

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0117678
(43) 공개일자 2024년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/9789 (2017.01) A61K 8/35 (2006.01)
A61K 8/36 (2006.01) A61K 8/362 (2006.01)
A61K 8/37 (2006.01) A61K 8/63 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)
A61K 8/342 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0009438

(22) 출원일자 2023년01월25일

심사청구일자 2023년01월25일

(71) 출원인

건양대학교산학협력단

충청남도 논산시 대학로 121 (내동)

(72) 발명자

조영호

세종특별자치시 마은로 182, 1305동 2403호 (고운동, 가락마을13단지)

(74) 대리인

강성혜

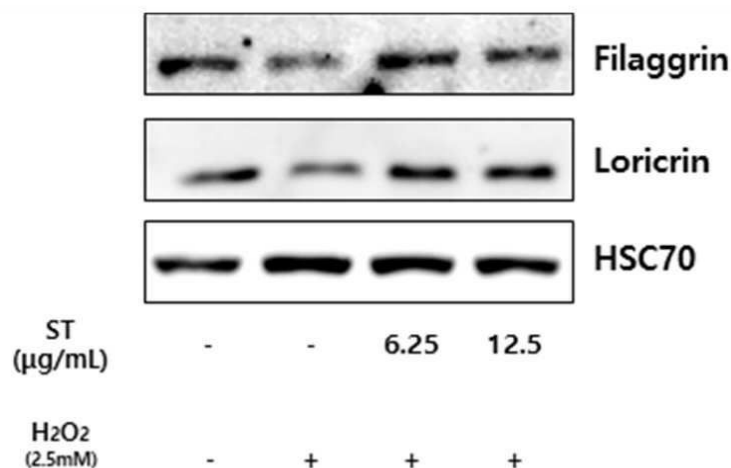
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 초음파 소태나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽 개선 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 초음파 소태나무 (*Picrasma quassioides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽 개선 화장품 조성물에 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 유효성분 (허킨노린 (Herkinorin), 아세토제닌 등)의 추출 수율을 높이기 위하여 소태나무를 추출용매에 침지한 후 초음파를 처리하는 단계; 상기 단계를 거친 추출물을 원심분리하고 분리한 상등액을 여과하는 단계; 감압농축 및 동결건조하는 단계;로부터 수득된 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부장벽 개선 화장품 조성물에 관한 것으로, 항산화 효소 (SOD-1, HO-1, 카탈레이즈) 및 피부장벽 구성 단백질 (필라그린, 로리크린)의 발현 증가를 통한 피부장벽 개선 효과를 나타낸다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 8/345 (2013.01)
A61K 8/36 (2013.01)
A61K 8/362 (2013.01)
A61K 8/37 (2013.01)
A61K 8/494 (2013.01)
A61K 8/4973 (2013.01)
A61K 8/498 (2013.01)
A61K 8/585 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345356198
과제번호	LINC3.0-2022-26
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	3단계 산학협력 선도대학 육성사업(LINC 3.0)
연구과제명	초음파 소태나무 추출물을 이용한 코스메슈티컬 소재 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	건양대학교 산학협력단
연구기간	2022.10.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

가) 소태나무 (*Picrasma quassioides*)를 추출용매에 침지하고 초음파로 추출하는 단계; 및
나) 상기 초음파로 추출한 소태나무 추출물을 원심분리하고 분리한 상등액을 여과하는 단계;로부터 수득되며, 허킨노린 (Herkinorin)이 수용성 용매로 열수 추출한 소태나무 추출물 대비 10~50배, 아세트제닌 (Acetogenin)이 뜨거운 주정 알코올 수용액으로 추출한 소태나무 추출물 대비 1.2~5배 함유된 초음파 소태나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽 개선 화장료 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,
상기 나) 단계 이후
다) 여과한 상등액을 감압농축 및/또는 동결건조하는 단계;가 부가된, 피부장벽 개선 화장료 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,
상기 가) 단계의 추출시 추출용매는 주정 알코올이 40~95% (v/v) 함유된 수용액인, 피부장벽 개선 화장료 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,
상기 초음파 소태나무 추출물의 함량이 화장료 조성물 전체에 대해 0.001~30.0중량%인, 피부장벽 개선용 화장료 조성물.

청구항 5

청구항 2에 있어서,
상기 감압농축 또는 동결건조된 추출물은 정제수 및 주정 알코올 중 선택되는 어느 하나 이상의 용매에 0.001~30.0중량% 용해된 것인, 피부장벽 개선용 화장료 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,
상기 가) 초음파로 추출하는 단계는 소태나무를 추출용매에 침지한 후 초음파를 2~5회 반복 처리하여 추출하는, 피부장벽 개선용 화장료 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 초음파 소태나무 추출물은 필라그린 발현량 및 로리크린 발현량을 H_2O_2 처리군에 비하여 증가시키는, 피부장벽 개선용 화장료 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 초음파 소태나무 추출물은 SOD-1, HO-1 및 카탈레이즈 활성을 H_2O_2 처리군에 비하여 증가시키는, 피부장벽 개선용 화장료 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 초음파 소태나무 추출물은 HAS2 (hyaluronan synthase 2) 및 아쿠아포린-3 발현량을 H_2O_2 처리군에 비하여 증가시키는, 피부장벽 개선용 화장료 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 초음파 소태나무 추출물은 데카메틸-사이클로페타실록산 (decamethyl-cyclopentasiloxane), 1,2-사이클로페탄다이온 (1,2-cyclopentanedione), 숙신산 (succinic acid), 1-메틸-9H-피리도[3,4b]인돌 (1-methyl-9H-pyrido[3,4b]indole), n-노나데카놀-1 (n-nonadecanol-1), 메틸 10-트랜스-12-시스-옥타데카디에노에이트 (methyl 10-trans-12-cis-octadecadienoate), 7-메톡시-5(10H)-피리도[3,4b]퀴놀론 (7-methoxy-5(10H)-pyrido[3,4b]quinolone), 1,3-다이아미노-7-메틸벤조[f]퀴나졸린 (1,3-diamino-7-methylbenzo[f]quinazoline), 헥사노익산 (hexanoic acid), (13,14-디메톡시-1,8-다이아자테트라사이클로[7.7.0.0(2,7).0(10,15)] 헥사데카-2(7),3,5,8,10(15),11,13-헵탄-16-온) (13,14-demethoxy-1,8-diazatetracyclo[7.7.0.0(2,7).0(10,15)] hexadeca-2(7),3,5,8,10(15),11,13-heptane-16-one), 3-부텐-2-온 (3-buten-2-one), 에르고스트-5-엔-3-올 (ergost-5-en-3-ol) 및 에르고스타-5,24(28)-다이엔-3-올 (ergosta-5,24(28)-dien-3-ol)의 성분을 포함하는, 피부장벽 개선용 화장료 조성물.

청구항 11

청구항 1에 있어서,

상기 화장료 조성물은 화장수, 젤, 로션, 크림, 에센스, 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 립스틱, 페이스파우더, 투웨이케익, 아스새도우, 마스크라 및 아이브로우펜슬류 중에서 선택되는, 피부장벽 개선용 화장료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 초음파 추출기술을 이용한 소태나무 추출물 및 이의 추출방법에 관한 것으로, 상세하게는 초음파 추출기술을 이용하여 제조된 필라그린, 로리크린, HAS-2, 아쿠아포린-3, 및 항산화 효소(SOD-1, HO-1, Catalase) 활성 효과가 우수한 초음파 소태나무 추출물을 함유하는 피부장벽 및 피부보습용 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 외부 환경으로부터 인체의 최외각을 보호해 주는 중요한 보호 기관 중 하나이다. 피부장벽은 각질형성세포의 분화과정에서 케라틴 단백질과 필라그린이 복합체를 형성하고 로리크린 (loricrin), 인볼루크린 (involucrin), 엔보플라킨 (envoplakin) 등의 단백질이 측쇄 결합하여 형성된다. 외부 환경으로부터 피부장벽 기능의 약화나 점차적인 소실로 피부 소양증, 아토피성 피부 및 건선 등이 발생할 수 있으며, 이러한 증상은 건조한 환경에서 더욱 악화될 수 있다. 또한, 필라그린, 로리크린 등과 같은 피부 결합조직을 구성하는 단백질이 손상되거나, 히알루론산 합성효소 (HAS) 및 피부 표면에 수분을 공급하는 아쿠아포린 단백질이 손상되는 경우 피부의 수분 함량이 감소하는 문제가 발생한다. 따라서 피부장벽 보호 및 보습 등 피부 개선을 위한 천연물 소재 개발에 대한 연구가 지속되고 있다(한국공개특허 제10-2019-0054734).

[0003] 천연물 소재로부터 유효성분을 추출하기 위해 일반적으로 열수 추출, 유기용매 추출, 초임계 추출 등의 방법이 사용되고 있다. 그러나 이러한 방법들은 추출 성분의 제한, 잔류 용매 문제, 추출비용이 고가인 문제점 등으로 인하여 유효성분의 추출수율과 경제성이 높은 추출방법이 요구되고 있다.

[0004] 한편, 소태나무 (*Picrasma quassioides*)는 소태나무과에 속하는 활엽교목으로 나무껍질에 황색의 피복이 있고 높이는 약 20m 정도까지 자란다. 한방에서는 청열조습, 건위, 살충, 해독의 효능이 있어 줄기, 뿌리 등을 물로 달여 제조한 추출물 형태로 소화불량, 위장염, 담도감염, 편도선염 치료에 사용하여 왔다. 그러나 소태나무의 줄기부위는 목질부로 일반적인 추출법으로는 추출수율이 낮고 특정 유효성분이 추출되기에 어려움이 많은 실정이다. 따라서 소태나무 추출물의 용도의 다각화를 위하여 새로운 추출물의 제조방법 개발이 필요하다(한국공개특허 제10-2011-0039084).

[0005] 이에 본 발명자들은 소태나무의 유효성분을 효과적으로 빠르게 추출할 수 있는 고효율 추출 방법을 찾고자 연구한 결과, 소태나무를 에탄올 수용액에 침지한 후 특정 조건 하에서 초음파를 처리하는 경우 기존의 에탄올 수용액 환류 추출법에 비하여 특정 성분 (허키노린, 아세토제닌 등)의 추출수율이 높고 환류 추출에서는 추출되지 않는 성분들이 추출되는 것을 확인하고, 또한, 이와 같은 방법으로 추출한 추출물이 피부 개선 효능 면에서 더 좋은 효과를 나타내는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 초음파 추출기술을 이용하여 소태나무로부터 허키노린, 아세토제닌 등의 성분이 고수율로 함유된 초음파 소태나무 추출물을 추출하는 방법 및 이와 같이 추출된 소태나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부장벽 개선용 화장료를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 허키노린, 아세토제닌 등의 추출 수율을 높이기 위하여 소태나무를 추출용매에 침지한 후 초음파를 처리하는 단계; 상기 단계를 거친 추출물을 원심분리하고 분리한 상등액을 여과하는 단계; 감압농축 및 동결건조하는 단계;로부터 수득된 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피부장벽 개선 및 피부보습용 화장료를 제공한다.

[0010] 이하 본 발명의 초음파 소태나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽 개선 및 피부보습용 화장료 조성물에 대해 상세히 설명하고자 한다.

[0011] 본 발명은 허키노린 (Herkinorin), 아세토제닌 (Acetogenin) 등의 유효성분 추출 수율을 높이기 위하여 소태나무를 용매에 침지한 후 초음파를 처리하는 단계; 상기 단계를 거친 추출물을 원심분리하고 분리한 상등액을 여과하는 단계; 감압농축 및 동결건조하는 단계;로부터 수득된 추출물을 유효성분으로 함유하는데, 상기 단계를 통해 수득된 추출물은 일반적인 용매 추출물보다 허키노린, 아세토제닌 등과 같은 유효성분의 함량이 증가한 것을 본 실험에서 확인하였으며, 또한, 일반적인 용매 추출물에서는 발견되지 않는 다양한 성분들이 추출되는 것을 실험으로 확인하였다.

[0012] 또한, 본 발명에서 초음파 추출로 추출된 소태나무 추출물은 자유라디칼 소거효과, 필라그린, 로리크린, HAS2 (hyaluronan synthase 2), 아쿠아포린-3 및 항산화 효소 (SOD-1 (Superoxide dismutase-1), HO-1 (heme

oxygenase isoform 1), Catalase) 등의 단백질 합성이 증가하여 통한 피부장벽 개선 및 보습개선 효과가 우수한 것을 특징으로 한다.

- [0013] 또한, 본 발명은 상기 추출시 추출용매로 주정 알코올이 40~95% (v/v) 함유된 수용액을 사용하는 것을 특징으로 하는 피부장벽 개선 및 보습용 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [0014] 또한, 본 발명은 추출물의 함량이 피부장벽 개선 및 보습용 화장료 전체에 대해 0.001~30.0 중량%인 것을 특징으로 하는 초음파 소태나무 추출물을 함유하는 피부장벽 개선 및 보습용 화장료 조성물에 관한 것이다. 상기 추출물이 0.001중량% 미만으로 포함되는 경우에는 필라그린, 로리크린, HAS-2, 아쿠아포린-3 및 항산화 효소의 활성 효과가 거의 없으며, 30.0중량% 이상인 경우에는 함유량 증가에 대한 효과 증대 정도가 미미하여 경제적이지 못하다.
- [0015] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 화장수, 젤, 로션, 크림, 에센스, 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 립스틱, 페이스파우더, 투웨이케익, 아스새도우, 마스크라 및 아이브로우펜슬류 중에서 선택된 어느 하나 이상의 제형으로 조제할 수 있다.
- [0016] 본 발명은
- [0017] 가) 소태나무 (*Picrasma quassioides*)를 추출 용매에 침지하고 초음파로 추출하는 단계; 및
- [0018] 나) 상기 초음파로 추출한 소태나무 추출물을 원심분리하고 분리한 상등액을 여과하는 단계;로부터 수득되며, 수용성 용매로 열수 추출한 대조군 소태나무 추출물 대비 허킨노린 (Herkinorin)이 10~50배, 아세토제닌 (Acetogenin)이 1.2~5배 함유된 초음파 소태나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부장벽 개선 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 상기 가) 단계의 추출 용매는 수용성 용매이면 특별한 제한은 없으나, 바람직하게는 정제수, 수용성 알콜 등을 들 수 있다.
- [0020] 상기 나) 단계의 수용성 용매는 특별한 제한은 없으나, 바람직하게는 정제수, 수용성 알콜 등을 들 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 나) 단계 이후 다) 여과한 상등액을 감압농축 및/또는 동결건조하는 단계;가 부가된, 피부장벽 개선 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 또한, 본 발명에서 상기 가) 단계의 추출시 추출용매는 주정 알코올이 40~95% (v/v) 함유된 수용액인 것을 특징으로 한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 초음파 소태나무 추출물의 함량이 화장료 조성물 전체에 대해 0.001~30.0중량%인, 피부장벽 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [0024] 또한, 본 발명에서 상기 감압농축 또는 동결건조된 추출물은 정제수 및 주정 알코올 중 선택되는 어느 하나 이상의 용매에 0.001~30.0중량% 용해된 것인, 피부장벽 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [0025] 또한, 본 발명에서 상기 가) 초음파로 추출하는 단계는 소태나무를 추출용매에 침지한 후 초음파를 2~5회 반복 처리하여 추출하는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 또한, 본 발명에서 상기 초음파 소태나무 추출물은 필라그린 발현량 및 로리크린 발현량을 H₂O₂ 처리군에 비하여 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 또한, 본 발명의 상기 초음파 소태나무 추출물은 SOD-1, HO-1 및 카탈레이즈 활성을 H₂O₂ 처리군에 비하여 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 또한, 본 발명의 상기 초음파 소태나무 추출물은 HAS2 및 아쿠아포린-3 발현량을 H₂O₂ 처리군에 비하여 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [0029] 또한, 본 발명의 상기 초음파 소태나무 추출물은 발명의 설명 중 표 4의 조건으로 수행한 Pyro-GC-MS 분석 결과 체류 시간 (retention time) 4.30분 데카메틸-사이클로페타실록산 (decamethyl-cyclopentasiloxane), 5.25분 1,2-사이클로페탄다이온 (1,2-cyclopentanedione), 26.445분 숙신산 (succinic acid), 28.225분 1-메틸-9H-피리도[3,4b]인돌 (1-methyl-9H-pyrido[3,4b]indole), 29.37분 n-노나데카놀-1 (n-nonadecanol-1), 29.535분 메틸 10-트랜스-12-시스-옥타데카디에노에이트 (methyl 10-trans-12-cis-octadecadienoate), 32.405분 7-메톡시-5(10H)-피리도[3,4b]퀴놀론 (7-methoxy-5(10H)-pyrido[3,4b]quinolone), 33.23분 1,3-다이아미노-7-메틸벤조

[f]퀴나졸린 (1,3-diamino-7-methylbenzo[f]quinazoline), 35.585분 헥사노익산 (hexanoic acid), 39.23분 (13,14-디메톡시-1,8-다이아자테트라사이클로[7.7.0.0(2,7).0(10,15)] 헥사데카-2(7),3,5,8,10(15),11,13-헵탄-16-온) (13,14-demethoxy-1,8-diazatetracyclo [7.7.0.0(2,7).0(10,15)] hexadeca-2(7),3,5,8,10(15),11,13-heptane-16-one), 41.555분 3-부텐-2-온 (3-buten-2-one), 46.9분 에르고스트-5-엔-3-올 (ergost-5-en-3-ol) 및 53.03분 에르고스타-5,24(28)-다이엔-3-올 (ergosta-5,24(28)-dien-3-ol)의 성분을 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명의 초음파 소태나무 추출물은 필라그린, 로리크린, HAS-1 및 아쿠아포린-3의 발현 증가에 의한 피부장벽 개선 및 보습효과를 나타낸다.
- [0032] 본 발명의 초음파 소태나무 추출물은 주정 수용액으로 추출한 소태나무 추출물에서 발견되지 않는 성분들 (도 3a 참조)을 포함하고 있어 피부장벽, 항산화 활성 및 보습 효과의 증대에 유용하다.
- [0033] 따라서, 본 발명의 초음파 소태나무 추출물은 피부 화장품으로 이용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 소태나무 추출물과 초음파 소태나무 추출물의 UV 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 소태나무 추출물과 초음파 소태나무 추출물의 총 이온 크로마토그램 (Total ion chromatogram)이다.
- 도 3은 소태나무 추출물과 초음파 소태나무 추출물의 Pyro-GC-MS 크로마토그램이다.
- 도 4는 초음파 소태나무 추출물의 항산화 효소 발현 촉진효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 초음파 소태나무 추출물의 피부장벽 개선 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 초음파 소태나무 추출물의 피부보습 개선 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 좀 더 구체적으로 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명의 예시적인 기재일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

비교예 1: 소태나무 추출물의 제조

- [0039] 세절하여 음건한 소태나무 500g을 뜨거운 70% (v/v) 주정 알코올 수용액으로 2시간씩 3회 환류추출하고 냉침한 후, 왓만 (Whatman) #5 여과지로 여과하였다. 여과된 추출물을 50℃ 이하에서 감압농축 및 동결건조한 후 37.4g의 소태나무 추출물을 얻었다.

실시예 1: 초음파 소태나무 추출물의 제조

- [0042] 세절하여 음건한 소태나무 500g을 70% (v/v) 주정 알코올 수용액에 1시간 침지한 후 초음파 추출기 (SJC-II, Greenapple, Uhan, China)를 사용하여 20kHz의 초음파를 발생시켜 상온에서 30분씩 3회 반복 추출하였다. 추출물을 4℃에서 원심분리 (5,000rpm, 30분)하고, 그 상등액을 왓만 (Whatman) #5 여과지로 여과하였다. 여과된 추출물을 50℃ 이하에서 감압농축 및 동결건조한 후 65.0g의 초음파 소태나무 추출물을 얻었다.

실험예 1: 초음파 소태나무 추출물과 소태나무 추출물에 함유된 주요 성분의 함량 비교

- [0045] 본 실험예 1에서는 상기 비교예 1에서 제조된 소태나무 추출물과 실시예 1에서 제조된 초음파 소태나무 추출물

의 주요 성분의 함량을 LC-ESI-Q-TOF MS 분석을 통하여 비교하였다.

[0046]

C18 역상 컬럼과 Electrospray 이온화 방식을 사용하였으며, 측정된 adduct m/z 값과 MS/MS 패턴의 m/z 값을 이용하여 C, H, O, N으로 구성된 분자식 및 물질 구조를 추정하였다. 측정된 adduct m/z 값을 이용해 피크 면적을 평가하여 주요 성분의 함량을 비교하였다. 샘플은 메탄올 (MS grade)로 10배 희석한 다음 0.45 μ m 실린지로 필터한 후 분석하였다. LC-ESI-TOF 분석의 LC/MS 조건과 LC 이동상 조성 및 시간에 따른 농도구배 조건은 표 1과 2에 나타내었으며, 분석결과는 도 1, 2와 표 3에 나타내었다.

표 1

[0047]

LC condition	MS condition
Flow rate : 0.5mL/min	Mode : Positive
Mode : Gradient	m/z scan range : 50~2000
Mobile phase : DW(0.1% Formic acid) : ACN (0.1% Formic acid)	Ion source gas 1, 2 : 50 psi
Column temperature : 25℃	Curtain gas : 30
Analyzing time : 75 min	CAD : 7
Column : C18	Temperature : 450℃
Injection volume : 10 μ L	DP : 50
Detection wavelength : 254 nm	CE : 35

표 2

[0049]

Step #	Time (min)	% Solvent A (Water+0.1% Formic acid)	% Solvent B (ACN+0.1% Formic acid)
1	0	95	5
2	20	70	30
3	40	80	20
4	60	5	95
5	70	95	5
6	75	95	5

[0051]

표 3에 나타난 바와 같이 adduct m/z 값을 이용하여 피크 면적을 평가하였을 때 소태나무 추출물에 비해 허킨노린 (Herkinorin)은 22.8배, 아세토제닌 (Acetogenin)은 2배 정도 초음파 소태나무 추출물에 더 많이 함유된 것으로 나타났다.

표 3

[0052]

Compound	m/z of adduct	Peak area	Mother ion --> Daughter ion	Sample
Herkinorin	495.2014	2,099,000	495.201-->253.0976, 267.1132, 243.1136	초음파 소태나무 추출물
	495.2008	91,910	495.201-->253.0967, 243.1134	소태나무 추출물
Acetogenin	471.3309	51,040,000	471.331-->89.0587, 57.0693, 121.0637, 233.1891	초음파 소태나무 추출물
	471.3309	26,830,000	471.331-->89.0589, 57.0695, 121.0639, 233.1892	소태나무 추출물

[0054]

위 결과로부터 단순 추출에 의해 제조된 소태나무 추출물에 비하여 초음파 추출기술에 의해 제조된 초음파 소태나무 추출물에서 특정 성분의 함량을 증가시킬 수 있다는 사실을 확인하였고, 이를 바탕으로 초음파 소태나무 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 피부장벽 개선용 화장료 조성물을 제조하였다.

[0056] **실험예 2: 초음파 소태나무 추출물과 소태나무 추출물에 함유된 성분 비교**

[0057] 본 실험예 1에서는 상기 비교예 1에서 제조된 소태나무 추출물과 실시예 1에서 제조된 초음파 소태나무 추출물의 성분을 Pyro-GC-MS 분석법으로 비교하였다.

[0058] DB-5 컬럼과 Electron impact 이온화 방식을 사용하였으며, 측정된 피크들의 화학구조는 NIST Library 기반으로 동정하였다. Pyro-GC-MS 분석의 GC/MS 조건과 열분해 (Pyrolysis) 조건은 표 4와 5에 나타내었으며, 분석결과는 도 3에 나타내었다.

표 4

[0059]

GC condition	MS condition
Column : DB-5	Ion source temperature : 200℃
Column temperature : 50℃	Interface temperature : 250℃
Final temperature : 320℃, 3 min hold	Mode : Scan
Injector temperature : 250℃	Solvent cut time : 2 min
Injection mode : Split	Start time : 3 min
Column flow : 1.0 mL/min	End time : 54 min
Split ratio : 50.0	Start <i>m/z</i> : 50.00
Temperature rising: 50℃ --> 120℃ (5℃/min, hold 3 min) --> 230℃ (10℃/min, hold 3 min) --> 320℃ (5℃/min, hold 5 min)	End <i>m/z</i> : 700.00

표 5

[0061]

Furnance temperature	500℃
Time	1.00 min
Interface	150℃
Mode	Single-Shot analysis

[0063] 도 3에 나타난 바와 같이 Pyro-GC-MS 분석 결과 체류 시간 (retention time) 4.30분 데카메틸-사이클로페타실록산 (decamethyl-cyclopentasiloxane), 5.25분 1,2-사이클로페탄다이온 (1,2-cyclopentanedione), 26.445분 숙신산 (succinic acid), 28.225분 1-메틸-9H-피리도[3,4b]인돌 (1-methyl-9H-pyrido[3,4b]indole), 29.37분 n-노나데카놀-1 (n-nonadecanol-1), 29.535분 메틸 10-트랜스-12-시스-옥타데카디에노에이트 (methyl 10-trans-12-cis-octadecadienoate), 32.405분 7-메톡시-5(10H)-피리도[3,4b]퀴놀론 (7-methoxy-5(10H)-pyrido[3,4b]quinolone), 33.23분 1,3-다이아미노-7-메틸벤조[f]퀴나졸린 (1,3-diamino-7-methylbenzo[f]quinazoline), 35.585분 헥사노익산 (hexanoic acid), 39.23분 (13,14-디메톡시-1,8-다이아자테트라사이클로[7.7.0.0(2,7).0(10,15)] 헥사데카-2(7),3,5,8,10(15),11,13-헵탄-16-온) (13,14-demethoxy-1,8-diazatetracyclo[7.7.0.0(2,7).0(10,15)] hexadeca-2(7),3,5,8,10(15),11,13-heptane-16-one), 41.555분 3-부텐-2-온 (3-buten-2-one), 46.9분 에르고스트-5-엔-3-올 (ergost-5-en-3-ol) 및 53.03분 에르고스타-5,24(28)-다이엔-3-올 (ergosta-5,24(28)-dien-3-ol)에 비교예 1의 소태나무 추출물에서는 검출되지 않는 성분들이 초음파 소태나무 추출물에서 발견되었다.

[0064] 위 결과로부터 단순 추출에 의해 제조된 소태나무 추출물에서는 검출되지 않는 성분들이 초음파 추출기술에 의해 제조된 초음파 소태나무 추출물에서 발견되는 것으로 보아 추출방식에 따라 새로운 성분들이 추출됨을 확인할 수 있었고, 이를 바탕으로 초음파 소태나무 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 피부장벽 개선용 화장품 조성물을 제조하였다.

[0066] **실험예 3: 항산화 효과**

[0067] 본 실험에는 실시예 1에서 수득한 시료의 항산화 효과를 평가하기 위하여 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 및 ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 라디칼 소거능을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성 측정은 96 웰 플레이트에 시료를 농도별로 취한 다음 실험군에는 DPPH를, 대조군에는 메탄올을 첨가하여 20분간 교반한 후 560nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거활성 측정은 7mM ABTS와 2.45mM 과황산칼륨 (potassium persulfate)을 어두운 곳에서 24시간 반응하여 라디칼을 형성시켜 ABTS 스톡 용액을 제조하였다. 이후 증류수로 희석시키고 시료를 첨가하여 10분간 반응시킨 후 415nm에서 흡광도를 측정하였다. 아스코빅산과 BHA (butylated hydroxyanisole)를 양성 대조군으로 사용하였다. 시료의 라디칼 소거활성은 라디칼을 50% 저해하는 시료의 농도인 SC₅₀값으로 비교하였다.

표 6

시료명	SC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	DPPH 라디칼 소거활성	ABTS 라디칼 소거활성
비교예 1	30.1	7.49
실시예 1	25.2	6.5
L-ascorbic acid	2.66	-
BHA	-	0.78

[0069] DPPH 라디칼과 ABTS 라디칼 소거활성을 통하여 시료의 항산화 효과를 측정한 결과 (표 6), 실시예 1의 추출물이 비교예 1의 추출물보다 라디칼 소거활성이 약 1.2배 정도 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0071] 실험예 4: 항산화 효소 관련 단백질 발현 촉진효과

[0072] 본 실험에는 실시예 1에서 수득한 시료가 항산화 효소 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 항산화 효소 단백질인 SOD-1, HO-1 및 카탈레이즈의 발현량 변화를 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 먼저 시료를 농도별로 처리해 24시간 동안 배양한 HaCaT 세포 내 단백질을 passive lysis buffer로 추출한 후, 세포 용해물의 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준물질로 하고, BCA 단백질 분석 키트를 사용하여 측정하였다. 단백질 30 μg 을 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis)로 분리한 후, 나이트로셀룰로스 막 (nitrocellulose membrane)에 분리된 단백질을 블롯팅하였다. 그 후 막을 마우스 단일클론 SOD-1 항체 (1:500 희석), 토끼 단일클론 HO-1 항체 (1:500 희석), 마우스 단일클론 카탈레이즈 항체 (1:500 희석)와 4℃에서 반응시켰다. 그 후 막을 세척하고 HRP-결합 이차 항체와 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 단백질 발현은 ECL (enhanced chemiluminescence) 탐지 시스템 (AI680, GE healthcare, Uppsala, Sweden)을 이용하여 분석하였다.

[0073] 실시예 1에서 수득한 시료가 항산화 효소 단백질 발현에 미치는 영향을 측정한 결과 도 4에 나타난 바와 같이 H₂O₂ 처리군에 비하여 SOD-1은 약 2~2.1배, HO-1은 약 1.7~2배, 카탈레이즈는 약 1.6~2배 정도로 발현량이 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 본 발명에 따른 초음파 소태나무 추출물은 항산화 효소 발현 증가를 통하여 활성 산소종을 소거함으로써 항산화 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

[0075] 실험예 5: 피부장벽 개선 관련 단백질 발현 촉진효과

[0076] 본 실험에는 실시예 1에서 수득한 시료가 피부장벽 개선에 미치는 영향을 평가하기 위하여 피부장벽의 구성 단백질인 필라그린 및 로리크린의 발현량 변화를 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 먼저 시료를 농도별로 처리해 24시간 동안 배양한 HaCaT 세포 내 단백질을 passive lysis buffer로 추출한 후, 세포용해물의 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준물질로 하고, BCA 단백질 분석 키트를 사용하여 측정하였다. 단백질 30 μg 을 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis)로 분리한 후, 나이트로셀룰로스 막에 분리된 단백질을 블롯팅하였다. 그 후 막을 마우스 단일클론 항-필라그린 항체 (1:200 희석)와 토끼 단일클론 항-로리크린 항체 (1:1000 희석)와 4℃에서 반응시켰다. 그 후 막을 세척하고 HRP-결합 이차 항체와 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 단백질 발현은 ECL (enhanced chemiluminescence) 탐지 시스템 (AI680, GE healthcare, Uppsala, Sweden)을 이용하여 분석하였다.

[0077] 실시예 1에서 수득한 시료가 피부장벽 구성 단백질 발현에 미치는 영향을 측정한 결과 도 5에 나타난 바와 같이

필라그린과 로리크린의 발현량이 H_2O_2 처리군에 비하여 필라그린은 약 1.4~2.2배, 로리크린은 약 1.4배 정도로 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 본 발명에 따른 초음파 소태나무 추출물은 피부장벽 구성에 핵심적인 단백질 중 필라그린과 로리크린의 발현을 증가시켜 피부장벽 개선효과를 가지는 것으로 확인되었다.

[0079]

실험예 6: 피부보습 관련 단백질 발현 촉진효과

[0080]

본 실험예는 실시예 1에서 수득한 시료가 피부보습에 미치는 영향을 평가하기 위하여 피부수분 유지를 담당하는 단백질인 HAS2 및 아쿠아포린-3의 발현량 변화를 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 먼저 시료를 농도별로 처리해 24 시간 동안 배양한 HaCaT 세포 내 단백질을 passive lysis buffer로 추출한 후, 세포용해물의 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준물질로 하고, BCA 단백질 분석 키트를 사용하여 측정하였다. 단백질 30 μ g을 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis)로 분리한 후, 나이트로셀룰로스 막에 분리된 단백질을 블로팅하였다. 그 후 막을 마우스 단일클론 HAS2 항체 (1:200 희석)와 마우스 단일클론 아쿠아포린-3 항체 (1:100 희석)와 4℃에서 반응시켰다. 그 후 막을 세척하고 HRP-결합 이차 항체와 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 단백질 발현은 ECL (enhanced chemiluminescence) 탐지 시스템 (AI680, GE healthcare, Uppsala, Sweden)을 이용하여 분석하였다.

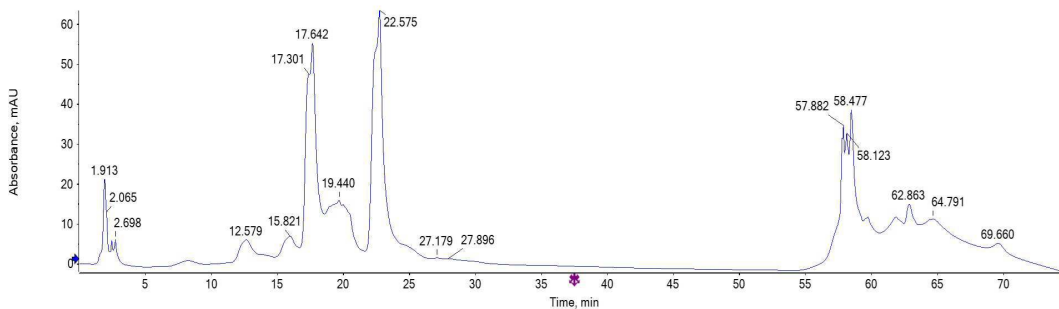
[0081]

실시예 1에서 수득한 시료가 피부수분 유지 단백질 발현에 미치는 영향을 측정한 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 HAS2와 아쿠아포린-3의 발현량이 H_2O_2 처리군에 비하여 HAS2는 약 2.2~2.7배, 아쿠아포린-3는 약 1.2~1.4배 정도로 증가하였으며, 이러한 효과는 농도 의존적으로 나타났다. 따라서 본 발명에 따른 초음파 소태나무 추출물은 피부수분 유지에 핵심적인 단백질 중 HAS-2과 아쿠아포린-3의 발현을 증가시켜 피부보습 개선효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

도면

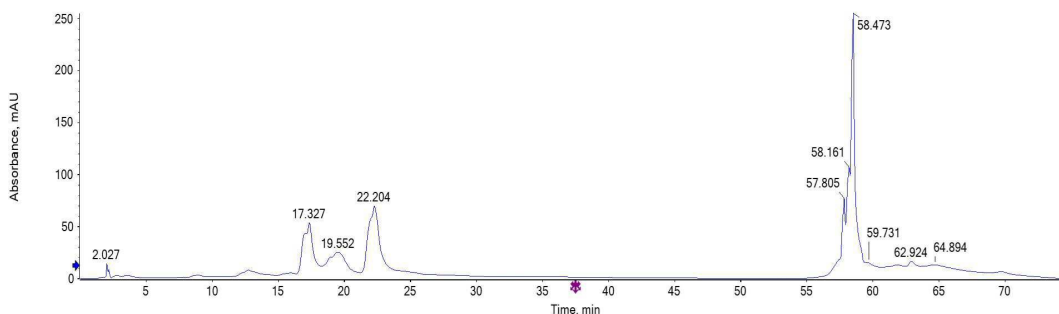
도면 1a

<실시예1>



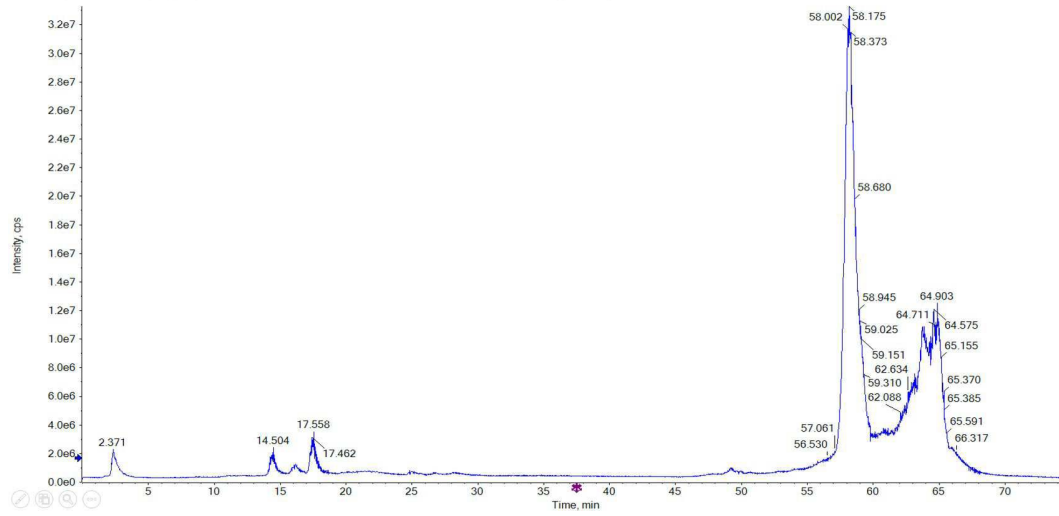
도면 1b

<비교예1>



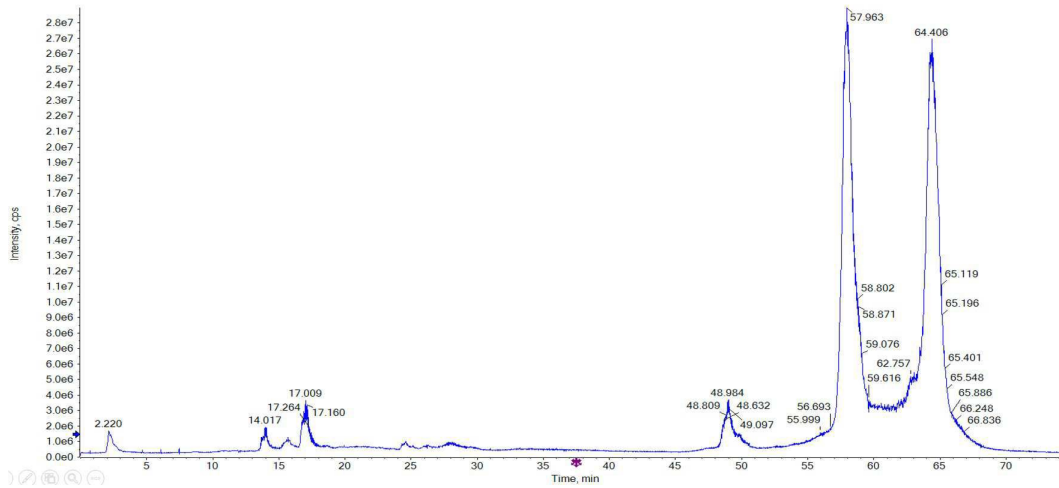
도면2a

<실시예1>



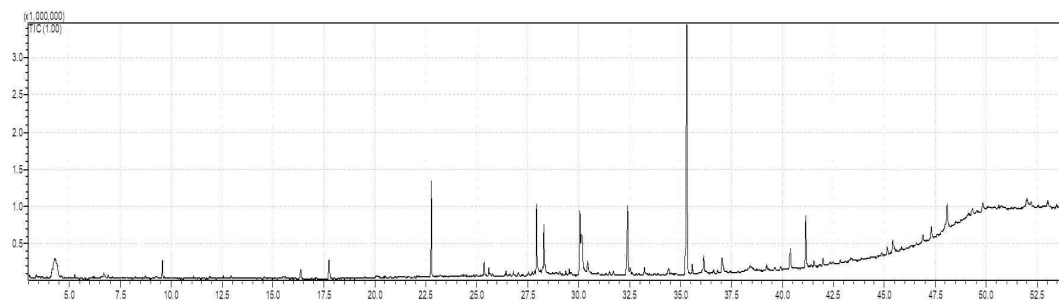
도면2b

<비교예1>



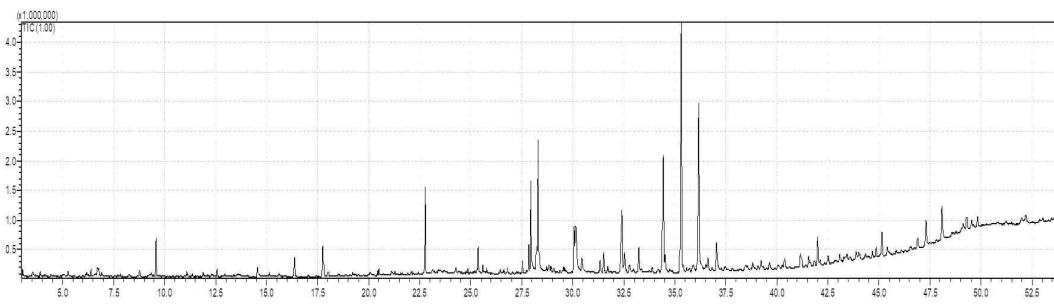
도면3a

<실시예1>

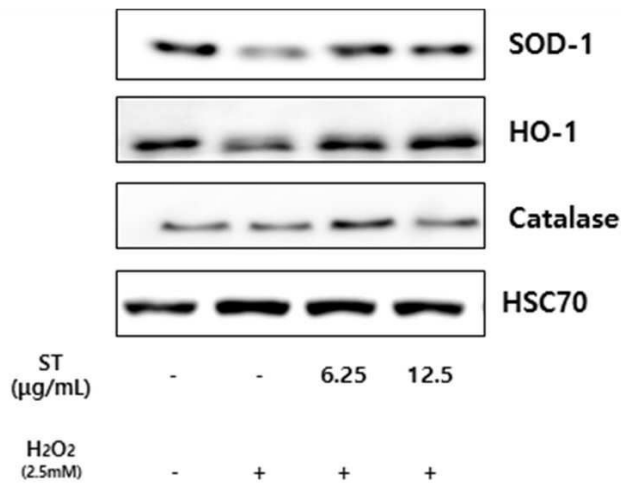


도면3b

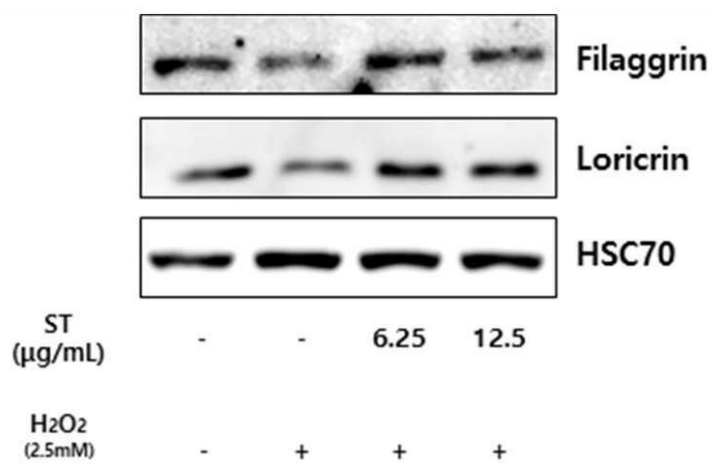
<비교예1>



도면4



도면5



도면6

