

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 2월 18일 (18.02.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/024756 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/008213
- (22) 국제출원일: 2015년 8월 5일 (05.08.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0104014 2014년 8월 11일 (11.08.2014) KR
- (71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR). 동국대학교 경주캠퍼스 산학협력단 (DONGGUK UNIVERSITY GYEONGJU CAMPUS INDUSTRY-ACADEMY CO-OPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 38066 경상북도 경주시 동대로 123, Gyeongsangbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 장영표 (JANG, Young Pyo); 06063 서울시 강남구 삼성로 147길 22, 101동 202호, Seoul (KR). 정세영 (CHOUNG, Se Young); 02448 서울시 동대문구 천장산로 11길 17, 204동 1503호, Seoul (KR). 김동일 (KIM, Dongil); 10326 경기도 고양시 일산동구 동국로 27, 3층 한방여성의학과, Gyeonggi-do (KR).

- (74) 대리인: 안소영 (AHN, So Young); 06632 서울시 서초구 서초대로 344, 4층, 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, 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, ST, 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).

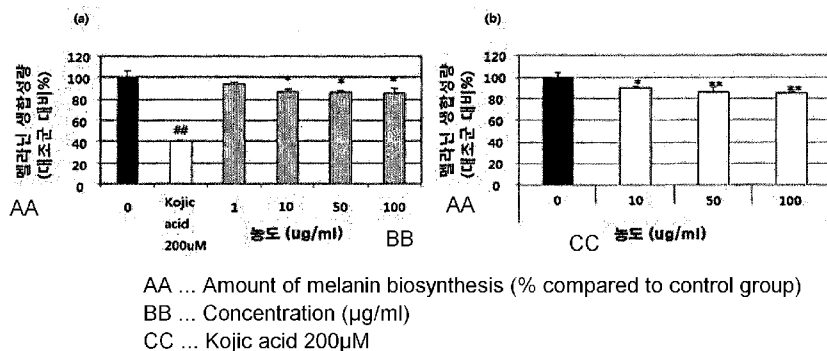
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: COSMETIC COMPOSITION FOR SKIN WHITENING

(54) 발명의 명칭: 피부 미백용 화장품 조성물

[Fig. 3]



(57) Abstract: The present invention relates to a mixture of Radix Rehmanniae, Lycium barbarum, Radix Scutellariae, and Radix Angelicae dahuricae extracts. The present invention comprises safe natural agents, thus does not cause side effects when applied to the skin, and has an excellent skin whitening effect by inhibiting tyrosinase and biosynthesis of melanin, among others, thereby being appropriate as a cosmetic composition for skin whitening.

(57) 요약서: 본 발명은 피부 미백용 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물에 관한 것이다. 본 발명은 안전한 천연 제제를 이용한 것으로 피부 적용시 부작용이 없으며, 티로시나제 활성 저해, 멜라닌 생합성 저해 등을 통해 피부 미백에 탁월한 효과를 가져, 피부 미백용 화장품 조성물로 적합하다.

WO 2016/024756 A1

명세서

발명의 명칭: 피부 미백용 화장품 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 한약재 혼합 추출물을 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 사람의 피부색을 결정하는 데는 여러 가지 요인들이 관여하는데, 그 중에서도 멜라닌 색소를 만드는 멜라노사이트(melanocyte)의 활동성, 혈관의 분포, 피부의 두께 및 카로티노이드와 빌리루빈 등의 인체 내외의 색소 함유 유무 등의 요인들이 중요하다.
- [3] 멜라닌 색소의 형성에는 유전적 요인, 호르몬 분비, 스트레스 등과 관련된 생리적 요인 및 자외선 조사 등과 같은 환경적 요인 등이 영향을 미친다.
- [4] 신체 피부의 멜라닌 세포에서 생성되는 멜라닌 색소는 검은 색소와 단백질의 복합체 형태를 갖는 페놀계 고분자 물질로서, 태양으로부터 조사되는 자외선을 차단하여 진피 이하의 피부기관을 보호해주는 동시에 피부 생체 내에 생겨난 자유 라디칼 등을 잡아주는 등 피부 내 단백질과 유전자들을 보호해주는 유용한 역할을 담당한다.
- [5] 이와 같이 피부 내, 외부의 스트레스적 자극에 의해 생겨난 멜라닌은 스트레스가 사라져도 피부 각질화를 통해서 외부로 배출되기 전까지는 없어지지 않는 안정한 물질이다. 그러나 멜라닌이 필요 이상으로 많이 생기게 되면 기미, 주근깨 및 점 등과 같은 과색소 침착증을 유발하여 미용상으로 좋지 않은 결과를 가져오게 된다.
- [6] 이와 같은 요구에 부응하여 종전부터 아스코르빈산, 코지산, 알부틴, 하이드로퀴논, 글루타치온 또는 이들의 유도체, 또는 타이로시나제 저해활성을 가진 물질들을 화장품이나 의약품에 배합하여 사용하여 왔으나, 이들의 불충분한 미백효과, 피부에 대한 안전성 문제, 화장품에 배합 시 나타나는 제형 및 안정성의 문제 등으로 인해 그 사용이 제한되고 있다. 이에 따라, 기존의 피부 미백용 조성물보다 생체에 안전하고 효과가 높은 새로운 피부 미백용 조성물의 개발이 절실히 요망되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 미백 효과를 가지는 화장품 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물을 유효한 양으로 적용시키는 것을 포함하는 피부 미백 방법을 제공하는 데에 있다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 미백을 위한 화장품의 제조에 있어서 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물의 용도를 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

- [10] 본 발명자들은 피부 미백 효과를 갖는 화장료 조성물을 개발하고자 예의 연구한 결과, 생지황, 구기자, 황금 및 백지가 우수한 피부 미백 효과를 가짐을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.
- [11] 본 발명은 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물을 제공한다.
- [12] 본 발명의 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물은 상기 4 종의 약재의 혼합에 의한 시너지 효과에 따라, 각각의 약재를 사용하였을 때보다 낮은 세포 독성을 가지며 우수한 피부 미백 효과를 가진다.
- [13] 본 발명에 있어서, 생지황(*Rehmanniae Radix Recens*)은 현삼과에 속하는 다년생 초본인 지황(*Rehmannia glutinosa* (Gaertner) Liboschitz ex Steudel)의 신선한 뿌리이며, 한국, 중국, 일본에 자생한다.
- [14] 본 발명에 있어서, 구기자(*Lycium Fruit*)는 가지과에 속하는 덩굴성 낙엽관목인 구기자나무(*Lycium chinense* Miller) 또는 영하구기(*Lycium barbarum* Linne)의 열매이다. 성숙한 과실을 채취하여 서늘한 곳에서 말려 외피가 유연해지고 찌그러들면 음건하여 사용한다. 한국, 중국, 일본 등지에서 자생한다.
- [15] 본 발명에 있어서, 황금(*Scutellaria Root*)은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본인 속적은풀(*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 뿌리이다. 한국, 중국, 몽골 및 시베리아 동부 등지에 분포한다.
- [16] 본 발명에 있어서, 백지(*Angelica Dahurica Root*)는 산형과에 속하는 일년 또는 이년성의 초본인 구릿대(*Angelica dahurica* Benthām et Hooker f.) 또는 항백지(*Angelica dahurica* Benthām et Hooker f. var. *formosana* Shan et Yuan)의 뿌리이다. 한국, 중국, 일본 등지에 분포한다.
- [17] 상기 약재들은 국내외에서 저비용으로 원료 확보가 용이하며 구입하거나 직접 채취한 것을 사용할 수 있다.
- [18] 본 발명에서 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물은 이들 추출물을 먼저 혼합한 후 추출한 추출물이거나, 이들 각각을 추출한 후 이를 혼합한 혼합 추출물일 수 있으며, 바람직하게 본 발명의 혼합 추출물은 생지황, 구기자, 황금 및 백지를 혼합한 후 추출한 추출물을 사용한다. 본 발명에서 상기 혼합 추출물은 농축된 액상일 수도 있고, 동결 건조된 분말 형태일 수도 있다.
- [19] 본 발명의 혼합 추출물은 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물 총중량에 대하여 생지황 40 중량% 내지 50 중량%, 구기자 15 중량% 내지 25 중량%, 황금 15 중량% 내지 25 중량% 및 백지 10 중량% 내지 20 중량%를 포함할 수 있으며, 바람직하게 생지황 40 중량% 내지 50 중량%, 구기자 17 중량% 내지 25 중량%, 황금 17 중량% 내지 25 중량% 및 백지 15 중량% 내지 20 중량%의 중량%를 포함할 수 있다.
- [20] 본 발명의 혼합 추출물은 상기 4종의 약재에 대하여 상기 기재된 중량 %를 포함함으로써 개별 추출물 내지 2이상의 조합추출물과 대비하여 피부 미백에

현저히 우수한 효과를 나타내며, 특히 티로시나제 활성 억제 및 멜라닌 생합성 저해에 기인한 피부 미백에 우수한 활성을 나타낸다.

- [21] 본 발명에 있어서, 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물의 제조는 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 추출 방법 등을 사용하여 제조할 수 있으며, 추출 회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하다. 추출 용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이의 혼합물, 바람직하게는 물, 에탄올 수용액을 사용하는 것이 좋으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출 용매의 양은 생지황, 구기자, 황금 및 백지의 총중량의 2 내지 15 배로 한다. 열수(물) 추출물의 경우 100~110°C에서 2~24시간 동안 바람직하게는 2~10시간 동안 수욕 환류 추출하는 것을 1 내지 4회 반복할 수 있다.
- [22] 본 발명에서 상기 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물을 추가로 분리하여 얻어진 생지황, 구기자, 황금 및 백지 추출물의 분획물을 제공한다. 분획분리는 당해 분야에 알려진 분리법에 의해 수행된다. 바람직하게는 생지황, 구기자, 황금 및 백지를 물에 현탁한 후, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 등의 용매를 이용하여 추출하여 생지황, 구기자, 황금 및 백지 가용 추출물을 수득할 수 있다.
- [23] 본 발명은 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물을 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공한다.
- [24] 본 발명의 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물은 안전한 천연 제제를 이용한 것으로 피부 적용시 부작용이 없으며, 티로시나제 활성 저해, 멜라닌 생합성 저해 등을 통해 피부 미백에 탁월한 효과를 가져, 피부 미백용 화장품 조성물로 적합하다.
- [25] 특히, 본 발명의 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물을 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물은 이들 각각의 단독 추출물 내지 2 이상의 조합 추출물과 대비하였을 때, 생지황, 구기자, 황금 및 백지의 구성 약제 간 조합에 따른 시너지 효과 때문에 더욱 우수한 피부 미백 효과를 가진다.
- [26] 본 발명에서 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물은 화장품 조성물의 총 중량에 대하여 분말형태 또는 액상 형태로 0.001% ~ 10중량%의 양으로 화장품에 첨가될 수 있으며, 바람직하게는 화장품 조성물 총 중량에 대하여 분말형태 또는 액상형태로 0.01~5중량%의 양으로 화장품에 첨가될 수 있다.
- [27] 본 발명에서 화장품 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서의 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 색소 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [28] 본 발명의 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나,

이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 맛사지 크림, 에센스, 팩, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

- [29] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [30] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [31] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 폴리옥시에틸렌 경화피마자유, 글리세롤, 글리세린, 지방족 에스테르, 페녹시에탄올, 트리에탄올아민, 폴리에틸렌 글리콜, 밀납, 폴리솔베이트 60, 솔비탄세스퀴오레이드, 파라핀, 소르비탄 스테아레이트, 친유형 모노스테아린산 글리세린, 스테아린산, 글리세릴스테아레이트/피이지-400 스테아레이트, 카르복시폴리머, 시토스테롤, 폴리글리세릴 2-올레이트, 세라마이드, 콜레스테롤, 스테아레스-4, 디세틸포스페이트, 마카다미아 오일, 카르복시비닐폴리머, 산탄검 또는 소르비탄의 지방산 에스테르 등이 있다.
- [32] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올, 부틸렌글리콜 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 소디움히아루로네이트, 페녹시에탄올, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [33] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [34] 본 발명은 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물을 유효한 양으로 적용시키는 것을 포함하는 피부 미백 방법을 제공한다.
- [35] 본 발명에서 사용되는 “유효한 양”이라는 용어는 피부의 미백에 효과를

나타내는 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물의 양을 나타낸다.

- [36] 본 발명의 피부 미백 방법은 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물을 포함하는 조성물을 피부에 접촉시키는 단계를 포함한다. 상기 피부는 얼굴의 피부, 목의 피부, 손과 팔의 피부, 및 발과 다리의 피부를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 피부 미백에 있어서, 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물의 용량은 대상체의 연령, 색소의 침착 정도, 또는 적용 부위에 따라 다양할 것이다. 적합한 용량은 이러한 인자를 당연히 고려하는 이 분야 통상의 기술자에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 또한, 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물은 피부 미백에 도움이 되는 추가적인 활성 제제의 유효한 양과 함께 적용될 수 있다.

- [37] 본 발명의 피부 미백 방법은 피부 미백이 필요한 부분을 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 확인은 사용자 또는 제3자, 예를 들어, 피부과 전문의, 미용 전문가, 또는 다른 개인에 의해 수행될 수 있다.

- [38] 본 발명은 피부 미백을 위한 화장료의 제조에 있어서, 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물의 용도를 제공한다. 화장료 제조를 위한 상기 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물은 허용되는 보조제, 희석제 등과 혼합될 수 있으며, 다른 활성 제제와 혼합되어, 상승 작용을 가질 수 있다. 상기 다른 활성 제제는 예를 들어, 자외선 차단제, 보습제, 각질 제거제, 연화제, 주름 개선제 등일 수 있다.

발명의 효과

- [39] 본 발명의 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물은 안전한 천연 제제를 이용한 것으로 피부 적용시 부작용이 없으며, 티로시나제 활성 저해, 멜라닌 생합성 저해 등을 통해 피부 미백에 탁월한 효과를 가져, 피부 미백용 화장료 조성물로 탁월한 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

- [40] 도 1은 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물 처리에 따른 세포 생존율 변화를 확인한 도이다.
- [41] 도 2는 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물 처리에 따른 티로시나제 활성 저해를 확인한 도이다.
- [42] 도 3은 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물 처리에 따른 멜라닌 생성 저해를 확인한 도이다.
- [43] 도 4는 생지황, 황금, 백지 또는 구기자 개별 약제 추출물 처리에 따른 멜라닌 생성 변화를 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [44] 이하, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

[45] 실시예 1. 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물의 제조

[46] 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물을 제조하기 위하여, 생지황(원산지: 경북산), 구기자(원산지: 충남산), 황금(원산지: 전남산) 및 백지(원산지: 경북산)를 (주)옵니허브에서 구입하여 물로 세척하고 음건한 후에 사용하였다.

[47] 상기 생지황 100 g, 구기자 50 g, 황금 50 g 및 백지 35 g을 증류수 1L에 넣고, 환류관을 장착한 후 100 °C에서 4 시간 동안 환류 추출한 후, 감압 농축하여 62.26g의 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물을 제조하였다.

[48] 대조군으로 생지황, 황금, 백지 또는 구기자 개별 추출물을 각 개별 약제 100 g을 증류수 1 L에 넣고 환류관을 장착한 후 100°C에서 4시간 동안 환류 추출하고, 감압 농축 하여 생지황 41 g, 구기자 34 g, 황금 35 g 및 백지 31 g을 제조하였다.

[49] 실시예 2. 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물의 세포 독성 여부 확인

[50] MTT assay를 이용하여 생지황, 황금, 백지 및 구기자 혼합 추출물의 세포 독성 여부를 확인하였다.

[51] 마우스 유래 B16F10 melanoma 세포를 24 well plate에 10^4 cells/well의 수가 되도록 1 ml의 세포 현탁액을 분주하고, 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 및 100 mg/mL streptomycin이 포함된 DMEM media를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 24 시간 배양하였다. 배양된 세포에 농도별(0~400 µg/mL)로 생지황, 황금, 백지 및 구기자 혼합 추출물을 처리하였다. 48시간을 더 배양한 후 pH 7.4의 PBS로 2회 세척 후 배양액에 10배 희석한 MTT 시약 (0.5 mg/mL)을 1 mL 처리한 다음 4 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 반응시켰다. MTT 반응 4 시간 후 배양액을 제거한 후 DMSO 용액 1 mL을 넣어 세포를 녹인 후, 이 때 나타나는 포르마잔염의 농도를 분광광도계를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[52] 세포 생존율은 하기 [식 1]에 의해 산출되었으며, 그 결과는 하기 도 1에 나타내었다.

[53] [식 1]

[54]

$$\text{세포 생존율 (\%)} = \frac{\text{시료 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}} \times 100$$

[55] 상기 실험 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 생지황, 황금, 백지 및 구기자 혼합 추출물은 약 100 µg/ml를 처리하였을 때까지 세포 생존에 미치는 영향이 미비하였으나, 세포에 처리한 농도가 200 µg/mL 이상이 되었을 때부터 대조군과 대비하여 세포독성이 유의적으로 나타난 것을 확인하였다.

[56] 실시예 3. 생지황, 황금, 백지 및 구기자 혼합 추출물의 티로시나제 저해 활성 확인

[57] 마우스 유래 B16F10 melanoma 세포에서 추출한 티로시나제를 이용하여 생지황, 황금, 백지 및 구기자 혼합 추출물의 티로시나제 활성 저해를 확인하였다.

- [58] 100 mm 세포 배양접시에 melanoma 세포가 95% confluency 될 때까지 배양하였다. 배양된 세포를 PBS (pH 7.4)로 2회 세척 후 0.1% triton 100이 포함된 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8)를 이용하여 효소를 추출하였다. 효소액의 단백질 농도를 20 μ g으로 정량한 후 농도별 (0~1 mg/mL)로 생지황, 황금, 백지 및 구기자 혼합 추출물을 처리하고, 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응액에 0.15% dopa (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine)용액을 분주한 후, 37°C에서 20분간 반응시킨 다음 분광광도계를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [59] 반응색이 갈색이기 때문에 0.15% dopa 용액 대신 증류수를 넣어 반응시킨 시료군 (a)을 준비하였으며, 0.15% dopa 용액과 농도별 생지황, 황금, 백지 및 구기자 처방을 함께 반응시킨 (b)군에서 (a)를 제외한 후 값을 산출하였다.
- [60] 티로시나제 활성 저해는 하기 [식 2]에 의해 산출되었으며, 그 결과는 하기 도 2에 나타내었다.
- [61] [식 2] 티로시나제 활성 저해 (%) =
$$\frac{\text{자운방추경험방}(b-a)\text{흡광도}}{\text{대조군}(b-a)\text{흡광도}} \times 100$$
- [62] 상기 실험 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 생지황, 황금, 백지 및 구기자 처방에 의해 0.1 mg/mL에서부터 대조군 대비 농도 의존적으로 감소하였으며, 0.1 및 1 mg/mL에서 각각 12.1 및 33.1%로 티로시나제 활성이 감소한 것을 확인하였다.
- [63] 실시예 4. 생지황, 황금, 백지 및 구기자 혼합 추출물의 멜라닌 생성 저해 확인
- [64] 마우스 유래 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 생합성 정도를 측정하였다.
- [65] B16F10 melanoma 세포를 100 mm 배양 접시에서 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin 및 100 mg/mL streptomycin이 포함된 DMEM media를 이용하여 5% CO₂를 포함하는 37°C 배양기 내에서 세포가 90% confluency 될 때까지 배양하였다.
- [66] 멜라닌 생성 저해능을 측정하기 위하여, B16F10 melanoma 세포를 24 well plate에 2×10⁴세포/웰로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 농도별 (0~100 μ g/mL) 생지황, 황금, 백지 및 구기자 혼합 추출물, 개별 약제 각각의 추출물, 2 이상의 조합 추출물, 및 양성대조군으로 사용한 코직산(kojic acid) 200 μ M 을 세포에 처리한 후 48 시간 배양하였다. 배양액을 제거한 후 PBS를 이용하여 2회 세척한 다음 1 N NaOH를 세포가 부착되어 있는 웰에 분주한 후 30분 동안 더 배양하였다. 배양한 녹은 세포를 튜브에 수거한 다음 100°C 30분 동안 boiling을 실시하였다. 녹인 액을 분광광도계를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 멜라닌 농도를 멜라닌 표준 곡선을 이용하여 산출하였으며, 녹인 액의 단백질 농도를 정량하여 멜라닌 농도를 보정하였다. 단백질 농도의 측정은 로우리법(Lowry method)를 기본으로 한 BCA protein assay kit(Thermo Scientific, 23225)를 사용하여 측정하였다.

[67] 그 결과를 도 3 및 4에 나타내었다.

[68] 도 3의 (a)는 실시예 1에서 제조된 생지황, 황금, 백지 및 구기자 혼합 추출물을 처리한 결과이며, 도 3의 (b)는 생지황, 황금, 백지 또는 구기자 개별 추출물을 실시예 1과 동일 농도로 조합하여 처리한 결과이다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 생지황, 황금, 백지 및 구기자 혼합 추출물 처리에 따라 농도 의존적으로 유의성 있게 멜라닌 생성량이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 생지황, 황금, 백지 또는 구기자 추출물의 개별 약제 조합의 멜라닌 생합성 저해능도 비슷한 것을 확인하였다.

[69] 한편, 도 4는 생지황, 황금, 백지 또는 구기자의 개별 추출물 처리에 따른 멜라닌 생합성 변화를 나타낸다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 생지황, 황금, 백지 또는 구기자의 개별 추출물은 멜라닌 생합성에 효과가 없음을 확인하였다.

[70] 즉, 생지황, 황금, 백지 또는 구기자의 개별 추출물은 멜라닌 합성 저해에 거의 영향을 미치지 못하나, 이들을 조합한 생지황, 황금, 백지 및 구기자 혼합 추출물은 각 약제간의 혼합에 따른 시너지 효과에 의해 멜라닌 생성 억제에 현저한 효과를 가졌다.

[71] 또한, 각각 개별 약제 추출물들이 가지는 세포 독성 등을 고려할 때, 상기 중량부로 조합된 생지황, 황금, 백지 및 구기자 혼합 추출물이 다른 어떠한 조합보다 현저한 미백 효과를 가지는 것을 확인하였다.

[72] **제형예 1. 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물을 함유한 화장수 제조**

[73] 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물(실시예 1)을 함유한 화장수(스킨로션)를 하기의 [표 1]의 함량으로 1kg을 제조하였다.

[74] [표 1] 생지황, 구기자, 황금 및 백지를 함유한 화장수 조성

[75]

번호	원료	함량(중량%)
1	생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물 (실시예 1)	1.0
2	글리세린	3.0
3	부틸렌글리콜	2.0
4	프로필렌글리콜	2.0
5	폴리옥시에칠렌 경화피마자유	1.0
6	에탄올	10.0
7	트리에탄올아민	0.1
8	페녹시에탄올	미량
9	색소	미량
10	향료	미량
11	정제수	잔량

[76] **제형예 2. 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물을 함유한 영양로션 제조**

[77] 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물(실시예 1)을 함유한 영양로션을 하기의 [표 2]의 함량으로 1kg을 제조하였다.

[78] [표 2] 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물을 함유한 영양로션 조성

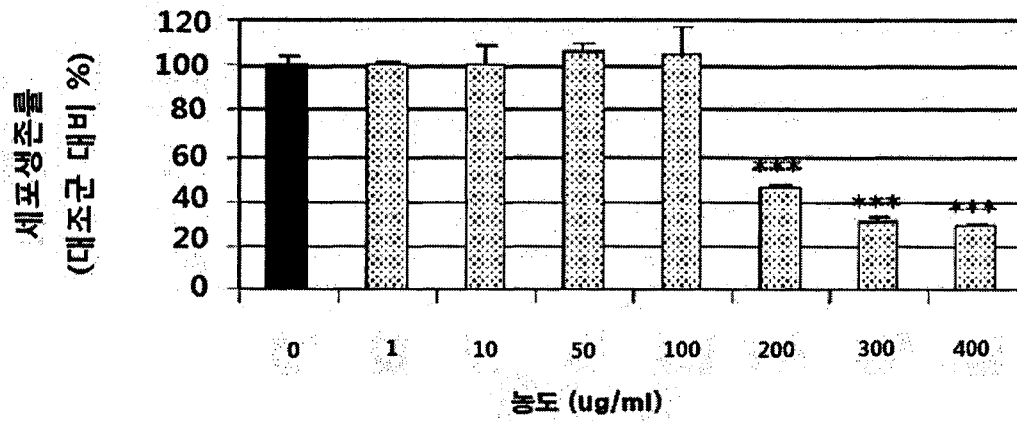
[79]

번호	원료	함량(중량%)
1	생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물 (실시예 1)	1.0
2	밀납	1.0
3	폴리솔베이트 60	1.5
4	솔비탄 세스퀴올레이트	0.5
5	유동 파라핀	10.0
6	소르비탄 스테아레이트	1.0
7	친유형 모노스테아린산 글리세린	0.5
8	스테아린산	1.5
9	글리세릴스테아레이트/피이지-400 스테아레이트	1.0
10	프로필렌글리콜	3.0
11	카르복시폴리머	0.1
12	트리에탄올아민	0.2
13	페녹시에탄올	미량
14	색소	미량
15	향료	미량
16	정제수	잔량

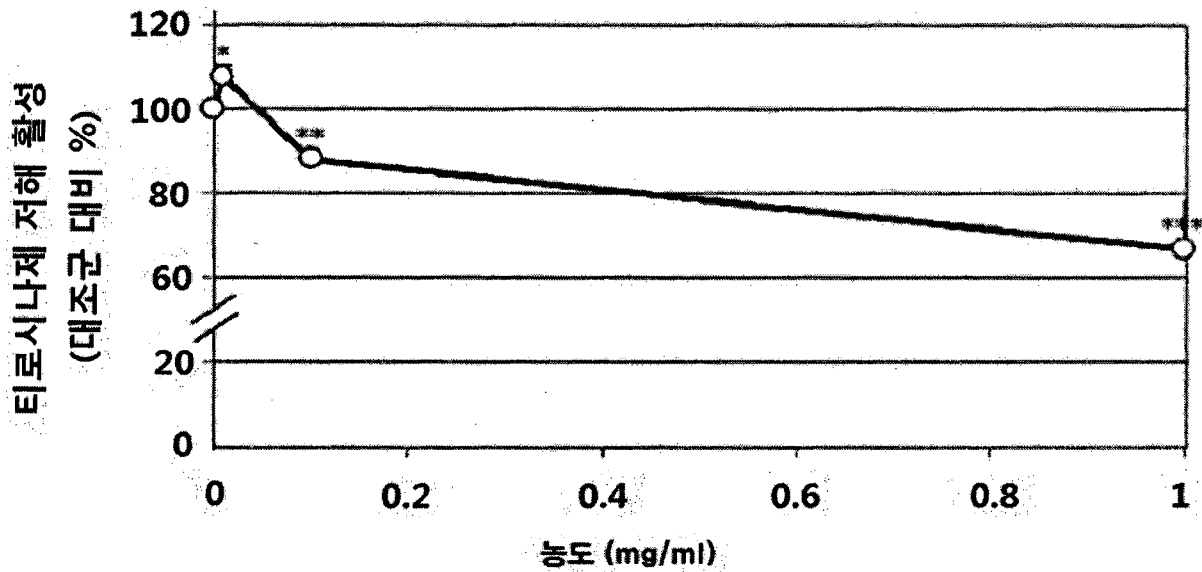
청구범위

- [청구항 1] 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물을 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물은 생지황 40 중량% 내지 50 중량%, 구기자 15 중량% 내지 25 중량%, 황금 15 중량% 내지 25 중량% 및 백지 10 중량% 내지 20 중량%으로 이루어진 피부 미백용 화장료 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합물 중에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출된 것인 피부 미백용 화장료 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 피부 미백은 티로시나제 활성 저해, 멜라닌 생합성 저해 또는 이들 모두에 의한 것인 피부 미백용 화장료 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 화장료는 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 맛사지 크림, 에센스, 팩, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더 중에서 선택된 어느 하나의 제형을 가지는 화장료 조성물.
- [청구항 6] 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물을 유효한 양으로 적용시키는 것을 포함하는 피부 미백 방법.
- [청구항 7] 피부 미백을 위한 화장료의 제조에 있어서 생지황, 구기자, 황금 및 백지 혼합 추출물의 용도.

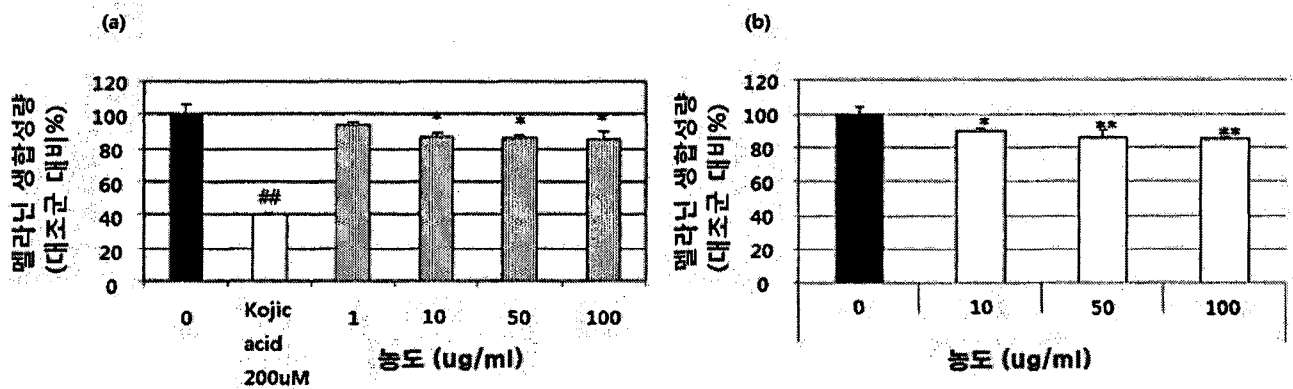
[Fig. 1]



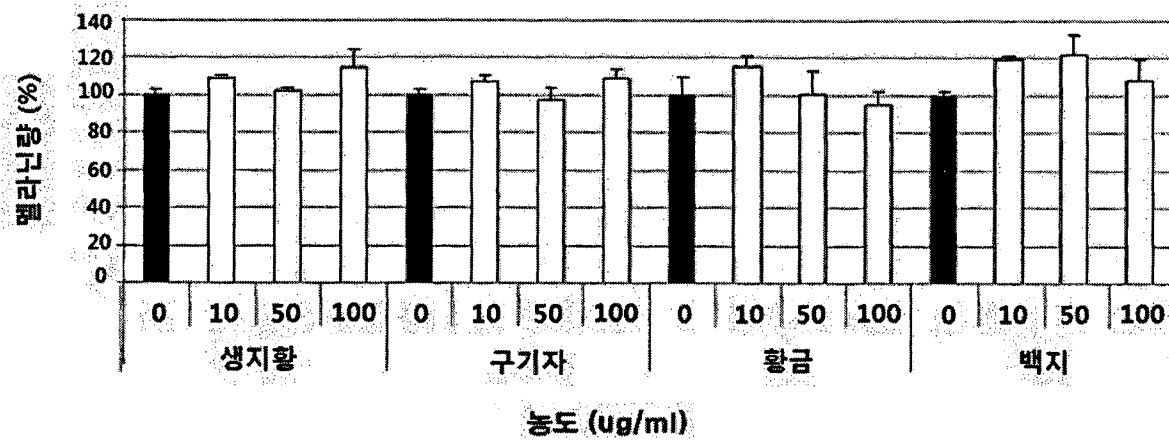
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/008213**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 8/97(2006.01)i, A61Q 19/02(2006.01)i, A61Q 19/00(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 8/97; A61K 36/28; A61K 36/804; A61Q 19/02; A45D 44/22; A61K 36/488; A61P 17/18; A61Q 19/00

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) & Keywords: Rehmanniae Radix Recens, Lycium Fruit, Scutellaria Root, Angelica Dahurica Root, lightning

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 20-2012-0005409 U (CELLAB CO., LTD.) 26 July 2012 See abstract and the claims	1-5,7
Y	KR 10-2009-0072850 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION DAEGU HAANY UNIVERSITY) 02 July 2009 See abstract and the claims	1-5,7
Y	KR 10-2006-0082205 A (KIM, Sung - Ho) 18 July 2006 See abstract and the claims	1-5,7
Y	KR 10-2003-0077872 A (COREANA COSMETICS CO., LTD.) 04 October 2003 See abstract and the claims	1-5,7
Y	KR 10-2002-0025346 A (ANBUL COSMETICS CO., LTD.) 04 April 2002 See abstract and the claims	1-5,7
A	KR 10-2013-0047778 A (AMOREPACIFIC CORPORATION) 09 May 2013 See abstract and the claims	1-5,7



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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 NOVEMBER 2015 (23.11.2015)

Date of mailing of the international search report

23 NOVEMBER 2015 (23.11.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/008213

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention as in claim 6 comprises a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/008213

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 20-2012-0005409 U	26/07/2012	NONE	
KR 10-2009-0072850 A	02/07/2009	NONE	
KR 10-2006-0082205 A	18/07/2006	NONE	
KR 10-2003-0077872 A	04/10/2003	NONE	
KR 10-2002-0025346 A	04/04/2002	NONE	
KR 10-2013-0047778 A	09/05/2013	CN 103906526 A	02/07/2014
		JP 2014-530905A	20/11/2014
		WO 2013-062266 A2	02/05/2013
		WO 2013-062266 A3	20/06/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 8/97(2006.01)i, A61Q 19/02(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 8/97; A61K 36/28; A61K 36/804; A61Q 19/02; A45D 44/22; A61K 36/488; A61P 17/18; A61Q 19/00

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: 생지황, 구기자, 황금, 백지, 미백

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 20-2012-0005409 U (주식회사 셀랩) 2012.07.26 요약 및 청구항 참조	1-5,7
Y	KR 10-2009-0072850 A (대구한의대학교산학협력단) 2009.07.02 요약 및 청구항 참조	1-5,7
Y	KR 10-2006-0082205 A (김성호) 2006.07.18 요약 및 청구항 참조	1-5,7
Y	KR 10-2003-0077872 A (주식회사 코리아나화장품) 2003.10.04 요약 및 청구항 참조	1-5,7
Y	KR 10-2002-0025346 A (한불화장품주식회사) 2002.04.04 요약 및 청구항 참조	1-5,7
A	KR 10-2013-0047778 A ((주)아모레퍼시픽) 2013.05.09 요약 및 청구항 참조	1-5,7

☐ 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

2015년 11월 23일 (23.11.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 11월 23일 (23.11.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

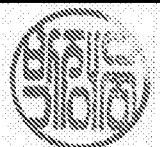
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

박정웅

전화번호 +82-42-481-3355



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 6
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 6 발명은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 내용을 포함하고 있으므로,
PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약 규칙 39.1(IV)의 규정에 의하여 국제조사기관이
국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 20-2012-0005409 U	2012/07/26	없음	
KR 10-2009-0072850 A	2009/07/02	없음	
KR 10-2006-0082205 A	2006/07/18	없음	
KR 10-2003-0077872 A	2003/10/04	없음	
KR 10-2002-0025346 A	2002/04/04	없음	
KR 10-2013-0047778 A	2013/05/09	CN 103906526 A JP 2014-530905A WO 2013-062266 A2 WO 2013-062266 A3	2014/07/02 2014/11/20 2013/05/02 2013/06/20