



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0101563
(43) 공개일자 2016년08월25일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 36/899</i> (2006.01) <i>A61K 31/352</i> (2006.01)
 <i>A61K 8/97</i> (2006.01) <i>A61Q 19/08</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 36/899</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/352</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0024387
 (22) 출원일자 2015년02월17일
 심사청구일자 2015년02월17일</p> | <p>(71) 출원인
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
 정대균
 경기도 성남시 분당구 중앙공원로 54, 212동 1802호 (서현동, 시범단지우성아파트)</p> <p>이도경
 경기도 용인시 기흥구 서그대로16번길 11, 207호 (서천동, 백운원룸)
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 안소영</p> |
|---|--|

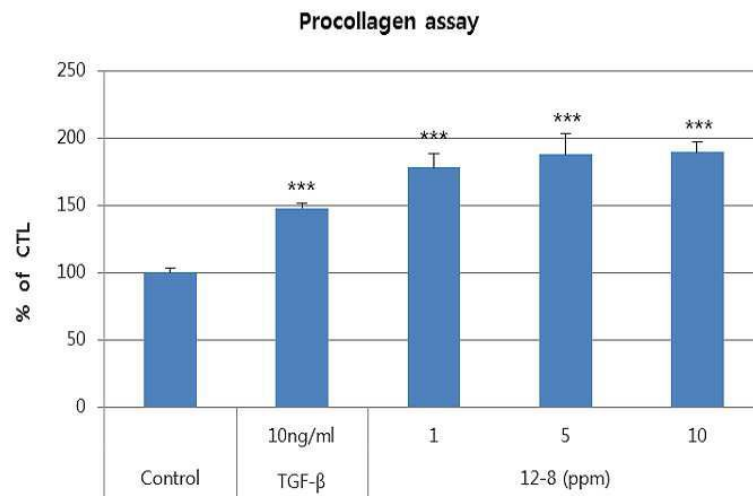
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **고장초 추출물을 포함하는 피부 주름 개선용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 고장초 추출물을 포함하는 피부 주름 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 세포독성이 없어 안전하며, 피부 섬유아세포의 프로콜라겐 합성을 촉진하는 효과가 있어 피부 주름을 효과적으로 개선할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 8/97 (2013.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

(72) 발명자

박원만

경기도 수원시 영통구 영통로290번길 25, 506동
1306호 (영통동, 신나무실주공아파트)

방면호

경기도 수원시 장안구 송원로 131-28, 104동 2204
호 (조원동, 수원광고산스위첸)

오수진

경기도 화성시 동탄지성로 405, 113동 504호 (기산
동, 대우푸르지오아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 [RIC 07-06004]

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 경희대학교 피부생명공학 센터

연구사업명 지역혁신센터 사업

연구과제명 피부생명

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 피부생명공학 센터

연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

고장초(*Zizania latifolia* Turcz.) 알코올 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물.

청구항 2

고장초 알코올 추출물의 에틸 아세테이트 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물.

청구항 3

하기 단계를 포함하는 방법으로 수득된 고장초 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물:

- a) 고장초를 알코올로 추출하는 단계;
- b) 상기 a)에서 수득된 추출물을 에틸 아세테이트로 분획하는 단계; 및
- c) 상기 b)에서 수득된 분획물을 클로로포름-메탄올 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계.

청구항 4

제3항에 있어서, c) 단계 다음에

- d) 상기 c)에서 수득된 분획물이 실리카 박막 크로마토그래피 상에서 클로로포름-메탄올 9:1 (v/v) 혼합용매에 의해 전개되었을 때 $R_f=0.25$ 내지 0.3의 값을 갖는 분획물을 수득하는 단계를 더 포함하는 방법으로 수득된 고장초 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물.

청구항 5

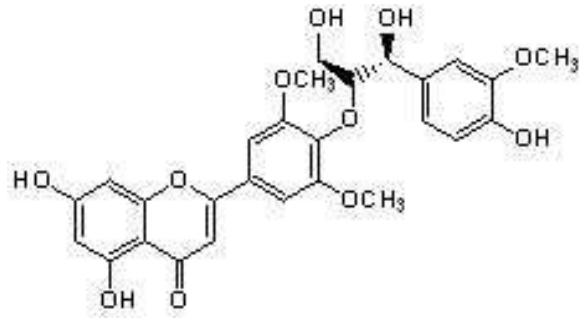
하기 단계를 포함하는 방법으로 수득된 고장초 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물:

- a) 고장초를 알코올로 추출하는 단계;
- b) 상기 a)에서 수득된 추출물을 에틸 아세테이트로 분획하는 단계;
- c) 상기 b)에서 수득된 분획물을 클로로포름-메탄올 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계; 및
- d) 상기 c)에서 수득된 분획물을 n-헥산-아세톤 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계.

청구항 6

화학식 1로 기재되는 트리신-4'-O-(에리스로-β-구아이어아실글리세릴) 에테르(Tricin-4'-O-(erythro-β-guaiacylglyceryl) ether), 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 수화물 또는 용매화물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 7

하기 1) 내지 5)로부터 선택되는 1 이상을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 화장품 조성물.

- 1) 고장초 알코올 추출물;
- 2) 고장초 알코올 추출물의 에틸 아세테이트 분획물;
- 3) 하기 단계를 포함하는 방법으로 수득된 고장초 추출물:
 - a) 고장초를 알코올로 추출하는 단계;
 - b) 상기 a)에서 수득된 추출물을 에틸 아세테이트로 분획하는 단계; 및
 - c) 상기 b)에서 수득된 분획물을 클로로포름-메탄올 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계;
- 4) 하기 단계를 포함하는 방법으로 수득된 고장초 추출물:
 - a) 고장초를 알코올로 추출하는 단계;
 - b) 상기 a)에서 수득된 추출물을 에틸 아세테이트로 분획하는 단계;
 - c) 상기 b)에서 수득된 분획물을 클로로포름-메탄올 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계; 및
 - d) 상기 c)에서 수득된 분획물을 n-헥산-아세톤 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계;
- 5) 화학식 1로 기재되는 트리신-4'-O-(에리스로-β-구아이아실글리세릴) 에테르.

청구항 8

하기 1) 내지 5)로부터 선택되는 1 이상을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 식품 조성물.

- 1) 고장초 알코올 추출물;
- 2) 고장초 알코올 추출물의 에틸 아세테이트 분획물;
- 3) 하기 단계를 포함하는 방법으로 수득된 고장초 추출물:
 - a) 고장초를 알코올로 추출하는 단계;
 - b) 상기 a)에서 수득된 추출물을 에틸 아세테이트로 분획하는 단계; 및
 - c) 상기 b)에서 수득된 분획물을 클로로포름-메탄올 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계;
- 4) 하기 단계를 포함하는 방법으로 수득된 고장초 추출물:
 - a) 고장초를 알코올로 추출하는 단계;
 - b) 상기 a)에서 수득된 추출물을 에틸 아세테이트로 분획하는 단계;

c) 상기 b)에서 수득된 분획물을 클로로포름-메탄올 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계; 및

d) 상기 c)에서 수득된 분획물을 n-헥산-아세톤 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계;

5) 화학식 1로 기재되는 트리신-4'-O-(에리스로-β-구아니아실글리세릴) 에테르.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고장초 알코올 추출물은 화학식 1로 기재되는 트리신-4'-O-(에리스로-β-구아니아실글리세릴) 에테르를 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 고장초 알코올 추출물은 화학식 1로 기재되는 트리신-4'-O-(에리스로-β-구아니아실글리세릴) 에테르를 포함하는 피부 주름 개선용 화장료 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 고장초 알코올 추출물은 화학식 1로 기재되는 트리신-4'-O-(에리스로-β-구아니아실글리세릴) 에테르를 포함하는 피부 주름 개선용 식품 조성물.

청구항 12

화학식 1로 기재되는 트리신-4'-O-(에리스로-β-구아니아실글리세릴) 에테르를 포함하는 고장초 추출물을 유효 성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물.

청구항 13

하기 단계를 포함하는 고장초로부터 화학식 1로 기재되는 트리신-4'-O-(에리스로-β-구아니아실글리세릴) 에테르를 분리하는 방법:

a) 고장초를 알코올로 추출하는 단계;

b) 상기 a)에서 수득된 추출물을 에틸 아세테이트로 분획하는 단계;

c) 상기 b)에서 수득된 분획물을 클로로포름-메탄올 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계;

d) 상기 c)에서 수득된 분획물이 실리카 박막 크로마토그래피 상에서 클로로포름-메탄올 9:1 (v/v) 혼합용매에 의해 전개되었을 때 $R_f=0.25$ 내지 0.3의 값을 갖는 분획물을 수득하는 단계;

e) 상기 d)에서 수득된 분획물을 n-헥산-아세톤 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계; 및

f) 상기 e)에서 수득된 분획물이 실리카 박막 크로마토그래피 상에서 n-헥산-아세톤 2:1 (v/v) 혼합용매에 의해 전개되었을 때 $R_f=0.25$ 내지 0.3의 값을 갖는 분획물을 수득하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고장초 추출물을 포함하는 피부 주름 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 인체의 외부에 덮고 있는 기관으로 표피(epidermis), 진피(dermis), 피하지방층(hypodermis)의 3개의 층으로 구성되어 있다. 표피는 중층편평상피인 각질형성세포(keratinocyte)가 대부분을 차지하고 있고, 진피는 섬유아세포(fibroblast)가 만들어내는 콜라겐(collagen, 교원섬유)과 탄력섬유(elastic fiber)로 구성된 결합조직과 기질로 이루어져 있으며 신경, 혈관, 림프관, 땀샘 등을 포함하고 있다.

[0003] 모든 생명체는 나이가 들면서 자연히 피부 노화가 일어난다. 태양광의 자외선은 피부 노화를 가속화시키는 원인으로 잘 알려져 있다. 또한 현대 사회에서는 매연, 먼지 등 각종 환경오염 물질도 피부 노화를 가속화시키는 원인이 되고 있다. 피부가 노화되면 일어나는 대표적인 현상이 바로 주름(wrinkles)이다. 피부에서 콜라겐 합성이 감소하고 수분이 소실되면서 피부가 탄력을 잃고 주름이 생기는 것이다.

[0004] 시중에는 피부 주름을 개선하기 위한 다양한 제품이 시판되고 있다. 또한 피부 주름 개선 제품을 개발하기 위한 연구들도 활발히 진행되고 있다. 이러한 제품들은 콜라겐 합성을 증가시키거나, 수분을 보충하거나, 콜라겐 분해 효소를 억제하는 등 다양한 기전으로 작용한다. 그러나 이러한 제품들 중에는 피부 주름 개선 효과가 미미하거나, 피부에 독성과 자극을 유발하는 부작용이 있는 경우도 많다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 고장초 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물, 화장료 조성물 및 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 고장초(Zizania latifolia Turcz.) 알코올 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0007] 고장초(Zizania latifolia Turcz.)는 벼과에 속하는 여러해살이 풀로 줄 또는 줄풀이라고도 불린다. 한의학에서는 고혈압, 중풍, 변비, 비만, 동맥경화 등의 효과가 있다고 알려져 있으며, 민간요법에서는 건강식품으로 식용되기도 한다. 그러나 고장초 추출물의 피부 주름 개선 효과에 대해서는 이전에 공지된 바가 없다.

[0008] 본 발명에서는 고장초의 전초를 사용하여 추출물을 수득한다.

[0009] 본 발명에 있어서, 고장초 추출물의 추출 방법은 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있으며, 추출 방법은 이에 한정되지 않는다. 추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 이러한 농축에 의해 액상 또는 분말 형태로 고장초 추출물을 추출한다. 고장초 추출물은 탄소수 1~4의 알코올, 탄소수 1~4의 알코올 수용액으로 이루어진 군으로부터 선택된 추출용매로 추출하여 얻어질 수 있으며, 이렇게 얻어진 추출물, 그 추출물의 반건조물 또는 건조 분말이 될 수 있다. 바람직하게는 상기 추출용매는 탄소수 3 이하의 알코올 수용액, 보다 바람직하게는 에탄올 수용액을 사용할 수 있다. 상기 추출은 실온에서 12시간 내지 7일 동안, 바람직하게는 3일 동안 수행될 수 있다. 또한, 필요에 따라 차광 및/또는 가온(예를 들어, 온침) 조건 하에서 수행될 수 있으며, 바람직하게는 실온에서 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 추출 용매의 양은 고장초 건조 중량의 2 내지 15 배가 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0010] 본 발명은 고장초 알코올 추출물의 에틸 아세테이트 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 고장초 알코올 추출물의 에틸 아세테이트 분획물은 고장초를 알코올로 추출한 추출물을 에틸 아세테이트와 물을 용매로 하여 분배 추출하였을 때 에틸 아세테이트에 용해된 분획물을 의미한다.

[0012] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 방법으로 수득된 고장초 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] a) 고장초를 알코올로 추출하는 단계;

[0014] b) 상기 a)에서 수득된 추출물을 에틸 아세테이트로 분획하는 단계; 및

[0015] c) 상기 b)에서 수득된 분획물을 클로로포름-메탄을 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계.

[0016] 상기 c) 단계에서 구체적인 컬럼 크로마토그래피 조건은 하기와 같다.

[0017] ● 칼럼: 실리카겔 컬럼 (Kiesel gel 60, 머크)(Φ 12 x 20 cm)

[0018] ● 이동상: 클로로포름-메탄을 혼합용매 49:1(v/v)(5min) → 19:1(v/v)(10min) → 9:1(v/v)(20min) →

4:1(v/v)(20min) → 1:1(v/v)(20min), run time = 120 min

[0019] 본 발명은 상기 방법에서 c) 단계 다음에

[0020] d) 상기 c)에서 수득된 분획물이 실리카 박막 크로마토그래피 상에서 클로로포름-메탄올 9:1 (v/v) 혼합용매에 의해 전개되었을 때 $R_f=0.25$ 내지 0.3의 값을 갖는 분획물을 수득하는 단계를 더 포함하는 방법에 의해 수득된 고장초 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 d) 단계에서, 전개용매는 실리카 박층 크로마토그래피 상에서 컬럼 크로마토그래피에서의 이동상으로 사용되는 혼합용매 중 혼합비가 중간 정도에 위치한 용매를 사용할 수 있다. 본 발명의 일 구현예로서, 클로로포름-메탄올 9:1 (v/v) 혼합용매를 전개용매로 사용할 수 있다.

[0022] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 방법으로 수득된 고장초 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] a) 고장초를 알코올로 추출하는 단계;

[0024] b) 상기 a)에서 수득된 추출물을 에틸 아세이트로 분획하는 단계;

[0025] c) 상기 b)에서 수득된 분획물을 클로로포름-메탄올 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계; 및

[0026] d) 상기 c)에서 수득된 분획물을 n-헥산-아세톤 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계.

[0027] 상기 d)에서 구체적인 컬럼 크로마토그래피 조건은 하기와 같다.

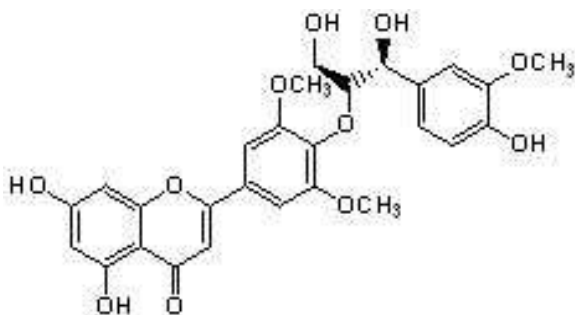
[0028] ● 칼럼: 실리카겔 컬럼(Kiesel gel 60, 머크)(Φ 2 x 10 cm)

[0029] ● 이동상: n-헥산-아세톤 혼합용매 4:1(v/v)(10min) → 2:1(v/v)(20min) → 1:1(v/v)(10min). run time = 90 min

[0030] 본 발명은 상기 방법에서 d) 단계 다음에 e) 상기 d)에서 수득된 분획물이 실리카 박막 크로마토그래피 상에서 n-헥산-아세톤 2:1 (v/v) 혼합용매에 의해 전개되었을 때 $R_f=0.25$ 내지 0.3의 값을 갖는 분획물을 수득하는 단계를 더 포함하는 방법으로 수득된 고장초 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0031] 상기 얻어진 분획물은 순도 98% 이상으로 단일 화합물을 포함하고 있는 것으로 분석되었으며, 상기 화합물은 하기 화학식 1로 기재되는 트리신-4'-O-(에리스로- β -구아이어아실글리세릴) 에테르(Tricin-4'-O-(erythro- β -guaiacylglyceryl) ether, 또는 salcolin B라고도 함)로 동정되었다.

[0032] [화학식 1]



[0033]

[0034] 따라서 본 발명은 화학식 1로 기재되는 트리신-4'-O-(에리스로- β -구아이어아실글리세릴) 에테르, 이의 약제학적 염, 또는 이의 수화물 또는 용매화물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체는 통상적으로 이용되는 것들이 될 수 있으며, 예를 들어 락토오스, 텍스트로스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 이산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸셀룰로오스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필

히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 담체 외에 윤화제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [0036] 본 발명의 약학적 조성물은 조성물 100 중량부에 대하여 본 발명의 유효성분을 0.001 내지 99.99 중량부 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.001 내지 30 중량부, 보다 바람직하게는 0.001 내지 20 중량부 포함할 수 있다. 그러나 함량은 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명의 약학적 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 조성물은 경구 또는 피하로 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로는 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 경우에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 약학적 조성물은 성인에게 10 mg 내지 5g/kg의 용량으로 투여할 수 있다. 단위 체형당 상기 약학적 조성물의 1일 용량 또는 이의 1/2, 1/3 또는 1/4의 용량이 함유될 수 있으며, 1일 1 내지 6 회 투여될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0039] 본 발명은 하기 1) 내지 5)로부터 선택되는 1 이상을 포함하는 피부 주름 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0040] 1) 고장초 알코올 추출물;
- [0041] 2) 고장초 알코올 추출물의 에틸 아세테이트 분획물;
- [0042] 3) 하기 단계를 포함하는 방법으로 수득된 고장초 추출물:
- [0043] a) 고장초를 알코올로 추출하는 단계;
- [0044] b) 상기 a)에서 수득된 추출물을 에틸 아세테이트로 분획하는 단계; 및
- [0045] c) 상기 b)에서 수득된 분획물을 클로로포름-메탄을 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계;
- [0046] 4) 하기 단계를 포함하는 방법으로 수득된 고장초 추출물:
- [0047] a) 고장초를 알코올로 추출하는 단계;
- [0048] b) 상기 a)에서 수득된 추출물을 에틸 아세테이트로 분획하는 단계;
- [0049] c) 상기 b)에서 수득된 분획물을 클로로포름-메탄을 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계; 및
- [0050] d) 상기 c)에서 수득된 분획물을 n-헥산-아세톤 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계;
- [0051] 5) 화학식 1로 기재되는 트리신-4'-O-(에리스로-β-구아이어실글리세릴) 에테르.
- [0052] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0053] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0054] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.
- [0055] 본 발명의 조성물은 피부 주름의 예방 또는 개선을 위한 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며,

예컨대, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조 식품, 식품 첨가제 등에 사용될 수 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 환 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다. 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태일 수 있다.

- [0056] 본 발명의 식품 조성물의 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태로 제조 가능하다.
- [0057] 본 발명의 식품 조성물은 조성물 100 중량부에 대하여 유효성분을 0.001 내지 99.99 중량부, 바람직하게는 0.001 내지 30 중량부 포함할 수 있다. 그러나 유효성분의 함량은 이에 제한되지 않으며, 적절히 조정될 수 있고, 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0058] 본 발명은 하기 1) 내지 5)로부터 선택되는 1 이상을 포함하는 피부 주름 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0059] 1) 고장초 알코올 추출물;
- [0060] 2) 고장초 알코올 추출물의 에틸 아세테이트 분획물;
- [0061] 3) 하기 단계를 포함하는 방법으로 수득된 고장초 추출물:
- [0062] a) 고장초를 알코올로 추출하는 단계;
- [0063] b) 상기 a)에서 수득된 추출물을 에틸 아세테이트로 분획하는 단계; 및
- [0064] c) 상기 b)에서 수득된 분획물을 클로로포름-메탄을 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계;
- [0065] 4) 하기 단계를 포함하는 방법으로 수득된 고장초 추출물:
- [0066] a) 고장초를 알코올로 추출하는 단계;
- [0067] b) 상기 a)에서 수득된 추출물을 에틸 아세테이트로 분획하는 단계;
- [0068] c) 상기 b)에서 수득된 분획물을 클로로포름-메탄을 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계; 및
- [0069] d) 상기 c)에서 수득된 분획물을 n-헥산-아세톤 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계;
- [0070] 5) 화학식 1로 기재되는 트리신-4'-O-(에리스로- β -구아이아실글리세릴) 에테르.
- [0071] 본 명세서에서 '화장료'란 화장품 또는 의약외품이 될 수 있는 물질을 말한다.
- [0072] 화장품이란 인체를 청결·미화하여 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키거나 피부·모발의 건강을 유지 또는 증진하기 위하여 인체에 사용되는 물품으로서 인체에 대한 작용이 경미한 것을 말한다. 또한 기능성화장품이란 피부의 미백에 도움을 주거나, 피부의 주름개선에 도움을 주거나, 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품으로 보건복지가족부령이 정한 것을 포함하며, 피부를 개선시켜주는 모든 것을 통칭한다.
- [0073] 의약외품은 질병을 치료하거나 예방하기 위해 쓰는 의약품보다는 인체에 대한 작용이 경미한 물품에 대해 보건복지부가 따로 정한 분류 기준에 의한 약품을 지칭한다. 약사법에 따르면 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 섬유·고무 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않으며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염병을 막기 위한 살균·살충제 등이 포함된다. 의약외품의 대표적인 예로는 치약, 기능성 비누, 기능성 샴푸 등이 있다.
- [0074] 따라서 본 발명의 화장료 조성물은 노화 방지, 주름 개선 또는 피부 탄력 증진을 위한 화장품(에센스, 크림 등) 또는 노화 방지, 주름 개선 또는 피부 탄력 증진을 위한 기능성 비누 또는 클렌징폼, 클렌징크림, 클렌징워터 등의 의약외품으로 사용될 수 있다.
- [0075] 본 발명의 조성물 중 상기 화합물은, 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 10 중량%로 함유될 수 있다. 그러나 함량은 이에 제한되지 않는다.
- [0076] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분과 배합될 수 있다. 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유효 및 무기 안

료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알코올, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수, 자외선 차단제 등을 들 수 있다.

- [0077] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 상기 화합물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 추가로 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함할 수 있다.
- [0078] 본 발명의 화장료 조성물은 보습제를 더 포함할 수 있다.
- [0079] 또한, 본 발명의 조성물은 본 발명의 화장료 조성물은 업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 유액, 현탁액, 크림, 화장수, 에센스, 팩, 젤, 파우더, 립스틱, 메이크업 베이스, 파운데이션, 로션, 연고, 패취, 미용액, 클렌징폼, 클렌징크림, 클렌징워터, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 샴푸, 린스, 바디세정제, 비누, 및 분무제에서 선택된 제형인 것일 수 있다.
- [0080] 이들 제형의 제조방법은 통상의 화장료 제형의 제조방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0081] 본 발명의 약학적 조성물, 식품 조성물 또는 화장료 조성물에 유효성분으로서 포함된 고장초 추출물은 화학식 1로 기재되는 트리신-4'-0-(에리스로-β-구아니아실글리세릴) 에테르를 포함할 수 있다.
- [0082] 본 발명은 화학식 1로 기재되는 트리신-4'-0-(에리스로-β-구아니아실글리세릴) 에테르를 포함하는 고장초 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 개선용 약학적 조성물, 식품 조성물 및 화장료 조성물을 제공한다.
- [0083] 또한 본 발명은 상기 기술한 방법들에 의해 고장초 추출물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0084] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 고장초로부터 화학식 1로 기재되는 트리신-4'-0-(에리스로-β-구아니아실글리세릴) 에테르를 분리하는 방법을 제공한다:
- [0085] a) 고장초를 알코올로 추출하는 단계;
- [0086] b) 상기 a)에서 수득된 추출물을 에틸 아세테이트로 분획하는 단계;
- [0087] c) 상기 b)에서 수득된 분획물을 클로로포름-메탄을 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계;
- [0088] d) 상기 c)에서 수득된 분획물이 실리카 박막 크로마토그래피 상에서 클로로포름-메탄을 9:1 (v/v) 혼합용매에 의해 전개되었을 때 Rf=0.25 내지 0.3의 값을 갖는 분획물을 수득하는 단계;
- [0089] e) 상기 d)에서 수득된 분획물을 n-헥산-아세톤 혼합용매를 이동상으로 하는 컬럼 크로마토그래피로 분리하는 단계; 및
- [0090] f) 상기 e)에서 수득된 분획물이 실리카 박막 크로마토그래피 상에서 n-헥산-아세톤 2:1 (v/v) 혼합용매에 의해 전개되었을 때 Rf=0.25 내지 0.3의 값을 갖는 분획물을 수득하는 단계.

발명의 효과

- [0091] 본 발명은 세포독성이 없어 안전하며, 피부 섬유아세포의 프로콜라겐 합성을 촉진하는 효과가 있어 피부 주름을 효과적으로 개선할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0092] 도 1은 본 발명의 고장초 에탄올 추출물의 에틸 아세테이트 분획물의 프로콜라겐 합성 촉진 효과를 확인한 도이다.
- 도 2는 본 발명의 고장초로부터 분리된 Fr.12-8 분획물의 프로콜라겐 합성 촉진 효과를 확인한 도이다.
- 도 3은 본 발명의 고장초로부터 분리된 Fr.12-8 분획물의 세포 독성을 확인한 도이다.
- 도 4는 본 발명의 고장초로부터 분리된 Fr.12-8 분획물에서 동정된 화합물(트리신-4'-0-(에리스로-β-구아니아실글리세릴) 에테르)의 ¹H NMR 데이터를 나타낸 도이다.
- 도 5는 본 발명의 고장초로부터 분리된 Fr.12-8 분획물에서 동정된 화합물(트리신-4'-0-(에리스로-β-구아니아실글리세릴) 에테르)의 ¹³C NMR 데이터를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0093] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.
- [0094] **제조예 1. 고장초 1차 분획물의 제조**
- [0095] **(1) 에탄올 추출**
- [0096] 경상북도 경산시 하양읍에서 건조한 고장초(*Zizania latifolia* Turcz.)를 삼흥건재 약업사(서울시 동대문구 제기동 89-45 1층)로부터 구입하였다. 상기 고장초 5 kg을 음지에서 건조하고 세절한 다음, 80% 에탄올을 이용하여 실온에서 3일 동안 자기 교반기로 교반하면서 추출하였다.
- [0097] **(2) 에틸 아세테이트 분획**
- [0098] 상기 (1)에서 얻은 에탄올 추출물을 여과하고 40 °C에서 감압농축기를 이용하여 농축하여 검질 덩어리 454 g을 얻었다. 상기 검질 덩어리를 물에 현탁한 후, 여기에 에틸 아세테이트(ethyl acetate)(3 ℓ 씩 3회)와 물(3 ℓ) 첨가하여 분배 추출하였다. 각 층을 감압 농축하여, 에틸 아세테이트 분획물(97g) 및 물 분획물(340g)을 수득하였다.
- [0099] **(3) 클로로포름-메탄을 분획**
- [0100] 상기 (2)에서 얻은 에틸 아세테이트 분획물을 클로로포름-메탄을 혼합용매를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 100 ml 씩 분취하였다. 구체적인 컬럼 크로마토그래피 조건은 하기와 같다.
- [0101] ● 칼럼: 실리카겔 컬럼(Kiesel gel 60, 머크) (Φ 1 x 25 cm)
- [0102] ● 이동상: 클로로포름-메탄을 혼합용매 49:1(v/v)(5min) → 19:1(v/v)(10min) → 9:1(v/v)(20min) → 4:1(v/v)(20min) → 1:1(v/v)(20min), run time = 120 min
- [0103] 각 분취액을 SiO₂를 이용한 박층 크로마토그래피(실리카 박층 크로마토그래피)(TLC Silica gel 60 RP-18, 머크)로 확인하였다. 컬럼 크로마토그래피에서의 이동상으로 사용되는 혼합용매 중 혼합비가 중간지점에 위치한 용매에 해당하는 클로로포름-메탄을 9:1 (v/v) 혼합용매를 전개용매로 사용하였다.
- [0104] 박층 크로마토그래피 상에서 유사한 부분끼리 모으고 농축하여 14개의 분획물을 얻었다. 이하 상기 14개의 분획물을 모두 '고장초 1차 분획물'이라고 지칭한다. 고장초 1차 분획물은 크로마토그래피 하단에서부터 Fr.-1 내지 Fr.-14로 각각 지칭한다.
- [0105] **실험예 1. 고장초 1차 분획물의 프로콜라겐 합성 촉진 효과 확인**
- [0106] **(1) 인간 피부 섬유아세포의 준비**
- [0107] 인간 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast)를 MCTT(Modern Cell & Tissue Technologies) 사로부터 구입하였다. 페니실린 (100 units/ml), 스트렙토마이신 (100 µg/ml), 10% FBS가 함유된 DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium)(WelGENE, Inc. 한국)에 상기 세포를 접종하고, 5% 이산화탄소를 포함하는 37°C 배양기에서 배양하였다. 배양된 섬유아세포를 48 웰 플레이트(well plate)에 5×10^4 cells/ml의 농도로 200 µl씩 접종하여 24시간 동안 배양하였다.
- [0108] **(2) 고장초 1차 분획물의 프로콜라겐 합성 촉진 효과 확인**
- [0109] 상기 (1)에서 준비한 섬유아세포를 PBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)로 1회 세척하였다.
- [0110] 상기 제조예 1에서 준비한 고장초 1차 분획물을 각각 DMSO에 용해시켜 100 µg/ml 농도로 희석하고, 각각을 500 µl 씩 무혈청 DMEM 배지(serum free-Dulbecco's Modified Eagle Medium)(WelGENE, Inc. 한국)에 첨가하였다. 한편 음성 대조군으로서 고장초 1차 분획물을 첨가하지 않은 DMEM 배지를 준비하였고, 양성 대조군으로서 성장 촉진 인자인 TGF-β를 10 ng/ml 농도로 희석하여 500 µl첨가된 DMEM 배지를 준비하였다.
- [0111] 상기 PBS로 세척된 섬유아세포를 각 배지에 접종하고 72시간 동안 배양하였다.
- [0112] 그 후 각 배지의 배양액을 수거하여, 프로콜라겐 타입 I-펩타이드 EIA 키트(procollagen Type I C-Peptide EIA, Takara Biomedical Co., Japan)로 제조사의 프로토콜에 따라 각 배양액에서의 프로콜라겐(procollagen)

생합성 정도를 측정하였다.

- [0113] 결과는 도 1에 나타내었다. 도 1에서 고장초 1차 분획물이 유의하게 프로콜라겐 생합성을 촉진했음을 확인할 수 있다. 프로콜라겐 생합성 촉진 효과는 Fr.-12가 가장 우수하게 나타났다. Fr.-12는 제조예 1 (3)에서 실리카 박층 크로마토그래피 상에서 전개하였을 때 $R_f=0.25$ 내지 0.3을 나타내는 분획물에 해당한다.
- [0114] **제조예 2. 고장초 2차 분획물의 제조**
- [0115] 고장초 1차 분획물 중에서, 상기 실험예 1에서 프로콜라겐 생합성 촉진능력이 높은 것으로 확인된 Fr.-12 분획 (5.0g)을 n-헥산-아세톤 혼합용매를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다.
- [0116] 구체적인 컬럼 크로마토 그래피 조건은 하기와 같다.
- [0117] ● 칼럼: 실리카겔 컬럼(Kiesel gel 60, 머크)(Φ 2 x 10 cm)
- [0118] ● 이동상: n-헥산-아세톤 혼합용매 4:1(v/v)(10min) → 2:1(v/v)(20min) → 1:1(v/v)(10min), run time = 90 min
- [0119] 각 분취액을 실리카 박층 크로마토그래피(TLC Silica gel 60 RP-18, 머크)로 확인하였다. 이때 전개용매는 컬럼 크로마토그래피에서의 이동상으로 사용되는 혼합용매 중 혼합비가 중간지점에 위치한 n-헥산-아세톤 2:1 (v/v) 혼합용매를 사용하였다.
- [0120] 박층 크로마토그래피 상에서 유사한 부분끼리 모으고 농축하여 12개의 분획물을 얻었다. 이하 상기 12의 분획물을 모두 '고장초 2차 분획물'이라고 지칭한다. 고장초 2차 분획물은 크로마토그래피 하단에서부터 Fr.-12-1 내지 Fr.-12-12로 각각 지칭한다.
- [0121] **실험예 2. 고장초 2차 분획물의 프로콜라겐 합성 촉진 효과 및 세포 독성 평가**
- [0122] **(1) 고장초 2차 분획물의 프로콜라겐 합성 촉진 효과 확인**
- [0123] 실험예 1과 동일한 방법으로 상기 제조예 2에서 얻은 고장초 2차 분획물의 프로콜라겐 합성 촉진 효과를 확인하였다. 그 결과 Fr.-12-8의 프로콜라겐 생합성 촉진 효과가 매우 우수하게 나타났다. Fr.-12-8 분획은 제조예 2에서 실리카 박층 크로마토그래피 상에서 $R_f=0.25-0.3$ 인 분획물에 해당한다.
- [0124] **(2) Fr-12-8의 농도별 프로콜라겐 합성 촉진 효과 확인**
- [0125] 실험예 1의 (1)과 같이 섬유아세포를 준비하고, 이를 PBS로 세척하였다. Fr.-12-8을 DMSO에 용해시켜 각각 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 희석한 것을 각각 500 μl 씩 무혈청 DMEM 배지에 첨가하였다. 그 외에는 실험예 1 (2)와 동일한 방법으로 프로콜라겐 합성 촉진 효과를 확인하였다.
- [0126] 한편 음성 대조군으로서 고장초 분획물을 첨가하지 않은 DMEM 배지를 준비하였고, 양성 대조군으로서 성장 촉진 인자인 TGF- β 를 10 ng/ml로 희석한 것을 첨가한 DMEM 배지를 준비하였다.
- [0127] 결과는 도 2에 나타내었다. 도 2에서 Fr.-12-8이 모든 농도에서 TGF- β 보다 우수한 프로콜라겐 생합성 촉진 효과를 나타냄을 확인할 수 있다.
- [0128] **(3) 세포 독성 평가**
- [0129] 상기 실험예 1 (1)에서와 동일한 방법으로 인간 섬유아세포를 배양하고, 이를 96웰 플레이트(well plate)에 1×10^4 cells/ml의 농도로 200 μl 씩 접종하여 24시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척하였다.
- [0130] Fr.-12-8을 DMSO에 10 $\mu\text{g/ml}$ 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각각 희석하여 200 μl 씩 무혈청 DMEM 배지에 처리하였다. 음성 대조군으로서 고장초 1차 분획물을 첨가하지 않은 DMEM 배지를 준비하였다. 20시간 동안 배양한 후, 각 배지의 세포 배양액을 제거하고, PBS로 1회 세척하였다.
- [0131] 세포의 증식이나 생존을 측정하는 방법(Western blot analysis)에서 사용되는 WST-1용액을 1/10로 무혈청 DMEM 배지에 희석하고, 상기 배양된 배지에 200 μl 씩 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 그 후 마이크로플레이트-리더(microplate-reader; TECAN Group Ltd, 스위스)를 이용하여 450 내지 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0132] 결과는 도 3에 나타내었다. 도 3에서 Fr.-12-8이 각 농도에서 모두 대조군과 마찬가지로 세포 독성이 낮게 나타남을 알 수 있다.

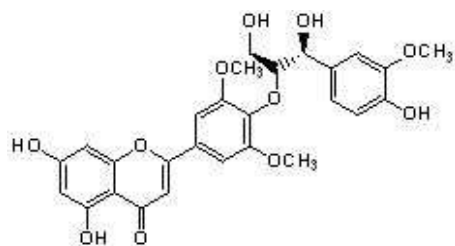
[0133] 실험예 3. 트리신-4'-O-(에리스로-β-구아아실글리세릴) 에테르의 동정

[0134] 상기 실험예 2에서 프로콜라겐 합성 촉진 효과가 우수하고 세포 독성이 낮은 Fr.-12-8 분획을 실리카 박층 크로마토그래피(TLC Silica gel 60 RP-18, 머크)로 확인한 결과, 거의 순수한 단일 물질임을 확인하였다.

[0135] 상기 분획에 대하여 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS (Agilent technology)를 사용하여 분자량 및 분자식을 결정하였다. 또한 핵자기 공명 분석(Bruker AVANCE II 400)을 통하여 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 호모-코지(HOMO-COSY), HMQC(¹H-Detected heteronuclear Multiple-Quantum Coherence), HMBC(Hetronuclear Multiple-Bond Correlation), DEPT(Distortionless Enhancement by Polarization) 스펙트럼을 획득하였다(도 4 및 도 5).

[0136] 상기 스펙트럼 결과, Fr.-12-8 분획은 트리신-4'-O-(에리스로-β-구아아실글리세릴) 에테르(Tricin-4'-O-(erythro-β-guaiacylglyceryl) ether, 또는 salcolin B라고도 함)(21 mg)를 순도 98% 이상으로 포함하고 있는 것으로 동정되었다. 상기 트리신-4'-O-(에리스로-β-구아아실글리세릴) 에테르의 화학식은 하기에 화학식 1로 나타내었다.

[0137] [화학식 1]



[0138]

[0139] 1) 미황색 분말 고체

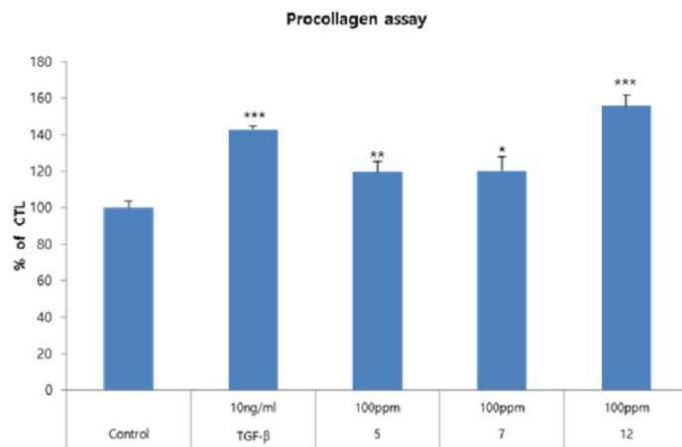
[0140] 2) ESI-MS: m/z 525 [M-H]⁺(calcd. for C₂₇H₂₆O₁₁: 526.1475)

[0141] 3) ¹H-NMR(400MHz,pyridine-d₅) δ 3.71(3H, s, OCH₃-3''), 3.80 (6H, s, OCH₃-3', 5'), 4.35 (1H, dd, J=12.0,3.2Hz, H-9''), 4.68 (1H, dd, J=12.0, 5.2 Hz, H-9''), 5.10 (1H, m, H-8''), 5.72 (1H, d, J= 4.8 Hz, H-7''), 6.74 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 6.85 (1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 7.00(1H, s, H-3), 7.29(1H, d, J=8.0 Hz, H-5''), 7.31 (2H, s, H-2', 6'), 7.39 (1H, dd, J=8.0,1.6Hz,H-6''), 7.53 (1H, d, J=1.2Hz, H-2'').

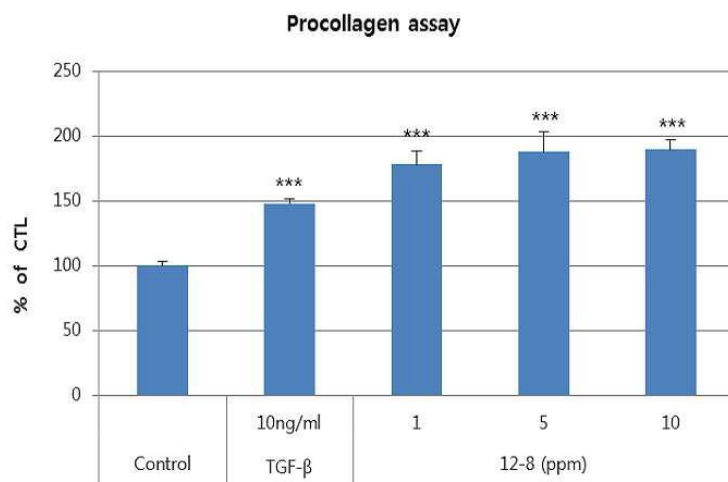
[0142] ¹³C-NMR(100 MHz, pyridine-d₅) δ 165.1 (C-2), 107.1 (C-3), 184.1 (C-4), 164.4 (C-5), 101.4 (C-6), 167.4 (C-7), 96.4 (C-8), 160.0 (C-9), 107.1 (C-10), 128.6 (C-1'), 106.1 (C-2'), 155.4 (C-3'), 141.8 (C-4'), 155.4 (C-5'), 106.1 (C-6'), 57.7(OCH₃-3'), 57.7(OCH₃-5'), 135.7(C-1''), 112.9(C-2''), 149.7(C-3''), 148.6(C-4''), 117.3(C-5''), 121.8(C-6''), 75.1(C-7''), 89.5(C-8''), 62.9(C-9''), 57.1(OCH₃-3'').

도면

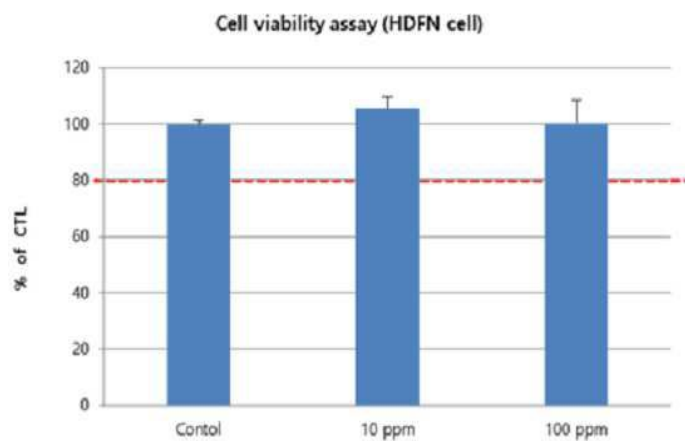
도면1



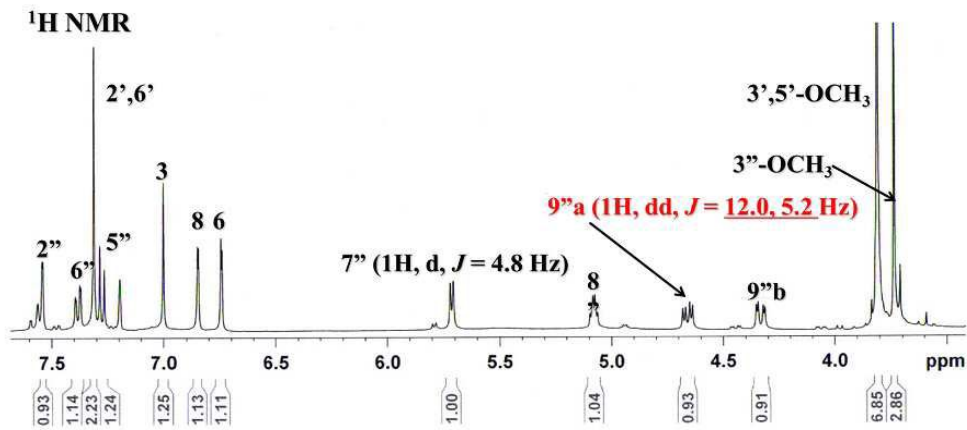
도면2



도면3



도면4



도면5

