

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0080131 (43) 공개일자 2016년07월07일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)		(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(21) 출원번호 10-2014-0191535		(72) 발명자
(22) 출원일자 2014년12월29일		이재용 강원도 춘천시 춘주로 174 그린타운아파트 103-1303
심사청구일자 2014년12월29일		전영은 강원도 원주시 무실로 455 우미린아파트 107-802
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도		(뒷면에 계속)

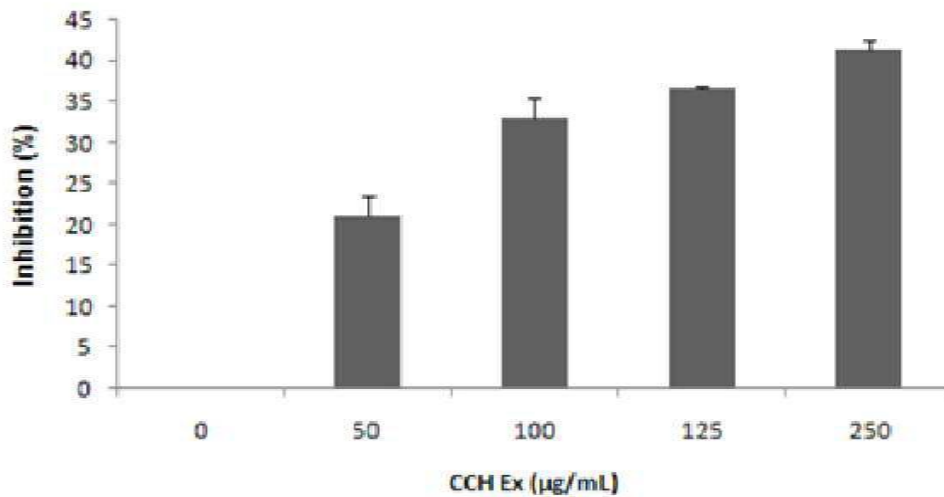
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **충충나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부미백용 화장품 조성물**

(57) 요약

본 발명은 충충나무 추출물을 포함하는 피부 미백용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 충충나무 추출물은 L-DOPA 산화활성저해, tyrosinase 활성저해, 멜라닌 생성저해로 인하여 탁월한 미백효과를 갖는다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최미란

강원도 춘천시 후석로326번길 13 현대2차아파트
201-208

김소미

강원도 춘천시 서부대성로 327 101-1005

최면

강원도 춘천시 동면 만천로 107 한일유엔아아파
트 102-502

명세서

청구범위

청구항 1

층층나무(*Cornus controversa Hemsl*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 층층나무 추출물은, (a) 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 글리세린, 아세톤, 에틸 아세테이트, 클로로포름, 부틸 아세테이트, 디에틸에테르, 디클로로메탄, 헥산 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 추출용매를 이용한 용매 추출법, (b) 초임계 추출법 및 (c) 초음파 추출법 중 선택되는 어느 하나의 추출법을 통해 추출된 것을 특징으로 하는 피부미백용 화장품 조성물

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 층층나무 추출물의 비극성용매 분획물은 상기 층층나무 추출물을 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 글리세린 및 부틸렌글리콜로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나의 비극성 용매로 분획하여 얻어지는 것을 특징으로 하는 층층나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 층층나무 추출물의 극성용매 분획물은 상기 층층나무 추출물을 물 및 n-부탄올로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나의 극성 용매로 분획하여 얻어지는 것을 특징으로 하는 층층나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물

청구항 5

제 1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 층층나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물을 포함하며, 로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 크림, 파운데이션, 에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 및 바디클린저로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나의 제형으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 층층나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 층층나무 추출물을 포함하는 피부 미백용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 층층나무 추출물은 L-DOPA 산화활성저해, tyrosinase 활성저해, 멜라닌 생성저해로 인하여 탁월한 미백효과를 갖는다.

배경 기술

[0002] 피부는 인체를 보호하고, 체온을 조절하며, 감각을 느끼고 미적인 기능도 담당하고 있다 (전국한 의과대학 피부 외과학 교재편찬위원회). 멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할을 하나 과도하게 생성될 경우 피부에 색소가 침착되어 기미, 주근깨를 형성하며, 기미와 주근깨, 피부의 흑화 등 피부 색소 침착은 멜라닌 세포에 의한 멜라닌 합성 증가에서 기인한다 (대한피부과학회, Marmol V. del. et al., 1996). 따라서 멜라닌 합성 억제제를 통해 미백의 효과를 기대할 수 있다 (Kuzumaki T. et al., 1993, Jimboe K. et al., 1997). 이러한 색소 침착 현상을 방지하기 위해서는 멜라닌 생성과정의 일부분을 저해하여 멜라닌의 생성을 감소 시켜야 한다. 현재 tyrosinase 저해제로서 kojic acid와 albutin이 미백제로 많이 사용되나 세포독성, 돌연변이 유발 등의 부작용 등이 보고되고 있다 (Duncan CL et al., 1968). 따라서 피부에 안전하며 미백활성이 높은 천연물질의 개발이 요구되고 있다.

[0003] 본발명에서사용된층층나무(*Cornus controversa Hemsl*)는 한국, 일본, 중국에 산과 골짜기에 분포하는 낙엽교목이다. 생육환경은 물 빠짐이 좋고 토양의 비옥도가 높은 곳에서 자란다. 키는 3-10m이고, 잎은 길이가 5-12cm, 폭이 3-8cm로 표면은 녹색이고 가시가 층층으로 달려서 수평으로 퍼진다. 작은가지는 겨울에 짙은 자홍색으로 물들고, 봄에 가지를 자르면 물이 흐른다. 잎의 양면에는 미세한 털이 있다. 주로 관상용으로 쓰이며, 밀월식물로도 쓰인다. 층층나무에 대한 연구는 다양하게 보고되어 있는데, 층층나무에 대한 기능 연구는 오존 내성 개체의 선발 (Jang et al., 2003), 항염증성 조성물 (재단법인 제주테크노파크), 수액을 포함한 음식의 제조에 관한 특허 (강재식) 및 논문만이 알려져 있을 뿐 미백과 같은 피부미용에 관한 효능에 대해서는 알려진 바가 없다. 이에 본 발명자들은 천연물에서 피부미백과 관련하여 tyrosinase 활성억제와 멜라닌생성을 억제하는 물질을 확인하던 중 층층나무 추출물이 우수한 미백효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 부작용이 적은 천연 소재인 층층나무 추출물을 이용한 피부 미백용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 좀 더 구체적으로, 층층나무 추출물을 이용하여 L-DOPA 산화 활성 저해 시험, tyrosinase 활성 저해 시험, 멜라닌 생성저해시험을 통하여 피부미백 효능이 우수한 조성물을 제조함으로써, 천연 추출물로 이루어진 인체에 무해하고 안전성이 우수한 피부미백 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 층층나무로부터 수득한 추출물을 피부미백과 관련된 L-DOPA 산화 활성, tyrosinase 활성 및 멜라닌 생성저해에 대한 효과를 입증하여 층층나무 추출물이 피부미백에 효능이 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였으며, 상기 목적을 달성하기 위해 층층나무 추출물은 하기와 같은 방법으로 수득할 수 있다.

[0006] 건조된 층층나무 분쇄물의 중량을 기준으로 1 내지 10배의 추출용매를 가하여 열수추출, 냉침추출, 환류냉각추출 또는 상온추출 등의 방법으로 추출하며, 추출공정을 통하여 추출된 추출액은 진공 감압농축에 의해 추출용매를 제거한 후 건조시켜 분말상의 층층나무 추출물을 수득하는 것으로 이루어지며, 이후 분말상의 층층나무 추출물에 유기용매를 가하여 분획하여 분획물 형태로 제조할 수도 있다.

[0007] 상기한 추출용매로는 물을 사용하거나 메탄올, 에탄올, 부탄올 또는 이소프로판올 등과 같은 탄소수가 1 내지 5인 저급알코올 중에서 선택된 하나 이상인 것을 사용할 수 있다.

[0008] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 상기 층층나무 추출물은, 바람직하게 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 0.001~30.0중량% 함유되는 것이 좋다. 가장 바람직하게는 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 0.01~10중량% 함유되는 것이 좋다. 상기 추출물의 함량이 0.001중량% 미만인 경우에는 피부 미백 개선 효과가 나타나지 않으며, 30.0중량%를 초과하는 경우에는 함유량 증가에 대한 피부 미백 개선 효과 증대 정도가 미미하고, 제형상의 안전 및 안정성에 문제가 있으며, 경제적이지 않다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 층층나무 추출물을 함유하는 조성물로 피부미백과 관련된 L-DOPA 산화 활성, tyrosinase 활성 및 멜라닌 생성저해에 대한 효과를 입증하여 층층나무 추출물이 피부미백에 효과적으로 작용하기 때문에 층층나무 추출물을 유효성분으로 하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 L-DOPA 산화활성저해시험을 나타낸 도이다.

도 2는 *in vitro* tyrosinase 활성저해시험을 나타낸 도이다.

도 3은 세포내의 멜라닌 생성저해 효과 실험을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 시료제조 예

[0012] 본 연구에서 사용된 층층나무(CCH Ex) 메탄을 추출물은 한국생명공학연구원의 한국식물추출물은행(대전)에서 구입한 시료를 사용하였다.

[0013] 실시예 1. L-DOPA 산화활성저해 시험

[0014] 이 시험방법은 멜라닌 합성과정의 속도결정단계를 촉매 하는 타이로시나제의 DOPA 산화반응에 대한 활성저해를 측정하여 미백 성분의 효과를 평가하는 방법이다.

[0015] 시료를 DMSO에 녹이고 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)에 희석하여 DOPA 산화반응에 대한 활성을 억제하기 위한 적당한 농도 범위로 희석한 것을 시료 액으로 하였다. 96 well plate에 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 187.5 l와 0, 50, 100, 125, 250 g/ml 농도로 희석 한 시료 액을 넣었다. 그리고 2000 unit/mL mushroom tyrosinase 10 l를 순서대로 넣고 10 mM L-DOPA 10 L을 넣은 다음 37에서 10-15분 동안 반응시켰다. 그리고 이것을 ELISA reader를 이용하여 475nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시료액으로 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)를 사용하였다.

[0016] 실시예 2. *In vitro* tyrosinase 활성저해시험

[0017] 타이로시나제는 인체 내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도결정단계에 관여하는 효소로서 많은 미백성분이 이 효소를 억제하는 작용기전을 가지고 있다. 이 시험은 시험관 내에서 타이로시나제 효소의 활성을 저해하는 정도를 평가하는 방법이다.

[0018] 시료를 DMSO에 녹여 타이로시나제 활성을 억제하기 위한 적당한 농도범위로 희석한 것을 시료액으로 하였다. 96 well plate에 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) 187.5 L와 0, 50, 100, 125, 250 g/mL농도로 희석한 시료 액을 넣었다. 그리고 2000 unit/mL mushroom tyrosinase 10 L를 순서대로 넣는다. 이 용액에 1.5 mM L-tyrosine 10 L를 넣고 37에서 10-15분 동안 반응시켰다. 그리고 이것을 ELISA reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시료액으로 0.1 M phosphate buffer(pH6.5)를 사용하였다.

[0019] 실시예 3. 세포내의 멜라닌 생성저해시험

[0020] 이 시험 방법은 멜라닌을 만들어 내는 B16F10 세포의 배양 시 세포내의 멜라닌 생성을 시료가 저해하는지 대조군과 비교하여 미백효능을 평가하는 방법이다. 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 60mm dish에 접종한 후 5% CO₂, 37에서 배양하였다. 배양 후 배지를 제거 하고 시료가 적당 농도로 희석된 배지로 교체한 후 5% CO₂, 37에서 72시간 배양하였다. 시료의 농도범위는 MTT를 이용한 독성실험을 통하여 결정하였다. 배지를 제거한 세포를 PBS (phosphated buffer saline)로 세척하고, 이것을 트립신으로 처리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 세포수를 측정한 후 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 다음 상등 액을 제거하여 pellet을 얻었다. 이 세포 pellet은 60에서 건조한 후 10% DMSO가 함유 된 1 M NaOH를 넣어 60 항온조에서 세포내 멜라닌을 얻었다. 이것을 microplate reader로 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0021] 층층나무 추출물이 피부 미백에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 L-DOPA 산화활성저해, tyrosinase 활성저해, 세포내의 멜라닌 생성저해 효과 등을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

[0022] (1) L-DOPA 산화활성저해 시험

[0023] 층층나무 추출물이 피부 미백에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 L-DOPA 산화활성저해 실험을 하였다 (도 1). L-DOPA 산화활성저해 시험에서 50 g/mL 농도의 층층나무 추출물을 처리했을 때 21%의 저해율을 보였고, 100, 125,

250 g/mL 농도의 층층나무 추출물을 처리했을 때는 33, 37, 41%로 농도 의존적인 저해율을 보였다.

(2) *In vitro* tyrosinase 활성저해시험

Tyrosinase 저해제는 미백화장품의 주요 기능성 성분으로서 임상적으로 피부암과 과색소 침착에 관련되는 피부 병 치료에 유효한 것으로 알려져 있다. 우선 *in vitro* 상에서 mushroom tyrosinase를 이용하여 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정한 결과, 층층나무 추출물 50 g/mL 농도로 처리했을 때 52%의 저해율을 보였다. 또한, 100, 125, 250 g/mL 농도의 층층나무 추출물을 처리했을 때 각각 59, 62, 67%의 농도 의존적인 저해율을 보였다.

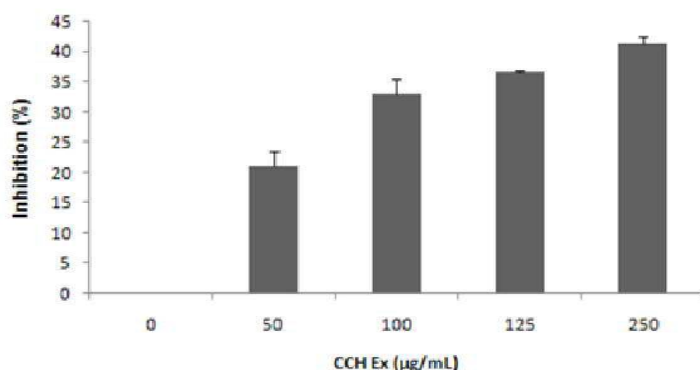
(3) 세포내의 멜라닌 생성저해시험

멜라닌은 피부 내 기저층에 존재하는 색소 세포인 멜라노사이트에서 합성되는 검은 색소로서 외부 환경에 대해 피부세포를 보호해주는 역할을 하는 단백질 복합체이다. 자외선 노출 등의 외부자극에 대한 방어 기작으로 세포 내 멜라닌 생성이 증가되면, 기미, 주근깨, 점, 검버섯 등의 색소침착이 일어나 피부노화 및 손상을 초래하고, 심한 경우 흑색종까지도 유발시키는 것으로 알려져 있다. 멜라닌 합성 과정의 주요 효소인 tyrosinase는 L-tyrosine으로부터 L-3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA)가 합성되는 단계와 L-DOPA로부터 DOPA quinone이 합성되는 단계를 촉진하여 멜라닌의 합성을 촉진하게 된다. 이에 본 발명에서는 층층나무 추출물을 가지고 세포 내의 멜라닌 생성 저해 여부를 확인하였다(도 3). 세포내의 멜라닌 생성 저해 시험에서 대조군의 멜라닌 수치를 100%로 기준하였을 때, 5 g/mL 농도의 층층나무 추출물을 처리한 군에서는 87%의 멜라닌 생성저해값을 나타내었고, 10, 20, 40 g/mL 농도의 층층나무 추출물을 처리한 군에서는 각각 87, 76, 64%의 멜라닌 생성 저해값을 보였다.

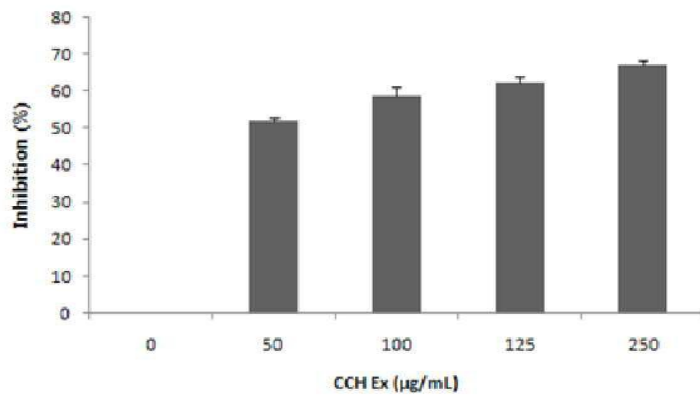
천연물로부터 안전하고 독성이 없는 새로운 미백 소재를 개발하기 위하여 층층나무 추출물의 L-DOPA 산화활성 저해, tyrosinase 활성 억제 및 멜라닌 생성 억제효과를 조사하였다. 그 결과 L-DOPA 산화활성 저해 실험에서 50~250 g/mL에서 약 20~41%의 농도 의존적인 산화 활성저해효과가 있음을 확인하였으며, mushroom tyrosinase 활성 실험에서는 50 g/mL에서 50% 이상의 생성 저해효과와 농도 의존적인 저해율을 나타내었다. 또한 B16F10 세포를 이용하는 멜라닌 생성 저해 시험을 한 결과, 5 g/mL 농도에서 87%의 멜라닌 생성을 저해함을 나타내어 본 발명에 사용된 층층나무 추출물은 미백관련 기능성 소재로서의 활용가치가 있음을 보여주며 이에 본 발명을 완성하였다.

도면

도면1



도면2



도면3

