



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년08월07일
(11) 등록번호 10-0850686
(24) 등록일자 2008년07월31일

(51) Int. Cl.

A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0030028

(22) 출원일자 2007년03월27일

심사청구일자 2007년03월27일

(56) 선행기술조사문헌

Chem. Pharm. Bull. 52(4), pp. 454~455(2004)*

Molecules, Vol.11, pp. 693~699 (2006).

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

김은기

서울 강남구 대치동 은마아파트 8-212

김동만

서울 구로구 궁동 190-101호

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 6 항

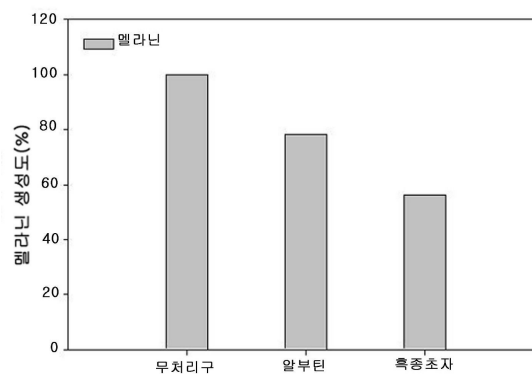
심사관 : 송종민

(54) 피부 미백 활성을 갖는 흑종초자 추출물 및 이를유효성분으로 함유하는 미백용 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 피부 미백 활성을 갖는 흑종초자(*Nigella glandulifera Freyn et Sint*)추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 미백용 화장품 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 멜라닌 생성 세포에서의 멜라닌 생성을 저해하는 흑종초자 추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 미백용 화장품 조성물에 관한 것이며 본 발명의 추출물 및 조성물은 피부 미백 활성이 있으며 세포 독성은 없으므로 피부 미백용 화장품 또는 미백제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

피부 미백 활성을 갖는 흑종초자(*Nigella glandulifera Freyn et Sint*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 흑종초자 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출되는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 2항에 있어서, 저급 알코올은 메탄올인 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 피부 미백 활성은 세포의 멜라닌 생성 저해를 통해 이루어지는 것임을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1항의 피부 미백용 화장품 조성물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생성 억제용 화장품 조성물.

청구항 8

제 1항의 피부 미백용 화장품 조성물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 약학적 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <8> 본 발명은 피부 미백 활성을 갖는 흑종초자(*Nigella glandulifera Freyn et Sint*)추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 미백용 화장품 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 멜라닌 생성 세포에서의 멜라닌 생성을 저해하는 흑종초자 추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 조성물은 피부 미백 활성이 있으며 세포 독성은 없으므로 피부 미백용 화장품 또는 미백제로 유용하게 사용될 수 있다.
- <9> 피부는 외부 환경과 직접 접하면서 인체를 보호하며 생화학적이고 물리적인 기능을 가지고 있는 아주 중요한 조직이다. 이 조직은 크게 3가지 즉, 표피(epidermis), 진피(dermis) 및 피하조직(hypodermis)으로 구성되어 있으며, 주로 인체를 보호하는 장벽역할을 한다. 멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 고분자 물질이며 피부의 색을 결정하는 중요한 색소로서 피부의 표피층에 존재한다. 주로 흑색이나 갈색을 나타내는 유멜라닌(eumelanin)과 노란색이나 레드(red)를 나타내는 페오멜라닌(pheomelanin)이 있다. 멜라닌은 표피의 기저층에 존재하는 멜라노사이트(melanocyte)로부터 만들어진다. 합성된 멜라닌은 인접한 케라티노사이트(keratinocyte)라는 표피 세포로 이동하면서 케라티노사이트의 각화과정을 통해 제거된다.
- <10> 멜라닌 합성 과정을 살펴보면, 멜라노사이트 내의 멜라노좀이라는 소포체에서 먼저 티로시나제(Tyrosinase)라는

효소에 의해 티로신이 도파(DOPA)를 거쳐 도파퀴논(DOPAquinone)으로 전환되고, 도파퀴논으로부터 자동 산화 반응과 효소 반응으로 도파크롬(DOPAchrome)을 거쳐 공중합체인 멜라닌이 생성된다.

- <11> 멜라닌은 햇빛 UV(ultraviolet)의 빛 에너지를 흡수하여 UV에 의한 손상으로부터 진피 이하의 피부 기관을 보호하는 역할을 하며, 피부 생체 내에 생겨난 유해산소 및 유리기(free radical) 등을 잡아주는 등 외부 유해인자로부터 피부를 보호해주는 유용한 역할을 수행한다. 또한, 피부 세포 내의 멜라닌 양에 따라 사람의 피부색이 결정된다. 멜라닌 색소가 많은 사람은 갈색 또는 검은 색 피부를 갖는 반면, 멜라닌 색소가 적은 사람은 흰색의 피부를 갖게 된다.
- <12> 그러나 멜라닌이 비정상적으로 적게 생산되면 백반증과 같은 피부병변이 유발되고, 반대로 일광, 호르몬 변화, 염증 또는 약제 등 여러 가지 환경적 요인에 의해 멜라닌이 과도하게 합성되거나 각화작용이 원활히 이루어지지 않아 피부에 손상을 줄 뿐만 아니라 색소가 침착되면 기미, 주근깨를 형성하며, 이와 같은 병변으로부터 나아가 피부암의 원인이 되기도 한다. 그러므로 이러한 색소 침착 현상을 방지하기 위해서는 멜라닌 생성 과정의 일부분을 저해하여 멜라닌의 생성을 감소시켜야 한다.
- <13> 피부에서의 색소침착 방지는 주로 다음의 네 가지 관점에서 연구되어 왔다. 첫째로, 멜라닌 합성의 주효소인 티로시나아제(tyrosinase) 활성을 조절하기 위하여 티로시나아제 합성 저해 물질이나, 티로시나아제의 기질에 대한 길항물질(antagonist)을 개발한다. 둘째로, 동물의 멜라닌 생합성 장소인 멜라노사이트의 기능을 저하시키기 위해 멜라노사이트에 독성을 나타내는 물질을 개발한다. 셋째로, 멜라닌 합성 경로의 중간 대사물질인 도파(dopa)의 산화방지를 위해 도파 환원물질을 개발한다. 마지막으로, 멜라닌 생성 기구인 제 1 효소 티로시나아제와 도파크롬(DOPA chrome)에서 DHICA로의 변환을 촉매 하는 제 2 효소인 도파크롬 타우토머라아제(DOPA chrome tautomerase), 및 DHICA에서 인돌-5,6-퀴논-2-카르복실산(indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid)으로의 변환을 촉매하는 제 3 효소의 활성을 동시에 감소시킨다.
- <14> 최근, 동양권의 여성들은 백옥같이 하얗고 깨끗한 피부를 선호하며 이를 미의 중요한 기준으로 삼고 있기 때문에 피부색소 이상 침착의 치료 및 미용 욕구 충족을 위한 미백제에 대한 개발이 활발히 이루어지고 있다.
- <15> 미백제의 개발에 있어서, 생성된 멜라닌 색소를 환원시켜 탈색하는 방법과 멜라닌 색소를 형성하는 효소인 티로시나아제의 활성을 억제하는 방법이 알려져 있다. 그러나 멜라닌 색소를 환원시키기 위해 사용되는 토코페롤이나 비타민류 등을 사용한 미백제는 멜라닌 색소의 탈색효과가 아주 작은 것으로 알려져 있다. 따라서 티로시나아제의 활성을 저해시킴으로써 멜라닌 색소의 생성을 억제하는 저해제가 주목받고 있다.
- <16> 종래의 화장품 분야에서는 미백 성분으로서, 예를 들면, 코지산(Kojic acid), 알부틴(Arbutin) 등과 같은 티로시나아제 효소 활성을 억제하는 물질, 하이드로퀴논(Hydroquinone), 비타민 C(L-Ascorbic acid) 및 이들의 유도체와 각종 식물 추출물이 사용되어 왔다.
- <17> 그러나, 처방계 중에서의 안정성이 나빠 분해되어 착색되거나, 이취의 발생, 생체 레벨에서의 효능, 효과의 불분명 및 안전성 문제 등으로 그 사용이 제한되고 있는 실정이다. 코지산은 티로시나아제의 활성 부위에 존재하는 구리 이온을 흡착시켜 효소활성을 저해하지만, 화장품에 배합 시 불안정성, 피부 부작용의 문제 및 최근 동물실험 결과 간암을 유발한다고 밝혀져 화장품 원료로 사용이 중지되었다. 비타민 C 및 그 유도체는 산화가 잘되는 불안정성 때문에 화장품 원료로서 사용이 어려우며, 하이드로퀴논은 피부에 대한 미백효과는 탁월하지만 알레르기 반응을 유발하는 성질, 멜라닌 생성 세포에 대한 독성, 피부의 영구 탈색화 등 피부에 대한 자극성이 높으며, 최근 발암성 물질로 규정되어 사용이 금지되어 각 나라별로 제한적인 농도만 허가하고 있다. 또한, 알부틴은 하이드로퀴논에 글루코피라노사이드(Glucopyranoside)가 결합된 유도체로 하이드로퀴논 사용 시 나타나는 부작용이 적으면서 인체에 대한 독성은 없이 멜라닌 색소의 합성을 억제하는 작용이 있어, 멜라닌 색소 침착이 증가되는 피부 질환의 치료제로서의 이용 가능성이 제시되었으나, 피부 효소에 의해 일부 분해되는 단점이 있다.
- <18> 이들 미백 물질들 외에 천연물, 특히 식물 중에서 미백 활성 성분을 찾기 위한 연구도 계속 이루어져 왔고, 그 중 상백피(일본공개특허 소 55-44375호, 소 64-26507호, 소 64-83009호, 평 1-25687호 및 평 5-139950호, 및 대한민국 공개특허 제92-002109호 및 제97-021273호), 감초(일본공개특허 소 60-214721호, 소 60-214728호, 소 63-23809호, 소 64-63506호 및 평 1-149706호, 및 대한민국 공개특허 제92-002109호 및 제97-025601호), 작약(일본공개특허 소 61-246109호 및 대한민국 공개특허 제92-002111호), 계피(일본공개특허 소 63-30403호 및 평 5-139954호), 고삼(일본공개특허 소 64-26507호 및 대한민국 공개특허 제92-002110호), 갈근(일본공개특허 소 60-214727호 및 소 64-16709호), 당귀(일본공개특허 소 56-92211호 및 평 4-26610호), 목단피(일본공개특허 소 60-214721호, 소 61-50915호 및 소 61-246109호), 반하(일본공개특허 평 2-207028호 및 대한민국 공개특허 제

96-033442호), 알로에(일본공개특허 소52-44375호, 평 2-207030호 및 평 5-139950호) 등의 다수의 식물 추출물 및 생약재 추출물 등이 티로시나제에 작용하여 멜라닌 생성을 억제한다는 사실이 밝혀졌으나, 이들 역시 안전성, 변색 가능성 등의 측면에서 화장품이나 의약품에 유효 농도 이상으로 사용하는 데는 많은 문제점이 있으며, 아직 뛰어난 효과를 나타내지도 못하고 있는 실정이다. 따라서 천연에서 유래되는 효능이 뛰어난 미백제가 절실히 요구되고 있다.

<19> 한편, 흑종초자는 흑종초(*Nigella glandulifera* Freyn)의 종자로서 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속한다. 중국의 신장, 운남, 저장 등의 지역에 널리 분포되어 있고 주로 감기나 기침 또는 불면증을 치료하는 민간요법으로 널리 알려져 있다. 중국 위구르족은 요리에도 많이 첨가하는데 이뇨, 진통, 진경, 최유, 천식완화 등의 작용이 있는 것으로 알려져 있고 부종과 요도결석, 기관지 천식 등을 치료할 수 있다고 한다.

<20> 이에, 본 발명자들은 피부에 안전하고 변색 가능성이 적은 미백 화장료 조성물에 대하여 천연 약용 식물 중에서 연구하던 중, 중국의 고산지대에서 자생하는 식물인 흑종초에서 추출한 추출물이 멜라닌 생성 저해 활성이 우수함을 확인하고 피부 미백용 화장료 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<21> 본 발명의 목적은 피부 미백 활성을 갖는 흑종초자 추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 미백용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<22> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 피부 미백 활성을 갖는 흑종초자(*Nigella glandulifera* Freyn et Sint) 추출물을 제공한다.

<23> 또한, 본 발명은 흑종초자 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

<24> 또한, 본 발명은 흑종초자 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생성 억제제를 제공한다.

<25> 아울러, 본 발명은 흑종초자 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 약학적 조성물을 제공한다.

<26> 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

<27> 본 발명은 피부 미백 활성을 갖는 흑종초자(*Nigella glandulifera* Freyn et Sint) 추출물을 제공한다.

<28> 본 발명에 따른 흑종초자 추출물은 다음과 같이 제조될 수 있다.

<29> 흑종초자를 물로 깨끗이 세척한 후, 그늘에서 건조한다. 건조된 흑종초자를 추출 용기에 넣고, 물, 알코올 또는 이들의 혼합물로 적절한 온도에서 일정 시간 추출한다. 추출물은 여과되고, 농축될 수 있다.

<30> 상기 추출 용매로는 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 사용하는 것이 바람직하며, 메탄올을 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

<31> 상기 추출 용매의 양은 생약 건조 중량의 2 내지 10배로, 바람직하게는 4배로 한다.

<32> 상기 추출 방법은 열 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 열 추출의 추출방법으로 1회 내지 5회 추출될 수 있다.

<33> 상기 침적 온도는 30 내지 70℃이며, 보다 바람직하게는 40 내지 60℃이며, 가장 바람직하게는 50℃ 정도로 유지하는 것이 부패, 변색 및 변취의 예방에 가장 효과적이다.

<34> 상기 침적 시간은 5 내지 20 시간이며, 바람직하게는 10 시간이다.

<35> 상기 흑종초자 추출물을 수득한 후, 거름종이 등을 이용하여 고형분을 제거하고, 현탁액을 원심분리시키고, 상층액을 감압 여과할 수 있다. 상기 여과된 추출물은 질소를 이용하여 추출물 내 메탄올을 제거함으로써 농축한다.

<36> 본 발명에 의한 흑종초자 추출물은 일반적인 미백 물질로 알려진 알부틴보다 B16 멜라노마 세포에서 3배 이상 멜라닌 생성을 저해함으로써(표 1 및 도 1 참조) 미백 효과를 갖는다. 흑종초자 추출물을 B16 멜라노마 세포에 처리하면 농도 의존적으로 세포의 색이 흐려지는데(도 2 참조) 이는 B16 멜라노마 세포의 멜라닌 양이 흑종초자 추출물에 농도 의존적으로 감소함을 의미한다. 또한, 멜라닌 생성도도 흑종초자 추출물에 농도 의존적으로 저

해되며 IC₅₀ 값은 118.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 나타낸다(도 3 참조).

- <37> 세포 독성면에서 살펴보면, B16 멜라노마 세포에 흑종초자 추출물을 높은 농도(100 mg/ml)로 처리하여도 세포 생존율은 우수하며(표 2 및 도 4 참조) 흑종초자 추출물을 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 B16 멜라노마 세포에 각각 투여하면 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지 독성을 나타내지 않음을 알 수 있다(도 5 참조).
- <38> 상기와 같이 흑종초자 추출물은 멜라닌 생성 저해능이 우수할 뿐만 아니라 독성도 없으므로 피부 미백 활성을 갖는 추출물로 제공될 수 있다.
- <39> 또한, 본 발명은 흑종초자 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.
- <40> 본 발명의 흑종초자 추출물은 상기와 같이 과다한 멜라닌 생성을 억제하므로 미백용 화장료 조성물에 효과적으로 사용될 수 있다.
- <41> 본 발명의 조성물에서 상기 흑종초자 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.005 내지 50 중량 % 함유되는 것이 바람직하지만, 미백 효과가 있고 독성이 나타나지 않는 범위에서 사용 용도에 따라서 상기 범위 이상 또는 이하로도 사용될 수 있다.
- <42> 본 발명의 조성물은 상기 흑종초자 추출물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- <43> 본 발명의 흑종초자 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물로 제조되는 화장품은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조할 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다. 또한, 본 발명의 흑종초자 추출물을 함유하는 화장품 이외에도 피부 과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유함으로써 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 국소 적용 또는 전신 적용할 수 있는 보조제 형태로 제조될 수 있다.
- <44> 적합한 화장품의 제형으로는 예를 들면, 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱(conceal stick)의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.
- <45> 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 흑종초자 추출물에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 그리고, 상기의 성분들은 피부과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.
- <46> 본 발명의 화장료 조성물의 구체적인 제형으로는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형을 포함한다.
- <47> 또한, 본 발명은 흑종초자 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생성 억제제를 제공한다
- <48> 상기에서 살펴본 바와 같이 흑종초자 추출물은 일반적인 미백 물질로 알려진 알부틴보다 3배 이상 멜라닌 생성을 저해하므로 본 발명의 흑종초자 추출물은 멜라닌 생성 억제제로서 제공될 수 있다.
- <49> 본 발명의 멜라닌 생성 억제제의 구체적인 제형으로는 시럽제, 정제, 캡슐제, 트로키제, 액제 또는 현탁제 등이 이용가능하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- <50> 아울러, 본 발명은 흑종초자 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 약학적 조성물을 제공한다.
- <51> 본 발명의 약제 조성물은 경구투여용 제형, 예를 들면 정제, 산제, 캡슐제, 트로키제, 액제, 현탁제 등의 경구투여용 제제; 또는 연고제 등의 다양한 제제로 제형화 할 수 있다. 통상적인 담체를 사용하여 제조된 약학적 제제는 경구적으로 투여하거나, 비경구적으로 예를 들면, 피부 또는 국소 적용할 수 있다. 또한, 상기 유효성분의 투여 용량은 환자의 나이, 상태 등에 따라 차이가 있으나, 일반적으로 성인에게 1일에 10 ~ 500 mg, 바람

직하게는 50 ~ 300 mg의 양이 투여되도록 하며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 수회, 바람직하게는 1회 내지는 6회 분할 투여할 수 있다.

<52> 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제제예에 의해 상세히 설명한다.

<53> 단, 하기 실시예, 실험예 및 제제예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제제예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<54> <실시예 1> 피부 미백용 흑종초자 추출물의 제조

<55> 본 실시예의 흑종초자(*Nigella glandulifera* Freyn et Sint)는 중국의 고산지방에서 채취한 것을 사용하였다. 채취한 식물을 메탄올로 재빨리 씻어 이물질을 제거한 후 건조하였다. 건조된 식물 1 kg을 99.5% 메탄올 200 ml에 침지시켜 40℃ 수욕조에서 10 시간 동안 온탕하였다. 수득한 추출액을 실온으로 냉각시키고 거름종이로 여과하여 여과액을 취하였다. 회전진공농축기로 농축시킨 후 질소를 사용하여 여과액에서 남은 메탄올을 증발시켜 흑종초자 추출물을 140 g정도 수득하였다. 세포에 처리시 99.5% 메탄올에 녹여서 사용하였다.

<56> <실험예 1> 미백 효과 측정

<57> <1-1> B16 멜라노마 세포 배양

<58> B16 멜라노마 세포는 ATCC(The American Type Culture Collection)에서 분양받아 사용하였다. B16 멜라노마 세포는 멜라닌을 생산하는 세포주로서 일반적으로 미백물질 스크리닝에 사용된다.

<59> 상기 세포를 배양하기 위한 배지는 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지를 제조, 멸균하여 무균상태로 만들었다. 세포 배양은 37℃, 5% CO₂의 인큐베이터에서 배양하였다. 멜라노마 세포를 3일 정도 배양하여 100 mm 패트리 디쉬가 90% 정도 찼을 때 계대 하였다.

<60> <1-2> 흡광도 측정을 통한 멜라닌 저해 측정

<61> 흑종초자 추출물의 미백효과 측정을 위하여 B16 멜라노마 세포에 흑종초자 추출물 또는 알부틴을 처리하여 생성된 멜라닌 양의 변화를 측정하였다. 6웰 플레이트에 세포를 접종(seeding)하고 24 시간 후 실시예에서 제조한 흑종초자 추출물 또는 알부틴을 일정한 농도로 처리하여 다시 48 시간 배양한 후, 트립신-EDTA를 이용하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포에 10% DMSO(Dimethylsulfoxide)를 포함하는 1N NaOH를 가해 80℃에서 1 시간 동안 반응시켜 멜라닌이 충분히 녹아나오도록 한 후, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 리더(reader)를 이용하여 파장 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 생성도는 하기 수학적 식 1을 이용하여 계산하였다. 그 결과, 일반적인 미백 물질로 알려진 알부틴의 경우 무처리구와 비교했을 때, 200 µg/ml의 농도에서 멜라닌의 양이 78.2%인 것에 반해, 흑종초자 추출물은 100 µg/ml 농도에서 56.2%로 알부틴보다 약 3배 정도 더 높은 멜라닌 생성 저해 효과를 가짐을 확인할 수 있다(표 1 및 도 1). 또한 흑종초자 추출물의 농도를 0 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml 및 150 µg/ml로 하여 상기와 같은 방법으로 측정할 경우, 세포의 색은 농도 의존적(0 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml 및 150 µg/ml)으로 흐려지는 것을 관찰할 수 있다(도 2). 또한, 멜라닌 생성도도 흑종초자 추출물에 농도 의존적(0 µg/ml, 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml 및 150 µg/ml)으로 감소하는 것을 관찰할 수 있으며 IC₅₀ 값은 118.5 µg/ml이었다(도 3).

수학적 식 1

<62> 멜라닌 생성도(%) = 처리구 흡광도/무처리구 흡광도 × 100

표 1

시료명	무처리구	알부틴	흑종초자 추출물
멜라닌 생성도(%)	100	78.2	56.2

<64> <실험예 2> 독성 시험

<65> 흑종초자 추출물을 미백 화장품 조성물로 사용할 수 있는지 여부를 판단하기 위하여, 세포 독성 실험을 실시하였다. 96웰 플레이트에 세포를 접종하고 24 시간 후, 흑종초자 추출물을 일정한 농도로 처리하여 37℃, 5% CO₂의 인큐베이터에서 배양하였다. 48 시간 배양 후, 배지를 제거하고 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium, bromide) 용액 100 μl 을 첨가하여 37℃에서 4 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 용액을 제거하고 DMSO 100 μl 를 첨가하여 염색된 세포를 녹인 후 ELISA 리더(reader)를 이용하여 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 하기 수학식 2를 이용하여 계산하였다. 그 결과, 흑종초자 추출물(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리한 구는 무처리구와 비교하였을 때, 세포 생존율이 97.1%로 나타났다(표 2 및 도 4). 또한, 흑종초자 추출물의 농도를 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 하여 상기와 같은 방법으로 각각 세포 생존율을 측정한 결과, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지 독성을 나타내지 않았다(도 5).

수학식 2

<66> 세포생존율(%) = (처리구 흡광도/무처리구 흡광도) $\times$ 100

표 2

시료명	무처리구	알부틴	흑종초자 추출물
세포 생존율(%)	100	98.3	97.1

<68> 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

<69> <제제예 1> 흑종초자 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백 화장료의 제조

<70> <1-1> 유연 화장수의 제조

<71> 흑종초자 추출물을 유효성분으로 함유하는 유연 화장수의 제제예는 하기 표 3과 같이 제조하였다.

표 3

원료	함량(중량부)
흑종초자 추출물	10.00
1,3-부틸렌글리콜	1.00
디소듐이디티에이	0.05
알란토인	0.10
디포타슘글리시리제이트	0.05
시트릭에씨드	0.01
소듐시트레이트	0.02
글리세레스-26	1.00
알부틴	2.00
하이드로제네이티드캐스터오일	1.00
에탄올	30.00
보존제	미량
착색제	미량
착향제	미량
정제수	잔량

<73> <1-2> 영양 크림의 제조

<74> 흑종초자 추출물을 함유한 영양크림의 제제예는 하기 표 4의 조성과 같이 제조하였다.

표 4

원료	함량(중량부)
흑종초자 추출물	10.0
1,3-부틸렌 글리콜	7.0
글리세린	1.0
D-판테놀	0.1
식물 추출물	3.2

마그네슘알루미늄실리케이트	0.3
PEG-40 스테아레이트	1.2
스테아릭애씨드	2.0
폴리소르베이트 60	1.5
친유형글리세릴스테아레이트	2.0
소르비탄세스퀴올리에이트	1.5
세테아틸알코올	3.0
미네랄오일	4.0
스쿠알란	3.8
카르틸릭/카프릭트리글리세라이드	2.8
식물성 오일	1.8
디메치콘	0.4
디포타슘글리시리제이트	미량
알란토인	미량
소듐 히아루로네이트	미량
토코페릴아세테이트	적량
트리에탄올아민	적량
보존제	적량
착향제	적량
정제수	잔량

<76> <제제예 2> 흑종초자 추출물을 유효성분으로 함유하는 멜라닌 생성 억제제의 제조

<77> <2-1> 시럽제의 제조

<78> 흑종초자 추출물을 유효성분으로 함유하는 시럽제는 하기 표 5의 조성으로 제조하였다.

표 5

<79>

구성성분	함량(중량부)
흑종초자 추출물	2
사카린	0.8
당	25.4
글리세린	8
향미료	0.04
에탄올	4
소르브산	0.4
증류수	60

<80> <2-2> 정제의 제조

<81> 흑종초자 추출물을 유효성분으로 함유하는 정제는 하기 표 6의 조성으로 제조하였다.

표 6

<82>

구성성분	함량(중량부)
흑종초자 추출물	250
락토오스	175.9
감자전분	180
콜로이드성 규산	32
10% 젤라틴 용액	
감자전분	160
활석	50
스테아르산 마그네슘	5

- <83> 흑종초자 추출물 250 중량부, 락토오스 175.9 중량부, 감자전분 180 중량부 및 콜로이드성 규산 32 중량부와 혼합하였다. 상기 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄하여 14 매쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조하고 여기에 감자전분 160 중량부, 활석 50 중량부 및 스테아린산 마그네슘 5 중량부를 첨가하여 얻은 혼합물을 정제로 제조하였다.
- <84> <제제예 3> 흑종초자 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 제제의 제조
- <85> <3-1> 산제의 제조
- <86> 흑종초자 추출물 2 g
- <87> 유당 1 g
- <88> 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- <89> <3-2> 정제의 제조
- <90> 흑종초자 추출물 100 mg
- <91> 옥수수전분 100 mg
- <92> 유 당 100 mg
- <93> 스테아린산 마그네슘 2 mg
- <94> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- <95> <3-3> 캡슐제의 제조
- <96> 흑종초자 추출물 100 mg
- <97> 옥수수전분 100 mg
- <98> 유 당 100 mg
- <99> 스테아린산 마그네슘 2 mg
- <100> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

발명의 효과

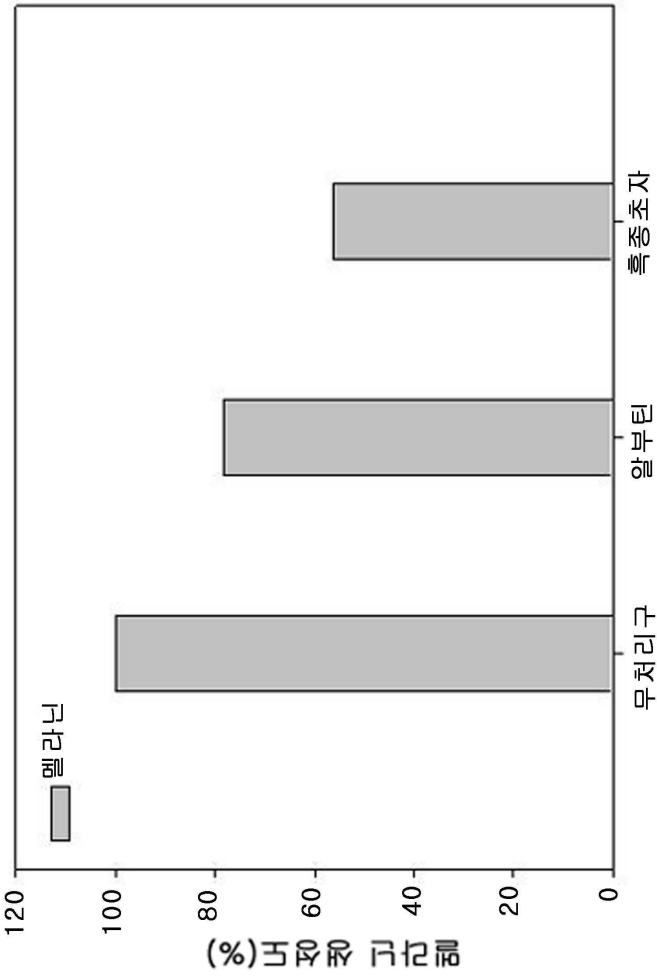
- <101> 본 발명의 흑종초자 추출물은 B16 멜라노마 세포에 의한 멜라닌 생성을 저해하며, 세포 독성은 없으므로, 피부 미백용 화장품 조성물, 멜라닌 생성 억제제 및 미백용 약학적 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

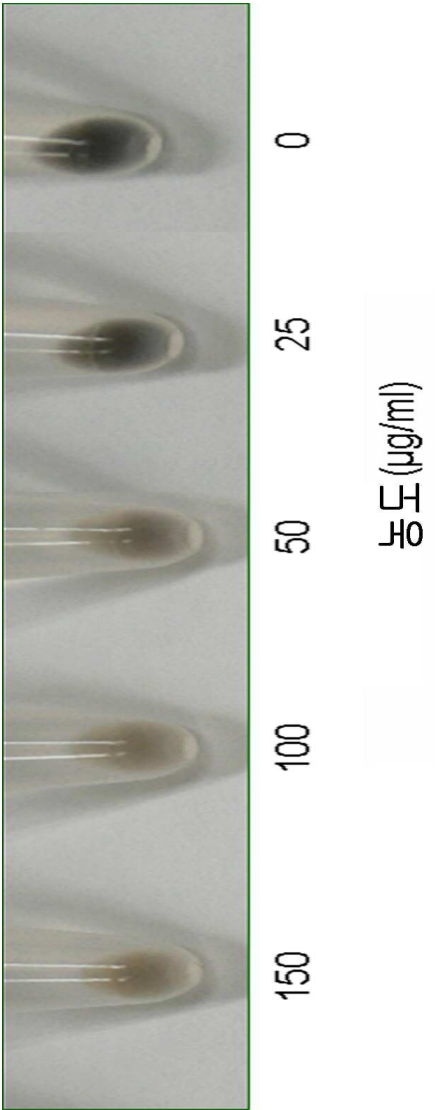
- <1> 도 1은 흑종초자(*Nigella glandulifera* Freyn et Sint) 추출물 처리시 멜라닌 생성도를 나타낸 그래프이다.
- <2> 도 2는 흑종초자 추출물의 농도별 처리시 세포의 색을 나타낸 사진이다.
- <3> 도 3은 흑종초자 추출물의 농도별 처리시 IC₅₀를 나타낸 그래프이다.
- <4> *: p< 0.05 및 **: p< 0.01
- <5> 도 4는 흑종초자 추출물 처리시 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.
- <6> 도 5는 흑종초자 추출물의 농도별 처리시 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.
- <7> *: p< 0.05 및 **: p< 0.01

도면

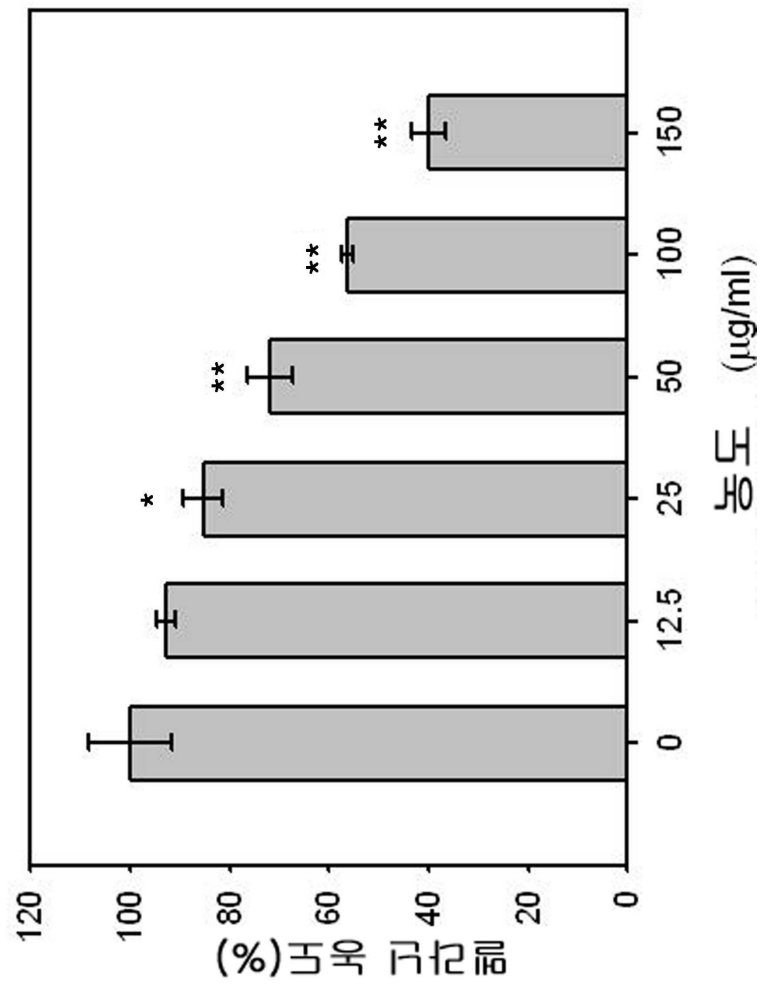
도면1



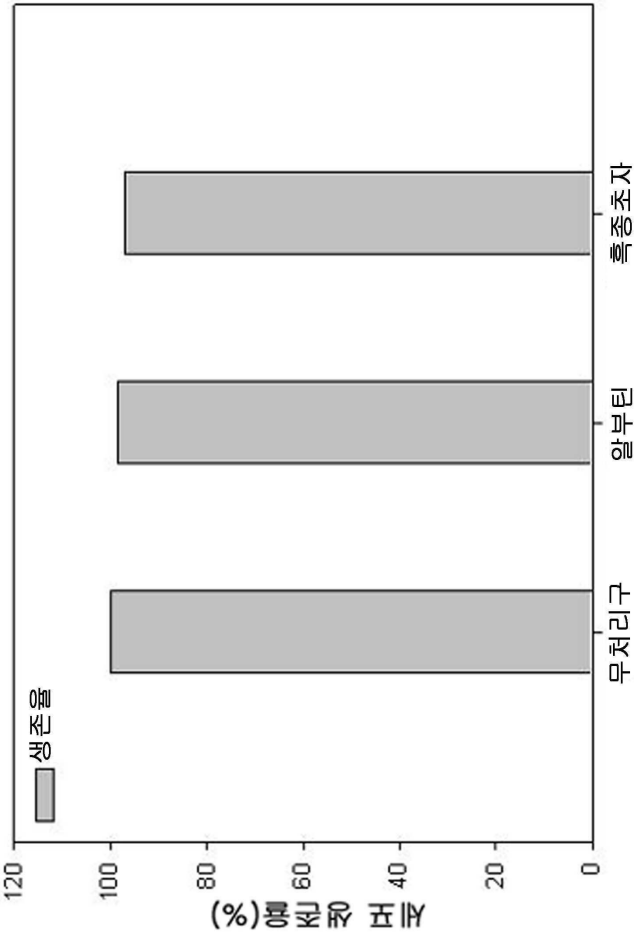
도면2



도면3



도면4



도면5

