



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0034988
(43) 공개일자 2018년04월05일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 8/97</i> (2017.01) <i>A61Q 5/00</i> (2006.01)
 <i>A61Q 7/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 8/97</i> (2013.01)
 <i>A61Q 5/00</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0124903
 (22) 출원일자 2016년09월28일
 심사청구일자 없음</p> | <p>(71) 출원인
 충남대학교산학협력단
 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
 김기광
 충청남도 청양군 장평면 묵은논길 67
 박준영
 대전광역시 유성구 배울로 13, 205동 1402호(관평동, 대덕테크노밸리2단지아파트)</p> <p>(74) 대리인
 최규환</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 5 항

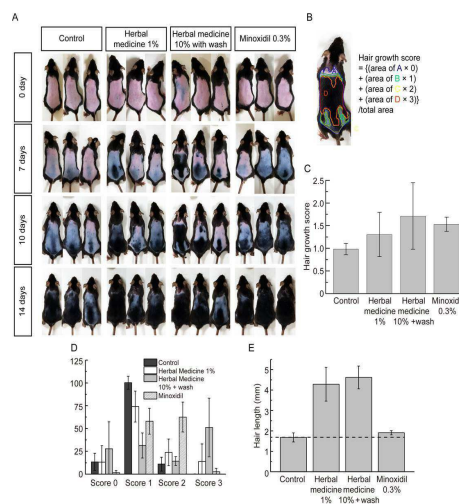
(54) 발명의 명칭 **복합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 및 탈모 촉진용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 복합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 및 탈모 촉진용 조성물에 관한 것이다. 상세하게는 홍삼, 감초, 유근피, 황련, 지골피, 생지황, 고삼, 석창포, 원지 및 우슬을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 및 탈모 촉진용 조성물에 관한 것이다.

상기 복합 생약 추출물이 모유두 세포(dermal papilla cells)에 대한 세포 독성이 없고, 세포 성장을 증가시킬 뿐만 아니라, 모유두 세포에 복합 생약 추출물을 처리하였을 때에도 항산화능을 가지고 있으며, 5 α -리덕타아제 활성을 효과적으로 억제하고, 마우스 모델에서 대조군에 비하여 모낭에서 털이 자라나는 속도가 빠르므로, 탈모 방지 또는 탈모 촉진용 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어컨디셔너, 헤어트리트먼트 또는 헤어토닉용 조성물로 활용가능하다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61Q 7/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C03284430100438026

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 첫걸음 기술개발 사업

연구과제명 천연물 유래 모근세포 활성화 물질의 개발 및 상용화

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

복합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 탈모방지 및 발모촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 복합 생약 추출물은 홍삼, 감초, 유근피, 황련, 지골피, 생지황, 고삼, 석창포, 원지 및 우슬을 포함하는 것을 특징으로 하는 탈모방지 및 발모촉진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 탈모방지 및 발모촉진용 조성물은 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어컨디셔너, 헤어트리트먼트 또는 헤어토닉용인 것을 특징으로 하는 탈모방지 및 발모 촉진용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 복합생약 추출물의 용매는 물, C₁~C₄의 저급알코올 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 탈모방지 및 발모 촉진용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 복합 생약 추출물은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 탈모방지 및 발모 촉진용 조성물:

(1) 물 100 중량부에 대하여, 1~3중량부의 원지, 1~3중량부의 지골피, 1~3중량부의 우슬, 1~3중량부의 석창포 및 1~3중량부의 생지황을 혼합한 제1 혼합물;

물 100 중량부에 대하여, 1~3중량부의 홍삼, 1~3중량부의 고삼 및 1~3중량부의 유근피를 혼합한 제2 혼합물; 및

물 100 중량부에 대하여, 1~3중량부의 감초 및 1~3중량부의 황련을 혼합한 제3 혼합물;을 각각 90~100℃에서 5~7시간 동안 열수 추출하는 단계;

(2) 상기 제1 혼합물의 추출물, 제2 혼합물의 추출물 및 제3 혼합물의 추출물을 동량의 부피비로 재혼합하여 90~100℃에서 5~7시간 동안 추출하는 단계; 및

(3) 상기 단계 (2) 이후에, 원심분리하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 복합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 및 발모 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 탈모는 전 세계적으로 발병률이 높고 이로 인하여 야기되는 정신적 스트레스는 대인관계나 사회생활에 많은 지장을 초래하여 삶의 질을 저하시킨다. 기존의 탈모 관련 제품들은 주로 남성호르몬의 활성 조절을 하거나 혈관의 확장을 통해 탈모 억제 및 발모 효과를 유도하는데, 이러한 제품들의 장기적인 이용은 성 기능 저하 및 약물 내성을 보이는 등의 부작용을 일으킨다. 따라서 탈모 치료에 있어서 부작용을 최소화한 새로운 탈모 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

[0003] 모낭에서 모발 생성은 성장기, 퇴행기, 휴지기의 반복되는 주기를 가지며 성장기가 단축되거나 퇴행기와 휴지기가 길어짐에 의해 탈모증이 발생한다. 남성 호르몬인 테스토스테론(testosterone)은 모유두 세포의 5 α -리덕타아제와 작용하여 DHT(dihydrotestosterone)를 생성한다. 이때 생성된 DHT는 모유두 세포의 안드로젠 수용체와

결합함으로써 모낭의 성장기를 단축시켜 남성형 탈모증을 유발한다. 현재 미국 식품의약국에 승인받은 탈모 치료제는 피나스테리드(Finasteride)와 Minoxidil(미녹시딜)이 있다. 상기 피나스테리드(Finasteride)는 5 α -리덕타아제의 활성을 억제하여 탈모의 진행을 지연시키고 발모를 유도하지만 6개월 이상의 복용 기간이 필요하고 성기능 저하나 기형아 출산과 같은 부작용이 발생한다. Minoxidil(미녹시딜)은 혈관 확장을 통한 영양공급의 증가 및 칼륨 채널의 개방을 통해 발모 효과를 유도하는 것으로 알려져 있다. 하지만 Minoxidil(미녹시딜)은 탈모증의 근본적 원인을 치료하지 못하여 영구적으로 제품을 사용해야 하며 사용을 중단할 경우 다시 탈모가 나타나 는 단점이 있다.

[0004] 한편, 홍삼은 인삼을 찌고 말리기를 반복하여 붉은색으로 변환 삼으로, 다양한 사포닌이 함유되어 있어 원기 회복, 면역력 증강, 자양 강장에 도움을 줄 뿐만 아니라, 항산화 작용을 한다.

[0005] 감초는 한국과 일본에서는 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fischer), 유럽감초(*Glycyrrhiza glabra* L.) 또는 기타 동속식물의 뿌리와 줄기 일부를 껍질이 붙은 채로, 또는 껍질을 벗겨서 사용한다. 중국에서는 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fischer:甘草), 광과감초(*Glycyrrhiza glabra* L.:光果甘草), 창과감초(*Glycyrrhiza inflata* Batal:脹果甘草)의 말린 뿌리를 사용한다. 감초는 모든 약의 독성을 조화시켜서 약효가 잘 나타나게 하며 장부의 한열과 사기를 다스리고 모든 혈액의 소통을 잘 시키며 근육과 뼈를 튼튼히 한다. 약리작용은 해독작용, 간염, 두드러기, 피부염, 습진 등에 효과가 있다. 진해·거담, 근육이완, 이뇨작용, 항염작용이 있으며 소화성궤양을 억제한다. 감초의 껍질은 적갈색이나 암갈색을 띠며 세로로 주름이 있고 때때로 피목, 싹눈 및 비늘잎이 붙어 있다. 껍질 벗긴 감초는 바깥 면이 얇은 황색이고 섬유성이다.

[0006] 유근피는 느릅나무과 느릅나무의 나무껍질 혹은 뿌리 껍질을 말하며, 위장병, 장염, 기관지염 비염 불면증, 기미, 주근깨에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0007] 황련은 미나리아재비목 미나리아재비과의 상록 여러해살이풀로서 건위·진정·소염·항균 등의 효능이 있어 소화불량·위염·장염·복통·구토·이질·심계(心悸)·번열(煩熱)·정신불안·인후종통(咽喉腫痛)·토혈·코피·하혈·화상 등의 치료에 처방한다.

[0008] 지골피는 구기자나무(*Lycium chinense* Miller) 또는 기타 동속 식물(가짓과 Solanaceae)의 뿌리껍질을 말린 약재(한국)이며, 일본에서는 구기자나무(*Lycium chinense* Miller) 및 영하구기자(*Lycium barbarum* L.:寧夏枸杞子)를 말한다. 중국에서는 영하구기자(*Lycium barbarum* L.:寧夏枸杞子)만을 공정생약으로 수재하고 있다. 지골피는 몸이 허약하여 생기는 식은땀, 해수, 천식, 토혈, 코피, 소변출혈, 고혈당, 고혈에 좋으며 신경통, 두통, 어깨통증, 근육통, 요통, 허리와 무릎의 무력감이 있는 경우에 사용하고, 심혈관계통의 혈압강화작용 및 혈당강화작용을 한다는 것이 알려져 있다.

[0009] 생지황은 지황(*Rehmannia glutinosa* Liboschitz ex Steudel(현삼과 Scrophulariaceae)의 신선한 뿌리이다. 가을에 채취하여 노두, 뿌리털 및 흙모래를 제거하고 신선한 것을 썰거나 80%까지 마르도록 hong진한 것을 쓴다. 전자를 선지황(鮮地黃), 후자를 생지황(生地黃)이라고 하였다.

[0010] 고삼은 한국, 중국, 일본 모두 고삼(*Sophora flavescens* Aiton)의 주피를 거의 벗긴 뿌리를 사용한다. 한국과 일본은 고삼가루도 약용한다. 약리효과로는 백혈구감소증 치료 및 항방사능작용, 관상동맥혈류량 증가, 심장근육 강화, 혈당 낮추는 작용, 항종양, 항균, 면역기능 억제작용 등이 보고되었다.

[0011] 석창포는 사철 푸른 잎을 가진 여러해살이풀로, 뿌리줄기는 굵고 딱딱하며 많은 마디가 있으며 잔뿌리를 내어 바위틈과 같은 자리에 붙어 자란다. 잎은 뿌리줄기로부터 밑동이 서로 겹친 상태로 자라난다. 좁은 줄 꼴로 길기며 윤기가 난다. 잎 끝은 칼처럼 뾰족하고 가장자리는 밋밋하며 항상 좋은 향기를 풍긴다. 꽃은 잎과 같은 생김새를 가진 꽃대의 중간부에 둥근 막대기 모양으로 뭉쳐 핀다. 꽃이 뭉친 막대기의 길이는 5cm 안팎이고 빛깔은 노란빛을 띤 푸른색이다. 호흡을 조절해주고 혈액순환을 원활하게 해주는 이외에 풍기를 흠어지게 해주며 건위, 거습, 소종 등의 효능이 있다. 적용질환은 속이 몹시 답답한 증세와 정신이 혼미한 증세, 건망증, 간질병 등을 치료하는 데에 쓴다. 또한 소화불량이나 위통, 복통, 악성종기, 타박상에 의한 멍, 눈이 붉게 충혈되는 증세 등에 사용한다.

[0012] 원지는 원지(*Polygala tenuifolia* Willdenow)의 뿌리이다. 원지는 그 처리방법에 따라 원지통(遠志筒), 원지육(遠志肉) 및 원지곤(遠志棍)으로 나눈다. 즉, 3~4년 된 것을 봄과 가을에 채취하여 바깥 껍질이 쪼글쪼글해질 때까지 말리고 그대로 목심을 꺼낸 것을 원지통(遠志筒)이라 하고, 이를 가로로 자르고 목심을 꺼낸 것은 원지육(遠志肉)이라 하며, 너무 가늘어서 목심을 제거하지 못하고 그대로 말린 것을 원지곤(遠志棍)이라 한다. 뿌리로 원기둥 모양이며 가늘고 길며 구부러져 있다. 원뿌리는 길이 10~20cm, 지름 0.2~1cm이다. 바깥 면은 연한 회

황색~회갈색이며 비교적 조밀하고 깊게 패인 가로주름무늬, 세로주름무늬 및 벌어진 무늬가 있다. 오래된 뿌리는 가로주름무늬가 비교적 조밀하고 더욱 깊게 패여 있으며 약간 결절상을 나타낸다. 질은 단단하면서 취약하고 자르기 쉽다. 자른 면은 피부가 황갈색이고 목부는 황백색이며, 피부와 목부는 분리되어 떨어지기 쉽고, 어떤 것은 이미 목심을 제거해 버린 것도 있다. 특유한 냄새가 약간 있고 맛은 약간 아리다.

[0013] 우슬은 우리나라에서는 비름과의 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai) 또는 우슬(*Achyranthes bidentata* Blume:牛膝)의 뿌리를 말하며, 일본에서는 우슬(*Achyranthes bidentata* Blume:牛膝)과 털쇠무릎(*Achyranthes fauriei* H. Lev. & Vaniot)을 쓴다. 중국은 우슬(*Achyranthes bidentata* Blume:牛膝)만을 인정하고 있다. 약리작용으로 자궁흥분작용, 콜레스테롤 강하작용, 이뇨작용, 혈당강하작용, 간기능 개선작용 등이 보고되었다.

[0014] 한편, 천연물 소재의 탈모방지 또는 발모 촉진 관련 기술의 일례로, 한국공개특허 제2011-0023211호에 탈모방지 및 발모촉진용 조성물과 그 제조방법이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2011-0072636호에 복령등의 복합 생약 추출물을 함유하는 탈모 방지 및 발모 촉진효과를 갖는 화장료 조성물이 개시되어 있으며, 한국공개특허 제2011-0005363호에 탈모 예방 및 양모 효과를 갖는 모발 개선용 조성물이 개시되어 있으나, 본 발명의 홍삼, 감초, 유근피, 황련, 지골피, 생지황, 고삼, 석창포, 원지 및 우슬을 유효성분으로 포함하는 탈모의 방지 및 발모 촉진용 조성물은 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 복합 생약 추출물을 함유하는 탈모 방지 및 발모 촉진용 조성물을 제공하고, 상기 복합 생약 추출물이 모유두 세포(dermal papilla cells)에 대한 세포 독성이 없고, 세포 성장을 증가시킬 뿐만 아니라, 항산화능을 가지고 있으며, 5 α -리덕타아제 활성을 효과적으로 억제하며, *in vivo*에서의 발모 효능을 확인한 결과, 대조군에 비하여 모낭에서 털이 자라나는 속도가 빠른 것이 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0017] 본 발명은 복합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 탈모방지 및 발모촉진용 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 (1) 물 100 중량부에 대하여, 1~3중량부의 원지, 1~3중량부의 지골피, 1~3중량부의 우슬, 1~3중량부의 석창포 및 1~3중량부의 생지황을 혼합한 제1 혼합물;
- [0019] 물 100 중량부에 대하여, 1~3중량부의 홍삼, 1~3중량부의 고삼 및 1~3중량부의 유근피를 혼합한 제2 혼합물; 및
- [0020] 물 100 중량부에 대하여, 1~3중량부의 감초 및 1~3중량부의 황련을 혼합한 제3 혼합물;을 각각 90~100℃에서 5~7시간 동안 열수 추출하는 단계;
- [0021] (2) 상기 제1 혼합물의 추출물, 제2 혼합물의 추출물 및 제3 혼합물의 추출물을 동량의 부피비로 재혼합하여 90~100℃에서 5~7시간을 추출하는 단계; 및
- [0022] (3) 상기 단계 (2) 이후에, 원심분리하는 단계;를 포함하는 복합 생약 추출물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 복합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 및 발모 촉진용 조성물에 관한 것이다. 상세하게는 홍삼, 감초, 유근피, 황련, 지골피, 생지황, 고삼, 석창포, 원지 및 우슬을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 및 발모 촉진용 조성물에 관한 것이다. 상기 복합 생약 추출물이 모유두 세포(dermal papilla cells)에 대한 세포 독성이 없고, 세포 성장을 증가시킬 뿐만 아니라, 모유두 세포에 복합 생약 추출물을 처리하였을 때에도 항산화능을 가지고 있는 것이 확인되었다. 또한, 탈모 유발에 중추적인 역할을 하는 5 α -리덕타아제 활성을 효과적으로 억제하였고, 마우스 모델을 이용하여 *in vivo*에서의 발모 효능을 확인한 결과, 대조군에 비하여 모낭에서 털이 자라나는 속도가 빠른 것이 확인되었다. 따라서 본 발명의 조성물은 부작용이 거의 없고, 탈모 방지 및 발모 촉진 효과가 있는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 복합 생약 추출물의 세포 생존율 및 세포 증식을 확인한 것으로, (A)는 본 발명의 복합 생약 추출물의 세포 생존율이고, (B)는 피나스테리드 및 미녹시딜의 세포 생존율이며, (C)는 복합 생약 추출물의 세포 증식 결과이다.

도 2는 본 발명의 복합 생약 추출물, 레스베라트롤, 피나스테리드 및 미녹시딜의 농도별 항산화 활성에 대한 결과이다.

도 3은 본 발명의 복합 생약 추출물의 5 α -리덕타아제의 활성 억제를 확인한 결과이다.

도 4는 마우스 모델에서 본 발명의 복합 생약 추출물의 발모 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 복합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 탈모방지 및 발모촉진용 조성물에 관한 것이다. 상기 복합 생약 추출물은 홍삼, 감초, 유근피, 황련, 지골피, 생지황, 고삼, 석창포, 원지 및 우슬을 혼합하여 추출한 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다. 상기 탈모방지 및 발모촉진용 조성물은 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어컨디셔너, 헤어트리트먼트 또는 헤어토닉용인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다. 상기 복합생약 추출물의 용매는 물, C₁~C₄의 저급알코올 또는 이들의 혼합물인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0026] 상기한 본 발명의 탈모방지 및 발모촉진용 조성물의 유효성분인 복합 생약 추출물을 베이스로 하여 통상적인 범위 이내로, 증점제, 이온성 계면 활성제, 가용화제, 방부제, 에센스 및 기능성 첨가제 중에서 선택된 1종 이상을 추가할 수 있다.

[0027] 상기 복합 생약 추출물은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다:

[0028] (1) 물 100 중량부에 대하여, 1~3중량부의 원지, 1~3중량부의 지골피, 1~3중량부의 우슬, 1~3중량부의 석창포 및 1~3중량부의 생지황을 혼합한 제1 혼합물;

[0029] 물 100 중량부에 대하여, 1~3중량부의 홍삼, 1~3중량부의 고삼 및 1~3중량부의 유근피를 혼합한 제2 혼합물; 및

[0030] 물 100 중량부에 대하여, 1~3중량부의 감초 및 1~3중량부의 황련을 혼합한 제3 혼합물;을 각각 90~100℃에서 5~7시간 동안 열수 추출하는 단계;

[0031] (2) 상기 제1 혼합물의 추출물, 제2 혼합물의 추출물 및 제3 혼합물의 추출물을 동량의 부피비로 재혼합하여 90~100℃에서 5~7시간 동안 추출하는 단계; 및

[0032] (3) 상기 단계 (2) 이후에, 원심분리하는 단계.

[0033] 또한, 본 발명은 (1) 물 100 중량부에 대하여, 1~3중량부의 원지, 1~3중량부의 지골피, 1~3중량부의 우슬, 1~3중량부의 석창포 및 1~3중량부의 생지황을 혼합한 제1 혼합물;

[0034] 물 100 중량부에 대하여, 1~3중량부의 홍삼, 1~3중량부의 고삼 및 1~3중량부의 유근피를 혼합한 제2 혼합물; 및

[0035] 물 100 중량부에 대하여, 1~3중량부의 감초 및 1~3중량부의 황련을 혼합한 제3 혼합물;을 각각 90~100℃에서 5~7시간 동안 열수 추출하는 단계;

[0036] (2) 상기 제1 혼합물의 추출물, 제2 혼합물의 추출물 및 제3 혼합물의 추출물을 동량의 부피비로 재혼합하여 90~100℃에서 5~7시간 동안 추출하는 단계; 및

[0037] (3) 상기 단계 (2) 이후에, 원심분리하는 단계;를 포함하는 복합 생약 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

[0038] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0039] 1. 재료 및 방법

[0040] 1) 복합 생약 추출물의 제조

[0041] 홍삼, 감초, 유근피, 황련, 지골피, 생지황, 고삼, 석창포, 원지 및 우슬을 각각의 농가에서 확보하였다.

[0042] 원지, 지골피, 우슬, 석창포 및 생지황(그룹 1)은 각 2kg 씩 추출포에 담아 추출기에 넣고 물을 100ℓ 넣은 후, 95℃에서 6시간을 추출하였고, 홍삼, 고삼 및 유근피(그룹 2)도 상기 그룹 1과 동일한 방법으로 추출하고,

마찬가지로 감초 및 황련(그룹 3)도 동일한 방법으로 추출하였다. 상기한 바와 같이 그룹 1 내지 3을 열수 추출한 후, 상기 그룹 1 내지 3을 동량의 부피비율로 약 100 ℓ 가 되도록 혼합한 후, 다시 95℃에서 6시간을 추출하였다. 이후, 비수용성 침전물을 제거하기 위하여 원심분리를 수행하였다. 본 발명의 복합 생약 추출물의 밀도는 0.9913 g/ml이고, pH는 약산성인 5.48로 확인되었다.

[0043] 2) 세포 배양

[0044] 본 발명에 사용된 세포주는 모유두 세포(충남대학교 의과대학 피부과 김창덕 교수팀, Kim et al. 2003 J.Dermatology)로, Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, WELGENE)에 10%(v/v) fetal bovine serum(FBS, WELGENE)과 1% antibiotic antimycotic (100U/ml 페니실린 및 50 µg/ml 스트렙토마이신)을 첨가한 후 표준 세포 배양법인 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 계대배양은 2~3일에 한 번씩 수행하였다.

[0045] 3) 세포 독성 평가

[0046] 복합 생약 추출물, 피나스테리드(sigma, #F1293) 및 미녹시딜(sigma, #M7920)이 모유두 세포에 미치는 독성을 측정하여 유효 농도를 결정하기 위해 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) 어세이를 수행하였다. 96웰 플레이트에 모유두 세포를 5,000세포/웰로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 각각의 웰에 각 시료가 농도별로 첨가된 배지로 교환하고 다시 24시간 동안 배양하였다. 그 후 MTS 시약(Promega #G3580)을 첨가하고 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices EMax Plus #6611048)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 시료를 처리한 세포의 생존율을 백분율로 표시하여 상대적인 세포 독성을 측정하였다. 세포의 생존율은 하기 식(1)으로 계산하였다.

[0047] 식(1)

[0048] 세포 생존율(%)=(시료첨가군의 흡광도/대조군의 흡광도)×100

[0049] 4) 마우스를 이용한 발모 효과 측정

[0050] ① 실험동물 및 사육처리

[0051] 실험동물은 생후 5주령 수컷 C57BL/6J를 (주)대한바이오파마로부터 구입하여, 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 조명주기 12시간 명/암을 유지하는 조건하에서 식이와 식수를 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 실험실 환경에 7일간의 적응기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

[0052] ② 실험군의 구분 및 처리

[0053] 발모 촉진효과를 관찰하기 위해 6주령의 C57BL/6J 마우스 등 부위의 털을 피부에 손상이 가지 않게 주의하면서 일차적으로 animal hair clipper로 제거한 다음, 이차적으로 비트 제모크림(옥시, Korea)을 사용하여 피부에 남아있는 미세한 털을 제거하였다. 이후 하루의 회복기를 거친 뒤 대조군, 복합 생약 추출물 1%, 복합 생약 추출물 10%, 미녹시딜 0.3%로 나눈 후 각 군당 3마리씩 배정하였다. Vehicle액은 증류수 24.75ml, 100% 에탄올 3.75ml과 보습 역할을 하는 호호바 오일 1.5ml을 넣어 혼합하였다. 대조군에는 vehicle액만을, 복합 생약 추출물 1%와 10%군에는 vehicle액에 복합 생약 추출물을 각 농도에 맞춰 추가로 첨가한 시료를, 미녹시딜 0.3%군에는 동일한 vehicle액에 시중에서 판매하는 미녹시딜 액 3%(동성제약, Korea)를 첨가한 시료를 매일 일정 시간에 붓을 이용하여 체모해 놓은 등 부위에 200µl씩 도포하여 주었다. 한편 복합 생약 추출물 10% 군에는 시료를 도포하여 주고 피부에 잘 흡수되도록 15분 정도 방치한 후 추가적으로 도포한 부위를 증류수로 닦아내어 주었다.

[0054] 5) 항산화능 평가

[0055] 모유두 세포에 대한 복합 생약 추출물, 피나스테리드 및 미녹시딜을 항산화능이 있다고 널리 알려진 레스베라트롤(Resveratrol)과의 항산화능 비교 실험에 사용하기 위하여 60mm 세포 배양에 모유두 세포를 0.8×10^6 cells/dish로 분주하였다. 24시간 배양 후 기존 배양액은 제거하고 각 디쉬 당 복합 생약 추출물(0.1, 1%), 피나스테리드(0.1, 1 µM), 미녹시딜(0.1, 1 µM)을 포함한 배양액으로 교환하였다. 이후, 다시 24시간을 배양하고 PBS(phosphate buffer saline)를 넣고 cell scraper를 이용하여 수득하였다. 상기 수득한 단백질을 초음파 처리한 후, 4℃ 13,000rpm에서 3분 동안 원심분리 뒤 상층액만 항산화능 실험에 사용하였다. 복합 생약 추출물, 피나스테리드, 미녹시딜 및 레스베라트롤의 항산화능 분석에서는 시료를 각 농도별로 증류수로 희석하여 사용하였다.

[0056] 항산화능 측정은 ABTS(2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 어세이를 이용하여 측정하였다. ABTS(sigma #A1888) 7mM과 과황화칼륨(potassium persulfate; sigma #216224) 2.4mM을 1:1로 혼합하고 24시간 암실에서 반응시켜 ABTS를 자유 라디칼 상태로 만들었다. 그 후 실험에 사용 전 암실에서 반응시킨 ABTS 용액을 650nm에서 흡광도 0.7 부근이 되도록 희석하였다. 96웰 플레이트에 ABTS 용액 90 μ l와 시료(단백질 7.5 μ g) 10 μ l를 넣어주고, 10분간 차광한 후 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices EMax Plus #6611048)를 이용하여 650nm에서 흡광도를 측정하였다. 이렇게 측정한 흡광도를 이용하여 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 항산화능을 백분율로 표시하였다. 항산화능은 하기 식(2)에 따라 계산하였다.

[0057] 식(2)

[0058]
$$\text{ABTS 라디칼 소거 활성(\%)} = [1 - (A_{\text{Sample}} - A_{\text{Sample blank}})/A_{\text{Blank}}] \times 100$$

[0059] 6) 5 α -리덕타아제 활성 평가

[0060] 모유두 세포에 대한 복합 생약 추출물의 5 α -리덕타아제 활성 억제 평가에 사용하기 위하여 60mm 세포 배양 디쉬에 모유두 세포를 0.8×10^6 cells/well로 분주하고 24시간 배양 후 기존 배양액은 제거하고 각 디쉬 당 복합 생약 추출물(0, 0.1, 1%), 피나스테리드(0.1, 1 μ M), 미녹시딜(0.1, 1 μ M)을 포함한 배양액으로 교환하였다. 이후, 다시 24시간 배양하여 기존 배양액을 제거하고 1 $\times$ PBS로 세척한 후 트립신/EDTA를 처리하여 단일세포로 만들어주었다. 원심분리 후 추출 완충용액(880 mM 슈크로오스, 1.5M CaCl₂)를 이용하여 세포를 용해시켰다. 이렇게 얻은 세포 용해물을 원심분리 후 상층액만 실험에 사용하였다.

[0061] 기존 탈모 치료제인 피나스테리드와 미녹시딜과 비교하여 복합 생약 추출물의 5 α -리덕타아제 활성 억제 효과를 확인하기 위하여, 테스트스테론에서 DHT으로 전환될 때 사용되는 NADPH 양의 변화를 흡광도로 측정하여 5 α -리덕타아제의 활성을 확인하였다. 96웰 플레이트에 시료(단백질 35 μ g), 테스트스테론(sigma, #86500) 20 μ M, NADPH(sigma, #N5130) 320 μ M을 넣고 30분 동안 인큐베이션한 후 340nm에서 흡광도를 측정하였다. 이렇게 측정한 흡광도를 이용하여 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 5 α -리덕타아제의 활성을 백분율로 표시하였다. 5 α -리덕타아제의 활성은 하기 식(3)에 따라 계산하였다.

[0062] 식(3)

[0063]
$$5\alpha\text{-리덕타아제 활성(\%)} = [1 - (A_{\text{Sample}} - A_{\text{Sample blank}})/A_{\text{Blank}}] \times 100$$

[0064] 7) 자료 분석 및 통계처리

[0065] 모든 실험의 결과는 평균 $\pm$ 표준오차로 표기하였고, 실험자료의 통계분석은 대조군에 대한 실험군의 유의성을 Student's t-test로 하였으며 p 값이 0.01 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

[0066] 실시예 1. 복합 생약 추출물의 세포 독성 평가 및 세포 수 측정

[0067] 본 발명의 복합 생약 추출물이 인간 모유두 세포(Dermal Papillar cells)의 성장 및 증식, 독성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 인간 모유두 세포에 복합 생약 추출물을 각기 다른 농도로 처리한 후 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium(MTS) 어세이를 수행하였다.

[0068] 그 결과, 모유두 세포에 복합 생약 추출물 1%까지 처리해 배양하여도 세포 독성이 거의 관찰되지 않았다. 복합 생약 추출물을 10% 처리하였을 경우 시료를 넣지 않은 대조군에 비해 세포 독성이 관찰되었다(도 1A). 따라서 이후 실험에서는 모유두 세포에 복합 생약 추출물의 농도를 1%까지 처리하였다. 기존 탈모 치료제인 피나스테리드와 미녹시딜도 0~10 μ M로 농도를 설정하여 복합 생약 추출물 세포 독성 평가 실험 방법과 동일한 방법으로 수행하였다. 피나스테리드와 미녹시딜 모두 10 μ M일 때까지도 각 세포 생존율이 $100.3 \pm 2.90\%$, $104.2 \pm 4.26\%$ 로 세포 독성이 관찰되지 않았다(도 1B).

[0069] 또한, 본 발명의 복합 생약 추출물을 처리한 결과, 상대적인 세포의 증식을 확인할 수 있었다(도 1C).

[0070] 실시예 2. 복합 생약 추출물의 항산화능 평가

[0071] 탈모의 원인으로는 유전적 요인뿐만 아니라, 환경적 요인도 있다. 최근에는 환경적 요인에 의한 탈모가 증가하고 있는 추세이다. 이러한 환경적 요인은 활성산소(Active oxygen)와 밀접한 관련이 있다. 활성산소란 여러 대사과정에서 생성된 산화력이 강한 산소를 말한다. 피로와 잘못된 식단, 자외선, 화학물질, 스트레스 등과 같은

환경적 요인으로 인해 과잉 생산된 활성 산소는 산화 작용으로 노화를 촉진하고 모발이 활력을 잃게 한다. 활성 산소는 콜레스테롤과 결합하여 과산화 지질로 변하게 되고 혈관 벽에 붙게 된다. 이로 인해 두피 혈관을 좁게 하고 모공을 막아 혈류를 감소시켜 모근에 영양 공급을 어렵게 한다. 또한, 모낭을 구성하는 세포의 세포막을 공격하여 세포 사멸을 일으키게 하며, 두피 염증을 일으켜 탈모를 일으킨다. 따라서 탈모 치료제를 개발함에 있어서 두피에서의 활성산소 발생을 억제하고, 과잉 발생된 활성산소를 제거하거나 활성을 낮추는 항산화능 평가는 중요하다.

[0072] 본 실시예에서는 복합 생약 추출물 자체의 항산화능과 모유두 세포에 미치는 항산화능을 측정하기 위하여, ABTS(2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 어세이를 수행하였다. ABTS 어세이는 과황화 칼륨과 반응하여 생성된 ABTS 자유 라디칼이 항산화 물질에 의해 자유 라디칼 고유의 색인 짙은 청록색에서 투명한 하늘색으로 탈색되는 차이를 흡광도 값으로 나타내어 자유 라디칼 소거능을 측정하는 방법이다. 적포도주에 다량 함유되어 있으며 폴리페놀 계열에 속하는 물질로 항암 및 강력한 항산화 작용을 하는 것으로 이미 널리 알려진 레스베라트롤(Resveratrol)을 양성 대조군으로 하여 복합 생약 추출물, 피나스테리드, 미녹시딜의 비교 실험을 통하여 항산화능을 평가하였다.

[0073] 복합 생약 추출물, 피나스테리드, 미녹시딜 및 레스베라트롤 시료 자체의 항산화능 측정 결과는 도 2A에 개시하였다. 양성 대조군인 레스베라트롤은 10 μ M에서 $21.61 \pm 1.52\%$, 100 μ M에서 $74.91 \pm 2.66\%$ 의 소거능이 측정되었다. 반면 복합 생약 추출물은 0.2%에서 $3.57 \pm 1.64\%$, 2%에서 $30.22 \pm 1.64\%$, 20%에서 $97.49 \pm 0.41\%$ 로 농도별로 증가하는 ABTS 라디칼 소거능을 보여 레스베라트롤보다 더 뛰어난 것으로 나타났다. 특히 복합 생약 추출물 20%의 경우, ABTS 용액에 시료를 넣은 즉시 라디칼 고유의 색인 청록색이 사라지는 것이 관찰되어 매우 뛰어난 라디칼 소거능을 보였다. 피나스테리드와 미녹시딜은 ABTS 라디칼 소거능이 거의 보이지 않았다.

[0074] 또한, 세포에 독성을 주지 않는 농도 범위에서 모유두 세포에 각 시료를 첨가하여 항산화능을 측정한 결과를 도 2B에 개시하였다. 레스베라트롤은 50 μ M에서 $86.22 \pm 4.42\%$ 의 세포 생존율을 보여 독성이 적은 최대 농도인 50 μ M로 실험을 실시하였다. 레스베라트롤을 처리한 모유두 세포 대비 각 시료를 처리한 모유두 세포의 ABTS 라디칼 소거능을 백분율로 나타낸 결과, 시료 자체의 항산화 결과에 비해 모유두 세포에 처리한 경우에는 각 시료마다 큰 차이를 보이진 않았다. 복합 생약 추출물을 처리한 세포는 농도에 따라 ABTS 라디칼 소거능이 증가하여 1%를 처리하였을 경우 $94.76 \pm 4.24\%$ 로 레스베라트롤과 유사한 소거능이 측정되었다. 피나스테리드와 미녹시딜을 처리한 모유두 세포는 시료의 농도가 증가함에 따라 소거능이 감소하는 양상을 보였다.

[0075] 실시예 3. 복합 생약 추출물의 5 α -리덕타아제 활성 억제 평가

[0076] 남성 호르몬인 테스토스테론은 모낭에서 5 α -리덕타아제에 의해 DHT(Dihydrosterone)로 전환이 되는데, 이렇게 전환된 DHT가 전두부와 두정부에 있는 모유두 세포막의 안드로젠 수용체와 결합하면 모발의 모세포(Hair mother cells)의 DNA에 세포과피 신호가 전달되어 세포과사 인자인 BMP, DKK-1, TGF- β 가 생성된다. 이렇게 생성된 세포과사 인자는 모발의 모세포를 공격하여 파괴시켜, 모발의 성장기를 짧게 하고 이른 시기에 퇴행기가 오게 한다. 5 α -리덕타아제는 주로 피지선에 분비되는 제1형과 모낭의 외측모근초, 모유두에 분포하는 제2형이 있으며 탈모에는 제2형 효소가 주된 원인이다. 피나스테리드는 제2형 5 α -리덕타아제를 억제하여 탈모 예방 및 치료에 효과를 보이는 것으로 알려져 있다. 따라서 5 α -리덕타아제를 억제하거나 제거할 수 있다면 남성형 탈모와 같은 안드로젠성 탈모증을 예방하거나 치료할 수 있으므로 5 α -리덕타아제 억제능 평가는 탈모 방지 효과 유무를 알 수 있는 중요한 지표라고 할 수 있다.

[0077] 본 실시예 3에서는 기존 탈모 치료제인 피나스테리드와 미녹시딜과 비교하여 복합 생약 추출물의 5 α -리덕타아제 활성 억제 효과를 확인하기 위하여, 테스토스테론에서 DHT로 전환될 때 사용되는 NADPH 양의 변화를 흡광도로 측정하여 5 α -리덕타아제의 활성을 확인하였다(도 3). 시료를 처리하지 않은 모유두 세포에서의 5 α -리덕타아제의 활성 대비 시료를 처리한 모유두 세포에서의 5 α -리덕타아제의 활성을 백분율로 나타낸 결과, 5 α -리덕타아제의 활성을 저해한다고 알려진 피나스테리드의 경우 0.1 μ M에서 $76.79 \pm 2.04\%$ 의 활성도가 측정되었다. 반면, 피나스테리드 1.0 μ M은 $122.58 \pm 1.73\%$ 의 활성도가 측정되어 오히려 5 α -리덕타아제의 활성이 증가하는 양상을 보였다. 반면, 기능성 추출물 0.1%와 1%에서 각 $72.61 \pm 0.10\%$, $89.89 \pm 0.71\%$ 의 활성도가 측정되어 피나스테리드보다도 더 효과적으로 5 α -리덕타아제의 활성이 저해되는 결과를 볼 수 있었다. 미녹시딜은 0.1 μ M에서 $104.07 \pm 5.16\%$, 1.0 μ M에서 $118.73 \pm 1.39\%$ 의 활성도를 보여 모든 농도에서 5 α -리덕타아제가 저해되지 않고, 오히려 더 활성이 증가하였다.

[0078] 실시예 4. 마우스 모델에서 복합 생약 추출물의 효능 확인

[0079]

1. 발모 상태의 육안적 변화

[0080]

C57BL/6 마우스는 체모가 검은색이고, melanocyte가 표피에는 존재하지 않고 모낭에만 한정적으로 존재하며, 모낭에서의 멜라닌 합성이 성장기에만 이루어지기 때문에 성장기에는 피부색이 검은색이 휴지기 및 퇴행기에는 피부색이 분홍색이 된다. 이처럼 멜라닌 합성이 모발성장주기와 잘 일치하므로 피부 조직검사를 하지 않고도 피부색을 통해 모발의 성장주기를 판정할 수 있다는 장점이 있어 모발생리 연구에 널리 이용되고 있다. C57BL/6 마우스는 생후 6~7주령이 되면 대부분의 털이 모두 휴지기가 되며 피부색은 분홍색이 되기 때문에 이 시기의 마우스는 양모와 발모 효능 연구에 적합하고 알려져 있다.

[0081]

따라서 본 실시예 4에서는 미녹시딜과의 비교 실험을 통해 복합 생약 추출물의 발모 효과를 알아보기 위하여, 생후 6주령의 C57BL/6J 마우스 모델을 이용하여 실험을 실시하였다. 경구용이 아닌 피부에 도포하는 실험을 실시하기 위해 피나스테리드가 아닌 미녹시딜을 양성 대조군으로 택하였다. 미녹시딜의 경우 기존에 시판되고 있는 미녹시딜 액 3%가 1일 총 투여량이 2mL를 초과할 경우, 전신 흡수 증가로 인해 체액 저류, 혈압강하 및 빈맥과 같은 혈관확장작용과 관련된 전신적 효과가 나타날 수 있으므로 마우스에 실험을 할 때는 vehicle액으로 0.3% 농도로 희석하여 사용하였다.

[0082]

제모 익일부터 각각의 시료를 마우스의 제모한 등 부위에 도포하면서 털이 자라는 양상을 육안으로 확인한 결과, 4일째까지는 모든 군에서 제모한 등 부위가 제모된 상태의 분홍색 피부로 관찰되었다. 7일째부터 피부가 부분적으로 회색빛을 띠는 정도가 각 시험군별로 확인한 차이를 보였는데, 미녹시딜군은 3마리 중 두 마리의 피부가 전체적으로 회색 피부로 변한 반면, 복합 생약 추출물 10%군은 미녹시딜군과 비교하여 조금 더 국소적인 부위이기는 하나 피부색이 더 진하고, 털이 자라난 것을 확인할 수 있을 정도로 모낭으로부터 털이 자라나는 속도가 더 빠른 것을 알 수 있었다. 복합 생약 추출물 1%군은 1마리의 피부가 전체적으로 회색빛을 띠면서 국소적으로 털이 자라는 것을 육안으로 관찰되었다. vehicle만을 도포한 대조군은 피부가 회색빛을 띠는 정도가 미미하였다. 10일째부터는 각 시험군의 모든 마우스에서 피부 밖으로 털이 자라는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 발모 정도를 비교해봤을 때, 대조군은 제모한 피부가 전체적으로 회색으로 변하면서 털이 자랐으며, 미녹시딜군은 대조군에 비해 회색 피부색이 더 진하고 더 많은 털이 모낭으로부터 자라는 것이 관찰되었다. 복합 생약 추출물 1%군은 미녹시딜과 유사한 발모효과를 보였으며, 복합 생약 추출물 10%군은 털의 성장이 증가하여 양성 대조군인 미녹시딜과 비교하여도 털 길이가 확연히 긴 것을 알 수 있었다. 14일째에는 모든 시험군에서 10일째에 비해 더 증가된 발모현상을 보였다. 미녹시딜군은 모낭으로부터 털이 자라 육안으로 확인이 되면 털이 성장하는 속도가 빨라 세 마리 모두 발모가 거의 완료된 것을 관찰할 수 있었다. 복합 생약 추출물 1%군과 복합 생약 추출물 10%군 모두 대조군과 비교하여 털이 더 굵고 길면서, 밀도가 더 높은 것을 관찰할 수 있었다(도 4A).

[0083]

2. 털 길이 및 발모 지수의 변화

[0084]

각 군의 모발성장 효과를 육안으로 관찰하면서 발모 상태를 수치화하기 위하여 발모 정도에 따라 털이 전혀 자라지 않은 분홍색 피부는 0점, 피부가 회색빛을 띠면 1점, 피부에서 털이 자라 육안으로 확인이 되면 2점, 털이 완전히 자라면 3점으로 정하여 Image J 프로그램을 이용해 각 점수에 해당하는 면적을 측정하였다. 이렇게 측정한 면적을 제모한 전체 면적에 대한 비율로 환산하여 해당 점수를 곱한 총합을 각 군별로 평균을 내어 발모 지수를 계산하였다(도 4B). 발모 지수 최소값은 0이고, 최대값은 3이다. 제모 후 10일째 마우스 등 부위의 사진을 촬영한 후 영상 분석을 통하여 모발 성장 효과를 알아보았다. 발모 상태를 털이 자란 정도를 점수화하여 면적에 근거해 발모지수를 수치화한 결과, 대조군은 0.98 ± 0.13 점, 복합 생약 추출물 1%군은 1.31 ± 0.49 점, 복합 생약 추출물 10%군은 1.71 ± 0.49 점, 미녹시딜군은 1.53 ± 0.16 점을 나타내었다(도 4C). 미녹시딜군은 발모가 완료된 면적은 거의 없었으나 제모한 피부 전체가 회색빛을 띠면서 털이 자라기 시작하는 면적이 넓었다. 복합 생약 추출물 10%군에서는 개체 간 차이가 커서 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으나, 모낭으로부터 일단 털이 자라기 시작하면, 성장 속도가 빨라 발모가 완료된 면적이 다른 시험군에 비하여 넓었다(도 4D).

[0085]

제모 후 10일째에 핀셋을 이용하여 털을 뽑아 모발의 길이를 측정한 결과, 복합 생약 추출물 1%군, 복합 생약 추출물 10%군이 각각 4.29 ± 0.88 mm, 4.62 ± 0.56 mm으로 대조군 1.68 ± 0.22 mm, 미녹시딜군 1.92 ± 0.10 mm에 비해 털 길이가 더 긴 것이 관측되었다(도 4E). 미녹시딜군은 제모한 피부가 전체적으로 회색빛을 띠었으나, 발모 속도가 느려 대조군에 비해 1.14배 증가하여 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 반면, 복합 생약 추출물 1%와 10%군은 제모 후 모낭으로부터 털이 자라는 속도가 다른 군에 비해 빨라 7일째부터도 육안으로 털이 확인되었으며, 10일째에는 대조군에 비해 각 2.55, 2.75 배 털 길이가 더 긴 것으로 측정되었다.

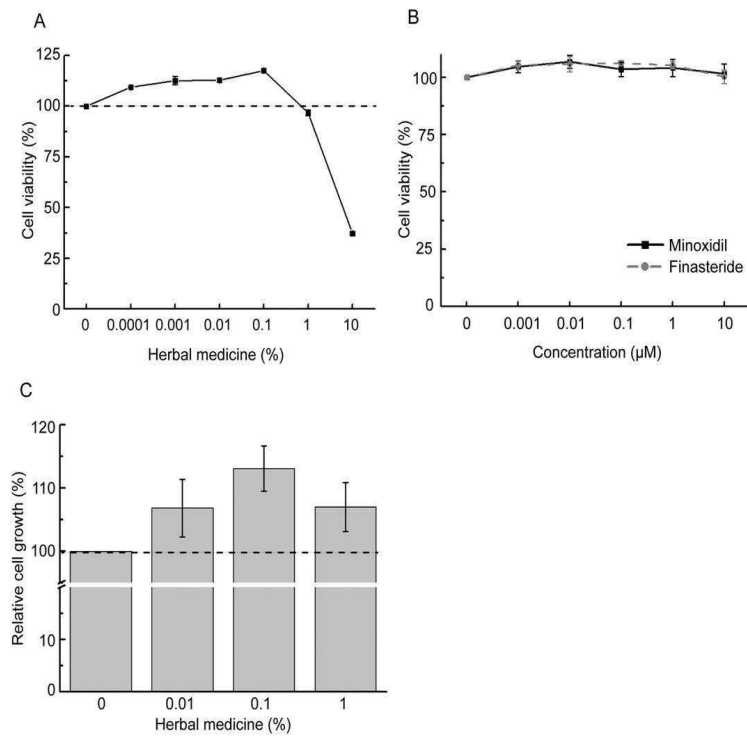
[0086]

이상의 실험 결과를 종합해 보았을 때, 개체 간의 차이는 크지만 대조군에 비하여 복합 생약 추출물의 우수한

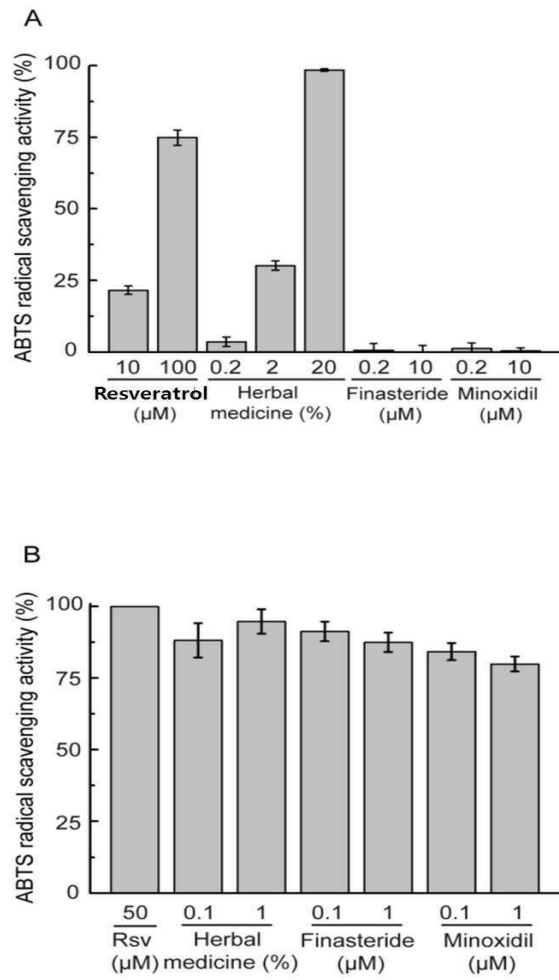
모발 성장 효과가 유의미하게 있음이 확인되었다.

도면

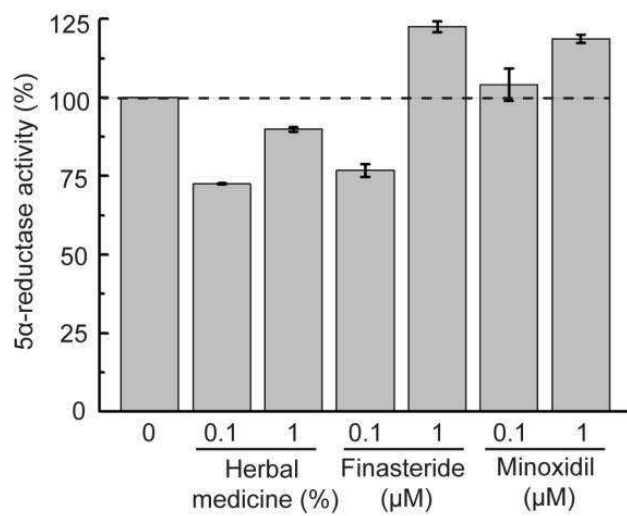
도면1



도면2



도면3



도면4

