

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0000813 (43) 공개일자 2014년01월06일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 8/97 (2006.01) A61Q 7/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)		(71) 출원인 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 필문대로 309, 조선대학교 (서석동)
(21) 출원번호	10-2012-0068155	(72) 발명자 최철희 광주광역시 동구 필문대로 309 조선대학교(서석동, 의과대학)
(22) 출원일자	2012년06월25일	조훈 광주광역시 남구 서문대로663번안길 12, 104동 601호(진월동, 금광하늘연가)
심사청구일자	2012년06월25일	(74) 대리인 위병갑

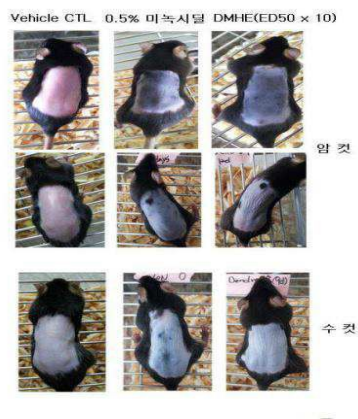
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진용 화장품 조성물, 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선용 약제학적 조성물 및 기능성 식품에 관한 것이다. 본 발명에 따른 황칠나무 추출물은 15-PGDH 활성을 억제하여 PGE₂을 증가시키는 활성이 우수하며, 또한 남성형 탈모의 중요기전인 AR 시그널링을 억제하는 기전을 통해 남성형 탈모에도 우수한 효과가 있음을 규명하였다. 따라서 본 발명은 탈모를 방지하고 발모를 촉진시키는 효과가 우수함을 확인함으로써 발모 촉진용 화장품, 의약품 및 기능성 식품의 제조에 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도15



(72) 발명자

문영숙

광주광역시 남구 진제길 28, 201동 1401호(진월동, 고운하이플러스)

한지원

광주광역시 북구 용봉로 77 전남대학교(용봉동, 수의과대학 수의 미생물학실)

한주희

광주광역시 동구 밤실로 40-1, 상가 서울 세탁소(지산2동, 동산아파트 3동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R13-2003-009

부처명 교육과학기술부

연구사업명 선도연구센터육성사업 기초의약학분야

연구과제명 항암 및 호르몬내성기전의 규명 및 극복전략개발에 관한 연구

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2003.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진용 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 황칠나무 추출물은 황칠나무의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물임을 특징으로 하는 발모 촉진용 화장료 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 조추출물은 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매로부터 가용한 추출물인 것을 특징으로 하는 발모 촉진용 화장료 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 비극성용매 가용 추출물은 헥산, 클로로포름, 디클로로메탄 또는 에틸아세테이트에 가용한 추출물인 것을 특징으로 하는 발모 촉진용 화장료 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 황칠나무 추출물은,

- (i) 15-PGDH 효소활성 억제;
- (i) 세포내 및 세포외에서 PGE₂ 증가;
- (iii) COX-1 (cyclooxygenase-1) 및 MRP4 (multidrug resistance-associated protein4) 유전자 발현 증가;
- (iv) PGT (prostaglandin transporter) 발현 억제;
- (v) 5 α -리덕타아제 발현 억제; 및
- (vi) 안드로겐 수용체(AR) 발현 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 발모 촉진용 화장료 조성물.

청구항 6

황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선용 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 피부외용제로서 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군으로부터 선택되는 피부 외용제 형태의 조성물인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 8

황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선용 건강기능식품.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 두릅나무과에 속하는 황칠나무(*Dendropanax morbifera* Lev.)는 우리나라의 남부 해안 지역과 제주도에서 자생하는 상록활엽교목으로 겨울에도 낙엽이 지지 않는 수종으로 수피에 상처를 주면 황색의 수지액이 나오는데 이것을 황칠(黃漆)이라고 한다.

[0003] 황칠은 삼국시대부터 황제의 갑옷, 투구, 기타 금속 장신구의 황금색을 발하는 진귀한 도료로 이용되어 왔으며, 고려시대에 쓰여진 고려사절요, 중국의 계림유사, 계림지, 해동역사에 황칠의 채취시기, 사용 용도 등이 기록되어 있고, 그 이전인 백제의 특산품이었다는 것이 당나라 역사서인 책부원구, 통전에 남아있다. 또한, 황칠나무가 번열 제거, 술해독, 안질 및 황달치료, 나병에 효과가 있으며 인체에 무해하다는 기록도 전해지고 있다(이시진, 본초강목, 중국문광도서, 1590).

[0004] 종래의 황칠나무에 관한 관련 기술로는 한국 특허공개 제 2000-0004499에 항암활성을 가지는 황칠나무 추출물이 기재되어 있고, 한국 특허공개 제 2003-0079205에 간세포 보호효과를 갖는 황칠 추출물, 황칠 분획물 및 이들을 함유한 약학 조성물이 기재되어 있고, 한국 특허공개 제 2004-01077853에 에탄올 유발 간 손상을 억제하는 황칠 추출물이 기재되어 있고, 한국 특허공개 제 2004-0107852에 피부 미백 효과가 있는 황칠추출물과 황칠 분획물이 기재되어 있으며, 한국 특허공개 제 2005-0036093에 황칠나무 수액을 유효성분으로 하는 자외선 차단 화장품 조성물에 대한 내용이 개시되어 있다.

[0005] 그러나, 지금까지 황칠나무 추출물의 15-PGDH (15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase) 및 PGE₂ 활성조절에 관여하는 분자적 메커니즘은 전혀 규명되어 있지 않았으며, 이러한 분자적 메커니즘을 이용한 질환 치료 및 생리활성에 대한 내용은 전혀 보고된 바 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 황칠나무 잎의 핵산 추출물이 15-PGDH 효소활성을 억제하고 PGE₂를 증가시킴으로써 발모를 촉진시키는 활성이 있다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제988,072호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 그러므로 본 발명의 목적은 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한 본 발명의 다른 목적은 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선용 건강기능식품 또는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진용 화장료 조성물

을 제공한다.

- [0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 황칠나무 추출물은 황칠나무의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조추출물은 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매로부터 가용한 추출물일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 비극성용매 가용 추출물은 헥산, 클로로 포름, 디클로로메탄 또는 에틸아세테이트에 가용한 추출물일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 황칠나무 추출물은, (i) 15-PGDH 효소활성 억제; (ii) 세포내 및 세포외에서 PGE_2 증가; (iii) COX-1(cyclooxygenase-1) 및 MRP4 (multidrug resistance-associated protein4) 유전자 발현 증가; (iv) PGT(prostaglandin transporter) 발현 억제; (v) 5 α 리덕타아제(5 α -R) 발현 억제; 및 (vi) 안드로겐 수용체(AR) 발현 억제 활성을 갖는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명은 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 피부외용제로서 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0017] 또한 본 발명은 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명은 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 발모 촉진용 화장품 조성물, 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선용 약제학적 조성물 및 기능성 식품에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 황칠나무 추출물은 15-PGDH 활성을 억제하여 PGE_2 를 증가시키는 활성이 우수하여 탈모를 방지하고 발모를 촉진시키는 효과가 우수함을 확인함으로써 발모 촉진용 화장품, 의약품 및 기능성 식품의 제조에 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 다양한 PG(프로스타글란딘)의 생합성 공정을 나타내는 모식도이다.
- 도 2는 15 - PGDH 및 PGE_2 가 결합한 복합체의 입체구조이다.
- 도 3은 황칠나무의 사진이다.
- 도 4는 본 발명의 황칠나무 추출물을 제조하는 일 공정을 나타내는 모식도이다.
- 도 5는 재조합 15 - PGDH 를 함유하는 PGEX - 2T 발현 벡터의 모식도이다.
- 도 6은 NADH의 표준곡선 그래프이다.
- 도 7는 ELISA 키트를 이용한 PGE_2 측정을 위한 실험 공정의 개략도이다.
- 도 8은 황칠나무 추출물의 15 - PGDH 저해활성(ED_{50}) 그래프이다.
- 도 9는 MTT 분석에 의한 HaCaT 세포에서의 황칠나무 추출물의 세포 독성 평가 그래프이다.
- 도 10은 MTT 분석에 의한 LNCaP · FGC 세포에서의 황칠나무 추출물의 세포 독성 평가 그래프이다.
- 도 11은 A549 세포에서의 황칠나무 추출물에 의한 농도-의존적 PGE_2 증가효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 12는 HaCaT 세포에서 황칠나무 추출물 DMHE에 의해 영향을 받는 시간-의존적 세포의 PGE_2 농도의 변화를 나타

낸 그래프이다.

도 13은 HaCaT 세포에서 황칠나무 추출물 DMHE에 의한 세포내(intra-cellular) 및 세포외(extra-cellular) PGE₂ 농도의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 14는 HaCaT 세포에서 DMHE의 COX - 1/2, MRP4, 15-PGDH 및 PGT mRNA 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 15는 C57BL/6 마우스를 이용한, DMHE의 발모 촉진효과를 확인한 사진이다.

도 16은 LNCaP·FGC 세포에서 황칠나무 추출물의 PSA (prostate specific antigen) mRNA 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 17은 LNCaP·FGC 세포에서 황칠나무 추출물의 5 α -R 1/2 mRNA 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 18은 LNCaP·FGC 세포에서 DMHE 및 플루타미드의 AR, 15-PGDH 및 PSA mRNA 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 19는 LNCaP·FGC 세포에서 AR 및 이들의 타겟 유전자(15-PGDH 및 PSA)에 DHT에 의해 유도되는 mRNA의 과발현에 미치는 DMHE 농도-의존적 영향을 나타낸 그래프이다.

도 20은 DMHE에 의한 AR의 타겟 유전자인 PSA mRNA 억제 효과가 고농도의 DHT에 의하여 회복되는 효과를 보여준 그래프로 AR에 대하여 DHT와 경쟁적으로 억제함을 보여준 그래프이다.

도 21은 본 발명의 DMHE이 HFDPC(primary hair follicle dermal papilla cell)에서 5 α R-1의 유전자 발현을 농도 의존적으로 억제하는 활성이 있다는 것을 보여준 그래프이다.

도 22는 본 발명의 DMHE이 HFDPC(primary hair follicle dermal papilla cell)에서 5 α R-2의 유전자 발현을 농도 의존적으로 억제하는 활성이 있다는 것을 보여준 그래프이다.

도 23은 본 발명의 DMHE이 HFDPC(primary hair follicle dermal papilla cell)에서 안드로젠 수용체(AR)의 발현을 억제하는 활성이 있다는 것을 보여준 그래프이다.

도 24는 본 발명의 DMHE이 HFDPC(primary hair follicle dermal papilla cell)에서 안드로젠 수용체(AR)의 타겟 유전자인 15-PGDH의 발현을 농도 의존적으로 억제하는 활성이 있다는 것을 보여준 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

[0022]

"추출물"은 황칠나무의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물임을 특징으로 한다.

[0023]

"조추출물"은 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물 및 메탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 50~100% 메탄올에 가용한 추출물을 포함한다.

[0024]

"극성용매 가용 추출물"은 물, 메탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택되어진 용매, 바람직하게는 물 또는 메탄올, 보다 바람직하게는 메탄올에 가용한 추출물을 포함한다.

[0025]

"비극성용매 가용 추출물"은 헥산, 클로로포름, 디클로로메탄, 또는 에틸아세테이트, 바람직하게는 헥산, 디클로로메탄 또는 에틸아세테이트, 보다 바람직하게는, 헥산 또는 에틸아세테이트 용매에 가용한 추출물을 포함한다.

[0026]

"약학적 조성물(pharmaceutical composition)"은 본 발명의 황칠나무 추출물과 희석제 또는 담체와 같은 다른 화학 성분들의 혼합물을 의미한다.

[0027]

"담체(carrier)"는 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물로 정의된다. 예를 들어, 디메틸설폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기 화합물들의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.

[0028]

"희석제(diluent)"는 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키게 되는

물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다.

[0029] "유효량"은, 이롭거나 바람직한 임상적 또는 생화학적 결과에 영향을 주는 적절한 양이다. 유효량은 한번 또는 그 이상 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위하여, 유효량은 질병 상태의 진행을 일시적으로 완화, 개선, 안정화, 되돌림, 속도를 늦춤 또는 지연시키는데 적절한 양이다. 만약, 수혜동물이 조성물의 투여에 견딜 수 있거나, 조성물의 그 동물에의 투여가 적합한 경우라면,

[0030] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0031] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0032] 본 발명은 황칠나무 추출물의 용도에 관한 것으로, 황칠나무 추출물이 내포하고 있는 특정 생리활성 및 기능의 발휘에 관한 것이다.

[0033] 황칠나무(*Dendropanox morbifera* LEV.)는 두릅나무에 속하는 상록 활엽교목으로 우리나라의 제주도와 완도, 보길도, 해남 등 남·서해안 일대에 자생하고 있는 우리나라 특산 수종이다(도 3). 황칠나무에 함유된 정향성분은 소량의 터펜(Terpene)류와 다량의 세스퀴터펜(Sesquiterpene)류가 포함되어 있는데, 채취시기나 장소에 따라서 차이가 있지만 germacrene-d, β -selinene, α -amorphene, α -selinene, δ -cadinene, γ -cadinene, T-muuroiol, β -elemene, bicyclo [4,4,0] dec- 1 -en - 2 - isopropyl - 5 - methyl - 9-methylene, β -cadinene, germacrene-B, α -copaene, α -humulene, α -cadinene과 소량의 linalool L, α -terpinene, α -cubebene, α -ylangene,(+)-calarene, 3,7-guaiadine, (-)-isolekene, β -cubebene, limonene, aromadendrene, cadina-1,4-diene 등이 함유되어 있다.

[0034] 본 발명에서 사용할 수 있는 황칠나무의 부위는 잎, 줄기, 수피 등 제한이 없으나, 바람직하게는 잎을 사용할 수 있다.

[0035] 황칠나무 추출물은 당업계에 알려진 방법, 이의 변형된 방법 또는 본 발명에 의한 방법으로 제조하여 사용할 수 있다. 일 구체예로서, 이하와 같은 방법으로 제조할 수 있다.

[0036] 본 발명의 황칠나무 추출물 또는 조추출물은 황칠나무 중량의 약 1 내지 30배 부피량, 바람직하게는 5 내지 15배 부피량 (w/v%)의 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 50~100% 에탄올을 가하여, 약 0 내지 100℃, 바람직하게는 실온에서 10 내지 60 시간, 바람직하게는 30 내지 50 시간 동안 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출, 또는 가열추출법 등의 추출방법으로, 바람직하게는 열수추출법으로 추출한 후 여과하고 감압 농축하여 본 발명의 황칠나무 조추출물을 얻을 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명의 극성용매 또는 비극성용매 가용 추출물은 상기에서 얻은 조추출물, 바람직하게는 50~100% 에탄올 조추출물 중량의 약 1 내지 150배, 바람직하게는 5 내지 100배 부피(w/v%)의 물을 분산시킨 후, 헥산, 에틸아세테이트 및 부탄올을 순차적으로 물의 약 1 내지 10배, 바람직하게는 1 내지 5배의 부피를 가하여 1 내지 5회, 바람직하게는 2 내지 4회 분획하여 본 발명의 극성 용매 및 비극성용매 가용 추출물을 수득할 수 있다. 바람직하게는 헥산 추출물을 수득하여 사용할 수 있다.

[0038] 상기 추출물들의 농축액을 -80℃ 동결건조 혹은 50℃ 진공감압을 통하여 분말상태로도 얻을 수 있다.

[0039] 본 발명은 상기 황칠나무 추출물을 제조하는 방법을 포함한다. 상기 제조방법은 그것의 예시적인 방법에 지나지 않으며, 당해 분야의 기술에 근간한 다양한 방법들에 의해 적절히 변형시켜 사용할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 따른 비-예시된 추출방법은 당분야의 숙련자에게 명백한 변형에 의해 성공적으로 수행될 수 있다.

[0040] 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 본 발명에 따른 황칠나무 추출물의 제조를 위한 구체적인 반응조건 등을 후술 설명하는 실시예들을 통해 확인할 수 있으므로, 그에 대한 자세한 설명은 생략한다.

- [0041] 본 발명은 황칠나무 추출물의 15-PGDH 활성 및 PGE₂ 관련 기작의 분자적 메커니즘의 발견에 기초하고 있다.
- [0042] (1) 본 발명의 황칠나무 추출물은 NAD⁺ 의존형 15-PGDH의 활성을 억제하여 PGE₂의 세포내외 생성을 증가시킨다.
- [0043] 프로스타글란딘(Prostaglandin, PG)는 물리적, 화학적, 특정한 사이토카인 성장인자 기타 자극들에 의해 세포막에서 유리된 아라키돈산로부터 생성되는 에이코사노이드(eicosanoid)라 알려진 매개물질이다. 다양한 PG의 합성 공정을 도 1에 도시하였다. 이 중에서 특히, PGE₂는 상처치유, 소화성 궤양, 눈썹과 두발 형성 및 골 형성의 중요한 매개인자로 알려져 있다. 그러나 PGE₂는 NAD⁺ 의존형 15-PGDH에 의해 신속히 대사되므로, 체내에서 반감기가 매우 짧다.
- [0044] 본 발명의 황칠 추출물은 상기 15-PGDH를 억제함으로써 PGE₂를 증가시키는 탁월한 활성을 가지고 있다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에서는 황칠잎 추출물(methanol, n - hexane, n - butanol 및 water)의 15-PGDH 효소활성 억제효능(ED₅₀)이 1.74 µg/mL ~ 661.8 µg/mL로 다양하게 나타났고, 특히 n - 헥산 과 에틸 아세테이트 추출물의 경우 각각 1.74 µg/mL 와 10.6 µg/mL의 ED₅₀값을 보였다. 또한, 황칠잎 헥산 추출물은 A549 폐암세포에서 세포외 PGE₂를 농도 의존적으로 증가시켰고, HaCaT 세포주에서도 세포내 및 세포외의 PGE₂ 농도를 증가시켰다.
- [0046] (2) 또한, 본 발명의 황칠나무 추출물은 상기 기작과 관련하는 다른 특정 유전자의 발현 메커니즘에도 영향을 미친다.
- [0047] 즉, 본 발명의 황칠나무 추출물은 COX-1과 MRP4 mRNA 발현을 증가시켰으며, PGT 와 15 - PGDH의 mRNA 발현은 감소시켰다.
- [0048] (3) 또한, 황칠나무 추출물은 15 - PGDH 활성억제를 통한 발모 촉진 효과를 가지고 있다.
- [0049] 탈모는 질병에 의한 탈모, 호르몬적 원인에 의한 탈모, 영양 불균형에 의한 탈모 또는 스트레스에 의한 탈모가 원인이 될 수 있는데, 상기 질병에 의한 탈모는 유전, 자가 면역질환, 화상, 화학요법, 건선, 진균 감염, 방사선 노출 또는 중양이 원인일 수 있고, 상기 호르몬적 원인에 의한 탈모는 약물, 임신 출산 전 후, 갱년기, 당뇨병, 뇌하수체 기능 이상, 부갑상선 또는 갑상선 기능 이상이 원인일 수 있다.
- [0050] 또한 탈모는 PGE₂의 분해와 관련이 있는데, PGE₂는 체내에서 사람들의 머리에 세포분열을 촉진하고 머리내 혈관에 혈류를 확장시켜서 영양공급을 원활하게 하여 모발의 성장을 촉진시킨다. 필수 지방산은 PLA 2 효소에 의해 아라키돈산(arachidonic acid)으로 분해되며, COX-2 효소에 의해 다시 프로스타글란딘으로 분해되는데, 이때, 15-PGDH은 NAD⁺ 의존적으로 프로스타글란딘을 분해시킨다. 따라서, 15-PGDH의 작용을 억제시킨다면 프로스타글란딘의 분해를 억제하여 발모를 촉진하거나 탈모를 예방할 수 있는 것이다. 또한, PGE₂는 두피의 염증 반응에도 관여하여 비듬 제거하는 효과가 있다(Michelet JF 등, 2008, Exp. Dermatol, 17(10), 821-8).
- [0051] 본 발명의 일 실시예에서는 휴지기로 들어간 C57BL/6 블랙 마우스를 제모한 탈모모델에서 황칠잎 헥산 추출물의 우수한 발모효과를 확인하였다.
- [0052] (4) 뿐만 아니라 본 발명의 황칠나무 추출물은 AR의 단백질 합성을 억제하는 항안드로겐 특성을 가지고 있다.
- [0053] 즉 본 발명의 황칠나무 추출물은 남성형 탈모(androgenetic alopecia)의 주된 기전으로 알려진 AR 시그널링 억제에 관여하고 있다. 5α-리덕타제는 테스토스테론을 5α 디하이드록시테스토스테론(DHT)로 전환시켜 AR 에 대한 시그널링을 가속화시키는 중요한 효소이다. 5α-리덕타제 억제제인 finasteride는 남성형 탈모 치료제(상명; Propecia)와 전립선비대증(benign prostatic hyperplasia, BPH) 치료제(상명; Proscar)로 쓰이고 있다. 본 발명의 황칠나무 추출물은 5α-리덕타제1, 2 와 AR 유전자 발현감소 및 AR 수용체 차단에 의한 AR 시그널링을 억제시키며, 이들의 표적효소인 15-PGDH의 양적 감소를 초래하게 한다. 또한 DHT와는 AR에 대하여 경쟁성 억제(competitive inhibition) 양상으로 작용함을 보여주었다. 즉, AR의 단백질 합성 및 활성을 방해함으로써 표적 유전자인 PSA와 함께 15-PGDH mRNA 발현을 감소시켰다. 남성형 탈모인 경우 AR 및 5α-리덕타제의 활성증가가 주된 요인으로 보고되어 있는데, 본 발명의 황칠나무 추출물은 남성형 탈모에도 효과가 큰 기전을 지니고 있음을 보여주었다.
- [0054] 이러한 메커니즘은 AR 활성 및 15-PGDH 활성 관련 질환에서도 치료 및 예방 효과를 가질 수 있음을 알 수 있다.

예를 들어, 과다 합성된 DHT는 전립선 세포에 있는 AR에 결합하여 전립선 비대, 더 나아가 전립선 암을 유발하기도 하며, 5 α -R는 전립선 뿐만 아니라 두피의 모낭에도 존재하여 테스토스테론을 DHT로 변환시켜 탈모를 유발하므로, 이러한 질환의 치료 및 모발 관련 화장품 조성물에 유용하게 사용할 수 있다.

[0055] 이와 같이, 본 발명의 황칠나무 추출물은 15-PGDH 효소활성을 억제; 세포내 및 세포외의 PGE₂ 농도를 증가; COX-1(cyclooxygenase-1) 및 MRP4(multidrug resistance-associated protein4)유전자의 발현 증가; PGT(prostaglandin transporter) 발현 억제; 및 5 α -리덕타제 유전자 발현을 억제하고, 안드로겐 수용체(AR)의 단백질 합성을 억제하며, 15-PGDH 발현도 억제하며, 실험동물에서 독성을 나타내지 않으므로, 이러한 분자적 메커니즘을 기반으로 15-PGDH 활성 및 PGE₂ 관련 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0056] 그러므로 본 발명은 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 모발 증식용 조성물, 바람직하게는 발모 촉진용 화장품 조성물을 제공한다.

[0057] 탈모란, 15-PGDH 활성과 관련 있는 질환으로, 모발이 줄어드는 증상을 의미하며, 모발주기에서 성장기가 짧아지고, 전체 모발에서 차지하는 성장기 모발의 비율이 줄어드는 특성이 나타난다. 남성형 탈모의 경우, 그 발생 기전이 정확히 밝혀지지는 않았지만 남성호르몬에 의존적이고, 휴지기 모낭의 비율이 증가되고 모낭이 왜소화되는 현상을 보인다.

[0058] 본 발명에 따른 화장품 조성물은 유효성분이 황칠나무 추출물 뿐만 아니라, 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0059] 또한, 본 발명의 조성물은 상술한 황칠나무 추출물 이외에, 황칠나무 추출물에 의한 발모(탈모)방지 및 모발 개선의 작용을 손상시키지 않는 한도에서 종래부터 사용되어오던 양모제 또는 욱모제를 혼합하여 사용할 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명의 화장품 조성물은 당 업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 헤어토닉, 헤어컨디셔너, 헤어에센스, 헤어로션, 헤어영양로션, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어트리트먼트, 헤어크림, 헤어영양크림, 헤어모이스처크림, 헤어맛사지크림, 헤어왁스, 헤어에어로졸, 헤어팩, 헤어영양팩, 헤어비누, 헤어클렌징폼, 머릿기름, 모발건조제, 모발보존처리제, 모발염색제, 모발용 웨이브제, 모발탈색제, 헤어겔, 헤어글레이즈, 헤어드레싱어, 헤어래커, 헤어모이스처라이저, 헤어무스 및 헤어스프레이 등 다양한 형태로 제조될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 황칠나무 추출물의 함량은 조성물 총 중량에 대하여 0.00001-30중량%이며, 바람직하게는 0.5-20%이며, 보다 바람직하게는 1.0-10중량%이다. 상기 황칠나무 추출물의 함량이 0.00001중량% 미만이면, 황칠나무 추출물에 의한 탈모방지 및 발모개선 효과가 크게 감소되고, 30중량%를 초과하는 경우에는 오히려 피부 자극을 초래할 수 있고, 제형상의 문제점이 있다.

[0062] 또한, 본 발명의 조성물은 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물일 수 있다.

[0063] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 봉해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0064] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0065] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 봉해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 봉해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있

다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

- [0066] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 황칠나무 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.00001 ~ 30 중량%로 포함될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 피부외용 약제학적 조성물은 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선 효과를 갖는 피부외용제로서 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용제 형태의 약학조성물로 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0068] 본 발명의 조성물은 또한 식품 조성물일 수 있는데, 이러한 식품 조성물은 유효성분인 황칠나무 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0069] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강 보조식품류 등이 있다.
- [0071] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 황칠나무 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 유효성분인 황칠나무 추출물은 천연물질로서 독성 및 부작용은 거의 없으므로 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선을 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0073] 본 발명은 또한 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0074] 본 발명의 건강기능식품은 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0075] 본 발명에서 “건강기능식품” 이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제672호에 따른 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0076] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0077] 상기 “식품 첨가물 공전” 에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.
- [0078] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 황칠나무 추출물을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.
- [0079] 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명의 유효성분인 황칠나무 추출물을 부형

제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 황칠나무 추출물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0080] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 황칠나무 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0081] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 황칠나무 추출물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0082] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0083] 또한 본 발명은 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선용 화장품, 의약 또는 식품의 제조를 위한 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 탈모 방지, 발모 촉진 및 두피 개선용 화장품, 의약 또는 식품의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.

[0084] 또한 본 발명은 포유동물에게 황칠나무 추출물을 투여하는 것을 포함하는 탈모 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0085] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0086] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료 방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 황칠나무 추출물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 1mg/kg~250mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0087] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 황칠나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0088] 실시예

[0089] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 또한, 각 실험들은 3번 이상 수행하였고, 각 데이터들을 평균± SE로 표시하였다. 통계적 유의성은 paired Student's t test에 의해 결정하였다. P < 0.05는 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0090] 재료 및 기구

[0091] 한국 무안에 위치한 곡우 농장에서 황칠 나무(*Dendropanax morbifera*)의 잎을 수거하였다.

[0092] PGE_2 , NAD⁺, NADH, 글루타치온-세파로오즈(glutathione - Sepharose) 4B, DTT(dithiothreitol), SDS(sodium dodecylsulfate), EDTA, 환원 글루타치온(reduced glutathione), SC560 (COX - 1 저해제), 세레콕시브(celecoxib, COX - 2 저해제), 나프록센(naproxen, 비선택성 COX 저해제), 5 α - dihydrotestosterone (DHT), 미토마이신, 수크랄페이트(sucralfate), CMC(carboxy methyl cellulose), 및 미녹시딜을 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하고, TGF - β 1을 Biovision Pharmacia Co. (New Jersey, USA)로부터 구입하였다.

[0093] 인간 태반 cDNA 라이브러리(Cho and Tai, 2002)로부터 인간 15 - PGDH의 cDNA를 클로닝하였다. Shimadzu RF -

5301IPC Fluorescence Spectrophotometer (Shimadzu, Japan)을 이용하여 UV 스펙트럼을 획득하였다.

[0094] PGE₂ 효소 면역분석 키트를 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)로부터 구입하였고, Real-time PCR을 Light Cycler 2.0 Instrument (Roche, Mannheim, Germany)로 수행하였다.

[0095] *In vitro* 상처 스크래치들을 역상 투과전자 현미경(Hitachi, Tokyo, Japan)으로 사진을 찍었다.

[0096] 분석적 HPLC는 디게서(degasser), 바이너리 믹싱 펌프, 컬럼 오븐 및 PDA 검출기로 구성된 Agilent HP1100 series 상에서 Waters SunFire™ (4.6 x 150 mm, 5 μm) 컬럼을 이용하여 수행하였다. Semi-preparative HPLC를, DECASSIT™ 6342 디게서가 결합된 Waters multisolvent delivery system으로 Waters SunFire™ Prep C18 (10 x 250 mm and 19 x 150 mm, 5 μm) 컬럼을 이용하여 수행하였다. 식물 추출에 사용된 모든 용매들은 HPLC grade였다

[0097] 실시예 1 : 황칠나무잎 추출물 제조

[0098] (1) 추출물 제조

[0099] 모아둔 황칠나무(*D. morbifera*) 잎을 상온에서 그늘진 곳에서 건조시켰다.

[0100] 건조된 잎들을 상온에서 메탄올로 3회 추출하였다. 상기 메탄올 추출물을 와트만 넘버 1 여과지를 이용하여 여과하고, 상기 결합된 메탄올 추출물을 회전식 증발농축기로 진공에서 농축시켰다. 메탄올 추출물을 수 중 현탁시키고 이어서 헥산, 디에틸 에테르, 에틸 아세테이트, n-부탄올 및 물로 극성에 따라 각각 분획하였다. 각 추출물들을 회전식 진공 증발농축기로 농축하였으며, 이러한 공정을 도 4에 도시하였다.

[0101] (2) 분획화 및 분리 공정

[0102] 그라디언트 용매 시스템 [CHCl₃ (0.1% HCOOH) 100% through CHCl₃ (0.1% HCOOH) - MeOH (0.1% HCOOH)/55:45 for 120 min]을 이용하여 Isolera Flash Purification system (BIOTAGE, Sweden)으로 헥산 추출물의 활성 유도 분획법(Activity-guided fractionation)을 254 및 280 nm 하에 수행하여 10 분획을 획득하였고(DEE01 - DEE10), 각 분획을 그라디언트 MeCN - H₂O (0.1% HCOOH) 용매 시스템에서 HPLC를 이용하여 모니터링하고 각 화합물을 검출하였다.

[0103] 또한, UV광(254nm)하에서 얇은 층 크로마토그래피에 의해 스팟들을 검출하거나 바닐린 - H₂SO₄ 으로 스프레이한 후 110℃로 가열하였다.

[0104] 0.1% 포름산(30:70 → 100% MeCN)을 함유하는 MeCN/H₂O의 그라디언트 용매 시스템으로 SunFire™ Prep C18 (10 x 250 mm 및 19 x 150 mm, 5 μm) 컬럼을 이용하여 반복적인 semi-preparative HPLC 실험을 40분 동안 수행하고, 이러한 분획으로부터 주요한 성분들로서 화합물들을 최종적으로 분리하였다.

[0105] (3) 결과

[0106] 추출 용매에 따른 황칠나무 추출물의 수율은 하기 표 1에 기재하였다.

표 1

[0107]

용매	최종산물(g)	수율(%)
Methanol	230.1	13.6
n-Hexane	34.6	2.1
Ethyl acetate	31.0	1.9
n-Butanol	46.6	2.8
Water	98.4	5.8

[0108] 추출 결과, 수율은 메탄올 추출물이 가장 높게 나타난 반면, 에틸 아세테이트를 이용한 수율은 다소 낮게 나타났다.

[0109] 실시예 2 : 15 - PGDH의 발현 확인

[0110] (1) 15 - PGDH의 발현 및 정제

[0111] 도 5에 도시한 바와 같은 벡터, 즉, BamH I 및 EcoR I 위치 사이에 재조합 15 - PGDH 를 함유하는 PGEX - 2T 발현 벡터로 *Escherichia coli* BL - 21 DE3 세포들을 형질 전환하였다. 세포들을 50 μ g/mL 암피실린을 함유하는 500 mL 배지에서 37 $^{\circ}$ C 및 220 rpm의 조건하에서 성장시켜 600nm에서 O.D.가 0.6가 되도록 배양하였다. 이후 IPTG (isopropyl β - D - thiogalactoside, 1M stock solution)을 첨가하고 상기 세포들을 12시간 동안 25 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 그 후, 세포들을 30분 동안 4 $^{\circ}$ C에서 4000 x g 으로 원심분리하여 수득하고 상기 세포 펠렛들을 20mL의 차가운 용해 버퍼(1 x PBS buffer pH 7.4 containing 1mM EDTA 및 0.1 mM DTT)에 재현탁하고, 초음파로 분해하였다(4 x 10 s at 4 $^{\circ}$ C). 파쇄된 세포들을 4 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 4000 x g으로 원심분리하였다.

[0112] 이후 상등액을 천천히 글루타치온-세파로오즈4B 컬럼에 적용하여 4 $^{\circ}$ C에서 용해 버퍼로 평형화시켰다. 상기 컬럼을 O.D 280에서 O.D가 0.005에 이르기까지 용해 버퍼로 세척하였다. 그 후, 글루타치온-세파로오즈 4B 컬럼으로부터 상온에서 5분 동안 용리버퍼(50 mM Tris-HCl pH 8.0 containing 10 mM reduced glutathione, 1 mM EDTA and 0.1 mM DTT)를 이용하여 15 - PGDH를 용리하였다. 15 - PGDH의 농도는 Bradford method (Schleicher and Wieland, 1978)로 측정하였고, 15 - PGDH(분자량 29KD)의 순도를 SDS - PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacryl amide gel electrophoresis) 및 쿠마신 블루 염색으로 확인하였다.

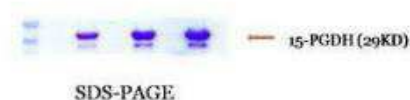
[0113] (2) 쿠마신 블루(Coomassie blue) 염색

[0114] SDS - PAGE 겔을 염색용액(0.1% Coomassie brilliant blue R 250, 50% methanol and 10% glacial acetic acid in water)으로 20분 동안 염색하였다. 상기 겔을 탈염색 용액(10% methanol, 7% glacial acetic acid in water)으로 겔의 배경이 완전히 탈색될 때까지 여러 번 세척하였다. 최종적으로, 상기 겔을 저장 용액(5% glacial acetic acid in water)에 저장하고 검출을 위해 스캔하였다.

재조합 플라스미드(15-PGDH)로 BL21 DE3 competent E.Coli에 형질전환: 단백질 발현

↓
글루타치온 세파로오즈 4B 컬럼

↓
NAD⁺- 의존성 15-PGDH



[0115]

[0116] (3) 15-PGDH 활성 분석

[0117] 15-PGDH 저해제의 활성 분석은 형광 분광광도계를 이용하여 468 nm 및 340 nm에서 NADH의 형성을 측정함으로써 수행하였다

[0118] 0.1 mM DTT, 0.25 mM NAD⁺, 정제된 효소 (10 μ g), 21 μ M PGE2 및 다양한 농도의 15 - PGDH 저해제를 함유하는 Tris - HCl 버퍼 (50 mM, pH 7.5)를 각 반응 혼합물에 첨가하였다. 트리플리케이트에서 각 농도를 분석하였다. 반응 혼합물의 흡광도를 도 6의 NADH의 표준곡선으로부터 15-PGDH 저해제 활성으로 보정하였다.

[0119] 그 결과를 하기 표 2 및 도 8에 나타내었다.

[0120] 15-PGDH에 대한 ED₅₀ 값은 추출용매에 따라 1.7 μ g/mL ~ 661.8 μ g/mL 값으로 나타났다.

표 2

Extraction solvent	ED ₅₀ (μg/mL)
Methanol	31.0
<i>n</i> -Hexane	1.74
Ethyl acetate	10.6
<i>n</i> -Butanol	14.3
Water	661.8

실시예 3 : 세포 생존능 분석

(1) 세포 배양

HaCaT 세포, 인간 케라티노사이트 세포주를 10% 가열 불활성화된 FBS, 100 μg/mL 항생제로 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's media)로, 37 °C 하 습한 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 아데노카르시노마 (adenocarcinoma) 유사 인간 폐포(alveolar) 타입 II로부터 유래된 A549 세포를 RPMI 배지로 37 °C 하 습한 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 그리고, LNCaP·FGC (androgen-dependent prostate cancer) 세포를, RPMI 배지로 37 °C 하 습한 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 모든 배양된 배지들은 10% 가열 불활성화된 FBS 및 100 μg/mL 페니실린으로 보충되어 있다.

(2) 세포생존능 평가

MTT 분석(Mosmann, 1983)에 의해 세포 생존능을 측정하였다.

96 웰 플레이트에 DMEM 배지 90 μL 당 HaCaT 세포 (1 x 10⁴ /mL), LNCaP·FGC 세포 (4 x 10⁴/mL)들을 씨딩하였다. 밤새 배양 후, 약들을 72시간 동안 처리하고, MTT (5 mg/mL stock solution) 10 μL로 4시간 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고 DMSO 150 μL를 첨가하여 포마잔을 용해시켰다. ELISA microplate reader (PerkinElmer, California, USA)을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

그 결과를 하기 표3 및 도9, 도 10에 도시하였다.

표 3

용매	HaCaT IC ₅₀ (μg/mL)	LNCaP·FGC IC ₅₀ (μg/mL)
<i>n</i> -Hexane	39.86	169
Ethyl acetate	246.27	88.3
<i>n</i> -Butanol	471.40	562
Water	>1000.00	>800

상기 표에서 알 수 있는 것처럼, 황칠나무의 핵산, 에틸아세테이트, 메탄올 및 물 추출물의 IC₅₀는 HaCaT 세포에서 39.86 μg/mL ~ > 1000 μg/mL (도 9), LNCaP·FGC 세포에서 88 μg/mL ~ > 800 μg/mL (도 10)로 나타났다. 즉, 소수성 추출물이 상대적으로 높은 독성을 보이긴 했지만, 세포 생존능에는 치명적인 정도는 아니었다.

실시예 4 : 단백질 정량 분석 및 PGE₂ 방출 검사

COX 및 마이크로솜 PGE 신타아제 - 1 (mPGES - 1) - 유래 PGs 유사PGE₂는 폐기능의 중요한 조절인자로 간주되고 있다. 특히, 감염부위에서 PGE₂ 생성은 면역 및 염증성 반응을 조절하고 폐 상피 세포에 의해 자유로움이 보고되어 있다 (N'Guessan et al., 2007).

단백질 농도는 Bradford (Schleicher and Wieland, 1978)에 기반을 둔 Bio-Rad 단백질 분석법에 의해 측정하

였다. 표준 곡선을 BSA(bovine serum albumin)의 연속적 희석을 이용하여 준비하고, Bio-Rad 단백질 분석 염색 시약을 수 중 1:4의 비율로 희석하였다. 4 μ L의 표준 및 샘플들을 1 mL의 희석된 염색 시약에 첨가하고 흡광도를 595nm에서 측정하였다. 샘플 단백질 농도를 BSA로 준비한 표준곡선으로부터 결정하였다.

[0134] 한편, PGE₂ 방출을 알아보기 위해, HaCaT 세포 및 A549 세포들을, 37 °C 및 습윤된 5% CO₂ 배양기에서 FBS 및 항생제가 함유된 DMEM 및 RPMI의 각 배지에서 6웰 배양 플레이트에 씨딩 하고(5×10^5 cells/well), 상이한 농도의 15-PGDH 저해제를 처리한 후, 배지들을 약 2시간 후 특정 시간마다 상층액을 수집하였다. 세포내 및 세포외 PGE₂ 수준을, PGE₂ 효소 면역분석 키트(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0135] 그 결과, 도 11에 도시되어 있는 바와 같이, DMEA (1-, 2-, 3-배 ED₅₀), DMW (1-, 10-, 100-배 ED₅₀), DMHE (1-, 10-, 100-배 ED₅₀) 및 DMME (0.5-, 1- 2-배 ED₅₀)는 농도 의존적으로 PGE₂를 증가시켰다. D. morbifera 핵산 추출물(DMHE)은 15-PGDH를 보다 효율적으로 저해하였다.

[0136] 그리고, 시간 의존적으로 세포외 PGE₂ 변화가 확인되었다. PGE₂ 수준은 24시간째 대조군의 1200%까지 급격히 증가하였고, 그 시간 후 빠르게 감소하였다(표 4, 도 12). 이러한 결과를 통해 PGE₂ 검출의 적합한 시간이 12시간째임을 확인 하고, DMHE (17.4 μ g/mL)을 12시간 동안 처리하고 마찬가지로 세포내 및 세포외 PGE₂ 수준을 측정하여 각각 대조군과 비교하여 165% 및 315%까지 상승하였음을 확인하였다(표 5, 도 13).

표 4

[0137]

시간	샘플	PGE ₂ (pg/mL)
0시간	대조군	143.6
	DMHE	143.6
12시간	대조군	420.4
	DMHE	3967.1
24시간	대조군	442.9
	DMHE	5373.23
48시간	대조군	323.28
	DMHE	687.28

표 5

[0138]

샘플	Intracellular (ng/mg) (mean $\pm$ SD)	Extracellular (pg/ mL) (mean $\pm$ SD)
대조군	1.96 $\pm$ 0.18	393.67 $\pm$ 12.46
DMHE(17.4 μ g/mL)	3.24 $\pm$ 0.53*	1238.04 $\pm$ 91.76*

[0139] * p < 0.05

[0140] 실시예 5: 정량적 RT-PCR 분석

[0141] 세포내(Intra) 및 세포외(extra) PGE₂ 수준은 COX-1/2, MRP4, 15-PGDH 및 PGT의 유전자 발현 수준과 기능적 관계가 있다. 상기 유전자들에서 D. morbifera 의 영향을 알아보기 위해, HaCaT 세포에서 DMHE (17.4 μ g/mL) 처리 후 COX-1/2, MRP4 및 PGT의 mRNA 발현을 측정하였다. 분석에 사용된 DMHE (17.4 μ g/mL, 10 x ED₅₀) 농도는 이전 실험을 통해 세포독성을 가지지 않는, 충분한 15-PGDH 저해활성을 보이는 농도를 사용하였다.

[0142] 이를 위해, TRI 시약(RNAiso Plus, Takara)을 이용하여 세포로부터 전체 세포 RNA를 분리하였다. 각 RNA 샘플로부터 cDNA를 20 μ L 합성하였다 (Invitrogen, USA). PCR 반응은 4 μ L의 1:5 희석된 cDNA, 4 mM MgCl₂, 10 p mole의 각 프라이머 및 4 μ L의 Fast Starter Mix buffer (dNTPs, SYBR Green dye and Tag polymerase)을 포함하였다. RT-PCR에 활용한 프라이머 및 조건들을 이하 표에 기재된 바와 같다. 표에 기재되지 않은 5R 1, 2 프

라이머는 Qiagen Korea Ltd.(Seoul, Korea)으로부터 검증된 것을 구입하여 사용하였으며, 각각의 amplicon size는 185 bp, 119 bp이며 annealing temperature 는 60℃에서 5초, extension 은 72℃에서 8 초간 수행하였다.

표 6

Gene	Amplicon (bp)	Primer
PGT	336	Sense 5'-GGATGCTGTTTGGAGGAATC-3' (서열번호 1)
		Antisense 5'-GCACGATCCTGTCTTTGCTGA-3' (서열번호 2)
MRP4	394	Sense 5'-ACCTCTAACCGACATTCCCTG-3' (서열번호 3)
		Antisense 5'-TCAACATATTACAGCCACCAT-3' (서열번호 4)
COX-1	207	Sense 5'-CCTCATGTTTGCCTTCTTTGC-3' (서열번호 5)
		Antisense 5'-GGCGGGTACATTTCTCCATC-3' (서열번호 6)
COX-2	171	Sense 5'-GATCTACCCCTCCTCAA-3' (서열번호 7)
		Antisense 5'-GAACAACCTGCTCATCAC-3' (서열번호 8)
PSA	217	Sense 5'-CCTCCTGAAGAATCGATTCC-3' (서열번호 9)
		Antisense 5'-GAGGTCCAACACTGAAG-3' (서열번호 10)
15-PGDH	105	Sense 5'-TGCTTCAAAGCATGG CATAG-3' (서열번호 11)
		Antisense 5'-AACAAAGCCTGGACAAATGG-3' (서열번호 12)
β-actin	504	Sense 5'-GACTATGACTTAGTTGCGTT-3' (서열번호 13)
		Antisense 5'-GTTGAACTCTACATACTTCCG-3' (서열번호 14)

Gene	Hot start	Denaturation	Annealing	Extension
PGT			60 °C, 5 sec	72 °C, 12 sec
MRP4	95 °C, 1 min	95 °C, 15 sec	57 °C, 5 sec	72 °C, 16 sec
COX-1			60 °C, 5 sec	72 °C, 15 sec
COX-2			59 °C, 5 sec	72 °C, 7 sec
PSA			57 °C, 5 sec	72 °C, 9 sec
15-PGDH			60 °C, 5 sec	72 °C, 5 sec
β-actin			55 °C, 5 sec	72 °C, 21sec

그 결과, 도 14에 도시한 바와 같이, Real - time PCR 분석결과 는 DMH가 COX - 1 및 MRP4 mRNA 발현을 증가시키고, MRP4, PGT 및 15 - PGDH의 발현은 감소시킴을 나타냈다.

실시예 6 : 발모촉진 효과

휴지기에 머무르게 한(synchronized - telogen stage) 8주령의 C57BL/6 마우스를 발모 촉진 효과를 알아보기 위해 사용하였으며, 본 발명의 실시예에서 수행한 동물실험은 전남대학교 동물실험 윤리위원회(IRB)의 승인(CNU IACUC-YB-R-2012-8)을 얻어 수행하였고, 검정 색소를 휴지기로부터 성장기로의 털 모낭의 전이 증거로 간주하였다(Peters et al., 2002).

(1) 발모 효과

황칠나무의 발모 촉진 효과를 확인하기 위해, 건강한 C57BL/6 마우스(7주령, 암컷 또는 수컷)를 Damul Science Co. (대전, 한국)로부터 구입하였다

일주일 후, 모든 털의 모 낭들을 휴지기 단계에 있도록 동물 클리퍼를 사용하여 모든 동물의 등 부분의 털을 밀

었다. 동물들을 임의로 3그룹: 음성 대조군(vehicle), 양성 대조군(미녹시딜) 및 실험군(DMHE)으로 나누었다. 면도 3일 후, C57BL/ 6 마우스 등 부분 피부에 DMHE (8.7 μ g/25 μ L), 0.5% 미녹시딜 (25 μ L) 또는 vehicle 을 매일 적용시켰다. 약 처리와 함께 Vaseline (petroleum jelly cream)을 발라 약의 흡수를 도왔다. 약 처리 후 1주 및 2주일 쯤 눈으로 보이는 털 성장을 기록하였다.

[0151] 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, 일주일 후, DMHE - 및 미녹시딜 - 처리군에서 어두운 색소가 검출되었지만, 용매 대조군(vehicle control group)에서는 나타나지 않았다. 2주 후, DMHE - 및 미녹시딜 - 처리군에서는 면도한 등 부분은 완전히 털로 덮여 원래 상태로 돌아왔다.

[0152] (2) 항안드로겐 활성

[0153] 털 손실에 있어서 안드로겐이 관여함을 잘 알려져 있으므로, DM HE가 항안드로겐 활성을 가지는지 추가로 확인 해보았다. 안드로겐 수용체 시그널링 상에서의 효과를 알아보기 위해, LNCaP·FGC 세포, 안드로겐-의존성 전립 선 암세포주를 사용하였다. 전립선 암에서 PSA(Prostate s pecific antigen)는 AR 표적 유전자 중 하나이다.

[0154] 그 결과, 도 16에서와 같이, 본 발명의 황칠나무 추출물은 PSA mRNA의 DHT-유도된 발현을 저해하였다: n-Hex > EA > n-But > H₂O 추출물 순.

[0155] 또한, 도 17 내지 19에서와 같이, 플루타미드가 아닌 DMHE는 또한 DHT 합성에서 5 α RI/2 효소를 감소시킴으로써, PSA 및 15-PGDH 발현을 포함하는 표적 유전자를 농도 의존적으로 감소시켰다.

[0156] 이는 다량의 DHT 첨가에 의해 억제되었고, 이러한 결과는 DMHE의 항안드로겐 효과가 AR상에서 DHT와 경쟁적인 기작으로부터 비롯됨을 시사한다(도 20). 또한, AR의 DMHE 하향 조절된 유전자 발현 또한 플루타미드-처리된 세포에서 관찰되었다(도 18).

[0157] 실시예 7 : HFDPC(Hair follicle dermal papilla cells)의 AR 시그널링 억제 효과

[0158] 안드로겐(androgen)-의존성 세포인 LNCaP·FGC 전립선암 세포주를 통하여 확인된 황칠 추출물의 항안드로겐 효과를, AR-의존성 탈모가 진행된다고 알려진 남성형 탈모에 효과가 있는지 확인하기 위하여, 인체 두피유래의 HFDPC(primary hair follicle dermal papilla cell)을 이용하여 그 효과를 검증하고자 아래와 같은 실험을 수행하였다. 이때 본 실험을 수행하기 위한 HFDPC는 인체의 두피에서 분리한 Primary Human Follicle Dermal Papilla Cells (HFDPC) (Cat. No. C-12071, PromoCell)을 PromoCell (Heidelberg, Germany)에서 구입한 것을 사용하였고, 이것은 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)에 양성반응으로 염색된다. 또한, HFDPC는 안드로겐 리셉터(androgen receptor, AR)를 지니고 있어서 AR 시그널링 연구에 사용될 수 있으며, 본 실험에 사용된 primary HFDPC는 모두 3~4 passage를 거친 것이며, Follicle Dermal Papilla Cell 성장 배지(C-26501, PromoCell)를 이용하여 5% CO₂, 수분 공급된 37 °C 배양기에서 배양하였다. 배양된 HFDPC (5 x 10⁵ / 6 well) 을 충분하여 세포가 부착한 뒤 DMHE를 24 시간 투여하였다. 그 후 세포내 AR 타겟 유전자인 15-PGDH 및 테스토스테론을 DHT 로 전환하여 AR 에 대한 민감도 증폭에 관여하는 5 α R-1 및 5 α R-2 및 AR 의 mRNA 발현에 미치는 영향을 살펴보았다.

[0159] 그 결과, 도 21 및 도 22에 나타난 바와 같이, 본 발명의 황칠 추출물은 5 α R-1 및 5 α -R2를 농도 의존적으로 발현 억제하는 것으로 나타났고, 특히 5 α R-2 에 더 강한 억제효과를 보였다. 양성대조군으로 사용한 미녹시딜이나 bimatoprost의 경우 역시 5 α R-1 또는 5 α R-2 에 억제효과를 보였으나 본 발명의 황칠추출물처럼 농도의존적인 억제 효과는 보이지 않았다(결과 미도시).

[0160] 또한, 도 23에 나타난 바와 같이, AR의 발현 역시 미녹시딜과 황칠추출의 경우 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났고, 황칠 추출물은 AR의 타겟 유전자인 15-PGDH의 발현에도 농도 의존적으로 강한 억제효과를 보였다(도 24 참조).

[0161] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 황칠 추출물이 15-PGDH 활성 억제제로서의 역할을 충분히 지니고 있으며, 동시에 AR 시그널링을 타겟팅함으로써 15-PGDH 발현을 억제한다는 사실을 알 수 있었다. 즉 남

성탈모의 주된 요인인 AR 시그널링이 과활성화로 생기는 탈모진행은, 타겟 유전자인 15-PGDH 활성도 동시에 가져와 두피주위에 PGE2의 감소를 초래함으로써 탈모가 진행된다고 할 수 있다. 따라서 황칠추출물은 이러한 기전을 차단하여 남성형 탈모기전을 억제할 수 있는 뛰어난 효능을 지닌 물질로서 남성형 탈모 치료에 쓰일 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

[0162]

[0163]

<제제예 1> 약학적 제제의 제조

[0164]

1. 정제의 제조

[0165]

상기 실시예에서 수득한 본 발명의 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 정제는 하기와 같은 방법으로 제조하였다.

[0166]

락토오스, 전분 및 전젤라틴화 옥수수 전분을 황칠나무 추출물과 혼합한 후, 적합한 용적의 정제수를 첨가하고 분말로 과립화 시켰다. 과립을 건조시킨 후 스테아르산 마그네슘과 혼합하고 압착하여 정제를 얻었다.

[0167]

상기 정제의 구성성분은 하기와 같다.

[0168]

황칠나무 추출물	5.0 mg
----------	--------

[0169]

락토오스 BP	150.0 mg
---------	----------

[0170]

전분 BP	30.0 mg
-------	---------

[0171]

전젤라틴화 옥수수 전분 BP	15.0 mg
-----------------	---------

[0172]

스테아르산 마그네슘	1.0 mg
------------	--------

[0173]

2. 캡슐제의 제조

[0174]

본 발명의 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 캡슐제는 하기와 같은 방법으로 제조하였다.

[0175]

상기 본 발명의 황칠나무 추출물을 일정량의 부형제 및 스테아르산 마그네슘과 혼합하였다. 얻어진 혼합물을 젤라틴 캡슐 중에 충전하여 캡슐을 수득하였다.

[0176]

상기 캡슐제의 구성성분은 하기와 같다.

[0177]

황칠나무 추출물	5.0 mg
----------	--------

[0178]

전분 1500	100.0 mg
---------	----------

[0179]

스테아르산마그네슘 BP	1.0 mg
--------------	--------

[0180]

3. 주사액제의 제조

[0181]

본 발명의 황칠나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 주사액제는 하기와 같은 방법으로 제조하였다.

[0182]

적당한 용적의 주사용 염화나트륨 BP 중에 상기 식물 추출물을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 사용하여 pH 3.5로 조절하고, 이어서 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 이어서 120 ℃로 15분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액제를 얻었다.

[0183]

상기 주사액제의 구성성분은 하기와 같다.

[0184]	황칠나무 추출물	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
[0185]	끓은 염산 BP	pH 3.5로 될 때까지
[0186]	주사용 염화나트륨 BP	최대 1 ml
[0187]	<제제예 2> 외용제 조성물의 제조	
[0188]	1. 크림의 제조	
[0189]	세토스테아릴알코올	2.8 중량부
[0190]	밀납	2.6 중량부
[0191]	스테아린산	1.4 중량부
[0192]	친유형모노스테아린산글리세린	2 중량부
[0193]	피이지-100 스테아레이트	1 중량부
[0194]	세스퀴올레인산소르비탈	1.4 중량부
[0195]	호호바오일	4 중량부
[0196]	스쿠알란	3.8 중량부
[0197]	폴리소르베이트 60	1.1 중량부
[0198]	마카다이어아오일	2 중량부
[0199]	초산토코페롤	0.2 중량부
[0200]	메칠폴리실록산	0.4 중량부
[0201]	에칠파라벤	0.1 중량부
[0202]	프로필파라벤	0.1 중량부
[0203]	Euxyl K-400	0.1 중량부
[0204]	1,3-부틸렌글리콜	7 중량부
[0205]	메칠파라벤	0.05 중량부
[0206]	글리세린	6 중량부
[0207]	d-판테놀	0.2 중량부
[0208]	황칠나무 추출물	4.6 중량부
[0209]	트리에탄올아민	0.2 중량부
[0210]	pt 41891	0.2 중량부
[0211]	p-H ₂ O	46.05 중량부
[0212]	2. 로션의 제조	
[0213]	세토스테아릴알코올	1.6 중량부
[0214]	스테아린산	1.4 중량부
[0215]	친유형모노스테아린산글리세린	1.8 중량부
[0216]	피이지-100 스테아레이트	2.6 중량부

[0217]	세스퀴올레인산소르비탈	0.6 중량부
[0218]	스쿠알렌	4.8 중량부
[0219]	마카다이어아오일	2 중량부
[0220]	호호바오일	2 중량부
[0221]	초산토코페롤	0.4 중량부
[0222]	메칠폴리실록산	0.2 중량부
[0223]	에칠파라벤	0.1 중량부
[0224]	프로필파라벤	0.1 중량부
[0225]	1,3-부틸렌글리콜	4 중량부
[0226]	메칠파라벤	0.1 중량부
[0227]	산탄검	0.1 중량부
[0228]	글리세린	4 중량부
[0229]	d-판테놀	0.15 중량부
[0230]	알란토인	0.1 중량부
[0231]	황칠나무 추출물	3.5 중량부
[0232]	카르보내(2% aq. Sol)	4 중량부
[0233]	트리에탄올아민	0.15 중량부
[0234]	에탄올	3 중량부
[0235]	pt 41891	0.1 중량부
[0236]	p-H ₂ O	48.3 중량부
[0237]	<제제예 3> 팻취제의 제조	
[0238]	황칠나무 추출물	1~25 중량부
[0239]	약물방출조절제(지방산 에스테르)	1~35 중량부
[0240]	고분자 점착제(아크릴레이트)	50~95 중량부
[0241]	보습제(폴리에틸렌글리콜 200)	0.5~25 중량부
[0242]	<제제예 4> 헤어제품의 제조	
[0243]	1. 샴푸의 제조	
[0244]	본 발명의 샴푸 조성물은 하기 제제를 사용하여 제조하였다.	
[0245]	나트륨 라우레트-7-설페이트	16 중량부
[0246]	라우로일 디에탄올아미드	2.0 중량부
[0247]	황칠나무 추출물	0.5 중량부
[0248]	DI 수(DI water)	81.5 중량부

[0249] 2. 린스의 제조

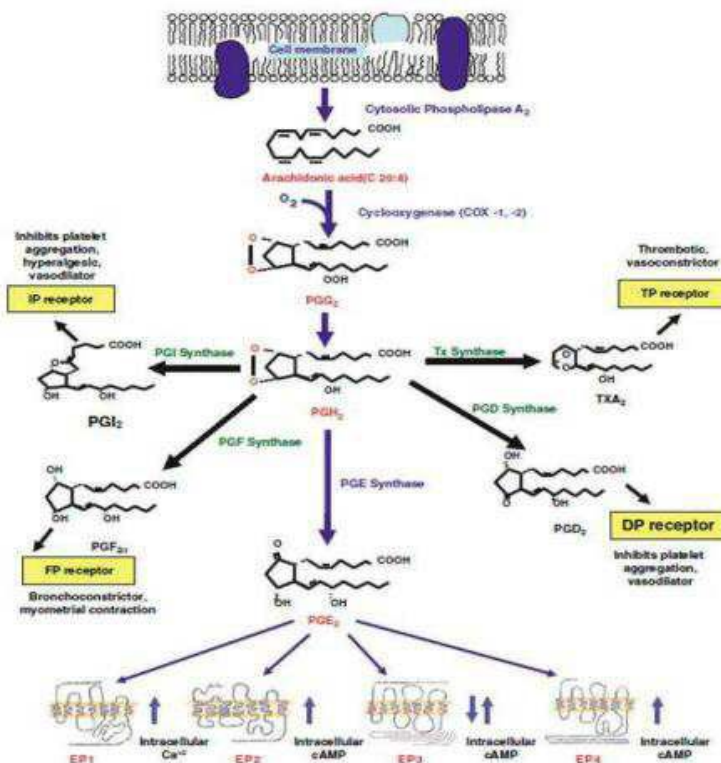
[0250] 본 발명의 린스 조성물은 하기 제제를 사용하여 제조하였다.

[0251]	배리쿠아트638	2.0 중량부
[0252]	라우로일 디에탄올아미드	2.0 중량부
[0253]	실리콘 오일(10,000의 분자량)	0.5 중량부
[0254]	황칠나무 추출물	0.5 중량부
[0255]	DI 수(DI water)	95.0 중량부

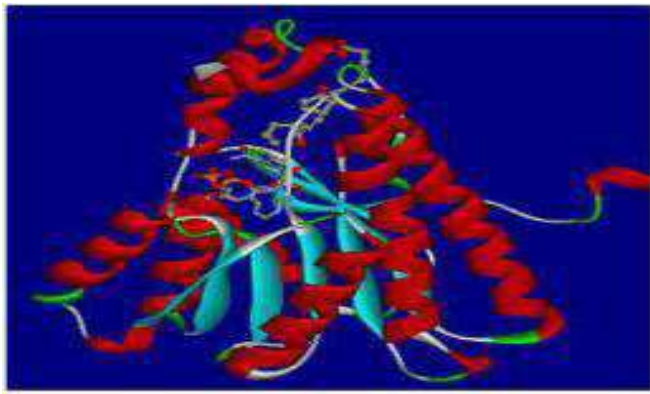
[0256] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



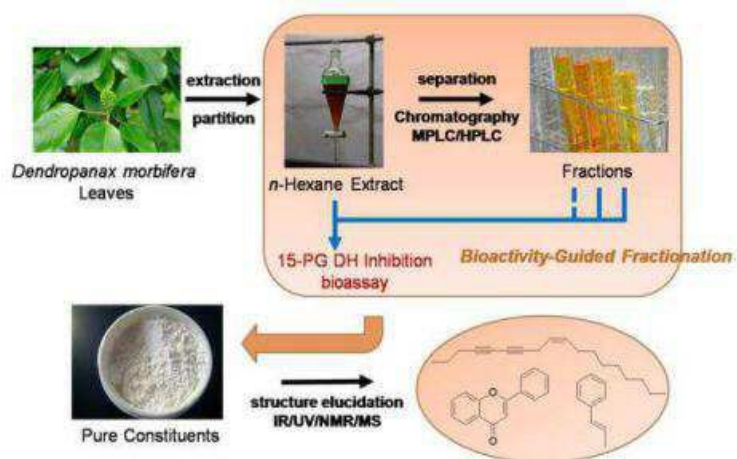
도면2



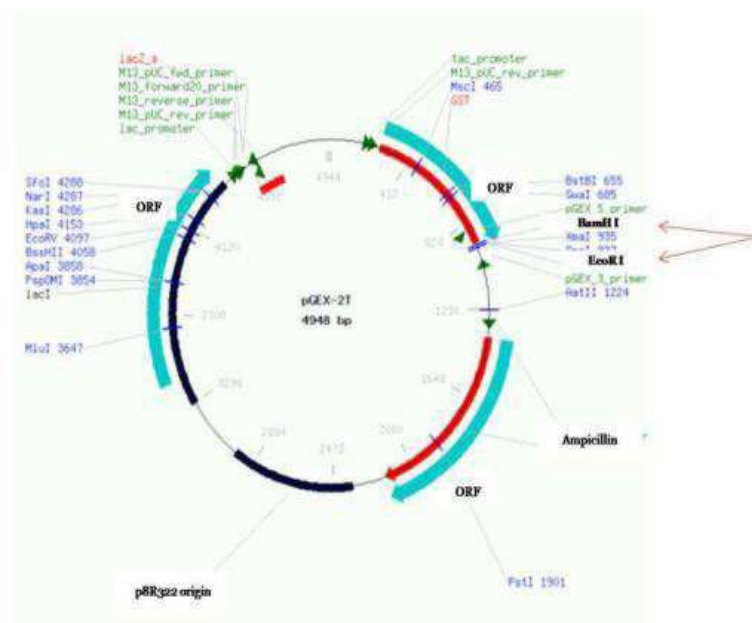
도면3



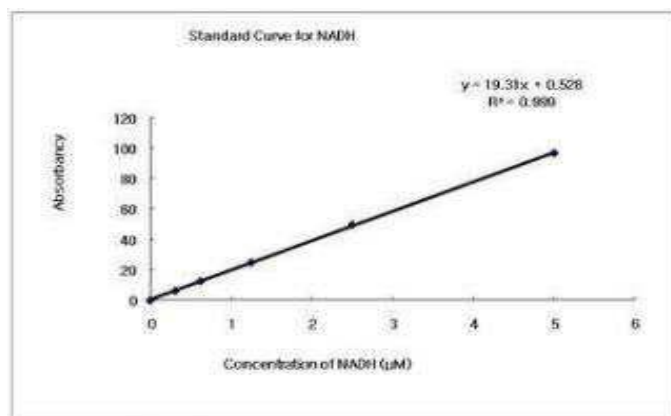
도면4



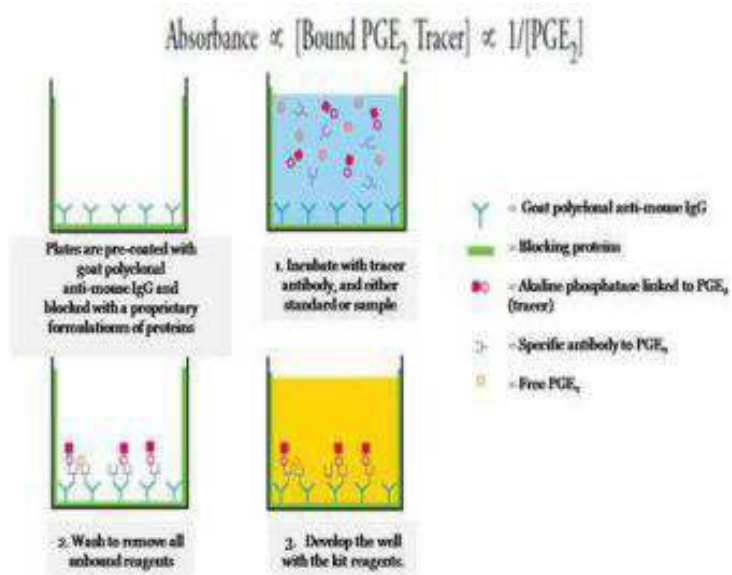
도면5



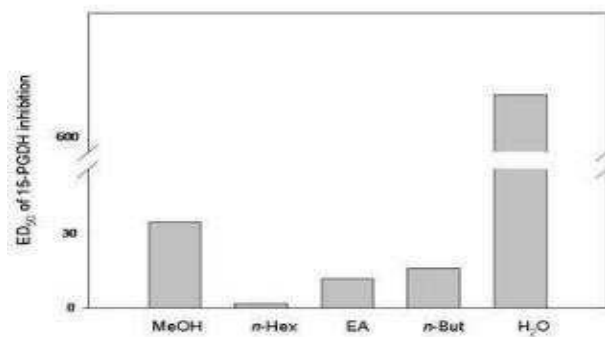
도면6



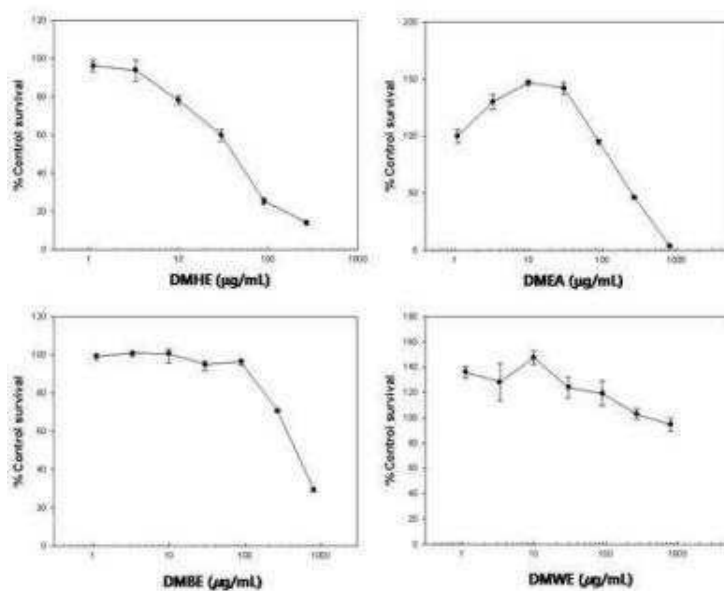
도면7



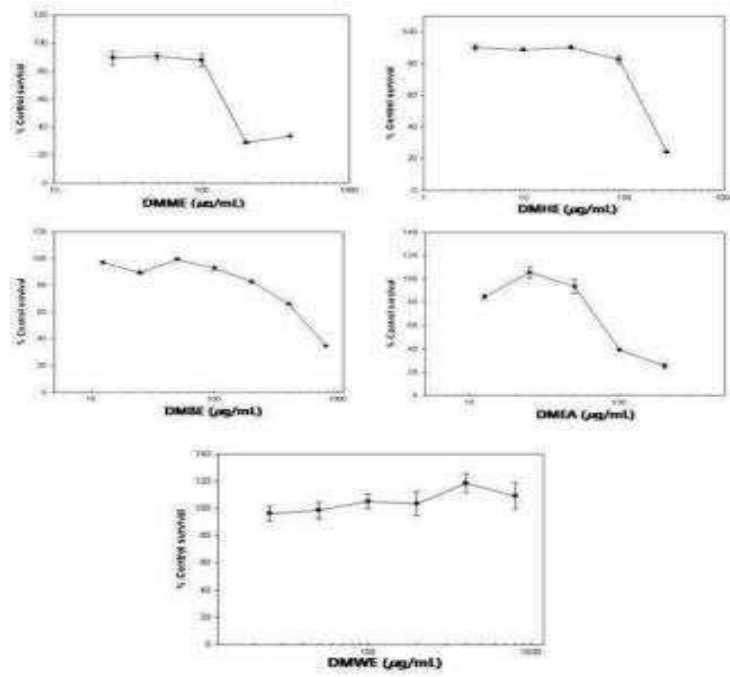
도면8



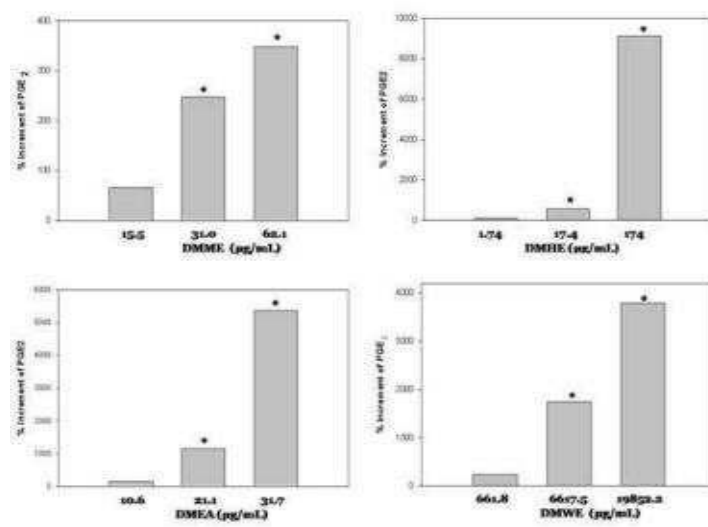
도면9



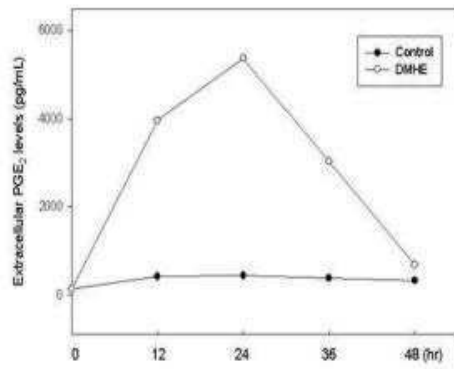
도면10



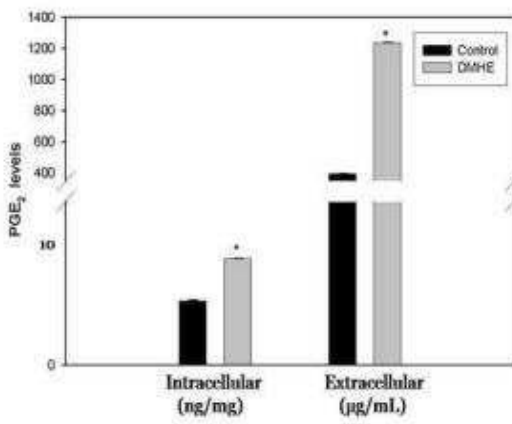
도면11



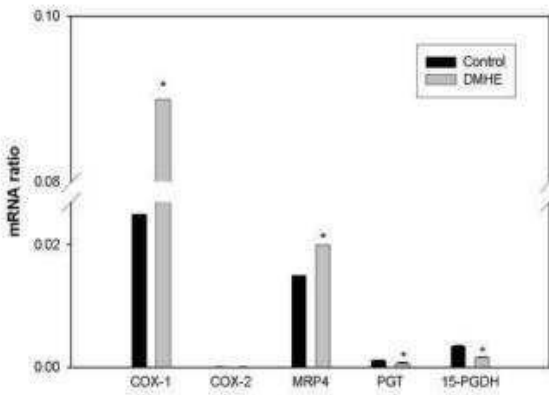
도면12



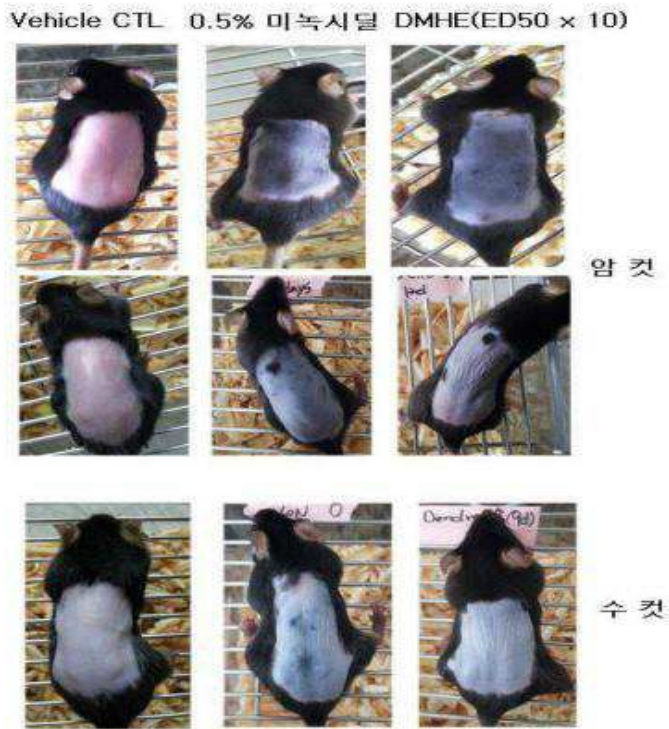
도면13



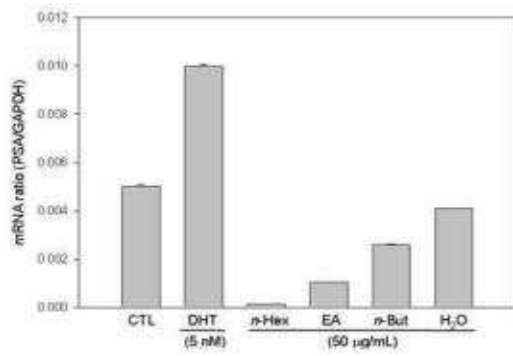
도면14



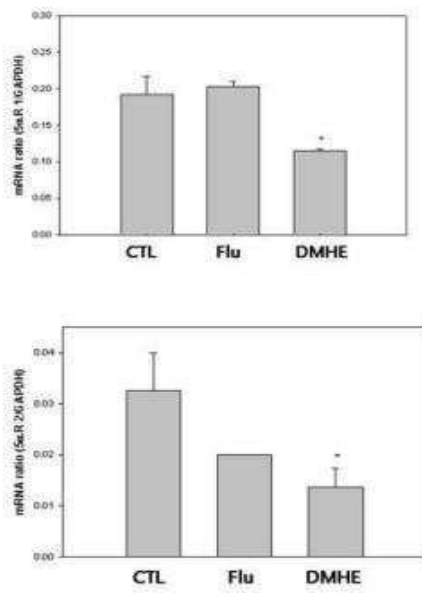
도면15



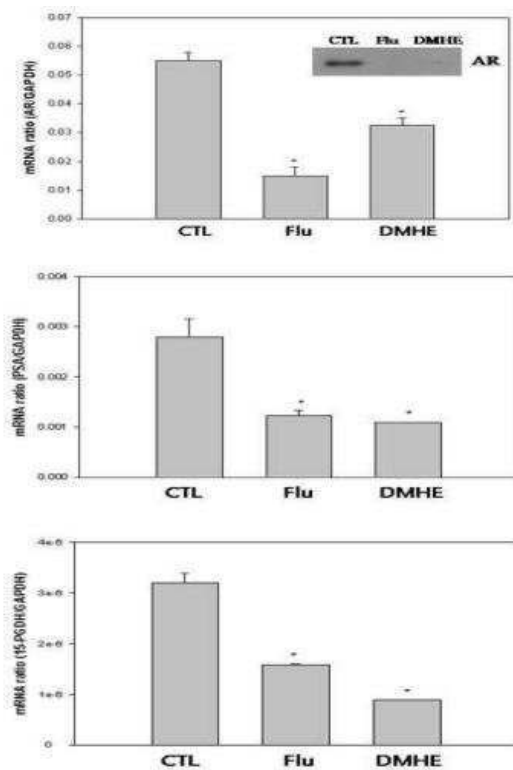
도면16



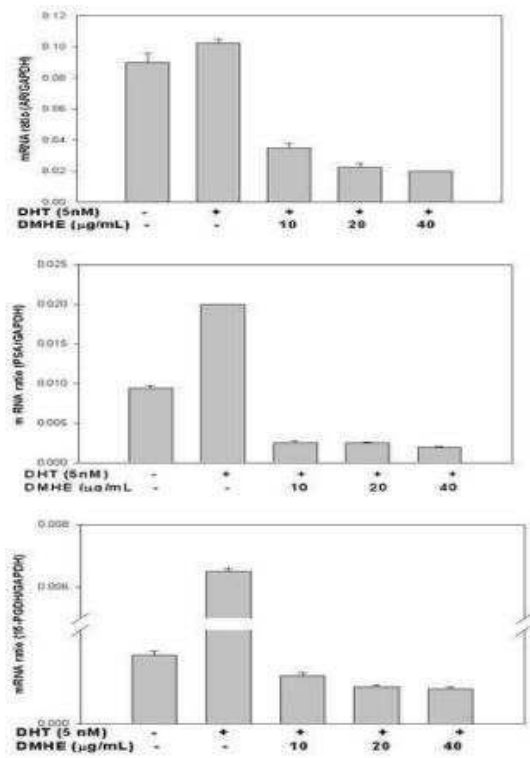
도면17



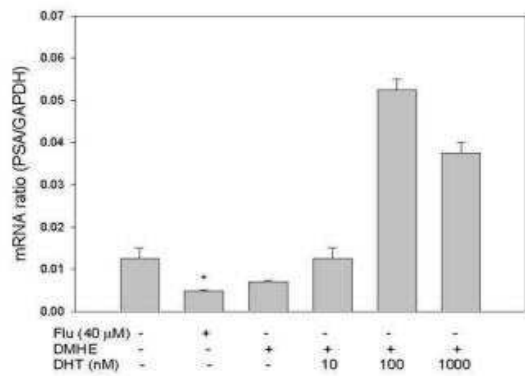
도면18



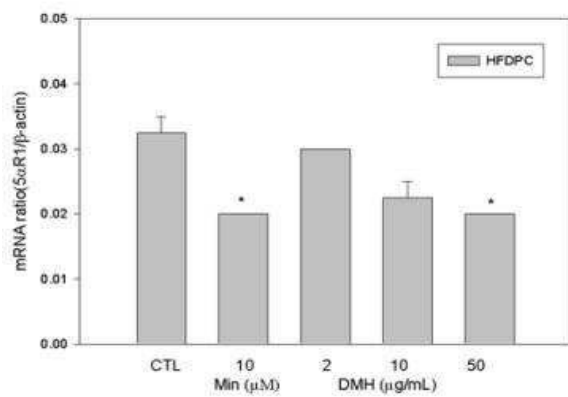
도면19



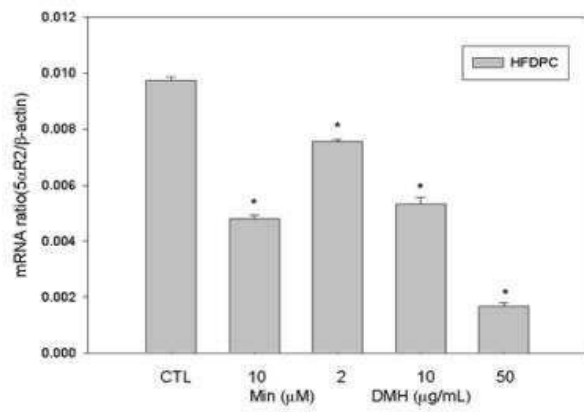
도면20



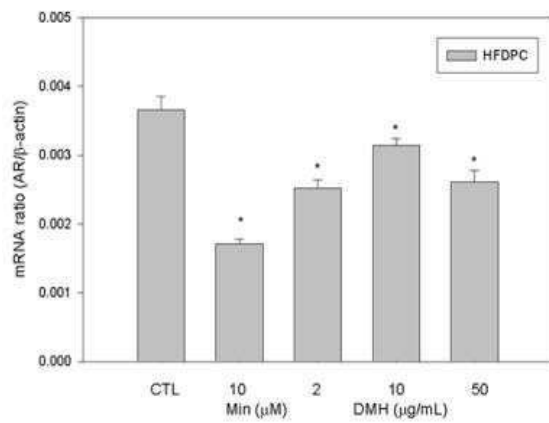
도면21



도면22



도면23



도면24

