

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0025910 (43) 공개일자 2014년03월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 8/35 (2006.01) A61K 8/34 (2006.01) A61K 8/30 (2006.01) A61K 31/122 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0092472 (22) 출원일자 2012년08월23일 심사청구일자 없음	(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교) (72) 발명자 김세권 부산광역시 동래구 사직로 80, 125동 1402호(사직 동, 쌍용에가아파트) 이수루 위제세카라 부산광역시 남구 용소로 45, 해양바이오프로세스 연구단(대연동, 부경대학교 대연캠퍼스) (74) 대리인 위병갑	

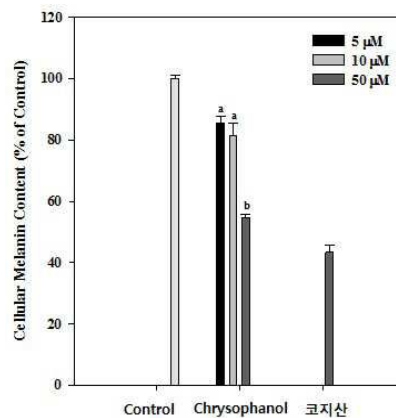
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **크리소파놀을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물**

(57) 요약

본 발명은 크리소파놀(chrysophanol)의 피부 미백의 신규 용도에 관한 것으로, 자세하게는 크리소파놀을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 크리소파놀 화합물은 우수한 안정성과 더불어 티로시나아제의 발현 및 활성을 저해하는 기작을 통하여 멜라닌 생성을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 피부에 자극 없이 멜라닌 색소 억제를 통한 우수한 미백 효과를 나타낼 수 있어 기능성 화장품 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M2010-02

부처명 국토해양부

연구사업명 해양생명공학기술개발사업

연구과제명 해양생물 유래 미백 및 주름개선 기능성 화장품 소재의 임상평가를 통한 제품화 및 산업화

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교

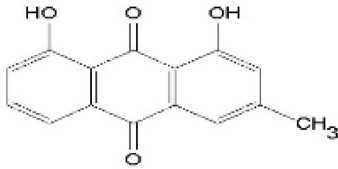
연구기간 2011.01.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 크리스소파놀(chrysophanol) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물;

<화학식 1>



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 크리스소파놀은 해양진균인 마이크로스포럼 속(*Microsporium* sp.) 유래인 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 크리스소파놀은 티로시나아제의 발현 및 활성을 저해하는 기작을 통하여 멜라닌 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 크리스소파놀은 조성물에 10 내지 50 μ M의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 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, 립스틱, 메이크업 베이스, 파운데이션, 프레스파우더 및 루스파우더로 이루어진 군으로부터 선택된 1종으로 제형화되는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 크리스소파놀(chrysophanol)의 피부 미백의 신규 용도에 관한 것으로, 자세하게는 크리스소파놀을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 피부는 외부 환경과 직접 접하면서 인체를 보호하며 생화학적 및 물리적인 기능을 가지고 있는 아주 중요한 조직이다. 이 조직은 크게 3가지, 즉, 표피, 진피, 그리고 피하조직으로 나뉘어진다. 사람의 피부색은 주로 피부 세포속에 들어있는 멜라닌을 함유하는 멜라노솜의 숫자, 크기, 종류 및 분포도에 따라 다르게 나타난다.

[0003] 멜라노솜은 멜라닌 세포에 의해 생산되고, 표피에서 생성되는 검은 색소인 멜라닌은 멜라노사이트라는 세포에서 생산된다. 멜라닌은 햇빛 중 자외선의 빛에너지를 흡수하여 더 깊숙이 있는 세포들이 자외선에 의해 손상되는

것을 막아주는 역할을 한다. 이러한 멜라닌이 비정상적으로 적게 생산되면 백반증과 같은 피부병변이 유발되고 반대로 자외선 등에 의해 멜라닌이 과도하게 합성되면 피부에 손상을 줄 뿐만 아니라 기미, 주근깨를 형성하게 되고, 더 나아가 피부암의 원인이 되기도 한다.

[0004] 멜라닌 형성과정에서 가장 중요한 역할을 하는 것은 티로시나아제 효소로 알려져 있으며, 이 효소는 조직 중에 존재하는 티로신이라고 하는 아미노산에 작용하는 도파퀴논을 생성시키며 이 도파퀴논으로부터 여러 단계의 자동 산화과정을 거쳐 흑색 색소인 멜라닌이 생성된다. 따라서 멜라닌 생성을 억제할 수 있는 단계의 어느 과정 중에 작용하느냐에 따라 다음과 같은 여러 방법으로 미백용 조성물을 만들 수 있다.

[0005] 첫 번째로는 멜라닌 생성의 주원인인 자외선을 차단할 수 있는 성분을 함유시키는 것으로, 이 방법에 의한 조성물은 광 차단제 또는 광 차단제를 함유함으로써 자외선에 의한 DNA 손상 또는 염증을 줄여 글루코사민과 같은 티로시나아제가 활성을 나타내기 위해 필요한 코어 탄수화물의 합성을 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제시킬 수 있다(미백 A 단계에 작용). 두 번째는 효소산(코직산), 루시놀, 에릭산 또는 알부틴과 같이, 멜라닌 생성에 관여하는 티로시나아제의 기능을 방해하는 물질을 사용하는 것이다(미백 B 단계에 작용). 세 번째로는 도파크롬을 안정화하여 흑색 멜라닌인 유-멜라닌(Eu-Melanin)으로의 진행을 저지할 수 있는 방법이 있다(미백 C 단계에 작용). 네 번째는 티로신이 도파와 도파크롬을 거쳐 복잡한 산화와 축합 반응을 거치는 동안에, 강한 항산화 효과를 발휘하여 미백효과를 낼 수 있는 비타민 C와 같은 물질을 사용하는 것이다(미백 D 단계에 작용). 다섯 번째로는, 효소 또는 AHA(Alpha Hydroxy Acid)등을 사용하여, 생성된 멜라닌을 각질층에서 제거 및 환원시켜 줄 수 있는 방법도 있다(미백 E 단계에 작용).

[0006] 종래의 화장품 분야에서는 미백 성분으로서, 예를 들면, 코지산(Kojic acid), 알부틴(Arbutin) 등과 같은 티로시나아제 효소활성을 억제하는 물질, 하이드로퀴논(Hydroquinone), 비타민 C(L-Ascorbic acid) 및 이들의 유도체와 각종 식물 추출물이 사용되어 왔다. 그러나 상기 티로시나아제 효소활성을 억제하는 물질은 처방계 중에서의 안정성이 낮기 때문에 분해되어 착색되거나, 이취의 발생, 생체 레벨에서의 효능, 효과의 불분명 및 안전성 문제 등으로 그 사용이 제한되고 있는 실정이다.

[0007] 이에 본 발명자들은 천연물질로부터 유래되어 인체에 안정하면서도, 탁월한 미백 효과를 나타낼 수 있는 소재를 찾고자 모색하던 중, 해양진균인 마이크로스포럼 속(*Microsporium* sp.)으로부터 분리 동정한 크리소파놀(chrysophanol) 화합물에 주목하여 그것의 미백 효과를 실험한 결과, 크리소파놀 화합물이 티로시나아제 발현 및 활성을 농도 의존적으로 저해함으로써 멜라닌의 합성을 효과적으로 억제할 수 있다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2012-0054375호
(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2008-0022010호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 인체에 안정하면서 멜라닌 억제 활성이 우수하여 피부 미백에 효과적인 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 크리소파놀(chrysophanol) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 크리소파놀은 해양진균인 마이크로스포럼 속(*Microsporium* sp.) 유래일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 크리소파놀은 티로시나아제의 발현 및 활성을 저해하는 기작을 통하여 멜라

닌 생성을 억제할 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 크리소파놀은 조성물에 10 내지 50 μ M의 농도로 포함될 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 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, 립스틱, 메이크업 베이스, 파운데이션, 프레스파우더 및 루스파우더로 이루어진 군으로부터 선택된 1종으로 제형화될 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 크리소파놀(chrysophanol) 화합물은 우수한 안정성과 더불어 티로시나아제의 발현 및 활성을 저해하는 기작을 통하여 멜라닌 생성을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 피부에 자극 없이 멜라닌 색소 억제를 통한 우수한 미백 효과를 나타낼 수 있어 기능성 화장품 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 해양 홍조류 *Lomentaria catenata* 의 외피로부터 분리된 해양 유래의 진균인 마이크로스포럼 속(*Microsporum* sp.) 균주의 형태를 나타낸 사진이다.

도 2는 해양 유래의 진균인 마이크로스포럼 속(*Microsporum* sp.) MFS-YL 균주의 에틸아세테이트 추출물 수득 과정을 계략적으로 나타낸 것이다.

도 3은 해양 유래의 진균인 마이크로스포럼 속(*Microsporum* sp.) MFS-YL 균주로부터 크리소파놀 화합물 분리과정을 계략적으로 나타낸 것이다.

도 4는 크리소파놀의 $^1\text{H-NMR}$ (a) and $^{13}\text{C-NMR}$ (b) 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 5는 B16F1 흑색종 세포에 크리소파놀의 농도별 처리에 따른 세포 생존율을 나타낸 그래프이다.

도 6은 크리소파놀의 티로시나아제 저해 활성을 mushroom tyrosinase assay를 이용하여 측정한 것이다.

도 7은 B16F1 흑색종 세포에 크리소파놀의 농도별 처리에 따른 멜라닌 형성 억제 정도를 측정한 것이다.

도 8은 B16F1 흑색종 세포에 크리소파놀의 농도별 처리에 따른 세포 내 멜라닌 함량을 측정한 그래프이다.

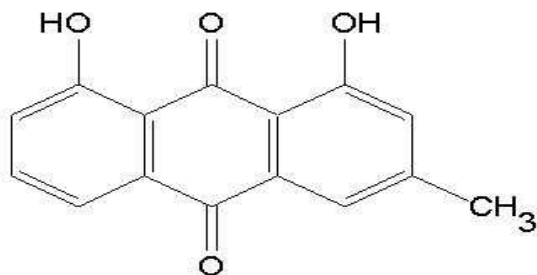
도 9는 B16F1 흑색종 세포에 크리소파놀의 농도별 처리에 따른 티로시나아제 단백질 발현 정도를 웨스턴 블랏을 통해 측정한 것이다.

도 10은 크리소파놀의 피부 미백 효과 기작을 계략적으로 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 하기 화학식 1의 크리소파놀(chrysophanol) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0018] <화학식 1>



[0019]

[0020] 본 발명의 ‘크리소파놀(chrysophanol)’은 안트라퀴논 유도체로서 파리에틴(parietin) 등은 소리쟁이(*Rumex*

crispus) 및 참소리쟁이(*Rumex japonica*)등의 다양한 식물에서 추출하거나 아스퍼질러스 속균(*Aspergillus* spp.), 페니실리움 속균(*Penicillium* spp.) 및 알터나리아 속균(*Alternaria* spp.) 등에 의해 생산되는 것으로 알려져 있다. 크리스오파놀 화합물의 분자식은 $C_{15}H_{10}O_4$ 이고, 분자량은 254.242이다.

- [0021] 상기와 같은 특징을 갖는 크리스오파놀(chrysophanol)은 항암활성(Lin 등, J . Natural Products , 64 , 674, 2001), 항산화활성(Bezabih 등, Planta Medica ,67 , 340, 2001; Yen 등, Food Chemistry , 70 , 437, 2000), 항돌연변이활성(Choi 등, Planta Medica , 63 , 11, 1997), 토포이소머레이즈 II(topoisomerase II) 억제활성(미국 특허출원 제 544203 호), 복강 주사 시 쥐에 대한 독성(Bachmann 등, J. Agric. Food Chem. , 27 , 1342, 1979), 폴리오바이러스에 대한 시험관 내(in vitro) 항바이러스활성(Semple 등, Antiviral Research , 49 , 169, 2001) 및 무좀균(*Trichophyton mentagrophytes*)에 대한 항균활성(Agarwal 등, J . Ethnopharmacol. , 72 , 43, 2000) 등이 보고되어 있다.
- [0022] 그러나 현재까지 피부 미백과 관련하여 연구된 바 없다.
- [0023] 본 발명자들은 천연물질로부터 유래되어 인체에 안정하면서도, 탁월한 미백 효과를 나타낼 수 있는 소재를 찾고자 모색하던 중, 해양진균인 *Microsporum* 속으로부터 분리 동정한 크리스오파놀에 주목하여 그것의 미백 효과를 실험한 결과, 크리스오파놀이 티로시나아제 발현 및 활성을 농도 의존적으로 저해함으로써 멜라닌의 합성을 효과적으로 억제할 수 있다는 사실을 최초로 규명하였으며, 따라서 본 발명은 크리스오파놀의 피부 미백 활성이라는 신규 용도를 제공함에 그 특징이 있다.
- [0024] 본 발명의 하기 실험에 2에서는, 본 발명의 크리스오파놀 화합물의 티로시나아제 저해 활성을 측정한 결과, 크리스오파놀의 농도에 의존적으로 티로시나아제 저해 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(도 6 참조).
- [0025] 또한, 본 발명의 하기 실험에 3에서는, B16F1 흑색종 세포에 본 발명의 크리스오파놀 화합물을 농도별로 처리한 후 α -MSH로 멜라닌생성을 유도한 결과, 크리스오파놀 처리 농도에 의존적으로 B16F1 흑색종 세포 내의 멜라닌 함량이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 50 μ M의 농도를 처리한 실험군에서는 양성대조군인 코지산과 거의 유사한 수준으로 멜라닌 함량이 측정되어, 크리스오파놀의 멜라닌 생성 억제가 우수함을 알 수 있었다(도 7 및 도 8 참조).
- [0026] 또한, 본 발명의 하기 실험에 4에서는, B16F1 흑색종 세포에 본 발명의 크리스오파놀 화합물을 농도별로 처리한 후 α -MSH로 멜라닌생성을 유도한 결과, 크리스오파놀 처리 농도에 의존적으로 B16F1 흑색종 세포 내의 티로시나아제 단백질 발현이 억제되는 것을 웨스턴 블랏을 통해 확인할 수 있었다(도 9 참조).
- [0027] 이와 같은 결과를 통해, 본 발명자들은 크리스오파놀이 멜라닌 생성 억제를 통해 피부 미백에 효과적이라는 사실을 실험적으로 입증하였다.
- [0028] 본 발명에 따른 상기 크리스오파놀(chrysophanol)은 염, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하며, 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.
- [0029] 본 발명에 따른 크리스오파놀(chrysophanol)은 시중에서 판매되는 것을 사용할 수도 있으며, 또는 천연으로부터 분리되거나 당업계에 공지된 화학적 합성법으로 제조된 것을 사용할 수 있다.
- [0030] 예를 들어, 본 발명의 크리스오파놀은 소리쟁이(*Rumex crispus*) 및 참소리쟁이(*Rumex japonica*)등의 다양한 식물에서 추출할 수 있으며, 마이크로스포럼 속균, 아스퍼질러스 속균, 페니실리움 속균 및 알터나리아 속균 등을 이용하여 2차 대사산물의 형태로 생산될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 크리스오파놀은 마이크로스포럼 속(*Microsporum* sp.) 유래일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 조성물이 화장료 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 조성물은 상술한 크리스오파놀(chrysophanol)뿐만 아니라, 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명의 조성물은 상술한 크리스오파놀(chrysophanol) 이외에, 크리스오파놀과 반응하여 피부보호 효과를 손상시키지 않는 한도에서 종래부터 사용되어오던 유기 자외선 차단제를 혼합하여 사용할 수도 있다.

- [0034] 상기 유기 자외선 차단제로는 글리세릴파바, 드로메트리졸트리실록산, 드로메트리졸, 디갈로일트리올리에이트, 디소듐페닐디벤즈이미다졸테트라설폰네이트, 디에칠헥실부타미도트리아존, 디에칠아미노하이드록시벤조일헥실벤조에이트, 디이에이-메톡시신나메이트, 로우손과 디하이드록시아세톤의 혼합물, 메칠렌비스-벤조트리아졸릴테트라메칠부틸페놀, 4-메칠벤질리텐캠퍼, 멘틸안트라닐레이트, 벤조페논-3(옥시벤존), 벤조페논-4, 벤조페논-8(디옥시페벤존), 부틸메톡시디벤조일메탄, 비스에칠헥실옥시페놀메톡시페닐트리아진, 시녹세이트, 에칠디하이드록시프로필파바, 옥토크릴렌, 에칠헥실디메칠파바, 에칠헥실메톡시신나메이트, 에칠헥실살리실레이트, 에칠헥실트리아존, 이소아밀-p-메톡시신나메이트, 폴리실리콘-15(디메치코디에칠벤잘말로네이트), 테레프탈릴리텐디캠퍼설폰네아씨드 및 그 염류, 티이에이-살리실레이트 및 아미노벤조익아씨드(파바)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 화장료 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 수렴화장수, 유연화장수, 영양화장수, 각종 크림, 에센스, 팩, 파운데이션 등과 같은 화장품류와 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 미용액 등이 있다.
- [0036] 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, 립스틱, 메이컵 베이스, 파운데이션, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형을 포함한다.
- [0037] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 크리스파놀(chrysophanol)의 함량은 조성물 총 중량에 대하여 0.0001-20중량%이며, 바람직하게는 0.5-20%이며, 보다 바람직하게는 1.0-20중량%이다. 상기 크리스파놀의 함량이 0.0001중량% 미만이면 크리스파놀에 의한 미백 효과가 크게 감소되고, 20중량%를 초과하는 경우에는 피부 자극을 초래할 수 있으며, 제형상의 문제점이 발생할 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 본 발명의 크리스파놀(chrysophanol)은 조성물에 10 내지 50 μM 의 농도로 포함될 수 있다. 상기 크리스파놀의 농도가 10 μM 미만이면 크리스파놀에 의한 미백 효과가 크게 감소될 수 있으며, 50 μM 을 초과하는 경우 세포에 독성을 줄 수 있기 때문이다.
- [0039] 한편, 본 발명에 따른 상기 화장료 조성물은 크리스파놀(chrysophanol)을 나노리포솜 내부에 함유시켜 안정화하여 제형화할 수도 있다. 상기 크리스파놀을 나노리포솜 내부에 함유시키면, 크리스파놀의 성분이 안정화되어 제형화시 침전형성, 변색, 변취 등의 문제점을 해결할 수 있으며, 성분의 용해도 및 경피흡수율을 높일 수 있어 상기 화합물로부터 기대되는 효능을 최대로 발현시킬 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 나노리포솜은 통상적인 리포솜의 형태를 갖는 것으로서 평균 입자 지름이 10~500nm인 리포솜을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 나노리포솜의 평균 입자 지름은 50~300nm이다. 나노리포솜의 평균 입자 지름이 300nm를 초과하는 경우에는 본 발명에서 달성하고자 하는 기술적 효과 중 피부침투의 개선 및 제형 안정성의 개선이 매우 미약하다.
- [0041] 본 발명에 따라 상기 화합물(크리스파놀)을 안정화하는데 사용되는 나노리포솜은 폴리올, 유성성분, 계면활성제, 인지질, 지방산 및 물을 포함하는 혼합물에 의해 제조될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 나노리포솜에 이용되는 폴리올은 특히 제한되지 않으며, 바람직하게는 프로필렌글리콜, 디프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세린, 메틸프로판디올, 이소프로판글리콜, 펜틸렌글리콜, 에리스리톨, 자일리톨, 솔비톨 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상이다. 그 사용량은 나노리포솜 총 중량에 대하여 10~80중량%, 바람직하게는 30~70중량%이다.
- [0043] 본 발명의 나노리포솜의 제조에 이용되는 유성(oil) 성분은 당업계에 공지된 다양한 오일이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 헥사데칸 및 파라핀 오일과 같은 하이드로카본계 오일, 에스테르계의 합성오일, 디메치콘 및 사이크로메치콘계와 같은 실리콘 오일, 해바라기유, 옥수수유, 대두유, 아보카도유, 참깨유 및 어유와 같은 동물성 오일, 에톡시레이티드 알킬에테르계오일, 프로폭시레이티드 알킬에테르계오일, 피토스핑고신, 스펡고신 및 스펡가닌과 같은 스펡고노이드 지질, 세레브로사이드 콜레스테롤, 시토스테롤 콜레스테릴설페이트, 시토스테릴설페이트, C_{10-40} 지방알콜 및 이의 혼합물이다. 그 사용량은 나노리포솜 총 중량에 대하여 1.0~30.0중량%일 수 있으며, 바람직하게는 3.0~20.0중량%이다.
- [0044] 본 발명의 나노리포솜의 제조에 이용되는 계면활성제는 당업계에 공지된 어떠한 것도 사용할 수 있다. 예를 들어, 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 양성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제가 사용될 수 있다. 바람직하게는 음이온성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제이다. 음이온성 계면활성제의 구체적인 예는 알킬아

실글루타메이트, 알킬포스페이트, 알킬락틸레이트, 디알킬포스페이트 및 트리알킬포스페이트를 포함한다. 비이온성 계면활성제의 구체적인 예는 알콕시레이티드 알킬에테르, 알콕시레이티드 알킬에스테르, 알킬폴리글리코사이드, 폴리글리세릴에스테르 및 슈가에스테르를 포함한다. 특히 바람직한 계면활성제는 비이온성 계면활성제에 속하는 폴리솔베이트류이다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 0.1~10중량%일 수 있으며, 바람직하게는 0.5~5.0중량%이다.

- [0045] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 또 다른 성분인 인지질은 양쪽친화성 지질이 이용되며, 천연 인지질(예를 들어, 난황 레시틴 또는 대두 레시틴, 스펡고마이엘린) 및 합성 인지질(예를 들어, 디팔미토일포스파티딜콜린 또는 수첨 레시틴)을 포함하며, 바람직하게는 레시틴이다. 특히, 대두 또는 난황에서 추출한 천연 유래의 불포화 레시틴 또는 포화 레시틴이 바람직하다. 통상적으로 천연 유래의 레시틴은 포스파티딜콜린의 양이 23~95%, 그리고 포스파티딜에탄올아민의 양이 20% 이하이다. 본 발명의 나노리포좀의 제조에 있어서, 인지질의 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 0.5~20.0중량%이며, 바람직하게는 2.0~8.0중량%이다.
- [0046] 본 발명의 나노리포좀 제조에 이용되는 지방산은 고급 지방산으로서, 바람직하게는 C₁₂~22 알킬 체인의 포화 또는 불포화 지방산으로서, 예컨대, 라우린산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아린산, 올레산 및 리놀레산을 포함한다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 0.05~3.0중량%일 수 있으며, 바람직하게는 0.1~1.0중량%이다.
- [0047] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 물은 일반적으로 탈이온화된 증류수이며, 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 5.0~40중량%일 수 있다.
- [0048] 나노리포좀의 제조는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 이루어질 수 있으나, 가장 바람직하게는 상기 성분들을 포함하는 혼합물을 고압 호모게나이저에 적용하여 제조된다. 고압 호모게나이저에 의한 나노리포좀의 제조는 소망하는 입자 크기에 따라 다양한 조건(예: 압력, 횟수 등)으로 실시할 수 있으며, 바람직하게는 600~1200bar의 압력 하에서 1~5회 고압 호모게나이저를 통과하도록 하여 나노리포좀을 제조할 수 있다.
- [0049] 본 발명에 따른 피부 개선용 화장품 조성물은 상기 크리스오파놀(chrysophanol)을 나노리포좀 총 중량 기준으로 0.1~20.0중량%로 함유할 수 있다.
- [0050] 본 발명은 또한 크리스오파놀(chrysophanol)을 유효성분으로 포함하는 피부 미백 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0051] 이러한 식품 조성물은 유효성분인 크리스오파놀을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0052] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.
- [0054] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 크리스오파놀(chrysophanol) 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 유효성분인 크리스오파놀(chrysophanol)은 천연물질로부터 유래된 것으로서 인체에 안정하며 피부 미백을 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0056] 본 발명은 또한 크리스오파놀(chrysophanol)을 유효성분으로 포함하는 피부 미백 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0057] 본 발명의 건강기능식품은 피부 미백 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0058] 본 발명에서 “건강기능식품”이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가

진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0059] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0060] 상기 “식품 첨가물 공전”에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[0061] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 크리스오파놀(chrysophanol)을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 파립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0062] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 크리스오파놀(chrysophanol)을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 크리스오파놀(chrysophanol)을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0063] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 크리스오파놀(chrysophanol)과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0064] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 크리스오파놀(chrysophanol)과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0065] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0067] <실시예>

[0068] 시약

[0069] Mushroom tyrosinase, L-tyrosine, α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone) 와 kojic acid 는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO)에서 구매하였다. Antibody for tyrosinase (H-109) 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)에서 구매하였고 모든 다른 시약들은 분석등급을 사용하였다.

[0070] <실시예 1>

[0071] 해양유래 진균 마이크로스포럼 속 균주의 분리 및 배양

[0072] 곰팡이 균주 MFS-YL은 2009년 포항 남구 구룡포에서 수집된 해양 홍조류 *Lomentaria catenata* 의 외피로부터 분리되었다. 상기 곰팡이 균주는 YPG 배지(0.5% yeast extract, 0.5% 펩톤, 1% 글루코오스, 60% 해양수)에서 배양되었으며, YPG 배지와 함께 10% 글리세롤에서 보관하였다. 2차 대사물질들을 분리하기 위한 추가 배양은 상기 와 동일한 배지(YPG, 1L×20 Erlenmeyer flasks)에서 진행되었다(도 1 참조). 곰팡이 균주의 배양 전에 배지를 살균하였으며(121℃, 15lb/inch²), laminar flow 하에 배지를 식힌 후 균주를 접종하였다. 상기 균주는 25℃에서 30일 동안 배양한 후 균주의 종류를 확인한 결과, 세포 지방산 조성에 기초(한국미생물보존센터에 의한 0.62

유사성 지수)하여 마이크로스포럼 속(*Microsporium* sp.)으로 동정되었다.

[0073] <실시예 2>

[0074] 해양유래 진균 마이크로스포럼 속 균주에서 생산되는 2차 대사산물 분리

[0075] 상기 실시예1을 통해 수득한 마이크로스포럼 속(*Microsporium* sp.) 진균인 MFS-YL을 배양한 후 생산된 2차 대사산물을 분리/동정하였다.

[0076] 자세하게는 상기 실시예 1을 통해 수득한 균주 배양물에서 균사체를 제거하여 배양액만을 분리한 후, 배양액에 에틸 아세테이트(1:1.5 v/v, broth: EtOAc)를 첨가하여 추출한 다음, 실리카겔 크로마토그래피(n-헥산:에틸아세테이트 및 클로로포름:메탄올)를 수행하여 상기 에틸 아세테이트 추출물에서 10개의 분획물(F1-F10)을 수득하였다. 추가 정제를 위해 ODS 컬럼 크로마토그래피(물:메탄올) 수행 후, 고속액체크로마토그래피(YMC ODS-A, 메탄올)를 수행하였다(도 2 및 도 3 참조).

[0077] <실시예 3>

[0078] 화합물의 동정

[0079] 상기 실시예2를 통해 수득한 화합물을 동정하기 위하여 분광특성을 분석하였으며, 그 결과 본 화합물이 크리스오파놀(*Chrysophanol*)임을 확인할 수 있었다(도 4 참조).

[0080] *Chrysophanol*, 17.5 mg: yellow crystalline compound; ¹H-NMR(CDC13, 400MHz) δ 12.05(1H, s, -OH), 11.93(1H, s, -OH), 7.72(1H, dd, J=8.4, 7.6Hz, H-6), 7.61(1H, d, J=7.6Hz, H-5), 7.55(1H, d, J=0.8Hz, H-4), 7.22(1H, d, J=8.4Hz, H-7), 7.01(1H, d, J=0.8Hz, H-2), 2.34(3H, s, -CH₃); ¹³CNMR(CDC13, 100MHz) δ 192.5(C-9), 181.9(C-10), 162.7(C-8), 162.4(C-1), 149.3(C-3), 136.9(C-6), 133.6(C-10a), 133.2 (C-4a), 124.5 (C-2), 123.4 (C-7), 121.3 (C-4), 119.9 (C-5), 115.8 (C-8a), 113.7 (C-9a), 22.2 (-CH₃). LREIMS m/z: 254.11[M]⁺(C₁₅H₁₀O₄).

[0081] <실험예 1>

[0082] 크리스오파놀(chrysophanol)의 세포에 대한 독성 실험

[0083] 멜라노마 세포인 B16F1 세포를 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)로부터 구매하였고 Dulbecco's modification of eagle's medium (DMEM, GIBCO, New York, USA) 배지에 100 /ml penicillin-streptomycin, 10% /ml fetal bovine serum (FBS) 을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 마이크로스포럼 속(*Microsporium* sp.)에서 분리된 본 발명의 크리스오파놀 화합물의 B16F1에 대한 세포독성은 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 법으로 측정하였다.

[0084] 간략히, B16F1세포를 96-웰 플레이트에 5×10³ cells/well 정도로 24시간 동안 배양한 후, 상기 세포에 크리스오파놀 화합물을 각각의 농도별(10, 50, 100 μM)로 처리하였다. 24시간이 경과한 시점에서, 상기 세포들을 PBS로 두 번 세척한 뒤 각 웰에 100 의 MTT 시약을 (1 mg/ml) 첨가하였다. 4시간 후 MTT 시약을 제거하고 100 의 dimethyl- sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 포마잔 염을 용해시켰다. 용해된 포마잔의 흡광도는 UV microplate reader (Tecan Austria GmbH, Groedig, Austria)를 이용하여 540 nm 에서 측정하였다. 세포 생존률은 아무것도 처리하지 않은(blank) 그룹과 비교하여 상대적인 수치로서 나타내었다.

[0085] 그 결과 도 5에서 나타낸 바와 같이, 크리스오파놀을 10 및 50 μM의 농도로 처리한 실험군에서 세포 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 크리스오파놀의 적정 처리 농도는 10 내지 50 μM의 범위라 판단하였다.

[0086] <실험예 2>

[0087] 크리스오파놀(chrysophanol)의 티로시나아제 저해 활성

[0088] 티로시나아제에 대한 저해효과는 in vitro에서 mushroom tyrosinase assay에 따라 L-티로신에서 L-도파의 히드

록실화 정도를 분광학적 실험법을 이용하여 측정하였다.

[0089] 96-웰 마이크로플레이트에 각각의 농도별 크리소파놀 용액 10 μ L, 머쉬룸 티로시나아제(1000 units/ml) 20 μ L를 포함하는 50mM의 인산염 완충액 (pH 6.5) 및 170 μ L의 혼합용액(1mM L-티로신 용액, 50 mM 인산칼륨 완충액 (pH 6.5) 및 증류수가 10:10:9의 비율로 함유됨)을 첨가하였다. 37℃에서 30분 동안 배양한 후, 반응액의 흡광도를 GENios 마이크로플레이트 리더기(Tecan Austria GmbH, Austria)를 사용하여 490nm에서 측정하였다.

[0090] 그 결과 도 6에서 나타낸 바와 같이, 크리소파놀의 농도에 의존적으로 티로시나아제 저해 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0091] <실험예 3>

[0092] 크리소파놀(chrysophanol)의 멜라닌 생성 억제 효과

[0093] 멜라닌 함량의 측정은 이전에 개발된 방법(Hosoi et al., 1985)을 약간 변형하여 측정하였다.

[0094] 간략하게, B16F1 흑색종 세포를 24-웰 플레이트에 2×10^4 cells/well 밀도로 분주하고, 24시간 동안 배양하였다. 세포에 크리소파놀을 농도별(5, 10, 50 μ M)로 처리하였다. 1시간 후, 100nM 농도의 α -MSH(alpha-melanocyte stimulating hormone)을 첨가하여 72시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 2회 세척하고, 60℃에서 30분간 가열하여 1N NaOH (in 10% DMSO)에 용해시켰다. 용리물을 5000 $\times$ g로 5분간 원심분리한 후, 405 nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다.

[0095] 그 결과 도 7 및 도 8에서 나타낸 바와 같이, 크리소파놀 처리 농도에 의존적으로 B16F1 흑색종 세포 내의 멜라닌 함량이 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 50 μ M의 농도를 처리한 실험군에서는 양성대조군인 코지산과 거의 유사한 수준으로 멜라닌 함량이 측정되어, 크리소파놀의 멜라닌 생성 억제가 우수함을 알 수 있었다.

[0096] <실험예 4>

[0097] 크리소파놀(chrysophanol)의 티로시나아제 단백질 발현 저해 효과

[0098] 상기 실험예 2에서는 크리소파놀이 티로시나아제 활성을 저해할 수 있는 것으로 나타났는데, 이러한 티로시나아제 저해 활성이 티로시나아제 발현 억제를 통해서 이루어지는 것인지를 알아보기 위하여, 본 실험에서는 크리소파놀의 처리에 따른 티로시나아제 단백질 발현 정도를 웨스턴 블랏을 이용하여 측정하였다.

[0099] B16F1 흑색종 세포에 본 발명의 크리소파놀 화합물을 농도별로 처리한 다음 α -MSH를 첨가하여 일정시간 배양 후, 세포를 RIPA 완충용액(Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA)에 용균시켰다. 원심분리 후에, 세포 용균물의 총 단백질량을 Lowry method (BioRad Laboratories, Hercules, CA)을 사용하여 측정하였다. 동량의 단백질 (15 μ g)을 함유하는 분취량의 상청액을 10% 또는 12% SDS-PAGE 겔에 전기영동하고 니트로셀룰로오스 멤브레인(Amersham Pharmacia Biotech., England, UK)으로 옮긴 후, 0.1% 트윈 20 (TBS-T)을 함유하는 TBS에 용해된 5% BSA(Bovine Serum Albumin)로 적어도 1시간 동안 차단시키고 일차 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)와 혼성화시켰다. 모든 일차 모노클로날 항체를 1:1000 비율로 TBS-T로 희석시켰다. 결합된 항체를 실온에서 1시간 동안 호스래디쉬 퍼옥시다아제-결합 이차 항체로 검출하고 면역반응성 단백질을 화학형광 ECL 검정 키트(Amersham Pharmacia Biosciences, England, UK)를 제조업자의 지시사항에 따라 사용하여 검출하였다. 웨스턴 블랏 밴드는 LAS3000발광 이미지 분석(Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)을 사용하여 시각화하였다.

[0100] 그 결과 도 9에서 나타낸 바와 같이, 크리소파놀 처리 농도에 의존적으로 B16F1 흑색종 세포에서 티로시나아제 단백질 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 20 μ M 농도를 처리한 실험군에서 티로시나아제 단백질 발현이 현저히 억제되는 것으로 나타났다.

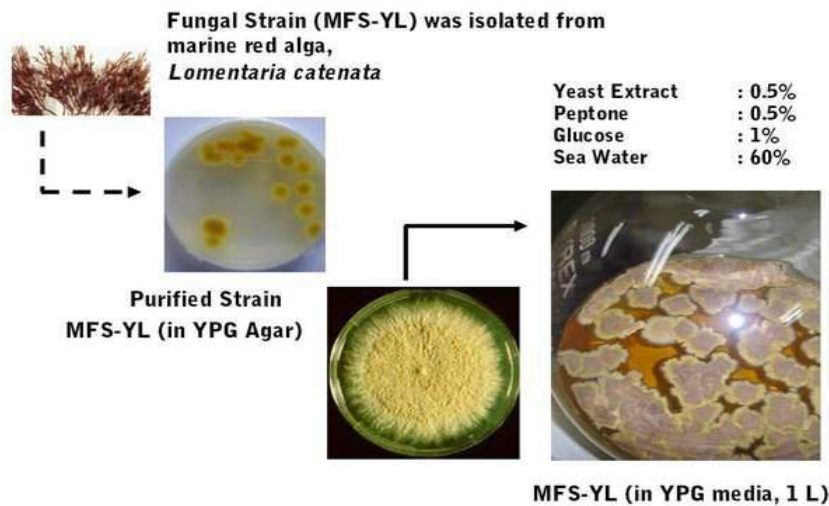
[0101] 결론적으로, 해양진균에서 유래한 크리소파놀 화합물이 티로시나아제 활성 및 발현을 저해하는 기작을 통해 멜라닌 합성을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 미백 기능성 소재로서 유용하게 사용될 수 있다고 판단된다.

[0102] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통

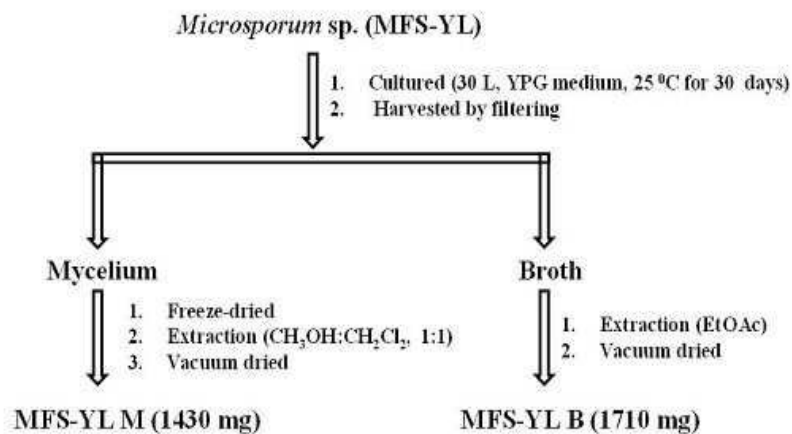
상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

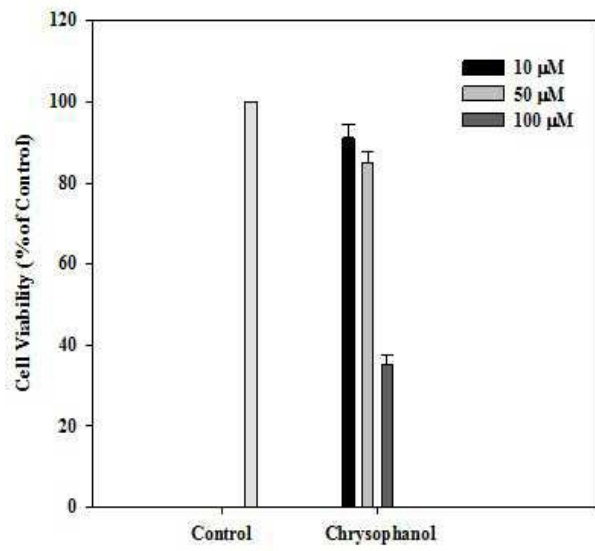
도면1



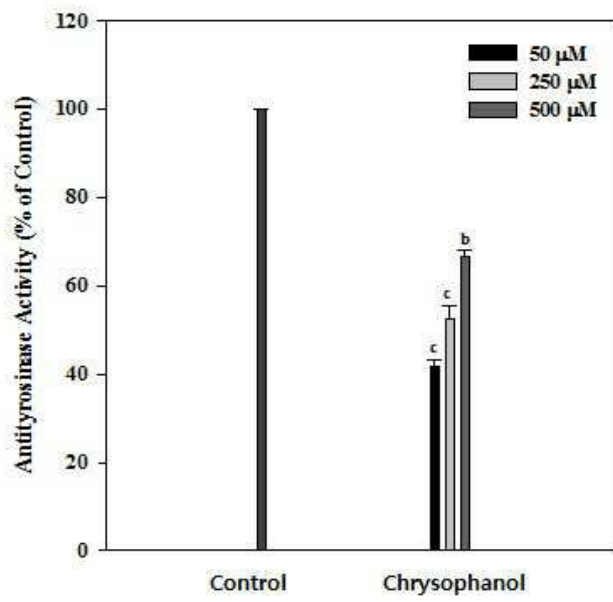
도면2



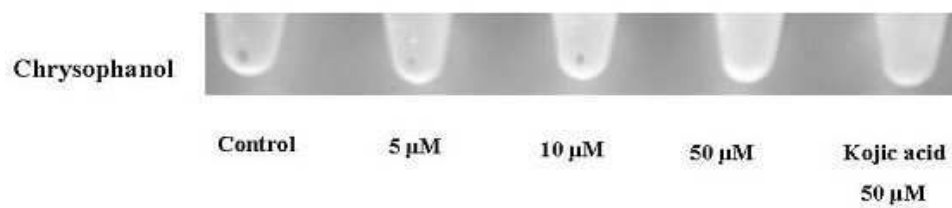
도면5



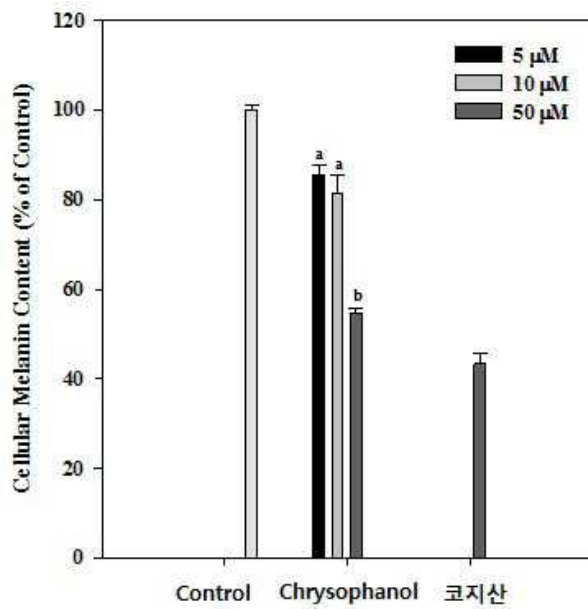
도면6



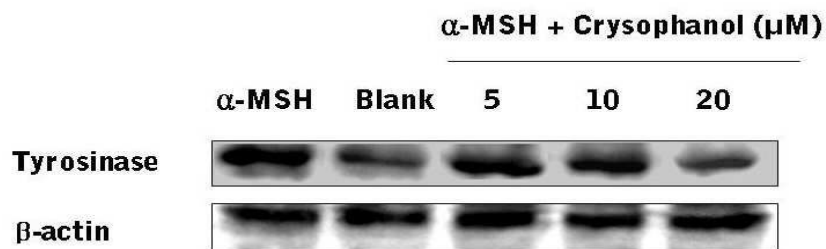
도면7



도면8



도면9



도면10

