



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0050751
 (43) 공개일자 2013년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C07D 493/08 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)
 A61K 36/074 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0115975
 (22) 출원일자 2011년11월08일
 심사청구일자 2011년11월08일

(71) 출원인
건국대학교 산학협력단
 서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)
 (72) 발명자
이창수
 충청북도 충주시 중원대로 3379, 108동 602호 (문화동, 럭키문화아파트)
박영진
 충청북도 충주시 용산동 남산동일하이빌 110-404 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인 수

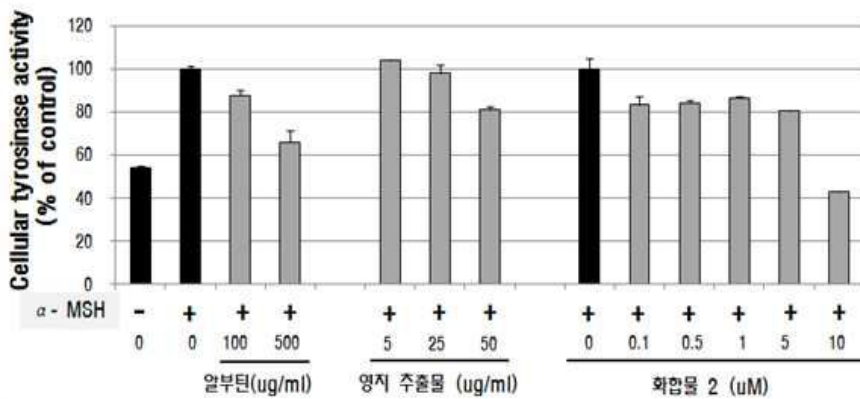
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **영지버섯 유래 신규 화합물 및 그 응용**

(57) 요약

본 발명은 영지버섯 유래 신규 화합물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 티로시나아제 활성 및 멜라닌 생합성을 저해하는 영지버섯 추출물 또는 에고스테롤 퍼옥사이드(ergosterol peroxide) 화합물과 가나도만난디올(ganodermanndiol) 화합물을 포함하는 화장품 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 의한 영지버섯 추출물 및 그로부터 분리된 화합물은 티로시나아제에 대하여 저해활성을 가지고, 특히 흑색종 세포에서의 티로시나아제 활성과 멜라닌 생합성에 대해 유의적인 저해효과가 나타내었으며, 이를 미백과 관련된 화장품 조성물로서 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

손은숙

인천광역시 서구 명가골로 20 (석남동)

박혜란

경기도 부천시 원미구 부일로 525, 802호 (심곡동, 동영피렌체아파트)

권오철

인천광역시 연수구 연수2동 연수시영1차아파트 114-802

한우리자랑

경기도 수원시 팔달구 아주로27번길 20-24, 영신빌라 B101호 (우만동)

윤대은

경기도 남양주시 진접읍 금곡리 휴먼시아16단지아파트 2403-1203

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011A0080010

부처명 농림부

연구사업명 공동연구사업

연구과제명 영지버섯류 중간 특성평가 및 기능성 활성 연구

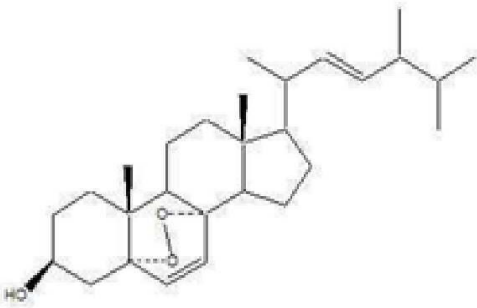
주관기관 건국대학교 산학협력단

연구기간 2011.03.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물 또는 그의 염.



[화학식 1]

청구항 2

제 1항에 있어서 상기 화합물은 티로시나아제 저해 활성을 가지는 화합물 또는 그의 염

청구항 3

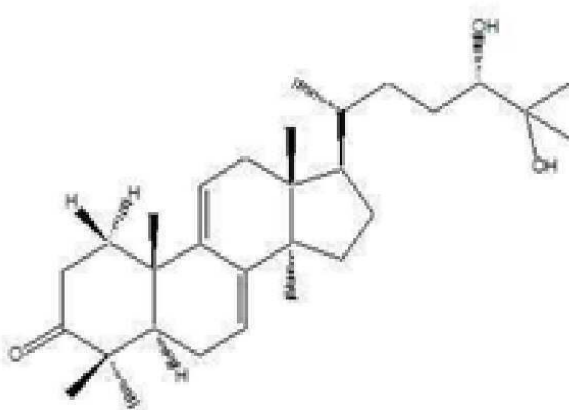
제 1항 또는 제 2항의 화합물을 유효성분으로 포함하는 미백용 화장품 조성물.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항의 화합물을 유효성분으로 포함하는 미백용 약학적 조성물.

청구항 5

하기 화학식 2의 화합물 또는 그의 염.



[화학식 2]

청구항 6

제 5항에 있어서 상기 화합물은 티로시나아제 저해 활성을 가지는 화합물 또는 그의 염

청구항 7

제 5항 또는 제 6항의 화합물을 유효성분으로 포함하는 미백용 화장품 조성물.

청구항 8

제 5항 또는 제 6항의 화합물을 유효성분으로 포함하는 미백용 약학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 영지버섯 유래 신규 화합물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 티로시나아제(tyrosinase) 활성 및 멜라닌(melanin) 생합성을 저해하는 영지버섯 추출물 또는 에고스테롤 퍼옥사이드(ergosterol peroxide) 화합물과 가나도마난디올(ganodermanondiol) 화합물을 포함하는 화장품 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따라 얻어진 영지버섯 추출물 및 그로부터 분리된 화합물은 티로시나아제에 대하여 저해활성을 가지며, 특히 흑색종 세포에서의 티로시나아제 활성과 멜라닌 생합성에 대해 유의적인 저해효과가 나타내며, 이를 미백과 관련된 화장품 조성물로서 유용하게 이용될 수 있다.

배경기술

[0002] 환경오염으로 피부의 자외선 노출이 증가하고 있어 피부노화에 의한 피부색의 침착이 심해지고 있다(J. M. Wood, et al. Exp. Dermatol. 8. 153-164 (1999), Kim C. H, et al. J. Kor. acupuncture, 5, 69-78 (2004)). 또한 미용적인 이유에서 피부착색에 대한 관심이 높아지고 있어, 이에 보다 안정적이고 효과적인 미백소재를 발견하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Hwang J. S. et al. J. Soc. Cosmet. Sic. Kor. 28(1), 135-149 (2002)).

[0003] 인간의 피부색은 멜라닌의 양에 의해서 주로 결정되며 혈색소, 카로틴 같은 색소성분과 혈관분포, 각질층의 두께 등에 의해서도 영향을 받는다. 특히 표피에 분포하는 멜라닌세포는 멜라닌을 합성하여 피부의 색소침착에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 생성된 멜라닌이 각질형성세포로 이동하여 과도한 자외선을 흡수하고 차단 보호하는 광보호 작용을 한다(M. Rozanowska, et al. Free Radic. Bio. Med. 26. 518-525 (1999)). 하지만 멜라닌의 과잉 색소침착은 기미, 주근깨, 검버섯을 형성하며 피부노화도 촉진시키는 것으로 알려져 있다(H. Z. Hill, et al. Pigment Cell Res. 10, 158 (1997), J. H. Kway. et al. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 19(6), (2004)).

[0004] 피부의 멜라닌 생성은 멜라닌세포(melanocyte) 내의 멜라소좀(melanosome)에서 단계적인 여러 효소의 작용을 통해 이루어진다(R. Cui, et al. Cell, 128, 853 (2007)). 아미노산의 일종인 티로신(tyrosine)이 티로시나아제(tyrosinase)에 의해 산화되어 도파(dopa), 도파퀴논(dopaquinone)이 되고 이것이 다시 5,6-디하이드록시인돌(5,6-dihydroxy indole, indole 5,6-quinone)로 자동 산화되고 최종적으로 중합에 의해 멜라닌 폴리머(melanin polymer)를 생성하는 것으로 되어 있다(Ken-ichi. Y. et al. J. Proteome Research. 2(1). 69-7(2002)). 또한 멜라닌 합성은 -MSH, cAMP 유도물질인 cholera toxin, forskolin 등과, melanogenic enzyme인 티로시나아제 관련 단백질(TRP-1, TRP-2), pMel 17과 염증반응에 관여하는 각종 cytokine류, melanocyste gene expression factor인 MITF, Pax-3 등에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Parvze et al. Phytotherapy Research. 20, 921-934 (2006)).

[0005] 관련 연구들을 살펴보면 멜라닌 합성의 주효소인 tyrosinase 활성을 조절하기 위한 티로시나아제 활성억제 소재 연구 (알부틴, 코직산, 감초추출물, 닥나무 추출물 등), 피부각질층의 제거 효능을 가진 소재에 대한 연구 (AHA, BHA, 아미노산, 살리실산 등), 자외선 차단소재 연구 (이산화티탄, 감마오리자놀, 옥시벤존 등), 멜라닌 생합성 장소인 멜라닌형성세포(melanocyte)의 기능을 저하시키기 위한 멜라닌형성세포(melanocyte)에 독성을 나타내는 소재 연구 (비타민 C 등), 활성산소제거 소재에 대한 연구 (비타민 E, 비타민 C) 등으로 이루어지고 있다(K. T. Lee, et al. J. Cosmet. Sic., 54, 133 (2003), K Sato, et al. Biol. Pharm. Bull., 31, 33 (2008), Battaini. G., et al. J. Biol. Inorg. Chem. 5, 262-268 (2000)).

[0006] 그러나 이들 대부분의 것은 효과가 불충분하거나 제형상 불완전한 면이 있고, 피부에 대한 안정성 측면에서 그 사용이 제한되어 있으며, 원료에 대한 수입 의존도가 높은 문제점으로 최근에는 보다 안전하고 효과적인 멜라닌 생성 억제물질을 개발하려는 많은 연구들이 요구되고 있다(Lee. H. B et al. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 34(9), 1325-1329 (2005)). 특히 코직산(kojic acid)의 경우는 in vitro 상의 티로시나아제 억제효과에 비해 세포상이나 in vivo 상의 멜라닌 생성억제 효과가 미비한 실정이며 또한 장기 사용시 간암을 유발한다고 보고되었다(Cabanes, J. S. et al. J. Pharm. Pharmacol. 46. 982-985 (1994)). 또한 알부틴(arbutin)은 히이드로퀴

논(hydroquinone)계열이 갖는 세포독성과 약한 활성으로 문제점이 있으며, 비타민 C 역시 화학적 안정성에 대한 문제가 있어 장기 보관이 어렵다. 따라서 미백 대체 원료로 여러 천연물 추출물을 이용한 기능성 미백 소재에 대한 연구 또한 활발히 진행되어 상백피나 천화분 추출물, 울피, 녹두 등이 미백원료로써 사용되고 있으며, 이에 대한 우수한 대체 미백제의 개발이 시급한 실정이다(Park, S. S. et al. J. Life Sci. 17, 816-821 (2007)).

[0007] 관련 선행특허로 대한민국특허공개번호 제1020100130109호는 '식용버섯 자실체 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 화장품 조성물'에 관한 것으로, 새송이버섯, 팽이버섯 및 만가닥버섯으로 이루어진 군에서 선택된 단독 또는 이들의 조합에서 선택된 식용버섯 자실체 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 화장품이 기재되어 있으며,

[0008] 다른 관련 선행특허로 대한민국특허공개번호 제1020050034833호는 '차가버섯 추출물을 함유하는 있는 미백화장료'에 관한 것으로, 차가버섯 자실체 및 균사체와 물, 친수유기용제 및 그 혼합물 중 어느 하나의 용제를 섞어 차가버섯 자실체 및 균사체를 추출물을 추출하고, 상기 추출물은 화장료에 대하여 0.01 ~ 10 중량% 포함되는 것을 특징으로 하는 차가버섯 추출물을 함유하는 미백 화장료가 기재되어 있다.

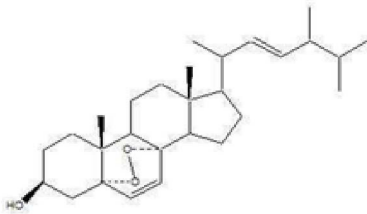
발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 영지버섯으로부터 분리된 화합물을 포함하는 티로시나아제 저해제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

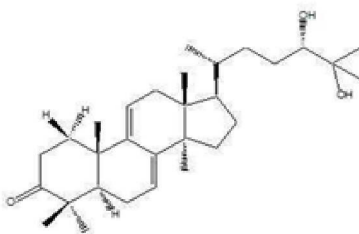
[0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 1의 에고스테롤 퍼옥사이드 화합물을 제공한다.



[0011]

[화학식 1]

[0013] 또 본 발명은 하기 화학식 2의 가나도마난디올 화합물을 제공한다.



[0014]

[화학식 2]

[0016] 본 발명의 구체예에 있어서, 상기 화합물은 영지버섯으로부터 유래한 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하고, 화학적으로 합성되어 제조된 상기 화합물도 본 발명의 범위에 포함된다.

[0017] 본 발명의 일 구체예에 있어서 상기 화합물들은 티로시나아제 저해 활성을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0018] 또 본 발명은 상기 본 발명의 화합물을 유효성분으로 포함하는 미백 화장료 조성물을 제공한다.

[0019] 또 본 발명은 상기 본 발명의 화합물을 유효성분으로 포함하는 미백 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 본 명세서에서 사용되는 "약학적 조성물"은 약리학적 유효량의 티로시나아제 저해 물질 및 약학적으로 허용되는

담체를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "약리학적 유효량", "치료학적 유효량" 또는 간단히 "유효량"은 의도하는 약리학적, 치료학적 또는 예방학적 결과를 달성하는데 유효한 티로시나아제 저해 물질의 양을 말한다.

[0021] 용어 "약학적으로 허용되는 담체"는 치료제의 투여를 위한 담체를 말한다. 이러한 담체에는 염수, 완충염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올 및 이들의 배합물이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 경구 투여되는 약물의 경우, 약학적으로 허용되는 담체에는 약학적으로 허용되는 부형제, 예를 들면 불활성 희석제, 봉해제, 결합제, 윤활제, 감미제, 풍미제, 착색제 및 보존제가 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 적당한 불활성 희석제에는 탄산나트륨 및 탄산칼슘, 인산나트륨 및 인산칼슘, 및 락토스가 포함되는 반면에, 옥수수 전분 및 알긴산은 적당한 봉해제이다. 결합제에는 전분 및 젤라틴이 포함할 수 있는 반면에, 윤활제는 일반적으로 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 또는 활석(talc)일 것이다. 경우에 따라, 정제는 위장관에서의 흡수를 지연시키기 위하여, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트와 같은 물질로 피복할 수 있다.

[0022] 본 발명은 상기에서 기술된 바와 같은 티로시나아제 저해 물질, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 피부 미백용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] 이러한 약학적 조성물은 전달 방식을 기준으로 제형화된다. 한 예로는 비경구 전달을 통한 전신 투여용으로 제형화된 조성물이 있다.

[0024] 본 발명의 약학적 조성물은 티로시나아제 저해에 충분한 용량으로 투여된다. 일반적으로, 투여량은 하루에 수용자의 체중 kg당 0.01 내지 5.0 mg의 범위, 일반적으로 하루에 체중 kg당 1 µg 내지 1 mg의 범위일 것이다. 약학적 조성물은 하루에 1회 투여되거나, 또는 본 발명의 화합물은 하루에 2회, 3회 이상의 소용량으로 적절한 간격으로, 또는 제어 방출 제형을 통한 연속 주입 또는 전달도 사용하여 투여할 수 있다.

[0025] 본 발명의 약학적 조성물은 국소 또는 전신 치료가 바람직한지에 따라, 그리고 치료되는 부위에 따라 다양한 방법으로 투여될 수 있다. 투여는 국소 투여, 폐 투여, 예를 들면, 분무기에 의한 투여를 포함하는 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 통기에 의한 폐 투여; 기관내, 비강내, 상피 및 경피, 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 비경구 투여에는 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내 또는 근육내 주사 또는 주입; 또는 두개내, 예를 들면, 경막내 또는 뇌실내 투여가 포함된다.

[0026] 국소 투여용의 약학적 조성물 및 제형에는 경피 패치제, 연고제, 로션제, 크림제, 젤제, 점적제, 좌제, 분무제, 용액제 및 산제가 포함될 수 있다. 통상적인 약학적 담체, 수성, 분말 또는 유성 기제, 증점제 등이 요구될 수 있다. 바람직한 국소 제형에는 본 발명의 화합물이 지질, 리포솜, 지방산, 지방산 에스테르, 스테로이드, 킬레이트제 및 계면활성제와 같은 국소 전달제와 혼합된 제형이 포함된다. 바람직한 지질 및 리포솜에는 중성(예: 디올레오일포스파티딜 DOPE) 에탄올아민, 디미리스토일포스파티딜 콜린 DMPC, 디스테아로일포스파티딜 콜린), 음성(예: 디미리스토일포스파티딜 글리세롤 DMPG) 및 양이온성(예: 디올레오일테트라메틸아미노프로필 DOTAP 및 디올레오일포스파티딜 에탄올아민 DOTMA)이 포함된다. 본 발명의 화합물은 리포솜 내에 캡슐화되거나, 또는 이에 대해, 특히 양이온성 리포솜에 대해 착화될 수 있다. 또는, 화합물은 지질, 특히 양이온성 지질과 착화될 수 있다. 바람직한 지방산 및 에스테르에는 아라키돈산, 올레산, 에이코사노산, 라우르산, 카프릴산, 카프르산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 리놀산, 리놀렌산, 디카프레이트, 트리카프레이트, 모노올레인, 디라우린, 글리세릴 1-모노카프레이트, 1-도데실아자사이클로헥탄-2-온, 아크릴카르니틴, 아실콜린 또는 C1-10 알킬 에스테르(예: 이소프로필미리스테이트 IPM), 모노글리세라이드, 디글리세라이드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 경구 투여용 조성물 및 제형에는 산제 또는 과립제, 미립제, 나노미립제, 물 또는 비-수성 매질 중의 현탁액제 또는 용액제, 캡슐제, 겔 캡슐제, 사세제(sachet), 정제 또는 미니정제(minitab)가 포함된다. 증점제, 풍미제, 희석제, 유효제, 분산 보조제 또는 결합제가 바람직할 수 있다. 바람직한 경구 제형은, 본 발명의 화합물은 하나 이상의 침투 향상제, 계면활성제 및 킬레이트제와 함께 투여되는 것들이다. 또한, 본 발명의 화합물은 분무 건조된 입자를 포함하는 과립 형태로 경구 전달되거나, 또는 착화되어 마이크로입자 또는 나노입자를 형성할 수 있다. 비경구, 수막내, 뇌실내 또는 간내 투여용 조성물 및 제형에는 완충제, 희석제 및 침투 향상제, 담체 화합물 및 기타 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 기타 적합한 첨가제를 함유할 수도 있는 멸균 수용액이 포함될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 약학적 조성물에는 용액, 에멀전 및 리포솜-함유 제형이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 이들 조성물은 예비형성된 액체, 자가-유화성 고체 및 자가-유화성 반고체가 포함되지만, 이에 한정되지 않

는 다양한 성분으로부터 생성될 수 있다. 단위 투여형으로 편리하게 제공될 수 있는 본 발명의 약학적 제형은 약제 산업에 익히 공지된 통상적인 기술에 따라 제조할 수 있다. 이러한 기술은 활성 성분을 약학적 담체(들) 또는 부형제(들)와 배합하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제형은 활성 성분을 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 이들 둘 모두를 균질하고 긴밀하게 배합하고 나서, 경우에 따라, 제품을 성형하여 제조한다.

[0029] 또한, 본 발명의 조성물은 정제, 캡슐제, 겔 캡슐제, 액체 시럽제, 연질 겔제, 좌제 및 관장제와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 임의의 많은 가능한 투여형으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 수성, 비-수성 또는 혼합 매질 중의 좌제로서 제형화될 수 있다. 수성 현탁액제는, 예를 들면, 나트륨카복시메틸셀룰로스, 소르비톨 및/또는 텍스트란을 포함하는, 현탁액제의 점도를 증가시키는 물질을 추가로 함유할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 티로시나아제 저해 물질을 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명의 피부 미백용 화장품 조성물에 있어서, 상기 티로시나아제 저해 물질은 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. 또한, 본 발명의 피부 미백용 화장품 조성물은 상기 티로시나아제 저해 물질 이외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0032] 본 발명의 피부 미백용 화장품 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 피부 미백용 화장품 조성물은 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.

[0033] 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.

[0034] 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명의 피부 미백용 화장품 조성물은 상기 티로시나아제 저해 물질에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 항산화제, 안정화제, 발포제, 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 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

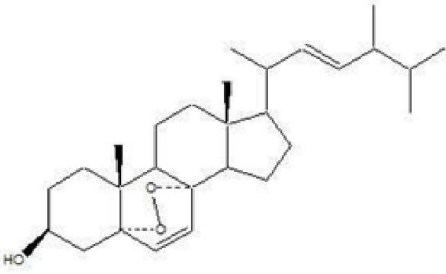
[0036] 본 발명의 화장품 조성물의 구체적인 제형으로서는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형을 포함한다.

[0037] 이하 본 발명을 설명한다.

[0038] 본 발명은 영지버섯 추출물 또는 이로부터 분리된 에고스테롤 피옥사이드를 포함하는 또는 가나도마난디올을 포함하는 화합물은 티로시나아제 저해활성을 가지는 것으로, 특히 흑색종 세포에서 티로시나아제 활성과 멜라닌 생합성에 대해 유의적인 저해효과가 나타내었으며, 이러한 결과는 영지버섯 유래 에고스테롤 피옥사이드 또는 가나도마난디올 화합물이 미백과 관련된 화장품 조성물로서 유용하게 제공될 수 있다.

[0039] 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0040] 본 발명은 영지버섯 추출물을 포함하는 티로시나아제 저해제 또는 미백 화장품 조성물을 제공한다. 또한, 하기 화학식 1과 2로 표시되는 화합물을 포함하는 티로시나아제 저해제 또는 미백 화장품 조성물을 제공한다.



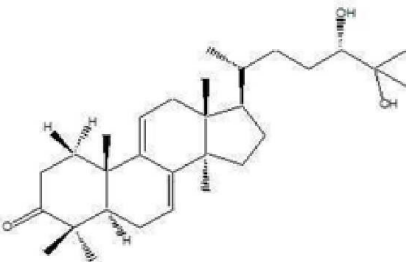
[0041]

[0042] [화학식 1]

[0043] 본 발명에 따른 영지버섯 추출물 및 이로부터 분리된 활성성분은 분리를 위한 일반적인 방법에 의해 얻을 수 있고, 시판되는 시약을 사용할 수 있으며, 균류를 포함한 식물 및 생약제로부터 얻을 수 있다. 본 발명에서는 영지버섯 추출물 및 이로부터 분리된 활성성분을 다음과 같은 방법으로 추출분리하여 제조한다.

[0044] 구체적으로, 건조된 영지버섯 자실체를 10배의 물, 또는 유기용매, 또는 이의 혼합용매로서 20 내지 85℃에서 3시간 내지 7일, 바람직하게는 10일 내지 15일간 초음파 추출 또는 환류 냉각 추출 방법으로 1회 내지 3회 추출한다. 추출액은 농축 및/또는 건조하여 사용할 수 있다. 상기 영지버섯 자실체 추출물은 증류수에 현탁시키고 에틸아세테이트로 3회 추출하여 에틸아세테이트 분획과 물 분획을 얻는다.

[0045] 에틸아세테이트 분획을 헥산/아세테이트 및/또는 클로로포름/메탄올을 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 실시하여 10개의 활성분획을 얻는다(Fr1~Fr10). 이중 5번째 분획과 6번째 분획을 합하여 농축한 후 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 클로로포름/에틸아세테이트의 혼합용매 (10:1 ~5:1)을 용출용매로 하여 4개의 활성분획을 얻는다. 이중 2번째 활성분획은 역상크로마토그래피(RP C-18)를 아세토나이트릴: 물 혼합용매(50:50 ~70:30)를 용출 용매로 분리정제하여 순수화합물 에고스테롤 퍼옥사이드(ergosterol peroxide, 화합물 1)를 얻었으며 4번째 분획은 역상크로마토그래피(RP C-18)를 아세토나이트릴: 물 혼합용매(50:50 ~70:30)를 용출용매로 분리정제하여 순수화합물 가나더만디올(ganodermanondiol, 화합물 2)를 얻었다.



[0046]

[0047] [화학식 2]

[0048] 본 발명에 따른 영지버섯 추출물 및 이로부터 분리된 화합물 1과 화합물 2는 흑색종 세포에서 티로시나아제에 대한 유의적인 저해활성을 갖고 있다.

[0049] 또한, 본 발명에 따른 티로시나아제 저해활성을 갖는 화합물 1과 화합물 2를 포함하는 영지버섯 추출물은 흑색종 세포에서의 멜라닌 생성을 효과적으로 저해하였다. 따라서 본 발명에 따른 화합물 1과 화합물 2를 포함하는 영지버섯 추출물은 멜라닌 생합성 과정에 핵심적으로 작용하는 티로시나아제에 대해 저해제로 작용하여 티로신으로부터 생성되는 도파와 도파퀴논으로의 산화적 반응을 감소시켜 흑색소 세포에서의 멜라닌 생합성을 저해하므로 미백을 포함하는 화장품 조성물에 효과적으로 사용할 수 있다.

[0050] 따라서, 본 발명에 따른 영지버섯의 추출물 및 이로서 분리된 상기 화합물 1과 화합물 2는 흑색종 세포에서 티로시나아제 활성과 멜라닌 생합성에 대하여 유의적으로 저해활성을 나타냄으로써 멜라닌 생성 저해를 통한 미백 기능을 갖는 화장용 조성물에 있어 유효성분으로 우수한 미백제로서 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명을 통해서 알 수 있는 바와 같이, 영지버섯 추출물과 이로부터 분리된 에고스테롤 퍼옥사이드와 가나더마난디올 화합물들은 티로시나아제 저해활성을 갖고 있으며, 특히 상기 추출물과 화합물들은 흑색종 세포에서 화합물들의 효과에 의해 티로시나아제 활성화와 멜라닌 생합성을 저해시켜, 피부 미백에 관여하는 화장품 또는 약학 조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 에고스테롤 퍼옥사이드(ergosterol peroxide), 화합물 1의 화학식을 기재한 그림.

도 2는 가나더마난디올(ganodermanondiol), 화합물 2의 화학식을 기재한 그림.

도 3은 흑색종 B16F10세포에서 세포독성에 대한 화합물들의 효과를 나타낸 그림. 본 도면은 흑색종 B16F10세포에 대한 영지버섯 추출물과 그로부터 분리된 화합물들의 세포독성 유무에 관한 실험으로, MTT가 세포내 미토콘드리아의 활성화에 의해서 분해됨으로 보라색으로 발색되는데 이를 흡광도로 측정하여 세포 생존력 및 독성을 확인하고자 한 것으로, 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 영지버섯 추출물로부터 분리된 화합물 1과 2는 각각 0.1 ~ 1uM, 0.1 ~ 10uM의 농도별로 처리하여 흡광도를 측정한 결과 세포에 대하여 세포독성을 나타나지 않았다.

도 4는 흑색종 B16F10세포에서 α -MSH와 에고스테롤 퍼옥사이드(ergosterol peroxide), 화합물 1의 처리에 의한 티로시나아제 활성화 저해효과를 나타낸 그림. 본 도면은 영지 추출물 및 화합물 1을 흑색종 B16F10세포에 처리하였을 때 티로시나아제 활성화 저해정도를 확인하고자 한 것으로, 그 결과 양성 대조군인 알부틴을 처리하였을 때 보다 화합물 1을 처리한 경우 티로시나아제의 활성을 크게 저해시켰으며, 10uM 농도에서는 약 33.10% 4.91%로 나타났다.

도 5는 흑색종 B16F10세포에서 α -MSH와 가나더마난디올(ganodermanondiol), 화합물 2의 처리에 의한 티로시나아제 활성화 저해효과를 나타낸 그림. 본 도면에서는 도 4의 실험과 동일한 방법의 분석법으로 영지 추출물 및 화합물 2를 흑색종 B16F10세포에 처리 하였을 때 티로시나아제 활성화 저해정도를 확인한 것으로, 그 결과 양성 대조군인 알부틴을 처리하였을 때 보다 화합물 2를 처리한 경우 농도의존적으로 티로시나아제의 활성을 크게 저해시켰으며, 10uM 농도에서는 약57.18% 0.71% 로 나타났다.

도 6는 흑색종 B16F10세포에서 α -MSH 유도 멜라닌 생성에 대하여 에고스테롤 퍼옥사이드(ergosterol peroxide), 화합물 1의 저해효과를 나타낸 그림. 멜라닌(melanin)은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌형성세포(melanocyte)의 멜라노솜(melanosome)에서 생합성되며, 흑갈색의 eumelanin과 적노랑색의 pheomelanin이 있으며, 이는 멜라닌 생성 관련 단백질들이나 멜라노솜과 멜라닌형성세포의 자극 호르몬인 α -MSH(α -melanocyte stimulating hormone)에 의해 시작된다. 본 도면에서는 흑색종 B16F10세포에 α -MSH를 처리하여 멜라닌 생성을 유도시킨 다음, 영지 추출물 및 화합물 1의 처리에 의한 멜라닌 생성 저해정도를 확인하고자 하였다. 그 결과 양성 대조군인 알부틴을 처리하였을 때 보다 화합물 1을 처리한 경우 농도의존적으로 멜라닌 생성을 저해시켰으며, 10uM 농도에서 약 39.60% 0.51%로 나타났다.)

도 7은 흑색종 B16F10세포에서 α -MSH 유도 멜라닌 생성에 대하여 가나더마난디올(ganodermanondiol), 화합물 2의 저해효과를 나타낸 그림. 본 도면은 흑색종 B16F10세포에 α -MSH를 처리하여 멜라닌 생성을 유도시킨 다음, 영지 추출물 및 화합물 1의 처리에 의한 멜라닌 생성 저해정도를 확인하고자 한 것으로, 그 결과 양성 대조군인 알부틴을 처리하였을 때 보다 화합물 1을 처리한 경우 농도의존적으로 멜라닌 생성을 저해시켰으며, 10uM 농도에서 약 50.98% 1.52%로 나타났다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0054] 실시예 1. 영지버섯 추출물의 제조

[0055] 영지버섯 재배농가에서 구입한 영지버섯 4kg을 세절하여 에탄올 30L에 침지시킨 후 실온에서 7일간 방치하여 여과하고 수득한 추출액을 감압 농축 및 건조하여 총 추출물 90g을 수득하였다.

- [0056] 실시예 2. 영지버섯 에틸아세테이트 가용추출물의 제조
- [0057] 상기 총 추출물 90g을 2L의 증류수에 현탁시킨 다음, 에틸아세테이트 3L씩 가하여 3회 추출하였으며, 티로시나아제 저해활성 및 멜라닌 생성 억제 활성이 높은 에틸아세테이트 분획을 수득하였다. 상기 수득한 에틸아세테이트 분획을 감압 농축하여 에틸아세테이트 가용부 70g을 수득하였다.
- [0058] 실시예 3. 영지버섯 에틸아세테이트 가용추출물로부터 화학물 1의 분리
- [0059] 상기 실시예 2의 에틸아세테이트 가용부 70g을 실리카겔(230~400 mesh, Merck사)에 흡착시킨 후 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 이때 전개용매로서 헥산/에틸아세테이트 혼합용매(20:1)을 초기용매로 하여 헥산/에틸아세테이트 혼합용매(1:1)까지 극성을 조절하며 분획을 하였으며, 이후, 용매의 조성을 클로로포름/메탄올 혼합용매(20:1)로 전환하여 클로로포름/메탄올 혼합용매(1:1)까지 극성을 높여 분획을 수행하였다. 이로써 10개의 활성분획을 얻었으며(Fr1~Fr10), 티로시나아제 저해활성 및 멜라닌 생성 억제 활성이 높은 5번째 분획과 6번째 분획을 합하여 농축한 후 2차 실리카겔 컬럼크로마토그래피(70~230 mesh, Merck사)를 클로로포름/에틸아세테이트의 혼합용매 (10:1~5:1)을 용출용매로 하여 4개의 활성 분획을 얻었다. 이 중 2번째 활성분획은 역상크로마토그래피(RP-C-18)를 아세토나이트릴/물 혼합용매(50:50 ~70:30)를 용출 용매로 분리정제하여 순수화합물 예고스테롤 퍼옥사이드(ergosterol peroxide, 화학물 1)를 얻었다(도 1).
- [0060] 실시예 4. 화합물 2의 분리
- [0061] 상기 실시예 3의 2차 실리카겔 크로마토그래피를 통해 수득한 활성 분획 중 4번째 분획을 역상크로마토그래피(RP C-18)를 아세토나이트릴/물 혼합용매(50:50~70:30)를 용출용매로 분리정제하여 순수화합물 가나더마난디올(ganodermanondiol, 화학물 2)를 얻었다(도 2).
- [0062] 실시예 5. 화학식 1로 표시되는 화합물의 이화학적 특성
- [0063] Ergosterol peroxide (화학식 1)의 이화학적 특성은 다음과 같다:
- [0064] 무색 침상(needles), $C_{28}H_{46}O_3$;
- [0065] 1H -NMR($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.81(3H, s, H-18), 0.82(3H, d, $J=4.5$ Hz, H-26), 0.88(3H, s, H-19), 0.90(3H, d, $J=6.6$ Hz, H-28), 0.915(2H, s, H-15), 0.99(3H, d, $J=6.6$ Hz, H-21), 3.96(1H, m, H-3), 5.13(1H, dd, $J=8.1, 15$ Hz, H-22), 5.21(1H, dd, $J=7.5$ Hz, 15.36 Hz H-23), 6.24(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-6), 6.51(1H, d, $J=8.4$ Hz, H-7). ^{13}C -NMR(75 MHz, $CDCl_3$): 12.84(C-18), 17.53(C-28), 18.15(C-19), 19.61(C-27), 19.92(C-26), 20.60(C-15), 20.85(C-21), 23.37(C-11), 28.61(C-16), 30.08(C-2), 33.04(C-25), 34.67(C-1), 36.89(C-10), 36.94(C-4), 39.32(C-12), 39.7(C-20), 42.75(C-24), 44.53(C-13), 51.06(C-9), 51.65(C-14), 56.17(C-17), 66.43(C-3), 79.40(C-8), 82.13(C-5), 130.72(C-7), 132.28(C-23), 135.17(C-22), 135.39(C-6)
- [0066] 실시예 6. 화학식 2로 표시되는 화합물의 이화학적 특성
- [0067] Ganodermanondiol (화학식 2)의 이화학적 특성은 다음과 같다:
- [0068] 무색 결정, $C_{30}H_{48}O_3$;
- [0069] 1H -NMR($CDCl_3$, 300M Hz): δ 0.59(3H, s, H-18), 0.87(3H, s, H-28), 0.91(3H, d $J=6.3$ Hz, H-21), 1.08(3H, s, H-19), 1.12(3H, s, H-29), 1.16(3H, s, H-26), 1.19(3H, s, H-27), 2.77(1H, m, H-1), 3.30(1H, bd, $J=8.1$ Hz, H-24), 5.38(1H, bd, $J=6.3$ Hz, H-7), 5.50(1H, bd, $J=6.3$ Hz, H-11). ^{13}C -NMR(75 MHz, $CDCl_3$): 15.70(C-18), 18.61(C-21), 22.02(C-19), 22.43(C-30), 23.19(C-28), 23.64(C-6), 25.32(C-27), 25.42(C-26),

26.54(C-29), 27.83(C-16), 28.69(C-15), 31.44(C-22), 33.45(C-23), 34.83(C-2), 36.51(C-20), 36.51(C-20), 36.60(C-1), 37.17(C-12), 37.80(C-10), 43.73(C-13), 47.45(C-4), 50.28(C-5), 50.69(C-14), 50.95(C-17), 73.22(C-25), 79.57(C-24), 117.23(C-11), 119.90(C-7), 142.83(C-8), 144.49(C-9), 216.83(C-3)

[0070] 실시예 7. 흑색종 B16F10세포주의 세포배양 및 세포생존에 미치는 영향

[0071] 흑색종 B16F10 세포주는 ATCC (American Type Culture Collection, 6475)로부터 분양받아 사용하였다. 이 세포는 DMEM에 10% FBS, 100U/ml penicillin 및 100ug/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80 ~ 90%의 confluency에서 실험하였다.

[0072] 흑색종 B16F10 세포에 대한 영지 추출물 및 화합물의 세포독성 유무를 확인하기 위해 MTT assay를 시행하였다. 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM으로 96 well plate에 3x10³ cells/well로 100ul씩 넣고 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 동안 배양한다. 배양 후 배지를 제거하고 상이한 농도의 화합물을 처리하여 각 그룹 당 triplicate로 처리한 뒤 37℃, 5% CO₂ 조건으로 72시간 배양한다. 배양 후 시험액이 포함된 배지에 5mg/ml의 MTT 시약을 well 당 10ul씩 분주한 다음 96 well plate의 빛을 차단하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양이 완료되면 MTT 시약이 포함된 배지를 제거하고, DMSO (dimethyl sulfoxide) 100ul를 가하여 MTT-formazan crystal을 용해시키고 570nm 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다.

[0073] 세포 생존율 (%) = (대조군의 흡광도/실험군의 흡광도) X 100

[0074] 도 3에서 보는 바와 같이, 본 발명의 영지버섯 추출물 및 그로부터 분리된 화합물 1과 2는 각각 5 ~ 50ug/ml, 0.1 ~ 10uM의 농도 범위에서 흑색종 B16F10 세포에 대하여 세포독성을 나타내지 않았다.

[0075] 실시예 8. 흑색종 B16F10세포주의 티로시나아제 활성 저해 효과

[0076] 티로시나아제 활성은 DOPA oxidase 활성을 측정한 것으로 나타내었다. 흑색종 B16F10 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM으로 6 well plate에 1x10⁵ cells/well의 농도 분주하고 37℃, 5% CO₂조건하에서 24시간 동안 배양한다. 배양 후 배지를 제거하고 상이한 농도의 영지버섯 추출물 및 화합물 1과 2를 10% FBS 함유 DMEM 배양액에 넣고, 여기에 유도인자로 α-MSH (100nM)를 첨가하였으며 37℃, 5% CO₂ 조건으로 72시간 동안 배양하였다. 세포를 배양한 후 배지를 제거하고, PBS로 2회 세척한 다음 well당 PBS 1ml를 분주하여 세포 pellet을 회수한다. 회수된 pellet은 14,000rpm으로 20분 동안 원심분리한 다음 상층액을 제거한 후 lysis buffer (67mM sodium phosphate, pH 6.8, 1% Triton-X100, 0.2mM PMSF) 500ul를 첨가하여 초음파 분쇄기로 세포를 분쇄하였다. 세포 분쇄액을 1시간 동안 얼음에 보관한 후 14,000rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 얻고, 이 상층액을 tyrosinase 활성 분석에 사용하기 위해 단백질을 정량하였다. 67mM sodium phosphate (pH6.8)에 40ul의 4mM L-DOPA와 40ug의 각각의 상층액을 혼합하여 200ul가 되도록 96 well plate에 첨가한 후 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 생성된 도파크롬(DOPA chrome)을 475nm에서 흡광도를 측정하여 상대적 티로시나아제 활성으로 나타내었다.

[0077] 티로시나아제 활성 저해율 (%) = 1-(대조군의 흡광도/실험군의 흡광도) X 100

표 1

시료	농도	저해율 (%)	시료	농도	저해율 (%)	시료	농도	저해율 (%)
----	----	---------	----	----	---------	----	----	---------

무처리	0	0	화합물1 (uM)	0	0	화합물2 (uM)	0	0
알부틴 (ug/ml)	100	12.29		0.1	-		0.1	16.62
	500	33.87		0.5	-		0.5	15.75
영지추출물 (ug/ml)	5	-		1	-		1	13.40
	25	1.94	5	34.94	5	19.74		
	50	19.10	10	33.41	10	57.18		

[0079] 표 1은 흑색종 B16F10 세포내 티로시나아제의 저해 효과를 나타낸 표이다.

[0080] 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 영지버섯 추출물로부터 분리된 화합물 1과 2는 음성 대조군에 비하여 현저하게 세포내 티로시나아제(tyrosinase) 활성을 농도의존적으로 저해시키는 것을 확인할 수 있었으며, 현재 미백제로 사용되어지는 양성 대조군인 알부틴(arbutin)처리군 보다 낮은 농도에서 티로시나아제 활성을 더 강하게 저해시켰다. 화합물 1과 2를 처리한 농도(10uM)에서 각각 33.10% 4.91%, 57.18% 0.71% 정도로 티로시나아제의 활성을 저해시켰다(표 1).

[0081] 실시예 9. 흑색종 B16F10세포주의 멜라닌 생성 저해 효과

[0082] 흑색종 B16F10 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM으로 6 well plate에 1×10^5 cells/well 의 농도로 분주하고 37, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 동안 배양한다. 배양 후 배지를 제거하고 상이한 농도의 영지버섯 추출물 및 화합물을 10% FBS 함유 DMEM 배양액에 넣고, 여기에 유도인자로 α -MSH (100nM)를 첨가하였으며 37, 5% CO₂ 조건으로 72 시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하여 PBS로 2회 세척하고 well당 PBS 1ml를 분주하여 세포 pellet을 회수한다. 회수된 pellet은 14,000rpm으로 20분 동안 원심 분리한 다음 상등액을 제거한다. 그리고 이 세포 pellet을 60에 1시간 동안 건조한 후 10% DMSO가 함유된 1M NaOH 150ul을 넣어 60 항온조에서 1시간 처리하여 세포내의 멜라닌을 용해시킨다. 이 액 100ul를 96 well plate에 넣고 ELISA reader로 405nm에서 흡광도를 측정하고 멜라닌 표준액을 이용한 표준곡선과 비교하여 멜라닌 함량을 정량하였다.

[0083] 멜라닌 함량 저해율(%) = 1-(대조군의 멜라닌 함량/실험군의 멜라닌 함량) X 100

표 2

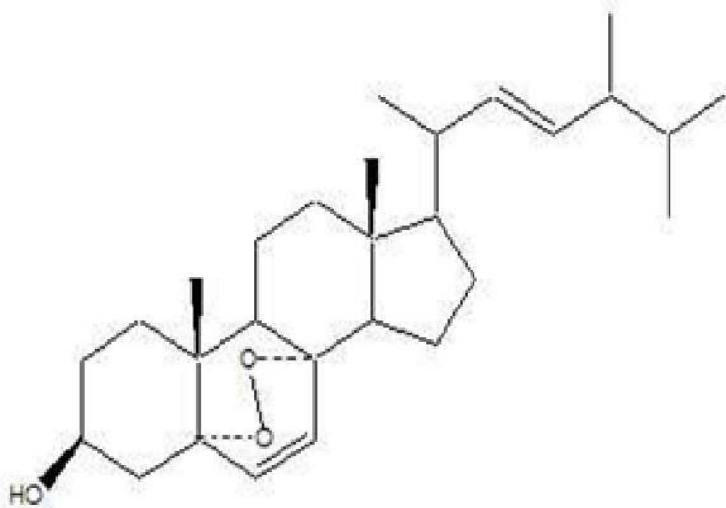
시료	농도	저해율 (%)	시료	농도	저해율 (%)	시료	농도	저해율 (%)
무처리	0	0	화합물1 (uM)	0	0	화합물2 (uM)	0	0
알부틴 (ug/ml)	100	12.37		0.1	6.77		0.1	3.84
	500	23.12		0.5	4.10		0.5	13.81
영지추출물 (ug/ml)	5	-		1	12.44		1	20.13
	25	15.61	5	40.58	5	40.43		
	50	37.14	10	39.60	10	50.98		

[0085] 표 2는 흑색종 B16F10 세포내 멜라닌 함량 저해 효과를 나타낸 표이다.

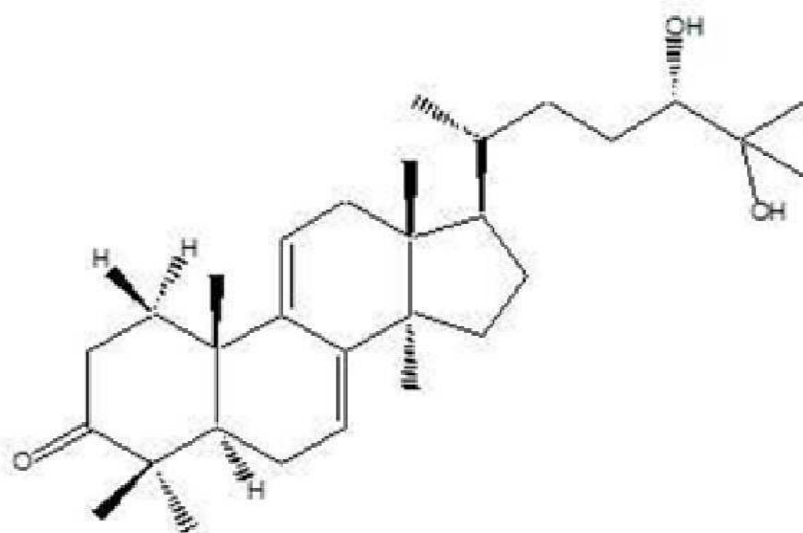
[0086] 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 영지버섯 추출물로부터 분리된 화합물 1과 2는 α -MSH 유도에 의해 생성된 멜라닌 함량을 현저하게 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한 화합물 1과 2는 현재 미백제로 사용되어지는 양성 대조군인 알부틴(arbutin) 처리군 보다 낮은 농도에서 멜라닌 생성을 억제시켰다. 이들은 10uM 농도에서 각각 39.60% 0.51%, 50.98% 1.52% 정도로 대조군에 비해 멜라닌 생성을 억제시켰다(표 2).

도면

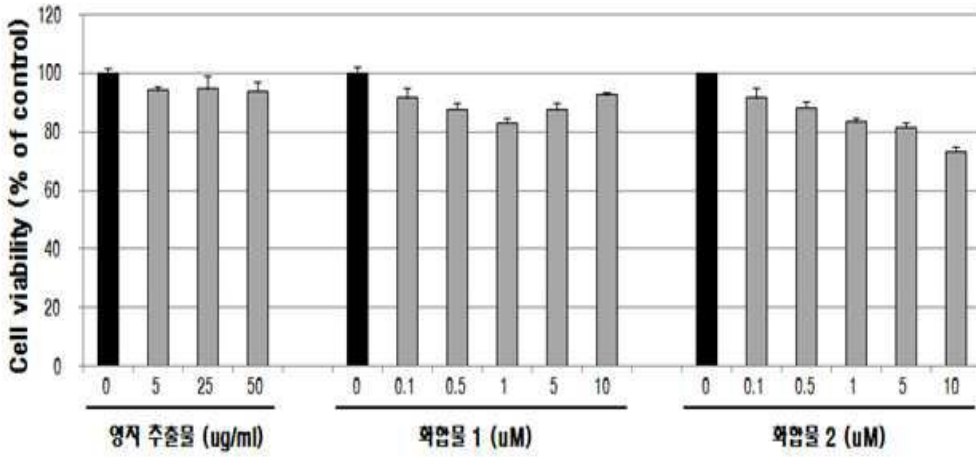
도면1



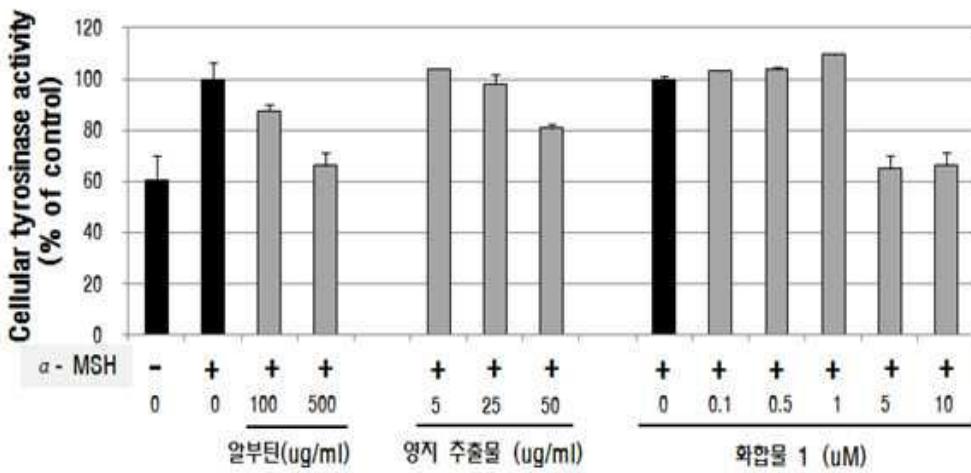
도면2



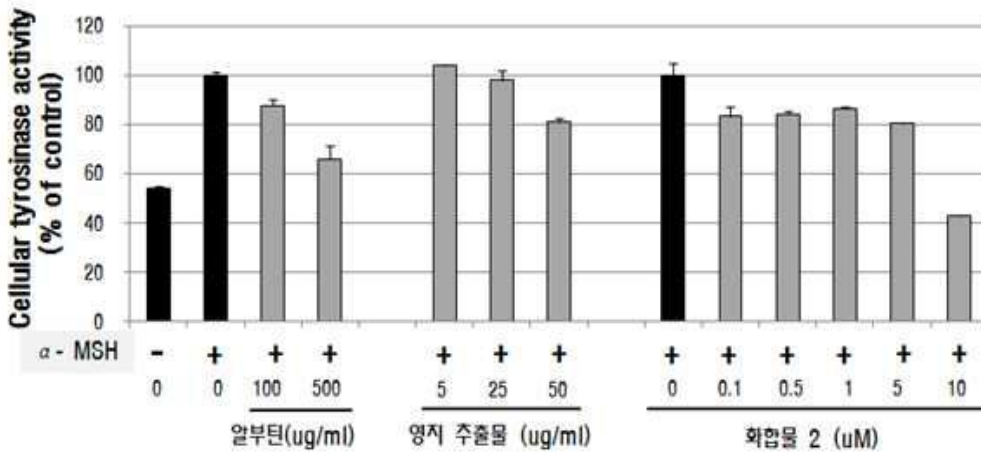
도면3



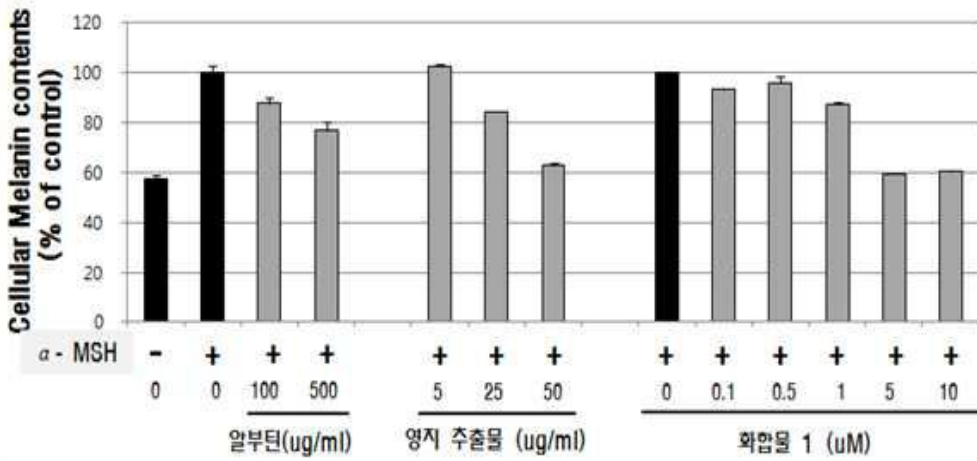
도면4



도면5



도면6



도면7

