(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0113185
(43) 공개일자 2019년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9794 (2017.01) *A61K 8/9789* (2017.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9794 (2017.08)
A61K 8/9789 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2018-0035530
(22) 출원일자 2018년03월28일
심사청구일자 2018년03월28일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
네이처퓨어코리아 주식회사
전라남도 담양군 담양읍 에코길 61
(72) 발명자
신현재
전라남도 화순군 도곡면 원화길 32
최문희
전라남도 여수시 망마로 82-10, 28동 406호(신기동, 대림산업제2사택)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 5 항

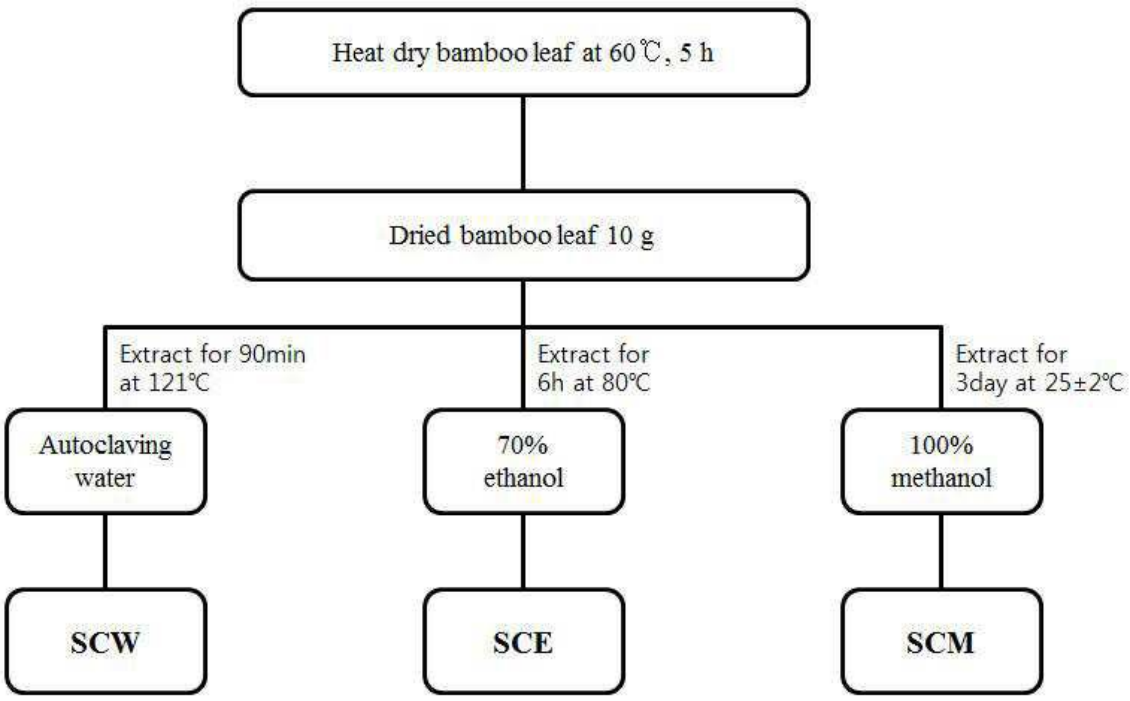
(54) 발명의 명칭 **대나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 화장료 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 대나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화 및 미백 활성을 갖는 화장료 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 대나무(신이대) 잎 추출물은 우수한 안전성, 항산화 활성과 더불어 티로시나아제 저해 활성을 통하여 멜라닌 생성을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 이를 유효성분

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



으로 포함하는 본 발명의 조성물은 피부에 자극 없이 멜라닌 색소 억제를 통한 우수한 미백 효과와 항산화 효과를 나타낼 수 있어 기능성 화장료 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 약용식물에 해당하는 벌씀바귀 추출물을 본 발명의 대나무(신이대) 잎 추출물과 병용하여 사용하는 경우 멜라닌 생성 억제 효과가 두드러지게 증대되는 시너지 효과를 보임에 따라 대나무 잎 추출물과 벌씀바귀 추출물을 포함하는 조성물의 경우 피부 미백을 위한 화장료 소재로서 유용하게 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에서 유효성분으로 사용되는 대나무(신이대) 잎 추출물 및 벌씀바귀 추출물은 천연 식물로부터 유래한 것으로서, 이를 포함하는 본 발명의 화장료 조성물은 장기간 사용에도 안전한 이점을 가진다.

(52) CPC특허분류
A61Q 19/02 (2013.01)

(72) 발명자
김상준
충청북도 청주시 청원구 오창읍 오창중앙로 27, 305동 304호(코아루아파트)

조순장
대전광역시 중구 태평로 15, 107동 1103호(태평동, 버드내마을아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015H1C1A1035883
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 지역혁신창의인력양성사업
연구과제명 대나무 유래 플라보노이드와 폴리페놀을 함유한 고부가가치 미용식품 소재 개발
기 여 율 1/1
주관기관 조선대학교 산학협력단
연구기간 2017.05.01 ~ 2018.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

대나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 대나무 종류는 신이대인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 물 및 헥산으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출된 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 벌씀바귀 추출물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 유연 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 밀크로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 수중유 형 에멀젼, 유중수 형 에멀젼, 페이스크성 무수 생성물, 고체 무수 생성물, 소구체를 사용한 수성 상에서의 오일 분산물, 이온성 지질 소포체, 비이온성 지질 소포체, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 보디오일, 수중유 형 메이크업베이스, 유중수 형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이섀도우, 마스카라, 치크칼라 및 아이브로우펜슬류로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종의 제형인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 화장료 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 대나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화 및 미백 활성을 갖는 화장료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 피부는 외부 환경과 직접 접하면서 인체를 보호하며 생화학적 및 물리적인 기능을 가지고 있는 아주 중요한 조직이다. 이 조직은 크게 3가지, 즉, 표피, 진피, 그리고 피하조직으로 나누어진다. 사람의 피부색은 주로 피부 세포속에 들어있는 멜라닌을 함유하는 멜라노좀의 숫자, 크기, 종류 및 분포도에 따라 다르게 나타난다.

[0003] 멜라노좀은 멜라닌 세포에 의해 생산되고, 표피에서 생성되는 검은 색소인 멜라닌은 멜라노사이트라는 세포에서 생산된다. 멜라닌은 햇빛 중 자외선의 빛에너지를 흡수하여 더 깊숙이 있는 세포들이 자외선에 의해 손상되는 것을 막아주는 역할을 한다. 이러한 멜라닌이 비정상적으로 적게 생산되면 백반증과 같은 피부병변이 유발되고 반대로 자외선 등에 의해 멜라닌이 과도하게 합성되면 피부에 손상을 줄 뿐만 아니라 기미, 주근깨를 형성하게 되고, 더 나아가 피부암의 원인이 되기도 한다.

[0004] 멜라닌 형성과정에서 가장 중요한 역할을 하는 것은 티로시나아제 효소로 알 려져 있으며, 이 효소는 조직 중에 존재하는 티로신이라고 하는 아미노산에 작용하는 도파퀴논을 생성시키며 이 도파퀴논으로부터 여러 단계의 자

동 산화과정을 거쳐 흑색 색소인 멜라닌이 생성된다. 따라서 멜라닌 생성을 억제할 수 있는 단계의 어느 과정 중에 작용하느냐에 따라 다음과 같은 여러 방법으로 미백용 조성물을 만들 수 있다.

[0005] 첫 번째로는 멜라닌 생성의 주원인인 자외선을 차단할 수 있는 성분을 함유시키는 것으로, 이 방법에 의한 조성물은 광 산란제 또는 광 차단제를 함유함으로써 자외선에 의한 DNA 손상 또는 염증을 줄여 글루코사민과 같은 티로시나아제가 활성을 나타내기 위해 필요한 코어 탄수화물의 합성을 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제시킬 수 있다(미백 A 단계에 작용). 두번째는 효소산(코직산), 루시놀, 에릭산 또는 알부틴과 같이, 멜라닌 생성에 관여하는 티로시나아제의 기능을 방해하는 물질을 사용하는 것이다(미백 B 단계에 작용). 세번째로는 도파크롬을 안정화하여 흑색 멜라닌인 유-멜라닌(Eu-Melanin)으로의 진행을 저지할 수 있는 방법이 있다(미백 C 단계에 작용). 네 번째는 티로신이 도파와 도파크롬을 거쳐 복잡한 산화와 축합 반응을 거치는 동안에, 강한 항산화 효과를 발휘하여 미백효과를 낼 수 있는 비타민 C와 같은 물질을 사용하는 것이다(미백 D 단계에 작용). 다섯 번째로는, 효소 또는 AHA(Alpha Hydroxy Acid)등을 사용하여, 생성된 멜라닌을 각질층에서 제거 및 환원시켜 줄 수 있는 방법도 있다(미백 E 단계에 작용).

[0006] 종래의 화장품 분야에서는 미백 성분으로서, 예를 들면, 코지산(Kojic acid), 알부틴(Arbutin) 등과 같은 티로시나아제 효소활성을 억제하는 물질, 하이드로퀴논(Hydroquinone), 비타민 C(L-Ascorbic acid) 및 이들의 유도체와 각종 식물 추출물이 사용되어 왔다. 그러나 상기 티로시나아제 효소활성을 억제하는 물질은 처방계 중에서의 안정성이 낮기 때문에 분해되어 착색되거나, 이취의 발생, 생체 레벨에서의 효능, 효과의 불분명 및 안전성 문제 등으로 그 사용이 제한되고 있는 실정이다.

[0007] 이에 본 발명자는 천연물질로부터 유래되어 인체에 안정하면서도, 탁월한 미백 효과를 나타낼 수 있는 소재를 찾고자 모색하던 중, 대나무 잎 추출물의 화장물 소재로서의 효과를 실험한 결과, 대나무 잎 추출물이 항산화 활성을 가질 뿐 아니라, 티로시나아제(tyrosinase) 활성을 농도 의존적으로 저해함으로써 멜라닌의 합성을 효과적으로 억제할 수 있다는 사실을 확인하였으며, 특히 대나무 잎 추출물과 함께 벌씀바귀 추출물을 병용으로 사용하는 경우 멜라닌 생성을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2012-0054375호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 인체에 안정하면서 항산화 활성과 멜라닌 억제 활성이 우수하여 피부 미백에 효과적인 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,

[0011] 본 발명은 대나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 대나무 종류는 신이대일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 물 및 헥산으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출될 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화장료 조성물은 벌씀바귀 추출물을 더 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화장료 조성물은 유연 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 밀크로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 수중유 형 에멀젼, 유중수 형 에멀젼, 페이스크성 무수 생성물, 고체 무수 생성물, 소구체를 사용한 수성 상에서의 오일 분산물, 이온성 지질 소포체, 비이온성 지질 소포체, 연고, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 보디오일, 수중유 형 메이크업베이스, 유중수 형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이섀도우, 마스카라, 치크칼라 및 아이브로우펜슬류로 이루어진 군 중에

서 선택되는 1종의 제형일 수 있다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 대나무(신이대) 잎 추출물은 우수한 안전성, 항산화 활성과 더불어 티로시나아제 저해 활성을 통하여 멜라닌 생성을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 피부에 자극 없이 멜라닌 색소 억제를 통한 우수한 미백 효과와 항산화 효과를 나타낼 수 있어 기능성 화장료 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 약용식물에 해당하는 벌씀바귀 추출물을 본 발명의 대나무(신이대) 잎 추출물과 병용하여 사용하는 경우 멜라닌 생성 억제 효과가 두드러지게 증대되는 시너지 효과를 보임에 따라 대나무 잎 추출물과 벌씀바귀 추출물을 포함하는 조성물의 경우 피부 미백을 위한 화장료 소재로서 유용하게 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에서 유효성분으로 사용되는 대나무(신이대) 잎 추출물 및 벌씀바귀 추출물은 천연 식물로부터 유래한 것으로서, 이를 포함하는 본 발명의 화장료 조성물은 장기간 사용에도 안전한 이점을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명의 대나무 잎 추출물의 추출 공정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물(SCM) 및 표준샘플(standard)의 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물(SCM), 아스코르브산, 카테킨의 머쉬룸 티로시나아제 억제 활성을 나타내는 그래프이다.

도 4는 α-MSH 유도된 B16F10 세포에 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물(SCM)의 농도별 처리에 따른 멜라닌 생성 억제 활성을 나타내는 그래프이다(α-MSH: alpha-melanin stimulating hormone).

도 5는 α-MSH 유도된 B16F10 세포에 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물(SCM)의 농도별 처리에 따른 멜라닌 생성 정도를 확인한 현미경 관찰 사진이다(α-MSH: alpha-melanin stimulating hormone).

도 6은 α-MSH 유도된 B16F10 세포에 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물(SCM)의 농도별 처리에 따른 티로시나아제, TRP1, TRP2 단백질 발현량을 웨스턴 블랏으로 분석한 결과이다.

도 7은 B16F10 세포에 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물(SCM)의 농도별 처리에 따른 세포생존율을 MTT 에세이를 통해 측정한 결과이다.

도 8은 α-MSH 유도된 B16F10 세포에 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물(SCM)과 함께 약용식물 추출물(히어리 추출물, 꽈리 추출물, 벌씀바귀 추출물)의 병용 처리에 따른 멜라닌 생성 억제 활성을 나타내는 그래프이다.

도 9는 B16F10 세포에 본 발명의 약용식물 추출물(히어리 추출물, 꽈리 추출물, 벌씀바귀 추출물) 100㎍/mL 처리에 따른 세포생존율을 MTT 에세이를 통해 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 대나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0019] 본 발명의 일구체예에서, 상기 대나무 종류는 신이대일 수 있다.

[0020] 본 명세서에서 언급하는 '신이대'는 대나무의 한 종류로서 학명은 *Sasa coreana Nakai* 이며, 생물학적 분류로는 식물계, 피자식물문, 단자엽식물강, 화본목, 벼과, 조리대속에 해당한다. 특징으로는 잎은 초상엽은 밑부분의 것은 털이 있고 윗부분의 것은 털이 없다. 잎은 가지끝에 5-8개씩 달리며 긴 타원형 또는 난상 긴 타원형으로서 길이 3-12cm, 폭 6-22mm이고 점첨두이며 아심장저 또는 넓은 예저이고 표면에 털이 없으며 뒷면에 견모(絹毛)가 밀생하고 가장자리에 잔톱니와 5-6맥이 있다. 엽초는 보통 털이 없으며 견모(肩毛)가 일찍 떨어진다. 줄기는 높이 30-80cm, 지름 3-8mm로서 어린 것은 역모가 있다. 윗부분의 5-20cm에는 가지가 밀생하며 원줄기와 가지에 홈이 있다. 뿌리는 근경은 짧고 가지가 갈라지며 마디사이가 짧다.

[0021] 이러한 신이대는 관상용으로 쓰이며 잎은 식용한다.

[0022] 그러나 대나무(신이대) 잎 추출물의 항산화, 미백활성에 관련하여 연구된 바 없다.

[0023] 본 발명에서는 대나무(신이대) 잎 추출물 항산화 기능성과 더불어 미백 활성이 우수하여 기능성 화장품의 소재

로 사용할 수 있음을 최초로 확인하였다.

[0024] 본 발명에 따른 대나무 잎 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 '추출물' 은 적절한 용매를 이용하여 대나무(신이대)으로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 대나무 잎 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다.

[0025] 상기 대나무로부터 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 있다.

[0026] 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 대나무 잎 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.

[0027] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 대나무(신이대) 잎 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 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.

[0028] 따라서 본 발명에 있어서 대나무(신이대) 잎 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[0029] 본 발명의 일실시예에 따른 대나무(신이대) 잎 추출물을 제조하는 방법을 조금 더 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.

[0030] 건조된 대나무 잎을 물에 넣어 120℃에서 90분동안 auto clave를 사용하여 추출한 뒤 여과하였으며 여과액을 감압농축기로 농축하여 열수 추출물을 제조할 있다. 또는, 건조된 대나무 잎을 에탄올에 넣어 80℃에서 6시간 동안 환류 추출하고 여과액을 감압농축기로 농축하여 최종적으로 주정 추출물을 제조할 수 있다. 또는, 건조된 대나무 잎을 100% 메탄올에 넣어 상온에서 7일간 침지 추출하고 추출된 용액은 여과하였으며 여과액을 감압농축기로 농축하여 메탄올 추출물을 제조할 수도 있다.

[0031] 이에 본 발명의 조성물은 대나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물에 해당한다.

[0032] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 대나무 잎 추출물은 화장료 조성물에 0.001 내지 10000 μg/ml의 농도로 포함될 수 있다.

[0033] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 조성물은 약용식물 추출물을 더 포함할 수 있다.

[0034] 상기 약용식물 추출물의 종류로는 히어리 추출물, 파리 추출물, 벌씀바귀 추출물을 예시할 수 있으며, 바람직하게는 벌씀바귀 추출물이 좋다.

[0035] '히어리(*Corylopsis coreana, Uyeki*)' 는 조록나무과의 식물로 우리나라 특산이며 남해도, 지리산, 수원 광교산의 산록, 산복에서 자란다. 관목으로 높이 5m까지 자라며 군집을 형성하며, 근맹아가 많이 올라와 커다란 군집을 형성하고 철쭉, 진달래, 참싸리, 팥배나무, 신갈나무와 함께 혼생하며 양지에서 잘 자라고 내한성이 강하여 영하 30℃이하에서도 동해를 입지 않으며 내건성도 강하여 건조한 토양에서도 잘 자란다. 작은 가지는 황갈색으로 수피에 백색의 피목을 가지며 동아는 타원형으로 황갈색이다. 잎은 호생하고 란상원형으로 단첨두, 심장저이며 길이 5-9cm, 넓이 4-8cm로 뾰족한 톱니가 있고 표면은 연한 녹색으로 질감이 좋으며 뒷면은 회백색이고 털이 없다. 총상화서는 길이 3-4cm로 꽃이 핀 다음에는 7-8cm로 자라고, 3월에 8-12개의 작은 꽃이 초롱 모양으로 늘어져 피며 꽃잎은 도란형이고 연한 황록색이다.

[0036] 본 명세서에서, 용어 '히어리 추출물' 은 히어리의 다양한 기관 또는 부분 (예: 잎, 꽃, 뿌리, 줄기, 가지, 껍질 및 종자 등)으로부터 추출하여 얻은 것을 의미한다.

[0037] '꽈리 (*Physalisalkekengi var. francheti* (Masters) Hort)'는 우리나라 각지에 재배하는 다년생 초본으로 해발 600m 이하의 숲 가장자리에 자라는 다년초로서 높이 60~90 cm 정도이다. 지하에는 옆으로 기는 긴 근경이 있다. 잎은 호생하며 광난형으로 끝이 날카롭고 치아식의 거치가 있으며 절마다 2매씩 난다. 꽃은 엽액에서 나오며 흰색으로 1개씩 달리며 소화경은 길이 3~4cm이고, 꽃받침은 짧은 통형이며, 끝이 얕게 5개로 갈라지고 가장자리에 털이 있다. 과실은 구형의 액과로 적색으로 익는다. 생약으로는 전초를 사용하며 산장 (Physalis Herba), 등룡이라고도 한다. 성분으로는 전초에 피살린 A, B, C (physalin A, B, C) (Jacobo-Herrera et al, J. Nat. Prod., 69, pp328-331, 2006), 사포닌 (saponin), 플라보노이드 (flavonoid), 알칼로이드 (alkaloid)가 있으며 열매에는 0.12% 카로티노이드 (carotenoid)인 붉은 색소, 아스코르빈산, 수지, 펙틴, 탄닌, 쓴맛물질, 카로틴, 알칼로이드, 퀘르쎄틴 (quercetin), 카페인산, 시나민산, 페룰라산 등이 있고 뿌리에는 3-알파-티글로옥시트로판, 피살린, 제아크산틴이 함유되어있고 씨에는 리놀레인을 주성분으로 하는 기름이 함유되어 있다 (Weller P et al., J. Agric. FoodChem., 51, pp7044-7049, 2003). 약리작용으로는 뿌리에는 자궁 수축작용이 있고 열매에는 이뇨작용이 있다.

[0038] 본 명세서에서, 용어 '꽈리 추출물'은 꽈리의 다양한 기관 또는 부분 (예: 잎, 꽃, 뿌리, 줄기, 가지, 껍질 및 종자 등)으로부터 추출하여 얻은 것을 의미한다.

[0039] '벌씀바귀(*Ixeris polycephala Cassini*)'는 국화과에 속하는 씀바귀의 일종으로, 우리나라 중부 이남의 산이나 들, 밭에 나는 다년생 잡초이다. 25~50cm 정도의 크기로 자라며, 줄기나 잎을 자르면 흰 유즙이 나온다. 꽃은 5~7월에 노랑색으로 약 1.5cm의 크기로 핀다.

[0040] 본 명세서에서, 용어 '벌씀바귀 추출물'은 벌씀바귀의 다양한 기관 또는 부분 (예: 잎, 꽃, 뿌리, 줄기, 가지, 껍질 및 종자 등)으로부터 추출하여 얻은 것을 의미한다.

[0041] 본 발명의 상기 약용식물 추출물은 적절한 용매를 이용하여 추출할 수 있으며, 상기 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 있다.

[0042] 본 발명의 하기 실험예에서는 약용식물에 해당하는 벌씀바귀 추출물을 본 발명의 대나무(신이대) 잎 추출물과 병용하여 사용하는 경우 멜라닌 생성 억제 효과가 두드러지게 증대되는 시너지 효과를 보임에 따라 대나무 잎 추출물과 벌씀바귀 추출물을 포함하는 조성물의 경우 피부 미백을 위한 화장료 소재로서 유용하게 사용될 수 있음을 객관적인 실험을 통해 입증하였다.

[0043] 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.

[0044] 본 발명의 화장료 조성물의 구체적인 제형으로서는 유연 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 밀크로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 수중유 형 에멀젼, 유중수 형 에멀젼, 페이스크성 무수 생성물, 고체 무수 생성물, 소구체를 사용한 수성 상에서의 오일 분산물, 이온성 지질 소포체, 비이온성 지질 소포체, 연고, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 보디오일, 수중유 형 메이크업베이스, 유중수 형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이섀도우, 마스카라, 치크칼라 및 아이브로우펜슬류로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종의 제형을 포함한다.

[0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 유효성분의 함량은 조성물 총 중량에 대하여 0.00001-40중량%이며, 바람직하게는 0.0005-40%이며, 보다 바람직하게는 0.0005-20중량%이다. 상기 유효성분(대나무 잎 추출물)의 함량이 0.00001중량% 미만이면 피부 미백 효과가 크게 감소되고, 20중량%를 초과하는 경우에는 피부 자극을 초래할 수 있으며, 제형상의 문제점이 발생할 수 있다.

[0046] 한편, 본 발명에 따른 상기 화장료 조성물은 유효성분을 나노리포좀 내부에 함유시켜 안정화하여 제형화할 수도 있다. 상기 유효성분을 나노리포좀 내부에 함유시키면, 유효성분이 안정화되어 제형화시 침전형성, 변색, 변취 등의 문제점을 해결할 수 있으며, 성분의 용해도 및 경피흡수율을 높일 수 있어 상기 추출물로부터 기대되는 효능을 최대로 발현시킬 수 있다.

[0047] 본 발명에서 나노리포좀은 통상적인 리포좀의 형태를 갖는 것으로서 평균 입자 지름이 10~500㎚인 리포좀을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 나노리포좀의 평균 입자 지름은 50~300㎚이며, 더욱 바람직하게는 100~200㎚이다. 나노리포좀의 평균 입자 지름이 500㎚를 초과하는 경우에는 본 발명에서 달성하고자 하는 기술적 효과 중 피부침투의 개선 및 제형 안정성의 개선이 매우 미약하다.

[0048] 본 발명에 따라 상기 추출물을 안정화하는데 사용되는 나노리포좀은 폴리올, 유성성분, 계면활성제, 인지질, 지방산 및 물을 포함하는 혼합물에 의해 제조될 수 있다.

[0049] 본 발명의 나노리포좀에 이용되는 폴리올은 특히 제한되지 않으며, 바람직하게는 프로필렌글리콜, 디프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세린, 메틸프로판디올, 이소프로필렌글리콜, 펜틸렌글리콜, 에리스리톨, 자일리톨, 솔비톨 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상이다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 10~80중량%, 바람직하게는 30~70중량%이다.

[0050] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 유성(oil) 성분은 당업계에 공지된 다양한 오일이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 헥사데칸 및 파라핀 오일과 같은 하이드로카본계 오일, 에스테르계의 합성오일, 디메치콘 및 사이크로메치콘계와 같은 실리콘 오일, 해바라기유, 옥수수유, 대두유, 아보카도유, 참깨유 및 어유와 같은 동식물성 오일, 에톡시레이티드 알킬에테르계오일, 프로폭시레이티드 알킬에테르계오일, 피토스핑고신, 스핑고신 및 스핑가닌과 같은 스핑고노이드 지질, 세레브로사이드 콜레스테롤, 시토스테롤 콜레스테릴설페이트, 시토스테릴설페이트, C_{10-40} 지방알콜 및 이의 혼합물이다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여1.0~30.0중량%일 수 있으며, 바람직하게는 3.0~20.0중량%이다.

[0051] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 계면활성제는 당업계에 공지된 어떠한 것도 사용할 수 있다. 예를 들어, 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 양성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제가 사용될 수 있다. 바람직하게는 음이온성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제이다. 음이온성 계면활성제의 구체적인 예는 알킬아실글루타메이트, 알킬포스페이트, 알킬락틸레이트, 디알킬포스페이트 및 트리알킬포스페이트를 포함한다. 비이온성 계면활성제의 구체적인 예는 알콕시레이티드 알킬에테르, 알콕시레이티드 알킬에스테르, 알킬폴리글리코사이드, 폴리글리세릴에스테르 및 슈가에스테르를 포함한다. 특히 바람직한 계면활성제는 비이온성 계면활성제에 속하는 폴리솔베이트류이다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 0.1~10중량%일 수 있으며, 바람직하게는 0.5~5.0중량%이다.

[0052] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 또 다른 성분인 인지질은 양쪽친화성 지질이 이용되며, 천연 인지질(예를 들어, 난황 레시틴 또는 대두 레시틴, 스핑고마이엘린) 및 합성 인지질(예를 들어, 디팔미토일포스파티딜콜린 또는 수첨 레시틴)을 포함하며, 바람직하게는 레시틴이다. 특히, 대두 또는 난황에서 추출한 천연 유래의 불포화 레시틴 또는 포화 레시틴이 바람직하다. 통상적으로 천연 유래의 레시틴은 포스파티딜콜린의 양이 23~95%, 그리고 포스파디딜에탄올아민의 양이 20% 이하이다. 본 발명의 나노리포좀의 제조에 있어서, 인지질의 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 0.5~20.0중량%이며, 바람직하게는 2.0~8.0중량%이다.

[0053] 본 발명의 나노리포좀 제조에 이용되는 지방산은 고급 지방산으로서, 바람직하게는 C_{12-22} 알킬 체인의 포화 또는 불포화 지방산으로서, 예컨대, 라우린산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아린산, 올레산 및 리놀레산을 포함한다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 0.05~3.0중량%일 수 있으며, 바람직하게는 0.1~1.0중량%이다.

[0054] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 물은 일반적으로 탈이온화된 증류수이며, 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 5.0~40중량%일 수 있다.

[0055] 나노리포좀의 제조는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 이루어질 수 있으나, 가장 바람직하게는 상기 성분들을 포함하는 혼합물을 고압 호모게나이저에 적용하여 제조된다. 고압 호모게나이저에 의한 나노리포좀의 제조는 소망하는 입자 크기에 따라 다양한 조건(예: 압력, 횟수 등)으로 실시할 수 있으며, 바람직하게는 600~1200bar의 압력 하에서 1~5회 고압 호모게나아저를 통과하도록 하여 나노리포좀을 제조할 수 있다.

[0056] 본 발명의 화장료 조성물을 단독 또는 중복 도포하여 사용하거나, 본 발명 이외의 다른 화장료 조성물과 중복 도포하여 사용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 항산화 및 미백 효과가 우수한 화장료 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다.

[0058] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설

명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0060] **<실시예>**

[0062] **통계처리**

[0063] 모든 결과 값은 세 번 반복실험 후 통계처리 하였으며, 실험에 의해 얻어진 값들의 평균±표준편차로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검증은 SPSS 23 (SPSS Inc., Chicago, IL)를 이용하여 t-Test를 실시하였으며, $p<0.05$ 이하 경우 통계적으로 유의 하다고 판정 하였다.

[0065] **세포배양**

[0066] B16F10 cell은 한국 세포주은행에서 분양 받았으며, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, USA), 0.2 % sodium bicarbontate를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 배지로 사용하였고, 37℃에서 5% CO2 상태로 배양하였으며, 세포가 바닥 면적의 90% 정도까지 자란 상태에서 계대 배양하여 실험을 진행하였다.

[0068] **<실시예 1>**

[0069] **대나무 잎 추출물 제조**

[0070] 본 연구에서는 전라남도 담양군 담양읍에서 채취한 신이대 잎 (Sasa coreana Nakai)을 dry oven을 사용하여 60 ℃ 에서 5시간 동안 건조하였으며, 각각 다른 3가지 추출 방법을 사용하였다(도 1 참조).

[0071] 첫 번째 추출방법으로, 건조된 대나무 잎 10 g을 물 500 mL에 넣어 120℃에서 90분동안 auto clave를 사용하여 추출한 뒤 여과하였으며 여과액을 감압농축기로 농축하여 열수 추출물을 수득하였다.

[0072] 두 번째 추출방법으로, 건조된 대나무 잎 10 g을 70% 에탄올 250 mL에 넣어 80℃에서 6시간동안 환류 추출하고 여과액을 감압농축기로 농축하여 최종적으로 주정 추출물을 수득하였다.

[0073] 세 번째 추출방법으로, 건조된 대나무 잎 10 g을 100% 메탄올 500 mL에 넣어 상온에서 7일간 침지 추출하고 추출된 용액은 여과하였으며 여과액을 감압농축기로 농축하여 유기용매 추출물 얻었다.

[0074] 상기 3가지 추출방법을 통해 수득한 열수 추출물, 에탄올 추출물, 메탄올 추출물 각각은 SCW, SCE, SCM으로 명명하였다.

[0075] SCW, SCE, SCM의 추출 수율은 각각 고형분 기준으로 13%, 16%, 17%로 확인되었으며, 100% 메탄올을 사용하여 추출한 SCM의 수율이 가장 높게 확인되었다.

표 1

[0077] 본 발명의 대나무(신이대) 잎 추출물

종류	약칭
대나무 잎 열수 추출물	SCW
대나무 잎 에탄올 추출물	SCE
대나무 잎 메탄올 추출물	SCM

[0079] **<실험예 1>**

[0080] **대나무 잎 추출물의 항산화 활성**

[0081] 본 실험에서는 상기 실시예 1을 통해 제조된 본 발명의 대나무 잎 추출물의 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH 라디칼 소거능 및 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다.

[0082] DPPH 자유 라디칼은 천연 추출물의 항산화 활성 측정하는 방법으로 널리 사용되는 방법이다. 본 실험에서는 항산화 활성 측정방법 중 Blois의 방법을 변형하여 시료의 라디칼 소거능을 측정하였다 [Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200.]. 메탄올에 용해시킨 0.1 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma, USA) 800 μL와 각 샘플 200 μL을 micro centrifuge tube에 넣고 voltexing하여 암실에서 15분간 반응시켰다. 남아 있는 라디칼의 농도를 UV-Visible spectrophotometer (SCINCO, Seoul, Korea)를 사용하여 517 nm에서 측정하였다. 양성 대조군으로는 아스코르브산 (Sigma, USA)을 사용하였고, 추출물의 DPPH에 대한 소거능 (IC_{50})은 용매만을 사용한 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 농도로 나타내었다.

[0083] ABTS 라디칼 소거능은 친수성 및 소수성 시료의 라디칼 소거 활성을 모두 측정할 수 있어 적용 범위가 넓다는 장점을 가지고 있다. 본 실험에서는 Jeong 등의 방법을 변형하여 측정하였다 [Jeong, C. H., G. Choi, J. Kim, J. Kwak, H. Heo, K. H. Shim, B. R. Cho, Y. I. Bae, and J. S. Choi (2009) In vitro antioxidative activities and phenolic composition of hot water extract from different parts of Cudrania tricuspidata. J. Food Sci. Nutr. 14: 283-289.]. 증류수에 용해한 7 mM의 ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate를 1:1로 넣어 12시간 동안 암소에 방치하였다. Radical stock solution을 흡광도 값이 0.70 ±0.02이 되도록 PBS (pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 용액 800 μL에 농도별로 제조된 시료 200 μL씩을 가하여 암실에서 15분 동안 반응 후 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 아스코르브산(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하였고, 추출물의 ABTS에 대한 소거능 (IC_{50})은 용매만을 사용한 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 농도로 나타내었다.

[0084] $$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{\text{absorbance of control} - \text{absorbance of 시료}}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

[0085] 그 결과 하기 표 2에서 나타낸 바와 같이, 각 시료의 DPPH IC_{50} 범위는 604~797 μg/mL로 확인되었으며, ABTS의 IC_{50}범위는 117~166 μg/mL로 확인되었다 (Table 1). 특히 신이대 잎 추출물 중 100% 메탄올로 추출된 SCM의 DPPH와 ABTS IC_{50}는 각각 604 μg/mL, 117 μg/mL로 3가지 추출물 중 가장 높은 항산화 활성이 확인되었다. 기존의 연구에서 왕대, 솜대, 맹종죽, 조릿대 및 오죽 추출물의 항산화 활성을 조사하였는데 IC_{50} 범위는 200~1600 μg/mL로 보고 되었다. 본 실험 결과가 기존의 항산화 활성 보다 높은 항산화 활성을 나타내는 이유는 대나무 잎의 종류와 추출방법이 다르기 때문으로 판단되며, 자생지 및 체취 시기에 따라 대나무 잎의 폴리페놀 성분 및 생리활성을 나타내는 성분들의 함량도 달라질 수 있을 것으로 생각된다.

표 2

[0087] 본 발명의 대나무 잎 추출물의 DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼 소거능

시료	DPPH IC_{50}[a] (μg/mL)	ABTS IC_{50} (μg/mL)
SCW	608	166
SCE	797	138
SCM	604	117
아스코르브산	25	56

[a] IC_{50} Inhibitory concentration

[0089] **<실험예 2>**

[0090] **대나무 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량 측정**

[0091] Folin-Ciocalteu 시약을 증류수로 10배 희석한 용액과 2% Na_2CO_3 (w/v)와 1:1:1의 비율로 혼합하였다. 실온에서 30분간 반응시킨 후, 반응 혼합물의 흡광도는 UV-Visible spectrophotometer (SCINCO, Seoul, Korea)를 사용하여 750 nm에서 측정하였다 [Choi, M. H., M. J. Kim, Y. J. Jeon, and H. J. Shin (2014) Quality changes of fresh vegetable and fruit juice by various juicers. KSBB J. 29: 145-154.].

[0092] 그 결과 하기 표 3에서 나타낸 같이, SCM의 폴리페놀 함량이 gallic acid 기준으로 보았을 때, 42 μg/mg로 가장 높은 폴리페놀 함량이 확인되었다. 기존의 연구에서 조릿대 열수 추출물과 80% 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 15 μg/mL, 12 μg/mL로 확인되었는데 총 폴리페놀 함량이 높을수록 높은 항산화 활성이 높다고 보고되었다. 본 연구의 실험결과와 비교해 보았을 때 SCM의 총 폴리페놀 함량이 기존의 연구 결과보다 더 높은 것으로 확인되었다.

표 3

[0094] 본 발명의 대나무 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량

시료	TPC[b](GAE[c] μg/mg)
SCW	24
SCE	25
SCM	42
[b] TPC Total polyphenol content, [c] GAE Garlic acid equivalent	

[0096] **<실험예 3>**

[0097] **대나무 잎 추출물의 HPLC 분석**

[0098] 항산화 활성이 가장 높은 SCM을 대상으로 high-performance liquid chromatography (HPLC)를 사용하여 추출물 속에 함유된 폴리페놀 (catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, rutin)을 정량 분석하였다. Shimadzu HPLC의 LC-20AD 펌프, diode array detector (SPD-20A) 및 XBridge C18 column (4.6 x 150mm, 5μm)을 사용하였다. HPLC의 이동상은 A: water (0.2 % (v/v) TFA)와 B: methanol (0.2 % (v/v) TFA)를 사용하였다. HPLC 분석조건은 0-50분, 25 % -55 % B, 유속은 0.6 mL/min 이었다. Column 온도는 40 ℃이고, 흡수파장은 330 nm에서 측정되었으며, 시료 주입은 20 μL로 주사하고 표준 물질의 머무름 시간을 비교하여 화합물을 확인하였다.

[0099] 그 결과 도 2에서 나타낸 바와 같이, HPLC 분석 결과 catechin 409 μg/g, chlorogenic acid 178 μg/g, caffeic acid 109 μg/g, p-coumaric acid 54 μg/g, ferulic acid 4 μg/g, rutin 39 μg/g이 함유된 것을 확인하였다. SCM에 다량으로 함유되어 있는 catechin, chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid는 천연 항산화제로 알려져 있는 성분이다.

[0101] **<실험예 4>**

[0102] **대나무 잎 추출물의 미백 활성 측정**

[0104] <4-1> 머쉬룸 티로시나아제 저해활성측정

[0105] 티로시나아제는 구리를 함유한 효소이며, 멜라닌 생성에 있어서 결정적인 역할을 하는 효소이다. 멜라노솜 (Melanosome) 내에서 티로신을 산화시켜 DOPA 를 만드는 티로시나아제 수산화효소(tyrosine hydroxylase)로 DOPA를 산화시켜 DOPA 퀴논을 만드는 DOPA 산화효소(oxidase)로써 작용하여 멜라닌 중합체를 합성한다. 본 연구에서는 대나무 잎 메탄올 추출물 (SCM)의 티로시나아제 저해 활성을 측정하기 위해 SCM을 각 농도별 (25, 50, 100 μg/mL)로 처리하여 실험을 진행하였다. 대조군으로 티로시나아제 저해제로 알려져 있는 아스코르브산과 카테킨을 사용하였다.

[0106] 항산화 활성이 가장 높은 SCM을 대상으로 티로시나아제 저해 활성을 확인하기 위해 Macrini 방법 [Macrini, D. J., I. B. Suffredini, A. D. Varella, R. N. Younes, and M. T. Ohara (2009) Extracts from Amazonian plants have inhibitory activity against tyrosinase: An in vitro evaluation. Brazilian J. Pharm. Sci. 45: 715-721.]에 따라 진행하였다. 실험방법은 시험관에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) 220 μL 와 25~100 μg/mL 농도로 제조된 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물 20 μL, L-tyrosine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1.5 mM 40 μL, 1500 unit 로 제조한 머쉬룸 티로시나아제(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 20 μL을 넣고 37℃ 에서 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 티로시나아제에 의해 3, 4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로부터 형성되는 DOPAchrome의 양을 490 nm에서 측정하였다.

[0107] 그 결과 도 3에서 나타낸 바와 같이, SCM의 티로시나아제 저해결과 IC_{50}값은 164 ㎍/mL 으로 측정되었으며, 양성대조군으로 사용한 아스코르브산과 카테킨의 IC_{50}값은 각각 38 ㎍/mL과 97 ㎍/mL 로 나타났다. 이와 같은 결과는 양성대조군으로 사용한 아스코르브산과 카테킨 보다는 낮은 저해활성을 나타내지만 천연물 수준에서는 매우 높은 저해 활성이라 할 수 있다.

[0108] 기존의 연구에서 카테킨은 강력한 티로시나아제 저해제로써, 100 μM 이하의 저농도에서 효과가 있음이 밝혀졌으며, 또 다른 연구에서는 대나무 맹종죽 추출물 및 발효 추출물의 티로시나아제 저해활성을 조사하였는데 625~1550 ㎍/mL 의 농도범위에서 50% 이상 저해능이 있다고 보고 하였다. 이와 같은 결과로 보았을 때 대나무의 종류와 추출방법에 따라 티로시나아제 저해활성이 다른 것을 확인할 수 있으며, 본 연구에서 기존의 실험에 비해 높은 티로시나아제 저해 활성이 확인된 이유는 SCM에 포함되어 있는 catechin, chlorogenic acid 등 다양한 폴리페놀 성분들이 티로시나아제 활성을 강력하게 저해한 것으로 생각된다.

[0110] <4-2> 멜라닌 함량 측정

[0111] 본 실험에서는 미백 활성 평가를 위해 B16F10 멜라노마 세포에서 SCM을 각 농도별로 처리하고 α-MSH (1 ㎍/mL)병용 처리하여 48시간 배양한 후 멜라닌 생성량을 측정하였다.

[0112] 멜라닌 함량 측정은 Hosoi의 방법 [Hosoi, J., E. Abe, T. Suda, and T. Kuroki (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1α,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res. 45: 1474-1478.]에 따라 B16F10 세포를 96 well에 1×10^4 cells/mL 농도로 분주하고 24시간 후에 1000 ㎍/mL 농도의 α-MSH와 SCM을 각 농도별 (25~100 ㎍/mL)로 각각 처리하였으며, 48시간 경과 후 멜라닌 생성을 확인하고 세포를 PBS로 세척하였다. 세포를 수확하고 12,000 rpm 에서 5분 동안 원심분리하고 생성된 펠렛에 1N NaOH를 넣고 80℃에서 1시간 동안 방치하여 용해시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 함량은 무 처리군의 흡광도와 비교하였으며, 양성대조군으로는 알부틴을 사용하였다.

[0113] 그 결과 도 4에서 나타낸 바와 같이, α-MSH (1 μg/mL) 처리군은 vehicle control에 비해서 멜라닌 함량이 95.69%로 증가 되었으며, SCM 처리군은 α-MSH (1 μg/mL) 처리군에 비해 25, 50, 100 ㎍/mL 농도에서 30.8%, 69.6%, 86.4%로 멜라닌 생성이 감소 되었고, 양성대조군인 알부민은 100 μg/mL 농도에서 59.2% 정도 멜라닌 생성량이 감소되었다.

[0114] 또한, 도 5에서 나타낸 바와 같이, SCM을 각 농도별 (25, 50 μg/mL)로 처리하여 morphology를 관찰하였을 때 48시간 이후 멜라닌 형성이 저해되는 것을 확인하였다.

[0116] <4-3> 멜라닌형성 관련 단백질 발현 분석

[0117] 본 실험에서는 미백 활성 평가를 위해 B16F10 멜라노마 세포에 α-MSH를 유도하고 SCM 추출물 각 농도별로 처리하여 멜라닌형성과 관련된 단백질(티로시나아제, TRP-1, TRP-2)의 발현 변화 양상을 웨스턴블랏을 통해 분석하였다.

[0118] 티로시나아제, TRP-1, TRP2, 액틴의 일차항체와 anti-goat, anti-rabbit, antimouse등의 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 시료 처리가 끝난 배양 세포에서 cell lysate를 추출하여 Bradford assay로 단백질 농도를 결정한 후 50 ㎍의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 blotting한 후 1:1000으로 희석한 일차 항체와 hybridization하였다. Membrane 수세 후 horse radish peroxidase가 부착된 이

차항체 (1:1000)로 1시간 동안 반응시키고 chemiluminescence detection system (FluoChem®FC2, AlphaInnotech, USA)을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다.

[0119] 그 결과 도 6에서 나타낸 바와 같이, α-MSH로 색소침착을 유도시킨 세포주에 SCM을 25, 50, 100 μg/mL 농도로 48시간 동안 처리한 결과 티로시나아제, TRP-1, TRP-2에서 높은 단백질 발현억제 효과를 나타냈으며 농도 의존적으로 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다.

[0121] **<실험예 5>**

[0122] **대나무 잎 추출물의 세포독성평가**

[0123] B16F10 cell suspension을 6 well에 1×10^4 cells/mL 농도로 200 μL씩 분주하여 배양기에서 24시간 동안 안정화를 시킨 후 시료를 농도별(25, 50, 100 μg/mL)로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. Choi의 방법 [Choi, M. H., H. K. Han, Y. J. Lee, H. G. Jo, and H. J. Shin (2014). In vitro anti-cancer activity of hydrophobic fractions of Sparassis latifolia extract using AGS, A529, and HepG2 cell lines. J. Mushrooms 12: 304-310.]에 따라 2.5 mg/mL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 well 당 100 μL씩 넣어 1시간 동안 배양기에 방치한다. 이후 상등액을 제거하고 DMSO를 well 당 200 μL씩 가하고 1분간 shaking하여 formazan을 완전히 용해시킨 후 ELISA Bio-Tek instrument Inc (Winooski, VT, USA)을 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험에 사용한 MTT, DMSO는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0124] 그 결과 도 7에서 나타낸 바와 같이, 실험한 농도 전체에서 24시간이 지난 후 세포독성은 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 기존의 연구에서 대나무 맹종죽 수액을 처리했을 때, 200 μg/mL 이하의 농도에서 세포독성을 나타내지 않았던 연구 결과와 유사하다. 화장품 성분은 화학물질, 합성 유래 또는 천연물 유래 등이 있으며, 경우에 따라 단독 또는 혼합물의 형태로 사용되는데 최종 제품의 안전성을 확보하기 위해서는 먼저 원료 성분의 안전성이 확보되어야 한다. 본 실험의 결과로 보았을 때 본 발명의 대나무 잎 추출물 SCM은 화장품 원료로써 비교적 안전한 성분으로 판단되며, 추후 인간유래 세포 및 추가적인 임상 실험을 통해 안전성을 확인할 필요가 있다.

[0126] **<실시예 2>**

[0127] **약용식물 추출물 제조**

[0129] <2-1> 히어리 추출물 제조

[0130] 히어리는 전라남도 나주 지역에서 재배된 히어리를 구입한 후, 유수에서 3회 씻어내어 불순물을 제거한 후, 히어리 지상부(전체에서 뿌리만 제외)를 35℃에서 30시간 건조를 수행하여 상기 세척한 히어리를 완전히 건조시켰다. 상기 건조시킨 히어리 지상부를 건조 시료를 제조하였다. 시료인 히어리 1 kg에 80 % 에탄올을 1: 5 (w/v)의 비율로 첨가하고 혼합 후 상온에서 48시간 동안 3회 반복 환류 추출하여 획득한 추출액을 여지 No.2 (Advantec TOYO, Japan)로 여과한 후 50 ℃에서 회전감압농축기 (Rotary vacuum evaporator ; Heidolph VV2011, Switzerland)로 감압농축한 후에 동결 건조하여 히어리 에탄올 추출물을 수득하였으며, -20 ℃에 보관하며 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0132] <2-2> 꽈리 추출물 제조

[0133] 본 발명에 사용한 꽈리(*Physalis alkekengi* var. *francheti* (Mast.) Hort)는 지상부(전체에서 뿌리만 제외)를 채취후 검정된 공시재료를 세척한 후 절단하여 사용하였다. 시료인 꽈리 1 kg에 80 % 에탄올을 1: 5 (w/v)의 비율로 첨가하고 혼합 후 상온에서 48시간 동안 3회 반복 환류 추출하여 획득한 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 꽈리 에탄올 추출물을 수득하였으며, -20 ℃에 보관하며 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0135] <2-3> 벌씀바귀 추출물 제조

[0136] 벌씀바귀는 전라남도 나주 지역에서 자생하는 것을 지상부(전체에서 뿌리만 제외)를 채취하여 세척하고 음건하여 사용하였다. 음건한 벌씀바귀 1 kg에 80 % 에탄올을 1:5 (w/v)의 비율로 첨가하고 혼합 후 상온에서 48시간 동안 3회 반복 환류 추출하여 획득한 추출액을 여지 No.2 (Advantec TOYO, Japan)로 여과한 후 50℃에서 회전감압농축기 (Rotary vacuum evaporator ; Heidolph VV2011, Switzerland)로 감압농축한 후에 동결 건조하여 벌씀바귀 에탄올 추출물을 수득하였으며, -20℃에 보관하며 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0138] **<실험예 6>**

[0139] **대나무 잎 추출물 및 약용식물 추출물 병용 처리에 따른 미백 활성 측정**

[0140] 본 실험에서는 상기 실시예 1을 통해 제조된 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물(SCM)에 약용식물 추출물로서 히어리 추출물, 꽈리 추출물, 벌씀바귀 추출물 각각을 병용 처리하였을 때 SCM 단독 처리군 대비 미백 활성이 증진되는지 여부를 살펴보았다.

[0141] 미백 활성 측정을 위해 멜라닌 함량 측정을 실시하였으며, 멜라닌 함량 측정은 상기 실험예 <4-2>와 유사한 방법으로 진행하였다. 간략하게는, B16F10 멜라노마 세포에서 α-MSH (1 ㎍/mL)을 처리하여 멜라닌형성을 유도하였으며, 이때 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물(SCM) 25 ㎍/mL 및 상기 실시예 2를 통해 제조된 히어리 추출물, 꽈리 추출물, 벌씀바귀 추출물 각각을 25 ㎍/mL 농도로 병용 처리하여 48시간 배양한 후 멜라닌 생성량을 측정하였다.

[0142] 그 결과 하기 표 4 및 도 8에서 나타낸 바와 같이, 약용식물 추출물로서 벌씀바귀 추출물을 병용 처리한 실험군에서 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물(SCM) 단독 처리군 대비 멜라닌 생성량이 두드러지게 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 반면에, 히어리 추출물, 꽈리 추출물을 병용 처리한 실험군에서는 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물(SCM) 단독 처리군과 거의 유사하거나 더욱 증대되는 멜라닌 생성량을 보여주었다.

[0143] 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물(SCM)에 벌씀바귀 추출물을 병용 사용하는 경우 미백 활성에 시너지 효과를 가질 수 있음을 확인하였다. 특히, 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물(SCM)을 25 ㎍/mL 농도로 사용하고도 고농도인 100 ㎍/mL 보다 더욱 우수한 미백 활성을 도출하였다.

표 4

[0145] 처리구별 멜라닌 함량

Concentration (㎍/mL)	Activity (%)	표준편차
CON	100	3.5
a-MSH 1	226	12.5
SCM 25	156	8.8
SCM 25 + 히어리 25	158	7.7
SCM 25 + 꽈리 25	165	5.2
SCM 25 + 벌씀바귀 25	102	7.5
Arbutin 100	136	10.8

[0147] **<실험예 7>**

[0148] **약용식물 추출물의 세포독성평가**

[0149] 본 실험에서는 상기 실시예 2를 통해 제조된 본 발명의 약용식물 추출물(히어리 추출물, 꽈리 추출물, 벌씀바귀 추출물)의 세포독성을 평가하였다. 세포독성 평가는 상기 실험예 5와 동일한 방식으로 측정하였다.

[0150] 그 결과 하기 표 5 및 도 9에서 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 2를 통해 제조된 본 발명의 약용식물 추출물(히어리 추출물, 꽈리 추출물, 벌씀바귀 추출물)은 100㎍/mL까지 세포독성이 없는 것으로 확인되었다. 따라서 본

발명의 약용식물 추출물은 화장품 원료로써 비교적 안전한 성분으로 판단되었다.

표 5

[0152] 본 발명의 약용식물 추출물의 세포독성평가

Concentration (㎍/mL)	Activity (%)	표준편차
CON	100	3.5
히어리 25	101.4	8.2
히어리 50	104.3	8.8
히어리 100	103.9	7.7
꽈리 25	100.2	8.2
꽈리 50	102.8	8.8
꽈리 100	98.5	7.7
벌씀바귀 25	102.2	8.2
벌씀바귀 50	101.8	8.8
벌씀바귀 100	105.4	2.5

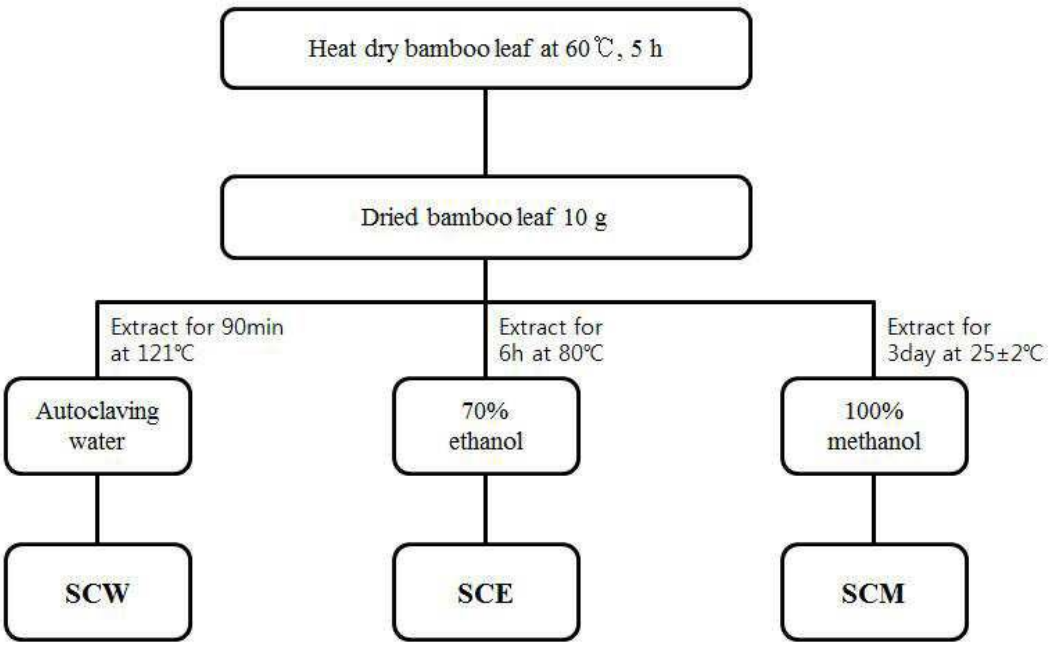
[0154] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

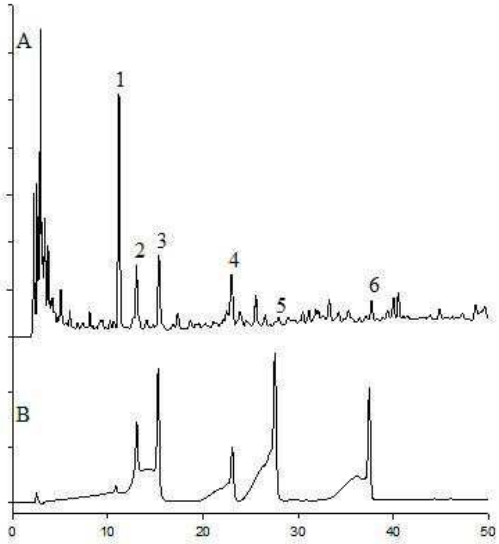
[0155] SCM : 본 발명의 대나무 잎 메탄올 추출물

도면

도면1

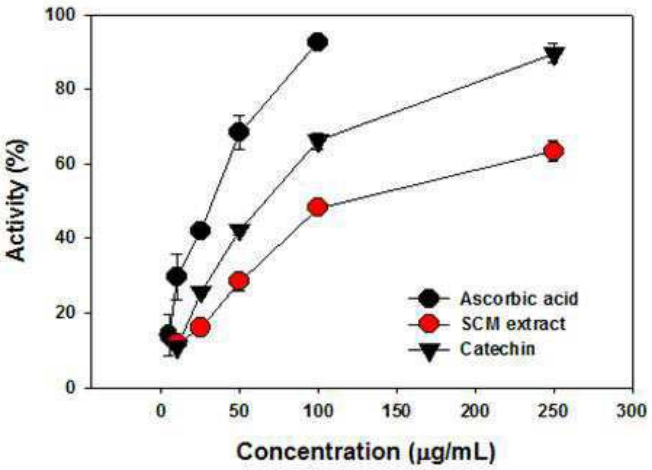


도면2

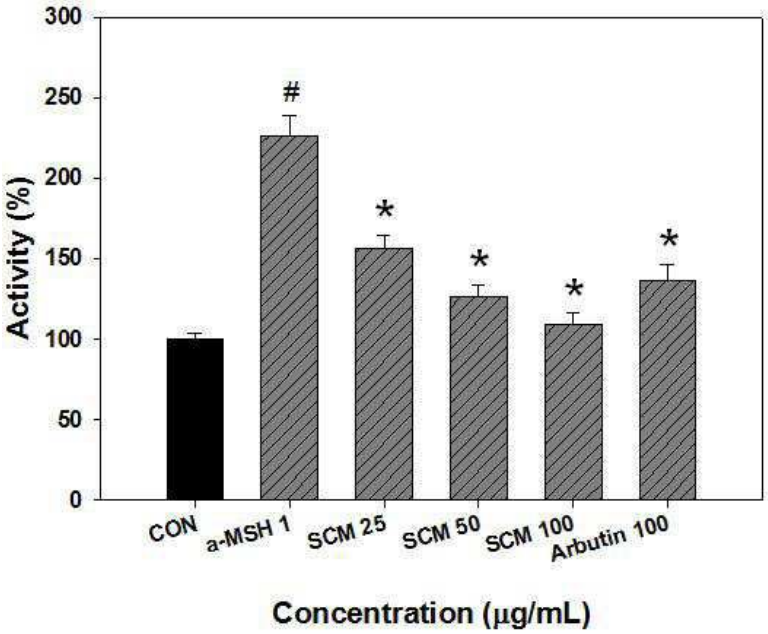


No.	Compound	SCM content (μg/g)
1	Catechin	409
2	Chlorogenic acid	178
3	Caffeic acid	109
4	*p*-Coumaric acid	54
5	Ferulic acid	4
6	Rutin	39

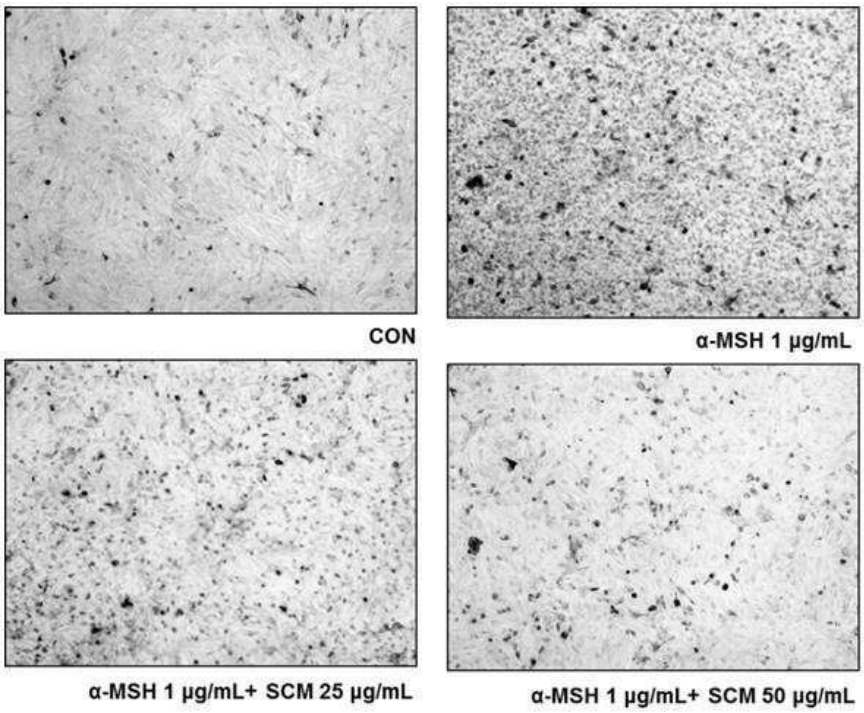
도면3



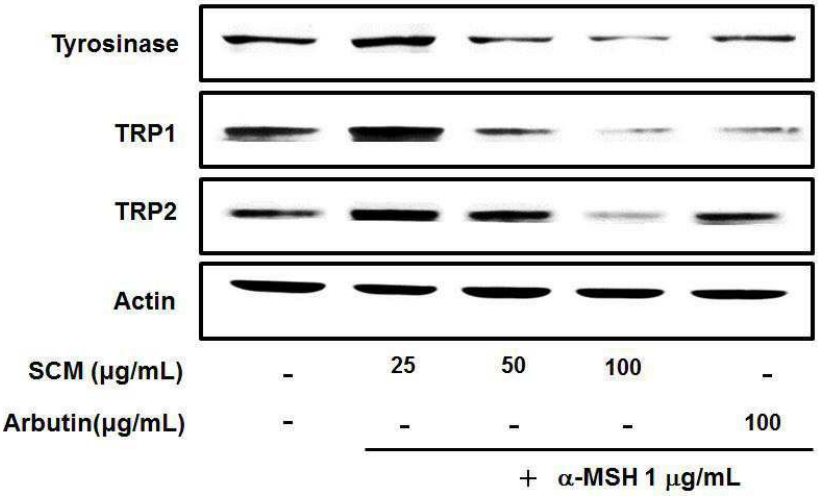
도면4


300
250
200
150
100
50
0
Activity (%)
#
*
*
*
*
CON
a-MSH 1
SCM 25
SCM 50
SCM 100
Arbutin 100
Concentration (μg/mL)

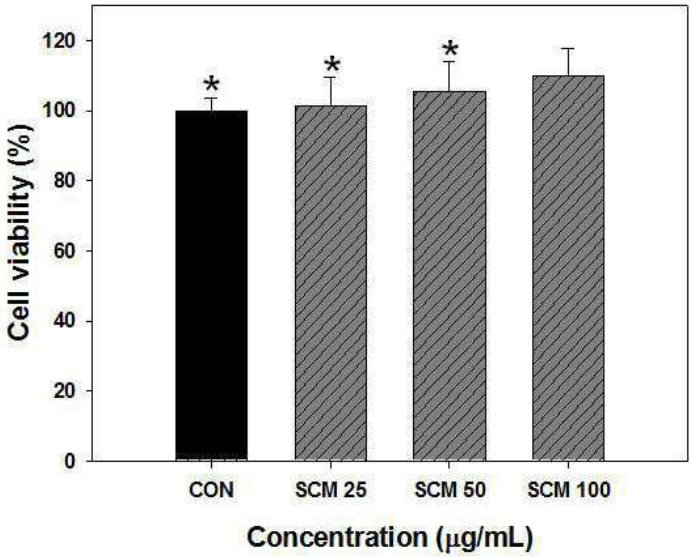
도면5


CON
α-MSH 1 μg/mL
α-MSH 1 μg/mL+ SCM 25 μg/mL
α-MSH 1 μg/mL+ SCM 50 μg/mL

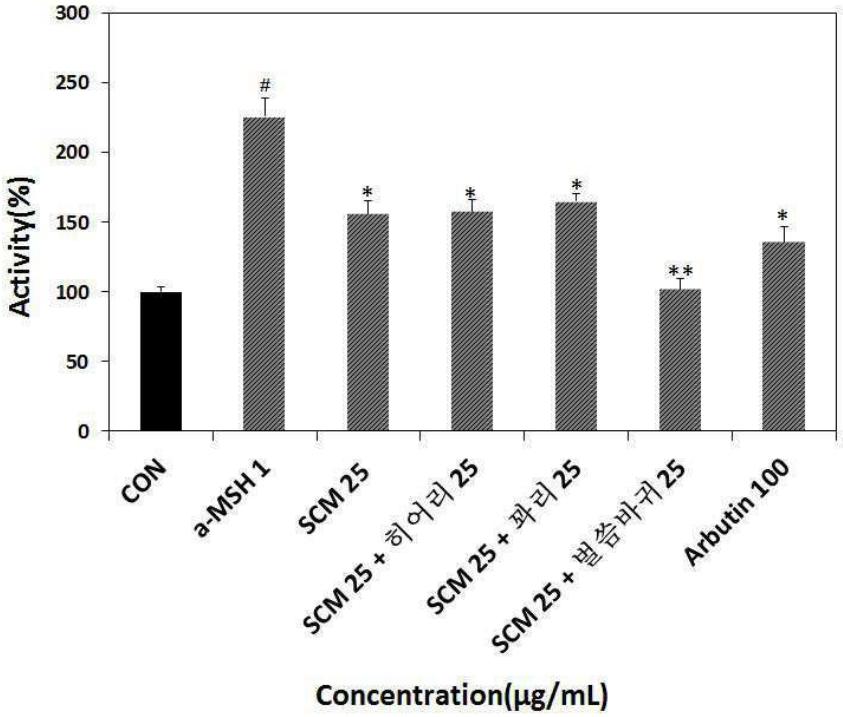
도면6


Tyrosinase
TRP1
TRP2
Actin
SCM (μg/mL) - 25 50 100 -
Arbutin(μg/mL) - - - - 100
+ α-MSH 1 μg/mL

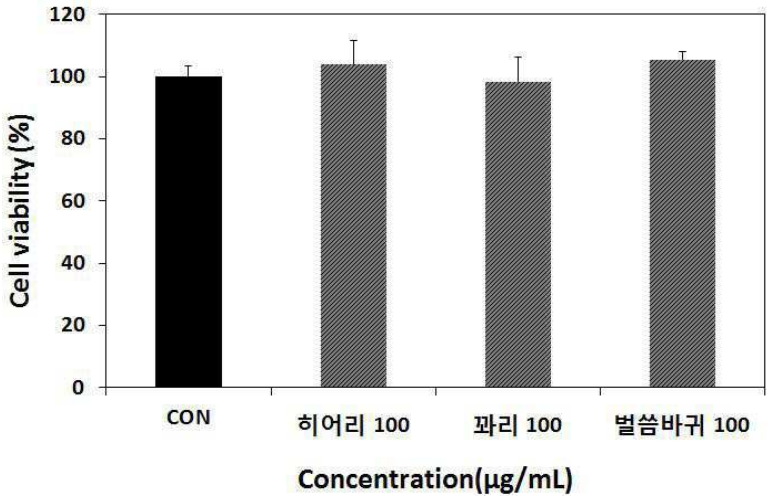
도면7


Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
*
*
*
CON
SCM 25
SCM 50
SCM 100
Concentration (μg/mL)

도면8


300
250
200
150
100
50
0
Activity(%)
#
*
*
*
**
*
CON
a-MSH 1
SCM 25
SCM 25 + 히어리 25
SCM 25 + 꽈리 25
SCM 25 + 벌씀바귀 25
Arbutin 100
Concentration(μg/mL)

도면9


120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (%)
CON
히어리 100
꽈리 100
벌씀바귀 100
Concentration(μg/mL)