



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0107565
(43) 공개일자 2008년12월11일

(51) Int. Cl.

A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0055473

(22) 출원일자 2007년06월07일
심사청구일자 2007년06월07일

(71) 출원인

주식회사 코리아나화장품

충청남도 천안시 서북구 성거읍 정촌리 204-1

(72) 발명자

이정노

충남 연기군 조치원읍 옥일아파트 105동 605호

최정은

충남 천안시 백석동 브라운스톤 114동 202호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인세신

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 백리향 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물

(57) 요약

본 발명은 항산화 효과, 피부노화 방지 효과, 피부주름 개선 효과, 미백 효과, 자외선에 의한 피부자극 완화 효과 및 보습 효과를 갖는 백리향 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물 및 상기 화장료 조성물을 인간의 피부에 도포하는 것을 특징으로 하는 화장방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면 백리향 추출물은 항산화능 뿐만 아니라 인간 섬유아세포활성효과, 피부 잔주름 개선효과, 미백효과, 자외선에 의한 피부손상 완화 효과 및 자극 완화 효과가 있어 이 물질을 이용하여 각종 기능성 화장료를 제조할 수 있다.

(72) 발명자

유영경

충북 청주시 상당구 우암동 165-23

이강태

충남 천안시 성거읍 신월리 벽산아파트 102동 120
1호

이건국

서울 송파구 방이동 89번지 올림픽선수기자촌 APT
328동 106호

특허청구의 범위

청구항 1

항산화 효과, 피부노화 방지 효과, 피부주름 개선 효과, 미백 효과, 자외선에 의한 피부자극 완화 효과 및 보습 효과를 갖는 백리향 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 백리향 추출물은 조성물 전체에 대해서 0.001-30.0중량%로 함유되는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 백리향 추출물은 (a) 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸 아세테이트, 클로로포름, 부틸아세테이트 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 추출용매를 이용한 용매 추출법, (b) 초임계 추출법 또는 (c) 초음파 추출법을 이용하여 추출한 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 크림, 에센스, 수중유(O/W)형 또는 유중수(W/O)형의 제형의 화장료 조성물 또는 연고 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 화장료 조성물을 인간의 피부에 도포하는 것을 특징으로 하는 화장 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <1> 본 발명은 백리향을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물에 관한 것이다.
- <2> 사람의 피부는 노화 과정에서 다양한 물리, 화학적인 변화가 일어난다. 그 원인으로는 크게 내적인 노화 (intrinsic aging)와 광노화(photo-aging)로 구분되며 이에 관한 연구가 활발히 이루어져 왔다. 자외선, 스트레스, 질병상태, 환경인자, 상처, 나이가 들어감에 따라 프리라디칼이 활성화되어 야기될 수 있으며, 이런 상태가 심화될 경우 생체 내에 존재하는 항산화 방어망을 파괴하고, 세포 및 조직을 손상시켜 성인병 및 노화를 촉진하게 된다. 좀 더 구체적으로 말하자면, 피부의 주요 구성물질인 지질, 단백질, 다당류 및 핵산 등이 산화되어 피부세포 및 조직이 파괴되고, 결국 피부노화 현상이 생겨나는 것이다. 특히 단백질의 산화는 피부의 결합 조직인 콜라겐(collagen), 히아루론산(hyaluronic acid), 엘라스틴(elastin), 프로테오글리칸(proteoglycan), 피브로넥틴(fibronectin) 등이 절단되어 심한 과다 염증반응과 피부의 탄력에 지장을 주고 이것이 더 심해질 경우 DNA의 변이에 의해 돌연변이, 암의 유발, 면역기능 저하의 사태에 이르게 된다.
- <3> 그러므로, 신체의 대사 과정 중 발생하는 프리라디칼이나 자외선 조사, 염증반응에 의해 매개되는 프리라디칼을 소거하여 세포막을 보호하고, 또 이미 손상 받은 세포는 활발한 신진대사에 의해 재생시켜서 세포를 증식시켜야 피부는 빠르게 회복되고 건강한 피부를 유지할 수 있다. 노화에는 프리라디칼 뿐만 아니라 기질 금속단백질 분해효소(Matrix Metalloprotease; MMP)라는 효소가 관여하는데 생체 내에서 콜라겐과 같은 세포외기질의 합성과 분해는 적절하게 조절되나 노화가 진행되면서 그 합성이 감소하며 콜라겐을 분해하는 효소인 기질 금속단백질 분해효소(MMP)의 발현이 촉진되어 피부의 탄력이 저하되고 주름이 형성된다. 또한 자외선 조사에 의해 이러한 분해효소가 활성화되기도 한다. 그러므로 세포내에서 활성화가 유도되는 MMP 발현을 조절하거나 그 활성을 억제할 수 있는 물질의 개발이 요구되고 있다. 이제까지 화장품의 소재로서 사용된 원료들은 단순히 효소 활성만

을 억제하는 것이 대부분이었다. 이에 세포내 자연노화와 광노화에 의해 그 발현이 유도되는 MMP 발현량 및 활성을 조절하고자 하였다.

- <4> 다음으로, 색소침착에 의한 피부 변화이다. 피부색을 결정하는 인자에는 기본적으로 인종과 지역, 성별, 나이에 따른 차이를 배제하면 기미, 주근깨와 자외선 노출로 인한 태닝과 같은 부분, 또는 전체적인 색소침착, 그 외에 여드름 및 흉터, 각질의 분포상태와 혈액순환, 스트레스, 건강상태 등이 있다. 이상의 인자들 가운데에서도 가장 중요한 인자는 색소침착이다.
- <5> 피부색에 영향을 주는 색소로는 멜라닌, 멜라조이드, 카로틴, 헤모글로빈 등이 있는데 이중 가장 중요한 것은 멜라닌으로서, 이 멜라닌의 생합성에 영향을 미치는 가장 큰 요인은 자외선과 체내 호르몬 분비 정도이다. 멜라닌은 자외선을 흡수 또는 산란시켜 자외선으로부터 피부가 손상되는 것을 방지하는데 큰 역할을 하는데, 특별한 최대흡수파장이 없으며 전 영역의 빛을 흡수한다. 또한 활성산소종을 제거하는 기능이 탁월하나, 때로는 멜라닌 자체가 활성산소를 발생시키기도 하며, 멜라닌 구조내의 카테콜이나 퀴논에 의하여 다른 물질을 환원시키거나 산화시키고, 멜라닌 자체가 자유라디칼의 성질을 나타내기도 한다.
- <6> 멜라닌의 생합성은 아미노산의 일종인 티로신이 멜라닌형성세포의 멜라노솜에서 티로시나제에 의해 산화되어 디하이드록시 페닐알라닌(dihydroxy phenylalanine)으로 전환되는 것을 시작으로 계속되는 일련의 산화과정을 거쳐 갈색(pheoelanin), 흑색(eumelanin)의 중합체로 형성된다. 이러한 생합성 과정은 멜라노솜이라는 특수한 형태의 갈색 세포내 소기관에서 진행되며 멜라닌 과립을 포함한 멜라노솜은 핵 주변 부위에서 수지상 돌기 끝부분으로 이동, 각질세포의 식세포작용에 의해 세포질 내로 이동하고 이들은 각질세포의 핵 주변에 축적된다.
- <7> 멜라닌의 합성과 멜라노솜의 수, 주위의 각질세포로의 이동은 부분적으로 호르몬과 자외선 등에 영향을 받고 일차적으로는 유전적인 영향을 크게 받는다. 그 밖에 티로시나제의 발현 및 멜라닌의 합성, 전송에 관여하는 세포내 조절인자인 싸이토카인(cytokine), 구리, 아연, 철 등의 금속 이온 및 인터페론, 프로스타글란딘, 히스타민 등이 관여하는 것으로 알려져 있다.
- <8> 이미 아스코르빈산(일본특개평 4-9320), 하이드로퀴논(일본특개평-192062), 코직산(일본특개소 56-7710), 알부틴(일본특개평 4-93150) 및 일부의 추출물 등이 티로시나제 저해 활성을 가지고 있어 미백 화장품으로 이용되고 있으나 화장품 제형 중에서의 안정성이 낮으므로 분해되어 착색되거나, 이취의 발생, 생체 레벨에서의 효능, 효과의 불분명 및 안전성문제 등으로 그 사용이 제한되고 있는 실정이다. 그리고 티로시나제의 억제 효과는 입증되었으나 실제 생체 레벨과 유사한실험에서는 그 효과가 낮게 나타난다. 따라서 생체 레벨과 유사한 흑색종 세포 배양에 의한 저해효과 평가가 요구되고 있는 실정이다. 또한 하이드로퀴논은 발암성 물질로 규정되어 화장품에서는 그 사용이 금지 또는 제한되고 있다. 코직산과 아스코르빈산은 매우 불안정한 물질이다. 상기 성분들을 소량 함유한 화장품은 실온에서 수 주일동안 보관하면 갈변 현상이 발생한다.
- <9> 이러한 피부의 문제점을 해결하기 위하여, 최근 여러 화학물질 등에 의한 피부 자극을 줄이기 위해 천연물을 사용한 화장품이 많이 개발되고 있다. 천연 재료는 피부에 부작용이 적을 뿐만 아니라, 최근 천연재료를 이용한 화장품에 대한 소비자들의 호응이 높아짐에 따라 화장품 원료로서 개발가치가 한층 늘어나고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <10> 본 발명자들은 이제까지 알려지지 않은 여러 천연물들에 있어서 화장품으로의 응용 가능성을 연구한 결과, 꿀풀과 낙엽 반관목 식물인 백리향(*Thymus quinquecostatus*)을 선정하고 이들로부터 추출물을 제조하여, 피부 항산화 효과, 콜라겐합성효과, 피부 잔주름 완화효과, 미백효과, 자외선에 의한 피부손상 완화효과 및 피부자극완화효과를 측정한 결과, 그 효능이 매우 우수하므로 화장품으로서의 효능을 기대할 수 있다는 것을 발견하게 되었다.
- <11> 따라서, 본 발명의 목적은 항산화 효과, 피부노화 방지 효과, 피부주름 개선 효과, 미백 효과, 자외선에 의한 피부자극 완화 효과 및 보습 효과를 갖는 백리향 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물을 제공하는데 있다.
- <12> 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 백리향 추출물을 함유하는 화장품 조성물을 인간의 피부에 도포하는 것을 특징으로 하는 화장 방법을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

- <13> 본 발명은 항산화 효과, 피부노화 방지 효과, 피부주름 개선 효과, 미백 효과, 자외선에 의한 피부자극 완화 효

과 및 보습 효과를 갖는 백리향 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물을 제공한다.

- <14> 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 백리향(*Thymus quinquecostatus*)은 꿀풀과 낙엽 반관목 식물로서 높은 산꼭대기나 바닷가의 바위틈에서 자란다. 높이는 3~15 cm이다. 원줄기는 땅위로 퍼져나가고 어린가지가 긴 타원형이거나 바소꼴이며 길이는 5~12 mm 이다. 양면에 선점(腺點)이 있으며 가장자리는 밋밋하다. 꽃의 길이 약 1 cm 인 것을 심백리향(var. japonica)이라고하는데, 한국 특산종이다. 향기가 있어서 관상용으로 심으며, 포기 전체에 정유(精油)가 있어서 진해, 진경, 구풍에 사용하고 한국, 일본, 중국등지에서 분포한다. 꽃은 6월에 분홍색으로 피고, 줄기가 좀더 들이나 길가에서 자란다. 높이 20-50 cm로 전체에 털에 없고 줄기는 붉은 자주빛의 등근 통으로 곧게 선다. 가지를 많이 내며 마디에 뿌리를 뻗는다. 잎은 어긋나고 길이 4-8 cm 정도이다.
- <15> 본 명세서에서, 용어 '백리향 추출물'은 백리향의 다양한 기관 또는 부분 (예: 잎, 꽃, 뿌리, 줄기, 가지, 껍질 및 종자 등)으로부터 추출하여 얻은 것을 의미하고, 바람직하게는 잎, 줄기, 가지, 껍질 또는 뿌리, 보다 바람직하게는 잎, 가지 또는 뿌리, 가장 바람직하게는 가지로부터 얻은 추출물을 의미한다.
- <16> 본 발명의 백리향 추출물은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도와 압력의 조건 하에서, 통상적인 용매를 사용하여 제조될 수 있다.
- <17> 본 발명의 백리향 추출물은 정제수, 메탄올, 에탄올, 글리세린, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸에테르, 부틸렌글라이콜 및 헥산으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 추출용매를 사용하여 추출되며, 바람직하게는 에탄올, 70% 에탄올 또는 물을 사용하여 추출되며, 보다 바람직하게는 70%에탄올을 사용하여 추출되는 것을 특징으로 한다.
- <18> 한편, 본 발명의 백리향 추출물은 상기한 추출 용매뿐만 아니라, 다른 추출 용매를 이용하여도 실질적으로 동일한 효과를 나타내는 추출물이 얻어질 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 것이다.
- <19> 또한, 본 발명의 추출물은 상술한 추출 용매에 의한 추출물뿐만 아니라, 통상적인 정제 과정을 거친 추출물도 포함한다. 예컨대, 이산화탄소에 의한 감압, 고온에 의한 초임계추출법에 의한 추출, 초음파를 이용한 추출법에 의한 추출, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 이용한 분리, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 활성 분획도 본 발명의 추출물에 포함되는 것이다.
- <20> 또한, 본 발명은 상기 추출물이 상온에서 냉침, 가열 여과하여 얻어진 액상물, 추가로 용매를 감압농축 또는 동결건조하여 얻은 것임을 특징으로 하는 피부외용제 조성물을 제공한다.
- <21> 또한, 본 발명의 백리향 추출물은 화장료 조성물 전체에 대해서 0.001-30.0중량% 함유되며, 바람직하게는 0.1-10.0 중량% 함유되는 것을 특징으로 한다. 상기 추출물의 함량이 0.001중량% 미만인 경우에는 피부개선 효과가 나타나지 않으며, 30.0중량% 이상인 경우에는 함유량 증가에 대한 효과 증대 정도가 미미하며, 제형상의 안전 및 안정성에 문제가 있으며 경제적이지도 못하다.
- <22> 본 발명에 따르면, 백리향 추출물은 항산화 효과(실험예 1 및 2), MMP-1 생성 억제효과(실험예 3), 자외선에 의한 MMP-1 생성 억제효과(실험예 4), 콜라겐 합성증진효과(실험예 5), 멜라닌 생성 억제효과(실험예 6), 자외선 조사에 의한 세포독성 완화 효과(실험예 7), 자외선 조사에 의한 염증성 사이토카인 발현 억제효과(실험예 8), 피부탄력 개선효과(실험예 9), 보습효과(실험예 10)가 뛰어나다.
- <23> 따라서, 이러한 다양한 기능을 가진 백리향 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 화장료 조성물은 항산화 효과, 피부노화 방지 효과, 피부주름 개선 효과, 미백 효과, 자외선에 의한 피부자극 완화 효과 및 보습 효과를 갖는다.
- <24> 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서 상기 유효성분 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- <25> 본 발명의 화장료 조성물은 당 업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

- <26> 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- <27> 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.
- <28> 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 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.
- <29> 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- <30> 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- <31> 또한, 본 발명은 본 발명의 백리향 추출물을 함유하는 화장료 조성물을 인간의 피부에 도포하는 것을 특징으로 하는 화장방법을 제공한다.
- <32> 본 발명의 화장 방법은 본 발명의 화장료 조성물을 인간의 피부에 도포하는 모든 화장 방법을 일컫는다. 즉, 화장료 조성물을 피부에 도포하는 당업계에 공지된 모든 방법이 본 발명의 화장 방법에 속한다.
- <33> 본 발명의 화장료 조성물은 단독 또는 중복 도포하여 사용하거나, 본 발명 이외의 다른 화장료 조성물과 중복 도포하여 사용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 피부 보호 효과가 우수한 화장료 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다.
- <34> 본 발명의 화장료 조성물이 비누, 계면활성제 함유 클렌징 또는 계면활성제 비함유 클렌징 제형일 경우, 피부에 도포한 후 닦아내거나 떼거나 물로 씻어낼 수도 있다. 구체적인 예로서, 상기 비누는 액상비누, 가루비누, 고형비누 및 오일비누이며, 상기 계면활성제 함유 클렌징 제형은 클렌징폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비함유 클렌징 제형은 클렌징크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 겔이며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <35> 본 발명의 백리향 추출물을 포함하는 화장료 조성물을 인간의 피부에 도포하는 화장방법을 수행하면, 피부의 노화 방지, 주름개선 효과, 미백 효과, 보습 효과, 자외선에 의한 피부자극 완화 효과를 얻을 수 있다.
- <36> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- <37> **제조예 1: 백리향 추출물의 제조**
- <38> 세절하여 음건한 백리향을 70%(V/V) 에탄올 수용액으로 5시간씩 3회 환류추출하고 냉침한 후, 와트만(Whatman) #5 여과지로 여과하였다. 여과된 추출물을 50℃ 이하에서 감압농축 및 동결건조하였다. 감압농축물 및 동결건조물이 1%가 되게 50% 부틸렌글리콜용액에 분산/용해하여 백리향 추출물을 제조하였다.
- <39> **실험예 1: NBT법을 이용한 항산화 효과 측정 실험**
- <40> 본 실험예는 제조예 1에서 수득한 백리향 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위해 실험실 조건에서 다른 항산화제 즉, 레티놀(retinol)과 BHT(Butylated Hydroxytoluene)를 비교샘플로 하였으며, NBT법을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다.
- <41> 항산화 효과를 측정하기 위해서 크산틴과 크산틴옥시다제에 의해 생성되는 활성산소를 NBT법에 의해 측정하고

피검물질이 활성산소를 제거하는 효과, 즉 활성산소 소거효과를 평가한다. 크산틴과 크산틴옥시다제에 의해 활성산소를 생성시킨다. 이 활성산소가 니트로블루테트라졸리움(Nitro Blue Tetrazolium;NBT)과 반응하여 이것에 의해 생성되는 청색을 파장 560nm에서 측정하는 것으로 활성산소 소거율을 측정한다.

<42> 측정방법으로서

- <43> 1. 0.05M Na₂CO₃ ----- 2.4ml
- <44> 2. 3mM 크산틴 용액----- 0.1ml
- <45> 3. 3mM EDTA 용액----- 0.1ml
- <46> 4. BSA 용액----- 0.1ml
- <47> 5. 0.72mM NBT 용액----- 0.1ml
- <48> 6. 크산틴 옥시다제 용액----- 0.1ml
- <49> 7. 6mM CuCl₂ 용액----- 0.1ml

- <50> ① 바이엘병에 1,2,3,4,5를 가하고 여기에 시료용액 0.1ml을 첨가하고 25℃에서 10분간 방치한다.
- <51> ② 6을 가하여 빨리 교반하고 25℃에서 20분간의 배양을 개시한다.
- <52> ③ 그 후 7을 가하여 반응을 정지시키고 560nm에서의 흡광도 St를 측정한다.
- <53> ④ 공시험은 시료용액 대신에 증류수를 사용한 것을 상기와 똑같이 조작해 흡광도 Bt를 측정한다.
- <54> ⑤ 역시, 시료용액의 블랭크(Blank)는 6 대신에 증류수를 사용해 똑같이 조작하여 흡광도 Bo를 측정한다.
- <55> 활성산소 소거율은 수학적 식 1에 의하여 산출하였으며, 결과는 표 1에 나타내었다.

수학적 식 1

- <56> 활성산소 소거율(%) = [1-(St-So)/(Bt-Bo)] X 100
- <57> St : 시료용액의 효소 반응 후의 560nm에서의 흡광도
- <58> Bt : 공시험용액의 효소 반응 후의 560nm에서의 흡광도
- <59> So : 시료용액의 효소 무첨가시 반응전의 560nm에서의 흡광도
- <60> Bo : 공시험용액의 효소 무첨가시 반응전의 560nm에서의 흡광도

표 1

시료명	처리 농도(%)	항산화효과(%)
백리향 추출물(제조예 1)	0.01	94.3
레티놀	0.01	93.1
BHT	0.01	90.2

<62> 상기 표 1의 결과에서 보는 바와 같이, 0.01% 농도에서 시험한 시료 모두에서 우수한 항산화 효과를 확인할 수 있었다. 백리향 추출물은 레티놀 및 BHT보다 훨씬 우수한 항산화력을 가지고 있음이 확인되었다.

<63> 실험예 2: DPPH법을 이용한 항산화 효과 측정 실험

<64> 본 실험예는 제조예 1에서 수득한 백리향 추출물의 항산화 효과를 측정하기 위해 실험실 조건에서 비타민 C와 같은 항산화제를 비교샘플로 하여 DPPH법을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다.

<65> DPPH법은 DPPH(2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) 프리라디칼이라는 유리기를 사용하여 환원력에 의한 항산화 활성을 측정한다. 피검물질에 의해 DPPH가 환원되어 흡광도가 감소하는 정도를 공시험액의 흡광도와 비교하여 파장 560nm에서 자유라디칼 소거율을 측정한다.

<66> 사용한 시약으로서는 2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl 프리라디칼(Aldrich Chem. Co.,

MW=618.76)0.1mM 용액으로서 61.88mg을 메탄올에 용해하여 100ml로 한다.

<67> 측정방법으로서

<68> ① 96-웰 플레이트에 0.1mM DPPH 용액 0.15ml에 시료용액 0.15ml를 가하여 빨리 교반하고 25℃에서 10분간의 배양을 개시한다.

<69> ② 그 후 560nm에서의 흡광도 St를 측정한다.

<70> ③ 공시험은 시료용액 대신에 증류수를 사용한 것을 상기와 똑같이 조작해 흡광도 Bt를 측정한다.

<71> ④ 역시, 시료용액의 블랭크(Blank)는 0.1mM DPPH 용액 대신에 메탄올을 사용해 똑같이 조작하여 흡광도 Bo를 측정한다.

<72> 효과의 결과는 수학적 식 2에 의하여 산출하였으며, 결과는 표 2에 나타내었다.

수학적 식 2

<73> 자유라디칼 소거율(%) = [1-(St-So)/(Bt-Bo)] X 100

<74> St : 시료용액의 자유라디칼 소거 후의 560nm에서의 흡광도

<75> Bt : 공시험용액의 자유라디칼 소거 후의 560nm에서의 흡광도

<76> So : 시료용액의 자유라디칼 무첨가시 반응 전의 560nm에서의 흡광도

<77> Bo : 공시험용액의 자유라디칼 무첨가시 반응 전의 560nm에서의 흡광도

표 2

시료명	처리 농도(%)	항산화효과(%)
백리향 추출물(제조예1)	0.01	90.3
vit-C	0.01	89.1

<79> 상기 표 2의 결과에서 보는 바와 같이, 본 발명의 백리향 추출물은 0.01% 농도에서 비타민 C보다 훨씬 우수한 자유라디칼 소거율을 갖고 있음이 확인되었다.

실험예 3. MMP-1 생성 억제 효과

<81> 인간 정상 피부세포인 섬유아세포(한국 세포주 은행, 대한민국)를 48-웰 마이크로 플레이트(Nunc, 덴마크)에 각 웰당 1×10^6 세포가 되도록 접종하고, DMEM 배지(Sigma, 미합중국) 및 37℃의 조건에서 24시간 동안 배양한 후 상기 제조예 1의 백리향 추출물을 최종 농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가한 무혈청 DMEM 배지 및 대조군으로 백리향 추출물이 포함되지 않은 무혈청 DMEM 배지에서 48시간 동안 추가로 배양하였다. 배양 후, 각 웰의 상층액을 모아 MMP-1 분석 키트(Amersham, 미합중국)를 이용하여 새로 합성된 MMP-1의 양(ng/ml)을 측정하고, 하기 수학적 식 3에 따라 MMP-1 생성 억제율을 계산하였으며, 그 결과는 표 3에 나타내었다. 이때, MMP-1 생성 억제율의 양성 대조군으로 TGF- β (10ng/ml, Roche, 미합중국)를 사용하였다.

수학적 식 3

<82>
$$\text{MMP-1 생성 억제율(\%)} = \left\{ 1 - \frac{\text{실험군의 MMP-1의 양}}{\text{대조군의 MMP-1의 양}} \right\} \times 100$$

표 3

<83> 백리향 추출물의 MMP-1 생성억제율(%)

시험 물질	MMP-1 생성 억제율(%)
TGF- β	68.5
백리향(제조예 1)	66.5

<84> 상기 표 3의 결과에서 보는 바와 같이, 본 발명의 백리향 추출물은 TGF-β와 거의 유사한 정도의 MMP-1 생성 억제율을 보여주었다.

<85> **실험예 4. 백리향 추출물의 자외선 유도에 의한 MMP-1 생성 억제 효과**

<86> 일반적으로 MMP-1은 자외선에 의해 그 양이 증가되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 발명의 백리향 추출물이 자외선에 의해 생성이 증가되는 MMP-1의 양을 억제하는지를 알아보고자 실험을 실시하였다. 실험은 시료 처리에 앞서 UVA를 일정량 처리하는 것을 제외하고는 실험에 3과 동일하게 실시하였다. 본 실험에 사용한 백리향 추출물은 제조예 1의 추출물을 사용하였으나, 본 실험의 결과가 이에 한정되는 것은 아니다. MMP-1 생성 억제율은 상기 수학적 식 3에 따라 계산하였으며, 그 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

<87> 자외선 유도 후의 백리향 추출물의 MMP-1 생성 억제율(%)

시험 물질	MMP-1 생성 억제율(%)
TGF-β	75.3
백리향(제조예 1)	75.8

<88> 상기 표 4의 결과에서 보는 바와 같이, 본 발명의 백리향 추출물의 자외선 유도 후의 MMP-1 생성 억제율은 TGF-β보다 더 우수하였다.

<89> **실험예 5. 백리향 추출물의 콜라겐 합성 증진 효과**

<90> 인간 정상 상피세포인 섬유아세포를 48-웰 마이크로 플레이트에 각 웰당 1 x 10⁶ 세포가 되도록 접종하고, DMEM 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 제조예 1의 백리향 추출물을 최종농도 100 μg/ml로 첨가한 무혈청 DMEM 배지(실험군) 및 백리향 추출물이 포함되지 않은 무혈청 DMEM 배지(대조군)를 48시간 동안 추가로 배양하였다. 배양 후, 각 웰의 상층액을 모아 콜라겐 키트(Takara, 일본)를 이용하여 프로콜라겐 (procollagen) 타입 I C-펩타이드 (PICP) 양을 측정하여 ng/ml 환산하였으며, 이로 합성된 콜라겐 양을 측정하였다. 본 실험의 양성대조군으로는 TGF-β를 사용하였다. 콜라겐 생합성 증가율은 하기 수학적 식 4에 따라 계산하였으며, 그 결과는 표 5에 나타내었다.

수학적 식 4

$$\text{콜라겐 생성 증가율}(\%) = \left[\frac{\text{실험군의콜라겐양}}{\text{대조군의콜라겐양}} - 1 \right] \times 100$$

<91>

표 5

<92> 백리향 추출물의 콜라겐 합성 증진 효과

시험 물질	콜라겐 생합성율(%)
TGF-β	88.6
레티놀	83.8
제조예1	85.8

<93> 상기 표 5의 결과에서 보는 바와 같이, 본 발명의 백리향 추출물의 콜라겐 합성 증진 효과는 TGF-β 및 레티놀과 비슷한 효과를 갖는 것을 확인하였다.

<94> **실험예 6: B16F1 멜라닌형성세포를 이용한 멜라닌 생성 억제효과 측정**

<95> 제조예 1에서 수득한 백리향 추출물의 미백효과를 확인하기 위해 B16F1 멜라닌형성세포에 대한 멜라닌 생성 억제 정도를 보고 미백효과를 판단하였다. 본 실험예에 사용된 B16F1 멜라닌형성세포는 마우스에서 유래한 세포 균주이며, 멜라닌이라는 흑색색소를 분비하는 세포이다. 이 세포의 인공배양 중에 시료를 처리하여 멜라닌 흑색색소가 감소하는 정도를 비교 평가하였다. 본 실험예에 사용된 B16F1 멜라닌형성세포는 ATCC(American Type

Culture Collection)로부터 분양받아 사용하였다.

<96> B16F1 멜라닌형성세포의 멜라닌 생합성 억제효과 측정은 다음과 같이 행하였다. B16F1 멜라닌형성 세포를 6웰 플레이트에 각 웰당 2×10^6 농도로 분주하고 세포를 부착시킨 후 독성을 유발하지 않는 농도로 시료를 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 72시간 배양 후 세포를 트립신-EDTA로 떼어 낸 후 세포수를 측정하여 다음 원심분리하여 세포를 회수하였다. 세포내 멜라닌의 정량은 로탄(Lotan: Cancer Res., 40: 3345-3350, 1980)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 셀 펠릿을 PBS로 1회 세척한 후 균질화 버퍼액(50 mM 소듐 포스페이트, pH 6.8, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF) 1ml를 첨가하여 5분간 와류하여 세포를 파쇄하였다. 원심분리 (3,000 rpm, 10분)하여 얻은 세포 여액에 1N NaOH(10% DMSO)를 첨가하여 추출된 멜라닌을 용해한 후 마이크로 플레이트 판독기로 405nm에서 멜라닌의 흡광도를 측정한 다음 멜라닌을 정량하여 시료의 멜라닌 생성저해율(%)을 측정하였다. B16F1 멜라닌형성세포의 멜라닌 생성저해율(%)은 수학적 식 5에 의하여 계산하였으며, 그 값을 하기 표 6에 나타내었다. IC₅₀ 값은 멜라닌 생성을 50% 저해하는 물질의 농도이다. 백리향 추출물의 멜라닌 생성저해율 정도를 확인하기 위해 양성 대조군으로서 하이드로퀴논 및 알부틴을 사용하여 동일하게 실험하였다.

수학적 식 5

<97> 저해율 (%) = [(A-B)/A]X100

<98> A : 시료를 첨가하지 않은 웰의 멜라닌 양

<99> B : 시료를 첨가한 웰의 멜라닌 양

표 6

시료명	처리농도(%)	멜라닌 합성저해효과(IC ₅₀)
백리향 추출물(제조예 1)	0.1	0.04%
하이드로퀴논	0.1	0.03%
알부틴	0.1	0.2%

<101> 상기 표 6의 결과에서 보는 바와 같이, 본 발명의 백리향 추출물의 멜라닌 합성 저해효과(IC₅₀)는 0.04%로 나타났으며, 기존의 미백제인 알부틴보다 훨씬 우수하고, 하이드로퀴논과 유사한 효과를 나타내었다.

실함예 7: 자외선 조사에 의한 세포독성 완화 효과

<103> 본 실시예는 제조예 1에서 수득한 백리향 추출물의 자외선 조사에 의한 세포독성의 완화효과를 평가하기 위하여 실시되었다. 섬유아세포(fibroblast)를 24-웰 시험 플레이트에 1×10^5 개씩 넣고 24시간 동안 부착시켰다. 각 웰을 PBS로 1회 세척하고 각 웰에 500 μ l의 PBS를 넣었다. 이 섬유아세포에 자외선 B(UVB) 램프(Model : F15T8, UV B15W, Sankyo Denki사, Japan)를 이용하여 자외선 10mJ/cm²를 조사한 후 PBS를 덜어내고 세포배양 배지(DMEM에 10%FBS가 첨가된 것) 1ml을 첨가하였다. 여기에 평가하고자 하는 백리향 추출물을 처리한 후 24시간동안 배양하였다. 24시간이 지나면 배지를 제거하고, 각 웰당 세포배양 배지 500 μ l 배지와 MTT 용액(2.5mg/ml) 60 μ l를 넣은 후 2시간동안 37 $^{\circ}$ C CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배지를 제거하고 이소프로판올-HCl(0.04N)을 500 μ l씩 넣어주었다. 5분간 진탕하여 세포를 용해시키고 상등액 100 μ l씩을 96-웰 시험 플레이트에 옮긴 후, 마이크로플레이트 판독기를 사용해 565 nm에서 흡광도를 측정하였다. 하기 수학적 식 6에 의해 세포생존율(%)을 측정하고 자외선에 의한 세포독성 완화율은 수학적 식 7에 의하여 계산하였다.

수학적 식 6

<104> 세포생존율(%) = [(St-Bo)/(Bt-Bo)] X 100

<105> Bo : 세포배양배지 만을 발색 반응한 웰의 565 nm 흡광도

<106> Bt : 시료를 처리하지 않은 웰을 발색 반응한 웰의 565 nm 흡광도

<107> St : 시료를 처리한 웰을 발색 반응한 웰의 565 nm 흡광도

수학적 식 7

- <108> 자외선에 의한 세포독성 완화율(%) = $[1-(St-Bo)/(Bt-Bo)] \times 100$
- <109> Bo : 자외선 조사하지 않고 시료 처리하지 않은 웰의 세포 생존율
- <110> Bt : 자외선 조사하고 시료를 처리하지 않은 웰의 세포생존율
- <111> St : 자외선 조사하고 시료를 처리한 웰의 세포생존율

표 7

<112> 세포독성 완화율(%)

시료명	처리농도	세포독성 완화율(%)
백리향추출물	0.013%	45
백리향추출물	0.025%	63

<113> 상기 표 7의 결과에서 보는 바와 같이, 본 발명의 백리향 추출물은 자외선에 의한 세포 독성을 0.013% 농도에서 45% 억제하며, 0.025%에서는 63%나 억제하므로, 자외선에 의한 세포독성을 효과적으로 방어함을 알 수 있었다.

실험예 8: 자외선 조사에 의한 염증성 사이토카인 발현 억제효과

<115> 본 실시예는 제조예 1에서 수득한 백리향 추출물의 자외선 조사에 의해 발현되는 염증성 사이토카인 발현 억제 효과를 평가하기 위하여 사람의 표피조직에서 분리한 섬유아세포(Fibroblast)를 24-웰 시험 플레이트에 5×10^4 개씩 넣고 24시간 동안 부착시켰다. 각 웰을 PBS로 1회 세척하고 각 웰에 500 μ l의 PBS를 넣었다. 이 섬유아세포에 자외선(UVB) 램프(Model : F15T8, UV B 15W, Sankyo Dennki사, Japan)를 이용하여 자외선 10mJ/cm²를 조사한 후 PBS를덜어내고 세포배양 배지(DMEM에 FBS가 첨가되지 않은 배지) 350 μ l를 첨가하였다. 여기에 평가하고자 하는 백리향 추출물을 처리한 후 5시간 동안 배양하였다. 배양 상층액을 150 μ l 취하여 IL-1 α 를 정량함으로써 백리향 추출물의 염증성 사이토카인 발현억제효과를 판단하였다. IL-1 α 의 양은 효소면역분석법 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)를 이용하여 정량화하였으며, IL-1 α 의 생성율은 수학적 식 8에 의해 계산하였다.

수학적 식 8

- <116> 염증성 사이토카인 발현 억제율(%) = $[1-(St-Bo)/(Bt-Bo)] \times 100$
- <117> Bo : 자외선 조사하지 않고 시료 처리하지 않은 웰의 IL-1 α 생성량
- <118> Bt : 자외선 조사하고 시료를 처리하지 않은 웰의 IL-1 α 생성량
- <119> St : 자외선 조사하고 시료를 처리한 웰의 IL-1 α 생성량

표 8

<120>

시료명	처리농도(%)	염증성 사이토카인 발현 억제율(%)
백리향추출물	0.013%	63%
백리향추출물	0.025%	72%

<121> 상기 표 8의 결과에서 보는 바와 같이, 본 발명의 백리향 추출물은 자외선에 의한 염증성 사이토카인인 IL-1 α 의 생성을 0.013% 농도에서 58% 억제하며, 0.025%에서는 무려 72%나 억제하므로, 낮은 처리 농도에서도 자외선에 의한 염증 발생을 효과적으로 방어함을 알 수 있다.

실험예 9. 백리향 추출물을 함유하는 화장료의 피부탄력 개선효과

<123> 본 실험예는 제조예 1에서 수득한 백리향 추출물을 함유한 화장료(실시예 1)를 제조하여 사람을 대상으로 피부탄력 개선효과를 보았으며, 백리향 추출물을 함유하지 않은 화장료(비교예 1)를 제조해 비교실험을 행하여 평가하였다. 비교실험에 사용된 화장료는 크림형태이고, 그 조성은 하기 표 9에 나타낸 바와 같다. 실험자(20세-35세의 여성) 20명을 대상으로 얼굴 오른쪽 부위에는 실시예 1의 크림을 얼굴 왼쪽 부위에는 비교예 1의 크림을 각각 1일 2회씩 연속 3개월간 도포하였다.

<124> 실험완료 후 피부탄력 개선효과는 제품 사용 전과 2개월간 사용 후에 피부탄력측정기(cutometer SEM 575, C+K

Electronic Co., Germany)를 이용하여 측정하였다. 실험결과는 하기 표 10에 Cutometer SEM 575의 $\Delta R8$ 값으로 기재하였는데 R8값은 피부의 점탄성(viscoelasticity)의 성질을 나타낸다.

표 9

<125>

성분	실시예 1	비교예1
백리향 추출물	3.0	-
친유형 모노스테아린산글리세린	2.0	2.0
세테아릴알콜	2.2	2.2
스테아린산	1.5	1.5
밀납	1.0	1.0
폴리솔베이트 60	1.5	1.5
솔비탄스테아레이트	0.6	0.6
경화식물유	1.0	1.0
스쿠알란	3.0	3.0
광물유	5.0	5.0
트리옥타노인	5.0	5.0
디메치콘	1.0	1.0
소듐마그네슘실리케이트	0.1	0.1
글리세린	5.0	5.0
베타인	3.0	3.0
트리에타올아민	1.0	1.0
소듐히아루로네이트	4.0	4.0
방부제, 향, 색소	미량	미량
증류수	잔량	잔량
합계	100	100

<126>

상기 표에서 함량 단위는 중량%이다.

표 10

<127>

실험제품	피부탄력효과($\Delta R8$)
실시예 1	0.26
비교예 1	0.11

<128>

상기 표 10의 결과에서 보는 바와 같이, 백리향 추출물을 함유하지 않은 크림을 도포한 비교군에 비해 백리향 추출물을 함유한 크림을 도포한 실험자의 피부 탄력개선 효과가 2배 정도 우수함을 알 수 있다.

<129>

실험예 10. 백리향 추출물을 함유하는 화장료의 보습효과

<130>

상기 실험예 9에서 제조한 화장료 (실시예 1 및 비교예 1)의 보습력을 평가하기 위하여, 각 화장료가 도포된 피부를 대상으로 하여 수분 보유능을 다음과 같이 측정하였다.

<131>

22℃ 및 상대습도 45%의 항온 항습실에서 상기 실시예 및 비교예의 각 화장료를 24명의 피시험자 얼굴을 반으로 나누어 한쪽에는 실시예의 제품을 다른 한쪽에는 비교예의 제품을 도포하면서(2회/1일) 4주후의 수분 함유량을 측정하였다.

<132>

측정 기기는 피부의 수분 함량에 따른 피부의 전기 용량을 측정하여 보습력을 측정하는 수분 함량 측정기 (Corneometer CM825, Courage + Khazaka사, 독일연방국)를 사용하였다. 그 결과는 하기 표 11에 나타나 있다.

표 11

<133>

수분함량

사용 주수	실시예 1	비교예 1
0 Week	23.61 ± 9.34	23.44 ± 11.36

4 Week	34.61 ± 7.09	27.38 ± 5.58
4 Week-0Week	11.00 ± 2.25	3.94 ± 5.78

<134> 상기 표 11의 결과에서 보는 바와 같이, 본 발명의 백리향 추출물을 함유한 화장료 조성물(실시예 1)은 백리향 추출물을 함유하지 않은 화장료 조성물(비교예 1)에 비해 피부 보습효과가 월등히 뛰어났다.

발명의 효과

<135> 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 백리향 추출물은 항산화 효과, MMP 저해 효과, 자외선 조사에 의한 MMP 발현 조절효과, 잔주름 개선효과 등 우수한 항노화 효과와 자외선 조사 후 야기되는 피부자극을 완화시켜 주는 효과를 나타내었다. 또한, 백리향 추출물은 기미, 주근깨 및 피부 색소 침착의 원인이 되는 물질인 멜라닌 생성억제 효과 등의 미백작용을 나타내었다. 따라서, 이러한 백리향추출물을 함유하는 화장료 조성물은 항산화 효과와 함께 콜라겐 분해효소 활성 조절 효과, 피부 잔주름 개선 효과, 항염증, 미백 등 우수한 피부 개선 효과를 가짐을 알 수 있다.

<136> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.