



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월17일

(11) 등록번호 10-1503211

(24) 등록일자 2015년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/896 (2006.01) A61K 36/484 (2006.01)

A61K 36/232 (2006.01) A61P 17/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0006994

(22) 출원일자 2014년01월21일

심사청구일자 2014년01월21일

(56) 선행기술조사문헌

KR101183139 B1

KR101017709 B1

KR1020110138776 A

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(73) 특허권자

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

강일준

강원도 춘천시 퇴계로 168 주공2차아파트 209-403

임순성

강원도 춘천시 후석로 325 포스코더샵아파트

105-301

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 8 항

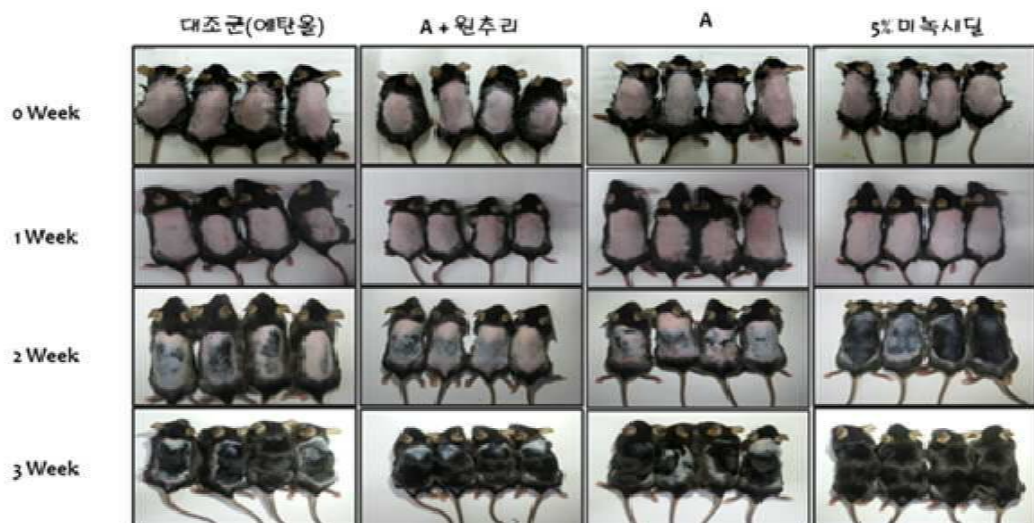
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 발모 활성화 효능을 가지는 원추리추출물과 이를 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 추출물을 함유하는 발모활성화 효능을 갖는 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시 예에서, 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 각 성분의 중량비는 2.5:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1 이다. 또한, 본 발명은 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물로부터 유효한 추출물을 얻는 새로운 제조방법을 제공함을 목적으로 한다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

윤광섭

대구광역시 수성구 청수로 213 캐슬골드파크
1304-2401

장재만

강원도 춘천시 퇴계로 242 퇴계주공4단지아파트
405-1103

강범구

강원도 춘천시 퇴계로 167 주공1차아파트 211-1105

이수경

강원도 춘천시 후석로 동아아파트 102-601

황파

강원도 춘천시 한림대학길 1 생명과학관 5층 8510
호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 B0008864

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 지역혁신센터조성사업(RIC)

연구과제명 식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2013.03.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 추출물을 유효성분으로 함유하는 발모 촉진 및 탈모 방지용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 각 성분의 중량비가 2.5:1:1:1:1:1:1:1:1:1임을 특징으로 하는 발모 촉진 및 탈모 방지용 조성물.

청구항 3

제1항에 따른 조성물을 제조하는 방법에 있어서,

생약 복합물에 탄소수 1 내지 5의 저급 알코올을 가하여 추출하는 단계; 및 추출액을 농축하여 감압 농축하는 단계를 포함하는 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

저급 알코올이 에탄올인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서,

에탄올이 30%(v/v) 에탄올인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 추출하는 단계가 2회 이상 수행되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 감압 농축하는 단계 이후에 농축액을 분획하는 단계, 동결 건조하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물이 헤어토닉, 모발 영양화장수, 스칼프트리트먼트, 헤어트리트먼트, 헤어린스, 헤어샴푸 및 헤어로션으로 이루어진 군으로부터 선택된 제형임을 특징으로 하는 발모 촉진 및 탈모 방지용 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 발모활성화 효능을 갖는 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 추출물을 유효 성분으로 함유하는 발모 촉진 및 탈모 방지용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 머리카락은 건강을 나타내는 중요한 척도로 건강이 나빠졌을 때는 머리카락이 거칠어지거나 빠지는 등의 현상이 나타난다. 정상적인 모발의 성장기로는 생장기 (anagen), 퇴행기(catagen), 휴지기 (telogen), 탈모기(exogen)의 주기적인 변화를 하면서 생성, 소멸을 반복한다. 모발을 구성하는 기본 성분으로는 18종의 아미노산으로 구성된 90% 케라틴과 10% 정도의 수분으로 이루어져 있으며, 머리카락은 하루에 대개 50~100개 정도가 정상적으로 빠지며 빠진 자리에는 새로운 모발이 형성되게 된다.
- [0003] 탈모는 머리카락이 새로 나는 숫자보다 빠지는 숫자가 많은 상태를 말하며 원인으로는 유전적 요인과 남성호르몬의 과다, 정신적 스트레스, 혈액순환 및 영양장애, 내분비장애, 노화, 자가면역질환, 환경오염, 식생활 패턴의 서구화(고지방식), 염색 등으로 인하여 급격하게 탈모가 증가하고 있다.
- [0004] 유전적 요인에 의한 탈모의 유전자 발현에는 남성호르몬이 관여한다. 남성 호르몬의 하나인 테스토스테론(testosterone)은 5 알파-리덕타아제 (5 α -reductase)라는 효소에 의해서 활성형 남성 호르몬인 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone)으로 전환된다. 5 알파-리덕타아제 (5 α -reductase)는 모근에 존재하며 디하이드로테스토스테론이 모낭의 생장기를 단축시키고 모낭의 크기도 감소시키는 역할을 한다. 즉, 굵고 검은 머리카락이 충분히 자라지 못하고 점점 가늘어지고 힘이 없어지면서 정상보다 훨씬 빨리 빠지도록 작용하고, 헤어 사이클을 단축시키기 때문에 처음에는 머리카락이 힘이 없고 가늘어지다 점차로 머리가 빠지고 새로 나지 않게 된다.
- [0005] 또한, 두피의 기저부에서는 끊임없이 세포분열이 일어나 점차 피부표면으로 밀려가면서 각화하여 두피의 제일 바깥쪽에 각질층을 형성하게 되는데 이는 시간이 지나면 표피가 떨어져 나가 비듬을 형성하게 된다. 이 비듬이 피지선에서 나오는 피지와 혼합하여 지루가 되는데, 이것이 모공을 막아 영양장애와 위축작용을 일으키면서 머리카락이 빠지게 된다. 그러나 지루 자체 역시 남성 호르몬 작용에 의한 이차적인 현상이며, 지루 자체가 탈모의 원인은 아니다. 즉 남성호르몬은 머리카락은 가늘게 하지만 피지선은 비대시켜 피지의 분비를 증가시킨다. 피지선이 비대해지고 기능이 활발해지면, 머리의 표면에 잔비듬이 많아지고 5 알파-리덕타아제 (5 α -reductase)의 분비도 늘어나 모발의 발육과 성장에 영향을 주게 된다.
- [0006] 원형탈모증은, 반상 또는 융합성의 탈모가 두피나 몸에 발생하며 국소적으로 나타나는 경우가 많으나 전두탈모증(전 두피의 털 소실), 범발성 탈모증(전신의 털 소실)과 같이 나타나는 경우도 있다. 원형탈모증에서 두피는 정상으로 보이며 탈모 부위의 가장자리에서는 근위부가 가늘고 원위부의 끊어진 부위는 굵고 색이 진하며 짧게 부러져 있는 감탄부호모발을 관찰할 수 있다. 원형탈모증은 국소적으로 탈모반이 발생한 경우 4-6주 간격으로 스테로이드를 병변내 주입하거나 국소 또는 전신적인 스테로이드 사용이 필요한 경우도 있다. 다른 치료 방법에 반응하지 않는 원형탈모증, 광범위한 원형탈모증의 경우에는 면역요법을 사용할 수 있다.
- [0007] 안드로겐탈모증은, 남자와 여자 모두의 약 50%에서 발생하며 30~40대에 시작하는 경우가 흔하지만 사춘기 직후에 시작되기도 한다. 주로 두정부에서 시작하여 점차 머리 전체로 진행하며, 남자에서는 양측 측두부 모발선의 후퇴와 정수리의 탈모가 주로 나타난다. 안드로겐(androgen)탈모증에서는 국소 요법으로 미녹시딜(미녹시딜) 2~5% 용액을 사용하거나 여성 안드로겐탈모증에서는 경구 피임약을 사용하는 경우도 있다. 남성 안드로겐탈모증에서는 피나스테라이드(finasteride)를 사용하며 1년이 지난 뒤 약 50%의 환자에서 발모가 증가한다고 알려져 있다.
- [0008] 이외에도 수술적 요법인 모발 이식과, 세정용 샴푸 등의 국·내외의 특허기술에 의하면 천연생약초를 혼합·배합시킨 발모촉진제 및 그 제조방법들이 다양하게 제안되어 있다.
- [0009] 그러나 지금까지 알려진 수많은 발모촉진제 및 그 방법들이 소개되어 있으나, 환자들의 모발이 획기적으로 촉진되어 재생되고 장기적으로 탈모가 예방되었다는 보고는 전혀 없다. 앞서 언급된, 탈모환자의 병변내 주입용 스테로이드나 미녹시딜 및 경구용 피임약을 장기간 사용하거나 복용하는 경우 소수에서 여성형 유방이 나타나기도 하고, 피나스테라이드에 대한 FDA의 7년간의 임상실험 결과에 의하면 전립선암 진단률 자체는 낮게 나타났지만 악성도가 높은 데다 한층 강한 공격성을 띄는 고등급(high-grade) 전립선암 발생률은 증가할 수 있다고 한다. 약을 끊게 되면 3-6개월 후부터 다시 점차 탈모가 진행되므로 가능한 한 오랫동안 약을 복용하는 것이 요구되므로 그에 따른 부작용도 여전히 문제점으로 남아 있다.
- [0010] 대한민국 등록특허 제10-0581316호에서는 충을자, 감송향, 감국, 도인, 산수유, 토사자, 오미자, 백출, 솔잎과 당귀의 수증 한약재 혼합 추출액을 함유하는 탈모방지 및 발모촉진 조성물에 대해 언급하고 있고 대한민국 등록특허 제 10-1310970 호에서는 황련, 황백, 황금, 황정, 황기, 백지, 야국화, 감초, 및 생강이 혼합 추출되어 제

조되거나, 또는 고과, 발아 서목태, 측백엽, 당삼, 당귀, 블루베리, 상백피, 한련초, 옥잠화, 지황, 홍삼, 하수오, 목단피, 형개, 우방자 및 방풍이 혼합추출 되어 제조된 조성물에 대하여 언급하고 있으며, 대한민국 등록특허 제10-0609210호에서는 당귀뿌리와 우영뿌리의 에탄올 추출물을 함유함으로써 당귀 뿌리의 베타시토스테롤 성분에 의한 5-알파 환원효소의 억제 효과와 우영뿌리의 이눌린 성분에 의한 혈류개선 효과로 탈모방지 효과를 가지는 탈모방지 샴푸 조성물에 대해 언급하고 있다.

[0011] 그러나 이와 같은 사례 중 많은 경우가 임상적으로 나타나는 탈모 방지 효과의 작용 기작을 명확하게 규명할 수 없는 경우가 많으며, 본 발명의 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 추출물에 대한 모유두 세포 증식, 혈행 촉진효과 및 두피 항상화 효과에 대해서는 아직까지 알려진바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 추출물을 함유하는 발모활성화 효능을 갖는 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다

[0013] 본 발명의 일 실시예에서, 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 각 성분의 중량비는 2.5:1:1:1:1:1:1:1:1:1 이다.

[0014] 또한, 본 발명은 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물로부터 유효한 추출물을 얻는 새로운 제조방법을 제공함을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는 본 발명은 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 추출물을 함유하는 발모 활성화 효능을 갖는 조성물을 제공한다.

[0016] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 사용되는 상기 원추리(*Hemerocallis fulva* L)는 원추리과 원추리속의 여러해살이풀의 총칭으로 긴 꽃통이 있고, 백합과 비슷한 꽃이 피는 여러해살이풀이다. 잎은 선형이고 두 줄로 어긋나며 뒷부분은 활처럼 뒤로 휘어진다. 어린순은 나물로 하고, 왕원추리의 말린 꽃은 중국 요리에 쓰인다. 또 뿌리는 이뇨제·지혈제·소염제로 쓰인다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 사용되는 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fischer)는, 콩과의 다년생 초본으로 키는 30~80cm로 직립하고, 기부는 목질화하며 가지가 많고 껍질이 얇고 붉은 빛을 띤다. 다른 약의 작용을 순하게 하며, 간장에서 해독작용을 하기 때문에 간장 기능을 회복시키고 특히 리퀴리틴(Liquiritin), 리퀴리티게닌(Liquiritigenin) 등의 성분은 소화성 궤양의 발생을 억제하여 새치와 탈모를 방지한다. 상기 감초는 감초의 주성분과 효능을 살펴보면, 먼저 주성분은 글리시리진산(glycyrrhizic acid)이며, 그 밖에 글리브리딘(glabridin), 사포나레틴(saponaretin) 플라보노이드(flavonoid)인 리쿠라시드, 플라보노이드(flavonoid), 트리펜계 사포닌(saponin) 등이 함유되어 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 사용되는 당귀는 신갈채의 뿌리를 한방에서 이르는 말이며 두피의 혈행을 개선시킨다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 사용되는 창포는 습지에서 자라는 다년생초이다. 지방에 따라 췌피, 췌피풀이라 하고, 한자로는 백창(白苳), 취창(臭苳), 수창포(水苳浦), 이창(泥苳)이라 한다. 창포는 예로부터 여인들이 좋아했던 자생 수초이다. 홍석모(洪錫謨)의 《동국세시기(東國歲時記)》에는 단옷날에 창포가 여인들의 모발 세정제로 쓰였다는 것을 기술하고 있다. 창포는 근경을 비롯하여 잎과 뿌리 등 전체에 방향성 물질을 갖고 있다. 창포를 삶으면 향기로운 물이 우리나라와 목욕물로 사용하게 되는데 이때 쑥이나 당귀 뿌리를 함께 삶기도 한다. 모두 방향물질을 갖고 있다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 사용되는 천궁(*Cnidium officinale*)은, 천궁은 산형과(Apiaceae)에 속하는 다년생초로, 다소 매운 맛을 가지고 있으며 따뜻한 성질을 가지고 있다. 동의보감에 의하면, "천궁은 두통을 치료하는 데 없어서는 안 되며, 그러므로 정수리와 뇌가 아플 때에는 모름지기 천궁을 써야 한다"라고 하였다. 즉, 체내에서 혈액이 잘 돌지 못하면 두통, 어지럼증, 월경부조, 월경통, 부월경, 복통 등 여러 가지 증상이 생

기는데 천궁은 이러한 증상을 개선시켜 준다.

- [0022] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 사용되는 상기 인삼(人蔘)은 두릅나무과의 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 뿌리로서 가는 뿌리와 코르크 층을 제거한 것을 말한다. 생김새는 가늘고 긴 원주형이나 방추형으로 2~5개의 결뿌리가 나 있고 바깥 면은 옅은 황갈색이며 세로주름과 가는 뿌리 자국이 있다. 다량의 사포닌 등의 유익성분들이 함유되어 있는 홍삼은 모발 및 두피를 촉촉하고 부드럽게 하면서 항균작용 등에 의해 건강한 모발과 두피를 유지하게 하며, 환경호르몬(특히 다이옥신)의 독성을 예방하고 혈액순환을 촉진시키며 면역기능을 높여주어 노화방지에 효과적이고, 상처치유 뿐만 아니라 염증치료에 탁월한 효능을 발휘하는 것으로 알려져 있다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 사용되는 녹차(*Green tea / Thea sinensis* Linnaeus)는 차나무과(Theaceae)에 속하는 상록 교목 또는 관목이다. 녹차에서 발견되는 폴리페놀 성분은 플라보놀과 카테킨 성분으로 알려져 있으며, 항산화, 항암, 항염증, 항균 등의 다양한 효능 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있어, 화장품 원료로서도 많이 이용이 되고 있다. 최근에는 두피에 사용하여 두피의 민감성을 완화시켜 주고, 비듬을 예방하며, 탈모 유발 호르몬 생성을 억제하는 효과가 보고된 바 있다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 사용되는 도인은 장미과의 복숭아나무(*Prunus persica* Batsch) 또는 산복사(*Prunus persica* Franchet var. *daurica* Maximowicz)의 씨로 만든 약재(한국, 일본)이다. 약리작용으로 혈관확장작용, 혈류량증가, 자궁수축 및 자궁지혈작용 촉진, 배변작용, 항염증작용, 진해작용, 진통작용, 항알레르기작용, 항종양작용 등이 보고되었다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 사용되는 단삼(丹蔘)은 *Salvia miltiorrhiza* Bunge의 뿌리로 만든 약재(한국, 중국)이며 분마초(奔馬草)라는 이름으로 부르기도 하였다. 혈액순환을 돕고, 어혈을 제거하며 사지관절 동통을 완화시킨다. 부인의 생리불순, 생리통, 산후복통, 어혈성심 복부통, 타박상 등을 치료한다. 약리작용은 관상동맥 확장, 콜레스테롤 강하, 혈압 강하, 간기능 활성화, 진정 항염, 항암, 항균작용이 보고되었다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 사용되는 산초는 운향과의 초피나무(*Zanthoxylum piperitum* De Candolle) 또는 동속 식물의 과피로서 씨를 최대한 제거하여 만든 약재이다. 복부의 찬 기운으로 인한 복통, 설사와 치통 등에 사용되며, 국소마취작용 등이 보고되었다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물에 사용되는 홍화는 높이는 1m 정도이며, 꽃은 7월과 8월경에 노란색으로 피며, 모양이 엉겅퀴와 같으나 시간이 지나면 붉은색으로 된다. 주로 심장과 간에 작용하여 온 몸의 혈액순환을 돕고 어혈을 풀어주는 동시에 통증을 완화시키는 효능이 있어서 내과, 부인과, 외과를 막론하고 어혈에 사용하는 약재이다.
- [0028] 본 발명의 생약 복합물의 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 일 예로 생약 복합물의 각 성분의 꽃, 잎, 가지, 뿌리, 열매 또는 껍질이나 이의 분쇄물에 추출용매를 가함으로써 제조하거나 추출용매로 추출하여 제조한 조추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조된 것일 수 있다.
- [0029] 상기 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 상기 알코올 회석수 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있다. 상기 탄소수 1 내지 5의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 알코올 회석수는 알코올을 50 내지 99.9%(v/v)로 물에 희석한 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 추출물을 얻기 위해 사용된 추출용매는 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올, 알코올 회석수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 가장 바람직하게는 30 내지 99% 에탄올 수용액 또는 주정일 수 있다. 상기 추출과정은 일 예로, 4℃ 내지 120℃, 또는 50℃ 내지 90℃, 또는 70℃ 내지 85℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 추출시간은 특별히 한정되지는 않으나, 10분 내지 12시간, 바람직하게는 1시간 내지 6시간일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 생약 복합물의 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 구체적으로는 냉침추출법, 온침추출법, 열 추출법, 초음파 추출법 등일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.
- [0032] 또한, 상기 용매로 추출한 추출물은 이후, 헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로로포름, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 분획과정을 더욱 실시할 수 있

다. 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있다. 또한, 상기 분획과정은 일 예로, 4℃ 내지 120℃, 또는 50℃ 내지 90℃, 또는 70℃ 내지 85℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0033] 상기 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 감압 농축기, 일 예로 회전 증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있으며, 상기 건조는 일 예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.

[0034] 본 발명의 발모 촉진 및 탈모 방지용 조성물은 제형화 하는데 있어서 특별히 한정되는 바가 없으나, 헤어토닉, 모발 영양화장수, 스칼프트리트먼트, 헤어트리트먼트, 헤어샴푸, 헤어로션 등의 제형을 갖는 화장품 조성물일 수 있다. 또한, 각각의 제형에 있어서 상기한 필수성분 이외에 다른 성분들은 기타 외용제의 종류 또는 사용목적 등에 따라 당업자가 어려움 없이 적합하게 선정하여 배합할 수 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 추출물은, 모두두 세포 증식에 탁월한 효능이 있으며 두피 및 모근 주위의 혈액순환이 개선되어 탈모가 방지됨과 동시에 두피가 건강하게 유지될 수 있으며 모발에 영양분이 제공되어 발모가 촉진되는 탁월한 효과가 있다.

[0036] 또한, 본 발명은 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물로부터 유효한 추출물을 얻는 새로운 제조방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 모두두 세포(HHDCP)를 이용한 세포 증식을 나타낸 그래프이다.

도 2는 C57BL/6 마우스를 이용한 모발 성장 효과를 나타낸 사진이다.

도 3은 모낭조직 활성화 효과를 나타낸 것이다.

도 4a는 모두두 세포(HHDCP)를 이용한 알티-피시알을 나타낸 그림이다.

도 4b는 모두두 세포(HHDCP)를 이용한 웨스턴 블롯을 나타낸 그림이다.

도 5a는 C57BL/6 마우스를 이용한 모발 성장 시험을 통해 얻은 피부 조직을 이용한 알티-피시알을 나타낸 그림이다.

도 5b는 C57BL/6 마우스를 이용한 모발 성장 시험을 통해 얻은 피부 조직을 이용한 웨스턴 블롯을 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하 실시예에 의해 본 발명을 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0039] 실험예 1. 시료의 제조

[0040] 생약 복합물(감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화 각 20g)에 원추리 50g을 곱게 분쇄하여 제조한 11개 복합 시료 250 g에 30% 주정, 2000 ml 넣고 환류시켜 2시간 동안 추출하였다. 제조된 추출물을 감압회전농축기(Eyela N-1000, Tokyo, Japan)로 감압농축하고 동결건조하여 추출물을 얻었다. (원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 각 성분의 중량비는 2.5:1:1:1:1:1:1:1:1:1 이다.)

[0041] 실험예 2. 테스토스테론 5- α -리덕타아제 효소조제 방법

[0042] 본 실험에 필요한 테스토스테론 5 알파-리덕타아제 효소를 아래와 같이 제조하였다. 24시간 절식한 래트(rat)의 간장을 빙냉한 크랩스 링거 완충액(krebs-Ringer phosphate buffer, pH 7.2)으로 관류하여 혈액을 제거하였다. 여기에 1.4배 양의 빙냉한 0.01 M 트리스 염화수소 완충액(Tris-HCl buffer, pH 7.2)을 가하여 균질화하

고, 3000 rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리하여 분리된 상층을 7,000 rpm, 4℃에서 10분간 다시 원심분리하고, 여기서 분리된 상층액을 10,000 rpm, 4℃에서 10분간 한번 더 원심분리하여 얻어진 상층액을 효소액으로 사용하였다. 효소액은 -70℃에서 동결보존하여 실험에서 사용하였다.

[0043] **실험예 3. 5- α -리덕타아제 효능 억제 연구**

[0044] 테스토스테론(Testosterone, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 50 μl , 시료를 각각 녹인 시험액 50 μl (6.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 상기에서 제조한 테스토스테론 5알파-리덕타아제 효소액 160 μl 를 혼합하고, NADPH(0.77 mg/ml) 80 μl , 2 mM 디티오프레이트(dithiothreitol) 400 μl 를 가하여 반응을 개시한 다음 37℃에서 30분간 인큐베이션하였다. 디클로로메탄(Dichloromethane)에 내부표준물질(p-hydroxybenzoic acid n-hexyl ester, 0.01 mg/ml)을 녹인 다음 820 μl 를 넣어 반응을 정지시켰다. 그 후, 볼텍싱(vortexing)하여 상하를 잘 섞이게 한 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 상층을 제거한 후, 디클로로메탄(Dichloromethane)층을 질소로 날렸다. 여기에 메탄올(Methanol) 500 μl 를 가하고, 고속액체크로마토그래피(HPLC)로 남아있는 테스토스테론(Testosterone)량을 측정하여 테스토스테론 5알파-리덕타아제 활성 억제율을 계산하여 %로 나타내었다. 테스토스테론 5알파-리덕타아제 활성억제 실험의 양성대조군으로는 시중에서 테스토스테론 5알파-리덕타아제 저해제로 피나스테라이드(Finasteride)와 에치닐에스트라디올(Ethinylestradiol)을 사용하였다.

[0045] **실험예 4. 고속액체크로마토그래피(HPLC) 측정**

[0046] 고속액체크로마토그래피(HPLC)의 측정조건 - 컬럼(Column)은 Thermo Hypersil Gold C₁₈(150×4.6 mm) 사용하였고, 이동상으로는 메탄올과 물을 65:35의 비율로 혼합하여 사용하였다. 유속은 1.0 ml/min, 컬럼온도는 40℃, 주입량은 20 μl , 검출파장은 254 nm에서 측정하였다. 측정은 내부표준물질법을 이용하였고, 피크-면적 비(테스토스테론/내부표준물질)로 테스토스테론 5알파-리덕타아제 억제율을 % 값으로 나타내었다.

[0047] 억제율(%)=100×{(테스트 샘플의 면적 - 30분동안 반응이 진행된 샘플의 면적)/(0분동안에서 반응이 정지된 샘플의 면적 - 30분동안 반응이 진행된 샘플의 면적)}

[0048] **실험예 5. 모유두 세포(HHDP)를 이용한 세포 증식 활성실험**

[0049] a. 세포배양: 인간 모유두 세포(HHDP)는 10% FBS, 1% antibiotics를 함유하는 MSC medium, 37℃, 5% CO₂의 조건 하에서 배양하며, 3일 간격으로 계대 배양하여 사용하였다.

[0050] b. MTT assay(모유두 세포 증식활성): MTT 분석법은 살아있는 세포에서만 활성을 보이는 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용을 이용하여 최종적으로 formazan이라는 색소 산물을 형성시켜 그것을 측정함으로 시험물질의 세포 독성 정도를 측정하는 방법이다. 배양된 HHDP를 혈구 계산기를 이용하여 세포 수를 0.5×10⁴ cells/mL로 맞춘 후 각 well에 200 μL 씩 넣어 24시간 배양하였다. 시약 처리 농도에 따라 두 개의 실험군과 대조군으로 나누고, 실험군에는 추출물을 처리하고 양성대조군으로 2 μM 농도의 미녹시딜을 사용하였다. 시료는 100 mg/mL의 농도로 DMSO에 녹인 추출물액을 이용하여 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 다섯 가지 농도로 처리하였다. 선발 추출물의 효과는 MTT 검정법에 의하여, 처리 농도에서 세포 증식률을 알아보기 위하여 96-well plate에 최종농도 0.5 mg/mL가 되도록 MTT 용액을 첨가하여 3시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, MTT 용액이 섞여 있는 배양액을 제거하고 DMSO를 첨가하여 배양 시 생성된 formazan을 용해하여 ELISA reader로 550 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0051] **실험예 6. C57BL/6 마우스를 이용한 모발 성장 실험(*in vivo*)**

[0052] a. 실험동물 사육: 생후 6주 된 수컷 C57BL/6 mouse를 (주)중앙실험동물로부터 구입하여 1주간 동물 사육실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실은 온도 23±3℃ 상대습도 50±10%, 12시간씩 밤낮을 유지시킨다. 실험동물은 Clean rack에서 사육하였고 실험동물용 사료를 자유로이 급여하고 cage는 매 3일마다 교체하였다.

[0053] b. 모발성장실험: 제모 크림(비키로 크림, 태극제약)을 이용하여 40초동안 방치하여 털을 제거하고 충분히 증류수로 닦아서 남아있는 여분의 제모크림을 없애준 후 알코올로 닦아준다. 48시간 동안 방치하여 미세 상처가 회복되도록 하였다. 시료 도포는 면봉을 이용하여 제모 부위에 시료 용액 100 μL 씩을 mouse의 등에 골고루 도포하였고 시료 처리는 매일 오후 4시에 1회씩 21일간(3주) 실시하였다. 시험 시료 추출물은 50mg/mL의 농도로 70% 에탄올에 용해시켜 사용하고, 음성대조군은 70% 에탄올을 사용하고, 양성대조군으로 5% 미녹시딜을 사용하였다. 실험 시작 후 매일 모발이 성장하는 상태를 육안적으로 확인하기 위하여 7일에 한 번씩 마취제(2,2,2-

tribromoethyl alcohol + tert-amyl alcohol)로 마취한 후 디지털 카메라를 이용하여 사진 촬영을 실시하였다.

[0054]

c. 조직학적 분석: 실험 3주 후에 마우스 희생과 조직 채취 실시하였다. 4% 중성 포르말린 용액으로 고정하였다. 각 개체별로 넓이 0.5cm, 길이 2.5cm의 피부조직 절편 4개를 얻었는데, 4개의 피부조직을 하나의 쌍으로 하여 일반적 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 블록(paraffin block)으로 제작한 후, 5 μ m 두께로 박절하여 H&E 염색(stain)을 실시하였다. Hematoxylin과 Eosin (H&E)으로 염색하여 광학현미경으로 모낭 조직의 조직학적 변화를 관찰하였다.

[0055]

d. 웨스턴 블롯 (Western blotting) : 세포와 조직 속에 함유되어 있는 growth factor (IGF-1, HGF, KGF, VEGF)를 분석하기 위하여 -80℃에 보관하고 있던 등 피부조직 1 g에 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100) 500 μ l를 가하고 Homogenizer (Tissue tearor, Biospec, Korea)를 이용하여 분쇄하고 원심 분리 후 Lowly법을 이용하여 단백질을 정량하였다. 60 μ g의 protein을 15% SDS-PAGE gel에 전기영동하고 PVDF paper로 이동시킨 다음, 5% skim milk로 1시간 동안 blocking하고, primary antibody (IGF-1, HGF, KGF, VEGF, Upstate, USA)는 5% skim milk에 1:1000로 희석하여 4℃에서 overnight 하였다. 이후 1X PBST로 세척 후 secondary antibody (Goat anti-Rabbit IgG, Stressgen, USA)를 5% skim milk에 1:1000으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 세척하고, ECL solution (Elpisbiotec, Korea)을 이용하여 이미지 분석기 (Gel Documentation system, UVP, USA)로 분석하였다.

[0056]

e. 알티-피시알 (RT-PCR) : 세포와 조직에서 총 RNA는 guanidine thiocyanate-water saturated phenol/chloroform 분리 방법을 이용하였다. 물 층에 있는 total RNA는 이소프로판올을 이용하여 침전시켜 분리한 RNA는 260 nm와 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하고 총 RNA 1 μ g을 Moloney murine leukemia virus transcriptase와 random hexamer를 이용하여 역전사하였다.

[0057]

f. 통계처리 : 실험결과와 통계 처리는 SPSS 11.5 (SPSS Inc, USA)를 이용하며, 모든 측정값은 MeanB $\pm$ S.E.로 표시하고 분석에 대한 유의성은 one-way-ANOVA를 실시, 분석결과에 대한 p<0.05의 수준에서 LSD 다중 검정법으로 사후검정을 실시하여 각 처리구간의 평균치에 대한 유의성을 분석하였다.

[0058]

모발형성 세포인 HHDPC로부터의 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 추출물에 대한 세포 증식 효과를 보기 위해 MTT assay법으로 흡광도를 측정하고, 그 결과도 도 1에 도시하였다. 그 결과, 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 추출물을 처리한 군이 처리하지 않은 군에 비해 높은 증식률을 나타내었다. 또한 양성대조군인 2 μ M minoxidil과도 유사한 증식률을 나타냈다.

[0059]

또한, C57BL/6 마우스를 이용한 모발 성장 효과를 관찰하고 이를 도 2에 나타내었다. 그 결과, 음성대조군에 비해 양성 대조군, 원추리를 제외 본원발명의 생약 복합물의 5% 추출물 및 본원발명의 생약 복합물의 추출물을 도포한 시험군의 모발 성장 상태가 가장 우수한 것으로 확인되었다. 도포 7일 후, 음성대조군에서는 모발 성장이 미흡하였으나, 본원발명의 추출물을 도포한 시험군에서는 우수한 모발 성장 효과가 나타났고, 특히 21일 후에는 몸통 전체에 모발이 난 것을 확인할 수 있었다.

[0060]

도 3은 모낭조직 활성화 효과를 나타내기 위한 실험을 도시한 것이다. 각 개체별로 넓이 0.5cm, 길이 2.5cm의 피부조직 절편 4개를 얻었는데, 4개의 피부조직을 하나의 쌍으로 하여 일반적 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 블록(paraffin block)으로 제작한 후, 5 μ m 두께로 박절하여 H&E 염색(stain)을 실시하였다. 조직 절편은 광학 현미경하에서 모낭 조직의 조직학적 변화를 관찰하였다. 본원발명의 생약 복합물의 추출물 및 본원발명의 추출물에서 모근세포가 길게 자란 것을 확인할 수 있었는데, 특히, 본원발명의 추출물을 처리한 군에서 모근세포의 성장이 우수하게 나타났다. 상기의 결과로부터 본원발명의 추출물이 모근활성의 촉진을 통한 우수한 발모효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0061]

도 4a는 모두유 세포(HHDCP)를 이용한 알티-피시알을 나타내었다. 도 4b는 모두유 세포(HHDCP)를 이용한 웨스턴 블롯을 나타낸 그림이다. 그 결과, 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 추출물을 처리한 군이 처리하지 않은 군에 비해 성장인자 (IGF-1, VEGF, KGF, HGF)의 발

현이 현저히 증가되는 것을 알 수 있었다.

[0062]

도 5a는 C57BL/6 마우스를 이용한 모발 성장 시험을 통한 피부 조직을 이용한 알타-피시알을 나타내었다. 도 5b는 피부 조직을 이용한 웨스턴 블롯을 나타낸 그림이다. 그 결과, 원추리, 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 추출물을 처리한 군이 처리하지 않은 군에 비해 성장인자 (IGF-1, VEGF, KGF, HGF)의 발현이 현저히 증가되는 것을 알 수 있었다.

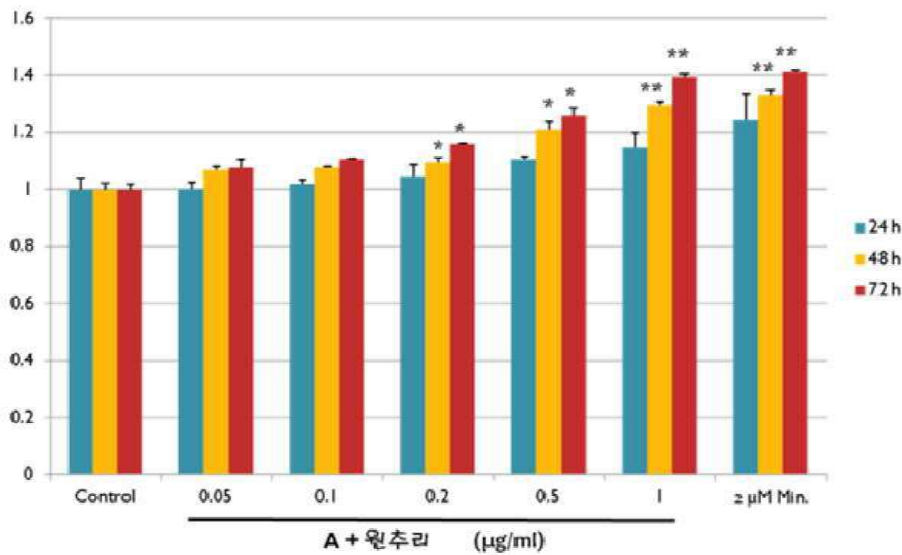
부호의 설명

[0063]

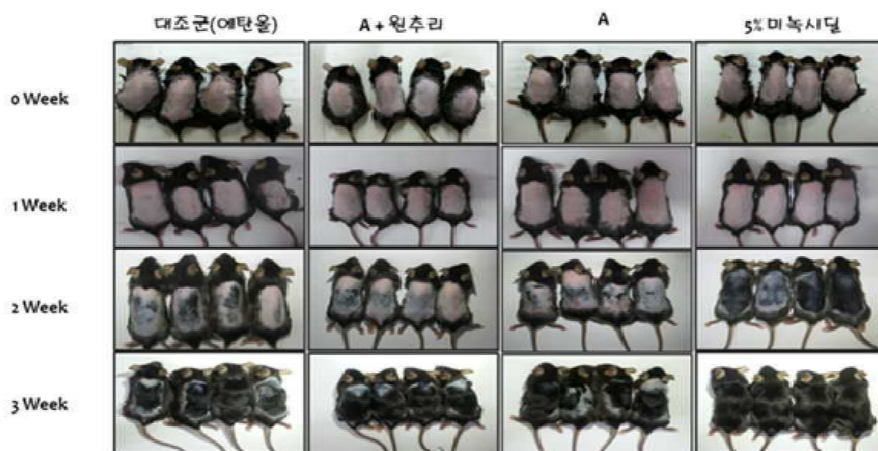
도 1 도 2 도 3 도 4 도 5에서 A는 본원발명의 생약 복합물에서 원추리를 제외한 감초, 당귀, 창포, 천궁, 인삼, 녹차, 도인, 단삼, 산초, 홍화로 이루어진 생약 복합물의 추출물을 의미한다.

도면

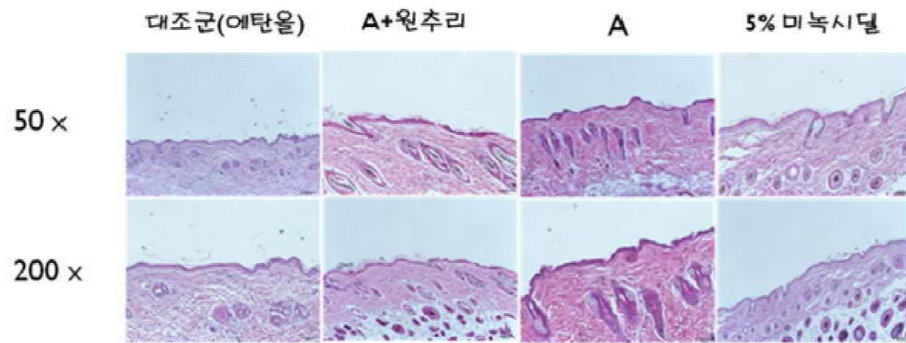
도면1



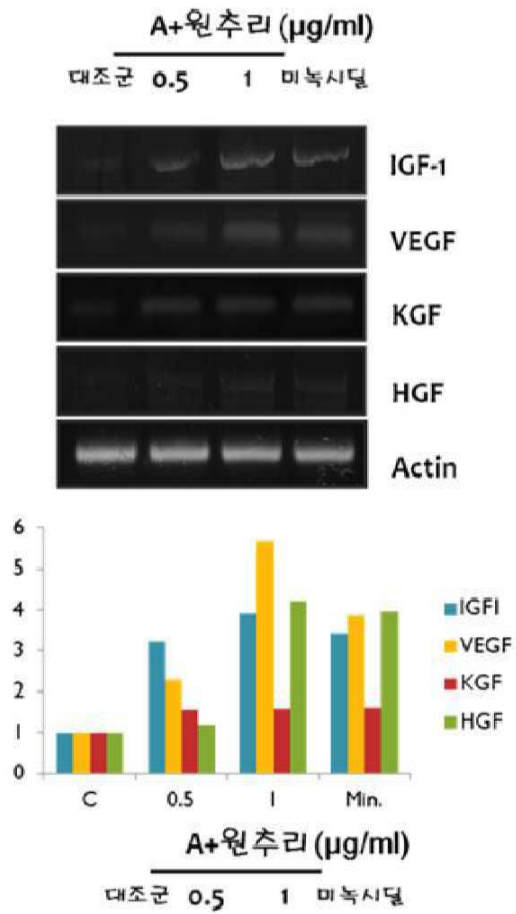
도면2



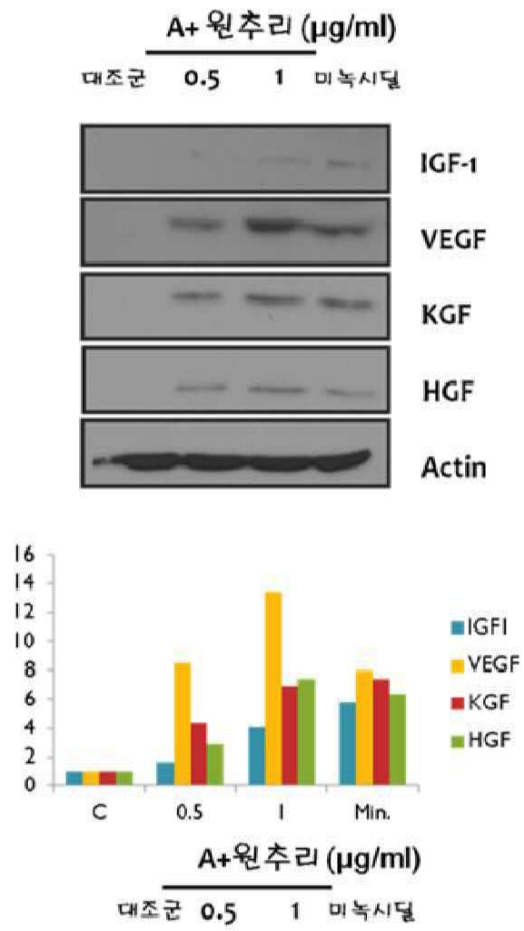
도면3



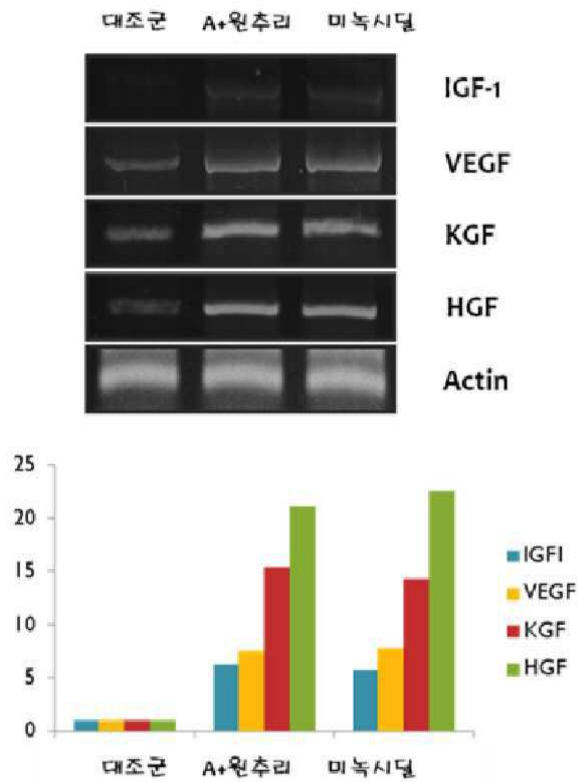
도면4a



도면4b



도면5a



도면5b

