(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
A61K 8/97 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0108864
(43) 공개일자 2006년10월18일

(21) 출원번호 10-2005-0031074
(22) 출원일자 2005년04월14일

(71) 출원인 인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자 노경호
서울특별시 강남구 대치동 500 개포2차 우성아파트 14동 201호
김은기
서울 강남구 대치동 은마아파트 8-212
김동만
서울 구로구 궁동 190-101
이향복
인천 계양구 작전동 동남도 두리마을 동남A 518동 2003호
김은철
인청광역시 남구 용현동 253 인하대학교 고순도분리연구실
안소영
서울 양천구 신정4동 983-13 한솔그린 아트빌 A동 201호
홍은숙
서울 관악구 신림5동 1410-18
리광화
인천광역시 남구 용현동 인하대학교 고순도분리연구실

(74) 대리인 이원희

심사청구 : 있음

(54) 서장채국화 추출물, 이의 제조 방법 및 이를 유효성분으로함유하는 미백용 화장료 조성물

요약

본 발명은 서장채국화 추출물, 이의 제조 방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 미백용 화장료 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 서장채국화 추출물은 멜라닌 생성 저해 활성이 우수하고 세포 독성이 없으므로, 미백용 화장료 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 3

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 서장채국화로부터 추출, 분리 및 정제과정을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명에 따른 서장채국화 추출물의 에틸아세테이트 층의 추출 분획(1～4)을 제조용 HPLC로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명에 따른 서장채국화 추출물(물 층, 클로로포름 층, 에틸아세테이트 층)을 농도별로(50, 100, 200㎍/㎖) 처리하였을 때, 멜라닌 함량을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명에 따른 서장채국화 추출물의 에틸아세테이트 층의 추출 분획(1～4)을 농도별로(10, 50, 100㎍/㎖) 처리하였을 때, 멜라닌 함량을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명에 따른 서장채국화 추출물(물 층, 클로로포름 층, 에틸아세테이트 층)의 세포 독성 실험 결과를 나타낸 도이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 서장채국화(*Chrysanthemum morifolium* Ramat) 추출물, 이의 제조 방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 미백용 화장료 조성물에 관한 것이다.

피부는 외부 환경과 직접 접하면서 인체를 보호하며 생화학적이고 물리적인 기능을 가지고 있는 아주 중요한 조직이다. 이 조직은 크게 3가지 즉, 표피(epidermis), 진피(dermis), 그리고, 피하(hypodermis)로 나누어진다. 멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 고분자 물질로 피부의 표피층에 존재하는 검은 색소로서, 표피의 기저층에 존재하는 멜라노사이트(melanocyte)로부터 만들어져 케라티노사이트(keratinocyte)라는 표피 세포로 이동한다. 생체 내에는 멜라닌을 분해하는 효소가 없고, 다만 케라티노사이트가 표피에서 떨어져나갈 때 같이 피부에서 떨어져나가는 것으로 제거된다.

멜라닌은 햇빛 UV의 빛 에너지를 흡수하여 UV에 의한 손상으로부터 진피 이하의 피부 기관을 보호하는 역할을 하며, 피부 생체 내에 생겨난 아민, 유리기, 금속이온, 유해산소 및 프리라디칼 등을 잡아주는 등 외부 유해인자로부터 피부를 보호해주는 유용한 역할을 수행한다. 또한, 피부 세포 내의 멜라닌 양에 따라 사람의 피부색을 결정한다. 멜라닌 색소가 많은 사람은 갈색 또는 검은 색 피부를 갖는 반면, 멜라닌 색소가 적은 사람은 흰색의 피부를 갖게 된다.

이러한 멜라닌이 비정상적으로 적게 생산되면 백반증과 같은 피부병변이 유발되고, 반대로 일광, 호르몬변화, 염증, 약제 등에 의해 멜라닌이 과도하게 합성되거나 각화작용이 원활히 이루어지지 않아 멜라닌이 완전히 없어지지 않으면 피부에 손상을 줄 뿐 만 아니라 피부의 색소가 침착되어 기미, 주근깨를 형성하며, 이와 같은 병변으로부터 나아가 피부암의 원인이 되기도 한다. 따라서, 이러한 색소 침착 현상을 방지하기 위해서는 멜라닌 생성 과정의 일부분을 저해하여 멜라닌의 생성을 감소 시켜야 한다.

멜라닌의 생합성은 주로 티로시나아제 작용에 의해 이루어지는 것으로 보고되었지만, 1980년대 이후 생체 내에서 도파크롬(dopachrome)이 DHI로 전환되는 경로 외에 도파크롬 타우토머라아제 작용에 의해 DHICA(5,6-di-hydroxyindole carboxylic acid)로 전환되는 새로운 경로가 밝혀졌다. 도파크롬에서 DHICA를 거쳐 멜라닌을 합성하는 경로는 세포가 독성이 있는 생성 중간 대사물질로부터 자신을 보호하기 위한 파생 경로로 추정되고 있다. 이렇게 생성된 멜라닌은 멜라노좀을 통해 케라티노사이트로 옮겨지고 여기에서 약 28일간의 각화 과정을 거치면서 피부 표면으로 나와 각질과 함께 소실된다.

피부에서의 색소침착 방지는 주로 다음의 네 가지 관점에서 연구되어 왔다. 첫째로, 멜라닌 합성의 주효소인 티로시나아제(tyrosinase) 활성을 조절하기 위하여 티로시나아제 합성 저해 물질이나, 티로시나아제의 기질에 대한 길항물질(antagonist)을 개발한다. 둘째로, 동물의 멜라닌 생합성 장소인 멜라노사이트의 기능을 저하시키기 위해 멜라노사이트에 독성을 나타내는 물질을 개발한다. 셋째로, 멜라닌 합성 경로의 중간 대사물질인 도파(dopa)의 산화방지를 위해 도파 환원

물질을 개발한다. 마지막으로, 멜라닌 생성 기구인 제 1 효소 티로시나아제와 도파크롬(DOPA chrome)에서 DHICA로의 변환을 촉매 하는 제 2 효소인 도파크롬 타우토머라아제(DOPA chrome tautomerase), 및 DHICA에서 인돌-5,6-퀴논-2-카르복실산(indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid)으로의 변환을 촉매하는 제 3 효소의 활성을 동시에 감소시킨다.

오늘날 동양권의 여성들은 백옥같이 하얗고 깨끗한 피부를 선호하며 이를 미의 중요한 기준으로 삼고 있기 때문에 피부색소 이상침착의 치료 및 미용욕구 충족을 위한 미백제에 대한 개발이 활발히 이루어지고 있다. 피부가 검게 되는 것을 막기 위한 멜라닌 생성의 억제는 미백의 주된 목적으로 멜라닌 생합성 저해제는 의약품, 화장품 및 식품 등에서 피부질환 치료제, 식품갈변방지제 또는 피부미백제 등에 적용되고 있다.

현재 피부미용을 위한 미백제의 개발에 있어서, 생성된 멜라닌 색소를 환원시켜 탈색하는 방법과 멜라닌 색소를 형성하는 효소인 티로시나제의 활성을 억제하는 방법이 알려져 있다. 그러나 멜라닌 색소를 환원시키기 위해 사용되는 토코페롤이나 비타민류 등을 사용한 미백제는 멜라닌 색소의 탈색효과가 미미한 것으로 알려져 있다. 따라서 티로시나제의 활성을 저해시킴으로써 멜라닌 색소의 생성을 억제하는 저해제가 주목받고 있다.

종래의 화장품 분야에서는 미백성분으로서, 예를 들면, 코지산(Kojic acid), 알부틴(Arbutin) 등과 같은 티로시나제 효소활성을 억제하는 물질, 하이드로퀴논(Hydroquinone), 비타민 C(L-Ascorbic acid) 및 이들의 유도체와 각종 식물 추출물이 사용되어 왔다.

그러나, 처방계 중에서의 안정성이 나빠 분해되어 착색되거나, 이취의 발생, 생체 레벨에서의 효능, 효과의 불분명 및 안전성 문제 등으로 그 사용이 제한되고 있는 실정이다. 코지산은 티로시나제의 활성부위에 존재하는 구리이온을 흡착시켜 효소활성을 저해하지만, 화장품에 배합 시 불안정성, 피부 부작용의 문제 및 최근 동물실험 결과 간암유발이 밝혀져 화장품 원료로 사용이 중지되었다. 비타민 C 및 그 유도체는 산화가 잘되는 불안정성 때문에 화장품 원료로서 사용이 어려우며, 하이드로퀴논은 피부에 대한 미백효과는 탁월하지만 알레르기를 유발하는 성질, 멜라닌 생성 세포에 대한 독성, 피부에의 영구 탈색화 등 피부에 대한 자극성이 높으며, 최근 발암성 물질로 규정되어 사용이 금지되어 각 나라별로 제한적인 농도만 허가하고 있다. 또한, 알부틴은 하이드로퀴논에 글루코피라노사이드(Glucopyranoside)가 결합된 유도체로 하이드로퀴논 사용 시 나타나는 부작용이 적으면서 인체에 대한 독성은 없이 멜라닌 색소의 합성을 억제하는 작용이 있어, 멜라닌 색소 침착이 증가되는 피부질환의 치료제로서 이용가능성이 제시되었으나, 피부에 존재하는 효소에 의해 일부 분해되는 단점이 있다.

이들 미백물질들 외에 천연물 특히 식물 중에서 미백활성성분을 찾기 위한 연구도 계속 이루어져왔고, 그 중 상백피(일본공개특허 소 55-44375호, 소 64-26507호, 소 64-83009호, 평 1-25687호, 평 5-139950호 및 대한민국 공개특허 제92-002109호, 제97-021273호), 감초(일본공개특허 소 60-214721호, 소 60-214728호, 소 63-23809호, 소 64-63506호, 평 1-149706호 및 대한민국 공개특허 제92-002109호, 제97-025601호), 작약(일본공개특허 소 61-246109호 및 대한민국 공개특허 제92-002111호), 계피(일본공개특허 소 63-30403호, 평 5-139954호), 고삼(일본공개특허 소 64-26507호 및 대한민국 공개특허 제92-002110호), 갈근(일본공개특허 소 60-214727호, 소 64-16709호), 당귀(일본공개특허 소 56-92211호, 평 4-26610호), 목단피(일본공개특허 소 60-214721호, 소 61-50915호, 소 61-246109호), 반하(일본공개특허 평 2-207028호, 대한민국 공개특허 제96-033442호), 알로에(일본공개특허 소52-44375호, 평 2-207030호, 평 5-139950호)등 다수의 식물추출물 및 생약재 추출물 등이 티로시나아제에 작용하여 멜라닌 생성을 억제한다는 사실이 밝혀졌으나, 이들 역시 안전성, 변색 가능성 등의 측면에서 화장품이나 의약품에 유효농도 이상으로 사용하는 데는 많은 문제점을 갖고 있다. 따라서, 피부에 안전하고 변색 가능성이 적은 미백 화장료에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다.

한편, 국화는 엉거시과에 속하는 다년생 초본으로 국화속 식물이다. 국화속 식물은 세계적으로 약 200여종 알려지고 있으며, 국화가 혈압을 낮추고 풍을 막아주며 혈기에 좋고 몸을 가볍게 하며 위장을 편하게 하고, 감기, 두통, 현기증에 유효하고 알려져 있다. 또한, 서장채국화는 국화속이 가지고 있는 일반성질을 가지고 있으며, 일곱 가지 부동한 색을 띄므로 '칠채국(七彩菊, Chrysanthemum)'이라고도 한다.

이에, 본 발명자들은 피부에 안전하고 변색 가능성이 적은 미백 화장료에 대하여 천연 약용 식물 중에서 연구하던 중, 중국 티벳에서 자생하는 서장채국화 추출물에서 멜라닌 생성 저해 활성이 우수함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 멜라닌 생성 저해 활성을 갖는 서장채국화 추출물을 제공하고자 한다.

또한, 본 발명은 서장채국화 추출물의 제조하는 방법을 제공하고자 한다.

또한, 본 발명은 서장채국화 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 화장료 조성물을 제공하고자 한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 멜라닌 생성 저해 활성을 갖는 서장채국화 추출물을 제공한다.

또한, 본 발명은 서장채국화 추출물의 제조 방법을 제공하며,

(1) 서장채국화에 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 첨가하여 추출하는 단계,

(2) 상기 단계(1)에서 얻은 추출물을 클로로포름으로 분배 추출하는 단계,

(3) 상기 단계(2)에서 얻은 수용액 층을 에틸아세테이트로 분배 추출하는 단계, 및

(4) 상기 단계(3)에서 얻은 에틸아세테이트 층을 여과, 분리 및 정제하는 단계로 이루어진다.

본 발명의 서장채국화 추출물의 제조 방법을 상세히 설명하면 다음과 같다.

중국 티벳에서 자생하는 서장채국화를 물로 세척하여 이물질을 제거한 후, 그늘에서 건조하고, 분쇄한다. 분쇄된 서장채국화에 적당한 양의 용매를 첨가하여 완전히 침지되도록 하며, 교반하면서 추출한다. 추출 용매로는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매가 바람직하며, 가장 바람직하게는 물이다. 상기 추출 용매의 양은 서장채국화 건중량의 10 내지 30배이며, 보다 바람직하게는 15 내지 25배로 하며, 가장 바람직하게는 20배로 한다.

추출 방법은 실온에서 함침하거나, 가온할 수 있으며, 바람직하게는 70℃에서 3시간 동안 추출한다.

상기에서 얻어진 추출물을 냉각시키고, 여과한다. 여과된 용액은 회전식 감압증발기를 이용하여 감압 농축한다.

상기에서 얻은 농축액과 클로로포름을 분액 깔때기에 넣고 충분히 교반시킨 다음, 수용액 층과 클로로포름 층으로 분액 한다. 이때, 바람직하게는 클로로포름의 양은 농축액과 동량이 되도록 한다. 상기에서 얻은 수용액 층과 에틸아세테이트를 분액 깔때기에 넣고 충분히 교반시킨 다음, 수용액 층과 에틸아세테이트 층으로 분액 한다. 이때, 바람직하게는 에틸아세테이트의 양은 수용액과 동량이 되도록 한다. 상기에서 얻은 수용액 층, 클로로포름 층, 에틸아세테이트 층을 각각 회전식 감압증발기로 증발시켜 분말화 한 후, 멜라노마 세포를 이용한 멜라닌 생성 저해 실험을 통하여 에틸아세테이트 층에서 멜라닌 생성 저해 활성이 가장 우수함을 확인하였다.

상기에서 얻은 서장채국화 추출물의 에틸아세테이트 층을 여과한 다음, 제조용 컬럼을 이용한 크로마토그래피를 실시하여 4개의 분획(1 ~ 4)으로 분리한다. 이때, 이동상 용매로 아세토니트릴과 물(60 : 40)의 혼합 용매를 사용한다. 상기 분획 중 분획 2에서 멜라닌 생성 저해 활성이 가장 우수함을 확인하였다.

또한, 본 발명은 상기 서장채국화 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 서장채국화 추출물의 물, 클로로포름, 에틸아세테이트 층은 B16 멜라노마 세포에 의한 멜라닌 생성을 알부틴 처리군에 비해 각각 최대 약 18%, 약 45% 및 약 11.8%까지 감소시킨다(도 3). 상기의 세 가지 서장채국화 추출물의 용매 층 중 멜라닌 생성 저해 효과가 가장 우수한 에틸아세테이트 층을 크로마토그래피하여 얻은 분획 1, 2, 3 및 4 중 20~50분 사이에 검출되는 분획 2는 알부틴 처리군에 비해 9.6%까지 멜라닌 생성을 감소시킨다(도 4). 또한, 각 용매 층은 B16 멜라노마 세포를 대상으로 실시한 세포 독성 실험에서 독성을 전혀 나타내지 않는다(도 5).

따라서, 본 발명의 서장채국화 추출물 중 에틸아세테이트 층 및 에틸아세테이트 추출 분획 2에서 멜라닌 생성 저해 활성이 우수하게 나타나고 세포 독성이 없으므로, 미백용 화장료 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물에서 서장채국화 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.005~20 중량 % 함유되는 것이 바람직하지만, 멜라닌 생성 억제 효과가 있고 독성이 나타나지 않는 범위에서 사용 용도에 따라서 상기 범위 이상 또는 이하로도 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물은 상기 서장채국화 추출물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

본 발명의 서장채국화 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물로 제조되는 화장품은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조할 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다. 또한, 본 발명의 서장채국화 추출물을 함유하는 화장품 이외에도 피부 과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유함으로써 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 국소적용 또는 전신 적용할 수 있는 보조제 형태로 제조될 수 있다.

적합한 화장품의 제형으로는 예를 들면, 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀젼, 현탁액, 마이크로에멀젼, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포좀), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱(conceal stick)의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.

또한, 본 발명의 화장료 조성물은 서장채국화 추출물에 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 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 그리고, 상기의 성분들은 피부과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

본 발명의 화장료 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 수렴화장수, 유연화장수, 영양화장수, 각종 크림, 에센스, 팩, 파운데이션 등과 같은 화장품류와 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 미용액 등이 있다.

본 발명의 화장료 조성물의 구체적인 제형으로서는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형을 포함한다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 서장채국화 추출물의 제조

1-1: 서장채국화로부터 추출

중국 티벳에서 제공받은 서장채국화 10g을 분쇄한 후 200 ㎖의 물을 첨가하여 70℃에서 3 시간동안 교반, 추출하였다. 추출된 용액을 상온에서 하루 동안 냉각시켰다. 냉각시킨 용액을 32㎛의 체로 여과한 후 다시 여과지로 여과하였다. 여과액은 회전식 감압증발기(Buchi Rotavapor R-200, Buchi Labotechuik AG. Switzerland)를 이용하여 50 ㎖까지 농축시켰다. 상기에서 얻은 농축액 50 ㎖와 50 ㎖의 클로로포름을 분액깔때기에 넣고, 충분히 교반시킨 다음 수용액 층과 클로로포름 층으로 분액 하였다. 그 다음 단계로 상기에서 얻은 수용액 층 50 ㎖에 50 ㎖의 에틸아세테이트를 넣고 충분히 교반시킨 후 수용액 층과 에틸아세테이트 층으로 분액 하였다. 상기에서 얻은 수용액 층, 클로로포름 층, 에틸아세테이트 층의 용액을 각각 회전식 감압증발기로 증발시켜 분말화하여, 수용액 층 850 ㎎, 클로로포름 층 20 ㎎ 및 에틸아세테이트 층 138 ㎎을 얻었다.

1-2: 서장채국화 추출물의 분리 및 정제

상기 1-1에서 얻은 서장채국화 추출물의 에틸아세테이트 층을 0.2㎛ PTFE(polytetrafluoruethylene) 주사기 여과기(syringe filter)를 이용하여 여과한 후 크로마토그래피 시료로 사용하였다. 상기 여과액 중 2 ㎖를 역상 제조용 컬럼(21.5×500 mm, GFC, C18, 13 ㎛, JAI, 일본)에 주입하고, 이동상 용매로 아세토니트릴 : 물 = 60 : 40인 혼합 용매를 이용하여 용리시켰다. 이동상 용매의 용리속도는 3.5 ㎖/min이었으며, 검출 파장은 254 nm로 유지하였다.

에틸아세테이트 층은 용리 시간 100분 이내에 검출되었으며, 4개의 분획(1 ~ 4)으로 분리하였다. 각 분획을 감압 회전식농축기로 감압, 농축시켜, 3분 내지 18분 사이의 분획 1은 11.5 ㎎, 20분 내지 50분 사이의 분획 2는 67.4 ㎎, 50분 내지 58분 사이의 분획 3은 13.8㎎ 및 60분 내지 75분 사이의 분획 4는 14.1 ㎎을 얻었다.

본 발명에 따른 서장채국화로부터 추출, 분리 및 정제 과정은 도 1에 나타내었으며, HPLC 분석결과는 도 2 에 나타내었다.

실험예 1: 서장채국화 추출물의 미백 효과 실험

본 발명의 서장채국화 추출물의 미백 효과를 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 실시하였다.

멜라닌 세포는 B16 멜라노마 세포(ATCC, CRL-6475)로서 ㈜태평양에서 분양받아 사용하였고, 배양 배지로는 RPMI 1640 배지에 10%(v/v %) FBS (fetal bovine serum), 1%의 항생제(페니실린/스트렙토마이신)를 첨가하여 만들었다.

B16 세포를 1×10^5 세포/웰을 표준으로 접종한 후 24시간이 지나서, 상기 실시예 1에서 제조한 서장채국화 추출물(물, 클로로포름, 에틸아세테이트)을 50, 100, 200 ㎍/㎖의 농도로, 에틸아세테이트 층의 4개의 추출 분획(1 ~ 4)을 10, 50, 100 ㎍/㎖의 농도로 처리하고 방치하였다. 48시간이 지난 후 세포들을 마이크로 원심분리 튜브에 옮겨 PBS(인산완충용액)로 세척하고, 10% DMSO(Dimethylsulfoxide)를 함유하고 있는 NaOH 250 ㎕에 용해시켰다. 용해시킨 세포들을 85℃ 인큐베이터에서 30분 동안 방치시켜 멜라닌이 용해되도록 하였다. 200 ㎕의 용액을 96 웰 플래이트에 옮겨서 475 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 함량을 검측하였다. 이때 대조군으로서 미백 성분으로 잘 알려져 있는 알부틴을 처리한 군을 사용하였다.

결과는 도 3 및 도 4에 나타내었다.

도 3에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 서장채국화 추출물 중 에틸아세테이트 층의 50, 100, 200 ㎍/㎖ 농도에서 38.75, 27.18, 11.8%의 멜라닌 함량을 나타내어 대조군에 비해 멜라닌 함량이 현저히 낮게 나타남을 확인하였다. 또한, 본 발명의 서장채국화 추출물의 에틸아세테이트 층이 물 층 및 클로로포름 층 보다 멜라닌 함량이 낮게 나타남을 확인하였다.

또한, 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 서장채국화 추출물의 에틸아세테이트 추출 분획 중 분획 2에서 각 농도별(10, 50 100 ㎍/㎖)로 각각 33.3, 26.5, 9.6%로 나타나, 멜라닌 함량이 가장 낮게 나타남을 확인하였다.

따라서, 본 발명의 서장채국화 추출물은 멜라닌 생성 저해 활성이 우수하므로, 미백용 화장료 조성물에 유용하게 사용할 수 있다.

실험예 2: 서장채국화 추출물의 세포 독성 실험

본 발명의 서장채국화 추출물의 세포 독성을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

세포 독성 검사는 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 시그마 화학사, 미국)를 이용하여 진행하였다. B16 멜라노마 세포를 2×104 세포/웰로 96 웰 플래이트에 접종하고, 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 2일 동안 방치한 후, 5 ㎎/㎖의 MTT용액을 100 ㎕씩 각 웰에 첨가하고 4 시간 동안 더 방치하였다. 그 다음 세포를 100 ㎕의 DMSO에 용해시키고 ELISA 리더(reader)를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 활성을 검측하였다.

결과는 도 5에 나타내었다.

도 5에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 서장채국화 추출물은 어떤 시료도 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때, 세포 생장률이 높아 독성이 없는 것으로 나타났다.

하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

제제예 1: 유연 화장수

서장채국화 추출물을 함유한 유연 화장수의 제제예는 다음 표 1의 조성과 같이 제조하였다.

[표 1]

원료	함량(중량%)
본 발명의 서장채국화 추출물	10.00
1,3-부틸렌글리콜	1.00
디소듐이디티에이	0.05
알란토인	0.10
디포타슘글리시리제이트	0.05
시트릭애씨드	0.01
소듐시트레이트	0.02
글리세레스-26	1.00
알부틴	2.00
하이드로제네이티드캐스터오일	1.00
에탄올	30.00
보존제	미량
착색제	미량
착향제	미량
정제수	잔량

제제예 2: 영양 크림

서장채국화 추출물을 함유한 영양크림의 제제예는 다음 표 2의 조성과 같이 제조하였다.

[표 2]

원료	함량(중량%)
본 발명의 서장채국화 추출물	10.0
1,3-부틸렌 글리콜	7.0
글리세린	1.0
D-판테놀	0.1
식물 추출물	3.2
마그네슘알루미늄실리케이트	0.3
PEG-40 스테아레이트	1.2
스테아릭애씨드	2.0
폴리소르베이트 60	1.5
친유형글리세릴스테아레이트	2.0
소르비탄세스퀴올리에이트	1.5
세테아릴알코올	3.0
미네랄오일	4.0
스쿠알란	3.8
카르릴릭/카프릭트리글리세라이드	2.8
식물성 오일	1.8
디메치콘	0.4
디포타슘글리시리제이트	미량
알란토인	미량
소듐 히아루로네이트	미량
토코페릴아세테이트	적량
트리에탄올아민	적량
보존제	적량

착향제	적량
정제수	잔량

발명의 효과

본 발명의 서장채국화 추출물은 멜라닌 생성 저해 활성이 우수하고 세포 독성이 없으므로, 미백용 화장료 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

멜라닌 생성 저해 활성을 갖는 서장채국화 추출물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 서장채국화 추출물은 서장채국화를 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매로 추출한 것임을 특징으로 하는 서장채국화 추출물.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 상기 용매가 물인 것을 특징으로 하는 서장채국화 추출물.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 상기 서장채국화 추출물에 클로로포름을 가하여 분배 추출하고, 분배 추출된 수용액 층에 에틸아세테이트를 가하고 분배 추출하여 에틸아세테이트 층을 얻는 것을 특징으로 하는 서장채국화 추출물.

청구항 5.

제 4항에 있어서, 상기 클로로포름 또는 에틸아세테이트는 각각 수용액 층에 대하여 동량으로 첨가되는 것을 특징으로 하는 서장채국화 추출물.

청구항 6.

제 4항에 있어서, 상기 서장채국화 추출물의 에틸아세테이트 층을 아세토니트릴과 물의 혼합 용매를 이동상으로 하여 제조용 HPLC로 분리하는 것을 특징으로 하는 서장채국화 추출물.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 상기 아세토니트릴과 물이 60:40으로 혼합되는 것을 특징으로 하는 서장채국화 추출물.

청구항 8.

(1) 서장채국화를 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 첨가하여 열수 추출하는 단계,

(2) 상기 단계(1)에서 얻은 열수 추출물을 클로로포름으로 분배 추출하는 단계,

(3) 상기 단계(2)에서 얻은 수용액 층을 에틸아세테이트로 분배 추출하는 단계, 및

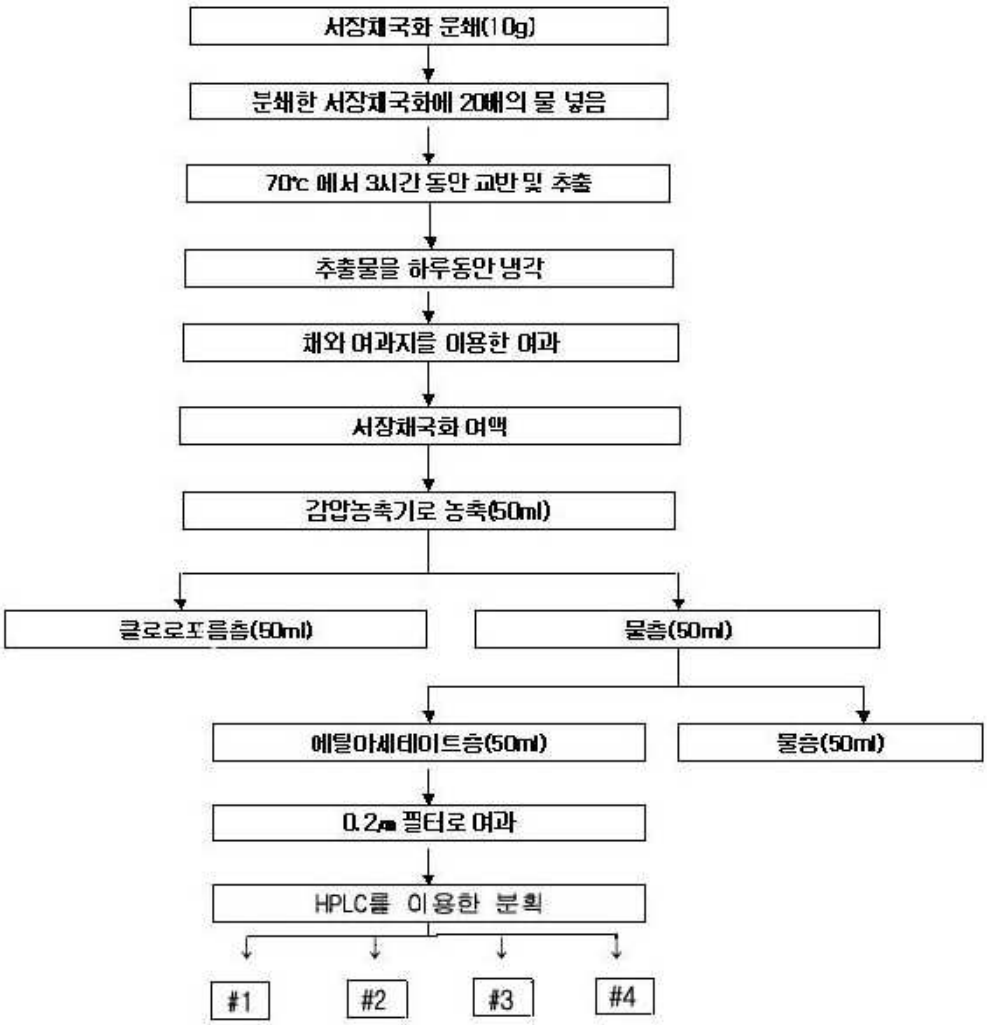
(4) 상기 단계(3)에서 얻은 에틸아세테이트 층을 여과, 분리 및 정제하는 단계로 이루어지는 서장채국화 추출물의 제조 방법.

청구항 9.

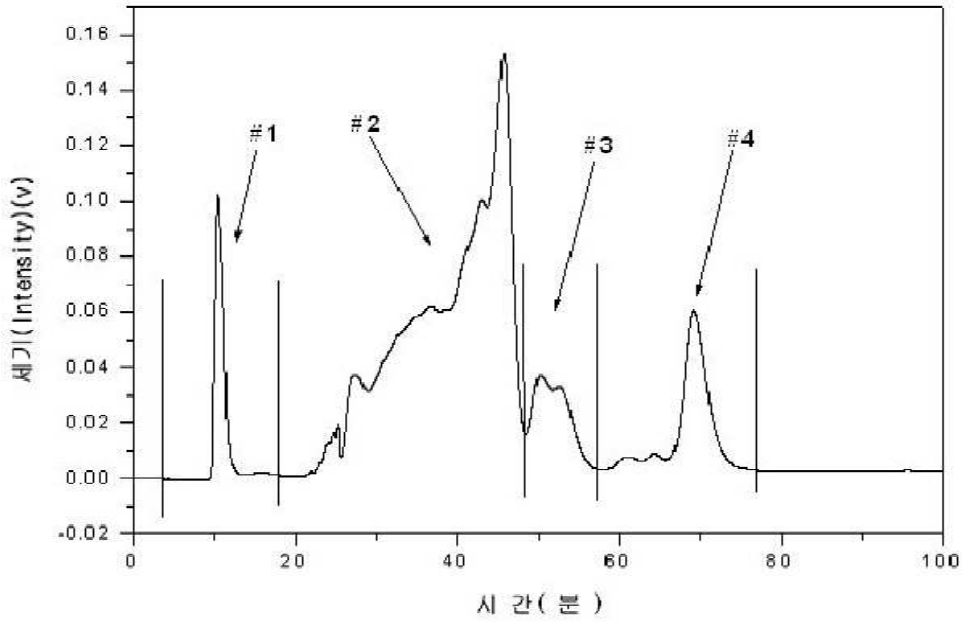
제 1항 내지 7항 중 어느 한 항의 서장채국화 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 화장료 조성물.

도면

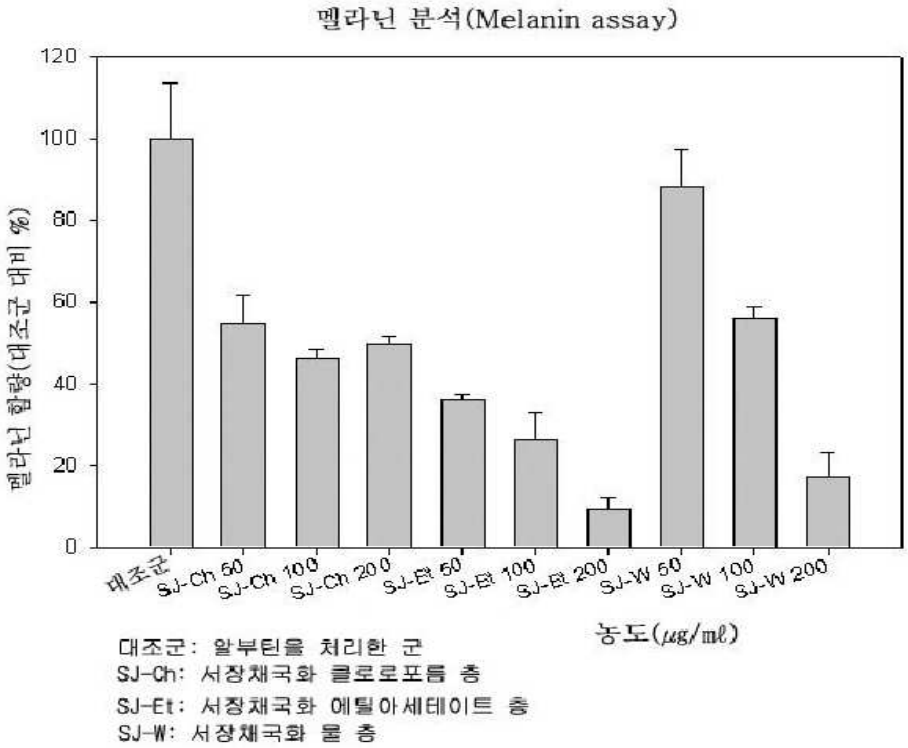
도면1



도면2

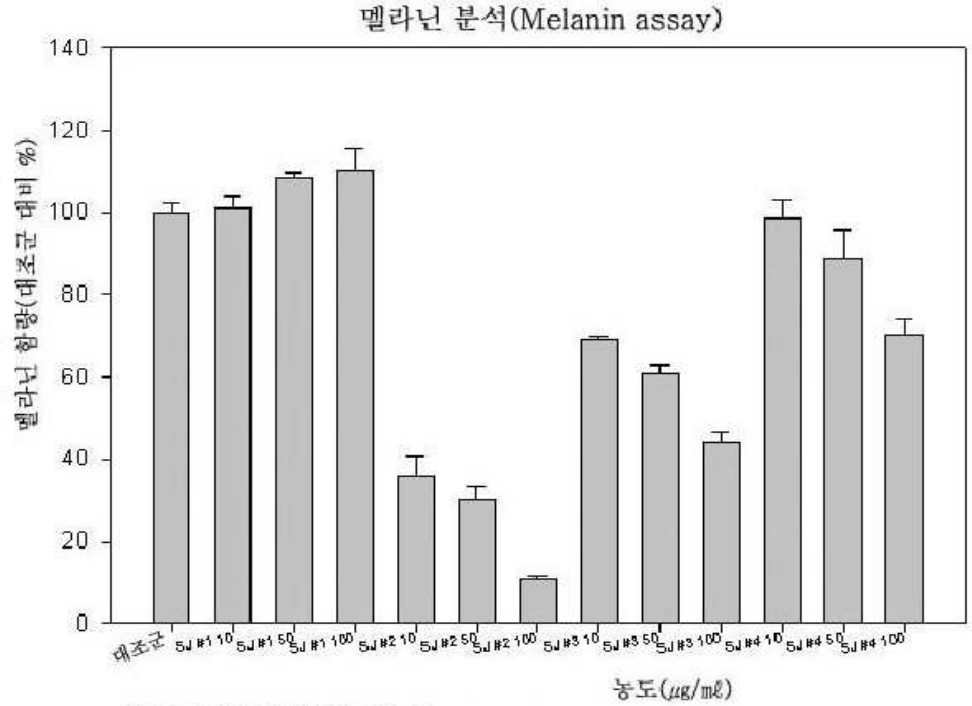


도면3



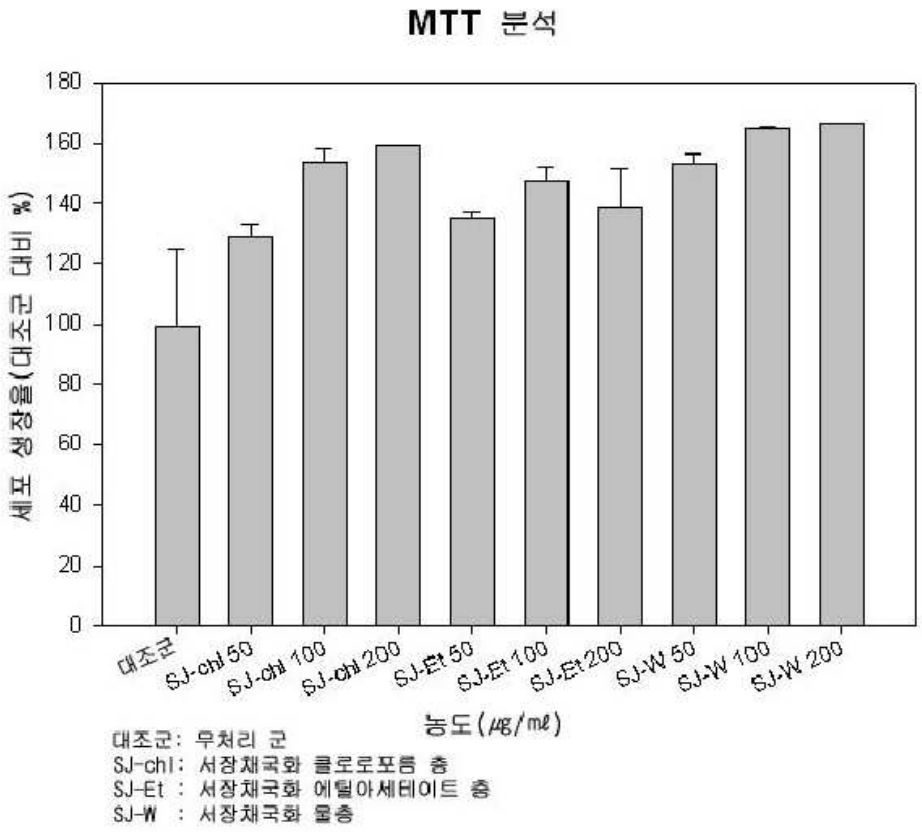
대조군: 알부틴을 처리한 군
SJ-Ch: 서장채국화 클로로포름 층
SJ-Et: 서장채국화 에틸아세테이트 층
SJ-W: 서장채국화 물 층

도면4



대조군: 알부틴을 처리한 군
SJ #1: 서장채국화 에틸아세테이트 층 분획 1
SJ #2: 서장채국화 에틸아세테이트 층 분획 2
SJ #3: 서장채국화 에틸아세테이트 층 분획 3
SJ #4: 서장채국화 에틸아세테이트 층 분획 4

도면5


MTT 분석
세포 생장율(대조군 대비 %)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
대조군
SJ-chl 50
SJ-chl 100
SJ-chl 200
SJ-Et 50
SJ-Et 100
SJ-Et 200
SJ-W 50
SJ-W 100
SJ-W 200
농도(㎍/㎖)
대조군: 무처리 군
SJ-chl: 서장채국화 클로로포름 층
SJ-Et : 서장채국화 에틸아세테이트 층
SJ-W : 서장채국화 물층