



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년12월18일
(11) 등록번호 10-1930264
(24) 등록일자 2018년12월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0082187
(22) 출원일자 2018년07월16일
심사청구일자 2018년07월16일
(56) 선행기술조사문헌
JP2014172905 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
주식회사 코스메카코리아
충청북도 음성군 대소면 대금로196번길 17-12
(주)더마랩
강원도 원주시 문막읍 문막공단길 231
(72) 발명자
조현대
충청북도 청주시 흥덕구 장구봉로26번길 12, 302호(가경동)
서재용
충청북도 청주시 청원구 오창읍 창리1길 7-5, 302호(금정2차아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
권혁철

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 이현석

(54) 발명의 명칭 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔갓나무 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 피지생성 억제 및 여드름 개선용 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔갓나무 복합추출물을 함유하는 화장품 조성물에 관한 것으로, 상기 유효성분으로서의 복합추출물은 천연 추출물로 이루어져 부작용과 피부 자극성이 적으며 우수한 피지생성 억제 및 여드름 개선 효과를 나타낸다.

- | | |
|--|--|
| <p>(52) CPC특허분류
A61K 2800/59 (2013.01)</p> <p>(72) 발명자
정주태
충청북도 진천군 진천읍 문화2길 36, 105동 1501호(진천 1차 대명루첸 아파트)</p> <p>신정원
경기도 성남시 분당구 구미로159번길 8, 비동 302호(구미동, 동부썬빌라)</p> <p>유지수
경기도 군포시 금당로 102, 102동 1305호(당동, 삼성미도아파트)</p> <p>어서린
강원도 원주시 문막읍 건등로 20-20, 303호</p> <p>이대우
강원도 원주시 무실로 415, 203동 1903호(무실동, 세영리첸2차아파트)</p> <p>김다애
강원도 원주시 문막읍 건등로 67, 104동 903호(원주문막극동스타클래스)</p> | <p>(56) 선행기술조사문헌
KR1020000001148 A
KR1020080099965 A
KR1020090055243 A
KR1020100111791 A</p> |
|--|--|
-

명세서

청구범위

청구항 1

현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔갓나무를 70% 에탄올 수용액 용매로 추출한 후, 가수분해효소인 β -글루코시다아제로 가수분해하여 제조되는 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔갓나무 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 피지생성 억제 및 여드름 개선용 화장료 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 복합추출물은 70% 에탄올 수용액 용매로 추출한 후, 가수분해효소인 β -글루코시다아제로 가수분해하여 제조되는 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔갓나무의 추출물이 각각 1~2 : 1~2 : 1~2 : 1~2 : 1~2 : 1~2 : 1~2의 중량비율로 혼합되어 이루어지는 것임을 특징으로 하는 피지생성 억제 및 여드름 개선용 화장료 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 복합추출물은 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 0.01~10 중량% 포함되는 것임을 특징으로 하는 피지생성 억제 및 여드름 개선용 화장료 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔갓나무 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 피지생성 억제 및 여드름 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 여드름이란 모낭에 붙어있는 피지선에 염증이 발생하는 피부 질환을 말하며 주로 얼굴, 목, 가슴, 등, 어깨 부위에 발생한다. 여드름의 발생원인은 크게 남성호르몬의 증가, 피지 분비의 증가, 모낭의 협착, 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)의 증식 등이 있다. 여드름의 정확한 원인은 밝혀져 있지 않으나 여러 원인이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 여드름은 남성호르몬에 의해 활성화되며, 특히 남성호르몬인 테스토스테론이 피지선을 커지게 하여 피지 분비를 과도하게 증가시킨다. 피지는 모공을 통해 피부 밖으로 배출되는데, 피지 분비가 많아지면 모낭의 내벽을 자극하여 내벽세포의 과각화(過角化)를 유도한다. 탈락한 세포들은 엉겨서 모공을 폐쇄하고 모낭 내 피지가 배출되지 못하고 면포를 형성하여 염증으로 이어진다.

[0004] 또한 여드름은 모낭 내에 상주하는 세균인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)에 의해 악화된다. 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)는 과잉 분비된 피지에 의해 생장이 촉진되고 지방분해 효소를 분비하여 피지를 구성하는 트리글리세라이드(*Triglyceride*)를 분해한다. 이에 따라 자유 지방산(*free fatty acid*)이 형성되고 모낭을 자극하여 여드름 생성을 촉진시키고 염증반응까지 수반하게 된다.

[0005] 여드름을 완화시키기 위해서는 비정상적인 남성호르몬의 분비를 제어하거나 과잉 피지 분비 감소, 분비된 피지 제거를 통해 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) 증식을 억제, 피부 각질 제거를 통한 모낭 협착을 예방하는 방법이 있다.

[0006] 종래 여드름을 치료하기 위해 호르몬제 및 화합물 제제를 사용하고 있는데 초기 치료에는 효과적이지만 내성이 생기고 당뇨, 고혈압, 소화성궤양, 면역기능 저하 등 부작용이 발생하는 문제점이 있다.

[0007] 본 발명자들은 부작용과 피부 자극이 적고 효과적인 여드름용 화장료 조성물을 개발하기 위하여 여러 천연물을 조사하였으며, 항균 및 항염 효과를 갖는 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔жат나무 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물이 피지생성 억제 및 여드름 개선 효과가 우수함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) (0001) 대한민국 공개특허 제2009-0055243호 (2009.06.02)

(특허문헌 0002) (0002) 대한민국 공개특허 제2014-0069470호 (2014.06.10)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동초, 개박하 및 솔жат나무의 복합추출물을 유효성분으로 함유하여 우수한 피지생성 억제 효과 및 여드름 개선효과를 나타내는 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따르면, 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔жат나무 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 피지생성 억제 및 여드름 개선용 화장료 조성물이 제공된다.

[0011] 상기 복합추출물은 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔жат나무를 열수 추출하거나, 물, 탄소수 1~4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 부틸렌글리콜로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 용매로 추출한 후, 가수분해효소, 더욱 바람직하게는 β -글루코시다아제로 가수분해하여 제조되는 것이다.

[0012] 상기 복합추출물은 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔жат나무의 추출물이 각각 1~2 : 1~2 : 1~2 : 1~2 : 1~2 : 1~2 : 1~2의 중량비율로 혼합되어 이루어진다.

[0013] 상기 복합추출물은 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 0.01~10 중량% 포함된다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔жат나무 복합추출물은 천연 추출물로 이루어져 부작용과 피부 자극성이 적으며 우수한 피지생성 억제 및 여드름 개선 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명은 현호색을 포함하는 7가지의 천연추출물을 유효성분으로 함유하는 피지생성 억제 및 여드름 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0017] 현호색(Corydalis Turtschaninovii)은 산과 들에서 자라는 여러해살이풀로 땅 속에 지름 1 cm의 덩이줄기가 있다. 한방에서는 덩이줄기를 약용으로 사용하며 진경제 및 진통제로 사용한다. 본 발명에서는 현호색의 전초, 덩이줄기, 뿌리를 사용하며, 바람직하게는 뿌리를 사용한다.

[0018] 캣츠클로(Uncaria Tomentosa)는 주로 중남미에서 자라며, 원주민들은 전통적으로 뿌리와 줄기껍질을 약용으로 사용해왔다. 캣츠클로우의 껍질에서 열수추출 또는 알콜추출로 얻은 성분은 진통, 항염, 항균작용에 효과가 높

은 것으로 알려졌다. 본 발명에서는 캣츠클로의 전초, 나무껍질, 잎, 뿌리를 사용하며, 바람직하게는 전초를 사용한다.

[0019] 센티드제라늄(Pelargonium Graveolens)은 마다가스카르가 원산지이고 신경안정제, 소염제, 이뇨제 등의 약제로 쓰인다. 피지분비 조절, 피부 정화에 효과가 있다. 본 발명에서는 센티드제라늄의 전초, 꽃, 잎, 줄기를 사용하며, 바람직하게는 전초를 사용한다.

[0020] 아그리모니(Agrimonia Eupatoria)는 미국과 캐나다 등지에서 원주민들이 약용으로 많이 활용하였고 탄닌, 고미질, 정유 등이 풍부하다. 차로 만들어 음료로 상용하면 정혈 효과, 감기 예방에 효과가 있다고 하며 항염, 항산화 기능이 강한 것으로 알려져 있다. 본 발명에서는 아그리모니의 전초, 꽃, 잎, 뿌리를 사용하며, 바람직하게는 전초를 사용한다.

[0021] 인동덩굴(Lonicera Caprifolium, Honeysuckle)은 금은화 또는 허니서클이라고도 하며 동아시아에 주로 분포한다. 해열, 해독, 항균, 항염증 작용이 있어 염증, 전염성 질환의 치료제로 쓰여 왔다. 본 발명에서는 인동덩굴의 전초, 꽃을 사용하며, 바람직하게는 전초를 사용한다.

[0022] 개박하(Nepeta Cataria)는 캣뇨 또는 캣민트라라고도 불리며 우리나라 전역에 나며, 일본, 중국, 중앙아시아, 아프리카, 유럽, 북미 등에 분포한다. 통증완화, 해열 작용이 있다. 본 발명에서는 개박하의 전초, 잎을 사용하며, 바람직하게는 전초를 사용한다.

[0023] 솔잣나무(Cupressus Sempervirens)는 원산지가 한국, 중국, 일본, 러시아로 동북아시아 지역이며 약리학적으로 고혈압, 중풍, 당뇨, 항암효과, 빈혈, 숙취해소, 피부미용, 체질개선 등 광범위하게 사용된다. 본 발명에서는 솔잣나무의 잎, 줄기, 껍질을 사용하며, 바람직하게는 잎을 사용한다.

[0024] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔잣나무 복합추출물은 다음과 같은 방법에 의하여 제조된다. 먼저 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔잣나무를 열수추출하거나, 물, 탄소수 1~4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 부틸렌글리콜로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 용매로 추출하여 추출물을 제조한다. 추출은 통상의 방법에 따라 이루어지며, 바람직하게는 초음파 추출이 병행될 수 있다.

[0025] 이어서, 상기 추출물을 가수분해효소, 바람직하게는 β -글루코시다아제로 가수분해하여 추출물을 제조한다.

[0026] 상기 복합추출물은 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔잣나무의 추출물이 각각 1~2 : 1~2 : 1~2 : 1~2 : 1~2 : 1~2 : 1~2의 중량비율로 혼합되어 이루어지며, 가장 바람직하게는 1 : 2 : 2 : 1 : 2 : 1 : 1의 중량비율로 혼합되어 이루어진다. 본 발명에 있어서, 상기 복합추출물은 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔잣나무를 혼합한 후 추출 제조된 것이거나, 각각의 추출물을 제조한 후 혼합하여 제조되는 추출물일 수 있다.

[0027] 상기 복합추출물은 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 0.01~10 중량% 포함된다.

[0028] 유효성분으로서의 상기 현호색, 캣츠클로, 센티드제라늄, 아그리모니, 인동덩굴, 개박하 및 솔잣나무 복합추출물은 각각의 추출물들에 비하여 그 상승작용에 의하여 염증매개인자 발현 억제효과(시험예 2), 피지생성 억제효과(시험예 3, 4), 프로피오니박테리움 아크네스(Propionibacterium acnes)에 대한 항균 효과(시험예 5)가 우수한 것을 확인하였다.

[0029] 본 발명의 화장료 조성물은 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조 될 수 있으며, 그 예로는 화장수, 크림, 에센스, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 바디 로션, 바디 오일, 바디 젤, 샴푸, 린스, 헤어 컨디셔너, 헤어 젤, 파운데이션, 립스틱, 마스크라, 메이크업 베이스 등을 들 수 있다.

[0030] [실시예]

[0031] 이하, 하기의 실시예와 시험예들을 통하여 본 발명을 상세하게 설명하지만, 본 발명이 이 예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0033] 제조예 1: 현호색 추출물의 제조

[0034] 현호색 뿌리를 정제수로 세척한 뒤 건조하고, 추출용매로서 70% 함수 에탄올 5배 중량을 넣고 냉각 콘텐서가 달린 추출기(Cosmos-660, 경서기계)에서 80~100℃로 가열하여 2 시간씩 총 3회 추출하였다.

[0035] 위의 방법으로 추출한 뒤 3일간 실온에서 방치하여 침전물을 300메쉬 여과지로 여과하고, 침전물을 에드벤텍 5

번 여과지와 와트만 GFC 150mm 여과지로 2번 여과하였다. 그리고 감압 농축기(Coolace CCA-1100, EYELA)를 이용하여 40℃~50℃의 온도에서 농축한 후 스프레이 드라이어(B-290, BUCHI사)를 이용하여 인렛(Inlet) 온도 180℃, 흡입기(Aspirator) 효율 100%(35cm³/시간), 펌프(Pump) 효율 25%(7.5ml/분), 노즐클리너 4(Nozzle Cleaner 4) 및 유량계(Rotameter):30mm(357리터/시간)의 조건으로 건조시켜 표제의 추출분말 10g을 얻었다.

[0036]

제조예 2: 캣츠클로 추출물의 제조

[0037]

캣츠클로 전초를 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 추출하여 캣츠클로 추출물을 제조하였다.

[0038]

제조예 3: 센티드제라늄 추출물의 제조

[0040]

센티드제라늄 전초를 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 추출하여 센티드제라늄 추출물을 제조하였다.

[0041]

제조예 4: 아그리모니 추출물의 제조

[0043]

아그리모니 전초를 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 추출하여 아그리모니 추출물을 제조하였다.

[0044]

[0045]

제조예 5: 인동덩굴 추출물의 제조

[0046]

인동덩굴 전초를 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 추출하여 인동덩굴 추출물을 제조하였다.

[0047]

제조예 6: 개박하 추출물의 제조

[0049]

개박하 전초를 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 추출하여 개박하 추출물을 제조하였다.

[0050]

제조예 7: 솔갓나무 추출물의 제조

[0052]

솔갓나무 전초를 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 추출하여 솔갓나무 추출물을 제조하였다.

[0053]

[0054]

제조예 8 : 현호색 효소 추출물의 제조

[0055]

현호색 뿌리를 정제수로 세척한 뒤 건조하고, 추출용매로서 5배 중량에 해당하는 70% 함수 에탄올에 침지하여 48시간 동안 swelling을 한 후, 초음파기기를 이용하여 25KHz의 강도로 30℃에서 15분, 3회 반복 조건으로 처리하였다.

[0056]

위의 방법으로 추출한 뒤 3일간 실온에서 방치하여 침전물을 300메쉬 여과지로 여과하고, 침전물을 에드벡 5번 여과지와 와트만 GFC 150mm 여과지로 2번 여과하였다. 그리고 감압 농축기(Coolace CCA-1100, EYELA)를 이용하여 40℃~50℃의 온도에서 농축한 후 스프레이 드라이어(B-290, BUCHI사)를 이용하여 인렛(Inlet) 온도 180℃, 흡입기(Aspirator) 효율 100%(35cm³/시간), 펌프(Pump) 효율 25%(7.5ml/분), 노즐클리너 4(Nozzle Cleaner 4) 및 유량계(Rotameter):30mm(357리터/시간)의 조건으로 건조시켜 표제의 추출분말 10g을 얻었다.

[0057]

상기 현호색 추출물의 추출분말 10g을 아세트이트 버퍼(acetate buffer, pH 4.0) 500ml와, β-글루코시다아제 효소 25ml를 넣어 55℃에서 100rpm으로 4시간 동안 반응시켰다. 다음으로 90℃로 5분간 가온하여 효소 반응을 완료한 후 반응물을 진공 농축하였다. 농축물은 60℃에서 30시간 건조하였다. 위의 방법으로 추출한 뒤 3일간 실온에서 방치하여 침전물을 300메쉬 여과지로 여과하고, 침전물을 에드벡 5번 여과지와 와트만 GFC 150mm 여과지로 2번 여과하였다. 그리고 감압 농축기(Coolace CCA-1100, EYELA)를 이용하여 40℃~50℃의 온도에서 농축한 후 스프레이 드라이어(B-290, BUCHI사)를 이용하여 인렛(Inlet) 온도 180℃, 흡입기(Aspirator) 효율 100%(35cm³/시간), 펌프(Pump) 효율 25%(7.5ml/분), 노즐클리너 4(Nozzle Cleaner 4) 및 유량계(Rotameter): 30mm(357리터/시간)의 조건으로 건조시켜 현호색 효소추출물을 얻었다.

[0058]

제조예 9 : 캣츠클로 효소 추출물의 제조

[0060]

캣츠클로 전초를 상기 제조예 8과 동일한 방법으로 추출하여 캣츠클로 효소 추출물을 제조하였다.

[0061]

제조예 10: 센티드제라늄 효소 추출물의 제조

[0063]

센티드제라늄 전초를 상기 제조예 8과 동일한 방법으로 추출하여 센티드제라늄 효소 추출물을 제조하였다.

[0064]

[0066] 제조예 11: 아그리모니 효소 추출물의 제조

[0067] 아그리모니 전초를 상기 제조예 8과 동일한 방법으로 추출하여 아그리모니 효소 추출물을 제조하였다.

[0069] 제조예 12: 인동덩굴 효소 추출물의 제조

[0070] 인동덩굴 전초를 상기 제조예 8과 동일한 방법으로 추출하여 인동덩굴 효소 추출물을 제조하였다.

[0072] 제조예 13: 개박하 효소 추출물의 제조

[0073] 개박하 전초를 상기 제조예 8과 동일한 방법으로 추출하여 개박하 효소 추출물을 제조하였다.

[0075] 제조예 14: 솔жат나무 효소 추출물의 제조

[0076] 솔жат나무 잎을 상기 제조예 8과 동일한 방법으로 추출하여 솔жат나무 효소 추출물을 제조하였다.

[0078] 실시예 1~5: 복합추출물의 제조

[0079] 상기 제조예 8~14의 추출물을 하기 표 1의 중량비로 혼합하여 동일 중량의 복합추출물들을 제조하였다.

표 1

[0080]

중량비	제조예 8	제조예 9	제조예 10	제조예 11	제조예 12	제조예 13	제조예 14
실시예 1	1	1	1	1	1	1	1
실시예 2	2	2	2	1	1	1	1
실시예 3	1	1	1	2	2	2	1
실시예 4	2	1	1	2	1	1	2
실시예 5	1	2	2	1	2	1	1

[0082] 시험예 1: 세포 독성 여부 확인

[0083] 세포 독성 여부를 확인하기 위해 섬유아세포를 10% FBS를 첨가한 IMDM 배지에 5×10^5 의 세포 농도로 접종하여, 37°C 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 상기 제조예 및 실시예에서 제조한 추출물을 시료농도가 50, 100, 500, 1000 μ g/ml가 되도록 디메틸설폭시드에 희석하여 제조한 희석용액을 처리하여 24시간 배양한 후에 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2yl] - 2,5-diphenyltetrazoliumboromide, Sigma, U.S.A.)용액을 각 well에 100 μ l씩 첨가한 후 (3mg/ml) 4시간 동안 더 배양하였다. 이후 상층액을 제거하고, 150 μ l의 디메틸 설폭시드를 첨가한 후, 30분간 shaking하여 생성된 formazan을 녹여 multimicroplate reader(Molecular device Spectra max190)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 아래의 식에 따라 계산하였으며 그 결과는 하기의 표 2에 나타내었다.

[0085] 세포생존율(%)=시료첨가군의 흡광도 / 대조군의흡광도 $\times$ 100

표 2

[0087]

구분	세포 생존율(%)				
	0 μ g/ml	50 μ g/ml	100 μ g/ml	500 μ g/ml	1000 μ g/ml
제조예 1	100	100	100	100	96.7
제조예 2	100	100	100	100	96.9
제조예 3	100	100	100	100	97.5
제조예 4	100	100	100	100	96.5
제조예 5	100	100	100	100	97.6
제조예 6	100	100	100	100	96.4
제조예 7	100	100	100	100	98.1
제조예 8	100	100	100	100	97.3
제조예 9	100	100	100	100	96.4
제조예 10	100	100	100	100	96.6
제조예 11	100	100	100	100	97.8
제조예 12	100	100	100	100	97.7
제조예 13	100	100	100	100	96.4
제조예 14	100	100	100	100	97.9

실시예 1	100	100	100	100	97.9
실시예 2	100	100	100	100	98.9
실시예 3	100	100	100	100	98.5
실시예 4	100	100	100	100	98.8
실시예 5	100	100	100	100	99.1

[0088] 상기 표 2에서 확인되는 바와 같이, 제조예 1 내지 14 및 실시예 1 내지 5 모두 세포생존율이 확인됨에 따라 세포 독성에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었고, 이에 안전에는 문제가 없는 것을 확인하였다.

[0090] **시험예 2: 염증매개인자 발현 억제효과 확인**

[0091] RAW264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5×10^5 cell/well로 조절한 후, 12 well plate에 접종하고 18시간 동안 배양하였다. 배양한 뒤 12시간 동안 기아상태를 유지시킨 후, LPS 10ng/mL와 시료를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에서 RNA를 추출하여 Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 통해 TNF- α 의 발현 억제율을 확인하였다. TNF- α 발현 억제율은 하기 식에 의해 산출되었고, 그 결과는 하기 표 3에 나타내었다. 대조군으로는 덱사메타손(Dexamethason)을 사용하였다.

[0093] **TNF- α 발현억제율(%) = (시료 TNF- α 발현양/ 대조군 TNF- α 발현양) $\times$ 100**

표 3

[0095]

시료명	처리농도(w/v%)	TNF- α 발현억제율(%)
제조예 1	0.1	50.6
제조예 2	0.1	51.2
제조예 3	0.1	53.2
제조예 4	0.1	49.6
제조예 5	0.1	48.5
제조예 6	0.1	35.6
제조예 7	0.1	54.5
제조예 8	0.1	52.3
제조예 9	0.1	51.5
제조예 10	0.1	52.5
제조예 11	0.1	48.5
제조예 12	0.1	47.5
제조예 13	0.1	56.5
제조예 14	0.1	61.5
실시예 1	0.1	75.4
실시예 2	0.1	76.1
실시예 3	0.1	78.1
실시예 4	0.1	79.7
실시예 5	0.1	85.8
Dexamethasone	0.1	81.8

[0096] 상기 표 3에서 확인되는 바와 같이 0.1(wt/v)% 농도에서 시험한 시료 모두에서 TNF- α 억제 효과를 확인할 수 있었다. 본 발명 실시예의 복합추출물은 제조예 1 내지 14에 비하여 우수한 TNF- α 억제 효과를 나타내었으며, 특히 실시예 5의 복합추출물은 가장 우수한 효과를 나타내었다.

[0098] **시험예 3: 중성지방 측정**

[0099] 100mm 배양접시에 1×10^6 개의 피지선세포(sebocyte)를 시딩(seeding)을 하고 substance P를 10~9M 첨가하여 70% 정도의 콘플루언시(confluency)를 보일 때 배양 배지를 제거하고 시험약물을 처리한다. 5일 후에 배지를 제거하고 생리식염수(PBS)로 3회 세척한 뒤, PBS를 넣어 스크래퍼로 긁어 세포 수거 후 1200rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포를 모으고 PBS를 제거한다. 지질 추출액의 구성은 0.9% NaCl + 1% triton X 100의 조성으로 만든다. 지질 추출액을 넣고 보텍스(vortex)하여 균질화한 다음 13000rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액만 수거한다. 이후에 키트 제조사(ASAN co. Seoul, Korea) 방법대로 효소법으로 중성지방을 측정하며, Bradford법으로 단백질을 정량하여 단위 농도 단백질 당 중성지방 양으로 보정하여 준다. 그 결과를 다음 표 4에 정리하였다.

표 4

[0100]

구분	중성지방 양
제조예 1	1.1864
제조예 2	1.0685
제조예 3	1.2974
제조예 4	1.2642
제조예 5	1.2345
제조예 6	1.3421
제조예 7	1.3967
제조예 8	1.2745
제조예 9	1.0975
제조예 10	1.1142
제조예 11	1.1226
제조예 12	1.0752
제조예 13	1.0245
제조예 14	1.0348
실시예 1	0.8513
실시예 2	0.8916
실시예 3	0.8579
실시예 4	0.8346
실시예 5	0.8113

[0101]

상기 표 4로부터 본 발명 실시예들은 제조예들에 비하여 피지생성을 크게 감소시킴을 확인할 수 있었다. 복합추출물인 실시예 5에서 피지생성이 제일 크게 감소되었으며, 그 다음으로 실시예 4, 실시예 1 순으로 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0103]

시험예 4: 피지생성 억제 측정

[0104]

피지선 세포를 DMEM/F-12 (1:1)에 10% FBS를 첨가한 배지에 배양하였으며, 96well plate에 2×10^3 의 세포를 부착하여 2일간 배양하였다. 물질 P와 제조예 1 내지 14 및 실시예 1 내지 5를 1,3-부틸렌글리콜로 희석하여 0.1 중량%의 농도로 투여하고 3일 동안 추가 배양하였다. PBS로 세척 후 세포내 지질을 Nile red로 염색하였다. 다기능 효소 면역분석기를 이용하여 형광 측정을 하였으며, excitation 485nm, emission 565nm 필터를 이용하여 피지선 세포 내 피지 생성량을 측정하였다. 하기 표 5는 무처리군을 1로 하여 형광 강도비율을 나타낸 결과이다.

표 5

[0105]

	형광강도 비율(control=1)
물질 P (10^{-9} M)	1.66
물질 P (10^{-9} M)+ 제조예 1	1.60
물질 P (10^{-9} M)+ 제조예 2	1.58
물질 P (10^{-9} M)+ 제조예 3	1.59
물질 P (10^{-9} M)+ 제조예 4	1.56
물질 P (10^{-9} M)+ 제조예 5	1.53
물질 P (10^{-9} M)+ 제조예 6	1.54
물질 P (10^{-9} M)+ 제조예 7	1.54
물질 P (10^{-9} M)+ 제조예 8	1.60
물질 P (10^{-9} M)+ 제조예 9	1.52
물질 P (10^{-9} M)+ 제조예 10	1.55
물질 P (10^{-9} M)+ 제조예 11	1.57
물질 P (10^{-9} M)+ 제조예 12	1.53
물질 P (10^{-9} M)+ 제조예 13	1.51

물질 P (10^{-9} M)+ 제조예 14	1.52
물질 P (10^{-9} M)+ 실시예 1	1.25
물질 P (10^{-9} M)+ 실시예 2	1.34
물질 P (10^{-9} M)+ 실시예 3	1.32
물질 P (10^{-9} M)+ 실시예 4	1.20
물질 P (10^{-9} M)+ 실시예 5	1.17
음성 대조군 (control)	1

[0106] 상기 표 5에서 확인되는 바와 같이 물질 P를 투입하였을 때 지질생성이 크게 증가하였으며, 제조예 1 내지 14 및 실시예 1 내지 5를 함께 투여하였을 경우 세포 내 피지 생성이 감소하는 것을 확인하였다. 따라서, 제조예 1 내지 14 및 실시예 1 내지 5가 물질 P에 의한 피지생성을 감소시키는 것을 알 수 있다. 복합추출물인 실시예 5가 피지생성이 제일 크게 감소되었으며, 그 다음으로 실시예 4, 실시예 1 순으로 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0108] 시험예 5: 프로피오니박테리움 아크네스에 대한 항균활성의 시험

[0109] 제조예 1 내지 14 및 실시예 1 내지 5에 대하여, 평판배지 확산법(Agar diffusion method)을 이용하여 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)에 대한 항균활성을 측정하였다.

[0110] 본 시험에 사용된 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes* 3314)균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양받아 사용하였다.

[0111] plate에 Brain Heart Infusion agar를 멸균하여 plate당 25mL씩 분주한다. 균주 도말 각각의 균주의 균수를 10^5 으로 맞춰 100 μ L 도말한다. 10% Ethanol에 녹인 제조예 1 내지 14 및 실시예 1 내지 5를 0.1%, 0.5%, 1.0% 농도로 맞춘 후 50 μ L씩 disc(paper disk(10mm), Advantec Filter Paper, Toyo Roshi Kaisha Ltd, Japan)에 loading 한다. 양성 대조군으로 Salicylic acid를 사용하였으며 10% Ethanol에 녹인 Salicylic acid를 0%, 1.0% 농도로 맞춘 후 50 μ L씩 disc(paper disk(10mm), Advantec Filter Paper, Toyo Roshi Kaisha Ltd, Japan)에 loading 한다. 멸균된 핀셋으로 loading된 disc를 집어서 균이 도말된 plate에 심는다. 산소를 차단하는 anaerobic jar에 plate를 넣은 상태로 37°C에 배양한다. paper disk 주변에 형성된 원형 발육 저지환의 크기(mm 단위)를 측정하였으며, 모든 시험은 독립적으로 3회 반복하여 평균값을 구했다.

[0112] 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0113]

구분	지름(mm)			
	0%	0.1%	0.5%	1.0%
제조예 1	0	4.3	7.5	9.8
제조예 2	0	3.9	7.3	9.7
제조예 3	0	4.1	7.2	9.7
제조예 4	0	4.8	7.1	9.1
제조예 5	0	4.0	7.6	9.5
제조예 6	0	3.7	7.4	9.6
제조예 7	0	4.5	6.9	9.4
제조예 8	0	4.3	7.9	9.2
제조예 9	0	4.2	7.9	10.1
제조예 10	0	4.3	7.5	9.8
제조예 11	0	4.1	7.8	10.2
제조예 12	0	4.2	7.7	9.8
제조예 13	0	4.1	7.2	9.7
제조예 14	0	4.0	7.6	7.2
실시예 1	0	15.2	21.5	45.5
실시예 2	0	16.5	22.5	46.5
실시예 3	0	21.5	23.4	51.2
실시예 4	0	19.5	24.5	56.3
실시예 5	0	32.5	65.8	80.7

양성대조군 (Salicylic Acid)	0	-	-	7.5
---------------------------	---	---	---	-----

[0114] 상기 표 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 제조예 1 내지 14 및 실시예 1 및 5는 농도 의존적으로 Clean Zone의 넓이가 증가하는 것을 볼 수 있다. 본 발명 실시예의 복합추출물은 제조예의 추출물들에 비하여 우수한 항균활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 특히 실시예 5는 프로피오니박테리움 아크네스 (Propionibacterium acnes)에 대한 항균활성 효과가 매우 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0116] 실시예 6: 복합추출물을 함유하는 세럼의 제조

[0117] 상기 복합추출물(실시예 5)을 함유한 세럼을 하기의 표 7의 조성 및 함량으로 통상의 방법에 따라 제조하였다.

표 7

원료	함량(중량%)
복합추출물(실시예 5)	1.0
밀납	1.0
폴리솔베이트 60	1.5
솔비탄 세스퀴올레이트	0.5
미네랄 오일	10.0
소르비탄 스테아레이트	0.5
친유형 모노스테아린산 글리세린	1.0
스테아린산	1.5
글리세릴스테아레이트/피이지-400 스테아레이트	1.0
프로필렌글리콜	3.0
카르복시폴리머	0.1
트리에탄올아민	0.1
페녹시에탄올	적량
정제수	To 100

[0120] 실시예 7: 복합추출물을 함유하는 크림의 제조

[0121] 상기 복합추출물(실시예 5)을 함유한 크림을 하기의 표 8의 조성 및 함량으로 통상의 방법에 따라 제조하였다.

표 8

원료	함량(중량%)
복합추출물(실시예 5)	1.0
시어버터	2.0
폴리솔베이트 60	1.5
솔비탄 세스퀴올레이트	0.8
미네랄 오일	10.0
디메치콘	3.0
소르비탄 스테아레이트	0.5
친유형 모노스테아린산 글리세린	1.0
세테아릴알코올	2.0
글리세릴스테아레이트/피이지-400 스테아레이트	1.0
프로필렌글리콜	3.0
카르복시폴리머	0.25
트리에탄올아민	0.25
페녹시에탄올	적량
정제수	To 100

[0124] 시험예 6: 제형안정도 확인

[0125] 상기 실시예 6, 7에서 제조한 제형에 대하여 실온(25℃), 냉장(4℃) 및 항온(50℃)으로 일정하게 유지되는 실내, 냉장고 및 인큐베이터에서 불투명 초자 용기에 담아 12주 동안 보관 및 관찰(변색, 변취 및 분리)하며,

안정성을 확인 하였다. 결과는 표 9에 나타내었다.

표 9

온도조건	안정성 확인(변색, 변취 및 분리)	
	실시예 6	실시예 7
실온(25℃)	0	0
냉장(4℃)	0	0
항온(50℃)	0	0

< 제형 안정 등급 >0: 변화 없음 1: 미세한 변화 2: 변화 3: 극심한 변화

상기 표에서 나타난 바와 같이 실시예 6, 7 제형 모두 25℃, 4℃ 및 50℃ 온도 조건하에서 변색, 변취 및 분리 현상이 나타나지 않고 안정함이 확인되었다.