(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0074688
(43) 공개일자 2010년07월02일

(51) Int. Cl.
A61K 8/97 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0133181
(22) 출원일자 2008년12월24일
심사청구일자 2008년12월24일

(71) 출원인
주식회사 한국화장품제조
서울 종로구 서린동 88번지
(72) 발명자
최종완
서울특별시 광진구 노유2동 한강우성아파트 102동 1701호
정민석
서울특별시 송파구 잠실동 트리지움아파트 307동 1803호
박창민
충청북도 음성군 대소면 대풍리 산수화아파트 106동 407호
(74) 대리인
한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 조직배양한 에키네시아 부정근 추출물을 포함하는 화장료 조성물 및 이의 제조 방법

(57) 요 약

본 발명은 조직배양한 에키네시아 부정근 추출물을 포함하는 화장료 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 본 발명의 조직배양한 에키네시아 부정근 추출물은 세포 증식 효과 및 자극에 대한 세포 보호 효과를 가지고, 상기 추출물을 함유한 화장료 제형은 피부 자극을 유발하지 않으면서 피부 보습 효과를 가지므로, 피부손상에 대한 피부보호 및 피부개선을 위한 화장료 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

조직배양한 에키네시아 부정근 추출물을 유효성분으로서 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 보습 및 피부 보호용 화장료 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 에키네시아는 에키네시아 푸르푸레아(*Echinacea purpurea*), 에키네시아 안구스티폴리아(*Echinacea angustifolia*) 및 에키네시아 팔리다(*Echinacea pallida*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 피부 보습 및 피부 보호용 화장료 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 추출물은 화장료 조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 20중량%로 함유되는 것을 특징으로 하는, 피부 보습 및 피부 보호용 화장료 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 추출물은, 상기 부정근을 정제수, C_1 내지 C_4의 저급 알코올, 다가 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매를 이용하여 추출한 여액인 것을 특징으로 하는, 피부 보습 및 피부 보호용 화장료 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 용매는 용매 총중량에 대해 20~40중량%의 다가 알코올 및 20~50중량%의 C_1 내지 C_4의 저급 알코올을 함유하는 수용액인 것을 특징으로 하는, 피부 보습 및 피부 보호용 화장료 조성물.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 다가 알코올은 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜 및 펜틸렌글리콜을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 피부 보습 및 피부 보호용 화장료 조성물.

청구항 7

청구항 4에 있어서, 상기 추출물은, 상기 에키네시아 부정근 1~5 중량%를 상기 용매 95~99 중량%에 첨가하여 제조되는 것을 특징으로 하는, 피부 보습 및 피부 보호용 화장료 조성물.

청구항 8

i) 조직배양한 에키네시아 부정근을 물, C_1 내지 C_4의 저급 알코올, 다가 알코올, 또는 이들의 혼합용매와 혼합하는 단계;

ii) 상기 혼합물을 10℃ 내지 40℃의 실온에서 숙성한 후 여과하여 그 여액을 얻는 단계, 및

iii) 상기 여액 및 화장료 성분을 포함하는 화장료 조성물을 제조하는 단계

를 포함하는 청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 기재된 피부 보습 및 피부 보호용 화장료 조성물의 제조 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피부 자극을 유발하지 않으면서 세포 보호 및 보습 효과를 갖는 조직배양한 에키네시아 부정근 추출물을 포함하는 화장료 조성물 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 표피의 각질층은 피부에서도 가장 외측에 존재하면서 피부 밖으로 수분과 전해질이 소실되는 것을 억제함으로써 피부의 건조를 막고 피부가 정상적인 생화학적 대사를 할 수 있는 환경을 제공한다. 또한 외부의 물리적 손상과 화학물질로부터 인체를 보호하거나 세균, 바이러스 등이 피부로 침범하는 것을 방지하는 중요한 역할을 한다. 정상 피부에서의 수분은 체내에 70%, 각질층에 20% 함유되어 있어 피부의 탄력성 및 유연성을 지탱해준다. 또한, 자연보습인자(NMP; Natural Moisturizing Factor)와 피지는 각질층에 존재하며 각질층의 수분 밸런스를 유지하는데 도움을 준다. NMF와 피지의 양이 균형이 잘 이루어진다면 피부는 촉촉함과 부드러운 상태를 유지한다.

[0003] 그러나, 피부의 이러한 기능에도 불구하고, 피부는, 혹독한 외부환경, 오염된 대기, 노화에 의한 건조에 의해 수분을 유지할 수 없어 건조해지기 쉬우므로, 피부 보습제의 필요성이 증가되고 있다.

[0004] 보습을 위한 물질들이 다수 알려져 있으며, 지금까지 알려진 피부 보습제로서는 세라마이드 등의 지질 성분과 필수 지방산 및 지질 복합체 등 각질층에서의 수분 보유를 증가시킬 수 있는 물질을 사용하는 것이 일반적이고, 이들 물질을 함유한 제형을 만들기 위해서는 소듐 라우릴 설페이트(sodium lauryl sulfate), 디메틸 술폭사이드(dimethyl sulfoxide), 크로톤 오일, 수산화나트륨 등과 같이 일반적으로 20종 내지 50여종의 다양한 원료들이 제품에 적용됨으로써 피부에 염증, 가려움증, 알러지 등 자극이 유발될 수 있었다.

[0005] 피부가 자극을 일으키는 물질에 노출되면 각질층이 손상을 받게되고, 따라서 각질층의 손상의 지표가 되는 경표피 수분손실(Transepidermal Water Loss)이 증가하게 되며, 이는 1차적인 염증반응의 원인이 되기도 한다. 화장품의 사용에 의해 유발될 수 있는 염증반응에는 가려움증(itching), 따가움(stinging), 화끈거림(burning) 등의 자극감과 홍반(erythema), 부종(edema) 등이 있으며 접촉성 피부염으로는 자극성 접촉 피부염, 감각성 자극, 광독성 피부염 등으로 대별할 수 있으나, 이들 증상을 명확하게 구별하기는 어려우며 서로 복합적으로 발생하는 경우가 대부분이다.

[0006] 따라서 피부 보습 및 피부 보호 효과를 가지면서 피부에 대한 자극이 없고 인체에 대해 안전성이 확보되는 천연생약으로부터 유용 성분을 얻고자 하는 연구가 진행되고 있다.

[0007] 에키네시아(*Echinacea*)는 북아메리카 원산의 쌍떡잎 식물 초롱꽃목 국화과의 다년생 초본류 허브식물로서, 수세기 동안 원주민들의 감기, 감염에 의한 질병 및 염증의 치료를 위한 약용식물로써 사용되어 왔다. 에키네시아에는 9가지 종이 알려져 있으며, 이들 중 에키네시아 푸르푸레아(*Echinacea purpurea*), 에키네시아 안구스티폴리아(*Echinacea angustifolia*), 에키네시아 팔리다(*Echinacea pallida*)의 3종이 주로 이용되고 있다. 에키네시아 선호도가 높은 유럽과 북미에서 허브제품의 판매가 매년 증가하고 에키네시아의 치료적 특성에 대한 과학적 연구가 계속 진행되고 있다. 최근, 에키네시아의 효능으로 조직 재생, 치료, 정화 그리고 면역증진 및 염증억제 효과에 대한 과학적 연구 결과가 보고되고 있지만, 국내에서는 일부 농원에서 관상용으로만 재배하고 있다.

[0008] 한편, 천연 생약 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제조에 있어서, 야생종의 수확만으로는 화장료 제조를 위한 공급을 충족시키기 어렵고, 가공 비용이 많이 드는데다, 또한 상기 식물의 수확 시기, 기후 및 토양 등 생육환경 차이에 따른 품질(효능)의 차이 등의 단점을 극복하기 어렵다.

[0009] 이에, 본 발명자들은, 배양조건을 일정하게 유지함으로써 일정한 품질을 유지할 수 있고, 또한 야생종의 수확에 비해 단기간에 배양할 수 있다는 장점을 가지는 식물조직배양 기술을 이용하여 조직배양한 에키네시아 부정근 추출물이 세포 재생, 세포 보호 효과를 가지고, 상기 추출물을 포함한 화장료 조성물이 피부 자극을 유발하지 않으면서 피부 보습 효과를 가지는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 따라서, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는, 피부 보습 및 피부 보호 효과를 갖는 조직배양한 에키네시아 부정근 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 피부 보습 및 피부 보호 효과를 갖는, 조직배양한 에키네시아 부정근

추출물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 에키네시아는, 바람직하게는, 에키네시아 푸르푸레아(*Echinacea purpurea*), 에키네시아 안구스티폴리아(*Echinacea angustifolia*) 및 에키네시아 팔리다(*Echinacea pallida*)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0013] 본 발명의 화장료 조성물은, 조성물 총중량에 대하여 0.1 내지 20 중량%의 조직배양한 에키네시아 부정근 추출물을 함유하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 에키네시아 부정근 추출물은, 상기 조직배양한 에키네시아 부정근을 정제수, C_1 내지 C_4의 저급 알코올, 다가 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매를 이용하여 추출한 여액인 것을 특징으로 한다.

[0015] 또한, 본 발명은

[0016] i) 조직배양한 에키네시아 부정근을 물, C_1 내지 C_4의 저급 알코올, 다가 알코올, 또는 이들의 혼합용매와 혼합하는 단계;

[0017] ii) 상기 혼합물을 10℃ 내지 40℃의 실온에서 숙성한 후 여과하여 그 여액을 얻는 단계, 및

[0018] iii) 상기 여액 및 화장료 성분을 포함하는 화장료 조성물을 제조하는 단계

[0019] 를 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 보습 및 피부 보호용 화장료 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0020] 이하에서 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0021] 본 발명의 조직배양한 에키네시아 부정근 추출물을 포함하는 조성물은,

[0022] i) 조직배양한 에키네시아 부정근을 추출 용매와 혼합하는 단계;

[0023] ii) 상기 혼합물을 숙성시킨 후 여과하여 그 여액을 얻는 단계, 및

[0024] iii) 상기 여액 및 화장료 성분을 포함하는 화장료 조성물을 제조하는 단계

[0025] 를 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 보습 및 피부 보호용 화장료 조성물의 제조 방법에 의해 제조된다.

[0026] 본 발명의 조직배양한 에키네시아 부정근은 당업자에게 공지된 식물조직배양방법, 바람직하게는 한국등록특허 제0842420호에 기재된 조직배양방법에 의해 수득하는 것을 특징으로 한다.

[0027] 본 발명의 조직배양한 에키네시아 부정근의 추출물은 하기와 같은 제조 공정으로 수득할 수 있다.

[0028] 상기 조직배양한 에키네시아 부정근을, 물, C_1 내지 C_4의 저급 알코올, 다가 알코올, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 추출 용매로, 약 10℃ 내지 120℃, 바람직하게는 10℃ 내지 40℃에서 약 1시간 내지 20일, 바람직하게는 24시간 내지 15일 동안 숙성시킨 후 여과하고, 2℃ 내지 8℃, 바람직하게는 2℃ 내지 5℃에서 12시간 내지 48시간 침전시켜, 여액 상태로서 수득할 수 있다. 또한, 상기 추출물로부터 용매를 제거하는 단계를 더 포함하여 본 발명의 추출물을 수득할 수도 있다.

[0029] 상기 추출물의 제조 공정에서, 조직배양한 에키네시아 부정근과 용매의 첨가량은 각각 1~ 5 중량% 및 95~ 99 중량%인 것이 바람직하다.

[0030] 상기 추출용매로서, 바람직하게는 다가 알코올 및 C_1 내지 C_4의 저급 알코올을 포함하는 수용액, 보다 바람직하게는 용매 총중량에 대하여 20 내지 40중량%의 다가 알코올 및 20 내지 50중량%의 C_1 내지 C_4의 저급 알코올을 함유하는 수용액인 혼합용매를 들 수 있다. 상기 혼합용매 중 다가 알코올 함량이 20중량% 미만이거나 또는 C_1 내지 C_4의 저급 알코올 함량이 20% 미만인 혼합용매인 경우, 극성(polarity)이 너무 낮아져 에키네시아 부정근으로부터 원하는 물질이 함유된 추출물을 수득하기 어려우며, 다가 알코올 함량이 40중량%를 초과하거나 또는 C_1 내지 C_4의 저급 알코올 함량이 50%를 초과하는 혼합용매인 경우, 극성이 너무 높아져 원치 않는 성분이 함유된

추출물을 수득하게 되는 문제점이 있다. 상기 다가 알코올은 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜 또는 펜틸렌글리콜인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 또한, 상기 숙성 방법으로는 25~ 100℃의 물중탕에서 환류(reflux) 장치를 이용하는 방법이 있으나, 이에만 한정되는 것은 아니고 동일한 효과를 낼 수 있는 방법이라면 당 기술분야에 알려져 있는 방법을 선택하여 얻을 수 있다.

[0032] 또한, 상기 여액을 얻는 방법에 있어서는 여과 후, 필요에 따라 탈색 및 탈취과정을 더 수행 할 수 있다.

[0033] 본 발명은 상기의 제조공정으로 얻어진 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물을 제공한다. 본 발명의 화장료 조성물 중에는 상기 방법으로 추출된 1종 이상의 에키네시아 부정근 추출물이 혼합되어 사용될 수도 있다.

[0034] 본 발명의 조성물 중 상기 추출물은, 조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 20중량%로 함유되는 것이 바람직하다. 상기 추출물이 0.1중량% 미만이면 유용성분 부족에 의해 보습 및 피부 보호 효과가 미약하며, 20중량%를 초과하는 경우에는 사용자의 피부에 자극을 발생시킬 소지가 있다.

[0035] 또한 본 발명자들은, 상기 제조공정에 의해 얻어진 조직배양한 에키네시아 부정근 추출물의 세포 증식 효과 및 자극 물질에 대한 세포 보호 효과를 확인하여 피부 보호 효과가 있음을 입증하였고, 또한 상기 추출물을 함유한 화장료 조성물의 탁월한 보습 효과를 확인하였다.

[0036] 에키네시아는 오랫동안 생약 및 식용으로 사용되어 오던 약재로서 이들로부터 추출된 본 발명의 추출물들 역시 독성 및 부작용 등의 문제가 없으며, 안전성이 입증되었으므로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0037] 본 발명의 조성물은 피부 보습 및 피부 보호를 위한 화장품, 세안제 및 샴푸 등에 다양하게 이용될 수 있다.
본 발명의 조성물은 그 제형에 의해 한정되지 않고, 당 기술분야에 알려져 있는 제형을 취할 수 있다. 예컨대, 본 발명에 따른 화장료 조성물의 제형은, 예를들어, 각종 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저 등을 들 수 있으며, 이로 한정되는 것은 아니다.
또한, 본 발명의 화장료 조성물에는 상기 추출물과 더불어 통상적인 화장료 성분, 예를 들어 용매, 체질안료, 무기안료, 유기안료, 무기분체, 유제, 화장료에 배합할 수 있는 계면활성제, 실리콘함유 계면활성제, 증점제, 안정제, 방부제, 산화방지제 및 향료 등을 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 배합할 수 있다.

효 과

[0038] 본 발명의 조직배양한 에키네시아 부정근 추출물을 첨가한 화장료 조성물을 사용함으로써, 피부 자극을 유발하지 않으면서 피부 건조화로부터 피부를 보호하는 보습 효과 및 피부 세포 보호 효과를 제공하여, 피부보호 및 피부개선에 기여 할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 시험예에 의해 상세히 설명한다.

[0040] 단, 하기 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 시험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0041] **참조예 1. 조직배양한 에키네시아 푸르푸레아 부정근 준비**

[0042] 본 발명에 사용된 에키네시아 푸르푸레아(*Echinacea purpurea*) 부정근은 충북대학교 첨단 원예 기술개발 연구센터에서 제공 받아 사용하였다. 상기 에키네시아 푸르푸레아 부정근은, 성장조절인자(growth ragulator)인 인돌부틸산(IBA)과 탄소원인 당(sucrose) 및 비타민류가 함유되어 있는 Murashige & Skoog medium(MS medium, Duchefa, Netherland)을 사용하는 배양방법(한국등록특허 제0842420호 참조)에 기재된 방법으로 조직배양하여 대량증식한 것으로, 사용 전에 건조시켜 사용하였다.

[0043] **참조예 2. 인간 섬유아세포 배양**

[0044] 10% 우태아혈청(FBS, Invitrogen, USA) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin, Invitrogen, USA)이 첨가된 Iscove's modified Dulbeco's medium (IMDM, Welgene, Korea)이 10 ㎖이 담긴 10㎝ 세포 배양접시에, ATCC사로부터 구입한 CCD-1064sk 인간 섬유아세포(ATCC number: CRL-2076)를 접종하였다. 상기 세포는 37℃, 5% CO_2 분위기의 배양기에서 세포가 70~80% 합류(confluency)에 도달할 때까지 배양하였다. 배지는 일주일에 두 번씩 갈아주고, 합류에 도달한 세포는 트립신-EDTA(Invitrogen, USA)를 사용하여 트립신처리(trypsinization)한 후 계대배양하여 유지하였다.

[0045] **실시예 1~4. 조직배양한 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물의 제조**

[0046] 하기 표 1에 기재된 바와 같이, 참조예 1에서 준비한 에키네시아 푸르푸레아 부정근 20g을 70% 에탄올과 1,3-부틸렌글리콜 또는 프로필렌글리콜의 혼합용매 980g과 혼합하였다. 이 혼합물을 2주간 침적하여 숙성시킨 후, 여과지(5C, 185㎜, Toyo roshi Kaisha, Ltd., Japan)에 여과시켜 여액 상태인 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물 (실시예 1 내지 4)을 수득하였다.

표 1

[0047]

	혼합 용매	혼합 비율 (w/w)
실시예 1	70% 에탄올 : 1,3-부틸렌글리콜	7:3
실시예 2	70% 에탄올 : 1,3-부틸렌글리콜	6:4
실시예 3	70% 에탄올 : 프로필렌글리콜	7:3
실시예 4	70% 에탄올 : 프로필렌글리콜	6:4

[0048] **제형예 1~3. 실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 추출물을 포함하는 유연화장수(스킨)의 제조**

[0049] 하기 표 2에 나타낸 조성비로, 실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물을 포함하는 유연화장수(스킨)를 제조하였다.

표 2

[0050]

성분	제형예 1	제형예 2	제형예 3
	함량(중량%)	함량(중량%)	함량(중량%)
실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물	10.00	5.00	2.00
부틸렌글리콜	2.00	2.00	2.00
글리세린	3.00	3.00	3.00
올레일알코올	2.00	2.00	2.00
폴리소르베이트 20	1.00	1.00	1.00
에탄올	6.00	6.00	6.00
방부제	0.5	0.5	0.5
향	0.5	0.5	0.5
정제수	잔량	잔량	잔량
계	100.00	100.00	100.00

[0051] **제형예 4~6. 실시예 1의 추출물을 포함하는 영양유액(밀크로션)의 제조**

[0052] 하기 표 3에 나타낸 조성비로, 실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물을 포함하는 영양유액(밀크로션)을 제조하였다.

표 3

[0053]

성분	제형예 4	제형예 5	제형예 6
	함량(중량%)	함량(중량%)	함량(중량%)

실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물	10.00	5.00	2.00
부틸렌글리콜	4.00	4.00	4.00
글리세린	3.00	3.00	3.00
올레일알코올	1.00	1.00	1.00
폴리소르베이트20	1.00	1.00	1.00
방부제	0.5	0.5	0.5
향	0.5	0.5	0.5
정제수	잔량	잔량	잔량
계	100.00	100.00	100.00

[0054] **제형예 7~9. 실시예 1의 추출물을 포함하는 크림의 제조**

[0055] 하기 표 4에 나타낸 조성비로, 실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물을 포함하는 크림을 제조하였다.

표 4

[0056]

성분	제형예 7	제형예 8	제형예 9
	함량(중량%)	함량(중량%)	함량(중량%)
실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물	10.00	5.00	2.00
부틸렌글리콜	2.00	2.00	2.00
글리세린	4.00	4.00	4.00
포타슘하이드록사이드	0.10	0.10	0.10
토코페릴 아세테이트	1.0	1.0	1.0
유동파라핀	5.0	5.0	5.0
스쿠알란	5.0	5.0	5.0
마카디미아넛트오일	10.0	10.0	10.0
폴리소르베이트 60	1.0	1.0	1.0
소르비탄세스퀴올레이트	1.0	1.0	1.0
카보머	0.3	0.3	0.3
방부제	0.5	0.5	0.5
향	0.5	0.5	0.5
정제수	잔량	잔량	잔량
계	100.00	100.00	100.00

[0057] **제형예 10~12. 실시예 1의 추출물을 포함하는 파우더의 제조**

[0058] 하기 표 5에 나타낸 조성비로, 실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물을 포함하는 파우더를 제조하였다.

표 5

[0059]

성분	제형예 10	제형예 11	제형예 12
	함량(중량%)	함량(중량%)	함량(중량%)
실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물	0.50	0.25	0.10
탈크	잔량	잔량	잔량
마이카	25.00	25.00	25.00
에칠헥실메톡시신나메이트	4.29	4.29	4.29
나일론-12	3.00	3.00	3.00
실리카	1.00	1.00	1.00

티타늄디옥사이드	5.52	5.52	5.52
산화철	1.10	1.10	1.10
디메치콘	5.51	5.51	5.51
디이소스테아릴말레이트	3.28	3.28	3.28
카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드	1.84	1.84	1.84
방부제	0.50	0.50	0.50
향	0.50	0.50	0.50
계	100.00	100.00	100.00

[0060] **제형예 13~15: 실시예 1의 추출물을 포함하는 파운데이션의 제조**

[0061] 하기 표 6에 나타낸 조성비로, 실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물을 포함하는 파운데이션을 제조하였다.

표 6

[0062]

성분	제형예 13 함량(중량%)	제형예 14 함량(중량%)	제형예 15 함량(중량%)
실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물	1.00	0.50	0.20
미네랄 오일	7.00	7.00	7.00
퀴터늄-18 벤토나이트	0.80	0.80	0.80
사이크로펜타실록산(and) 피이지/피피지-20/20디메치콘	10.55	10.55	10.55
사이클로메치콘	8.50	8.50	8.50
티타늄디옥사이드	8.50	8.50	8.50
산화철	2.73	2.73	2.73
비스-피이지/피피지-14/14디메치콘	0.50	0.50	0.50
정제수	잔량	잔량	잔량
마그네슘설페이트	0.50	0.50	0.50
부틸렌글리콜	2.00	2.00	2.00
방부제	0.5	0.5	0.5
향	0.5	0.5	0.5
계	100.00	100.00	100.00

[0063] **제형예 16~18: 실시예 1의 추출물을 포함하는 메이크업베이스의 제조**

[0064] 하기 표 7에 나타낸 조성비로, 실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물을 포함하는 메이크업베이스를 제조하였다.

표 7

[0065]

성분	제형예 16 함량(중량%)	제형예 17 함량(중량%)	제형예 18 함량(중량%)
실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물	1.00	0.50	0.20
메칠글루세스-10	3.00	3.00	3.00
마그네슘알루미늄실리케이트	1.00	1.00	1.00
셀룰로오스검	0.20	0.20	0.20
부틸렌글리콜	4.00	4.00	4.00
티타늄디옥사이드	1.67	1.67	1.67

산화철	0.25	0.25	0.25
소르비탄올리베이트	2.00	2.00	2.00
정제수	잔량	잔량	잔량
글리세릴스테아레이트	4.00	4.00	4.00
올레일알콜	6.00	6.00	6.00
이소트리데실이소노나노에이트	5.00	5.00	5.00
에칠헥실메톡시신나메이트	4.00	4.00	4.00
방부제	0.5	0.5	0.5
향	0.5	0.5	0.5
계	100.00	100.00	100.00

[0066] **제형예 19~21. 실시예 1의 추출물을 포함하는 마스카라의 제조**

[0067] 하기 표 8에 나타낸 조성비로, 실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물을 포함하는 마스카라를 제조하였다.

표 8

[0068]

성분	제형예 19	제형예 20	제형예 21
	함량(중량%)	함량(중량%)	함량(중량%)
실시예 1의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물	1.00	0.50	0.20
하이드록시에칠셀룰로오스	0.70	0.70	0.70
아카시아고무	0.60	0.60	0.60
스테아릭애씨드	7.00	7.00	7.00
부틸렌글리콜	2.00	2.00	2.00
세틸알콜	1.00	1.00	1.00
산화철	10.00	10.00	10.00
카나우바왁스	3.00	3.00	3.00
정제수	잔량	잔량	잔량
칸데릴라왁스	1.00	1.00	1.00
피이지-8비즈왁스	7.00	7.00	7.00
트리에탄올아민	2.35	2.35	2.35
폴리비닐피롤리돈	4.00	4.00	4.00
아크릴레이트/스테아릴메타아크릴레이트공중합체	25.00	25.00	25.00
방부제	0.5	0.5	0.5
향	0.5	0.5	0.5
계	100.00	100.00	100.00

[0069] 이하와 같이, 상기 실시예에서 제조한 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물의 세포증식 및 세포보호 효과를 측정하였으며, 상기 추출물을 함유한 화장료 제형예의 보습효과 및 안전성을 측정하였다.

[0070] **시험예 1. 조직배양한 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물의 세포증식 및 세포보호 효과 측정**

[0071] 상기 실시예 1의 조직배양한 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물의 세포증식 및 세포보호 효과를 평가하였다.

[0072] 1-1. 세포 증식 효과의 측정

[0073] 참조예 2에 따라 배양된 인간 섬유아세포를 96-멀티웰 플레이트(SPL, Korea)에 각각 1×10^4 세포/웰로 분주하고 24시간 배양하였다. 배양 후, 배지를 2% FBS가 첨가된 IMDM으로 교체하고, 실시예 1에서 준비한 에키네시아 푸

르푸레아 부정근 추출물을 하기 표 9에 나타낸 처리 농도로 배지에 희석하여 처리한 후 48hr 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 각각의 웰에 뉴트랄 레드(Neutral Red, Sigma-aldrich, USA) 50㎍/ml를 첨가하고 3시간 동안 반응시켰다. 뉴트랄 레드는 완전히 살아있는 세포 또는 손상 받지 않는 세포의 리소좀에 농축되는 시약이다. 반응 후, 세포를 1.0% 포르말린/1.0% 염화칼륨으로 고정한 다음 1.0% 아세트산/50% 에탄올 용액을 첨가하여 뉴트랄 레드를 추출하였다. 추출된 뉴트랄 레드에 대한 흡광도는 흡수분광광도계(UVmax, Molecular Device, USA)를 이용하여 540nm의 파장에서 측정하고, 하기 수학식 1에 따라 에키네시아 부정근 추출물 처리 농도별 세포 증식율을 계산하여 하기 표 9에 나타내었다. 측정 시험은 3 배치(batch)로 3회 실시하였으며, Raw 데이터를 토대로 무처리군의 흡광도와 추출물 처리군의 흡광도의 평균을 계산하여 표준편차를 구하였다.

수학식 1

[0074]

$$\text{세포 증식율}(\%) = \frac{\text{시료처리군 흡광도}}{\text{무처리군 흡광도}} \times 100$$

표 9

[0075]

	O.D. Mean ± S.D. (대조군에 대한 %)				
추출물 농도	대조군 (추출물 무처리)	0.001 (w/w%)	0.005 (w/w%)	0.01 (w/w%)	0.05 (w/w%)
실시예 1 추출물	0.302±0.014 (100.0)	0.318±0.021 (105.3)	0.349±0.029 (115.6)	0.361±0.025 (119.5)	0.339±0.018 (112.3)
실시예 2 추출물		0.307±0.024 (101.7)	0.343±0.018 (113.6)	0.369±0.029 (122.2)	0.327±0.023 (108.3)
실시예 3 추출물		0.322±0.016 (106.6)	0.341±0.021 (112.9)	0.349±0.031 (115.6)	0.319±0.021 (105.6)
실시예 4 추출물		0.331±0.019 (109.6)	0.347±0.031 (114.9)	0.356±0.023 (117.9)	0.324±0.017 (107.3)

[0076] 상기 표 9에 나타난 바와 같이, 본 발명의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물은 대조군 대비 최대 22%의 세포 증식을 유도하였다. 상기에 따라, 본 발명의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물은 세포증식 효과를 가짐을 알 수 있다.

[0077] 1-2. SDS(Sodium dodecyl sulfate) 자극에 대한 세포보호 효과의 측정

[0078] 참조예 2에 따라 배양된 인간 섬유아세포를 96-멀티웰 플레이트(SPL, Korea)에 각각 1×10^4 세포/웰로 분주하고 24시간 배양하였다. 그 후, 배지를 2% FBS가 첨가된 IMDM으로 교체하고, 실시예 1에서 준비한 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물을 하기 표 10에 나타낸 처리 농도로 배지에 희석하여 전처리하고 1hr 후, 자극 물질인 SDS 0.1 mM를 병행처리 하고 24hr 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포에, PBS(phosphate buffered saline)에 용해한 MTT stock 용액(5 mg/㎖)을 새로운 배지에서 10배 희석하고, 이 용액을 세포 각각의 웰에 100㎕씩 첨가하여 37℃에서 4시간 반응시켰다. 반응 후 살아있는 세포는 미토콘드리아에 존재하는 탈수소 효소에 의해 노란색의 수용성 기질인 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide]가 비수용성의 MTT 포르마잔(formazan) 결정으로 환원되므로 이것의 양을 재면 세포 생존율을 측정할 수 있다. 배양 상등액을 제거하고 각각의 웰에 DMSO 200㎕를 첨가하여 세포에서 생성된 MTT 포르마잔 결정체를 용해시킨 후 흡수분광광도계(UVmax, Molecular Device, USA) 이하와 같이 흡광도를 측정하였다. 포르마잔의 흡광도가 최대가 되는 테스트 필터(test filter)인 540 nm의 파장에서의 O.D값과 대조 필터(Reference filter)인 630nm 파장의 O.D값을 측정하여 그 차이값을 구하고, 하기 수학식 2에 따라 농도별 세포보호율을 계산하여 하기 표 10에 나타내었다(The EMBO Journal (2002) 21, pp2407-2417 등 참조). 측정 시험은 3 배치(batch)로 3회 실시하였으며, Raw 데이터를 토대로 흡광도의 평균을 계산하여 표준편차를 구하였다.

수학식 2

$$\text{세포 보호 효과 (\%)} = \frac{\text{시료처리군 흡광도}}{\text{무처리군 흡광도}} \times 100$$

[0079]

표 10

[0080]

	O.D. Mean ± S.D. (대조군에 대한 %)						
시 료	무처리 대조군	SDS only (0.1 mM)	SDS(0.1 mM) + 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물 (w/w%)				
			SDS+0.005	SDS+0.01	SDS+0.05	SDS+0.1	SDS+0.2
실시예 1 추출물	0.321± 0.014 (100)	0.171± 0.021 (53.3)	0.192± 0.018 (59.8)	0.202± 0.020 (62.9)	0.229± 0.017 (71.3)	0.252± 0.022 (78.5)	0.265± 0.015 (82.6)
실시예 2 추출물			0.182± 0.022 (56.7)	0.212± 0.010 (66.0)	0.238± 0.023 (74.1)	0.245± 0.015 (76.3)	0.2535± 0.023 (79.0)
실시예 3 추출물			0.179± 0.017 (55.8)	0.198± 0.027 (61.7)	0.217± 0.022 (67.6)	0.235± 0.014 (73.2)	0.247± 0.021 (76.9)
실시예 4 추출물			0.183± 0.019 (57.0)	0.209± 0.021 (65.1)	0.225± 0.013 (70.1)	0.248± 0.016 (77.3)	0.259± 0.019 (80.7)

[0081] 상기 표 10에 나타난 바와 같이, 본 발명의 조직배양한 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물은 SDS를 단독으로 처리한 대조군 대비 최대 30% 이상 세포의 사멸을 억제하였다. 상기에 따라, 본 발명의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물은 세포 자극에 대한 보호 효과를 가짐을 알 수 있다.

[0082] **시험예 2. 조직배양한 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물을 함유하는 제형예의 피부 보습 효과 및 안전성 측정**

[0083] 상기 제조예 1에서 준비된 조직배양한 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물을 포함하는 크림에 대해, 피부 보습력 테스트 및 피부 자극 여부 검출을 통한 안전성 시험을 실시하였다.

[0084] 2-1. 피부 보습 효과 측정

[0085] 본 발명에 따른 화장료의 보습 효과를 조사하기 위해 피부의 수분함량 측정을 실시하였다. 상기 실시예 1 또는 3의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물을 함유한 크림 제형과 상기 추출물을 함유하지 않은 제형을 하기 표 11의 조성과 같이 제조한 후, 20~50세의 여성 20명을 대상으로 도포 전 및 후의 피부의 수분함량을 하기와 같이 측정하였다.

[0086] 피부 보습효과의 측정을 위하여, 피부 수분 함량 및 피부 수분 손실량(TEWL:Transepidermal Waterloss)을 각각 피부 수분량 측정기(Corneometer CM 825, Courage + Khazaka electronic company, Germany) 및 피부 수분손실량 측정기(Tewameter TM 210, Courage + Khazaka electronic company, Germany)를 이용하여 측정하였다. 시험 시작 1시간 전부터 항온항습조건(20 ~ 22℃, 상대습도 40 ~ 60%)의 실내에서 대기한 지원자의 상박부에 각각의 샘플을 2.0 ㎎/㎠ 의 농도로 균일하게 도포하고, 시료를 도포하지 않은 다른쪽 상박부를 대조군으로 하였다. 도포직전의 피부수분함량 및 피부 수분손실량을 측정하였으며, 이후, 1시간, 3시간, 5시간 경과시의 피부 수분 함량 및 피부 수분손실량을 측정하여 하기 표 12, 표 13에 각각 나타내었다.

표 11

[0087]

성분	함량(중량%)	
	제형예 8 (실시예 1 또는 3의 추출물 함유 크림)	비교예 (실시예 1 또는 3의 추출물 미 함유 크림)
실시예 1 또는 3의 추출물	5.00	-
부틸렌글리콜	2.00	2.00
글리세린	4.00	4.00
포타슘하이드록사이드	0.10	0.10
토코페릴 아세테이트	1.0	1.0
유동파라핀	5.0	5.0
스쿠알란	5.0	5.0
마카다미아넛트오일	10.0	10.0
폴리솔베이트 60	1.0	1.0
소르비탄세스퀴올레이트	1.0	1.0
카보머	0.3	0.3
방부제	0.5	0.5
향	0.5	0.5
정제수	잔량	잔량
계	100.00	100.00

표 12

sample	Time(hr)	Corneometric value(A.U.)		
		도포부위	비도포부위	Improvements(Δ%)
추출물 무첨가 제형	T 0	80.2	80.1	0.00
	T 1	100.1	81.1	23.28
	T 3	92.1	81.3	13.14
	T 5	86.2	80.6	6.82
실시예 1 추출물 첨가 제형	T 0	81.5	82.4	0.00
	T 1	107.7	81.1	34.29
	T 3	99.9	80.3	25.82
	T 5	89.9	80.2	13.37
실시예 3 추출물 첨가 제형	T 0	81.6	80.1	0.00
	T 1	110.1	81.5	32.65
	T 3	102.2	80.6	24.48
	T 5	90.6	80.1	11.03

A.U.= Arbitary Units

Improvement(Δ%)=[{(Tti-Tto)-(NTti-NTto)}/(NTti-NTto+Tto)]*100

to : 화장료 도포 직전

ti : 화장료 도포 후 경과 시간

Tto : to에서의 도포부위의 수분함량 측정값 (Value on the treated zone at to)

Tti : ti에서의 도포부위의 수분함량 측정값 (Value on the treated zone at ti)

NTto : to에서의 비도포부위의 수분함량 측정값 (Value on the non-treated zone at to)

NTti : ti에서의 비도포부위의 수분함량 측정값 (Value on the non-treated zone at ti)

[0088]

표 13

sample	Time(hr)	TEWL(g/m^2· h)		
		도포 부위	비도포 부위	Improvements(△%)
추출물 무첨가 제형	T 0	10.6	10.5	0.00
	T 1	9.4	10.6	-12.15
	T 3	10	10.4	-4.76
	T 5	10.7	10.5	0.94
실시예 1 추출물 첨가 제형	T 0	10.3	10.4	0.00
	T 1	8.5	10.6	-19.05
	T 3	9.4	10.6	-10.48
	T 5	9.9	10.5	-4.81
실시예 3 추출물 첨가 제형	T 0	10.4	10.7	0.00
	T 1	8	10.6	-22.33
	T 3	9.2	10.5	-9.80
	T 5	10.1	10.5	-0.98

TEWL=Trans Epidermal Water Loss

Improvement(△%)=[{(Tti-Tto)-(NTti-NTto)}/(NTti-NTto+Tto)]*100

to : 화장료 도포 직전

ti : 화장료 도포 후 경과 시간

Tto : to에서의 도포부위의 수분손실 측정값 (Value on the treated zone at to)

Tti : ti에서의 도포부위의 수분손실 측정값 (Value on the treated zone at ti)

NTto : to에서의 비도포부위의 수분손실 측정값 (Value on the non-treated zone at to)

NTti : ti에서의 비도포부위의 수분손실 측정값 (Value on the non-treated zone at ti)

[0089]

[0090] 표 12 및 표 13에 나타난 바와 같이, 본 발명의 추출물을 첨가하지 않은 제형을 도포한 부위의 피부수분함량 및 피부 수분 손실량에 비해, 실시예 1 또는 3의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물을 함유한 크림을 도포한 부위의 피부 수분 함량은 높았으며 또한 피부 수분 손실량은 적었다. 상기에 따라, 실시예 1 또는 3의 에키네시아 푸르푸레아 부정근 추출물을 함유한 제형이 무첨가 제형에 비해 탁월한 수분 함량 유지 효과 및 피부 수분 손실 억제 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0091] 2-2. 인체 피부 첩포 시험(Irritation test)에 의한 안전성 측정

[0092] 피부 일차 자극을 평가하기 위한 인체 첩포시험을 미국 화장품 협회(CTFA) 가이드라인에서 제시한 방법에 약간의 변형을 가하여 실시하였다. 상기 시험예 2-1의 표 11에 나타낸 크림 제형을 제조한 후, 상기 제형의 도포에 의한 안전성을 하기와 같이 측정하였다.

[0093] 20~50세의 여성 20명을 대상으로, 첩포 부위인 전박부를 70% 에탄올로 닦아내고 건조시킨 후, 상기 제형 20 ㎎이 적용된 헤이즈 챔버(Haye's chamber, Haye's Service, Netherland)를 시험 부위에 부착시켰다. 24시간 후에 헤이즈 챔버를 제거하고 첫 판독을 하고, 30분, 24시간, 48시간 후에 자극 발생 유무를 평가하였다. 평가 기준은 International Contact dermatitis Research Group(ICDRG)의 평가 기준(하기 표 14 참조)에 따랐으며, 피부 자극 유발 가능성의 평가는 이하의 수학식 3에 따라 계산된 평균값을 계산하여 수행하였다.

[0094] 일차 자극의 정도는, 평균값 0~ 0.99을 자극 없음(No irritation), 1.0~ 1.99을 약간의 자극(slight irritation), 2.0~ 2.99을 중등도의 자극(moderate irritation), 3.0~ 4.99을 강한 자극(strong irritation), 5이상을 중한 자극(severe irritation)으로 평가하였으며, 그 결과는 하기 표 15에 나타내었다.

수학식 3

[0095]

$$\text{평균값} = \frac{\text{가중치 x 반응자 수 x 100 x 1/3}}{\text{최고 가중치 x 총 피험자 수}}$$

표 14

[0096]

반응	가중치	평가 기준
-	0	무반응
+-	0.5	약양성 반응 (홍반)
+	1	중양성 반응 (홍반)
++	2	강양성 반응 (홍반, 부종)
+++	3	극양성 반응 (홍반, 부종, 수포)

표 15

[0097]

시험 제형	irritation test 평균값 (%)
추출물 무첨가 제형	0.77
실시예 1 추출물 첨가 제형	0.68
실시예 3 추출물 첨가 제형	0.71

[0098] 상기 표 15에 나타난 바와 같이, 조직배양한 에키네시아 부정근 추출물을 함유한 제형의 인체 피부 첩포 시험 및 주관적 자극에 대한 평가 결과, 에키네시아 부정근 추출물을 함유한 제형은 무첨가 제형과 비교하여 일차 자극의 평균값이 보다 낮은, 유의한 값을 나타냄으로써 피부 자극을 유발하지 않았으며, 이로서 본 발명의 추출물의 안전성을 확인할 수 있었다.