아제는 멜라닌의 생합성을 개시하거나 멜라닌 형성을 제한하는 효소로 일컬어진다. 또한, 티로시나아제는 티로신에서 도파로의 산화를 촉매하고 그 다음 도파퀴논으로의 산화를 촉매한다. 도파퀴논 화합물은 시스테인(cysteine)존재하에서 자연적으로 도파크롬(dopachrome) 또는 시스테인도파(cysteinyldopa) 유도체로 변형된다.

[0011] 상기 TRP-2는 5,6-디하이드록시인돌-2-카복실산(5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA))으로 도파크롬의 토토머화를 촉매한다. TRP-2의 존재하에서, 도파크롬은 자연적으로 탈카복실화를 거쳐 5,6-dihydroxyindole(DHI)을 형성한다.

[0012] 또한, 상기 TRP-1은 DHICA 화합물을 산화시켜 퀴논 유도체를 형성한다.

[0014] 백모증은 모근의 멜라닌 세포 및 멜라닌 세포의 전구 세포 모두에 영향을 받으며, 모발 멜라닌 세포의 특이적이며 점진적인 고갈과 연계되어 있다(Commo 등, Br. J. Dermatol., 2004, 150, 435-443). 모낭에 존재하는 기타 유형의 세포는 영향을 받지 않는다. 또한, 이런 멜라닌 세포의 고갈은 표피에서는 관찰되지 않는다. 모근 내 멜라닌 세포 및 멜라닌 세포 전구체의 이러한 점진적이며 특이적인 고갈 원인은 아직까지 확인되지 않았다.

[0016] 또한, 머리카락과 체모는 주기(cycle)를 갖는다. 이러한 주기는 성장기(anagenic phase), 퇴행기(catagenic phase) 그리고 휴지기(telogenic phase)로 이루어지며, 이후에 새로운 성장기로 발전된다. 이러한 모발 주기의 결과, 모낭 색소침착 단위 또한 반드시 주기적으로 재개된다. 사람에게서 퇴행기에서 성장기로의 전이 동안에, 불활성 멜라노사이트의 일부가 증식하고, 발생기 단계에 있는 모구의 모유두 주변에 위치한, TRP-2를 제외한 타이로시나아제 및 TRP-1과 같은 멜라닌 합성에 필요한 효소를 발현시키기 시작한다(Pigment Cell Res. 2004 Oct; 17:488-497). 이와 병행하여, 모낭의 상부층에서, 나머지 휴(quiescent)멜라노사이트는 불활성화상태로 남아있다. 타이로시나아제 및 TRP-1 효소는 성장기 동안 모구의 멜라노사이트에서 발현되나, 퇴행기 및 휴지기 동안에는 멜라노사이트에서 더 이상 발현되지 않는다. 따라서, 사람의 모낭에서 멜라노사이트의 정상적인 주기는 모낭의 상부에 존재하는, 모낭 색소침착 단위를 재생하기 위하여 주기적으로 활성화될 수 있는 멜라노사이트 전구체가 존재할 것을 요한다.

[0018] 특허문헌 1은 백모증을 치료하기 위한 엘라그산(ellagic acid) 또는 이들의 유도체를 유효성분으로 함유하는 조성물에 대해서 개시하고 있다.

[0020] 본 발명자들은 백모증 치료를 위한 효과적인 치료제를 개발하기 위하여 연구하던 중, 용안육의 추출물 또는 이의 분획물이 멜라노블라스트 세포의 생존율, 멜라노블라스트의 세포분화/멜라닌 합량, 멜라노블라스트 세포 이동율, 티로시나아제 활성을 증가시킬 뿐만 아니라, 모발 내 멜라닌 함유량을 현저히 증가시키므로 백모증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있음을 알아내어 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0022] (특허문헌 0001) 유럽공개특허 EP 1870081

발명의 내용

해결하려는 과제

[0023] 본 발명의 목적은 용안육(*Longanae Arillus*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증(canities) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0025] 본 발명의 다른 목적은 용안육 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

[0027] 본 발명의 또 다른 목적은 용안육 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0029] 상기 목적을 달성하기 위하여,
 [0030] 본 발명은 C_{2-3} 알코올; 및 C_{2-3} 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육(*Longanae Arillus*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은 C_{2-3} 알코올; 및 C_{2-3} 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증의 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0034] 나아가, 본 발명은 C_{2-3} 알코올; 및 C_{2-3} 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0035]

발명의 효과

[0036] 본 발명의 C_{2-3} 알코올; 및 C_{2-3} 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육 추출물 또는 이의 분획물은 멜라노블라스트 세포의 생존율, 멜라노블라스트의 세포분화/멜라닌 함량, 세포 이동을, 티로시나아제 활성을 증가시킬 뿐만 아니라, 모발 내 멜라닌 함유량을 현저히 증가시키므로 백모증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 용매 종류에 따른 용안육 추출물의 세포 생존율을 나타낸 그래프이다(음성대조군(control) : DMSO 처리한 음성대조군; 및 α -MSH : 양성 대조군(α -Melanocyte-stimulating hormone)이며, 이하 동일함).

도 2는 용매 종류에 따른 용안육 추출물의 멜라닌 함유량을 나타낸 그래프이다.

도 3은 용매 종류에 따른 용안육 추출물의 세포 이동을 나타낸 그래프이다.

도 4는 용매 종류에 따른 용안육 추출물의 티로시나아제 활성을 나타낸 그래프이다.

도 5는 에탄올의 농도에 따른 용안육 추출물의 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.

도 6는 에탄올의 농도에 따른 용안육 추출물의 멜라닌 함유량을 나타낸 그래프이다.

도 7은 에탄올의 농도에 따른 용안육 추출물의 세포 이동을 나타낸 그래프이다.

도 8은 에탄올의 농도에 따른 용안육 추출물에 따른 멜라노블라스트 세포 이동의 현미경 사진이다.

도 9는 에탄올의 농도에 따른 용안육 추출물의 티로시나아제 활성을 나타낸 그래프이다.

도 10은 용매의 종류 또는 농도에 따른 용안육 추출물에 의한 마우스 모발 중 티로시나아제 활성 및 멜라닌 함유량을 나타낸 그래프이다.

도 11은 용안육 에탄올 추출물 인체 백모 Phototricogram 대표 사진이다.

도 12는 용안육 에탄올 추출물이 24주 동안 인체 백모 감소에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 13은 용안육 분획물의 세포 이동률에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 14는 용안육 분획물의 C3H/HeJ 마우스 모발에서의 멜라닌 함량 및 티로시나아제 함량에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

도 15는 백모증의 기전을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0041] 본 발명은 C₂₋₃ 알코올; 및 C₂₋₃ 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육(*Longanae Arillus*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0043] 이하, 본 발명에 따른 백모증 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0045] 용안육(*Longanae Arillus*)은 무환자나무과(Sapindaceae)의 상록교목이고 열매의 용안의 과육을 말한다. 대한약전에서 용안육은, 용안의 헛씨껍질로 세로로 과열된 불규칙한 박편으로서 보통 여러 개가 끈끈하게 붙어 있고, 길이 2~4 cm, 너비 1~2 cm, 두께 2~4 mm이며, 바깥면은 진한 적갈색~흑갈색으로 반투명하여 한 면은 주름이 지어 고르지 않고 다른 면은 윤기가 있으며 세로 주름이 있고, 질은 부드럽고 점착성이며, 약간 특유한 냄새가 있고 맛은 달다고 정의되어 있다.
- [0047] 본 발명의 유효성분인 용안육 추출물의 추출 대상인 용안육은 대한약전에서 정의하는 용안육을 재배한 것 또는 시판되는 것 등을 제한없이 사용할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 유효성분인 용안육 추출물은 통상적인 추출방법을 통하여 얻을 수 있으나, 본 발명의 백모증에 대한 치료 또는 예방의 목적을 달성하기 위한 유효성분을 추출하기 위해서는 용매가 중요하며, 이러한 용매는 C₂ 또는 C₃의 알코올; 및 C₂ 또는 C₃의 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것이 바람직하다. 또한, 상기 용매는 에탄올; 이소프로판올; 에탄올과 물의 혼합 용액; 및 이소프로판올과 물의 혼합 용액;로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것이 보다 바람직하고, 에탄올, 에탄올과 물의 혼합 용액, 이소프로판올을 단독으로 사용하는 것이 보다 더 바람직하다. 이때, 상기 C₂₋₃ 알코올과 물의 혼합 용액 농도는, 순도가 96% 이상인 C₂₋₃ 알코올 기준으로 20 부피% 이상, 30 부피% 이상, 40 부피% 이상이 바람직하고, 50 부피% 이상이 보다 바람직하다. 이때, 혼합 용액 농도가 100 부피%는 물과의 혼합 용액이 아니라 C₂₋₃ 알코올을 단독으로 사용하는 것을 의미한다. 또한, 제조 또는 시판의 C₂₋₃ 알코올 자체의 순도에 영향을 주는 기타 물질의 포함은 본 발명이 목적하는 추출물 성분에 영향을 미치지 않는 범위 내이다.
- [0051] 구체적으로, 본 발명의 유효성분인 용안육 추출물은 용매가 에탄올, 이소프로판올일 경우의 용안육 추출물이, 양성 대조군인 α-MSH 보다 멜라닌 함유량이 약 1.5 배 이상 증가하였고, 음성 대조군과 대비하여 멜라노블라스트의 수에 따른 세포 이동율이 약 2 배 이상 증가하였으며, 양성 대조군과 대비하여 티로시아나제 활성이 현저히 증가하였을 뿐만 아니라, 동일한 종류의 용매일 경우, 농도가 증가할수록 모발 내 세포 이동율과 티로시아나제 활성은 유사하나 멜라닌 함유량이 현저히 증가함을 확인하였다(하기 실험에 참조).
- [0053] 본 발명의 유효성분인 용안육 추출물의 제조 방법에 있어서, 예를 들면, 상기 용매를 건조된 용안육 부피에 대하여 5 내지 15배 이상 첨가하여 추출할 수 있고, 상기 용매를 용안육에 첨가한 후 진탕 추출, Soxhlet 추출, 초음파 추출, 환류 냉각 추출 등으로 추출할 수 있다. 또한, 추출 시의 온도는 5 ~ 95 ℃인 것이 바람직하며, 15 ~ 80℃인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 나아가, 추출 시간은 10 시간 ~ 15일이 바람직하며, 20 시간 ~ 5일이 보다 바람직하고, 추출 회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3회 이상 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 또한, 용안육 추출액을 여과한 후, 여과액을 감압 농축하고 건조하여 용안육 추출물을 제조할 수 있다. 이때, 상기 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조 등으로 수행할 수 있다.

- [0055] 백모증(canities; poliosis; 백발증 등을 포함하는 의미이다)은 털뿌리(모구)의 멜라닌 세포의 수가 현저히 감소되고 멜라닌 소체를 만드는 활성도가 저하되면서 모기질과 모피질의 멜라닌이 소실되어 모(毛)가 하얗게 변하여, 백모(white hair, grey hair)가 되는 형태로 나타나는 질환이다. 발병의 위치는 주로 머리카락, 눈썹, 속눈썹, 턱수염 등의 모이며, 발병 원인은 신체의 노화가 진행됨에 따른 자연스러운 노화의 한 과정일 수 있으나, 유전적 요인, 고열병, 정신적 쇼크, 약물, 당뇨병, 갑상선 질환 등이 원인일 수 있다. 노화에 의한 백모의 현상은 점차적으로 진행하기 때문에 검은색과 흰색 사이의 여러 가지 중간색으로 나타날 수 있으며, 본 발명에서의 백모증은 이러한 현상, 모발의 탈색, 새치 등도 포함한다.
- [0057] 본 발명에 따른 C₂₋₃ 알코올; 및 C₂₋₃ 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육 추출물은 마우스 멜라노블라스트 세포주인 melb-a 세포의 생존율을 증가시키고, 멜라노블라스트의 세포분화/멜라닌 함량을 현저히 증가시키며, 티로시나제 활성을 향상시키고, 멜라노블라스트 세포 이동율이 우수할 뿐만 아니라, 백모 발생 빈도가 Placebo군 대비 현저히 둔화되는 것을 확인하였다(하기 실험에 참조).
- [0058] 따라서, 본 발명에 따른 용안육 추출물은 백모증의 치료 또는 예방에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0060] 또한, 본 발명의 조성물은 용안육 추출물을 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 제조하여 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 염은 유리산(free acid)에 의해 형성된 부가염이 유용하다. 적합한 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산 및 인산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 구연산(citric acid), 초산, 젖산, 주석산(tartaric acid), 말레인산, 푸마르산(fumaric acid), 포름산, 프로피온산(propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산 또는 아스파르트산 등을 사용할 수 있다. 나아가, 약학적으로 허용가능한 염뿐만 아니라, 수화물 및 용매화물을 모두 포함할 수 있다.
- [0062] 또한, 본 발명의 조성물은 용안육 추출물의 분획물 중 하나 이상을 선택적으로 함유할 수 있으며, 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0063] 구체적으로, 상기 용안육 추출물의 분획물은 C₂₋₃ 알코올; 및 C₂₋₃ 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 추출용매로부터 추출된 추출물에, 추가적으로 유기용매를 가하여 추출된 분획물을 의미하며, 상기 유기용매는 헥산, 클로로포름 또는 에틸아세테이트로 추출하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 용안육의 에탄올 추출물을 물에 현탁한 후, 헥산, 클로로포름 또는 에틸아세테이트로 차례로 분배하여 감압 농축하여 분획물을 제조할 수 있으며, 헥산 분획물, 클로로포름 분획물 및 에틸아세테이트 분획물로부터 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 분획물일 수 있다.
- [0065] 본 발명에 따른 용안육 추출물의 분획물은, 음성 대조군과 대비하여 클로로포름 분획물, 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 순으로 멜라노블라스트 세포 이동 효과 및 C3H/HeJ 마우스 모발에서의 멜라닌 함량 및 티로시나제 함량 증가가 우수함을 알 수 있다(하기 실험에 5 참조).
- [0066] 따라서, 본 발명에 따른 용안육 추출물의 분획물은 백모증의 치료 또는 예방에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있다. 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제일 수 있고, 예를 들면, 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰

로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0070] 본 발명의 약학적 조성물은 중증도에 따라 인간 및 다른 동물에게 경구로, 직장으로, 비경구로, 낭내로, 질내로, 복강내로, 국소로 (분말, 연고, 로션, 고약, 또는 드롭스에 의해서), 구강으로, 경구 또는 비강 스프레이로서, 등으로 투여될 수 있다. 특정 구체예에서, 본 발명의 화합물은 원하는 치료 효과를 얻기 위해 약 0.01 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 예를 들면 약 1 mg/kg 내지 약 25 mg/대상체 체중 kg / 1일, 1회 이상 /1일의 복용량 수준으로 경구로 또는 비경구로 투여될 수 있다.

[0072] 경구 투여용 액체 투약 형태는, 비제한적으로, 약제학적으로 허용 가능한 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함한다. 활성 화합물에 추가하여, 액체 투약 형태는 당해기술에서 통상적으로 사용된 하기 예의 불활성 희석제를 함유할 수 있다: 물 또는 다른 용매, 가용화제, 및 유화제 예컨대 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일 (예를 들면, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 세균, 올리브, 캐스터, 및 참깨 오일), 글리세롤, 테트라하이드로푸르푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물. 불활성 희석제 외에, 경구 조성물은 아췌반트 예컨대 습윤제, 유화 및 현탁화 제제, 감미제, 풍미제, 및 방향제를 또한 포함할 수 있다.

[0074] 주사가능 제제, 예를 들면, 멸균된 주사가능 수성 또는 지질생산성 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균된 주사가능 제제는 또한 비독성 비경구로 허용 가능한 희석제 또는 용매 중 멸균된 주사가능 용액, 현탁액 또는 에멀전일 수 있고, 예를 들면 1,3-부탄디올 중 용액이다. 이용될 수 있는 허용 가능한 비히클 및 용매 중에서, 물, 링거액, U.S.P. 및 등장의 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균된, 고정유는 용매 또는 분산매로서 종래에 이용된다. 이러한 목적을 위해 임의의 블랜드 고정유가 이용될 수 있고, 합성 모노- 또는 디글리세라이드를 포함한다. 또한, 지방산 예컨대 올레산은 주사제의 제조에 사용된다.

[0076] 주사가능 제형은, 예를 들면, 박테리아-고정 필터를 통한 여과, 또는 사용 전에 멸균수 또는 다른 멸균된 주사가능 매질에서 용해 또는 분산될 있는 멸균된 고형 조성물의 형태로 산술제를 편입시켜 멸균될 수 있다.

[0078] 본 발명의 약학적 조성물의 국소 또는 경피 투여용 복용 형태는 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 분말, 용액, 스프레이, 흡입제 또는 패치를 포함한다. 활성 성분은 요구되는 대로, 멸균 조건 하에서 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 임의의 필요한 보존제 또는 버퍼와 혼합된다. 안과 제형, 귀물약, 및 안약은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 또한 고려된다. 추가로, 본 발명은 화합물의 신체에의 제어된 절단을 제공하는 부가된 이점을 갖는 경피 패치의 사용을 고려한다. 그와 같은 복용 형태는 화합물을 적절한 매질에서 용해 또는 분산시켜 만들어질 수 있다. 흡수 촉진제는 피부를 가로질로 화합물의 유동을 증가시키기 위해 또한 사용될 수 있다. 속도는 속도 조절 막을 제공하거나 또는 폴리머 매트릭스 또는 겔에서 화합물을 분산시켜 제어될 수 있다.

[0080] 본 발명의 조성물은 백모증의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0082] 또한, 본 발명은 C₂₋₃ 알코올; 및 C₂₋₃ 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안유 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증 예방 또는 개선용 화장품 조성

물을 제공한다.

[0083]

[0084] 이하, 본 발명에 따른 백모증 예방 또는 개선용 화장료 조성물에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0086]

상기 화장료 조성물은, 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 화장품 형태로 제조될 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양 화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연 화장수 등이 있다. 또한, 본 발명의 추출물을 함유하는 화장품 이외에도 피부 과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유함으로써 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 국소 적용 또는 전신 적용할 수 있는 보조제 형태로 제조될 수 있다.

[0088]

적합한 화장품의 제형으로는 예를 들면, 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 비누, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱(conceal stick) 등의 형태로 제공될 수 있다.

[0090]

또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸(분무제) 조성물의 형태로도 제조될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 그리고, 상기의 성분들은 피부과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

[0092]

본 발명의 용안육 추출물을 함유하는 화장료 조성물에 있어서, 통상적으로 함유되는 화장료 조성물에 본 발명의 추출물이 1 내지 15 중량%, 바람직하게는 2 내지 10 중량%의 양으로 첨가될 수 있다.

[0094]

나아가, 본 발명은 C_{2-3} 알코올; 및 C_{2-3} 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 백모증 예방 또는 개선용 건강 기능 식품 조성물을 제공한다.

[0096]

이하, 본 발명에 따른 백모증 예방 또는 개선용 건강 기능 식품 조성물에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0098]

본 발명에 따른 건강 기능 식품 조성물은 C_{2-3} 알코올; 및 C_{2-3} 알코올과 물의 혼합 용액;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출된 용안육 추출물 또는 이의 분획물을 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있다. 이때, 첨가되는 유효성분의 함량은 목적에 따라 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 함량은 전체 식품 중량의 0.01 내지 90 중량부일 수 있다.

[0100]

또한, 상기 건강기능식품 조성물의 형태 및 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 건강기능식품의 형태는 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등일 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 건강기능식품과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

- [0102] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택될 수 있다.
- [0104] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0105] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0107] <실시예 1> 용안육(*Longanae Arillus*) 추출물의 제조
- [0108] 실시예 1-1: 이소프로판올 추출물
- [0109] 용안의 과육(*Longanae Arillus*)을 60℃에서 6 시간 건조한 후, 세절하여 추출 용기에 용안육 500 g과, 용매로 이소프로판올(순도:99%, 제조사:MERCK) 1000 ml을 가하여 추출한 다음, 거름종이로 여과하여 추출물을 얻었다. 이후 용매를 감압 농축 및 건조하여 100 g의 추출물을 수득하였다.
- [0111] 실시예 1-2: 에탄올 추출물
- [0112] 상기 실시예 1에서, 용매로 이소프로판올 대신에 에탄올(순도:99%, 제조사:MERCK)을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 수행하여 100 g의 추출물을 수득하였다.
- [0114] 실시예 1-3: 95 부피% 농도의 에탄올 추출물
- [0115] 상기 실시예 1에서, 용매로 이소프로판올 대신에 95 부피% 농도의 에탄올(실시예 2에서 사용한 에탄올과 증류수의 혼합 용액)을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 수행하여 100 g의 추출물을 수득하였다.
- [0117] 실시예 1-4: 70 부피% 농도의 에탄올 추출물
- [0118] 상기 실시예 1에서, 용매로 이소프로판올 대신에 70 부피% 농도의 에탄올(실시예 2에서 사용한 에탄올과 증류수의 혼합 용액)을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 수행하여 100 g의 추출물을 수득하였다.
- [0120] 실시예 1-5: 30 부피% 농도의 에탄올 추출물
- [0121] 상기 실시예 1에서, 용매로 이소프로판올 대신에 30 부피% 농도의 에탄올(실시예 2에서 사용한 에탄올과 증류수의 혼합 용액)을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 수행하여 100 g의 추출물을 수득하였다.
- [0123] <비교예 1> 용안육(*Longanae Arillus*) 추출물의 제조
- [0124] 비교예 1-1: 메탄올 추출물
- [0125] 상기 실시예 1에서, 용매로 이소프로판올 대신에 메탄올(순도:99%, 제조사:MERCK)을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 수행하여 100 g의 추출물을 수득하였다.
- [0127] 비교예 1-2: 물 추출물
- [0128] 상기 실시예 1에서, 용매로 이소프로판올 대신에 증류수를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 수행하

여 100 g의 추출물을 수득하였다.

[0130] <실시예 2> 용안육 에탄올 추출물에 대한 분획물의 제조

[0131] 상기 실시예 1-2 에서 제조한 용안육 에탄올 추출물 100 g에 300 ml의 물을 가하여 현탁시키고 동일한 양의 헥산을 넣어 물층과 헥산층으로 분리하였다. 이와 동일한 방법으로 클로로포름 및 에틸아세테이트 순으로 분획하고 감압 농축하여 헥산 가용추출물, 클로로포름 가용추출물 및 에틸아세테이트 가용추출물을 각각 얻었다.

[0133] <실험예 1> 용매 종류에 따른 용안육 추출물의 효능 평가

[0134] 용매 종류에 따른 용안육 추출물의 백모증에 대한 효능을 평가하기 위하여, 멜라노블라스트 세포의 생존력, 멜라닌 함량 및 세포 이동에 미치는 효과에 대한 실험을 다음과 같이 수행하였다.

[0136] 멜라노블라스트(melanoblast) 세포주 배양

[0137] Melb-a(멜라노블라스트)는 Functional Genomics Cell Bank (London, UK), Wellcome Trust에서 구입하여 사용하였다. Melb-a는 37 °C, 10 % CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 1 % 페니실린(penicilline; Invitrogen Corp (CA, USA))/스트렙토마이신(streptomycin; Invitrogen Corp (CA, USA))을 첨가한 RPMI 1640 배지에 성장 촉진을 위하여 20 nM PDBu(Phorbol12,13-dibutyrate; Sigma Chemical Co. (St Louis, USA)), 1 ng/ml bFGF (Murine FGF(Fibroblast growth factor)- basic; PeproTech), 5 % 우태아 혈청(Fetal bovine serum; Invitrogen Corp(CA, USA)), 및 2 nM L-글루타민을 첨가한 배지로 계대 배양하였다.

[0138] 상기 세포는 트립신/에틸렌디아민 테트라아세트산(trypsin-EDTA; Invitrogen Corp (CA, USA))를 처리한 후, 침전시키고 complete RPMI 1640 배지(Invitrogen Corp (CA, USA))를 첨가하여 세포를 현탁시킨다. 살아있는 세포의 수는 trypan blue exclusion 방법과 혈구계수기(hemocytometer)를 이용하여 측정하였고, 10 cm 세포 배양 디쉬에 complete RPMI 1640 배지를 넣고 2 x 10⁵ 세포/디쉬의 농도로 접종하였다.

[0140] 1. 멜라노블라스트 세포 생존율 확인

[0141] 상기 실시예 1-1, 1-2 및 비교예 1-1, 1-2에서 제조한 용안육 추출물에 의한 melb-a 세포의 생존율을 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 하였다.

[0142] 구체적으로, Melb-a 세포(4 x 10³ 세포/웰)을 96 웰 플레이트에 200 µl씩 넣은 후, 37 °C, 10 % CO₂ 항온기에서 24 시간 전 배양시키고, 부착된 세포에 상기 실시예 1-1, 1-2 및 비교예 1-1, 1-2에서 제조한 용안육 추출물을 50 ppm 농도로 포함하는 배양액을 첨가한 후, 배양 4 일 동안 이틀마다 교환하였다(총 시료를 두 번 처리). 음성 대조군인 DMSO 및 양성 대조군인 α-MSH(α-Melanocyte-stimulating hormone)는 0.8 µM을 처리하였다. 96 시간 후, 배양된 세포에 5 mg/ml MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide); Sigma Chemical Co. (St Louis, USA)) 시약을 처리하여 형성된 포르마잔(formazan)을 DMSO로 녹인 후 ELISA 마이크로플레이트 리더 540 nm에서 ELISA 마이크로플레이트 리더로 측정하여 그 결과를 도 1 및 하기 표 1에 나타내었다.

[0144] 도 1은 용매 종류에 따른 용안육 추출물의 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.

표 1

[0145]

	세포생존율
음성대조군	100.00
α-MSH	120.00
비교예 1-2	115.00
비교예 1-1	110.00

실시예 1-2	120.00
실시예 1-1	115.00

[0147] 표 1 및 도 1에 나타난 바와 같이, 용매 종류에 따른 용안육 추출물은 음성 대조군과 대비하여 세포 생존율이 유사 또는 증가함으로써 세포에 대한 독성이 없는 것을 확인할 수 있다.

[0149] **2. 멜라노블라스트 세포분화/멜라닌 함량(Cell Differentiation assay/melanin assay) 효과 확인**

[0150] 멜라노블라스트는 티로시나아제 기능이 멈추어 있는 비색소 세포로, 멜라노블라스트 분화를 멜라닌 함량을 이용하여 측정할 수 있다. 상기 실시예 1-1, 1-2 및 비교예 1-1, 1-2에서 제조한 용안육 추출물에 의한 멜라닌 함유량을 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0151] 구체적으로, 상기 멜라노블라스트 세포주 배양과 동일하게 배양한 세포의 배양 96시간 후 배양액을 제거하여 PBS(phosphate buffered saline; Invitrogen Corp(CA, USA)) 1 ml씩 첨가하여 2 번 세척을 한 후, trypsin-EDTA를 첨가하여 세포를 수거하였다. 수거한 세포는 1.5 ml 에펜도르프 튜브에 옮겨 담아 원심분리를 이용하여 세포 펠렛을 얻어내었다. 이와 같이 수거한 각각의 세포에 10 % DMSO가 들어있는 1N NaOH 용액 100 μ l씩 넣어주고 현탁시켜 80℃에서 1 시간 동안 반응시킨다. 반응하여 용해된 세포 내의 멜라닌은 플레이트 리더를 이용하여 405 nm 파장에서 대조군과 비교하여 측정하여 그 결과를 도 2 및 표 2에 나타내었다.

[0153] 도 2는 용매 종류에 따른 용안육 추출물의 세포 내 멜라닌 함유량을 나타낸 그래프이다.

표 2

[0154]

	멜라닌 함유량
음성대조군	100.00
α -MSH	160.00
비교예 1-2	180.00
비교예 1-1	150.00
실시예 1-2	220.00
실시예 1-1	190.00

[0156] 도 2 및 표 2에 나타난 바와 같이, 용매가 메탄올인 비교예 1-1 추출물에 의한 멜라닌 함유량은 양성 대조군인 α -MSH 보다 오히려 적고, 용매가 물인 비교예 1-2 추출물에 의한 멜라닌 함유량은 α -MSH 보다 약간 증가한 반면, 용매가 에탄올인 실시예 1-2 추출물에 의한 멜라닌 함유량은 α -MSH 보다 약 1.5 배 이상 증가하였고, 용매가 이소프로판올인 실시예 1-1 추출물에 의한 멜라닌 함유량은 용매가 물인 비교예 1-2 경우 보다 더 증가한 것을 알 수 있다.

[0157] 따라서, 용매가 메탄올, 물, 이소프로판올, 에탄올 순으로 추출물에 의한 멜라닌 함유량이 우수한 것을 확인하였다.

[0159] **3. 멜라노블라스트 세포의 이동(migration) 효과 확인**

[0160] 상기 실시예 1-1, 1-2 및 비교예 1-1, 1-2에서 제조한 용안육 추출물에 의한 멜라노블라스트의 이동에 미치는 효과를 보기 위해 트랜스웰 이동 분석(Transwell migration assay)를 수행하였다.

[0161] 구체적으로, 세포의 이동은 트랜스웰 세포 배양 챔버를 이용하여 측정되었다. 트랜스웰 세포 배양 챔버(Costar 3422)는 0.8 μ m의 폴리비닐피롤리돈이 없는 폴리카보네이트 필터(polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate filter)가 있고 filter에 1 % 젤라틴(gelatin)으로 코팅하였다. 코팅한 cell insert를 굳힌 후, 챔버의 아래에 혈청이 포함되지 않은 RPMI 배지 600 μ l를 첨가하고 챔버 위에 melb-a 세포(2×10^6 세포/ml)를 100 μ l 접종하

고 24 시간 동안 배양된다. 본 발명의 시험 시료의 농도는 50 ppm으로 처리하였으며, 양성 대조군인 α -MSH는 0.8 μ M을 처리하였다. 24 시간 후, 필터를 올려내어 메탄올로 고정시킨다. 그리고 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색한 후, 필터 위의 이동되지 않은 세포를 제거하기 위해 면봉으로 닦아낸다. 이동된 세포를 보기 위해 필터의 아래 부분을 현미경으로 보았으며, 세포의 수를 측정하기 위해 필터를 사등분하여 현미경으로 40 배 확대하여 보았고 그 평균값을 구하였다. 실험은 각각의 조건에서 3번 반복 수행하여, 그 결과를 도 3 및 표 3에 나타내었다.

[0163] 도 3은 용매 종류에 따른 용안육 추출물의 세포 이동율을 나타낸 그래프이다.

표 3

[0164]

	세포이동률
음성대조군	100.00
α -MSH	130.00
비교예 1-2	150.00
비교예 1-1	130.00
실시예 1-2	220.00
실시예 1-1	210.00

[0166] 도 3 및 표 3에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1-1, 1-2 및 비교예 1-1, 1-2에서 제조한 용안육 추출물을 각각 처리한 필터 아래 면의 이동한 멜라노블라스트의 수에 따른 세포 이동율을 살펴보면, 용매가 메탄올인 비교예 1-1 추출물 및 용매가 물인 비교예 1-2 추출물의 세포 이동율은 음성 대조군과 대비하여 약 1.5 배 미만으로 증가하였으나, 용매가 이소프로판올인 실시예 1-1 추출물 및 용매가 에탄올인 실시예 1-2 추출물의 세포 이동율은 음성 대조군과 대비하여 약 2 배 이상 증가함을 알 수 있었다.

[0167] 따라서, 용매가 메탄올, 물, 이소프로판올, 에탄올 순으로 추출물에 의한 멜라노블라스트 세포 이동율이 우수한 것을 확인하였다.

[0169] 4. 티로시나아제 활성 효과 확인

[0170] 상기 실시예 1-1, 1-2 및 비교예 1-1, 1-2에서 제조한 용안육 추출물이 티로시나아제 유도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포 내 티로시나아제 분석 실험을 하기와 같이 수행하였다.

[0171] 세포 내 티로시나아제 활성은 DOPA 산화 활성을 측정하여 분석되었다. Melb-a 세포는 2×10^4 세포 / 디쉬의 농도로 60 디쉬에 접종하였다. 24시간 전배양 시키고 부착된 세포에 시험 시료가 포함된 동일한 양의 배양액을 첨가한 후, 배양 4 일 동안 이틀마다 교환하였다(총 시료를 두 번 처리). 96 시간 후, 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 스크래퍼를 사용하여 디쉬로부터 세포를 분리하여 1.5 ml 에펜도르프 튜브에 옮겨 담아 원심분리를 통해 세포를 침전시킨 후, 상등액을 제거하였다. 침전된 세포에 용해 완충액(0.1 M phosphate buffer, pH 6.8, 1 % (w/v) Triton X-100) 100 μ l를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C의 소니케이터에서 30 분 동안 반응시켰다. 13000 rpm에서 10분간 원심분리를 실시하여 세포 파편 등을 제거하고, 시료 내의 단백질의 정량은 Bio-Rad 단백질 분석 키트를 사용하여 측정하였다. 추출한 단백질은 96 웰 플레이트에 넣고 PBS에 녹인 2.5 mM L-DOPA(3,4-dihydroxy-L-phenyl-alanine; Sigma Chemical Co. (St Louis, USA))를 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C 배양기에 1 시간 동안 반응시킨 후, 475 nm에서 ELISA 리더로 측정하여 대조군과 비교하여, 그 결과를 도 4 및 표 4에 나타내었다.

[0173] 도 4는 용매 종류에 따른 용안육 추출물에 의한 티로시나아제 활성을 나타낸 그래프이다.

표 4

	티로시나아제
음성대조군	100.00 ± 18.00
α-MSH	140.00 ± 17.00
비교예 1-2	160.00 ± 21.00
비교예 1-1	130.00 ± 13.00
실시예 1-2	180.00 ± 29.00
실시예 1-1	170.00 ± 22.00

[0175]

[0177]

도 4 및 표 4에 나타난 바와 같이, 용매가 메탄올인 비교예 1-1 추출물의 티로시나아제 활성은 양성 대조군인 α-MSH 보다 오히려 낮고, 용매가 물인 비교예 1-2 추출물, 이소프로판올인 실시예 1-1 추출물 및 용매가 에탄올인 실시예 1-2 추출물의 티로시나아제 활성은 양성 대조군과 대비하여 증가하였고, 에탄올 추출물의 티로시나아제 활성의 증가폭이 가장 큰 것을 확인하였다.

[0178]

따라서, 용매가 메탄올, 물, 이소프로판올, 에탄올 순으로 추출물에 의한 티로시나아제 활성이 우수한 것을 확인하였다.

[0180]

<실험예 2> 에탄올의 농도에 따른 용안육 추출물의 효능 평가

[0181]

에탄올 농도에 따른 용안육 추출물의 백모증에 대한 효능을 평가하기 위하여, 멜라노블라스트 세포의 생존력, 멜라닌 함량, 세포 이동을 및 티로시나아제 활성에 미치는 효과에 대한 실험을 다음과 같이 수행하였다.

[0183]

1. 멜라노블라스트 세포 생존율 확인

[0184]

상기 실시예 1-2, 실시예 1-3, 실시예 1-4 및 실시예 1-5에서 제조한 용안육 추출물에 의한 melb-a 세포의 생존율을 확인하기 위해 상기 실험예 1의 1과 유사한 방법으로 실험을 하여, 그 결과를 도 5 및 표 5에 나타내었다.

[0186]

도 5는 에탄올의 농도에 따른 용안육 추출물에 의한 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.

표 5

	세포 생존율
음성대조군	100.00 ± 5.00
α-MSH	120.00 ± 3.00
실시예 1-5	110.00 ± 6.20
실시예 1-4	115.00 ± 6.50
실시예 1-3	120.00 ± 7.00
실시예 1-2	120.00 ± 6.80

[0188]

[0190]

도 5 및 표 5에 나타낸 바와 같이, 에탄올의 농도에 따른 용안육 추출물은 음성 대조군 대비 세포 생존율이 증가하여 세포에 대한 독성이 없는 것을 확인할 수 있다.

[0192]

2. 멜라노블라스트 세포분화/멜라닌 함량(Cell Differentiation assay/melanin assay) 효과 확인

[0193]

상기 실시예 1-2, 실시예 1-3, 실시예 1-4 및 실시예 1-5에서 제조한 용안육 추출물에 의한 멜라닌 함유량을 확인하기 위해 상기 실험예 1의 2와 유사한 방법으로 실험을 수행하여, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0195] 도 6은 에탄올의 농도에 따른 용안육 추출물에 의한 멜라닌 함유량을 나타낸 그래프이다.

표 6

[0196]

	멜라닌 함유량
음성대조군	100.00 ± 13.00
α-MSH	160.00 ± 12.00
실시예 1-5	170.00 ± 16.00
실시예 1-4	195.00 ± 20.0
실시예 1-3	220.00 ± 22.00
실시예 1-2	230.00 ± 23.00

[0198] 도 6 및 표 6에 나타난 바와 같이, 실시예 1-5에서 제조한 30 부피% 에탄올 용안육 추출물에 의한 멜라닌 함유량은 양성 대조군인 α-MSH에 의한 멜라닌 함유량과 유사하고, 실시예 1-4에서 제조한 70 부피% 에탄올 용안육 추출물에 의한 멜라닌 함유량이 더 증가함을 알 수 있으며, 실시예 1-3에서 제조한 95 부피% 에탄올 용안육 추출물과 실시예 1-2에서 제조한 100 부피% 에탄올 용안육 추출물은 음성대조군과 대비하여 2 배 이상 멜라닌 함유량이 현저히 증가함을 알 수 있다.

[0199] 따라서, 용매인 에탄올의 농도가 증가할수록 멜라닌 함유량은 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0201] 3. 멜라노블라스트 세포의 이동(migration) 효과 확인

[0202] 상기 실시예 1-2, 실시예 1-3, 실시예 1-4 및 실시예 1-5에서 제조한 용안육 추출물에 의한 멜라노블라스트의 이동에 미치는 효과를 보기 위해 상기 실험에 1의 3과 유사한 방법으로 실험을 수행하여, 그 결과를 도 7-8, 표 7에 나타내었다.

[0204] 도 7은 에탄올의 농도에 따른 용안육 추출물의 세포 이동율을 나타낸 그래프이다.

[0205] 도 8은 에탄올의 농도에 따른 용안육 추출물에 따른 멜라노블라스트 세포 이동의 현미경 사진이다.

표 7

[0207]

	세포 이동율
음성대조군	100.00
α-MSH	140.00
실시예 1-5	220.00
실시예 1-4	230.00
실시예 1-3	240.00
실시예 1-2	245.00

[0209] 도 7-8 및 표 7에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1-2, 실시예 1-3, 실시예 1-4 및 실시예 1-5에서 제조한 용안육 추출물을 각각 처리한 필터 아래 면의 이동한 멜라노블라스트의 수에 따른 세포 이동율을 살펴보면, 음성 대조군과 대비하여 약 2 배 이상 증가함을 알 수 있으며, 에탄올의 농도가 증가하여도 세포 이동율은 유사한 것을 알 수 있다.

[0211] 4. 티로시나아제 활성 효과 확인

[0212] 상기 실시예 1-2, 실시예 1-3, 실시예 1-4 및 실시예 1-5에서 제조한 용안육 추출물이 티로시나아제 유도에 미치는 효과를 보기 위해 상기 실험예 1의 4와 유사한 방법으로 실험을 수행하여, 그 결과를 도 9 및 표 8에 나타내었다.

[0214] 도 9는 에탄올의 농도에 따른 용안육 추출물의 티로시나아제 활성을 나타낸 그래프이다.

표 8

	티로시나아제
음성대조군	100.00 ± 18.00
α-MSH	140.00 ± 17.00
실시예 1-5	150.00 ± 21.00
실시예 1-4	160.00 ± 23.00
실시예 1-3	180.00 ± 29.00
실시예 1-2	190.00 ± 28.00

[0218] 도 9 및 표 8에 나타난 바와 같이, 에탄올의 농도가 증가할수록 티로시나아제 활성도 증가함을 알 수 있다.

[0220] <실험예 3> 용안육 추출물이 C3H/HeJ 마우스 모발에서의 멜라닌 생성능 및 티로시나아제 활성 증진 확인

[0221] 상기 실시예 1-1 내지 1-5 및 비교예 1-1 및 비교예 1-2에서 제조한 용안육 추출물로 시험제제(용안육 추출물 6%, 에탄올 30%, 폴리옥실40수소화피마자유 2%, 디나트륨이디티에이 0.03%, 자몽중자추출물 0.03%, 시트르산 0.5%, 정제수 적량)를 제조하여, 이를 시료로 이용하여 마우스의 모발에서의 멜라닌 생성능 및 티로시나아제 활성 증진 효과 실험을 실시하였다.

[0222] 구체적으로, 7 주령의 C3H/HeJ 마우스의 등 부위 털을 제거하고, 등 부위 피부가 깨끗한 것을 골라 물질군마다 5마리씩을 선정하여 매일 상기 시료 물질을 개체당 100μl씩, 4주 동안 도포하며 진행하였으며, 양성 대조군으로 α-MSH(α-Melanocyte-stimulating hormone)를 1mg/kg 농도로 이용하였다. 시험종료 후 동물을 sacrifice한 후 새로 자라난 털들을 수집하여 일부는 모발 내 멜라닌 양과 흡광도를 측정하였고, 일부는 L-Tyrosin 1mM용액에 하여 보관하여, Tyrosinase 활성도를 측정하여, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0224] 도 10은 용매의 종류 또는 농도에 따른 용안육 추출물에 의한 마우스 모발 중 티로시나아제 활성 및 멜라닌 함유량을 나타낸 그래프이다.

[0226] 도 10에 나타난 바와 같이, 용안육 추출물에 의한 모발 중 티로시나아제 활성을 살펴보면, 용매가 물인 추출물은 음성 대조군에 비해 오히려 감소하였고, 용매가 메탄올, 30 부피% 에탄올, 70 부피% 에탄올, 100 부피% 에탄올 및 이소프로판올인 추출물은 음성 대조군에 비해 증가하였으나 증가폭이 유사함을 알 수 있다.

[0227] 또한, 용안육 추출물에 의한 모발 중 멜라닌 함유량을 살펴보면, 물을 용매로 제조한 비교예 1-2 추출물은 115%, 메탄올을 용매로 제조한 비교예 1-1 추출물은 111%으로 음성 대조군과 대비하여 약간 증가한 반면, 에탄올을 용매로 제조한 실시예 1-2 추출물은 160%, 이소프로판올을 용매로 제조한 실시예 1-1 추출물은 153%으로 현저히 증가함을 알 수 있다.

[0228] 따라서, 용매에 따른 용안육 추출물은 모발 중 티로시나아제 활성에 미치는 영향은 유사하나, 모발 중 멜라닌 함유량에 미치는 영향은 용매의 종류에 따라 상이하여, 물, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올 순으로 모발 중 멜라닌 함유량이 증가하며, 용매가 에탄올일 경우에는 농도가 증가할수록 모발 중 멜라닌 함유량이 현저히 증가하는 것을 확인하였다.

[0230] <실험예 4> 용안옥 에탄올 추출물의 인체 백모 감소에 미치는 효과

[0231] 상기 실시예 1-2에서 제조한 용안옥 에탄올 추출물을 시험 제제로 제조하고, 이를 시료로 사용하여 인체의 모발에서의 백모 감소 효과 실험을 실시하였다.

[0232] 구체적으로, 백모가 있는 건강한 성인에서 각각 10명에게 매일 시료 물질을 1일 2회 1ml씩, 6개월 동안 도포하며 진행하였으며, 음성 대조군으로 용안옥 추출물이 함유되지 않은 Placebo제제를 사용하여 비교 평가를 진행하였다. 시험 종료 후 Phototricogram을 통하여 실시 전 대비 백모 발생 정도를 평가하여, 그 결과를 표 9 및 도 12에 나타내었다.

표 9

	Placebo 제제군	용안옥 추출물 군
개시시	100%	100%
4주	112%	109%
12주	121%	112%
24주	136%	118%

[0236] 도 11은 용안옥 에탄올 추출물 인체 백모 Phtotricogram 대표 사진이다.

[0238] 도 12는 용안옥 에탄올 추출물이 24주 동안 인체 백모 감소에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

[0240] 상기 표 9 및 도 12에 나타낸 바와 같이, 실시 전 대비하여 인체 모발 내 백모 발생 정도를 비교한 결과, 실시예 1-2에서 제조한 용안옥 에탄올 추출물을 함유하는 시험 제제를 도포한 모발에서의 백모 발생 빈도가 감소됨을 확인할 수 있었다.

[0242] <실험예 5> 용안옥 분획물의 세포 이동률, C3H/HeJ 마우스 모발에서의 멜라닌 함량 및 티로시나제 함량에 미치는 효과 확인

[0243] 상기 실시예 1-2에서 제조한 용안옥 에탄올 추출물에 대한 물, 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트 분획물의 멜라노블라스트 세포 이동의 효과를 확인하기 위해 각각의 용안옥 용매 분획물을 상기 실험예 <1-3> 및 실험예 3의 방법과 동일하게 실험하여 그 결과를 도 13-14 및 표 10-11에 나타내었다.

[0245] 도 13은 용안옥 분획물의 세포 이동률에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

[0247] 도 14는 용안옥 분획물의 C3H/HeJ 마우스 모발에서의 멜라닌 함량 및 티로시나제 함량에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다.

표 10

	세포 이동율
음성대조군	100 ± 14
α-MSH	124 ± 14
에탄올 추출물	150 ± 12
헥산 분획물	165 ± 22

클로로포름 분획물	171 ± 21
에틸아세테이트 분획물	157 ± 18
물 분획물	108 ± 16

표 11

	멜라닌 함유량	티로시나아제
음성대조군	100 ± 15	100 ± 14
α-MSH	134 ± 12	117 ± 14
에탄올 추출물	136 ± 17	121 ± 12
헥산 분획물	181 ± 28	154 ± 22
클로로포름 분획물	202 ± 15	186 ± 21
에틸아세테이트 분획물	166 ± 11	142 ± 18
물 분획물	105 ± 15	106 ± 16

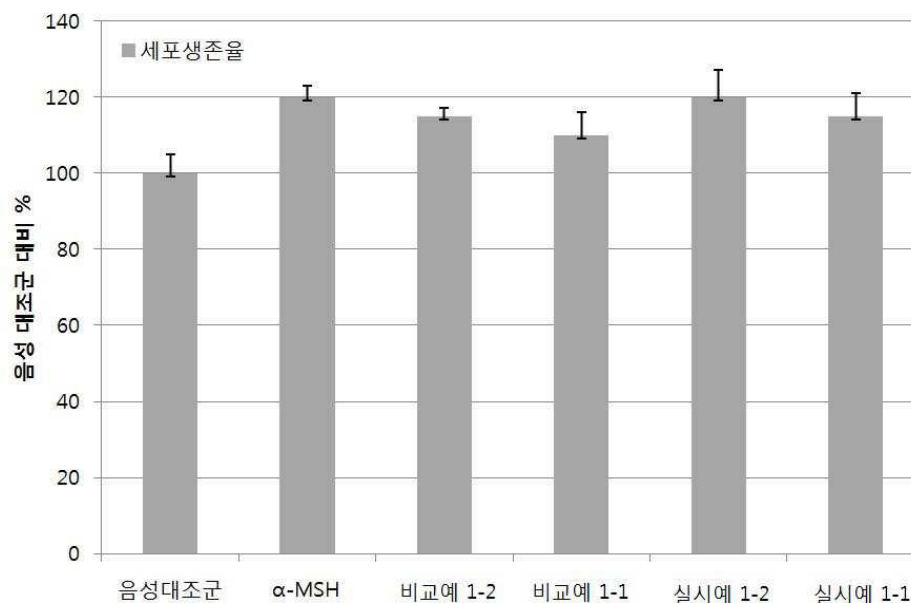
[0251]

[0253]

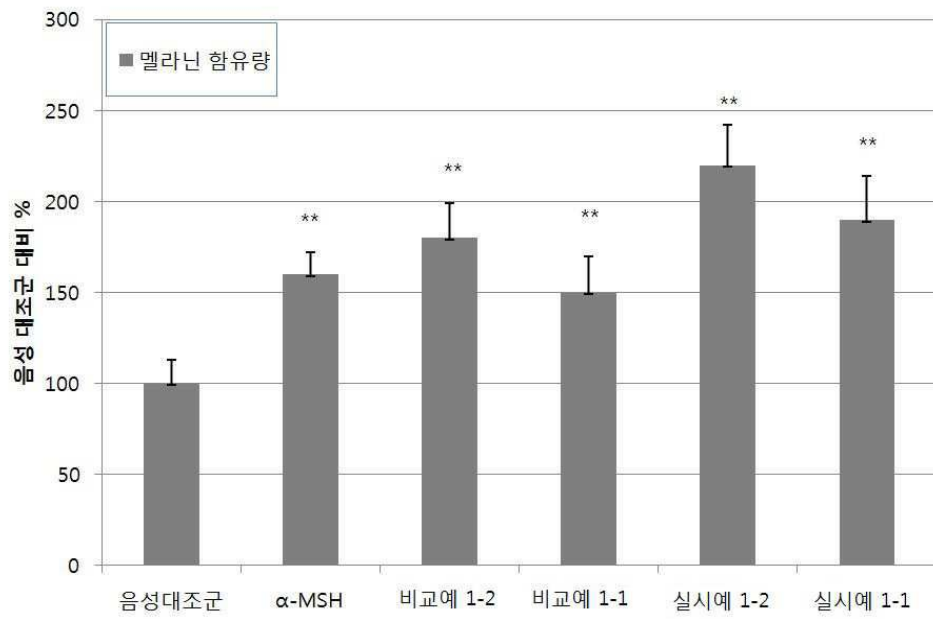
그 결과, 도 13-14 및 표 10-11에 나타낸 바와 같이, 용안육 에탄올 추출물에 대한 헥산 분획물은 음성 대조군에 비해 멜라노블라스트 이동이 165% 증가하였으며, 클로로포름 분획물은 171%, 에틸아세테이트 분획물은 157% 증가한 것을 확인하였다. 양성대조군인 α-MSH를 처리한 멜라노블라스트는 124% 증가한 것을 확인하였다. 또한 C3H/HeJ 마우스 모발에서의 멜라닌 함량 및 티로시나아제 함량 또한 용안육 헥산 분획물은 음성 대조군에 비해 멜라닌 함량이 181%, 티로시나아제 함량이 154% 증가하였으며, 클로로포름 분획물은 멜라닌 함량이 202%, 티로시나아제 함량이 186%, 에틸아세테이트 분획물은 멜라닌 함량이 166%, 티로시나아제 함량이 142% 증가한 것을 확인하였다. (도 13 및 도 14).

도면

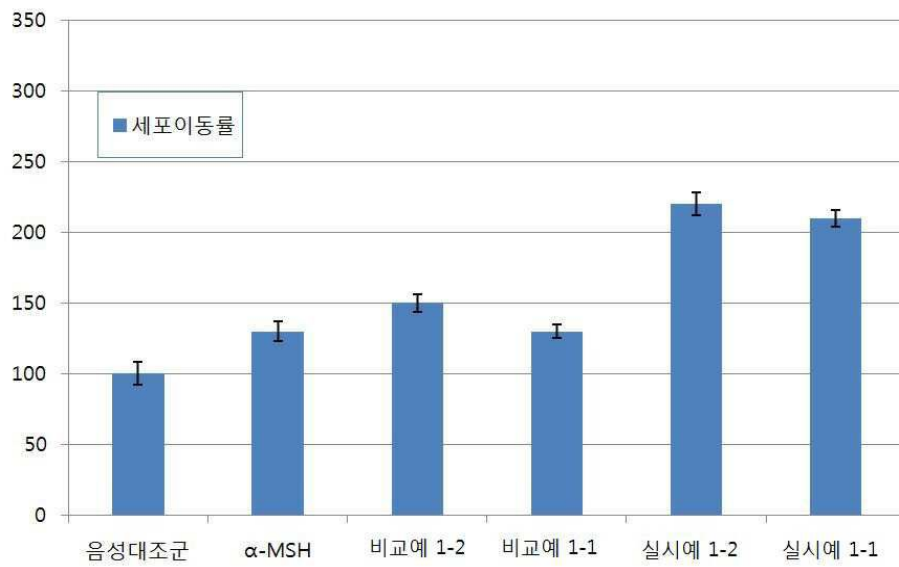
도면1



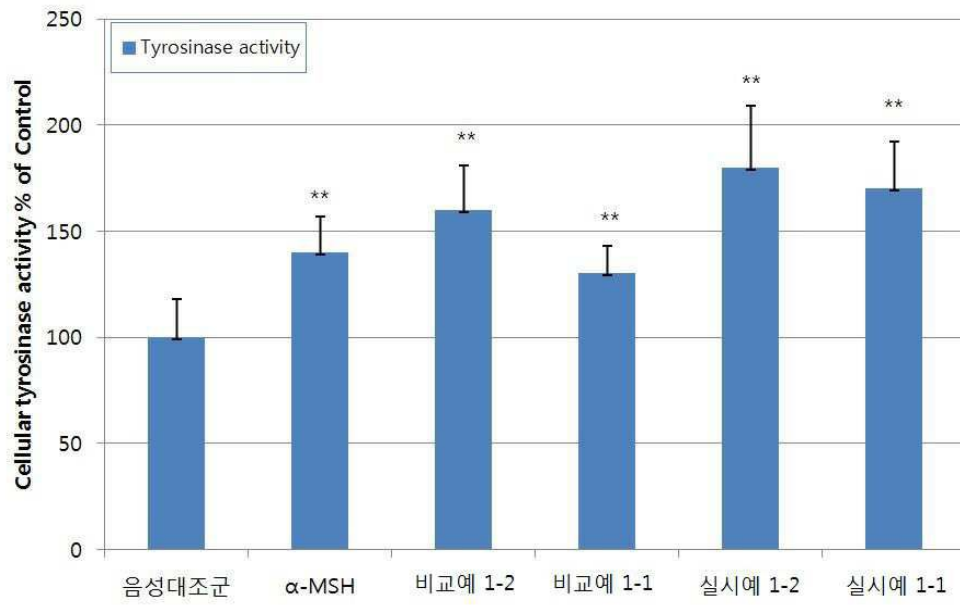
도면2



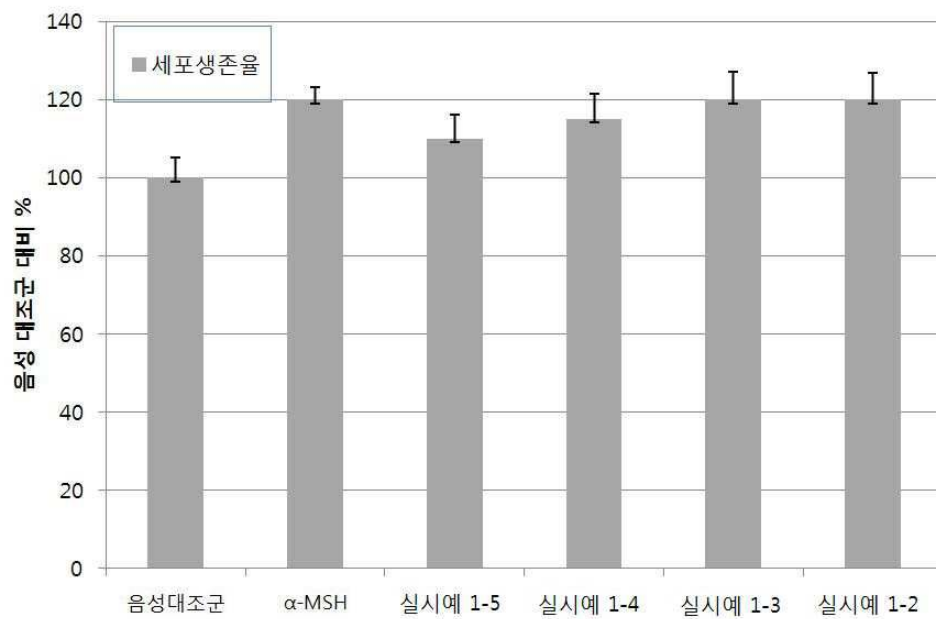
도면3



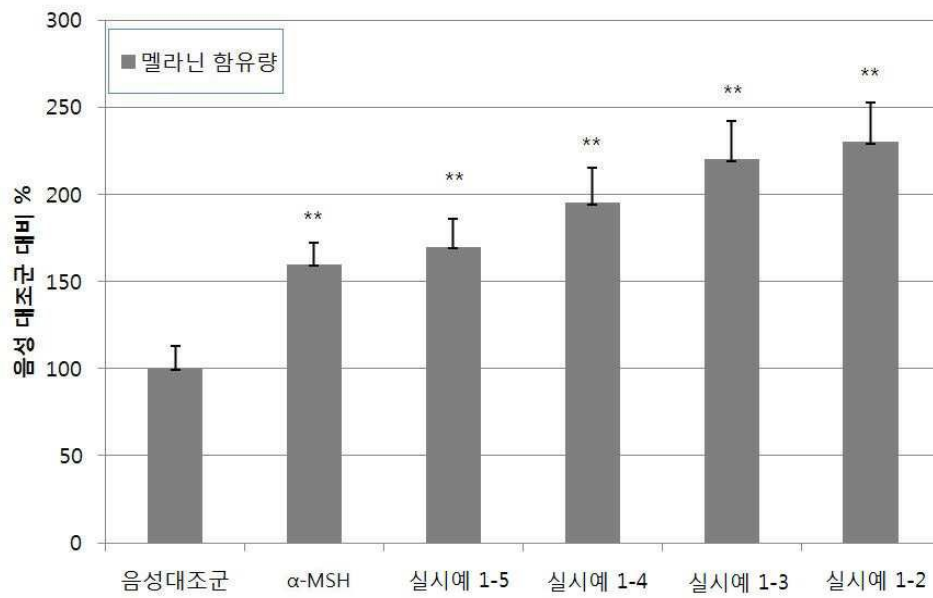
도면4



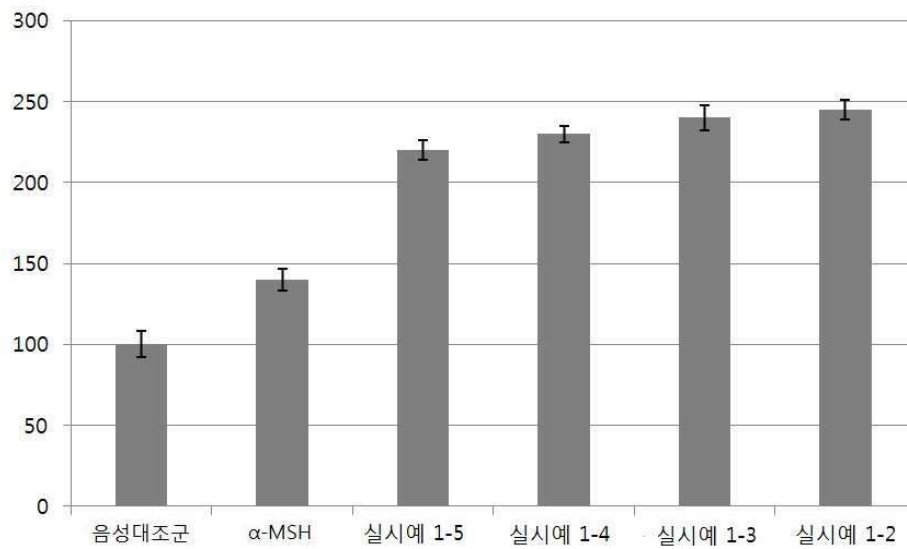
도면5



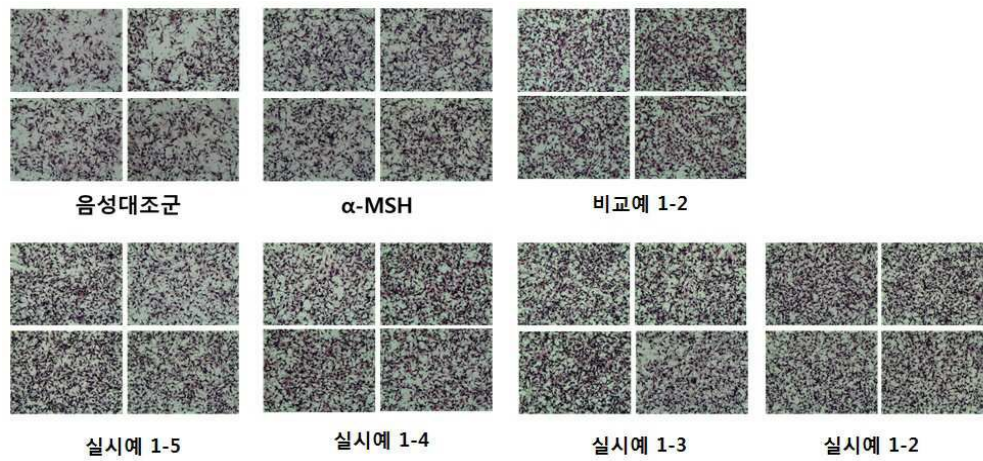
도면6



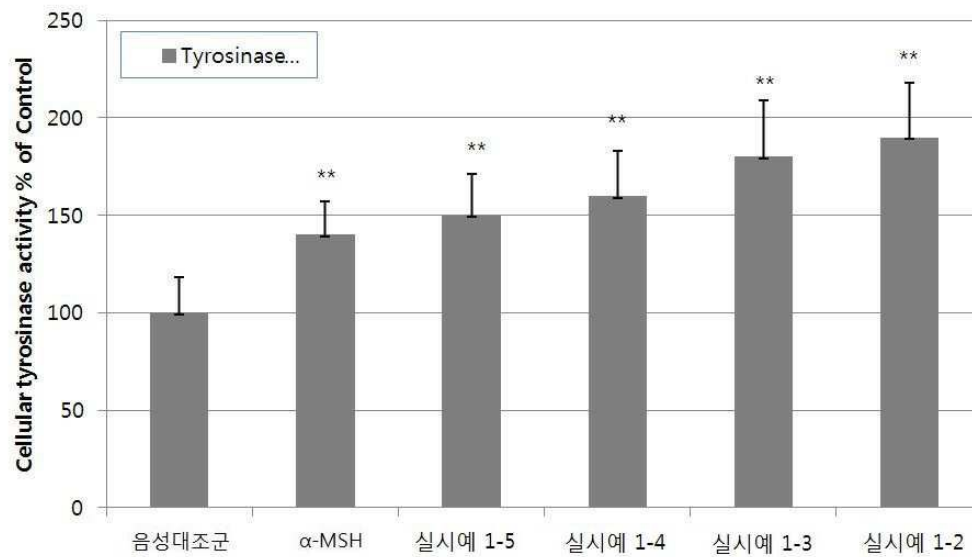
도면7



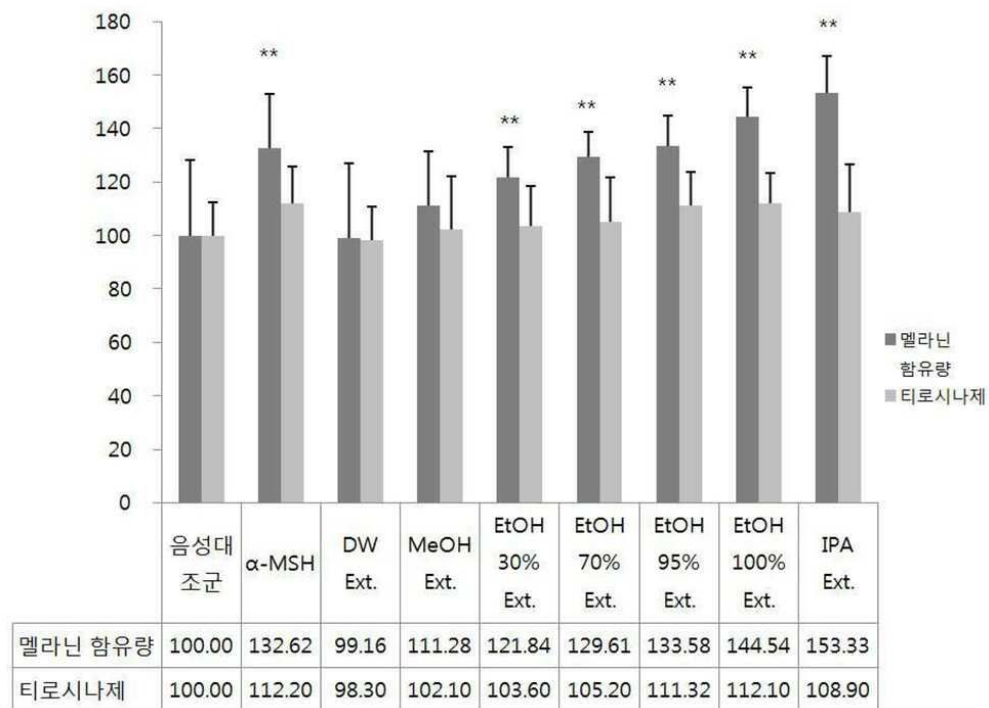
도면8



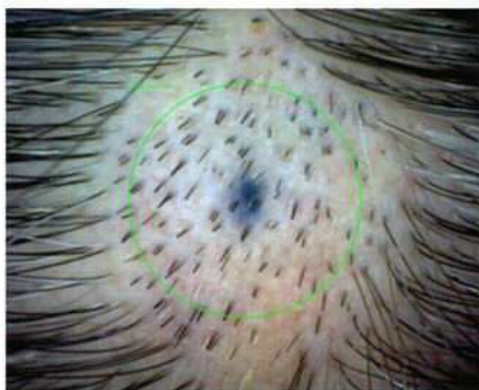
도면9



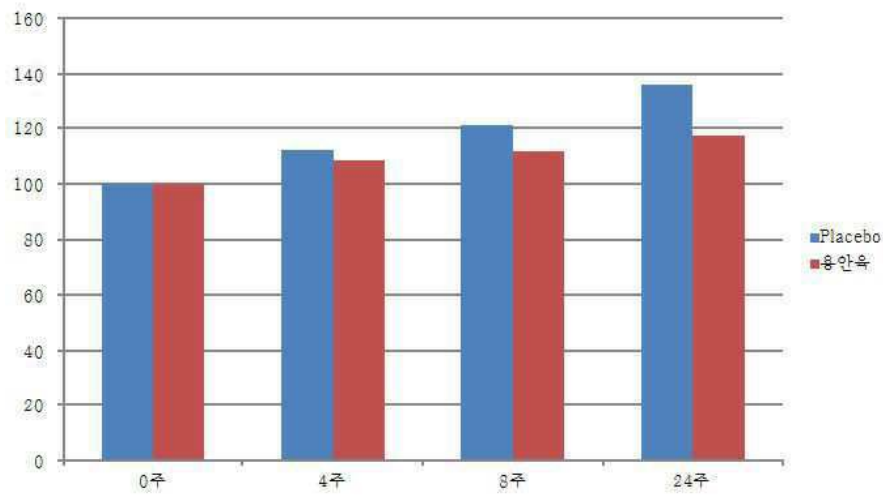
도면10



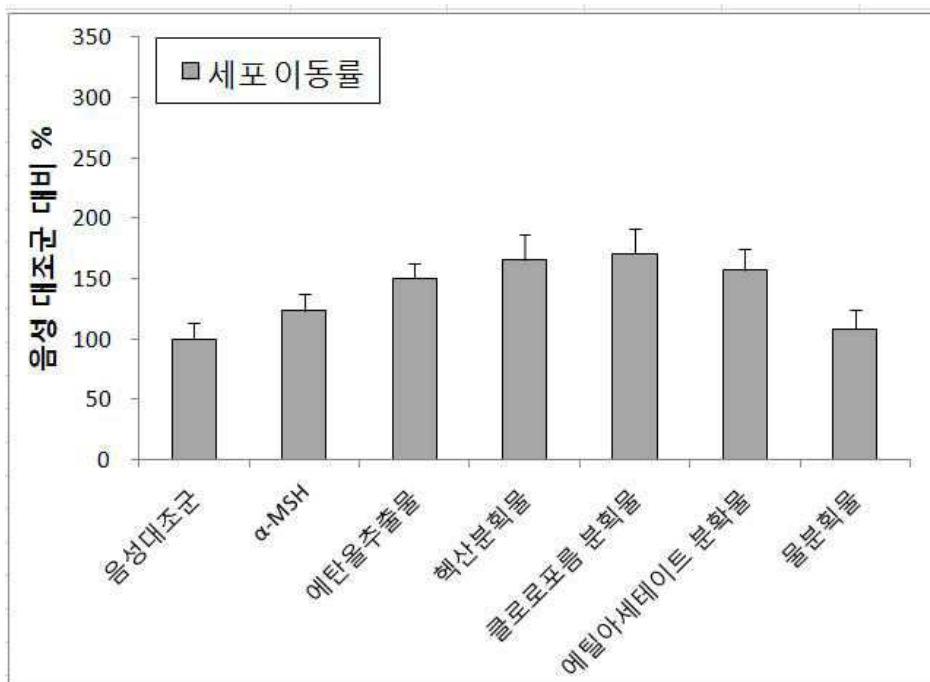
도면11



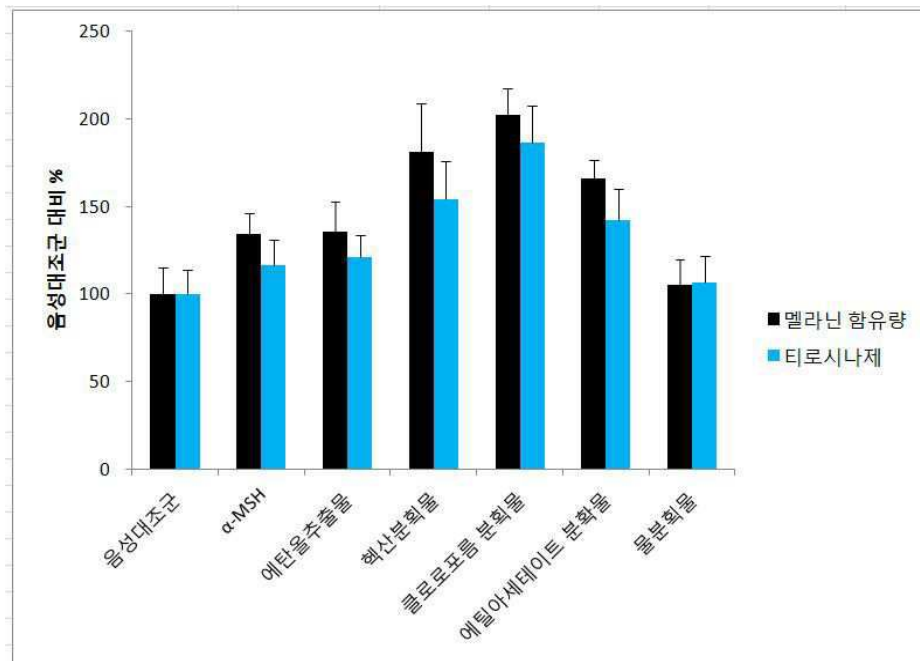
도면12



도면13



도면14



도면15

