



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월06일
(11) 등록번호 10-1499453
(24) 등록일자 2015년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/88 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0053986
(22) 출원일자 2013년05월13일
심사청구일자 2013년05월13일
(65) 공개번호 10-2014-0134175
(43) 공개일자 2014년11월21일
(56) 선행기술조사문헌
JP08175957 A*
KR1020110083813 A
JP2007126368 A
KR100975078 B1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 이지합화장품
서울특별시 강남구 논현로 710, 2층(논현동, 서울빌딩)
재단법인 한국한방산업진흥원
경상북도 경산시 화랑로 94 (갑제동)
(72) 발명자
김세기
경북 경산시 장산로 319, 206동 1702호 (사동, 2차부영아파트)
오중학
경북 경산시 압량면 청운2로17길 4-1, 301호 (로즈빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 4 항

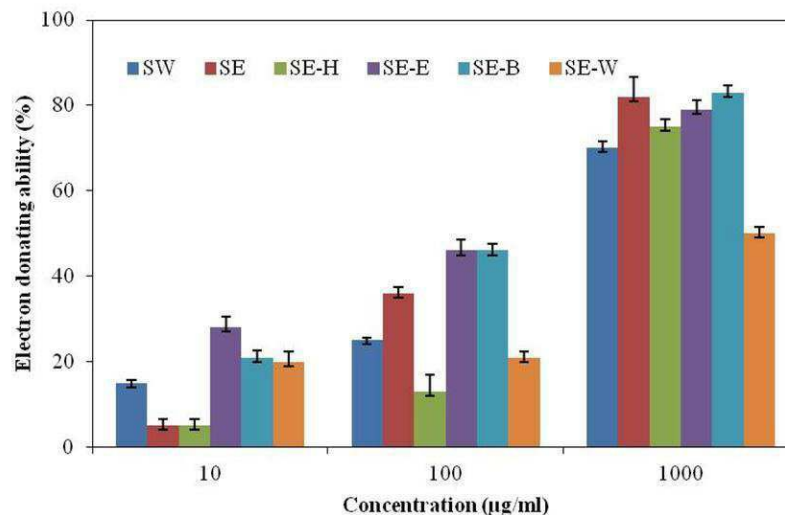
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 부평초 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백 및 피부노화 치료 및 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 부평초 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명의 부평초 추출물은 항산화효과; 높은 세포 생존률; 미백활성; 주름개선효과 등을 확인하여 미백 및 피부노화 치료 및 예방용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이슬기

서울특별시 용산구 한강대로 14가길 23 군인아파트
404호

정영주

경북 경산시 삼풍로2길 8, 선비촌 304호 (삼풍동)

손준호

대구 수성구 달구벌대로641길 31, 101동 1108호 (매호동, 매호화성파크드림)

박태순

대구광역시 수성구 동대구로 59 F동 3201호

김동희

대구 달서구 야외음악당로7길 68, (성당동)

황주영

경북 경산시 압량면 압독3로2길 4-9, 203호 (드림캐슬)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0001360

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 지역산업기술개발사업

연구과제명 부평초를 활용한 기능성 바이오소재 및 화장품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)이지합화장품

연구기간 2012.06.01 ~ 2013.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

부평초 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 미백 및 피부노화의 치료 및 예방용 피부외용 약학조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 제형인 것을 특징으로 하는 피부외용 약학조성물.

청구항 7

부평초 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 미백 및 피부노화의 개선 및 예방용 화장품 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서 상기 화장품 조성물은 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 팩의 제형인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 부평초 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백 및 피부노화 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] [문헌 1] Voegeli, R. 1996. Elastase and typtase determination on human skin surface. Cosmetic &Toiletries. 111, 51-58

[0003] [문헌 2] Aroca, P., et al. 1993. Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. J. Biol Chem 268, 25650-25655

[0004] [문헌 3] Jimenez-Cervantes C., et al. 1994. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. J. Biol Chem 269, 17993-18001

[0005] [문헌 4] Paval, S. 1993. Dynamics of melanogenesis intermediates. J. Invest Dermatology 100, 162-165

[0006] [문헌 5] Chin, J. E., et al. 2005. Effects of Houttuynia cordata extracts on tyrosinase gene expression. J. Korean Soc Food Sci Nutr 34, 1284-1288

- [0007] [문헌 6] Lee, P. J. 2009. Inhibitory effect of muscat bailey a seed extract on melanin production in α -MSH stimulated B16 cell. *J. Kor Plant Res* 22, 477-482
- [0008] [문헌 7] Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. (1995) Antioxidative activity and hysiological activity of some Korean medicinal plants. *J. Food Sci. Technol.* 27, 80-86
- [0009] [문헌 8] Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y and Imokawa G. (2001) The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem. Photobiol.* 74(2), 283-290
- [0010] [문헌 9] Roth GJ, Siok CJ and Ozols J. (1980) Structural characteristics of prostaglandin synthetase from sheep vesicular gland. *J. Biol. Chem.* 255(4), 1301-1304
- [0011] [문헌 10] A physiology active minuteness chemical technique development road map. (2002) *Ministry of Commerce, Industry and Energy.* 229-322
- [0012] [문헌 11] Jeroma SP, Gabrielle L and Raul F. (1998) Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. *J. Invest. Dermatol.* 90(1), 48-54
- [0013] [문헌 12] Oh KN. (2007) Protective effects of apigenin and luteolin on ultraviolet A- induced matrix metaaloproteinase expression in human keratinocyte. M. D. Thesis. Chosun university
- [0014] [문헌 13] Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD and Mitchell JB. (1987) Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47(4), 936-942
- [0015] [문헌 14] Prota G. (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest Dermatol.* 75(1), 122-127
- [0016] [문헌 15] Pavel S and Muskiet FA. (1983) Eumelanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report. *Cancer Detect Prev.* 6, 311-316
- [0017] [문헌 16] Lee NH, Yang HC, Bu HJ, Jung DS, Lee SJ, Riu KZ. (2001) Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities and radical scavenging effects using plants in Cheju. *Kor. J. Pharmacogn.* 32(3), 175-180
- [0018] [문헌 17] 정보섭 외 1인, 향약 대사전, 영림사, pp.277~278, 1998년).
- [0019] [문헌 18] Suh, S. S. and Shin, J. S.: Studies on phytosterols, *Yakhak HoeChi*, **13**, 144-146 (1969)
- [0020] [문헌 19] Wallace, J. W.: Biosynthesic studies on flavones and C-glycosylflavones: B-ring oxidation patterns, *Phytochemistry*, 14, 1765-1768 (1975)
- [0021] [문헌 20] Harborne, J. B.: The natural distribution in angiosperms of anthocyanins acylated with aliphatic dicarboxylic acids, *Phytochemistry*, **25** (8), 1887-1894 (1981) [문헌 21] Woo, W. S., Lee, E. B. and Chang, I M.: Biological evaluation of Korean medicinal plants. II., *Kor. J. Pharm.*, **21**, 177-183 (1977)
- [0022] [문헌 22] 우원식, 이은방: 적출장기표본에 의한 국산생약의 생리활성 검색 (II), *생약학회지*, **10** (1), 27-30 (1979)
- [0023] [문헌 23] 장일무, 지형준: 한국산 생약의 약리작용 및 독성연구 (제3보), *생약학회지*, **13** (2), 55-61 (1982)
- [0024] [문헌 24] Kim, C. J., Cho, S. K., Shin, M. S., Cho, H., Ro, D. S., Park, J. S. and Yook, C. S.: Hypoglycemic activity of medicinal plants, *Arch. Pharm. Res.*, **13** (4), 371-373 (1990)
- [0025] [문헌 25] Blois MS. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. 26, 1199-1120
- [0026] [문헌 26] Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosen- sitivity

testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.

- [0027] [문헌 27] Cannell RJP, Kellan SJ, Owsiansk AM and Walker JM. (1988) Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Media*. 54(1), 10-14.
- [0028] [문헌 28] WE and Heindrich HG. (1963) Zur quantitativen bestimmung der collagenase. *Hoppe-Seyler's. Physiol. Chem.* 333:149-151
- [0029] [문헌 29] Kim MJ, Kim JY, Choi SW, Hong JT and Yoon KS. (2004) Anti-wrinkle effect of safflower (*Cathamus tinctorius*) seed extract. *J. Soc. Cosmet. Scientis Korea*. 30(1), 15-22
- [0030] [문헌 30] Shim JS, Choi EJ, Lee CW, Kim HS and Hwang JK. (2009) Matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity of *Kaempferia pandurata* Roxb. *J of food*. 12(3), 601-607
- [0031] [문헌 31] Yagi A, Kanbara T and Morinobu N. (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Media*. 3981, 517-519
- [0032] [문헌 32] Hosoi J, Abe E, Suda T and Kuroki T. (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 45(4), 1474-1478
- [0033] [문헌 33] Choi BW, Lee BH, Kang KJ, Lee ES and Lee NH. (1998) Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* 29(3), 237-242

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0034] 현대인들은 자외선, 스트레스 등의 여러 가지 내외적인 요인에 의해 각종 피부 트러블 유발로 기미, 주근깨, 피부 색소 침착 등의 피부 노화 현상을 촉진한다(Voegeli, R. 1996. Elastase and typtase determination on human skin surface. *Cosmetic &Toiletries*. 111, 51-58.). 피부의 색소 침착은 멜라닌 색소가 생합성에서 tyrosinase 효소를 비롯하여 DHICA oxidase(TRP-1)등의 L-tyrosine을 DOPA(3,4-dihydroxyphenyla-lanine)으로 DOPA에서 DOPA quinone으로 초기반응을 조절하는 것으로 알려져 있다(Aroca, P., et al. 1993. Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. *J. Biol Chem* 268, 25650-25655.; Jimenez-Cervantes C., et al. 1994. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. *J. Biol Chem* 269, 17993-18001.; Paval, S. 1993. Dynamics of melanogenesis intermediates. *J. Invest Dermatology* 100, 162-165.). 이를 바탕으로 티로시나제(tyrosinase) 효소의 활성을 저해하여 멜라닌 생합성의 억제에 영향을 미칠 수 있는 천연물 탐색에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 결과 여성초 추출물을 이용하여 티로시나제(tyrosinase) 유전자 발현 억제 효과(Chin, J. E., et al. 2005. Effects of Houttuynia cordata extracts on tyrosinase gene expression. *J. Korean Soc Food Sci Nutr* 34, 1284-1288.), 머루 포도씨 추출물의 α-MSH으로 자극한 B16세포에서 멜라닌(melanin) 생성억제 효과(Lee, P. J. 2009. Inhibitory effect of muscat bailey a seed extract on melanin production in α-MSH stimulated B16 cell. *J. Kor Plant Res* 22, 477-482.) 등 천연물을 활용한 연구가 활발히 이뤄지고 있다. 그 외 현재 알려져 있는 항산화 및 미백원료는 아르부틴(Arbutin), 코지산(Kojic acid), 아스코르브산(Ascorbic acid) 등의 물질이 대표적이고 상백피, 닥나무, 감초 등의 식물 추출물이 널리 알려져 있다.
- [0035] DPPH는 화학적으로 안정화된 자유 라디칼 (free radical)을 가지고 있는 수용성 물질로 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물 등에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되는데, 이것은 다양한 천연 소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. ROS (reactive oxygen species)는 체내 방어기전에 의해 대부분 제거되지만 제거되지 못할 경우 생체분자들과 신속하게 반응하여 단백질의 변성이나 생체막의 지질 과산화, DNA 손상 등을 일으키며, 세포 내로 확산되거나 혈류를 통해 이동된 지질 과산화물은 새로운 radical 반응을 촉진시켜 각종 질환의 원인으로 작용하였다. (Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. (1995) Antioxidative activity and hysiological activity of some Korean medicinal plants. *J. Food Sci. Technol.* 27, 80-86)
- [0036] Elastase는 진피 내 피부탄력을 유지시키는 데 중요한 기질인 엘라스틴을 분해하는 효소이다. 또한 elastase는 다른 중요한 기질단백질인 collagen을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다. 따라서 elastase 저해제는

피부주름을 개선하는 작용을 나타내며, ursolic acid 등이 elastase 저해제로서 이용되고 있다. Elastase는 동물 결합조직의 불용성 탄성 섬유 단백질인 elastin을 분해시켜 피부의 진피조직의 그물망 구조 결합을 끊어줌으로서 주름생성의 주원인인 효소로 알려져 있다.(Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y and Imokawa G. (2001) The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem. Photobiol.* 74(2), 283-290) 피부의 진피 조직 속에는 collagen과 피부의 탄력성에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있는데, 이러한 그물망 구조가 깨어지면서 즉 elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부가 처지고 주름이 생기므로 내인성 피부노화가 발생한다. 그러므로 피부노화의 주원인 중의 하나인 elastin 분해효소인 elastase의 활성을 저하시킴으로서 피부노화를 억제할 수 있다. 현재 피부노화를 방지하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며 지금까지 α -1-proteinase inhibitor, mucus proteinase inhibitor, α -2-macri globulin, inter- α -trypsin, bowman-birk inhibitor, verapamil, beta lactam, chondroitin sulfates, deoxycycline, heparin등의 elastase 저해제들이 보고되고 있다. (Roth GJ, Siok CJ and Ozols J. (1980) Structural characteristics of prostaglandin synthetase from sheep vesicular gland. *J. Biol. Chem.* 255(4), 1301-1304)

[0037] 세포 외 기질(extracellular matrix)의 주요 구성 성분인 collagen은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질이다. 또한 생체 단백질 총 중량의 약 30%를 차지하는 중요한 단백질로서 견고한 3중 나선구조를 가지고 있다. Collagen은 피부, 건(tendon), 뼈 및 치아의 유기 물질의 대부분을 형성하는데, 특히 뼈와 피부의 진피에 그 포함량이 높다. Collagen의 주된 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포 접착의 지탱, 세포 분할과 분화의 유도 등이 알려져 있다. 이러한 collagen은 연령 및 자외선 조사에 의한 광노화에 의해 감소하며, 이는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다. 또한 collagen은 트립신 등의 단백질 분해효소의 작용을 받지 않으나, collagenase에 의해 분해된다는 보고된 바 있다 (A physiology active minuteness chemical technique development road map. (2002) *Ministry of Commerce, Industry and Energy.* 229-322)

[0038] 콜라겐은 대부분 피부의 진피층에 존재하며, 피부 전체 건조중량의 약 70~80%를 차지하고 있어, 세포외 기질의 대부분을 차지하면서 피부를 지지하는 역할을 한다. 그러나 자연 노화에 따른 세포 활성의 감소와 같은 내적 요인에 의해 콜라겐의 생합성이 감소되고, 여러 가지 유해 환경에 의한 스트레스의 증가 및 태양 광선에 의한 활성 산소종의 증가와 같은 외적 요인에 의해 분해가 가속화 되어 피부 기질이 파괴되면서 주름이 생성된다. 또한 collagen은 상처 치유에 있어서 중요한 역할을 담당하며, 손상된 상피에서 collagen의 합성을 촉진시키면서 상처를 신속하게 흉터 없이 회복할 수 있다. 현재까지 밝혀진 collagen 합성 촉진 물질 중 가장 대표적인 것으로는 centella asiatica의 주성분들인 asiaticoside, asiatic acid, madecasic acid 등을 들 수 있다. (Jeroma SP, Gabrielle L and Raul F. (1998) Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. *J. Invest. Dermatol.* 90(1), 48-54)

[0039] 체내에서 생성되는 수종의 MMPs 가운데 MMP-1은 콜라겐에 특이적으로 작용하는 protease로서 MMP-1의 활성을 억제하여 콜라겐의 분해를 감소시키면, 피부조직의 탄력을 유지하고 주름생성을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다. (Oh KN. (2007) Protective effects of apigenin and luteolin on ultraviolet A- induced matrix metalloproteinase expression in human keratinocyte. M. D. Thesis. Chosun university)

[0040] MTT 검색법은 96 well plate를 사용하여 검사 결과를 ELISA reader를 이용하여 많은 시료를 간단하게 관독할 수 있어 세포 독성 및 세포 증식 검색법으로 널리 사용되고 있으며, 세포의 대사과정에서 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 방법이다.(Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD and Mitchell JB. (1987) Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47(4), 936-942.)

[0041] 피부의 색조를 결정하는 주요한 인자인 melanin은 표피 기저층의 melanocyte라고 불리는 색소세포내의 melanosome에서 생합성 된다. 멜라닌을 합성하는데 있어서의 출발물질은 아미노산의 일종인 tyrosine이다. Tyrosine은 멜라닌 세포내에서의 tyrosinase에 의해 L-3,4-dihydroxyl phenylalanine (DOPA), DOPA quinone으로 산화된다. 그 후 DOPA quinone이 DOPA chrome, 5,6-dihydroxyindole, indole-5,6-quinone이 되고, 이어서 indole-5,6-quinone으로의 중합에 의해 melanin을 생성하는 것으로 알려져 있다. 또한 tyrosinase는 피부 멜라닌 생성에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있으며, melanosome 내에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase로, DOPA를 산화시켜 DOPA quinone을 만드는 DOPA oxidase로서 작용하여 멜라닌 중합체를

합성하는데 중요한 효소로 작용한다.(Prota G. (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest Dermatol.* 75(1), 122-127.)

[0042] 사람의 피부색을 결정하는 가장 중요한 요인인 멜라닌(melanin)은 피부의 광노화나 일광각화증을 억제할 뿐만 아니라, 기미, 주근깨, 검버섯 등의 부분적인 hyperpigmentation을 일으키는 역할을 하고 있다. 상기의 색소 침착을 치유하기 위해 멜라닌 생성을 억제하는 hydroquinone, resorcinol 등의 페놀 유도체나, L-ascorbic acid 와 그 유도체 및 kojic acid, arbutin, lactic acid, glucosamine, tunicamycin 등이 개발되었으나, 피부 저자극성이나 안정성에 문제가 있어 극히 제한된 양만 사용되고 있다. (Pavel S and Muskiet FA. (1983) Eumelanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report. *Cancer Detect Prev.* 6, 311-316.).

[0043] 피부 흑화는 피부에 존재하는 melanocyte가 UV 노출 등의 외부적 환경에 대응하여 melanin의 생성을 증가하기 때문이다. 원료 및 물질의 미백효능을 확인하기 위해 melanin 생성효소인 Tyrosinase의 효소활성 억제 탐색이 주요하게 이용되어 왔으나 최근 효소활성억제와 더불어 미백원료가 melanocyte에서 tyrosinase와 관련 효소 발현을 증가시키는 환경에서 신호전달 체계를 교란시키는 기전 연구에 대한 보고가 매우 많아졌다. (Lee NH, Yang HC, Bu HJ, Jung DS, Lee SJ, Riu KZ. (2001) Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities and radical scavenging effects using plants in Cheju. *Kor. J. Pharmacogn.* 32(3), 175-180.).

[0044] 부평초(*Spirodela polyrrhiza*)는 천남성과의 다년생 초본으로서 수면에 뜨는 작은 풀로서 개구리밥에 전초를 부평초라고도 지칭하며, 산화칼륨 및 염화칼륨, 불소 등의 성분이 알려져 있고 강심작용, 해혈작용 등에 효과가 있는 것으로 알려진바 있다.(정보집 외 1인, 향약 대사전, 영림사, pp.277~278, 1998년).

[0045] 浮萍草 (부평초)의 성분 연구로는 개구리밥의 全草 (전초)에서 campesterol, β -sitosterol, stigmasterol 등의 sterol(4. Suh, S. S. and Shin, J. S.: Studies on phytosterols, *Yakhak HoeChi*, **13**, 144-146 (1969)과, flavone-0-glycoside로서 apigenin-7-O- β -D-glucoside, cynaroside (luteolin-7-O- β -D-glucoside), hypolaetin-8-O- β -D-glucoside (8-hydroxyluteolin-8-O- β -D-glucoside)와, flavone-C-glycoside로서 vitexin (apigenin-8-C- β -D-glucoside), orientin (luteolin-8-C- β -D-glucoside) 등의 flavonoid(5. Wallace, J. W.: Biosynthetic studies on flavones and C-glycosylflavones: B-ring oxidation patterns, *Phytochemistry*, **14**, 1765-1768 (1975) 및 anthocyanin(6. Harborne, J. B.: The natural distribution in angiosperms of anthocyanins acylated with aliphatic dicarboxylic acids, *Phytochemistry*, **25** (8), 1887-1894 (1981)이 존재한다고 알려져 있다.

[0046] 한편 浮萍草 (부평초)의 생리활성 연구로는 1977년 Woo등(7. Woo, W. S., Lee, E. B. and Chang, I M.: Biological evaluation of Korean medicinal plants. II., *Kor. J. Pharm.*, **21**, 177-183 (1977)의 실험에서 개구리밥 EtOH (defatted with pet ether) 추출물이 sarcoma 180, leukemia SN 36, Ehrlich ascites carcinoma에 대한 항암작용, HeLa cell에 대한 세포독성작용, Staphylococcus aureus와 *Escherichia coli*에 대한 항미생물작용이 모두 없었고, 1979년 개구리밥 MeOH 추출물로 한 실험에서는 rat의 회장절편에 대해 직접적인 수축작용이나 항acetylcholine작용이 없었으며, 자궁절편에 대해서도 직접적인 수축작용이나 항oxytocin작용이 없었다.(우원식, 이은방: 적출장기표본에 의한 국산생약의 생리활성 검색 (II), *생약학회지*, **10** (1), 27-30 (1979).1982년에 장 등(9. 장일부, 지형준: 한국산 생약의 약리작용 및 독성연구 (제3보), *생약학회지*, **13** (2), 55-61 (1982)이 한 실험에서 개구리밥 EtOH 추출물이 neuroglioma 9ASK에 대해 약한 항유사분열작용을 보였으나 세포독성작용은 나타나지 않았고, CHCl₃ 분획의 추출물은 leukemia P388에 대해 항암작용이 없다고 보고하였고, 1990년 Ro 등 (10. Kim, C. J., Cho, S. K., Shin, M. S., Cho, H., Ro, D. S., Park, J. S. and Yook, C. S.: Hypoglycemic activity of medicinal plants, *Arch. Pharm. Res.*, **13** (4), 371-373 (1990)은 개구리밥의 물 추출물이 streptozotocin에 의해 유발된 당뇨병 mouse에서 항과혈당작용이 없음을 보고된 바 있다.

[0047] 그러나 상기 문헌의 어디에도 부평초 추출물의 미백, 주름개선 등의 피부노화에 대한 치료효과에 대하여 언급 또는 개시된 바는 없다.

[0048] 이에 본 발명자들은 부평초 추출물에 대하여 DPPH 자유 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 양이온 소거능 저해활성, 크산틴 옥시다제(Xanthine oxidase) 저해활성 등의 항산화효과; 높은 세포 생존률; 티로시나제 (Tyrosinase) 저해활성, 세포내 티로시나제(Cellular tyrosinase) 저해활성 멜라닌(melanin) 생합성 저해 활성, 미백과 관계되어진 티로시나제(tyrosinase) 단백질 발현억제 등의 미백활성; 엘라스타제 (Elastase) 저해활성, MMP-1저해활성, 프로-콜라게나제(pro-collagenase) 저해활성 실험을 통한 주름개선효과 등을 확인하여 미백 및 피부노화 치료 및 예방용 조성물로 유용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0049] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 부평초 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백 및 피부노화의 치료 및 예방용 피부외용 약학조성물을 제공한다.

[0050] 또한, 본 발명은 부평초 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백 및 피부노화의 개선 및 예방용 화장품 조성물을 제공한다.

[0051] 본원에서 정의되는 추출물은 조추출물, 또는 분획 추출물을 포함한다.

[0052] 본원에서 정의되는 “조추출물”은 물, 에탄올, 메탄올, 프로판올, 부탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 헥산, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 합수부틸렌글리콜, 합수프로필렌글리콜, 합수글리세린으로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 용매, 바람직하게는 물 또는 물 및 에탄올 혼합용매, 가장 바람직하게는 60% 내지 80% 에탄올 가용 추출물을 포함한다.

[0053] 본원에서 정의되는 분획 추출물은 비극성용매 가용 분획 추출물 및 극성용매 가용 분획 추출물을 포함한다.

[0054] 본원에서 정의되는 비극성용매 가용 분획 추출물은 상기 조추출물을 물로 현탁한 후에 헥산, 메틸렌클로라이드, 디클로로메탄, 클로로포름 또는 에틸 아세테이트로부터 선택된 비극성용매로, 바람직하게는 헥산, 메틸렌 클로라이드 분획, 또는 에틸 아세테이트, 보다 바람직하게는 메틸렌클로라이드 비극성 유기용매로 분획하여 얻은 비극성용매에 가용한 분획 추출물을 포함하고; 극성용매 가용 분획 추출물은 상기 비극성용매 가용정제물을 제거하고 남은 조추출물을 부탄올 또는 물로 분획을 수행하여 얻은 극성용매에 가용한 분획 추출물을 포함한다.

[0055] 본원에서 정의되는 추출물은 조추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 포함하며 하기와 같은 제조공정으로 제조 가능하다.

[0056] 예를 들어, 본원발명의 조추출물은 시료 총 중량의 약 1배 내지 200배(w/w), 바람직하게는 10배 내지 100배 (w/w)의 정제수를 포함한 물, 주정, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 또는 물 및 에탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 물 또는 50-99% 물 및 에탄올 혼합용매를 가하여 2시간 내지 1주일, 바람직하게는 4시간 내지 24시간 동안, 10℃ 내지 150℃, 바람직하게는 20℃ 내지 100℃, 보다 바람직하게는 실온에서 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출 등의 추출방법, 바람직하게는, 환류냉각 추출법을 수행하여 추출물을 수득하는 제 1단계 공정을 통하여 수득가능하다.

[0057] 예를 들어, 본원발명의 비극성용매 및 극성용매 가용 추출물은 상기에서 얻은 조추출물, 바람직하게는 60 내지 90% 에탄올 조추출물 중량의 약 0.0005 내지 50배, 바람직하게는 0.05 내지 5배 부피 (v/w%)의 물을 가한 후, n-헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸 아세테이트 및 부탄올을 이용한 통상적인 분획과정을 수행하여 n-헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸 아세테이트 등의 비극성 용매에 가용한 비극성 용매 가용 추출 정제물; 및 부탄올, 물 등의 극성용매에 가용한 극성용매 가용 추출 정제물을 각각 수득할 수 있다.

[0058] 본원에서 정의되는 "피부노화"는 주름살, 기미, 주근깨, 자외선에 의한 피부 손상, 피부암, 바람직하게는, 주름살 또는 기미를 포함한다.

[0059] 상기 부평초 추출물은 피부외용 약학조성물은 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%으로 포함함을 특징으로 한다.

- [0060] 상기 피부외용 약학 조성물은 크림, 젤, 페취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 제형을 포함한다.
- [0061] 또한, 상기 화장료 조성물은 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 팩의 제형을 포함한다.
- [0062] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0063] 본 발명의 부평초 추출물은 하기와 같이 수득될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 건조상태의 부평초 중량의 약 1 내지 30배, 바람직하게는 약 1 내지 15배에 달하는 부피의 물, 에탄올, 메탄올, 프로판올, 부탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 헥산, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 합수부틸렌글리콜, 합수프로필렌글리콜, 합수글리세린으로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 용매, 바람직하게는 물 및 에탄올, 바람직하게는 물을 첨가하여 약 10 ℃ 내지 100 ℃ 바람직하게는 60℃ 내지 90℃에서 약 1시간 내지 5시간 동안 열수 추출, 환류 냉각 추출, 침지 추출 또는 압력추출 등의 추출방법을 사용하여, 바람직하게는 환류 냉각 추출하는 제 1단계; 상기 추출물을 1회 내지 5회 원심분리, 감압여과, 농축 및 동결건조 하는 제 2단계를 포함하는 제조방법을 통하여 본 발명의 부평초 추출물을 수득할 수 있다.
- [0065] 본 발명자들은 본 발명의 부평초 추출물에 대하여 DPPH 자유 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 양이온 소거능 저해활성, 크산틴 옥시다제(Xanthine oxidase) 저해활성 등의 항산화효과; 높은 세포 생존률; 티로시나제(Tyrosinase) 저해활성, 세포내 티로시나제(Cellular tyrosinase) 저해활성 멜라닌(melanin) 생합성 저해활성, 미백과 관계되어진 티로시나제(tyrosinase) 단백질 발현억제 등의 미백활성; 엘라스타제(Elastase) 저해활성, MMP-1저해활성, 프로-콜라게나제(pro-collagenase) 저해활성 실험 등을 통한 주름개선효과 등을 확인하여 미백 및 피부노화 치료 및 예방용 조성물로 유용함을 확인하였다.
- [0066] 또한, 본 발명의 부평초 추출물 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없으며, 피부 첩포 시험에서 무자극 시료임이 입증되었으므로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 부평초 추출물을 함유하는 피부외용 약학조성물은 크림, 젤, 페취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용제 형태의 약학조성물로 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0068] 본 발명의 부평초 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 부평초 추출물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명의 부평초 추출물은 미백 효과를 갖는 화장품 및 세안제 등에 다양하게 이용될 수 있다.
- [0070] 본 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 팩 등과 같은 화장품류와 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 미용액 등이 있다.
- [0071] 본 발명의 화장료는 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스펅고 지질 및 해초 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 조성물을 포함한다.
- [0072] 수용성 비타민으로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B6, 피리독신, 엽산피리독신, 비타민 B12, 판토텐산, 니코틴산, 니코틴산아미드, 엽산, 비타민 C, 비타민 H 등을 들 수 있으며, 그들의 염 (티아민염산염, 아스코르빈산나트륨염 등)이나 유도체 (아스코르빈산-2-인산나트륨염, 아스코르빈산-2-인산마그네슘염 등)도 본 발명에서 사용할 수 있는 수용성 비타민에 포함된다. 수용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 수득할 수 있다.
- [0073] 유용성 비타민으로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 비타민 A, 카로틴, 비타민 D2, 비타민 D3, 비타민 E (d1-알과 토코페롤, d-알과 토코페롤, d-알과 토코페롤) 등을 들 수 있으며, 그들의 유도체 (팔미틴산아스코르빈, 스테아르산아스코르빈, 디팔미틴산아스코르빈, 아세트산 d1-알과 토코페롤, 니코틴산 d1-알과 토코페롤비타민 E, d1-판토텐일알코올, D-판토텐일알코올, 판토텐일에틸에테르 등) 등

도 본 발명에서 사용되는 유용성 비타민에 포함된다. 유용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 취득할 수 있다.

- [0074] 고분자 펩티드로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 콜라겐, 가수 분해 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴, 가수 분해 엘라스틴, 케라틴 등을 들 수 있다. 고분자 펩티드는 미생물의 배양액으로부터의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 정제 취득할 수 있으며, 또는 통상 돼지나 소 등의 진피, 누에의 견섬유 등의 천연물로부터 정제하여 사용할 수 있다.
- [0075] 고분자 다당으로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 히드록시에틸셀룰로오스, 크산탄검, 히알루론산나트륨, 콘드로이틴 황산 또는 그 염 (나트륨염 등) 등을 들 수 있다. 예를 들어, 콘드로이틴 황산 또는 그 염 등은 통상 포유동물이나 어류로부터 정제하여 사용할 수 있다.
- [0076] 스펅고 지질로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 세라미드, 피토스핑고신, 스펅고당지질 등을 들 수 있다. 스펅고 지질은 통상 포유류, 어류, 패류, 효모 또는 식물 등으로부터 통상의 방법에 의해 정제하거나 화학 합성법에 의해 취득할 수 있다.
- [0077] 해초 엑기스로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 갈조 엑기스, 홍조 엑기스, 녹조 엑기스 등을 들 수 있으며, 또, 이들의 해초 엑기스로부터 정제된 칼라기난, 아르긴산, 아르긴산나트륨, 아르긴산칼륨 등도 본 발명에서 사용되는 해초 엑기스에 포함된다. 해초 엑기스는 해초로부터 통상의 방법에 의해 정제하여 취득할 수 있다.
- [0078] 본 발명의 화장료에는 상기 필수 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분을 배합해도 된다.
- [0079] 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다.
- [0080] 유지 성분으로서는 에스테르계 유지, 탄화수소계 유지, 실리콘계 유지, 불소계 유지, 동물 유지, 식물 유지 등을 들 수 있다.
- [0081] 에스테르계 유지로서는 트리2-에틸헥산산글리세릴, 2-에틸헥산산세틸, 미리스틴산이소프로필, 미리스틴산부틸, 팔미탄산이소프로필, 스테아르산에틸, 팔미탄산옥틸, 이소스테아르산이소세틸, 스테아르산부틸, 리놀레산에틸, 리놀레산이소프로필, 올레인산에틸, 미리스틴산이소세틸, 미리스틴산이소스테아릴, 팔미탄산이소스테아릴, 미리스틴산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 세바신산디에틸, 아디핀산디이소프로필, 네오펜탄산이소알킬, 트리(카프릴, 카프린산)글리세릴, 트리2-에틸헥산산트리메틸올프로판, 트라이소스테아르산트리메틸올프로판, 테트라2-에틸헥산산펜타엘리글리콜, 카프릴산세틸, 라우린산데실, 라우린산헥실, 미리스틴산데실, 미리스틴산미리스틸, 미리스틴산세틸, 스테아르산스테아릴, 올레인산데실, 리시노올레인산세틸, 라우린산이소스테아릴, 미리스틴산이소트리데실, 팔미탄산이소세틸, 스테아르산옥틸, 스테아르산이소세틸, 올레인산이소데실, 올레인산옥틸도데실, 리놀레산옥틸도데실, 이소스테아르산이소프로필, 2-에틸헥산산세토스테아릴, 2-에틸헥산산스테아릴, 이소스테아르산헥실, 디옥탄산에틸렌글리콜, 디올레인산에틸렌글리콜, 디카프린산프로필렌글리콜, 디(카프릴, 카프린산)프로필렌글리콜, 디카프릴산프로필렌글리콜, 디카프린산네오펜틸글리콜, 디옥탄산네오펜틸글리콜, 트리카프릴산글리세릴, 트리운데실산글리세릴, 트라이소팔미탄산글리세릴, 트라이소스테아르산글리세릴, 네오펜탄산옥틸도데실, 옥탄산이소스테아릴, 이소노난산옥틸, 네오데칸산헥실데실, 네오데칸산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 이소스테아르산이소스테아릴, 이소스테아르산옥틸데실, 폴리글리세린올레인산에스테르, 폴리글리세린이소스테아르산에스테르, 시트르산트라이소세틸, 시트르산트라이소알킬, 시트르산트라이소옥틸, 락트산라우릴, 락트산미리스틸, 락트산세틸, 락트산옥틸데실, 시트르산트리에틸, 시트르산아세틸트리에틸, 시트르산아세틸트리부틸, 시트르산트리옥틸, 말산디이소스테아릴, 히드록시스테아르산 2-에틸헥실, 숙신산디2-에틸헥실, 아디핀산디이소부틸, 세바신산디이소프로필, 세바신산디옥틸, 스테아르산콜레스테릴, 이소스테아르산콜레스테릴, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 올레인산콜레스테릴, 올레인산디히드록콜레스테릴, 이소스테아르산피트스테릴, 올레인산피트스테릴, 12-스테알로일히드록시스테아르산이소세틸, 12-스테알로일히드록시스테아르산스테아릴, 12-스테알로일히드록시스테아르산이소스테아릴 등의 에스테르계 등을 들 수 있다.
- [0082] 탄화 수소계 유지로서는 스쿠알렌, 유동 파라핀, 알파-올레핀올리고머, 이소파라핀, 세레신, 파라핀, 유동 이소파라핀, 폴리부텐, 마이크로크리스탈린왁스, 왁셀린 등의 탄화 수소계 유지 등을 들 수 있다.
- [0083] 실리콘계 유지로서는 폴리메틸실리콘, 메틸페닐실리콘, 메틸시클로폴리실록산, 옥타메틸폴리실록산, 데카메틸폴

리실록산, 도데카메틸시클로실록산, 디메틸실록산·메틸세틸옥시실록산 공중합체, 디메틸실록산·메틸스테알록시실록산 공중합체, 알킬 변성 실리콘유, 아미노 변성 실리콘유 등을 들 수 있다.

- [0084] 불소계 유지로서는 퍼플루오로폴리에테르 등을 들 수 있다.
- [0085] 동물 또는 식물 유지로서는 아보카도유, 아르몬드유, 올리브유, 참깨유, 쌀겨유, 새플라워유, 대두유, 옥수수유, 유채유, 행인(杏仁)유, 팜핵유, 팜유, 피마자유, 해바라기유, 포도종자유, 면실유, 야자유, 쿠쿠이너트유, 소맥배아유, 쌀 배아유, 시아버터, 월견초유, 마커테이미아너트유, 메도홍유, 난황유, 우지(牛脂), 마유, 밉크유, 오렌지라피유, 호호바유, 캔데리러왁스, 카르나바왁스, 액상 라놀린, 경화피마자유 등의 동물 또는 식물 유지를 들 수 있다.
- [0086] 보습제로서는 수용성 저분자 보습제, 지용성 분자 보습제, 수용성 고분자, 지용성 고분자 등을 들 수 있다.
- [0087] 수용성 저분자 보습제로서는 세린, 글루타민, 솔비톨, 만니톨, 피콜리돈-카르복실산나트륨, 글리세린, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜B(중합도 n = 2 이상), 폴리프로필렌글리콜(중합도 n = 2 이상), 폴리글리세린B(중합도 n = 2 이상), 락트산, 락트산염 등을 들 수 있다.
- [0088] 지용성 저분자 보습제로서는 콜레스테롤, 콜레스테롤에스테르 등을 들 수 있다.
- [0089] 수용성 고분자로서는 카르복시비닐폴리머, 폴리아사파라긴산염, 트라가칸트, 크산탄검, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 수용성 키틴, 키토산, 텍스트린 등을 들 수 있다.
- [0090] 지용성 고분자로서는 폴리비닐피롤리돈·에이코센 공중합체, 폴리비닐피롤리돈·헥사데센 공중합체, 니트로셀룰로오스, 텍스트린지방산에스테르, 고분자 실리콘 등을 들 수 있다.
- [0091] 에몰리엔트제로서는 장쇄아실글루타민산콜레스테릴에스테르, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 12-히드록시스테아르산, 스테아르산, 로진산, 라놀린지방산콜레스테릴에스테르 등을 들 수 있다.
- [0092] 계면 활성제로서는 비이온성 계면 활성제, 음이온성 계면 활성제, 양이온성 계면 활성제, 양성 계면 활성제 등을 들 수 있다.
- [0093] 비이온성 계면 활성제로서는 자기 유화형 모노스테아르산글리세린, 프로필렌글리콜지방산에스테르, 글리세린지방산에스테르, 폴리글리세린지방산에스테르, 솔비탄지방산에스테르, POE (폴리옥시에틸렌)솔비탄지방산에스테르, POE 솔비탄지방산에스테르, POE 글리세린지방산에스테르, POE 알킬에테르, POE 지방산에스테르, POE 경화피마자유, POE 피마자유, POE·POP (폴리옥시에틸렌·폴리옥시프로필렌) 공중합체, POE·POP 알킬에테르, 폴리에테르변성실리콘, 라우린산알카놀아미드, 알킬아민옥시드, 수소첨가대두인지질 등을 들 수 있다.
- [0094] 음이온성 계면 활성제로서는 지방산비누, 알파-아실술폰산염, 알킬술폰산염, 알킬알릴술폰산염, 알킬나프탈렌술폰산염, 알킬황산염, POE 알킬에테르황산염, 알킬아미드황산염, 알킬인산염, POE 알킬인산염, 알킬아미드인산염, 알킬로일알킬타우린염, N-아실아미노산염, POE 알킬에테르카르복실산염, 알킬술폰숙신산염, 알킬술폰아세트산나트륨, 아실화 가수분해 콜라겐펩티드염, 퍼플루오로알킬인산에스테르 등을 들 수 있다.
- [0095] 양이온성 계면 활성제로서는 염화알킬트리메틸암모늄, 염화스테아릴트리메틸암모늄, 브롬화스테아릴트리메틸암모늄, 염화세토스테아릴트리메틸암모늄, 염화디스테아릴디메틸암모늄, 염화스테아릴디메틸벤질암모늄, 브롬화베헤닐트리메틸암모늄, 염화벤잘코늄, 스테아르산디에틸아미노에틸아미드, 스테아르산디메틸아미노프로필아미드, 라놀린 유도체 제 4급 암모늄염 등을 들 수 있다.
- [0096] 양성 계면 활성제로서는 카르복시베타인형, 아미드베타인형, 술포베타인형, 히드록시술포베타인형, 아미드술포베타인형, 포스포베타인형, 아미노카르복실산염형, 이미다졸린 유도체형, 아미드아민형 등의 양성 계면 활성제 등을 들 수 있다.
- [0097] 유기 및 무기 안료로서는 규산, 무수규산, 규산마그네슘, 텔크, 세리사이트, 마이카, 카올린, 벵갈라, 클레이, 벤토나이트, 티탄피막운모, 옥시염화비스무트, 산화지르코늄, 산화마그네슘, 산화아연, 산화티탄, 산화알루미늄, 황산칼슘, 황산바륨, 황산마그네슘, 탄산칼슘, 탄산마그네슘, 산화철, 군청, 산화크롬, 수산화크롬, 칼라민 및 이들의 복합체등의 무기 안료 ; 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리우레탄, 비닐수지, 요소수지, 페놀수지, 불소수지, 규소수지, 아크릴수지, 멜라민수지, 에폭시수지, 폴리카보네이트수지, 디비닐벤젠·스티렌 공중합체, 실크파우더, 셀룰로오스, CI 피그먼트옐로우, CI 피그먼트오렌지 등의 유

기 안료 및 이들의 무기 안료와 유기 안료의 복합 안료 등을 들 수 있다.

- [0098] 유기 분체로서는 스테아르산칼슘 등의 금속비누 ; 세틸린산아연나트륨, 라우릴린산아연, 라우릴린산칼슘 등의 알킬인산금속염 ; N-라우로일-베타-알라닌칼슘, N-라우로일-베타-알라닌아연, N-라우로일글리신칼슘 등의 아실아미노산 다가금속염 ; N-라우로일-타우린칼슘, N-팔미토일-타우린칼슘 등의 아미드술포산 다가금속염 ; N-엡실론-라우로일-L-리진, N-엡실론-팔미토일리진, N-알파-파리토일올니틴, N-알파-라우로일아르기닌, N-알파-경화우지지방산아실아르기닌 등의 N-아실염기성아미노산 ; N-라우로일글리실글리신 등의 N-아실폴리펩티드 ; 알파-아미노카프릴산, 알파-아미노라우린산 등의 알파-아미노지방산 ; 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 나일론, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리스티렌, 디비닐벤젠·스티렌 공중합체, 사불화에틸렌 등을 들 수 있다.
- [0099] 자외선 흡수제로서는 파라아미노벤조산, 파라아미노벤조산에틸, 파라아미노벤조산아미, 파라아미노벤조산옥틸, 살리실산에틸글리콜, 살리신산페닐, 살리신산옥틸, 살리신산벤질, 살리신산부틸페닐, 살리신산호모멘틸, 계피산벤질, 파라메톡시계피산-2-에톡시에틸, 파라메톡시계피산옥틸, 디파라메톡시계피산모노-2-에틸헥산글리세틸, 파라메톡시계피산이소프로필, 디이소프로필·디이소프로필계피산에스테르 혼합물, 우로카닌산, 우로카닌산에틸, 히드록시메톡시벤조페논, 히드록시메톡시벤조페논술포산 및 그 염, 디히드록시메톡시벤조페논, 디히드록시메톡시벤조페논디술포산나트륨, 디히드록시벤조페논, 테트라히드록시벤조페논, 4-*tert*-부틸-4'-메톡시디벤조일메탄, 2,4,6-트리아닐리노-*p*-(카르보-2'-에틸헥실-1'-옥시)-1,3,5-트리아진, 2-(2-히드록시-5-메틸페닐)벤조트리아졸 등을 들 수 있다.
- [0100] 살균제로서는 히노키티올, 트리클로산, 트리클로로히드록시디페닐에테르, 크로르헥시딘글루콘산염, 페녹시에탄올, 레조르신, 이소프로필메틸페놀, 아줄렌, 살리칠산, 진크필리티온, 염화벤잘코늄, 감광소 301 호, 모노니트로과이어콜나트륨, 운테시렌산 등을 들 수 있다.
- [0101] 산화 방지제로서는 부틸히드록시아니솔, 갈릭산프로필, 엘리소르빈산 등을 들 수 있다.
- [0102] pH 조정제로서는 시트르산, 시트르산나트륨, 말산, 말산나트륨, 프말산, 프말산나트륨, 숙신산, 숙신산나트륨, 수산화나트륨, 인산일수소나트륨 등을 들 수 있다.
- [0103] 알코올로서는 세틸알코올 등의 고급 알코올을 들 수 있다.
- [0104] 또한, 이외에 첨가해도 되는 배합 성분은 이에 한정되는 것은 아니며, 또, 상기 어느 성분도 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 배합 가능하지만, 총중량에 대하여 바람직하게는 0.01 - 5 % 중량, 보다 바람직하게는 0.01 - 3 % 중량로 배합된다.
- [0105] 본 발명의 화장료는 용액, 유화물, 점성형 혼합물 등의 형상을 취할 수 있다.
- [0106] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 부평초 추출물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함한다.
- [0107] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 유액, 크림, 화장수, 팩, 파운데이션, 로션, 미용액, 모발화장료 등을 들 수 있다.
- [0108] 구체적으로, 본 발명의 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저의 제형을 포함한다.
- [0109] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0110] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0111] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0112] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0113] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0114] 본 발명의 부평초 추출물은 DPPH 자유 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 양이온 소거능 저해활성, 크산틴 옥시다제 (Xanthine oxidase) 저해활성 등의 항산화효과; 높은 세포 생존률; 티로시나제 (Tyrosinase) 저해활성, 세포내 티로시나제 (Cellular tyrosinase) 저해활성 멜라닌(melanin) 생합성 저해 활성, 미백과 관계되어진 티로시나제 (tyrosinase) 단백질 발현억제 등의 미백활성; 엘라스타제 (Elastase) 저해활성, MMP-1저해활성, 프로-콜라게나제(pro-collagenase) 저해활성 실험 등을 통한 주름개선효과 등을 확인하여 미백 및 피부노화 치료 및 예방용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0115] 도 1은 시료의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타낸 도이고;
- 도 2는 시료의 ABTS 양이온 라디칼 소거활성을 나타낸 도이고;
- 도 3은 시료의 섬유아세포의 생존률을 나타낸 도이며;
- 도 4는 시료의 흑색종세포의 생존률을 나타낸 도이며;
- 도 5는 시료의 엘라스타제 저해활성을 나타낸 도이며;
- 도 6는 시료의 콜라게나제 저해활성을 나타낸 도이며;
- 도 7는 시료의 프로-콜라겐 저해활성을 나타낸 도이며;
- 도 8는 시료의 MMP-1 저해활성을 나타낸 도이며;
- 도 9는 시료의 티로시나제 저해활성을 나타낸 도이며;
- 도 10는 시료의 멜라닌 생합성에 미치는 영향을 나타낸 도이며;
- 도 11는 시료의 멜라노마 세포의 세포내 티로시나제 저해활성을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0116] 이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0117] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0118] 실시예 1. 부평초 추출물의 제조

[0119] 1-1. 부평초 물 추출물

[0120] 부평초는 (주) 휴먼허브에서 구입하여 사용하였다. 열수 추출물의 경우 시료 100 g에 증류수 10배 양을 가하여 85℃에서 9시간 환류냉각 추출하여 상등액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하고, 각 추출물은 12,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 Whatman No. 1 여과지로 여과하였으며 각 추출물은 농축하여 동결건조하여 물 추출물

13.9 g 을 수득하였다(이하 SW라 함).

[0121]

1-2. 부평초 에탄올 추출물

[0122]

부평초는 (주) 휴먼허브에서 구입하여 사용하였다. 시료 100 g에 70% 에탄올을 10배 양을 가하여 85℃에서 12시간 환류냉각 추출하여 상등액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하고, 각 추출물은 12,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 Whatman No. 1 여과지로 여과하였으며 각 추출물은 농축하여 동결건조하여 70% 에탄올 추출물 12 g을 각각 수득하였다(이하 SE라 함).

[0123]

실시예 2. 부평초 분획 추출물의 제조

[0124]

용매별 분획은 상기 실시예 1의 부평초 에탄올 추출물과 헥산을 1:1 비율(v/v)로 분획하였고, 감압 농축하여 헥산 분획물을 얻었다. 동일한 과정을 통해 에틸아세테이트 층, 부탄올 층 및 물 층을 순차적으로 가하여 각 분획물을 얻었다. 각 추출물과 용매 분획물은 농축 후 동결건조시켜 헥산 분획물 94.05 g (이하, SE-H라 함), 에틸아세테이트 분획물 68.80 g (이하, SE-E라 함), 부탄올 분획물 50.26 g (이하, SE-B라 함), 및 물 분획물 205.5 g (이하, SE-W라 함),을 각각 분말 상태로 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료에 사용하였다.

[0125]

실험예 1. 항산화 효과 확인

[0126]

1-1. 전자 공여능 (electron donating ability) 측정

[0127]

상기 실시예 시료의 전자공여능을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 Blois의 방법을 변형하여 하기와 같이 실험을 수행하였다. (Blois MS. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. 26, 1199-1120)

[0128]

각 시료용액 2mL에 0.2mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 1ml 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다. DPPH radical 소거활성은 하기 수학적 식 1에 따라, 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도 값으로 나타내었다.

수학적 식 1

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

[0129]

[0130]

본 실험결과, 부평초 에탄올, 열수 추출물과 에탄올 추출물의 용매별 분획물에 대한 DPPH radical 소거활성 결과는 도 1과 같이 나타내었다. 부평초 에탄올 추출물 100 µg/ml 농도에서 36.1%의 소거능을 나타내었고, 열수 추출물 100 µg/ml 농도에서 24.7%의 소거능을 나타내어 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 DPPH radical 소거활성이 우수하였다. 부평초 에탄올 추출물의 용매별 분획물의 경우 100 µg/ml 농도에서 EtOAc 분획층과 BuOH 분획층에서 각각 44.2%, 42.6%의 소거능을 나타내었다.

[0131]

1-2. ABTS 라디칼 양이온 소거능 저해활성 측정

[0132]

상기 실시예 시료의 ABTS 라디칼 양이온 탈색화(radical cation decolorization) 법에 의한 항산화 효능을 시험하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다(Roterta, R., P. Nicoletta, P. Anna, P. Ananth, Y. Min and R.E. Catherine. 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Radic. Biol. Med.* 26, 1231-1237.)

[0133]

7mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Wako Chemical Co., Japan)와 2.45mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺을 형성시킨 후

phosphate buffer saline (PBS, pH7.4) 로 희석하였다. 희석된 용액 100 μl에 시료 50 μl를 가하여 5분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 하기 수학적 2와 같이 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도 값으로 나타내었다.

수학적 2

$$\text{ABTS radical 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

[0134]

[0135]

ABTS radical cation 소거능은 2,2-azino-bis(3-ethyl-benthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS)와 potassium persulfate와의 반응으로 ABTS+radical이 생성되면 특유의 색인 청록색을 띄게 되며 hydrogen donating antioxidant와 chain breaking antioxidant 모두를 측정할 수 있다.

[0136]

부평초의 ABTS radical 소거능 측정 결과를 도 2와 같이 나타내었다. 부평초 에탄올 추출물의 경우 10 μg/ml의 농도에서 36.7%로 열수 추출물보다 ABTS radical 소거능이 우수하였다. 부평초 에탄올 추출물의 용매별 분획물의 경우 EtOAc 분획물 10 μg/ml의 농도에서 44.2% 소거활성을 나타내어 분획물 중 가장 우수한 ABTS radical 소거능을 나타내었다.

[0137]

실험예 2. MTT assay에 의한 세포 생존률 측정

[0138]

세포 생존률 측정은 Carmichael 등의 방법에 따라 측정하였다(Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.).

[0139]

2-1. 세포 배양

[0140]

B16F10 melanoma 세포는 Michikawa[Michikawa, M., K.T. Lim, J. G. McLarnon and S. U. Kim. 1994. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J. Neurosci Res.* **37**, 62-70. 등의 방법에 따라 배양 세포에 0.25% 트립신(trypsin) 용액을 희석 처리한 후 세포를 분리한 다음 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin) (100U/ml)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 배양하였다.

[0141]

2-2. 세포생존률 측정

[0142]

각 세포주[melanoma (B16F10), fibroblast (CCD-986sk)]을 96 well plate에 0.6~8×10³ cells/well이 되게 0.18ml 분주하고, 시료를 농도 별로 조제하여 0.02ml 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 0.02ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO:ethanol(1:1) 0.15ml를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0143]

CCD986sk 세포에 대한 부평초의 세포 생존율을 측정한 결과, 대조군에 비해 부평초 에탄올, 열수 추출물과 용매별 분획물은 25 μg/ml의 농도에서 80% 이상의 세포생존율을 나타내었다(도 3, 4). 부평초 에탄올, 열수 추출물과 용매별 분획물은 세포생존율 결과를 바탕으로 25 μg/ml의 농도에서 procollagen 생합성능과 MMP-1 활성을 검증 하였다.

[0144]

실험예 3. 주름 개선 효능 실험

[0145]

3-1. 엘라스타제(Elastase) 저해활성 측정

[0146] 실시예에서 얻은 시료들의 엘라스타제 (Elastase) 저해활성을 시험하기 위하여 카넬 (Cannell) 등을 응용하여 하기와 같이 실험하였다(Cannell RJP, Kellan SJ, Owsianks AM and Walker JM. (1988) Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Media*. 54(1), 10-14.)

[0147] 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)3-Aster glehni-nitroanilide를 사용하여 37℃에서 20분간 기질로부터 생성되는 Aster glehni -nitroanilide의 생성량을 405nm에서 측정하였다. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.5mL씩 시험관에 취하고, 50mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (2.5U/mL, Sigma Chemical Co) 용액 0.5mL을 가한 후 기질로 50mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)3-Aster glehni -nitroanilide (0.5mg/mL)을 첨가하여 20분간 반응시켜 측정하였다. 엘라스타제 (Elastase) 저해활성은 하기 수학적 3과 같이, 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

수학적 3

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

[0148]

[0149] 이러한 본 실험 결과, 주름 생성과 관련된 elastase 저해 활성을 측정한 결과는 도 5과 같이 나타내었다. 부평초 에탄올의 경우 1,000 µg/ml의 농도에서 27.3%로 열수 추출물(7.2%)보다 elastase 저해효능을 나타내었다. 분획물의 경우 1,000 µg/ml의 농도에서 28.5%로 EtOAc 분획물이 가장 우수하였다.

[0150] 2-2. 콜라게나제 저해활성 측정

[0151] 실시예에서 얻은 시료들의 콜라게나제(collagenase) 저해활성을 시험하기 위하여 문헌에 기재된 W등의 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다(WE and Heindrich HG. (1963) Zur quantitativen bestimmung der collagenase. *Hoppe-Seyler's. Physiol. Chem.* 333:149-151.)

[0152] 즉 반응구는 0.1M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazo benzyloxycarbonyl-Pro-Leu- Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/ml)를 녹인 기질액 0.25ml 및 시료용액 0.1ml의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/ml) 0.15ml를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5ml을 넣어 반응을 정지 시킨 후, ethyl acetate 1.5ml을 첨가하여 320nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 하기 수학적 4과 같이, 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

수학적 4

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

[0153]

[0154] 부평초의 열수, 에탄올 추출물 및 용매별 분획물의 collagenase 저해활성을 측정하였다(도 6). 측정 결과, 1,000 µg/ml의 농도에서 에탄올 추출물 83.8%, 열수 추출물 77.2%의 collagenase 저해활성을 나타내었다. 또한, EtOAc 분획물은 1,000 µg/ml의 농도에서 84.3%의 collagenase 저해활성을 나타내어 분획물 중 가장 우수하였다.

[0155] 2-3. 프로-콜라겐 생합성 측정

[0156] 실시예에서 얻은 시료들의 프로-콜라겐(pro-collagen) 생합성에 미치는 영향을 시험하기 위하여 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다 (Kim MJ, Kim JY, Choi SW, Hong JT and Yoon KS. (2004) Anti-wrinkle effect of safflower (*Cathamus tinctorius*) seed extract. *J. Soc. Cosmet. Scientis Korea*.

30(1), 15-22.).

[0157] CCD-986sk세포(ATCC)에 시료를 농도별로 처리했을 때 pro-collagen type I의 합성량을 측정하기 위해 Procollagen Type-I C-Peptide (PIP) EIA kit(#MK101)를 TAKARA Bio Inc. (Shiga, Japan)에서 구입하여 이용하였다. 96-well plate에 각 well당 5×10^4 cells/well세포가 되도록 12well plate에 접종한 후 24시간을 안정화 하였다. 이 후, 배양된 배지를 제거하고 시료 추출물을 농도별로 처리한 후 CO₂ 배양기에서 48시간을 배양하였다. 각 well로부터 상등액을 회수하여 procollagen Type-I C-Peptide (PIP) EIA kit의 각 well에 첨가한 후, 제조사의 방법에 따라 procollagen type I의 총 양을 측정 하였다.

[0158] 섬유아세포에 대한 procollagen type I C-peptide (PICP) enzyme immunoassay에 의한 collagen 생합성량을 측정한 결과, 도 7과 같이 나타내었다. 부평초 에탄올과 열수 추출물의 경우 25 µg/ml의 농도에서 각각 45.1%, 37.2%의 procollagen 생합성량이 나타내었다. 부평초의 용매별 분획물의 경우 EtOAc (57.2%) > BuOH (41.5%) > water (42.8%) > hexane (32.3%) 순으로 Procollagen 생합성 활성을 나타내었다.

[0159] 2-4. MMP-1 저해활성 측정

[0160] 실시예에서 얻은 시료들의 MMP-1 저해활성을 시험하기 위하여 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다(Shim JS, Choi EJ, Lee CW, Kim HS and Hwang JK. (2009) Matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity of *Kaempferia pandurata* Roxb. *J of food*. 12(3), 601-607.).

[0161] 세포를 5×10^4 cells/well 농도로 12well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 첨가하여 CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 이때 MMP-1의 활성을 높이기 위하여 TNF-α를 10ng/mL의 농도로 첨가하였다. 세포의 배양액을 수거하여 matrix metalloproteinase-1 biotrack activity assay kit(R&D system, DMP100)을 이용하여 측정하였다.

[0162] 부평초의 MMP-1 저해활성 측정 결과는 도 8과 같이 나타내었다. 그 결과, 부평초 에탄올 추출물의 경우 25 µg/ml의 농도에서 17.5%를 나타내어 물 추출물보다 효과가 우수하였다. EtOAc 분획물의 경우 대조군에 비해 31.7%의 저해율을 나타내어 분획물 중에서 MMP-1 저해활성이 가장 우수하였다.

[0163] **실험예 4. 미백 활성 실험**

[0164] 4-1. 티로시나제 저해활성

[0165] 실시예에서 얻은 시료들의 티로시나제 (Tyrosinase) 저해활성을 시험하기 위하여 문헌에 개시된 Yagi 등의 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다 (Yagi A, Kanbara T and Morinobu N. (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Media*. 3981, 517-519.)

[0166] 반응구는 0.175M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5mL에 10mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2mL 및 시료용액 0.1mL의 혼합액에 버섯 티로시나제 (mushroom tyrosinase; 110U/mL) 0.2mL을 첨가하여 25℃에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475nm에서 측정하였다. 티로시나제 (Tyrosinase) 저해활성은 하기 수학적 식 5와 같이, 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

수학적 식 5

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

[0167]

[0168] 본 실험 결과, 피부 내에서 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해할 수 있는 tyrosinase 저해활성을 측정하기 위하여 mushroom유래의 tyrosinase 저해 활성 측정 결과는 도 9과 같이 나타내었다. 측정된 결과, 부평초 에

탄을 추출물의 경우 1,000 µg/ml의 농도에서 25.8%의 저해율을 나타내었고, 물추출물의 경우 8.7%의 저해율을 나타내었다. 용매 분획물 중에서는 EtOAc 분획물의 경우 1,000 µg/ml의 농도에서 38.2%의 저해율을 나타내어 tyrosinase 저해효과가 가장 우수하였다.

[0169] 4-2. 멜라닌(melanin) 생합성 저해율

[0170] 실시예에서 얻은 시료들의 피부 멜라노마 세포로부터의 멜라닌(melanin) 생합성 저해 활성을 시험하기 위하여 Hosoi 등의 문헌에 개시된 Melanoma cell(B16F10)에서의 멜라닌(melanin) 생합성 저해율 측정 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다(Hosoi J, Abe E, Suda T and Kuroki T. (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 45(4), 1474-1478.)

[0171] DMEM 배지로 배양된 멜라노마 세포를 100mm culture dish에 2×10^6 cell/dish가 되게 분주하고, 24시간 배양 후 시료를 농도별로 조제하여 2 ml 첨가하고, 48시간 후에 인산완충액 (pH 7.4)으로 세척하였다. 그 다음 0.25M trypsin-EDTA 용액으로 세포를 탈착한 후 수확한 세포를 1×10^6 세포 당 1ml의 5% TCA로 처리하고, 2,500rpm으로 2회 원심분리한 후 분리된 melanin을 인산완충액으로 세척한 뒤 ether:ethanol(1:3) 1ml를 가하여 2회 원심분리한 후 ether 1ml로 세척 건조시킨다. 건조된 melanin에 1N NaOH를 1ml 가하여 80℃에서 1시간 반응시킨 후 분광광도계 405nm에서 흡광도를 측정하였다. Melanin 생합성 저해는 하기 수학적 6과 같이, 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

수학적 6

$$\text{Melanin 생합성 저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

[0172] 추출물의 melanoma 세포에서의 멜라닌 생합성을 측정한 결과는 부평초 에탄올, 열수 추출물과 용매별 분획물에 의한 melanoma 세포의 생존율을 확인한 결과 도 10와 같이 대조군에 비해 25 µg/ml의 농도에서 모두 80% 이상의 생존율이 나타났다.

[0174] 4-3. 세포내 티로시나제 저해활성

[0175] 실시예에서 얻은 시료들의 세포내 티로시나제(Cellular tyrosinase) 저해활성을 시험하기 위하여 문헌에 개시된 Choi 등의 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다(Choi BW, Lee BH, Kang KJ, Lee ES and Lee NH. (1998) Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* 29(3), 237-242.)

[0176] B16F10 melanoma 세포(ATCC)를 6 well에 5×10^4 cell이 되도록 접종하여 배양하고, 24시간 뒤 각 well에 시료를 48시간 동안 처리한다. 처리 후 PBS로 2회 세척한 후 각 well의 세포에 lysis buffer (1% triton X-100, 0.1M Sodium phosphate buffer, 50mM PMSF, pH 6.8)를 가하였다. 얼음 위에서 세포를 파괴시키고 원심 분리한 후 상층액만 따로 모아 효소용액으로 사용하였다. L-DOPA를 2mg/mL 농도로 0.1M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 기질을 준비하고 기질 160 µL에 효소용액 40 µL를 가하고 37℃에서 1시간 가온하고 생성된 DOPA chrome의 양을 490nm에서 측정할 후 (1-시료의 흡광도/대조구의 흡광도)×100에 의하여 억제율을 계산하였다.

[0177] 본 실험 결과, 부평초 에탄올, 열수 추출물의 melanin 생합성 저해활성을 측정한 결과는 도 11과 같이 나타내었다. 부평초 에탄올과 열수 추출물의 경우 25 µg/ml의 농도에서 각각 9.6%, 0.8%의 저해활성을 나타내었다. 분

획물의 경우 EtOAc 분획물이 16.5%로 melanin 생합성 저해활성이 가장 우수하였다.

[0178] 이하, 본 발명의 제형예로서 크림, 마사지크림, 로션, 스킨로션, 에센스, 팩, 클렌징폼의 제형을 예시하고 있으나, 본 발명의 화장품 조성물을 포함하는 제형은 이에 한정되는 것은 아니다.

[0179] **제형예 1. 크림조성물**

[0180] 유상과 수상을 각각 75 ℃로 가열 혼합한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	1.0
2	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	1.0
3	친유형 모노스테아린산 글리세린	2.5
4	마이크로 스탈린 납	2.0
5	파라옥시안식향산메틸	0.2
6	파라옥시안식향산프로필	0.1
7	밀납	2.0
8	모노스테아린산 폴리메틸렌글리콜	2.0
9	모노스테아린산 소르비탄	1.0
10	트리 (카프릴, 카프린산) 글리세린	5.0
11	액상 리놀린	5.0
12	미리스틴산 옥틸도데실	8.0
13	스쿠알란	8.0
14	농글리세린	5.0
15	1,3-부틸렌글리콜	5.0
16	알란토인	0.1
17	SW 추출물 (실시예 1)	10.0
18	향료	미량
19	황색4호	미량
20	정제수	잔량

[0181]

[0182] **제형예 2. 마사지크림 조성물**

[0183] 유상과 수상을 각각 75 ℃로 가열 용해 혼합한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	2.0
2	친유형 모노스테아린산 글리세린	2.5
3	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	1.5
4	파라옥시안식향산메틸	0.2
5	파라옥시안식향산프로필	0.1
6	바셀린	3.5
7	모노스테아린산 폴리에틸렌글리콜	3.5
8	세스퀴올레인산 소르비탄	1.8
9	유동 파라핀	35.0
10	트리 (카프릴, 카프린산) 글리세린	3.0
11	옥틸도데칸올	5.0
12	스쿠알렌	2.0
13	농글리세린	5.0
14	SE 추출물 (실시예 1)	5.0
15	히아루로닉애씨드추출물	1.0
16	향료	미량
17	정제수	잔량

[0184]

[0185] 제형예 3. 로션 조성물

[0186] 유상과 수상을 각각 75 ℃로 가열 혼합 유화한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	2.0
2	스테아린산	1.0
3	친유형 모노스테아린산 글리세린	1.0
4	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	2.0
5	바셀린	1.0
6	모노스테아린산 폴리에틸렌글리콜	1.5
7	세스퀴올레인산 소르비탄	1.0
8	유동 파라핀	5.0
9	스쿠알렌	5.0
10	파라옥시안식향산프로필	0.2
11	파라옥시안식향산메틸	0.2
12	농글리세린	5.0
13	SE-H 추출물 (실시예 2)	15.0
14	트리에탄올아민	0.5
15	카르복시비닐폴리머	0.2
16	향료	미량
17	정제수	잔량

[0187]

[0188] 제형예 4. 스킨로션 조성물

[0189] 수상과 에탄올상을 각각 제조 혼합한 후 여과한다.

번호	원료명	중량 %
1	글리세린	2.0
2	1,3-부틸렌글리콜	2.0
3	구연산	0.01
4	에탄올	15.0
5	폴리옥시에틸렌경화피마자유	1.0
6	SE-E 추출물 (실시예 2)	25.0
7	향료	미량
8	위치하젤추출물	1.0
9	정제수	잔량

[0190]

[0191] 제형예 5. 에센스 조성물

[0192] 수상과 에탄올상을 각각 제조 혼합한 후 여과한다.

번호	원료명	중량 %
1	농글리세린	15.0
2	1,3-부틸렌글리콜	5.0
3	알란토인	0.1
4	에탄올	7.0
5	파라옥시안식향산메틸	0.15
6	트리에탄올아민	0.15
7	폴리옥시에틸렌경화피마자유	1.0
8	초산토코페롤	0.5
9	카르복시비닐폴리머	0.15
10	SE-B 추출물 (실시예 2)	30.0
11	향료	미량
12	정제수	잔량

[0193]

[0194] 제형예 6. 팩 조성물

[0195] 수상과 에탄올상을 각각 분산 용해하여 혼합시킨 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	폴리비닐알코올	15.0
2	카르복시메틸셀룰로오스나트륨	0.3
3	농글리세린	3.0
4	알란토인	0.1
5	에틸렌디아민테트라초산디나트륨	0.01
6	폴리에틸렌글리콜	1.0
7	에탄올	6.0
8	파라옥시안식향산메틸	0.15
9	타라옥시안식향산프로필	0.05
10	디엘판테놀	0.1
11	폴리옥시에틸렌 (12) 노닐페닐에테르	0.5
12	SE-W 추출물 (실시예 2)	45.0
13	향료	미량
14	정제수	잔량

[0196]

[0197]

제형예 7. 클렌징폼 조성물

[0198]

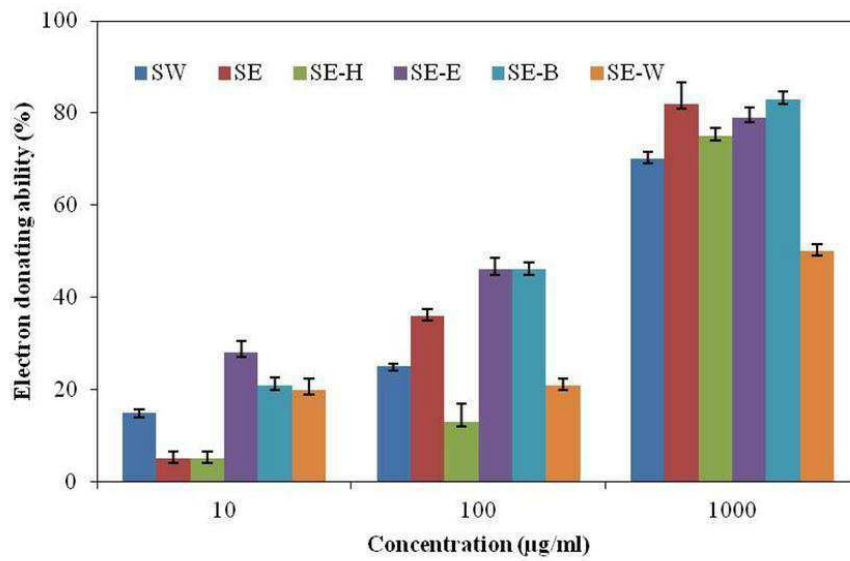
수상과 오일상을 각각 분산 용해하여 혼합 검화한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	스테아린산	6.5
2	미리스틴산	28.0
3	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	3.0
4	프로필렌 글리콜	5.0
5	농글리세린	10.0
6	수산화나트륨	7.0
7	에틸렌디아민테트라초산나트륨	0.1
8	태반 추출물	0.5
9	SE-E 추출물 (실시예 1)	15.0
10	향료	미량
11	정제수	잔량

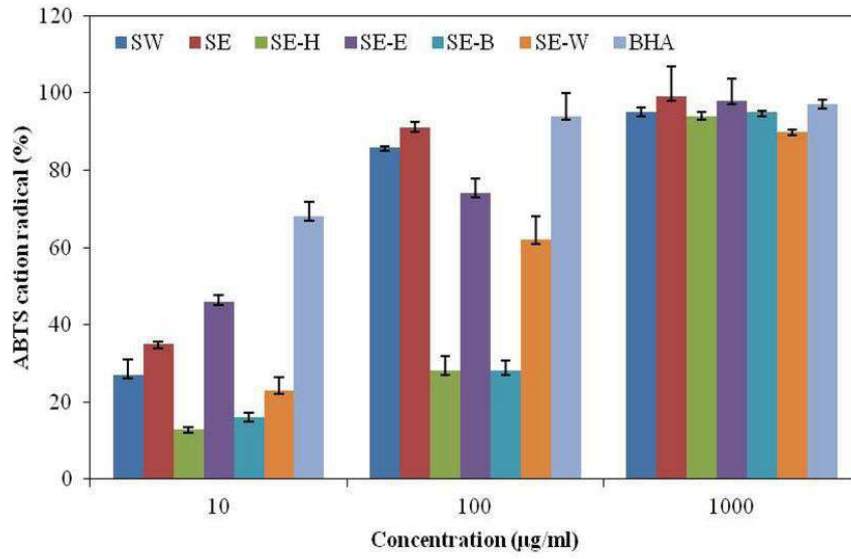
[0199]

도면

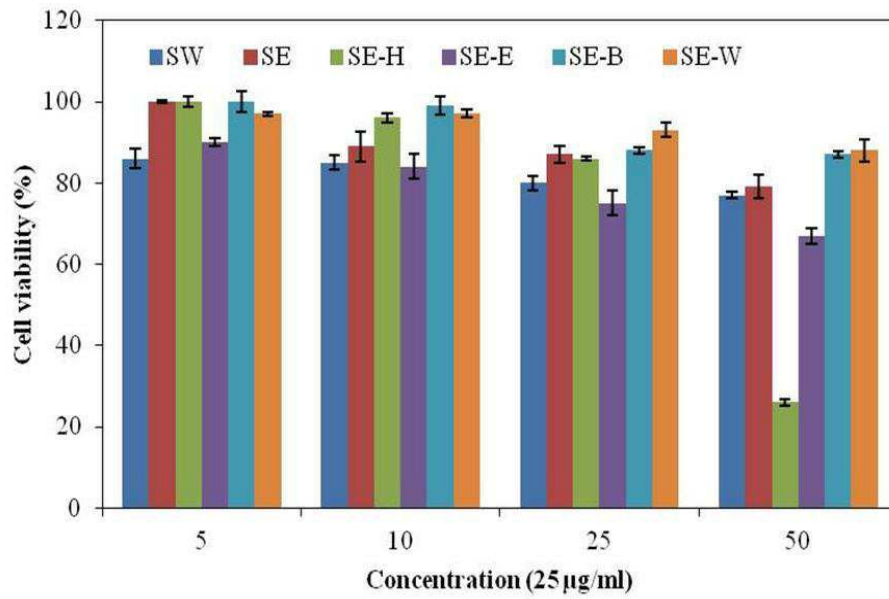
도면1



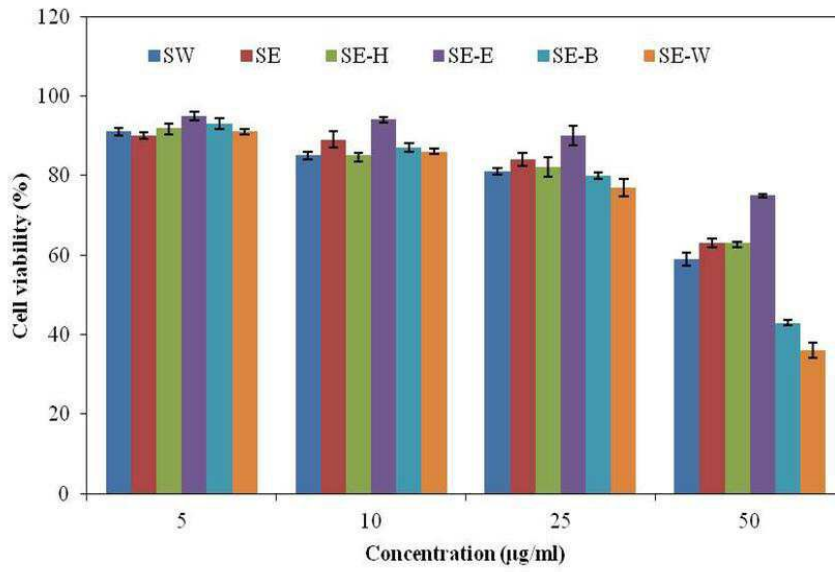
도면2



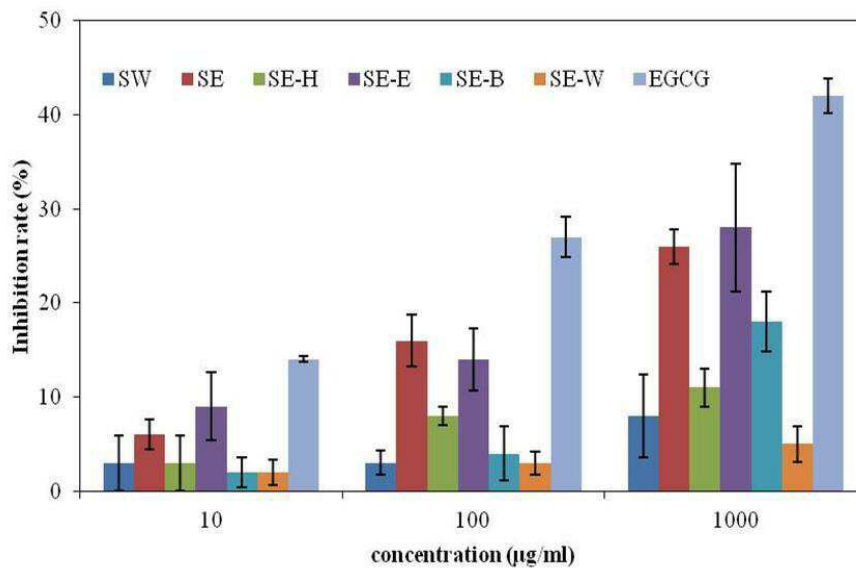
도면3



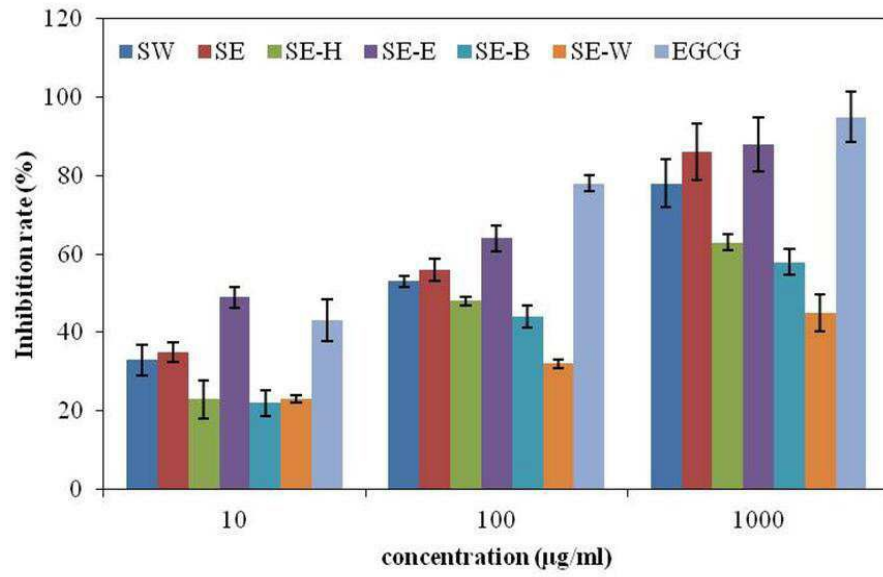
도면4



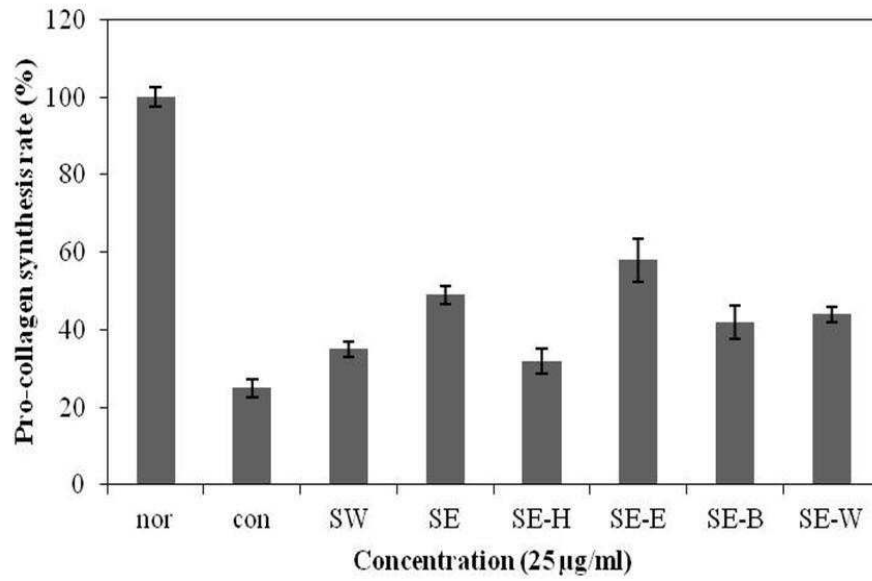
도면5



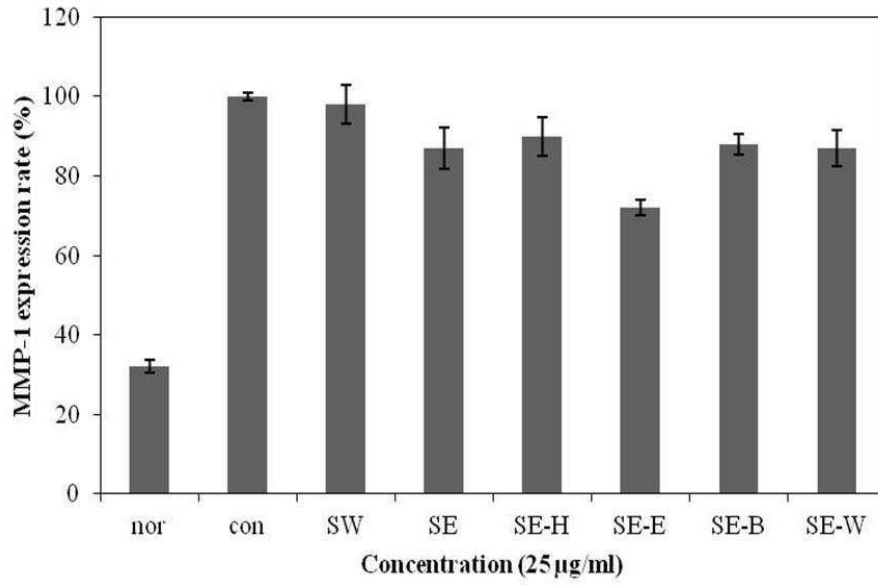
도면6



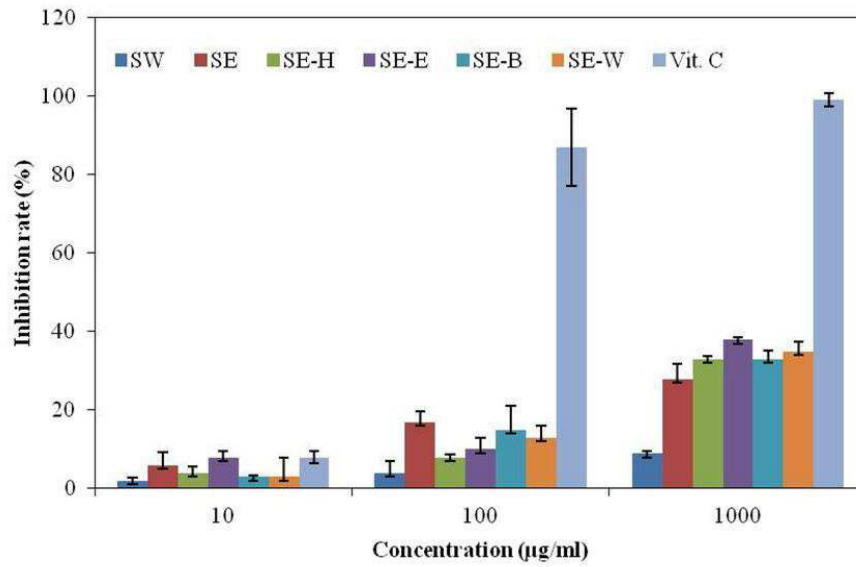
도면7



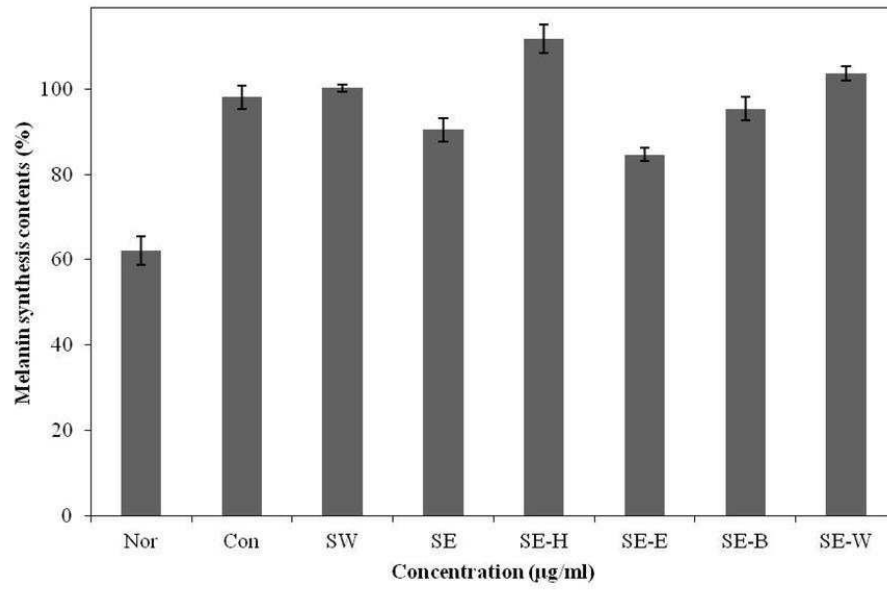
도면8



도면9



도면10



도면11

