

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0131508 (43) 공개일자 2012년12월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 8/97 (2006.01) A61K 36/02 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0049714 (22) 출원일자 2011년05월25일 심사청구일자 2011년05월25일		(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교) (72) 발명자 김형탁 부산광역시 남구 황령대로319번길 26, 104동 210 2호 (대연동, 대연경동메르빌아파트) 이민섭 부산광역시 해운대구 해운대로383번길 119-14 (우 동) (뒷면에 계속) (74) 대리인 김일성

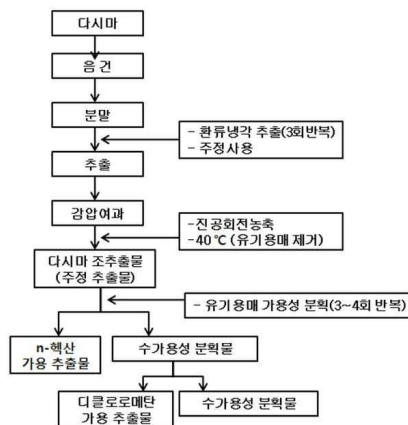
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 피부세포에서 멜라닌 생합성 억제 효과를 갖는 다시마 (*Laminaria japonica*) 주정 추출물 또는 그로부터 분리된 *n*-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물을 함유하는 피부 미백용 조성물

(57) 요약

본 발명은 다시마 (*Laminaria japonica*) 유래 미백 효과용 조성물에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 다시마의 주정 추출물 및 *n*-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물을 유효성분으로 함유하여 흑색종 세포에서 멜라닌 생합성성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 미백용 기능성 화장품, 기능성 식품 또는 약학 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

신태선

전라남도 여수시 신월로 561-8, 금호아파트 12동
502호 (신월동)

우희철

부산광역시 남구 분포로 111, LG메트로시티 133동
406호 (용호동)

특허청구의 범위

청구항 1

다시마의 주정추출물, *n*-헥산 가용 추출물, 디클로로메탄 가용 추출물 중 선택된 하나 또는 하나 이상의 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생합성 억제제를 통한 피부 미백용 화장품 조성물

청구항 2

다시마의 주정추출물, *n*-헥산 가용 추출물, 디클로로메탄 가용 추출물 중 선택된 하나 또는 하나 이상의 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생합성 억제제를 통한 과색소 침착 피부 질환의 치료용 약학 조성물

청구항 3

다시마의 주정추출물, *n*-헥산 가용 추출물, 디클로로메탄 가용 추출물 중 선택된 하나 또는 하나 이상의 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생합성 억제제를 통한 피부 미백용 기능성 식품 조성물

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 다시마 (*Laminaria japonica*) 유래 미백 효과용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 다시마의 주정 추출물 및 *n*-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물을 유효성분으로 함유하여 흑색종 세포에서 멜라닌 생합성성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 미백용 기능성 화장품, 기능성 식품 또는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 기능성 화장품 (cosmeceuticals) 또는 식품은 의약품 개발에 비해 상대적으로 적은 시간과 비용으로도 경쟁력 있는 제품 개발이 가능하여 저자본으로 고부가가치의 창출이 가능한 첨단 미래형 산업으로 떠오르고 있다.

[0003] 최근 항산화 능력이 뛰어난 해조류 같은 해양자원과 해양심층수를 이용한 기능성 화장품을 개발 중에 있으나, 해조류의 높은 점성 때문에 해조분말을 이용한 팩 등의 화장품은 효과에 비해 실용성이 저평가 되어 있다.

[0004] 기능성 화장품 또는 식품에 있어서 해양에서 유래된 천연물은 원료개발의 핵심부분으로서 우리나라가 외국의 유력한 화장품 또는 식품업체에 비해 국제경쟁력을 가질 수 있는 부분으로 평가된다.

[0005] 최근 급성장하고 있는 기능성 화장품 분야에서 미백 소재인 알부틴 (arbutin), 닥나무 (*Broussonetia*) 추출물 분말, 감초 (licorice; *Glycyrrhiza*) 추출물, 에틸 아스코르베이트와 주름개선 소재 (항노화소재)인 레티놀, 레티닐팔미테이트, 폴리에톡실레이티드아마이드에 한하여 식품의약품안전청 (KFDA)에서 기능성을 인정하고 있으며, 이들을 원료로 한 제품은 2005년 약 5천억 원 정도의 매출을 기록하였으나, 이들 소재 100%가 수입 원료로서 국산화 또는 국내 신소재 개발을 필요로 하고 있다.

[0006] 유럽, 미국, 일본 등의 선진국에서는 광우병의 발병으로 동물 유래의 화장품 소재들이 대부분 식물 유래의 소재

로 급격히 대체되고 있으며, 최근에 실시된 규제 완화 조치에 의해 일부 배합이 금지된 성분을 제외하고는 배합된 전성분을 표시하면 자유롭게 모든 소재들을 사용할 수 있게 됨에 따라 식물 유래의 화장품 원료 개발에 박차를 가하게 되었다.

[0007] 식물 유래의 화장품 소재로 올리브유, 야자유와 사포닌, 소맥배아유, 미강유, 인지질 등 같은 계면 활성성분, 아미노산, 단백질, 당류 등을 함유한 수용성 성분 등이 보습제, 피막형성제, 피부보호제로 이용되고 있으며, 최근에는 MMP-1 (matrix metalloproteinase-1) 활성 및 생산을 억제하는 소재, 엘라스티나제 (elastinase)의 활성을 억제하는 소재, 히알루론산의 합성을 촉진하는 소재, 활성 산소의 제거 능력을 가진 소재, 각화 세포의 증식을 촉진하는 소재, 섬유아세포의 증식을 촉진하는 소재, 멜라닌 생성을 억제하는 소재 등이 연구개발 중이거나 이미 보습, 항노화, 미백 화장품의 원료로 사용되고 있다.

[0008] 이들은 대부분 90% 이상 또는 100%까지의 천연성분을 사용하며, 로즈메리 나뭇잎, 버드나무껍질 추출액, 나제 지치 뿌리, 꿀, 당근 등 다양한 천연물이 크림류, 보습류, 립스틱, 향류 등 다양한 화장품에 이용되고 있다.

[0009] 최근, 미국, 유럽, 일본 등 선진국을 중심으로 기능성 미용식품 개발도 활발한데, 이것은 기존의 화장품들과는 달리 피부노화의 억제를 영양적 측면에서 접근하여, 일본 가네바노 시세이도 같은 대형 회사에서는 '뷰티푸드'라는 이름의 브랜드를 선보이고 있다.

[0010] 야채나 과일을 위주로 하는 미용식, 녹차나 허브차 등의 미용차에서 그 원형을 찾아볼 수 있는 신개념의 먹는 화장품은 콜라겐, 포도씨 추출물, 석류 추출물, 실크펩타이드, 베타카로틴 등의 천연물질을 사용해 식용이 가능하도록 하면서도 항산화제나 기타 유효성분의 체내 흡수를 촉진시켜 그 작용을 원활하게 하는 특징을 가지고 있다.

[0011] 일본의 경우 생활습관성 질병의 증가, 고령화 사회 도래, 의료비 자가부담 증가 및 예방지식의 증가로 건강기능성 식품과 더불어 미용 식품 시장이 증가함에 따라 이에 관련된 연구가 증가하고 있다.

[0012] 일본에서 연구된 동물 유래 미용기능소재로는 콜라겐, 히알루론산, 엘라스틴, 플라센타, 콘드로이친 설페이트, 글로쿠사민 등이 있으며, 식물 소재로는 종자 추출액, 비타민 C 등이 연구된 바 있다.

[0013] 또한 일본에서는 월도엽 (月挑葉) 추출물을 이용하여 피부신진대사를 활성화시킴으로써 섬유아세포의 활성화, 엘라스틴 생성촉진과 분해억제에 의한 피부탄성을 향상시키는 제품을 개발 중에 있고, 자현미 (紫玄米) 추출물을 이용하여 섬유아세포의 활성화와 콜라겐 분해 억제에 의한 피부탄성을 향상시키는 제품을 개발 중에 있다.

[0014] 한편, 화장품 개발을 위하여 미백효과를 나타내는 여러 가지 화합물의 대부분이 페놀성 화합물로서 멜라닌 합성 저해제 또는 광보호제로 연구되고 있다. 천연에 존재하는 식물 유래 추출물의 대표적인 화합물은 페놀, 플라보노이드, 쿠마린 계통으로 하이드록시퀴논, 알부틴, 코즈산 등은 세포 독성 또는 발암성 때문에 화장품 원료로서의 사용이 제한되어 있다 (Pigment Cell Res. 19: 550-571).

[0015] 멜라닌 생합성은 티로시나아제 (tyrosinase), 티로신 관련 단백질-1 (tyrosinase related protein-1; TRP-1), 티로신 관련 단백질-2 (TRP-2), 멜라닌 전달과 분해에 관련된 사이토카인 등의 많은 단백질이 관련된 복잡한 과정이므로 (Pigment Cell Res. 17: 96-110; J Invest Dermatol. 122:xxvii-xxix), 티로시나아제 저해제가 새로운 미백제 개발을 위한 지표로 연구되고 있다 (Biol Pharm Bull. 29: 1947-1951; Biosci Biotechnol. Biochem. 67: 631-634).

[0016] 멜라닌 색소 생성에 가장 중요한 역할을 하는 전사인자는 마이크로프탈미아-관련 전사인자 (microphthalmia-associated transcription factor; MITF)로써 색소침착은 물론 흑색종 세포의 증식에도 중요한 역할을 함으로 MITF의 발현을 변화시키는 물질의 개발이 관심을 끌고 있다(Pigment Cell Res. 13: 60-69; 230-240).

- [0017] 플라보노이드 화합물은 식품의 잎, 껍질, 꽃 등에 존재하는 페놀성 화합물로 세포 독성이 낮아 항암, 항염증, 항산화능이 높아 의약품으로 이용되어 왔다. 플라보노이드는 면역조절능과 항산화 효과 외에도 티로시나아제의 저해제로 작용하여 미백효과를 나타내기도 하지만 멜라닌 합성 경로에 작용함으로써 멜라닌 합성을 억제하는 효과가 있다 (J Agric Food Chem. 53: 2009-2014).
- [0018] 레스베라트롤은 티로시나아제의 저해효과 뿐만 아니라 MITF 전사활성을 감소시켜 티로시나아제의 생합성을 억제하는 것으로 보고되고 있다 (J Invest Dermatol. 119: 1330-1340). 최근의 연구에 의하면 285 종의 한약재 추출물의 미백활성을 검색한 결과 2-옥시레스베라트롤을 함유한 뽕나무 (*Morus alba* L.) 추출물이 가장 활성이 높은 것으로 보고되고 있으며, 추출물은 티로시나아제 활성 저해효과가 가장 높으며, 세포 독성이 없는 것으로 나타났다 (J. Cosmet Sci. 54: 133-142).
- [0019] 녹차 중의 EGCG (epigallocatechin gallate)는 티로시나아제의 저해활성 뿐만 아니라 MITF 전사활성을 감소시키는 것으로 확인되었으며 (Arch Pharm Res. 27: 334-339), 포도씨중의 프로시아니딘은 항산화성과 더불어 흑색종 세포에서 멜라닌 합성을 억제하고 있는 것으로 알려져 있다 (J Agric Food Chem. 53: 6105-6111; FEBS Lett. 579: 4219-4225).
- [0020] 화분에 많이 함유되어 있는 에라그산 또한 티로시나아제 저해능이 높아 갈색의 기니피크 피부에 처리한 결과 흑색종 세포에 손상을 주지 않고 멜라닌 합성을 억제하였으며, 경구투여한 경우에도 미백효과를 나타냄으로써 인체에 무해한 미백화장품 개발원으로 주목 받고 있다 (Biosci Biotechnol Biochem. 69: 2368-2373).
- [0021] 쿠마린은 티로시나아제와 직접적으로 결합하여 멜라닌 합성을 저해하며, 알파-토코페롤과 동시에 처리할 경우 활성산소 소거 기작에 의하여 미백 효과가 뛰어난 것으로 보고된 바 있다 (Arch Dermatol Res. 294: 349-354).
- [0022] 알로에로부터 분리된 알로에신은 플라보놀과 유사한 구조를 취하며 티로시나아제의 활성 위치와 결합하여 저해활성을 나타내며, 알로에신의 여러 가지 유도체를 합성하여 티로시나아제 저해능을 분석한 결과 몇몇 화합물은 알부틴이나 코즈산 보다도 강한 티로시나아제 저해능을 나타내었다 (Chem Pharm Bull (Tokyo). 50: 309-311).
- [0023]
- [0024] 90여종의 한약재 추출물의 흑색종 세포를 이용하여 멜라닌 변화량을 측정한 결과 9종의 한약재 추출물이 미백효과가 뛰어난 것으로 보고되고 있으며 그 중에서도 오배자 (*Galla chinensis*)의 물추출 희분과 위령선 (*Radix clematidis*)의 에탄올 추출 희분에서 가장 높은 미백활성이 나타났다 (Biol Pharm Bull. 29: 1947-1951).
- [0025] 용안 (Longan) 씨앗은 코틸라긴, 갈산, 엘라그산과 같은 화합물을 다량 함유하는 것으로 알려져 있으며, 항산화성 뿐만 아니라 티로시나아제 저해능이 높아 미백 화장품 개발을 위한 원료로 활용될 수 있음이 입증되었다 (Food Chem Toxicol (Epub)).
- [0026] 이외에도 다양한 식물로부터 분리된 프레닐화 플라보노이드 (Planta Med. 69: 559-561), 사포닌 (Int J Dermatol. 39: 299-301), 헵타노이드 (Arch Dermatol. Res. 25: 885-888), 그라브리딘 (Biol Pharm Bull. 28: 2216-2219) 등의 화합물을 이용한 미백 효과들이 보고되었다.
- [0027] 해조류 중 특히 다시마는 갈조류에 속하는 다시마과의 한 속으로서 한국, 일본 및 중국 등의 극동 아시아 지역에 서식하며, 독특한 맛과 향으로 기호성이 양호하다 (In Process of 7 th International Seaweed Symposium. ed Univ. Toko Press, Japan. 558-561, 1972). 또한 갈조류 중에는 중성다당인 laminaran과 황산기를 함유한 산성 다당이 다량 함유되어 있으며, 그 대표적인 것이 황황 산성 다당인 fucoidan과 산성 다당인 alginate이며 (J Korean Fish Soc. 1958: 18: 29-36), fucoidan은 heparin과 같은 혈액응고 억제활성 이외에 항암 및 항 AIDS 등의 활성이 있다는 보고가 있다 (Thromb Res. 1991: 64: 143-154). 그리고 해조류는 특히 식이섬유소가 풍부하기 때문에 비만과 관련된 질병의 예방 및 치료제 개발을 위한 연구가 활발히 진행 중에 있다.

[0028] 상기 다시마와 관련하여 대한민국 등록특허 제10-0852203호 "다시마 추출물을 포함하는 항진균 조성물"에는 다시마 추출물을 포함하는 조성물의 항진균 활성을 확인함으로써 비듬증에 대한 개선, 예방 또는 치료와 두피 가려움증 제거 용도를 개시하였으며, 대한민국 등록특허 제10-0861688호 "마사지용 분말"에는 다시마의 건조 분말에 대한 피부 미용 효과가 개시되어 있다.

[0029] 또한, 대한민국 등록특허 제10-0996882호 "미용조성물용 갈조류분말제조방법, 상기 방법으로 제조된 미용조성물용 갈조류분말, 상기 갈조류분말함유 비누조성물 및 상기 비누조성물을 포함하는 화장용 비누"에서는 갈조류 분말에 포함된 생리활성 물질에 의해 보습력과 세정력이 우수한 비누조성물이 개시되어 있으며, 대한민국 등록특허 제10-0964018호 "발효 푸코잔틴 제조법 및 이를 함유하는 화장료 조성물"에서는 다시마 등의 갈조류를 바실러스 섭틸리스 (*Bacillus subtilis*, 고초균)를 이용한 발효를 통해 푸코잔틴을 높은 수율로 습득하고 이를 주요 활성성분으로 함유하는 다기능성 화장료 조성물에 대한 용도가 개시된바 있다.

[0030] 대한민국 등록특허 제10-0851407호 "생약 미용팩 조성물"에서는 건조 다시마가 함유된 미용팩 조성물을 개시하고 있으며, 대한민국 등록특허 제10-0962587호 "천연 식물소재 및 한약재의 발효방법, 상기 방법에 의해서 제조된 발효물 및 이를 함유하는 약학 조성물, 화장품 조성물 및 식품 조성물"에서는 다시마를 누룩 및 유산균을 이용하여 발효시킨 후 이를 이용한 약학, 화장품, 식품 조성물로의 이용에 대한 용도를 개시한 바 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0031] 본 발명자들은 상기와 같은 종래의 기술들을 바탕으로 식물 유래의 기능성 화장품 및 기능성 식품 또는 약학 조성물의 원료를 개발하고자 예의 연구를 거듭한 결과 해조류인 다시마로부터 생리활성 성분을 추출해내어 본 발명에 이르게 되었다.

과제의 해결 수단

[0032] 따라서 본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 완성한 것으로 다시마의 주정 추출물, *n*-헥산 가용 추출물 및 디클로로메탄 가용 추출물이 흑색중세포내 멜라닌 생합성 억제 효과를 규명하는데 그 목적이 있다.

[0033] 본 발명의 다른 목적은 상기 주정 추출물과 특히 멜라닌 생합성 억제 활성이 높은 *n*-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물을 유효성분으로 함유하는 물질의 멜라닌 생합성 억제 효과를 제공하는데 있다.

[0034] 본 발명의 또 다른 목적은 다시마로부터 분리한 상기 가용 추출물을 유효성분으로 하고 화장료로 허용되는 담체를 포함하는 피부 미백용 기능성 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[0035] 본 발명의 또 다른 목적은 다시마로부터 분리한 상기 가용 추출물을 유효성분으로 하고 식품학적으로 허용되는 첨가제를 포함하는 피부 미백용 기능성 식품을 제공하는 것이다.

[0036] 본 발명의 또 다른 목적은 다시마로부터 분리한 상기 가용 추출물을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 피부 미백용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0037] 이상의 설명에서와 같이, 본 발명에 따른 다시마로부터 분리된 주정 추출물 및 *n*-헥산 가용 추출물 또는 디

클로로메탄 가용 추출물은 B16F10 흑색종 세포에서 α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone)로 유도되는 멜라닌 생합성을 억제하는 효과가 있으므로 피부 미백용 화장품 및 기능성 식품, 또는 멜라닌 과생성으로 인한 피부 질환의 치료용 약학 조성물로 사용할 수 있는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0038]

도 1은 본 발명의 다시마 추출물의 추출과정의 흐름도

도 2는 다시마 주정 추출물을 B16F10 흑색종 세포에 처리하여 세포 생존율에 미치는 영향을 확인한 도면

도 3은 다시마 m -핵산 가용 추출물을 B16F10 흑색종 세포에 처리하여 세포 생존율에 미치는 영향을 확인한 도면

도 4는 다시마 디클로로메탄 가용 추출물을 B16F10 흑색종 세포에 처리하여 세포 생존율에 미치는 영향을 확인한 도면

도 5는 다시마 주정 추출물과 α -MSH를 B16F10 흑색종 세포에 처리하여 세포내 멜라닌 생합성에 미치는 영향을 확인한 사진과 도면

도 6은 다시마 주정 추출물과 α -MSH를 B16F10 흑색종 세포에 처리하여 세포내 멜라닌 양을 측정하여 나타낸 도면

도 7은 다시마 m -핵산 가용 추출물과 α -MSH를 B16F10 흑색종 세포에 처리하여 세포내 멜라닌 생합성에 미치는 영향을 확인한 사진

도 8은 다시마 m -핵산 가용 추출물과 α -MSH를 B16F10 흑색종 세포에 처리하여 세포내 멜라닌 양을 측정하여 나타낸 도면

도 9는 다시마 디클로로메탄 가용 추출물과 α -MSH를 B16F10 흑색종 세포에 처리하여 세포내 멜라닌 생합성에 미치는 영향을 확인한 사진

도 10은 다시마 디클로로메탄 가용 추출물과 α -MSH를 B16F10 흑색종 세포에 처리하여 세포내 멜라닌 양을 측정하여 나타낸 도면

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039]

본 발명의 상기 목적은 유기용매를 이용하여 멜라닌 생합성 억제 활성을 가지는 다시마 조추출물을 제조하고, 이로부터 m -핵산 가용추출물과 디클로로메탄 가용추출물을 얻어, 피부세포에서의 멜라닌 생합성 억제 효과를 검증함으로써 달성하였다.

[0040]

본 발명은 다시마 주정 추출물 또는 그로부터 분획된 m -핵산 가용성분 및 디클로로메탄 가용성분 또는 이의 약학 조성물을 제공한다.

[0041]

상기 다시마 추출물은 조추출물 또는 비극성용매 가용 추출물로서, 조추출물은 물, 에탄올, 메탄올, 부탄올과 같은 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 에탄올에 가용한 추출물을 포함하며, 비극성 용매 가용 추출물은 m -핵산, 디클로로메탄, 클로로포름 또는 에틸아세테이트로부터 선택된 비극성용매로, 바람직하게는 m -핵산 또는 디클로로메탄으로 추출한 것을 포함한다.

[0042]

이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0043]

본 발명의 다시마 조추출물 및 비극성용매 가용추출물은 하기와 같이 수득될 수 있다.

[0044]

본 발명의 다시마 조추출물은 다시마를 음지에서 자연건조 후 마쇄하여 분말화한 후, 다시마 건조 중량의 약 3 내지 20배, 바람직하게는 약 3 내지 5배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올 및 부탄올과 같은 저급 알코올 또

는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합용매로, 주정으로 20 내지 100, 바람직하게는 20 내지 70의 추출 온도에서 약 0.5시간 내지 2일, 바람직하게는 1시간 내지 1일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법으로 1회 내지 5회, 바람직하게는 3회 연속 추출하여 수득한 후, 감압여과하고 여액을 진공회전농축기 20 내지 100, 바람직하게는 40 내지 70에서 감압 농축하여 물, 저급알코올 또는 이들의 혼합용매에 가용한 다시마 조추출물을 수득할 수 있다.

[0045] 상기 다시마 조추출물은 물에 현탁한 후, *n*-헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, *n*-부탄올 순으로 용매를 이용하여 추출하여 본 발명의 다시마 비극성용매 가용 추출물, 바람직하게는 *n*-헥산 가용성 분획물을 수득할 수 있고, 더욱 구체적으로는 다시마 조추출물 즉, 다시마 에탄올 추출물에 *n*-헥산:물:에탄올을 일정 비율, 바람직하게는 10:9:1로 혼합하여 *n*-헥산 가용성 분획물 및 물 가용성 분획물을 수득할 수 있고, 다시 상기 물가용성 분획물을 디클로로메탄으로 추출하여 물가용성 분획물 및 디클로로메탄 가용성 분획물을 수득할 수 있으며, 이 물가용성 분획물에 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트 가용성 분획물 및 물가용성 분획물을 수득할 수 있고, 마지막으로 상기 물가용성 분획물을 부탄올로 추출하여 부탄올가용성 분획물과 물가용성 분획물을 수득할 수 있다.(도 1참조)

[0046] 본 발명은 다시마 조추출물 및 비극성용매 가용추출물을 분리하는 방법을 제공한다.

[0047] 본 발명은 상기 방법으로 수득된 다시마 추출물을 함유하는 멜라닌 생합성 억제 활성을 갖는 피부미백용 조성물을 제공한다.

[0048] 상기에서 수득된 다시마 추출물의 멜라닌 생합성 억제에 대한 피부미백용 조성물로써의 효능을 조사하기 위하여, 멜라닌 생합성과 관련된 실험에 사용하는 세포주 중에서 멜라닌 생합성에 있어 아주 특이적인 결과를 보여주는 세포인 B16F10 흑색종세포를 사용하여 α -MSH으로 유도된 멜라닌 생합성 반응에 대한 효과를 측정해 본 결과, 본 발명에 따른 다시마 추출물이 B16F10 흑색종세포의 멜라닌 생합성에 대한 억제 효과가 우수함을 확인하였다.

[0049] 본 발명의 다시마 추출물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0050] 이하 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 좀 더 구체적으로 설명하기로 한다.

[0051] 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범주가 이들 실시예 및 실험예에 국한되는 것은 아니다.

[0052] [실시예 1] 다시마 추출물의 제조

[0053] 본 발명에 사용한 다시마는 부산시 기장군과 전남 완도군에서 양식산을 구입하여 사용하였다. 다시마는 음지에서 자연건조 후 마쇄하여 얻은 분말 3 kg을 주정 10 L에 넣고 70에서 일정시간 간격으로 3회 반복하여 환류냉각 추출한 후 감압 여과한 다음, 여과 추출물은 진공회전농축기로 35에서 주정을 제거한 후 추출된 잔사로서 다시마 조추출물 800 g을 수득하였으며(도 1), 이 중 1 g을 취하여 멜라닌 생합성 저해 활성검색을 위한 시료로 사용하였다.

[0054] 상기에서 얻은 다시마 조추출물 800 g에 *n*-헥산:물:메탄올=10:9:1의 혼합용매 4 L를 가하여 혼합한 후 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 L 및 *n*-헥산 가용성 분획물 2L를 수득하여 시료로 사용하였다.

[0055] 상기에서 얻은 수가용성 분획물 2L에 디클로로메탄 2 L를 가하여 혼합한 후 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 L 및 디클로로메탄 가용성 분획물 2 L를 수득하여 시료로 사용하였다.

[0056] 상기에서 얻은 수가용성 분획물 2 L에 에틸아세테이트 2 L를 가하여 혼합한 후 3~4차례 분획하여 수가용성 분획물 2 L 및 에틸아세테이트 가용성 분획물 2 L를 얻은 후, 이 에틸아세테이트 분획물을 건조하여 에틸아세테이트 가용 추출물 24.99 g을 수득하여 시료로 사용하였다.

[0057] <실험예 1> 다시마 주정추출물 및 *n*-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물의 B16F10 흑색종 세포의 멜라닌 생합성 저해 효과

[0058] 1. 세포독성 실험

[0059] B16F10 흑색종세포에 대한 화합물의 세포독성은 세포의 생존율을 엠티에스 (MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2-H-tetrazolium) 분석 방법으로 측정하여 확인하였다 (Kim et al., J Agric Food Chem, 2009, 57, 3483-3489). 즉, 세포를 일정 시간 배양한 후, MTS 시약을 처리하여 1시간 동안 반응시켜 생성된 보라색 불용성의 포르마잔 (formazan)을 분광광도계 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) reader로 490 nm의 파장 하에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

[0060] 1) 다시마 주정추출물의 세포독성을 확인하기 위하여,

[0061] B16F10 세포주에 10-400 $\mu\text{g/ml}$ 의 주정추출물을 처리한 후, 24 시간 배양하여 세포의 생존율을 측정하였다. 또한, B16F10 세포주에 10-400 $\mu\text{g/ml}$ 의 다시마 주정추출물을 1 시간 동안 처리한 후, 10 nM의 a-MSH를 처리하여 24 시간 배양하여 세포의 생존율을 측정하였다.

[0062] 그 결과는 도 2에 나타난 바와 같이, 10-400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도범위에서 다시마 주정추출물은 B16F10 세포주에 어떠한 세포독성도 나타나지 않았다.

[0063] 2) 다시마 주정추출물의 *n*-헥산 가용 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여,

[0064] B16F10 세포주에 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 *n*-헥산 가용 추출물을 처리한 후, 24 시간 배양하여 세포의 생존율을 측정하였다. 또한, B16F10 세포주에 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 *n*-헥산 가용 추출물을 1 시간 동안 처리한 후, 10 nM의 a-MSH를 처리하여 24 시간 배양하여 세포의 생존율을 측정하였다.

[0065] 그 결과는 도 3에 나타난 바와 같이, 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도범위에서 *n*-헥산 가용 추출물은 B16F10 세포주에 어떠한 세포독성도 나타나지 않았다.

[0066] 3) 다시마 주정추출물의 디클로로메탄 가용 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여,

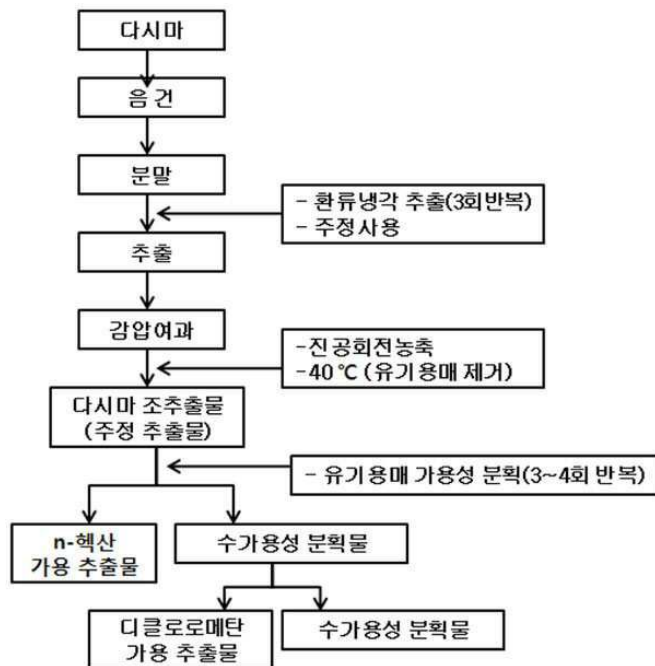
[0067] B16F10 세포주에 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 디클로로메탄 가용 추출물을 처리한 후, 24 시간 배양하여 세포의 생존율을 측정하였다. 또한, B16F10 세포주에 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 디클로로메탄 가용 추출물을 1 시간 동안 처리한 후, 10 nM의 a-MSH를 처리하여 24 시간 배양하여 세포의 생존율을 측정하였다.

- [0068] 그 결과는 도 4에 나타낸 바와 같이, 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도범위에서 디클로로메탄 가용 추출물은 B16F10 세포주에 어떠한 세포독성도 나타나지 않았다.
- [0069] **2. 멜라닌 생합성에 미치는 영향**
- [0070] B16F10 흑색종 세포내 멜라닌 함량은 Hosoi 등이 개발한 방법을 이용하였다. 즉, 세포를 일정시간 배양한 후, 세포를 회수하여 1 N NaOH에 용해시킨 후 60에서 30 분간 동안 가열하였다. 용리물을 5000 x g로 5분간 원심분리한 후, 405 nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다.
- [0071] 1) 다시마 주정추출물이 멜라닌 생합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여,
- [0072] B16F10 세포주에 10-400 $\mu\text{g/ml}$ 의 주정추출물을 처리하고 1 시간 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 72 시간 배양하여 세포내 멜라닌 함량을 측정하였다.
- [0073] 그 결과는 도 5와 6에 나타낸 바와 같이, 다시마 주정추출물은 흑색종 세포내 멜라닌 생합성을 농도 의존적으로 저해시키는 것으로 나타났다.
- [0074] 2) 다시마 주정추출물의 *n*-헥산 가용 추출물이 멜라닌 생합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여,
- [0075] B16F10 세포주에 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 *n*-헥산 가용 추출물을 처리하고 1 시간 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 72 시간 배양하여 세포내 멜라닌 함량을 측정하였다.
- [0076] 그 결과는 도 7과 8에 나타낸 바와 같이, 다시마 *n*-헥산 가용 추출물은 흑색종 세포내 멜라닌 생합성을 농도 의존적으로 저해시키는 것으로 나타났다.
- [0077] 3) 다시마 주정추출물의 디클로로메탄 가용 추출물이 멜라닌 생합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16F10 세포주에 10-100 $\mu\text{g/ml}$ 의 디클로로메탄 가용 추출물을 처리하고 1 시간 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 72 시간 배양하여 세포내 멜라닌 함량을 측정하였다. 그 결과는 도 9와 10에 나타낸 바와 같이, 다시마 디클로로메탄 가용 추출물은 흑색종 세포내 멜라닌 생합성을 농도 의존적으로 저해시키는 것으로 나타났다.
- [0078] 이상의 결과에 따라, 본 발명의 다시마 주정 추출물 및 *n*-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0079] 하기에 상기 화장료 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.
- [0080] [비누 제조]
- [0081] 실시예 1의 다시마의 주정추출물 또는 *n*-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물 1~30 (%)에 유지, 수산화나트륨, 염화나트륨을 적당량과 향료를 소량첨가하여 정제수로 전량을 100으로 하였으며, 상기의 배합비에 의해 비누를 제조하였다.
- [0082] [로션 제조 1]
- [0083] 실시예 1의 다시마의 주정추출물 또는 *n*-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물 3.00 (%), L-아스코르빈산-2-인산마그네슘염 1.00, 수용성 콜라겐 (1 % 수용액) 1.00, 시트르산나트륨 0.10, 시트르산 0.05, 감초 엑기스. 0.20, 1,3-부틸렌글리콜 3.00에 정제수로 전량을 100으로 하였으며, 상기의 배합비에 의해 로션을 제조하였다.

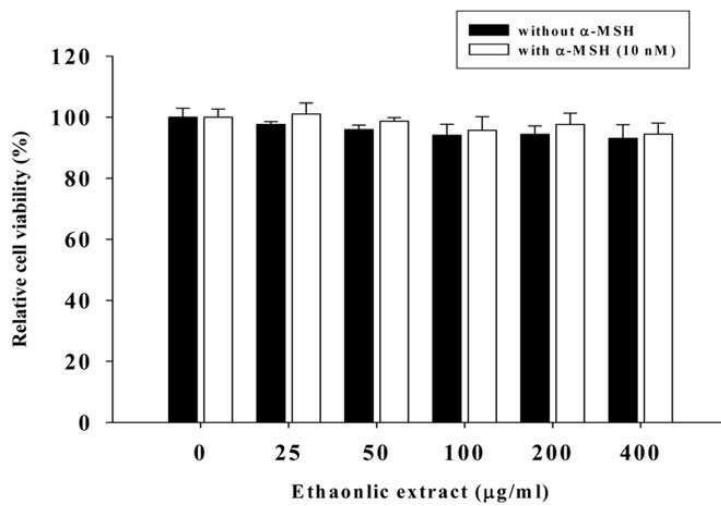
- [0084] [로션 제조 2]
- [0085] 실시예 1의 다시마의 주정추출물 또는 *n*-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물 3.00 (%), L-아스코르빈산-2-인산마그네슘염 1.00, 수용성 콜라겐 (1 % 용액) 1.00, 시트르산나트륨 0.10, 시트르산 0.05, 1,3-부틸렌글리콜 3.00에 정제수로 전량을 100으로 하였으며, 상기의 배합비로 로션을 제조하였다.
- [0086] [로션 제조 3]
- [0087] 실시예 1의 다시마의 주정추출물 또는 *n*-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물 4.00 (%)에 갈조 엑기스 1.00, 시트르산나트륨 0.10, 시트르산 0.05, 1,3-부틸렌글리콜 3.00을 첨가하고 정제수로 전량을 100으로 하였으며, 상기의 배합비(%)로 로션을 제조하였다.
- [0088] [크림 제조]
- [0089] 실시예 1의 다시마의 주정추출물 또는 *n*-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물 1.00(%)에 폴리에틸렌글리콜모노스테알레이트 2.00, 자기유화형모노스테아르산글리세린 5.00, 세틸알코올 4.00, 스쿠알렌 6.00, 트리2-에틸헥산산글리세릴 6.00, 스펅고당지질 1.00, 1,3-부틸렌글리콜 7.00을 첨가하고 정제수로 전량을 100으로 하였으며, 상기의 배합비로 크림을 제조하였다.
- [0090] [팩 제조]
- [0091] 실시예 1의 다시마의 주정추출물 또는 *n*-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물 5.00(%)에폴리비닐알코올 13.00, L-아스코르빈산-2-인산마그네슘염 1.00, 라우로일히드록시프롤린 1.00, 수용성 콜라겐 (1 % 수용액) 2.00, 1,3-부틸렌글리콜 3.00, 에탄올 5.00을 첨가하고 정제수로 전량을 100으로 하였으며, 상기의 배합비로 팩을 제조하였다.
- [0092] [미용액 제조]
- [0093] 실시예 1의 다시마의 주정추출물 또는 *n*-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물 2.00(%)에 히드록시에틸렌셀룰로오스(2 % 수용액) 12.00, 크산탄검(2 % 수용액) 2.00, 1,3-부틸렌글리콜 6.00, 진한 글리세린 4.00, 히알루론산나트륨 (1%수용액) 5.00을 가하고 정제수로 전량을 100으로 하였으며, 상기의 배합비(%)로 미용액을 제조하였다.

도면

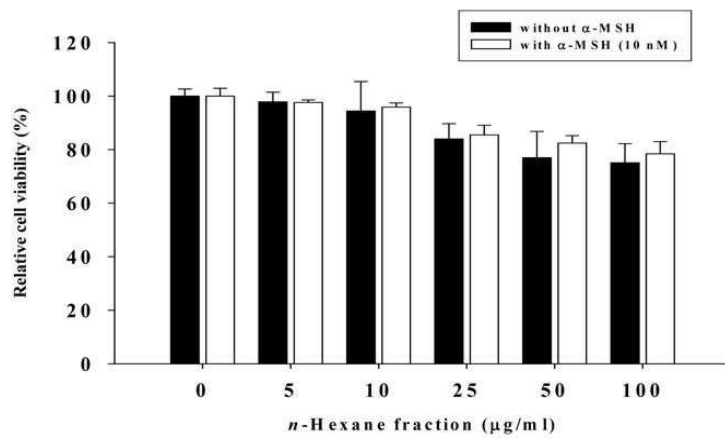
도면1



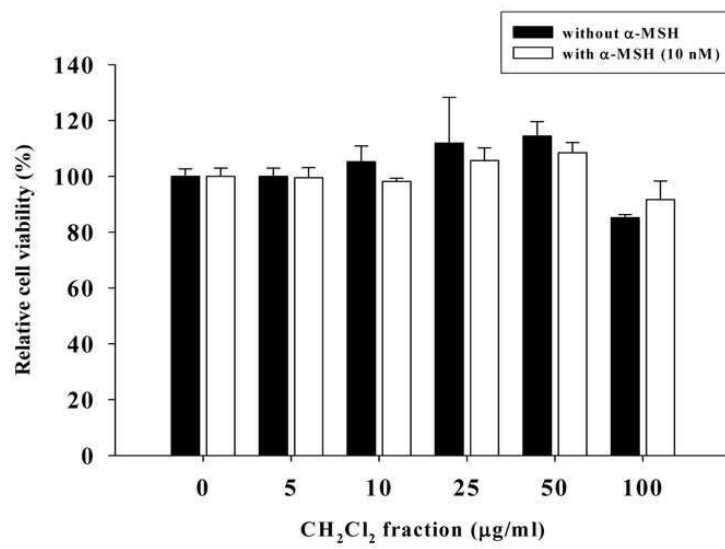
도면2



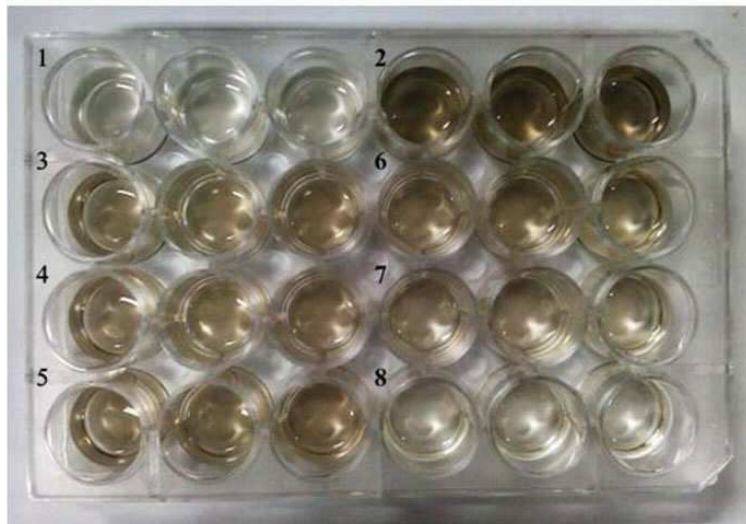
도면3



도면4

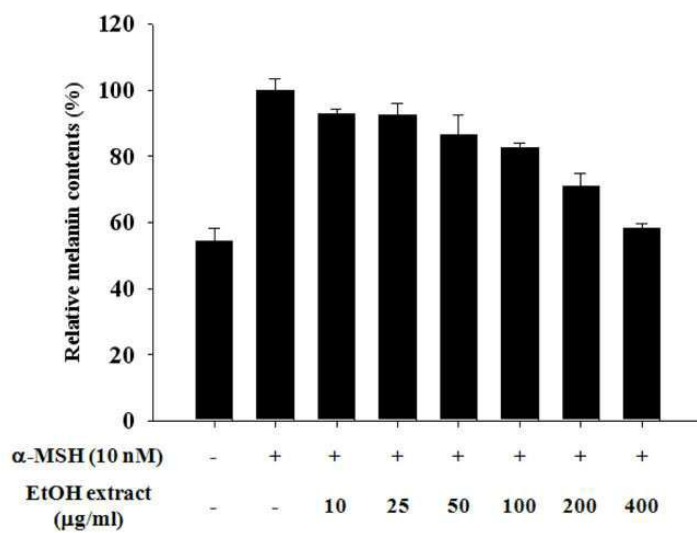


도면5



No.	α -MSH (nM)	Sample (μ g/ml)
1	0	0
2	10	0
3	10	10
4	10	25
5	10	50
6	10	100
7	10	200
8	10	400

도면6

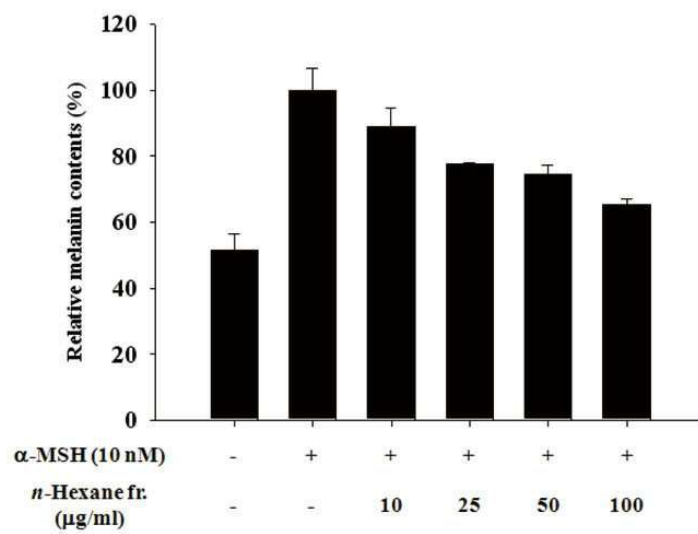


도면7

α -MSH (10 nM)	-	+	+	+	+	+	+
<i>n</i> -Hexane fr. (μ g/ml)	-	-	5	10	25	50	100



도면8



도면9

α -MSH (10 nM)	-	-	+	+	+	+	+
CH_2Cl_2 fr. (μ g/ml)	-	-	5	10	25	50	100



도면10

