



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0001698
(43) 공개일자 2025년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/282 (2006.01) A61K 31/194 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01) A61K 31/37 (2006.01)
A61K 8/37 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)
A61K 8/9789 (2017.01) A61P 17/14 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/282 (2013.01)
A61K 31/194 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0084260

(22) 출원일자 2023년06월29일

심사청구일자 2023년06월29일

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
국립군산대학교산학협력단
전라북도 군산시 대학로 558 (미룡동,
군산대학교)

(72) 발명자

정은주
경남 진주시 진주대로 859
노정래
전북 군산시 미룡로 42
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김종석

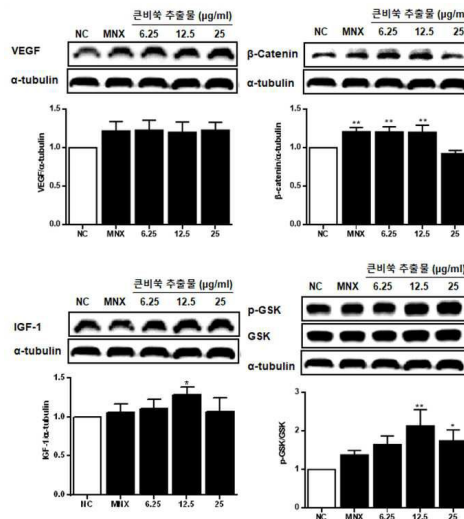
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 큰비썩 추출물을 유효성분으로 포함하는 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 큰비썩 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 탈모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 천연 유래 성분인 큰비썩 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 사용함으로써 부작용이 적지만 종래의 탈모 치료제인 미녹시딜보다 우수한 탈모 치료 효과를 가진다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 31/365 (2013.01)
A61K 31/37 (2013.01)
A61K 8/37 (2013.01)
A61K 8/4973 (2013.01)
A61K 8/498 (2013.01)
A61K 8/9789 (2017.08)
A61P 17/14 (2018.01)
A61Q 5/00 (2013.01)
A61Q 7/00 (2019.01)

(72) 발명자

이재순

경남 진주시 망경남길24번길 6

김윤나

경남 진주시 강남로167번길 22

박민규

경상남도 진주시 향교로12번길 8

김유정

경상남도 진주시 강남로301번길 7

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525013006
과제번호	202205263
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	블루카본 기반 기후변화 적응형 해안 조성 기술개발
연구과제명	블루카본 기반 기후변화 적응형 해안조성 기술개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	군산대학교산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711180039
과제번호	2023R1A2C1007448
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	모유두세포 증식 및 재생 조절을 통한 탈모 치유 활성천연물연구
기 여 율	70/100
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

큰비쭉 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

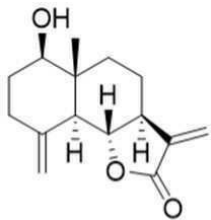
청구항 2

제1항에 있어서,

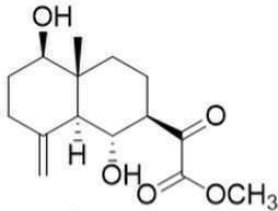
상기 화합물은

하기의 화학식 1 내지 8로 표시되는 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

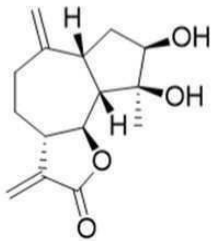
[화학식 1]



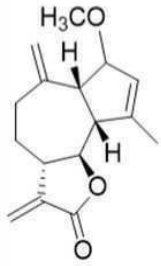
[화학식 2]



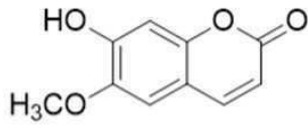
[화학식 3]



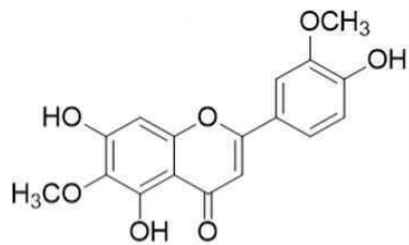
[화학식 4]



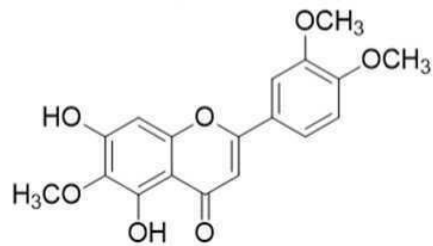
[화학식 5]



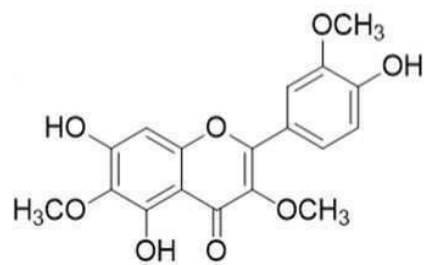
[화학식 6]



[화학식 7]



[화학식 8]



청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 조성물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 따른 조성물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 화장품 조성물은

헤어토닉, 헤어컨디셔너, 헤어에센스, 헤어로션, 헤어영양로션, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어트리트먼트, 헤어크림, 헤어왁스, 헤어에어로졸, 헤어팩, 헤어비누, 헤어클렌징폼, 모발건조제, 모발보존처리제, 모발염색제, 모발용 웨이브제, 모발탈색제, 헤어젤, 헤어글레이즈, 헤어드레싱어, 헤어래커, 헤어모이스처라이저, 헤어무스 및 헤어스프레이로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 따른 조성물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 건강기능식품 조성물.

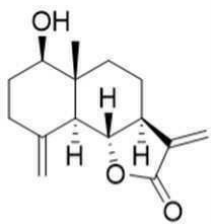
청구항 7

큰비쭉 추출물을 제조하는 단계;

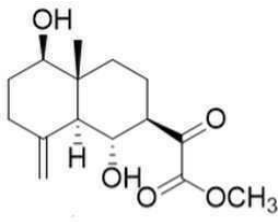
상기 큰비쭉 추출물로부터 큰비쭉 분획물을 제조하는 단계;

상기 큰비쭉 분획물을 크로마토그래피로 분획하여 하기의 화학식 1 내지 8로 표시되는 화합물을 분리 및 정제하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 제조방법.

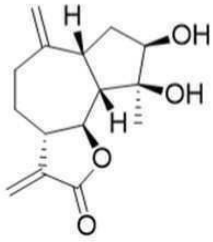
[화학식 1]



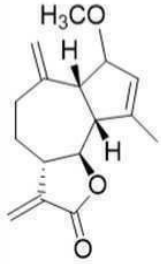
[화학식 2]



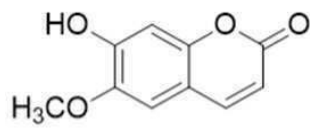
[화학식 3]



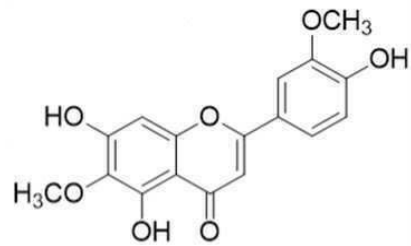
[화학식 4]



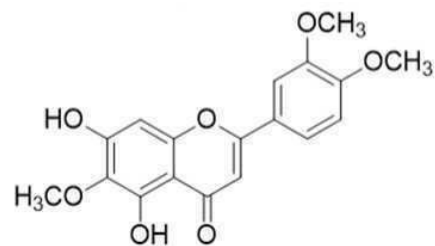
[화학식 5]



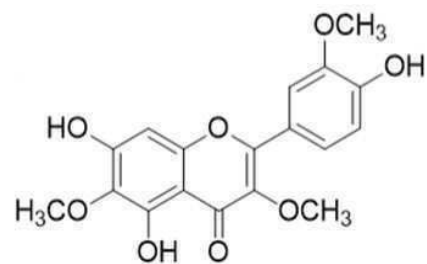
[화학식 6]



[화학식 7]



[화학식 8]



청구항 8

제7항에 있어서,

상기 큰비쭈 추출물을 제조하는 단계는

큰비쭈를 건조하는 단계;

상기 큰비쭈 건조물을 메탄올에 추출하여 조추출물을 얻는 단계; 및

상기 조추출물을 감압 농축하여 큰비쭈 추출물을 얻는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 큰비쭈 분획물을 제조하는 단계는

큰비쭈 추출물을 증류수에 현탁하여 증류수와 디클로메탄(CH_2Cl_2)으로 분배하여 큰비쭈 디클로메탄(CH_2Cl_2) 분획물을 얻는 단계; 및

상기 디클로메탄(CH_2Cl_2) 분획물을 메탄올에 현탁하여 노말헥산과 메탄올로 분배하여 큰비쭈 메탄올 분획물을 얻는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 큰비쭈 추출물을 유효성분으로 포함하는 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 큰비쭈 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 탈모는 두피에서 머리카락이 빠지는 현상을 의미하며, 일반적으로 두피의 성모(굵고 검은 머리털)가 빠지는 것을 의미한다. 성모는 색깔이 없고 굵기가 가는 연모와는 달리, 빠질 경우 미용상 문제를 일으킬 수 있다. 한국 사람의 경우 5-7 만개의 머리카락이 있으며, 하루에 약 50-70 개의 머리카락이 빠지는 것은 정상적인 현상이다. 하지만, 100 개 이상의 머리카락이 빠지면 탈모가 진행 중일 가능성이 있다.

[0004] 종래에는 탈모가 중년 이후의 남성에게만 일어나는 일로, 젊은 남성 및 여성과는 상관없는 문제로 여겨졌지만, 최근에는 연령 또는 성별에 상관 없이 누구에게나 일어나는 경향이 있으며, 탈모가 진행되면 미용 및 외관상의 문제로 큰 스트레스를 유발할 수 있다.

[0005] 이러한 탈모에 대한 종래의 치료방법으로는 대표적으로 미녹시딜 계열의 약물 치료법이 사용되고 있지만, 이는 사람에 따라 효과가 크지 않고 약물을 중단할 경우 다시 탈모가 진행된다고 알려져 있다. 또한, 미녹시딜은 각질, 피부발진, 홍조, 두통, 어지러움 및 안구자극 등의 부작용을 유발하기도 하며, 혈관 확장을 유발하기 때문에 심혈관계 질환자, 18세 이하인 사람 및 임신부는 사용하지 못하는 한계가 있다.

[0006] 따라서 부작용이 적은 새로운 치료 방법에 대한 필요성이 커지고 있으며, 특히 천연 재료로 제조된 약제를 포함하는 대체 의학에 대한 관심이 커지고 있다.

[0007] 한편, 큰비쭈는 바닷가에 자라는 한해살이 또는 두해살이풀로, 한반도, 제주도, 타이완, 일본 등에 분포하며, 주로 해열제, 해독제, 지혈제 등으로 사용된다. 이러한 큰비쭈를 포함하는 향미생물제 조성물과 큰비쭈를 포함하는 구강질환 치료용 조성물에 대해서는 개시된 바 있으나, 큰비쭈를 포함하는 탈모 치료용 조성물에 대해서는

개시된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-1757775호

발명의 내용

해결하려는 과제

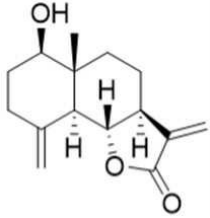
- [0010] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 천연 유래 성분으로 구성되어 부작용이 적은 큰비쭉 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 조성물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 약학적; 화장품; 및 건강기능식품; 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 발명이 이루고자 하는 기술적 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 본 발명의 기재로부터 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명은 큰비쭉 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 화합물은 하기의 화학식 1 내지 8로 표시되는 화합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명은 본 발명에 따른 조성물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 본 발명에 따른 조성물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 화장품 조성물은 헤어토닉, 헤어컨디셔너, 헤어에센스, 헤어로션, 헤어영양로션, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어트리트먼트, 헤어크림, 헤어왁스, 헤어에어로졸, 헤어팩, 헤어비누, 헤어클렌징폼, 모발건조제, 모발보존처리제, 모발염색제, 모발용 웨이브제, 모발탈색제, 헤어젤, 헤어글레이즈, 헤어드레싱어, 헤어래커, 헤어모이스처라이저, 헤어무스 및 헤어스프레이로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명은 본 발명에 따른 조성물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 큰비쭉 추출물을 제조하는 단계; 상기 큰비쭉 추출물로부터 큰비쭉 분획물을 제조하는 단계; 상기 큰비쭉 분획물을 크로마토그래피로 분획하여 하기의 화학식 1 내지 8로 표시되는 화합물을 분리 및 정제하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 큰비쭉 추출물을 제조하는 단계는 큰비쭉을 건조하는 단계; 상기 큰비쭉 건조물을 메탄올에 추출하여 조추출물을 얻는 단계; 및 상기 조추출물을 감압 농축하여 큰비쭉 추출물을 얻는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 큰비쭉 분획물을 제조하는 단계는 큰비쭉 추출물을 증류수에 현탁하여 증류수와 디클로

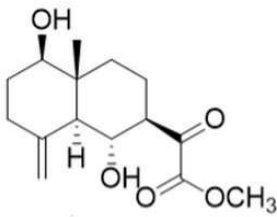
메탄(CH_2Cl_2)으로 분배하여 큰비쭉 디클로메탄(CH_2Cl_2) 분획물을 얻는 단계; 및 상기 디클로메탄(CH_2Cl_2) 분획물을 메탄올에 현탁하여 노말헥산과 메탄올로 분배하여 큰비쭉 메탄올 분획물을 얻는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0024] [화학식 1]



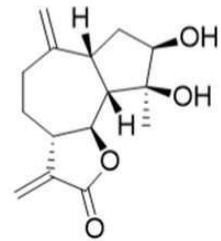
[0025]

[0026] [화학식 2]



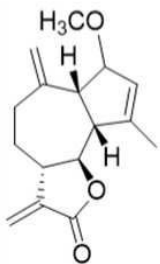
[0027]

[0028] [화학식 3]



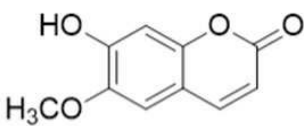
[0029]

[0030] [화학식 4]



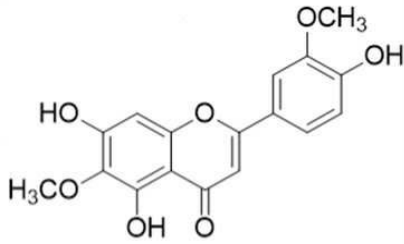
[0031]

[0032] [화학식 5]



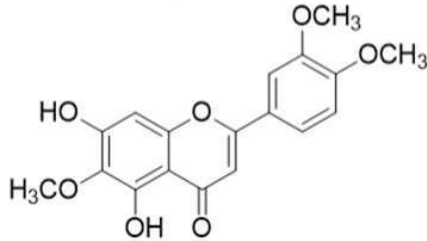
[0033]

[0034] [화학식 6]



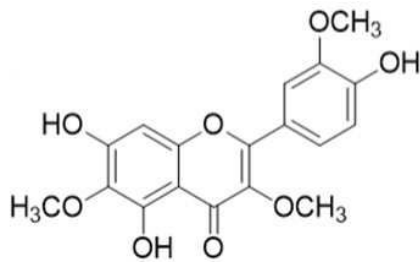
[0035]

[0036] [화학식 7]



[0037]

[0038] [화학식 8]



[0039]

발명의 효과

[0041] 본 발명의 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 천연 유래 성분으로 구성되어 부작용이 적지만, 종래의 탈모 치료제인 미녹시딜보다 우수한 탈모 치료 효과를 가진다.

[0042] 본 발명에 따른 조성물은 천연 유래 성분으로 구성되어 부작용이 적지만, 종래의 탈모 치료제인 미녹시딜보다 우수한 탈모 치료 효과를 가지는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 의약품; 화장품; 및 건강기능식품;으로 활용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 효과들은 이상에서 언급한 효과들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 청구범위의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 큰비썍 추출물 및 이의 분획물을 제조하는 방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명에 따른 큰비썍 추출물의 세포 독성 평가 결과에 대한 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따른 큰비썍 추출물을 농도별로 인간모유두세포(HFDPC)에 처리했을 때 VEGF, β -catenin, IGF-1 및 p-GSK 단백질의 발현을 나타낸 western blot 결과이다.

도 4는 본 발명에 따른 큰비썍 추출물을 농도별로 각질형성세포(HaCaT)에 처리했을 때 β -catenin 및 p-GSK 단백질의 발현을 나타낸 western blot 결과이다.

도 5는 본 발명에 따른 큰비썍 추출물을 농도별로 인간제대정맥세포(HUVEC)에 처리했을 때 VEGF, β -catenin,

IGF-1 및 p-GSK 단백질의 발현을 나타낸 western blot 결과이다.

도 6은 본 발명에 따른 큰비속 분획물로부터 화합물 8종을 분리 및 정제하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 7는 본 발명에 따른 큰비속 분획물로부터 분리한 화합물 8종의 세포 독성 평가 결과에 대한 그래프이다.

도 8은 본 발명에 따른 큰비속 분획물로부터 분리한 화합물 8종을 인간모유두세포(HFDPC)에 처리했을 때, VEGF, β -catenin, IGF-1 및 p-GSK 단백질의 발현을 나타낸 western blot 결과이다.

도 9는 본 발명에 따른 큰비속 분획물로부터 분리한 화합물 8종을 각질형성세포(HaCaT)에 처리했을 때 VEGF, β -catenin, IGF-1 및 p-GSK 단백질의 발현을 나타낸 western blot 결과이다.

도 10는 본 발명에 따른 본 발명에 따른 큰비속 분획물로부터 분리한 화합물 8종을 인간제대정맥세포(HUVEC)에 처리했을 때 VEGF, β -catenin, IGF-1 및 p-GSK 단백질의 발현을 나타낸 western blot 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0047] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0048] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.

[0050] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0052] 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물

[0053] 큰비속 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0054] 상기 약학적 조성물에 사용되는 화합물은 하기의 화학식 1 내지 8로 표시되는 화합물 1 내지 8로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 화합물인 것을 특징으로 하며, 상기 화합물 1 내지 8은 염, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하며, 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰 산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산 등을 포함할 수 있다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산 등을 포함할 수 있다.

[0055] 상기 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] **발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물**

[0058] 큰비쭉 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 화장품 조성물을 제공한다.

[0059] 상기 화장품 조성물은 통상의 방법에 따라 헤어토닉, 헤어컨디셔너, 헤어에센스, 헤어로션, 헤어영양로션, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어트리트먼트, 헤어크림, 헤어왁스, 헤어에어로졸, 헤어팩, 헤어비누, 헤어클렌징폼, 모발건조제, 모발보존처리제, 모발염색제, 모발용 웨이브제, 모발탈색제, 헤어젤, 헤어글레이즈, 헤어드레싱어, 헤어래커, 헤어모이스처라이저, 헤어무스 또는 헤어스프레이의 형태로 제형화하여 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] **발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 건강기능식품 조성물**

[0062] 큰비쭉 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0063] 상기 건강기능식품 조성물은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함할 수 있으며, 상기 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예시로 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 분유, 전식, 생식, 유산균 발효유, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 이하, 상기에서 기술한 큰비쭉 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 제조방법을 상세히 기술한다.

[0067] **발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 제조방법**

[0068] 본 발명은 큰비쭉 추출물을 제조하는 단계; 상기 큰비쭉 추출물로부터 큰비쭉 분획물을 제조하는 단계; 상기 큰비쭉 분획물을 크로마토그래피로 분획하여 하기의 화학식 1 내지 8로 표시되는 화합물을 분리 및 정제하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 발모 촉진, 탈모 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0069] 본 발명에 있어서, 상기 큰비쭉 추출물을 제조하는 단계는 큰비쭉을 건조하는 단계; 상기 큰비쭉 건조물을 메탄올에 추출하여 조추출물을 얻는 단계; 및 상기 조추출물을 감압 농축하여 큰비쭉 추출물을 얻는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0070] 상기 큰비쭉을 건조하는 단계는 큰비쭉 추출물을 제조하기 위한 큰비쭉 건조물 시료를 준비하는 과정으로, 상기 단계에서 사용되는 건조방법으로는 동결건조, 감압건조, 진공건조, 비등건조 또는 분무건조 등이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 동결건조가 이용될 수 있고, 더욱 바람직하게는 3 내지 7일 동안 동결건조하는 방법이 이용될 수 있다.

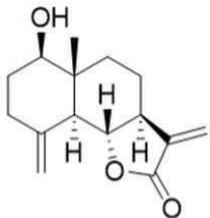
[0071] 상기 큰비쭉 건조물을 메탄올에 추출하여 조추출물을 얻는 단계는 상기 큰비쭉 건조물을 추출용매를 사용하여 조추출물을 얻는 단계를 의미한다. 상기 추출용매로는 에탄올, 메탄올, 물, 클로로포름, 부탄올, 아세톤, 헥산, 이소프로판올, 에틸아세테이트 등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 메탄올이 사용될 수 있고, 더욱 바람직하게는 60 내지 100% 메탄올이 사용될 수 있다. 상기 조추출물을 얻는 단계는 5 내지 35℃의 온도에서 60 내지 100% 메탄올에 1 내지 5시간 동안 침지하여 조추출물을 얻을 수 있으며, 바람직하게는 15 내지 25℃의 온도에서 70 내지 90% 메탄올에 2 내지 4시간 동안 침지하여 조추출물을 얻을 수 있다. 상기 조추출물을 얻는 단계는 필요에 따라 2 내지 4회 반복하여 실시될 수 있다. 상기 조추출물을 얻는 단계를 2회 미만으로 반복하여 추출할 경우, 추출 수율이 좋지 않으며, 4회 초과로 반복하여 추출할 경우, 추출 수율 대비 공정시간이 길어질 수 있다. 상기 조추출물을 얻는 단계에서 사용되는 추출 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 있고, 바람직하게는 초음파 추출법이 사용될 수 있다. 상기 큰비쭉 추출물을 얻는 단계는 상기 큰비쭉 조추출물을 감압농축하여 큰비쭉 추출물을 얻는 단계를 의미한다.

[0072] 본 발명에 있어서, 상기 큰비썬 분획물을 제조하는 단계는 큰비썬 추출물을 증류수에 현탁하여 증류수와 디클로메탄(CH_2Cl_2)으로 분배하여 큰비썬 디클로메탄(CH_2Cl_2) 분획물을 얻는 단계; 및 상기 디클로메탄(CH_2Cl_2) 분획물을 메탄올에 현탁하여 노말헥산과 메탄올로 분배하여 큰비썬 메탄올 분획물을 얻는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0073] 상기 디클로메탄(CH_2Cl_2) 분획물을 얻는 단계는 상기 큰비썬 추출물을 증류수에 현탁하여 증류수와 디클로메탄(CH_2Cl_2)으로 분배하여 큰비썬 디클로메탄(CH_2Cl_2) 분획물을 얻는 단계를 의미하며, 상기 큰비썬 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 물과 디클로메탄(CH_2Cl_2)으로 분배하여 큰비썬 디클로메탄(CH_2Cl_2) 분획물을 얻을 수 있다. 상기 큰비썬 메탄올 분획물을 얻는 단계는 상기 큰비썬 디클로메탄(CH_2Cl_2) 분획물을 메탄올에 현탁하여 노말헥산과 메탄올로 분배하여 큰비썬 메탄올 분획물을 얻는 단계를 의미하며, 상기 큰비썬 디클로메탄(CH_2Cl_2) 분획물을 60 내지 100% 메탄올에 현탁시킨 후 60 내지 100% 메탄올과 노말헥산으로 분배하여 큰비썬 60 내지 100% 메탄올 분획물을 얻을 수 있고, 바람직하게는 상기 큰비썬 디클로메탄(CH_2Cl_2) 분획물을 70 내지 90% 메탄올에 현탁시킨 후 70 내지 90% 메탄올과 노말헥산으로 분배하여 큰비썬 70 내지 90% 메탄올 분획물을 얻을 수 있다.

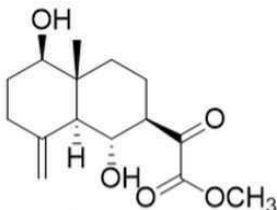
[0074] 본 발명에 있어서, 상기 큰비썬 분획물을 크로마토그래피로 분획하여 하기의 화학식 1 내지 8로 표시되는 화합물을 분리 및 정제하는 단계는 상기 큰비썬 분획물로부터 화학식 1 내지 8로 표시되는 화합물을 분리하는 단계로, 상기 화합물의 분리 및 정제에 사용되는 방법의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 방법을 사용할 수 있다. 상기 화합물 분리 및 정제에 사용되는 방법의 비제한적인 예시로는 실리카겔(silica gel)이나 활성 알루미나(alumina)등의 각종 합성수지를 충전한 컬럼크로마토그래피(column chromatography), 중압액체크로마토그래피 (medium pressure liquid chromatography: MPLC), 박막크로마토그래피(thin layer chromatography: TLC), HPLC 등을 단독으로 혹은 병행하여 사용할 수 있다. 또한, 상기 분리한 화합물을 $1\text{D}({}^1\text{H}, {}^{13}\text{C})$ -, $2\text{D}(\text{HSQC}, \text{COSY}, \text{HMBC}, \text{ROESY}, \text{NOESY})$ -NMR 스펙트럼 등의 방법으로 측정하여 구조를 동정할 수 있다.

[0076] [화학식 1]



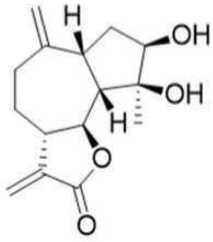
[0077]

[0078] [화학식 2]



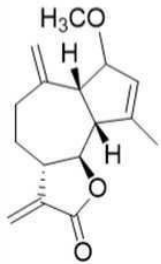
[0079]

[0080] [화학식 3]



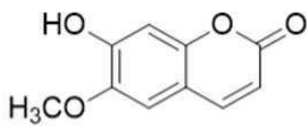
[0081]

[0082] [화학식 4]



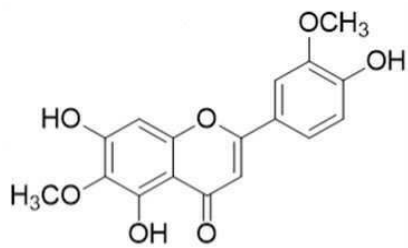
[0083]

[0084] [화학식 5]



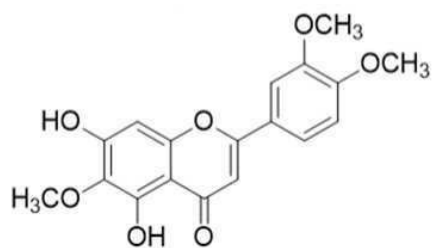
[0085]

[0086] [화학식 6]



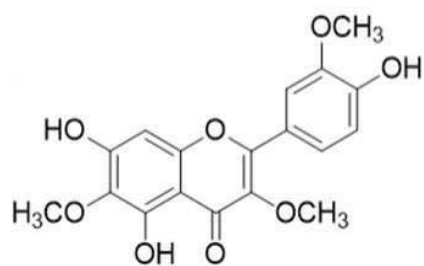
[0087]

[0088] [화학식 7]



[0089]

[0090] [화학식 8]



[0091]

[0093] 이하, 본 발명의 실시예를 상세히 기술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 한정되지 아니함은 자명하다.

[0095] 실시예 1. 큰비쭉 추출물 및 분획물의 제조

[0097] 1-1. 큰비쭉 준비

[0098] 야생의 큰비쭉 전초를 2013년에 대한민국 신안군에서 채취하여, 경상국립대학교 생약학 실험실에 채집표본 (GNTEX-24)으로 기탁하였다. 기탁한 표본과 동일한 큰비쭉의 지상부를 동결건조기로 5일간 건조하여 큰비쭉 건조물 7.39 kg을 얻은 후 파쇄하여 준비하였다.

[0100] 1-2. 큰비쭉 추출물 및 분획물 제조

[0101] 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 준비한 큰비쭉 건조 시료 부피와 동량 이상의 80% MeOH로 상온에서 3시간 동안 3회 초음파 추출하고 감압 농축하여 조추출물 1.35 kg을 얻었다. 상기 조추출물을 증류수에 현탁시킨 후 증류수와 CH_2Cl_2 으로 분해하여 CH_2Cl_2 분획물 312.0 g을 얻었으며 이를 다시 90% MeOH에 현탁하여 각각 *n*-Hexane 분획물 103.9 g과 90% MeOH 분획물 208.1 g을 얻었다. 상기 큰비쭉 추출물 및 분획물을 제조하는 과정을 도 1에 나타내었다.

[0103] 실험예 1. 큰비쭉 추출물의 세포독성 평가

[0104] 인간모유두세포(Human follicle dermal papilla cell; HFDPC)는 Promocell사(Sickingenstr, Heidelberg, Germany)에서 분양받아 사용하였다. 상기 인간모유두세포는 supplementMix(Promocell, Sickingenstr, Heidelberg, Germany)와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 Follicle Dermal Papilla Cell Growth Medium(Promocell, Sickingenstr, Heidelberg, Germany) 배지를 이용하여 37℃ 및 5% CO_2 환경에서 배양하였다.

[0105] 각질형성세포(keratinocyte; HaCaT)는 한국 KB 코스메틱에서 제공받아 사용하였다. 상기 HaCaT 세포는 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 이용하여 37℃ 및 5% CO_2 환경에서 배양하였다.

[0106] 인간제대정맥내피세포(Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVEC)는 Thermo Fisher scientific사(USA)에서 분양받아 사용하였다. 상기 인간제대정맥내피세포는 EGM™-2 SingleQuots® supplement(Lonza, Walkersville, USA)이 함유된 Endothelial Cell Basal Medium-2(EBM-2, Lonza, Walkersville, USA)배지를 사용하여 37℃ 및 5% CO_2 환경에서 배양하였다.

[0107] 상기 인간모유두세포, 각질형성세포 및 인간제대정맥내피세포에서 큰비쭉 추출물에 대한 세포독성은 Cell Counting Kit-8 키트(CCK-8, Dojindo Molecular Biology, Japan)를 통해 측정하였다. 상기 3가지 세포 모두 96-well plate에 1×10^5 cells/ml을 100 μl 씩 분주한 뒤, 안정화를 위해 37℃ 및 5% CO_2 조건 하에서 24시간 동안 배양하였다.

[0108] 상기 배양한 세포에 상기 실시예 1-2에서 얻은 큰비쭉 추출물을 6.25, 12.5 및 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도별로 처리한 다음 37℃ 및 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 배양한 후, 상기 CCK-8 키트 시약을 10 μl 씩 넣고 2시간 동안 반응시킨 후 마이크로플레이트 흡광도 리더 (Infinite M200 PRO, TECAN, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조구의 상기 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

[0109] 본 실험예 1의 결과, 도 2에 기재한 바와 같이 인간모유두세포, 각질형성세포 및 인간제대정맥내피세포에서 상기 큰비쭉 추출물의 농도별 처리군에 대한 세포독성이 관찰되지 않았다.

[0111] 실험예 2. 인간모유두세포(HFDPC)에서 큰비쭉 추출물에 의한 탈모 관련 단백질 발현

[0112] 인간모유두세포를 6-Well Plate에 3×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 안정화를 위해 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 세포에 상기 실시예 1-2와 동일한 방법으로 얻은 큰비쭉 추출물을 6.25, 12.5 및 25 µg/ml 농도별로 처리한 뒤, 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였고, 양성대조군으로 미녹시딜(MNX)을 10 µM을 처리하였다.

[0113] 상기 미녹시딜과 농도별 큰비쭉 추출물을 처리한 각 Well의 세포 배양액을 제거한 다음 PBS로 세척한 후 M-per Buffer를 사용하여 cell lysate를 준비하였고, 4℃의 조건에서 14,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 총 단백질 추출액으로 사용하였다. 상기 단백질의 농도는 Bradford Assay로 정량한 후, 10% Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE)에 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 단백질을 PVDF membrane으로 Transfer 한 후, 5% Non-Fat Dry Milk를 함유한 TBST에 담구어 상온에서 1시간 동안 배양하여 비특이적 단백질에 대한 Blocking을 실시하고 TBST로 세척하였다. 상기 Blocking한 membrane에 1차 항체를 처리하여 4℃에서 15시간 동안 반응시킨 뒤, TBST로 세척하고 처리된 상기 1차 항체에 맞는 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후, 다시 TBST로 세척하고 ECL(enhanced chemiluminescence) kit로 반응시킨 후 Chemidoc image 분석기(Vilber Fusion FX5, Germany)를 이용하여 VEGF, β-catenin, IGF-1 및 p-GSK 단백질의 발현 양을 확인하였다.

[0114] 본 실험예 2의 결과, 도 3 및 표 1에 기재한 바와 같이 VEGF 단백질 발현의 경우 큰비쭉 추출물의 농도별 처리에 의해 미녹시딜 처리군(무처리군 대비 22% 증가)에 준하는 활성을 보였으며 농도별로 큰 차이는 없는 것으로 확인되었다. β-catenin 단백질 발현은 큰비쭉 추출물 6.25 및 12.5 µg/ml 처리에 의해 미녹시딜 처리군(무처리군 대비 21% 증가)에 준하는 증가를 확인하였다. 상기 큰비쭉 추출물 12.5 µg/ml 처리군에서 미녹시딜 처리군 대비 IGF-1 및 p-GSK 단백질의 발현이 각각 23% 및 75% 증가하여, 미녹시딜에 비해 큰비쭉 추출물이 탈모 치료에서 우수함을 나타내었다.

표 1

HFDPC		VEGF	β-catenin	IGF-1	p-GSK
NC		1.00	1.00	1.00	1.00
MNX (10 µM)		1.22	1.21	1.06	1.38
큰비쭉 추출물 (µg/ml)	6.25	1.23	1.21	1.11	1.64
	12.5	1.20	1.20	1.29	2.13
	25	1.23	0.92	1.06	1.74

[0116]

[0118] 실험예 3. 각질형성세포(HaCaT)에서 큰비쭉 추출물에 의한 탈모 관련 단백질 발현

[0119] 각질형성세포를 6-Well Plate에 3×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 안정화를 위해 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 세포에 상기 실시예 1-2와 동일한 방법으로 얻은 큰비쭉 추출물을 6.25, 12.5 및 25 µg/ml 농도별로 처리한 뒤, 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였고, 양성대조군으로 미녹시딜(MNX)을 10 µM을 처리하였다.

[0120] 상기 미녹시딜과 농도별 큰비쭉 추출물을 처리한 세포에서 β-catenin 및 p-GSK 단백질의 발현 양을 확인하였으며, 상기 단백질의 발현 양을 확인하기 위한 western blot 실험방법은 상기 실험예 2와 동일하게 실시하였다.

[0121] 본 실험예 3의 결과, 도 4 및 표 2에 기재한 바와 같이 β-catenin 단백질의 발현에서 무처리군 대비 미녹시딜 처리군은 71% 증가하였으며, 큰비쭉 추출물의 모든 농도별 처리군에서 미녹시딜 처리군 대비 증가하였다. 특히 큰비쭉 추출물을 6.25 µg/ml 농도로 처리한 군에서 미녹시딜 처리군 대비 β-catenin 단백질의 발현량이 76% 증

가한 것으로 확인되었다. 또한, p-GSK 단백질 발현에서 큰비쭉 추출물 처리에 의해 농도의존적으로 증가함을 확인하였으며, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 군에서 미녹시딜 처리군 대비 p-GSK 단백질의 발현량이 29% 증가함을 확인하였고, 미녹시딜에 비해 큰비쭉 추출물이 탈모 치료에서 우수함을 나타내었다.

표 2

HaCat	β -catenin	p-GSK
NC	1.00	1.00
MNX (10 μM)	1.71	1.14
큰비쭉 추출물 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	6.25	1.30
	12.5	1.39
	25	1.43

실험예 4. 인간제대정맥세포(HUVEC)에서 큰비쭉 추출물에 의한 탈모 관련 단백질 발현

인간제대정맥세포를 6-Well Plate에 3×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 안정화를 위해 37℃ 및 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 세포에 상기 실시예 1-2와 동일한 방법으로 얻은 큰비쭉 추출물을 6.25, 12.5 및 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도별로 처리한 뒤, 37℃ 및 5% CO_2 조건에서 24시간 동안 배양하였고, 양성대조군으로 미녹시딜(MNX)을 10 μM 을 처리하였다.

상기 미녹시딜과 큰비쭉 추출물을 처리한 세포에서 VEGF, β -catenin, IGF-1 및 p-GSK 단백질의 발현 양을 확인하였으며, 상기 단백질의 발현 양을 확인하기 위한 western blot 실험방법은 상기 실험예 2와 동일하게 실시하였다.

본 실험예 4의 결과, 도 5 및 표 3에 기재한 바와 같이 VEGF 단백질 발현의 경우 상기 큰비쭉 추출물을 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 군에서 미녹시딜 처리군 대비 20% 증가한 것으로 확인되었다. 상기 큰비쭉 추출물을 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 군에서 β -catenin 단백질의 발현이 미녹시딜 처리군 대비 3% 증가한 것으로 확인되었으며, 무처리군 대비 51% 증가한 것으로 확인되었다. IGF-1 단백질의 발현의 경우 큰비쭉 추출물을 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 군에서 가장 높은 발현을 보였으며 이는 미녹시딜 처리군과 비교하여 11% 증가한 것으로 확인되었다. 큰비쭉 추출물 처리군 모든 농도에서 p-GSK 단백질 발현이 미녹시딜 처리군 대비 증가하였으며, 농도의존적으로 증가하여 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리에서 57% 증가한 것으로 확인되었다. 이는 미녹시딜에 비해 큰비쭉 추출물이 탈모 치료에서 우수함을 나타내었다.

표 3

HUVEC	VEGF	β -catenin	IGF-1	p-GSK
NC	1.00	1.00	1.00	1.00
MNX (10 μM)	1.24	1.48	1.15	1.40
큰비쭉 추출물 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	6.25	1.44	1.13	1.65
	12.5	1.24	1.26	1.83
	25	0.88	1.21	1.97

[0132] 실시예 2. 큰비쭉 분획물로부터 화합물의 분리 및 구조 동정

[0134] 2-1. 큰비쭉 분획물로부터 화합물의 분리

[0135] 상기 실시예 1-2과 동일한 방법으로 준비한 90% MeOH 분획물 100 g을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(*n*-Hexane : EtOAc → EtOAc : MeOH → MeOH)를 수행하여 64개의 소분획(M1-M64)으로 나누었다. 상기 소분획 M35와 M37에 대하여 각각 다시 ODS gel chromatography(20% MeOH → 100% MeOH)를 실시하여 6개의 소분획(M35-1 ~ M35-6, M37-1 ~ M37-6)으로 나누었다. 상기 소분획 M35-4에 대하여 H₂O와 MeOH의 혼합용매(H₂O:MeOH=40:60)로 HPLC를 실시하여 11개의 소분획(M35-4-1 ~ M35-4-11)으로 나누었고 화합물 1과 8을 분리하였다.

[0136] 마찬가지로, 상기 소분획 M35-4-8에 대하여 H₂O와 MeOH의 혼합용매(H₂O:MeOH=40:60)로 HPLC를 실시하여 화합물 4와 7을 분리하였다. 상기 소분획 M37-2에 대하여 H₂O와 MeOH의 혼합용매(H₂O:MeOH=63:37)로 HPLC를 실시하여 16개의 소분획(M37-2-1 ~ M37-2-16)으로 나누었고 화합물 3과 5를 분리하였다. 상기 소분획 M37-2-15에 대하여 H₂O와 MeOH의 혼합용매(H₂O:MeOH=40:60)로 HPLC를 실시하여 화합물 2를 분리하였다. 상기 소분획 M37-4에 대하여 H₂O와 MeOH의 혼합용매(H₂O:MeOH=40:60)로 HPLC를 실시하여 화합물 6을 분리하였다.

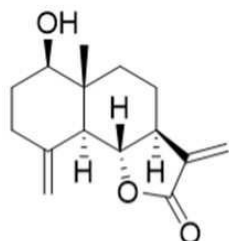
[0137] 상기 큰비쭉 90% MeOH 분획물로부터 화합물 1 내지 8을 분리한 과정을 도 6에 모식도로 나타내었다.

[0139] 2-2. 큰비쭉 분획물로부터 분리한 화합물의 구조 동정

[0140] 상기 실시예 2-1에서 큰비쭉 분획물로부터 분리한 총 8개의 화합물을 1D(¹H, ¹³C)-, 2D(HMBC, HSQC, COSY, NOSEY, ROSEY)-핵자기공명 스펙트럼(NMR spectrum)을 측정하여 구조를 동정한 결과는 하기와 같다.

[0142] 화합물 1 {Reynosin}

[0143] [화학적식 1]

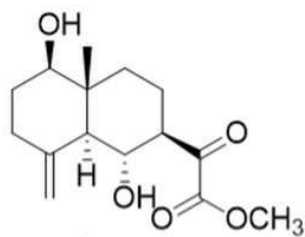


[0144]

[0145] ¹H NMR(CD₃OD): δ 0.79 (3H, brs, H-14), 1.37 (1H, m, H-3a), 1.55 (1H, m, H-2a), 1.58 (1H, m, H-8a), 1.77 (1H, m, H-2b), 2.05 (1H, m, H-3b), 2.06 (1H, m, H-8b), 2.14 (1H, m, H-9a), 2.24 (1H, d, J=10.76 Hz, H-5), 2.30 (1H, m, H-9b), 2.60 (1H, m, H-7), 3.47 (1H, dd, J=4.65, 16.14 Hz, H-1), 4.10 (1H, t, J=10.76 Hz, H-6), 4.78 (1H, d, J=1.47 Hz, H-15a), 4.94 (1H, d, J=1.47 Hz, H-15b), 5.48 (1H, d, J=3.17 Hz, H-13a), 5.99 (1H, d, J=3.18 Hz, H-13b); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 12.02 (C-14), 22.37 (C-8), 32.11 (C-2), 34.75 (C-9), 36.93 (C-3), 44.23 (C-10), 50.72 (C-7), 54.07 (C-5), 78.75 (C-1), 81.48 (C-6), 110.17 (C-15), 117.24 (C-13), 141.26 (C-11), 145.05 (C-4), 172.86 (C-12); ESIMS[M+H]⁺=248

[0147] 화합물 2 {Bayno1 C}

[0148] [화합식 2]



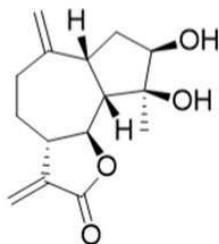
[0149]

[0150] ^1H NMR(CD_3OD): δ 0.77 (3H, s, H-14), 1.22 (1H, d, $J=3.91$ Hz,

[0151] H-3a), 1.55 (1H, m, H-2a), 1.59 (1H, m, H-8a), 1.69 (1H, m, H-8b), 1.77 (1H, m, H-5), 1.78 (1H, m, H-2b), 1.92 (1H, m, H-3b), 2.06 (1H, m, H-9a), 2.28 (1H, m, H-9b), 2.49 (1H, m, H-7), 3.36 (1H, m, H-1), 3.73 (3H, s, 12-OMe), 3.99 (1H, t, $J=10.27$ Hz, H-6), 4.72 (1H, brs, H-15a), 4.93 (1H, brs, H-15b), 5.71 (1H, s, H-13a), 6.23 (1H, d, $J=1.22$ Hz, H-13b); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 12.10 (C-14), 27.97 (C-8), 32.80 (C-2), 36.27 (C-9), 37.62 (C-3), 43.24 (C-7), 50.59 (C-10), 52.20 (12-OMe), 56.19 (C-5), 69.48 (C-6), 79.63 (C-1), 109.25 (C-15), 125.95 (C-13), 144.47 (C-4), 146.11 (C-11), 169.22 (C-12); ESIMS $[\text{M}+\text{H}]^+=280$

[0153] 화합물 3

[0154] [화합식 3]

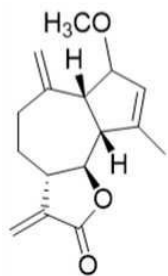


[0155]

[0156] ^1H NMR (CD_3OD): δ 1.32 (1H, m, H-8a), 1.45 (3H, s, H-15), 1.69 (1H, dd, $J=7.83, 13.45$ Hz, H-2a), 2.00 (1H, m, H-9a), 2.31 (1H, m, H-8b), 2.37 (1H, s, H-5), 2.39 (1H, m, H-2b), 2.64 (1H, m, H-9b), 2.88 (1H, m, H-7), 3.12 (1H, m, H-1), 3.78 (1H, d, $J=4.16$ Hz, H-3), 4.28 (1H, m, H-6), 4.96 (1H, s, H-14a), 4.98 (1H, s, H-14b), 5.58 (1H, d, $J=3.18$ Hz, H-13a), 6.11 (1H, d, $J=3.42$ Hz, H-13b); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 23.65 (C-15), 33.03 (C-8), 36.97 (C-2), 39.81 (C-9), 45.40 (C-1), 49.00 (C-7), 53.31 (C-5), 82.19 (C-3), 83.49 (C-4), 84.47 (C-6), 112.90 (C-14), 120.42 (C-13), 141.42 (C-11), 150.10 (C-10), 172.52 (C-12); ESIMS $[\text{M}+\text{H}]^+=264$

[0158] 화합물 4

[0159] [화학식 4]

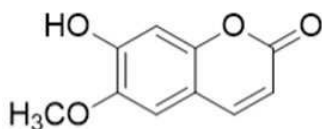


[0160]

[0161] ^1H NMR (CD_3OD): δ 1.89 (3H, brs, H-15), 1.42 (1H, m, H-8a), 2.32 (1H, m, H-8b), 2.25 (1H, m, H-9a), 2.54 (1H, m, H-9b), 2.96 (1H, m, H-1), 2.99 (H, dd, $J=3.18, 10.76$ Hz, H-7), 3.06 (1H, t, $J=9.29$ Hz, H-5), 3.30 (3H, s, 2-OMe), 4.03 (1H, m, H-6), 4.37 (1H, m, H-2), 4.76 (1H, s, H-14a), 4.91 (1H, s, H-14b), 5.60 (1H, d, $J=3.18$ Hz, H-13a), 6.13 (1H, d, $J=3.42$ Hz, H-13b), 5.78 (1H, m, H-3); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 17.14 (C-15), 32.49 (C-8), 37.35 (C-9), 46.44 (C-1), 54.26 (C-7), 56.03 (C-5), 56.64 (2-OMe), 86.98 (C-6), 90.22 (C-2), 114.13 (C-14), 120.91 (C-13), 128.29 (C-3), 141.19 (C-11), 148.35 (C-4), 149.29 (C-10), 172.08 (C-12); ESIMS $[\text{M}+\text{H}]^+=260$

[0163] 화합물 5 {Scopoletin}

[0164] [화학식 5]

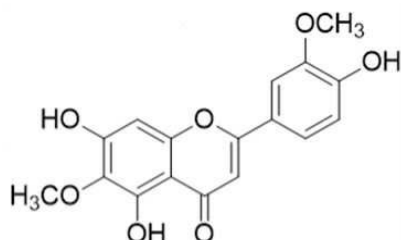


[0165]

[0166] ^1H NMR (CD_3OD): δ 3.90 (3H, s, 6-OMe), 6.75 (1H, s, H-8), 7.09 (1H, s, H-5), 6.19 (H, d, $J=9.54$ Hz, H-3), 7.84 (1H, d, $J=9.29$ Hz, H-4); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 56.79 (6-OMe), 103.94 (C-8), 109.86 (C-5), 112.52 (C-10), 112.54 (C-3), 146.16 (C-4), 147.08 (C-6), 151.39 (C-7), 152.93 (C-9), 164.10 (C-2); ESIMS $[\text{M}+\text{H}]^+=193$

[0168] 화합물 6 {Jaceosidin}

[0169] [화학식 6]



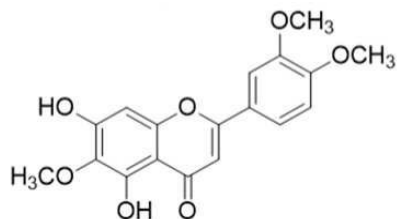
[0170]

[0171] ^1H NMR (CD_3OD): δ 3.74 (3H, s, 6-OMe), 3.90 (3H, s, 3'-OMe), 6.62 (1H, d, $J=2.20$ Hz, H-8), 6.90 (1H, s, H-3), 6.93 (1H, d, $J=8.56$ Hz, H-5'), 7.55 (1H, s, H-2'), 7.56 (1H, brs, H-6'); ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 55.99 (3'-OMe), 60.01 (6-OMe), 94.40 (C-8), 102.78 (C-3), 104.06 (C-10), 110.16 (C-2'), 115.80 (C-5'), 120.39 (C-6'), 121.58 (C-1'), 131.40 (C-6), 148.04 (C-4'), 150.76 (C-3'), 152.48 (C-9),

152.78 (C-5), 157.45 (C-7), 163.76 (C-2), 182.21 (C-4) ; ESIMS[M]⁺=330

[0173] **화합물 7 {Eupatilin}**

[0174] [화학식 7]

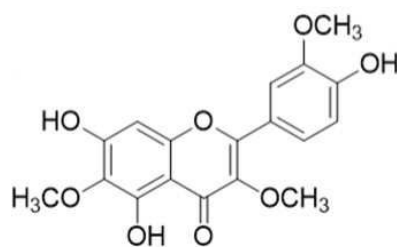


[0175]

[0176] ¹H NMR (CD₃OD): δ 3.74 (3H, s, 6-OMe), 3.85 (3H, s, 4'-OMe), 3.90 (3H, s, 3'-OMe), 6.68 (1H, s, H-8), 6.98 (1H, s, H-3), 7.14 (1H, d, J=8.56 Hz, H-5'), 7.56 (1H, d, J=1.96 Hz, H-2'), 7.68 (1H, dd, J=1.96, 8.31 Hz, H-6') ; ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d) δ 55.74 (4'-OMe), 56.30 (3'-OMe), 60.00 (6-OMe), 94.46 (C-8), 103.37 (C-3), 104.08 (C-10), 109.38 (C-5'), 111.66 (C-2'), 120.01 (C-6'), 122.94 (C-1'), 131.40 (C-6), 140.68 (C-5), 148.99 (C-7), 152.50 (C-9), 153.23 (C-4'), 153.23 (C-3'), 162.98 (C-2), 182.16 (C-4) ; ESIMS[M]⁺=344

[0178] **화합물 8 {Jaceidin}**

[0179] [화학식 8]



[0180]

[0181] ¹H NMR (CD₃OD): δ 3.73 (3H, s, 6-OMe), 3.78 (3H, brs, 3-OMe), 3.84 (3H, brs, 3'-OMe), 6.55 (1H, brs, H-8), 6.95 (1H, dd, J=1.96, 10.27 Hz, H-5'), 7.55 (1H, d, J=8.56 Hz, H-6') 7.62 (1H, s, H-2') ; ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d) δ 55.79 (3'-OMe), 59.81 (3-OMe), 60.02 (6-OMe), 94.29 (C-8), 104.36 (C-10), 112.02 (C-2'), 115.72 (C-5'), 120.92 (C-6'), 122.23 (C-1'), 131.38 (C-6), 137.44 (C-3), 147.53 (C-3'), 149.80 (C-4'), 151.73 (C-5), 152.34 (C-2), 155.45 (C-9), 158.15 (C-7), 178.10 (C-4) ; ESIMS[M-H]⁺=359

[0183] **실험예 5. 큰비쑥 분획물로부터 분리한 화합물의 세포독성평가**

[0184] 상기 실시예 2에서 분리한 화합물 8종에 대한 세포독성 평가를 인간모유두세포, 각질형성세포 및 인간제대정맥 내피세포에서 CCK-8 키트를 통해 측정하였다. 상기 3가지 세포를 각각 96-well plate에 1×10⁵ cells/ml을 100 μl씩 분주한 뒤, 안정화를 위해 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 24시간 동안 배양하였다.

[0185] 상기 배양한 세포에 상기 실시예 2에서 얻은 8종의 화합물을 10 μM로 처리한 다음 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 24시간 동안 배양한 후, 상기 CCK-8 시약을 10 μl씩 넣고 2시간 동안 반응시킨 후 마이크로플레이트 흡광도 리더(Infinite M200 PRO, TECAN, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0186] 본 실험예 5의 결과, 상기 큰비쑥 분획물로부터 분리한 화합물 8종은 상기 인간모유두세포, 각질형성세포 및 인

간세포대정맥내피세포에 대한 유의한 세포독성이 관찰되지 않았다(도 7).

실험예 6. 인간모유두세포(HFDPC)에서 큰비속 분획물로부터 분리한 화합물에 의한 탈모 관련 단백질 발현

인간모유두세포를 6-Well Plate에 3×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 안정화를 위해 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 세포에 상기 실시예 2과 동일한 방법으로 얻은 큰비속 분획물로부터 분리한 화합물 1 내지 8을 각각 10 μM 농도로 처리한 뒤, 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였고, 양성 대조군으로 미녹시딜(MNX) 10 μM을 처리하였다.

상기 미녹시딜과 큰비속 화합물 1 내지 8을 처리한 인간모유두세포에서 단백질을 추출하여 western blot 실험을 통해 β-catenin, p-GSK, IGF-1 및 VEGF 단백질의 발현을 확인하는 과정은 상기 실험예 2와 동일하게 진행하였다.

본 실험예 6의 결과, 도 8 및 표 4에 기재한 바와 같이 상기 화합물 1, 4, 5, 7 및 8 처리군에서 VEGF 단백질의 발현이 미녹시딜 처리군 대비 모두 증가하였으며, 각각 32%, 21%, 36%, 39% 및 114% 증가한 것으로 확인되었다. β-catenin 단백질 발현의 경우, 화합물 1, 4, 5 및 8 처리에 의해 미녹시딜 대비 각각 2%, 18%, 24% 및 12% 증가한 것으로 확인되었다. IGF-1 단백질 발현의 경우 무처리군과 비교하여 미녹시딜 처리군에서 오히려 19% 감소하는 경향을 나타내었으며, 화합물 1 및 2 처리군에서는 무처리군 대비 각각 5% 및 4% 증가한 것으로 확인되었다. 화합물 4, 5, 6, 7, 및 8 처리에 의한 p-GSK 단백질의 발현에서는 미녹시딜 대비 각각 24%, 18%, 98%, 22% 및 53% 증가한 것으로 확인되었다. 또한 화합물 2 및 3의 경우 미녹시딜에 준하는 활성을 나타내진 않았지만 무처리군 대비 각각 32% 및 27% 증가로 큰비속 화합물이 탈모 치료에서 우수함을 나타내었다.

표 4

HFDPC		VEGF	β-catenin	IGF-1	p-GSK
NC		1.00	1.00	1.00	1.00
MNX (10 μM)		1.17	1.14	0.81	1.42
Compounds (10 μM)	1	1.49	1.16	1.05	0.88
	2	1.05	1.09	1.04	1.32
	3	0.90	1.11	0.76	1.27
	4	1.38	1.32	0.53	1.66
	5	1.53	1.38	0.49	1.60
	6	0.95	1.03	0.28	2.40
	7	1.56	0.87	0.39	1.64
	8	2.31	1.26	0.81	1.95

실험예 7. 각질형성세포(HaCaT)에서 큰비속 분획물로부터 분리한 화합물에 의한 탈모 관련 단백질 발현

각질형성세포를 6-Well Plate에 3×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 안정화를 위해 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 세포에 상기 실시예 2과 동일한 방법으로 얻은 큰비속 분획물로부터 분리한 화합물 1 내지 8을 각각 10 μM 농도로 처리한 뒤, 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였고, 양성 대조군으로 미녹시딜(MNX) 10 μM을 처리하였다.

상기 미녹시딜과 큰비속 화합물 1 내지 8을 처리한 각질형성세포에서 단백질을 추출하여 western blot 실험을 통해 β-catenin, p-GSK, IGF-1 및 VEGF 단백질의 발현을 확인하는 과정은 상기 실험예 2와 동일하게 진행하였다.

본 실험예 7의 결과, 도 9 및 표 5에 기재한 바와 같이 상기 화합물 3, 4, 5, 6 및 7 처리에 의해 VEGF 단백질

의 발현이 미녹시딜 처리군 대비 증가하였으며, 각각 8%, 33%, 28%, 15% 및 16% 증가한 것으로 확인되었다. β -catenin 단백질 발현의 경우, 8 처리군을 제외한 나머지 화합물 처리군에서 발현이 증가하였으며 미녹시딜 대비 각각 15%, 10%, 17%, 23%, 46%, 37% 및 71% 증가한 것으로 확인되었다. 모든 화합물 처리군에 의해 IGF-1 및 p-GSK 단백질의 발현이 무처리군 및 미녹시딜 처리군 대비 모두 증가하였으며, 무처리군과 비교하여 미녹시딜 처리군에서 오히려 각각 10% 및 20% 감소한 것으로 확인되었다. 특히 상기 화합물 3 처리군에서 P-GSK 단백질의 발현량이 무처리군 대비 55% 증가하였다. 또한, 상기 화합물 1 처리군에서 IGF-1 단백질의 발현이 무처리군 대비 73% 증가로 큰비썩 화합물이 탈모 치료에서 우수함을 나타내었다.

표 5

HaCaT		VEGF	β -catenin	IGF-1	p-GSK
NC		1.00	1.00	1.00	1.00
MNX (10 μ M)		1.08	1.05	0.90	0.80
Compounds (10 μ M)	1	1.02	1.20	1.73	1.13
	2	0.96	1.15	1.18	1.29
	3	1.16	1.22	1.23	1.55
	4	1.41	1.28	1.10	1.30
	5	1.36	1.51	1.52	1.37
	6	1.23	1.42	1.26	1.30
	7	1.24	1.76	1.17	1.52
	8	0.57	0.95	1.05	1.19

실험예 8. 인간제대정맥세포(HUVEC)에서 큰비썩 분획물로부터 분리한 화합물에 의한 탈모 관련 단백질 발현

인간제대정맥세포를 6-Well Plate에 3×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 안정화를 위해 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 인간제대정맥세포에 상기 실시예 2과 동일한 방법으로 얻은 큰비썩 분획물로부터 분리한 화합물 1 내지 8을 각각 10 μ M 농도로 처리한 뒤, 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였고, 양성대조군으로 미녹시딜(MNX) 10 μ M을 처리하였다.

상기 미녹시딜과 큰비썩 화합물 1 내지 8을 처리한 인간제대정맥세포에서 단백질을 추출하여 western blot 실험을 통해 β -catenin, IGF-1 및 p-GSK 단백질의 발현을 확인하는 과정은 상기 실험예 2와 동일하게 진행하였다.

본 실험 결과, 도 10 및 표 6에 기재한 바와 같이 상기 화합물 1 및 3을 제외한 나머지 화합물 처리에 의해 VEGF 단백질의 발현이 미녹시딜 처리군 대비 증가하였으며, 각각 16%, 36%, 22%, 56%, 69% 및 6% 증가한 것으로 확인되었다. β -catenin 단백질 발현의 경우, 화합물 2, 3 및 5 처리군에서 발현이 증가하였으며 미녹시딜(무처리군 대비 122% 증가) 대비 각각 14%, 13% 및 12% 증가한 것으로 확인되었다. 모든 화합물 처리군에서 무처리군 대비 IGF-1 발현이 증가한 것으로 확인되었으며, 화합물 3(무처리군 대비 171% 증가)을 제외한 나머지 화합물 처리군에서 미녹시딜 처리군(무처리군 대비 239% 증가)과 비교하여 단백질 발현량이 증가한 것으로 확인되었다. 미녹시딜 처리군 대비 각각 35%, 29%, 14%, 51%, 58%, 137% 및 77% 증가한 것으로 확인되었다. p-GSK 단백질 발현의 경우 무처리군 대비 미녹시딜 처리군에서 오히려 발현이 10% 감소한 것으로 확인되었다. 화합물 2, 3, 5 및 6 처리에 의해 p-GSK 단백질 발현이 각각 무처리군 대비 13%, 49%, 15% 및 41% 증가한 것으로 확인되었으며, 큰비썩 화합물이 탈모 치료에서 우수함을 나타내었다.

표 6

HUVEC		VEGF	β -catenin	IGF-1	p-GSK
NC		1.00	1.00	1.00	1.00
MNX (10 μ M)		1.38	2.22	3.39	0.90
Compounds (10 μ M)	1	1.27	2.07	3.74	0.64
	2	1.54	2.36	3.68	1.13
	3	1.23	2.35	2.71	1.49
	4	1.74	2.20	3.53	0.73
	5	1.60	2.34	3.90	1.15
	6	1.94	1.76	3.97	1.41
	7	2.07	1.64	4.76	0.91
	8	1.44	1.26	4.16	0.84

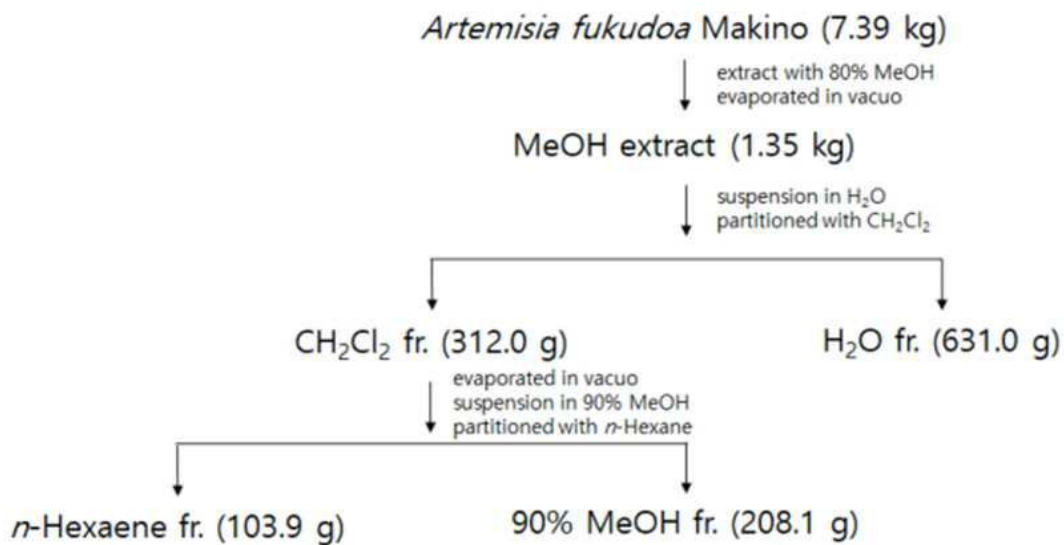
[0207]

[0209]

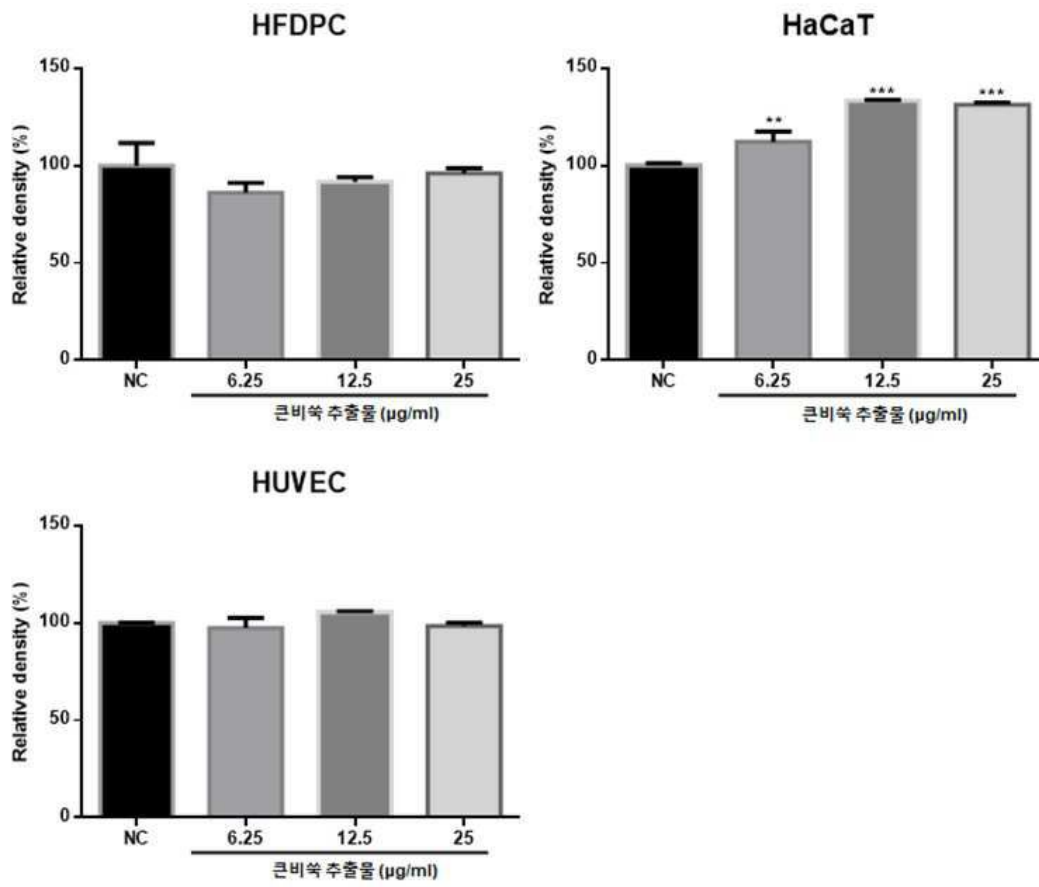
이상 설명으로부터, 본 발명에 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다.

도면

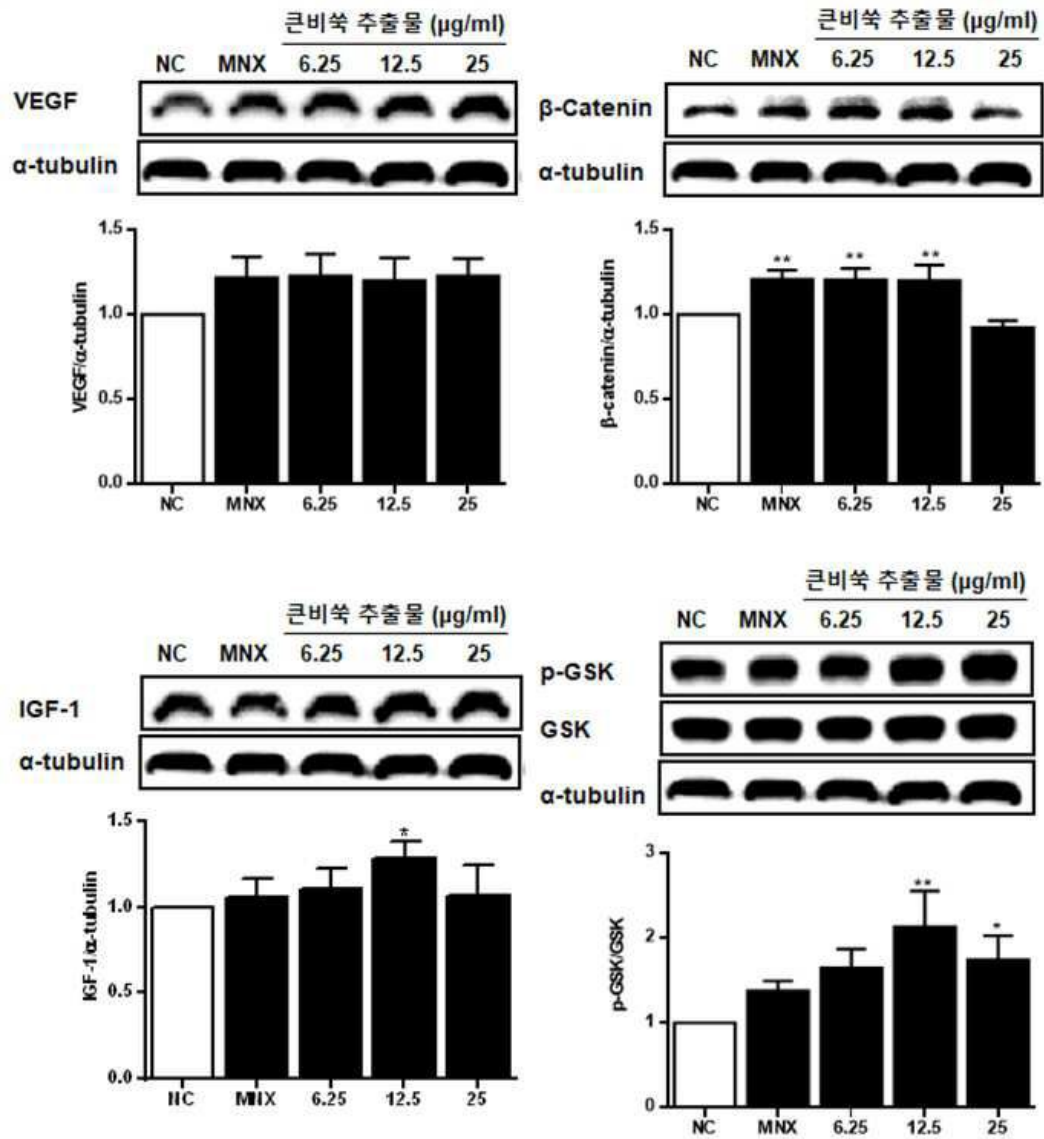
도면1



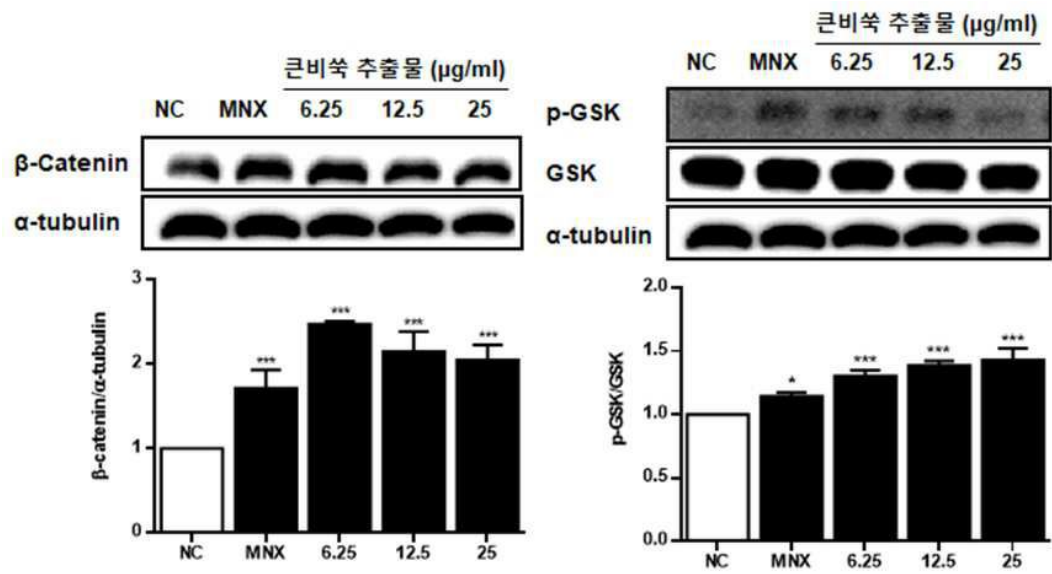
도면2



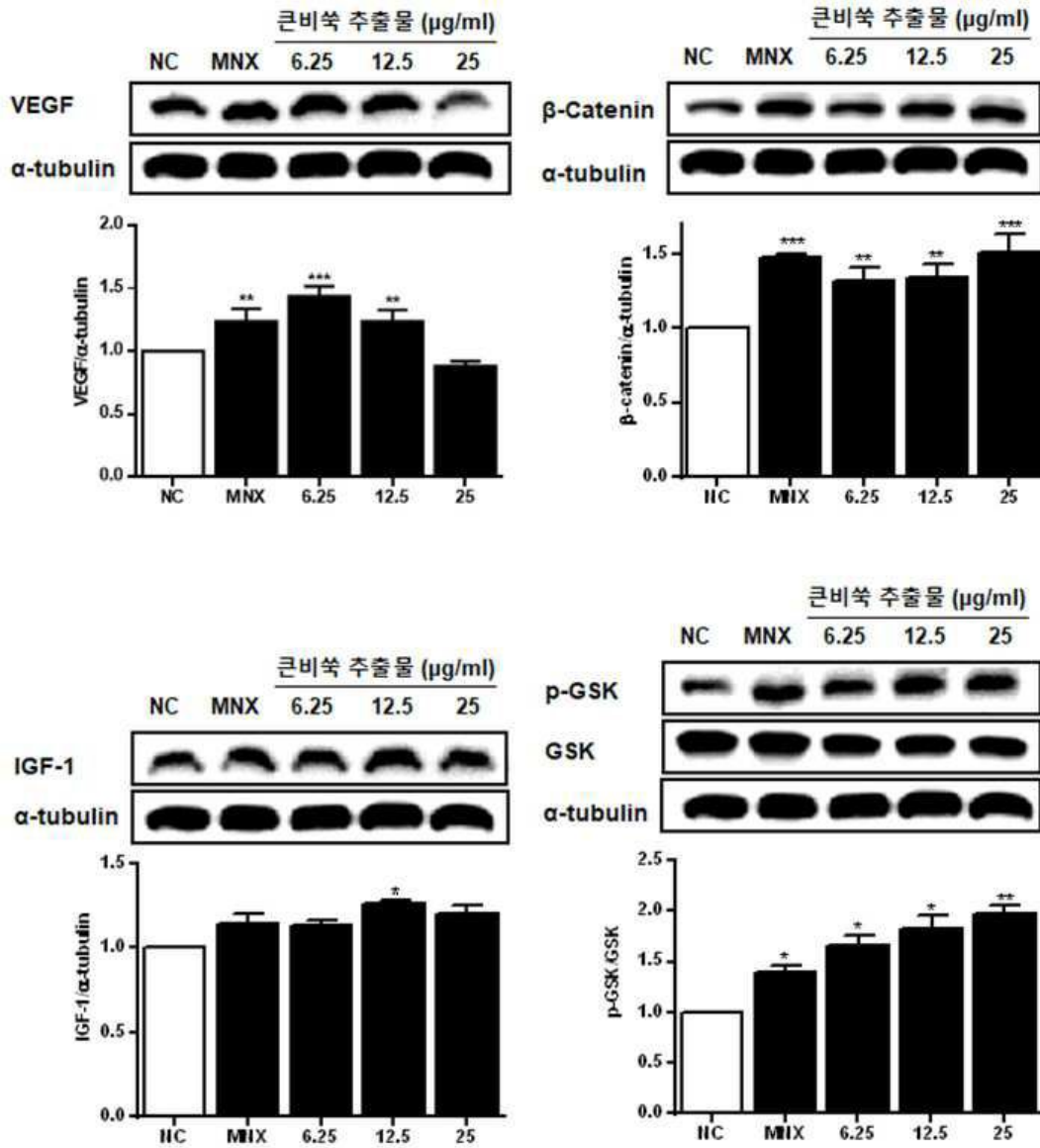
도면3



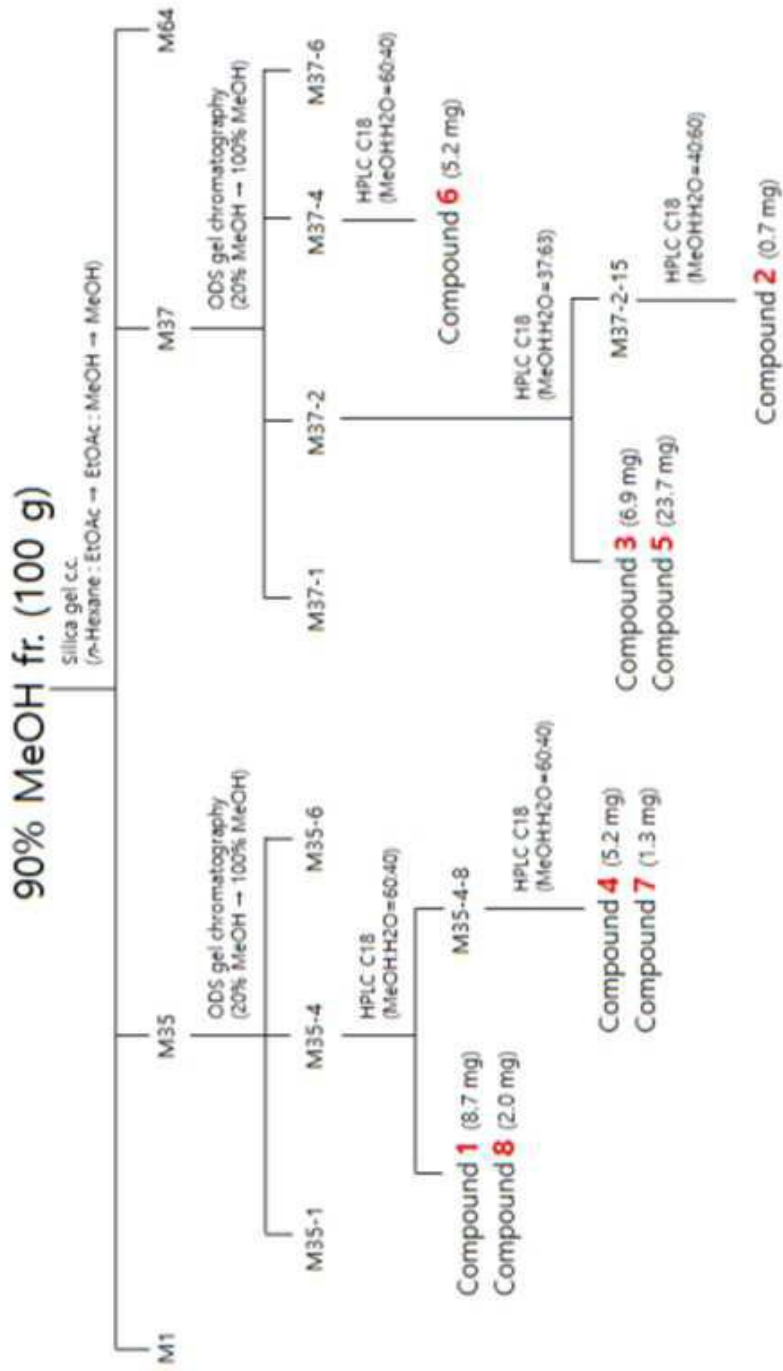
도면4



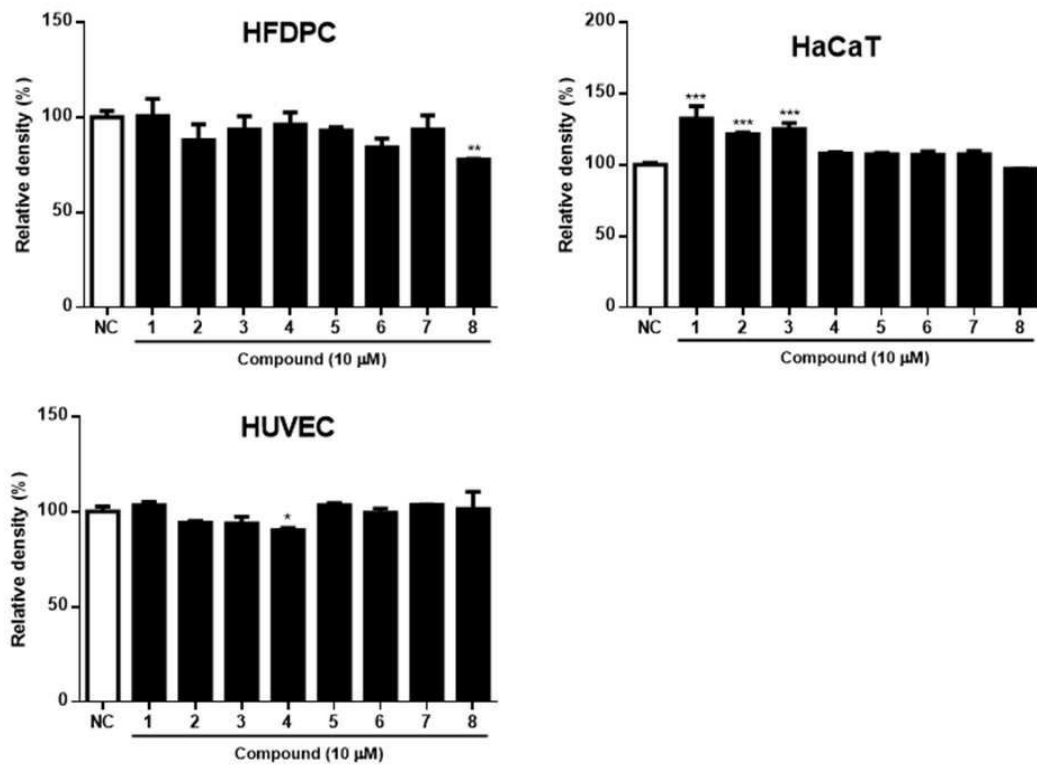
도면5



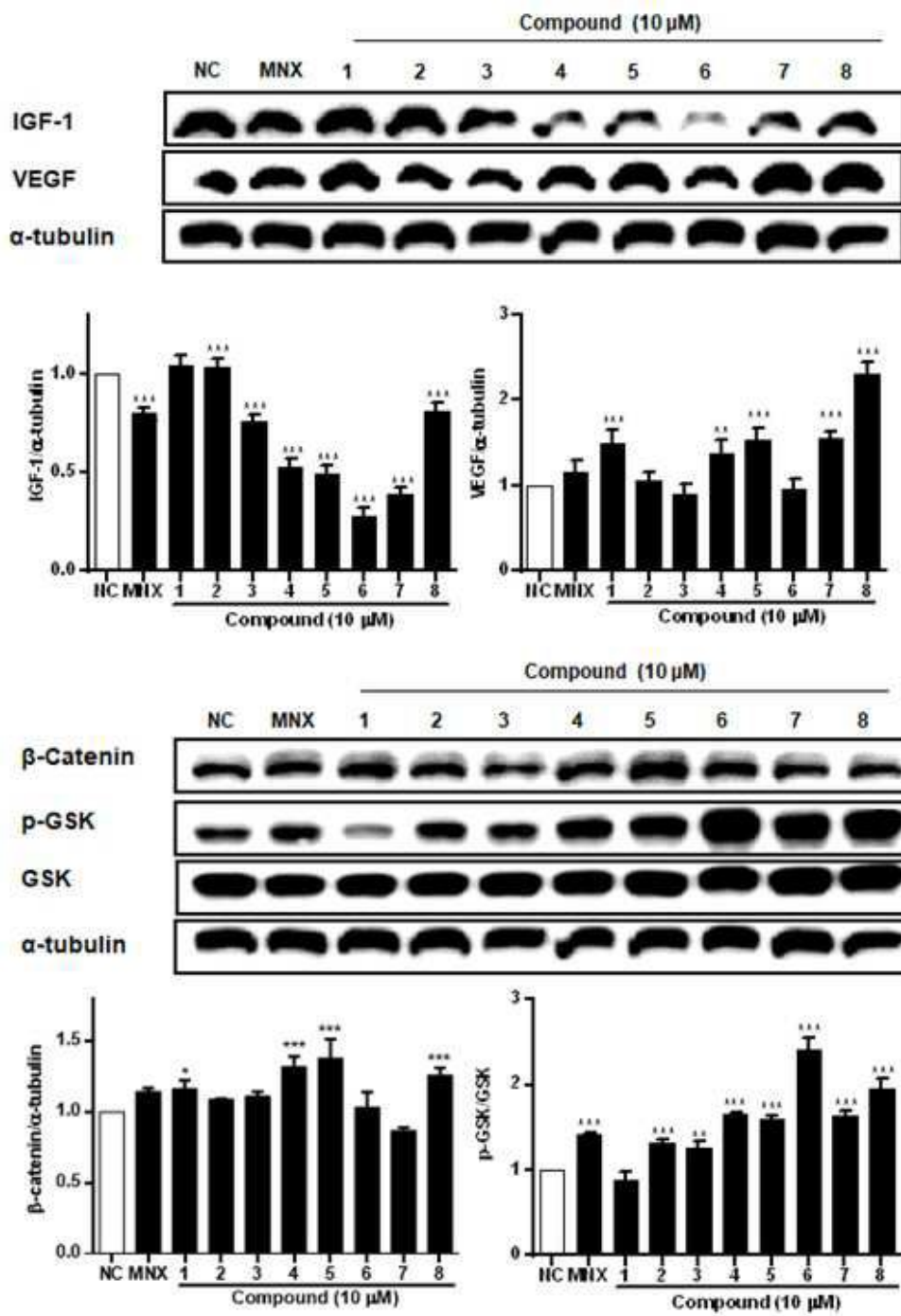
도면6



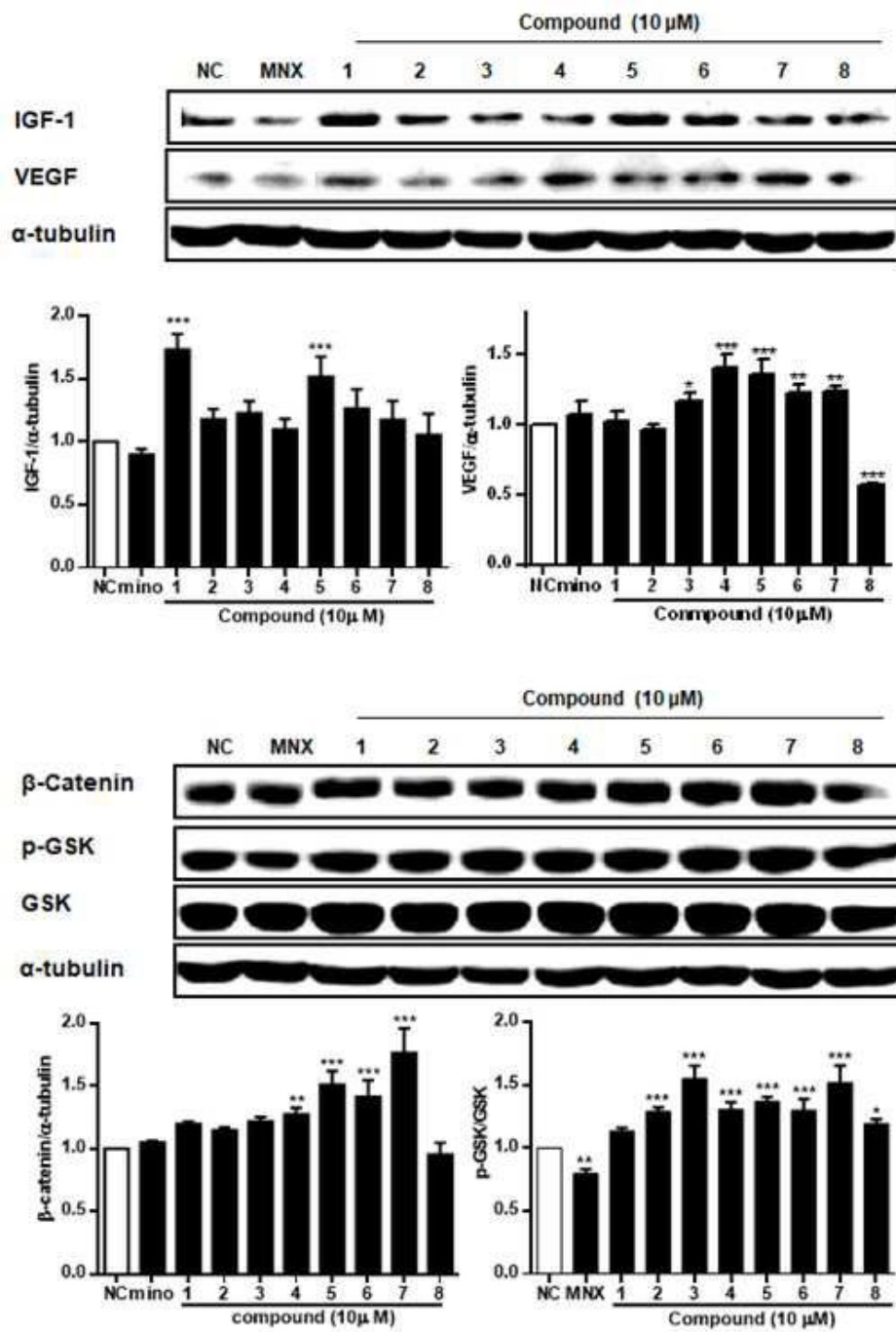
도면7



도면8



도면9



도면10

