

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000499-01

보안과제( ), 일반과제(○)

과제번호 108075-2

마유래 천연성분인 디오스게닌을 이용한  
비고시 미백 기능성 화장품 소재 및 제품 개발

( Development of cosmetic materials and  
finished products using diosgenin from yam plant)

주관기관 : 바이오스펙트럼(주)

협동기관 : 한국콜마(주)

농림수산식품자료실



0004941

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “마유래 천연성분인 디오스게닌을 이용한 비고시 미백 기능성 화장품 소재 및 제품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 06 월 30 일

주관연구기관명 : 바이오스펙트럼(주)

주관연구책임자 : 박 덕 훈

연 구 원 : 이 종 성

연 구 원 : 함 경 만

연 구 원 : 유 신 애

연 구 원 : 이 상 엽

연 구 원 : 임 지 훈

연 구 원 : 김 정 은

협동연구기관명 : 한국콜마(주)

협동연구책임자 : 정 태 화

연 구 원 : 이 성 종

연 구 원 : 백 문 기

연 구 원 : 김 은 영

# 요 약 문

## I. 제 목 : 마유래 천연성분인 디오스게닌을 이용한 비고시 미백 기능성 화장품 소재 및 제품 개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

소득 수준의 향상으로 미에 대한 관심이 증가되고 있다. 특히 자외선이나 스트레스 등에 의해 발생하는 주름, 기미, 주근깨 등에 대한 관심은 지대하다고 볼 수 있다. 이로 인해 피부 관련 기능성 화장품개발이 활기를 띠고 있지만, 소비자의 기대심리를 충족시킬만한 제품개발은 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 본 사업팀에서는 마(yam)에 대한 연구를 수행한 결과, 미백 효능이 우수하다는 사실을 밝혀 국제학계로부터 최근 인정을 받았고(국제SCI저널 게재), 관련 특허의 경우, 국내 등록되었고, 국제특허는 출원된 상태이다. 그러므로 본 과제에서는 마의 유효성분인 디오스게닌(diosgenin)을 이용하여 비고시 미백 기능성 화장품 소재로서의 개발을 위해 화장품 원료화 연구를 수행하고, 최종적으로 이를 이용하여 완제품을 개발하여 상업화를 추진하고자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 과제에서는 마의 유효성분인 디오스게닌(diosgenin)을 이용하여 비고시 미백 기능성 화장품 소재로서의 개발 및 완제품을 개발하기 위하여 다음과 같이 연구개발을 통해 상업화를 추진하고자 한다.

1. 본 사업팀에 의해 미백 효능이 입증된 디오스게닌에 대한 화장품 원료화 (빛, 온도, pH등에 대한 안정성, 피부투과도(리포솜 공법이용), 안전성)
2. 고순도의 디오스게닌의 추출, 분리 및 정제방법 확립
3. 마에 대한 디오스게닌 고함량 안정(성분의 균일화), 대량 생산 기술 확립
4. 디오스게닌에 대한 동물안전성 시험
5. 원료화된 디오스게닌을 이용한 화장품 제형연구 및 시제품 개발
6. 시제품을 이용한 미백 임상효능 시험 수행
7. 시제품내에서의 디오스게닌의 안정성 검증(빛, 온도, pH등의 조건)

8. 시제품의 인체 안전성 검증
9. 식약청으로부터 비고시 미백기능성 인증 신청 및 획득
10. 디오스게닌을 함유한 미백기능성 완제품 3종 개발(영양크림, 스킨, 로션) 및 상업화

#### IV. 연구개발 결과

디오스게닌은 이전의 연구를 통해 미백효능이 규명되어 기능성화장품 원료로서 가능성을 지닌 물질임을 확인되었다. 그러나 기능성 화장품 원료화를 위한 용해도 실험에서 디오스게닌의 용매에 대한 난용성이 확인됨에 따라 이를 극복하기 위하여 당사에서 보유한 나노리포좀 원료화 및 제형화 기술을 통해 디오스게닌 2%를 함유한 디오스피어 2.0 리포좀 원료(DioSphere 2.0) 개발하여 용매에 대한 난용성 문제를 해결하였으며, pH, 온도, 빛에 대한 안정성 실험결과, 디오스피어 2.0 리포좀 원료에서의 디오스게닌의 안정성을 확인하였다.

이와 함께 국내산 마로부터 미백활성을 나타내는 디오스게닌을 대량 추출할 수 있는 방법을 탐색함으로써 기능성 화장품 원료로서 신속하고, 경제적인 프로토콜을 확립하고, 이를 제품화단계에 이용할 수 있도록 대량생산공정체계를 구축하여 국내산 마(*D. batatas*)로부터 1.1~1.3%의 수율로 디오스게닌을 대량 추출함으로써 원료 생산에 대한 경제성을 높이고, 원료 물질인 디오스게닌을 자체적으로 확보할 수 있는 기반을 확립하였다.

디오스게닌의 안전성을 규명하기 위하여 동물과 인체 모델에서의 독성여부 검증 및 완제품 제형 연구를 통해 화장품 시제품을 개발하였으며, 인체 피부에서의 안전성 및 미백 유효성을 평가 수행하였으며, 그 결과 안전성 및 미백 유효성에 대한 유의성 있는 효능을 확인하였다. 상기의 결과들을 통해 4종의 비고시 미백 기능성 화장품 개발 및 이에 대한 상표등록을 하였으며, GenoPhyto(제노피토), 이를 식품의약품 안정청에 비고시 미백 기능성 인증을 신청하였다. 향후, 미백 기능성 인증을 식약청으로부터 획득한 후, 비고시 미백화장품 사업화를 적극적으로 진행할 예정이다. 본 연구를 통해 디오스게닌 원료에 대한 기술이전이 진행 중에 있으며, 특히 2건 출원 (일본, 중국) 및 SCI 논문 1편을 투고 하였다.

#### V. 연구성과 및 성과활용 계획

화장품 원료는 현재 년 간 900억 원 정도가 수입되고 있으며 매년 수입비중이 점차로 커지고 있다. 따라서 화장품 원료의 국산화는 중요성이 더욱 커지고 있다. 본 과제의 주관기관인 바이오스펙트럼(주)은 이미 50여 개의 화장품 제조업체에 원료를 공급하고 있으며 해외에도 일부 수출하고 있다. 따라서 본 과제에서 확보된 디오스게닌 원료(DioSphere 2.0)는 바이오스펙트럼(주)을 통하여 기존 거래처에 빠른 시일 내에 공급될 수 있을 것이다. 또한 당사의 해외 대리점을 통하여 13개국에 수출이 가능할 것이다.

화장품 완제품은 국제규격의 원료만을 사용하여 제품화 한 것으로서 각 제품에 사용된 모든 원료에 대한 안전성 확보 및 완제품에 대한 안전성과 유효성이 확보된 고급제품이다. 따라서 본 과제에서 얻어진 모든 화장품은 국내뿐만 아니라 국제적으로도 수출이 가능하다. 국내의 경우, 국내 1위의 OEM업체인 한국콜마(주)를 통해 국내 화장품업체에 대량 공급할 예정이다.

현재 한국콜마의 경우, 기존 네트워크가 구축되어 있어, 국내 및 해외 유통에는 어려움이 없는 상태이다. 국제적으로는 주관기관에 의하여 매년 참가하고 있는 국제 화장품 원료전시회에 부스 참석하여 국제 마케팅을 수행하고 있으며 이미 독일을 비롯한 세계 13개국에 에이전시를 두고 있다. 따라서 기존의 해외 판매망을 통해 유통이 가능하다. 또한 개발된 완제품은 홍콩 국제 미용전시회와 동경 미용박람회 및 독일과 미국 등에서 열리는 국제 전시회에 참석하여 수출을 추진할 예정이다. 주관기관인 바이오스펙트럼(주)과 협동기관인 한국콜마(주)는 이미 수차례에 걸쳐서 여러 해외 박람회에 참석한 경험을 갖고 있기 때문에 충분히 수출 추진이 가능할 것으로 예상되고 있다.

원료화를 위한 전체 공정에 관한 노하우 습득은 추후의 유사한 사례에서 모든 과정이 응용되어 질 수 있는 기반기술이 될 것이다. 본 과제에서는 “원료추출 → 원료의 물리 화학적 특성 및 효능 파악 → 원료 생산 안정화-원료 안정성 확보 → 원료규격 결정 및 국제공인”의 전체 과정을 거치게 되며 이 과정은 원료개발의 표준공정으로서 확립될 수 있으며 다른 모든 신규 원료개발에 응용되어 질 수 있다. 경제적 산업적 측면에서는 화장품 원료의 90% 이상을 수입에 의존하고 있는 국내시장 상황을 고려해 볼 때, 천연원료 개발성공은 원료수입 의존도를 줄일 뿐만 아니라 국제 원료 시장에 진출할 수 있는 가능성을 높일 것으로 예상된다. 마의 우수한 효능을 내세운 제품들이 상업화됨으로써 기존제품들과의 뚜렷한 차별성을 통해 가치창출을 유도할 수 있다. 특히 본 과제의 협력기관인 한국콜마를 통한 화장품 브랜드를 출시할 예정이므로 세계적인 제품으로 커 나갈 수 있는 가능성을 갖게 될 것이다.

## SUMMARY

### (영문 요약문)

Diosgenin, a steroid sapogenin, is the product of hydrolysis by acids, strong bases, or enzymes of saponins, extracted from the tubers of Dioscorea wild yam. Through the earlier studies, We have been identified as a cosmetic ingredient, diosgenin was represented whitening effect of skin. However, it has low solubility of the solvent. In order to overcome this problem, we developed DioSphere 2.0 containing 2% diosgenin by our Nano liposome technology. And then, we investigated stability of liposome formulation of diosgenin, DioSphere 2.0, for pH, temperature and light. As a result, it was found to be stable under various circumstances.

In addition, we established the bulk extraction and cost-effective protocol of diosgenin with the whitening activity from domestic yam. Mass production of diosgenin to increase economic efficiency from domestic yam can be secured based on its own has been established.

For the safety of diosgenin, we investigated toxicity test with animal and human models. Also we developed a cosmetic formulation prototypes developed by research, safety and whitening efficacy assessment in human skin has been conducted, results for safety and whitening efficacy confirmed a significant effect.

The four kinds of whitening functional cosmetics and trademarks were registered (GenoPhyto Diosgen Whitening Emulsion, GenoPhyto Diosgen Whitening Toner, GenoPhyto Diosgen Whitening Serum, GenoPhyto Diosgen Whitening Cream). And then these four kinds of whitening functional cosmetics were submitted to Korea Food and Drug Administration (KFDA) to obtain the unofficial whitening functional certification. In the future, after the unofficial whitening functional certification obtained from the KFDA, for cosmetic commercialization is expected to proceed aggressively.

## CONTENTS

SUBMISSION -----	1
SUMMARY (Korean) -----	2
SUMMARY -----	5
CONTENTS -----	6
CONTENTS (Korean) -----	7
제 1 장 Overview of R & D projects -----	8
제 1 절 The Purpose of R & D -----	8
제 2 절 The need for R & D -----	8
제 2 장 Present condition of Domestic and Abroad technology development -----	10
제 1 절 Present condition of Domestic and Abroad technology for R & D target -----	10
제 2 절 Previous studies on related technology -----	12
제 3 장 Information and results of R & D -----	17
제 1 절 Development of Cosmetic materials and extraction/isolation of diosgenin -----	17
제 2 절 Development of extraction, isolation and purification protocol of diosgenin from Yam -----	28
제 3 절 Pilot Production of DioSphere 2.0 by established protocol -----	30
제 4 절 Development of cosmetic formulations and prototypes using diosgenin -----	31
제 5 절 Stability, safety and emotion assessment of diosgenin in prototypes -----	32
제 6 절 Development of Unofficial whitening efficacy cosmetic and commercialisation -----	39
제 4 장 Achievement of the goal and contribution of related area --	42
제 1 절 Achievement of R & D -----	43
제 2 절 Contribution of related area -----	44
제 5 장 Accomplishment of R & D and plan for utilization -----	45
제 1 절 Utilization of R & D results -----	45
제 6 장 International scientific and technical information -----	47
제 7 장 Reference -----	48
Attachments -----	49

# 목 차

제 출 문 -----	1
요 약 문 -----	2
SUMMARY -----	5
CONTENTS -----	6
목 차 -----	7
제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	8
제 1 절 연구개발의 목적 -----	8
제 2 절 연구개발의 필요성 -----	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	10
제 1 절 연구개발대상 기술의 국내·외 현황 -----	10
제 2 절 관련기술에 대한 선행연구결과 -----	12
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	17
제 1 절 디오스게닌의 화장품 원료화 및 추출/분리에 대한 공정구축 --	17
제 2 절 마(Yam)로부터 디오스게닌 추출, 분리 및 정제 프로토콜 개발	28
제 3 절 확립된 프로토콜을 통한 디오스피어 2.0의 파일럿 생산 -----	30
제 4 절 디오스게닌을 활용한 화장품 제형연구 및 시제품 개발 -----	31
제 5 절 시제품에서의 디오스게닌의 안정성 및 인체 안전성 및 감성평가 -----	32
제 6 절 디오스게닌을 이용한 비고시 미백 기능성 완제품 개발 및 상업화 -----	39
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	42
제 1 절 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 -----	43
제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도 -----	44
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	45
제 1 절 연구개발결과의 활용방안 -----	45
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	47
제 7 장 참고문헌 -----	48
첨부자료 -----	49

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

소득 수준의 향상으로 미에 대한 관심이 증가되고 있다. 특히 자외선이나 스트레스 등에 의해 발생하는 주름, 기미, 주근깨 등에 대한 관심은 지대하다고 볼 수 있다. 이로 인해 피부관련 기능성 화장품개발이 활기를 띠고 있지만, 소비자의 기대심리를 충족시킬만한 제품개발은 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 본 사업팀에서는 마(yam)에 대한 연구를 수행한 결과, 미백 효능이 우수하다는 사실을 밝혀 국제학계로부터 최근 인정을 받았고(국제SCI저널 게재), 관련 특허의 경우, 국내등록되었고, 국제특허는 출원된 상태이다. 그러므로 본 과제에서는 마의 유효성분인 디오스게닌(diosgenin)을 이용하여 비고시 미백 기능성 화장품 소재로서의 개발을 위해 화장품 원료화 연구를 수행하고, 최종적으로 이를 이용하여 완제품을 개발하여 상업화를 추진할 예정이다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

생활수준의 향상과 인공적이지 않은 자연 소재를 선호하는 웰빙 흐름에 맞추어 각 산업에서 친환경적인 천연물 소재가 각광받고 있다. 최근의 천연물 연구는 천연물의 분류학적 특징과 화학적 구성 성분을 밝히는 분석적 연구 단계를 뛰어넘은 상태로 천연물의 생물학적 다양성과 화학적 특성을 연계시켜 활성 성분을 규명함으로써 새로운 기능성 소재를 발굴, 의약품이나 기능성 식품, 화장품 등을 개발하는 단계에 도달해 있다. 이러한 변화는 1980년대 중반 이후 세계적으로 개발된 신규 의약품 중 약 60%가 천연물을 기원으로 하고 있다는 사실을 통해서도 쉽게 파악할 수 있다. 천연물을 이용한 건강 기능성 식품이나 화장품 관련 산업 또한 전 세계적으로 급속하게 성장하고 있다. 화장품업계의 관심도 소비자의 선호도가 높고 국내 민간요법이나 전통의학에 기반을 둔 식물성 화장품 원료개발에 중심을 두고 있다. 그러나 국내 화장품업계의 원료개발 노력에도 불구하고 아직 전체시장의 90%를 해외원료에 의존하고 있는 실정이다. 2002년 화장품 원료 수입액은 완제품 수입액 보다 훨씬 많은 7억4천9백만 달러로 이는 전년대비 17%나 상승한 수치로 화장품 원료 수입 의존도가 갈수록 높아지고 있는 것으로 나타났다. 이에 국내 천연물을 이용한 화장품 원료 개발은 농가의 수익증대뿐 아니라 화장품 원료의 해외 의존도를 낮추고 더 나아가 해외시장에서도 경쟁력 있는 원료 및 제품개발의 계기가 될 것으로 기대된다.

한국농업은. 대외적으로 시장개방 압력과 값싼 중국농산물의 유입으로 인한 국내경쟁력 저하 등 안팎으로 거센 파고에 시달리고 있다. 이에 대한 방안으로 품질 고급화 및 다양화, 새로

은 자원의 창출확대가 필요하게 되었다. 현재 건강 기능성 및 고부가가치 신소재 개발이(약용 작물로부터 기능성 약효성분의 추출 이용기술 개발) 식품과 의약 부분 등 다양한 분야에서 이루어지고 있다. 화장품 분야에서는 쌀추출물, 상백피, 녹차, 대나무, 매실, 쑥, 감잎, 울피 등을 포함하는 제품들이 개발되고 있다.

마는 백합목 마과의 덩굴성 여러해살이풀로 한국, 중국, 타이완, 일본 등지에 분포하다산지에서 자생하는 식물이다. 성분은 전분, 점액질, 단백질, 지방, 아르기닌콜린 등과 디아스타제를 함유하고 있으며, 지라, 콩팥, 위, 간의 경락에도 작용한다. 마에 대해 알려진 효능으로는 소화 작용을 돕거나 비기허증, 야뇨증, 이명증, 소갈, 위염, 천식 등 다양하게 알려져 있다. 대부분 마는 건강 기능성 식품이나 의약품 용도로 제품화되어, 일반 소비자에게 공급되고 있는 실정이다. 피부 관련 효능에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않은 상태이다.

본 연구는 바이오스펙트럼에서 마에 대한 피부 관련 효능연구를 통해 규명된 미백효능(국제논문 게재 (Life sciences, 2007, 81(3):249-54); 국내특허 등록(출원번호:10-2006-0063414)을 토대로, 마유래 디오스게닌을 화장품 원료화하고, 이를 이용해 화장품 완제품 3종을 개발할 예정이다. 뿐만 아니라, 디오스게닌 (diosgenin)을 마로부터 추출, 분리 및 정제할 수 있는 신속하고, 경제적인 프로토콜을 확립하고, 이를 제품화단계에 이용할 수 있도록 대량생산공정체계를 구축할 계획이다. 본 과제를 통한 우수한 화장품 원료 및 화장품제품 개발은 마의 한정된 용도, 즉 식품, 의약품에만 이용된 활용도를 화장품 영역까지 광범위하게 확장시킴으로써, 마의 수요를 증가시킬 것으로 예상되어, 농가의 수익증대에도 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 연구개발대상 기술의 국내·외 현황

#### 1. 세계적 수준

화장품산업은 기초과학과 응용기술이 종합적으로 적용되는 두뇌 집약 산업이다. 대한화장품협회에서 집계한 2002년도 화장품생산실적에 의하면 화장품 전체생산은 3조 7,456억 원에 이르며 원료수입이 매년 9000억 원에 이르며 완제품 수입이 6000억 원에 이르고 있다. 특히 소비자가로는 국내시장이 국내제품을 3조 7천억 원을 공급가보다 소비자가는 통상 2배 이상의 유통마진이 붙게 됨으로 가장 보수적으로 예측한다 하더라도 7조 5천억 원이 되며 수입완제품은 통상 수배에서 수십 배의 마진이 붙기 때문에 보수적으로 환산하여 3배로 잡더라도 1조 8천억 원에 이르게 된다. 그러므로 총 소비자 시장규모는 9조원 이상으로 예측된다. 이러한 규모는 소비자 시장규모로는 세계 8위에 해당되며 아시아에서는 일본 다음으로 큰 시장이다.

국내 화장품업체의 기술수준 및 R&D 투자규모는 대기업의 경우 매출액의 3% 수준에 불과하며 소재 분야의 기술력 역시 미흡하여 선진국 대비 40% 수준에 그치고 있다. 국내특히 중외국기업의 출원비율은 지속적으로 증가하여 47% 수준에 이르고 있어 기술의 종속이 심화되고 있는 실정이다 (보건산업기술동향, 2004).

국제적으로는 어떤 한 가지 원료에 대한 효능을 한 회사에서 표방하는 경우가 아니라 충분히 학계에서 논의되어 국제적으로 받아들일 수 있는 시점에 여러 회사에서 비슷한 성분을 동시에 사용하여 새로운 조류를 만들어 내는 것으로 보여 지고 있다. 최근의 이소플라본의 예에서도 알 수 있는데 그 동안 국내에서는 여러 가지 이유로 이소플라본에 대한 기능성 인증이 안 되었다. 그러나 이미 학계에서는 여성호르몬 보충기능이 밝혀져 현재는 여성들의 노화를 늦출 수 있는 유익한 성분으로 사용되고 있으며 식품에서 화장품으로 그 사용영역이 확대되었다.

**로레알:** 국내 기준에 맞춘 아테노신이 함유된 주름개선 화장품을 국내에 최근 출시하였다.

**비쉬:** 주름개선용으로 콩의 이소플라본을 이용한 노바디올 제품을 출시하여 전 세계적으로 공급하고 있다. 이소플라본은 국제적으로 여성호르몬 보충제로 널리 알려지면서 여성의 노화를 늦출 수 있는 신물질로 인정받아 주름개선용 제품에 대한 적용이 늘어나고 있다.

**클라란스:** 이소플라본 함유제품으로 주름개선을 표방

#### 2. 국내수준

본 과제와 관련된 주변기술과 시장과의 관계를 살펴보면,

##### ● 국내의 경우

국내는 주름개선 및 미백과 관련된 기술은 기능성법의 테두리 안에서 연구 개발되어져 왔으며 법 테두리 내에서 연구개발을 수행함으로써 장단점을 나타내게 되었다.

즉 주름개선에 대한 원료성분을 정부에서 규정함으로써 규정된 원료를 사용한 제품들이 시장에 넘쳐나게 되었다. 특히 지정된 성분이 함유된 제품에 대하여 무조건적인 허가를 해 줌으로써 모든 회사가 유사한 제품을 공급하게 되어 시장에서의 회사간 차별화 전략이 어렵게 되어 영업상 어려움을 초래하고 있다.

예를 들면 레티놀은 대부분의 회사에서 주름개선용 제품의 고시원료로서 알부틴은 미백용 고시원료로서 사용하고 있다. 또한 두 가지 기능성에 대하여 두 물질을 비롯하여 고시된 원료만 함유하면 실제 기능여부에 관계없이 법적인 기능성을 허가하고 있어 실제적인 기능성을 나타내는 원료를 개발할 필요가 없게 되었다. 특히 신규 기능성 원료나 제품인 경우 효능, 안정성 및 유효성에 대한 자료제출을 의무화함으로써 비용발생이 커지게 되어 대기업을 제외하고는 굳이 새로운 비고시 신원료나 신규 기능성 제품개발을 진행하지 않게 되었다.

### 3. 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
태평양	천연유래 미백소재 개발	제품화를 준비중에 있음
나드리	주름기능성 물질로 NAG개발	제품화 및 상업화가 진행중

**태평양:** 주름에는 레티놀을 주로 사용하고 있으며 미백에는 알부틴과 유용성 감초추출물을 사용하고 있다. 비고시 미백제품으로 나린진이 함유된 비고시 기능성 제품을 출시하였고 오레아 놀릭산이 함유된 주름개선 제품을 출시하였다.

**LG:** 메디민 A(PEG 링크된 레티놀)과 알부틴을 주로 사용한 주름 및 미백제품에 한정되어 있으며 펩타이드나 단백질을 이용한 제품 개발이 진행 중인 것으로 알려져 있다.

**코리아나:** 주름에는 레티놀이 미백에는 알부틴이 주로 사용되며 근래에 EGF를 이용한 비고시 주름개선 화장품을 허가받아 고가 방판용으로 판매하고 있다.

**나드리:** 최근에 NAG를 주름개선 비고시 원료로 사용하여 기능성으로 인정받아 마케팅을 활발히 펼치고 있다.

**참존:** 아데닌과 우르솔산을 이용한 두 품목의 비고시 주름개선 기능성 화장품을 개발하여 판매중에 있으나 그 반향은 매우 작은 것으로 나타났다. 특히 우르솔산은 주름개선보다는 국제학계에서 진정, 항염증, 항암 성분으로 잘 알려져 있으나 참존에서 주름개선을 기능성 제품화 하였으나 국제학계의 인정은 없는 것으로 알려지고 있다.

**대기업제의 대부분의 화장품 제조사 및 관련사:** 미백 원료로서 알부틴과 유용성감초추출물을

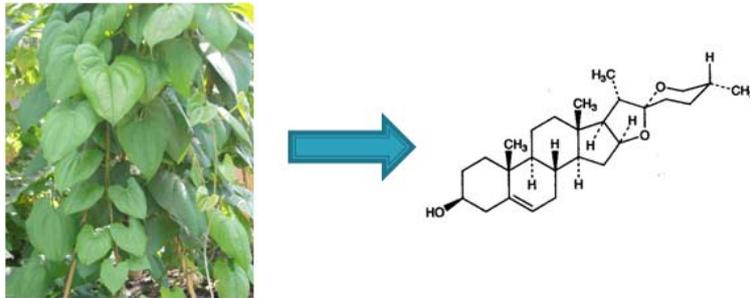
사용하고 있으며 비고시 원료개발은 진행하고 있지 않다.

## 제 2 절 관련기술에 대한 선행연구결과

### 1. 연구결과 요약

멜라닌함량의 비정상적 증가는 후천성 과색소증과 같은 피부질환이 나타내는 일반적인 특성이다. 후천성 과색소증 질환으로는 melasma, postinflammatory melanoderma, solar lentigo 등이 알려져 있다. 이러한 이유로 신규 미백제 개발의 필요성이 점차적으로 증가하고 있는 추세이다. 그러므로 본 연구를 통해 마로부터 피부미백효능을 나타내는 물질을 분리정제하여 그 작용기전을 규명하는 작업을 수행하였다. 마의 주성분중의 하나인 디오스게닌(diosgenin)은 농도 의존적으로 멜라닌생합성을 억제하였다. 이러한 멜라닌생성 억제 메카니즘을 규명하기 위하여 다양한 신호전달 유도물질을 사용하였다. 그 결과, PI3 kinase 억제제인 LY294002에 의해 발생하는 흑화과정이 디오스게닌에 의해 차단되는 현상을 관찰하였다. 좀 더 구체적으로 디오스게닌의 작용을 규명하기 위하여 Western analysis를 실시한 결과, LY294002에 의해 야기되는 Akt와 GSK 3beta의 인산화가 디오스게닌에 의해서 차단되었다. 뿐만 아니라, 디오스게닌은 흑화현상의 중요한 인자인 MITF와 tyrosinase의 발현을 유의성 있게 억제하였다. 이러한 결과를 통해, 마의 주성분인 디오스게닌이 미백효능을 보유하고 있고, 그 작용 메카니즘은 PI3K signaling 활성화임을 최종 규명할 수 있었다.

### 2. 마(Yam)로부터 미백물질인 디오스게닌의 분리 정제.

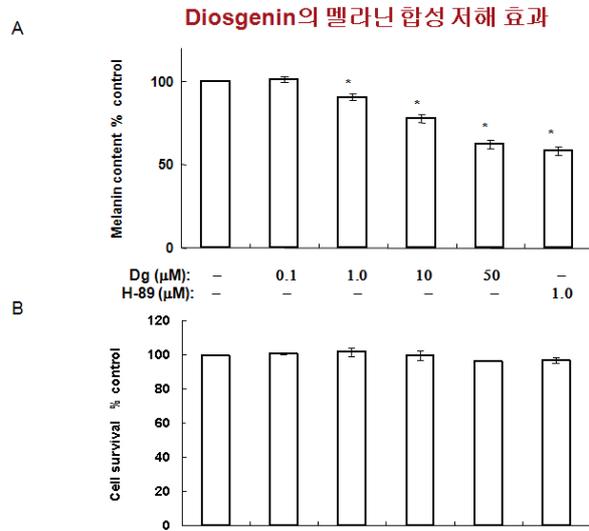


마추출물이 우수한 멜라닌생성억제 효능을 가지고 있음을 확인하였고, 이에 미백효능물질을 추적한 결과, 디오스게닌(diosgenin)임을 최종 확인 규명하였다.

### 3. 디오스게닌에 의한 멜라닌 생성억제효과

=> 분리정제된 디오스게닌을 이용하여 B16 melanoma cells에서 멜라닌 생성억제효능을 살펴보았다. 디오스게닌 1uM부터 유의성있게 멜라닌생성 억제효능을 나타내었고, 농도가 증가할수록 멜라닌 생성억제 능도 증가함을 알 수 있었다.

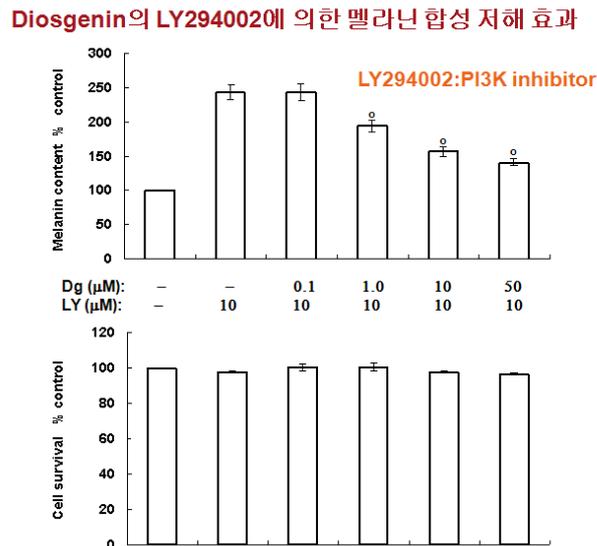
## Diosgenin reduces the melanin content in B16 melanoma cells



### 4. LY294002(PI3K inhibitor)에 의해 유도되는 melanogenesis에 대한 디오스게닌의 효과.

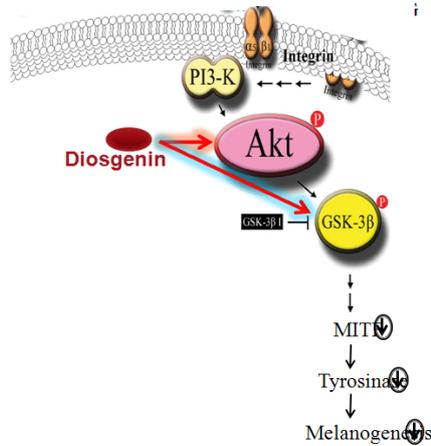
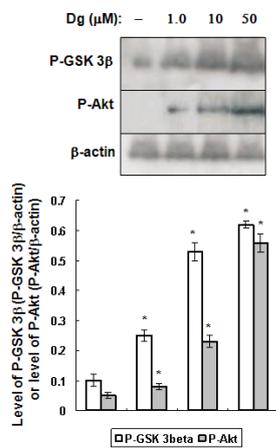
Melanogenesis inducer로 LY294002를 사용하여 디오스게닌의 효과를 살펴보았다. 상기의 결과처럼, LY294002에 의해 발생된 멜라닌생성 증가현상이 디오스게닌에 의해 억제되었고, 이를 통해 디오스게닌이 PI3K signaling을 활성화시킴으로써 미백효과를 나타낼 수 있을 것이라는 가능성을 확보하였다.

## Diosgenin inhibits LY294002-induced increase of melanin content in B16 cells



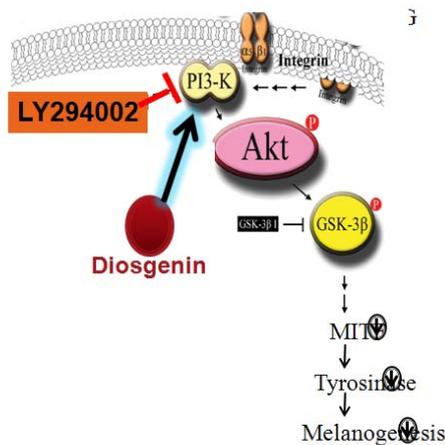
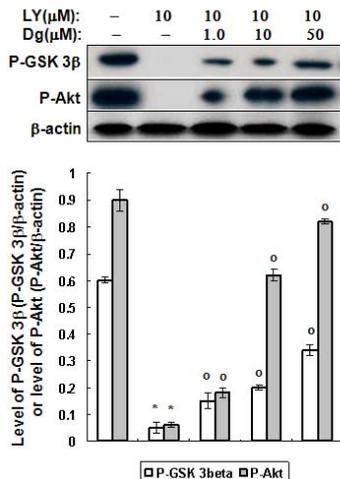
## 5. PI3K signaling과 디오스게닌 미백효능의 관련성

### Diosgenin activates the phosphorylation of GSK-3 $\beta$ and Akt



PI3K signaling에 대한 디오스게닌의 관련성을 규명하기 위해, PI3K signaling pathway의 신호전달물질인 Akt와 GSK 3beta에 대한 디오스게닌의 효과를 살펴보았다. 디오스게닌 농도가 증가함에 따라 Akt와 GSK 3 beta의 인산화가 증가함을 알 수 있었다.

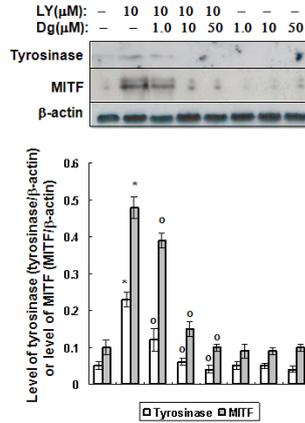
## 6. 디오스게닌의 LY294002 활성 억제효과



일반적으로 PI3K가 억제되면 하위의 신호전달체계가 차단되어 흑화현상이 일어난다고 보고되어 있다. 그러므로, PI3K억제제인 LY294002과 디오스게닌을 동시에 처리하여 Akt와 GSK 3beta의 인산화정도를 관찰하였다. LY294002에 의해 억제되었던 Akt와 GSK 3beta의 인산화가 디오스게닌에 의해 증가됨을 알 수 있었다. 이를 통해, 디오스게닌은 PI3K signaling활성화를 통해 미백효능을 나타냄을 확인하였다.

## 7. 흑화현상의 중요인자인 MITF와 Tyrosinase발현에 미치는 디오스게닌의 효과 탐색

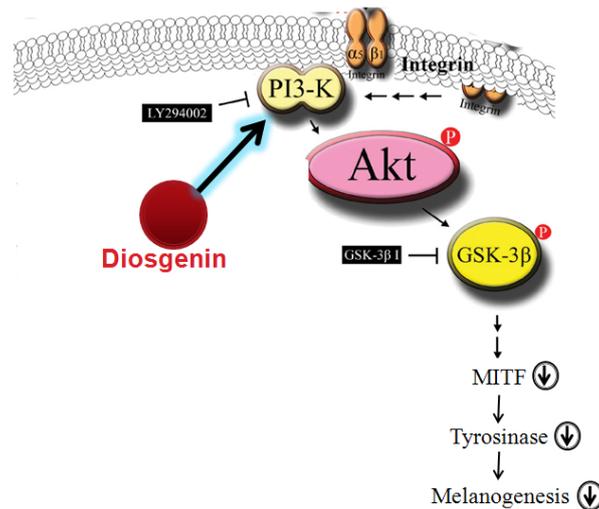
### Diosgenin inhibits LY294002-induced increase of MITF and tyrosinase production



흑화현상 유도제인 LY294002를 처리했을 경우, MITF와 Tyrosinase의 발현이 증가하였다. 반면에 LY294002와 디오스게닌을 동시에 처리했을 경우, 두 단백질의 발현이 감소하였다. 이러한 결과는 디오스게닌의 작용기전이 PI3K signaling 활성화임을 뒷받침해주고 있다.

## 8. 미백효능 물질인 디오스게닌(diosgenin)의 작용메카니즘

### A Proposed Model for Diosgenin



상기의 모든 결과를 토대로 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 마의 미백유효물질이 디오스게닌이고, 그 작용메카니즘은 PI3K signaling의 활성화임을 제시하고 있다.

본 연구 결과는 국제논문 (Life sciences, 2007, 81(3):249-54)에 게재되었고, 관련 기술은 국내 특허등록 결정되었다(출원번호:10-2006-0063414).

**Publication: Life sciences, Diosgenin inhibits melanogenesis through the activation of PI3K signaling, 2007, 81(3), 249-254**

**Patent: 1. 디오스게닌을 함유하는 피부미백용 조성물(출원번호:10-2006-0063414)**

[특허결정에 대한 특허청 문서]

발송번호: 9-5-2007-068766689  
발송일자: 2007. 12. 20

수신 서울 강남구 삼성동 159-9 도심공항타워  
19층(한일국제특허사무소)  
손민

135-973

YOUR INVENTION PARTNER

---  
특 허 청  
특허결정서  
---

출원인명	명	칭	바이오스펙트럼 주식회사 (출원인코드: 120000259748)
	주	소	경기도 군포시 당정동 522 에스케이벤처빌 101-701
대리인명	명	칭	손민
	주	소	서울 강남구 삼성동 159-9 도심공항타워 19층(한일국제특허사무소)
발명자성명	명	성	박덕훈
	주	소	경기도 용인시 수지구 풍덕천1동 삼성1차아파트 105-303
발명자성명	명	성	이종성
	주	소	경기도 안양시 만안구 안양1동 90-1 삼성래미안아파트 115-2706
발명자성명	명	성	정광선
	주	소	경기도 김포시 월곶면 용강리 249
발명자성명	명	성	현창구
	주	소	제주도 제주시 아라1동 4-8 제주하이테크산업진흥원 내 204호
발명자성명	명	성	정은선
	주	소	경기도 수원시 팔달구 매탄동 172-38
출원번호	번	호	10-2006-0063414
발명구항	의 명	칭	디오스게닌을 함유하는 피부미백용 조성물
	항	항	5

이 출원은 특허법 제66조의 규정에 의하여 특허결정합니다.  
(특허법 제87조의 규정에 따라 특허권은 특허료를 납부하여 설정등록함으로써 발생하게 됩니다.) 끝.

[ 참고문헌 ]

1. JP2002080323 A

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절. 디오스게닌의 화장품 원료화 및 추출/분리에 대한 공정구축 (주관)

마는 백합목 마과의 덩굴성 여러해살이풀로 한국, 중국, 타이완, 일본 등지에 분포하다산지에서 자생하는 식물이다. 성분은 전분, 점액질, 단백질, 지방, 아르기닌콜린 등과 디아스타제를 함유하고 있으며, 지라, 콩팥, 위, 간의 경락에도 작용한다. 마에 대해 알려진 효능으로는 소화작용을 돕거나 비기허증, 야뇨증, 이명증, 소갈, 위염, 천식 등 다양하게 알려져 있다. 대부분 마는 건강 기능성 식품이나 의약품 용도로 제품화되어, 일반 소비자에게 공급되고 있는 실정이다. 피부 관련 효능에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않은 상태이다.

멜라닌함량의 비정상적 증가는 후천성 과색소증과 같은 피부질환이 나타내는 일반적인 특성이다. 후천성 과색소증 질환으로는 melasma, postinflammatory melanoderma, solar lentigo 등이 알려져 있다. 이러한 이유로 신규 미백제 개발의 필요성이 점차적으로 증가하고 있는 추세이다. 그러므로 본 연구를 통해 마로부터 피부미백효능을 나타내는 물질을 분리정제하여 그 작용기전을 규명하는 작업을 수행하였다. 마의 주성분중의 하나인 디오스게닌(diosgenin)은 농도 의존적으로 멜라닌생합성을 억제하였다. 이러한 멜라닌생성 억제 메카니즘을 규명하기 위하여 다양한 신호전달 유도물질을 사용하였다. 그 결과, PI3 kinase 억제제인 LY294002에 의해 발생하는 흑화과정이 디오스게닌에 의해 차단되는 현상을 관찰하였다. 좀 더 구체적으로 디오스게닌의 작용을 규명하기위하여 Western analysis를 실시한 결과, LY294002에 의해 야기되는 Akt와 GSK 3beta의 인산화가 디오스게닌에 의해서 차단되었다. 뿐만 아니라, 디오스게닌은 흑화현상의 중요한 인자인 MITF와 tyrosinase의 발현을 유의성 있게 억제하였다. 이러한 결과를 통해, 마의 주성분인 디오스게닌이 미백효능을 보유하고 있고, 그 작용 메카니즘은 PI3K signaling 활성화임을 최종 규명할 수 있었다.

본 연구는 바이오스펙트럼(주)에서 마에 대한 피부 관련 효능연구를 통해 규명된 미백효능(국제논문 게재 (Life sciences, 2007, 81(3):249-54); 국내특허 등록(출원번호:10-2006-0063414)을 토대로, 마유래 디오스게닌을 화장품 원료화하고, 이를 이용해 화장품 완제품 3종을 개발할 예정이다. 이와 함께 디오스게닌(diosgenin)을 마로부터 추출, 분리 및 정제할 수 있는 신속하고, 경제적인 프로토콜을 확립하고, 이를 제품화단계에 이용할 수 있도록 대량생산공정체계를 구축할 계획이다. 본 과제를 통한 우수한 화장품 원료 및 화장품제품 개발은 마의 한정된 용도, 즉 식품, 의약품에만 이용된 활용도를 화장품 영역까지 광범위하게 확장시킴으로써, 마의

수요를 증가시킬 것으로 예상되어, 농가의 수익증대에도 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

## 1. 디오스게닌의 원료화

### 가. 디오스게닌의 용해도 실험

용매에 대한 디오스게닌의 용해도를 알아보기 위하여 squalane, macadamida nut oil, glycerin, butylene glycol, propylene glycol, ethanol, D.W., dimethicone, 0.5% polysorbate 20 과 같이 화장품 제형에 사용되는 용매를 대상으로 하여 디오스게닌의 용해도 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 디오스게닌의 농도는 0.1%로 하였으며, 용해되는 용매에 대해 세분화하여 0.2, 0.5, 0.6, 0.8% 까지 농도를 증가시켜 실시하였다.

**Table 1. Solubility test of Diosgenin**

Solvent	Diosgenin (0.1%)
Butylene glycol	Precipitation
Dimethicone	Precipitation
Ethanol	Soluble
Ethanol:DW (75:25)	Dispersion
Ethanol:DW (50:50)	Precipitation
Ethanol:DW (25:75)	Precipitation
Glycerin	Precipitation
Macadamida nut oil	Precipitation
0.5% Polysorbate 20 in DW	Precipitation
Propylene glycol	Precipitation
Squalane	Precipitation
Water	Precipitation

디오스게닌의 용해도 실험결과, 실험에 사용된 용매 중에서 에탄올을 제외한 어떠한 용매에서도 쉽게 용해되는 않는 난용성물질임을 확인하였으며, 에탄올에서 0.5%까지 용해가능하며, 0.6%에서 0.8%까지는 완전 용해되지 않으나 1일 방치시 용해됨을 확인하였다. 또한 에탄올에 0.1%로 용해시킨 디오스게닌을 정제수에 적용시 바로 분리 및 석출되는 현상이 나타났다. 이러한 결과는 이전의 연구를 통해 마에 대한 피부 관련 효능연구를 통해 규명된 미백효능을 토대로, 마유래 디오스게닌을 화장품 원료화하는데 중요한 문제점으로, 용매에 대한 디오스게닌의 난용성 문제를 해결하기 위하여 당사에서 보유한 나노리포솜 원료화, 제형화 기술을 이용하고자 하였다.

## 나. 리포솜 원료화에 따른 디오스게닌의 농도 설정

선행연구를 통해 분리정제된 디오스게닌을 이용하여 B16 melanoma cells에서 멜라닌 생성억제 효능을 살펴보았다. 그 결과, 디오스게닌 1  $\mu\text{M}$ 부터 유의성 있게 멜라닌 생성억제 효능을 나타내었으며, 디오스게닌 50  $\mu\text{M}$ 에서 멜라닌 생성이 대조군 대비 약 40%이상 억제 되는 효과를 나타내었다(그림 1). 이러한 *in vitro* 결과를 토대로, 디오스게닌을 원료에 적용하기 위하여, 미백효능을 보인 디오스게닌 50  $\mu\text{M}$  농도를 %농도로 환산하여 0.002% 값을 얻었다. 통상적으로 *in vitro*에서 효능을 보인 물질을 임상에 적용할 때 피부투과도 등을 고려하여 *in vitro* 효능농도의 10~100 배의 농도를 임상적용농도로 정하는데, 디오스게닌의 경우 디오스게닌을 2% 함유한 리포솜 원료가 제형내에 2% 적용되는 농도 즉, 0.04%를 최종 임상시험 농도로 정하였다.

디오스게닌 0.04%를 포함한 제품의 미백임상효능을 알아보기 위해 임상전문 기관인 “더마프로 피부연구센터”에 시험을 의뢰하여 23세에서 46세 사이의 성인 여성 10명을 대상으로 하여 8주 동안 시험을 진행하였다. UV조사로 인공색소침착을 유도한 후, 각 부위에 대조군 (vehicle group)과 2% 디오스게닌 리포솜을 포함한 제품을 적용하여 ITA° 값을 계산하여 그 개선도를 살펴본 결과, 2% 디오스게닌 리포솜을 포함한 제품을 적용한 부위가 대조군 대비 10%이상 미백효과가 개선되는 결과가 나타났다(그림2). 임상시험 진행과 함께 피험자에 대한 피부자극 증상을 관찰한 결과, 어떠한 자극도 나타나지 않아 디오스게닌 적용제품의 피부안전성을 확인 할 수 있었다(표 2). 이러한 결과를 바탕으로 2차년도 에서는 피험자 수를 늘려 비교시 미백임상을 추진하였다.

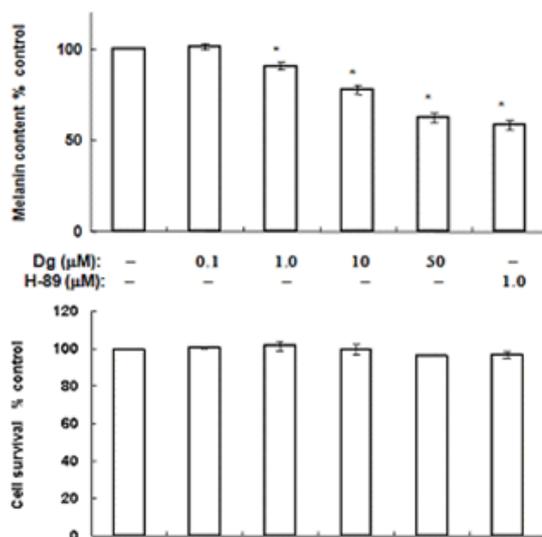


그림 1. B16 melanoma cell에서의 디오스게닌의 멜라닌 합성 저해 효과

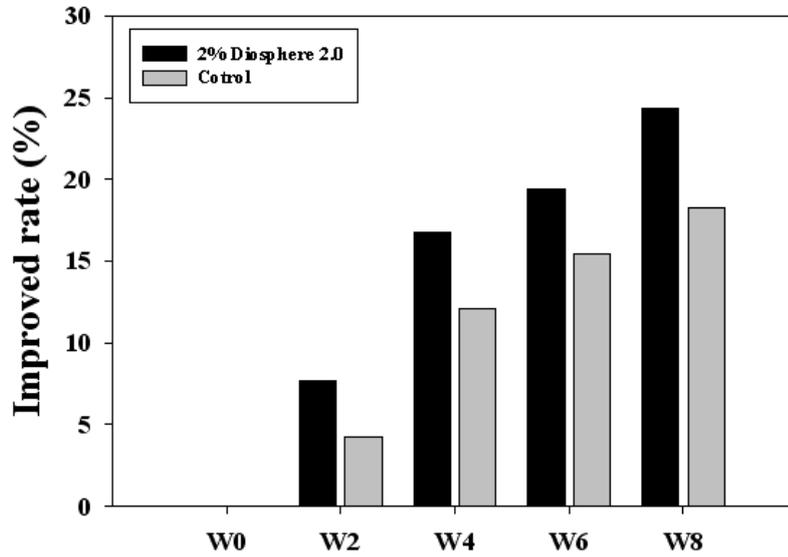


그림 2. 실험군과 대조군의 ITA<sup>®</sup> 개선을 변화

## 표 2. Skin adverse or uncomfortable reactions

Symptom		W2	W4	W6	W8
Subjective irritation	Itching	0	0	0	0
	Prickling	0	0	0	0
	Creepy	0	0	0	0
	Burning	0	0	0	0
	Sting	0	0	0	0
	Stiffness	0	0	0	0
	Tightening	0	0	0	0
Objective irritation	Erythema	0	0	0	0
	Edema	0	0	0	0
	Scale	0	0	0	0
	Papule	0	0	0	0
	Etc.	0	0	0	0
Number of Subjects		0	0	0	0

### 다. 리포솜 원료화

일반적으로 나노크기의 리포솜은 원료의 안정화정도를 증가시키고 피부투과력을 강화시키기 때문에 최근의 기능성화장품 같이 주요성분이 피부내로의 침투가 필수적인 분야에서 각광받고 있다. 현재 당사에는 시간당 30리터와 300리터의 나노 리포솜을 만들 수 있는 대용량의 두 가지 초고압 호모게나이저를 보유하고 있다. 또한 나노 리포솜 제조기술로서 당사에서 자체 개발한 Nano Lipo Tech(NLT) 와 Fast Multi Lipo Tech(FMLT) 기술을 보유하고 있다. NLT는 통상 200nm 정도의 이중 단일막 구조의 리포솜으로 제조되며 FMLT는 통상 800nm 정도의 복합 다중막 구조를 갖고 있다.

디오스게닌의 리포솜 원료화를 위하여 *in vitro* 실험 및 임상실험을 통해 설정된 2% 디오스게닌을 포함한 유백색 크림상의 디오스피어 2.0 (DioSphere 2.0)을 개발하였다.

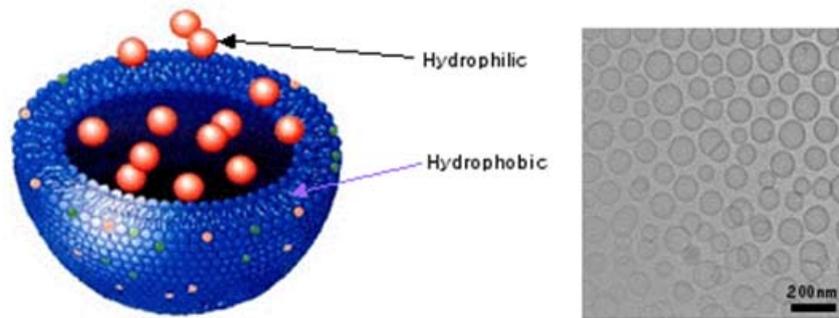


그림 3. 이중 단일막에 의해 제조된 NLT MultiSphere (liposome)의 구조도와 전자현미경 사진

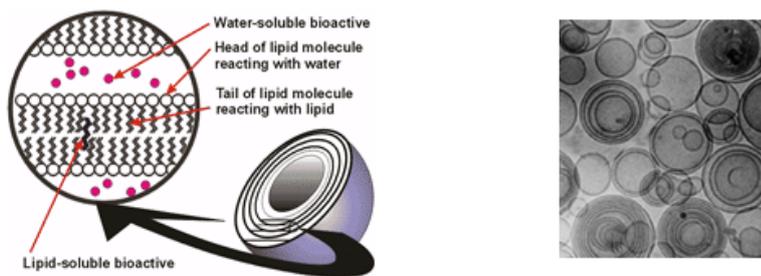


그림 4. 다중막에 의해서 제조된 FMLT MultiSphere (liposome)의 구조도와 전자현미경 사진

### 라. 디오스게닌의 안정성 시험

디오스게닌을 이용한 기능성 화장품을 개발하기 위하여 나노리포솜 공법을 이용한 디오스피어 2.0 (DioSphere, 2% 디오스게닌)을 제조하였으며, 이 원료의 안정성을 확인하기 위하여 빛, 온도, pH에 대한 디오스게닌의 안정성을 확인하였다.

#### (1) 재료 및 방법

### (가) 재료

시험에 사용한 표준물질은 Biochemica 사의 순도 >99.0%의 디오스게닌을 구입하여 사용하였다.

### (나) 시험에 사용된 분석기기 및 조건

디오스게닌의 함량 분석을 위한 HPLC는 Dionex P580 pump, ASI-100 autosamated sample injector를 사용하였으며, 검출기로는 UV/Vis detector UVD 340S (Dionex)를 사용하였으며, 206 nm의 파장으로 분석하였다. 분석 컬럼은 Phenomenex사의 Luna C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm) 컬럼을 사용하였으며, 유동상으로는 0.5% TFA를 함유한 95% MeOH를 0.5 mL/min의 유속으로 일정하게 유지하여 분석하였다.

### (다) 시료의 전처리 및 검액의 조제

본 제품 약 50 mg을 정밀하게 담아 테트라하이드로퓨란(THF) 10 mL을 넣고 초음파로 충분히 분산, 용해시킨 다음 메탄올을 넣어 정확히 100 mL이 되게 하였다. 이 액을 20 µm의 syringe filter로 여과하여 분석에 사용하였다. 표준품과 검액의 농도는 500 mg/L의 동일 농도로 조정하여 분석하였으며, 검액과 표준액의 면적비 백분율로 함량계산을 실시하였다.

## (2) 분석방법의 검증

### (가) 직선성

디오스게닌 표준품 1 g을 THF 1 mL에 넣고 초음파로 충분히 분산시킨 다음 메탄올을 넣어 100 mg/mL로 stock soln.을 만든 후, 50 mg/L에서 2000 mg/L의 농도도 HPLC로 분석하였으며, 적정곡선을 작성하여 직선회귀 방정식과 상관계수를 구하였다. 디오스게닌 표준품을 이용하여 구한 직선 회귀방정식은  $y=0.099x + 4.583$ , 상관계수  $r^2=0.999$ 로 직선성이 매우 양호한 것으로 나타났으며, 100-2000 mg/L의 농도 범위에서 정량성을 확인하였다.

### (나) 특이성

상기 검액의 조제 방법과 HPLC의 조건하에서 분석하여 얻어진 크로마토그램에서 디오스게닌의 peak 유지시간은 20.2분이었으며, peak의 순도를 측정하기 위하여 photodiode array detector (PDA)로 UV spectrum을 확인한 결과, 205.5 nm에서 최대 흡광 파장을 확인하였다.

### (다) 정밀성

안정성 실험 0주차에서 실시한 함량분석 시험에서 디오스게닌을 3롯트 3반복 시험한 결과를 토대로 하여 peak의 면적비의 표준편차를 평균값으로 나눈비의 백분율로서 구한 결과 상대표준편차 (RSD, %)는 0.1250으로 분석결과의 재현성은 양호한 것으로 나타났다.

## (3) 결과

### (가) 디오스게닌의 온도 및 가혹조건 (cycling 시험) 안정성

디오스게닌을 이용한 기능성 화장품을 개발하기 위한 첫 번째 단계로 디오스게닌의 안정성을 확인하기 위하여 시간, 온도, 가혹조건하에서 디오스게닌에 대한 함량분석 시험을 실시하였다.

백색 또는 미황색의 디오스게닌 분말을 이용하여, 실온과 45℃ 암조건에서 12주차 동안 실시하였으며, 가속실험은 Cycling incubator를 이용하여 25℃ → 45℃ → -5℃ → 25℃, 각 6시간씩 3 주기로 진행하였으며, HPLC 분석법에 의하여 디오스게닌의 함량을 측정하였다. HPLC를 이용한 함량 분석 결과, 시험물질인 디오스게닌은 상온 (25℃, 암조건) 및 고온 (45℃, 암조건) 하에서 12주차에서도 95%이상의 함량을 보여 수치상 매우 안정한 것으로 확인하였다. 가속시험의 경우 또한 95% 이상의 디오스게닌 함량을 나타내어 수치상 매우 안정한 것으로 확인하였다 (그림 5). 이와 함께 색상 또는 성상에서도 거의 변화를 나타내지 않았다.

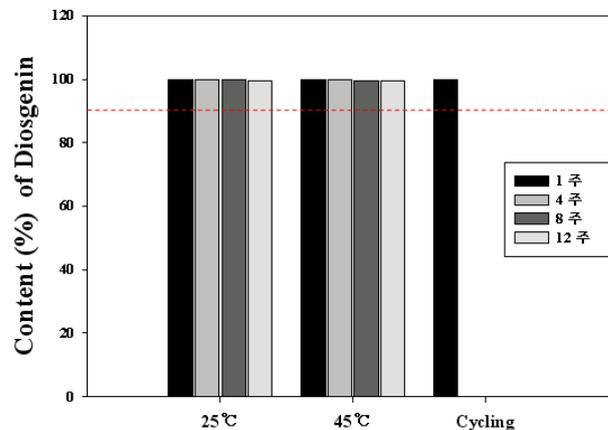


그림 5. 디오스게닌의 온도 및 가속조건에 대한 안정성 실험

#### (나) 디오스피어 2.0의 pH 안정성

0.04% 디오스피어 2.0을 포함하는 스킨제형을 제조한 후, pH4~pH9까지 pH를 조절한 후, 125℃에서 30분간 감압하여, 다양한 pH와 가혹조건 (온도)에 따른 디오스게닌의 안정성을 HPLC 분석을 통해 확인하였다. 그 결과 pH4에서 pH9까지 디오스게닌은 가혹조건에서도 모두 안정함을 확인하였다 (그림 6).

#### (다) 디오스피어 2.0의 온도와 빛 안정성

디오스피어 2.0의 온도와 빛에 대한 안정성을 확인하기 위하여 상대습도 75%로 조절되는 항온기에서 상온 (25℃)과 고온 (50℃) 상태로 유지한 후, 명상태와 암상태에서 0, 2, 4, 8, 16, 26주 기간동안 디오스피어 2.0 내의 디오스게닌 함량을 HPLC를 이용하여 조사하였다. 그 결과 26주 기간동안 온도와 빛의 영향과 상관없이 디오스게닌의 함량이 일정하게 유지됨을 확인하였다.

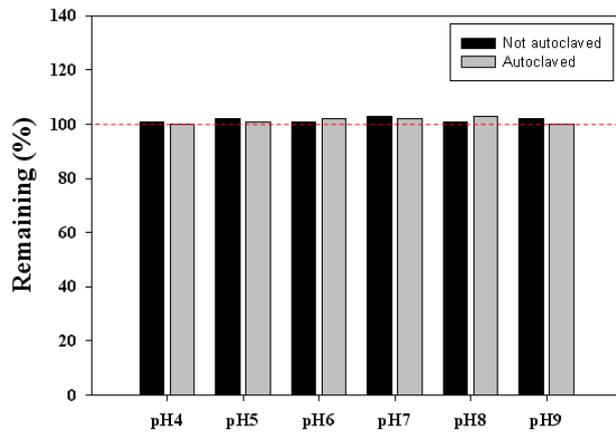


그림 6. 여러 pH에 따른 디오스피어 2.0의 열 안정성.

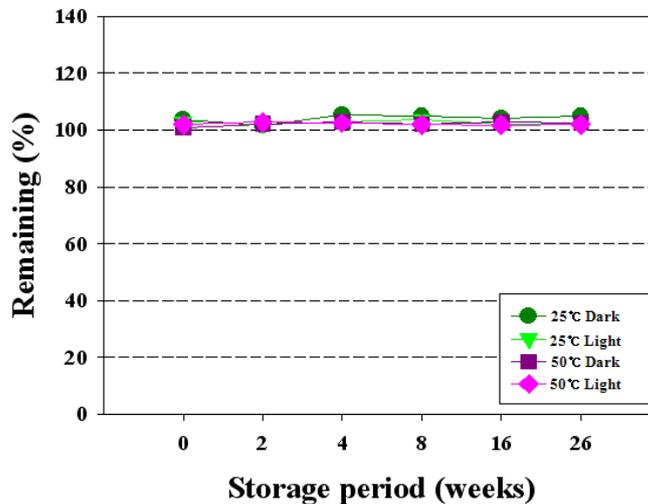


그림 7. 온도와 빛에 대한 디오스피어 2.0의 안정성.

#### (4) 종합 결론

디오스게닌은 이전의 연구를 통해 미백효능이 규명되어 기능성화장품 원료로서 가능성을 지닌 물질임을 확인되었다. 그러나 기능성 화장품 원료화를 위한 용해도 실험에서 디오스게닌의 용매에 대한 난용성이 확인됨에 따라 이를 극복하기 위하여 당사에서 보유한 나노리포솜 원료화 및 제형화 기술을 통해 디오스게닌 2%를 함유한 디오스피어 2.0 리포솜 원료를 개발하였으며, 이를 통해 디오스게닌의 용매에 대한 난용성 문제를 해결하였으며, pH, 온도, 빛에 대한 안정성 실험결과, 디오스피어 2.0 리포솜 원료에서의 디오스게닌의 안정성을 확인하였다.

#### 라. 안전성 시험

미백효능이 우수하고, 물질자체의 안정성이 높더라도, 실제로 인체에 독성이 있을 경우, 화장품 소재로 사용할 수 가 없다. 그러므로, 동물과 인체에서의 안전성 시험은 매우 중요한 부분을 차지하고 있다. 따라서 한국 또는 미국의 FDA, 일본 후생성 등의 기관에서 인증하는

곳에서 안전성 시험을 완료한 시료를 선정하여야 한다.

### (1) 동물 안전성 시험

동물 안전성 시험은 DioSphere 2.0을 대상으로 하여 “설치류단회경구독성시험”을 한국 화학시험연구원에 의뢰하였다.

#### (가) 설치류단회경구독성시험 결과 요약

- ① 품명 : DioSphere 2.0
- ② 목적 : DioSphere 2.0에 대한 단회투여경구독성시험을 실시하여 독성의 정도를 알아보기 위해 실시하였다.
- ③ 결과 요약 : SD계 랫드에 대한 DioSphere 2.0의 단회투여경구독성을 조사하기 위하여 시험물질을 체중 1 kg당 2,000 mg을 경구 투여한 다음 2주간 치사수, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사하였다.

- 시험기간 중 시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 일반증상 관찰시 시험물질 투여에 기인된 이상소견은 인정되지 않았다.
- 체중측정 결과, 대조군과 시험군(투여군)간의 유의성 있는 체중변화는 인정되지 않았다.
- 부검소견 결과 투여군에서 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 DioSphere 2.0의 2,000 mg/kg B.W. 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 어떠한 이상증상과 부검소견도 인정되지 않았고, 사망동물 또한 관찰되지 않았으므로 DioSphere 2.0에 대한 SD계 랫드의 개략의 치사량치는 암,수 모두 2,000 mg/kg B.W. 이상으로 판단된다.

- ④ 참고문헌 : 식품의약품안전청고시 제 2005-60호, 의약품등의 독성시험기준, 2005

### (2) 인체 안전성 시험

사람을 상대로 한 자극시험으로서 첩포시험을 수행하여 자극유무를 판단하여 자극이 있으면 어느 정도이며 다른 진정 성분으로 완화 가능한지를 점검한다. 시험은 임상 전문기관 또는 당사에서 수행할 수 있으며 최소 30명의 인원이 시험에 참가하여야 하며 결과에 따라 화장품 원료로서 부적격한 경우는 탈락시킨다. 첩포부위는 사람의 상등부(정중선의 부분은 제외) 또는 전완부 등 인체사용시험을 평가하기에 적절한 부위를 폐쇄첩포한다. 원칙적으로는 첩포 24시간 후에 팻취를 제거하고 제거에 의한 일과성의 홍반의 소실을 기다려 관찰하여 판정하며 판정은 피부과 전문의 5년 이상 동종업계의 전문 종사자의 책임 하에 이뤄져야 한다.

인체 안전성 시험은 DioSphere 2.0을 대상으로 하여 “인체 첩포시험”을 아이이씨코리아(주)에 의뢰하였다.

**(가) 인체 첩포시험 결과 요약**

- ① 품명 : DioSphere 2.0
- ② 목적 : 신체 건강한 성인 여성 피험자 30명을 대상으로 DioSphere 2.0에 의한 피부 일차 자극 유무를 확인하기 위해 피부에 시료를 단회 폐쇄 첩포 하였다. 48시간 경과 뒤, 첩포 제거후 시료에 의한 피부 일차 자극을 확인하였다.
- ③ 결과 요약
  - 피험자 : 본 실험을 위해 32명의 피험자를 당사[아이이씨코리아(주)]의 피험자 데이터 베이스로부터 모집하였다. 실험 시작일에 32명의 피험자가 방문하였고, 피험자 선정 및 제외기준에 따라 설문조사를 실시하여 32명이 실험에 적합한 피험자로 선정되어 실험을 개시하였다. 최종 방문일에 모든 피험자가 실험을 정상적으로 종료 하였으나, 피부과 전문의의 판정 결과 1명의 피험자가 알루미늄 첩포에 의한 피부반응을 보여, 최종 결과산정에서 제외하였다. 따라서 최종 31명의 유효한 데이터를 획득하였다.
  - 피부자극 판정 결과 : 실험 도중 피부 감염이나 질환 증세는 나타나지 않았으며, 2차감염도 없었다. 시료에서 특이적인 피부 병변과 민감성 자극은 나타나지 않았다. 전체 31명의 피험자 중에서 시료에 의한 특이적 이상반응을 보인 피험자는 없었다.

표 3. 단회 인체 첩포 실험 결과

번호	코드	시료명	PCI	결론
17	Q	DioSphere 2.0	0.032	good cuntaneous compatibility

PCI: 1차 피부 자극 지수

**마. 피부투과도 개선**

특정 유효성분이 피부에 대한 효능을 나타내기 위해서는 피부 진피층 내까지 전달 가능한 기술을 응용하는 게 필요하다. 디오스게닌은 용해도 실험에서 EtOH를 제외한 모든 용매에서 난용성을 나타내었다. 이러한 난용성 문제를 해결하기 위하여, 당사에서 보유한 나노리포솜 원료화, 제형화 기술을 이용하여 나노리포솜 제형인 디오스피어 2.0을 원료화 하였다 이러한

나노 리포솜화한 원료가 실제 피부내로 얼마나 잘 들어가는 지에 대한 피부투과 시험을 실시하였다.

**(1) 시험 방법**

경피흡수는 털을 제거한 기니아 피그(Jackson Laboratories) 피부를 대상으로 프란트 투과셀 (PermeGear, Inc.)을 이용하여 측정하였다. 시험 직전, 털을 제거한 기니아 피그의 복부 부분의 피부를 채취하여, 평방 1 cm<sup>2</sup>의 면적으로 절단한 후, 이를 투과경의 직경이 0.9 cm인 투과셀에 장착하고, 클램프로 고정하였다. 피부의 한쪽 면(donor 용기)은 디오스게닌과 나노 리포솜 원료인 디오스피어 2.0을 0.5 mL 씩 각각 넣어주었다. 반대쪽 면 (receptor 용기)은 정제수와 에탄올이 4:1 중량비로 혼합된 용매와 접촉하도록 하였으며, 시험온도는 실제 피부온도인 32℃를 유지하였다. 시험 시작 후, 일정 시간 간격으로 용매의 일부를 채취한 후, 피부를 통과한 디오스게닌 양을 측정하여, 도포 농도 당 피부흡수량 (µg/cm<sup>2</sup>/중량%)으로 나타내었다. 디오스게닌의 정량 분석은 HPLC 방법으로 수행하였다.

**(2) 시험 결과**

표 4. 디오스게닌과 디오스피어 2.0의 경피흡수량 (µg/cm<sup>2</sup>)

구분	시료	경과시간(hour)												평균			
		1회차				2회차				3회차							
		0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12
경피흡류	디오스게닌	0	2	2	3	0	1	2	2	0	0	1	1	0	1.0	1.7	2.0
	디오스피어 2.0	0	65	150	162	0	78	158	172	0	84	163	184	0	75.7	157.0	172.7

디오스게닌 자체만을 이용하였을 경우, 난용성의 문제로 인하여 피부내로 거의 이동되지 못한 것을 확인하였다. 이와는 달리 난용성의 문제를 해결한 나노 리포솜 형태의 디오스피어 2.0의 경우, 시간 의존적으로 리포솜 형태로 디오스게닌이 피부내로 흡수됨을 확인할 수 있었다. 따라서 디오스피어 2.0은 디오스게닌의 피부투과도를 현저히 향상시키고 있음을 본 실험을 통해 확인하였다..

## 바. 원료의 CTFA 등재

디오스게닌 및 디오스피어 2.0에 대한 물리/화학적 자료를 정리하여 CTFA에 등재  
[등재명 : SingleEX Diosgenin 96 (디오스게닌)/DioSphere 2.0 (디오스피어 2.0)]

## 제 2 절 마(Yam)로부터 디오스게닌 추출, 분리 및 정제 프로토콜 개발

마과(*Dioscoreaceae*)에 속한 식물 중 야생종은 부채마(*Dioscorea nipponoca* Makino), 도꼬로마(*D. tokoro* Makino), 참마(*D. japonica* Thunb.), 각시마(*D. tenuipes*), 단풍마(*D. quinqueloba* Thunb) 등과 같이 다양하나, 재배마는 *D. opposita* Thunb. 또는 *D. batatas*로 분류되는 한 종만이 재배되고 있다. 재배 마의 함유성분은 품종, 재배환경 등에 따라 다르나 전분이 생체중에 약 8~24%, 점질물이 약 0.6~2.4%를 차지하며, 점질물은 당 단백질의 일종인 mucin과 미량의 비타민(B1, C)을 함유한다. 마의 약용성분으로는 amylose, cholin, saponin 등이며, 한방에서는 신체허약, 폐결핵, 정력부족, 야뇨증, 설사, 당뇨병, 대하증 등에 쓰이고 있다. 최근 야생마와 재배마의 saponin 함량 비교 연구에서 야생마인 부채마와 단풍마가 재배마보다 강력한 항암활성을 가진 dioscin의 함량이 각각 약 150배 또는 20배 많다고 보고되었다 (Kim et al., 1991). Dioscin은 여러 가지 약용식물의 주요 약리성분으로(Kim et al., 1989; Kim et al., 1991) 항돌연변이원성작용(Kim et al., 1989), 항암작용, 항염증의 지표인 phospholipase A2(PLA2) 저해작용(Baek et al., 1994)등의 다양한 생리활성이 보고되고 있다.

다양한 식물로부터 기원한 기원한 steroidal saponin과 sapogenin은 약용성분으로 알려져 있다 (Hordman, 1987). 특히 diosgenin, hecogenin, solasodin, sterol 등은 항염 steroid, 무기질코르티코이드 유사 steroid, 동화작용 steroid, 피임약, 스테로이드성 마취제 등과 같이 약용물질로 사용되는 steroid의 전구체로서 사용된다 (Fieser and Fieser, 1967).

Diosgenin는 마의 steroid saponin의 aglycon 부분으로서 saponin의 hydrolysis에 의해 얻을 수 있다. 이전의 연구를 통해 확인된 마에 대한 피부 관련 효능연구를 통해 규명된 미백효능을 토대로, 마유래 디오스게닌을 화장품 원료화하기 위하여 디오스게닌 (diosgenin)을 마로부터 추출, 분리 및 정제할 수 있는 신속하고, 경제적인 프로토콜을 확립하고, 이를 제품화단계에 이용할 수 있도록 대량생산공정체계를 구축하고자 하였다.

### 1. 실험방법

#### 가. 실험재료

실험에 사용한 마는 한약재시장(<http://hanyakjae.net>)에서 국내산 마(*D. batatas*)를 구입하여 사용하였다. 디오스게닌 표준품(>99.0%)은 Fluka에서 구입하였다. 분취용 액체 크로마

토그래피에 사용한 silica gel은 Merck사에서 구매하였다.

#### 나. 실험기기

분취용 액체 크로마토그래피 system은 Buchi사의 C-610 controller, C-601 pump, C-635 UV photometer, C-660 fraction collector로 구성하였다. 농축장비로는 R-210 (Buchi) 대용량 진공감압농축기를 사용하였다.

#### 다. 디오스게닌의 추출/분리

국내산 마(*D. batatas*) 10 kg(건조중량)을 분쇄한 후, 50 L의 MeOH로 3일간 침액 시킨 후, 2번 추출한 후, 감압 농축하였다. 농축된 MeOH 분획(1.2 kg)은 2 L의 xylene과 2 L의 3N HCl을 첨가하여 95°C에서 4시간 교반하였다. 이후 실온에서 xylene 층을 분리, 여과지(Whatman 5)로 여과하였다. 여과된 xylene 층은 진공감압 농축기를 이용하여 농축 건조하였다. 건조된 xylene 분획은 95% EtOH에서 재결정 반응을 수행한 다음, 여과지로 여과하고, 증류수 1 L로 2회 세척하였다. 이후, 40°C가 유지되는 오븐에서 건조하였다. 건조된 결정은 소량의 CHCl<sub>3</sub>에 녹여 분취용 액체 크로마토그래피를 수행하였다. 컬럼은 C-690 glass column (100 × 920 mm)에 silica 5 kg을 충전하여 사용하였다. 용출용매로는 CHCl<sub>3</sub>:MeOH=9:1을 사용하였으며, 각 분획은 1 L씩 수집하였다. Diosgenin을 포함하는 분획인 #18-#19 분획은 농축하여 diosgenin 122 g 을 얻었다(그림 8). 분석용 HPLC를 이용하여 정성 분석한 결과, >99%의 순도를 유지하는 것을 확인하였다.

## 2. 결과 및 고찰

최근 들어서 마 가공식품이 다양하게 개발되어 약용뿐만 아니라 건강식품으로도 중요한 위치를 차지하게 되어 국내 재배면적은 약 318 ha에 생산량 2,186톤으로 1990년대 초의 83.4 ha 보다 4.5배 증가하였다. 전국의 마 재배 면적 중 약 69%인 269 ha로 안동, 영주, 봉화를 중심으로 한 경북북부 지역에서 재배되고 있으며, 그 생산량은 1,702톤에 달하여 경북북부지역의 중요한 소득작물이다.

본 연구에서는 국내산 마로부터 미백활성을 나타내는 디오스게닌을 대량 추출할 수 있는 방법을 탐색함으로써 기능성 화장품 원료로서 신속하고, 경제적인 프로토콜을 확립하고, 이를 제품화단계에 이용할 수 있도록 대량생산공정체계를 구축하고자 하였다. 그 결과, 반복 실험을 통해 국내산 마(*D. batatas*)로부터 1.1~ 1.3%의 수율로 디오스게닌을 대량 추출 할 수 있었다. 이와 같은 수율은 경제적인 측면에서 고려할 때, Fluka에서 판매되는 >95% diosgenin의 경우 100 g 당 623,000원이며, 본 공정을 통해 얻어진 >99% diosgenin의 경우, 100 g 당 약 380,000 원 임을 감안할 때 충분히 경쟁력을 갖고 있다고 판단되었다. 따라서 국내산 마를 대상으로 고순도 디오스게닌의 대량생산공정체계를 구축함으로써, 기능성 화장품 원료로서 공급을 원활히 하고, 이와 함께 마의 소비촉진 증가로 인한 국내 농가 소득에도 기여할 것으로 사료된다.

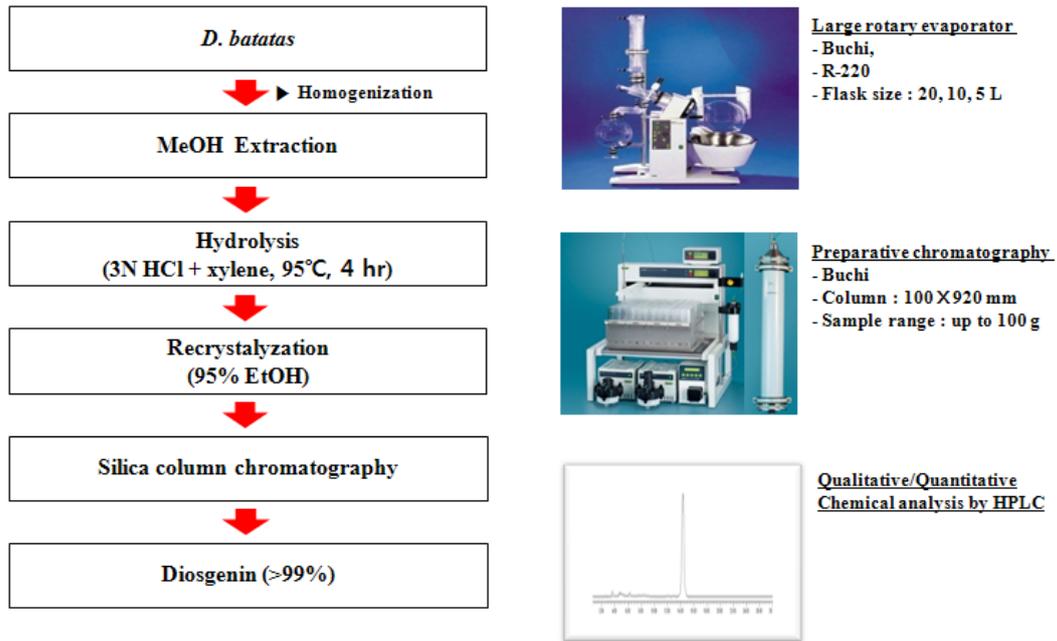


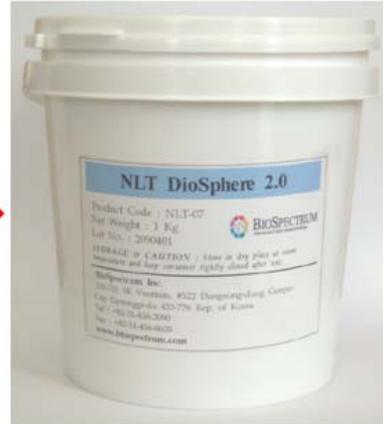
Fig. 8. Purification of diosgenin in *D. batatas*.

### 제 3 절 확립된 프로토콜을 통한 디오스피어 2.0의 파일럿 생산

본 연구를 통해 국내산 마로부터 디오스게닌을 대량 추출이 확립됨에 따라, 추출된 디오스게닌을 이용하여 원료화를 위한 리포솜 형태의 디오스게닌 (디오스피어 2.0)을 생산하고자 하였다. 현재 당사에는 시간당 30리터와 300리터의 나노 리포솜을 만들 수 있는 대용량의 두 가지 초고압 호모게나이저를 보유하고 있다. 또한 나노 리포솜 제조기술로서 당사에서 자체개발한 Nano Lipo Tech(NLT) 와 Fast Multi Lipo Tech(FMLT) 기술을 보유하고 있다. NLT는 통상 200nm 정도의 이중 단일막 구조의 리포솜으로 제조되며 FMLT는 통상 800nm 정도의 복합 다중막 구조를 갖고 있다. NLT와 FMLT를 이용한 리포솜 제조기술을 이용하여 2% 디오스게닌을 포함하는 유백색 크림상의 FMLT와 NLT DioSphere 2.0을 개발·생산하였다.



Diosgenin (powder)



NLT DioSphere 2.0

## 제 4 절 디오스게닌을 활용한 화장품 제형연구 및 시제품 개발 (협동)

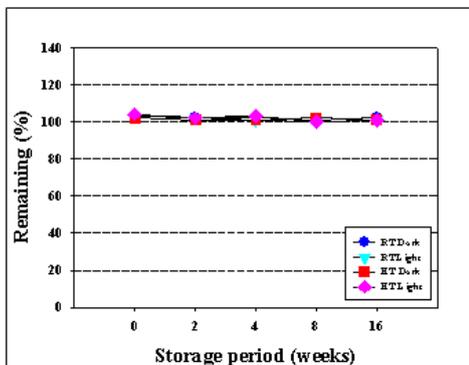
### 1. 화장품 제형연구 및 시제품 개발 (4종, 스킨, 로션, 영양크림, 아이크림)



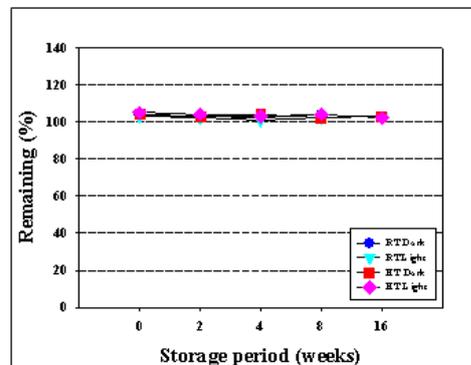
## 제 5 절 시제품에서의 디오스게닌의 안정성 및 인체 안전성 및 감성평가 (주관)

### 1. 시제품 내에서의 디오스게닌의 안정성 평가 (스킨, 로션, 영양크림, 아이크림)

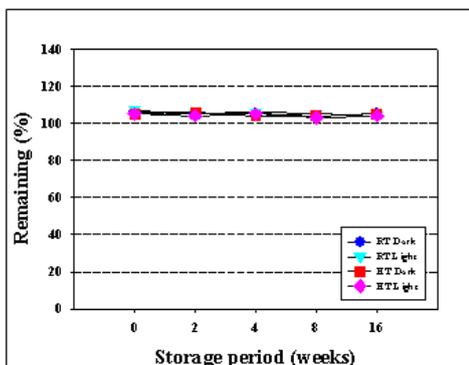
디오스피어 2.0을 2% 함유한 스킨, 로션, 영양크림, 아이크림을 대상으로 하여, 온도와 빛에 대한 안정성을 확인하기 위하여 상대습도 75%로 조절되는 항온기에서 상온 (25℃)과 고온 (50℃) 상태로 유지한 후, 명상태와 암상태에서 0, 2, 4, 8, 16, 26주 기간동안 스킨, 로션, 영양크림, 아이크림 내의 디오스게닌 함량 (0.04%)을 HPLC를 이용하여 조사하였다. 그 결과 26주 기간동안 온도와 빛의 영향과 상관없이 스킨, 로션, 영양크림, 아이크림에서 디오스게닌의 함량이 일정하게 유지됨을 확인하였다.



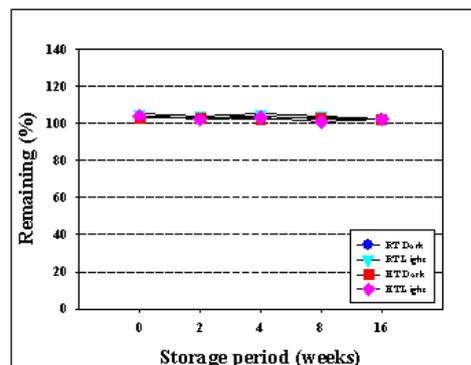
(1) 스킨



(2) 로션



(3) 영양크림



(4) 아이크림

그림. 디오스피어 2.0을 포함한 스킨, 로션, 영양크림, 아이크림 제형에서의 온도와 빛에 대한 디오스게닌의 안정성.

### 2. 시제품을 이용한 피백임상효능 시험

#### 가. 세포 생존 시험

Diosgenin를 B16 멜라노마 세포에 농도별로 처리하고 독성 영향을 미치는 농도를 알아보기 위한 방법으로 실험법은 다음과 같다.

### (1) 시험방법

세포 배양은 B16 melanoma cells(ATCC)을 DMEM 배지에 10% Fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 본 실험에 사용한 Diosgenin은 10% 농도로 클로르포름(Chloroform)에 녹였다. 시료농도는 세포에 처리할 농도의 1000배로 희석하여 준비해 두었다. Alpha-MSH는 경로를 통해 멜라닌생성을 유도하는 대표적인 물질로 미백후보물질과 함께 처리하여 미백후보물질이 alpha-MSH에 의해 유도되는 멜라닌 생성을 의미있게 차단하는 지를 살펴보는 데 쓰인다. 시험에 사용된 alpha-MSH는 1 mM 농도로 증류수에 녹여 준비해 두었다.

세포 독성 시험은 B16 melanoma 세포를 배양용 6 well plate에 각 well당 5X10<sup>4</sup> 개 씩 분주하였다. 16시간 배양 후 세포가 부착되면 Diosgenin와 alpha-MSH(100nM)을 함께 처리하고 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 1 mg/mL 농도의 MTT solution을 media의 1/10 volume으로 첨가하였다. 37°C에서 3시간 반응시킨 후, media를 제거한 후, 적당량의 DMSO를 넣고 37°C에서 10min간 반응시켜 결정을 녹여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 표준치는 평균+표준편차의 형태로 표시하였다.

### (2) 시험 결과

표 1. B16 melanoma세포의 생존에 미치는 시험물질의 효과

	Diosgenin	value 1	value 2	av.	S.D.
	(-)	0.452	0.485	0.469	0.023
동시처리 그룹	0ppm	0.506	0.493	0.500	0.009
	1ppm	0.486	0.483	0.485	0.002
	5ppm	0.476	0.459	0.468	0.012
	10ppm	0.481	0.514	0.498	0.023
	20ppm	0.442	0.478	0.460	0.025

value: 흡광도값,

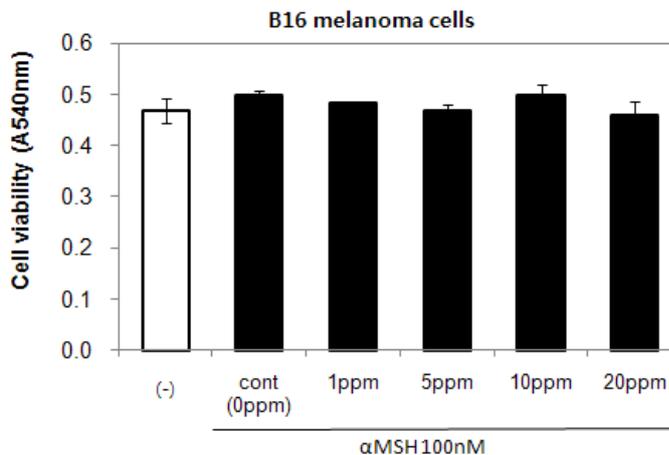


그림 1. B16 melanoma세포의 생존에 미치는 시험물질의 효과

표 1과 그림 1은 B16 melanoma 세포에서 시험물질의 독성 여부를 알아보기 위해 시행한 예비 실험 결과를 수치로 나타낸 것이다. 시험물질 Diosgenin을 B16 melanoma 세포에 0~20 ppm 농도로 처리했을 때, 유의한 세포생존율의 변화는 관찰되지 않았다. 세포생존시험 결과를 근거로 B16 melanoma 세포에 처리할 Diosgenin의 실험농도를 1~20ppm으로 정하였다.

#### 나. B16 melanoma 세포에서 멜라닌 생성 억제 시험

B16 멜라노마 세포에서 배양 시 시료 처리에 의한 멜라닌 합성의 억제 정도를 측정하는 방법으로 실험법은 다음과 같다.

##### (1) 시험방법

Diosgenin를 10 % 농도로 클로르포름(Chloroform)에 녹였다. 시료농도는 세포에 처리할 농도의 1000배로 희석하여 준비하였다. Alpha-MSH는 cAMP경로를 통해 멜라닌생성을 유도하는 대표적인 물질로 미백후보물질과 함께 처리하여 미백후보물질이 alpha-MSH에 의해 유도되는 멜라닌 생성을 의미있게 차단하는 지를 살펴보는 데 쓰인다. 시험에 사용된 alpha-MSH는 1 mM 농도로 증류수에 녹여 준비해 두었다.

B16 melanoma cells의 세포 배양 조건은 DMEM 배지에 10% Fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하며 시료 처리 조건은 다음과 같다.

- ① B16 melanoma 세포를 6well plates에 각 well 당 5X10<sup>4</sup> 개 씩 분주하였다.
- ② 세포가 부착된 후 시험 물질을 농도별로 처리하고, 이후 바로 멜라닌합성 유도물질로 알려진 alpha-MSH (100 nM)을 함께 처리하여 72h 동안 배양하였다.
- ③ 72시간 후 Phosphate buffered saline(PBS)으로 두 번 씻어 준 후 트립신을 처리하여 회수한 뒤, 회수된 세포는 5000g 에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 제거한 후 세포 펠렛을 얻는다.

단백질 정량 시험은 회수된 세포의 총 단백질량은 Bio-Rad의 protein assay kit를 이용하여 측정하였다. 방법은 다음과 같다.

- ① 회수된 세포 펠렛에 protein extraction buffer를 첨가한 후, 펠렛을 잘 풀어준 뒤, ice 에서 40분 동안 반응시킨다.
- ② Cell lysis가 끝나면, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 회수하며, 이를 적당히 희석하여 protein assay kit solution을 넣고 상온에서 15분동안 반응시킨다. 이 때, 표준품으로서 Bovine Albumin Serum (BSA)을 사용하였다.
- ③ 반응이 끝나면 ELISA reader (Bio-tek Inc.)를 이용하여 750nm에서 흡광도를 측정한다. 측정된 값은 standard curve에 대입하여 단백질량을 구한다.

멜라닌 합성 억제 시험은 시험물질을 처리하여 배양한 세포의 멜라닌 양을 측정함으로써 시료 처리에 의해 멜라닌 합성이 억제되었는지를 알아보기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였

다.

- ① 회수된 세포의 단백질정량이 끝난 후, 60°C에서 30분간 반응시켜 세포내 멜라닌을 얻는다.
- ② 반응이 끝나면 96 well plate에 옮겨 ELISA reader (Bio-tek Inc.)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.
- ③ 표준품으로서 합성 멜라닌 (Sigma Aldrich, USA)을 0~0.25mg/mL의 농도로 standard curve를 그린 뒤, 시료에서 얻어진 흡광도 값을 대입하여 멜라닌 양을 계산한다.

측정된 각 시료는 생성된 멜라닌 양/단백질 양 ( $\mu\text{g melanin/mg protein}$ )으로 나타내었다. 측정된 표준치는 평균 $\pm$ 표준편차의 형태로 표시하였고, 통계의 유의성은 student's *t*-test를 이용하여,  $p < 0.05$ 이하일 경우 유의하다고 판단하였다.

## (2) 시험 결과

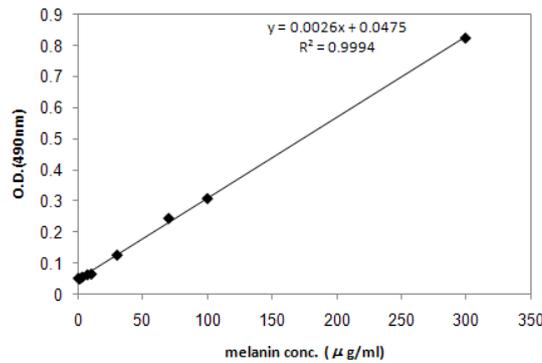


그림 A. melanin standard curve

표 A. B16 melanoma 세포의 melanin 합성에 미치는 Diosgenin의 효과

Diosgenin	alpha-MSH 100nM				
	(-)	0ppm	1ppm	10ppm	20ppm
1회	62.01	368.21	308.87	250.07	126.31
2회	53.66	347.14	292.34	263.77	132.25
3회	66.48	398.84	326.44	257.89	185.64
av.	60.72	371.40	309.22	257.24	148.07
S.D.	6.51	25.99	17.05	6.87	32.67
S.E.M.	3.76	15.01	9.85	3.97	18.86
*p value	<0.0001	-	0.0257	0.0018	0.0008

value: melanin content ( $\mu\text{g melanin/mg protein}$ ) n=6

The experiments have been repeated 3 times independently.

(-)를 제외한 나머지는 멜라닌 합성 유도물질로서 alpha-MSH를 100nM 농도로 처리함.

\*,  $p < 0.05$  vs Cont(alpha-MSH 100nM 처리 그룹 대조군)

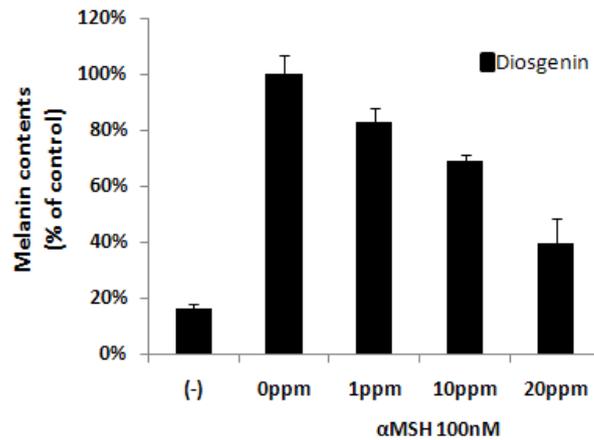


그림 B. melanin 합성에 미치는 Diosgenin 의 억제효과

표A와 그림 B는 B16 melanoma 세포에서 멜라닌 양의 측정 결과를 수치 및 그래프로 나타낸 것이다. 결과에서와 같이, 시험물질 Diosgenin을 농도 별로 처리하여 세포를 배양하였을 때, B16 melanoma 세포의 멜라닌 생성량은 동일 단백질량에 대하여 alpha-MSH처리에 의해 유도된 멜라닌 합성량을 농도 의존적으로 유의하게 감소시켰다.

결론적으로, 시험물질 Diosgenin는 마우스 멜라노마 세포에서 멜라닌 생성 억제 시험, 세포 독성 시험 등을 통한 유효성 검증에서, 시료 Diosgenin는 대조군과 비교시 유의한 수준 ( $p < 0.05$ )으로 멜라닌 합성을 억제하는 효과를 나타내었다. 종합적인 결과로서, 시료 Diosgenin는 미백 효과가 있는 시료로 판단되었다.

#### 다. 피부 미백 평가 시험

피부 미백 평가 시험은 디오스피어 2.0을 2% 포함하는 (디오스게닌 농도 0.04%) 제노피토 디오스젠 화이트닝 크림을 전문임상 기관인 (주)더마프로/피부과학연구소에 의뢰하여 평가하였다.

- 제품명 : 제노피토 디오스젠 화이트닝 크림
- 시험기간 : 2009년 9월 14 ~ 2009년 11월 26일
- 의뢰기관 : (주)더마프로/피부과학연구소
- 시험결과 : (가) 유효성 : 본 시험 제품은 육안평가, 멜라닌 지수, 피부색 측정 및 피험자에 의한 설문평가 결과 피부 미백에 도움을 주는 제품으로 판단된다.  
(나) 안전성 : 본 시험 기간 동안 피험자 모두에게서 피부 이상반응은 관찰되지 않았다.

바이오스펙트럼(주)에서 의뢰한 제노피토 디오스젠 화이트닝 크림의 피부 미백효과 평가 결과 본 시험 제품은 피부 미백에 도움을 주는 제품으로 판단된다. [(주)더마프로/피부과학연구소]

### 인체 시험결과 소견서

1. 제품명 : 제노피토 디오스젠 화이트닝 세럼
2. 시험기간 : 2009년 9월 14일 ~ 2009년 11월 26일
3. 시험결과 :
  - 가. 유효성 : 본 시험제품은 육안평가, 멜라닌 지수, 피부색 측정 및 피험자에 의한 설문평가 결과 피부 미백에 도움을 주는 제품으로 판단된다.
  - 나. 안전성 : 본 시험 기간 동안 피험자 모두에게서 피부 이상반응은 관찰되지 않았다.

위더미스킨에서 의뢰한 제노피토 디오스젠 화이트닝 세럼의 피부 미백효과 평가 결과 본 시험 제품은 피부 미백에 도움을 주는 제품으로 판단된다.

시험기관	위더마프로/피부과학연구소	고재숙 (인)
시험기관장	위더마프로 대표이사	고재숙 (인)
시험책임자	의학박사	김소정 (인)
담당연구원		강승주 (인)
공동연구원		서영경 (인)

### 3. 시제품에 대한 인체 안전성 및 감성평가

#### 가. 인체 첩포시험을 통한 자극 여부 판별

인체첩포시험을 통한 자극 여부 판별은 디오스피어 2.0을 2% 포함하는 (디오스게닌 농도 0.04%) 제형을 전문임상 기관인 (주)더마프로/피부과학연구소에 의뢰하여 평가하였다.

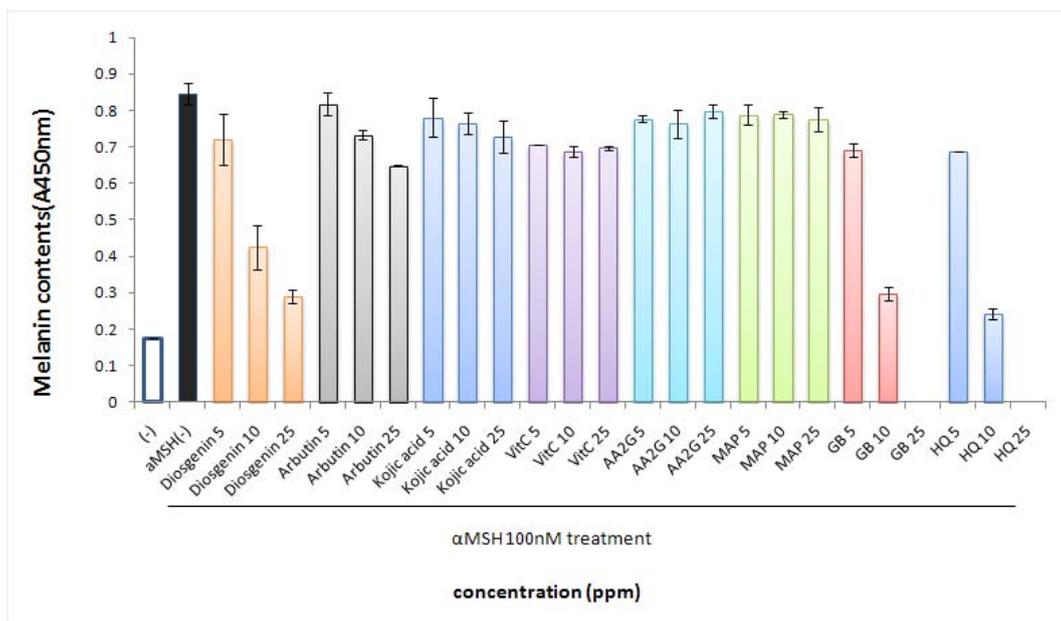
- 제품명 : 0.04% 디오스게닌 제형
- 시험기간 : 2009년 5월 11 ~ 2009년 5월 14일
- 의뢰기관 : (주)더마프로/피부과학연구소

## REPORT SUMMARY

Title	Clinical safety evaluation by single patch test of 0.04 % Diosgenin Formula		
Purpose	To evaluate the irritation potential of cosmetics and its ingredients on human skin		
Test center	Dermapro/Skin Research Center	Test period	11 May. – 14 May. 2009
Authentication of Test Center	Jae-sook Koh, Ph.D. Scientific Director of Dermapro/Skin Research Center DERMAPRO was validated "QUALITY MANAGEMENT SYSTEM CERTIFICATE" (Certificate No.5855) by KOTRIC Certification Center on the contract research and consulting service on human skin safety and efficacy.		
Sponsor	BioSpectrum SK ventium 101-701, Dangjung Dong, Gunpo City, Gyunggi-Do, Rep. of Korea Eunsun Jung / Team Manager		
Method	<p><u>Subjects</u>: 30 healthy women (mean age 39.73 ± 6.86)</p> <p><u>Procedure</u>: 48 hours single closed patch test on the upper back.</p> <p><u>Reading and interpretation</u>: Reactions were assessed at 30 minutes and 24 hours after patch removal by the dermatologist and principal researcher according to the modification of Frosch &amp; Kligman (1979) and CTFA safety guidelines (1981). All assessments were performed under standard lighting conditions.</p>		
Result	This material (#01) did not show any skin reaction at 30 minutes and 24 hours after patch removal in all subjects.		
Conclusion	This material (#01) did not show a significant evidence of primary irritation on human skin and were classified in the non-irritating range.		
Date of Final Report/Code	27 May. 2009 / DSA-PI-914		
Safety Test Assessor	Seung-joo Kang, M.D., Ph.D. Scientific Director of Dermapro / Skin Research Center		

### 나. 기존 제품들과의 비교평가

디오스게닌의 미백 효과를 알아보기 위하여 기존의 미백제로 알려진 arbutin, kojic acid, Vitamin C, AA2G, MAP, GB, HQ 등과 농도별로 측정하여 멜라닌 함량을 측정하였다. 그 결과, 같은 농도일 때, 디오스게닌이 기존에 미백물질로 알려진 상기의 물질보다 멜라닌 생성 억제 효과가 더 강하게 나타남을 확인하였다.



## 제 6 절 디오스게닌을 이용한 비고시 미백 기능성 완제품 개발 및 상업화 (협동)

본 연구를 통해 디오스게닌의 미백효능 및 디오스게닌의 안정성 및 인체 안전성 및 감성 평가를 확인하였으며, 이러한 결과를 바탕으로 이를 바탕으로 원료화된 디오스게닌(디오스피어 2.0/DioSphere 2.0)을 이용하여 완제품 개발을 시도하였다. 그 결과, 다음과 같이 4종의 미백 기능성 완제품을 개발 및 상표등록 하였으며 이를 식품의약품 안정청에 비고시 미백 기능성 인증을 신청하였다.

GenoPhyto Diosgen Whitening Emulsion

제노피토 디오스젠 화이트닝 에멀전

GenoPhyto Diosgen Whitening Toner

제노피토 디오스젠 화이트닝 토너

GenoPhyto Diosgen Whitening Serum

제노피토 디오스젠 화이트닝 세럼

GenoPhyto Diosgen Whitening Cream

제노피토 디오스젠 화이트닝 크림





中一國際特許法律事務所

JOONG-IL PATENT&LAW OFFICE

http://www.joongil-ip.co.kr

TEL.042-488-0300

(우)302-121 대전광역시 서구 둔산동 921 주은리더스빌 903호

FAX.042-488-6502

문서번호 : 201002-082

담당변리사 : 김기정

수 신 : (주)더미스킨

당 당 자 : 최영아

참 조 : 김성아님

발 송 일 : 2010.02.19

제 목 : '상표출원 제2010-0008436호를 포함한 총 2건에 대한 출원완료 안내'

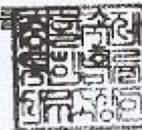
1. (주)더미스킨의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 당소에 위임하신 상표 건에 대한 출원서가 완성되고 출원되어 특허청으로부터 접수 및 처리된 내용을 통지하오니 업무에 참고하시기 바랍니다.

NO.	출원번호(출원일)	출원인	상표권	상표이미지	원소라리번호
1	40-2010-0008436 (2010.02.17)	(주)더미스킨	제03류		10400045
2	40-2010-0008441 (2010.02.17)				10400046

3. 특허청 심사관은 출원순서에 따라 등록여부를 결정하게 되며, 현재기준으로 약 6~10개월 정도가 소요됩니다.
4. 당소와의 약정에 따라 본 건의 착수수입료를 청구와 같이 청구하오니 입금하여 주시기 바랍니다.
5. 상기 건과 관련하여 향후 특허청의 통지사항이 있는 대로 연락드리겠습니다. 기타문의사항이 있으시면 언제든지 연락주시기 바랍니다.

◎ 출원 후 주소 등 연락처가 변동될 경우 특허청에 "출원인 정보변경 신고서"를 제출해야 하므로 변동시 당소로 연락하여 불이익을 받지 않도록 하시기 바랍니다.

중일국제특허법률  
대표변리사 인



- 첨 부 : 1. 청구서 1부  
2. 특허청납입 영수증 2부  
3. 출원서 2부, 끝.

접수번호 : 20100071492      신청일자 : 2010-07-06

민원명	기능성화장품심사-고시외품목 : 제노피토디오스젠화이트닝세럼		
민원인 (대표자 또는 대리인)	김명옥	업소명	(주)더미스킨
처리에정기한	( 60 일한)		
처리주관부서	식품의약품안전청 화장품심사과		
안내사항	※ 방문수령의 경우에는 교부받고자 하는 민원실에 본 접수증을 제출하셔야 하며, 본인의 신분증 또는 대리인인 경우에는 위임장을 제시하셔야 민원서류를 수령하실수 있습니다.		
교부(수령)기관	식품의약품안전청 운영지원팀		
수수료	※ 수수료는 전자지불을 통해 금 189000 원을 납부하였음을 증명합니다.(납부일: 2010-07-06 )		

위 건명의 민원이 신청되었습니다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2008)	디오스게닌의 화장품 원료화 및 추출/분리에 대한 공정구축 (주관)	디오스게닌의 원료화 (국제화장품규격집에 등재)	100	- 안전성 시험 (인체, 동물) - 안정성 시험 - 피부투과도 개선 - CTFA에 등재
		특허 출원 1건	100	- 특허 출원 1건 (일본)
		마(Yam)로부터 디오스게닌 추출, 분리 및 정제 프로토콜 개발	100	- 마(Yam)로부터 디오스게닌 추 출, 분리 및 정제 프로토콜 개발 - 신속, 경제적인 방법 확립
		확립된 프로토콜을 통한 디오 스게닌의 파일럿 생산	100	- 확립된 프로토콜을 통한 디오스 게닌의 파일럿 생산
	디오스게닌을 활용한 화장품 제형연구 및 시제품 개발 (협동)	원료화된 디오스게닌을 이용 한 제형연구 및 이를 통한 시 제품 개발	100	- 리포솜 제형 개발 - 4종 개발 (영양크림, 아이크림, 스킨, 로션)
2차 연도 (2009)	시제품에서의 디 오스게닌의 안정 성 및 인체 안전 성 및 감성평가 (주관)	시제품내에서의 디오스게닌의 안정성평가	100	- 안정성 시험 (빛, 온도, pH 등)
		시제품을 이용한 미백임상효능 시험	100	- 미백임상효능 결정 - 미백임상효능 수행 (전문 임상기관)
		시제품에 대한 인체 안전성 및 감성평가	100	- 인체침포시험을 통한 자극 여부 판별 - 기존제품들과의 비교평가
		특허 출원 1건	100	- 특허 출원 1건 (중국)
		SCI 논문 1건	100	- SCI 논문 1건 투고 완료 (African Journal of biotechnology)
		기술이전 1건	100	- 기술이전 진행중
		비교시 미백기능성 인증신청	100	- 비교시 미백기능성 인증신청 (식약청)
	디오스게닌을 이 용한 비교시 미 백 기능성 완제 품 개발 및 상업 화 (협동)	완제품 3종개발 및 상업화	100	- 디자인 개발 - 부자재 선정 - 마케팅 전략 구축 - 완제품 4종 개발

## 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

### 1. 기술적 측면

#### 가. 원료의 제품화 표준 공정 확립

원료화를 위한 전체 공정에 관한 노하우 습득은 추후의 유사한 사례에서 모든 과정이 응용되어 질 수 있는 기반기술이 될 것이다. 본 과제에서는 “원료추출 → 원료의 물리 화학적 특성 및 효능 파악 → 원료 생산 안정화-원료 안정성 확보 → 원료규격 결정 및 국제공인”의 전체 과정을 거치게 되며 이 과정은 원료개발의 표준공정으로서 확립될 수 있으며 다른 모든 신규원료개발에 응용되어 질 수 있다.

### 2. 경제·산업적 측면

#### 가. 화장품 원료의 수입대체효과

화장품 원료의 90% 이상을 수입에 의존하고 있는 국내시장 상황을 고려해 볼 때, 천연원료 개발성공은 원료수입 의존도를 줄일 뿐만 아니라 국제 원료 시장에 진출할 수 있는 가능성을 높일 것으로 예상된다. 또한 본 과제를 통해 개발된 원료는 디오스게닌의 다양한 생리적 기능에 피부관련 기능인 미백효능을 추가함으로써 고 기능성 천연 원료로서 자리매김할 수 있는 가능성도 높다. 그러므로 본 과제를 통한 원료화의 성공은 침체된 지역 경제를 이끌 수 있는 새로운 성장동력이 될 것으로 판단된다. 특히 지리적으로 세계 3위의 일본 시장을 바로 옆에 두고 있기 때문에 제대로 된 좋은 원료가 개발된다면 곧바로 일본 시장을 비롯하여 중국, 대만, 호주 등 태평양권과 동남아권을 비교적 용이하게 공략할 수 있을 것으로 판단된다.

#### 나. OEM 공급을 통한 높은 매출 신장효과

마유래 천연물질인 디오스게닌을 이용한 기능성 미백제품 개발은, 기존제품들과의 뚜렷한 차별성을 통해 가치창출을 유도할 수 있다. 특히 본 과제의 참여기관인 한국콜마는 국내 1위의 화장품OEM업체로서, 국내 및 국제 화장품 업체에 완제품의 대량공급이 가능하므로, 높은 매출신장효과를 기대할 수 있을 것이다.

#### 다. 국제 화장품 시장 진출

본 과제를 통해 개발된 디오스게닌의 경우, 기존 소재에 비해 우수한 미백 효능을 보유하고 있으므로, 국제화장품시장 진출에 대한 가능성도 높을 것으로 기대한다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 연구개발결과의 활용방안

#### 1. 사업화 및 활용방안

##### 가. 화장품 원료

화장품 원료는 현재 년 간 900억 원 정도가 수입되고 있으며 매년 수입비중이 점차로 커지고 있다. 따라서 화장품 원료의 국산화는 중요성이 더욱 커지고 있다. 본 과제의 주관기관인 바이오스펙트럼(주)은 이미 50여 개의 화장품 제조업체에 원료를 공급하고 있으며 해외에도 일부 수출하고 있다. 따라서 본 과제에서 확보된 디오스게닌 원료(DioSphere 2.0)는 바이오스펙트럼(주)을 통하여 기존 거래처에 빠른 시일 내에 공급될 수 있을 것이다. 또한 당사의 해외 대리점을 통하여 13개국에 수출이 가능할 것이다.

##### 나. 화장품 완제품

화장품 완제품은 국제규격의 원료만을 사용하여 제품화 한 것으로서 각 제품에 사용된 모든 원료에 대한 안전성 확보 및 완제품에 대한 안전성과 유효성이 확보된 고급제품이다. 따라서 본 과제에서 얻어진 모든 화장품은 국내뿐만 아니라 국제적으로도 수출이 가능하다.

##### 다. 유통방안 (국내)

수요기업: 한국콜마(주)(본 과제의 협동기관, 바이오스펙트럼(주)와 전략적 MOU체결)

개발된 화장품 완제품의 경우, 국내 1위의 OEM업체인 한국콜마(주)를 국내 화장품업체에 대량 공급할 예정이다. 현재 한국콜마의 경우, 기존 네트워크가 구축되어 있어, 국내 및 해외 유통에는 어려움이 없는 상태이다.

##### 라. 유통방안 (국제)

원료: 원료는 주관기관에 의하여 매년 참가하고 있는 국제 화장품 원료전시회에 부스 참석하여 국제 마케팅을 수행하고 있으며 이미 독일을 비롯한 세계 13개국에 에이전시를 두고 있다. 따라서 기존의 해외 판매망을 통해 유통이 가능하다.

완제품: 개발된 완제품은 홍콩 국제 미용전시회와 동경 미용박람회 및 독일과 미국 등에서 열리는 국제 전시회에 참석하여 수출을 추진할 예정이다. 주관기관인 바이오스펙트럼(주)과 협동기관인 한국콜마(주)는 이미 수차례에 걸쳐서 여러 해외 박람회에 참석한 경험을 갖고 있기 때문에 별 무리없이 수출 추진이 가능할 것으로 예상되고 있다.

#### 2. 기대성과

##### 가. 기술적 측면

##### (1) 원료의 제품화 표준 공정 확립

원료화를 위한 전체 공정에 관한 노하우 습득은 추 후의 유사한 사례에서 모든 과정이 응용되어 질 수 있는 기반기술이 될 것이다. 본 과제에서는 “원료추출 → 원료의 물리 화학적 특성 및 효능 파악 → 원료 생산 안정화-원료 안정성 확보 → 원료규격 결정 및 국제공인”의 전체 과정을 거치게 되며 이 과정은 원료개발의 표준공정으로서 확립될 수 있으며 다른 모든 신규원료개발에 응용되어 질 수 있다.

## 나. 경제적·산업적 측면

### (1) 화장품 원료의 수입대체효과

현재 세계적으로 화장품과 약품으로 널리 사용되는 미백제로는 hydroquinone, tretinoin, azelaic acid, 비타민 C 및 그의 유도체, linoleic acid, arbutin 등이 있다. 화장품 원료의 90% 이상을 수입에 의존하고 있는 국내시장 상황을 고려해 볼 때, 천연원료 개발성공은 원료수입 의존도를 줄일 뿐만 아니라 국제 원료 시장에 진출할 수 있는 가능성을 높일 것으로 예상된다. 또한 본 과제를 통해 개발된 원료는 세계적인 명품인 고려인삼의 이미지를 살려 웰빙 바람에 편승하여 세계적인 원료가 될 가능성도 높다. 그러므로 본 과제를 통한 원료화의 성공은 침체된 지역 경제를 이끌 수 있는 새로운 성장 동력이 될 것으로 판단된다. 특히 지리적으로 세계 3위의 일본 시장과 급성장을 하고 있는 중국시장을 바로 옆에 두고 있기 때문에 제대로 된 좋은 원료가 개발된다면 곧바로 일본 시장을 비롯하여 중국, 대만, 호주 등 태평양권과 동남아권을 비교적 용이하게 공략할 수 있을 것으로 판단된다.

### (2) 브랜드개발을 통한 고 부가가치 창출

마의 우수한 효능을 내세운 제품들이 상업화됨으로써 기존제품들과의 뚜렷한 차별성을 통해 가치창출을 유도할 수 있다. 특히 본 과제의 협력기관인 한국콜마를 통한 화장품 브랜드를 출시할 예정이므로 세계적인 제품으로 커 나갈 수 있는 가능성을 갖게 될 것이다.

### (3) 국제 화장품 시장 진출

본 과제를 통해 개발된 우수한 효능을 보유한 마(Yam)의 원료 및 이를 이용해 개발된 화장품은 세계적인 브랜드와의 경쟁에도 뒤지지 않는 수준으로 개발이 가능할 것으로 예측된다. 그러므로 국제시장 진출에 어려움이 없을 것으로 예상된다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

기존 미백제 스크리닝 기술로는 멜라닌 합성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase의 활성을 억제하는 소재를 찾는 것이 주류였다. 그러나, 최근에는 멜라닌 합성과정인 melanogenesis 보다 melanocyte에서 합성된 melanosome이 각질형성세포로 이동하는 단계를 억제할 수 있는 소재 개발로 방향이 전환되고 있는 상황이다. Melanosome이 melanocyte 내에서 actin bridge를 통해 각질형성세포와 접촉할 수 있는 위치로 이동하는 단계, melanocyte와 각질형성세포와 접촉하는 단계 등을 목표로 한 연구가 활발히 진행되고 있다.

## 제 7 장   참고문헌

- Baek SH, Kim SH, Son KH, Chung KC, Chang HW (1994) Inactivation of human pleural fluid phospholipase A2 by dioscin. Arch Pharm Res 17: 218-222.
- Cho D-H, Bae C-D, Juhnn Y-S. Multi-fact expressions of adenylate cyclase isoforms in B16-F10 melanoma cells differentiated by forskolin treatment. Exp Mol Med. 2000;32(4):235-242.
- Fieser LF, Fieser M (1967) in Steroids Reinhold Pub. NY pp 600.
- Hordman R (1987) Recent developments in our knowledge of steroids. Planta Med 233.
- Kim CM, Son KH, Kim SH, Kim HP (1991) steroidal sapogenin contents in some domestic plants. Arch Pharm 14: 305-310.
- Kim SW, Son KH, Chung KC (1989) Mutagenic effect of steroidal saponins from Smilax china rhizomes. Yakhak Hoeji 33: 285-289.
- Lee J, Jung E, Park J, Jung K, Park E, Kim J, Hong S, Park J, Park S, Lee S, Park D. Glycyrrhizin induces melanogenesis by elevating a cAMP level in b16 melanoma cells. J Invest Dermatol. 2005 Feb;124(2):405-11.
- Solano F, Briganti S, Picardo M, Ghanem G. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. Pigment Cell Res. 2006, 9(6):550-71.
- 기능성화장품의 기술개발동향. 보건산업기술동향. 2003

## #첨부자료

1. 설치류단회 경구독성시험 (시험성적서/시험결과보고서)
2. 시료21종의 인체 첩포 시험 결과보고서
3. CTFA 등록 자료 (DioSphere 2.0)
4. 제노피토 디오스젠 화이트닝 세럼의 피부 미백효과 평가시험 (인체시험결과보고서)
5. 0.04% Diosgenin Formula 등 38종 화장품 및 원료의 인체피부 일차자극 시험 (인체시험결과보고서)