

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 12월 20일 (20.12.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/173383 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/58 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61K 31/343 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/004647
- (22) 국제출원일: 2012년 6월 13일 (13.06.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0058903 2011년 6월 17일 (17.06.2011) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): (주) 아모레퍼시픽 (AMOREPACIFIC CORPORATION) [KR/KR]; 서울특별시 용산구 한강로 2가 181, 140-777 Seoul (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 이옥찬 (LEE, Ok Chan) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1 아모레퍼시픽기술연구원, 446-729 Gyeonggi-do (KR).
염명훈 (YEOM, Myeong Hun) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1 아모레퍼시픽기술연구원, 446-729 Gyeonggi-do (KR).
조가영 (CHO, Ga Young) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1 아모레퍼시픽기술연구원, 446-729 Gyeonggi-do (KR).
이진영 (LEE, Jin Young) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1 아모레퍼시픽기술연구원, 446-729 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 김순영 (KIM, Sun-Young); 서울특별시 종로구 수송동 80-6 석탄회관빌딩 10층, 110-727 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

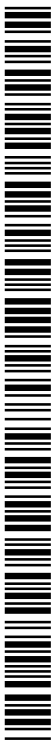
— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: SKIN COMPOSITION FOR EXTERNAL USE CONTAINING CRYPTOTANSHINONE AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭 : 크립토탄시논을 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물

(57) Abstract: The present invention provides a skin composition for external use containing cryptotanshinone, an isomer thereof, a precursor thereof, a salt thereof, a hydrate thereof, or a solvate thereof as an active ingredient. The composition according to the present invention has the effects of suppressing skin aging, smoothing skin wrinkles, skin whitening, skin moisturizing, improving atopic dermatitis, and improving skin tone and skin transparency.

(57) 요약서: 본 발명은 크립토탄시논(Cryptotanshinone), 그의 이성질체, 그의 전구체, 그의 염, 그의 수화물 또는 그의 용매 화물을 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 피부 노화 억제, 피부 주름 개선, 피부 미백, 피부 보습, 아토피 개선, 피부 혈색 개선 및 피부 투명도 개선 효과가 있다.



WO 2012/173383 A2

명세서

발명의 명칭: 크립토탄시논을 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 크립토탄시논을 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인간의 피부는 나이가 들어감에 따라 여러 가지 내적, 외적 요인에 의해 변화를 겪는다. 즉, 내적으로는 신진대사를 조절하는 각종 호르몬의 분비가 감소하고, 면역 세포의 기능과 세포들의 활성이 저하되어 생체에 필요한 면역 단백질 및 생체 구성 단백질들의 생합성이 줄어들게 되며, 외적으로는 오존층 파괴로 인하여 태양 광선 중 지표에 도달하는 자외선의 함량이 증가하게 되고 환경 오염이 더욱 심화됨에 따라 자유 라디칼 및 활성 유해 산소 등이 증가함으로써, 피부의 두께가 감소하고, 주름이 증가되고, 탄력이 감소될 뿐 아니라, 피부 트러블이 자주 발생하며, 기미와 주근깨 및 검버섯 또한 증가하는 등 여러 가지 변화를 일으키게 된다. 또한, 피부 노화에 따라 모세혈관이 감소되거나 변형되어 피부 혈행이 좋지 않게 되어 피부 혈색이 칙칙하게 되고, 피부가 쉽게 거칠어지게 된다.
- [3] 노화가 진행될수록 피부를 구성하는 물질인 콜라겐, 엘라스틴, 히아루론산, 및 당단백질의 함유량 및 배열이 변하거나 감소하는 증상들이 나타나게 되고, 자유 라디칼 및 활성 유해 산소에 의한 산화적 스트레스를 받게 된다. 또한 노화가 진행되거나 자외선에 의해서, 피부를 구성하는 대부분의 세포에서는, 염증을 일으킨다고 알려져 있는 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)을 생성하는 효소인 사이클로옥시게나제-2(Cox-2, cyclooxygenase)의 생합성이 증가하고, 이들 염증성 인자에 의해 피부조직을 분해하는 효소인 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP: Matrix metalloproteinase)의 생합성이 증가하며, iNOS(inducible nitric oxide synthase)에 의한 NO(nitric oxide)생성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 즉 자연적으로 진행되는 내인성 노화에 따른 세포 활성의 감소 및 미세염증에 의해 기질 물질의 생합성이 감소되고, 여러 가지 유해 환경에 의한 스트레스의 증가 및 태양 광선에 의한 활성 산소 종의 증가와 같은 외적 요인에 의해 분해 및 변성이 가속화되어 피부 기질이 파괴되고 얇아지면서 피부 노화의 제반 증상들이 나타나게 된다. 따라서, 이러한 노화의 현상들을 방지하고, 개선시킬 수 있는 활성성분에 대하여 많은 연구가 행해지고 있는 것이 현실이다.
- [4] 사람의 피부색을 결정하는 데는 여러 요인들이 관여하는데, 그 중에서도 멜라닌 색소를 만드는 멜라노사이트(melanocyte)의 활동성, 혈관의 분포, 피부의

두께 및 카로티노이드, 빌리루빈 등의 인체 내외의 색소 함유 유무 등의 요인들이 중요하다. 이중 특히 가장 중요한 요인은 인체 내의 멜라노사이트에서 타이로시나제 등의 여러 효소가 작용하여 생성되는 멜라닌이라는 흑색 색소이다. 이 멜라닌 색소의 형성에는 유전적 요인, 호르몬 분비, 스트레스 등과 관련된 생리적 요인 및 자외선 조사 등과 같은 환경적 요인 등이 영향을 미친다. 신체 피부의 멜라닌 세포에서 생성되는 멜라닌 색소는 검은 색소와 단백질의 복합체 형태를 갖는 펩티드 고분자 물질로서, 태양으로부터 조사되는 자외선을 차단하여 진피 이하의 피부기관을 보호해주는 동시에 피부 생체 내에 생겨난 자유 라디칼 등을 잡아주는 등 피부 내 단백질과 유전자들을 보호해주는 유용한 역할을 담당한다. 이와 같이 피부 내, 외부의 스트레스적 자극에 의해 생겨난 멜라닌은, 스트레스가 사라져도 피부 각질화를 통해서 외부로 배출되기 전까지는 없어지지 않는 안정한 물질이다. 그러나 멜라닌이 필요 이상으로 많이 생기게 되면 기미나 주근깨, 점 등과 같은 과색소 침착증을 유발하여 미용상으로 좋지 않은 결과를 가져오게 된다. 오늘날 동양권의 여성들은 백옥같이 하얗고 깨끗한 피부를 선호하며 이를 미의 중요한 기준으로 삼고 있기 때문에 과색소 침착에 대한 치료 및 미용상 문제를 해결하고자 하는 요구가 늘어나게 되었다. 이와 같은 요구에 부응하여 종전부터 아스코르빈산, 코지산, 알부틴, 하이드로퀴논, 글루타치온 또는 이들의 유도체, 또는 타이로시나제 저해활성을 가진 물질들을 화장품이나 의약품에 배합하여 사용하여 왔으나, 이들의 불충분한 미백효과, 피부에 대한 안전성 문제, 화장품에 배합 시 나타나는 제형 및 안정성의 문제 등으로 인해 그 사용이 제한되고 있다.

- [5] 피부(skin) 중에서 최외각에 위치한 표피(epidermis)의 가장 중요한 기능은, 외부로부터의 다양한 자극(화학물질, 대기오염물질, 건조한 환경, 자외선 등의 물리, 화학적 자극인자)에 대한 방어와 피부를 통한 체내 수분의 과도한 발산을 막는 보호기능이며, 이러한 보호기능은 각질형성세포로 구성된 각질층이 정상적으로 형성되어 있을 때만 그 기능을 유지할 수 있다. 표피 중에서도 가장 바깥에 존재하는 각질층(Stratum corneum, horny layer)은 각질형성세포로부터 형성되며, 분화가 완결된 각질 세포와 그를 둘러싼 지질층으로 구성되어 있다. 각질세포는 표피 최하층에서 지속적으로 증식(proliferation)하는 기저세포(basal cell)가 단계적으로 형태 및 기능상의 변화를 거치며, 피부 표면까지 상승한 특징적인 세포이며, 일정 기간이 경과하면 오래된 각질세포는 피부에서 탈락되고 새로운 각질세포가 그 기능을 대신하게 되는데, 이러한 반복적인 일련의 변화 과정을 「표피 세포의 분화」 또는 「각화(keratinization)」라고 부른다. 각화 과정 중에 각질형성세포는 천연보습인자(Natural Moisturizing Factor; NMF)와 세포간 지방질(세라마이드, 콜레스테롤, 지방산)을 생성하면서 각질층을 형성하여, 각질층이 견고함과 유연성을 가지게 하여 피부장벽(skin barrier)으로서의 기능을 보유하게 한다.

- [6] 그러나, 이러한 각질층은 과도한 세안이나, 목욕 등의 생활 습관적 요소나,

건조한 대기, 오염물질 등의 환경적인 요인, 그리고 아토피성 피부나 노인성 피부 같은 내인성 질환 등으로 인해 쉽게 그 기능이 손실될 수 있으며, 실제 현대에 들어서 더욱 늘어난 여러 요인들로 인해 최근에는 건조 피부 증상 및 이로 인한 제반 장애를 호소하는 사람들이 점점 증가하고 있는 추세이다. 따라서, 적절한 피부 수분을 유지하기 위하여 외부로부터 수분을 공급하거나, 체내로부터의 수분손실을 방지하기 위한 연구가 많이 진행되어 왔으며, 실제로 수분보유능력이 있는 여러 종류의 보습제(moisturizer)가 개발되어 주로 화장품 영역에서 많이 사용되고 있다. 그러나, 생활환경 중에 인간에 대한 위해 요인이 점점 증가하고, 노령인구가 급격히 늘어나면서, 각질층의 생성-탈락속도(turnover rate)가 늦어지고, 각질형성세포의 지질합성능력이 저하되거나, 표피에서 정상적인 세포의 분열, 성숙 및 분화가 원활하지 않음으로써, 각질층의 보습 인자와 지질의 양이 감소되어 정상적인 각질층의 기능을 유지하지 못하는 상태, 즉 피부장벽기능이 와해된 상태의 피부를 갖고 있는 인간들이 점점 증가하는 추세에 있다. 이러한 비정상적인 표피세포의 분열, 분화로 인해 피부는 피부 건조증, 아토피, 건선 등의 다양한 피부 질환을 유발하게 되며, 이러한 제 질환들은 자체로 수분보유기능만을 갖는 통상적인 보습제만으로는 그 증상을 약간 완화시킬 수는 있으나, 근본적인 치유를 기대하기는 어려운 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위해 피부에 대한 부작용 없이 안전하게 사용할 수 있으면서 피부 노화 억제, 피부 미백 효과, 피부 보습 효과, 아토피 개선 효과, 피부 혈색 개선 효과 및 피부 투명화 효과를 가지는 피부 외용제 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예는 크립토탄시논(Cryptotanshinone), 그의 이성질체, 그의 전구체, 그의 염, 그의 수화물 또는 그의 용매화물을 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [9] 본 발명의 일 실시예에서 상기 크립토탄시논의 함량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.0001~10 중량%인 것일 수 있다.
- [10] 본 발명의 일 실시예에서 상기 조성물은 매트릭스 메탈로프로테아제-1 (Matrix metalloproteinase-1: MMP-1)의 발현을 억제하는 효능을 가지는 피부 노화 억제용 및 피부 주름 개선용 피부 외용제 조성물일 수 있다.
- [11] 본 발명의 일 실시예에서 상기 조성물은 타입 I 프로콜라겐(Type 1 Procollagen) 생성을 증가시키는 효능을 가지는 피부 노화 억제용 및 피부 주름 개선용 피부 외용제 조성물일 수 있다.

- [12] 본 발명의 일 실시예에서 상기 조성물은 멜라닌 생성을 억제하는 효능을 가지는 피부 미백용 피부 외용제 조성물일 수 있다.
- [13] 본 발명의 일 실시예에서 상기 조성물은 각질형성세포의 분화를 촉진하는 효능을 가지는 피부 보습용 및 아토피 개선용 피부 외용제 조성물일 수 있다.
- [14] 본 발명의 일 실시예에서 상기 조성물은 피부세포주의 트랜스글루타미네이즈(transglutaminase)의 발현을 증가시키는 효능을 가지는 피부 보습용 및 아토피 개선용 피부 외용제 조성물일 수 있다.
- [15] 본 발명의 일 실시예에서 상기 조성물은 혈관내피세포에서 NO 생성을 증가시키는 효능을 가지는 피부 혈색 개선용 및 피부 투명도 개선용 피부 외용제 조성물일 수 있다.
- [16] 본 발명의 일 실시예에서 상기 조성물은 말초혈액 순환을 개선시키는 효능을 가지는 피부 혈색 개선용 및 피부 투명도 개선용 피부 외용제 조성물일 수 있다.
- [17] 본 발명의 일 실시예에서 상기 조성물은 약학 조성물일 수 있다.
- [18] 본 발명의 일 실시예에서 상기 약학 조성물은 점적제, 연고, 로션, 젤, 크림, 패취, 스프레이, 현탁제 및 유제로 이루어진 군에서 선택되는 제형일 수 있다.
- [19] 본 발명의 일 실시예에서 상기 조성물은 화장료 조성물일 수 있다.
- [20] 본 발명의 일 실시예에서 상기 화장료 조성물은 유연화장수, 영양화장수, 로션, 바디 로션, 영양 크림, 마사지 크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 젤, 패치, 립스틱, 메이크업베이스 및 파운데이션으로 이루어진 군에서 선택되는 제형일 수 있다.

발명의 효과

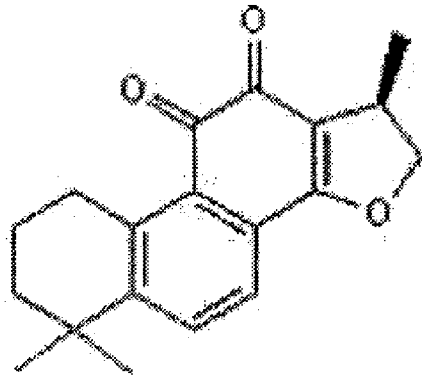
- [21] 본 발명의 조성물은 피부 노화 억제 및 피부 주름 개선 효과를 가질 수 있고, 피부 미백 효과를 가질 수 있으며, 피부 보습 및 아토피 개선 효과를 가질 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 피부 혈색 개선 및 피부 투명도 개선 효과를 가질 수 있다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [22] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [23] 본 발명의 일 실시예는 크립토탄시논(Cryptotanshinone), 그의 이성질체, 그의 전구체, 그의 염, 그의 수화물 또는 그의 용매화물을 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [24] 상기 "이성질체"는 특히 광학 이성질체, 형태 이성질체, 위치 이성질체(특히, 호변이성체) 또는 기하 이성질체를 포함한다.
- [25] 상기 "전구체"는 어떤 화합물을 화학적으로 변화시켜 물리·화학적 성질을 조절한 것을 의미하며, 그 자체는 생리 활성을 나타내지 않지만 투여 후 체내에서 화학적 혹은 효소의 작용에 의해 원래의 화합물로 바뀌어 효능을 발휘할 수 있다.
- [26] 상기 "염"은 "약학적으로 허용가능한 염"을 의미하며, 상기 "약학적으로

허용가능한"은 일반적으로 안전하고 비독성이며 생물학적으로 또는 달리 바람직한 약학 조성물을 제조하는 데 유용하고, 수의학적 용도뿐만 아니라 인간에 대한 약학 용도에도 유용함을 의미한다.

- [27] 상기 "약학적으로 허용가능한 염"이란 용어는 상기 정의된 바와 같이 약학적으로 허용가능하고 목적하는 약리 활성을 갖는 염을 의미한다. 이러한 염으로는 (1) 무기산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등에 의해 형성되거나, 유기산, 예컨대 아세트산, 프로피온산, 헥산산, 사이클로펜탄프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 락트산, 말론산, 석신산, 말산, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 3-(4-하이드록시벤조일)벤조산, 신남산, 만델산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 1,2-에탄-다이설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 벤젠설폰산, 4-클로로벤젠설폰산, 2-나프탈렌설폰산, 4-톨루엔설폰산, 캄포설폰산, 4-메틸바이사이클로[2.2.2]-옥트-2-엔-1-카복실산, 글루코헵톤산, 3-페닐프로피온산, 트라이메틸아세트산, 3급 부틸아세트산, 라우릴 황산, 글루콘산, 글루탐산, 하이드록시나프트산, 살리실산, 스테아르산, 류콘산 등에 의해 형성되는 산 부가 염; 또는 (2)모 화합물에 존재하는 산성 양성자가 대체될 경우 형성되는 염이 포함된다.
- [28] 상기 "수화물"은 "약학적으로 허용가능한 수화물"을 의미한다. 상기 "수화물"은 본 발명의 화합물이 물을 함유할 때 존재한다. 수화물은 본 발명의 화합물의 1분자에 대하여 1개 이상의 물 분자를 함유할 수 있다. 예시적인 비제한적인 예는 모노수화물, 디수화물, 트리수화물 및 테트라수화물을 포함한다. 수화물은 물 분자 1개에 대하여 1개 이상의 본 발명의 화합물 분자를 함유할 수 있다. 예시적인 비제한적인 예는 반(semi)수화물을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 물은 다양한 방식으로 결정 내에 유지될 수 있고, 이에 따라 물 분자는 결정 내에 격자 위치를 차지할 수 있고, 또는 상기에 기재된 화합물의 염과 결합을 형성할 수 있다. 수화물은 그의 수용물에 유해하지 않다는 의미에서 "허용가능한"이어야 한다.
- [29] 상기 "용매화물"은 "약학적으로 허용가능한 용매화물"을 의미하며, 상기 "용매화물"은, 본 발명의 화합물이 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 용매를 함유한다는 것을 의미한다. 용매화물은 본 발명의 화합물의 1분자에 대하여 1개 이상의 용매 분자를 함유할 수 있고, 또는 용매 1분자에 대하여 본 발명의 화합물의 분자 1개를 함유할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 용매는 다양한 방식으로 결정 내에 유지될 수 있고, 이에 따라 물 분자는 결정 내에 격자 위치를 차지할 수 있고, 또는 상기에 기재된 화합물의 염과 결합을 형성할 수 있다.
- [30] 상기 크립토탄시논(Cryptotanshinone)은 아래 [화학식 1]로 나타낼 수 있다.
- [31] [화학식 1]
- [32]



- [33] 상기 크립토탄시논의 함량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.0001~10 중량%일 수 있다. 상기 함량이 0.0001 중량% 미만이면 효능이 미약하며, 10 중량%를 초과하면 함유량 증가에 따른 뚜렷한 효능의 증가가 나타나지 않아 경제적이지 못하다. 상기와 같은 관점에서, 상기 크립토탄시논의 함량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.0005~9.5 중량%, 0.001~9 중량%, 0.005~8.5 중량%, 0.0001~10 중량%, 0.0001~10 중량%, 0.0001~10 중량% 또는 0.0001~10 중량%일 수 있다.
- [34] 상기 크립토탄시논은 유기합성으로도 제조 가능하고, 또는 단삼 추출물로부터 얻을 수 있다.
- [35] 단삼은 적삼, 분마초, 목양유 등의 이명을 가지고 있는 꿀풀과(순형과, Labiatae)의 다년생 초본식물로서, 근과 근경을 약용으로 사용한다. 근경은 짧고 거칠며 끝부분에 보통 줄기 자국이 남아 있다. 뿌리는 긴 원통형으로 여러 개로 갈라져 있으며 바깥 면은 적갈색 또는 어두운 적갈색이고 거칠고 세로 주름이 있다. 단삼은 혈액 순환을 돕고, 어혈을 제거하며, 사지관절 동통을 완화시킨다. 약리작용으로는 심혈관 혈류량 증가, 혈청 지질 감소, 미세순환 개선, 항혈전작용, 진정작용, 항균작용, 면역증강, 항암작용, 혈당강하 등이 있다. 상기 단삼은 예를 들어 살비아 밀티오리자 번지(*Salvia miltiorrhiza Bunge*)일 수 있고, 단삼 추출물은 예를 들어, 뿌리로부터 얻을 수 있다.
- [36] 본 발명에서 정의되는 상기 추출물은 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물인 것을 특징으로 한다. 상기 조추출물은 정제수를 포함한 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 75 내지 100% 에탄올에 가용한 추출물을 포함한다.
- [37] 또한 상기 극성용매 가용 추출물은 물, 메탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 n-부탄올에 가용된 추출물이고, 비극성용매 가용추출물은 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 글리세린, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜 또는 에테르로부터 선택된 용매, 바람직하게는 메틸렌클로라이드 또는 에틸아세테이트에 가용한 추출물을 포함한다.
- [38] 상기 추출물은 더욱 바람직하게는, 탄소수 1 내지 4의 무수 및 함수 저급

알코올, 아세톤 및 부틸렌글리콜을 포함하는 극성 용매 중 어느 하나 이상을 사용한 1차 추출을 한 후, 순차적으로 에틸아세테이트, 디에틸아세테이트, 디에틸에테르, 벤젠, 클로로포름 및 헥산을 포함하는 저극성 용매 중 어느 하나 이상을 사용한 2차 추출을 통하여 추출하는 것일 수 있다. 더욱 구체적으로, 추출용매로서 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 및 함수 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 노말 프로판올, 노말 부탄올), 물과 저급 알코올의 혼합물, 아세톤, 1,3-부틸렌글리콜, 이소프로판올을 포함하는 극성 용매와 이들의 혼합 용매를, 단삼 뿌리의 분쇄물 건조 중량에 대하여 5 내지 20배 부피량을 가하여 침적 추출하여 여과한 후 여액을 감압 농축한다. 얻어진 농축액에 물을 가하여 분산시킨 후 분산액에 동량의 에틸아세테이트, 디에틸아세테이트, 디에틸에테르, 벤젠, 클로로포름 및 헥산을 포함하는 저극성 유기 용매 중에 하나 이상을 가하고 진탕한다. 그 후 유기층을 분리한 후 감압농축하여 단삼 뿌리 추출물을 얻는다.

- [39] 추출 방법으로는 냉침의 경우 약 12 내지 96 시간 동안 행하거나, 탄소수 1 내지 4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 에틸아세테이트 또는 디에틸에테르 등을 용매로 하여 4 내지 25°C 상온에서 3 내지 20일 방치 숙성시켜서 유효성분을 추출할 수 있다. 온침의 경우는 추출용매의 종류와 온도에 따라 상이하나, 용매의 환류 온도에 가까운 온도로 약 5 내지 24시간동안 행하는 것이 바람직하다.
- [40] 상기와 같은 극성 변화에 따라 순차적으로 추출하는 추출방법에 의하여, 활성성분의 함량을 극대화시키고 불순물을 제거하여 안정도가 향상됨과 동시에 효능이 극대화된 추출물을 얻을 수 있다.
- [41] 또한 상기 추출 후 여과를 거치게 되는데, 본 발명에서 여과는 추출액으로부터 부유하는 고체 입자를 제거하는 과정으로, 면, 나일론 등을 이용하여 입자를 걸러 내거나 한외여과, 냉동여과법, 원심분리법 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [42] 또한, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 크로마토그래피)에 의한 분리 과정을 추가로 포함할 수 있다.
- [43] 다음으로, 여액을 건조하는 단계는 동결건조, 진공건조, 열풍건조, 분무건조, 감압건조, 포말건조, 고주파건조, 적외선건조 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 경우에 따라, 최종 건조된 추출물을 분쇄하는 공정을 추가할 수 있다.
- [44] 본 발명에 의한 피부 외용제 조성물은 일반적으로 피부 외용에 사용하는 조성물 전반을 포괄하는 개념이며, 예를 들어 약학 조성물 또는 화장품 조성물일 수 있다.
- [45]
- [46] 본 발명의 일 실시예에서 약학 조성물은 크립토탄시논을 유효성분으로 하여 상용되는 무기 또는 유기 담체, 부형제 및 희석제를 가하여 고체, 반고체 또는 액상의 형태로 비경구 투여제로 제제화 할 수 있다. 상기 비경구 투여를 위한

제제로는 점적제, 연고, 로션, 젤, 크림, 패취, 스프레이, 현탁제 및 유제로 이루어진 군에서 선택되는 경피 투여형 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [47] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [48] 각 제형에 의한 피부 외용제 조성물에 있어서, 상기한 본 발명의 조성물 이외의 다른 성분들을 기타 피부 외용제의 제형 또는 사용 목적 등에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 이 경우 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승효과가 일어날 수 있다.
- [49] 또한, 본 발명에 의한 조성물이 약학 조성물로 사용될 경우에, 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제 등의 약학적 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 함유할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다.
- [50] 유효성분의 실제 투여량은 증상의 중증도, 선택된 투여 경로, 대상의 연령, 성별, 체중 및 건강상태 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 한다.
- [51] 일반적으로 유효성분의 투여량은 0.001 μ g/kg/일 내지 대략 2000 μ g/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.5 μ g/kg/일 내지 2.5 μ g/kg/일이다. 외용투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [52] 본 발명의 일 실시예에서 상기 화장료 조성물은 예를 들어, 기초 화장료, 메이크업 화장료, 바디용 화장료 등이 있을 수 있고, 그 제형은 특별히 제한되지 않으며, 목적하는 바에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [53] 예를 들면, 상기 화장료 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연화장수, 영양화장수, 로션, 바디로션, 영양 크림, 마사지 크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 젤, 패치, 수중유(O/W)형, 유중수(O/W)형 등의 기초 화장료, 립스틱, 메이크업베이스 또는 파운데이션 등의 색조 화장료, 샴푸, 린스, 바디클렌저 등의 세정료 화장료 조성물로 제형화될 수 있다.
- [54] 상기 화장료 조성물은 화장품학적으로 허용가능한 매질 또는 기제를 함유한다. 이는 국소적용에 적합한 모든 제형으로, 예를 들면 용액, 젤, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전,

마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜) 및/또는 비이온형의 소낭 분산제의 형태로, 또는 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 이들 조성물은 당해 분야의 통상적 방법에 따라 제조될 수 있다.

- [55] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 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.
- [56] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [57] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [58] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로폴루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [59] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [60] 본 발명의 일 실시태양에서, 상기 화장료 조성물에 추가적으로 점증제를 함유할 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 점증제는 메틸 셀룰로스, 카르복시 메틸 셀룰로스, 카르복시 메틸 하이드록시 구아닌, 하이드록시 메틸 셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스, 카르복시 비닐 폴리머, 폴리쿼터늄, 세테아릴 알콜, 스테아릭산, 카라기난 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 카르복시 메틸 셀룰로스, 카르복시 비닐 폴리머, 폴리쿼터늄 중에서 1종 이상을 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 카르복시 비닐 폴리머가 될 수 있다.
- [61] 본 발명의 일 실시태양에서 상기 화장료 조성물은 필요에 따라 적절한 각종의 기제와 첨가제를 함유할 수 있으며, 이들 성분의 종류와 양은 발명자에 의해

용이하게 선정될 수 있다. 필요에 따라 허용 가능한 첨가제를 함유할 수 있으며, 예를 들면, 당업계에서 통상적인 방부제, 색소, 첨가제 등의 성분을 추가로 포함할 수 있다.

[62] 방부제는 구체적으로 페녹시에탄올(Phenoxyethanol) 또는 1,2-헥산디올(1,2-Hexanediol) 등이 될 수 있고, 향료는 인공향료 등이 될 수 있다.

[63] 그리고, 본 발명의 일 실시태양에서 화장료 조성물은 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스펅고 지질 및 해초 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 조성물을 포함할 수 있다. 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다.

[64] 또한, 이외에 첨가해도 되는 배합 성분은 이에 한정되는 것은 아니며, 또, 상기 어느 성분도 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 배합 가능하다.

발명의 실시를 위한 형태

[65] 이하, 본 발명의 실시예, 비교예 및 시험예를 참조하여 본 발명을 상세히 설명한다. 이들은 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위해 예시적으로 제시한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이 실시예, 비교예 및 시험예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가지는 자에 있어서 자명할 것이다.

[66]

[67] [실시예 1] 단삼 뿌리 추출물의 제조

[68] 단삼 뿌리를 정제수로 세척하고 건조시킨 다음 세말화하였다. 세말화한 단삼 뿌리 분말 200 g을 70% 에탄올 수용액 1리터에 넣고 냉각 콘덴서가 달린 추출기에서 12시간 끓여서 추출한 후 300 메쉬 여과포로 여과하였다. 상기 여과액을 4-15°C에서 7일간 방치하여 숙성시킨 후 와트만 2번 여과지로 여과하였다. 그 후, 상기 추출액을 3리터들이 분액 깔때기에 넣고 여기에 에틸아세테이트 1리터를 가한 후 흔들어서 잘 섞어준 다음 두 층으로 완전히 분리한 후 상층(에틸아세테이트 층)을 취하였다. 하층(물층)을 다시 분액 깔때기로 두 번 더 추출하였다. 분리된 상층을 모두 합한 뒤 냉각 콘덴서가 달린 증류 장치를 이용하여 50°C로 감압 농축하고, 건조하여 건조중량 45.5 g의 단삼 뿌리 추출물을 얻었다.

[69]

[70] [실시예 2] 단삼 뿌리 추출물로부터 크립토탄시논의 분리

[71] 실시예 1의 방법을 이용하여 얻은 단삼 뿌리 추출물 20 g을 실리카 겔 컬럼(230-400 mesh, ASTM, Art.9385)에 걸어 헥산-메틸클로라이드 (Hexane-CH₂Cl₂(1:1)), 클로로포름(CHCl₃), 클로로포름-아세톤(CHCl₃-Me₂CO(9:1)), 아세톤(Me₂CO) 그리고 메탄올(MeOH)을 기울기 용리(gradient elution)시켜

소분획을 얻어 이 중 클로로포름-아세톤 $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}(9:1)$ 용출액에 대하여 리사이클링 분취(recycling preperative)-HPLC (컬럼, JAIGEL-1H (GPC) ; 유속, 3.5ml/min.; 용매, CHCl_3 , 254nm)를 실시하여 황색의 크립토탄시논 60.9 mg을 얻었다. 하기 표 1은 크립토탄시논의 NMR 데이터를 나타낸 것이다.

[72]

[73] 표 1

[Table 1]

위 치(Position)	$^1\text{H-NMR}(500\text{MHz}, \text{CDCl}_3)$	$^{13}\text{C-NMR}(500\text{MHz}, \text{CDCl}_3)$
1	3.22(<i>t</i> , 5.1)	29.64(<i>t</i>)
2	7.56(<i>dd</i> , 7.0, 2.0)	19.03(<i>t</i>)
3	7.36(<i>d</i> , 7.0)	37.76(<i>t</i>)
4	-	34.82(<i>s</i>)
5	-	143.67(<i>s</i>)
6	8.32(<i>d</i> , 9.0)	132.55(<i>d</i>)
7	7.83(<i>d</i> , 9.0)	122.48(<i>d</i>)
8	X	128.36(<i>s</i>)
9	X	126.22(<i>s</i>)
10	X	152.35(<i>s</i>)
11	-	184.00(<i>s</i>)
12	-	175.67(<i>s</i>)
13	-	118.26(<i>s</i>)
14	-	170.77(<i>s</i>)
15	7.31(<i>d</i> , 0.5)	81.43(<i>d</i>)
16	-	34.56(<i>t</i>)
17	2.30(<i>d</i> , 1.0)	18.81(<i>q</i>)
18	2.70(<i>s</i>)	31.85(<i>q</i>)
19	-	31.89(<i>q</i>)
20	-	-

[74] [시험예 1] 피부노화억제 및 주름개선 테스트

[75] 1) MMP-1 발현 억제 분석

[76] 정상 인간 섬유아세포 단층 배양 시스템(Normal human fibroblast monolayer culture system)에서 크립토탄시논은 UVB 40 mJ/cm²에 의해서 유도되는

MMP-1의 발현을 유의적으로 억제하는 효과를 나타냈다. 따라서 크립토탄시논은 내적 노화 또는 외적 환경요인에 의하여 발생하는 피부조직 분해효소인 MMP-1의 생합성을 저해하여 피부노화를 억제하고 주름개선에 효과를 나타낼 수 있다. 하기 표 2은 시험물질 처리에 따른 MMP-1 발현 억제율을 나타낸 것이다.

[77]

[78] 표 2

[Table 2]

시험물질		MMP-1 발현억제 (%)
대조군	무처리	100
대조군	UVB 40 mJ/cm ²	152
크립토탄시논	0.0001 중량%	103
	0.001 중량%	71

[79] 2) 타입 I 프로콜라겐(Type 1 Procollagen) 분석

[80] 정상 인간 섬유아세포 단층 배양 시스템에서 크립토탄시논은 대조군에 비하여 타입 I 프로콜라겐 생성을 뚜렷하게 촉진시키는 효과를 나타냈다. 즉, 크립토탄시논은 인체 피부의 노화에 의해 발생하는 콜라겐 생성량 감소 현상을 억제할 수 있고, 주름의 개선효과를 나타내게 된다. 하기 표 3은 시험 물질 처리에 따른 타입 I 프로콜라겐 생성을 나타낸 것이다.

[81]

[82] 표 3

[Table 3]

시험물질		Type I procollagen 생성 (%)
대조군	무처리	100
크립토탄시논	0.0001 중량%	110
	0.001 중량%	138

[83] [시험에 2] 피부미백 효능 테스트

[84] 1) 쥐의 색소세포를 이용한 멜라닌 생성 억제효과 측정

[85] 크립토탄시논의 멜라닌 생성 억제효과를 알아보기 위하여 쥐의 색소세포를 이용하여 측정하였다.

[86] 먼저, C57BL/6 마우스 유래의 쥐의 색소세포(Mel-Ab cell)(Dooley, T.P. et al, Skin pharmacol, 7, pp 188-200)를 DMEM(Dulbeccos modified Eagles media)에 10% 우태반 혈청, 100nM

2-O-테트라데카노일포르볼(tetradecanoylphorbol)-13-아테이트, 1nM 콜레라

독소(cholera toxin)을 첨가한 배지에서 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 배양된 Mel-Ab세포를 0.25% 트립신-EDTA로 떼어내고, 24-웰 플레이트에 105 세포/웰(cells/well)의 농도로 세포를 배양하고 이틀째부터 3일 연속으로 1ppm, 10ppm의 크립토탄시논을 가하여 배양하였다. 이때, 하이드로퀴논은 대조군으로 사용하였다. 그 다음 배양액을 제거하고, PBS로 세척한 후, 1N 수산화나트륨으로 세포를 녹여 400nm에서 흡광도를 측정한 후, 하기 수학식 1에 따라 멜라닌 생성 억제율을 계산하여 그 결과를 표 4에 나타내었다(Dooley의 방법).

[87] 수학식 1

$$\text{멜라닌 생성 억제율(\%)} = 100 - \left(\frac{\text{각시험물질의 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}} \times 100 \right)$$

[88] 표 4

[Table 4]

시험물질	멜라닌 생성 억제율(%)
크립토탄시논 0.0001 중량%	13.0
크립토탄시논 0.001 중량%	34.0
하이드로퀴논(대조군)	42.9

[89] 상기 표 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 크립토탄시논은 우수한 멜라닌 생성 억제율을 보였고, 하이드로퀴논과 유사한 정도의 멜라닌 생성 억제율을 보이는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명의 크립토탄시논이 우수한 미백 효과를 가짐을 알 수 있었다.

[90]

[91] 2) 인체 피부에 대한 미백 효과 시험

[92] 크립토탄시논의 인체 피부에 대한 미백 효과를 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[93] 먼저, 건강한 10명의 남자를 대상으로 피검자의 상박 부위에 직경 1.5cm의 구멍이 뚫린 불투명 테이프를 부착한 뒤, 각 피검자의 최소 홍반량(Minimal Erythema Dose)의 1.5 ~ 2배 정도의 자외선(UVB)을 조사하여 피부의 흑화를 유도하였다.

[94] 상기 자외선 조사 후 시험물질로 각각 크립토탄시논과 하이드로퀴논을 바르고, 한곳은 아무 것도 바르지 않고 10 주 동안 상태변화를 관찰했다. 1주 단위로 피부의 색깔을 색차계 CR2002(일본, 미놀타 사)로 측정하였다.

[95] 그 다음 상기 각 시험물질의 도포 개시시점과 도포 완료시점에서의 피부색의 차이(ΔL^*)를 하기 수학식에 따라 계산하고, 이를 하기 표 5에 나타내었다. 한편, 미백효과는 시료 도포 부위와 대조군 부위의 ΔL^* 의 비교로 판정하는데,

ΔL^* 값이 2 정도일 경우는 침착된 색소의 미백화가 뚜렷한 경우이고, 1.5 정도 이상이면 미백효과가 있다고 판정할 수 있다.

[96]

[97] 수학식 2

$$\Delta L^* = \text{도포완료시점에서의 } L^* \text{ 값} - \text{도포개시시점에서의 } L^* \text{ 값}$$

[98]

표 5

[Table 5]

시험물질	피부색 밝기 정도(ΔL^*)
크립토탄시논	1.70±0.20
하이드로 퀴논(양성 대조군)	1.87 ±0.11
용매(Vehicle)(음성 대조군)	0.40 ±0.14

[99]

[100] 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 크립토탄시논은 하이드로 퀴논과 유사한 정도의 피부색 밝기 정도를 보임을 확인하였다. 이는 상기 크립토탄시논이 자외선에 의해 생성된 색소 침착을 개선하여 피부색을 밝게 하기 때문이다.

[101]

[102] [시험예 3] 피부 보습 및 아토피 증상 개선 테스트

[103] 1)인간 각질형성세포의 분화유도 시험

[104] 각질형성세포 및 인간피부세포주(HaCaT)의 분화시 생성되는 CE(Cornified Envelop)의 양을 측정하여 크립토탄시논의 세포분화 촉진효과를 보기 위해 흡광도를 이용하는 방법으로 시험하였다.

[105] 흡광도를 이용한 시험으로 일차 배양한 인간의 각질형성세포 (Human Epidermal Keratinocytes, catalogue #C-020-25P, Cascade Biologics Inc., Portland, Oregon (OR) USA) 를 배양용 플라스크에 넣어 바닥에 부착시킨 후, 하기 표 6의 시험물질들을 표 6에 제시한 농도로 배양액에 첨가하여, 세포가 바닥 면적의 70~80% 정도 자랄 때까지 5일간 배양하였다. 이 세포를 수확(cell harvest)하여 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 뒤, 2% SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)와 20mM 농도의 DTT(Dithiothreitol)를 함유한 10mM 농도의 트리스-염산 완충액(Tris-HCl, pH 7.4) 1ml를 가하여 소니케이션(sonication), 보일링(boiling), 원심분리한 침전물을 다시 PBS 1ml에 현탁시켜 340nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이와 별도로 상기 소니케이션 후의 용액 일부를 취하여 단백질 함량을 측정하여, 세포분화 정도의 평가시 기준으로 삼았다. 저칼슘(0.03mM) 처리군과 고칼슘(1.2 mM) 처리군을 각각 음성/양성 대조군으로 하고, 저칼슘농도에 시험물질을 첨가하여 실시한 시험 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

[106]

[107] 표 6

[Table 6]

시험물질		각질형성세포에서의 분화능 (%)
대조군	Low Ca ²⁺ (0.03 mM)	100
	Hign Ca ²⁺ (1.2 mM)	210
크립토탄시논	0.0001 중량%	113
	0.001 중량%	122
	0.01 중량%	128

[108]

[109] 표 6에 나타난 바와 같이, 본 발명에 의한 크립토탄시논은 각질형성세포에서 분화를 촉진하는 것을 알 수 있다. 따라서, 크립토탄시논은 피부 보습 효능을 가진다.

[110]

[111] 2)인간의 피부 세포주의 트랜스글루타미네이즈(transglutaminase)의 발현 효과

[112] 트랜스글루타미네이즈(transglutaminase)는 일종의 피부분화 지표물질로서, 인간피부세포주의 분화 시 생성되는 CE(Cornified Envelop)의 형성과 세포 분화(cell differentiation)이 원만하게 되도록 돕는다.

[113] 인간의 피부 세포주 (HaCaT)(Dr. N.E. Fusenig ,Deutsches

Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Germany)로부터 분양)를 96웰형 세포배양 플레이트의 각 웰에 5x10⁴개를 넣고 24시간 동안 부착시켰다. 부착시킨 피부 세포주에 시험물질을 처리한 후, 2일이 지난 다음, 배지를 제거하고, -20°C 냉장고에 보관하였다. 동결-해동(Freeze-thawing)을 2회 반복하여 물질 처리한 세포를 파괴시킨 후, -20°C 에 보관한 아세톤:에탄올(1:1, v/v)을 처리하여 4°C에서 30분간 방치하여 세포를 고정시킨다. 그 후, 실온에 방치하여 유기용매가 증발되게 하고, 블로킹(1% 소혈청알부민), 트랜스글루타미네이즈 항체(primary antibody), HRP 안티-마우스 항체(secondary)를 수행하고, 발색은 OPD(o-phennyldiamine)를 첨가하여 수행하였다. 발현량은 490nm에서 흡광도를 측정하였고, 보정은 630nm에서 백그라운드(background)를 측정하여 수행하였다. 저칼슘(0.03mM) 처리군과 고칼슘(1.2 mM) 처리군을 각각 음성/양성 대조군으로 하고, 저칼슘농도에 시험물질을 첨가하여 실시한 시험 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

[114]

[115] 표 7

[Table 7]

시험물질		트랜스글루타미네이즈 발현량 (%)
대조군	Low Ca^{2+} (0.03 mM)	100
	Hign Ca^{2+} (1.2 mM)	142
크립토탄시논	0.0001 중량%	139
	0.001 중량%	180
	0.01 중량%	211

[116]

[117] 상기 표 7에 나타난 바와 같이, 본 발명에 의한 크립토탄시논은 대조군에 비해 두 배 정도의 증가 양상을 보였고, 대조군보다도 많은 양이 발현됨을 알 수 있다. 따라서 본 발명에 의한 크립토탄시논이 트랜스글루타미네이즈의 발현을 향상시키는 것을 알 수 있었다.

[118] 3) 아토피성 피부염 개선 효과

[119] 아토피 증상 개선효과를 다음과 같이 측정하였다. 아토피 증상(가려움, 진물, 심한 건조증)으로 진단받았거나, 육안관찰로 아토피 유사 증상을 보이는 10대~50대 사이의 40명을 대상으로 하여 2그룹으로 나누고, 각각 실시예 1과 비교예 1을 제공하여, 아토피 증상을 보이는 부위에 매일 2회씩 12주 동안 도포하게 하였다.

[120] 하기 표 8는 실시예 1과 비교예 1의 조성을 나타낸 것이다.

[121] 표 8

[Table 8]

성분	실시예 1	비교예 1
	함량(중량%)	함량(중량%)
크립토탄시논	1.0	-
글리세린	5.0	5.0
올레일알코올	1.5	1.5
에탄올	5.5	5.5
폴리솔베이트 80	3.2	3.2
카르복실비닐폴리머	0.1	0.1
부틸렌 글리콜	3.0	3.0
프로필렌 글리콜	3.0	3.0
방부제, 향료	적량	적량
정제수	잔량	잔량
계	100	100

[122] 효능 평가는 12주 처치 후 설문 조사를 통해 개선 정도를 본인이 주관적으로 판단하게 하였다. 설문에서는 아토피성 피부염의 증상을 "가려움", "건조함", "각질발생", "비듬", "홍반", "부어 오름", "피부 균열", 및 "진물과 습진" 등으로 나누고 상기 증상이 있는 경우 각각의 증상에 대하여 개선 정도를 평가한 후에 이를 평균하여 아토피 증상 개선 효과를 개인별로 평가하였다. 그 결과는 하기 표 9에 나타내었다.

[123] 표 9

[Table 9]

시험군	응답자수 (인)			
	현저히 개선	개선	변화 없음	악화
크립토탄시논 (실시예1)	6	8	6	0
대조군(비교 예1)	2	4	14	0

[124]

[125] 표 9에서 나타난 바와 같이, 크립토탄시논이 함유된 제형을 도포한 처치군인 실시예 1이 대조군인 비교예 1보다 전반적으로 아토피 증상이 더 개선되었음을 알 수 있었다.

[126]

[127] [시험예 4] 피부 혈색 개선 테스트

[128] 1) 크립토탄시논의 HUVEC(Human umbilical vein endothelial cell)에서의 NO 생성능

[129] 사람의 혈관내피세포에는 eNOS(endothelial nitric oxide synthase)가 존재하며, 그 활성이 증가하는 것으로 NO(nitric oxide)를 생성시켜 혈관을 확장시키고, 혈행을 촉진하는 역할을 하게 된다. 사람의 혈관내피세포를 배양한 후 크립토탄시논을 배지에 처리하여 생성되는 NO의 양을 비교하였다. 하기 표 10은 크립토탄시논에 의한 NO 생성을 나타낸 것이다.

[130] 표 10

[Table 10]

시험물질		NO(nitric oxide)생성능 (%)
대조군	Low Ca ²⁺ (0.03 mM)	100
크립토탄시논	0.005 중량%	320
	0.01 중량%	780
	0.02 중량%	1190

[131]

[132] 상기 표 10의 결과에서 볼 수 있듯이 크립토탄시논은 우수한 혈관내피세포에서의 NO 생성능을 나타내었다. 크립토탄시논의 위와 같은 뛰어난 NO(nitric oxide)생성능은 결국 모세혈관을 확장시키고 혈액순환을 촉진시킴으로써 피부에 영양분을 원활하게 공급하고 피부노화를 억제시키며, 피부의 혈색을 개선시킬 수 있는 효능에 기여하게 된다. 또한, 피부 투명도 개선 효능에 기여한다.

[133]

[134] 2) 인체피부(얼굴)의 혈색 개선효과 테스트

[135] 본 발명의 크립토탄시논을 함유하는 조성물에 대하여 피부에서의 혈액순환 촉진 효과를 평가하기 위하여, Laser Doppler Perfusion Imager(LDPI)를 이용하여 피부에서의 혈액순환 정도를 측정하였다, LDPI는 피부에서의 혈액순환을 측정하는 기기로 널리 알려져 있고 현재도 사용되고 있는 기기로, 피부의 모세혈관에서의 혈액의 속도 및 양뿐만 아니라 소동맥과 소정맥에서의 흐름까지 측정해 낼 수 있는 매우 민감한 기기이다.

[136] 항온항습실에서 얼굴을 비누를 이용하여 수세 후 30분간 적응시키고, LDPI와 피부온도 측정기구인 IR(Infrad) 카메라를 이용하여 초기값을 측정하였다.

실험에 참여한 인원은 평소 손발이 차가운 여성 20명으로, LDPI로 이마 아래 부분의 초기 혈류량을 측정하고, IR 카메라를 이용하여 이마, 눈 밑, 뺨의 피부 온도 초기값을 측정하였다.

[137] 시험에 사용하기 위하여, 상기 표 8의 조성을 가진 실시예 1을 제조하여 실시예

1을 1주일 동안 사용한 후의 혈류량과 피부 온도를 초기 측정값과 비교하였다. 실시예 1의 사용 전후 LDPI 결과를 하기 표 11에, 사용 전후 IR 결과를 표 12에 나타내었다.

[138] 표 11

[Table 11]

얼굴	사용 전	1주 사용 후
평균값	0.952	1.169

[139] 표 12

[Table 12]

	이마	눈밑	뺨
사용전	32.26	32.02	30.44
1주 사용후	33.87	33.69	33.57

[140] 위와 같이 크립토탄시논을 함유한 실시예 1을 사용한 결과 얼굴의 말초혈액순환 개선 효과로서 혈색이 개선되는 것을 나타냈으며, 이는 궁극적으로 피부의 영양분을 효과적으로 전달하게 하고 피부노화를 억제하고 지연시키는데 기여하게 된다.

[141] 하기에 본 발명에 따른 화장료 조성물 및 약학 조성물의 제형예를 설명하나, 하기 예시 이외에도 여러 가지 제형으로 응용 가능하며, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[142]

[143] [제형예1] 유연 화장수(스킨 로션)

[144] 하기 표 13에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 유연 화장수를 제조하였다.

[145]

[146] 표 13

[Table 13]

성분	함량(중량%)
크립토탄시논	1.0
글리세린	3.5
올레일알코올	1.5
에탄올	5.5
폴리솔베이트 80	3.2
카르복실비닐폴리머	0.1
부틸렌 글리콜	2.0
프로필렌 글리콜	2.0
방부제, 향료	적량
정제수	잔량
계	100

[147] [제형예 2] 영양 화장수(밀크 로션)

[148] 하기 표 14에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 영양 화장수를 제조하였다.

[149]

[150] 표 14

[Table 14]

성분	함량(중량%)
크립토탄시논	1.0
글리세린	3.0
부틸렌글리콜	3.0
프로필렌글리콜	3.0
카르복시비닐폴리머	0.2
밀납	4.0
폴리솔베이트 60	1.5
카프릴릭/카프릭 리글리세라이드	5.0
스쿠알란	5.0
솔비타세스퀴올레이트	1.5
세테아릴 알코올	1.0
트리에탄올아민	0.2
방부제, 향료	적량
정제수	잔량
계	100

[151] [제형에 3] 영양 크림

[152] 하기 표 15에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 영양 크림을 제조하였다.

[153]

[154] 표 15

[Table 15]

성분	함량(중량%)
크립토탄시논	1.0
글리세린	3.5
부틸렌글리콜	3.0
유동파라핀	7.0
베타글루칸	7.0
카보머	0.1
카프릴릭/카프릭 리글리세라이드	3.0
스쿠알란	5.0
세테아릴 글루코사이드	1.5
소르비탄 스테아레이트	0.4
폴리솔베이트 60	1.2
트리에탄올아민	0.1
방부제, 향료	적량
정제수	잔량
계	100

[155] [제형에 4] 맞사지 크림

[156] 하기 표 16에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 맞사지 크림을 제조하였다.

[157]

[158] 표 16

[Table 16]

성분	함량(중량%)
크립토탄시논	1.0
글리세린	8.0
부틸렌글리콜	3.0
유동파라핀	45.0
베타글루칸	7.0
카보머	0.1
카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드	3.0
밀납	4.0
세테아릴 글루코사이드	1.5
세스퀴 올레인산 소르비탄	0.9
파라핀	1.5
방부제, 색소, 향료	적량
정제수	잔량
계	100

[159] [제형에 5] 팩

[160] 하기 표 17에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 팩을 제조하였다.

[161]

[162] 표 17

[Table 17]

성분	함량(중량%)
크립토탄시논	1.0
글리세린	4.0
폴리비닐알콜	15.0
히알루론산	5.0
베타글루칸	7.0
알란토인	0.1
노닐 페닐에테르	0.4
폴리솔베이트 60	1.2
에탄올 방부제	적량
방부제, 향료	적량
정제수	잔량
계	100

- [163] [제형에 6] 패취제국소 투여용 약제
- [164] 하기 표 18에 기재된 조성에 따라 통상적인 방법으로 패취제를 제조하였다.
- [165]
- [166] 표 18

[Table 18]

성분	함량(중량%)
크립토탄시논	1.0
베타-1,3-글루칸	3.0
디에틸아민	0.7
아황산나트륨	0.1
폴리옥시에틸렌라우릴에테르(E.O=9)	1.0
폴리히드록시에틸렌세틸스테아릴에테르 (Cetomacrogol 1000)	1.0
점성의 파라핀 오일	2.5
카프릴산에스테르/카프르산에스테르 (Cetiol LC)	2.5
폴리에틸렌글리콜400	3.0
폴리아크릴산(Carbopol 934P)	1.0
정제수	잔량
계	100

[167] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[168]

산업상 이용가능성

[169] 본 발명에 따른 조성물은 화장품, 의약 및 식품 분야 등에서 다양하게 활용 가능하다.

청구범위

- [청구항 1] 크립토탄시논(Cryptotanshinone), 그의 이성질체, 그의 전구체, 그의 염, 그의 수화물 또는 그의 용매화물을 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 크립토탄시논의 함량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.0001~10 중량%인 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 노화 억제용 또는 피부 주름 개선용이며, 상기 유효성분은 매트릭스 메탈로프로테아제-1 (Matrix metalloproteinase-1: MMP-1)의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 노화 억제용 및 피부 주름 개선용이며, 상기 유효성분은 타입 I 프로콜라겐(Type 1 Procollagen) 생성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 미백용이며, 상기 유효성분은 멜라닌 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 보습용 및 아토피 개선용이며, 상기 유효성분은 각질형성세포의 분화를 촉진하는 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 보습용 및 아토피 개선용이며, 상기 유효성분은 피부세포의 트랜스글루타미네이즈(transglutaminase)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 혈색 개선용 및 피부 투명도 개선용이며, 상기 유효성분은 혈관내피세포에서 NO 생성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 혈색 개선용 및 피부 투명도 개선용이며, 상기 유효성분은 말초혈액 순환을 개선시키는 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.