



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월03일
 (11) 등록번호 10-1885195
 (24) 등록일자 2018년07월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 8/97 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)
 A61Q 19/02 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
 A61K 8/97 (2013.01)
 A61Q 19/00 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2016-0129510
 (22) 출원일자 2016년10월07일
 심사청구일자 2016년10월07일
 (65) 공개번호 10-2018-0038639
 (43) 공개일자 2018년04월17일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020140024877 A*
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자
 주식회사 코리아나화장품
 충청남도 천안시 서북구 성거읍 삼곡2길 6
 (72) 발명자
 장선미
 경기도 안양시 만안구 박달로 403, 104동 301호(박달동, 한일유엔아이아파트)
 이광식
 충청남도 천안시 서북구 충무로 124-25, 114동 704호 (쌍용동, 현대아이파크홈타운)
 이건국
 서울특별시 송파구 송파대로8길 58, 1102동 502호(장지동, 송파파인타운11단지)
 (74) 대리인
 특허법인세신

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **목서 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물**

(57) 요약

본 발명은 목서 발효추출물 포함하는 화장료 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 목서 발효추출물은 항산화, 항염, 콜라겐 합성 촉진, 피부 주름 개선, 보습, 미백, 피부 장벽 개선으로 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61Q 19/02 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
A61K 2800/85 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020090081721 A*
KR1020150010778 A*
JP10114671 A
KR1020070002718 A
KR1020160075056 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

목서(*Osmanthus fragrans*)의 꽃부위를 에탄올로 추출한 후 비피도박테리움으로 발효시킨 목서 발효추출물을 함유하는 화장료 조성물로서,

상기 화장료 조성물은 항산화 효과, 항염증 효과, 피부 주름 개선 효과, 피부 미백 효과, 피부 보습 효과 및 피부 장벽 개선 효과로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 효과를 갖는 것인, 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 목서 발효추출물은 화장료 조성물 총 중량에 대해 0.0001 내지 30.0 중량% 첨가되는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화장료 조성물은, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 화장료 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 목서 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 피부노화는 자외선, 스트레스, 질병상태, 환경인자, 상처, 나이가 들어감에 따라 활성산소종이 활성화되어 야기 될 수 있다. 이런 상태가 심화되면, 생체 내에 존재하는 항산화 방어망이 파괴되고, 세포 및 조직이 손상되어 피부 노화가 촉진되게 된다. 구체적으로 설명하면, 피부의 주요 구성물질인 지질, 단백질, 다당류 및 핵산 등이 산화되어 피부 세포 및 조직이 파괴되고, 결국 피부노화 현상이 생겨나는 것이다. 단백질의 산화는 피부 결합조직인 콜라겐, 히알루론산, 엘라스틴, 프로테오글라이칸, 피브로넥틴 등을 절단시켜 심한 과다 염증반응을 일으키고, 피부 탄력에 영향을 주게 된다. 더 심해질 경우 DNA의 변이에 의해 돌연변이, 암의 유발, 면역기능 저하의 사태에 이르게 된다.
- [0003] 그러므로 신체의 대사 과정 중 발생하는 활성산소종이나 자외선 조사, 염증반응에 의해 매개되는 활성산소종을 소거하여 세포막을 보호하고, 이미 손상 받은 세포는 활발한 신진대사에 의해 재생시켜서 세포를 증식시켜야 피부가 회복되고 건강한 피부를 유지할 수 있다.
- [0004] 한편, 최근에는 여러 화학물질 등에 의한 피부 자극을 줄이기 위해 천연물을 사용한 화장품이 많이 개발되고 있다. 천연 재료는 피부에 부작용이 적을 뿐 아니라, 최근 천연 재료를 이용한 화장품에 대한 소비자들의 호응이 높아짐에 따라 화장품 원료로서 개발가치가 한층 늘어나고 있다.
- [0005] 본 발명자들은 여러 천연물들에 있어서 화장품으로의 응용 가능성을 연구한 결과, 목서 발효추출물에서 항산화, 항염증, 콜라겐 합성 촉진, 피부 주름 개선, 보습, 미백, 피부 장벽 개선 효과를 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0006] 한국 공개특허 제10-2015-0010778호는 오스만투스속 식물의 추출물을 포함하는 스킨 케어 조성물의 섬유아세포 붕괴를 감소 효과 등에 대하여 개시되어 있다. 한국 공개특허 제10-2014-0024877호는 *Osmanthus fragrans* 등의 식물 추출물의 항산화 효과, 티로시나제 억제 효과, 콜라겐 합성 효과 등에 대하여 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 피부 화장료에 적용이 가능하고 인체에 무해하여 안전성이 매우 뛰어난 목서 발효추출물을 유효 성분으로 하고 항산화, 항염, 콜라겐 합성 촉진, 피부 주름 개선, 보습, 피부 장벽 개선효과를 가지는 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 목서(*Osmanthus fragrans*) 발효추출물을 함유하는 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [0009] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은, 항산화용일 수 있다.
- [0010] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은, 항염증용일 수 있다.
- [0011] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은, 피부 주름 개선용일 수 있다.
- [0012] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은, 미백용일 수 있다.
- [0013] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은, 피부 보습용일 수 있다.
- [0014] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은, 피부 장벽 개선용일 수 있다.
- [0015] 바람직하게는, 상기 목서 발효추출물은, 목서 추출물을 유산균으로서 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)을 이용하여 발효시켜 얻은 것일 수 있다.
- [0016] 바람직하게는, 상기 목서 발효추출물은 화장료 조성물 총 중량에 대해 0.0001 내지 30.0 중량% 첨가될 수 있다.
- [0017] 바람직하게는, 상기 화장료 조성물은, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 피부 화장료에 적용이 가능하고 인체에 무해하여 안전성이 매우 뛰어난 천연추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 목서 발효추출물 및 이를 유효성분으로 하고 항산화, 항염, 콜라겐 합성 촉진, 피부 주름 개선, 보습, 미백, 피부 장벽 개선 효과를 가지는 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명자들은 다수의 천연물을 원료로 하여 다양한 추출방법으로 추출물을 제조하였고, 항산화, 항염, 콜라겐 합성 촉진, 피부 주름 개선, 보습, 피부 장벽 개선 효과 등의 효과가 우수한 물질을 선별하는 연구를 수행하였다. 그 결과, 목서 발효추출물이 상술한 본 발명의 목적에 가장 부합된다는 사실을 발견하게 되었다.

[0021] 목서(*Osmanthus fragrans*)는 쌍떡잎식물 용담목 물푸레나무과의 상록 대관목에 속하고 중국이 원산지로서 한국에서는 남부 지역에 서식하고 있다. 목서꽃은 2가화로 10월쯤 겨울에 피는 꽃으로도 잘 알려져 있으며, 향기가 약하지만 그윽한 향기가 나는 것이 특징이다.

[0022] 본 발명의 화장료 조성물은 목서 발효추출물을 포함하며, 뛰어난 항산화, 항염, 콜라겐 합성 촉진, 피부 주름 개선, 보습, 미백, 피부 장벽 개선 효과를 나타낸다.

[0023] 본 발명에서 목서 추출물은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라, 제조될 수 있다. 구체적으로 목서를 건조 및 분쇄한 후, 통상적인 온도와 압력의 조건하에서, 통상적인 용매를 사용하여 제조될 수 있다. 구체적으로는, 목서 추출물은 물, 탄수소 1~4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 사용하여 추출하거나 목서의 꽃, 열매, 잎 또는 줄기를 상기 용매를 이용하여 추출한 후, 이를 혼합하여 제조할 수 있다.

[0024] 상기 용매로는 알코올이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 에탄올이다. 이때, 에탄올은 바람직하게 70% 에탄올이다. 상기 추출 용매의 적합한 양은 목서 건조물 중량의 1 내지 15배이며, 더욱 바람직하게는 5 내지 10배이며, 가장 바람직하게는 약 7배이다.

[0025] 한편, 본 발명의 목서 추출물은 상술한 용매 추출법에 의한 추출물뿐만 아니라, 통상적인 정제 과정을 거친 추출물도 포함한다. 예컨대, 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 분획도 본 발명의 목서 추출물에 포함된다고 해석된다.

[0026] 또한, 본 발명의 목서 추출물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조될 수도 있다.

[0027] 목서 발효추출물은 상기 목서 추출물을 유산균류로 이루어진 균에서 선택되는 1종 이상으로 발효시켜 제조될 수 있으며, 구체적으로는 다음의 방법으로 제조할 수 있다. 먼저, 목서 추출물에 탄소원으로 포도당 1~5 중량%를 첨가하고, 디포타슘 포스페이트를 추가로 첨가하여 멸균할 수 있다. 여기에 10g/L이 되도록 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 균주 배양액을 접종하여 배양할 수 있다. 배양은 5L 발효조를 이용하여 1 내지 7일간, 20 내지 40℃에서 pH 5~7로 유지하며 배양할 수 있다. 배양 후 배양액을 원심분리하여 배양균을 1차 제거 후 더 이상 배양이 되지 않도록 멸균(121℃, 15분, 1.5기압)하였다.

[0028] 발효 후 배양균을 1차 제거한 목서 발효물을 최종 70%(V/V) 에탄올 수용액이 되도록 에탄올을 첨가하여 환류추출하고 냉침한 후, 여과할 수 있다. 여과가 완료되면 상기 추출단계에서 얻어진 추출액을 농축조로 이송하여 50℃ 이하에서 감압농축 또는 동결 건조하여 본 발명의 목서 발효추출물을 제조할 수 있다.

[0029] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 화장료 조성물에 첨가되는 목서 발효추출물은 화장료 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 30.0 중량%이며, 바람직하게는 0.001 내지 25.0 중량%이며, 가장 바람직하게는 0.1 내지 20.0 중량%로 포함될 수 있다. 상기 목서 발효추출물의 함량이 0.0001 중량% 미만인 경우에는 항산화, 항염, 콜라겐 합성 촉진, 피부 주름 개선, 보습, 미백, 피부 장벽 개선효과가 미미하다.

[0030] 한편, 본 발명의 화장료 조성물은 유효 성분으로서 상기 목서 발효추출물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0031] 한편, 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 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 있다. 다만, 이에 반드시 한정되는 것은 아니다. 더욱 상세하게는, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0032] 본 발명의 화장료 조성물의 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.

[0033] 또한, 본 발명의 화장료 조성물의 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.

[0034] 또한, 본 발명의 화장료 조성물의 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-부틸글리콜오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0035] 또한, 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 예특실하이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 계면활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0037] 한편, 본 발명의 목서 발효추출물은 항산화 효과, 항염 효과, 콜라겐 합성 효과 및 피부 미백 효과를 나타낸다. 또한, 이러한 효과를 갖는 목서 발효추출물을 유효성분으로 함유하여 제조한 화장료 조성물의 경우, 피부 보습 개선 효과, 피부 장벽 개선 효과가 뛰어난 것으로 나타났다.

[0038] 이하, 본 발명의 내용을 하기 제조예를 통하여 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 하기 제조예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 권리범위가 하기 제조예에만 한정되는 것은 아니다.

[0040] **[제조예 1의 제조 : 목서 발효추출물의 제조]**

[0041] 목서의 꽃부위를 정제수로 세척하고 건조한 다음 모두 분쇄한 후 100메시의 체를 이용하여 미세하게 만들었다. 목서 분쇄물을 100g/L가 되도록 70% 에탄올을 첨가하여 5시간씩 3회 환류추출하고 냉침한 후, 와트만(whatman) #3 여과지로 여과 후, 50℃ 이하에서 감압농축 및 동결 건조하여 목서 추출물을 제조하였다.

[0042] 제조된 목서 추출물을 10g/L 되게 유산균 배양액에 첨가하였다. 여기에 탄소원으로 글루코스, pH 조절제로 디포타슘 포스페이트를 첨가하였다. 이때 사용한 유산균은 비피도박테리움을 사용하였으며, 배양액당 50,000 cfu/L로 첨가하였다. 배양은 5L 발효조를 이용하여 7일간, 37℃, pH 5-7로 유지하며 배양하였다. 배양 후 배양액을 원심분리하여 배양균을 1차 제거 후 더 이상 배양이 되지 않도록 멸균(121℃, 15분, 1.5기압)하였다.

[0044] **[비교제조예 1의 제조 : 목서 추출물의 제조]**

[0045] 목서 발효추출물의 비교예로서 목서 추출물을 제조하였다. 목서의 꽃부위를 정제수로 세척하고 건조한 다음 모두 분쇄한 후 100메시의 체를 이용하여 미세하게 만들었다. 목서 분쇄물을 100g/L가 되도록 70% 에탄올을 첨가하여 5시간씩 3회 환류추출하고 냉침한 후, 와트만(whatman) #3 여과지로 여과 후, 50℃ 이하에서 감압농축 및 동결 건조하여 목서 추출물을 제조하였다.

[0047] **[실험예 1: 목서 추출물과 목서 발효추출물의 DPPH법을 이용한 항산화 평가]**

[0048] 상기 제조예 1과 비교제조예 1에서 수득한 목서 발효추출물과 목서 추출물의 농도별(31.5, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/ml) 자유라디칼 소거 활성(free radical scavenging activity)을 평가하였다.

[0049] DPPH 측정법은 억제제(inhibitor)가 안정한 라디칼 DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical)를 소거하여 탈색되는 정도를 540 nm에서 흡광도를 측정하는 방법이다. 사용한 시료는 하기 표 1에 나타내었으며, 하기 수학적 식 1을 이용하여 자유라디칼 소거활성을 측정하였다. 대조군은 에피갈로카테킨 갈레이트(EGCG, Epigallocatechin gallate)로 하였다.

표 1

[0050]	재료	대조군	Blank of C	Exp. Group	Blank of E
A	DPPH(MeOH)	180	(180)	180	(180)
B	샘플(용매)	(20)	(20)	20	20

수학적 식 1

$$\text{소거활성(\%)} = \frac{(C-D)-(A-B)}{C-D} \times 100$$

[0051]

[0052] A: Abs of experimental group

[0053] B: Abs blank of experimental group

[0054] C: Abs of control group

[0055] D: Abs of blank of control group

표 2

자유라디칼 소거활성

[0056]

	제조예1	비교제조예1	EGCG
25uM	-	-	54.34
0.001wt%	40.55	20.93	-
0.002wt%	69.25	34.09	-
0.005wt%	85.49	43.12	-
0.01wt%	94.78	58.09	-

[0057] 상기 표 2에서 나타난 바와 같이, 목서 발효추출이 목서 추출물에 비하여 자유라디칼 소거활성이 우수하였다. 따라서 본 발명의 목서 발효추출물이 목서 추출물에 비해 항산화 효과가 우수하다는 것을 확인하였다.

[0059] [실험예 2: 목서 추출물과 목서 발효추출물의 세포 생존율 평가]

[0060] 상기 제조예 1과 비교제조예 1에서 수득한 목서 발효추출물과 목서 추출물이 세포에 미치는 독성을 측정하였다. 세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosmann의 방법을 변형하여 실시하였다.

[0061] HDF를 96-웰 플레이트에 1×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 37℃, 5% CO₂에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 시료를 농도별로 처리한 배지에 24 시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 PBS(Phosphate buffered saline) 두 번씩 세척하였다. MTT를 5 mg/mL로 PBS에 녹여 50 μL 첨가하고 37℃, 5%의 CO₂에서 2 시간 동안 배양하였다. DMSO를 한 웰(well) 당 100 μL 넣고 10분 동안 교반한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0062] 측정 결과를 아래 표 3에 나타내었다. 표 3을 보면, 각 시료의 모든 농도에서 세포 독성은 나타나지 않았다. 이로부터 본 발명의 목서 발효추출물은 인체에 무해하며 안전성이 매우 우수함을 확인할 수 있었다.

표 3

[0063]

세포 생존율(%)

시료명	처리농도(PPM)	세포생존율(%)
제조예 1	50	101.8
	100	102.3
비교제조예 1	50	99.8
	100	100.2

[0065] [실험예 3: 목서 추출물과 목서 발효추출물의 항염 평가(5-Lipoxygenase 저해)]

[0066] 제조예 1의 목서 발효추출물과 비교제조예 1의 목서 추출물에 대하여 5-리폭시게나제(5-Lipoxygenase) 저해 활성 실험을 하여 항염 효과를 평가하고자 하였다.

[0067] 리폭시게나제는 아라키돈산(arachidonic acid)으로부터 생체내 염증반응이나 알레르기 반응 등에 관여하는 다양한 화학적인 매개체 역할을 하는 여러 물질들을 생성한다. 따라서 리폭시게나제를 저해하는 물질은 각종 화학적 매개체(chemical mediators)의 생성을 억제하는 결과를 가져오게 되므로 알레르기에 유효할 것이라고 추정할 수 있다. 리폭시게나제의 활성정도는 기질과 효소를 이용하여 과산화물 생성정도로 측정하는 실험이다.

[0068] 사용한 시료는 하기 표 4와 같이 시험하여 상기 수화식 2를 이용하여 5-리폭시게나제 저해 활성을 측정하였다. 대조군은 노르디히드로구아아아레트산(NDGA, Nordihydroguaiaretic acid)로 하였다.

수화식 2

$$\text{저해활성율(\%)} = \frac{1-(A-B)}{(C-D)}$$

[0069]

[0070] A : Abs of experimental group

[0071] B : Abs blank of experimental group

[0072] C : Abs of control group

[0073] D : Abs of blank of control group

표 4

[0074]

	재료	대조군	Blank of C	Exp. Group	Blank of E
A	완충용액	2ml	2ml	2ml	2ml
B	Sample(용매)	(20ul)	(20ul)	20ul	20ul
C	효소(Enzyme)	40ul	-	40ul	-
D	기질(Substrate)	70ul	70ul	70ul	70ul

표 5

[0075]

	제조예1	비교제조예1	NDGA
250nM	-	-	51.55
0.001wt%	32.18	13.24	-
0.002wt%	38.14	15.74	-
0.005wt%	59.33	19.46	-
0.01wt%	64.43	25.31	-

[0076] 상기 표 5의 결과에서 보는 바와 같이, 목서 발효추출물이 목서 추출물에 비하여 5-리폭시게나제 저해능이 우수하였다. 일반적으로 5-리폭시게나제 저해능이 높을수록 항염 효과가 있으므로, 상기의 결과는 목서 발효추출물이 일반 목서 추출물에 비해 항염 효과가 높다는 것을 확인시켜 준 것이다.

[0078] [실험예 4: 목서 추출물과 목서 발효추출물의 콜라겐 합성량 평가]

[0079] 상기 제조예 1과 비교제조예 1에서 수득한 목서 발효추출물과 목서 추출물의 콜라겐 생합성 증가율을 평가하였다.

[0080] HDF를 24-웰 플레이트에 5×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 37°C, 5% CO₂에서 24 시간 동안 배양하였다. 상기 제조예 1과 비교제조예 1에 의해 제조된 추출물을 첨가한 무혈청 DMEM 배지 및 대조군으로 목서 발효추출물이나 목서 추출물이 포함되지 않은 무혈청 DMEM 배지에서 24시간 동안 추가로 배양하였다. 배양 후, 각 well의 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 3에 따라 계산하였으며, 대조군은 엘-아스코르빅애씨드 (L-AA, L-ascorbic acid)로 하였다.

수학적 식 3

$$\text{콜라겐 생합성 증가율(\%)} = \left(\frac{\text{실험군의 콜라겐 양}}{\text{대조군의 콜라겐 양}} - 1 \right) \times 100$$

[0081]

표 6

	제조예1	비교제조예1	L-AA
0.3mM	-	-	131.51
0.001wt%	126.65	111.22	-
0.002wt%	142.38	122.54	-
0.005wt%	164.44	133.65	-
0.01wt%	185.35	153.74	-

[0082]

[0083] 상기 표 6의 결과에서 보는 바와 같이, 본 발명의 목서 발효추출물이 목서 추출물에 비하여 콜라겐 합성량이 우수하였다.

[실험예 5: B16F1 멜라닌 세포를 이용한 멜라닌 합성 억제효과 측정]

[0085] 실험예 5에서는 상기 제조예 1과 비교제조예 1에서 수득한 목서 발효추출물과 목서 추출물의 멜라닌 합성 억제 효과를 확인하기 위해 미백제로 알려진 알부틴을 비교샘플로 사용하였고, B16F1 멜라닌 세포를 이용하였다.

[0086] 실험예 5에서 사용된 B16F1 멜라노사이트는 마우스에서 유래한 세포주이며, 멜라닌이라는 흑색색소를 분비하는 세포이다. B16F1 멜라닌 세포의 멜라닌 합성 억제효과 측정은 다음과 같이 수행하였다.

[0087] B16F1 멜라닌 세포를 6-웰 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 떼어낸 후, 세포 수를 측정한 다음 원심분리하여 세포를 회수하였다. 세포 내 멜라닌의 정량은 로탄(R Lotan and D Lotan, Cancer Res, 40: 3345-3350, 1980)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 셀 펠렛을 PBS로 1회 세척한 후, 균질화 완충액(50 mM 소듐 포스페이트, pH 6.8, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF) 1 ml를 첨가하고, 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 측정한 다음, 멜라닌을 정량하여 시료의 멜라닌 생성 저해율(%)을 측정하였다. B16F1 멜라닌 세포의 멜라닌 생성 저해율(%)은 수학적 식 4에 의하여 계산하였다.

수학적 식 4

$$\text{멜라닌 합성 저해율(\%)} = \left(\frac{A-B}{A} \right) \times 100$$

[0089]

[0090] A: 시료를 첨가하지 않은 웰의 멜라닌 양

[0091] B: 시료를 첨가한 웰의 멜라닌 양

표 7

[0092]

	비교제조예1	제조예1	알부틴
0.2 wt%	-	-	53.2
0.001wt%	13.24	46.64	-
0.002wt%	21.54	69.28	-
0.005wt%	33.63	78.44	-
0.01wt%	42.74	86.35	-

[0093]

B16F1 멜라닌 세포를 이용한 멜라닌 합성 억제효과를 측정된 결과를 표 7에 나타내었다. 제조예 1로 제조된 목서 발효추출물은 알부틴보다 우수한 효능을 확인할 수 있었으며, 비교제조예 1보다 우수한 미백효과를 갖는 것을 확인하였다.

[0094]

상기의 결과로부터 목서 발효추출물의 우수한 멜라닌 합성 저해율을 확인할 수 있었고, 이를 바탕으로 본 발명의 피부 외용제 조성물의 우수한 미백효과를 알 수 있었다.

[0096]

[처방예 및 비교처방예의 제조: 목서 발효추출물을 함유하는 화장료의 제조]

[0097]

제조예 1의 목서 발효추출물을 20.0 중량%가 포함된 화장료 조성물을 하기 표 8의 조성으로 제조하여 이를 처방예 1이라 하고, 목서 추출물을 포함하는 화장료 조성물을 비교처방예 1라 하였다.

표 8

[0098]

성분	처방예 1 (중량%)	비교처방예 1 (중량%)
제조예 1	20.0	-
비교제조예 1	-	20.0
1,3-BG	10.0	10.0
글리세린	5.1	5.1
프로필렌글리콜	4.2	4.2
토코페릴아세테이트	3.0	3.0
유동파라핀	4.6	4.6
트리에탄올아민	1.0	1.0
스쿠알란	3.1	3.1
마카다미아너트오일	2.5	2.5
폴리아우베이트60	1.6	1.6
아위비탄세스퀴롤레이트	1.6	1.6
프로필파라벤	0.6	0.6
카르복실비닐폴리머	1.5	1.5
향	미량	미량
방부제	미량	미량
정제수	잔량	잔량
계	100	100

[0100]

[실험예 6: 목서 발효추출물의 피부 보습력 개선효과]

[0101]

본 발명의 목서 발효추출물을 함유하는 화장료의 피부 보습력 개선효과를 알아보기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다. 피부 질환이 없는 20~40대 25명을 대상으로 1조 당 20명씩 2개조로 나누고, 각 조별로 상기 표 8에서 제조한 처방예 1 및 비교처방예 1의 크림의 영양크림을 매일 2회씩 1개월간 얼굴 및 전박부에 도포하게 하였다. 미리 도포 시작 전 항온, 항습 조건(24℃, 습도 40%)에서 corneometer(CM820 courage Khazaka electronic GmbH, Germany)를 이용하여 피부 전도도를 측정하여 기본 값을 삼고, 1주, 2주, 4주 경과 후의 피부 전도도 증가율(%)을 측정하여 그 증가율을 평가하였다. 그 결과를 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

[0102]

시료	1 주 후	2 주 후	4 주 후
처방예 1	52	55	59
비교처방예 1	26	35	38

[0103]

상기 표 9의 결과에서 보는 바와 같이, 본 발명의 목서 발효추출물을 함유하는 화장료인 처방예 1의 경우, 비교 처방예 1에 비하여 피부 전도도 증가율이 매우 우수하였다. 일반적으로 피부 전도도는 피부 수분량에 비례하므로, 상기의 결과는 목서 발효추출물을 함유하는 화장료가 그렇지 않은 화장료에 비해 피부 수분 함량도 높게 유지한다는 것을 확인시켜 준 것이다.

[0105]

[실험예 7: 목서 발효추출물의 피부 장벽 개선효과]

[0106]

본 발명의 목서 발효추출물을 함유하는 화장료의 피부 장벽 개선효과를 알아보기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다. 본 실험에는 표 8의 화장료를 사람용 대상으로 경피수분손실량(TEWL : Trans-Epidemal Water Loss)을 Tewameterr(TM300, Courage and Khazaka Electronic Co., Germany)를 이용하여 비교실험을 행하여 평가하였다. 20 ~ 40대 여성 40명을 대상으로 오른쪽과 왼쪽 얼굴에 각 시료를 바르고 눈가에서 3cm 우측으로 1cm 아래로 떨어진 부위를 바르기 전과 바른 후 1시간, 2시간, 4시간, 6시간의 경피수분손실량을 Tewameterr(TM300, Courage and Khazaka Electronic Co., Germany)를 이용하여 3회 측정하여 평균값을 사용하여 경피수분손실량을 평가하였다.

표 10

[0107]

구분	1시간	2시간	4시간	6시간
처방예 1	9.2	7.8	6.4	5.2
비교처방예 1	22.1	20.0	16.2	15.9

[0108]

표 10에서 나타난 바와 같이, 경피수분손실량을 측정한 결과, 목서 발효추출물을 함유한 크림을 도포한 실험자의 안면 피부에서 경피수분손실량이 감소한 것으로 보아, 피부장벽 개선에 더 좋은 효과가 있음을 알 수 있었다.