



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월12일  
(11) 등록번호 10-1664878  
(24) 등록일자 2016년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)  
A61Q 19/02 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-0084639  
(22) 출원일자 2014년07월07일  
심사청구일자 2014년07월07일  
(65) 공개번호 10-2016-0005558  
(43) 공개일자 2016년01월15일  
(56) 선행기술조사문헌  
Asia University. 석사학위논문 “Study on the antimicrobial and antioxidation of Chinese leek” (2009.11.16.)\*  
Korea J. Aesthet. Cosmetol. 12(2):163-168(2014.04.)\*  
KFN international Symposium and Annual Meeting. P01-59 (2013.11.15.)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
주식회사 코리아나화장품  
충청남도 천안시 서북구 성거읍 삼곡2길 6  
(72) 발명자  
이지영  
대전광역시 대덕구 동춘당로 178, 109동 108호 (법동, 보람아파트)  
유영경  
충청남도 천안시 서북구 한들3로 100, 108동 903호 (백석동, 백석마을아이파크아파트)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인세신

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 **삼채 분획물을 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물**

**(57) 요약**

본 발명의 삼채(*Allium hookeri*) 분획물은 MMP-1 생성 억제 효과, 콜라겐 합성 증진 효과, 멜라닌 생성 억제효과를 갖으며, 또한 피부주름 개선효과, 피부미백효과, 피부탄력 개선효과, 피부노화 방지효과, 항산화 효과, 피부장벽 강화효과, 피부 보습효과, 방부효과를 갖는다.

(72) 발명자

**김태양**

경상남도 진주시 석갑로 58, 312동 203호 (신안  
동, 주공3차아파트)

**이강태**

충청남도 천안시 서북구 노태산로 145, 101동 140  
2호 (두정동, e편한세상 두정2차)

**이건국**

서울특별시 송파구 송파대로8길 58, 1102동 502호  
(장지동, 송파파인타운11단지)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

삼채 추출물의 노르말헥산 분획물, 염화메틸렌 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽 강화용 화장품 조성물.

#### 청구항 2

삼채 추출물의 노르말헥산 분획물, 염화메틸렌 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 피부 보습용 화장품 조성물.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 삼채 분획물은 삼채 추출물을 노르말헥산(N-hexane), 염화메틸렌(methylene chloride), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 물로 순차적으로 분획하여 얻어지는 노르말헥산 분획물, 염화메틸렌 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물인, 화장품 조성물.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 삼채 분획물은 상기 화장품 조성물의 전체 중량에 대하여 0.0001 ~ 30.0 중량% 함유되는 화장품 조성물.

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

### 발명의 설명

#### 기술분야

본 발명은 삼채 분획물을 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물에 관한 것이다.

[0001]

**배경 기술**

- [0002] 사람의 피부는 노화 과정에서 다양한 물리·화학적 변화가 일어난다. 그 원인으로는 크게 내적인 노화 (intrinsic aging)와 광노화 (photo-aging)로 구분되며 이에 관한 연구가 활발히 이루어져 왔다. 자외선, 스트레스, 질병 상태, 환경 인자, 상처, 나이가 들어감에 따라 자유라디칼이 활성화되어 야기될 수 있으며, 이런 상태가 심화될 경우 생체 내에 존재하는 항산화 방어망을 파괴하고, 세포 및 조직을 손상시켜 성인병 및 노화를 촉진하게 된다.
- [0003] 좀 더 구체적으로 말하자면, 피부의 주요 구성 물질인 지질, 단백질, 다당류 및 핵산 등이 산화되어 피부 세포 및 조직이 파괴되고, 결국 피부 노화 현상이 생겨나는 것이다.
- [0004] 특히, 단백질의 산화는 피부의 결합 조직인 콜라겐 (collagen), 히아루론산 (hyaluronic acid), 엘라스틴 (elastin), 프로테오글리칸 (proteoglycan), 피브로넥틴 (fibronectin) 등이 절단되어 심한 과다 염증 반응과 피부의 탄력에 지장을 주고 이것이 더 심해질 경우 DNA의 변이에 의해 돌연변이, 암의 유발, 면역 기능 저하의 상태에 이르게 된다.
- [0005] 그러므로 신체의 대사 과정 중 발생하는 자유라디칼이나 자외선 조사, 염증 반응에 의해 매개되어 발생하는 자유라디칼을 소거하여 세포막을 보호하고, 또 이미 손상 받은 세포는 활발한 신진 대사에 의해 재생시켜서 세포를 증식시켜야 피부는 빠르게 회복되고 건강한 피부를 유지할 수 있다.
- [0006] 노화에는 이러한 자유라디칼 뿐만 아니라 콜라겐 분해효소인 기질 금속 단백질 분해 효소 (Matrix Metalloproteinase; MMP)라는 효소도 관여한다. 즉, 생체 내에서 콜라겐과 같은 세포외기질의 합성과 분해는 적절하게 조절되나, 노화가 진행되면서 콜라겐 합성이 감소하고, 콜라겐을 분해하는 효소인 기질 금속 단백질 분해 효소(MMP)의 발현이 촉진되어 피부의 탄력이 저하되고 주름이 형성된다. 또한, 자외선 조사에 의해 이러한 분해 효소가 활성화되기도 한다.
- [0007] 그러므로, 세포 내에서 활성화가 유도되는 MMP 발현을 조절하거나 그 활성을 억제할 수 있는 물질의 개발이 요구되고 있다. 이제까지 화장품의 소재로서 사용된 원료들은 단순히 효소 활성만을 억제하는 것이 대부분이었다. 이에 세포내 자연노화와 광노화에 의해 그 발현이 유도되는 MMP 발현량 및 활성을 조절하고자 하였다.
- [0008] 한편, 색소 침착에 의한 피부 변화가 생긴다. 피부색을 결정하는 인자에는 기본적으로 인종과 지역, 성별, 나이에 따른 차이를 배제하면 기미, 주근깨와 자외선 노출로 인한 태닝과 같은, 부분 또는 전체적인 색소 침착, 그 외에 여드름 및 흉터, 각질의 분포 상태와 혈액 순환, 스트레스, 건강 상태 등이 있다. 이상의 인자들 가운데서도 가장 중요한 인자는 색소 침착이다.
- [0009] 피부색에 영향을 주는 색소로는 멜라닌, 멜라노이드, 카로틴, 헤모글로빈 등이 있는데, 이중 가장 중요한 것은 멜라닌으로서, 이 멜라닌의 생합성에 영향을 미치는 가장 큰 요인은 자외선과 체내 호르몬 분비 정도이다.
- [0010] 멜라닌은 자외선을 흡수 또는 산란시켜 자외선으로부터 피부가 손상되는 것을 방지하는데 큰 역할을 하는데, 특별한 최대 흡수 파장이 없고 전 영역의 빛을 흡수한다. 또한 활성 산소종을 제거하는 기능이 탁월하나, 때로는 멜라닌 자체가 활성 산소를 발생시키기도 하며, 멜라닌 구조 내의 카테콜이나 퀴논에 의하여 다른 물질을 환원시키거나 산화시키고, 멜라닌 자체가 자유라디칼의 성질을 나타내기도 한다.
- [0011] 멜라닌의 생합성은 아미노산의 일종인 티로신이 멜라닌 형성 세포의 멜라노솜에서 티로시나제에 의해 산화되어 디하이드록시 페닐알라닌 (dihydroxy phenylalanine)으로 전환되는 것을 시작으로 계속되는 일련의 산화 과정을 거쳐 갈색 (pheomelanin), 흑색 (eumelanin)의 중합체로 형성된다.
- [0012] 이러한 생합성 과정은 멜라노솜이라는 특수한 형태의 갈색 세포 내 소기관에서 진행되며 멜라닌 과립을 포함한 멜라노솜은 핵 주변 부위에서 수지상 돌기 끝부분으로 이동, 각질 세포의 식세포 작용에 의해 세포질 내로 이동하고 이들은 각질 세포의 핵 주변에 축적된다.
- [0013] 멜라닌의 합성과 멜라노솜의 수, 주위의 각질 세포로의 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.
- [0014] 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 화장품료로 이용되

고 있으나 화장품 제형 중에서의 안정성이 낮으므로 분해되어 착색되거나, 이취의 발생, 생체 레벨에서의 효능, 효과의 불분명 및 안전성 문제 등으로 그 사용이 제한되고 있는 실정이다. 그리고 상기한 물질들은 그 티로시나제 억제 효과가 입증되었으나 실제 생체 레벨과 유사한 실험에서는 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 화장료는 실온에서 수 주일동안 보관하면 갈변 현상이 발생한다.

[0015] 이러한 여러 가지 문제점을 해결하기 위하여, 최근 여러 화학 물질 등에 의한 피부 자극을 줄이기 위해 천연물을 사용한 화장품이 많이 개발되고 있다. 천연 재료는 피부에 부작용이 적을 뿐만 아니라, 최근 천연 재료를 이용한 화장품에 대한 소비자들의 호응이 높아짐에 따라 화장품 원료로서 개발 가치가 한층 늘어나고 있다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0016] 이에, 본 발명자들은 이제까지 알려지지 않은 여러 천연물들에 있어서 화장품으로의 응용 가능성을 연구한 결과, 백합과 식물인 삼채(삼미채, 주밋, 뿌리부추)를 선정하고 분획물을 제조하여 MMP-1 생성 억제 효과, 콜라겐 합성 증진 효과, 멜라닌 생성 억제 효과, 피부주름개선 효과, 피부미백 효과, 피부탄력 개선 효과, 피부보습효과, 방부효과 등을 측정한 결과, 그 효능이 매우 우수하므로 화장품으로의 효능을 기대할 수 있다는 것을 발견하게 되었다. 또한,

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 삼채 분획물을 함유하는 화장료 조성물을 이용하는 화장방법을 제공하는데 있다.

#### 과제의 해결 수단

[0018] 본 발명은 삼채(*Allium hookeri*) 분획물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0019] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은 피부주름 개선용이다.

[0020] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은 피부 미백용이다.

[0021] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은 피부탄력 개선용이다.

[0022] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은 피부노화 방지용이다.

[0023] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은 항산화 효과를 갖는다.

[0024] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은 피부장벽 강화효과를 갖는다.

[0025] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은 피부보습용이다.

[0026] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은 방부 효과를 갖는다.

[0027] 바람직하게는, 상기 삼채 분획물은 상기 화장료 조성물의 전체 중량에 대하여 0.0001 ~ 30.0 중량% 함유된다.

[0028] 바람직하게는, 상기 삼채 분획물은 삼채를 추출용매로 추출한 추출물을 노르말 헥산(N-hexane), 염화메틸렌(methylene chloride), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 물로 순차적으로 분획하여 얻어진다.

#### 발명의 효과

[0029] 본 발명의 삼채(*Allium hookeri*) 분획물은 MMP-1 생성 억제 효과, 콜라겐 합성 증진 효과, 멜라닌 생성 억제효과를 갖으며, 또한 피부주름 개선효과, 피부미백효과, 피부탄력 개선효과, 피부노화 방지효과, 항산화 효과, 피부장벽 강화효과, 피부 보습효과, 방부 효과(항균 효과)를 갖는다.

#### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명의 화장료 조성물 중 유효 성분으로 사용되는 삼채(삼미채, 주밋, 뿌리부추)는 영문표기가 학명으로는 *Allium hookeri*로 표기되고 있다. 백합과 과 속의 다년생초이며 8-9월경 백황색의 과와 비슷한 꽃이 핀다. 히말라야 산맥 1,400m 이상의 고랭지에서 자생하며 인도, 중국, 부탄, 스리랑카, 미얀마 등에 분포한다. 단맛, 쓴맛, 매운맛이 난다고 하여 삼채(三菜)라고 부르기도 하며, 인삼 맛이 난다고 하여 삼채(蔘菜)라고 부르기도 한다. 삼채의 잎과 뿌리에는 각각 필수 아미노산인 발린(valine), 이소류신(isoleucine), 메티오닌

(methionine), 트레오닌(threonine), 라이신(lysine), 페닐알라닌(phenylalanine), 트립토판(tryptophan), 히스티딘(histidine) 등이 함유되어 있고 비타민 A, 비타민 C, 질소, 인산, 철분, 망간, 아연 및 유허의 함유량이 높다. 특히, 삼채의 유허성분은 통상 100 g 당 3.28 mg으로서 마늘의 0.5 mg보다 6 배 많이 함유되어 있고, 특히 한국산 삼채의 경우 식이유허이 100 g 당 600 mg 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, 유허냄새 때문에 동물들도 피해한다고 하여 노지 재배시 울타리를 치지 않아도 야생동물의 피해를 받지 않는다.

- [0031] 본 발명에 있어서, 삼채 분획물은 삼채의 다양한 기관 또는 부분(예: 잎, 꽃, 뿌리, 줄기 등)으로부터 얻은 것을 의미하고, 바람직하게는 전초 또는 뿌리로부터 얻은 분획물이고, 가장 바람직하게는 전초로부터 얻은 분획물을 의미한다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 삼채를 추출용매로 추출하여 조추출물을 얻는 단계(단계 1), 상기 조추출물을 분획하는 단계(단계 2)로 얻어진다. 구체적으로 상기 조추출물을 분획하는 단계는 상기 조추출물을 노르말 헥산, 염화메틸렌, 에틸아세테이트 및 물로 순차적으로 분획하는 단계(단계 2)를 포함한다. 조추출물을 얻는 단계(단계 1)는 추출용매로 추출한다.
- [0033] 상기 추출물은 추출용매로 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 추출될 수 있다. 상기 유기용매는 C1 내지 C4의 알코올, 초산에틸, 염화메틸렌 및 클로로포름으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이들의 혼합용매이고, 바람직하게는 물 및 C1 내지 C4의 알코올의 혼합 용매로 추출하며, 보다 바람직하게는 60 내지 100%의 에탄올로 추출한다. 추출시 온도는 30℃ 내지 150℃이며, 바람직하게는 50℃ 내지 100℃이다. 추출시 시간은 30분 내지 48시간이며, 바람직하게는 1시간 내지 12시간이다. 추출방법은 초음파 추출법, 초임계 추출, 아임계 추출, 열수추출법, 상온 추출법 또는 환류추출법을 수행한다. 바람직하게는 상온 추출 또는 환류 추출법을 수행하고, 보다 바람직하게는 환류 추출법을 1 내지 20회, 바람직하게는 2 내지 10회 반복 수행한다. 본 발명의 삼채 추출물은 상기한 추출 용매뿐만 아니라, 다른 추출 용매를 이용하여도 실질적으로 동일한 효과를 나타내는 추출물이 얻어질 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 것이다.
- [0034] 또한, 본 발명의 삼채 추출물은 상술한 추출 용매에 의한 추출물뿐만 아니라, 통상적인 정제 및 발효 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 분리하거나 자연 상태나 각종 미생물을 이용한 발효산물에 의한 추출물 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 및 추출방법을 통해 얻어진 활성 분획도 본 발명의 추출물에 포함된다.
- [0035] 상기 조추출물을 분획하는 단계(단계2)는 조추출물을 얻는 단계(단계1)에서 얻어진 조추출물을 노르말 헥산(N-hexane), 염화메틸렌(methylene chloride), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 물로 극성에 따라 순차적으로 분획하는 단계를 포함한다.
- [0036] 상기 조추출물을 물에 재용해시킨 뒤 물과 동량의 노르말 헥산을 첨가하여 2~5회 분획하고 노르말 헥산층을 분리한 뒤 감압 농축하여 노르말 헥산 분획물을 제조한다. 다음으로 노르말 헥산을 제거한 후 남은 물층에 동량의 염화 메틸렌을 첨가하여 2~5회 분획하고 염화메틸렌을 분리한 뒤 감압 농축하여 염화메틸렌 분획물을 제조한다. 그 다음으로 염화메틸렌을 제거한 후 남은 물층에 동량의 에틸아세테이트를 첨가하여 2~5회 분획하고 에틸아세테이트를 제거한 뒤 감압 농축하여 에틸아세테이트 분획물을 제조한다. 남은 물층은 동결건조하여 물 분획물을 제조한다.
- [0037] 본 발명에 따르면, 상기 삼채 분획물은 화장품 조성물의 전체 중량에 대해서 0.0001 ~ 30.0 중량%함유되며, 더욱 바람직하게는, 상기 삼채 분획물은 화장품 조성물의 전체 중량에 대해서 0.01 ~ 10 중량%함유되는 것을 특징으로 한다. 상기 분획물의 함량이 0.0001 중량%미만인 경우에는 피부개선 효과가 나타나지 않으며, 30.0 중량%를 초과하는 경우에는 함유량 증가에 대한 피부 개선 효과 증대 정도가 미미하며, 제형상의 안전 및 안정성에 문제가 있으며 경제적이지도 못하다.
- [0038] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서 상기 유효 성분 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다. 본 발명의 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 팩, 마사지크림 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영

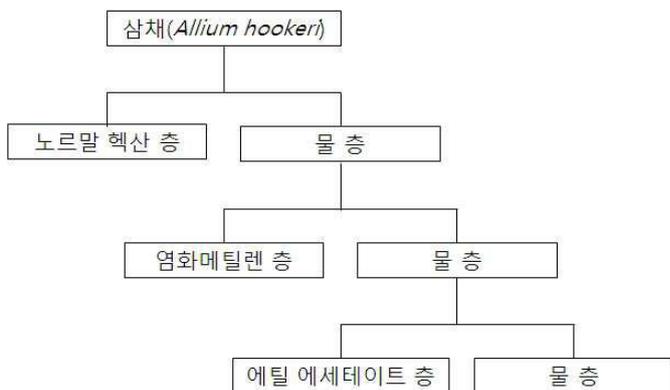
양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0039] 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 산화아연등이 이용될 수 있다. 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, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다. 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 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. 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 클로로플루오로히드록아본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다. 본 발명의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0040] 본 발명의 화장료 조성물이 비누, 계면활성제 함유 클렌징 제형 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 클렌징 폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비함유 클렌징 제형은 클렌징크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 겔이며, 이에 한정되는 것은 아니다. 한편, 본 발명의 화장 방법은 본 발명의 화장료 조성물을 이용하는 모든 화장 방법을 일컫는다. 즉, 화장료 조성물을 이용하는 당업계에 공지된 모든 방법이 본 발명의 화장 방법에 속한다. 본 발명의 화장료 조성물은 단독 또는 중복하여 사용하거나, 본 발명 이외의 다른 화장료 조성물과 중복하여 사용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 화장료 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다. 본 발명의 삼채 추출물을 포함하는 화장료 조성물을 이용하는 화장방법을 수행하면, 항염, 항균, 항산화, 보습, 피부장벽강화 강화 효과를 얻을 수 있다. 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 않는다

[0041] 이와 같은 방법으로 얻어진 분획물은, MMP-1 생성 억제 효과, 콜라겐 합성 증진 효과, 멜라닌 생성 억제 효과, 피부주름 개선효과, 피부 미백효과, 피부탄력 개선효과, 피부노화 방지효과, 피부장벽 강화효과, 항산화 효과, 방부 효과(항균 효과)가 있다.

[0042] [제조예 1 내지 4] 삼채 분획물의 제조



[0043]

[0044] 세절하여 음건한 삼채의 전초 200g을 70%(V/V) 에탄올 수용액으로 5시간씩 3회 환류 추출하고 냉침한 후 와트만(Whatman) #4 여과지로 여과하여 추출물을 얻었다. 여과하여 걸러진 여액을 감압 농축 및 동결 건조하여 41.2 g의 에탄올 추출물을 수득하였다. 상기 에탄올 추출물을 극성에 따라 분획하기 위해 유기용매를 이용한 계통적 분획을 실시하였다. 구체적으로는 상기 에탄올 추출물 20g을 물 200 mL에 다시 녹인 뒤 동량의 노르말 헥산(n-hexane)을 첨가하고 헥산층을 분리하여 헥산 분획물을 수득하였다(제조예 1). 상기 헥산 분획물을 제거한 물층에 염화메틸렌(methylene chloride)를 동량 첨가하고 염화메틸렌 층을 분리하여 염화메틸렌 분획물을 수득하였다(제조예 2). 상기 염화메틸렌 분획물을 제거한 물층에 에틸아세테이트(ethyl acetate)를 동량 첨가하고 에틸아세테이트 층을 분리하여 에틸아세테이트 분획물을 수득하였다(제조예 3). 상기 에틸 아세테이트 분획물을 제거하고 남은 물층을 동결건조하여 물 분획물을 수득하였다(제조예 4). 상기 분획과정은 상온에서 수행하였으며 각 분획을 3시간 이상 정치하였다. 각 분획물을 얻는 과정은 2회 반복 수행하였으며 물층을 제외한 분획물은 여과 후 감압농축하고 건조시켰다.

[0045] **실험예 1 : 삼채 분획물의 MMP-1 생성 억제 효과**

[0046] 본 실험예 1는 제조예 1 내지 4에서 수득한 삼채 분획물의 콜라겐 분해효소인 MMP-1 생성을 억제하는 효과를 측정하였다.

[0047] 인간 정상 피부 세포인 섬유아세포 (한국 세포주 은행, 대한민국)를 48-웰 마이크로 플레이트(Nunc, 덴마크)에 각 웰당  $1 \times 10^6$  세포가 되도록 접종하고, DMEM 배지(Sigma, 미합중국) 및 37°C의 조건에서 24시간 동안 배양한 후 상기 제조예 1 내지 4의 삼채 분획물을 첨가한 무혈청 DMEM 배지 및 대조군으로 삼채 분획물이 포함되지 않은 무혈청 DMEM 배지에서 48시간 동안 추가로 배양하였다.

[0048] 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 1에 따라 MMP-1 생성 억제율(%)을 계산하였으며, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

[0049] [수학적 식 1]

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

[0050]

**표 1**

[0051]

시료명	처리 농도	MMP-1 생성 억제율(%)			
		제조예 1	제조예 2	제조예 3	제조예 4
삼채 분획물	50ppm	37.92	38.89	40.05	25.82
	100ppm	49.50	56.14	59.48	35.75
	500ppm	69.15	79.53	81.25	59.15
	1000ppm	80.20	90.21	92.38	73.90
TGF-β	(200nM)	76.80			

[0052] 상기 표 1의 결과에서 보는 바와 같이, 본 발명의 삼채 분획물은 농도 의존적으로 MMP-1의 생성을 억제(MMP-1 활성 억제)시키며 특히 제조예 2와 3에서 효과가 우수함을 확인할 수 있었다. MMP-1 생성 억제효과가 있는 것으로 알려진 물질인 TGF-β의 농도(200nM)와 본원발명의 삼채 분획물의 농도(500ppm) 차이를 감안해도, 여러 종류의 물질이 혼합된 상태에서 상기와 같은 정도의 MMP-1 억제율을 나타낸 것은 본원발명의 삼채 분획물은 MMP-1 생성 억제 효과가 있다는 것을 보여준다.

[0053] **실험예 2 : 삼채 분획물의 콜라겐 합성 증진 효과**

[0054] 인간 정상 상피 세포인 섬유아세포를 48-웰 마이크로 플레이트에 각 웰당  $1 \times 10^6$  세포가 되도록 접종하고, DMEM 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 제조예 1 내지 4에 의해 제조된 분획물을 첨가한 무혈청 DMEM 배지 및 대조군으로 삼채 분획물이 포함되지 않은 무혈청 DMEM 배지에서 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, 이에 의해 합성된 콜라겐 양을 측정하였다. 콜라겐 생합성 증가율(%)은 하기 수학적 식 2에 따라 계산하였으며, 그 결과를 표 2에 나타내었다.

[0055] [수학적 식 2]

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

[0056]

표 2

[0057]

시료명	처리 농도	콜라겐 생합성 증가율(%)			
		제조예 1	제조예 2	제조예 3	제조예 4
삼채 분획물	5ppm	15.3	20.1	25.5	11.5
	10ppm	28.4	45.1	50.1	27.7
	25ppm	82.3	97.5	100.5	41.5
	50ppm	121.5	162.4	170.5	94.8
TGF-β	(200nM)	165.5			

[0058] 표 2에 따르면, 본 발명의 제조예 1 내지 4에 의해 제조된 삼채 분획물의 콜라겐 생합성율이 농도의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 제조예 2와 3에 의해 제조된 삼채 분획물의 효과가 우수한 것을 확인하였다.

[0059] **실험예 3 : 삼채 분획물의 B16F1 멜라닌형성세포를 이용한 멜라닌 생성 억제효과**

[0060] 본 실험예 3는 상기 제조예 1 내지 4에서 수득한 삼채 분획물의 미백 효과를 확인하기 위해 B16F1 멜라닌 형성 세포에 대한 멜라닌 생성 억제 정도를 보고 미백 효과를 판단한 것이다. 본 실험예 3에 사용된 B16F1 멜라닌 형성 세포는 마우스에서 유래한 세포주이며, 멜라닌이라는 흑색 색소를 분비하는 세포이다.

[0061] 이 세포의 인공 배양 중에 시료를 처리하여 멜라닌 흑색 색소가 감소하는 정도를 비교 평가하였다. 본 실험예에 사용된 B16F1 멜라닌 형성 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 분양받아 사용하였다.

[0062] B16F1 멜라닌 형성 세포의 멜라닌 생합성 억제 효과 측정은 다음과 같이 수행하였다.

[0063] B16F1 멜라닌 형성 세포를 6웰 플레이트에 각 웰당  $2 \times 10^5$  농도로 분주하고 세포를 부착시킨 후 독성을 유발하지 않는 농도로 제조예 1 내지 4에 따른 삼채 분획물을 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 72시간 배양 후 세포를 트립신-EDTA로 떼어낸 후 세포수를 측정하여 다음 원심분리하여 세포를 회수하였다. 세포 내 멜라닌의 정량은 로탄(Lotan: Cancer Res., 40: 3345-3350, 1980)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 셀 펠렛을 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 405 nm에서 멜라닌의 흡광도를 측정하여 다음 멜라닌을 정량하여 시료의 멜라닌 생성 저해율(%)을 측정하였다. B16F1 멜라닌 형성 세포의 멜라닌 생성 저해율(%)은 하기 수학적 식 3에 의하여 계산하였으며, 그 결과를 표 3에 기재하였다.

[0064] [수학적 식 3]

- [0065] 멜라닌 생성 저해율 (%) = [(A-B)/A]X100
- [0066] A : 시료를 첨가하지 않은 웰의 멜라닌 양
- [0067] B : 시료를 첨가한 웰의 멜라닌 양

**표 3**

시료명	처리 농도(%)	멜라닌 생성 저해효과 (%)			
		제조예 1	제조예 2	제조예 3	제조예 4
삼채 분획물	0.001	12.8	19.27	23.11	11.5
	0.005	28.4	37.89	42.16	27.7
	0.01	41.5	53.72	56.42	40.5
	0.05	51.2	74.11	77.42	48.4
알부틴	200ppm	68.25			

[0069] 상기 표 3의 결과에서 알 수 있듯이, 본 발명의 제조예 1 내지 4에 의해 제조된 정제된 삼채 분획물은 B16F1 멜라닌 형성 세포에서 멜라닌 생성을 크게 저해하는 것을 알 수 있었다.

[0070] **실험예 4 : 삼채 분획물의 항산화 효과**

[0071] 제조예 1 내지 4에서 수득한 삼채 분획물의 항산화 효과를 측정하기 위해 DPPH법을 이용하여 항산화 효과(자유라디칼 소거율)를 측정하였다. DPPH법은 DPPH(2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) 자유라디칼이라는 유리기를 사용하여 환원력에 의한 항산화 효과를 측정한다. 피검 물질(들메나무 추출물)에 의해 DPPH가 환원되어 흡광도가 감소하는 정도를 공시험액의 흡광도와 비교하여 파장 560nm에서 자유라디칼 소거율(%)을 측정한다. 사용한 시약으로서 2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl 자유라디칼(Aldrich Chem. Co., MW=618.76) 0.1 mM 용액으로서 61.88 mg을 메탄올에 용해하여 100ml로 한다.

[0072] 측정방법으로서

[0073] ① 96-웰 플레이트에 0.1 mM DPPH 용액 0.15 ml에 시료 용액 0.15ml를 가하여 빨리 교반하고 25℃에서 10분간의 배양을 개시한다.

[0074] ② 그 후 560nm에서의 흡광도 St를 측정한다.

[0075] ③ 시료 용액의 블랭크(Blank)는 상기 0.1mM DPPH 용액 대신 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 흡광도 St를 측정하는 때와 동일하게 조작하여 흡광도 So를 측정한다.

[0076] ④ 공시험은 상기 시료 용액 대신 증류수를 사용하는 것을 제외하고는 상기 흡광도 St를 측정하는 때와 동일하게 조작하여 흡광도 Bt를 측정한다.

[0077] ⑤ 공시험의 블랭크(Blank)는 상기 0.1mM DPPH 용액 대신 메탄올을 사용하고 상기 시료 용액 대신 증류수를 사용하는 것을 제외하고는 상기 흡광도 St를 측정하는 때와 동일하게 조작하여 흡광도 Bo를 측정한다.

[0078] 자유라디칼 소거율(%)의 결과는 수학적 식 3에 의하여 산출하였으며, 결과는 하기의 표 5와 같다.

[0079] [수학적 식 4]

[0080] 자유라디칼 소거율(%) = [1-((St- So) / (Bt-Bo))]x100

[0081] St : 시료용액의 자유라디칼 소거 후의 514nm에서의 흡광도

[0082] Bt : 공시험용액의 자유라디칼 소거 후의 514nm에서의 흡광도

[0083] So : 시료용액의 자유라디칼 무첨가시 반응 전의 514nm에서의 흡광도

[0084] Bo : 공시험용액의 자유라디칼 무침가시 반응 전의 514nm에서의 흡광도

표 4

시료명	SC <sub>50</sub> (%)
제조예 1	0.08
제조예 2	0.01
제조예 3	0.015
제조예 4	1.0

[0086] DPPH 자유라디칼을 50% 소거하는데 필요한 시료의 농도인 SC<sub>50</sub>을 확인한 결과 제조예 1 내지 4에서 항산화 효과를 보였으며 특히 제조예 2와 3에서 가장 우수한 효과를 보였다.

[0087] 제형예 1 내지 4 :삼채 분획물을 함유하는 화장료 조성물의 제조

[0088] 삼채 분획물을 포함하는 화장료는 제조예 1 내지 4의 삼채 분획물을 각각 포함하도록 제조하였으며, 효능의 비교를 위해 삼채 분획물 대신에 보습제로서 글리세린 및 1,3-부틸렌글리콜을 포함하는 화장료 조성물(비교제형예 1), 아데노신을 포함하는 화장료 조성물(비교제형예 2), 분획물이나 보습제를 모두 포함하지 않는 화장료 조성물(비교제형예 3) 및 세라마이드를 포함하는 화장료 조성물(비교제형예 4)를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

구분	성분	제형예 1	제형예 2	제형예 3	제형예 4	비교 제형예 1	비교 제형예 2	비교 제형예 3	비교 제형예 4
A	제조예 1	2.0	-	-	-	-	-	-	-
	제조예 2	-	2.0	-	-	-	-	-	-
	제조예 3	-	-	2.0	-	-	-	-	-
	제조예 4	-	-	-	2.0	-	-	-	-
	아데노신	-	-	-	-	-	3	-	-
	글리세린	-	-	-	-	5	-	-	-
	1,3-부틸렌글리콜	-	-	-	-	5	-	-	-
	세라마이드	-	-	-	-	-	-	-	0.5
EDTA-2Na	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	
정제수	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	
B	세토스테아릴알코올	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
	글리세릴스테아레이트	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
	마이크로크리스탈린	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
	스쿠알란	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	유동파라핀	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
	트리옥타노인	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	폴리솔베이트	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
	솔비탄스테아레이트	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	토코페릴아세테이트	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	사이클로메치콘	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
BHT	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	
C	향, 방부제	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량

[0090] 실험예 5 : 삼채 분획물의 피부 주름 개선효과

[0091] 본 발명의 삼채 분획물을 함유하는 화장료의 피부 주름 개선효과에 대한 임상실험을 실시하였다. 임상시험은 각 화장료의 실제 사용 테스트를 통하여 평가하였다.

[0092] 즉, 임상실험은 상기 표 6의 제조예 1 내지 4의 삼채 분획물을 함유하고 있는 제형예 1 내지 4와 삼채 분획물 대신에 보습제로서 글리세린 및 1,3-부틸렌글리콜을 포함하는 비교제형예 1의 화장료 조성물을 사람을 대상으로 화장료의 사용으로 인한 피부 주름 개선효과를 확인 및 비교 평가하였다.

[0093] 실험자(35세 - 50세의 여성) 120명의 여성을 대상으로 실험군을 각각 20명씩 삼채 분획물 대신에 보습제로서 글리세린 및 1,3-부틸렌글리콜을 포함하는 화장료 조성물(비교제형예 1) 처리군, 삼채 분획물을 아데노신 3%(v/v)로 대체한 크림(비교제형예 2) 처리군, 삼채 분획물을 포함하는 제형예 1 내지 4의 실험군의 6 그룹으로 나누고, 얼굴 양쪽 면을 사용하여 6주 후의 주름 개선 효과를 육안으로 평가하여 주름 개선 정도를 확인하였다. 이 평가를 토대 한 주름 개선 효과 결과는 하기의 표 7에 나타내었다.

[0094] 실험 완료 후 피부 주름 개선 효과는 제품 사용 전과 3개월간 사용 후의 각 피검자의 주름 개선 효과를 숙련된 의사의 육안 관찰 및 기기측정(cutometer SEM 575, C+K Electronic Co., Germany)을 통하여 평가하였으며, 실험 결과는 하기의 표 6에 나타낸 바와 같다.

표 6

	주름 개선 효과			유효율(%)
	우수	약간	없음	
제형예 1	12	2	6	70.0
제형예 2	14	4	2	90.0
제형예 3	15	3	2	90.0
제형예 4	9	6	7	65
비교제형예 1	3	3	14	30.0
비교제형예 2	14	2	3	85

[0096] 상기 표 6의 결과에서도 알 수 있듯이, 본 발명의 삼채 분획물을 함유한 제형예 1 내지 4의 화장료 조성물은 주름개선 효과를 보였으며 특히 제형예 2와 3은 보습제를 함유하는 비교제형예 1에 비하여 약 3.0배 높은 주름개선 효과를 보여주었다.

[0097] 또한, 삼채 분획물 대신 주름 개선 효과가 있는 것으로 알려진 아데노신을 함유하는 비교 제형예 2의 화장료와 유사한 결과가 나타나, 삼채 분획물이 우수한 주름 개선 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0098] **실험예 6 : 피부 탄력 개선 효과 측정**

[0099] 본 실험예 6은 제조예 1 내지 4에서 수득한 삼채 분획물을 포함하는 제형예 및 비교제형예에 따른 화장료 조성물의 피부 탄력 개선 효과를 알아보기 위하여, 30~40대의 탄력이 감소한 여성 75명을 대상으로 측정하였다. 15명씩 5개 그룹으로 나누는 뒤, 1 그룹에는 제형예 1을, 2그룹에는 제형예 2를, 3그룹에는 제형예 3을, 4그룹에는 제형예 4를 그리고 5그룹에는 비교제형예 1을 안면에 매일 아침, 저녁으로 2회씩 12주간 도포하게 한 후, 12주 후 피부 탄력을 측정하였다. 얼굴 부위의 탄력을 cutometer SEM575 (MPA 580, Courage+Khazaka GmbH, Germany)를 이용하여 측정하였으며, 피부 탄력을 나타내는 R2(biological elasticity)를 도포 전과 도포 후를 측정 한 뒤 개선도(%)로 평가하였다. 그 결과는 하기 표 8에 나타내었으며, 결과는 각 군에 대한 개선도의 평균치이다.

표 7

실험제품	피부 탄력 개선도(%)
제형예1	15.7
제형예2	24.8
제형예3	25.4
제형예4	13.4
비교제형예1	4.7

[0101] 상기 표 7에 나타난 바와 같이, 삼채 분획물이 함유된 제형예 1 내지 4는 비교제형예 1에 비하여 피부 탄력이

매우 향상됨을 알 수 있었다.

[0102] **실험예 7 : 피부장벽 강화효과 (TEWL)**

[0103] TEWL (Trans-Epidermal Water Loss)은 피부를 통해 증발되는 수분(땀은 제외)을 나타내는 지표로 각질층의 손상 정도와 피부장벽 기능을 평가하는데 이용된다. 높은 수준의 TEWL은 피부장벽이 손상됐다는 것을 나타낸다. TEWL의 측정온도는 항온 (22℃) 및 항습 (47%) 상태에서 이루어졌으며 단위는 g/h/m<sup>2</sup>이다. 측정방법은 다음과 같다: 우선, 테이프-스트리핑(tape-stripping)을 30회 실시하여 피부장벽의 손상을 유발시켰다. 피부장벽의 손상을 유발한 후 시험 제품을 도포하기 전 TEWL 수치를 Tewameter TM210 (Courage+Khazaka, 독일국)을 사용하여 측정하였다. 손상된 피부에 표 5의 제형예 1 내지 4와 비교제형예 3 및 4을 1일 2회씩 3일 동안 도포한 뒤 TEWL 수치의 변화를 측정하여 수학적 식 5에 따라 경피수분 손실의 회복도를 측정하였다. 그 결과는 표 8에 나타내었다.

[0104] [수학적 식 5]

[0105] 
$$\text{경피 수분손실회복도(\%)} = (\text{TEWL immediately after disturbance} - \text{TEWL at indicated time}) / (\text{TEWL immediately after disturbance} - \text{baseline TEWL}) \times 100$$

**표 8**

[0106]

시료명	TEWL값			TEWL 회복도(%)
	스트리핑 전	스트리핑 후	도포 3일후	
제형예 1	6.9	19.2	9.1	79.1
제형예 2	7.5	18.2	7.9	96.3
제형예 3	7.2	19.6	7.5	97.6
제형예 4	7.0	19.5	8.5	76.0
비교제형예 3	7.0	19.7	15.8	30.7
비교제형예 4	6.8	18.9	7.1	97.5

[0107] 표 8와 같이 삼채 분획물을 함유하는 제형예 1 내지 4와 세라마이드를 함유하는 비교제형예 4, 유효성분을 포함하지 않는 비교제형예 3을 피부에 도포한 후 TEWL을 측정하여 피부장벽 강화 효과를 확인한 결과, 염화메틸렌, 에틸 아세테이트 분획물을 함유한 제형예 2와 제형예 3에서 특히 우수한 효과를 보였으며 세라마이드를 함유하는 비교제형예 4와 유사한 효과를 보였다.

[0108] **실험예 8 : 삼채 분획물의 보습효과**

[0109] 상기 제형예의 화장료 조성물에 대한 임상 보습효과를 다음과 같이 측정하였다. 설문 조사를 통하여 피부가 건조하다고 느끼는 건강한 남녀 105명을 무작위로 15명씩 7개 그룹(A, B, C, D, E, F)으로 나눈 후, A, B, C, D 그룹에는 하기의 제형예의 화장료 조성물을, E 그룹에는 각각 삼채 분획물 대신에 보습제로서 글리세린 및 1,3-부틸렌글리콜을 포함하는 제형(비교제형예 1)을, F 그룹에는 별도의 보습제를 포함하지 않는 제형(비교제형예 3)을 각각 1일 2회씩 4주간 안면에 도포하게 하였다. 보습효과는 실사용 시험 시작 후 매 2주간, 그리고 종료 후의 개선 효과를 Corneometer CM820 (Courage + Khazaka, Germany)를 이용하여 평가하였다. 그 결과는 하기의 표 9에 나타내었다.

**표 9**

[0110]

구분	사용 전	사용 2주 후	사용 4주 후
제형예 1	29.15	44.15	51.12
제형예 2	28.98	45.19	53.89
제형예 3	30.81	37.18	54.19

제형예 4	31.11	43.15	49.45
비교제형예 1	30.3	42.1	50.9
비교제형예 3	28.5	29.4	28.9

[0111] 실험예 9: 삼채 추출물의 방부 효과

[0112] 삼채 추출물의 방부 효과를 알아보기 위해, 하기 표 10의 조성으로 제조예 1, 2, 3의 삼채 추출물을 다양한 함량비로 함유하는 제형예 5-12의 화장료, 삼채 추출물 대신 정제수를 함유한 비교제형예 5의 화장료 및 삼채 추출물 대신에 방부제로 메칠과라벤과 이미다졸리디닐우레탄을 함유하는 비교제형예 6의 화장료를 제조하였다.

표 10

[0113]

성분	제형예										비교제형예	
	5	6	7	8	9	10	11	12	5	6		
	함량 (단위: 중량%)											
삼채 분획물 (제조예 1)	0.5	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
삼채 분획물 (제조예 2)	-	-	0.5	1.0	-	-	-	-	-	-		
삼채 분획물 (제조예 3)	-	-	-	-	0.5	1.0	-	-	-	-		
삼채 분획물 (제조예 4)	-	-	-	-	-	-	0.5	1.0	-	-		
글리세린	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0		
부틸렌글리콜	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0		
프로필렌글리콜	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0		
EDTA-2Na	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02		
폴리소르베이트 60	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
글리세릴스테아레이트	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5		
밀납	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0		
마카데미아넛 오일	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0		
스쿠알란	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0		
향료	미량	미량	미량	미량	미량	미량	미량	미량	미량	미량		
메칠과라벤	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2		
이미다졸리디닐우레아	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2		
정제수	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100		

[0114] 상기 표 10의 제형예 및 비교제형예의 화장료를 이용하여 박테리아 및 곰팡이에 대한 방부 효과를 측정하였다.

[0115] 먼저, 박테리아의 경우 상기 제형예 5 내지 12의 화장료 및 비교제형예 5, 6의 화장료 20-30 g에 대장균 (*Escherichia coli* ; ATCC 8739), 슈도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa* ; ATCC9027) 및 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus* ; ATCC6538)의 혼합 균액을 시료당 초기 농도가 10<sup>7</sup> cfu/g 되도록 첨가 혼합하였다. 이들을 30-32℃ 항온조에서 4주간 배양하면서 1, 7, 14, 21 및 28일 간격으로 각 화장료를 1 g씩 취하여 생균수를 측정하였다. 측정결과는 하기의 표 11에 나타내었다.

[0116] 다음으로 곰팡이의 경우에는, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans* ; ATCC10231), 페니실리움 씨트리눔(*Penicillium citrinum* ; KCTC2123) 및 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger* ; ATCC16404)의 혼합균액을 시료당 10<sup>7</sup> cfu/g이 되도록 첨가 혼합한 후 25℃ 항온조에서 배양하면서 7일 간격으로 변취 유무와 시료표면의 균사 및 포자발생 유무를 관찰하여, 그 결과를 하기의 표 11에 나타내었다.

표 11

[0117]

화장료	박테리아(cfu/g)						곰팡이*
	초기균수	1일차	7일차	14일차	21일차	28일차	

제형예 5	$1 \times 10^7$	600000	25000	5000	500	<100	-
제형예 6	$1 \times 10^7$	310000	4000	500	<100	<100	-
제형예 7	$1 \times 10^7$	650000	31000	8000	600	<100	-
제형예 8	$1 \times 10^7$	360000	5000	650	200	<100	-
제형예 9	$1 \times 10^7$	690000	38000	7000	950	<100	-
제형예 10	$1 \times 10^7$	390000	6500	810	400	<100	-
제형예 11	$1 \times 10^7$	710000	100000	80000	25000	1200	-
제형예 12	$1 \times 10^7$	580000	13000	5000	900	<100	-
비교제형예 5	$1 \times 10^7$	8500000	8000000	7400000	6300000	5900000	+++
비교제형예 6	$1 \times 10^7$	350000	7000	800	<100	<100	-

[0118] - : 8주간 변취 및 균사와 포자 발생이 없고 양호

[0119] + : 4 주 이내에 기벽이나 뚜껑에 곰팡이 발생

[0120] ++ : 4 주 이내에 변취 및 표면 일부에 곰팡이 발생

[0121] +++ : 4 주 이내에 변취 및 표면 전체에 곰팡이 발생

[0122] 상기 표 11에서 보는 바와 같이, 방부제를 사용하지 않은 비교예 5의 화장료 조성물은 4주 이내에 변취 및 표면 전체에 곰팡이가 발생하고, 1일만 지나도 박테리아 균이 현저하게 증가하는 것을 알 수 있다. 그러나 본 발명의 삼채 추출물을 함유하는 제형예 5 내지 제형예 12의 화장료 조성물은 박테리아 및 곰팡이에 대해 농도-의존적으로 방부효과를 나타내었으며, 약 28일이 경과한 후에는 2.0%(w/v)의 함량으로 사용했을 때 방부제인 메칠파라벤과 이미다졸리디닐우레아를 혼합한 비교제형예 6과 유사하거나 더 우수한 방부력이 확보되었고, 배양일 전체로 판단했을 때에도 2.0% 이상의 함량으로 사용했을 때 방부제인 메칠파라벤과 이미다졸리디닐우레아를 혼합한 비교제형예 6에 비해 훨씬 우수한 방부력이 확보됨을 알 수 있었다. 특히 제조예 1와 2로 제조된 삼채 추출물이 보다 방부력이 뛰어난 것을 확인 할 수 있었다.

[0123] 상기 표 11에 나타난 바와 같이, 일반 다른 보습제를 함유한 비교제형예 1와 비교하여도 본 발명의 삼채 분획물을 함유한 제형예 1 내지 4의 보습효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

[0124] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.