



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0051077
 (43) 공개일자 2017년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2017.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01) *A61Q 5/00* (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
 (21) 출원번호 10-2015-0153435
 (22) 출원일자 2015년11월02일
 심사청구일자 없음

(71) 출원인
(주)모아캠
 서울특별시 강남구 학동로24길 11, 4층 (논현동)
 (72) 발명자
왕다혜
 경기도 수원시 영통구 삼성로277번길 29-69 (원천동)
이지언
 경기도 용인시 처인구 용문로 30-8, 903호 (역북동, 라이프청수아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
윤동열

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **맥문동 추출물 및 천연 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물**

(57) 요약

본 발명은 맥문동 추출물; 및 백자인, 만형자, 향부자, 감국, 상백피, 천궁, 백지, 세신, 측백엽, 한련초, 생강 및 인삼으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 천연 추출물;을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61Q 19/00 (2013.01)

A61Q 5/00 (2013.01)

A61Q 7/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자

이정민

경기도 성남시 중원구 여수울로15번길 8-10, 301호
(여수동)

한정희

경기도 용인시 기흥구 흥덕2로65번길 7-6, 401호
(영덕동)

권순상

경기도 용인시 수지구 상현로 30-10, 233동 1401호
(상현동, 상현마을성원상떼빌아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

맥문동 추출물; 및

백자인, 만형자, 향부자, 감국, 상백피, 천궁, 백지, 세신, 측백엽, 한련초, 생강 및 인삼으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 천연 추출물;을 유효성분으로 함유하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 맥문동 추출물의 함량은 조성물 전체 중량에 대하여, 0.01 중량% 내지 10 중량%인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 천연 추출물의 함량은 조성물 전체 중량에 대하여, 0.01 중량% 내지 10 중량%인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 맥문동; 및 백자인, 만형자, 향부자, 감국, 상백피, 천궁, 백지, 세신, 측백엽, 한련초, 생강 및 인삼으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 물을 첨가하여 95℃ 내지 100℃의 온도로 열수추출하여 수득한 추출물을 함유하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 맥문동; 및 백자인, 만형자, 향부자, 감국, 상백피, 천궁, 백지, 세신, 측백엽, 한련초, 생강 및 인삼으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 물을 첨가하여 20℃ 내지 25℃의 온도로 저온추출하여 수득한 추출물을 함유하는 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 열수추출하여 수득한 추출물 또는 상기 저온추출하여 수득한 추출물에 에틸아세테이트를 첨가하여 분리되는 어느 한 층으로 분리하는 에틸아세테이트 분획하여 수득한 추출물을 함유하는 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 에틸아세테이트 분획으로 분리하지 않은 층에 부탄올을 첨가하여 분리되는 어느 한 층으로 분리하는 에틸아세테이트 분획하여 수득한 추출물을 함유하는 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 열수추출하여 수득한 추출물 또는 상기 저온추출하여 수득한 추출물에 에탄올을 첨가하여 수득한 추출물을 함유하는 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 조성물은 탈모방지 또는 두피개선용인 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 조성물은 항산화용인 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 조성물은 항비듬용인 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 조성물은 항균용인 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 조성물은 피지 억제용인 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 조성물은 피지 억제용인 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 조성물은 화장료 조성물인 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 조성물은 식품 조성물인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 맥문동 추출물 및 천연 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 탈모의 원인에 관하여서는 모근, 피지선 등의 기관에서 남성 호르몬의 작용설, 모낭 (Hair follicle)의 혈류량 저하, 비듬균 번식이나 피지 분비 과다에 의한 두피 이상설, 유전적 요인 그리고 노화 등이 거론되어 왔다. 그러나 아직까지 탈모에 대한 명확한 원인은 규명되고 있지 않고, 최근 들어 오히려 탈모증으로 고민하는 사람이 점점 늘고 있으며 그 연령층도 낮아지고 있는 실정이다.

[0003] 인체의 모발은 약 130만개 이상, 두발은 10만개 이상이며 이들 모발은 성장기(anagen), 퇴화기(catagen), 휴지기(telogen)의 3단계 주기를 거치며 각 모발은 독립적인 주기로 활동하며 진행된다. 탈모는 머리카락이나 털이 어떤 원인에 의하여 정상보다 적거나 없는 상태를 의미하며, 크게 모발이 휴지기 상태에서 빠지는 일반적인 탈모 현상(휴지기 탈모, telogen effluvium)과 비정상적인 탈모 현상인 성장기 탈모 현상(anagen effluvium)으로 구별할 수 있는 데, 후자를 일반적으로 탈모라 일컫는다. 탈모(또는 탈모 질환)는 형태, 증상 또는 원인 등에

따라, 원형 탈모증(Alopecia Areata), 유전성 안드로젠 탈모증(Androgenetic Alopecia), 휴지기 탈모증(Telogen Effluvium), 외상성, 발모벽(Trichotilomania), 압박성(Pressure Alopecia)등의 성장기 탈모증, 비강성, 매독성(Alopecia syphilitic), 지루 탈모증(Alopecia seborrheica), 증후성, 반흔성, 선천성 탈모증 등으로 분류되고 있다.

[0004] 종래의 탈모증 치료방법으로는, 호르몬설과 관련하여 여성 호르몬을 주재로 한 제제가 있으나 효과뿐 아니라 피부 염증 발생, 호르몬 투여에 의한 부작용 발생 등의 보고가 있어 현재는 사용이 중단되고 있다. 발모제로서 미국 업존사의 미녹시딜(minoxidil), 이태리 크리노스(Crinos, Co.)사의 트리코사카라이드(trichosaccharide)등을 주성분으로 하는 제제가 사용되고 있으나 뚜렷한 효과의 부재 및 부작용 문제가 대두되고 있다. 또한 머크사에서 개발한 피나스테라이드(finasteride)는 모낭에서 남성호르몬 테스토스테론 대사에 작용하는 효소인 5- α -리덕테이스(5- α -reductase)의 활성을 억제시키는 물질로 알려져 있으나 우울증을 유발할 수 있으며 이 또한 장기간의 치료가 필요하다는 문제점을 안고 있다. 이 외에도 크레시나와 로게인이 있지만, 탈모 질환이 완전히 진행되기 전인 정상 두피에 모근이 살아있는 경우에만 사용된다. 이처럼 종래의 여러 종류의 발모제는 일반적으로 두피의 혈행 촉진과 모근의 영양공급을 목적으로 하여 모발의 성장에 도움을 주도록 하는 방법이 시도되었으나 이 역시 독성과 부작용이 심하고 그 효과 또한 미흡한 것이 현재 실정이다.

[0005] 한편, 맥문동은 백합과의 식물로 탈모 개선에 대한 일부 효능이 알려져 있기는 하나, 탈모에 가시적인 효능을 나타낼 수 있는 조성에 아직 구체적으로 알려진 바가 없으며, 탈모 개선 이외에 다른 효능을 나타낼 수 있는 조성 역시 아직 구체적으로 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 종래의 맥문동 추출 조성물보다도 탈모방지 및 두피개선 효과가 우수하고, 항비듬 효과가 우수하며, 항염증 효과가 우수하고, 항균 효과가 우수하며, 피지 억제 효과가 우수한 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 맥문동 추출물; 및 백자인, 만형자, 향부자, 감국, 상백피, 천궁, 백지, 세신, 측백엽, 한련초, 생강 및 인삼으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 천연 추출물;을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 맥문동 추출물과 함께 종래에 알려지지 않은 특유한 구성의 천연 추출물을 함유함으로써, 탈모방지 및 두피개선 효과가 우수하고, 항비듬 효과가 우수하며, 항염증 효과가 우수하고, 항균 효과가 우수하며, 피지 억제 효과가 우수하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 이하, 본 발명에 따른 조성물에 대하여 자세하게 설명한다.

[0010] 맥문동은 백합과의 식물로 학명은 *Ophiopogon Japonicus* 또는 *Liriope platyphylla* 이다. 포함하고 있는 성분으로는 오피오포고닌(Ophiopogonon) A-E, 스피카토시드(Spicatoside) A-B 등 스테로이드 사포닌, 오피오포나논(Ophioponanone) C-F, 오피오포고논(Ophiopogonone) C 등 플라보노이드가 알려져 있으며 수집종과 재배방법에 따라 그 성분의 차이가 나타난다고 보고되고 있다.

[0011] 감국은 국화과의 식물로 학명은 *Chrysanthemum indicum*이다. 포함하고 있는 성분으로는 리나린(Linarin), 퀘르세틴(Quercetin) 등 플라보노이드 화합물과 시나린(Cynarin) 등 페놀화합물이 알려져 있다.

[0012] 만형자는 마편초과의 식물로 학명은 *Vitex trifolia* 또는 *Vitex rotundifolia*이다. 포함하고 있는 성분으로는 비텍스칼핀(Vitexcarpin), 아르테메틴(Artemetin), 헤스페리딘(Hesperidin) 등 플라보노이드가 알려져 있다.

[0013] 인삼은 두릅나무과의 식물로 학명은 *Panax ginseng*이다. 포함하고 있는 성분으로는 진세노사이드(Ginsenoside Rb1-2) 등 사포닌이 알려져 있다.

[0014] 한련초는 국화과의 식물로 학명은 *Eclipta prostrata*이다. 포함하고 있는 성분으로는 에크랄바사포닌

(Eclalbasaponin) I-IV 등 사포닌, 웨델로락톤(Wedelolactone) 등 플라보노이드가 알려져 있다.

- [0015] 측백엽은 측백나무과의 식물로 *Thuja orientalis*의 잎으로 항균효능과 항염효능이 뛰어나다고 알려져 있다. 향부자는 방동사니과의 식물로 학명은 *Cyperus rotundus*으로, 전통의약서에서는 통증을 풀어주며 경맥을 돕는 효능이 있다고 설명하고 있다.
- [0016] 백자인은 측백나무과 식물의 잎으로 그 학명은 *Thuja orientalis*이다.
- [0017] 상백피는 뽕나무과의 식물로 학명은 *Morus alba*이다. 포함하고 있는 성분으로는 Mrusin, Kuwanon E-R 등 플라보노이드가 알려져 있다.
- [0018] 생강은 생강과의 식물로 학명은 *Zingiber officinale*이다. 포함하고 있는 성분으로는 진저론(gingerone)과 쇼가올(shogaol) 등 페놀화합물이 알려져 있다.
- [0019] 천궁은 미나리과의 식물로 학명은 *Cnidium officinale*이다..
- [0020] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 맥문동 추출물의 함량은 조성물 전체 중량에 대하여, 0.01 중량% 내지 10 중량%이다. 그 함량이 0.01중량% 미만이면 탈모방지 및 두피개선 효과가 거의 나타나지 않고, 10중량%를 초과하면 제형에 영향을 미칠 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 천연 추출물의 함량은 조성물 전체 중량에 대하여, 0.01 중량% 내지 10 중량%이다.
- [0022] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 조성물은 맥문동; 및 백자인, 만형자, 향부자, 감국, 상백피, 천궁, 백지, 세신, 측백엽, 한련초, 생강 및 인삼으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 물을 첨가하여 95℃ 내지 100℃의 온도로 열수추출하여 수득한 추출물을 함유한다.
- [0023] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 조성물은 맥문동; 및 백자인, 만형자, 향부자, 감국, 상백피, 천궁, 백지, 세신, 측백엽, 한련초, 생강 및 인삼으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상에 물을 첨가하여 20℃ 내지 25℃의 온도로 저온추출하여 수득한 추출물을 함유한다.
- [0024] 본 발명에 따른 조성물에 함유되는 상기 추출물들은 식물체로부터 유효성분을 추출하기 위하여 통상적으로 사용되는 방법에 의해 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 '추출물'은 적절한 용매를 이용하여 추출한 것이며 열수추출물, 극성용매 가용추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함할 수 있다.
- [0025] 추출물을 제조하기 위한 적절한 용매로는 당업계에서 허용되는 용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있다. 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 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0026] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나 이상의 방법을 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 추출물의 제조 방법은 종래 공지되어 있는 방법도 이용될 수 있다.
- [0027] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 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 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이며, 추출물은 각 생약제의 별도의 추출물을 혼합하여 이용할 수도 있고, 생약재를 혼합한 후 한꺼번에 추출하여 제조된 것을 사용할 수도 있다. 또한 본 발명에 의한 추출물은 1,3-부틸렌글라이콜에 녹여 조성물에 배합할 수 있다.

- [0029] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 조성물은 상기 열수추출하여 수득한 추출물 또는 상기 저온추출하여 수득한 추출물에 에틸아세테이트를 첨가하여 분리되는 어느 한 층으로 분리하는 에틸아세테이트 분획하여 수득한 추출물을 함유한다.
- [0030] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 조성물은 상기 에틸아세테이트 분획으로 분리하지 않은 층에 부탄올을 첨가하여 분리되는 어느 한 층으로 분리하는 에틸아세테이트 분획하여 수득한 추출물을 함유한다.
- [0031] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 조성물은 상기 열수추출하여 수득한 추출물 또는 상기 저온추출하여 수득한 추출물에 에탄올을 첨가하여 수득한 추출물을 함유한다.
- [0032] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 모유두세포 보호 효과가 우수한 상기 조성물은 탈모방지 또는 두피개선용이다.
- [0033] 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 자유라디칼 억제 및 활성 산소 억제 효과가 우수한 항산화용이다.
- [0034] 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 상기 조성물은 비듬 원인균에 대한 억제 효과가 우수한 항비듬용이다.
- [0035] 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 상기 조성물은 세균에 대한 억제 효과가 우수한 항균용이다.
- [0036] 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 상기 조성물은 피지 생성을 억제하는 효과가 우수한 피지 억제용이다.
- [0037] 본 발명에 일 실시상태에 있어서, 상기 조성물은 화장료 조성물이다. 상기 조성물은 화장료로서 피부에 외용이 허용되는 범위 내에서 다른 성분이 더 첨가될 수 있다.
- [0038] 본 발명에 일 실시상태에 있어서, 상기 조성물은 식품 조성물이다. 상기 조성물은 인간이 섭취가 허용되는 성분의 범위 내에서 다른 성분이 더 첨가될 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 자유라디칼 억제 및 활성 산소 억제 효과가 우수한 항산화용인 화장료 조성물이다.
- [0040] 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 엘라스테이즈 억제 효과가 우수하고, 콜라겐 합성 활성 효과가 우수하며, MMP-1 억제 효과가 우수한 피부 주름 개선 또는 예방용인 화장료 조성물이다.
- [0041] 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 NO 억제가 우수한 항염증용인 화장료 조성물이다.
- [0042] 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 피부 보습 효과, 항산화 효과, 피부 주름 개선 또는 예방 효과 및 항염증 효과가 우수한 항노화용인 화장료 조성물이다.
- [0043] 이하, 실시예를 들어 본 발명을 보다 자세하게 설명한다. 그러나 이러한 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하려는 것일 뿐, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 권리범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0044] **<실시예 1> 열수추출로 추출한 조성물의 제조**
- [0045] 맥문동, 백자인, 만형자, 향부자, 감국, 상백피, 천궁, 백지, 세신, 측백엽, 한련초, 생강 및 인삼을 각 100g을 취하여 정제수 1L 내지 2L를 첨가한 후, 95? 내지 100?의 온도에서 환류장치 하에서 10~15시간동안 끓이면서 추출하였다. 추출완료 후 원물을 제거 한 추출액을 회전식감압농축기로서 농축하고 동결건조 하여 고체상태의 추출물을 수득하였다.
- [0046] **<실시예 2> 저온추출로 추출한 조성물의 제조**
- [0047] 맥문동, 백자인, 만형자, 향부자, 감국, 상백피, 천궁, 백지, 세신, 측백엽, 한련초, 생강 및 인삼을 각 100g을 취하여 정제수 1L 내지 2L를 첨가한 후 20 내지 25?의 상온에서 1 주 내지3주동안 유지하여 유효성분을 용출하였다. 원물제거 한 추출액을 회전식감압농축기로서 농축하고 동결건조하여 고체상태의 추출물을 수득하였다.
- [0048] **<실시예 3> 에틸아세테이트 분획으로 추출한 조성물의 제조**
- [0049] 상기 실시예 1의 조성물에 정제수 1L 내지 2L를 가한 뒤 생기는 침전물을 여과하여 제거하고, 여기에 에틸아세테이트를 가하여 잘 섞은 다음 방치하여 층을 분리시킨 뒤 상층을 분리한 후, 회전식 감압농축기으로써 농축하고 동결건조하여 고체상태의 추출물을 수득하였다.
- [0050] **<실시예 4> 부탄올 분획으로 추출한 조성물의 제조**
- [0051] 상기 실시예 3의 조성물의 하층에 부탄올 1L 내지 2L을 가하여 잘 섞은 다음 방치하여 층을 분리시킨 뒤 상층을 분리한 후, 회전식 감압농축기으로써 농축하고 동결건조하여 고체상태의 추출물을 수득하였다.

[0052] <실시예 5> 다당 분획으로 추출한 조성물의 제조

[0053] 상기 실시예 1의 조성물을 회전식감압농축기로서 농축하고 농축액에 에탄올을 가하여 생기는 침전을 분리하여 진공건조하여 고체상태의 추출물을 수득하였다.

[0054] <실험예 1> 항산화 효능 측정

[0055] 항산화 효과를 확인하기 위하여 자유라디칼소거시험 및 활성산소소거시험을 실시하였다. 시험에 사용한 시료는 상기 실시예 1 내지 5에서 수득한 시료이며, 항산화효과를 비교하기 위하여 항산화효과가 뛰어난 아스코르브산(L-ascorbic acid)을 양성 대조군으로 이용하였다.

[0056] 자유라디칼 소거시험은 안정한 DPPH의 흡광도가 540nm에서 최대 흡광도를 나타는 것을 이용하고, 자유라디칼인 DPPH가 시료에 의해 소거되어 보라색에서 투명한 색이 될수록, 자유라디칼 소거율이 증가할수록 상기 540nm파장에서 흡광도가 줄어들게 됨을 응용하여 검정시험방법에 의해 진행하였다.

[0057] 0.1mM DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical, Sigma)용액 1ml에 상기의 실시예 1 내지 5에서 수득한 조성물을 메탄올에 적당한 농도로 희석하여 1ml를 혼합하고, 37℃에서 15분간 방치한 후, 마이크로플레이트 리더(microplate reader, UVT-06685, Thermo max, 미국)를 이용하여 540nm파장에서 흡광도를 측정하였다

[0058] 상기 자유라디칼 소거시험에서 대조군은 DPPH 1ml과 메탄올 1ml를 넣어 같은 방법으로 측정하였으며, 메탄올 1ml과 시료 1ml를 넣어 시료와 대조군에 대한 각각의 색 보정값을 얻었다. 하기 수학적 식 1을 이용하여 자유라디칼 소거율을 계산하였으며, IC₅₀은 자유라디칼을 50% 소거하기 위해 소요되는 시료의 농도이고, 값이 작을수록 항산화활성이 높음을 의미한다.

[0059] [수학적 식 1]

[0060] 자유라디칼 소거율(%)= 100-((시료의 흡광도/대조군의 흡광도)×100)

[0061] 활성산소 소거시험은 잔틴/잔틴옥시데이즈(xanthine/xanthine oxidase)의 효소반응에 의한 활성산소 발생을 이용하여 활성산소에 의한 니트로블루 테트라졸리움(nitroblue tetrazolium, NBT)의 산화를 이용한 흡광도 변화를 측정함으로써 활성 산소의 소거능을 알 수 있다.

[0062] 탄산나트륨(Na₂CO₃) 2.4ml, 잔틴(xanthine) 0.1ml, 에틸렌디아민테트라아세트산 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA) 0.1ml, 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA, Sigma) 0.1ml, NBT 0.1ml 및 시료 0.1ml을 넣고 볼텍서 믹서(vortex mixer, Type 37600 Mixer, USA)를 이용하여 vortexing하고 25℃에서 10분간 방치한 후, 잔틴산화효소(xanthine oxidase) 0.1ml을 넣고 25℃에서 20분간 반응, 6mM CuCl₂를 넣어 반응을 정지, 마이크로플레이트 리더를 이용하여 540nm파장에서 흡광도를 측정하였다

[0063] 상기 활성산소소거활성시험에서의 대조군은 시료용액 대신 3차 증류수를 넣어 같은 방법으로 측정하였으며, 잔틴산화효소 용액 대신 3차 증류수를 넣어 추출 시료와 대조군에 대한 각각의 색 보정값을 얻는 것으로 설정하였다.

[0064] 하기 수학적 식 2을 이용하여 활성산소소거율을 계산하였으며, IC₅₀은 활성산소를 50% 소거하기 위해 소요되는 시료의 농도이고, 값이 작을수록 항산화활성이 높음을 의미한다.

[0065] [수학적 식 2]

[0066] 활성산소 소거율(%)= 100-((시료의 흡광도/대조군의 흡광도)×100)

[0067] 상기 실시예 1 내지 5의 조성물을 시료로 자유라디칼 소거율 및 활성산소 소거율을 측정하였으며, 대조군으로서 L-아스코르브산을 사용하여 그 측정 결과를 하기 표 1과 같이 나타내었다.

표 1

[0068]

시료명	자유라디칼 소거율 IC ₅₀ (ug/mL)	활성산소 소거율 IC ₅₀ (ug/mL)
L-ascorbic acid	4.85	6.02
실시예 1	8.87	7.26
실시예 2	5.56	6.88
실시예 3	6.05	8.45
실시예 4	5.09	6.50

실시예 5	5.88	7.11
-------	------	------

[0069] 상기 표 1에서와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1 내지 5는 열수추출물과 저온추출물의 항산화 효능 비교한 결과 저온추출물의 항산화 효능이 열수추출물보다 뛰어난 것을 확인하였으며, 분획물의 항산화 효능은 부탄올 분획물, 다당체 분획물, 에틸아세테이트 분획물 순서임을 확인하였다.

[0070] <실험예 2> 모유두세포 보호효과 측정

[0071] 모유두세포는 모낭의 기저부에 존재하는 세포로, 모낭을 구성하는 세포들에게 산소와 영양을 공급하여 모발의 성장과 모낭 주기 조절을 담당한다. 따라서 모유두세포의 증식이 촉진되면 모발이 건강해지고 모발 성장이 촉진되며 탈모를 막을 수 있다. 모발의 성장은 모유두(dermal papilla)를 둘러싸고 있는 상피세포(epithelial cell)가 분열하여 모간(hair shaft)을 만들면서 진행되기 때문에 모유두세포는 상피세포의 분열을 조절하는 중요한 역할을 한다. 또한 남성형 탈모증에서 남성호르몬이 모낭에 작용하는 부위 역시 모유두로서 모유두세포는 발모에 있어 매우 중요한 역할을 하고 있다.

[0072] 모발은 지속적인 성장을 위해 왕성한 세포 분열이 필요하며 이에 따라 산화스트레스가 심한 기관이다. 따라서, 산화스트레스로부터 모발 모유두세포를 보호할 수 있는 조성물은 탈모방지에 효과적으로 작용할 것으로 예상하여 조성물이 모발 모유두세포를 산화 스트레스로부터 보호할 수 있는지 평가하였다.

[0073] 모유두세포를 96 well에 5,000개 접종하여 24 시간 배양 후 소태아혈청이 없는 DMEM 배지에서 48 시간 시료 처리하였다. 과산화수소 1 mM을 2.5 시간 처리하고 세척 후 소태아혈청이 없는 DMEM 배지에서 24 시간 배양 후 WST-1으로 생존율을 측정하여 하기 표 2에 그 결과를 나타내었다.

표 2

		세포 생존율(%)
음성대조군 (H ₂ O ₂ 무처리)		100
양성대조군		23.15
실시예 1	500ppm	57.47
	250ppm	49.85
실시예 2	500ppm	71.51
	250ppm	51.65
실시예 3	500ppm	39.56
	250ppm	21.01
실시예 4	500ppm	63.55
	250ppm	50.24
실시예 5	500ppm	60.15
	250ppm	41.02

[0075] 상기 표 2에서와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1 내지 5는 산화스트레스로부터 모유두세포 보호 효능이 뛰어난 것을 확인하였으며, 특히 실시예 4가 산화스트레스로부터 모유두세포 보호 효능이 뛰어난 것을 확인하였다.

[0076] <실험예 3> 비듬 생성 억제 활성 측정

[0077] 비듬이란 인체의 신진대사에 의해 생긴 두피의 죽은 세포나 벗겨진 세포들이 두피 피지선의 분비물과 함께 달라붙어서 생긴 각질형태의 덩어리를 말한다. 비듬은 점차 정상 피부와 뚜렷한 경계를 가지며, 통상 가려움과 염증을 수반하는 지루피부염으로까지 진행된다. 따라서 비듬의 생성을 억제하는 물질은 탈모방지 및 두피개선에 효과적으로 작용할 것으로 예상하여 조성물이 비듬생성을 억제하는지 평가하기 위해 비듬균 억제 효능을 평가하였다.

[0078] 조성물의 비듬생성 억제 효능을 확인하기위해 비듬 원인균 피티로스포름 오발레 (*Pityrosporum ovlae*, ATCC 12087)에 대해 억제효능을 측정하였다. 조성물을 브로스 희석법(broth dilution method)을 이용하여 배지에 단계적으로 희석하고, 이 희석액에 균을 접종 후, 35°C 인큐베이터에서 48시간 동안 흔들어 배양시켜 균이 증식하지 못하는 최소저해농도 (MIC)를 측정하여, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

	최소저해농도(MIC)
실시예 1	2.10
실시예 2	1.95
실시예 3	3.15
실시예 4	1.71
실시예 5	2.52

[0079] 상기 표 3에서와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1 내지 5는 비듬생성 억제활성이 뛰어난을 확인하였다.

[0081] <실험예 4> 항염 효능 측정

[0082] 조성물의 항염 효과를 확인하기 위하여, 쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포를 ATCC에서 구입하여 이용하였다. 세포의 배양(Cell culture)에 사용된 DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium/ Nutrient Mixture Ham's F12), FBS(fetal bovine serum), L-glutamine, 페니실린-스트렙토마이신 및 인슐린(Insulin)은 Gibco/BRL(USA)에서 구입하였다. 상기 RAW264.7 세포는 DMEM/F12 배지에 10% FBS, 1% 페니실린 스트렙토마이신 1% L-글루타민 및 20 µg/ml 인슐린을 첨가한 배양액을 사용하여 배양하였고, 37°C 습윤한 CO₂ 배양기(5% CO₂ /95% air)에서 배양하였다. 상기 세포가 배양접시의 약 80%가 차게 배양된 후, PBS(pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후세척하고, 0.25% 트립신 및 2.56 mmol/L EDTA를 처리하여 계대 배양하였다

[0083] 조성물과 LPS를 함께 첨가한 후, 24시간 배양한 뒤, 상기 24시간 배양한 후의 배양액을 수집하여, NO의 분비량을 Griess reagent system(Promega, USA)를 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 하단에 나타내었다. 상기 Griess reagent system을 이용한 측정법은 보다 상세하게는 상기 시스템의 제조사인 Promega에서 제공한 실험방법(protocol)에 의하였고, 상기수집된 세포배양액에 Sulfanilamide solution을 먼저 넣고, NED solution을 넣은 후에, microplate reader를 이용하여 540nm에서 측정하는 방법으로 수행하여, 그 결과를 하기 표 4와 같이 나타내었다.

표 4

시료명	처리농도	NO 억제율 (%)
실시예 1	500ppm	60.12
	250ppm	43.53
실시예 2	500ppm	35.94
	250ppm	27.84
실시예 3	500ppm	39.65
	250ppm	17.85
실시예 4	500ppm	89.15
	250ppm	76.66
실시예 5	500ppm	45.11
	250ppm	29.56

[0085] 상기 표 4에서와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1 내지 5는 항염 활성이 뛰어난을 확인하였으며, 특히, 실시예 4의 항염 활성이 뛰어난을 확인하였다.

[0086] <실험예 6> 항균 효능 측정

[0087] 조성물에 대한 항균력 효과 검정시험으로 고체 배양 희석법(agar serial dilution method)과 원형여과지법(paper disc method)에 의하여 항균시험을 실시하였다. 실험 균주는 한국생명공학연구원으로부터 분양받았으며, 그람양성균으로 포도상구균 (*Staphylococcus aureus*, KCTC 6910), 그람음성균으로 녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*, KCTC 1637), 대장균(*E. coli*, KCTC 1039), 효모로는 캔디다 효모 (*Candida albicans*, KCTC 7965), 사상균으로 흑국균 (*Aspergillus niger*, KCTC 6910) 이상 총 5종의 균주를 사용하였다.

[0088] 트립틱소이 배지에 균을 접종하여 37°C에서 24시간 전배양하여 준비하고, 효모의 경우, 포테이토텍스트로스 배지에 균을 접종하여 25°C에서 2일간 전배양하였으며, 사상균은 포테이토 텍스트로스 한천배지에 균을 접종하여 25°C 배양기에서 7일간 전배양한 후, 도말봉을 이용하여, 배지 표면에 형성된 사상균의 포자를 회수하여 멸균된

식염수에 희석하여 사용하였다.

[0089] 멸균된 페트리 디쉬에 시료 및 실험균종 별로 5% 디메틸설폭사이드 (DMSO) 생리식염수용액에 적절한 농도로 희석한 각각의 추출물을 2ml씩 넣고, 대조균은 5% 생리식염수 용액에 적절한 농도로 희석한 각 시료 2ml씩 넣고, 대조균은 5% DMSO 생리식염수용액 2ml을 넣은 후, 각 페트리 디쉬에 멸균하고 48℃로 냉각한 트립티소이 한천배지 및 포테이토텍스트로스 한천배지를 18ml씩 첨가하여 교반 후 정치하여 응고시킨다.

[0090] 이후 전배양시킨 각각의 시험균을 세균의 경우 최종농도 약 1×10^6 CFU/ml 의 균농도로 각각의 페트리디쉬에 도달하고, 효모의 경우 1×10^5 CFU/ml, 사상균의 경우 약 1×10^4 CFU/ml의 균농도로 각각의 페트리디쉬에 도달한다. 각각의 페트리 디쉬는 세균은 37℃에서 24시간 배양하고 효모는 25℃에서 3일간 배양, 사상균은 25℃ 배양기에서 7일간 배양한 후 각 구획 안에 Colony 형성여부를 관찰하였다.

[0091] 성장이 되지 않은 평판의 최소시료 농도를 최소저해농도 (MIC, Minimum inhibitory concentration)로 하며, 최소저해농도는 값이 작을수록 항균효과가 높음을 의미한다.

[0092] 항균력시험 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0093]

시료	최소저해농도(MIC)				
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
실시예 1	0.5	0.5	0.3	0.3	0.6
실시예 2	0.6	0.7	1.1	1.0	0.5
실시예 3	0.3	0.3	0.6	0.5	0.5
실시예 4	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1
실시예 5	0.3	0.4	0.2	0.2	0.2

[0094] 상기 표 5에서와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1 내지 5는 항균 활성이 뛰어난 것을 확인하였다.

[0095] <실험예 6> 피지분비 억제 효능의 측정

[0096] 인체 피지선 세포(sebaceous gland cell)는 진피층 내의 모낭(hair follicle)에서 얻었으며, 분리된 피지선 세포는 0.25% 트립신(Trypsin), 0.05% 에틸렌디아민테트라아세트산(Ethylene Diamene Tetraacetic Acid: EDTA)로 30분간 37℃에서 처리하고, 12% 소태아혈청(fetal bovine serum : FBS)가 함유된 MEM(Eagle's minimum essential medium)으로 트립신을 불활성화 시킨 후, 원심분리를 통해 배지를 제거하였으며, 그 후 KGM(keratinocyte growth medium) 배지에 재분산시켜 60mm 컬처용 디쉬에 배양하였다. 계대 배양시 본 실험을 위해 24 웰-플레이트(plate)를 이용하여 웰 당 2×10^5 개 세포를 심는다. 24시간 배양하여 세포가 웰에 고착된 이후 각 웰에 조성물을 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide: DMSO)에 분산시켜 최종 농도 0.1%(w/v) 로 처리하여 72시간을 배양한 후, 생존한 세포의 수를 계산하고, 생성된 피지의 양을 메탄올:클로로포름 추출법을 이용하여 추출 및 측정하여 10^4 cell당 생성된 총 피지량을 비교하여 피지 생성 억제 정도를 상대 비교하였다. 피지의 추출 방법은 조보울리스 등 (Zoboulis et. al.) (J. Invest. Dermatol.,1991; 24, 69-83)의 방법을 이용하였으며, 메탄올:클로로포름 추출단계, 초음파 파쇄단계, 필터링 단계, 질소 증발 (nitrogen evaporation) 단계를 포함한다. 본 실험 결과를 표 6에 나타내었다.

표 6

[0097]

	피지생성 억제율(%)
실시예 1	38
실시예 2	22
실시예 3	31
실시예 4	48
실시예 5	41

[0098] 상기 표 6에서와 같이, 본 발명에 따른 실시예 1 내지 5는 피지생성 억제 활성이 뛰어난 것을 확인하였다.

[0099] <실험예 7> 단백질 함량 분석

[0100] 조성물의 단백질 함량을 측정하기 위해 BCA(bicinchoninic acid) 측정법을 수행하였다. BCA 측정법은 단백질이 구리 이온(Cu^{2+} , Cu^{1+})을 환원시킬 수 있는 성질을 이용한 것으로 단백질에 의해 환원된 구리 이온은 BCA 용액과 반응하여 보라빛의 화합물(Cu^+ /BCA chromophore)을 생성하게 되는데, 이 보라빛 화합물은 특정 파장 562nm에서 최대 흡광도를 보인다. 따라서 단백질의 양이 많을수록 보라빛 화합물이 더 많이 생기며 562nm에서 흡광도가 증가함을 이용하여 단백질의 양을 측정하였다. 실험방법은 하기와 같다.

[0101] 우선 마이크로 BCA 단백질 측정 시약 키트(Pierce, cat. no. 23227)를 이용, 각 96마이크로플레이트 웰에 각각 150 μ l씩 표준액 또는 희석된 시료를 넣은 후 BCA(bicinchoninic acid) 키트 WR(Working Reagent) 시약을 첨가하여 30초간 격렬히 혼합하였다. 그 후 37 $^{\circ}C$, 2시간 동안 반응시키고 마이크로플레이트 판독기(UVT-06685, Thermo max, 미국)로 540nm 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하고 단백질 정량하였다. 결과는 다음과 같다.

표 7

시료명	총 단백질 함량(%)
실시예 1	6.25
실시예 2	5.10
실시예 3	3.15
실시예 4	7.51
실시예 5	7.36

[0103] <실험예 8> 구성 아미노산 분석

[0104] 조성물 0.2g을 20ml의 6N HCl에 130 $^{\circ}C$ 24시간 동안 가수분해 시켜 단백질의 펩타이드 결합을 끊어 유리아미노산으로 만들었다. 그 후 유리 아미노산을 OPA(o-phthalaldehyde, Agilent), FMOC(9-fluorenylmethylchloroformate) 유도체를 사용하여 형광을 띄는 아이소인돌(isoindole)을 형성시킨 후 고속액체크로마토그래피(Agilent Technologies 1200 Series HPLC, Agilent, USA)를 이용한 형광검출기(FLD, Agilent Technologies, USA)에서 아미노산을 검출하였다. 표준물질로 250pM 조성물의 성분 아미노산을 확인하였다. 함량은 하기 표 8에 나타내었다.

표 8

Amino acid (ppm)	Asp	Glu	Ser	His	Gly	The	Arg	Ala	Tyr	Cys	Val	Pro	
실시예	1	2.21	0.85	0.71	1.21	-	-	1.27	0.68	0.32	1.64	1.10	1.92
	2	-	1.15	0.23	-	0.21	0.08	0.56	0.25	-	0.98	0.05	-
	3	2.73	0.29	0.89	0.44	0.10	0.02	0.24	1.13	-	-	0.66	-
	4	0.35	-	-	1.02	0.34	-	-	-	0.10	1.22	0.25	0.86
	5	0.71	0.16	0.15	0.89	0.18	-	1.02	0.60	0.52	0.56	1.12	1.56

[0106] <제형 제조예> 제형예 1 내지 3 및 비교제형예 1 내지 3의 제조

[0107] 본 발명에 따른 조성물의 제형에 따른 사용감을 확인해보기 위하여, 하기 표 9의 조성에 따른 탈모방지 헤어 샴푸 조성물 (제형예 1), 하기 표 10의 조성에 따른 탈모방지 헤어 컨디셔너 조성물 (제형예 2) 및 하기 표 11의 조성에 따른 탈모방지 헤어 토닉 조성물 (제형예 3)을 제조하였다.

[0108] 또한, 본 발명에 따른 제형예와 비교하기 위하여, 하기 표 12의 조성에 따른

[0109] 일반 샴푸 조성물 (비교제형예 1), 하기 표 13의 조성에 따른 일반 탈모방지 헤어 컨디셔너 조성물 (비교제형예 2) 및 하기 표 14의 조성에 따른 일반 탈모방지 헤어 토닉 조성물 (비교제형예 3)을 제조하였다.

표 9

번호	원료	함량(중량%)
1	폴리쿼터늄-10	0.2

2	소듐라우릴설페이트	15
3	소듐라우레스설페이트	45
4	글라이콜스테아레이트	2
5	세테아릴알코올	0.5
6	라우릴디에틸아마이드	2.5
7	실시에 4의 조성물	1.0
8	페녹시에탄올	0.7
9	정제수	33.1

표 10

[0111]

번호	원료	합량(중량%)
1	세틸알코올	3.0
2	스테아릴알코올	3.0
3	프로펜글리콜	2.0
4	세틸트리메칠암모늄클로라이드	1.0
5	폴리 디메틸실록산	1.0
6	실시에 4의 조성물	1.0
7	미네랄오일	0.5
8	시트르산	0.2
9	페녹시에탄올	0.7
10	정제수	87.6

표 11

[0112]

번호	원료	합량(중량%)
1	멘톨	0.3
2	에탄올	30
3	살리실산	0.1
4	프로필렌글리콜	0.25
5	트리에탄올아민	0.2
6	판테놀	0.1
7	페녹시에탄올	0.7
8	정제수	68.35

표 12

[0113]

번호	원료	합량(중량%)
1	폴리쿼터늄-10	0.2
2	소듐라우릴설페이트	15
3	소듐라우레스설페이트	45
4	글라이콜스테아레이트	2
5	세테아릴알코올	0.5
6	라우릴디에틸아마이드	2.5
7	정제수	34.8

표 13

[0114]

번호	원료	합량(중량%)
1	세틸알코올	3.0
2	스테아릴알코올	3.0
3	프로펜글리콜	2.0
4	세틸트리메칠암모늄클로라이드	1.0
5	폴리 디메틸실록산	1.0
6	미네랄오일	0.5

7	시트르산	0.2
8	페녹시에탄올	0.7
9	정제수	88.6

표 14

[0115]

번호	원료	함량(중량%)
1	멘톨	0.3
2	에탄올	30
3	살리실산	0.1
4	프로필렌글리콜	0.25
5	트리에탄올아민	0.2
6	관테놀	0.1
7	페녹시에탄올	0.7
8	정제수	68.35

[0116]

<실험예 9> 샴푸 제형의 사용감 테스트

[0117]

대학교 재학생 30명을 대상으로 두 그룹으로 나누어 4주간 해당 제형에 대해 사용감 테스트를 진행하였다. 1주일에 3회 이상 제품을 사용하도록 하였으며 총 6주 동안 사용 후 설문조사를 실시하였다. 설문조사 척도는 다음과 같이 진행하였다.

[0118]

5점 : 아주 좋음/ 4점 : 좋음/ 3점 : 보통/ 2점 : 효과 없음/ 1점 : 악화

[0119]

본 발명에 따른 제형에 1 내지 3과 이에 대응하는 비교제형에 1 내지 3에 대하여 비교 사용감 테스트 후 설문조사를 실시한 결과는 하기 표 15 내지 17과 같다.

[0120]

설문조사 결과 본 발명에 따른 조성물을 투입하지 않은 제형보다 투입한 제형에서 높은 점수를 받는 경향을 확인하였으며 이를 통해 본 발명에 따른 조성물을 투입하였을 때 임상적인 효과가 있음을 확인하였다.

표 15

[0121]

설문항목	제형예 1	비교제형예 1
1. 두피의 가려움증상이 감소하였다.	3.8	3.2
2. 비듬이 감소하였다.	3.6	3.3
3. 두피의 피지가 감소하였다.	3.2	3.1
4. 모발의 두께가 두꺼워졌다.	3.0	2.9
5. 샴푸 후 모발의 광택이 느껴진다	4.0	3.5
6. 행굼 시 손가락 통과가 잘된다.	3.2	3.1
7. 건조 후 모발의 손질이 쉽고 부드럽다.	3.4	3.1
8. 샴푸 후 모발의 촉촉함이 오래간다	3.7	3.5

표 16

[0122]

설문항목	제형예 2	비교제형예 2
1. 두피의 가려움증상이 감소하였다.	3.3	3.2
2. 비듬이 감소하였다.	3.4	3.1
3. 두피의 피지가 감소하였다.	3.2	3.2
4. 모발의 두께가 두꺼워졌다.	3.1	3.0
5. 컨디셔너 사용 후 모발의 광택이 느껴진다	3.8	3.6
6. 행굼 시 손가락 통과가 잘된다.	3.6	3.1
7. 건조 후 모발의 손질이 쉽고 부드럽다.	3.7	3.2
8. 컨디셔너 후 모발의 촉촉함이 오래간다	3.5	3.2

표 17

[0123]

설문항목	제형예 3	비교제형예 3
1. 두피의 가려움증상이 감소하였다.	3.8	3.5
2. 비듬이 감소하였다.	3.6	3.3
3. 두피의 피지가 감소하였다.	3.5	3.3
4. 모발의 두께가 두꺼워졌다.	3.5	3.2
5. 샴푸후 모발의 광택이 느껴진다	3.7	3.5

[0124]

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.