



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0000355
(43) 공개일자 2011년01월03일

(51) Int. Cl.

A61K 36/28 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0057813

(22) 출원일자 2009년06월26일

심사청구일자 2009년06월26일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

대한민국(농촌진흥청장)

경기 수원시 권선구 서둔동 250번지

(72) 발명자

성낙술

경기도 수원시 권선구 호매실동 LG삼익아파트 10
6동 1703호

이승은

충청북도 음성군 음성읍 읍내리 한성진주아파트
105동 408호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인명문

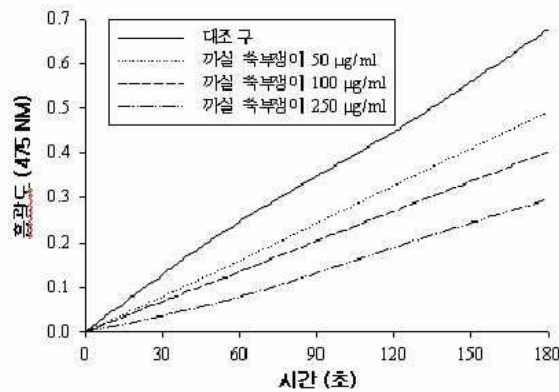
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 미백 활성을 나타내는 까실쑥부쟁이 추출물을 함유하는 경구 투여용 조성물

(57) 요약

본 발명은 까실쑥부쟁이 (*Aster ageratoides* Turcz. var. *ageratoides*)의 추출물을 유효성분으로 함유하는 경구 투여용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 시험관 내 (*in vitro*) 실험에서 우수한 티로시나제 저해활성을 나타내고, 동물세포 내 실험에서 멜라닌 합성 저해 활성을 나타내는 식품 첨가제 및 식품으로 유용하게 이용될 수 있는 경구 투여용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

성정숙

경기도 수원시 팔달구 화서동 영광아파트 1동 709호

이상국

서울특별시 강남구 대치3동 대치 현대아파트 107동 1202호

박현주

서울특별시 강남구 압구정동 미성아파트 2동 301호

특허청구의 범위

청구항 1

까실쑥부쟁이(*Aster ageratoides* Turcz. var. *ageratoides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백 활성을 갖는 경구 투여용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

까실쑥부쟁이 추출물은 까실쑥부쟁이의 꽃, 가지, 줄기, 잎, 미성숙열매, 열매를 포함하는 지상부; 뿌리줄기; 및 뿌리 중 선택된 하나 이상의 추출물인 것임을 특징으로 하는 경구 투여용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

까실쑥부쟁이 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜, 프로필렌글리콜, 초산에틸, 부틸렌글리콜, 에테르 및 클로로포름으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 혼합 용매로 추출된 것임을 특징으로 하는 경구 투여용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

까실쑥부쟁이 추출물을 0.01 내지 90 중량%로 포함하는 것임을 특징으로 하는 경구 투여용 조성물.

청구항 5

까실쑥부쟁이를 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜, 프로필렌글리콜, 초산에틸, 부틸렌글리콜, 에테르 및 클로로포름으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 혼합 용매로 추출하는 단계;

추출액을 여과하는 단계; 및

상기 여과 후 감압농축하는 단계를 포함하는 경구 투여용 조성물 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

추출하는 단계에서 혼합 용매는 까실쑥부쟁이 시료 중량의 1~30배로 혼합하는 것임을 특징으로 하는 경구 투여용 조성물 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

추출하는 단계는 10~100℃에서 1시간~4일동안 추출하는 것임을 특징으로 하는 경구 투여용 조성물 제조방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

추출하는 단계는 열탕 추출, 환류 순환 추출, 침지 추출 및 압력 추출 중 선택된 방법으로 추출하는 것임을 특징으로 하는 경구 투여용 조성물 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 경구 투여용 조성물 포함하는 식품 첨가제.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 경구 투여용 조성물 포함하는 식품.

청구항 11

제10항에 있어서,

음료, 칩류, 면류, 가공류, 곡류, 정제, 연질캡셀 및 과립제 중 선택된 하나 또는 그 이상인 것임을 특징으로 하는 식품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 가실썩부쟁이 추출물을 함유하는 미백 활성을 갖는 경구 투여용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 동아시아 여성들 특히 한국, 일본, 중국의 여성들에게 가장 관심이 미용 분야중 하나는 피부 미백이다, "피부 미백"이란 자외선, 스트레스, 호르몬 분비 이상 및 임신 등과 같은 환경 변화에 의해 피부 내에 색소의 생성이 과하게 일어나 발생하는 피부색의 변화를 정돈하여 주는 개념이라 할 수 있다, 이와 관련하여 가장 중요한 요소는 피부 색소인 멜라닌 (melanin)이다. 멜라닌은 표피 내 기저층에 존재하는 색소세포인 멜라노사이트 (melanocyte)에서 합성되고, 주변의 각질세포로 전이되어 피부색을 결정짓는다. 원래 멜라닌은 동물, 식물, 미생물 등에서 발견되는 검은 색소로 생육이나 발달에 필수적이진 않지만 어떤 환경에 대한 생존력과 경쟁력을 높여주는 물질이며, 특히 동물에서의 멜라닌은 피부병 및 악성 흑색종 (melanomas)과 관계가 있으며, 티로시나제 (tyrosinase)에 의해 티로신(tyrosine)으로부터 생산되는 도파 멜라닌(DOPA melanin) 외에도 1,8-디히드록시나프탈렌 멜라닌 (DHN melanin; 1,8-Dihydroxynaphtalene melanin), 오르쏘-디페놀 멜라닌 (GDHB melanin; o-diphenol melanin), 카테콜 멜라닌 (catechol melanin) 등이 보고되어 있다 (Bell AA and Wheeler MH, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 24, pp411-451, 1986). 멜라닌은 생물체에서 발견된 색소로는 특이하게 안정된 색소로서 거의 모든 용매에 불용이며, 추출이나 화학적인 취급이 쉽지 않다. 이 때문에 멜라닌의 화학적인 면에 대해 밝혀지지 않은 점들이 많고 연구의 진보도 부진한 편이다.

[0003] 멜라닌 색소 합성 (melanogenesis) 과정은 멜라노사이트 (melanocytes)라고 하는 특별히 분화된 세포의 멜라노솜 (melanosome)이라는 소기관에서 일어나는 것으로 명확하게 밝혀지고 있다.

[0004] 즉, 피부색은 멜라닌의 함량, 분포 등에 따라 결정되며 멜라노사이트 (melanocyte) 내에서 생성된 후 세포 외부로 방출되는 멜라노솜의 수와 분포에 연관되어 있다. 피부의 과색소침착 (hyperpigmentation)은 피부의 염증 반응 이후의 체내 호르몬 이상, 유전질환 및 자외선 조사 등 여러 요인에 의해 발생될 수 있는데, 주된 요인은 멜라닌 색소 합성 이상 및 분포 이상에 의한 것이다. 멜라닌의 주요한 기능은 산소 라디칼을 제거하여 이에 의한 손상으로부터 피부를 보호하는 것으로 멜라닌이 많다는 것은 물리적, 화학적 독성 물질로부터 피부를 보호하기 위한 효과적인 대응체계를 가지고 있음을 의미한다.

[0005] 피부에서 색소침착 방지는 다음의 세 가지 관점에서 연구가 가능하다. 1) 멜라닌 합성의 주효소인 티로시나제 (tyrosinase) 활성을 조절하기 위하여 티로시나제 합성 저해물질이나 티로시나제의 기질에 대한 길항제 (antagonist) 개발, 2) 동물의 멜라닌 생합성 장소인 멜라노사이트의 기능을 저하시키기 위해 멜라노사이트에 독성을 나타내는 물질 개발, 3) 3,4-디히드록시페닐알라닌 (DOPA)의 산화방지를 위해 3,4-디히드록시페닐알라닌 환원물질 개발 및 멜라닌 생성기구인 제 1효소 티로시나제와 도파크롬 (DOPAchrome)에서 5,6-디히드록시인돌-2-카르복시산 (DHICA; 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid)로의 변환을 촉매하는 제 2효소인 도파크롬 튜토머라제 (DOPAchrome tautomerase) 또는 5,6-디히드록시인돌-2-카르복실산에서 인돌-5,6-퀴논-2-카르복시산 (indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid)으로의 변환을 촉매하는 제 3의 효소의 활성 조절 등이 주목받고 있다.

[0006] 과도한 멜라닌의 침착은 피부 등의 병리적 문제의 원인이 되기도 하지만, 기미, 주근깨, 점, 검버섯과 같은 미용적인 측면의 문제로 인식되고 있으며, 따라서 멜라닌 형성을 억제할 수 있는 미백제에 대한 관심이 증가되고 많은 연구가 진행되고 있다.

[0007] 티로시나제 (tyrosinase ; monophenol, dihydroxy-L-phenylalanine : oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1) 는 넓은 범위의 페놀화합물을 기질로 이용하는 구리함유 효소로서, 티로신 (tyrosine)을 기질로 이용하여 L-3,4-디하이드록시페닐알라닌 (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)을 생성시키고 이를 다시 도파퀴논 (L-DOPAquinone)으로 전이시키는 연속된 효소적 산화 (hydroxylation and oxidation)를 거쳐, 각 생성물의 중합반응에 의해 멜라닌 (melanin)이 생합성 된다. 자외선에 의하여 멜라노사이트의 유사분열이 일어나 멜라노사이트가 활성화 되고, 활성화된 멜라노사이트에서는 티로시나제 합성이 촉진되어 멜라닌의 생성이 촉진되며 과량 생성된 멜라닌은 결국 표피 밖으로 운반 배출 되어 기미, 주근깨와 같은 색소 침착의 원인이 된다. 멜라닌이 비정상적으로 과잉 생산되면 기미나 주근깨를 생성하며, 이와 반대로 적게 생산되면 백반등과 같은 피부 병변이 유발된다. 색소 침착은 외부로부터 자외선, 염증 등의 각종 자극에 의해 발생되며, 이 색소침착의 정도는 표피 기저층에 존재하는 멜라노사이트가 반응한 양이다. 색소침착 메커니즘의 중심이 되는 것은 티로시나제이다.

[0008] 현재 티로시나제 저해제 (tyrosinase inhibitor)로 알려진 물질로는 알부틴 (α -arbutin), 알로에신 (aloesin), 히노키치올 (hinokitiol), 퀘르세틴 (quercetin), 신남산 (cinnamic acid), 안식향산 (benzoic acid), 시스테인 (cysteine), 클로로겐산 (chlorogenic acid) 등이 알려진 바 있으며 주로 여성의 기미치유에 사용되는 하이드로퀴논 (hydroquinone)을 비롯하여 멜라노스타틴 (melanostatin), 트로폴론 (tropolone), 코직산 (kojic acid), 알부틴 (arbutin) 등이 사용되어 왔으나, 안전성 등의 문제점이 있는 경우가 많으며 효과도 명확하거나 뚜렷하게 확인되고 있지는 못한 실정이다. 따라서 인간이 오랫동안 안전하게 먹어왔던 천연물로부터 티로시나제 저해능이 뛰어난 물질을 이용하려는 시도가 이루어지고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 본 발명은 까실쭈부쟁이 추출물을 함유하는 경구 투여용 조성물을 제공하고자 한다.

[0010] 본 발명은 티로시나제 저해활성이 우수한 경구 투여용 조성물을 제공하고자 한다.

[0011] 본 발명은 피부 미백용 조성물로 유용한 경구 투여용 조성물로서 식품 첨가제 및 식품을 제공하고자 한다.

과제 해결수단

[0012] 본 발명은 바람직한 제1구현예로서, 까실쭈부쟁이 (*Aster ageratoides* Turcz. var. *ageratoides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백 활성을 갖는 경구 투여용 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 구현예에서, 까실쭈부쟁이 추출물은 까실쭈부쟁이의 꽃, 가지, 줄기, 잎, 미성숙열매, 열매를 포함하는 지상부; 뿌리줄기; 및 뿌리 중 선택된 하나 이상의 추출물인 것일 수 있다.

[0014] 상기 구현예에서, 까실쭈부쟁이 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜, 프로필렌글리콜, 초산에틸, 부틸렌글리콜, 에테르 및 클로로포름으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 혼합 용매로 추출된 것일 수 있다.

[0015] 상기 구현예에 의한 경구 투여용 조성물은 까실쭈부쟁이 추출물을 0.01 내지 90 중량%로 포함하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명은 바람직한 제2구현예로서, 까실쭈부쟁이를 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜, 프로필렌글리콜, 초산에틸, 부틸렌글리콜, 에테르 및 클로로포름으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 혼합 용매로 추출하는 단계; 추출액을 여과하는 단계; 및 상기 여과 후 감압농축하는 단계를 포함하는 경구 투여용 조성물 제조방법을 제공한다.

[0017] 상기 구현예에 의한 경구 투여용 조성물 제조방법 중 추출하는 단계에서 혼합 용매는 까실쭈부쟁이 시료 중량의 1~30배로 혼합하는 것일 수 있다.

[0018] 상기 구현예에서, 추출하는 단계는 10~100℃에서 1시간~4일동안 추출하는 것일 수 있다.

[0019] 상기 구현예에서, 추출하는 단계는 열탕 추출, 환류 순환 추출, 침지 추출 및 압력 추출 중 선택된 방법으로 추출하는 것일 수 있다.

- [0020] 본 발명은 바람직한 제3구현예로서, 상기의 경구 투여용 조성물 포함하는 식품 첨가제를 제공한다.
- [0021] 본 발명은 바람직한 제4구현예로서, 상기의 경구 투여용 조성물 포함하는 식품을 제공한다.
- [0022] 상기 구현예에 따른 식품은 음료, 칩류, 면류, 가공류, 곡류, 정제, 연질캡셀 및 과립제 중 선택된 하나 또는 그 이상인 것일 수 있다.

효 과

- [0023] 본 발명의 경구 투여용 조성물은 시험관 내 (*in vitro*) 실험에서 우수한 티로시나제 저해활성을 나타내며 동물 세포를 이용한 실험에서 우수한 멜라닌 합성 저해 활성을 나타내는 까실쑥부쟁이 추출물을 함유하는바, 피부 미백용으로 유용한 식품 첨가제 및 식품과 같은 경구 투여용 조성물을 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 까실쑥부쟁이 (*Aster ageratoides* Turcz. var. *ageratoides*)는 국화과로 생약명은 산백국(山白菊)이며, 속명은 결کم취, 까실쑥부쟁이, 산쑥부쟁이라고 한다. 분포 국가는 한국, 중국, 러시아, 인도북부 등이고 원산지는 우리나라로 전국의 들판, 숲 가장자리에 여러해살이 형태로 자라며 키는 100cm이고 꽃색은 연한 보라이며 꽃피는 시기는 8월~10월이고 열매 맺는 시기는 10월이며 특징은 잎 끝이 뾰족하며 길이 10~14cm, 폭 3~6cm로 표면이 거칠고, 가장자리에 톱니가 있으며 줄기와 잎에 잔털이 있어 까실까실한 느낌이 있다. 연한 잎을 식용으로 이용하며 어린 잎을 생채로 먹거나 살짝 데쳐 무쳐 먹기도 하고 나물을 뜨거운 물에 데쳐 햇볕에 말려 목나물로 사용하거나 순을 잘게 썰어 쌀과 섞어 나물밥을 지어 먹는다. 성분은 kaempferol, quercetin, quercetin rhamnoside 등이 함유되어 있으며 보고되고 있는 성분 연구는 *Aster ageratoides* Turcz. 꽃봉오리의 물-에탄올 추출물로부터 쿠마로일퀴닉산 (p-coumaroylquinic acid), 카페오일퀴닉산 (caffeoylquinic acid), 페룰로일퀴닉산 (feruloylquinic acid), 디카페오일퀴닉산 (dicaffeoylquinic acid)과 디페룰로일퀴닉산 (diferuloylquinic acid)에 대해 각각 3개의 이성체와 쿠마로일-카페오일퀴닉산 (p-coumaroyl-caffeoylquinic acid), 쿠마로일-페룰로일퀴닉산 (p-coumaroyl-feruloylquinic acid), 카페오일-페룰로일퀴닉산 (caffeoyl-feruloylquinic acid)의 각각 6개의 이성체로 총 33종류의 클로로제닉산 (chlorogenic acid)이 분리되었다 (Clifford MN et al, *Phytochem. Anal.*, 17(6), pp384-393), 2006). 또한 Yan FL 등의 보고에 의하면 *Aster ageratoides* var. *pilosus*로 부터 2개의 새로운 펜타사이클릭 트리테르페노이드 (pentacyclic triterpenoids)인 2-알파,3-베타-16알파-트리하이드록실-24알파-알-올리안-12-엔-28-오익 산 [2beta,3beta,16alpha-trihydroxyl-24alpha-al-olean-12-en-28-oic acid (1)]과 2-베타,3-베타-디하이드록실-16-O-베타-D-글루코피라노즈-24-알파-알-올리안-12-엔-28-오익 산[2beta,3beta-dihydroxyl-16-O-beta-D-glucopyranose-24alpha-al-olean-12-en-28-oic acid (2)]와 이미 알려진 2개의 펜타사이클릭 트리테르페노이드 (pentacyclic triterpenoids)를 분리동정하고 항균성 및 항종양활성을 시험하였다 (Yan FL et al, *Pharmazie*, 59(11), pp882-884, 2004). 또한 *Aster ageratoides*로부터 기존물질인 크로토코릴리퓨란 (crotoctorylifuran)과 오플로판논 (oplopanone) 분리동정 되었다 (Ahmed AA et al, *Pharmazie*, 57(8), 567-569). 까실쑥부쟁이의 약리작용에 대하여 그다지 연구되어있지 않으며 항암작용, 항균작용, 항소포작용 등에 대한 보고가 있을 뿐이다(김창진 등, *한국농화학회지*, 39(5), pp409-413, 1996).
- [0026] 한의에서는 뿌리가 달린 전초를 산백국이라 하여 거풍, 청열, 해독, 소담, 지해의 효능이 있고, 풍열에 의한 감기, 편도선염, 기관지염, 독사교상, 벌에 쏘인 자상을 치료한다고 알려져 있다(한국의 약용식물, 배기환 저, 학창사, pp491, 2000).
- [0027] 이처럼 까실쑥부쟁이에는 다양한 기능이 있다고 알려졌으나, 과학적으로 증명된 결과는 제한된 상태이다. 또한, 까실쑥부쟁이의 생리활성기능과 관련된 특허는 없으며 발명 제목 '국화꽃 쑥연초' (대한민국 공개특허 제2002-0046108호)에서 까실쑥부쟁이가 언급되고 있을 뿐이며 까실쑥부쟁이의 미백활성과 관련된 내용으로는 어떠한 교시나 개시된 바는 없었다.
- [0028] 이에 본 발명자는 종래의 미백 원료들이 가지고 있는 문제점을 해결하고 보다 미백 효과가 뛰어난 원료를 찾기 위하여 200여종의 천연물로부터 효능물질을 탐색한 결과, 까실쑥부쟁이 추출물이 우수한 티로시나제 저해활성을 가짐을 시험관 내 및 세포 내 실험을 통해 확인하였으며, 까실쑥부쟁이 추출물의 미백효능이 매우 강력할 뿐만 아니라, 이러한 천연물은 오랜 기간 동안 인류가 이용하여 왔기 때문에 인간에게 비교적 안전한 성분을 함유할

것으로 여겨짐으로 미백용 기능성 소재로 개발될 수 있을 것으로 여겨진다.

- [0029] 본 발명은 바람직한 구현예로서, 까실쑥부쟁이 (*Aster ageratoides* Turcz. var. *ageratoides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 경구 투여용 조성물을 제공한다.
- [0030] 상기 까실쑥부쟁이 추출물은 하기와 같이 수득될 수 있다.
- [0031] 까실쑥부쟁이는 세척 후 까실쑥부쟁이 시료 중량의 약 1 내지 30배, 바람직하게는 약 1 내지 15배에 달하는 용매를 첨가하여 약 10 ℃ 내지 100 ℃에서 약 1시간 내지 4일, 바람직하게는 2시간 내지 2일 동안 열탕 추출, 환류 순환 추출, 침지 추출 또는 압력추출 등의 추출방법을 사용하여, 여과(또는 원심분리 후 여과), 감압농축 및 동결 건조하여 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물을 수득할 수 있다.
- [0032] 상기 까실쑥부쟁이는 꽃, 가지, 줄기, 잎, 미성숙열매, 열매를 포함하는 지상부; 뿌리줄기; 및 뿌리 중 선택된 하나 이상의 추출물인 것일 수 있다.
- [0033] 상기 용매는 정제수를 포함한 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜, 프로필렌글리콜, 초산에틸, 부틸렌글리콜, 에테르 및 클로로포름으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 혼합 용매인 것일 수 있다.
- [0034] 상기의 까실쑥부쟁이 추출물은 20 내지 90%의 액상, 분말 또는 과립형태일 수 있다.
- [0035] 상기 추출방법에 의해 얻어진 까실쑥부쟁이 추출물의 티로시나제 저해활성을 측정한 결과, 미백효과가 탁월하여 미백용 식품 첨가제 및 식품과 같은 경구 투여용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.
- [0036] 또한, 까실쑥부쟁이는 오랫동안 생약 및 식용으로 사용되어 오던 약재로서 이들로부터 추출된 본 발명의 추출물들 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없어, 안심하고 섭취할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 경구 투여용 조성물은 티로시나아제 활성 억제 및 멜라닌 세포에서의 멜라닌 생성 저해를 통한 미백 효과의 개선을 고려하여, 경구 투여용 조성물 총 중량에 대하여 상기 까실쑥부쟁이 추출물을 0.01 내지 90 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 70중량%, 가장 바람직하게는 0.01 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.
- [0038] 또한 본 발명은 바람직한 구현예로서, 상기의 경구 투여용 조성물을 포함하는 식품첨가제를 제공한다.
- [0039] 식품첨가제(또는 식품첨가물)는 식품의 제조, 가공, 또는 보존을 위해 식품에 첨가, 혼합, 침윤 기타의 방법에 의해 사용되는 물질을 말한다. 문화가 발달하고 경제적 여유가 생기면서 식품면에서 양적 증대와 더불어 질적 개선이 동반되었으며, 편리성에 대한 요구가 더욱 커졌다. 그 결과 대량생산되는 가공식품, 인스턴트식품 등이 식탁에 오르는 일이 많아졌고 매일 새로운 종류의 식품들이 쏟아져 나오고 있으며, 이러한 현상은 식품첨가제의 사용을 동반하고 있다.
- [0040] 식품첨가제의 종류에는 천연물과 합성품의 두 종류가 있으며, 보통 그 기능과 용도에 따라 분류한다. 현재 한국에서 식품첨가물로 허가되어 있는 품목은 화학적 합성품 370여종, 천연첨가물 50여종이며, 주로 용도에 따라서 보존료, 살균제, 산화방지제, 착색료, 발색제, 표백제, 조미료, 감미료, 착향료, 팽창제, 강화제, 개량제, 유화제, 증점제(호료) 및 안정제, 피막제, 껌 기초제, 소포제, 용제, 이형제, 방충제, 품질개량제와 기타 식품제조용 첨가제 등으로 분류되어 쓰이고 있는 것들이다. 한편, 기능성식품은 식품의 1차 기능인 영양기능, 2차 기능인 감각기능 이외에 3차 기능인 생체조절 기능이 잘 나타나도록 개발된 식품을 말한다. 기능성식품은 생체조절 기능에 의해 만성질환을 예방함으로써 삶의 질을 향상시키고, 개인 및 국가의 의료비를 경감하며, 건강사회 구현으로 풍요로운 복지국가를 형성하는데 직접적으로 기여한다. 식품이 나타낼 수 있는 생체조절 기능에는 항암, 혈압강하, 콜레스테롤 저하, 혈전 저해, 당뇨 예방, 노화억제 등이 있으며, 식품에 이러한 기능성을 부여하기 위하여 특정한 기능을 갖는 소재를 식품 첨가제로 사용할 수도 있다.
- [0041] 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물을 함유하는 경구 투여용 조성물로서 식품첨가제는 구연산, 후발산, 아디픽산, 젖산, 사과산 등의 유기산; 인산나트륨, 인산칼륨, 산성피로인산염, 폴리인산염(중합인산염) 등의 인산염; 폴리페놀, 카테킨(catechin), 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물(rosemary extract), 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등의 천연 항산화제 중 선택된 어느 하나 또는 그 이상을 포함할 수 있다.
- [0042] 또한 유당 카제인, 텍스트린, 포도당, 설탕, 솔비톨 중 선택된 어느 하나 또는 그 이상을 추가로 포함할 수 있다.

- [0043] 아울러 본 발명은 바람직한 구현예로서, 상기의 경구 투여용 조성물을 포함하는 식품을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 식품은 상기의 식품 첨가제 이외에 보존료, 살균제, 산화 방지제, 향신료, 조미료, 감미료, 착향료, 팽창제, 강화제, 개량제, 유화제, 여러 가지 영양제, 합성 풍미제와 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색료, 발색제, 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 소포제, 용제, 이형제, 방부제, 품질 개량제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 등의 기타 식품제조용 첨가제를 더 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 식품첨가제 및 기타 식품제조용 첨가제는 식품에 침지, 분무 또는 혼합하여 상기 식품에 첨가할 수 있다.
- [0046] 상기 구현예에 따른 식품은 음료, 칩류, 면류, 가공류, 곡류, 정제, 연질캡셀 및 과립제 중 선택된 하나 또는 그 이상인 것일 수 있다.
- [0047] 상기 음료, 칩류, 면류, 가공류, 곡류를 보다 구체적으로 살펴보면, 상기 식품은 과일, 야채, 과일이나 야채의 건조제품; 또는 절단제품, 과일주스, 야채주스 또는 이들의 혼합주스; 칩류, 면류, 축산가공식품, 수산가공식품, 유가공식품, 발효유식품, 두류식품, 곡류식품, 미생물발효식품, 제과제빵, 양념류, 육가공류, 산성음료수, 감초류, 허브류 중 어느 하나 또는 하나 이상이다.
- [0048] 예컨대, 껌 제조시 까실썩부쟁이 추출물 0.5 중량%, 껌베이스 25 중량%, 솔비톨 72 중량%를 60 내지 70 °C로 예비 가열한 믹서에 넣어 혼합한 후, 믹서내부 온도를 55 °C로 유지시키면서 페퍼민트 향료를 2.5 중량% 첨가한 다음 30분 혼합한 다음 추출하여 압연하고, 24-48시간 숙성시킨 후 재단하고 포장하여 껌을 제조할 수 있다(실시예 2 참조).
- [0049] 또한 제과제빵 제조과정에서 반죽할 때 첨가 사용하며, 소스, 양념장에도 첨가 사용하고, 또한 발효유 또는 요구르트 등에 분말이나 액상을 첨가하여 기능성 또는 기호성 식품으로 사용할 수 있다. 생약 추출분말을 김치, 젓갈, 야채 가공에 직접 투입하여 맛 보존성, 항산화, 변색 방지의 목적으로 사용할 수도 있다. 육가공에서 햄, 소세지 등에 침지 또는 분무 살포하여 사용하며, 분말 또는 과립 형태의 본 발명에 따른 식품첨가물을 마늘, 파, 생강, 허브(herb), 감초 등을 섞어 향신료를 만들어 사용할 수 있고, 수산가공식품인 어묵, 생선, 조미어포, 젓갈 등에도 침지, 분무 및 첨가 방법으로 사용하며, 김치, 단무지, 깍두기, 야채 절임 등에도 침지, 분무 및 혼합하여 첨가할 수 있다.
- [0050] 이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0051] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0052]
- [0053] **참고예 1. 동물세포주 배양**
- [0054] 본 발명에 사용된 동물세포주인 마우스 유래의 멜라노사이트인 멜란-에이 (Melan-a) 세포주는 영국의 베넷박사 (Dr. D.C. Bennett, University of London)로부터 분양받았으며, 2 mM 글루타민 (glutamine), 100 U/ml 페니실린 G (penicillin G), 100 µg/ml 스트렙토마이신 (streptomycin, Gibco, USA), 10 % 우태아혈청 (FBS, fetal bovine serum, Gibco, USA), 100 nM 티피에이 (TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, Sigma, USA)를 포함하는 RPMI 1640 (Gibco, USA) 배지를 첨가하여 37 °C의 10 % 이산화탄소 및 90 % 공기 조성의 배양기 (CO₂ incubator) 내에서 계대배양하면서 실험에 이용하였다.
- [0055] **제조예 1. 까실썩부쟁이 추출물의 제조**
- [0056] 본 발명에 사용한 까실썩부쟁이는 꽃, 가지, 줄기, 잎, 미성숙열매, 열매를 포함하는 지상부; 뿌리줄기; 및 뿌리를 채취하고 선택된 하나 이상의 검정된 공시재료 를 세척한 후 절단하여 사용하였다. 시료인 까실썩부쟁이 1 kg에 80 % 에탄올을 1: 5 (w/v)의 비율로 첨가하고 혼합 후 상온에서 48시간 동안 3회 반복 환류 추출하여 획득

한 추출액을 여지 No.2 (Advantec TOYO, Japan)로 여과한 후 50 ℃에서 회전감압농축기 (Rotary vacuum evaporator ; Heidolph VV2011, Switzerland)로 감압농축한 후에 동결 건조하여 갈색의 까실쑥부쟁이 에탄올 추출물을 수득하였으며, -20 ℃에 보관하며 티로시나제 저해활성 분석을 위한 시료로 사용하였다.

[0057] 실험예 1. 까실쑥부쟁이 추출물의 티로시나제 저해활성 측정 (in vitro)

[0058] 티로시나제 (Tyrosinase; monophenol monooxygenase, E.C.1.14.18.1, Sigma, USA) 저해 활성 측정은 티로시나제의 작용 결과 생성되는 도파퀴논을 비색법에 의해 측정하는 마사모토 등 (Masamoto Y et al., Planta Med., 40(4), pp361-365, 1980)의 방법을 일부 변형하여 실험하였다.

[0059] 100 mM 인산나트륨완충액 (sodium phosphate buffer, pH 6.8) 0.6 ml과 버섯유래의 티로시나제 (mushroom tyrosinase, 40 unit, Sigma, USA) 15 μ l와 디메틸설폭사이드 (Dimethylsulfoxide)로 20 mg/ml 농도가 되도록 녹인 제조예 1의 까실쑥부쟁이 추출물을 최종 농도가 50, 100, 250 μ g/ml이 되도록 첨가하고 최종 0.86 ml이 되도록 증류수로 보정하였다. 상기 혼합액을 실온에서 5분간 방치한 다음 기질로서 3.4 mM 디페닐알라닌 (DOPA, L-3,4-dihydroxyphenylalanine) 0.14 ml을 첨가한 후 분광광도계 (spectrophotometer; U-3000, Hitachi, Japan)로 475 nm에서 반응액 중 생성된 도파퀴논 (Dopaquinone)의 변화량을 실온에서 10분간 측정 (time scanning)하여 시료용액 대신 용제를 첨가한 대조구의 흡광도와 비교하여 티로시나제 저해율(inhibition rate, %)을 구하여, 그 결과를 하기 표 1 및 도 1에 나타내었다.

[0061] 도 1에 나타난 바와 같이, 까실쑥부쟁이 추출물을 50, 100, 250 μ g/ml 첨가하고 티로시나제에 의한 도파 (DOPA)의 도파퀴논 (DOPAquinone)으로의 시간적 변환을 스캐닝한 결과 농도의존적으로 티로시나제 저해활성은 나타났다.

[0062] 자세하게는 도 2에 나타난 바와 같이, 까실쑥부쟁이 추출물을 50 μ g/ml 첨가시 31.7 %, 100 μ g/ml 첨가시 50.8 %, 250 μ g/ml 첨가시 60.3 % 티로시나제 활성을 저해하였다. 상기 결과로부터 까실쑥부쟁이 추출물은 탁월한 티로시나제 저해활성을 가짐을 확인할 수 있다.

표 1

까실쑥부쟁이 추출물 처리 농도 (μ g/ml)	티로시나제 저해활성 (%)
50	31.7
100	50.8
250	60.3

[0064] 실험예 2. 까실쑥부쟁이 추출물의 멜라닌합성 저해 효능 측정 (동물세포주를 이용한 시험)

[0065] 동물세포주에서 타이로시나제 저해 효능 측정은 까실쑥부쟁이 추출물을 처리한 마우스의 멜라노사이트 세포주인 멜란-에이 세포의 멜라닌 생성 억제 활성을 측정함으로써 이뤄졌다. 멜라닌 정량은 호소이 등 (Hosoi J et al., Cancer Res., 45(4), pp1474-1478, 1985)의 방법을 변형하여 사용하였다.

[0066] 마우스의 멜라노사이트 (melanocyte)인 멜란-에이 (Melan-a) 세포를 6-웰 플레이트 (6-well plate)에 3×10^4 세포수/well로 분주하고 48시간 배양하여 세포를 부착시킨 후, 까실쑥부쟁이 추출물을 최종농도 10, 20, 30 μ g/ml이 되도록 처리하고 5일 동안 배양하였다. 배양세포를 염화칼슘 (CaCl_2), 염화마그네슘 (MgCl_2)이 들어있지 않은 인산염완충액 (DPBS; Dulbecco's Phosphated Buffered Saline)으로 2회 세척하고 트립신 (trypsin, Gibco, USA)을 처리하여 세포를 분리하여 각 군당 동일한 수의 세포를 수집하였다. 세포침전물을 염화칼슘 (CaCl_2), 염화마그네슘 (MgCl_2)이 들어있지 않은 인산염완충액 (DPBS; Dulbecco's Phosphated Buffered Saline)으로 세척하고 100 μ l의 10% 디메틸설폭시화물 (DMSO)이 첨가된 1 노르말농도 (N)의 수산화나트륨 (NaOH) 용액으로 현탁한 후 60 ℃에서 30분간 처리하고 475 nm에서 흡광도를 측정하여 합성 멜라닌으로 작성된 표준곡선으로부터 멜라닌양을 환산하여 표 2, 도 3 에 나타내었으며 까실쑥부쟁이 추출물에 의해 갈색의 멜라닌색소가

감소되는 것은 도 4에 나타내었다.

[0067] 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물을 최종 농도가 10, 20, 30 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 배지에 첨가하여 배양한 마우스의 멜란-에이 세포주로 상기의 시험방법에 따라 멜라닌양을 비교하여 티로시나제(tyrosinase) 저해능을 실험한 결과, 까실쑥부쟁이 추출물을 10 $\mu\text{g/ml}$ 첨가시 15.9 %, 20 $\mu\text{g/ml}$ 첨가시 75.3 %, 30 $\mu\text{g/ml}$ 첨가시 82.4 % 멜라닌 합성을 저해하였다. 상기 결과로부터 멜란-에이 세포주에서의 까실쑥부쟁이 추출물의 멜라닌합성 저해활성에 따른 IC_{50} 는 6.1 $\mu\text{g/ml}$ 으로 나타났다. 또한 도 4에 나타난 바와 같이, 까실쑥부쟁이 추출물 첨가량이 증가함에 따라 갈색의 멜라닌 색소가 현저히 감소하였으며, 또한 도 5에서 기존 미백제로 사용되고 있는 2 mM 알부틴 (α -arbutin, Sigma, USA)의 티로시나제 저해율이 62.3%인 것을 감안할 때 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물의 티로시나제 저해활성으로 인한 멜라닌 합성 저해효능은 상당히 강력함을 확인할 수 있었다.

표 2

[0068]

까실쑥부쟁이 추출물 처리 농도 ($\mu\text{g/ml}$)	멜라닌 생성 억제 활성 (%)
10	15.9
20	75.3
30	82.4
2 mM 알부틴	62.3

[0069] 따라서 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물은 시험관 내 (*in vitro*) 실험에서 우수한 티로시나제 저해활성을 나타내며 동물세포를 이용한 실험에서 우수한 멜라닌 합성 저해 활성을 나타내는 바 피부미백용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[0070] 실험예 3. 까실쑥부쟁이 추출물의 세포독성실험

[0071] 까실쑥부쟁이 추출물의 세포 독성을 알아보기 위하여, MTT 분석법으로 독성 여부를 확인하였다. 사람 섬유아세포(fibroblast, 한국세포주은행)를 96-웰 플레이트에 각 웰당 8×10^3 cell/well로 접종하여 200 μl DMEM(Dulbecco Minimum Essential Medium) 배지에서 24시간동안 배양한 후, 각 웰당 0~0.2%의 농도별로 까실쑥부쟁이 추출물을 처리하여 다시 24시간동안 배양하였다. 배양한 플레이트는 0.5mg/ml MTT 용액(시그마, 미국)을 첨가한 후 4시간 후 배지를 제거하고 200 μl 의 DMSO 용액으로 세포를 용해하였고, 그 반응액을 ELISA Reader(Molecular Device, 미국)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 까실쑥부쟁이 추출물 무처리군을 대조군으로 하였으며, 하기 식 1에 따라 세포 증식율을 계산하였으며, 그 결과는 하기 표 3과 같다.

[0072] <식 1>

[0073] 세포 증식율(%) = (실험군의 흡광도 / 대조군의 흡광도) $\times$ 100

표 3

[0074]

까실쑥부쟁이 추출물 처리 농도 (%)	세포 증식율 (%)
0.01	101.1
0.05	101.8
0.10	102.2
0.15	102.6
0.20	103.1
0.25	102.8
0.30	103.2
대조군	100.0

[0075] 이하, 본 발명의 실시예로서 츄잉껌, 캔디, 비스킷, 아이스크림, 소세지, 초콜렛, 음료, 정제, 연질캡셀 및 과립제의 제형을 예시하고 있으나, 본 발명의 경구 투여용 조성물을 포함하는 형태는 이에 한정되는 것은 아니다.

[0076] **실시예 1 : 츄잉껌(A)의 제조**

[0077] 껌베이스 20 중량%

[0078] 설탕 76.5 중량%

[0079] 까실쑥부쟁이 추출물 0.5 중량%

[0080] 후르츠향 1 중량%

[0081] 물 2 중량%

[0082] 상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 츄잉껌을 제조하였다.

[0083] **실시예 2 : 츄잉껌(B)의 제조**

[0084] 껌 베이스 25 중량%

[0085] 솔비톨 72 중량%

[0086] 까실쑥부쟁이 추출물 0.5 중량%

[0087] 페퍼민트 후레버 2.5 중량%

[0088] 상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 츄잉껌을 제조하였다.

[0089] **실시예 3 : 캔디(A)의 제조**

[0090] 설탕 54.5 중량%

[0091] 물엿 45 중량%

[0092] 까실쑥부쟁이 추출물 0.4 중량%

[0093] 오렌지향 0.1 중량%

[0094] 상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 캔디를 제조하였다.

[0095] **실시예 4 : 캔디(B)의 제조**

[0096] 말티톨 53.6 중량%

[0097] 환원물엿 45 중량%

[0098] 까실쑥부쟁이 추출물 0.5 중량%

[0099] 천연허브향 0.14 중량%

[0100] 상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 캔디를 제조하였다.

[0101] **실시예 5 : 비스킷의 제조**

[0102] 박력1급 밀가루 88 kg

[0103]	중력1급 밀가루	76.4 kg
[0104]	정백당	16.5 kg
[0105]	식염	2.5 kg
[0106]	포도당	2.7 kg
[0107]	팜쇼트닝	40.5 kg
[0108]	암모	5.3 kg
[0109]	중조	0.6 kg
[0110]	중아황산나트륨	0.55 kg
[0111]	쌀가루	5.0 kg
[0112]	비타민 B ₁	0.003 kg
[0113]	비타민 B ₂	0.003 kg
[0114]	밀크향	0.16 kg
[0115]	물	71.1 kg
[0116]	진지분유	4 kg
[0117]	대용분유	1 kg
[0118]	제일인산칼슘	0.1 kg
[0119]	살포염	1 kg
[0120]	분무유	25 kg
[0121]	까실쭉부쟁이 추출물	1.7 kg
[0122]	상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 비스킷을 제조하였다.	
[0123]	실시예 6 : 아이스크림의 제조	
[0124]	유지방	10.0 중량%
[0125]	무지유고형분	10.8 중량%
[0126]	설탕	12.0 중량%
[0127]	물엿	3.0 중량%
[0128]	유화안정제(스팬, span)	0.5 중량%
[0129]	향료(스트로베리)	0.15 중량%
[0130]	물	63.05 중량%
[0131]	까실쭉부쟁이 추출물	0.5 중량%
[0132]	상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 아이스크림을 제조하였다.	
[0133]	실시예 7 : 소세지의 제조	
[0134]	돈육	63.6중량%
[0135]	계육	27.5중량%

[0136]	전분	3.5중량%
[0137]	대두단백	1.7중량%
[0138]	식염	1.62중량%
[0139]	포도당	0.5중량%
[0140]	기타첨가물(글리세린)	1.34중량%
[0141]	까실썩부쟁이 추출물	0.24중량%
[0142]	상기와 같이 배합하여 통상적인 방법으로 소세지를 제조하였다.	

[0143] **실시예 8 : 초콜렛의 제조**

[0144]	설탕	34.5 중량%
[0145]	코코아 버터	34 중량%
[0146]	코코아 매스	15 중량%
[0147]	코코아 파우더	15 중량%
[0148]	레시틴	0.5 중량%
[0149]	바닐라향	0.5 중량%
[0150]	까실썩부쟁이 추출물	0.5 중량%
[0151]	상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 초콜렛을 제조하였다.	

[0152] **실시예 9 : 음료의 제조**

[0153]	설탕	7.78 중량%
[0154]	구연산	0.11 중량%
[0155]	바닐라향	0.1 중량%
[0156]	까실썩부쟁이 추출물	10 중량%
[0157]	정제수	82.01 중량%
[0158]	상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 음료를 제조하였다.	

[0159] **실시예 10 : 정제의 제조**

[0160]	유당	100mg
[0161]	전분	100mg
[0162]	까실썩부쟁이 추출물	500mg
[0163]	상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 정제를 제조하였다.	

[0164] **실시예 11 : 연질캡셀의 제조**

[0165]	유당	50mg
[0166]	전분	50mg
[0167]	탈크	2mg

- [0168] 까실쑥부쟁이 추출물 500mg
- [0169] 상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 젤라틴 캡슐에 충전하여 연질캡셀을 제조하였다.

[0170] **실시예 12 : 과립제의 제조**

- [0171] 포도당 28 중량%
- [0172] 텍스트린 28 중량%
- [0173] 70%에탄올 8.7 중량%
- [0174] 비타민 C 0.3 중량%
- [0175] 까실쑥부쟁이 추출물 35 중량%
- [0176] 정제수 82.01 중량%
- [0177] 상기 조성 및 함량과 통상적인 방법으로 60mesh의 과립제를 제조하였다.

[0178] **실험예 4. 미백효과 확인**

- [0179] 상기 실시예 9, 10, 11 및 12에서 제조된 식품과 비교예 1에서 제조된 식품을 20~50세의 성인남녀 50명에게 섭취하도록 하였다. 10명씩 5개군으로 나누어 1군은 실시예 9의 식품, 2군은 실시예 10의 식품, 3군은 실시예 11의 식품, 4군은 실시예 12의 식품, 5군은 비교예 1의 식품을 4주 동안 1일 3회 1개씩 식사에 관계없이 복용토록 하였으며, 복용 후 그 효과를 자기보고식 설문조사법에 의해 측정하였다. 복용 후 피부톤 개선 효과는 0점에서 3점까지로 나누어 평가하였으며, 그 결과는 하기 표 4와 같다.

표 4

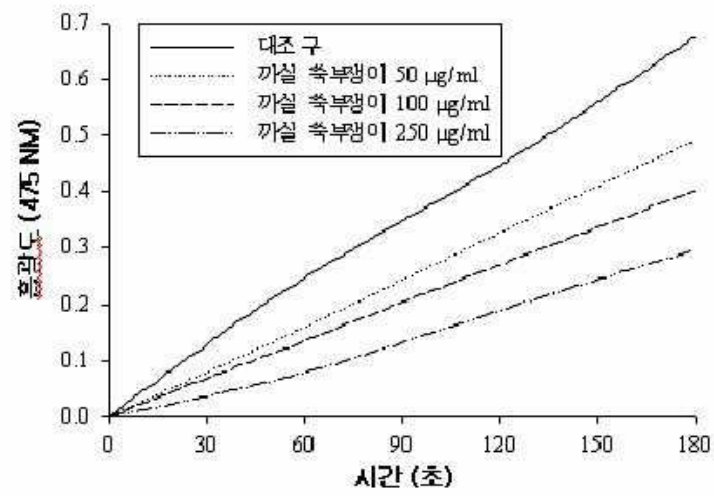
구분	0점	1점	2점	3점	계
실시예9	-	2	4	4	10
실시예10	-	-	2	8	10
실시예11	-	-	3	7	10
실시예12	-	1	3	6	10
비교예1	10	-	-	-	10

도면의 간단한 설명

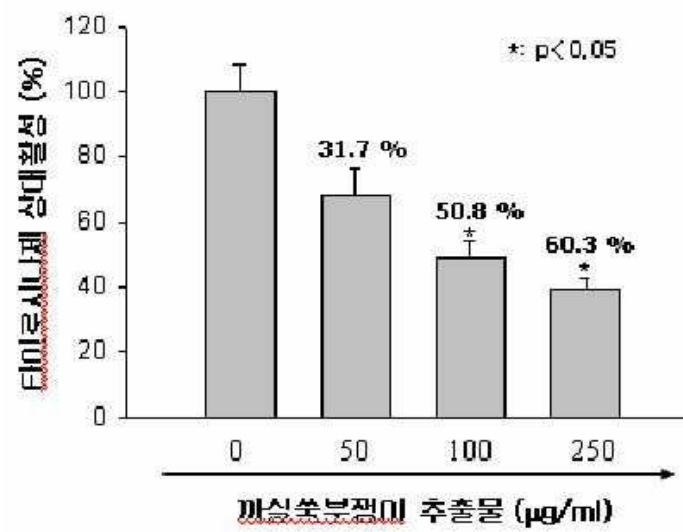
- [0181] 도 1은 도파 (DOPA; 3,4-dihydroxyphenylalanine)의 도파퀴논 (DOPAquinone)으로의 변환에 있어 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물의 농도별 (50, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 시간에 따른 변환 억제 활성을 나타낸 그래프,
- [0182] 도 2는 본 발명의 까실쑥부쟁이 추출물의 농도별 (50, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 티로시나제 억제 활성을 나타낸 그래프,
- [0183] 도 3는 마우스 멜라노사이트 세포주인 멜란-에이 (Melan-a)에 대한 까실쑥부쟁이 추출물의 농도별 (10, 20, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처리에 의한 멜라닌 색소 형성 억제율을 나타낸 그래프,
- [0184] 도 4는 마우스 멜라노사이트 세포주인 멜란-에이 (Melan-a)에 대한 까실쑥부쟁이 추출물의 농도별 (10, 20, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)처리 후 세포주가 형성한 멜라닌 색소의 변화를 나타낸 사진,
- [0185] 도 5는 마우스 멜라노사이트 세포주인 멜란-에이 (Melan-a)에 대한 알부틴 (α -arbutin)의 농도별 (0.5, 1, 2 mM) 처리에 의한 멜라닌 색소 형성 억제율을 나타낸 그래프이다.

도면

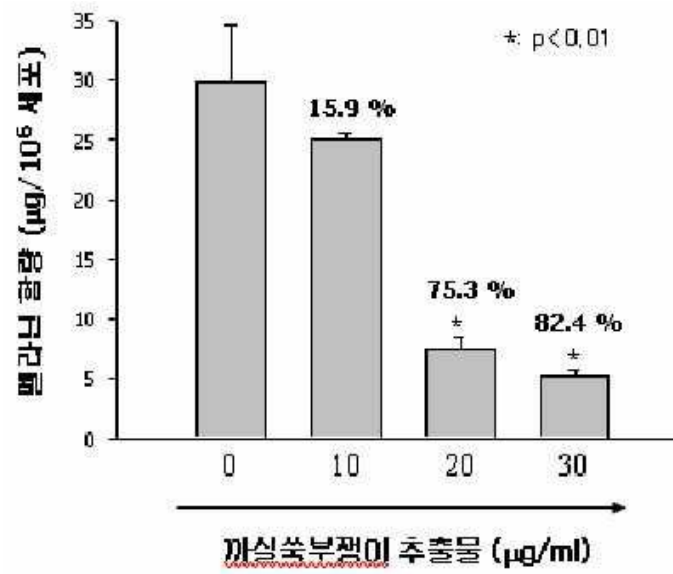
도면1



도면2



도면3



도면4



도면5

