(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0127224
(43) 공개일자 2017년11월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2017.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0057561
(22) 출원일자 2016년05월11일
심사청구일자 2016년05월11일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
박기훈
경상남도 진주시 초장로 14번길 29, 205동 402호 (초전동, 진주초전푸르지오 2단지)
김광동
경상남도 진주시 석갑로 53번길 28, 들말대경아파트 104동 901호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 10 항

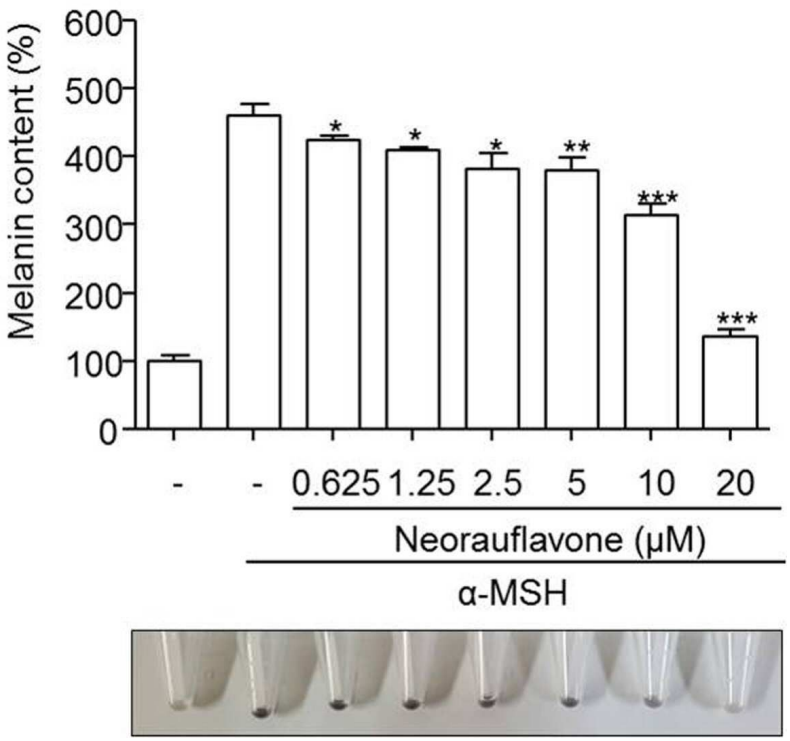
(54) 발명의 명칭 **타이로시네이즈 및 멜라닌 생성 저해 활성을 갖는 캠필로트로피스 히르텔라 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 타이로시네이즈 및 멜라닌 생성 저해 활성을 갖는 캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*) 추출물, 또는 이로부터 분리된 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 캠필로트로피스 히르텔라 뿌리의 메탄올 추출물은 농도의존적으로

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도11



타이로시네이즈 활성을 저해하였고, IC_{50}값이 20 μg/ml 농도임을 확인하였으며, 또한 상기 추출물의 분획물로부터 분리된 화합물인 Neorauflavane은 모노페놀레이즈(monophenolase)의 활성 저해에 대한 IC_{50} 값이 30 nM로, 이는 현재 표준물질로 이용되는 알부틴(albutin) 및 코지산(kojic acid) 보다 100배 이상 현저하게 높은 활성을 나타내었고, 또한 디페놀레이즈(dephenolase)의 활성 저해에 대한 IC_{50} 값이 500 nM이었으며, 또 다른 화합물인 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone은 모노페놀레이즈 및 디페놀레이즈에 대한 IC_{50} 값이 각각 2.9 μM 및 128 μM임을 확인하였으며, 또한, 캠필로트로피스 히르텔라 추출물은 농도 의존적으로 멜라닌 합성을 억제하였고, 특히 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone은 멜라닌 합성 억제에 대한 I_{C50}이 각각 13 μM 및 42.3 μM임을 확인함으로써, 캠필로트로피스 히르텔라 추출물, 및 이로부터 분리된 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone은 타이로시네이즈, 모노페놀레이즈 및 디페놀레이즈, 및 멜라닌 합성을 현저하게 억제하므로, 이를 유효성분으로 함유하는 조성물은 피부 미백용 화장료 조성물로써, 피부 화이트닝 및 라이트닝을 위한 기능성 소재로 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 8/498 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자
탄쉬에페이
경상남도 진주시 가좌길 29번길 63, 경상대학교 451동 441호

송영훈
경상남도 창원시 의창구 용지로 229, 15동 202호 (용호동, 롯데아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 3150320-4-1-SB010
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 농생명산업기술개발
연구과제명 두과 작물에서 기능성 생물소재 생산 및 표준화 기술
기 여 율 50/100
주관기관 경상대학교 산학협력단
연구기간 2015.08.14 ~ 2019.08.13
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015R1A6A1A03031413
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업 (중점연구소지원사업)
연구과제명 농생명산업 기후변화 대응기술개발
기 여 율 50/100
주관기관 경상대학교
연구기간 2015.09.01 ~ 2018.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C_1 내지 C_2 저급 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장료 조성물.

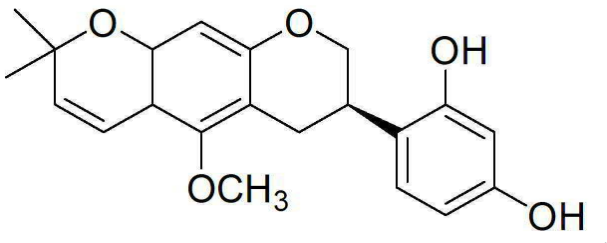
청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 타이로시네이즈(tyrosinase) 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장료 조성물.

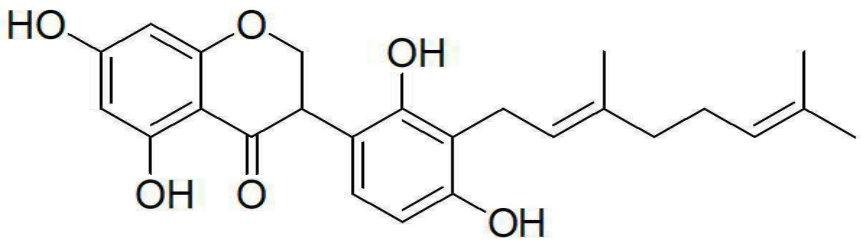
청구항 4

캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*) 추출물의 분획물로부터 분리된 하기 화학식 1 또는 2로 기재되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물:

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 화합물은 타이로시네이즈 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 타이로시네이즈의 활성 억제는 모노페놀레이즈(monophenolase) 또는 디페놀레이즈(diphenolase) 활성 억제인 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장료 조성물.

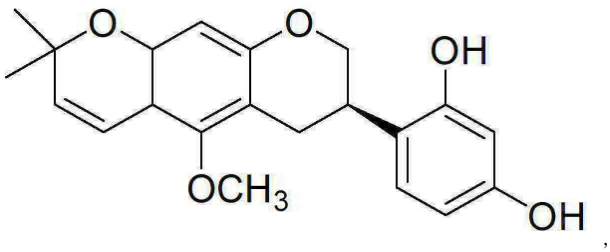
청구항 7

제 4항에 있어서, 상기 화합물은 멜라닌 합성을 억제하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 8

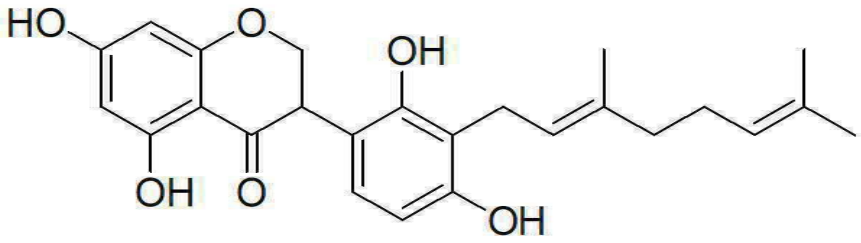
캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*) 추출물, 또는 이의 분획물로부터 분리된 하기 화학식 1 또는 2로 기재되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 건강기능식품:

[화학식 1]



,

[화학식 2]



.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 추출물은 타이로시네이즈(tyrosinase) 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 건강기능식품.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 화합물은 모노페놀레이즈(monophenolase) 또는 디페놀레이즈(diphenolase)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*) 추출물 또는 이로부터 분리한 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 타이로시네이즈(tyrosinase, EC 1.14.18.1)는 식물, 미생물, 포유동물 세포에서 일어나는 멜라닌 생합성의 가장 중요한 효소로서 타이로신을 멜라닌 생합성의 핵심 전구체인 도파퀴논(DOPA Quinone)로 전환시킨다. 이 효소는 L-타이로신(L-tyrosine)을 L-도파(DOPA, 3,4-dihydroxyphenylalanin)로 전환시키는 모노페놀레이즈(monophenolase) 기능과 L-도파를 L-도파퀴논으로 전환시키는 디페놀레이즈 (diphenolase)기능을 수행한다(J. Appl. Microbiol., 2006, 100, 219-232; Int. J. Biochem. Cell Biol., 2004, 36, 235-246). 여기서 만들어진 도파퀴논은 효소작용의 도움없이 자동적으로 멜라닌으로 전환된다. 따라서 타이로시네이즈 저해제는 멜라닌 생합성을 억제하게 된다.

[0005] 멜라닌(melanin)은 동물, 식물, 미생물 등에서 발견되는 검은 색소로 생육이나 발달에 필수적이진 않지만, 환경에 대한 생존력과 경쟁력을 높여주는 물질이다. 멜라닌은 생물체에서 발견되는 색소 중에서도 안정성이 있는 색소이고, 거의 모든 용매에 용해되지 않으며, 멜라닌 색소 합성(melanogenesis) 과정은 특별히 분화된 세포인 멜라노사이트(melanocytes)의 소기관인 멜라노좀(melanosome)에서 일어나는 것으로 밝혀졌다. 즉, 피부색은 멜라닌의 함량, 분포 등에 따라 결정되며 멜라노사이트(melanocyte) 내에서 생성된 후 세포 외부로 방출되는 멜라노좀의 수와 분포에 연관되어 있으며, 멜라닌은 자외선 광으로부터 피부를 보호하는 순기능을 가지고 있지만, 과다 생성되는 경우 기미, 주근깨 등 피부색 침착(hyperpigmentation) 및 흑색종(melanomas) 등을 유발의 중요 요인으로 알려져있다(J. Drugs Dermatol., 2004, 3, 668-678).

[0006] 또한, 타이로시네이즈는 뇌기능에 중요한 역할을 수행하는 도파민을 멜라닌으로 전환시켜, 도파민의 농도를 떨어뜨림으로써 파킨스병과 같은 퇴행성 신경질환 발생의 중요 원인으로 밝혀졌다(Neurotox. Res., 2003, 5, 165-176).

[0008] 종래, 멜라닌 생성 저해제로서 파라메톡시페놀(p-methoxy phenol), 하이드로퀴논(hydroquinone), 코직산(kojic acid) 또는 알부틴(arbutin)등이 사용되어 왔다. 그러나 이들 저해제들은 활성이 약하거나 색소 세포를 변성시켜 세포 본래의 기능을 손상시키는 등의 부작용을 나타내는 문제가 있다.

[0009] 또한, 멜라닌 생성을 저해하기 위한 목적으로 비타민 C 및 그 유도체 등이 사용되어 왔으나, 이들 역시 타이로시네이즈 저해 활성이 낮다는 문제가 있다.

[0010] 따라서, 세포독성이 낮고, 소량에 의해서도 타이로시네이즈 활성 및 멜라닌 생성을 저해할 수 있는 새로운 저해제의 개발이 시급한 실정이다(J. Agric. Food Chem., 1991, 39, 1897-1901).

[0012] 캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*)는 콩과(leguminosae)에 속하며, 중국 남부지방인 운남성 등에서 재배되는 아열대 작물로서 중국의 전통 약용식물로 이용되어왔다. 예로부터 이 식물은 생리불순을 포함한 부인병, 전립선 질환 및 위암에 이용되어 왔으며, 주요 활성 대사체로 쿠마린, 프라보노이드, 리그난, 탄닌 및 트리터펜 등이 밝혀져 있고(J. Agric. Food Chem., 2009, 57, 6712-6719; Fitoterapia, 2014, 95, 220-228), 특히 게라닐(geranyl) 기가 접합된 프라보노이드는 면역활성을 억제하는 것으로 밝혀져 있다(Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009, 19, 3389-3391). 또한, WEN, Ping 등은 캠필로트로피스 히르텔라로부터 분리된 7개 플라보노이드의 생활성(bioactivity)을 개시한 바 있으나(Journal of Shenyang Pharmaceutical University 6, 2008, 007), 상기 식물체의 타이로시네이즈 및 멜라닌 합성 억제 활성에 대해서는 현재까지 알려진 바가 없다.

[0014] 이에, 본 발명자들은 상술한 종래의 멜라닌 생성 저해제보다 우수한 타이로시네이즈 활성 또는 멜라닌 생성을 저해할 수 있는 천연소재 발굴을 위해 노력하던 중, 캠필로트로피스 히르텔라 뿌리의 메탄올 추출물이 농도 의존적으로 타이로시네이즈 활성을 저해함을 확인하였고, IC_{50}(the half maximal inhibitory concentration) 값이 20 μg/ml을 나타냄을 확인하였으며, 또한 상기 추출물의 분획물로부터 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone을 분리하였고, Neorauflavane은 모노페놀레이즈(monophenolase)의 활성

저해에 대한 IC_{50} 값이 30 nM로, 이는 현재 표준물질로 이용되는 알부틴(albutin) 및 코지산(kojic acid) 보다 100배 이상 현저하게 높은 활성이었으며, 또한 Neorauflavane은 디페놀레이즈(dephenolase)의 활성 저해에 대한 IC_{50} 값이 500 nM이었고, 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone은 모노페놀레이즈 및 디페놀레이즈에 대한 IC_{50} 값은 각각 2.9 μM 및 128 μM임을 확인하였으며, 또한, 캠필로트로피스 히르텔라 추출물은 농도 의존적으로 멜라닌 합성을 억제하였고, 특히 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone은 멜라닌 합성 억제에 대한 IC_{50}이 각각 13 μM 및 42.3 μM임을 확인함으로써, 캠필로트로피스 히르텔라 추출물, 및 이의 분획물로부터 분리된 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone은 타이로시네이즈, 모노페놀레이즈 및 디페놀레이즈, 및 멜라닌 합성에 대해 현저한 억제 활성을 나타내므로, 이를 유효성분으로 함유하는 조성물은 피부 미백용 화장료 조성물로써 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

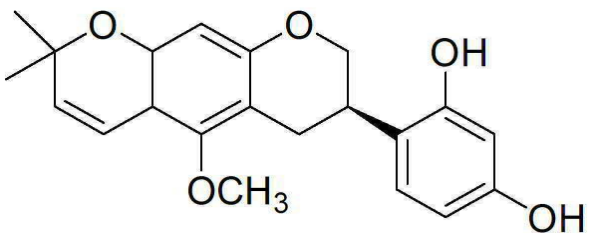
[0016] 본 발명의 목적은 타이로시네이즈 저해제 및 멜라닌 생성을 억제하는 기능을 갖는 캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*) 추출물 또는 이로부터 분리된 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone, 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

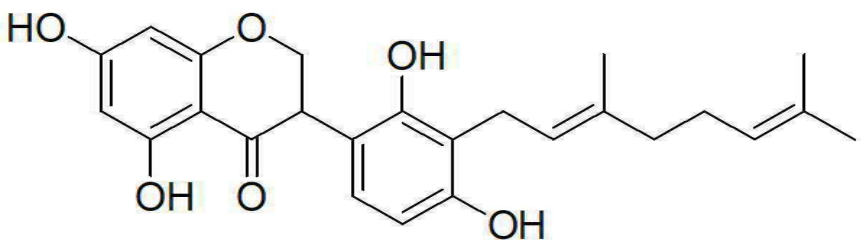
[0019] 또한, 본 발명은 캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*) 추출물의 분획물로부터 분리된 하기 화학식 1 또는 2로 기재되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0020] [화학식 1]



[0021] ,

[0022] [화학식 2]



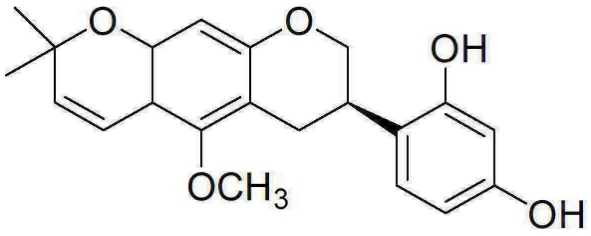
[0023] .

[0024] 아울러, 본 발명은

[0025] 캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*) 추출물, 또는 이의 분획물로부터 분리된 하기 화학식 1 또는 2로 기재되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 건강기능식품

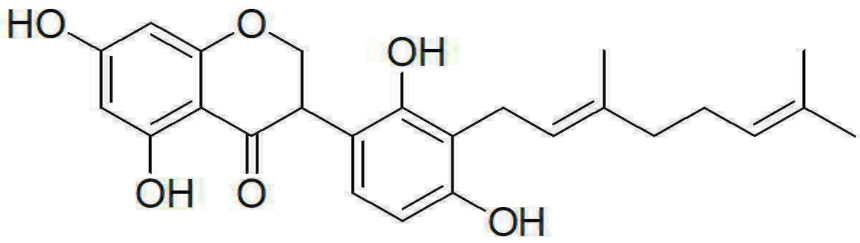
을 제공한다.

[0026] [화학식 1]



[0027] ,

[0028] [화학식 2]



[0029] .

발명의 효과

[0031] 본 발명에서 캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*) 뿌리의 메탄올 추출물은 농도 의존적으로 타이로시네이즈 활성을 저해하였고, IC_{50}(the half maximal inhibitory concentration) 값이 20 μg/ml을 나타냄을 확인하였으며, 또한 상기 추출물로부터 활성 지표물질인 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone를 분리하여, Neorauflavane은 모노페놀레이즈(monophenolase)의 활성 저해에 대한 IC_{50} 값이 30 nM로, 이는 현재 표준물질로 이용되는 알부틴(albutin) 및 코지산(kojic acid) 보다 100배 이상 현저하게 높은 활성이었으며, 또한 Neorauflavane은 디페놀레이즈(dephenolase)의 활성 저해에 대한 IC_{50} 값이 500 nM이었고, 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone은 모노페놀레이즈 및 디페놀레이즈에 대한 IC_{50} 값은 각각 2.9 μM 및 128 μM임을 확인하였으며, 또한, 캠필로트로피스 히르텔라 추출물은 농도 의존적으로 멜라닌 합성을 억제하였고, 특히 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone은 멜라닌 합성 억제에 대한 I_{C50}이 각각 13 μM 및 42.3 μM임을 확인함으로써, 캠필로트로피스 히르텔라 추출물, 이로부터 분리된 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone은 타이로시네이즈, 모노페놀레이즈 및 디페놀레이즈, 및 멜라닌 합성에 대해 현저한 억제 활성을 나타내므로, 이를 유효성분으로 함유하는 조성물은 피부 미백용 화장료 조성물로써 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 Neorauflavane의 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 2는 3'-geranyl-5,7,2',4' -tetrahydroxyisoflavanone의 ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 3은 캠필로트로피스 히르텔라 추출물의 농도별 타이로시네이즈 저해활성을 나타낸 도이다..

도 4은 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone 의 타이로시네이즈(모노페놀레이즈) 저해활성을 나타낸 도이다.

도 5는 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone 의 타이로시네이즈(디페놀레이즈) 저해활성을 나타낸 도이다.

도 6는 Neorauflavane의 타이로시네이즈(모노페놀레이즈) 저해양상을 Lineweaver-Burk plot으로 나타낸 도이다.

도 7은 Neorauflavane의 타이로시네이즈(디페놀레이즈) 저해양상을 Lineweaver-Burk plot으로 나타낸 도이다.

도 8은 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone의 타이로시네이즈(모노페놀레이즈) 저해양상을 Lineweaver-Burk plot으로 나타낸 도이다.

도 9은 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone의 타이로시네이즈(디페놀레이즈) 저해양상을 Lineweaver-Burk plot으로 나타낸 도이다.

도 10은 전-배양(Pre-incubation) 시간에 따른 Neorauflavane의 타이로시네이즈 저해 양상을 나타낸 도이다.

도 11은 캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*) 추출물로부터 분리된 화합물인 Neorauflavane의 농도별 멜라닌 생합성 저해활성의 변화를 나타낸 도이다.

도 12는 캠필로트로피스 히르텔라 추출물로부터 분리된 화합물인 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone의 농도별 멜라닌 합성 저해활성의 변화를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0037] 본 발명은 캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0038] 상기 캠필로트로피스 히르텔라 추출물 또는 이의 분획물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0039] 1) 캠필로트로피스 히르텔라에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0040] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;

[0041] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하여 캠필로트로피스 히르텔라 추출물을 제조하는 단계; 및

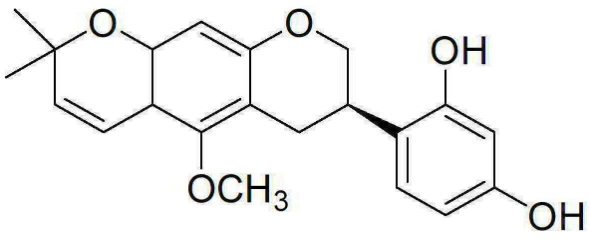
[0042] 4) 단계 3)의 캠필로트로피스 히르텔라 추출물에 추가적으로 유기용매로 추출하여 캠필로트로피스 히르텔라 분획물을 제조하는 단계.

[0043] 상기 방법에 있어서, 상기 단계 1)의 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C_1 내지 C_2 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 캠필로트로피스 히르텔라 분량에 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고, 4 내지 6배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출온도는 20℃ 내지 100℃인 것이 바람직하고, 20℃ 내지 40℃인 것이 더욱 바람직하고, 실온인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 48시간인 것이 바람직하며, 15 내지 30시간인 것이 더욱 바람직하고, 24시간인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3 내지 4회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하고, 3회인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압 농축은 진공 감압 농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

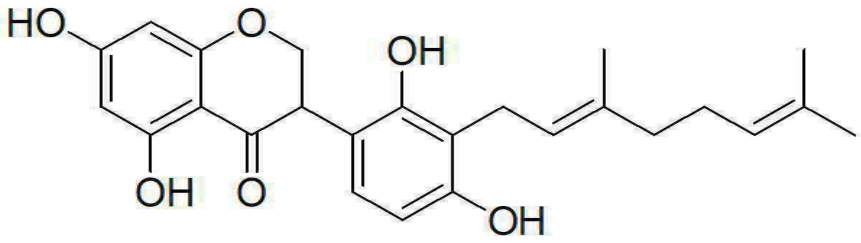
[0046] 또한, 본 발명은 캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*) 추출물의 분획물로부터 분리된 하기 화학식 1 또는 2로 기재되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0047] [화학식 1]

[0048] 

,

[0049] [화학식 2]

[0050] 

.

[0052] 또한, 상기 추출물은 타이로시네이즈(tyrosinase) 활성을 억제하는 것을 특징으로 하고, 상기 화합물은 타이로시네이즈 활성을 억제하는 것을 특징으로 하며, 상기 타이로시네이즈의 활성 억제는 모노페놀레이즈(monophenolase) 또는 디페놀레이즈(diphenolase) 활성 억제인 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 화합물은 멜라닌 합성을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0054] 본 발명은 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물뿐만 아니라, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이의 프로드럭(prodrug), 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 라세이체 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.

[0055] 본 발명은 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸이도에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트,니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 숙시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0056] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동량의 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물, 및 산 수용액 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0057] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능 한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조 시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0058] 본 발명의 약학적 조성물은 통상적으로 사용되는 부형제, 붕해제, 감미제, 활택제, 향미제 등을 추가로 포함할

수 있으며, 통상적인 방법에 의해 정제, 캅셀제, 산제, 과립제, 현탁제, 유제, 시럽제, 기타 액제로 제형화 될 수 있다.

[0060] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 100 μg/ml 농도의 캠필로트로피스 히르텔라 추출물이 타이로시네이즈의 활성을 80% 이상 억제하고, IC_{50} 값이 30 μg/ml 농도임을 확인하였다(도 3 참조). 또한, 캠필로트로피스 히르텔라의 분획물로부터 분리한 Neorauflavane은 모노페놀레이즈를 IC_{50}값이 30 nM이었으며, 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone은 2.5 μM임을 확인하였다(도 4, 도 6 및 도 8 참조).

[0061] 또한, 멜라닌 생합성 억제에 대해 Neorauflavane은 IC_{50} 값이 13 μM, 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone의 경우는 42 μM을 나타내었다(도 11 및 도 12 참조).

[0062] 따라서, 캠필로트로피스 히르텔라 추출물 및 이의 분획물로부터 분리한 화합물인 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'- tetrahydroxyisoflavanone은 타이로시네이즈 및 멜라닌 생합성의 억제 활성이 있으므로, 피부 미백용 화장료 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0064] 상기 피부 미백용 화장료 조성물은 로션, 연고, 겔, 크림, 패치 또는 분무제 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 캠필로트로피스 히르텔라 추출물, 또는 이의 분획물, 이로부터 분리된 화합물을 함유하는 피부미용 개선용 조성물을 제조함에 있어서, 통상적으로 함유되는 피부미용 개선용 조성물에 본 발명의 캠필로트로피스 히르텔라 추출물, 또는 이의 분획물, 이로부터 분리된 화합물이 3 내지 30 중량부, 바람직하게는 5 또는 20 중량부로 첨가할 수 있다.

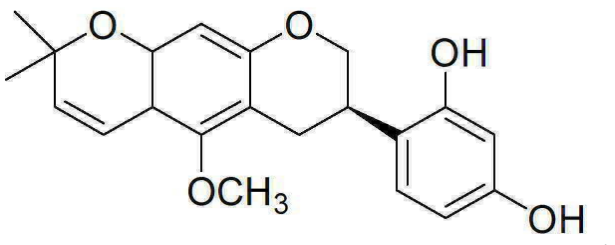
[0065] 또한, 본 발명의 조성물에는 본 발명의 캠필로트로피스 히르텔라 추출물, 또는 이의 분획물, 이로부터 분리된 화합물에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 피부미용 개선용 조성물에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.

[0066] 또한, 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

[0068] 아울러, 본 발명은

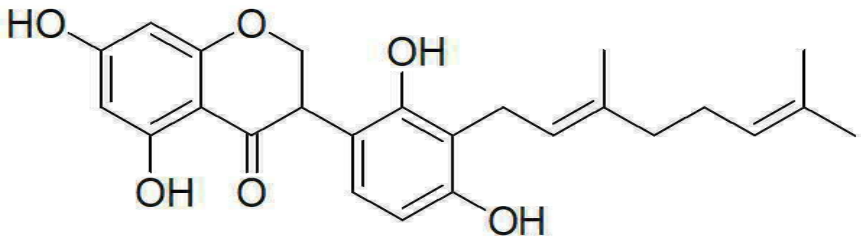
[0069] 캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*) 추출물, 또는 이의 분획물로부터 분리된 하기 화학식 1 또는 2로 기재되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 건강기능식품을 제공한다.

[0070] [화학식 1]

[0071] 

,

[0072] [화학식 2]

[0073] 

[0074] 상기 추출물은 타이로시네이즈(tyrosinase) 활성을 억제하고, 상기 화합물은 모노페놀레이즈(monophenolase) 또는 디페놀레이즈(diphenolase)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0076] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 캠필로트로피스 히르텔라 추출물이 타이로시네이즈의 활성을 80% 이상 억제하였고, 이의 분획물로부터 분리한 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'- tetrahydroxyisoflavanone가 모노페놀레이즈 및 디페놀레이즈 억제 활성을 나타내었으며, 또한, 멜라닌 생합성을 억제하였다.

[0077] 따라서, 캠필로트로피스 히르텔라 추출물 및 이의 분획물로부터 분리한 화합물인 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'- tetrahydroxyisoflavanone은 타이로시네이즈 및 멜라닌 생합성의 억제 활성이 있으므로, 이는 피부 미백용 건강기능식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0079] 본 발명의 건강기능식품은 상기 캠필로트로피스 히르텔라 추출물, 또는 이의 분획물, 이로부터 분리된 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0080] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 기능성 혼합차, 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0081] 본 발명에 따른 캠필로트로피스 히르텔라 추출물, 또는 이의 분획물, 이로부터 분리된 화합물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있는데, 일반적으로, 상기 캠필로트로피스 히르텔라 추출물, 또는 이의 분획물, 이로부터 분리된 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량으로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0082] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 캠필로트로피스 히르텔라 추출물, 또는 이의 분획물, 이로부터 분리된 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0083] 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 캠필로트로피스 히르텔라 추출물, 또는 이의 분획물, 이로부터 분리된 화합물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 캠필로트로피스 히르텔라 추출물, 또는 이의 분획물, 이로부터 분리된 화합물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0085] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의해서 상세히 설명한다.

[0086] 단, 하기 실시예, 실험예, 및 제조예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예, 실험예, 및 제조예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[0088] **<실시예 1> 캠필로트로피스 히르텔라(*Campylotropis hirtella*)추출물의 제조**

[0089] 캠필로트로피스 히르텔라 추출물을 제조하기 위하여 음건시킨 캠필로트로피스 히르텔라 뿌리(운남성, 중국) 껍질 0.5 kg 을 잘게 부수어 메탄올 5 L로 실온에서 1주일 동안 3회 반복 추출하였다. 상기과정을 통해 수득한 캠필로트로피스 히르텔라 메탄올 추출물을 감압 농축하여 흑갈색 조추출물 58 g을 수득하였다(수득율: 11.6 %).

[0091] **<실시예 2> 캠필로트로피스 히르텔라 분획물 및 활성을 나타내는 화합물의 분리 및 정제**

[0092] 상기 <실시예 1>의 방법을 이용하여 수득된 메탄올 추출물로부터 활성을 나타내는 화합물을 분리 및 정제하기 위하여, 헥산과 에틸아세테이트 혼합용매(50:1 →1:1)를 사용하여 실리카겔 크로마토그래피(230-400 메쉬)를 수행하여 5개의 분획물(A-E)을 수득하였다. 그 중, 분획물 C(3.2 g)를 메탄올과 물의 혼합용매를 이용하여 역상크로마토그래피를 수행하였고, 30개의 분획물(C1-C30)을 수득하였다. 그런 다음, 분획물(C11-C15, 520 mg)에 대해 상기와 같은 방법으로 메탄올과 물 혼합용매로 역상크로마토그래피를 수행하여, Neorauflavane (28 mg)을 순수분리 하였다. 또한, 분획물(C17-C21, 920 mg)을 세파덱스(LH-20)를 이용하여 90% 메탄올 용매로 상기와 같이 실시하였고, 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetra-hydroxyisoflavanone (96 mg)을 순수분리 하였다.

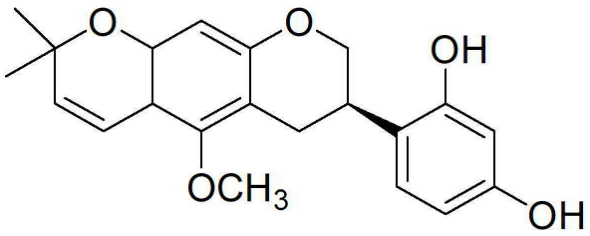
[0093] **("활성지표 화합물"은 특허법에 맞도록 모두 "화합물"로 수정하였습니다.)**

[0095] **<2-1> 캠필로트로피스 히르텔라 분획물로부터 분리된 화합물의 구조 분석**

[0096] 상기 <실시예 2>에서 분리된 2종의 화합물의 구조는 ^{1}H-NMR (500 MHz), ^{13}C-NMR (125 MHz), COSY, HMQC, HMBC 등 핵자기공명 분광법, 질량분석기, 자외선분광기, 편광기 및 원이색법 (Circular dichroism: CD)을 사용하여 수행하였고, ^{1}H-NMR (500 MHz), ^{13}C-NMR (125 MHz)에 대한 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetra-hydroxyisoflavanone의 스펙트럼 결과는 도 1 및 도 2에 나타내었고, 분석된 결과 및 각각의 화학식은 하기와 같다:

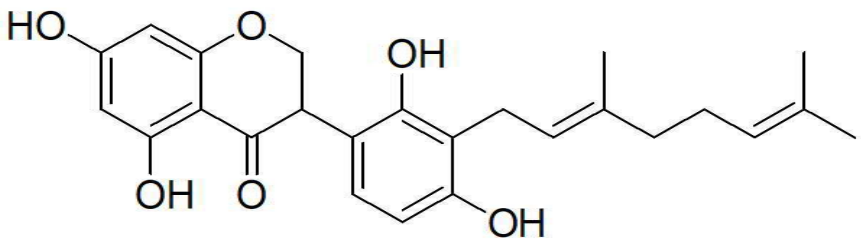
[0097] Neorauflavane; colorless powder; HREIMS $[M]^{+}$ 354.1467 (calcd for $C_{21}H_{22}O_5$ 354.1467); $[\alpha]_D$ = +3.8 (*c* 0.55, in $CHCl_3$); ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.39 (3H, s, H-8″), 1.40 (3H, s, H-7″), 2.78 (2H, dd, *J*= 15.95, 10.60 Hz, H-4), 2.96 (2H, dd, *J*= 16.00, 3.90 Hz, H-4), 3.40 (1H, br s, H-3), 3.72 (3H, s, OCH_3), 3.98 (2H, t, *J*= 20.10, 10.05 Hz, H-2), 4.26 (1H, d, *J*= 9.85 Hz, H-2), 5.51 (1H, d, *J*= 9.90, H-5″), 6.18 (1H, s, H-8), 6.26 (1H, br s, H-3′), 6.31 (1H, d, *J*= 7.70 Hz, H-5′), 6.51 (1H, d, *J*= 9.85 Hz, H-4″), 6.87 (1H, d, *J*= 8.25 Hz, H-6′). ^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 155.32 (C-4′), 155.28 (C-8a), 154.78 (C-2′), 154.11 (C-5), 152.64 (C-7), 128.26 (C-8), 128.15 (C-5″), 119.87 (C-4a), 116.95 (C-5′), 110.21 (C-1′), 108.32 (C-6), 107.74 (C-4″), 103.22 (C-6′), 100.76 (C-3′), 76.14 (C-6″), 69.83 (C-2), 61.44 (OCH_3), 31.23 (C-3), 27.77 (C-7″), 27.60 (C-8″), 25.33 (C-4).

화학식 1

[0098] 

[0100] 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone; pale yellow oil; HREIMS $[M]^+$ 424.1885 (calcd for $C_{25}H_{28}O_6$ 424.1886); ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.51 (3H, s, H-9″), 1.58 (3H, s, H-10″), 1.73 (3H, s, H-4″), 1.99 (2H, m, H-5″), 2.11 (2H, m, H-6″), 3.39 (2H, d, J= 6.59 Hz, H-1″), 3.92 (1H, t, J= 8.32, 4.16 Hz, H-3), 4.60 (2H, dd, J= 11.67, 4.39 Hz, H-2), 4.73 (2H, dd, J= 11.72, 4.47 Hz, H-2), 4.97 (1H, br s, H-7″), 5.17 (1H, t, J= 12.71, 6.29 Hz, H-2″), 5.86 (1H, br s, H-6), 5.86 (1H, br s, H-8), 6.33 (1H, d, J= 8.08 Hz, H-5′), 7.08 (1H, d, J= 8.27 Hz, H-6′). ^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 197.56 (C-4), 165.86 (C-7), 165.51 (C-5), 163.59 (C-8a), 155.76 (C-4′), 154.42 (C-2′), 139.61 (C-3″), 132.41 (C-8″), 125.95 (C-6′), 124.15 (C-7″), 121.79 (C-2″), 115.99 (C-3′), 115.43 (C-1′), 109.07 (C-5′), 102.32 (C-4a), 97.32 (C-6), 95.80 (C-8), 70.17 (C-2), 45.67 (C-3), 40.09 (C-5″), 26.78 (C-1″), 26.03 (C-9″), 23.18 (C-6″), 18.07 (C-10″), 16.60 (C-4″).

화학식 2

[0101] 

[0103] **<실험예 1> 캠필로트로피스 히르텔라 추출물 및 화합물의 타이로시네이즈(tyrosinase) 저해 활성 측정**

[0104] 상기 <실시예 1> 및 <실시예 2>에 기재된 방법으로 수행한 추출물 및화합물의 타이로시네이즈 저해 활성을 측정하기 위하여, 하기 실험을 수행하였다.

[0105] 구체적으로, 타이로시네이즈 저해효과는 Jeong 등의 방법을 이용하여 측정하였다(J. Agric. Food Chem., 2009, 57, 1195-1203). 활성측정에 사용한 타이로시네이즈와 기질인 L-tyrosine (모노페놀레이즈), L-DOPA (디페놀레이즈) 등은 시판되는 시그마알드리치사 제품(미국)을 이용하였고, 96 웰 플레이트(well plate)와 Spectra Max M3 Multi-Mode Microplate Reader(Molecular Device, 미국)을 이용하여 활성을 측정하였다. 측정에 이용된 시료는 상기 <실시예 1> 및 <실시예 2>에 기재된 방법으로 확보하였으며, 시료에 DMSO를 넣어 추출물은 10,000 μg/ml, 화합물은 10 mM 농도가 되도록 용액 (stock solution)을 만들고, 이들을 실험 목적에 맞도록 희석하여 사용하였다.

[0106] 구체적으로, 96 웰 플레이트에 0.25 M phosphate 완충용액 (PH 6.8) 165 μl 와 완충용액에 녹인 기질 1.8 mM L-tyrosine (monophenolase) 또는 3.6 mM L-DOPA (diphenolase)을 20 μl 을 넣고 5 μl 의 측정시료를 넣어 10분간 37℃에서 반응시켰다. 준비된 웰 플레이트에 완충용액에 녹인 효소(타이로시네이즈, 260 unit/ml) 10

μl를 넣고 추가로 15분간 반응시킨 뒤 Micro Plate Reader 기기로 475 nm의 흡광도에서 생성된 도파크롬(dopachrome)을 측정하였다. 효소의 저해활성은 농도별 저해 비율 또는 50% 저해하는 농도를 내삽(interpolation)에 의하여 구하고, 이를 IC_{50} 값으로 하였다. 저해 비율은 다음과 같이 계산하였다(수학식 1).

수학식 1

[0107] $$\text{타이로시네이즈 활성 (\%)} = 100[1/(1+([I]/IC_{50}))]$$

[0109] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 캠필로트로피스 히르텔라 추출물은 농도의존적으로 타이로시네이즈 활성을 저해하였다. 또한, 이들의 저해 활성 평가에서 30 μg/ml 에서 IC_{50} 을 나타내었다.

[0110] 분리한 화합물 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone 은 모노페놀레이즈 기질을 사용한 실험에서 2.9 μM, 디페놀레이즈 기질을 사용한 실험에서는 128 μM 정도의 IC_{50} 값을 나타내었다.

[0111] 또한, 분리한 화합물 Neorauflavane은 모노페놀레이즈 기질을 사용한 실험에서 30 nM, 디페놀레이즈 기질을 사용한 실험에서는 500 nM 정도의 IC_{50} 값을 나타내었으며, 상기 값은 현재 표준물질로 이용되는 코직산(Kojic acid) (모노페놀레이즈, IC_{50} = 13.2 μM), (디페놀레이즈, IC_{50} = 26.5 μM) 보다 50 ~ 400 배 이상의 현저히 높은 활성임을 확인하였다(표 1, 도 4 및 도 5).

표 1

[0112]

화합물	L-tyrosine		L-DOPA	
	IC_{50} (mM)	억제 유형(K_i, mM)	IC_{50} (mM)	억제 유형 (K_i, mM)
Neorauflavane	0.03±0.006	경쟁적 (0.019)	0.5±0.03	경쟁적 (0.13)
3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone	2.9±0.3	경쟁적 (1.8)	128.2±0.5	경쟁적 (76.4)
Kojic acid	13.2±0.8	측정 안함	26.5±1.6	측정 안함

[0114] **<실험예 2> 캠필로트로피스 히르텔라 분획물로부터 분리된 화합물 처리에 따른 타이로시네이즈 저해 메커니즘 분석**

[0115] 상기 <실시예 3> 의 결과에 따른 본 발명의 화합물 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetra-hydroxyisoflavanone이 타이로시네이즈(tyrosinase)의 활성을 어떠한 형태로 저해시키는지를 알아보기 위하여 Lineweaver-Burk plot을 통해 확인하였다.

[0116] 구체적으로, 상기 <실시예 1>의 결과를 이용하여 다양한 농도의 기질 및 다양한 농도의 저해제로 인해 반응물에서 나타나는 반응을 분광광도계 발광 값으로 분석하였다. 데이터 분석은 10분간 나타나는 발광 값의 변화 기울기로 실시하였고, 각 구간의 발광값 변화는 30초 마다 측정하여, Lineweaver-Burk plot으로 평가하였다.

[0117] 그 결과, 도 6 내지 도 9에 나타낸 바와 같이, 캠필로트로피스 히르텔라로부터 분리된 화합물을 처리하였을 때 두 가지의 기질(모노페놀레이즈, 디페놀레이즈)에 대해서 모두 Lineweaver-Burk plot에서 저해제의 농도(1/[S])에 따른 반응속도(1/[v]) 직선들이 1/v(y 축)의 한 점에서 만나는 것을 확인하였다. 따라서, Vmax는 변하지 않고 Km이 감소되는 전형적인 경쟁적 저해제로 확인하였다.

[0119] **<실험예 3> 캠필로트로피스 히르텔라로부터 분리된 화합물 처리에 따른 타이로시네이즈에 대한 시간 의존적 (Time-dependent) 저해 활성 측정**

[0120] 시간 의존적인 저해활성 및 진행 곡선(Progress curve)은 250 units 타이로시네이즈와 L-tyrosine(모노페놀레이즈), L-DOPA(디페놀레이즈)들을 기질로 사용하여 pH 6.8의 0.25 M 포타슘포스페이트 완충용액으로 37 ℃에서 실시하였다. 효소활성은 10분 동안 가시광선-자외선분광기를 이용하여 405 nm에서 측정하였다. 시간 의존성 관련 속도상수는 기질의 농도를 고정하고 저해제의 농도를 달리하여 30초 간격으로 10분간 측정하여 값을 구하였다. 데이터 분석은 Nonlinear regression program(Sigma plot. Spcc In c.Chicago, Il, USA)를 이용하여 수행하였으며, 저해 활성 규명에 중요한 파라미터인 슬로우 바인딩 저해 모델 분석은 하기 수학식 2와 수학식 3을 이용하여 계산하였다.

수학식 2

[0121] $$\frac{[P]_t}{[E]} = v_s t + \frac{(v_i - v_s)}{k_{obs}}(1 - e^{-k_{obs}t})$$

수학식 3

[0123] $$\frac{v}{v_0} = e^{(-k_{obs}t)}$$

[0124] 그 결과, 도 10A에 나타난 바와 같이, 화합물 Neorauflavane은 전-배양(Pre-incubation) 시간에 따라 활성이 증가하는 전형적인 시간 의존적인 저해양상을 나타내었고, 저해제의 농도를 증가함에 따라 초기속도(Vi)와 Steady-state rate (Vs)가 감소함을 확인하였다(도 10A). 또한, 도 10B에서 저해제의 농도를 달리하고 전-배양 후 저해 정도를 측정하였을 때도 시간 의존적인 저해양상을 확인하였다. 또한, Neorauflavane 반응시간에 따른 초기속도(K_{obs})를 화합물 농도 변화에 따른 직선 양상(R^2 = 0.98)을 나타내는 단순 가역적 느린 결합의 저해양상을 확인하였다(도 10B).

[0126] **<실험예 4> 캠필로트로피스 히르텔라로부터 분리된 화합물 처리에 따른 멜라닌(melanin) 함량의 변화 분석**

[0127] 캠필로트로피스 히르텔라 분획물로부터 분리된 화합물인 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone가 α-MSH(melanocyte-stimulating hormone)에 의해 유도된 색소침착(pigmentation)을 억제할 수 있는지를 알아보기 위해, B16F10 세포에 α-MSH 및 상기 화합물을 처리하여 72시간 동안 배양하였다.

[0128] 그 결과, 도 11 및 도 12 에 개시된 바와 같이 α-MSH 만을 처리한 경우, 세포 펠릿(pellet)이 검은색으로 변하였으나, Neorauflavane 또는 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone를 함께 처리한 경우, 펠릿의 색이 검은색에서 흰색으로 변하였다. 즉, 상기 화합물이 α-MSH에 의해 유도된 색소침착(pigmentation)을 억제함을 나타낸다. 특히, Neorauflavane은 대조구인 코직산(kojic acid)보다 약 200배 정도 높은 억제율을 나타내었고, 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone 보다 미백 활성이 현저함을 확인하였다(표 2).

표 2

[0129]

화합물	멜라닌 합성 IC_{50} (mM)	세포 독성 LD_{50} (mM)
Neorauflavane	13.0 ± 1.2	104.0 ± 1.8
3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone	42.3 ± 1.6	240.6 ± 2.9

Kojic acid*	>500	>500

[0131] **<실험예 5> 캠필로트로피스 히르텔라 분획물로부터 분리된 화합물 처리에 따른 세포 생존율(cell viability) 분석**

[0132] 캠필로트로피스 히르텔라 분획물로부터 분리된 화합물인 Neorauflavane 및 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone의 세포독성을 확인하기 위해, B16F10 세포에 다양한 농도의 Neorauflavane 또는 3'-geranyl-5,7,2',4'- tetrahydroxyisoflavanone을 처리하여 24시간 동안 배양하였으며, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석을 통하여 세포 생존율을 확인하였다.

[0133] 그 결과, 표 2에 개시된 바와 같이, Neorauflavane 또는 3'-geranyl-5,7,2',4'- tetrahydroxyisoflavanone을 처리한 경우, 세포 반수치사량(LD_{50}) 값이 Neorauflavane은 240.6 μM, 3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavanone 104 μM 으로 측정되었다(표 2).

[0135] **<제조예 1> 건강기능식품의 제조**

[0136] **<1-1> 선식의 제조**

[0137] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화한 후 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0138] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0139] 본 발명의 캠필로트로피스 히르텔라 추출물 또는 이의 분획물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0140] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및, 캠필로트로피스 히르텔라 추출물 또는 이의 분획물을 하기의 비율로 배합하여 제조하였다:

[0141] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0142] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0143] 본 발명의 캠필로트로피스 히르텔라 추출물 또는 이의 분획물(3 중량부),

[0144] 영지(0.5 중량부), 및 지황(0.5 중량부).

[0146] **<1-2> 건강 음료의 제조**

[0147] 본 발명의 캠필로트로피스 히르텔라 추출물

[0148] 또는 이의 분획물 100 mg

[0149] 구연산 100 mg

[0150] 올리고당 100 mg

[0151] 매실농축액 2 mg

[0152] 타우린 100 mg

[0153] 정제수를 가하여 전체 500 mℓ

[0154] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1 시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 1 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하여 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0155] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였으나, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0157] **<제조예 2> 피부미용 개선용 조성물의 제조**

[0158] **<2-1> 크림의 제조**

[0159] 본 발명의 캠필로트로피스 히르텔라 추출물 또는

[0160]	이의 분획물	4.6 중량부
[0161]	세토스테아릴알코올	2.8 중량부
[0162]	밀납	2.6 중량부
[0163]	스테아린산	1.4 중량부
[0164]	친유형모노스테아린산글리세린	2 중량부
[0165]	피이지-100 스테아레이트	1 중량부
[0166]	세스퀴올레인산소르비탈	1.4 중량부
[0167]	호호바오일	4 중량부
[0168]	스쿠알란	3.8 중량부
[0169]	폴리소르베이트 60	1.1 중량부
[0170]	마카다이아오일	2 중량부
[0171]	초산토코페롤	0.2 중량부
[0172]	메칠폴리실록산	0.4 중량부
[0173]	에칠파라벤	0.1 중량부
[0174]	프로필파라벤	0.1 중량부
[0175]	Euxyl K-400	0.1 중량부
[0176]	1,3-부칠렌글리콜	7 중량부
[0177]	메칠파라벤	0.05 중량부
[0178]	글리세린	6 중량부
[0179]	d-판데놀	0.2 중량부
[0180]	트리에탄올아민	0.2 중량부
[0181]	pt 41891	0.2 중량부
[0182]	p-H_2O	46.05 중량부

[0184] **<2-2> 로션의 제조**

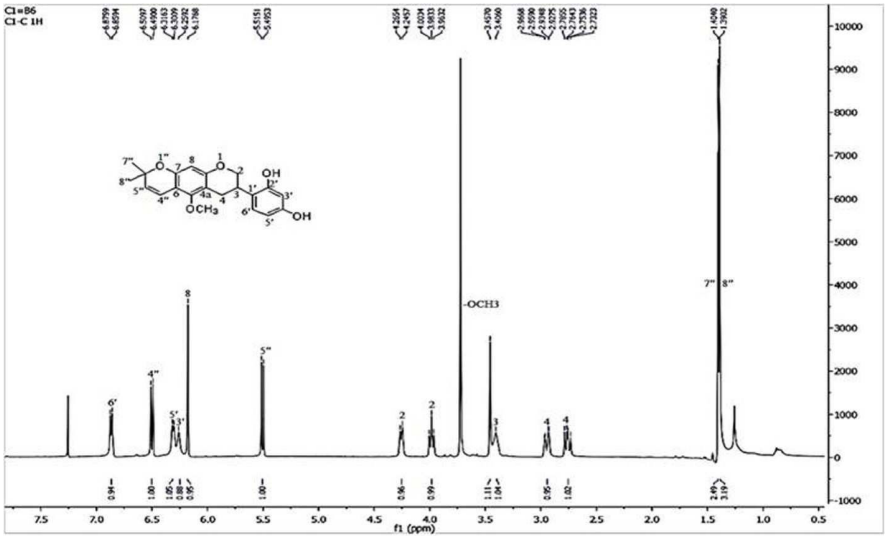
[0185] 본 발명의 캠필로트로피스 히르텔라 추출물 또는

[0186]	이의 분획물	3.5 중량부
[0187]	세토스테아릴알코올	1.6 중량부
[0188]	스테아린산	1.4 중량부
[0189]	친유형모노스테아린산글리세린	1.8 중량부

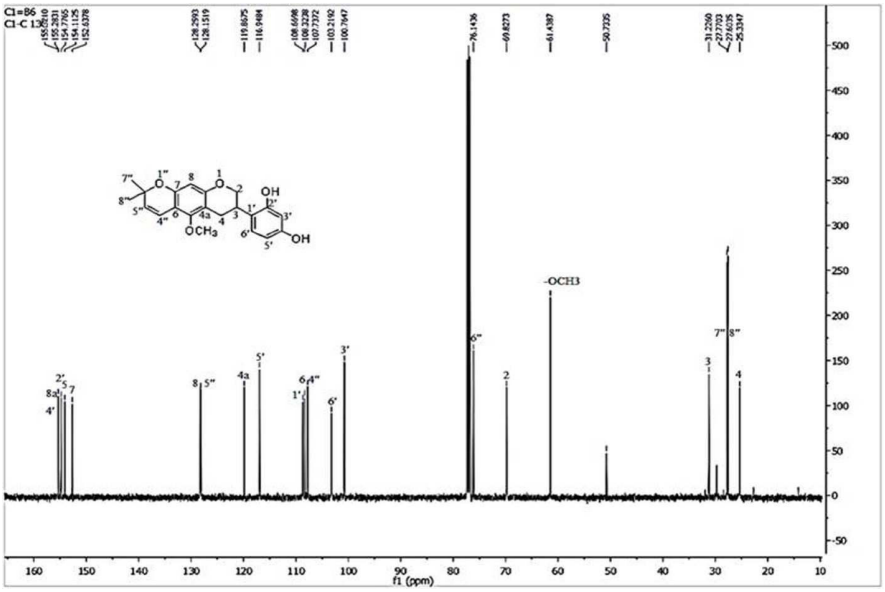
[0190]	피이지-100 스테아레이트	2.6 중량부
[0191]	세스퀴올레인산소르비탈	0.6 중량부
[0192]	스쿠알렌	4.8 중량부
[0193]	마카다이아오일	2 중량부
[0194]	호호바오일	2 중량부
[0195]	초산토코페롤	0.4 중량부
[0196]	메칠폴리실록산	0.2 중량부
[0197]	에칠파라벤	0.1 중량부
[0198]	프로필파라벤	0.1 중량부
[0199]	1,3-부칠렌글리콜	4 중량부
[0200]	메칠파라벤	0.1 중량부
[0201]	산탄검	0.1 중량부
[0202]	글리세린	4 중량부
[0203]	d-판데놀	0.15 중량부
[0204]	알란토인	0.1 중량부
[0205]	카르보내(2% aq. Sol)	4 중량부
[0206]	트리에탄올아민	0.15 중량부
[0207]	에탄올	3 중량부
[0208]	pt 41891	0.1 중량부
[0209]	p-H_2O	48.3 중량부

도면

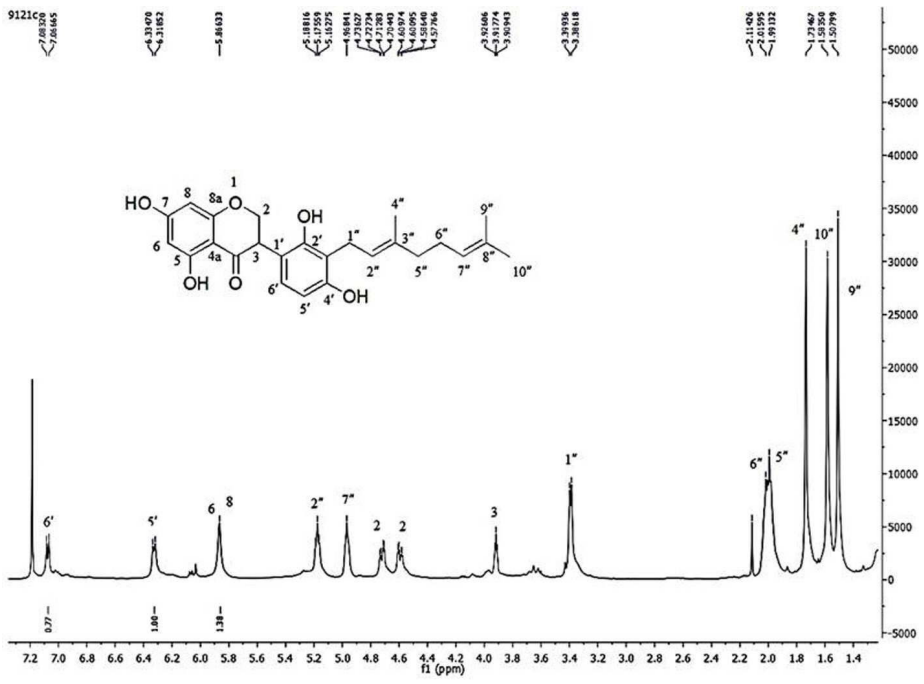
도면1a



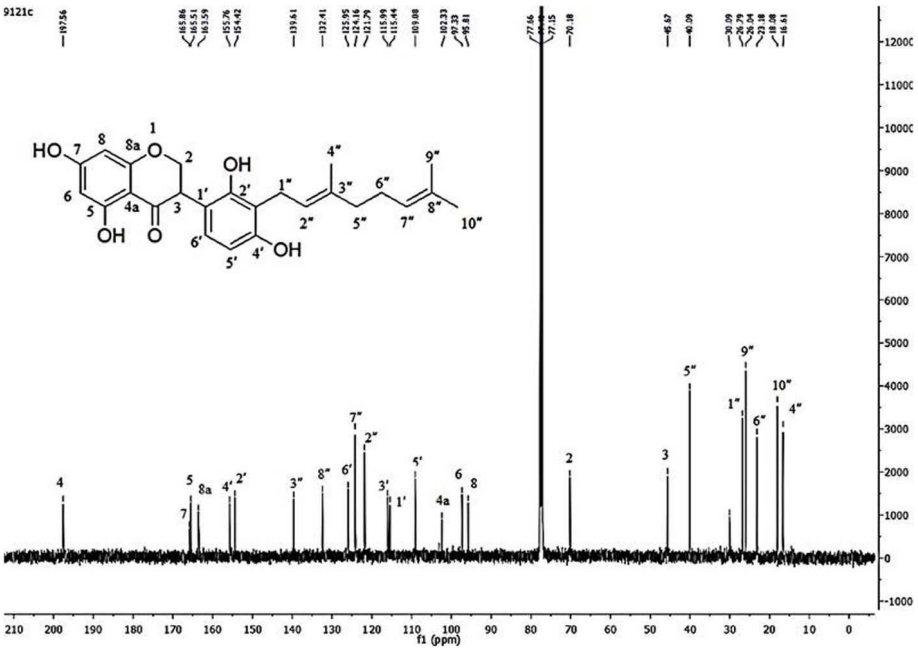
도면1b



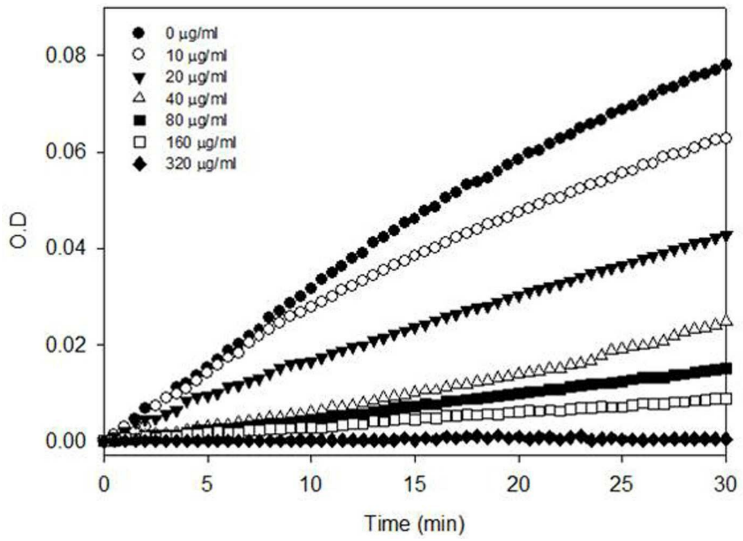
도면2a



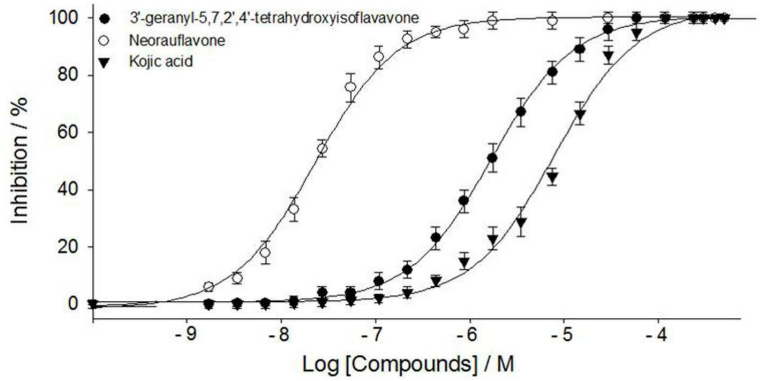
도면2b


9121c
HO
OH
OH
OH
O
f1 (ppm)

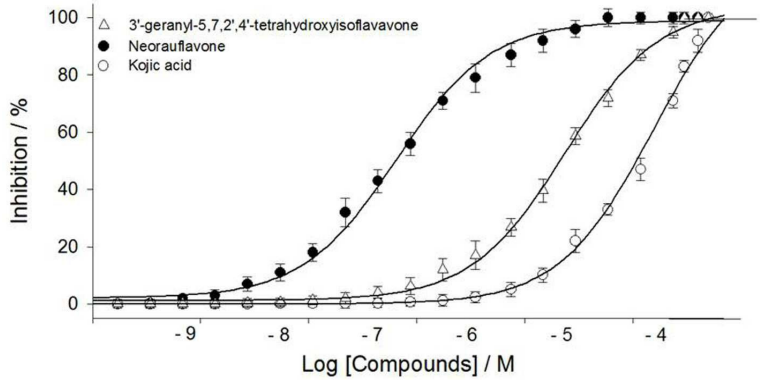
도면3


0 μg/ml
10 μg/ml
20 μg/ml
40 μg/ml
80 μg/ml
160 μg/ml
320 μg/ml
O.D
Time (min)

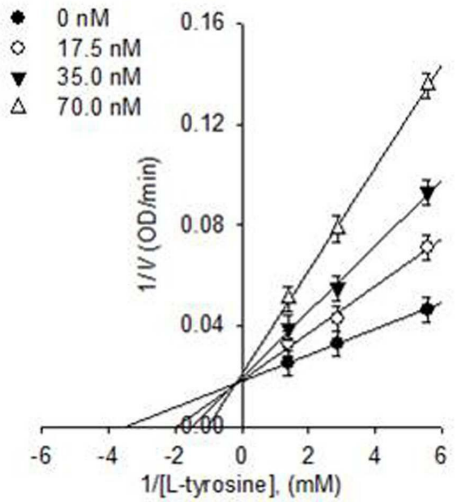
도면4


3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavavone
Neorauflavone
Kojic acid
Inhibition / %
Log [Compounds] / M

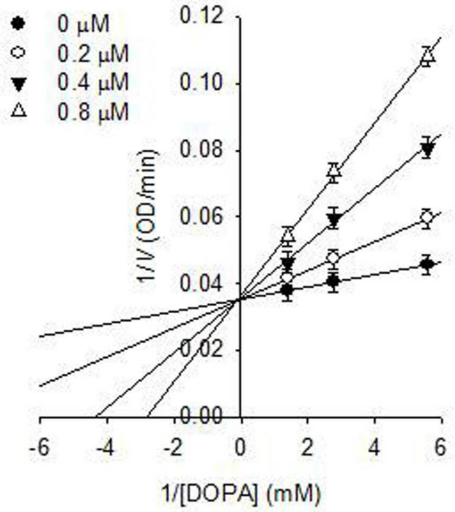
도면5


3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavavone
Neorauflavone
Kojic acid
Inhibition / %
Log [Compounds] / M

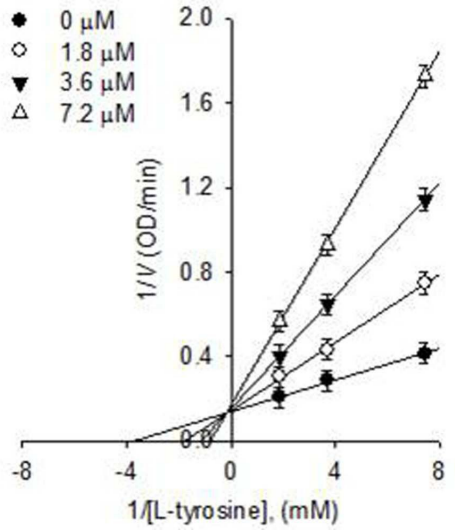
도면6


0 nM
17.5 nM
35.0 nM
70.0 nM
1/V (OD/min)
1/[L-tyrosine], (mM)

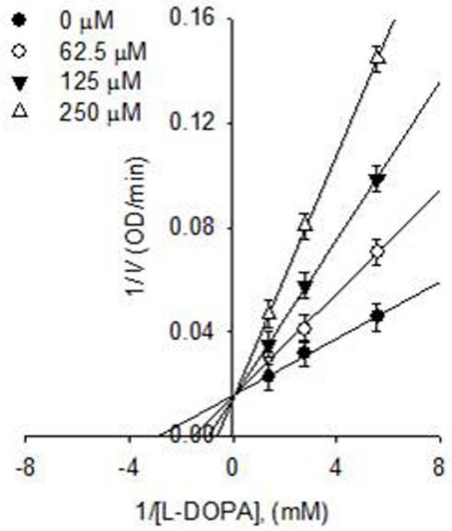
도면7


0 μM
0.2 μM
0.4 μM
0.8 μM
1/V (OD/min)
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
-6
-4
-2
0
2
4
6
1/[DOPA] (mM)

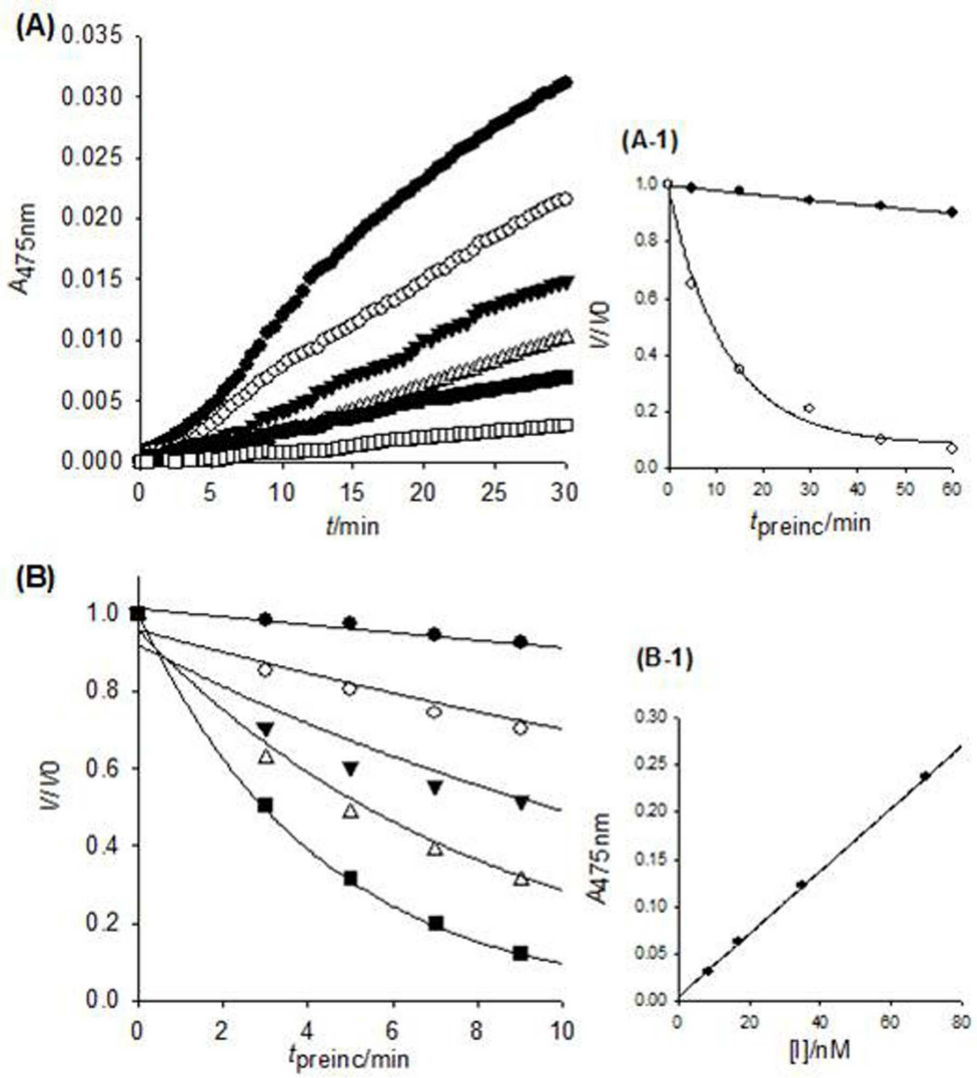
도면8


0 μM
1.8 μM
3.6 μM
7.2 μM
1/V (OD/min)
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
-8
-4
0
4
8
1/[L-tyrosine], (mM)

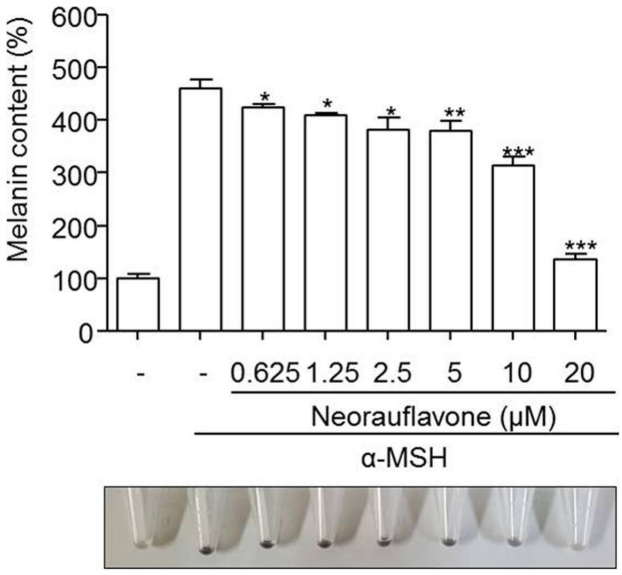
도면9


0 μM
62.5 μM
125 μM
250 μM
0.16
0.12
0.08
0.04
0.00
1/V (OD/min)
-8
-4
0
4
8
1/[L-DOPA], (mM)

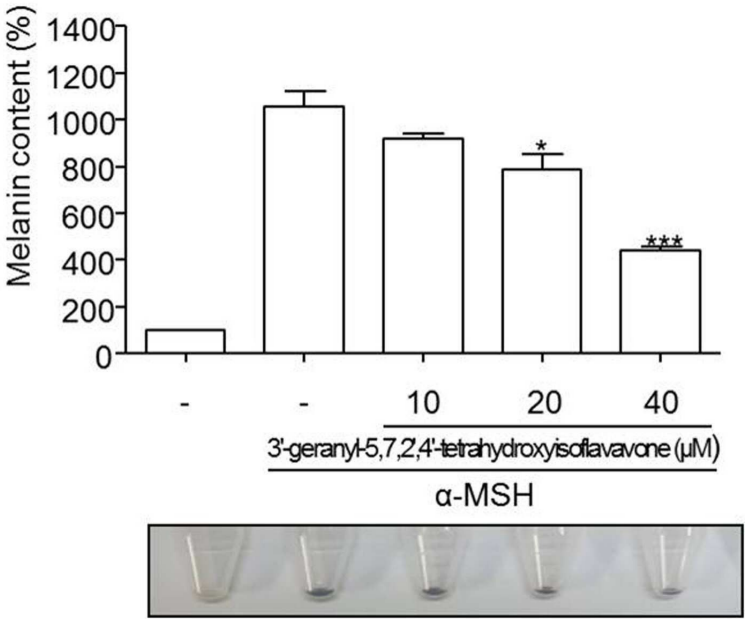
도면10


(A)
A475nm
t/min
(A-1)
V/V0
tpreinc/min
(B)
V/V0
tpreinc/min
(B-1)
A475nm
[I]/nM

도면11


Melanin content (%)
- - 0.625 1.25 2.5 5 10 20
Neorauflavone (μM)
α-MSH

도면12


Melanin content (%)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
*
***
-
-
10
20
40
3'-geranyl-5,7,2',4'-tetrahydroxyisoflavavone (μM)
α-MSH