



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0055340
(43) 공개일자 2020년05월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) A23L 3/3472 (2006.01)
A23L 3/3544 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A23L 3/3472 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0138888
(22) 출원일자 2018년11월13일
심사청구일자 2018년11월13일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
전북대학교산학협력단
전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567 (덕진동1
가)
(72) 발명자
최재수
부산광역시 남구 오륙도로 85, 109동 204호(용호
동, 오륙도 에스케이뷰 아파트)
장현아
전라북도 전주시 덕진구 송천3길 55, 101동 1105
호(송천동1가, 벽산 e리버파크)
(74) 대리인
위병갑

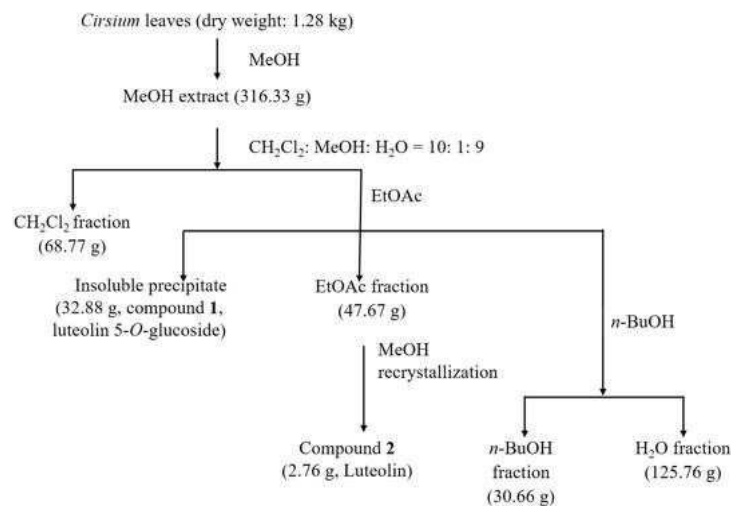
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **영경귀 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물**

(57) 요약

본 발명은 영경귀 추출물, 이의 분획물, 영경귀 유래의 루테올린 또는 루테올린 5-O-글루코사이드를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물 또는 식품의 갈변 방지용 조성물에 관한 것으로서, 상기 조성물은 티로시나제에 대한 억제 활성을 가짐으로써 피부 미백 뿐만 아니라 식품의 갈변 방지 효과가 있어 화장품 분야 및 식품 분야에서 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 3/3544 (2013.01)

A61K 8/498 (2013.01)

A61K 8/602 (2013.01)

A61Q 19/02 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/02 (2013.01)

A61K 2800/782 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

영경귀(*Cirsium maackii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 물, 유기 용매 또는 이들의 혼합물에 의해 추출된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 유기 용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산 및 시클로헥산으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 분획물은 디클로로메탄 분획물, 에틸아세테이트 분획물, *n*-부탄올 또는 물 분획물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

루테올린(luteolin) 또는 루테올린 5-*O*-글루코사이드(luteolin 5-*O*-glucoside)를 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 루테올린 또는 루테올린 5-*O*-글루코사이드는 영경귀(*Cirsium maackii*)에서 유래된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 루테올린은 티로시나제에 대한 비경쟁적 억제 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 루테올린 5-*O*-글루코사이드는 티로시나제에 대한 경쟁적 억제 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

영경귀(*Cirsium maackii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 식품의 갈변 방지용 조성물.

청구항 10

루테올린(luteolin) 또는 루테올린 5-*O*-글루코사이드(luteolin 5-*O*-glucoside)를 유효성분으로 포함하는 식품의 갈변 방지용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 엉겅퀴 추출물, 이의 분획물 또는 엉겅퀴 유래 화합물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물 및 식품의 갈변 방지용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 식품 가공 과정에서 발생하는 바람직하지 않은 변색은 식품 기술자에게 꾸준한 관심사로서, 이러한 변색의 원인 중 하나가 갈변(browning)이며, 갈변은 식품의 관능적 특성 및 영양적 품질에서의 감소를 야기할 수 있다 (J. Agric. Food Chem. 44 (3), 631-653, 1996; 및 Trends Food Sci. Technol. 6 (6), 195-200, 1995). 식품의 갈변은 퀸론을 형성하는 페놀계 화합물의 효소적 산화에 의해 시작될 수 있고, 퀸론은 빠르게 갈색 폴리머인 멜라닌(melanin)을 형성하는 것으로 알려져 있다 (Trends Food Sci. Technol. 6 (6), 195-200, 1995). 인간의 피부, 머리카락 및 눈의 색깔 역시 멜라닌 색소의 분포에 의해 결정된다 (FASEB J. 5 (14), 2902-2909, 1991). 멜라닌은 태양의 자외선 (ultra-violet radiation)으로부터 피부를 보호하며, 피부에서 생산된 자유 라디칼을 흡수하는 것으로 알려져 있다 (J Photochem Photobiol B. 3, 637-675, 2001). 그러나, 멜라닌의 과생산은 다양한 피부병을 일으킬 수 있다.
- [0003] 티로시나제 (tyrosinase)는 멜라닌 형성을 촉매하는 중요한 효소로서, 효소의 손상은 멜라닌 형성의 억제를 유도할 수 있다 (Science, 217 (4565), 1163-1165, 1982). 금속 단백질(metalloprotein) 그룹에 속한 티로시나제는 활성 부위에 2개의 구리 원자를 가지고 있다. 이것의 기능은 크리솔라제(cresolase) 활성 및 카테콜라제(catecholase) 활성에서 산소 분자의 존재 하에 각각 monophenol에서 *ortho*-diphenol로의 하이드록실화(hydroxylation) 및 *ortho*-diphenol에서 *ortho*-quinone으로의 산화(oxidation)에 관여한다 (Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol. 1247 (1), 1-11, 1995). 티로시나제는 멜라닌 생성에서 속도제한 효소(rate-limiting enzyme)이므로, 식품 및 화장품 분야에서는 이러한 티로시나제 활성을 억제하는 화합물, 특히, 천연물에 대한 수요가 증가하고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1766233호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 엉겅퀴(*Cirsium maackii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은 루테올린(luteolin) 또는 루테올린 5-*O*-글루코사이드(luteolin 5-*O*-glucoside)를 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 엉겅퀴(*Cirsium maackii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 식품의 갈변 방지용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 루테올린(luteolin) 또는 루테올린 5-*O*-글루코사이드(luteolin 5-*O*-glucoside)를 유효성분으로 포함하는 식품의 갈변 방지용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 엉겅퀴(*Cirsium maackii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 물, 유기 용매 또는 이들의 혼합물에 의해 추출된 것일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유기 용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산 및 시클로헥산으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 분획물은 디클로로메탄 분획물, 에틸아세테이트 분획물, *n*-부탄올 또는 물 분획물인 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물 또는 분획물은 조성물의 총 중량에 대해 0.01 내지 50 중량%로 포함되는 것일 수 있고, 바람직하게는 0.1 내지 30 중량%로 포함되는 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 1 내지 20 중량%로 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 또한, 본 발명은 루테올린(luteolin) 또는 루테올린 5-*O*-글루코사이드(luteolin 5-*O*-glucoside)를 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 루테올린 또는 루테올린 5-*O*-글루코사이드는 엉겅퀴(*Cirsium maackii*)에서 유래된 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 루테올린은 티로시나제에 대한 비경쟁적 억제 활성을 가지는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 루테올린 5-*O*-글루코사이드는 티로시나제에 대한 경쟁적 억제 활성을 가지는 것일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 엉겅퀴(*Cirsium maackii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 식품의 갈변 방지용 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 루테올린(luteolin) 또는 루테올린 5-*O*-글루코사이드(luteolin 5-*O*-glucoside)를 유효성분으로 포함하는 식품의 갈변 방지용 조성물을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 엉겅퀴(*Cirsium maackii*) 추출물 또는 이의 분획물을 식품에 처리하는 단계를 포함하는 식품의 갈변 방지 방법을 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 루테올린(luteolin) 또는 루테올린 5-*O*-글루코사이드(luteolin 5-*O*-glucoside)를 식품에 처리하는 단계를 포함하는 식품의 갈변 방지 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따른 조성물은 티로시나제에 대한 비경쟁적 또는 경쟁적 억제 활성을 가짐으로써 피부 미백 뿐만 아니라 식품의 갈변 방지 효과가 있어 화장품 분야 및 식품 분야에서 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 엉겅퀴(*Cirsium maackii*) 잎에서의 추출, 분획 및 분리를 나타낸 것이다.
- 도 2는 HPLC 분석 결과로서, (A)는 엉겅퀴 잎의 메탄올 추출물에 대한 것이고, (B)는 엉겅퀴 잎의 분획물에 대한 것이며, (C)는 디클로로메탄(CH_2Cl_2) 분획물에 대한 것이고, (D)는 에틸아세테이트-물($\text{EtOAc-H}_2\text{O}$) 분획에서 불용성 침전물(insoluble precipitates)에 대한 것이며, (E)는 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물에 대한 것이고, (F)는 *n*-부탄올(*n*-BuOH) 분획물에 대한 것이며, (G)는 물(H_2O) 분획물에 대한 것이다 (Peak 1: 루테올린-5-*O*-글루코사이드 (27.87 분); 및 Peak 2: 루테올린 (42.04 분)).

도 3은 루테올린 (luteolin), 루테올린 5-*O*-글루코사이드 (luteolin 5-*O*-glucoside), 루테올린 7-*O*-글루코사이드 (luteolin 7-*O*-glucoside), 네오헤스페리딘 (neohesperidin) 및 3',4',7-트리하이드록시플라본 (3',4',7-trihydroxyflavone)의 구조를 나타낸 것이다.

도 4는 기질로서 L-티로신 (위쪽 패널) 및 L-DOPA (아래쪽 패널)를 사용하여, 루테올린, 루테올린 5-*O*-글루코사이드, 루테올린 7-*O*-글루코사이드, 네오헤스페리딘, 3',4',7-트리하이드록시플라본 및 양성 대조군인 코지산 (kojic acid)에 대한 버섯 티로시나제 억제 활성을 분석한 결과를 나타낸 것이다 (error bar는 SEM (standard error of the mean)을 나타냄).

도 5는 기질로서 L-티로신을 사용하여, 루테올린에 대한 버섯 티로시나제의 억제 활성을 Lineweaver-Burk plot (A) 및 Dixon plot (B)으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 기질로서 L-티로신 (A, B) 및 L-DOPA (C, D)를 사용하여, 루테올린 5-*O*-글루코사이드에 대한 버섯 티로시나제의 억제 활성을 Lineweaver-Burk plot (A, C) 및 Dixon plot (B, D)으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 기질로서 L-티로신을 사용하여, 3',4',7-트리하이드록시플라본에 대한 버섯 티로시나제의 억제 활성을 Lineweaver-Burk plot (A) 및 Dixon plot (B)으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 oxy-form의 버섯 티로시나제에 L-티로신 (*blue stick*)이 결합된 부위와 루테올린 (*green stick*), 루테올린 5-*O*-글루코사이드 (*yellow stick*) 및 루테올린 7-*O*-글루코사이드 (*magenta stick*)의 억제 모드를 나타낸 것이다 (구리 이온: orange sphere; 및 과산화 이온: red stick).

도 9는 티로시나제 억제에 대한 2D 다이어그램으로서, (A) L-티로신; (B) 코지산; (C) 루테올린; (D) 루테올린 5-*O*-글루코사이드; 및 (E) 루테올린 7-*O*-글루코사이드를 나타낸 것이다.

도 10은 루테올린 및 루테올린 5-*O*-글루코사이드가 멜라닌 형성 과정에서의 주요 효소인 모노페놀라제 및 디페놀라제를 억제하는 효과를 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

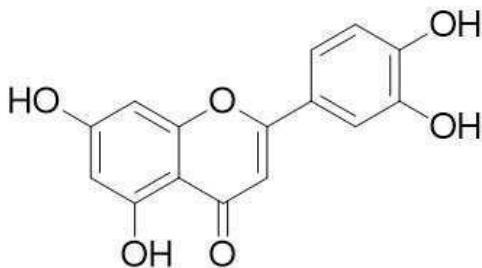
- [0028] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에서 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 "추출물"은 적절한 용매를 이용하여 엉겅퀴(*Cirsium maackii*)로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 엉겅퀴(*Cirsium maackii*)의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다.
- [0029] 상기 엉겅퀴(*Cirsium maackii*)로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있고, 바람직하게는 메탄올일 수 있다.
- [0030] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 엉겅퀴(*Cirsium maackii*) 추출물의 제조 방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- [0031] 예를 들면, 본 발명의 구성물에 포함되는 엉겅퀴(*Cirsium maackii*) 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출 방법으로 추출된 1차 추출물을 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다. 또한, 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다.
- [0032] 따라서, 본 발명에 있어서 엉겅퀴(*Cirsium maackii*) 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획물 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에 따른 엉겅퀴(*Cirsium maackii*) 추출물을 제조하는 방법을 조금 더 구체적으로 살펴보면 다음과 같다. 건조한 엉겅퀴를 분말화한 뒤, 건조분말에 메탄올을 추출용매로 사용하여 추출하고, 여과 및 감압 농축하여 추출할 수 있다.

[0034] 이러한 엉겅퀴(*Cirsium maackii*) 추출물은 헥산(hexane) 용매를 이용하여 추가적으로 분획과정을 더 거칠 수 있다. 예를 들어, 엉겅퀴 추출물을 디클로로메탄:메탄올:물 (10:1:9)에 녹인 후, 디클로로메탄 분획물을 제조할 수 있다. 또한, 수용성 분획물로부터 에틸아세테이트, *n*-부탄올을 순차적으로 가하여, 에틸아세테이트 분획물 및 *n*-부탄올 분획물을 제조할 수 있고, 남은 수용성 분획물을 사용할 수 있다.

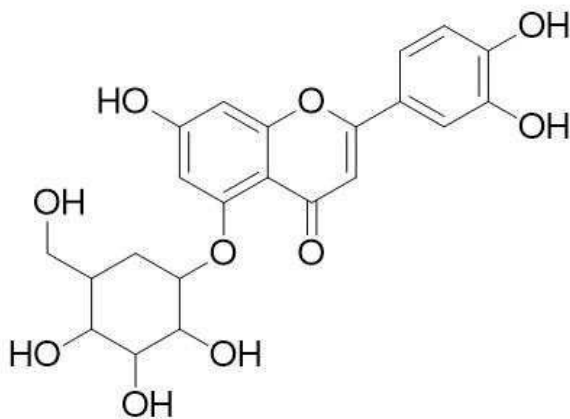
[0035] 본 발명에서는 엉겅퀴의 메탄올 추출물에 대한 에틸아세테이트 분획물로부터 플라보노이드인 루테올린(luteolin, 화학식 1) 및 이의 글루코사이드로서 루테올린-5-*O*-글루코사이드(luteolin 5-*O*-glucoside, 화학식 2)를 획득하였다. 상기 화합물에 대한 구조는 하기 화학식 1 및 2와 같다.

[0037] [화학식 1]



[0038]

[0040] [화학식 2]



[0041]

[0043] 본 발명의 용어, "미백"이란 피부의 과다 색소 침착을 억제, 저해 또는 완화시키는 것을 말한다. 피부의 과다 색소 침착은 주근깨, 기미, 자외선 노출 후 과다 색소 침착, 염증 후 과다 색소 침착, 노인흑색점, 갈색 반점 또는 검버섯 등을 포함한다.

[0044] 본 발명의 용어, "유효량"이란 피부의 과다 색소 침착을 억제, 저해 또는 완화시킬 수 있는 추출물, 분획물 또는 화합물의 양을 의미한다. 본 발명의 피부 미백용 조성물에 포함되는 상기 추출물, 분획물 또는 화합물의 유효량은 피부 미백용 조성물이 제품화되는 형태, 상기 추출물, 분획물 또는 화합물이 피부에 적용되는 방법 및 피부에 머무르는 시간 등에 따라 달라질 것이다. 예컨대, 상기 피부 미백용 조성물이 피부의 과다 색소 침착에 따른 피부과적 치료를 위한 의약품으로 제품화되는 경우에는 일상적으로 피부에 적용하게 되는 화장품으로 제품화되는 경우에 비해 높은 농도로 상기 추출물, 분획물 또는 화합물을 포함할 수 있을 것이다. 화장품으로 제품

화되는 경우에 있어서도 유효성분이 단기간 내에 피부에 머무르게 되는 메이크업 제거제, 세정제 등과 같은 워시-오프(wash-off) 타입의 화장품의 경우에는 비교적 높은 농도의 상기 추출물, 분획물 또는 화합물을 포함할 수 있을 것이다. 반면, 유효성분이 장기간 동안 피부에 머무르게 되는 화장수, 유액, 크림, 에센스 등의 리브-온(leave-on) 타입의 화장품의 경우에는 워시-오프 타입의 화장품에 비해 낮은 농도의 상기 화합물을 포함해도 무방할 것이다.

- [0045] 본 발명에 따른 피부 미백용 화장료 조성물은 피부외용 연고, 크림, 유연화장수, 영양화장수, 팩, 에센스, 헤어 토닉, 샴푸, 린스, 헤어 컨디셔너, 헤어 트리트먼트, 젤, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 마사지 크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드 크림, 파운데이션, 영양에센스, 선스크린, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디 로션 및 바디 클렌저로 이루어지는 군으로부터 선택된 제형을 가질 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 이들 각 제형의 조성물은 그 제형의 제제화에 필요하고 적절한 각종의 기재와 첨가물을 함유할 수 있으며, 이들 성분의 종류와 양은 당업자에 의해 용이하게 선정될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 조성물은 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 피부 미백 활성 성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 피부 미백 활성 성분으로는 코지산 및 이의 유도체, 알부틴, 아스코르브산 및 이의 유도체, 하이드로퀴논 및 이의 유도체, 레조르시놀, 사이클로알카논, 메틸렌디옥시페닐 알칸올, 2,7-디니트로인다졸 또는 덩굴굴 추출물, 쌀 추출물, 감초 추출물과 같은 식물 추출물 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 하이드록사이드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0050] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 제형은 형광물질, 살진균제, 굴수성 유발물질, 보습제, 방향제, 방향제 담체, 단백질, 용해화제, 당 유도체, 일광차단제, 비타민, 식물 추출물 등을 포함하는 부형제를 추가로 함유할 수 있다.
- [0053] 상기와 같이 피부 미백용 화장료 조성물을 의약품 또는 화장품으로 제형화할 경우, 활성 성분에 대한 담체로 작용하는 피부에 적용가능한 공지의 부형제를 포함할 수 있다. 의약품으로의 제형화시에는 [Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA]에 개시되어 있는 내용을 참조할 수 있으며, 화장품으로 제형화시에는 [International cosmetic ingredient dictionary, 6th ed., The cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc., Washington, 1995]에 개시되어 있는 내용을 참조할 수 있을 것이다. 상기 문헌들은 본 명세서의 일부로서 포함된다.
- [0055] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 실시예 1. 실험재료 및 방법

[0058] 1.1. 화학물질 및 시약

[0059] L-티로신(L-Tyrosine), L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine) 및 버섯 티로시나제(tyrosinase, EC 1.14.18.1)는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 3',4',7-트리하이드록시플라본(3',4',7-trihydroxyflavone)은 Indofine Chemical Company, Inc. (Hillsborough, NJ, USA)에서 구입하였다. K₂HPO₄ (dipotassium phosphate)는 Junsei Chemical Co. Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였고, KH₂PO₄ (monopotassium phosphate)는 Yakuri Pure Chemicals Co. Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. 다른 화학물질 및 용매들은 특별한 언급이 없는 한, E. Merck, Fluka 또는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

[0061] 1.2. 식물재료

[0062] 영경귀 (*Cirsium maackii*, Korean thistle) 식물은 한국, 울산에서 2001년 8월에 취득하였다. 이후, 식물의 인 증은 일본, 쓰쿠바(Tsukuba)의 국립자연과학박물관 (National Museum of Nature and Science)의 식물학부 소속의 영경귀 분류학 전문가인 Y. Kadota 박사로부터 수행되었다. 이후, 식물을 뿌리, 줄기, 잎 및 꽃으로 나누어 1 주일 동안 그늘에서 건조하였다. 전체 식물은 일본, 쓰쿠바의 국립자연과학박물관 및 부경대학교 식품영양학부(최재수 교수)의 식물 표본집에 등록 및 보관되었다.

[0064] 1.3. 추출, 분획 및 분리

[0065] 플라보노이드(flavonoids)의 추출, 분획 및 정제는 기존에 기재한 바와 같이 수행되었다 (Food Chem Toxicol. 47 (11), 2790-2797, 2009; 및 도 1). 간단히, 건조된 잎 (1.28 kg)은 뜨거운 메탄올 (2.5 L 씩 3회)을 이용하여 추출되었다. 필터한 후, 메탄올 추출물 (316.3 g)을 획득하였고, 메탄올 추출물 (310 g)을 디클로로메탄:메탄올:물 (10:1:9)에 녹인 후, 디클로로메탄 분획물 (68.8 g)을 얻었다. 수용성 분획물에서 순차적으로 분획하여 에틸아세테이트 분획물 (80.6 g), *n*-부탄올 분획물 (30.7 g) 또는 물 분획물 (125.8 g)을 얻었다. 또한, 공개된 스펙트라 데이터와 TLC (thin layer chromatography) 분석과 함께 ¹H-NMR (nuclear magnetic resonance) 및 ¹³C NMR와 같은 다양한 분광기를 이용한 방법을 사용하여, 루테올린-5-*O*-글루코사이드 (luteolin 5-*O*-glucoside, 1), 루테올린 (luteolin, 2) 및 루테올린-7-*O*-글루코사이드 (luteolin 7-*O*-glucoside)를 확인하였다 (The Netherlands, 134-320, 1989; 및 도 1). 분리된 화합물의 구조는 네오헤스페리딘 (neohesperidin) 및 3',4',7-트리하이드록시플라본 (3',4',7-trihydroxyflavone)과 함께 도 3에 나타내었다.

[0067] 1.4. HPLC (high-performance liquid chromatography) 정성 분석

[0068] HPLC는 Jung et al.에 의해 언급된 실험방법(Food Chem Toxicol. 47 (11), 2790-2797, 2009)에서 약간 변형되어 수행되었다. 물에 0.1% 포름산 (solvent A) 및 100% 메탄올 (solvent B)를 포함하는 linear gradient solvent system은 75% (solvent A): 25% (solvent B) 에서 0% (solvent A): 100% (solvent B)으로 하여 0.5 ml/min의 플로우 속도로 60 분 동안 진행하도록 변경하였다. 추출물 및 2개의 플라보노이드의 stock solution은 100% 메탄올에 2 mg/ml의 농도로 녹였고, 불용성 침전물 (insoluble precipitates) 및 에틸아세테이트 (EtOAc) 분획물은 각각 250 µg/ml 및 0.5 mg/ml의 농도로 하였다. 이후, 각 샘플에서 10 µl의 필터된 용액이 주입되었다. 루테올린-5-*O*-글루코사이드의 머무른 시간(retention time)은 27.87 분이었고, 루테올린은 42.04 분이였다.

[0070] 1.5. 실험관 내(*In vitro*) 버섯 티로시나제 억제 어세이 (mushroom tyrosinase inhibitory assay)

[0071] 버섯 티로시나제 억제 어세이에서는 Kang et al. 의 흡광분석 방법을 약간 변형하여 수행하였고 (Arch. Pharm. Res. 27 (12), 12261232, 2004), 코지산 (Kojic acid)을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0073] 1.6. 버섯 티로시나제 억제에 대한 활성 화합물의 동역학 파라미터 (Kinetic parameters)

[0074] 버섯 티로시나제 억제를 위한 억제 모드 및 억제 상수(K_i)는 Lineweaver-Burk plot 및 Dixon plot으로 계산되었다 (J. Am. Chem. Soc. 56 (3), 658666, 1934; 및 Biochem. J. 137 (1), 143144, 1974). 다양한 농도의 기질 (0.5, 0.75, and 1 mM) 및 억제제 (L-티로신 기질에 대한 루테올린 및 3'4'7-트리하이드록시플라본의 농도는 0, 10, 30 및 60 μ M을 사용; L-티로신 기질에 대한 루테올린-5-*O*-글루코사이드의 농도는 0, 1, 2, 4 및 6 μ M을 사용; 및 L-DOPA 기질에 대한 루테올린-5-*O*-글루코사이드의 농도는 0, 2.5, 5, 10 및 20 μ M을 사용)에 대한 동역학 파라미터들이 얻어졌다. 그래프는 SigmaPlot 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 나타내었다.

[0076] 1.7. 버섯 티로시나제 분자 도킹 시뮬레이션 (molecular docking simulation)

[0077] 분자 도킹 분석은 AutoDock 4.2로 수행되었고 (J. Mol. Recognit. 9, 15, 1996), 그리드 맵은 Autogrid program으로 만들어졌다. 양송이버섯 (*Agaricus bisporus*) 유래 티로시나제의 deoxy form (2Y9X)의 X-ray 결정 구조는 RCSB PDB (Protein Data Bank)에서 2.78 Å의 해상도로 얻었다 (Biochemistry, 50 (24), 54775486, 2011). 2Y9X의 chain A의 binuclear copper-binding site는 oxy-form enzyme으로 채워지도록 약간 변형되었다 (J. Mol. Catal. B Enzym. 125, 615, 2016). 억제제와 양성 대조군에서의 회전하는 결합은 ADT (AutoDock Tools)로 수행되었다. 루테올린 (5280445), 루테올린 5-*O*-글루코사이드 (5317471), 루테올린 7-*O*-글루코사이드 (5280637), 코지산 (3840) 및 L-티로신 (6057)의 구조는 PubChem Compound (NCBI) 데이터베이스에서 얻었고, Marvin Sketch (v17.1.30, ChemAxon, Budapest, Hungary)에 의해 3D 구조로 변환시켰다. 단단하고 유연한 리간드 도킹을 위한 도킹 프로토콜은 20개의 독립된 유전 알고리즘을 포함하였다. 도킹 결과는 PyMOL (v1.7.4, Schrodinger, LLC, Cambridge, MA, USA) 및 Discovery Studio (v16.1, Accelrys, San Diego, CA, USA)으로 가시화되고 분석되었다.

[0079] 1.8. 통계분석

[0080] 통계적 유의성은 one-way ANOVA 및 Student's t-test (Systat Inc., Evanston, IL, USA)으로 평가되었다. 모든 실험은 세 번 독립하여 수행되었다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM (standard error of the mean) ($n = 3$)으로 나타내었다.

[0082] 실시예 2. 영경귀(*C. maackii*) 추출물 및 분획물에 대한 티로시나제 억제 활성 효과

[0083] 영경귀의 뿌리, 줄기, 꽃 및 잎에서의 메탄올 추출물에 대한 티로시나제 억제 특성을 위한 스크리닝은 100 μ g/ml의 농도에서 수행되었다. 그 결과, 4개의 다른 메탄올 추출물 중에서 단지 잎에서만 65.53 ± 0.57 %로 유의미하게 나타났고, IC_{50} (half-maximal inhibitory concentration) 값은 55.67 ± 2.73 μ g/ml을 보였다(표 1). 또한, 잎 추출물의 분획물에서 버섯 티로시나제 억제 어세이를 수행하였고, 활성을 보이는 활성 분획을 발견하였다. L-티로신에 대한 활성을 보이는 에틸아세테이트 분획물의 IC_{50} 값은 36.16 ± 0.53 μ g/ml 이었고, *n*-부탄올 (*n*-BuOH) 분획물의 IC_{50} 값은 468.94 ± 0.52 μ g/ml 이었으며, 디클로로메탄 분획물 및 물 분획물에서는 유의미한 억제 활성이 나타나지 않았다 (표 1).

표 1

Extract/Fractions	Parts	Inhibition percentage (%) at 100 µg/ml	IC ₅₀ values (µg/ml) ^a
MeOH extract	Root	30.56 ± 1.51	—
	Stem	22.48 ± 3.71	—
	Flower	2.2 ± 2.72	—
	Leaves	65.53 ± 0.57	55.67 ± 2.73
CH ₂ Cl ₂ fraction	Leaves	9.15 ± 5.62	> 400
EtOAc fraction	Leaves	64.52 ± 5.06	36.16 ± 0.53
<i>n</i> -BuOH fraction	Leaves	26.63 ± 2.40	468.94 ± 0.52
H ₂ O fraction	Leaves	2.55 ± 1.19	> 400
Kojic acid ^b	—	—	1.29 ± 0.01

^a50% inhibition concentrations (IC₅₀, µg/ml) are expressed as mean ± SEM of triplicates using L-tyrosine as substrate.

^bPositive control.

[0085]

[0087]

실시예 3. 엉겅퀴의 분획물로부터 2개의 활성 플라보노이드의 HPLC (high-performance liquid chromatography) 분석

[0088]

엉겅퀴의 잎에서 티로시나제 억제 활성을 보였기 때문에, 잎 추출물 및 분획물에 대하여 reverse phase HPLC를 통해 정성 분석을 수행하였다. 그 결과, 크로마토그래피의 프로파일로부터 루테올린 및 루테올린 5-*O*-글루코사이드의 머무른 시간(retention time)과 일치하였다 (도 2). 이로써, 엉겅퀴 잎의 메탄올 추출물에 포함된 주요 화합물은 루테올린 (retention time, t_R 42.04 min) 및 루테올린 5-*O*-글루코사이드 (retention time, t_R 27.87 min)인 것으로 확인되었다. 에틸아세테이트 분획물은 스펙트럼 피크에서 루테올린 화합물을 용출시켰다. 또한, 엉겅퀴 잎의 에틸아세테이트-물 (EtOAc-H₂O) 분획물의 분획으로부터 불용성 침전물인 루테올린 5-*O*-글루코사이드를 얻었다 (도 1). 침전물에 대한 HPLC 분석에서 피크가 27.87 분으로 나왔고, 루테올린 5-*O*-글루코사이드로 확인되었다. 대조적으로, 디클로로메탄 (CH₂Cl₂) 분획물에서는 피크가 나타나지 않았고, *n*-부탄올 분획물 및 물 분획물에서는 작은 피크가 확인되었다.

[0090]

실시예 4. 엉겅퀴에서 분리된 화합물의 티로시나제 억제 활성

[0091]

본 발명자들은 5-디옥시 루테올린 (3'4'7-트리하이드록시플라본) 및 네오헤스페리딘과 함께 활성 분획물 유래의 화합물에 대하여 티로시나제의 모노페놀라제 (L-티로신) 및 디페놀라제 (L-DOPA) 활성 억제 가능성에 대한 실험을 수행하였다. 3'4'7-트리하이드록시플라본은 루테올린의 5 위치에서 하이드록실 그룹과 글루코오스 moiety 치환의 유의성을 확인하기 위하여 실험되었다. 그 결과, 루테올린 5-*O*-글루코사이드는 강력한 티로시나제 억제 효과를 보였는데, 기질로서 L-티로신을 사용한 경우 루테올린 5-*O*-글루코사이드의 IC₅₀ 값은 2.95 ± 0.11 µM 이었고, 기질로서 L-DOPA를 사용한 경우 IC₅₀ 값은 8.22 ± 0.18 µM 로서, 기질로서 L-티로신을 사용한 경우 양성 대조군인 코지산의 IC₅₀ 값 (9.78 ± 0.12 µM)에 비해 대략 3배 정도 억제 활성이 강한 것으로 나타났고, 기질로서 L-DOPA를 사용한 경우 IC₅₀ 값 (9.21 ± 0.10 µM)은 유사한 수준이었다 (표 2).

[0092]

또한, 아글리콘 (aglycone) 부분인 루테올린은 기질로서 L-티로신을 사용한 경우 IC₅₀ 값이 17.40 ± 0.62 µM 로서 유의미한 억제 활성을 보였다 (표 2). 3'4'7-트리하이드록시플라본도 기질로서 L-티로신을 사용한 경우 IC₅₀ 값이 18.69 ± 0.50 µM 로서 유의미한 억제 활성을 보였으나, 기질로서 L-DOPA를 사용한 경우에는 IC₅₀ 값이 155.14 ± 5.62 µM 로서 중간 정도의 억제 활성을 보였다 (표 2). 대조적으로, 루테올린 7-*O*-글루코사이드는 기질로서 L-티로신을 사용한 경우 IC₅₀ 값이 177.03 ± 0.77 µM 이고, 기질로서 L-DOPA를 사용한 경우

399.08 ± 3.89 μM 으로 나타났다 (표 2).

표 2

Compounds	IC ₅₀ values ^a (μM)		K _i value (μM) ^b , inhibition mode ^c	
	L-tyrosine	L-DOPA	L-tyrosine	L-DOPA
Luteolin	17.40 ± 0.62	374.55 ± 2.02	18.12, Non-competitive	— ^d
Luteolin 5- <i>O</i> -glucoside	2.95 ± 0.11	8.22 ± 0.18	3.02, Competitive	11.56, Competitive
Luteolin 7- <i>O</i> -glucoside	177.03 ± 0.77	399.08 ± 3.89	—	—
Neohesperidin	> 400	> 400	—	—
3',4',7-Trihydroxyflavone	18.69 ± 0.50	155.14 ± 5.62	19.88, Competitive	—
Kojic acid ^e	9.78 ± 0.12	9.21 ± 0.10	—	—

^a50% inhibition concentrations (IC₅₀) are expressed as mean ± SEM of triplicates.

^bDetermined by Dixon plots.

^cDetermined by Lineweaver-Burk plots.

^dNot determined.

^ePositive control.

[0094]

[0096]

분리된 화합물들에 대한 버섯 티로시나제 억제 그래프에서는 두 개의 기질에 대하여 농도-의존적으로 억제 활성이 증가하는 것으로 나타났으며, 다만, 루테올린은 초기에는 농도-의존적인 억제 활성을 보였으나 60 μM의 농도부터는 감소된 활성을 보였다 (도 4).

[0098]

실시예 5. 티로시나제 억제 효소 동역학 분석

[0099]

본 발명자들은 상기 실시예 4의 결과로부터 억제 활성이 강한 플라보노이드만을 선택하여 효소 동역학 분석을 수행하였고, 기질로서 L-티로신을 사용한 루테올린 (도 5); 기질로서 L-티로신 및 L-DOPA를 사용한 루테올린 5-*O*-글루코사이드 (도 6); 및 기질로서 L-티로신을 사용한 3',4',7-트리하이드록시플라본 (도 7)에 대한 버섯 티로시나제의 억제 활성을 Lineweaver-Burk plot 및 Dixon plot으로 분석하였다. 그 결과, Lineweaver-Burk plots의 결과에서 루테올린은 비-경쟁적 억제제인 것으로 확인되었다 (도 5A). 루테올린은 기질로서 L-티로신을 사용한 경우 버섯 티로시나제에 의한 기질 분해 반응의 최대 속도 (V_{max})를 감소시켰고, Lineweaver-Burk plot에서 K_m 값을 변화시키지 않았다. 또한, Dixon plot에서는 억제제가 존재한 경우 곡선의 기울기 및 y -절편에서의 변화가 관찰되었고, K_i 값은 18.12 μM 었다 (도 5B).

[0100]

대조적으로, 루테올린 5-*O*-글루코사이드 및 3',4',7-트리하이드록시플라본은 Lineweaver-Burk plot에서 억제제의 농도가 증가함에 따라 다른 경사를 가지지만 공통의 y -절편을 가진 것으로 나타남으로써 경쟁적 억제제인 것으로 확인되었다 (도 6A, 6C 및 도 7). 또한, Dixon plot에서 루테올린 5-*O*-글루코사이드의 K_i 값은 3.02 μM 및 11.56 μM으로 계산되었다 (도 6B 및 6D). K_i 값이 작을수록 억제제와 효소 사이의 결합력이 커지므로, 루테올린 5-*O*-글루코사이드의 강력한 억제 효과를 확인할 수 있었다.

[0102]

실시예 6. 티로시나제 억제에 관한 분자 도킹 시뮬레이션 (molecular docking simulation)

[0103] 본 발명자들은 티로시나제에 대한 루테올린 및 이의 글루코사이드의 억제 메커니즘을 확인하고 효소의 결합 부위를 확인하기 위하여 AutoDock program을 통해 *in silico* 컴퓨터의 모델링 연구를 수행하였다. 루테올린 및 루테올린 5-*O*-글루코사이드가 디페놀라제에 비해 모노페놀라제에서 현저한 억제 활성을 나타냈으므로, L-티로신에서 L-DOPA로 하이드록실화시키고 촉매 부위의 구리 이온 (copper ion) 사이에 2개의 과산화 이온 (peroxide ion)을 가지는 oxy-form의 티로시나제를 타겟 효소로 사용하였다.

[0104] 그 결과, 루테올린과 이의 글루코사이드의 결합 부위는 L-티로신의 결합 부위와 다름을 확인하였다. 모노페놀라제의 특이적인 리간드인 L-티로신은 티로시나제의 촉매 포켓에 하이드록실 모이티를 배치하고, van der Waals 작용을 통해 2개의 구리 이온과 과산화 이온으로 상호작용을 한다 (도 8). L-티로신의 하이드록실 및 이온화된 카르복실 모이티는 각각 Met280 및 His244 residue와 수소 결합을 형성시켰다. 또한, 양성화된 NH₂ 모이티는 수소 결합을 통해 Asn260 residue와 salt-bridge를 통해 Glu256 residue와 상호작용을 하였다 (도 9A). 양성 대조군인 코지산은 티로시나제의 구리 결합 부위에 도킹되고, Met280 residue와 수소 결합 및 2개의 구리 이온과 van der Waals 결합을 형성하였다 (도 9B).

[0105] 또한, 루테올린 5-*O*-글루코사이드는 L-티로신 및 코지산과 같이 구리 및 과산화 이온 근처에서 도킹되었으나, 루테올린 및 루테올린 7-*O*-글루코사이드는 그렇지 않았음을 확인하였다 (도 8 및 도 9). 또한, 루테올린 5-*O*-글루코사이드의 B ring의 아글리콘 부분은 2개의 구리 이온 (Cu400 및 Cu401) 사이에서 과산화 이온 (Per402)과 강한 수소결합을 형성하였다 (도 9D). 유사하게, 두 번째 구리 이온 (Cu401)의 리간드인 Ser282, Val283 및 Ala286 residue는 His263 및 His259와 함께 B ring과 소수성 상호작용을 형성하였다 (도 9). 또한, 루테올린 5-*O*-글루코사이드의 A ring과 His244 사이에서는 정전기적 상호작용이 일어났다. A ring에서 5 위치에 있는 글루코오스 모이티는 티로시나제의 Arg268 residue와 2개의 수소결합을 형성하였다. 루테올린 7-*O*-글루코사이드의 경우, 글루코오스 모이티는 Glu322 residue와 직접적으로 상호작용을 하였는데, 이는 루테올린 5-*O*-글루코사이드와 같이 활성 부위 residue에서 상호작용을 하지 않았다 (도 9E). oxy-form의 버섯 티로시나제 (modified 2Y9X)의 활성 부위에서의 분자 상호작용에 관하여 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

Compounds	Binding energy (Kcal/mol)	No. of H-bonds	H-bond interaction	van der Waals interaction	Electrostatic interaction	Hydrophobic interaction				
						Pi-sigma	Pi-Pi T-shaped	Pi-Pi stacked	Amide-Pi stacked	Pi-Alkyl
L-tyrosine ^a	-6.31	5	His244, Asn260, Met280, Glu256 (Salt-bridge)	Cu400, Cu401, Per402		Val283		His263		Ala286
Kojic acid ^b	-5.5	1	Met280	Cu400, Cu401		Val283	His263			Ala286
Luteolin ^c	-6.19	4	Cys83, Gly245, Ala246, Val248		Glu322	His85				Val248
Luteolin 5- <i>O</i> -glucoside	-5.5	3	Per402, Arg268,	Cu400, Cu401	His244	Val283	His259	His263	Ser282	Val283, Val248, Ala286
Luteolin 7- <i>O</i> -glucoside	-4.49	5	Tyr65, Asn81, Arg321, Glu322, Ala323			Ala80				Ala323

^aCompetitive ligand of the oxy-form of tyrosinase.

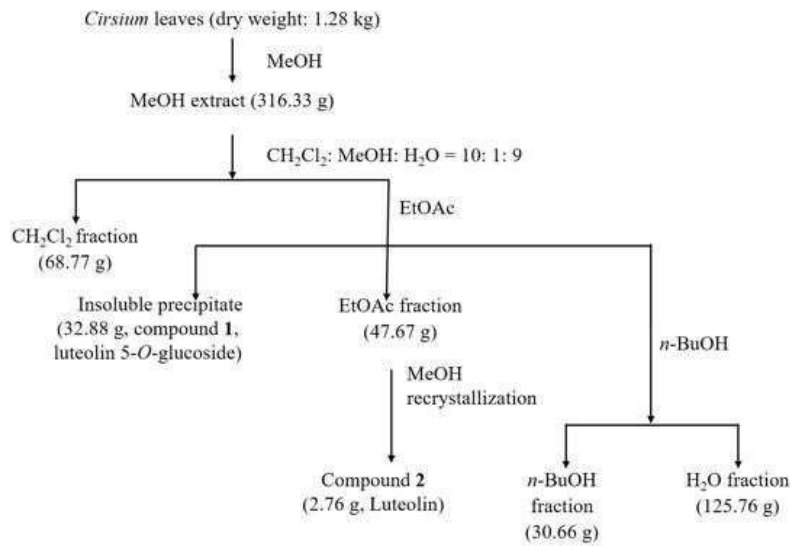
^bReported competitive inhibitor of mushroom tyrosinase.

^cReported non-competitive inhibitor.

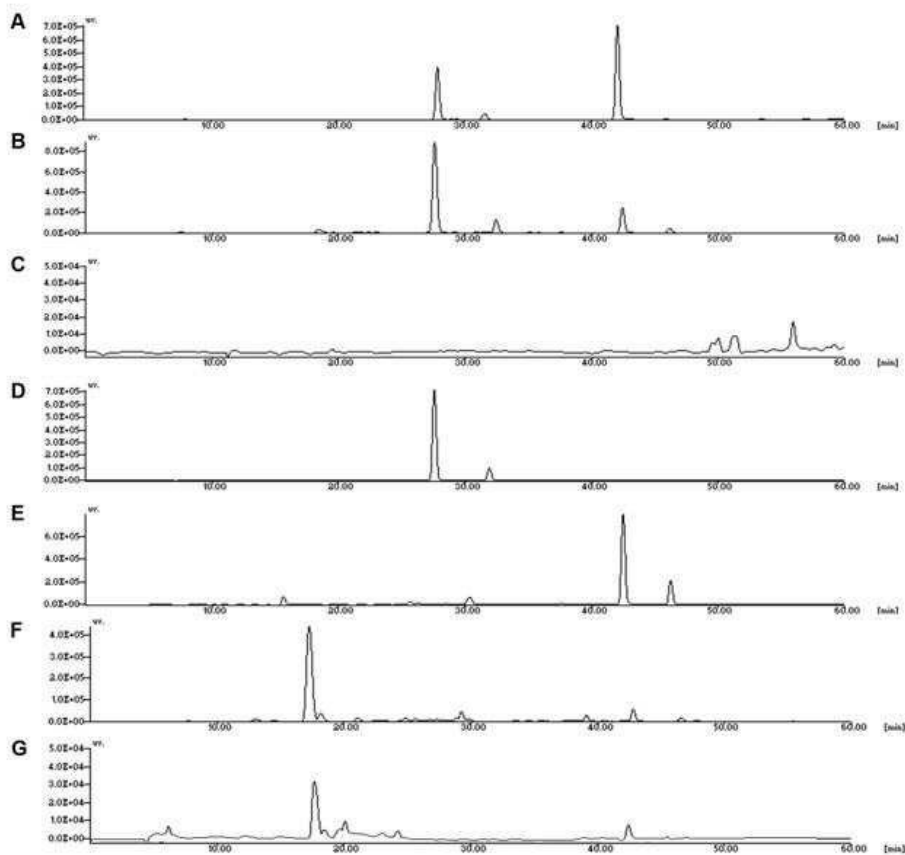
[0107]

도면

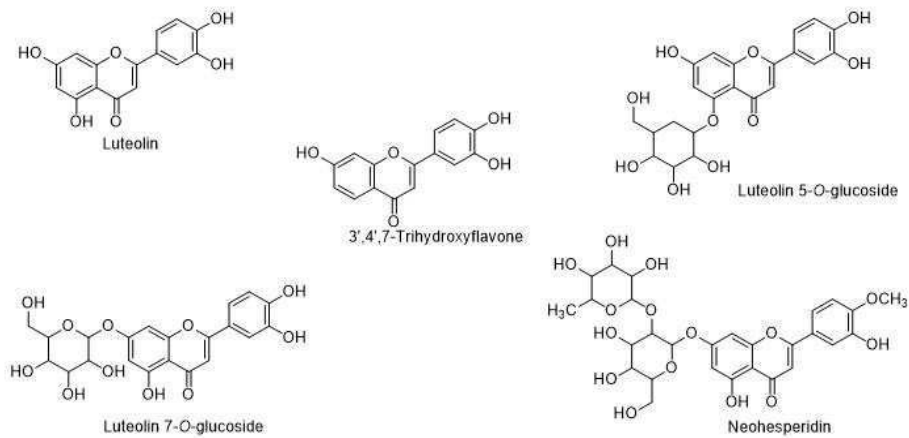
도면1



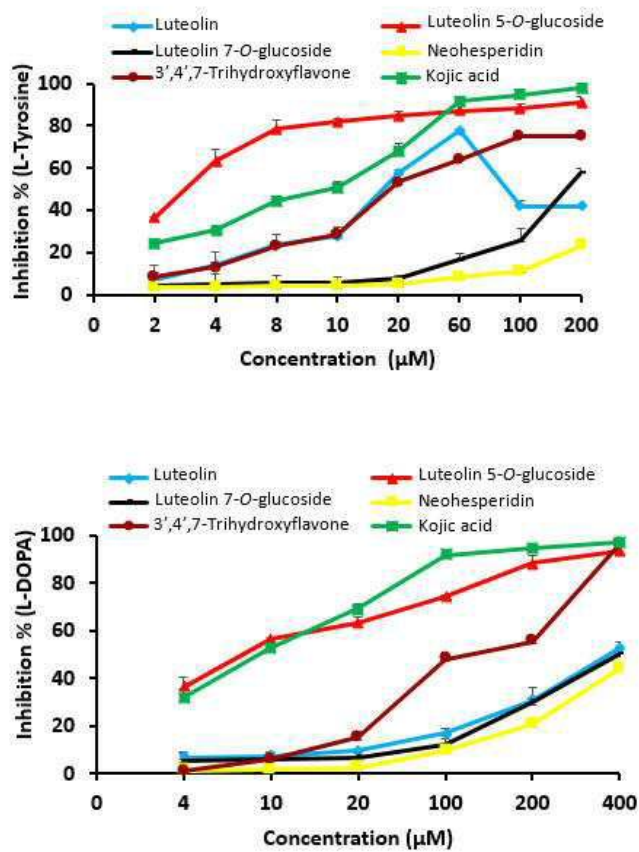
도면2



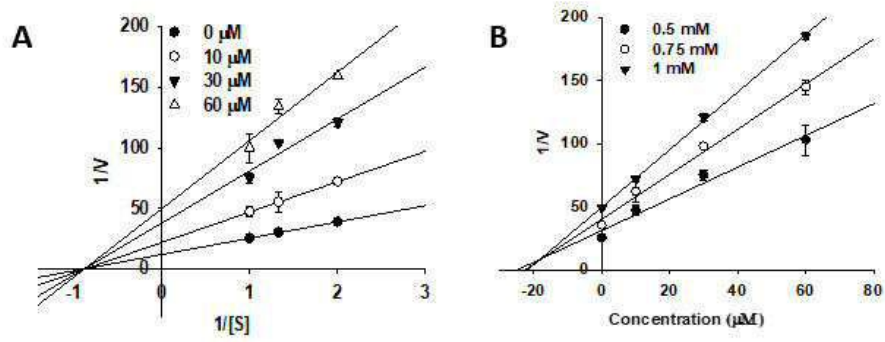
도면3



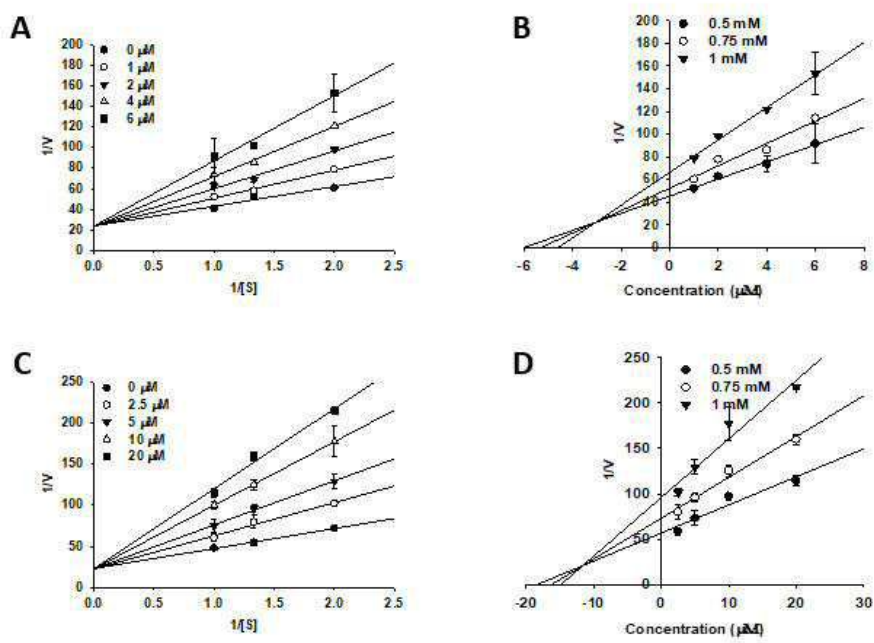
도면4



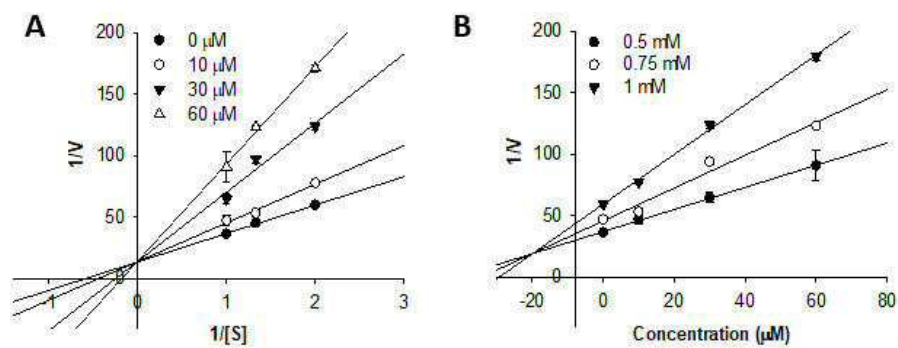
도면5



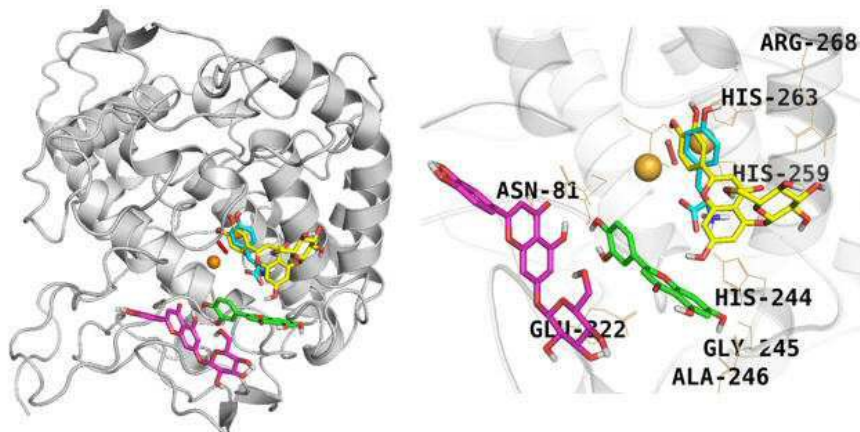
도면6



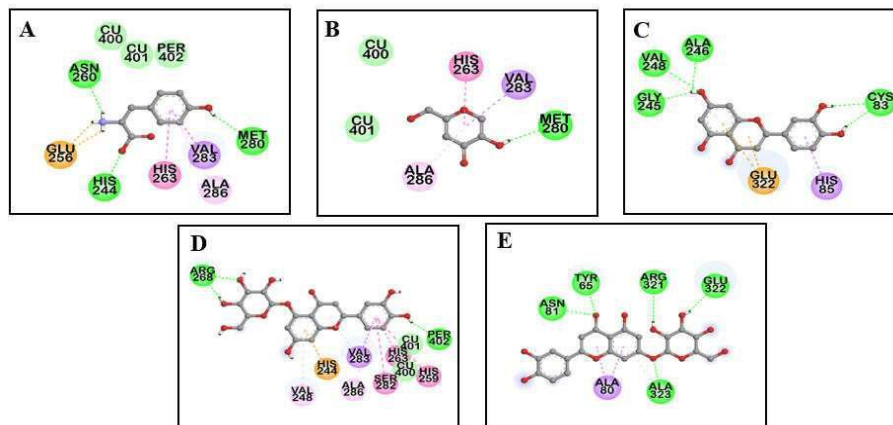
도면7



도면8



도면9



도면10

