

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2014년 11월 6일 (06.11.2014)



(10) 국제공개번호  
**WO 2014/178681 A1**

- (51) 국제특허분류:  
A61K 31/704 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)  
A61K 31/70 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/003953
- (22) 국제출원일: 2014년 5월 2일 (02.05.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2013-0049818 2013년 5월 3일 (03.05.2013) KR
- (71) 출원인: 주식회사 아모레퍼시픽 (AMOREPACIFIC CORPORATION) [KR/KR]; 140-777 서울시 용산구 한강대로 106, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김동현 (KIM, Dong Hyun); 446-729 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, Gyeonggi-do (KR). 류권렬 (RYU, Kwon Real); 446-729 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, Gyeonggi-do (KR). 이옥찬 (LEE, Ok Chan); 446-729 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, Gyeonggi-do (KR). 염명훈 (YEOM, Myeong Hun); 446-729 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, Gyeonggi-do (KR). 조준철 (CHO, Jun Cheol); 446-729 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 윤동열 (YOON, Dong Yol); 153-803 서울시 금천구 가산디지털1로 226 에이스 하이엔드타워 5차 3층 윤앤리 특허 법률 사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: TOPICAL COMPOSITION FOR SKIN CONTAINING GINCENOSIDE Y

(54) 발명의 명칭 : 진세노사이드 Y를 함유하는 피부 외용제 조성물

(57) Abstract: The present invention relates to a composition containing gincenoside Y, and more specifically, to a composition containing gincenoside thereby having superior antioxidant powers, for providing effects such as improved moisturization, anti-inflammation, improvement of skin troubles such as acne and atopic dermatitis symptoms, in addition to providing overall skin improvement effects such as skin whitening, sebum control, pore tightening, and skin tone improvement due to improvement of circulation, as well as providing scalp and hair improvement effects such as anti-dandruff, hair growth promotion, and prevention of gray-ing hair.

(57) 요약서: 본 발명은 진세노사이드 Y를 함유하는 피부 외용제 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 진세노사이드 Y를 함유함으로써 우수한 항산화력을 가지면서, 피부 보습력 개선 효과, 항염 효과, 여드름 및 아토피 등의 피부 트러블 개선 효과, 미백 효과, 피지 조절 효과, 모공 수축 효과, 혈행 개선을 통한 안색 개선 등의 전반적인 피부 상태 개선 효과뿐만 아니라 비듬 방지 효과, 욱모 효과 및 백모 방지 효과 등의 두피 및 모발 상태 개선 효과를 제공할 수 있는 조성물에 관한 것이다.



WO 2014/178681 A1

## 명세서

### 발명의 명칭: 진세노사이드 Y를 함유하는 피부 외용제 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 진세노사이드 Y(ginsenoside Y)를 함유하는 피부 외용제 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 진세노사이드 Y를 함유함으로써 우수한 항산화력을 가지면서, 피부 보습력 개선 효과, 항염 효과, 여드름 및 아토피 등의 피부 트러블 개선 효과, 미백 효과, 피지 조절 효과, 모공 수축 효과, 혈행 개선을 통한 안색 개선 등의 전반적인 피부 상태 개선 효과뿐만 아니라 비듬 방지 효과, 욱모 효과 및 백모 방지 효과 등의 두피 및 모발 상태 개선 효과를 제공할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] 인간의 피부는 인체의 일차 방어막으로서 온도 및 습도의 변화, 자외선, 공해물질과 같은 외부 환경의 자극으로부터 체내의 기관을 보호해 주는 기능을 하며, 나이가 들어감에 따라 여러 가지 내적, 외적 요인에 의해 변화를 겪는다. 즉, 내적으로는 신진대사를 조절하는 각종 호르몬의 분비가 감소하고, 면역 세포의 기능과 세포들의 활성이 저하되어 생체에 필요한 면역 단백질 및 생체 구성 단백질들의 생합성이 줄어들게 되며, 외적으로는 오존층 파괴로 인하여 태양 광선 중 지표에 도달하는 자외선의 함량이 증가하고 환경 오염이 더욱 심화됨에 따라 자유 라디칼 및 활성 유해 산소 등이 증가함으로써, 피부의 두께가 감소하고, 주름이 증가하며, 탄력이 감소될 뿐 아니라 피부 혈색도 칙칙해지고, 피부 트러블이 자주 발생하며, 기미와 주근깨 및 검버섯 또한 증가하고, 혈색이 나빠지고 피부톤도 어두워지는 등 여러 가지 변화를 일으키게 된다.
- [3] 이러한 피부 내적 및 외적 요인에 의한 피부 상태의 변화를 방지하고, 건강한 피부 상태를 유지하기 위해서 기존에 알려진 각종 동물, 식물, 미생물 등으로부터 얻은 생리 활성 물질들을 화장품에 부가하여 사용함으로써 피부 상태를 개선시키기 위한 노력이 있어 왔으며, 특히 인삼(*Panax ginseng* C. A Meyer) 성분을 이용한 화장품의 연구개발이 다수 이루어졌다. 인삼은 피부에 있어 그 효능이 일찍이 입증되어 화장품 조성물에 널리 사용되어 왔으며, 인삼의 뿌리 또는 잎의 추출물, 인삼 사포닌(ginsenoside), 인삼 어글리콘(aglycon) 및 인삼 다당체들이 사용되어졌다. 그러나 이러한 인삼추출물, 엑기스, 다당체 등을 함유한 화장품들은 그 활성 물질이 극미량 함유되어 있어 다른 원료들에 비해 그 효과가 확연히 뛰어나지 않은 단점이 있다.

### 발명의 상세한 설명

#### 기술적 과제

- [4] 이에 본 발명자들은 인삼에 함유되어 있는 진세노사이드 Y가 미백, 보습 개선

효과 뿐만 아니라 여드름 및 피부 트러블, 아토피 증상의 개선 효과도 제공할 수 있으며 피부 혈색 개선의 효과, 피지 조절, 모공 수축 효과 등의 피부 상태 개선 효과를 제공할 수 있고, 또한 비듬 방지, 욱모 및 백모 방지 등의 두피 및 모발 상태 개선 효과를 제공할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

- [5] 따라서, 본 발명의 목적은 진세노사이드 Y를 함유하여 피부의 전반적인 상태를 개선시킬 수 있는 피부 외용제 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제 해결 수단

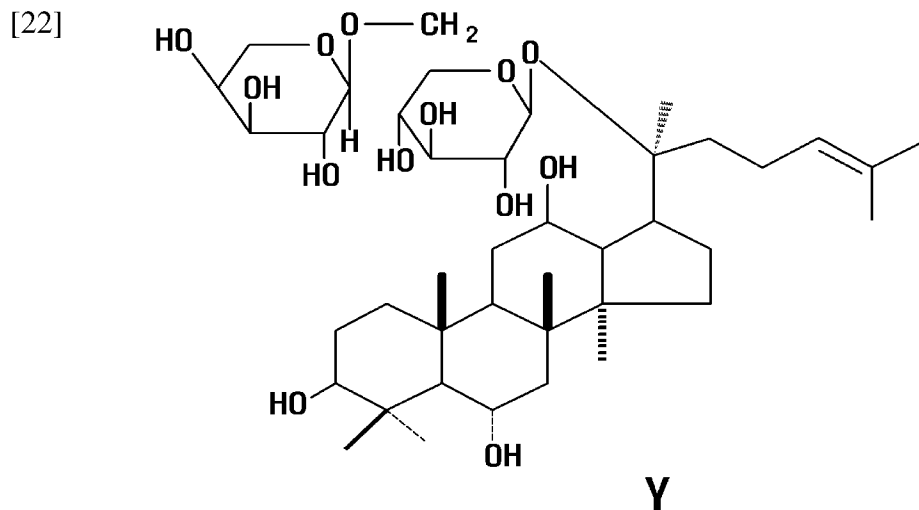
- [6] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [7] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하는 미백용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [8] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하는 보습용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하는 여드름 개선용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하는 아토피 개선용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하는 혈색 및 피부톤 개선용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하는 모공 축소용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하는 피지 조절용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하는 비듬 방지용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하는 욱모용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하는 백모 방지용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 진세노사이드 Y를 천연 방부제로 사용하는 피부 외용제 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

- [18] 본 발명의 조성물은 진세노사이드 Y를 함유함으로써 우수한 항산화력을 가지면서, 피부 보습력 개선 효과, 항염 효과, 여드름 및 아토피 등의 피부 트러블 개선 효과, 미백 효과, 피지 조절 효과, 모공 수축 효과, 혈행 개선을 통한 안색 개선 등의 전반적인 피부 상태 개선 효과뿐만 아니라 비듬 방지 효과, 욱모 효과 및 백모 방지 효과 등의 두피 및 모발 상태 개선 효과를 제공할 수 있다.

## 발명의 실시를 위한 형태

- [19] 본 발명에 의한 피부 외용제 조성물은 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하며, 특히 상기 진세노사이드 Y는 인삼에서 추출할 수 있다.
- [20] 본 발명에서 사용되는 진세노사이드 Y는 하기 화학식 1의 구조를 가진다.
- [21] [화학식 1]



- [23] 인삼은 오가피나무과(Araliace)의 인삼속에 속하고, 다년생 반지음성 숙근초로서 초본식물이다. 한국, 중국, 일본 및 미국 등 세계 여러 곳에서 생산되며 동아시아에서는 동경 85-140도, 북위 22-49도, 북미주에서는 서경 70-97도, 북위 34-47도에서 주로 재배된다. 이와 같이 세계 각지에서 생산되는 인삼은 그 성분에 차이가 있으며 인삼의 여러 생리학적, 약리학적 효능을 나타내는데 가장 중요한 진세노사이드라고 하는 인삼 사포닌(saponin)은 한국산 인삼에 가장 많이 포함되어 있다. 진세노사이드는 지금까지 약 34종이 분리되었으며, 아글리콘에 결합되어 있는 당의 종류나 결합된 당류의 수 또는 결합 위치에 따라 약리 효능이 각각 다르다. 구조적 특징에 따라 디올계, 트리올계 및 올레안(oleanane)계로 구분된다. 이밖에도 인삼 고유의 향기 성분인 파나센(panacen), 폴리아세틸렌 화합물, 폴리페놀 화합물, 플라보노이드 및 비타민 등이 함유되어 있다.
- [24] 인삼은 예로부터 한방적으로 그 효능이 인정되어 다양한 질환의 치료에 사용되었다. 인삼의 한방적 효능으로는 체력증진, 신진대사 개선, 스트레스 해소, 당뇨병 치료, 호흡기 질환 개선, 소화기관 개선 및 항암작용이 알려져 있고, 최근 연구에서 인삼은 항보체 활성, 항궤양작용, 면역증강, 항암작용 및 혈당 강하작용이 있는 것으로 보고되고 있다. 피부와 관련된 효능으로는 소염작용(Korean J. Dermatol. 18(1):39-42(1980), Korean J. Dermatol. 14(4):335-339(1976)), 과각화방지(Korean J. Dermatol. 28(4):434-440(1990)), 여드름 예방 및 치료(Korean J. Dermatol. 30(1):27-33(1992), Korean J. Dermatol. 28(4):434-440(1990)), 항산화 효과(Proceedings of the 2nd international ginseng symposium 13-17(1978)), 탄력성 및 수화성 증가(Fitoterapia 57(1):15-28(1986),

Fitoterapia 57(4) 217-222(1986)), 상처치유(Brit. J. Pharmacol. 125:255-262(1998), Arch. pharm. res. 25(1):71-76(2002)), 콜라겐 분해 억제(Mol. Cells 9(5):476-483(1999)), 미백효과(Journal of the society of cosmetic scientists of korea 27(2):45-56(2001)) 등이 연구 발표되었다.

- [25] 본 발명의 진세노사이드 Y는 식물에서 추출될 수도 있고, 당업계에서 공지된 방법에 따라 합성하여 사용할 수도 있으며, 상업적으로 시판되는 것을 사용할 수도 있다. 또한 상기 진세노사이드 Y를 당업계에서 통상적으로 실시되는 치환기의 부가 또는 치환 반응을 하여 얻어지는 유도체 중 피부, 모발 개선효과 및 방부효과를 나타내는 유도체도 본 발명의 범위에 포함된다는 것은 당업계의 기술수준을 고려하여 당업자에 명확하다.
- [26] 본 발명에서 사용되는 진세노사이드 Y는 특히 인삼 추출물에서 수득할 수 있다. 이 때 사용되는 인삼의 종류는 특히 제한되지 않고, 수삼, 홍삼, 백삼, 태극삼, 미삼 등을 사용할 수 있다. 또한 상기 인삼 추출물은 인삼으로부터 침출, 전출하여 얻은 침출액 뿐 아니라 침출액을 다시 일부 또는 전부 농축하여 얻은 농축물 또는 상기의 농축물을 다시 건조시켜 제조한 침체, 전제, 정기, 유동엑기스 및 인삼 중에 함유되어 주 효과를 발휘하는 화학 물질은 물론 식물 그 자체를 모두 포함하며, 줄기, 뿌리, 잎, 꽃, 열매 등 인삼의 모든 부분으로부터의 추출물이 사용가능하고 어느 특정 부분의 추출물로 한정되지 않는다. 또한 인삼 추출물로부터 진세노사이드 Y를 추출하는 방법은 공지의 방법을 사용할 수 있다.
- [27] 구체적으로 상기 진세노사이드 Y는 인삼에서 당업계에 잘 알려진 방법으로 물 또는 유기용매로 인삼 추출물을 제조한 후, 이로부터 분리할 수 있다. 본 발명에 사용하는 유기용매는 에탄올, 메탄올, 부탄올, 에테르, 에틸아세테이트, 클로로포름 및 이들 유기용매와 물의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 80% 에탄올을 사용한다. 이때, 추출온도는 10~80°C가 바람직하며, 3~24시간 동안 추출할 수 있다. 상기 추출온도 및 추출시간을 벗어나면 추출 효율이 떨어지거나 성분의 변화가 생길 수 있다.
- [28] 본 발명에 의한 조성물은 진세노사이드 Y를 조성물 총 중량에 대하여 0.001~50중량%, 바람직하게는 0.01~30중량%, 보다 바람직하게는 0.1~10중량%의 양으로 함유할 수 있다. 상기 진세노사이드 Y의 함량이 0.001중량% 미만이면 상기 성분에 의한 효능, 효과가 미약하고, 50중량%를 초과하면 피부 안전성 또는 제형상의 문제가 있기 때문이다.
- [29] 진세노사이드 Y는 우수한 항산화력을 가지는 성분이므로, 진세노사이드 Y를 함유하는 본 발명의 조성물은 피부에 우수한 항산화력을 제공한다.
- [30] 본 발명의 조성물은 미백용 조성물로서 사용될 수 있으며, 이는 티로시나제 활성을 저해하고 멜라닌의 생성을 억제함으로써 우수한 미백 효과를 제공할 수 있다.
- [31] 본 발명의 조성물은 보습용 피부 외용제 조성물로서 사용될 수 있으며, 이는

피부 장벽 기능을 강화시키고 피부 각질형성세포의 분화를 유도시킬 수 있다. 따라서 표피 분화의 불완전함으로 생기는 피부건조증, 아토피 피부염, 접촉성 피부염 또는 건선 등을 예방 또는 개선하는 피부 외용제 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

- [32] 본 발명의 조성물은 여드름 개선용 피부 외용제 조성물로서 사용될 수 있으며, 이는 항균 효과, 특히 여드름 원인균에 대한 항균 효과가 우수하고, 또한 항염 효과를 제공한다.
- [33] 본 발명의 조성물은 혈색 및 피부톤 개선용 피부 외용제 조성물로서 사용될 수 있으며, 이는 피부에 적용 시 모세혈관을 확장시키고 혈액순환을 촉진시킴으로써 피부에 영양분을 원활하게 공급하고 피부 노화를 억제시켜 혈색 및 피부톤 개선 효과가 탁월하다.
- [34] 본 발명의 조성물은 모공 축소, 피지 조절 및 피부 트러블 개선용 피부 외용제 조성물로서 사용될 수 있으며, 이는 피부에 적용 시 과잉으로 분비되는 피지를 억제하고, 활성 산소 제거와 콜라겐 합성을 촉진함으로써 모공을 축소시키며, 염증 인자의 발현 감소로 피부 트러블을 억제하는 효과가 탁월하다. 또한, 우수한 항산화력으로 인해 피부 자극의 생성을 방어할 수 있다.
- [35] 본 발명의 조성물은 비듬 방지용 피부 외용제 조성물로서 사용될 수 있으며, 이는 모발과 두피에 축적된 독소를 효과적으로 배출하여 두피를 정화하고, 비듬균의 증식과 성장을 억제하여 두피염증반응을 예방할 수 있으며, 또한 활성산소의 생성 및 작용을 억제하는 항산화 효능이 뛰어나 두피를 진정시키고 강화시키며 본연의 방어력을 강화시키는 효과를 제공할 수 있다.
- [36] 본 발명의 조성물은 육모용 피부 외용제 조성물로서 사용될 수 있으며, 이는 휴지기 모발주기의 성장기 모발주기로의 이행을 촉진시킴으로써 모발의 성장을 촉진하고, 탈모를 방지하는 효과를 제공할 수 있다.
- [37] 본 발명의 조성물은 백모 방지용 피부 외용제 조성물로서 사용될 수 있으며, 이는 멜라노사이트에서 MITF의 발현을 현저히 상승시켜 백모를 억제하며 흑모 유발을 촉진시킬 수 있다.
- [38] 또한, 본 발명의 피부 외용제 조성물에 사용되는 진세노사이드 Y는 천연 방부제로서의 효과를 제공할 수 있다.
- [39] 상기한 본 발명의 피부 외용제 조성물은 화장료 조성물로서 제형화될 수 있으며, 화장품학 또는 피부과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유하여 제형화될 수 있다. 이는 국소적용에 적합한 모든 제형으로서, 예를 들면, 용액, 젤, 고체, 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜) 및 비이온형의 소낭 분산제의 형태로, 또는 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한 폼(foam)의 형태로 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 사용될 수 있다. 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.

- [40] 특히, 본 발명의 피부 외용제 조성물이 비듬 방지, 욕모 또는 백모 방지용으로서 사용될 경우에는 두피 및 모발용 조성물로서 제형화될 수 있으며, 제형이 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 헤어토닉, 모발 영양화장수, 스칼프트리트먼트, 헤어트리트먼트, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어로션 또는 두피 모발 겸용 트리트먼트 등으로 제형화될 수 있다.
- [41] 또한 본 발명에 의한 조성물은 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 상기 보조제는 화장품학 또는 피부과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입된다.
- [42] 또한, 본 발명의 조성물은 피부 개선 효과를 증가시키기 위하여 피부 흡수 촉진 물질을 함유할 수 있다.
- [43]
- [44] 이하, 시험예 및 제형예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 시험예 및 제형예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 하기 예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [45]
- [46] [참고예 1]
- [47] 본 발명의 조성물의 효능을 실험하기 위한 진세노사이드 Y는 엠보연구소로부터 구입하여 사용하였다.
- [48]
- [49] [시험예 1] 활성 산소종(ROS: reactive oxygen species) 생성 억제 효과
- [50] 사람의 표피 조직에서 분리한 각질형성세포(keratinocyte)를 24웰 플레이트의 각 웰에  $5 \times 10^4$ 개를 넣고 24시간 동안 부착시켰다. 16시간 후, 진세노사이드 Y를 1%로 처리하였다. 이 때 비교를 위하여 대조군은 진세노사이드 Y를 처리하지 않았다. 2시간 뒤에 배양액을 제거한 후, 각 웰에  $100 \mu\text{l}$ 의 인산완충염액(PBS)을 넣었다. 이 각질형성세포에 자외선 B(UVB) 램프(Model: K5T8, UV B 15 W, Sankyo Denki社, Japan)를 이용하여 자외선  $30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ 를 조사한 다음, PBS를 덜어내고 각 웰에 각질형성세포 배양액  $200 \mu\text{l}$ 를 첨가하였다. 여기에 진세노사이드 Y를 다시 처리하고 일정 시간대별로 자외선 자극에 의해 증가한 활성 산소종의 양을 정량하였다. ROS의 양은 ROS에 의해 산화되는 DCF-DA(dichlorofluorescein diacetate)의 형광을 측정하는 Tan의 방법을 참고하여 정량하였으며(Tan et al., 1998, J. Cell Biol. Vol. 141, pp1423-1432), 비히클만 처리한 대조군의 ROS에 대한 비율을 산출한 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[51] 표 1

[Table 1]

| 시험물질           | UVB 30 mJ/cm <sup>2</sup> 조사 후 경과된 시간 |     |     |
|----------------|---------------------------------------|-----|-----|
|                | 0hr                                   | 2hr | 3hr |
| 비히클            | 100                                   | 244 | 287 |
| UVB + 비히클      | 100                                   | 325 | 381 |
| UVB + 진세노사이드 Y | 100                                   | 238 | 278 |

[52] 상기 표 1의 결과에서, 본 발명에 의한 진세노사이드 Y는 자외선에 의해 피부 세포 손상을 일으키는 것으로 알려진 ROS의 생성을 효과적으로 억제하며 자외선 자극 후 ROS의 양이 자외선을 조사하지 않은 경우 이상의 수준으로 ROS의 생성을 억제하여 항산화 효능이 매우 뛰어나음을 알 수 있다. 따라서, 본 발명에 의한 진세노사이드 Y가 산화를 억제하고 노화를 막음으로써 모공이 넓어지는 것을 예방할 수 있으며, 피부 자극의 생성을 방어함으로써 피부 트러블을 개선시킬 수 있음을 확인하였다.

[53]

[54] [시험예 2] 티로시나제 저해 효과

[55] 티로시나제 효소는 버섯류(Mushroom)로부터 추출된 것으로 시그마(SIGMA)사의 것을 사용하였다. 먼저 기질인 티로신을 증류수에 용해시켜 0.3mg/ml의 용액으로 만들고 그 용액을 1.0ml씩 시험관에 넣은 다음, 여기에 포타슘-포스페이트 완충용액(0.1mol 농도, pH 6.8) 1.0ml 및 증류수 0.7ml를 첨가하였다.

[56] 본 발명의 진세노사이드 Y를 에탄올 용액에 적당한 농도로 혼합하여 준비한 시료액 0.2ml를 반응액에 넣은 다음 37°C 항온조에서 10분 동안 반응시켰다. 이때 대조군은 각 시료액 대신 용매만을 0.2ml 넣은 것으로 준비하였고, 양성대조군으로는 아스코르브산을 사용하였다. 이 반응액에 2500유닛/ml의 티로시나제 용액 0.1ml씩을 넣고 다시 37°C 항온조에서 10분 동안 반응시켰다. 이 반응액이 든 시험관을 얼음물 속에 넣어서 급냉시켜 반응을 중지시키고 광전분광분석계로 파장 475nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다. 각각의 티로시나제 저해 효과는 하기 수학적 식 1로 산출하였다.

[57] 수학적 식 1

$$\text{티로시나제 저해율(\%)} = 100 - \left( \frac{\text{시험물질의 반응 흡광도}}{\text{대조군의 반응 흡광도}} \times 100 \right)$$

[58] 표 2

[Table 2]

| 시험물질     | 티로시나제 저해율(%) |
|----------|--------------|
| 대조군(무첨가) | 0            |
| 아스코르브산   | 52           |
| 진세노사이드 Y | 59           |

[59] 상기 표 2의 결과에서, 본 발명에 의한 진세노사이드 Y의 티로시나제 억제율이 공지된 티로시나제 저해제인 아스코르브산보다 훨씬 높아 미백 효과가 매우 우수함을 알 수 있다.

[60]

[61] [시험예 3] B16/F10 멜라노마 세포를 이용한 멜라닌 생성 억제 효과

[62] 진세노사이드 Y 및 코지산을 각각 0.1중량%로 함유한 시료를 시험물질로 하여 일정 농도로 B16/F10 멜라노마 세포(한국세포주은행)의 배양액에 첨가하여 3일간 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하고 1N NaOH로 세포를 녹여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 시험물질을 첨가하지 않은 세포를 대조군으로 하여 대조군에서의 멜라닌 함량과 비교하여 각 시험물질의 멜라닌 생성 저해 정도를 측정하였다. 수학식 2에 따라 멜라닌 생성 억제율을 계산하여 그 결과를 표 3에 나타내었다.

[63] 수학식 2

$$\text{멜라닌 생성 억제율(\%)} = 100 - \left( \frac{\text{시험물질의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100 \right)$$

[64] 표 3

[Table 3]

| 시험물질     | 멜라닌생성 저해율(%) |
|----------|--------------|
| 대조군(무첨가) | 0            |
| 코지산      | 53           |
| 진세노사이드 Y | 65           |

[65] 상기 표 3의 결과에서, 본 발명에 의한 진세노사이드 Y의 멜라닌 생성 억제율이 공지된 멜라닌 생성 저해제인 코지산보다 훨씬 높아 미백 효과가 매우 우수함을 알 수 있다.

[66]

[67] [제형예 1 및 비교제형예 1]

[68] 하기 표 4의 구성에 따라 통상적인 방법으로 영양크림을 제조하였다(단위: 중량%).

[69] 표 4

[Table 4]

| 배합성분                                                   | 제형예 1  | 비교제형예 1 |
|--------------------------------------------------------|--------|---------|
| 정제수                                                    | To 100 | To 100  |
| 진세노사이드 Y                                               | 0.1    | -       |
| 식물성 경화유                                                | 1.50   | 1.50    |
| 스테아린산                                                  | 0.60   | 0.60    |
| 글리세롤 스테아레이트                                            | 1.00   | 1.00    |
| 스테아릴 알코올                                               | 2.00   | 2.00    |
| 폴리글리세릴-10<br>펜타스테아레이트 & 베헤닐<br>알코올 & 소듐 스테아로일<br>락틸에이트 | 1.00   | 1.00    |
| 아라키딜 베헤닐 알코올<br>& 아라키딜글루코사이드                           | 1.00   | 1.00    |
| 세틸아릴 알코올 &<br>세테아릴글루코사이드                               | 2.00   | 2.00    |
| PEG-100 스테아레이트 &<br>글리세롤올레이트 &<br>프로필렌글리콜              | 1.50   | 1.50    |
| 카프릴릭/카르릭 트리<br>글리세라이드                                  | 11.00  | 11.00   |
| 사이클로메디콘                                                | 6.00   | 6.00    |
| 방부제, 향                                                 | 적량     | 적량      |
| 트리에탄올 아민                                               | 0.1    | 0.1     |

[70]

[71] [시험예 4] 피부 보습력 증가 효과 측정

[72] 진세노사이드 Y가 피부 보습력 증가에 미치는 효과를 측정하기 위하여, 상기 제형예 1 및 비교제형예 1을 이용하였고, 하기와 같이 평가하였다.

[73] 건조 피부로 분류된 40~50대 성인 남녀 20명을 각각 제형예 1 및 비교제형예 1의 2개 군에 대해 10명씩 2조로 나누어 영양크림을 매일 2회씩 4주간 안면에 도포하게 하였다. 도포 개시 전과, 도포 후 1주, 2주, 4주 경과한 시점, 그리고 도포를 중지한 2주 경과(총 6주 경과) 후에 항온, 항습 조건(24°C, 상대습도 40%)에서 피부수분량측정기(Corneometer CM825, C+K Electronic Co., 독일)로 피부수분량을 측정하였다. 그 결과는 하기 표 5에 나타내었다. 표 5의 결과는

시험개시 직전에 측정한 피부 수분량 측정기 값을 기준으로 하여 일정기간 처치한 후의 측정값의 증가분을 백분율로 표시한 것이다.

[74] 표 5

[Table 5]

| 시험군     | 수분 증가율 (%) |       |       |       |
|---------|------------|-------|-------|-------|
|         | 1주 경과      | 2주 경과 | 4주 경과 | 6주 경과 |
| 제형예 1   | 32         | 35    | 37    | 34    |
| 비교제형예 1 | 30         | 32    | 32    | 15    |

[75] 상기 표 5의 결과를 보면, 비교제형예 1을 도포한 경우에는 도포가 이루어진 4주까지는 약 30% 정도의 수분 증가율을 보이지만, 도포를 중지한 후에는 피부수분량이 감소하는 반면, 진세노사이드 Y를 함유한 제형예 1을 도포한 경우에는 도포를 중지한 후에도 30% 이상의 피부수분 증가율을 보임을 확인할 수 있다. 이를 통해 진세노사이드 Y를 함유한 본 발명의 조성물은 피부 보습력 효과가 우수함을 알 수 있다.

[76]

[77] [시험예 5] 각질형성세포 분화 촉진 효과 측정

[78] 진세노사이드 Y의 각질형성세포의 분화 촉진 효과를 알아보기 위해, 하기와 같이 각질형성세포의 분화시 생성되는 CE(Cornified Envelop)양을 흡광도를 이용하여 측정하였다.

[79] 먼저, 신생아의 표피로부터 분리해 일차 배양한 사람의 각질형성세포를 배양용 플라스크에 넣어 바닥에 부착시킨 뒤 진세노사이드 Y를 배양액에 5ppm 농도로 처리한 후 세포가 바닥 면적의 70~80% 정도 자랄 때까지 5일간 배양하였다. 이때, 저칼슘(0.03mM) 처리군과 고칼슘(1.2mM) 처리군을 각각 음성 대조군, 양성 대조군으로 하였다. 그 다음 상기 배양한 세포를 수확하여 PBS(Phosphate buffered saline)로 세척한 뒤 2% SDS(sodium dodecyl sulfate)와 20mM 농도의 DTT(Dithiothreitol)를 함유한 10mM 농도의 트리스-염산 완충액(Tris-HCl, pH 7.4) 1ml를 가하여 소니케이션(sonication), 보일링(boiling), 원심분리를 하고, 침전물을 다시 PBS 1ml에 현탁시켜 340nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이와 별도로 상기 소니케이션 후의 용액을 일부 취하여 단백질 함량을 측정하고, 세포 분화정도 평가시 기준으로 삼았다. 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

[80] 표 6

[Table 6]

| 시험물질                   | 각질형성세포에서의 분화능(%) |
|------------------------|------------------|
| 저칼슘(0.03mM) 용액(음성 대조군) | 100              |
| 고칼슘(1.2mM) 용액(양성 대조군)  | 210              |
| 진세노사이드 Y               | 290              |

[81] 상기 표 6에 나타난 바와 같이, 진세노사이드 Y를 처리한 경우 각질 형성 세포의 분화 촉진 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[82]

[83] [시험예 6] 피부 장벽기능 회복 효과 측정

[84] 진세노사이드 Y가 피부 손상으로 인해 손상된 피부 장벽기능의 회복에 미치는 효과 측정하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다. 성인 남녀 10명의 상박을 테이프 스트리핑(Tape Stripping) 방법을 이용하여 피부 장벽에 손상을 주고 각각 하기 표 7의 조성으로 제조한 제형예 2 및 비교제형예 2의 2개 군을 도포하면서 7일 동안 하루에 한번씩 경피수분손실량(TWEL)의 회복 정도를 Vapometer(Delfin, 핀란드)로 측정 비교하였다. 여기에서 비교제형예 2는 음성대조군으로서 비히클(vehicle)이다. 실험 결과는 하기 표 8에 나타내었다. 표 8의 결과는 장벽 손상 전과 장벽 손상 후의 처리전 차이를 100% 기준으로 하여 비교하였다.

[85] 표 7

[Table 7]

| 배합성분     | 제형예 2 | 비교제형예 2 |
|----------|-------|---------|
| 정제수      | 69    | 70      |
| 프로필렌글리콜  | 30    | 30      |
| 진세노사이드 Y | 1     | -       |

[86]

[87] 표 8

[Table 8]

| 시험군     | TWEL 변화 (%) |       |       |       |       |       |       |
|---------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|         | 처리전         | 1일    | 2일    | 3일    | 4일    | 5일    | 6일    |
| 제형예 2   | 100         | 125.6 | 129.1 | 125.8 | 114.3 | 110.2 | 103.9 |
| 비교제형예 2 | 100         | 121.4 | 112.7 | 98.3  | 70.5  | 62.3  | 43.5  |

[88] 상기 표 8에서 알 수 있는 바와 같이, 진세노사이드 Y를 함유하지 않은

비교제형예 2를 처리한 경우에는 시간이 지남에 따라 경피 수분 손실량이 점점 많아 지는 반면, 진세노사이드 Y를 함유하는 제형예 2를 처리할 경우에는 빠른 속도로 경피 수분 손실량이 정상으로 돌아오며 장벽 손상이 회복됨을 확인할 수 있다.

[89]

[90] [시험예 7] 혈색 개선 효과

[91] 본 발명에 의한 화장료 조성물의 피부 혈액 순환 촉진 효과를 평가하기 위하여, LDPI(Laser Doppler Perfusion Imager)를 이용하여 피부에서의 혈액순환 정도를 측정하였다. LDPI는 피부에서의 혈액순환을 측정하는 기기로 널리 알려져 있고 현재 사용되고 있는 기기로서, 피부의 모세혈관에서 혈액의 속도 및 양 뿐만 아니라 소동맥과 소정맥에서의 흐름까지 측정해 낼 수 있는 매우 민감한 기기이다.

[92] 항온항습실에서 얼굴을 비누로 수세한 후 30분간 적응시키고, LDPI를 이용하여 초기값을 측정하였다. 먼저 평소 손발이 차가운 여성 30명의 이마 아래 부분의 초기 혈류량을 LDPI로 측정하였다. 그런 다음 상기 제형예 1 및 비교제형예 1을 1주일 동안 피시험자들에게 사용하도록 한 후에 측정된 혈류량과 상기 초기 측정값을 비교한 결과(피부 혈류량 변화)를 하기 표 9에 나타내었다.

[93] 표 9

[Table 9]

화장료 사용 전후 LDPI 결과-피부 혈류량

| 시험물질    | 1주 사용 후 피부 혈류량 변화율(%) |
|---------|-----------------------|
| 제형예 1   | 11                    |
| 비교제형예 1 | 5                     |

[94] 상기 표 9의 결과에서, 본 발명에 의한 화장료 조성물은 진세노사이드 Y를 함유하지 않은 비교제형예 1보다 피부 혈류량을 현저하게 증가시켰으며, 이러한 혈액 순환 촉진을 통해 혈색이 개선되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 궁극적으로 본 발명에 의한 진세노사이드 Y를 함유하는 화장료 조성물이 피부의 영양분을 효과적으로 전달하고 피부 노화를 억제하며 지연시키는 데 기여할 수 있음을 시사한다.

[95]

[96] [시험예 8] 피부톤 개선 효과

[97] 상기 제형예 1 및 비교제형예 1의 피부톤 개선 효과를 알아보기 위하여 30명의 피험자에게 각각 사용(저녁 1회/일 도포, 총 1주간)하도록 한 후, Facial Stage DM-3(Moritex, Japan) 기기를 활용하여 피부톤 개선 정도를 평가하였다. 피부톤 개선율은 피부의 명도 및 색채 측정값으로 피부의 명도 및 색채 변화 값으로

판단하였으며, 그 결과는 하기 표 10에 나타내었다. 명도 및 색채 변화값이 클수록 피부톤이 개선되었음을 의미한다.

[98] 표 10

[Table 10]

| 시험물질    | 피부톤 개선율(%)  |             |
|---------|-------------|-------------|
|         | 명도(평균±표준편차) | 색채(평균±표준편차) |
| 제형예 1   | 13±3.24     | 14±2.34     |
| 비교제형예 1 | 5±2.34      | 5±2.05      |

[99] 표 10의 결과에서, 본 발명에 의한 진세노사이드 Y를 함유하지 않는 비교제형예 1은 유의적인 피부톤 개선 효능을 보이지 않은 반면, 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하는 제형예 1을 사용할 경우에는 사용 전보다 사용 후의 피부톤이 많이 개선되는 것을 확인하였다.

[100]

[101] [시험예 9] 모공 축소 효과

[102] 1. 콜라겐 생합성 촉진을 통한 모공 축소 효과

[103] 본 발명에 의한 진세노사이드 Y를 콜라겐 생합성 촉진 효과를 TGF-β와 비교하여 측정하였다. 먼저, 섬유아세포(fibroblast)를 24 공(well)에 1공 당 10<sup>5</sup> 개씩 파종(seeding)하여 90% 정도 자랄 때까지 배양하였다. 이를 24시간 동안 무혈청 DMEM 배지로 배양한 후 무혈청 배지에 녹인 본 발명의 진세노사이드 Y와 TGF-β를 각각 10ng/ml씩 처리하고 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이들의 상층액을 떼내어 프로콜라겐 형(I) ELISA 키트(procollagen type(I))를 이용하여 프로콜라겐(procollagen)의 증감여부를 보았다. 그 결과를 하기 표 11에 나타내었으며, 콜라겐의 합성능은 비처리군을 100으로 하여 대비하였다.

[104] 표 11

[Table 11]

| 시험물질     | 콜라겐 합성능(%) |
|----------|------------|
| 비처리군     | 100        |
| TGF-β    | 183.5      |
| 진세노사이드 Y | 189.9      |

[105] 상기 표 11의 결과에서, 본 발명에 의한 진세노사이드 Y는 양성대조군인 TGF-β보다 높은 수준의 우수한 콜라겐 합성능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명에 의한 진세노사이드 Y가 모공 주변의 콜라겐 생성량을 증가시켜 넓어진 모공을 축소시킬 수 있음을 확인하였다.

[106]

[107] 2. 모공 축소 효과

[108] 제형예 1 및 비교제형예 1의 모공 축소 효과를 알아보기 위하여 다음과 같이 평가하였다. 모공 크기가 넓은 피험자 남녀 20명을 선정하여 10명씩 2개 군으로 나누고 각 군별로 얼굴에 제형예 1 및 비교제형예 1의 영양크림을 4주간 매일 바르게 하였다. 모공 축소의 효과에 대한 판정은 실험 전과 4주 후 사진을 찍어서 전문가들의 육안 평가로 이루어졌다. 그 결과는 하기 표 12에 나타내었다(평가 등급: 0 - 전혀 축소 되지 않았다; 5 - 매우 축소되었다).

[109] 표 12

[Table 12]

| 시험물질    | 평가 등급 |
|---------|-------|
| 제형예 1   | 4     |
| 비교제형예 1 | 0     |

[110] 상기 표 12의 결과로부터, 비교제형예 1은 모공 축소 효과가 없지만, 제형예 1의 경우에는 육안으로 확인가능할 정도의 모공 축소 효과를 나타내어 본 발명에 의한 진세노사이드 Y는 모공의 크기를 감소시키는 효과가 우수함을 알 수 있었다.

[111]

[112] [시험예 10] 피지 분비 억제 효과

[113] 1. 5 $\alpha$ -리덕타아제 활성 억제를 통한 피부 과분비 억제 효과

[114] 5 $\alpha$ -리덕타아제 활성 억제 효과를 확인하기 위해서 HEK293-5 $\alpha$ R2 세포에서 [<sup>14</sup>C]테스토스테론이 [<sup>14</sup>C]디하이드로테스토스테론(DHT: dihydrotestosterone)으로 변환되는 비율을 측정하였다. HEK293 세포에 p3 x FLAG-CMV-5 $\alpha$ R2를 형질감염시켜서 24 웰 플레이트에 웰당 2.5 x 10<sup>5</sup> 세포로 넣고 배양하였다(Park et al., 2003, JDS. Vol. 31, pp. 191-98). 다음날 효소 기질과 저해제가 첨가된 새로운 배지로 바꿔주었다. 배지의 기질로는 0.05 $\mu$ Ci [<sup>14</sup>C]테스토스테론(Amersham Pharmacia biotech, UK)을 사용하였다.

[115] 5 $\alpha$ -리덕타아제 활성 억제 정도를 확인하기 위해서 진세노사이드 Y를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 이 때 진세노사이드 Y를 넣지 않은 것은 음성대조군으로 사용하고, 피나스테라이드(finasteride)를 넣은 것을 양성대조군으로 사용하였다. 이 후 배양 배지를 수거하여 스테로이드를 800 $\mu$ l 에틸아세테이트로 추출한 다음 상부의 유기용매층을 분리하여 말린 후 남은 잔유물을 다시 50 $\mu$ l 에틸아세테이트로 녹여서 실리카 플라스틱시트 카이젤겔 60 F254(Silica plastic sheet kieselgel 60 F254) 상에서 에틸아세테이트-헥산(1:1)을 용매로 하여 전개하였다.

[116] 플라스틱 시료를 공기 중에서 건조한 후, 동위원소의 양을 측정하기 위하여 바스 시스템을 사용하였는데, 건조된 플라스틱 시트와 엑스레이 필름을 함께 바스 카세트에 넣어 1주일 후에 필름에 남아있는 테스토스테론과

디하이드로테스토스테론의 동위원소 양을 측정한 다음 하기 수학적 식 3 및 4에 따라 전환율 및 저해율을 각각 산출하였으며, 그 결과를 하기 표 13에 나타내었다.

[117] 수학적 식 3

$$\text{전환율}(\%) = \frac{\text{DHT 영역에서의 방사능}}{\text{총 방사능}} \times 100$$

[118] 수학적 식 4

$$\text{저해율}(\%) = \frac{\text{대조군의 전환율} - \text{시험물질의 전환율}}{\text{대조군의 전환율}} \times 100$$

[119] 표 13

[Table 13]

| 시험물질     | 전환율(%) | 저해율(%) |
|----------|--------|--------|
| 음성대조군    | 48.0   | -      |
| 양성대조군    | 27.6   | 42.5   |
| 진세노사이드 Y | 13.9   | 62.8   |

[120] 상기 표 13의 결과에서, 테스토스테론을 디하이드로테스토스테론으로 전환시켜 세포질 내에 있는 수용체 단백질과 결합해 핵 내로 들어가 피지선 세포를 활성화하고 분화를 촉진시켜 피지선 내에서 피지를 과분비시키는 역할을 하는 5 $\alpha$ -리덕타아제의 활성을 진세노사이드 Y가 효과적으로 억제함으로써 테스토스테론의 디하이드로테스토스테론으로의 전환을 차단하는 것을 확인할 수 있었으며, 5 $\alpha$ -리덕타아제의 활성을 억제하는 것으로 알려진 피나스테라이드보다도 우수한 억제 효과를 가지는 것으로 나타났다. 따라서, 진세노사이드 Y는 5 $\alpha$ -리덕타아제의 활성을 효과적으로 억제시킴으로써 피지의 과분비를 억제시킬 수 있음을 확인하였다.

[121]

[122] 2. 피지 분비 억제 효과

[123] 상기 제형에 1 및 비교제형에 1의 피지 분비 억제 효과를 알아보기 위하여 다음과 같이 평가하였다. 피지분비가 많다고 느끼는 피험자 남녀 30명을 선정하여 지정된 부위에 제형에 1 및 비교제형에 1의 영양크림을 4주간 매일 바르게 하였다. 피지감소의 효과에 대한 판정은 피지량 측정기(Sebumeter SM810, C+K Electronic Co., 독일)를 사용하여 2주 및 4주 경과 후 평균 피지 감소율(%)을 각각 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 14에 나타내었다.

[124] 표 14

[Table 14]

| 시험물질    | 피지 감소율(%) |         |
|---------|-----------|---------|
|         | 2주 경과 후   | 4주 경과 후 |
| 제형예 1   | 34        | 43      |
| 비교제형예 1 | 5         | 5       |

[125] 상기 표 14의 결과에서, 본 발명에 의한 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하는 제형예 1은 이를 함유하지 않은 비교제형예 1 보다 과잉으로 분비되는 피지를 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

[126]

[127] [제형예 3 및 비교제형예 3~4]

[128] 하기 표 15에 나타난 성분 및 함량(중량%)에 따라 제형예 3 및 비교제형예 3~4를 제조하였다. 구체적으로 설명하면, 제형예 3은 진세노사이드 Y를 배합시킨 것이고, 비교제형예 3은 여드름 피부 개선의 유효성분을 전혀 포함시키지 않은 것이며, 비교제형예 4는 항균력에 대한 기준으로 삼을 표준물질로서, 여드름 치료제로 많이 사용하는 에리스로마이신(erythromycin)을 함유시킨 것이다.

[129] 제형예 3 및 비교제형예 3~4의 제조 방법은 다음과 같다. 하기 표 15의 A상의 성분들을 완전 용해시키고 별도의 용해조에서 B상의 성분들을 완전 용해시킨 다음, B상을 A상에 첨가하여 혼합가용화시켰다. 여기에 C상의 성분들을 표 15에 기재된 배합비율에 따라 첨가하여 혼합 균일화시킨 다음 여과시켜 분 조성물들을 제조하였다.

[130] 표 15

[Table 15]

| 구분 |                                         | 제형예 3  | 비교제형예 3 | 비교제형예 4 |
|----|-----------------------------------------|--------|---------|---------|
| A  | 탈이온수(Deionized Water)                   | To 100 | To 100  | To 100  |
|    | EDTA-2Na                                | 0.02   | 0.02    | 0.02    |
|    | 글리세린                                    | 5.0    | 5.0     | 5.0     |
| B  | 에탄올                                     | 2.0    | 2.0     | 2.0     |
|    | PEG-60 경화 피마자유(hydrogenated castor oil) | 0.4    | 0.4     | 0.4     |
|    | 향료(perfume)                             | 0.04   | 0.04    | 0.04    |
| C  | 진세노사이드 Y                                | 5.0    | -       | -       |
|    | 에리스롬마이신                                 | -      | -       | 5.0     |

[131]

[132] [시험예 11] 여드름균에 대한 항균력 시험

[133] 제형예 3 및 비교제형예 3~4의 조성으로 제조된 각각의 화장품 조성물을 가지고 여드름 원인 균주인 프로피오니박테리움 아크네스(ATCC 6919: 배지-BHI 브로쓰(broth))에 대하여 항균력을 시험하였다.

[134] 여드름균에 대한 항균력 시험 방법은 다음과 같았다.

[135] (1) 시험 균액 준비

[136] 프로피오니박테리움 아크네스는 BHI 브로쓰에 접종하여 혐기 배양한 배양액을 사용하였다.

[137] (2) 희석 용액 준비

[138] BHI 브로쓰(pH 6.8) 또는 LB 브로쓰(pH 4.5) 15ml에 상기 시험 균액을 0.15ml 첨가하여 잘 혼합한 것을 희석용액으로 사용하였다.

[139] (3) 시료 준비

[140] 제형예 3 및 비교제형예 3~4로부터 제조된 화장품 조성물 원액 그대로를 시료로 사용하였다.

[141] (4) 항균력 시험

[142] 1) 96웰의 세포배양판(96 well plate) 1번 행에 출발 농도에 맞도록 시료를 넣고 희석용액으로 총량을 200 $\mu$ l씩을 넣는다.

[143] 2) 1번 행의 혼합액을 잘 섞어준 다음 100 $\mu$ l를 취하여 2번 행에 넣고 잘 섞어준 다음, 다시 100 $\mu$ l를 취하여 3번 행에 넣는 방식으로 이중 희석(double dilution)을 행한다.

[144] 3) 32°C에서 24시간 및 48시간 정치 배양한 후 현탁된 정도로 균의 증식 유무를 판단하여 균의 증식이 없는 최소농도를 MIC(최소저지농도; Minimum Inhibitory Concentration) 값으로 결정한다. 만약 혼합액이 불투명하여 균의 증식 유무를 판단하기 어려우면 현미경 관찰을 통하여 확인한다.

[145] 여드름균에 대한 항균력 시험 결과를 하기 표 16에 나타내었다. MIC는 제형에 함유된 유효성분의 농도로 환산하여 표기하였다.

[146] 표 16

[Table 16]

| 항목      | pH  | 프로피오니박테리움 아크네스 |
|---------|-----|----------------|
| 제형예 3   | 5.7 | > 50ppm        |
| 비교제형예 3 | 5.7 | 최고 농도(항균력 없음)  |
| 비교제형예 4 | 5.7 | > 100ppm       |

[147] MIC에서 ppm 농도가 작을수록 여드름균에 대한 항균력에 대하여 유효한 물질이라고 할 수 있는데, 제형예 3의 경우 공지의 여드름 치료제인 에리스로마이신을 사용한 비교제형예 4보다 ppm 농도가 현저하게 작게 나와 진세노사이드 Y를 함유하는 조성물은 시험균에 대하여 훨씬 우수한 항균력을 가짐을 확인할 수 있다.

[148]

[149] [시험예 12] 지질합성(Lipogenesis) 억제 시험

[150] 생쥐의 섬유아세포주(fibroblast cell line)인 3T3-L1 세포를 10%의 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)이 함유된 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium, GIBCO BRL, Life Technologies 社) 배지가 담긴 6웰 배양 플레이트(culture plate)에  $1 \times 10^5$  세포/웰로 부착시켰다. 2일이 지난 후 다시 새로운 DMEM(10% FBS 함유) 배지로 교환하고 2일 동안 배양하였다. 그 다음, 상기 배양한 세포를 다시  $1 \mu\text{g/ml}$  인슐린(insulin), 0.5mM IBMX 및  $0.25 \mu\text{M}$  덱사메타손(dexamethasone)을 함유한 DMEM(10% FBS 함유)로 분화 유도도를 하고 진세노사이드 Y 및 카페인을  $50 \mu\text{M}$ 을 처리한 다음 처리 2일이 경과한 후 다시 인슐린이 포함된 DMEM으로 교환하여 5일 동안 배양하였다. 5일 후 다시 정상 배지(DMEM, 10% FBS 함유)로 교환하고 상기 세포가 형태적으로 지방세포로 변화할 때까지 관찰하면서 배양하였다.

[151] 진세노사이드 Y의 지방세포 내 지방 축적 억제 효능을 평가하기 위하여 상기에서 분화가 완료된 3T3-L1 지방세포를 이용하여 수단 III 염색(S4136, sigma-aldrich)을 실시하였다. 지방 세포를 인산염 버퍼 내에서 4% 파라포름알데하이드(pH 7.2)로 상온에서 고정한 후에 PBS(phosphate buffered saline)로 수세해 준 다음, 수단 III으로 염색한 후에 사진을 찍어서 육안 비교하였다. 대조군은 시험물질이나 비교물질을 첨가하지 않은 배지만을

사용한 것이고, 다른 비교군으로 카페인 50 $\mu$ M을 처리하였다. 지방 축적 억제 정도는 염색된 정도를 +++, ++, +, -로 나누어 등급을 부여하였다. 이때 +++로 갈수록 염색 정도가 크다는 것을 의미한다. 그 결과를 하기 표 17에 나타내었다.

[152] 표 17

[Table 17]

| 시료       | 저해율% |
|----------|------|
| 대조군      | +++  |
| 비교군      | +    |
| 진세노사이드 Y | -    |

[153] 상기 표 17에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 사용된 진세노사이드 Y는 지방세포 내 축적된 지방의 양이 적을 뿐만 아니라, 공지된 지질합성 저해 물질인 카페인보다 우수한 지질합성 저해 효과가 있음을 알 수 있다. 따라서, 지질합성이 억제됨으로써 피지가 감소되어 여드름 발생을 억제할 수 있다.

[154]

[155] [시험예 13] 여드름 개선과 피지분비 감소 및 자극 유무의 시험

[156] 여드름을 보유하고 있는 30명을 10명씩 3개 군으로 나누고 각각의 군에 해당하는 피험자에게 상기 제형예 3 및 비교제형예 3~4로 제조된 화장료 조성물을 한 달간 사용하게 하였다. 여드름 개선 척도는 1점에서 5점까지로 하고, 1점은 '아니다', 3점은 '보통이다', 5점은 '매우 그렇다'로 표기하도록 하였다. 실험 결과는 하기의 표 18에 10명의 평균점수로 표기하였다.

[157] 여드름 소멸 시기는 소멸이 판독된 일수를 기준으로 하였으며, 여드름 재발은 유무로 1개월 뒤의 결과를 기준으로 하였다. 피지 분비감소는 1점에서 5점까지로 하고, 1점은 '아니다', 3점은 '보통이다', 5점은 '매우 그렇다'로 표기하도록 하였다. 실험 결과는 하기 표 22에 10명의 평균점수로 표기하였다. 피부자극의 유무는 (자극반응을 보인 명수)/(총 시험자수)로 보았다.

[158] 표 18

[Table 18]

|            | 염증성<br>여드름 개선 | 면포성<br>여드름<br>소멸시기 | 여드름 재발 | 피지분비<br>감소 | 자극 유무 |
|------------|---------------|--------------------|--------|------------|-------|
| 제형예 3      | 3.2           | 3일                 | 무      | 4.3        | 0/10  |
| 비교제형예<br>3 | 2.1           | 13일                | 유      | 2.0        | 0/10  |
| 비교제형예<br>4 | 4.2           | 2일                 | 무      | 4.1        | 9/10  |

[159] 상기 표 18에 나타내 바와 같이, 제형예 3은 비교제형예 3에 비해 여드름이 재발되지 않았고, 전반적으로 여드름 개선에 대해 우수한 효과가 있음을 알 수 있다. 한편, 항균력 표준물질을 함유한 비교제형예 4의 경우 여드름 개선 효과를 나타내고 있지만, 사용함에 있어 피부자극이 강하여 장기적으로 사용하기에는 적당하지 않은 것으로 보이나, 본원 발명에 따른 조성물은 자극이 없어 장기간의 사용에도 적당한 것으로 나타났다.

[160]

[161] [시험예 14] IL-8 생성 억제 효과

[162] 실험 하루 전 피부 각화상피세포(Normal human skin keratinocyte, NHEK, 입수처: Lonza)를 96웰(well) 플레이트에  $5 \times 10^4$  세포/웰이 되도록 분주한 후  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  인큐베이터(incubator)에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, PBS로 세포를 2회 씻어주고 무혈청 KBM(serum free keratinocyte basement media)으로 갈아주었다. 각각의 웰에 진세노사이드 Y를 하기 표 19의 농도별로 처리하여 30분간 반응시킨 후, PGSA( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ), PGSA( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ), PGSA( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ )+LPS( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 각각 처리하였다. 여기서, PGSA(peptidoglycan from *S. aureus*)는 포도상구균에서 추출한 펩티도글리칸(peptidoglycan)으로서, 그람 양성(+) 균의 세포벽의 주요 구성 성분이고 박테리아의 세포막 성분들은 염증을 유발시키는 것으로 알려져 있으며, 특히 포도상구균의 경우 아토피 환자의 90% 정도가 이 균에 의한 2차 감염을 일으키는 것으로 보고되어 있다. LPS(lypopolysaccharide)는 그람 음성(-) 박테리아균의 세포막 주요 구성성분이며 염증 유발의 주원인으로 알려져 있다.

[163] 24시간 동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  인큐베이터에서 배양한 후 배양액을 취하여 인터류킨-8(Interleukin-8, IL-8)에 대한 ELISA를 진행하였으며, 그 결과를 하기 표 19에 나타내었다. ELISA는 제조회사(BD science)의 실험 방법을 이용하였다.

[164] 표 19

[Table 19]

| 구분                                                                | IL-8 분비( $\text{pg}/\text{ml}$ ) |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 무처리 대조군(Control)                                                  | 935.12                           |
| PGSA( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ )                                 | 4812.60                          |
| PGSA( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ )                                 | 5895.08                          |
| PGSA( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ )+LPS( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | 6814.91                          |
| 진세노사이드 Y(5ppm)                                                    | 1436.43                          |
| 진세노사이드 Y(25ppm)                                                   | 1204.19                          |
| 진세노사이드 Y(50ppm)                                                   | 1012.73                          |

[165] 상기 표 19에서 진세노사이드 Y가 PGSA와 LPS에 의해 증가한 IL-8의 분비를

현저히 감소 및 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 피부 외용제 조성물은 PGSA와 LPS에 의해 증가한 IL-8의 분비를 현저히 감소시킴으로써 우수한 항염증 효과를 제공할 수 있음을 알 수 있다.

[166]

[167] [시험예 15] 가려움 완화 평가

[168] 실험 하루 전 각질형성세포(세포주명: HaCaT 입수처: ATCC)를 96 웰(well) 플레이트에  $4 \times 10^4$  세포/웰이 되도록 분주한 후  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  인큐베이터(incubator)에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, HBSS(Hanks' Balanced Salt solution) 버퍼로 96웰 플레이트를 2회 워싱(washing)한 후, 반응 버퍼( $2\mu\text{M}$  Fluo-4-AM, 20% pluronic acid, 2.5mM probenecid)를 세포에 넣어주었다.  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  인큐베이터에서 30분, 상온에서 30분간 반응시킨 후, HBSS 버퍼로 2회 워싱하고 하기 표 20과 같은 농도(%)의 진세노사이드 Y로 세포를 처리하였다.

[169] 10분간 반응시킨 후, 2U/ml 트립신(Trypsin) 또는  $5\mu\text{M}$  PAR-2 활성 펩타이드(SLIGKV)를 처리하고 80초간 세포 내  $\text{Ca}^{2+}$  농도 변화를 측정하였다. 세포 내  $\text{Ca}^{2+}$  농도 변화 측정은 플렉스테이션3(FlexStation3: Molecular Device, USA)를 이용하였다. 진세노사이드 Y와 2U/ml 트립신(Trypsin) 또는  $5\mu\text{M}$  PAR-2 활성 펩타이드(SLIGKV) 처리 후 80초간의 플렉스(flex)를 측정하여 얻어낸 값의 최소값과 최대값의 차를 구한 후, 그 값을 2U/ml 트립신 또는  $5\mu\text{M}$  PAR-2 활성 펩타이드(SLIGKV) 처리 시의 최소값과 최대값의 차와 비교하여 칼슘 이온들의 세포 내 유입에 대한 억제율(%)을 하기 표 20에 나타내었다.

[170] 표 20

[Table 20]

| 진세노사이드 Y 농도 | 칼슘 이온들의 세포 내 유입에 대한 억제율(%) |                                 |
|-------------|----------------------------|---------------------------------|
|             | 트립신(2U/ml)                 | PAR-2 활성 펩타이드( $5\mu\text{M}$ ) |
| 0.05%       | 25                         | 29                              |
| 0.1%        | 31                         | 34                              |
| 0.5%        | 43                         | 44                              |
| 1.0%        | 48                         | 51                              |

[171] 상기 표 20에서 알 수 있듯이, 트립신 또는 PAR-2 활성 펩타이드(SLIGKV)에 의한 세포 내 칼슘 이온들의 유입이 진세노사이드 Y의 처리에 따라 감소되며, 진세노사이드 Y의 농도를 높여줌에 따라 세포 내 칼슘 이온들의 유입이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다.

[172] 따라서, 본 발명의 진세노사이드 Y를 함유하는 피부 외용제 조성물은 가려움을 유발시키는 PAR-2 활성을 효과적으로 억제함으로써 우수한 항소양 효과를

제공할 수 있다.

[173]

[174] [제형예 4 및 비교제형예 5]

[175] 하기 표 21의 조성으로 샴푸를 제조하였다. 구체적으로, 계면활성제와 에틸렌글리콜디스테아레이트를 정제수에 첨가하여 80°C가 될 때까지 가열하여 균일하게 용해시킨 후, 교반하에 40°C까지 서서히 냉각시키고, 상기 혼합물에 본 발명에 따른 유효성분과 방부제, 점도조절제, 향료, 모발 컨디셔닝제를 투입하여 혼합한 후, 교반하에 실온까지 냉각시켜 제조하였다.

[176] 표 21

[Table 21]

| 성분               | 제형예 4  | 비교제형예 5 |
|------------------|--------|---------|
| 라우릴 황산암모늄        | 10     | 10      |
| 폴리옥시에틸렌라우릴 황산암모늄 | 5      | 5       |
| 코코아미도프로필베타인      | 2      | 2       |
| 에틸렌글리콜디스테아레이트    | 1.5    | 1.5     |
| 코코일 모노에탄올아미드     | 0.8    | 0.8     |
| 진세노사이드 Y         | 5.0    | -       |
| 폴리쿼터늄-10         | 0.2    | 0.2     |
| 청색1호             | 0.0002 | 0.0002  |
| 황색4호             | 0.0001 | 0.0001  |
| 메틸파라벤            | 0.1    | 0.1     |
| 향료               | 0.8    | 0.8     |
| 구연산              | 0.1    | 0.1     |
| 디메치콘             | 1.0    | 1.0     |
| 물                | to 100 | to 100  |

[177]

[178] [시험예 16] 비듬감소 효과 시험

[179] 비듬이 비교적 많은 19~35세의 남성 24명을 선정하여 각 제형예 4 및 비교제형예 5의 샴푸에 대하여 12명씩 2개 그룹으로 1개월간 다음과 같은 방식으로 사용하게 한 후 비듬 감소율을 측정하였다.

[180] 시험 개시전에 보통 통상의 샴푸로 세발하고, 세발 후 2일간 누적된 비듬을 채집하여 채집된 비듬의 중량과 각 제형예 4 및 비교제형예 5의 샴푸로 2일에 한번씩 세발하여 시험종료 후 2일간 누적된 비듬의 중량을 비교 평가하였다. 이때 누적된 비듬은 진공 흡입 장치로써 두피로부터 직접 채집하여, 하기 수학적

5에 의거하여 비듬 감소율을 구하고 그 결과를 하기 표 22에 나타내었다.

[181] 수학식 5

$$\text{비듬 감소율(\%)} = \frac{\text{시험 개시 전 비듬 중량(mg)} - \text{1개월 후 비듬 중량(mg)}}{\text{시험 개시 전 비듬 중량(mg)}} \times 100$$

[182] 표 22

[Table 22]

|          | 제형예 4 | 비교제형예 5 |
|----------|-------|---------|
| 비듬감소율(%) | 63.8  | 0.7     |
|          | 59.2  | -0.5    |
|          | 72.6  | -1.1    |
|          | 64.3  | 1.5     |
|          | 47.0  | 2.2     |
|          | 54.2  | 1.3     |
|          | 63.9  | 6.3     |
|          | 69.3  | 3.6     |
|          | 51.3  | 3.3     |
|          | 69.1  | 4.6     |
|          | 66.9  | 3.7     |
|          | 53.7  | 4.2     |
| 평균값      | 61.27 | 2.5     |
| SD       | 8.1   | 2.2     |

[183] 상기한 표 22에서 알 수 있는 바와 같이, 진세노사이드 Y를 함유한 제형예 4의 경우 우수한 비듬방지 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[184]

[185] [시험예 17] 두피 가려움증 방지 효과 시험

[186] 비교적 두피 가려움을 심하게 느끼는 25세~45세의 남녀 24명을 선정하여 12명씩 2개 그룹으로 나누어 각 제형예 4 및 비교제형예 5의 샴푸를 3일에 1회씩 2주간 사용하게 한 후 두피 가려움 방지 효과를 하기 평가기준을 통하여 평가하고 그 결과를 하기 표 23에 나타내었다.

[187] [평가 기준]

[188] 매우 우수하다 - 5점

[189] 우수하다 - 4점

[190] 보통이다 - 3점

[191] 불량하다 - 2점

[192] 매우 불량하다 - 1점

[193] 표 23

[Table 23]

| 구분            | 제형예 4 | 비교제형예 5 |
|---------------|-------|---------|
| 두피의 가려움증 제거효과 | 4     | 2.3     |

[194] 상기한 표 23에서 알 수 있는 바와 같이, 진세노사이드 Y를 함유한 제형예 4의 경우가 두피 가려움증을 방지하는데 보다 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[195]

[196] [시험예 18] 모낭 모유두 세포 증식 효과

[197] 모발을 구성하는 케라틴 단백질은 모근부 케라틴형성세포 (keratinocyte)에서 생성되며, 이 케라틴형성세포는 모유두 세포로부터 분화된다. 본 조성물의 모유두 세포를 활성을 평가하기 위하여 본 발명에서는 DP6(rat immortalized dermal papilla cell) 세포주를 사용하였다(Wendy Filsell, Journal of Cell Science 107, 1761-1772 (1994)). 본 모유두 세포주는 수컷 PVG 래트 수염의 모근에서 현미해부(microdissection) 방법으로 분리하여 배양한 세포주이며, 10% FBS(Fetal bovine serum)가 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C가 유지되는 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. DP6을 96 웰 플레이트에 넣고 24시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양한 후 본 진세노사이드 Y를 각각 5ppm, 10ppm 및 20ppm의 농도로 처리하였다. 약물 처리 24시간 경과 후에 WST-1 키트(Roche)를 사용하여 세포 증식능을 측정하였다. 결과는 하기 표 24에 나타내었다.

[198] 표 24

[Table 24]

| 구분               | 세포 증식능(%) |
|------------------|-----------|
| 무처리 대조군(Control) | 100       |
| 진세노사이드 Y(5ppm)   | 123       |
| 진세노사이드 Y(10ppm)  | 131       |
| 진세노사이드 Y(20ppm)  | 146       |

[199] 상기 표 24에서 알 수 있는 바와 같이 진세노사이드 Y를 처리한 경우 모유두 세포의 증식이 증가하며, 이는 농도 의존적으로 유의차있게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[200]

[201] [시험예 19] 칼륨 이온 채널 활성 증가 효과 평가

[202] 탈모 치료제인 미녹시딜은 잠재적인 미토콘드리아 칼륨 이온 채널 오프너(K<sub>ATP</sub>

channel opener)로 알려져 있으며, 안드로겐성 탈모의 치료에 사용되는 대표적인 약물이다. 이러한 미녹시딜의 기작을 평가하기 위해서 두피의 진피를 구성하는 섬유아 세포에서  $K_{ATP}$  채널을 막는 톨부타미드(SIGMA AIDRICH, T0891)를 처리하여 세포증식을 억제하고, 다시 칼륨 이온 채널을 열어 세포증식이 회복되는 시험법을 사용하였다.

- [203] 본 조성물의  $K_{ATP}$  채널 오프너로서의 기능을 평가하기 위해서 본 발명에서는 섬유아세포주인 NIH3T3(Mouse embryonic fibroblast cell line) 세포주를 사용하였다. 본 세포주는 NIH 스위스 마우스 배아(Swiss mouse embryo)에서 분리한 섬유아 세포주를 3T3 프로토콜로 자연 불멸화시킨 세포주이다. 상기 세포주는 10% FBS가 함유된 DMEM(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에서 5%  $CO_2$ , 37°C가 유지되는 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. NIH3T3을 96웰 플레이트에 넣고 24시간 동안 37°C 인큐베이터에서 배양한 후 2.5mM 톨부타미드를 처리하고, 10분 뒤에 양성대조군인 미녹시딜 10 $\mu$ M과 진세노사이드 Y를 각각 2.5ppm, 5ppm 및 10ppm의 농도로 처리하며, 약물 처리 48시간 경과 후에 WST-1 키트(Roche)를 사용하여 세포 증식능을 측정하였다. 결과는 하기 표 25에 나타내었다.

- [204] 표 25

[Table 25]

| 구분               | 세포 증식능(%) |
|------------------|-----------|
| 무처리 대조군(Control) | 100       |
| 미녹시딜             | 132       |
| 진세노사이드 Y(2.5ppm) | 126       |
| 진세노사이드 Y(5ppm)   | 128       |
| 진세노사이드 Y(10ppm)  | 133       |

- [205] 상기 표 25에서 알 수 있는 바와 같이 진세노사이드 Y를 처리한 경우 섬유아 세포의 증식이 회복되고, 세포 증식능이 처리한 진세노사이드 Y의 농도의존적으로 증가함으로 알 수 있으며, 진세노사이드 Y를 10ppm으로 처리한 경우에는 미녹시딜 수준으로 섬유아 세포의 증식이 회복되는 것을 확인할 수 있다.

- [206]

- [207] [시험예 20] 진세노사이드 Y의 멜라닌 생성 촉진 효과 시험

- [208] RPMI 배지에 5%의 우태아혈청, 100IU의 페니시린G 및 0.2 $\mu$ M의 TPA를 첨가한 배지에 멜라닌 세포(melan-a)를 24웰플레이트(24-well microtiter plate)에 50,000세포/웰이 되도록 분주하였다. 다음날 분주된 세포에 시험 물질로서 진세노사이드 Y를 최종농도 10ppm 또는 50ppm으로 처리하고, 음성 대조군으로는 0.1% DMSO를, 양성 대조군으로는 100 $\mu$ M IBMX를 처리한 후에

37°C 온도에서 3일간 배양하였다. 배양 후, PBS로 웰을 씻어주고 1N NaOH를 100 $\mu$ l씩 넣은 후 세포 안의 멜라닌을 용해시켰다. 용해된 멜라닌의 흡광도를 평판배양측정기(microplate reader)를 이용하여 405nm에서 측정하였다. 진세노사이드 Y의 멜라닌 생성 촉진 효과를 대조군과 비교한 결과는 하기 표 26에 나타내었다.

[209] 표 26

[Table 26]

| 시료                | 멜라닌 합성양(%) |
|-------------------|------------|
| DMSO(0.1%)        | 100        |
| IBMX(100 $\mu$ M) | 120        |
| 진세노사이드 Y(10ppm)   | 108        |
| 진세노사이드 Y(50ppm)   | 118        |

[210] 상기 표 26을 보면, 진세노사이드 Y가 멜라노사이트의 멜라닌 합성을 촉진시켜 멜라닌 생성이 늘어나, 우수한 멜라닌 생성 촉진 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[211]

[212] [시험예 21] 진세노사이드 Y의 멜라노사이트에서의 MITF 및 티로시나제 발현 촉진 효과

[213] 501mel 세포주를 이용하여 6웰플레이트(6-well microtiter plate)에 500,000세포/웰이 되도록 분주하고, 각공에 음성 대조군으로는 DMSO 0.1%, 양성 대조군으로는 IBMX 100 $\mu$ M, 그리고 시험군으로는 진세노사이드 Y를 10ppm으로 처리하여, 37°C 온도에서 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양한 후 단백질을 얻었다. 이렇게 얻은 단백질에 대하여 MITF 및 티로시나제 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 하였다. 단백질 추출과 웨스턴 블랏은 통상적으로 당업자가 사용하는 표준 방법으로 수행하였다. 웨스턴 블랏 후 그 결과를 음성 대조군을 100으로 하고 이 값과 비교하여 하기 표 27에 나타내었다.

[214] 표 27

[Table 27]

|      | MITF |          | 티로시나제 |          |
|------|------|----------|-------|----------|
|      | IBMX | 진세노사이드 Y | IBMX  | 진세노사이드 Y |
| 24hr | 121  | 95       | 160   | 143      |
| 48hr | 98   | 109      | 149   | 151      |
| 72hr | 224  | 118      | 298   | 179      |

[215] 상기 표 27을 보면, 진세노사이드 Y는 멜라노사이트에서 MITF와 티로시나제 단백질 발현을 상승시킴을 확인할 수 있다.

[216]

[217] [시험예 22] 진세노사이드 Y의 항균력 평가

[218] 진세노사이드 Y의 항균력을 평가하기 위해 항균 실험을 실시하였다. 구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

[219] 실험에 사용한 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 에스체리치아 콜리(*Escherichia coli*), 세도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 균주는 트립티케이스 대두 배지(Tryptic Soy Broth)에서, 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 아스퍼질러스 니거(*Aspergillus niger*) 균주는 사부로 텍스트로오스 배지(Sabouraud Dextrose Broth)에서 배양했다. 배양액을 각 배지에 1/100(캔디다 알비칸스 균주는 1/10) 희석한 희석액을 시험균액으로 사용하였다. 아스퍼질러스 니거는  $2 \times 10^8$  cfu/ml이 되도록 제조한 포자 현탁액을 시험균액으로 사용하였다.

[220] 각 배지 15ml에 상기 시험균액을 0.15ml 첨가하여 잘 혼합한 것을 희석용액으로 사용하였다.

[221] 96 웰 플레이트(96 well plate) 1번 행에 시료를  $16 \mu\text{l}$ 씩 넣고, 희석용액을  $184 \mu\text{l}$ 씩 넣었다. 나머지 웰들에는 희석용액  $100 \mu\text{l}$ 씩을 넣었다. 1번 행의 혼합액을 잘 섞어준 다음  $100 \mu\text{l}$ 를 취하여 2번 행에 넣고 잘 섞어준 다음, 다시  $100 \mu\text{l}$ 를 취하여 3번 행에 넣는 방식으로 2배씩 희석시켰다.

[222] 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 에스체리치아 콜리(*Escherichia coli*), 세도모나스 애루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)는 32 C 항온조에서, 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 아스퍼질러스 니거(*Aspergillus niger*)는 25°C 항온조에서 배양하였다.

[223] 48시간 후에 균 증식여부를 현탁도와 현미경으로 확인하여 최소저해농도(MIC) 값을 결정하고 그 결과를 하기 표 28에 나타내었다.

[224] 표 28

[Table 28]

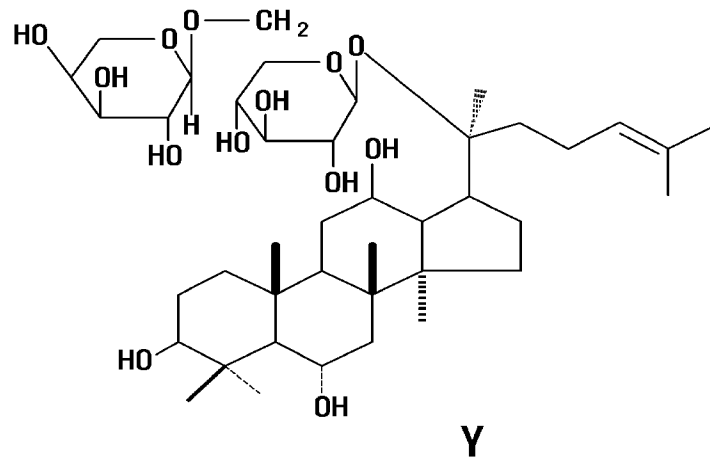
| 샘플       | 최소저해농도(MIC), 단위 % |                      |               |             |               |
|----------|-------------------|----------------------|---------------|-------------|---------------|
|          | 세도모나스<br>애루지노사    | 스타필로코<br>쿠스<br>아우레우스 | 에스체리치<br>아 콜리 | 캔디다<br>알비칸스 | 아스퍼질러<br>스 니거 |
| 진세노사이드 Y | 0.3               | 0.06                 | 0.129         | > 3         | > 1           |

[225] 상기 표 28에서 보는 바와 같이, 진세노사이드 Y는 다양한 균주에 대하여 항균력을 나타냄을 확인할 수 있으며, 이를 통하여 진세노사이드 Y는 조성물 내에서 천연 방부제, 또는 항균제로서 작용할 수 있음을 예측할 수 있다.

## 청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표현되는 진세노사이드 Y를 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물.

[화학식 1]



[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 진세노사이드 Y는 조성물 총 중량에 대하여 0.001~50중량%의 양으로 함유됨을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 미백용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 보습용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 장벽 기능 강화용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 각질형성세포 분화 유도용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 여드름 개선용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 항균용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 항염용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 지질생성을 억제함을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 아토피 개선용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

[청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 혈색 및 피부톤 개선용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

- [청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 모공 축소용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 피지 조절용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 15] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 트러블 개선용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 16] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 피부 자극 생성 방어용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 17] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 비듬 방지용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 18] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 욱모용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 19] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 백모 방지용임을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.
- [청구항 20] 제1항에 있어서, 상기 진세노사이드 Y는 천연 방부제로서 사용됨을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/003953

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A61K 31/704(2006.01)i, A61K 31/70(2006.01)i, A61P 17/00(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/704; C12P 19/44; C12P 33/00; C07J 17/00; A61K 31/56; A01N 65/00; A61K 36/258; A61P 17/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: saponin, ginsenoside Y, external composition for skin, whitening, moisturizing, acne, antibiotic, inflammatory

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | KR 10-2010-0107865 A (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP) 06 October 2010                                             | 1-2,9                 |
| A         | See paragraphs [0004] and [0010].                                                                                                | 3-8,10-20             |
| A         | US 2005-0233984 A1 (MOOK, In-Hee et al.) 20 October 2005<br>See claims 1, 2 and 4.                                               | 1-20                  |
| A         | US 8263565 B2 (YOO, Byung Hee et al.) 11 September 2012<br>See claim 1.                                                          | 1-20                  |
| A         | WO 2006-113495 A2 (CHEN, Hui-Ling et al.) 26 October 2006<br>See claims 1-3.                                                     | 1-20                  |
| A         | KR 10-2008-0028266 A (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 31 March 2008<br>See claims 1 and 4. | 1-20                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 AUGUST 2014 (27.08.2014)

Date of mailing of the international search report

27 AUGUST 2014 (27.08.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2014/003953**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| KR 10-2010-0107865 A                      | 06/10/2010          | KR 10-1079293 B1        | 04/11/2011          |
| US 2005-0233984 A1                        | 20/10/2005          | AU 2002-302997 A1       | 19/01/2004          |
|                                           |                     | US 2008-182800 A1       | 31/07/2008          |
|                                           |                     | WO 2004-002494 A1       | 08/01/2004          |
| US 8263565 B2                             | 11/09/2012          | EP 1327434 A1           | 16/07/2003          |
|                                           |                     | EP 1327434 B1           | 13/08/2008          |
|                                           |                     | JP 04549625 B2          | 22/09/2010          |
|                                           |                     | JP 2003-212776 A        | 30/07/2003          |
|                                           |                     | KR 10-0465976 B1        | 13/01/2005          |
|                                           |                     | KR 10-0465977 B1        | 13/01/2005          |
|                                           |                     | KR 10-0835863 B1        | 09/06/2008          |
|                                           |                     | KR 10-0835864 B1        | 09/06/2008          |
|                                           |                     | US 2003-0175315 A1      | 18/09/2003          |
|                                           |                     | US 2006-0216261 A1      | 28/09/2006          |
| WO 2006-113495 A2                         | 26/10/2006          | US 2006-234956 A1       | 19/10/2006          |
|                                           |                     | WO 2006-113495 A3       | 07/06/2007          |
| KR 10-2008-0028266 A                      | 31/03/2008          | NONE                    |                     |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

A61K 31/704(2006.01)i, A61K 31/70(2006.01)i, A61P 17/00(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/704; C12P 19/44; C12P 33/00; C07J 17/00; A61K 31/56; A01N 65/00; A61K 36/258; A61P 17/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC  
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 사포닌, 진세노사이드 Y, 피부 외용제, 미백, 보습, 여드름, 향균, 향염

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                              | 관련 청구항     |
|-------|-------------------------------------------------------------------------|------------|
| X     | KR 10-2010-0107865 A (건국대학교 산학협력단) 2010.10.06<br>단락 [0004] 및 [0010] 참조. | 1-2, 9     |
| A     |                                                                         | 3-8, 10-20 |
| A     | US 2005-0233984 A1 (MOOK, IN-HEE 외) 2005.10.20<br>청구항 1, 2 및 4 참조.      | 1-20       |
| A     | US 8263565 B2 (YOO, BYUNG HEE 외) 2012.09.11<br>청구항 1 참조.                | 1-20       |
| A     | WO 2006-113495 A2 (CHEN, HUI-LING 외) 2006.10.26<br>청구항 1-3 참조.          | 1-20       |
| A     | KR 10-2008-0028266 A (부산대학교 산학협력단) 2008.03.31<br>청구항 1 및 4 참조.          | 1-20       |



추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.



대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 08월 27일 (27.08.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 08월 27일 (27.08.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

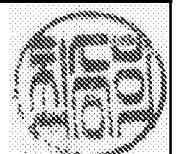
 대한민국 특허청  
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

최승희

전화번호 +82-42-481-8740



| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌             | 공개일        |
|-----------------------|------------|--------------------|------------|
| KR 10-2010-0107865 A  | 2010/10/06 | KR 10-1079293 B1   | 2011/11/04 |
| US 2005-0233984 A1    | 2005/10/20 | AU 2002-302997 A1  | 2004/01/19 |
|                       |            | US 2008-182800 A1  | 2008/07/31 |
|                       |            | WO 2004-002494 A1  | 2004/01/08 |
| US 8263565 B2         | 2012/09/11 | EP 1327434 A1      | 2003/07/16 |
|                       |            | EP 1327434 B1      | 2008/08/13 |
|                       |            | JP 04549625 B2     | 2010/09/22 |
|                       |            | JP 2003-212776 A   | 2003/07/30 |
|                       |            | KR 10-0465976 B1   | 2005/01/13 |
|                       |            | KR 10-0465977 B1   | 2005/01/13 |
|                       |            | KR 10-0835863 B1   | 2008/06/09 |
|                       |            | KR 10-0835864 B1   | 2008/06/09 |
|                       |            | US 2003-0175315 A1 | 2003/09/18 |
|                       |            | US 2006-0216261 A1 | 2006/09/28 |
| WO 2006-113495 A2     | 2006/10/26 | US 2006-234956 A1  | 2006/10/19 |
|                       |            | WO 2006-113495 A3  | 2007/06/07 |
| KR 10-2008-0028266 A  | 2008/03/31 | 없음                 |            |