



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0063048
(43) 공개일자 2021년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/03 (2006.01) A61K 8/9711 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 36/03 (2013.01)
A61K 8/9711 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2019-0151488
(22) 출원일자 2019년11월22일
심사청구일자 2019년11월22일

(71) 출원인
비비솔루션 주식회사
부산광역시 북구 만덕3로16번길 1, 403호(만덕동, 부산이노비즈센터)

(72) 발명자
최윤식
서울특별시 서초구 서초대로 74길 30 우성 5차 501동 1714호

김혜경
부산광역시 수영구 남천동로 41 남천코오롱하늘채 골든비치 111동 1601호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
신동인

전체 청구항 수 : 총 5 항

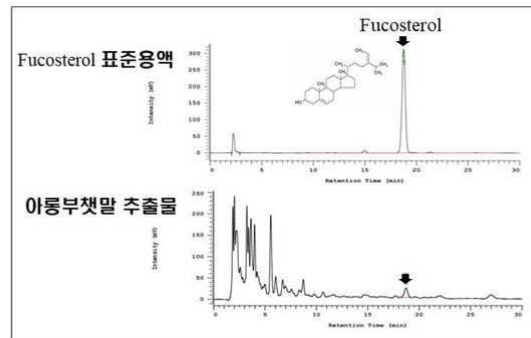
(54) 발명의 명칭 **아롱 부챗말 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 의학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 아롱 부챗말 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 우수한 티로시나제 저해활성을 나타내고, B16F10 melanoma 세포 내 실험에서 멜라닌 합성 저해 활성을 나타내는 바 본 발명의 추출물은 미백 효과를 갖는 피부외용 약학조성물 및 화장품 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1

푸코스테롤(fucosterol) 표준 용액 및 아롱부챗말 추출물의 HPLC chromatogram



- (52) CPC특허분류
A61K 9/0014 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/02 (2013.01)

강현본

부산광역시 사하구 다대로 617 다대자유아파트 11
2동 301호

- (72) 발명자

박지아

경상남도 창원시 마산합포구 현동4길 20 중흥S-클
래스 107동 2002호

김민지

부산광역시 해운대구 선수촌로 207번가길 10 대산
아파트 B동 208호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	B0080509000470
부처명	부산산업과학혁신원
과제관리(전문)기관명	경성대학교 산학협력단
연구사업명	지역특화 기술개발·확산 개방형연구실 운영사업
연구과제명	해양생물자원 발굴 및 Fusion Nano Some 기술을 적용한 항노화 화장품 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부산산업과학혁신원
연구기간	2019.03.01 ~ 2019.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

아롱 부챗말(*Padina gymnospora*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 피부외용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 에탄올, 메탄올, 프로판올, 부탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 헥산, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 합수부틸렌글리콜, 합수프로필렌글리콜, 합수글리세린으로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 피부외용 약학조성물.

청구항 3

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

청구항 4

아롱 부챗말(*Padina gymnospora*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 화장품 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서 상기 화장품 조성물은 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 팩의 제형인 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아롱 부챗말 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [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] 한국특허공개 제 10-2012-0062615호
- [0005] [문헌 4] 한국특허공개 제 10-2010-0111066호
- [0006] [문헌 5] 한국특허공개 제 10-2011-0068923호
- [0007] [문헌 6] 한국특허공개 제 특2002-0030141호
- [0008] [문헌 7] 한국특허공개 제 10-2019-0123019호
- [0009] [문헌 8] Lee , Y.P. and S. Kang. 2001. A catalogue of the seaweeds in Korea. Cheju National University Press. pp. 662
- [0010] [문헌 9] 환경부 국립생물자원관. 대한민국 생물지 한국의 조류(Algae). 2010. 제2권 2호. pp 46-48
- [0011] [문헌 10] Yagi A, Kanbara T and Morinobu N., 1986. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Media*. 3981, 517-519.
- [0012] [문헌 11] Kang SH, Jeon YD et al., 2018. Antioxidant and skin-whitening effects of aerial part of

Euphorbia supina Raf. Extract. *BMC Complement Altern Med.* 18(1), 256.

[0013] [문헌 12] BAK J, Pyeon H et al., 2018. Beneficial effects of nano-sized bee pollen on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rodents. *Journal of life science.* 28(4), 465-471.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 현대인들은 자외선, 스트레스 등의 여러 가지 내외적인 요인에 의해 각종 피부 트러블 유발로 기미, 주근깨, 피부 색소 침착 등의 피부 노화 현상을 촉진한다(1.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(2.Aroca, P., et al. 1993. Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. *J. Biol Chem* 268, 25650-25655.).

[0015] 이를 바탕으로 티로시나제(tyrosinase) 효소의 활성을 저해하여 멜라닌 생합성의 억제에 영향을 미칠 수 있는 천연물, 특히 해양생물자원 추출물에 대한 탐색 및 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0016] 그 결과, 한국특허공개 제 10-2012-0062615호에는 “부챗말(Padina arborescens) 추출물 또는 그 분획물을 이용한 항균성 피부 외용제 조성물”이 개시되고; 한국특허공개 제 10-2010-0111066호에는 “부챗말(Padina arborescens) 등의 해조류 추출물 또는 그 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 조성물”이 개시되고; 한국특허공개 제 10-2011-0068923호에는 부챗말(Padina arborescens) 등의 해조류 추출물을 유효성분으로 포함하는 항히스타민제 조성물 “; 한국특허공개 제 특2002-0030141호에는 “파디나파보니카 추출물(Padina Pavonica extract) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 보호용 조성물”이 개시되고; 한국특허공개 제 10-2019-0123019호에는 파디나 코머소니(Padina commersonii) 추출물에서 유래되는 항산화 또는 항염증 조성물 “ 등이 개시된 바가 있다.

[0017] 그물바탕말과 부챗말속은 부산에서 Okamura`s (1982)에 의해 Padina durvillaeI가 처음 보고되었으며, 우리나라에서는 P. arborescens Holmes, P. australis Hauck, P. boryana Thivy in Taylor, P. crassa Yamada, P. japonica Yamada, and P. minor Yamada 등 6종이 생육하고 있는 것으로 보고되어 있다(Lee , Y.P. and S. Kang. 2001. A catalogue of the seaweeds in Korea. Cheju National University Press. pp. 662).

[0018] 아롱 부챗말(Padina gymnospora)은 일본과 우리나라에 분포하고 있는데, 우리나라는 함경도, 부산, 비진도, 거제도, 남해도, 추자도, 제주도 등지에 분포한다고 알려져 있다. 몸은 편평하고 중륵이 없고 부채꼴이다. 단조이거나 또는 노성하면 방사상으로 깨어진다. 크기는 6~7cm, 때로는 25~30cm이다. 하부는 갈색의 모용이 있다. 생식세포의 군은 대체로 몸의 이면, 즉 성장면이 말려 들어간 쪽의 면에 생기고 몸의 모선대와 교호로 환상으로 배열된다. 질은 두꺼운 핵질이고 건조하면 특히 하부는 나무처럼 단단하고 대지에 붙지 않는다 (환경부 국립생물자원관. 대한민국 생물지 한국의 조류(Algae). 2010. 제2권 2호. pp 46-48).

[0019] 그러나, 본원에서 참고로만 인용되는 상기 선행문헌의 어디에도 본원 발명의 아롱 부챗말(Padina gymnospora) 추출물의 미백 및 피부노화의 치료효과에 대한 어떠한 교시 또는 개시내용도 없다.

[0020] 이에 본 발명자들은 본 발명의 추출물에 대하여 아롱 부챗말 추출물의 지표성분인 푸코스테롤(fucosterol) 성분 함량분석실험(실험예 1)을 통하여 아롱부챗말 추출물은 푸코스테롤(fucosterol)를 다량 함유(0.66%) 함을 확인하였고, 시험관내 티로시나제 저해활성(2-1), 시험관내 멜라닌(In vitro melanin) 함량 측정실험(2-2)를 통하여 강력한 미백활성을 확인하였으며; 세포 생존율 측정실험 (MTT assay)(실험예 3-1), LDH 분비 억제 활성 측정실험(실험예 3-2)를 통하여 세포독성이 없음을 확인하여 미백 및 피부노화 치료 및 예방용 조성물로 유용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0021] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아롱 부챗말(Padina gymnospora) 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 피부외용 약학조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 아롱 부챗말(Padina gymnospora) 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 화장료 조성물을 제공한다.

- [0023] 본원에서 정의되는 아롱 부챗말(*Padina gymnospora*) 추출물은 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 100% 에탄올 가용 추출물을 포함한다.
- [0024] 상기 추출물은 피부외용 약학조성물은 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%으로 포함함을 특징으로 한다.
- [0025] 본 발명의 추출물을 분리하는 방법은 하기와 같다.
- [0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0027] 본 발명의 추출물은, 건조된 아롱 부챗말(*Padina gymnospora*) 를 분쇄기로 분쇄한 후, 상기 분쇄물의 약 1배 내지 20배, 바람직하게는 약 1배 내지 15배의 물, 에탄올, 메탄올, 프로판올, 부탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 헥산, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 합수부틸렌글리콜, 합수프로필렌글리콜, 합수글리세린으로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 용매 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 물 또는 물 및 에탄올 혼합용매, 가장 바람직하게는 60% 내지 100% 에탄올 혼합용매를 가하여 12시간 내지 1주일, 바람직하게는 24시간 내지 72시간 동안, 10℃ 내지 50℃, 바람직하게는 실온에서 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출 등의 추출방법, 바람직하게는, 냉침추출법을 수행하여 추출물을 수득하는 제 1단계; 상기에서 얻은 추출물을 여과포로 여과하고 필터 여과하여 여과물을 얻는 제 2단계의 제조공정을 통하여 본 발명의 추출물을 수득할 수 있다.
- [0028] 본 발명은 상기 제조방법에서 얻어지는 아롱 부챗말(*Padina gymnospora*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 피부외용 약학조성물 또는 화장품 조성물을 제공한다.
- [0029] 상기 약학 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 제형을 포함한다.
- [0030] 또한, 상기 화장품 조성물은 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 팩의 제형을 포함한다.
- [0031] 본 발명자들은 본 발명의 추출물에 대하여 아롱 부챗말 추출물의 지표성분인 푸코스테롤(*fucosterol*) 성분 함량분석실험(실험예 1)을 통하여 아롱부챗말 추출물은 푸코스테롤(*fucosterol*)를 다량 함유(0.66%) 함을 확인하였고, 시험관내 티로시나제 저해활성(2-1), 시험관내 멜라닌(*In vitro melanin*) 함량 측정실험(2-2)를 통하여 강력한 미백활성을 확인하였으며; 세포 생존율 측정실험 (MTT assay)(실험예 3-1), LDH 분비 억제 활성 측정실험(실험예 3-2)를 통하여 세포독성이 없음을 확인하여 미백용 조성물로 유용함을 확인하였다.
- [0032] 본 발명의 아롱 부챗말은 오랫동안 생약 및 식용으로 사용되어 오던 약재로서 이들로부터 추출된 본 발명의 추출물 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없으며, 피부 첩포 시험에서 무자극 시료임이 입증되었으므로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 추출물을 함유하는 피부외용 약학조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용제 형태의 약학조성물로 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 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 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.
- [0035] 본 발명의 추출물은 미백 효과를 갖는 화장품 및 세안제 등에 다양하게 이용될 수 있다.
- [0036] 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.
- [0037] 본 발명의 화장품은 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스펅그 지질 및 해초 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 조성물을 포함한다. 수용성 비타민으로는 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 (티아민염, 산염, 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 취득할 수 있다.

[0038] 유용성 비타민으로서의 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) 등도 본 발명에서 사용되는 유용성 비타민에 포함된다. 유용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 취득할 수 있다.

[0039] 고분자 펩티드로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 콜라겐, 가수분해 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴, 가수분해 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 패지나 소 등의 진피, 누에의 견섬유 등의 천연물로부터 정제하여 사용할 수 있다.

[0040] 고분자 다당으로서의 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.

[0041] 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.

[0042] 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.

[0043] 본 발명의 화장료에는 상기 필수 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분을 배합해도 된다.

[0044] 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로서의 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면활성제, 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.

[0045] 유지 성분으로서의 에스테르계 유지, 탄화수소계 유지, 실리콘계 유지, 불소계 유지, 동물 유지, 식물 유지 등을 들 수 있다.

[0046] 에스테르계 유지로서는 트리2-에틸hex산산글리세릴, 2-에틸hex산산세틸, 미리스틴산이소프로필, 미리스틴산부틸, 팔미틴산이소프로필, 스테아르산에틸, 팔미틴산옥틸, 이소스테아르산이소세틸, 스테아르산부틸, 리놀레산에틸, 리놀레산이소프로필, 올레인산에틸, 미리스틴산이소세틸, 미리스틴산이소스테아릴, 팔미틴산이소스테아릴, 미리스틴산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 세바신산디에틸, 아디핀산디이소프로필, 네오펜탄산이소알킬, 트리(카프릴, 카프린산)글리세릴, 트리2-에틸hex산산트리메틸올프로판, 트리이소스테아르산트리메틸올프로판, 테트라2-에틸hex산산펜타엘리슬리톨, 카프릴산세틸, 라우린산데실, 라우린산헥실, 미리스틴산데실, 미리스틴산미리스틸, 미리스틴산세틸, 스테아르산스테아릴, 올레인산데실, 리시놀레인산세틸, 라우린산이소스테아릴, 미리스틴산이소트리데실, 팔미틴산이소세틸, 스테아르산옥틸, 스테아르산이소세틸, 올레인산이소데실, 올레인산옥틸도데실, 리놀레산옥틸도데실, 이소스테아르산이소프로필, 2-에틸hex산산세토스테아릴, 2-에틸hex산산스테아릴, 이소스테아르산헥실, 디옥탄산에틸렌글리콜, 디올레인산에틸렌글리콜, 디카프린산프로필렌글리콜, 디(카프릴, 카프린산)프로필렌글리콜, 디카프릴산프로필렌글리콜, 디카프린산네오펜틸글리콜, 디옥탄산네오펜틸글리콜, 트리카프릴산글리세릴, 트리운데실산글리세릴, 트리이소팔미틴산글리세릴, 트리이소스테아르산글리세릴, 네오펜탄산옥틸도데실, 옥탄산이소스테아릴, 이소노난산옥틸, 네오데칸산헥실데실, 네오데칸산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 이소스테아르산이소스테아릴, 이소스테아르산옥틸데실, 폴리글리세린올레인산에스테르, 폴리글리세린이소스테아르산에스테르, 시트르산트리이소세틸, 시트르산트리이소알킬, 시트르산트리이소옥틸, 락트산라우릴, 락트산미리스틸, 락트산세틸, 락트산옥틸데실, 시트르산트리에틸, 시트르산아세틸트리에틸, 시트르산아세틸트리부틸, 시트르산트리옥틸, 말산디이소스테아릴, 히드록시스테아르산 2-에틸헥실, 숙신산디2-에틸헥실, 아디핀산디이소부틸, 세바신산디이소프로필, 세바신산디옥틸,

스테아르산콜레스테릴, 이소스테아르산콜레스테릴, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 올레인산콜레스테릴, 올레인산디히드로콜레스테릴, 이소스테아르산피트스테릴, 올레인산피트스테릴, 12-스테알로일히드록시스테아르산이소세틸, 12-스테알로일히드록시스테아르산스테아릴, 12-스테알로일히드록시스테아르산이소스테아릴 등의 에스테르계 등을 들 수 있다.

- [0047] 탄화 수소계 유지로서는 스쿠알렌, 유동 파라핀, 알파-올레핀올리고머, 이소파라핀, 세레신, 파라핀, 유동 이소파라핀, 폴리부텐, 마이크로크리스탈린왁스, 와셀린 등의 탄화 수소계 유지 등을 들 수 있다.
- [0048] 실리콘계 유지로서는 폴리메틸실리콘, 메틸페닐실리콘, 메틸시클로폴리실록산, 옥타메틸폴리실록산, 데카메틸폴리실록산, 도데카메틸시클로실록산, 디메틸실록산·메틸세틸옥시실록산 공중합체, 디메틸실록산·메틸스테알록시실록산 공중합체, 알킬 변성 실리콘유, 아미노 변성 실리콘유 등을 들 수 있다.
- [0049] 불소계 유지로서는 퍼플루오로폴리에테르 등을 들 수 있다.
- [0050] 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, 멩크유, 오렌지라피유, 호호바유, 캔테리러왁스, 카르나바왁스, 액상 라놀린, 경화피마자유 등의 동물 또는 식물 유지를 들 수 있다.
- [0051] 보습제로서는 수용성 저분자 보습제, 지용성 분자 보습제, 수용성 고분자, 지용성 고분자 등을 들 수 있다.
- [0052] 수용성 저분자 보습제로서는 세린, 글루타민, 솔비톨, 만니톨, 피롤리돈-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.
- [0053] 지용성 저분자 보습제로서는 콜레스테롤, 콜레스테롤에스테르 등을 들 수 있다.
- [0054] 수용성 고분자로서는 카르복시비닐폴리머, 폴리아스파라긴산염, 트라가칸트, 크산단검, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 수용성 키틴, 키토산, 텍스트린 등을 들 수 있다.
- [0055] 지용성 고분자로서는 폴리비닐피롤리돈·에이코센 공중합체, 폴리비닐피롤리돈·헥사데센 공중합체, 니트로셀룰로오스, 텍스트린지방산에스테르, 고분자 실리콘 등을 들 수 있다.
- [0056] 에몰리엔트제로서는 장쇄아실글루타민산콜레스테릴에스테르, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 12-히드록시스테아르산, 스테아르산, 로진산, 라놀린지방산콜레스테릴에스테르 등을 들 수 있다.
- [0057] 계면 활성제로서는 비이온성 계면 활성제, 음이온성 계면 활성제, 양이온성 계면 활성제, 양성 계면 활성제 등을 들 수 있다.
- [0058] 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.
- [0059] 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.
- [0060] 양이온성 계면 활성제로서는 염화알킬트리메틸암모늄, 염화스테아릴트리메틸암모늄, 브롬화스테아릴트리메틸암모늄, 염화세토스테아릴트리메틸암모늄, 염화디스테아릴디메틸암모늄, 염화스테아릴디메틸벤질암모늄, 브롬화베헤닐트리메틸암모늄, 염화벤잘코늄, 스테아르산디에틸아미노에틸아미드, 스테아르산디메틸아미노프로필아미드, 라놀린 유도체 제 4급 암모늄염 등을 들 수 있다.
- [0061] 양성 계면 활성제로서는 카르복시베타인형, 아미드베타인형, 술포베타인형, 히드록시술포베타인형, 아미드

술포베타인형, 포스포베타인형, 아미노카르복실산염형, 이미다졸린 유도체형, 아미드아민형 등의 양성 계면 활성제 등을 들 수 있다.

[0062] 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 유기 안료 및 이들의 무기 안료와 유기 안료의 복합 안료 등을 들 수 있다.

[0063] 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-과리토일올니틴, 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.

[0064] 자외선 흡수제로서는 파라아미노벤조산, 파라아미노벤조산에틸, 파라아미노벤조산아밀, 파라아미노벤조산옥틸, 살리실산에틸렌글리콜, 살리신산페닐, 살리신산옥틸, 살리신산벤질, 살리신산부틸페닐, 살리신산호모멘틸, 계피산벤질, 파라메톡시계피산-2-에톡시에틸, 파라메톡시계피산옥틸, 디파라메톡시계피산모노-2-에틸헥산글리세릴, 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.

[0065] 살균제로서는 히노키티올, 트리클로산, 트리클로로히드록시디페닐에테르, 크로르헥시딘글루콘산염, 페녹시 에탄올, 레조르신, 이소프로필메틸페놀, 아줄렌, 살리칠산, 진크필리티온, 염화벤잘코늄, 감광소 301 호, 모노 니트로과이어콜나트륨, 운데시렌산 등을 들 수 있다.

[0066] 산화 방지제로서는 부틸히드록시아니솔, 갈릭산프로필, 엘리소르빈산 등을 들 수 있다.

[0067] pH 조정제로서는 시트르산, 시트르산나트륨, 말산, 말산나트륨, 프말산, 프말산나트륨, 숙신산, 숙신산나트륨, 수산화나트륨, 인산일수소나트륨 등을 들 수 있다.

[0068] 알코올로서는 세틸알코올 등의 고급 알코올을 들 수 있다.

[0069] 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.

[0070] 본 발명의 화장료는 용액, 유화물, 점성형 혼합물 등의 형상을 취할 수 있다.

[0071] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 복합생약 추출물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함한다.

[0072] 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.

[0073] 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.

[0074] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 진분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이

이용될 수 있다.

- [0075] 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.
- [0076] 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.
- [0077] 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.
- [0078] 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.
- [0079] 본 발명자들은 본 발명의 추출물에 대하여 아롱 부챗말 추출물의 지표성분인 푸코스테롤(fucosterol) 성분 함량 분석실험(실험예 1)을 통하여 아롱부챗말 추출물은 푸코스테롤(fucosterol)를 다량 함유(0.66%) 함을 확인하였고, 시험관내 티로시나제 저해활성(2-1), 시험관내 멜라닌(In vitro melanin) 함량 측정실험(2-2)를 통하여 강력한 미백활성을 확인하였으며; 세포 생존율 측정실험 (MTT assay)(실험예 3-1), LDH 분비 억제 활성 측정실험(실험예 3-2)를 통하여 세포독성이 없음을 확인하여 미백용 조성물로 유용함을 확인하였다.

발명의 효과

- [0080] 본 발명의 추출물에 대하여 아롱 부챗말 추출물의 지표성분인 푸코스테롤(fucosterol) 성분 함량분석실험(실험예 1)을 통하여 아롱부챗말 추출물은 푸코스테롤(fucosterol)를 다량 함유(0.66%) 함을 확인하였고, 시험관내 티로시나제 저해활성(2-1), 시험관내 멜라닌(In vitro melanin) 함량 측정실험(2-2)를 통하여 강력한 미백활성을 확인하였으며; 세포 생존율 측정실험 (MTT assay)(실험예 3-1), LDH 분비 억제 활성 측정실험(실험예 3-2)를 통하여 세포독성이 없음을 확인하여 미백 또는 피부노화 치료 및 예방용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0081] 도 1은 푸코스테롤(fucosterol) 표준 용액 및 아롱부챗말 추출물의 HPLC chromatogram을 나타낸 도이며;
- 도 2는 본 발명 시료의 티로시나제 저해활성을 나타낸 도이며;
- 도 3은 본 발명 시료의 시험관내 멜라닌(In vitro melanin) 함량 및 시료의 저해활성을 나타내는 도이고,
- 도 4는 본 발명 시료의 세포 생존율 측정 결과를 나타낸 도이고,
- 도 5는 본 발명 시료의 LDH 분비 억제 활성 측정 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0082] 이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0083] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0084] **실시예 1. 아롱 부챗말 추출물의 제조**

[0085] 만타스마린랩에 아롱 부챗말(Padina gymnospora) 채취를 의뢰하여 원료 건조 중량 약 2.38 kg 을 구입하고, 건조 원료 크기를 약 1 cm x 1 cm 크기로 분쇄하였다. 분쇄된 건조 원료에 100% 에탄올 36L을 가하고 실온에서 24시간 침출하는 냉침 추출법을 수행하고 이 공정을 2회 반복 추출하여 추출물을 얻었다. 이 추출물을

Whatman No. 1 여과지로 여과 및 감압농축기(A-1000S, EYELA, Japan)로 농축하고 동결건조기(FD5512, Ilshin, Korea)로 동결 건조하여 건조 추출물 약 50g을 수득하였다(이하 PGW라 함). 이후 시료를 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

실험예 1. 아롱 부챗말 추출물의 HPLC 분석

상기 실시예 1의 아롱 부챗말 추출물에 대한 지표성분인 푸코스테롤(fucosterol) 성분을 동정하고 함량분석을 위하여 하기 표 1의 분석조건으로 HPLC를 수행하였다.

1-1. HPLC분석조건 및 방법

이동상은 아세토니트릴(acetonitrile)과 메탄올(methanol)을 사용하며, solvent A는 acetonitrile, solvent B는 methanol로 하여 분석을 진행하고 컬럼(Column)의 온도는 30℃로 유지하고, 유속은 분당 1.2 mL로 하였으며 검출기로는 UV detector로 파장은 205 nm이며 분석용 컬럼은 C18 (4.6 x 250 mm, 5 μm)을 사용하고, 주입 용량은 각각 10 μL로 하였다. (표 1)

표 1

푸코스테롤 동정 HPLC 조건

HPLC condition			
column	Zorbax Eclipse Plus C18		
column temperature	30℃		
flow rate	1.2 ml/min		
wavelength	205 nm		
Injection volume	10 μL		
Mobile solvent	A: acetonitrile B: methanol		
obile phase	Time(min)	A(%)	B(%)
	0	70	30
	30	70	30

1-2. 실험 결과

상기 실험 결과, 아롱부챗말 추출물은 푸코스테롤(fucosterol)를 다량 함유(0.66%) 함을 확인하였다(도 1: 푸코스테롤(fucosterol) 표준 용액 및 아롱부챗말 추출물의 HPLC chromatogram)

실험예 2. 미백 활성 실험

2-1. 시험관내 티로시나제 저해활성

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.]

티로시나제(Tyrosinase) 활성 저해능은 ‘기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인I(2015 식약처)’에 따라 평가하였다. 구체적으로는 아롱부챗말을 증류수에 녹여 최종 농도를 0.1%가 되도록 하여 상층액 20μl를 반응액 (0.1M phosphate buffer(pH 6.5) 220μl, 머쉬룸 타이로시나제액(1500U/ml, T3824-25KU, Sigma Aldrich) 20 μl과 혼합하였다. 혼합물에 1.5mM 타이로신액 20μl을 넣고 37℃에서 15분 동안 반응시킨 후, 판독기(microplate reader, AMR100, Allsheng, Hangzhou)를 이용하여 492nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 알부틴(arbutin; A4256-10G, sigma) 200 μM을 이용하였다.

티로시나제 (Tyrosinase) 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

본 실험 결과, 피부 내에서 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해할 수 있는 티로시나제 저해활성을 측정하기 위하여 버섯(mushroom) 유래의 티로시나제 저해활성 측정 결과는 표 2 및 도 2과 같이 나타내었다. 본 실험에서는 아롱 부챗말(*Padina gymnospora*) 추출물을 1 mg/ml의 농도로 버섯(mushroom) 유래의 티로시나제 효소와 반응을 시킨 결과 약물 무처리군(control) 대비 93%, arbutin 대비 85.4%의 저해능을 나타내었다.

표 2

티로시나제 저해활성 측정 결과

Melanin contents	CON	Arbutin (200 μM)	아롱부챗말 (0.1%)
평균±표준편차	1±0.05	0.48±0.006**	0.07±0.02***,##
Compare to Control $p^{**}<0.01, p^{***}<0.001,$ Compare to Arbutin $p^{##}<0.01$			

[0099]

[0100]

2-2. 시험관내 멜라닌(In vitro melanin) 함량 측정

[0101]

실시예에서 얻은 시료들의 시험관내 멜라닌(In vitro melanin) 저해활성을 시험하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다[Kang SH, Jeon YD et al., 2018. Antioxidant and skin-whitening effects of aerial part of Euphorbia supina Raf. Extract. *BMC Complement Altern Med.* 18(1), 256.]

[0102]

Melanoma(B16F10 ATCC) 세포에 멜라닌 생성 증폭제인 α-MSH (05-23-0751-1MG, 등 Millipore corp)를 처리하고 200 μM Arbutin (A4256-10G, Sigma Aldrich) 또는 아롱부챗말을 증류수에 녹여 최종 농도를 0.01%, 0.05% 0.5% 가 되도록 하여 3~5일간 처리 후, 상기 세포를 수거하여 1N NaOH (10% DMSO) 200μl를 넣고 80℃에서 1시간 동안 녹인 후에 판독기 (microplate reader, AMR100, Allsheng, Hangzhou)를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0103]

본 실험 결과, 시험관내 멜라닌(In vitro melanin) 함량 및 시료의 저해활성 측정 결과는 도 3에 나타내었다. 아롱부챗말(Padina gymnospora) 추출물은 100, 500 또는 5,000 μg/ml에서 무처리군(control) 대비 8%, 31% 그리고 79%의 저해율을 나타내었다. 또한 5,000 μg/ml에서는 arbutin 처리군 대비 67.2%의 저해율을 나타내었다.

표 3

멜라닌(In vitro melanin) 저해활성 측정 결과

Melanin contents	Control	Arbutin	아롱부챗말		
			0.01%	0.05%	0.5%
평균±표준편차	1±0.09	0.64±0.09*	0.92±0.14	0.69±0.08*	0.21±0.05***,##
Compare to Control $p^{*}<0.05, p^{***}<0.001$ Compare to Arbutin $p^{##}<0.01$					

[0104]

[0105]

실험예 3. 세포독성실험

[0106]

3-1. 참조예 1. 실험준비

[0107]

실험재료

[0108]

세포 배양액인 RPMI-1640, Modified Eagle Medium(MEM) non-essential amino acids solution, fetal bovine serum(FBS), streptomycine, penicillin 등의 세포배양용 시약들은 Hyclone사(Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 SCF(Stem cell factor, STEMCELL, Vancouver, Canada), LPS(Lipopolysaccharides, Sigma, St. Louis, MO, USA), IL-10(Recombinant Mouse IL-10, BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA)을 구입하여 사용하였고, PGD₂ 및 LTC₄의 측정 kit은 Cayman사(Ann Arbor, MI, USA), IL 측정용 kit는 R&D System사(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

[0109]

세포배양

[0110]

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 10% FBS, 100U/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin을 포함한 DMEM(Hyclone)배지에서 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

[0111]

쥐 골수 유래의 비만세포 (BMDC, mouse bone marrow-derived mast cells)는 BALB/C 마우스의 대퇴골에서 골수

세포를 분리하여, 10% FBS, 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycine을 포함한 RPMI-1640 배지에 IL-3공급원으로 PWM-SCM(containing pokeweed mitogen-stimulated spleen cell-conditioned medium) 을 final 20 % 되도록 넣은 배양액으로 약 3주 정도 배양하여 90% 이상의 균질한 BMMC를 얻어 사용하였다. 세포는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였고, BMMC를 96-well plate에 일정한 수의 세포를 분주하여 실험하였다.

[0112] **시료준비**

[0113] 실험에 사용하기 위한 시료로서 아롱 부챗말(Padina gymnospora) 추출물을 증류수에 녹여 최종 농도를 0.01~0.5%가 되도록 농도로 희석하여 사용하였다.

[0114] **3-2. 세포 생존율 측정(MTT assay)**

[0115] 상기 실시예에서 얻은 시료의 MTT 어세이법에 의한 세포 생존율에 대한 효과를 알아보기 위해 기존 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다[BAK J, Pyeon H et al., 2018. Beneficial effects of nano-sized bee pollen on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rodents. *Journal of life science*. 28(4) 465-471.]

[0116] 아롱부챗말을 증류수에 녹여 최종 농도를 0.01~0.5%가 되도록 하여 섬유아세포 (CCD-986sk 세포, 21947, 한국세포주 은행)에 24시간 처치 후, 10 μ l 의 MTT (5mg/ml)용액(M2128, Sigma Aldrich)을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 처리하였다.

[0117] 처리 2시간 후에 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 well 당 100 μ l 씩 넣어 formazan을 잘 녹인 후 판독기 (microplate reader, AMR100, Allsheng, Hangzhou)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0118] 본 실험 결과, 표 4 및 도 4에 나타난 바와 같이, 처리한 아롱부챗말 추출물의 농도에서 독성을 나타내지 않았다.

표 4

[0119] 세포 생존율 측정 결과

MTT	CON	아롱부챗말			
		0.01%	0.05%	0.1%	0.5%
평균±표준편차	1±0.08	1±0.11	1±0.06	1±0.17	1±0.05

[0120] 3-3. LDH 분비 억제 활성 측정

[0121] 상기 실시예에서 얻은 시료의 LDH (lactate dehydrogenase) 분비 억제 활성에 대한 효과를 알아보기 위해 기존 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다[BAK J, Pyeon H et al., 2018. Beneficial effects of nano-sized bee pollen on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rodents. *Journal of life science*. 28(4), 65-471.]

[0122] 아롱부챗말을 증류수에 녹여 최종 농도를 0.01~0.5%가 되도록 하여 섬유아세포 (CCD-986sk 세포, 21947, 한국세포주 은행)에 24시간 처치 후, 상층액 25 μ l를 반응액 (LDH cytotoxicity assay kit, cayman, USA) 25 μ l와 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응시킨 후에 판독기(microplate reader, AMR100, Allsheng, Hangzhou)를 이용하여 492nm에서 흡광도를 측정하였다

[0123] 본 실험 결과, 표 5 및 도 5에 나타난 바와 같이, 처리한 아롱부챗말 추출물의 농도에서 독성을 나타내지 않았다.

표 5

[0124] LDH 분비 억제 활성 측정 결과

MTT	CON	아롱부챗말			
		0.01%	0.05%	0.1%	0.5%
평균±표준편차	1±0.48	0.90±0.26	0.77±0.26	0.51±0.32	0.37±0.24

[0125] 이하, 본 발명의 제형예로서 크림, 맛사지크림, 로션, 스킨로션, 에센스, 팩, 클렌징폼의 제형을 예시하고 있으

나, 본 발명의 화장품 조성물을 포함하는 제형은 이에 한정되는 것은 아니다.

[0136] 제형예 1. 크림조성물

[0137] 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 폴리에틸렌글리콜	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	PGW 추출물 (실시예 1)	10.0
18	향료	미량
19	황색4호	미량
20	정제수	잔량

[0138]

[0146] 제형예 2. 마사지크림 조성물

[0147] 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	PGW 추출물 (실시에 1)	5.0
15	히아루로닉애씨드추출물	1.0
16	향료	미량
17	정제수	잔량

[0148]

[0157] 제형예 3. 로션 조성물

[0158] 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	PGW 추출물 (실시예 2)	15.0
14	트리에탄올아민	0.5
15	카르복시비닐폴리머	0.2
16	향료	미량
17	정제수	잔량

[0159]

[0160] 제형예 4. 스킨로션 조성물

[0161] 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	PGW 추출물 (실시예 1)	25.0
7	향료	미량
8	위치하젤추출물	1.0
9	정제수	잔량

[0162]

[0163] 제형예 5. 에센스 조성물

[0164] 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	PGW 추출물 (실시예 2)	30.0
11	향료	미량
12	정제수	잔량

[0165]

[0166] 제형예 6. 팩 조성물

[0167] 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	PGW 추출물 (실시예 2)	45.0
13	향료	미량
14	정제수	잔량

[0168]

[0170] 제형예 7. 클렌징폼 조성물

[0171] 수상과 오일상을 각각 분산 용해하여 혼합 검화한 후 실온으로 냉각한다.

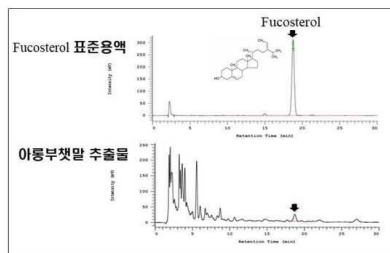
번호	원료명	중량 %
1	스테아린산	6.5
2	미리스틴산	28.0
3	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	3.0
4	프로필렌 글리콜	5.0
5	농글리세린	10.0
6	수산화나트륨	7.0
7	에틸렌디아민테트라초산나트륨	0.1
8	태반 추출물	0.5
9	PGW 추출물 (실시예 1)	15.0
10	향료	미량
11	정제수	잔량

[0172]

도면

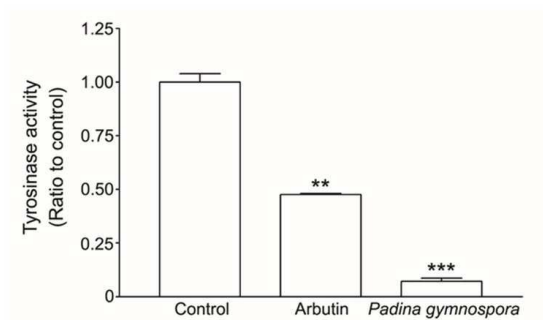
도면1

푸코스테롤(fucosterol) 표준 용액 및 아롱부챗말 추출물의 HPLC chromatogram



도면2

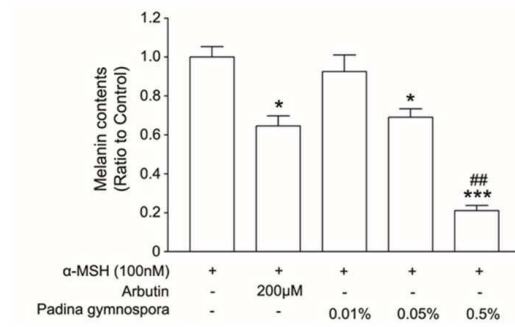
티로시나제 저해활성



** $p < 0.01$: compared to control
 *** $p < 0.001$: compared to control

도면3

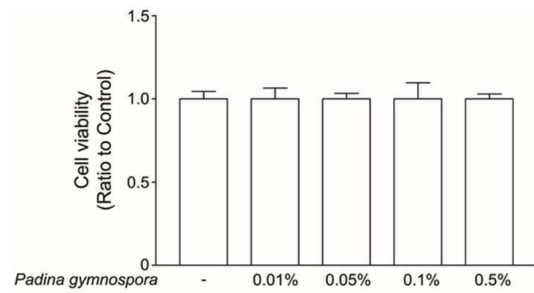
시험관내 멜라닌(in vitro melanin) 합량 및 시료의 저해활성 측정 결과



* $p < 0.05$: compared to Control
 *** $p < 0.001$: compared to Control
 ## $p < 0.01$: compared to Arbutin

도면4

세포 생존율 측정 결과



도면5

LDH 분비 억제 활성 측정 결과

