



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0083098  
(43) 공개일자 2020년07월08일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>A61K 8/9789 (2017.01) A61K 8/14 (2006.01)<br/>A61Q 17/00 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)<br/>A61Q 19/08 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>A61K 8/9789 (2017.08)<br/>A61K 8/14 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0020782<br/>(22) 출원일자 2019년02월21일<br/>심사청구일자 2019년02월21일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>1020180172288 2018년12월28일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인<br/>청담씨디씨제이엔팜 유한책임회사<br/>강원도 춘천시 소양강로 32, 307호(후평동)</p> <p>(72) 발명자<br/>권성필<br/>강원도 춘천시 소양강로 32, 307호<br/>김홍유<br/>강원도 춘천시 소양강로 32, 307호<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>특허법인태동</p> |
|--|---|

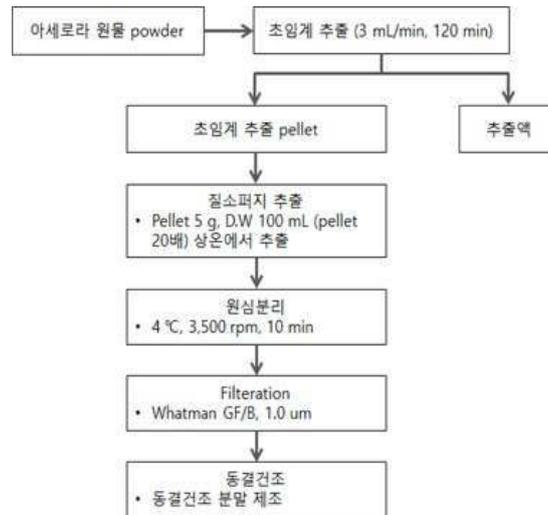
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 아세로라 추출물을 포함하는 리포솜을 함유하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물

(57) 요약

본 발명은 아세로라 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물에 관한 것으로, 뛰어난 피부 미백효과, 주름 개선 효과, 항균 및 항염 효과를 발휘할 수 있다.

대표도 - 도1



- (52) CPC특허분류
  - A61Q 17/005 (2013.01)
  - A61Q 19/02 (2013.01)
  - A61Q 19/08 (2013.01)

**이현석**  
강원도 춘천시 소양강로 32, 307호

- (72) 발명자
  - 김희선**  
강원도 춘천시 소양강로 32, 307호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R0005985
부처명	산업통상자원부
연구관리전문기관	강원지역사업평가단
연구사업명	경제협력권산업육성사업 창의융합 R&D 바이오활성소재
연구과제명	아세로라 유래의 천연비타민C를 포집한 리포솜 제형의 기능성화장품과 피부흡수를 돕는 저
주과 기기의 개발	
기 여 율	1/1
주관기관	제이앰팜유한책임회사
연구기간	2017.04.01 ~ 2018.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

아세로라 열매 분말에 초임계 이산화탄소를 가하여 초임계 추출을 한 후, 지용성 성분이 제거된 펠렛(pellet)을 회수하는 단계 (a);

상기 단계 (a)에서 회수된 펠렛에 정제수를 가한 후, 질소 퍼징을 하면서 추출하여 아세로라 추출액을 수득하는 단계 (b);

상기 단계 (b)에서 수득된 아세로라 추출액을 원심분리한 후, 상층액을 회수하고, 동결건조하여 아세로라 추출물 분말을 수득하는 단계 (c);

상기 단계 (c)에서 수득된 아세로라 추출물 분말을 유산균 생육용 배지에 첨가한 후, 유산균을 접종하여 배양함으로써 배양액을 수득하는 단계 (d1);

상기 단계 (d1)에서 수득한 배양액을 원심분리한 후, 상등액을 회수하는 단계(e1);를 포함하는 것을 특징으로 하는 아세로라 추출물의 제조방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유산균은,

락토바실러스 람노시스(*Lactobacillus rhamnosus*)인 것을 특징으로 하는 아세로라 추출물의 제조방법.

#### 청구항 3

아세로라 열매 분말에 초임계 이산화탄소를 가하여 초임계 추출을 한 후, 지용성 성분이 제거된 펠렛(pellet)을 회수하는 단계 (a);

상기 단계 (a)에서 회수된 펠렛에 정제수를 가한 후, 질소 퍼징을 하면서 추출하여 아세로라 추출액을 수득하는 단계 (b);

상기 단계 (b)에서 수득된 아세로라 추출액을 원심분리한 후, 상층액을 회수하고, 동결건조하여 아세로라 추출물 분말을 수득하는 단계 (c);

상기 단계 (c)에서 수득된 아세로라 추출물 분말에 정제수를 가한 후, 정치시켜 침전을 유도하는 단계 (d2);

상기 단계 (d2) 후, 원심분리하여, 상등액을 회수하는 단계(e2);를 포함하는 것을 특징으로 하는 아세로라 추출물의 제조방법.

#### 청구항 4

레시틴을 마누카 오일을 함유한 유기용매에 녹여 1차 균질화하는 단계 (가);

상기 단계 (가) 후, 상기 청구항 1 또는 청구항 3에서 제조된 아세로라 추출물을 함유하는 수용액을 첨가하여 2차 균질화하는 단계 (나);

상기 단계 (나) 후, 감압농축하여 건조함으로써 지질막을 형성시키는 단계 (다);

상기 단계 (다) 후, 형성된 지질막에 증류수 또는 수용성 버퍼(buffer) 용액을 첨가하여 수화한 후 3차 균질화하는 단계 (라);를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 리포솜의 제조방법.

**청구항 5**

제4항에 있어서,  
 상기 단계 (가)는,  
 서로 다른 종류의 레시틴을 마누카 오일을 함유한 유기용매에 녹이는 것을 특징으로 하는 리포솜의 제조방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 아세로라 추출물을 포함하는 리포솜을 함유하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0003] 피부는 외부 자극을 직접적으로 받아들이는 부위로 인체의 보호막 역할을 하면서 다양한 생리 기능을 조절하여 피부의 건강 및 탄력을 유지하게 된다. 나이가 들어감에 따라 발생하는 피부 노화 현상인 색소 침착, 피부 탄력 저하, 주름, 건조 등을 방지하기 위한 피부 관리나 좋은 기능성을 가지는 화장품에 대한 관심이 높으며, 이를 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0004] 최근에는 천연 소재를 사용하여 피부나 체내에 독성을 나타내지 않아 자극적이지 않으면서 효능이 뛰어난 화장품에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이에 따라 천연 추출물을 이용한 화장품들이 개발되고 있으나 빛, 산소, 수분, 온도 등의 외부요인으로부터 영향을 받아 손상되기 쉬우며 가공 및 유통 과정 동안 안정성이 저하되어 활성이 감소하게 된다는 한계가 있다. 또한, 천연 소재 등의 기능성 물질을 직접 섭취할 때, 낮은 투과성을 비롯하여 위장 내의 산성 조건, 효소, 그 밖의 영향 요인에 의하여 안정성이 감소하게 되고 이들이 보유한 생리활성물질의 기능에 제한이 발생한다.
- [0005] 따라서, 천연 소재를 이용하되 천연 추출 성분의 화학적 변화를 일으키지 않으면서 안전하게 효능을 발휘할 수 있는 화장품을 만드는 것이 필요한 실정이다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-0570092호(등록일자:2006.04.05)는 나노리포솜으로 안정화된 식물 추출물을 포함하는 피부보호용 화장료 조성물에 관한 것으로, 도엽, 백년초, 감초 및 솔잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부보호용 화장료 조성물에 대해 기재되어 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0008] 본 발명은 피부 미백효과, 주름 개선 효과, 항균 및 항염 효과가 뛰어난 천연물의 추출물을 발굴하고, 이를 유효성분으로 포함하는 리포솜을 함유하는 화장료 조성물을 개발하여 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제의 해결 수단**

[0010] 본 발명은 아세로라 열매 분말에 초임계 이산화탄소를 가하여 초임계 추출을 한 후, 지용성 성분이 제거된 펠렛(pellet)을 회수하는 단계 (a); 상기 단계 (a)에서 회수된 펠렛에 정제수를 가한 후, 질소 퍼징을 하면서 추출하여 아세로라 추출액을 수득하는 단계 (b); 상기 단계 (b)에서 수득된 아세로라 추출액을 원심분리한 후, 상층

액을 회수하고, 동결건조하여 아세로라 추출물 분말을 수득하는 단계 (c); 상기 단계 (c)에서 수득된 아세로라 추출물 분말을 유산균 생육용 배지에 첨가한 후, 유산균을 접종하여 배양함으로써 배양액을 수득하는 단계 (d1); 상기 단계 (d1)에서 수득한 배양액을 원심분리한 후, 상등액을 회수하는 단계(e1);를 포함하는 것을 특징으로 하는 아세로라 추출물의 제조방법을 제공한다.

[0011] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 유산균은, 바람직하게 락토바실러스 람노시스(*Lactobacillus rhamnosus*)인 것일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 아세로라 열매 분말에 초임계 이산화탄소를 가하여 초임계 추출을 한 후, 지용성 성분이 제거된 펠렛(pellet)을 회수하는 단계 (a); 상기 단계 (a)에서 회수된 펠렛에 정제수를 가한 후, 질소 퍼징을 하면서 추출하여 아세로라 추출액을 수득하는 단계 (b); 상기 단계 (b)에서 수득된 아세로라 추출액을 원심분리한 후, 상층액을 회수하고, 동결건조하여 아세로라 추출물 분말을 수득하는 단계 (c); 상기 단계 (c)에서 수득된 아세로라 추출물 분말에 정제수를 가한 후, 정치시켜 침전을 유도하는 단계 (d2); 상기 단계 (d2) 후, 원심분리하여, 상등액을 회수하는 단계(e2);를 포함하는 것을 특징으로 하는 아세로라 추출물의 제조방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 레시틴을 마누카 오일을 함유한 유기용매에 녹여 1차 균질화하는 단계 (가); 상기 단계 (가) 후, 상기 아세로라 추출물을 함유하는 수용액을 첨가하여 2차 균질화하는 단계 (나); 상기 단계 (나) 후, 감압 농축하여 건조함으로써 지질막을 형성시키는 단계 (다); 상기 단계 (다) 후, 형성된 지질막에 증류수 또는 수용성 버퍼(buffer) 용액을 첨가하여 수화한 후 3차 균질화하는 단계 (라);를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 리포솜의 제조방법을 제공한다.

[0014] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 단계 (가)는, 바람직하게 서로 다른 종류의 레시틴을 마누카 오일을 함유한 유기용매에 녹이는 것일 수 있다.

**발명의 효과**

[0016] 본 발명은 아세로라 추출물을 포함하는 리포솜을 함유하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물을 제공하여 뛰어난 피부 미백효과 및 주름 개선 효과를 발휘할 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 아세로라 추출물을 포함하는 리포솜을 함유하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물을 제공하여 항균 및 항염 효과를 발휘할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0019] 도 1은 아세로라 열매 추출법을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 동결건조법을 통해 얻은 아세로라 추출물 및 유산균 배양법 또는 자연 침전법을 사용하여 얻은 아세로라 추출물의 비타민 C함량을 측정된 결과 그래프이다.
- 도 3은 리포솜 제조 방법을 나타낸 모식도이다.
- 도 4는 뱅햄법(Bangham method, BM)을 응용하여 제조한 샘플 1 내지 3의 TEM 사진이다.
- 도 5는 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형의 티로시나제(Tyrosinase) 활성 저해능을 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형을 함유한 배양액에서의 B16F10 세포의 세포 생존율(cell viability)을 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형이 B16F10 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형을 함유한 배양액에서의 HS68 세포의 세포 생존율(cell viability)을 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형이 HS68 세포의 콜라겐(collagen) 생성에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 10은 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형이 HS68 세포의 MMP-1 생성에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 11은 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형이 마우스대식세포인 RAW 264.7 세포의 NO(Nitric oxide) 생성에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 12는 skin pampa test에 대한 설명 사진이다.

도 13은 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형의 skin pampa test의 결과를 나타낸 그래프이다.

도 14의 (A)는 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형의 비타민 C의 단기 안정성 실험 결과를 나타낸 그래프이고, (B)는 혼합 리포솜 제형의 비타민 C의 장기 안정성 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 15는 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형의 피부 투과률에 대한 결과 그래프이다.

도 16은 아세로라 추출물 멀티라멜라 리포솜 함유 화장품 조성물(실시예 7) 제품 사용군에 대해 각 제품의 사용 전후에 따른 피부 주름 개선능에 대한 그래프이다.

도 17은 아세로라 추출물 멀티라멜라 리포솜 함유 화장품 조성물(실시예 7) 제품 사용군에 대해 각 제품의 사용 전후에 따른 피부 멜라닌 개선능에 대한 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 아세로라 열매 분말에 초임계 이산화탄소를 가하여 초임계 추출을 한 후, 지용성 성분이 제거된 펠렛(pellet)을 회수하는 단계 (a); 상기 단계 (a)에서 회수된 펠렛에 정제수를 가한 후, 질소 퍼징을 하면서 추출하여 아세로라 추출액을 획득하는 단계 (b); 상기 단계 (b)에서 획득된 아세로라 추출액을 원심분리한 후, 상층액을 회수하고, 동결건조하여 아세로라 추출물 분말을 획득하는 단계 (c); 상기 단계 (c)에서 획득된 아세로라 추출물 분말을 유산균 생육용 배지에 첨가한 후, 유산균을 접종하여 배양함으로써 배양액을 획득하는 단계 (d1); 상기 단계 (d1)에서 획득한 배양액을 원심분리한 후, 상등액을 회수하는 단계(e1);를 포함하는 것을 특징으로 하는 아세로라 추출물의 제조방법을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 아세로라 열매 분말에 초임계 이산화탄소를 가하여 초임계 추출을 한 후, 지용성 성분이 제거된 펠렛(pellet)을 회수하는 단계 (a); 상기 단계 (a)에서 회수된 펠렛에 정제수를 가한 후, 질소 퍼징을 하면서 추출하여 아세로라 추출액을 획득하는 단계 (b); 상기 단계 (b)에서 획득된 아세로라 추출액을 원심분리한 후, 상층액을 회수하고, 동결건조하여 아세로라 추출물 분말을 획득하는 단계 (c); 상기 단계 (c)에서 획득된 아세로라 추출물 분말에 정제수를 가한 후, 정치시켜 침전을 유도하는 단계 (d2); 상기 단계 (d2) 후, 원심분리하여, 상등액을 회수하는 단계(e2);를 포함하는 것을 특징으로 하는 아세로라 추출물의 제조방법을 제공한다.

[0022] 아세로라(*Malphigia emaginata* D.C)는 체리 모양의 과실로서, 말피기아속(*Malphigia*)의 관목으로 멕시코, 중미, 카리브해 등의 열대아메리카에 제한 분포한다. 아세로라 열매에는 비타민 C인 아스코르브산(ascorbic acid)가 다량 함유되어 있어 식품 가공시 첨가제로 이용하거나 비타민 C를 제조할 때 주로 사용된다. 아세로라는 신맛이 강하여 생과일로 직접 먹기보다는 주로 다른 과일들과 같이 갈아서 주스로 마시거나 과일 칵테일 등으로 만든다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 아세로라 추출물은, 바람직하게 물 또는 유기용매를 가하여 추출하는 용매추출법; 또는 초고압(초임계) 추출법;을 이용하여 획득하는 것일 수 있다. 이때, 상기 유기용매는, 일 예로, 탄소수 1-4의 무수 또는 함유 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 글리세린, 아세톤, 에틸 아세테이트, 클로로포름, 부틸 아세테이트, 디에틸에테르, 디클로로메탄, 헥산 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 추출용매를 이용할 수 있으나, 바람직하게는 초임계 이산화탄소를 사용한 초임계 추출을 하고, 추출용매로 정제수를 사용하며, 비타민 C 함량의 최적 유지를 위해 질소 퍼징 추출법을 사용하였다. 또한, 비타민 C 함량을 더욱 높이기 위해 유산균 배양법 또는 자연 침전법을 사용하였다.

[0024] 한편, 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 유산균은 바람직하게 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)인 것일 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 레시틴을 마누카 오일을 함유한 유기용매에 녹여 1차 균질화하는 단계 (가); 상기 단계 (가) 후, 상기 아세로라 추출물을 함유하는 수용액을 첨가하여 2차 균질화하는 단계 (나); 상기 단계 (나) 후, 감압 농축하여 건조함으로써 지질막을 형성시키는 단계 (다); 상기 단계 (다) 후, 형성된 지질막에 증류수 또는 수용

성 버퍼(buffer) 용액을 첨가하여 수화한 후 3차 균질화하는 단계 (라);를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 리포솜의 제조방법을 제공한다.

[0026] 레시틴(lecithin)은 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline)이라고도 하는 생체 구성물질로서 글리세린 인산을 포함하고 있는 인지질의 하나이며, 피부 지질 성분과 유사한 조성을 가지고 있다. 레시틴은 글리세롤의 한쪽에는 콜린, 인산 등의 친수성 성분이 결합되고 다른쪽에는 소수성의 아실기가 결합된 구조를 가지고 있어 계면활성을 가지므로 주로 유화제의 목적으로 사용되며, 1위 및 2위 아실기의 조합 차이에 따라 여러 종류의 분자종이 존재한다. 일 예로는, 대두 레세틴, 해바라기 레시틴, 소야 포스파티딜콜린 레시틴, 밀크 레시틴 등이 있다.

[0027] 본 발명에서 사용하는 용어, '레시틴'은 천연계면활성제인 레시틴만을 지칭하는 것이 아니라, 이외에 레시틴으로부터 유래한 계면활성제를 모두 포함하는 것으로 정의하며, 인지질로 사용되어 리포솜을 제조하는 것에 사용할 수 있는 것이면 종류에 상관 없이 어느 것이나 본 발명에서 사용할 수 있다.

[0028] 리포솜(Liposome)은 물을 좋아하는 성질인 친수성(hydrophilic) 부위와 물을 싫어하는 성질인 소수성(hydrophobic) 부위를 동시에 가지고 있는 양친매성 지질의 생체세포막의 구성성분인 인지질을 주성분으로 사용하여 형성된 지질이중막 구조의 소포체이다. 이러한 구조적 특징으로 인해 내부에 다양한 효능 성분들을 넣고, 운반하여 변형 또는 분해되기 쉬운 불안정한 물질들은 안전하게 보호할 수 있는 특징을 활용하여 특정 조직이나 세포로의 도달성을 높이는 '면역 리포솜' 등으로 사용되기도 한다.

[0029] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 단계 (가)는, 바람직하게 서로 다른 종류의 레시틴을 마누카 오일을 함유한 유기 용매에 녹이는 것일 수 있다.

[0030] 본 발명의 피부 미백용, 주름 개선용, 항균용 또는 항염용 화장품 조성물에 있어서, 상기 화장품 조성물은, 일 예로, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 크림, 에센스, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 수중유(O/W)형 및 유중수(W/O)형 중 선택되는 어느 하나의 기초화장료 제형; 스킨; 로션; 아이크림; 수딩 젤; 연고; 마스크팩용 제형; 바디워시용 제형; 필링젤; 수중유형 및 유중수형 메이크업베이스; 파운데이션; 스킨케어; 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이케어, 아이세도, 치크칼라 및 아이브로우 펜슬류 중 선택되는 어느 하나의 색조화장료 제형; 두피용 제형; 중에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으며, 바람직하게는 크림, 로션, 앰플, 로션 제형인 것이 좋다.

[0031] 또한, 본 발명의 화장품 조성물은 본 발명 이외의 다른 화장품 조성물과 중복하여 사용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 화장품 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다.

[0033] 이하, 본 발명에 대해 하기 실시예 및 실험예에서 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 모두 포함한다.

[실시예1 : 비타민C 함량을 높인 아세로라 열매 추출물 파우더의 제조]

1) 아세로라 열매 추출물 파우더 및 비타민 C 함량이 증진된 아세로라 열매 추출물 파우더 제조

[0037] 아세로라 열매의 동결건조 분말에 대해 초임계 유체로 초임계 이산화탄소를 사용하는 초임계 추출법을 통해 지용성 성분이 제거된 펠렛(pellet)을 만들고 이 펠렛을 20배수의 D.W에 용해하여 수용액으로 제조 후 질소퍼징 추출법 (추출과정 중 질소를 퍼징하여 추출용매에 투입하는 방법)으로 추출물의 유효 성분의 파괴를 최소화하며 상온에서 추출하였다. 이 추출액을 4℃, 3,500 RPM으로 10분 동안 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 얻어진 상층액을 1.0 μm 필터를 사용하여 여과한 후 동결건조시켜 아세로라 추출물 파우더를 제조하였다.

[0038] 한편, 아세로라로부터 비타민C 추출 수율을 높이기 위해 유산균 배양법과 자연침전법을 사용하였다.

[0039] 유산균 배양법은 상기에서 제조한 아세로라 추출물 파우더 수용액에 락토바실러스 람노시스(*Lactobacillus rhamnosus*) 유산균 (KCCM: 11320)을 배양하여 추출물의 비타민 함량을 증가시키고자 했다. 상기 락토바실러스 람노시스 (*Lactobacillus rhamnosus*) 유산균 (KCCM: 11320)은 한국 미생물 보존센터에서 구입하여 사용하였다. 배양액은 아세로라 추출물 파우더 5%를 함유한 50% MRS배지와 동결건조 파우더 10% 수용액을 사용하였다. 락토바실러스 람노시스(*Lactobacillus rhamnosus*) 유산균을 1x10<sup>8</sup> CFU/mL 농도의 균액을 제조하여 각 배양액 50 mL에 균액 1mL을 접종 후 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. 이후, 배양액을 4℃, 3500rpm에서 10분 동안 원심분

리하여 침전을 제거하고 상등액을 얻었다.

[0040] 자연침전법은 상기에서 제조한 아세로라 추출물 파우더를 20배수 D.W에 용해시켜 수용액으로 만들고, 상온 보관과 4℃ 보관한 후, 생성된 침전물을 제거하기 위하여 4℃, 3500rpm 에서 10분 동안 원심분리하고, 1.0 μm 필터 여과하였다.

[0042] **2) 상기에서 제조한 유산균 배양법 및 자연침전법 추가에 따른 비타민 C 함량 변화 측정**

[0043] 상기에서 제조한 아세로라 추출물 파우더, 유산균 배양법 추가에 따른 아세로라 추출물 및 자연 침전법 추가에 따른 아세로라 추출물의 비타민C 함량을 High performance liquid chromatography (HPLC)를 사용하여 분석하였다.

[0044] HPLC 분석 조건은 0.05 M 제1인산칼륨(potassium phosphate monobasic) 수용액과 아세토나이트릴(acetonitrile) 용매를 60:40 비율의 이동상을 사용하여 1 mL/min 유속으로 분리하였다. Shiseido C18 (250x4.6 mm, 5 μm) 컬럼을 사용하였으며 비타민C 검출을 위해 사용한 파장은 254 nm이다. 표준 용액으로 아스코르브산(ascorbic acid)을 25~200 μg/mL 농도로 제조하여 검량선 작성에 사용하였다. 측정 결과, 도 2와 같이 기존의 동결건조하여 얻은 아세로라 추출물 파우더의 약 24%의 비타민C 함량과 비교하여 유산균 배양법(5% 배지 첨가, 10% 배지 무첨가)과 4℃ 자연 침전법에서 각각 26.0%, 25.9%, 26.0%로 비타민C 함량이 증가되었다.

[0046] **[실시예 2: 아세로라 추출물을 함유하는 리포솜 제조]-**

[0047] 본 실시예에서는 상기에서 제조한 4℃ 자연 침전법을 사용한 아세로라 추출물을 함유하는 리포솜을 제조하였다.

[0048] 리포솜을 제조하기 위해 뱅함법(Bangham method, BM)을 응용하였다. 뱅함법은 레시틴을 지용성 성분을 함유한 유기용매에 녹여 500rpm에서 30분 동안 교반하고 감압농축기로 40℃에서 감압 조건으로 플라스크의 내부에 지질막(lipid film)이 형성되도록 충분히 건조한 후, 수용성 성분을 녹인 증류수 또는 버퍼(buffer) 용액으로 수화한 후 균질화하여 리포솜을 제조하는 방법이다(도 3).

[0049] 본 실시예에서는 공지의 뱅함법을 응용하되, 제조방법에서 약간의 차이를 두어 리포솜 샘플을 각각 제조한 후, 최적의 리포솜을 선별하고자 하였다. 샘플 1(sample 1)은 대두 레시틴 일정 농도를 마누카 오일을 함유한 유기용매에 500rpm에서 교반하고, 충분히 균질화된 용액에 아세로라 추출물 수용액을 첨가하여 5000rpm, 10min 하여 2차 균질화하는 과정을 거쳐 제조하였다.

[0050] 샘플 2(sample 2)는 지질막 형성을 위해 감압농축하여 건조하는 과정을 추가하였다. 대두 레시틴 일정 농도를 마누카 오일을 함유한 유기용매에 500rpm에서 교반하고, 충분히 균질화된 용액에 아세로라 추출물 수용액을 첨가하여 5000rpm, 10min으로 2차 균질화하였다. 2차 균질화된 용액을 감압 농축기를 사용하여 지질막이 형성되도록 충분히 건조하였다. 이후, 생성된 지질막에 수용성 용매를 첨가하고 5000rpm, 10min으로 3차 균질화하는 과정을 거쳐 샘플 2(sample 2)를 제조하였다.

[0051] 샘플 3(sample 3)은 형성된 지질막의 안정성과 일정한 분산을 위하여 대두 레시틴과 해바라기 레시틴을 마누카 오일 함유 유기용매에 첨가하고, 500rpm에서 충분히 교반하여 1차 균질화하였다. 충분히 균질화된 용액에 아세로라 추출물 수용액을 첨가하여 5000rpm, 10min으로 2차 균질화하였다. 2차 균질화된 용액을 감압 농축기를 사용하여 지질막이 형성되도록 충분히 건조하였다. 이후, 생성된 지질막에 수용성 용매를 첨가하고 5000rpm, 10min으로 3차 균질화하는 과정을 거쳐 샘플 3(sample 3)을 제조하였다.

[0052] 상기와 같이 각 샘플을 제조한 후, TEM 사진을 통해 분석한 결과, 도 4와 같이 샘플 1(sample 1)의 TEM 사진에서는 지질막의 형태를 뚜렷하게 확인할 수 없었고, 형태나 모양이 리포솜이 형성되지 않은 것으로 관찰되었다. 샘플 2(sample 2)의 TEM 사진에서는 지질막의 형성을 확인할 수 있었으며, 형태나 모양을 보아 리포솜 체형이 형성됨을 확인할 수 있었다. 샘플 3(sample 3)의 TEM 사진에서는 멀티라멜라 구조의 입자가 관찰되었고, 입자의 크기와 형태가 균일한 모습을 보였다.

[0054] **[실험예 1: 아세로라 추출물의 피부 미백 효능 확인]**

[0055] 본 실험예에서는 티로시나제(Tyrosinase) 활성 저해능 및 멜라닌 생성 억제능 평가를 통해 상기 아세로라 추출

물의 피부 미백 효능을 확인하고자 하였다. 하기 실험결과에서 모든 분석 수치는 mean ± SEM으로 나타내었다. 수집된 결과는 Microsoft office excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 시험물질 투여군과 대조군의 차이를 비교하기 위하여 Student' s t-test 및 one-way analysis variance (ANOVA)를 이용하였다. p < 0.05 이상일 때만 통계적으로 유의성 있는 것으로 판단하였다.

[0057] 1) 티로시나제(Tyrosinase) 활성 저해능 평가

[0058] 티로신(Tyrosine)을 수산화(hydroxylation)시켜 3,4-다이하이드록시페닐알라닌(3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA)로 변화하는 티로시나제(tyrosinase)의 티로신 하이드록실라제(tyrosine hydroxylase) 활성 저해능을 평가하였다. 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형을 증류수로 녹이고 0.1 M 인산 버퍼(phosphate buffer) (pH 7.0)에 희석하여 다양한 농도(100, 500, 1000 µg/mL)의 시험액을 각각 준비하였다. 양성대조물질로 아스코르브산(ascorbic acid)를 사용하였고, 이는 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하였다. 96-well plate에 0.1 M 인산 버퍼(phosphate buffer) (pH 7.0) 170 µL, 다양한 농도로 희석한 시험액 10 µL, 2000unit/mL mushroom tyrosinase 10 µL 및 10 mM L-DOPA 10 µL를 순차적으로 넣은 후 혼합하여 37℃에서 15분 동안 반응시킨 후 475 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 공시험액의 흡광도는 시험액 대신 0.1 M 인산 버퍼(phosphate buffer) (pH 7.0)를 넣어 동일한 방법으로 반응하여 측정하였다. 효소 활성 억제율은 하기수학식 1로 산출하였다.

수학식 1

[0059] 
$$\text{효소활성억제율(\%)} = (A - B) / A \times 100$$
 (A:공시험액의반응후흡광도, B:시험액의반응후흡광도)

[0060] 그 결과, 하기 표 1 및 도 5와 같이 티로신 하이드록실라제(tyrosine hydroxylase) 활성 억제능은 다양한 농도의 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형을 처리할 때, 각각 농도 의존적으로 증가하였다. 또한, 양성 대조군인 아스코르브산(ascorbic acid) 200 µM 농도의 티로신 하이드록실라제(tyrosine hydroxylase) 활성 억제능에는 미치지 못하는 수준이었지만, 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형 순으로 티로신 하이드록실라제(tyrosine hydroxylase) 활성 억제능이 증가하는 것으로 나타났다. 이를 통해 아세로라 추출물을 포함하는 혼합 리포솜 제형이 티로신 활성 저해능에 큰 효능을 발휘함을 확인할 수 있었다.

표 1

[0062] 티로시나제(Tyrosinase) 활성 저해능

시험물질	처리농도(µg/ml)	저해능(%)
아세로라 추출물	Ascorbic acid 200 µm	86.0 ± 2.9
	100	54.5 ± 1.9
	500	57.5 ± 1.5
	1000	60.6 ± 5.5
마누카 오일	Ascorbic acid 200 µm	85.5 ± 3.9
	10	63.4 ± 1.4
	100	66.2 ± 2.5
	500	68.1 ± 1.2
혼합 리포솜 제형	Ascorbic acid 200 µm	85.9 ± 2.4
	100	72.0 ± 7.4
	500	74.0 ± 2.8
	1000	75.8 ± 1.4

[0064] 2) 멜라닌(melanin) 생성 억제능 평가

[0065] 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형이 B16F10 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하고자 하

였다.

[0067] 가) B16F10 세포 배양

[0068] 실험물질로 생쥐에서 유래한 흑색종 세포인 B16F10 세포는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다. B16F10 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-Invitrogen, carlabad, CA, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS), 100 units/mL 페니실린(penicillin)과 100 µg/mL 스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가한 세포 배양액을 사용하여 37°C 습윤한 CO<sub>2</sub> 배양기 (5% CO<sub>2</sub>/95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양접시의 80% 정도 찼을 때, 인산염완충식염수(phosphate buffer saline, PBS) (pH 7.4)으로 세포 단층을 씻어낸 후 세포배양액을 첨가하여 세포를 떼어내어 계대 배양하였고, 배지는 2일마다 교환하였다.

[0070] 나) B16F10 세포의 생존율(cell viability) 측정

[0071] B16F10 세포의 생존율(cell viability)을 측정하고자 MTT Assay (Denizot F and Lang R. J Immunological Method 89: 271-277, 1986)를 실시하여 측정하였다. B16F10 세포를 1 × 10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 24-well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. 세포를 24시간 배양한 후 시험물질인 아세로라 추출물, 마누카 오일, 리포좀 제형을 다양한 농도로 함유한 배양액으로 세포배양액을 교환하여 세포를 72시간 배양한 후 배양액을 제거하고 1 mg/mL MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Amresco) 용액을 첨가하여 2시간 추가 배양하였다. MTT 용액을 제거한 후 MTT가 미토콘드리아 디하이드로게나제(dehydrogenase)에 의해 환원되어 생성된 푸른색의 포르마잔(formazan)을 이소프로판올(isopropanol)을 첨가하여 용해한 다음 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0072] 그 결과, 하기 표 2 및 도 6과 같이 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포좀 제형을 5 - 1000 µg/mL 농도로 처리한 경우 세포 생존율에는 큰 영향을 미치지 않았다. 따라서 아세로라 추출물 100, 500, 1000 µg/mL 농도, 마누카 오일 10, 100, 500 µg/mL 농도, 혼합 리포좀 제형 100, 500, 1000 µg/mL 농도로 이후의 실험의 시험물질 처리 농도 설정하여 수행하였다.

**표 2**

[0073] B16F10 세포의 세포 생존율(cell viability)

시험물질	처리농도(µg/ml)	cell viability (Absorbance at 570nm)
아세로라추출물	0	2.879 ± 0.070
	5	2.688 ± 0.062
	10	2.659 ± 0.093
	20	2.635 ± 0.085
	50	2.581 ± 0.070
	100	2.578 ± 0.060
	500	2.532 ± 0.051
	1000	2.257 ± 0.064
마누카오일	0	2.859 ± 0.070
	5	2.678 ± 0.062
	10	2.639 ± 0.093
	20	2.633 ± 0.085
	50	2.591 ± 0.070
	100	2.598 ± 0.060
	500	2.434 ± 0.051
	1000	2.167 ± 0.064

혼합 리포솜 제형	0	2.867 ± 0.070
	5	2.686 ± 0.062
	10	2.668 ± 0.093
	20	2.643 ± 0.085
	50	2.641 ± 0.070
	100	2.598 ± 0.060
	500	2.432 ± 0.051
	1000	2.172 ± 0.064

[0075] 다) B16F10 세포에서 생성된 멜라닌(melanin) 함량 측정

[0076] B16F10 세포를  $0.5 \times 10^5$  cells/well이 되도록 12-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 세포를 24시간 배양한 후 100 nM  $\alpha$ -멜라닌세포자극호르몬( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 다양한 농도의 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형을 함유한 배양액으로 세포배양액을 교환하여 세포를 배양하였다. 72시간 동안 세포를 배양한 후 세포 단층을 PBS로 세척한 후 0.25% 트립신(trypsin)-2.65 mM EDTA를 처리하여 세포를 회수하였고, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 펠릿(pellet)을 얻었다. 획득한 pellet에 10% 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide, DMSO)를 함유된 1 N NaOH를 넣어 60°C에서 용해시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 합성 멜라닌(melanin)을 이용한 검량선으로부터 멜라닌의 양을 산출하였고, Lowry 법(Lowry OH et al., J BiolChem 193: 265-275)으로 단백질을 측정하여 멜라닌 생성량을 단백질 양으로 표준화한 후  $\alpha$ -MSH만을 처리한 군의 값을 100으로 하여 상대적인 값으로 나타내었다.

[0077] 그 결과, 하기 표 3 및 도 7과 같이  $\alpha$ -MSH를 처리한 경우  $\alpha$ -MSH를 처리하지 않은 경우보다 B16F10 세포에서 멜라닌 생성이 현저히 증가하는 것에 비교하여 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형의 처리 농도가 증가할수록 멜라닌 생성이 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 아세로라 추출물 500  $\mu$ g/mL, 마누카 오일 100  $\mu$ g/mL 및 혼합 리포솜 제형 500  $\mu$ g/mL 농도로 처리한 경우 양성 대조물질인 알부틴(arbutin) 2.5 mM 처리 군과 유사하게 멜라닌(melanin) 생성이 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해 아세로라 추출물이 멜라닌 생성 억제에 효능이 있으며, 아세로라 추출물을 포함하는 혼합 리포솜 제형이 멜라닌 생성 억제에 큰 효능을 발휘함을 확인할 수 있었다.

**표 3**

B16F10 세포에서 생성된 멜라닌(melanin) 함량

[0078]

시험물질	$\alpha$ -MSH (100nM)	처리농도( $\mu$ g/ml)	Melanin 함량 (% of control)
아세로라추출물	-	-	37.1 ± 3.0
	+	0	100.0 ± 7.1
	+	Arbutin 2.5 mM	53.7 ± 1.6
	+	100	68.7 ± 0.6
	+	500	58.4 ± 0.8
	+	1000	56.3 ± 0.7
마누카 오일	-	-	37.0 ± 1.9
	+	0	100.0 ± 5.1
	+	Arbutin 2.5 mM	53.1 ± 1.1
	+	10	61.6 ± 1.0
	+	100	51.6 ± 1.2
	+	500	49.2 ± 0.8
혼합 리포솜 제형	-	-	37.3 ± 1.2
	+	0	100.0 ± 6.4
	+	Arbutin 2.5 mM	53.2 ± 1.8
	+	100	53.3 ± 0.9
	+	500	47.1 ± 1.1
	+	1000	46.2 ± 0.9

[0080] [실험예 2: 아세로라 추출물의 주름 개선 효능 확인]

[0081] 본 실험예에서는 콜라겐(collagen) 및 MMP-1 함량 측정을 통해 상기 아세로라 추출물의 주름 개선 효능을 확인하고자 하였다. 하기 실험결과에서 모든 분석 수치는 mean ± SEM으로 나타내었다. 수집된 결과는 Microsoft office excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 시험물질 투여군과 대조군의 차이를 비교하기 위하여 Student' s t-test 및 one-way analysis variance (ANOVA)를 이용하였다. p < 0.05 이상일 때만 통계적으로 유의성 있는 것으로 판단하였다.

[0083] 1) HS68 세포 배양

[0084] 인간에서 유래한 피부 섬유아세포인 HS68 세포는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다. HS68 세포는 DMEM 배지(Welgene)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL 페니실린(penicillin)과 100 µg/mL 스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가한 세포 배양액(complete DMEM 배양액)을 사용하여 37°C 습윤한 CO<sub>2</sub> 배양기 (5% CO<sub>2</sub>/95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양접시의 80% 정도 찻을 때, 인산염완충식염수(phosphate buffer saline, PBS) (pH7.4)으로 세포 단층을 씻어낸 후 트립신(trypsin)-2.65 mM EDTA를 첨가하여 세포를 떼어내어 계대 배양하였고, 배지는 2일마다 교환하였다.

[0086] 2) HS68 세포 생존율(cell viability) 측정

[0087] HS68 세포에서 시험물질의 세포독성을 조사하기 위해 먼저 HS68 세포를 1 × 10<sup>4</sup> cells/well 이 되도록 48-well plate에 분주하고 24시간 세포를 배양하였다. 세포를 24시간 배양한 후 각각의 시험물질을 다양한 농도로 함유한 serum-free 세포 배양액으로 교환하여 세포를 24시간 배양하였다. 세포를 24시간 배양한 후 MTT assay (Denizot F and Lang R. J Immunological Method 89:271-277, 1986)을 실시하여 살아있는 세포수를 측정하였다. MTT assay 방법은 미토콘드리아의 디하이드로게나제(dehydrogenase)가 MTT (Amresco)를 환원시켜 푸른색 물질인 포르마잔(formazan)을 만드는 원리에 기초한 것으로 본 시험에서는 formazan을 이소프로판올(isopropanol)에 용해시킨 다음 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0088] 그 결과, 하기 표 4 및 도 8과 같이 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형을 5 - 1000 µg/mL 농도로 처리한 경우 세포 생존율에는 영향을 미치지 않았다. 따라서 아세로라 추출물 100, 500, 1000 µg/mL 농도, 마누카 오일 10, 100, 500 µg/mL 농도, 혼합 리포솜 제형 100, 500, 1000 µg/mL 농도로 이후의 실험의 시험물질 처리 농도 설정하여 수행하였다.

표 4

[0089] HS68 세포의 세포 생존율(cell viability)

시험물질	처리농도(µg/ml)	cell viability (Absorbance at 570nm)
아세로라추출물	0	0.125 ± 0.003
	5	0.124 ± 0.002
	10	0.113 ± 0.001
	20	0.116 ± 0.001
	50	0.118 ± 0.001
	100	0.121 ± 0.001
	500	0.126 ± 0.002
	1000	0.108 ± 0.002

마누카오일	0	0.119 ± 0.003
	5	0.117 ± 0.002
	10	0.113 ± 0.001
	20	0.114 ± 0.001
	50	0.119 ± 0.001
	100	0.121 ± 0.001
	500	0.104 ± 0.002
	1000	0.118 ± 0.002
혼합 리포솜 제형	0	0.117 ± 0.003
	5	0.116 ± 0.002
	10	0.115 ± 0.001
	20	0.117 ± 0.001
	50	0.121 ± 0.001
	100	0.112 ± 0.001
	500	0.123 ± 0.002
	1000	0.108 ± 0.002

[0091] 3) HS68 세포가 생성한 콜라겐(collagen) 및 MMP-1 함량 측정

[0092] 콜라겐은 모든 결합조직에 분포하는 주된 단백질로서, 피부, 골 및 인대에 풍부하게 존재하며, 진피의 85-90%를 차지하여 피부의 탄성과 탄력을 담당한다. 따라서 콜라겐의 함량에 따라 피부 주름의 상태가 결정된다. 한편, 자외선의 노출에 의해 콜라겐을 가수분해하는 것에 콜라겐 가수분해 효소인 MMPs(Matrix metalloproteinase) 유전자가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 MMP-1이 대표적이다. 이에 피부 주름에 대한 효능을 평가하기 위해 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형이 피부 섬유아세포인 HS68 세포의 콜라겐 및 MMP-1 생성 분비에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

[0093] 먼저 HS68 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well 이 되도록 24-well plate에 분주하고 24시간 세포를 배양하였다. 세포를 24시간 배양한 후 각각의 아세로라 추출물, 마누카 오일, 리포솜 제형을 다양한 농도로 함유한 serum-free 세포 배양액으로 교환하여 세포를 24시간 배양하였다. 세포를 24시간 배양한 후 세포 배양액을 수거하여 각각 Procollagen Type I C-Peptide (PIP) EIA Kit (Takara)와 Human MMP-1 ELISA Kit (Sigma-Aldrich)를 사용하여 제조사에서 제시한 방법에 따라 콜라겐 및 MMP-1 함량을 측정하였다. 양성대조군으로 사용한 형질전환성장인자-베타 1(transforming growth factor-beta 1, TGF-β1)은 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였다.

[0094] 콜라겐 함량을 측정된 결과, 하기 표 5 및 도 9와 같이 양성대조군인 L-Ascorbic acid를 200 μM 농도로 처리한 경우 대조군에 비해 현저히 증가하였고, 이와 유사하지는 않지만 아세로라 추출물, 마누카 오일 및 혼합 리포솜 제형을 다양한 농도로 처리한 경우, HS68 세포에서 생성된 콜라겐 함량은 농도의존적으로 증가하였다. 특히, 아세로라 추출물 1000 μg/mL, 마누카 오일 500 μg/mL 및 혼합 리포솜 제형 500, 1000 μg/mL 농도로 처리한 경우 시험물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 각각 25.4, 37.6, 30.7 및 52.1%으로 유의적인 증가를 나타냈다.

표 5

HS68 세포가 생성한 콜라겐(collagen) 함량

시험물질	처리농도(μg/ml)	collagen
아세로라추출물	control	100.0 ± 5.7
	L-Ascorbic acid 200 μM	135.3 ± 8.3
	100	44.7 ± 2.2
	500	98.1 ± 6.2
	1000	125.4 ± 8.9
마누카 오일	control	100.0 ± 5.7
	L-Ascorbic acid 200 μM	129.2 ± 7.9
	10	48.7 ± 2.4
	100	101.9 ± 6.4
	500	137.6 ± 9.8

혼합 리포솜 제형	control	100.0 ± 5.7
	L-Ascorbic acid 200 μM	134.7 ± 8.6
	100	53.6 ± 2.4
	500	130.69 ± 8.6
	1000	152.1 ± 11.1

[0097] 한편, MMP-1 함량을 측정된 결과, 하기 표 6 및 도 10과 같이, 양성대조군인 형질전환생장인자-베타 1(transforming growth factor-beta 1, TGF-β1)은 10 ng/mL 농도로 처리 시 MMP-1 생성 분비는 대조군 보다 낮게 나타났으며, 이와 유사하지는 않지만 아세로라 추출물, 마누카 오일 및 혼합 리포솜 제형을 다양한 농도로 처리한 경우 HS68 세포에서 생성된 MMP-1의 함량은 농도 의존적으로 감소하였다. 아세로라 추출물, 마누카 오일, 혼합 리포솜 제형 순으로 MMP-1의 함량이 감소하였고, 특히, 혼합 리포솜 제형을 1000 μg/mL 농도로 처리한 경우, MMP-1의 함량은 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 유사한 수준으로 나타났다. 이를 통해 아세로라 추출물이 콜라겐 생성을 증가시키고, 콜라겐 가수분해효소인 MMP-1 생성을 억제시킴으로써 주름 개선에 효능이 있으며, 아세로라 추출물을 포함하는 혼합 리포솜 제형이 주름 개선에 효능을 크게 발휘함을 확인할 수 있었다.

**표 6**

[0098] HS68 세포가 생성한 MMP-1 함량

	처리농도(μg/ml)	MMP-1 (% of control)
아세로라 추출물	control	100.0 ± 14.6
	TGF-β <sub>1</sub>	67.4 ± 28.6
	100	538.4 ± 15.4
	500	258.8 ± 10.5
	1000	134.5 ± 23.6
마누카 오일	control	100 ± 14.9
	TGF-β <sub>1</sub>	67.61 ± 28.4
	10	483.1 ± 15.8
	50	235.0 ± 10.1
	100	116.7 ± 25.0
혼합 리포솜 제형	control	100 ± 13.1
	TGF-β <sub>1</sub>	68.1 ± 15.8
	100	403.3 ± 13.7
	500	193.7 ± 23.6
	1000	103.8 ± 26.6

[0100] [실험예 3: 아세로라 추출물의 NO(Nitric oxide) 생성 억제능 확인]

[0101] 본 실험예에서는 상기 아세로라 추출물의 NO(Nitric oxide) 생성 억제능을 확인하고자 하였다.

[0103] 마우스대식세포인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. NO의 농도는 배양액 내의 NO농도를 griess reagent system을 이용하여 측정하였으며, RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1.5×10<sup>5</sup> cells/well로 분주하여 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 아세로라 추출물, 마누카 오일, 리포솜 제형을 다양한 농도로 처리하였고 LPS 1μg/ml의 농도를 처리하여 다시 24 h 동안 배양하였다. N1 buffer 50 μl를 각 well에 처리하여 10 min간 상온에서 반응 한 후, N2 buffer 50 μl를 각 well에 처리하고 10 min간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

[0104] 그 결과, 도 11과 같이 아세로라 추출물, 마누카 오일 및 혼합 리포솜 제형을 다양한 농도로 처리한 경우, 농도 의존적으로 NO 생성량이 유의적으로 감소하는 경향을 확인하였다. 이를 통해 아세로라 추출물이 NO 생성 억제능을 가짐을 확인할 수 있었으며, 아세로라 추출물을 포함하는 혼합 리포솜 제형이 NO 생성 억제에 큰 효능을 발

회합을 확인할 수 있었다.

[0106] [실험예 4: 아세로라 추출물의 항균력 테스트]

[0107] 본 실험예에서는 상기 아세로라 추출물의 항균력을 측정하고자 하였다.

[0109] 아세로라 추출물, 마누카 오일과 혼합 리포솜 제형의 항균력을 한천 배지 확산법(paper disk diffusion method)으로 측정하였다. 사용한 균주는 *S. aureus*, *E. coli*, *P.aeruginosa*, *C.albicans*와 *A.brasiliensis*로, 배지 및 배양 조건은 하기 표 7과 같았다.

표 7

균주	배지	온도
<i>Escherichia coli</i>	Trypic soy agar	37℃
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	Trypic soy agar	37℃
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Trypic soy agar	37℃
<i>Candida albicans</i>	YM AGAR	37℃
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	POTATO DEXTROSE AGAR	25℃

[0112] 각 균주에 맞는 아가 플레이트(agar plate) 배지에 배양된 1 콜로니(colony)를 취하여 브로스(broth) 배지에서 배양하였다. 이 배양액의 600nm에서의 흡광도가 0.15가 되도록 희석하여 균 농도를  $10^6$  CFU/ml(세균) 및  $10^5$  CFU/ml(효모)가 되도록 균액을 제조하였다. *A.brasiliensis*는 균사를 형성하는 진균이므로 호모믹서(homomixer)를 사용하여 균액을 균질화하여 600nm에서의 흡광도가 0.2가 되도록 희석하여 사용하였다. 각 시료의 항균력은 한천 배지 확산법(paper disk diffusion method)으로 측정하였다. 각 균액을 균주에 맞는 아가 플레이트(agar plate) 배지에 100ul씩 고르게 도말한 후 멸균된 페이퍼 디스크(paper disk)를 적당한 간격으로 올려놓고 준비된 시료를 50ul씩 처리하였다. 각 균주의 조건으로 배양한 후 시료가 처리된 페이퍼 디스크(paper disk)의 클리어존(clear zone)의 크기로 확인하여 항균 활성 측정을 측정하였다.

[0113] 그 결과, 하기 표 8과 같이 아세로라 추출물은 항균 활성을 보이지 않았으나 마누카 오일의 항균력은 5종의 균주에서 좋은 활성을 보였다. 혼합 리포솜 제형의 경우 마누카 오일의 항균력과 비교하여 더 좋은 결과를 나타냈고, 이를 통해 아세로라 추출물이 마누카 오일의 항균력을 더욱 증가시킴을 알 수 있었다.

표 8

	아세로라 추출물	마누카 오일	혼합 리포솜 제형
<i>Escherichia coli</i>	-	14	18
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	-	23	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	12	15
<i>Candida albicans</i>	-	17	21
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	-	18	24

[0116] [실험예 5: 아세로라 추출물의 skin pampa 테스트]

[0117] 본 실험예에서는 상기 아세로라 추출물에 대한 skin pampa 테스트를 수행하였다(도 12 참조).

[0118] 프리즈마 버퍼(prisma buffer)로 블랭크(blank)를 준비하였다. 그 후, deep well plate에 샘플을 준비하는 과정으로 deep well plate에 프리즈마 버퍼(prisma buffer) 1,000ul를 pH-map에 따라 넣고, 스톡 플레이트(stock plate)의 뚜껑을 열고 8channel pipettor를 이용하여 샘플 5ul를 따서 deep well plate로 옮겼다. 파이펫

(pipette)을 500ul로 맞춘 후 4~6번 섞고, Solution의 농도를 측정하거나 계산하여 어세이(aasay)의 <reference>로써 결과 이용하였다.

[0119] 다음으로 스킨 테스트 어세이(skin test assay)를 위해 도너판(donor plate)을 준비하는 과정으로 deep well plate로부터 샘플 용액(sample solution) 200ul를 도너판(donor plate)을 옮기고, 뚜껑을 덮었다. 이때, PAMPA 샌드위치(PAMPA sandwich)의 상판(top plate)은 어셉터 판(acceptor plate)이고, PAMPA 샌드위치(PAMPA sandwich)의 하판(bottom plate)은 도너판(donor plate)이다.

[0120] 다음으로 스킨 테스트 어세이(skin test assay)를 위해 PAMPA 샌드위치(PAMPA sandwich) 및 어셉터 판(acceptor plate)을 준비하는 과정으로 8 channel pipette을 200ul로 맞춘 후, 웰(Well)을 수화(hydration)하고 도너 판(donor plate)의 어세이(assay)를 준비한 후, 상판(top plate)을 수화 용액 저장고(hydration solution reservoir)로부터 서포트 판(support plate)으로 옮겼다. 그리고 어셉터 판(acceptor plate)의 각 웰(well)에 pH7.4의 프리즈마 버퍼(prisma buffer) 200ul를 넣고, 도너 판(donor plate)의 뚜껑을 벗긴 후, 버블(bubble)이 생기지 않게 주의하면서 acceptor plate bottom row(H)부터 도너 판(donor plate) 위에 천천히 올려놓았다. 샌드위치(sandwich)가 만들어지고 나면 어셉터 판(acceptor plate) 위에 뚜껑을 덮고, 스킨 멤브레인(skin membrane)이 마르는 것을 방지하기 위하여 4~5분 이내에 끝내고 실험을 시작하여야 한다. 증발을 최소화하기 위하여 높은 상대 습도를 유지하기 위한 젖은 스펀지가 있는 습도 챔버(humidity chamber)나 gut-box에 샌드위치(sandwich)를 놓되, 샌드위치 판(sandwich plate)은 절대로 기울이면 안 된다. 그리고 RT에서 5hr 동안 휘젓지 않은 상태로 배양(incubation)하였다. 배양(incubation)을 끝내고, 습도 챔버(humidity chamber)로부터 PAMPA 샌드위치(PAMPA sandwich)를 꺼낸 후 덮개(lid)를 열고 8 channel pipettor를 이용하여 어셉터 판(acceptor plate)으로부터 150ul 씩 UV 판(UV plate)으로 옮긴 후 스펙트로포토미터(spectrophotometer)에서 250~498nm 범위로 설정하고 분석하였다. 그 결과는 하기 표 9 및 도 13과 같았다.

**표 9**

[0121]

pH	6.5	7.4
NC(Blank)	0.042	0.048
NC(prisma bf.)	0.043	0.054
PC(Chlor.)	0.214	0.239
PC(Proge.)	0.22	0.296
ne	0.111	0.118
NL	0.116	0.162
ML-1	0.379	0.295
ML-2	0.208	0.304

[0122] NC: Negative control

[0123] PC: Positive Control

[0124] NE: Normal Extract

[0125] NL: Normal Liposome

[0126] ML-1: Multi Lamellar Liposome/Maqui Fruit Extract

[0127] ML-2: Multi Lamellar Liposome/Acerola Extract

[0129] **[실험예 6: 아세로라 추출물의 소재 안정성 측정]**

[0130] 본 실험예에서는 상기 아세로라 추출물 및 이의 리포솜 제형 및 멀티 라멜라 제형(혼합 리포솜 제형)으로 이루어진 비타민 C의 안정성을 측정하고자 하였다.

[0132] 아세로라 추출물, 리포솜 제형 및 멀티 라멜라 제형 약 9.6 µg/mL 농도로 만들어진 시료를 알루미늄 포일로 감싼 50 mL tube에 보관하였다. 단기 안정성은 1 개월 동안 매주 농도 분석을 진행 하였고, 장기 안정성은 7개월 동안 1개월 간격으로 농도 분석을 진행하였다.

[0133] 4주간 진행한 단기 안정성 실험 결과, 도 14와 같이 아세로라 추출물과 리포솜 제형은 초기 농도 대비 각각 35.9와 59.2%로 급격하게 농도가 감소하는 반면, 멀티 라멜라 제형의 비타민C는 초기 농도 대비 95.6%로 안정적으로 농도가 유지되는 것을 확인하였다. 따라서, 아세로라 추출물과 리포솜 제형은 장기 안정성 실험의 의미가 없어 멀티 라멜라 제형만 장기 안정성 실험을 진행하였고, 7개월 차 최종 농도가 초기 농도 대비 82.1 %로 비타민C가 파괴되지 않고 안정적으로 유지되는 것을 확인하였다. 이를 통해 비타민 C가 안정적으로 유지되는데 멀티 라멜라 제형이 탁월한 것을 알 수 있었다.

[0135] [실험예 7: 아세로라 추출물 소재의 피부투과도 측정]

[0136] 본 실험예에서는 상기 아세로라 추출물 및 이의 리포솜 제형 및 멀티 라멜라 제형의 피부 투과도를 측정하고자 하였다.

[0138] 아세로라 추출물, 리포솜 제형 및 멀티 라멜라 제형의 각 시료를 인공 피부막에 접촉한 상태에서 전기자극을 가하면서 실시하였다. 수용체 단계(receptor phase)에 D.W. 또는 버퍼(buffer)를 12ml로 기포가 발생하지 않도록 채운 후 시간마다 샘플을 채취하여 비타민C의 함량을 측정하여 피부 투과 정도를 측정하였다. 피부 투과 실험 24시간 경과 후 채취한 샘플의 비타민 함량을 측정하여 투과실험 전의 비타민C 함량과 비교하여 투과률을 나타내었다.

[0139] 그 결과 하기 표 10 및 도 15와 같이, 아세로라 추출물의 비타민C 투과률은 1.78%를 보이는 것에 비해 리포솜 제형과 멀티라멜라 제형에서 2.18%, 2.60% 로 유의적으로 증가하였다. 또한, 전기 자극을 가하였을 때 피부 투과률이 증가하는 경향이 나타났다. 이는 리포솜 제형의 인지질막의 재질이 피부각질층의 세포간질 성분과 유사한 지질로 구성되어 있어 자극이 거의 없고 생체 친화력이 우수하고 유효 성분의 안정화 및 성분 보존 능력이 뛰어나 경피 흡수력이 뛰어나다는 보고와 일치한 결과였다.

표 10

전기자극	아세로라 추출물	리포솜 제형	멀티라멜라 제형
0	1.78%	2.18%	2.60%
100	1.83%	2.26%	2.67%
200	1.87%	2.33%	2.77%
400	1.94%	2.39%	2.84%

[0142] [실시예 3: 아세로라 추출물 리포솜을 함유하는 화장료 조성물의 제조]

[0143] 본 실시예에서는 본 발명의 화장료 조성물의 일 예로 크림을 제조하였다.

[0144] 상기 실시예 2의 아세로라 추출물을 함유하는 멀티라멜라 리포솜 제형의 크림을 제조하였다. 하기 표 11은 실시예 3의 화장료 조성물에 대한 함량을 나타낸 것이다.

표 11

원료명	함량 (%)				
	15.00	13.00	13.00	13.00	
A (유상층)	Caprylic/Capric Triglyceride	6.00	6.00	6.00	6.00
	Symbio Muls GC	5.00	3.00	3.00	3.00
	Isoamy Laurate	2.00	2.00	2.00	2.00
	세테아릴알콜	1.00	1.00	1.00	1.00
	유기농포도씨오일	0.50	0.50	0.50	0.50
	유기농아르간오일	0.50	0.50	0.50	0.50
	유기농호호바오일	0.50	0.50	0.50	0.50
	Dermofeel Toco 50	0.50	0.50	0.50	0.50

B (수상층)	정제수	56.09	60.09	60.19	57.19	
	D-Glycerin	3.00	3.00	3.00	4.00	
	IPG-S	3.00	3.00	3.00	4.00	
	GE-26	2.00	2.00	2.00	3.00	
	멀티라멜라 리포솜 아세로라 추출물	1.00	1.00	1.00	1.00	
	잔탄검	0.40	0.40	0.30	0.30	
	시트릭에씨드	0.01	0.01	0.01	0.01	
C (1차후첨)	Dermosoft GMCY	2.00	2.00	2.00	2.00	
	Euro-Napre	1.00	1.00	1.00	1.00	
	아로마 향	0.50	0.50	0.50	0.50	
D (2차 후첨)	디메치콘	0.50	0.50	0.50	0.50	
합계		100.00	100.00	100.00	100.00	
		샘플1	샘플2		샘플3	샘플4

[0147] 상기 표 11에 나타난 성분을 이용하여 다음과 같은 공정과정을 거쳐 완제품 제조하였다. A상과 B상을 각각 다른 비커에 칭량하여 80도로 가온하여 20분간 녹였다. 20분간 녹이는 과정에 C상과 D상을 각각 다른 비커에 칭량해 놓았다(상온보관). B상에 A상을 넣고 3000RPM으로 호모를 쳐 주고, 온도가 50도로 내려가면 1차 후첨인 C상을 넣고 다시 호모를 쳐 주고, 온도가 40도로 내려가면 2차 후첨인 D상을 넣고 다시 호모를 쳐 주었다. 이후, 충분한 안정화가 될 때까지(약 5분) 호모를 쳐 주었다.

[0148] 사용감 테스트 결과 샘플1은 유분감이 많이 남아 샘플2에서 카프릴릭(Caprylic)과 아이소아미 라우레이트(isoamy Laurate)의 함량을 줄여 제조하였고, 샘플2는 유분감은 보완되었으나, 밀리는 감이 있어 샘플3에서 잔탄검의 함량을 줄였다. 샘플3 밀리지 않는 제형이 되었으나, 보습감이 부족하여 샘플4에서 보습제의 함량을 늘려 제조하여 최종 레시피로 선택하였다.

[0150] [실시예 4: 아세로라 추출물 리포솜을 함유하는 화장품 조성물의 제조]

[0151] 본 실시예에서는 본 발명의 화장품 조성물의 일 예로 로션을 제조하였다.

[0152] 상기 실시예 2의 아세로라 추출물을 함유하는 멀티라멜라 리포솜 제형의 로션을 제조하였다. 하기 표 12는 실시예 4의 화장품 조성물에 대한 함량을 나타낸 것이다.

표 12

		원료명	함량 (%)		
A (유상층)	Caprylic/Capric Triglyceride	12.00	10.00	8.50	
	Olivem 1000	4.00	3.00	3.00	
	Glyceryl oleate	3.00	3.00	3.00	
	Isoamy Laurate	4.00	3.00	2.50	
	Cetearyl alcohol	3.00	2.00	2.00	
	호호바오일	0.50	0.50	0.50	
	시어버터	0.50	0.50	0.50	
	해바라기씨오일	0.50	0.50	0.50	
	포도씨오일	0.50	0.50	0.50	
	Dermofeel Toco50	0.50	0.50	0.50	
	B (수상층)	정제수	63.67	68.67	70.67
Glycerin		4.00	4.00	4.00	
멀티라멜라 리포솜 아세로라 추출물		1.00	1.00	1.00	
C (1차후첨)	아로마 향	0.30	0.30	0.30	
	1,2-헥산디올	1.00	1.00	1.00	
	에칠헥실글리세린	0.03	0.03	0.03	
D (2차 후첨)	디메치콘	1.50	1.50	1.50	

합계	100.00	100.00	100.00
	샘플1	샘플2	샘플3

[0155] 상기 표 12에 나타난 성분을 이용하여 다음과 같은 공정과정을 거쳐 완제품 제조하였다. A상과 B상을 각각 다른 비커에 칭량하여 80도로 가온하여 20분간 녹였다. 20분간 녹이는 과정에 C상과 D상을 각각 다른 비커에 칭량을 해 놓았다(상온보관). B상에 A상을 넣고 3000RPM으로 호모를 쳐 주고, 온도가 50도로 내려가면 1차 후첨인 C상을 넣고 다시 호모를 쳐 주고, 온도가 40도로 내려가면 2차 후첨인 D상을 넣고 다시 호모를 쳐 주었다. 이후, 충분한 안정화가 될 때까지(약 5분) 호모를 쳐 주었다.

[0156] 사용감 테스트 결과 샘플1 점도가 많이 높고 유분감이 많이 남아 샘플2에서 Olivem 1000과 세테아릴 알코올(Cetearyl alcohol)함량을 줄이고 카프릴릭/카프릭 트리글리세리드(Caprylic/Capric Triglyceride)와 아이소아미 라우레이트(Isoamy Laurate)의 함량도 함께 줄여 제조하였다. 샘플2의 제형의 점도는 보완되었으나 유분감이 아직 남아 카프릴릭/카프릭 트리글리세리드(Caprylic/Capric Triglyceride)와 아이소아미 라우레이트(Isoamy Laurate)의 함량을 더 줄여 샘플3 제형의 점도와 유분감이 모두 보완되었다.

[0157] [실시예 5: 아세로라 추출물 리포솜을 함유하는 화장품 조성물의 제조]

[0158] 본 실시예에서는 본 발명의 화장품 조성물의 일 예로 앰플을 제조하였다.

[0159] 상기 실시예 2의 아세로라 추출물을 함유하는 멀티라멜라 리포솜 제형의 앰플을 제조하였다. 하기 표 13은 실시예 5의 화장품 조성물에 대한 함량을 나타낸 것이다.

표 13

[0160]

원료명	함량(%)					
	샘플1	샘플2	샘플3	샘플4	샘플5	
A	정제수	31.25	31.95	49.95	59.95	56.95
	글리세린	32.00	31.50	25.00	20.00	20.00
	BG	32.00	31.50	20.00	15.00	15.00
	멀티라멜라 리포솜 아세로라 추출물	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	잔탄검	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00
	Sodium alginate	0.00	0.50	0.50	0.50	0.50
	D-Glycerin	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00
	IPG-S	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00
	GE-26	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00
B	1,2-헥산디올	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
	에칠헥실글리세린	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
C	유기농알코올	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
합계	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	
	샘플1	샘플2	샘플3	샘플4	샘플5	

[0162] 상기 표 13에 나타난 성분을 이용하여 다음과 같은 공정과정을 거쳐 완제품 제조하였다. A상을 비커에 칭량하여 80도로 가온하여 20분간 녹였다. 20분간 녹이는 과정에 B상과 C상을 각각 다른 비커에 칭량을 해 놓는다(상온보관). A상을 넣고 3000RPM으로 호모를 쳐 주고, 온도가 50도로 내려가면 1차 후첨인 B상을 넣고 다시 호모를 쳐 주고, 온도가 40도로 내려가면 2차 후첨인 C상을 넣고 5분간 호모를 쳐 주었다.

[0163] 사용감 테스트 결과 샘플1은 잔탄검 사용으로 밀리는 느낌이 발생하여, 샘플2에서 잔탄검을 알긴산 나트륨(Sodium alginate)으로 대체하였다. 샘플2의 밀리는 느낌을 잡았으나 끈적한 느낌이 남아 샘플3에서 글리세린과 BG 함량을 낮추었다. 샘플3은 끈적한 느낌이 줄어들었으나, 끈적한 느낌이 조금 남아 있어 샘플4에서 글리세린과 BG 함량을 더 낮추었다. 샘플4 끈적한 느낌은 보완하였으나, 보습력을 높이기 위해 D-글리세린(D-Glycerin), IPG-S, GE-26 세가지 보습제를 각각 1%씩 추가하여 샘플5는 끈적한 느낌, 보습력 모두 보완되었다.

[0165] [실시예 6: 아세로라 추출물 리포솜을 함유하는 화장료 조성물의 제조]

[0166] 본 실시예에서는 본 발명의 화장료 조성물의 일 예로 세럼을 제조하였다.

[0167] 상기 실시예 2의 아세로라 추출물을 함유하는 멀티라멜라 리포솜 제형의 세럼을 제조하였다. 하기 표 14는 실시예 6의 화장료 조성물에 대한 함량을 나타낸 것이다.

표 14

[0168]

원료명	함량(%)						
	샘플1	샘플2	샘플3	샘플4	샘플5	샘플6	
A 정제수	77.03	75.93	76.43	82.43	85.43	87.43	
글리세린	8.00	8.00	8.00	5.00	4.00	3.00	
BG	10.00	10.00	10.00	7.00	5.00	4.00	
멀티라멜라 리포솜 아세로라 추출물	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
Amigel	0.00	2.00	1.50	1.50	1.50	1.50	
잔탄검	0.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
카보플	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
B 유로나프리	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
Fragrance	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	
C 유기농 알코올	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	
합계	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	

[0170] 상기 표 14에 나타난 성분을 이용하여 다음과 같은 공정과정을 거쳐 완제품 제조하였다. A상을 비커에 칭량하여 80도로 가온하여 20분간 스티어링(stirring)을 하며 녹였다. 20분간 녹이는 과정에 B상과 C상을 각각 다른 비커에 칭량을 해 놓는다(상온보관). A상을 넣고 3000RPM으로 호모를 쳐 주고, 온도가 50도로 내려가면 1차 후첨인 B상을 넣고 다시 호모를 쳐 주고, 온도가 40도로 내려가면 2차 후첨인 C상을 넣고 5분간 호모를 쳐 주었다.

[0171] 사용감 테스트 결과 샘플1 발림성에서 밀리는 느낌이 있어 점증제 종류를 아미젤(Amigel)로 대체하였다. 샘플2 제형의 점도가 높아 샘플3에서 아미젤(Amigel)의 함량을 1.5%로 줄였다. 샘플3 제형의 점도는 보완 되었으나, 끈적한 느낌을 없애고 발림성을 보완하기 위해 샘플4에서 글리세린과 BG의 함량을 줄였고, 샘플4 끈적한 느낌이 덜 보완되어 샘플5에서 글리세린과 BG의 함량을 더 줄였다. 샘플5 끈적한 느낌이 조금 남아있어 샘플6에서 글리세린과 BG의 함량을 더 줄여 샘플6을 제조하였다. 샘플6은 끈적한 느낌, 발림성, 점도 모두 보완하였다.

[0173] [실시예 7: 아세로라 추출물 리포솜을 함유하는 화장료 조성물의 제조]

[0174] 본 실시예에서는 본 발명의 화장료 조성물의 일 예로 최종 크림을 제조하였다. 상기 실시예 2의 아세로라 추출물을 함유하는 멀티라멜라 리포솜 제형의 최종 크림을 제조하였다. 하기 표 15는 실시예 7의 화장료 조성물에 대한 함량을 나타낸 것이다.

표 15

[0175]

원료명	함량(%)				
	샘플1	샘플2	샘플3	샘플4	샘플5
A (유상층) TCG-M	5.00	5.00	5.00	3.00	
Dermofeel senolv	3.00	3.00	3.00	2.00	
유기농 포도씨오일	1.00	1.00	1.00	1.00	
유기농 아르간오일	0.50	0.50	0.50	0.50	
유기농 호호바오일	0.50	0.50	0.50	0.50	
Dermofeel Toco 50	0.50	0.50	0.50	0.50	

B (수상층)	레시틴	1.25	2.00	1.50	1.50
	정제수	77.63	76.88	77.38	80.88
	멀티라멜라 리포솜 아세로라 추출물	2.00	2.00	2.00	2.00
	Diglycerin	3.00	3.00	3.00	3.00
	IPG-S	2.00	2.00	2.00	2.00
	GE-26	2.00	2.00	2.00	2.00
C (후첩)	에칠헥실글리세린	0.02	0.02	0.02	0.02
	1,2-hexanediol	1.00	1.00	1.00	1.00
	아로마 향료	0.10	0.10	0.10	0.10
합계		100.00	100.00	100.00	100.00
		샘플1	샘플2	샘플3	샘플4

[0177] 상기 표 15에 나타난 성분을 이용하여 다음과 같은 공정과정을 거쳐 완제품 제조하였다. A상과 B상을 각각 다른 비커에 칭량하여 80도로 가온하여 20분간 녹였다. 20분간 녹이는 과정에 C상을 다른 비커에 칭량을 해 놓는다 (상온보관). B상에 A상을 넣고 3000RPM으로 호모를 쳐 주고, 온도가 50도로 내려가면 후첩인 C상을 넣고 다시 호모를 쳐 주고, 충분한 안정화가 될 때까지(약 5분) 호모를 쳐 주었다.

[0179] 사용감 테스트 결과 샘플1은 유화는 되었으나 레시틴의 함량이 너무 낮아 제형이 묽고 안정성이 떨어져 샘플2에서 레시틴의 함량을 높였다. 샘플2의 안정성은 확실히 좋아졌으나, 고점도 제형을 가지게 되어 샘플3에서 레시틴의 함량을 샘플 1보다는 많게 샘플 2보다는 적은 함량으로 조절하였다. 샘플3 제형의 점도와 안정성에서 보완은 되었으나 바른 후 유분감이 남아 샘플4에서 TCG-M과 Dermofeel sensolv의 함량을 줄여 샘플4 점도, 안정성, 유분감 모든 면에서 보완되어 최종 레시피로 선정되었다.

[0181] [실험예 7: 본 발명 화장품 조성물의 피부 미백 효능 및 피부 주름 개선 효능 확인]

[0182] 본 실험예에서는 상기 실시예 3 내지 7의 화장품 조성물 중 일예로 실시예 7의 아세로라 추출물을 함유하는 멀티라멜라 리포솜 제형의 화장품 조성물인 크림의 피부 미백 효능 및 피부 주름 개선 효능을 확인하고자 하였다.

[0184] 1) 시험대상자 기본 정보

표 16

시험대상자 정보

등록 시험대상자	22명
최종 완료 시험대상자	21명
성별	여성
평균나이	46.0
표준편차	5.4

[0187] 2) 피부 주름 평가 결과

[0188] 제품을 2주 및 4주 사용 후 측정된 결과는 하기 표 17 및 도 14와 같다. 거칠기(roughness) 값이 낮아질수록 피부 주름이 개선되는 것을 의미한다.

표 17

[0189]

피부주름 측정결과

Roughness		사용 전	2주 후	4주 후
MLAC35	Mean	11.787	10.727	10.139
	S.D.	1.868	1.847	1.814
개선율(%)			8.99	13.98
유의확률(p-value) 군내비교			0.011 <sup>*</sup>	0.000 <sup>**</sup>

[0190]

개선율 = [ | 사용 전 - 사용 후 | / 사용 전 ] x 100

[0191]

군내비교 : Repeated measures ANOVA ( \* : P<0.05, \*\* : P<0.001)

[0193]

표 17 및 도 16의 결과와 같이, 실시예 7 제품 사용군은 사용전과 비교하여 사용 2주 후 및 4주 후에 각각 8.99 % 및 13.98 %의 개선율을 보였으며, 사용 2주 및 4주 후 모두 통계학적으로 유의하게 감소(P <0.05)하였다. 따라서, 아세로라 추출물 및 마누카오일이 포함되어 있는 멀티라멜라 리포솜을 함유하는 화장료 조성물은 피부 주름 개선에 효능이 있음을 확인할 수 있었다.

[0195]

**3) 피부 멜라닌 평가 결과**

[0196]

제품을 2주 및 4주 사용 후 측정된 결과는 하기 표 18 및 도 15와 같다. 멜라닌 평균농도(average concentration)가 낮아질수록 피부 멜라닌이 개선되는 것을 의미한다.

**표 18**

[0197]

피부멜라닌 측정결과

Average concentration		사용 전	2주 후	4주 후
MLAC35	Mean	0.582	0.576	0.575
	S.D.	0.052	0.052	0.051
개선율(%)			1.10	1.22
유의확률(p-value) 군내비교			0.001 <sup>*</sup>	0.002 <sup>*</sup>

[0198]

개선율 = [ | 사용 전 - 사용 후 | / 사용 전 ] x 100

[0199]

군내비교 : Repeated measures ANOVA ( \* : P<0.05)

[0201]

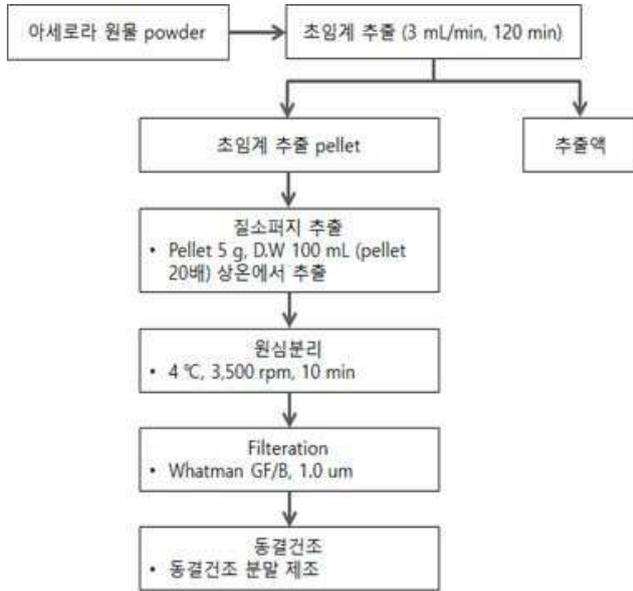
표 18 및 도 17의 결과와 같이, 실시예 7 제품 사용군은 사용전과 비교하여 사용 2주 후 및 4주 후에 멜라닌이 각각 1.10 % 및 1.22 %의 개선율을 보였으며, 사용 2주 및 4주 후 모두 통계학적으로 유의하게 감소(P <0.05)하였다. 따라서, 아세로라 추출물 및 마누카오일이 포함되어 있는 멀티라멜라 리포솜을 함유하는 화장료 조성물은 피부 멜라닌 개선을 통해 피부 미백에 효능이 있음을 확인할 수 있었다.

[0203]

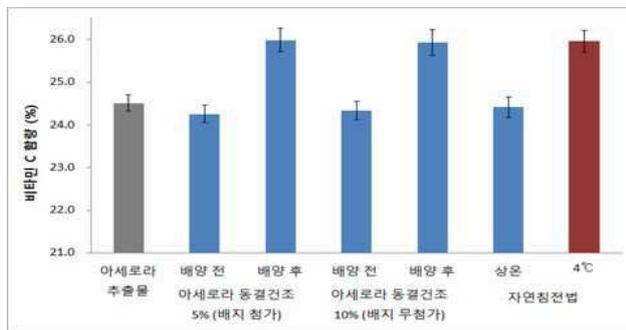
이상 종합하면, 본 발명의 아세로라 추출물 및 이를 포함하는 리포솜 제형 및 멀티 라멜라 제형은 피부 미백 및 피부 주름 개선에 효능이 있으며, 항균력 및 NO 생성 억제능을 통한 항균 및 항염 효과가 있는 것을 확인하였다. 특히, 본 발명의 아세로라 추출물의 멀티라멜라 리포솜 제형의 화장료 조성물은 뛰어난 안정성을 가지면서 피부 미백 효능 및 피부 주름 개선에 탁월한 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

도면

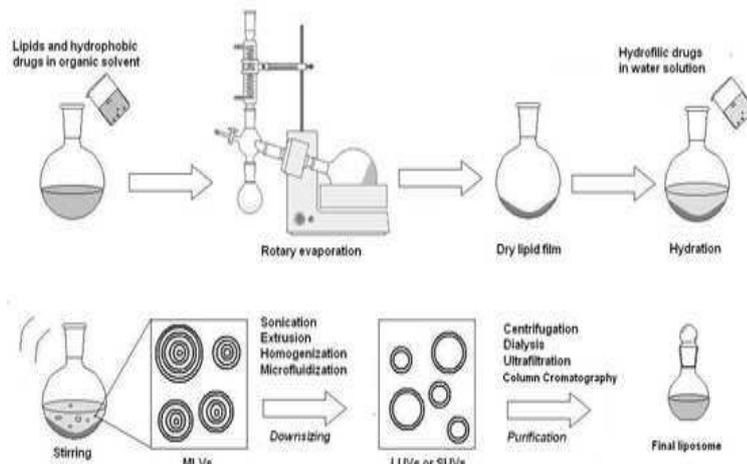
도면1



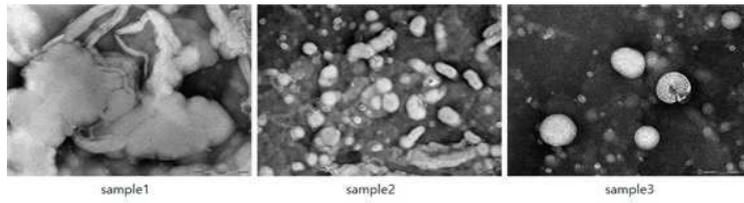
도면2



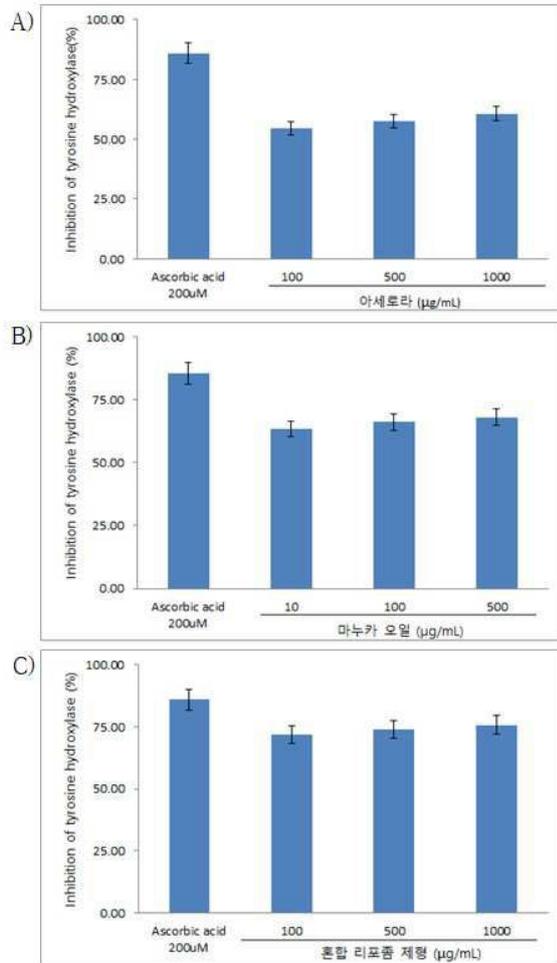
도면3



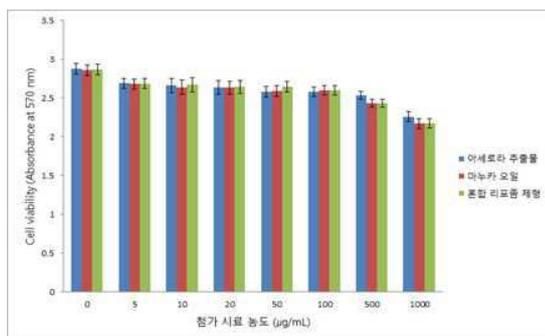
도면4



도면5

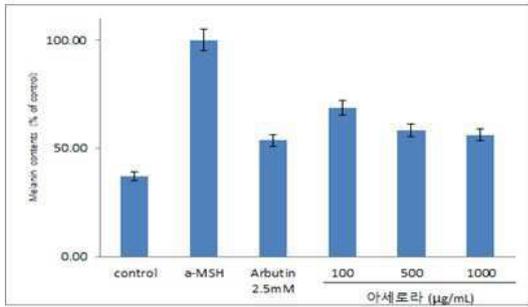


도면6

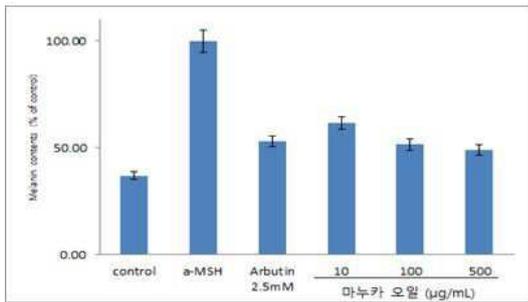


도면7

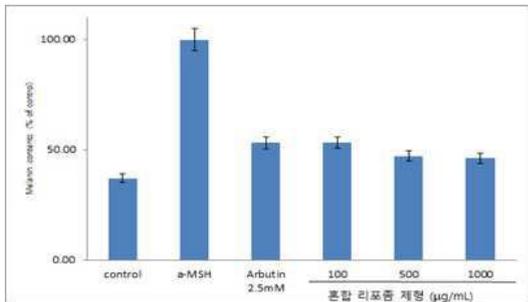
(A)



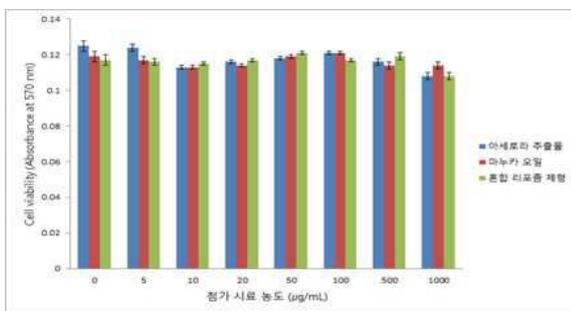
(B)



(C)

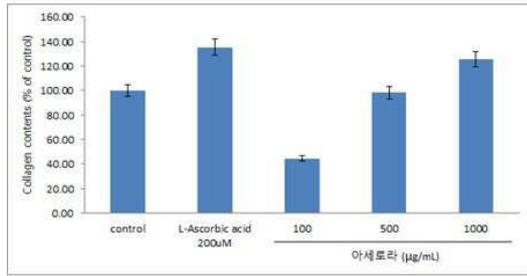


도면8

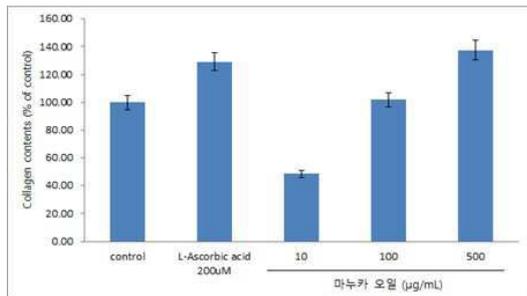


도면9

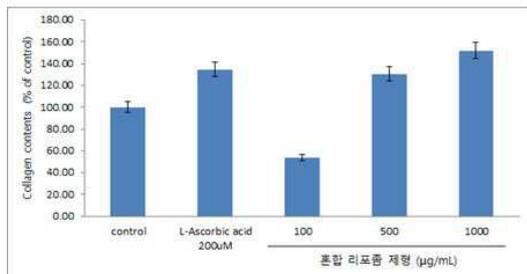
(A)



(B)

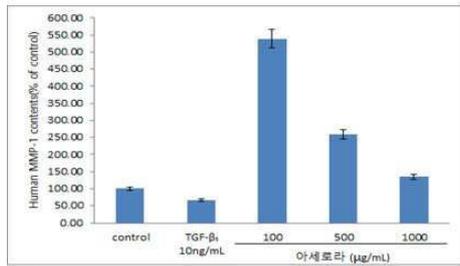


(C)

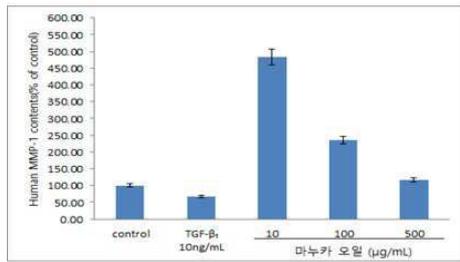


도면10

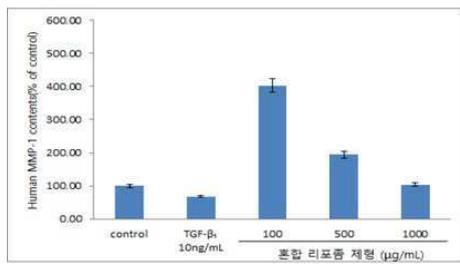
(A)



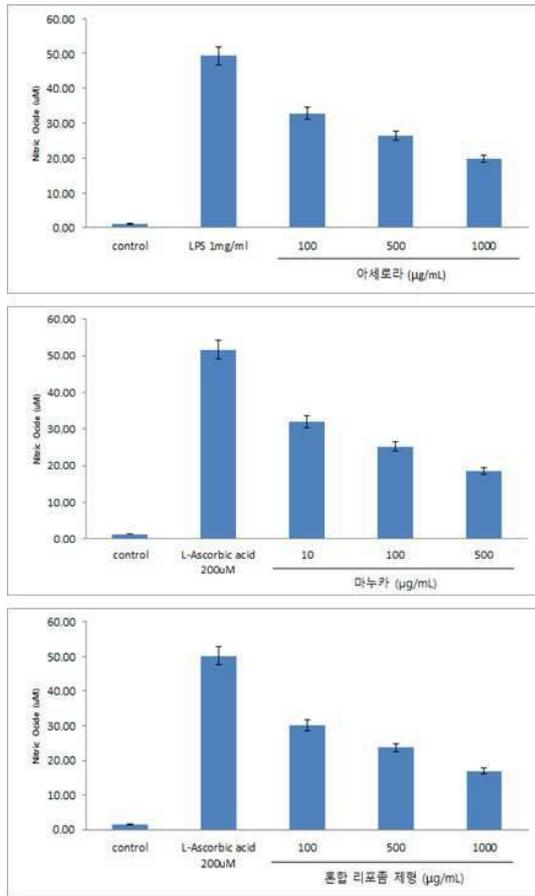
(B)



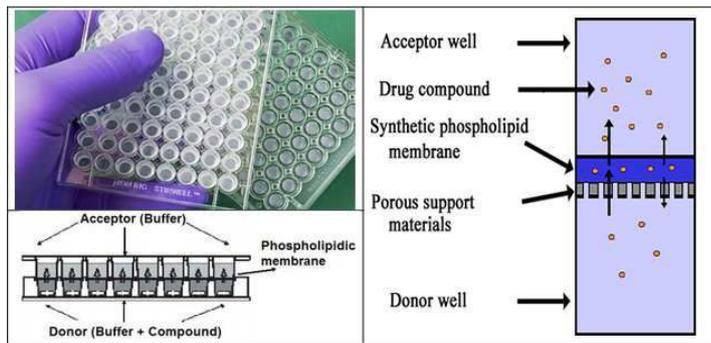
(C)



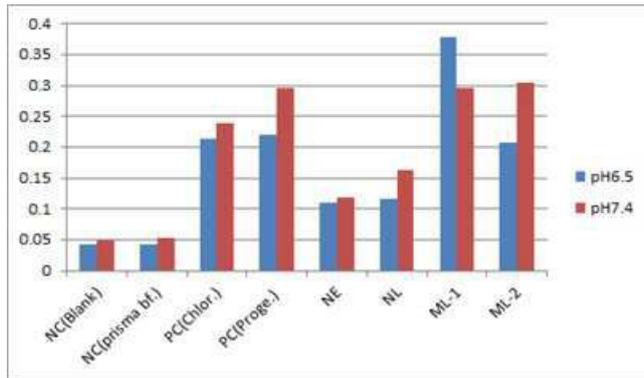
도면11



도면12

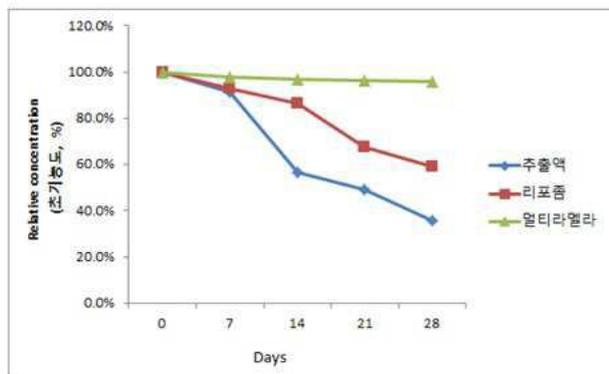


도면13

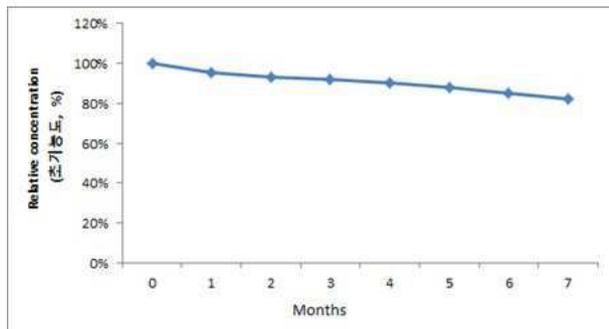


도면14

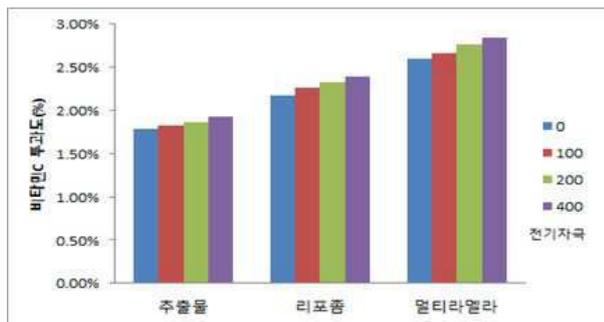
(A)



(B)



도면15



도면16



도면17

