

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 12월 16일 (16.12.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/143879 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 8/98 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/003690
- (22) 국제출원일: 2010년 6월 9일 (09.06.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0050969 2009년 6월 9일 (09.06.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여):
(주) 메디플랜 (MEDIPLAN CO., LTD.) [KR/KR]; 전
남 무안군 청계면 도림리 61 목포대학교 창업보육센
터내, 534-834 Jeollanam-do (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 정원철 (JEONG, Won
Chul) [KR/KR]; 전라남도 무안군 청계면 도림리
788-14, 534-834 Jeollanam-do (KR). 김지은 (KIM, Ji
Eun) [KR/KR]; 전라남도 목포시 상동 780-1, 530-823
Jeollanam-do (KR). 박은지 (PARK, Eun Ji) [KR/KR];
전라남도 나주시 송월동 송월부영아파트 201 동 915
호, 520-752 Jeollanam-do (KR). 강성국 (KANG, Seong
Gook) [KR/KR]; 광주광역시 북구 운암동 운암산 아
이파크 104 동 1501 호, 500-170 Gwangju (KR). 박난희

(PARK, Nan Hee) [KR/KR]; 전라남도 영암군 삼호읍
난전리 207 번지, 526-892 Jeollanam-do (KR).

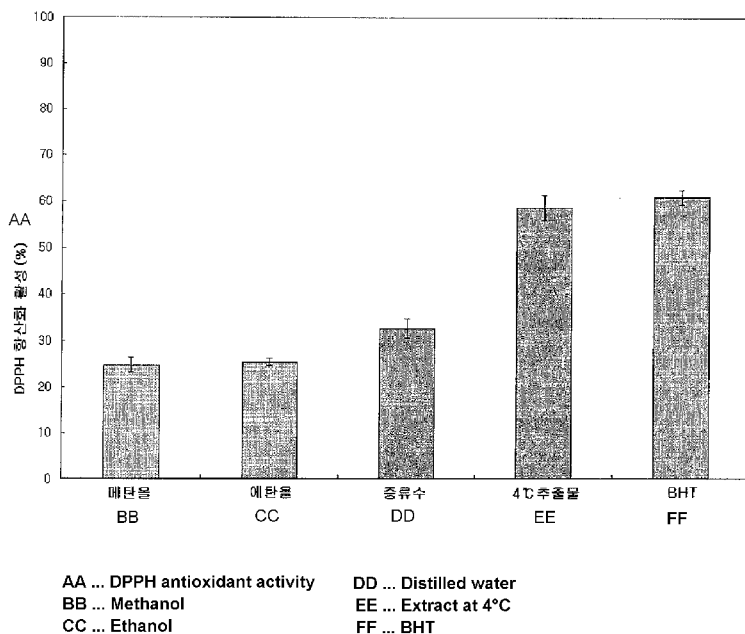
- (74) 대리인: 김문재 (KIM, Moon Jae) 등; 서울시 중구 서
소문동 41-3 대한항공빌딩 3 층, 100-813 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COSMETIC COMPOSITION FOR REMOVING WRINKLES, CONTAINING AN ABALONE EXTRACT AS AN ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 전복 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 주름 개선용 화장품 조성물

[Fig. 1]



부의 주름 개선용도로 우수하다.

(57) Abstract: The present invention relates to a cosmetic composition for removing wrinkles, containing an abalone extract as an active ingredient, and more particularly, to a cosmetic composition for removing wrinkles, containing methanol and ethanol of abalone viscera and an extract of abalone viscera extracted using hot water or water at a temperature of 4°C, as active ingredients. The cosmetic composition containing an abalone viscera extract of high protein is excellent in promoting antioxidant activity and collagen production, and exhibits excellent effects in inhibiting the collagenase or elastase breakdown enzymes (MMP-1), and can thus be useful for removing wrinkles.

(57) 요약서: 본 발명은 전복 추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부 주름 개선용 화장품 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 전복 내장의 메탄올, 에탄올, 열수 또는 4°C 추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부 주름 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다. 이에 의하여, 고 단백질의 전복 내장 추출물을 함유하는 화장품 조성물은 항산화 활성 및 콜라겐의 생성, 및 콜라겐, 엘라스타아제 분해효소(MMP-1)의 저해 효과가 우수하여 피



공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 전복 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 주름 개선용 화장품 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 전복 추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부 주름 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 전복은 분류학상 유용연체 동물류의 원시복족목(Archaeogastropoda) 전복과 전복속에 속하는 것으로, 우리나라 및 중국, 일본 등지에서 상당히 귀하게 여기는 기능성 수산물로서 시장가치가 매우 높은 것으로 알려져 있다. 전복은 조개류 중에서도 수분함량은 많고, 지방질 함량은 적으며, 비타민 B1, 비타민 B12, 칼슘, 인 등 인체에 중요한 성분이 풍부하다. 또한, 피부, 뼈 등의 유기물질의 대부분을 형성하고 있는 콜라겐 및 피부노화 억제, 합염증 및 진통효과 등의 효능을 갖는 기능성 소재인 콘드로이틴 황산(Chondroitin sulfate)이 함유되어 있다. 한의학상에 의하면, 전복은 피부의 부스럼을 치료하는 등 피부미용에도 효능이 있어 식용 뿐만 아니라 약용의 목적으로 이용되어 왔다.
- [3] 한편, 피부 주름은 유전적 배경과 함께 환경인자 특히, 일광 및 근육의 운동방향 등에 의해 발생되는 데, 피부의 탄력성, 유연성의 저하 및 구조적, 기능적 변화로 표피 뿐만 아니라 진피에도 발생된다. 이에, 만성적인 일광의 영향으로 생기는 광노화 피부의 진피에서는 섬유아세포가 증식하여 마스터 세포 및 염증성 세포 침윤이 현저하다. 정상적인 진피 세포외 기질(extracellular matrix: ECM)의 경우 일반적으로 규칙성의 시트상 구조를 갖는 콜라겐과 엘라스틴 섬유의 네트워크로 되어 있으며, 이 사이에 글리코아미노글리칸 등의 기질이 채워져 있다. 이때, 콜라겐 섬유는 성숙과 함께 가교형성으로 직선적인 큰 섬유가 되고, 적당한 탄력이 부여되며, 엘라스틴 섬유는 신축성이 풍부하여 피부에 적당한 유연성을 부여한다. 반면, 자연노화 및 광노화된 피부의 경우 섬유아세포의 활성 저하로, 진피 세포외 기질의 양적 감소 및 질적 변화가 발생되고, 콜라겐 섬유는 비정상적인 노화 가교가 형성으로 경직화되어 본래의 탄력성이 많이 소실되며, 엘라스틴 섬유는 특히, 광노화로 변성 붕괴되고, 아미노산 저성이 다른 엘라스틴이 생성되어 기능장애가 진행된다. 이와 같이, 자연노화 및 광노화된 피부는 유연성을 크게 상실하게 되고, 주름이 발생되는 것이다
- [4] 피부 노화의 원인 중 하나인 활성산소는 지질의 과산화, DNA 장애, 단백질 변성, 대사 이상 등의 광산화 장애와 함께 급성, 만성 염증, 세포외 매트릭스의 변성을 일으키고, 주름 및 탄력성 저하를 유발한다. 활성산소 및 프리라디칼은 직접적으로 매트릭스 성분을 공격하여 분해 또는 중합시켜 변성 및 단편화 등을 발생시키고, 메일라드 반응을 개시하여 콜라겐 섬유에 노화가료를 형성시키는

작용이 있다. 또한, 엘라스틴은 피부의 주름 및 탄력성 저하를 유발시키는데, 주름의 회복과 엘라스틴 섬유의 뒤틀림의 개선에 관한 다양한 연구가 진행되고 있다.

- [5] 또한, 피부 진피층의 약 90%를 구성하는 콜라겐의 감소는 피부노화와 매우 밀접한 관계를 가지고 있다. 콜라겐 분해효소인 MMP-1은 세포 외 기질과 기저막 분해에 관여하는 여러 효소의 family이다. Fisher 등은 1회의 자외선 조사에도 피부 내의 MMPs 활성이 증가되며 피부 내 콜라겐 붕괴에 영향을 미치며, 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보고한 바 있다.
- [6] 한편, 기능성 화장품 분야는 약초 등의 식물에서부터 소, 돼지 등의 콜라겐 추출까지 다양한 천연물을 이용하여 연구되고 있는 실정이다. 최근 소, 돼지 등 가축에서 추출된 콜라겐은 광우병 및 브루셀라 등의 노출소재로 유해성 문제가 대두되고 있는 바, 해양의 생물로부터 콜라겐을 추출하는 방법이 도입되었으며, 선진국에서는 이미 해양 천연물을 이용한 연구가 상당히 진행되고 있다.
- [7] 이에 의하여, 본 발명에서는 해양 천연자원 소재 중 전복 내장으로부터 피부노화 개선의 기능성 화장품 소재로서의 가능성 유무를 판별하고, 이를 이용한 주름개선 화장품을 제조하고자 한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 전복 추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부 주름 개선용 화장료 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 전복 내장의 메탄올, 에탄올, 열수 또는 4°C 추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부 주름 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 전복 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 주름 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 전복 내장의 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 주름 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [11] 바람직하게는, 상기 전복 내장추출물이 메탄올, 에탄올, 열수 및 4°C 추출물 중에서 선택된 어느 하나의 추출물일 수 있으며, 에탄올에 의한 추출물이 가장 바람직하다.
- [12] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 전복내장 추출물의 함량은 화장료 조성물 총 중량에 대하여 1 ~ 3.5 중량%이다. 이때, 전복내장 추출물의 총 중량이 0.0001% 미만일 때에는 그 효과가 나타나기 어렵고, 20% 이상일 때에는 피부에 자극을 유발할 가능성이 높으며, 제형의 안정화에도 큰 영향을 미칠 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 전복내장 추출물을 1 ~ 3.5 중량% 포함하는 주름개선 크림을 제조하였으며, 이를 피부에 직접 도포함으로써 피부 주름 개선 효과가 뛰어남을 확인하였다.

- [13] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 유효 성분으로서 상기 전복내장 추출물 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [14] 본 발명의 화장료 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, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [15] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [16] 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.
- [17] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예를 들어 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [18] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [19] 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, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [20] 본 발명의 전복내장 추출물은 피부 진피 구성 성분인 콜라겐의 합성 효과가 뛰어나며, 콜라겐 분해효소인 MMP-1 생성 억제 효과가 뛰어나다. 또한, 멜라닌

합성을 억제하는 효과도 뛰어나며, 피부 장벽 손상을 회복하는 특징도 가지고 있다. 이러한 효과를 갖는 전복내장 추출물을 유효성분으로 함유하여 제조한 화장료 조성물은 피부에 직접 도포 시 주관적 평가 및 객관적인 피부 주름 정도의 측정에서 모두 피부 주름 개선 효과가 뛰어나고, 피부 자극을 유발하지 않는다.

[21] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전복내장 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물을 인간의 피부에 도포하는 것을 특징으로 하는 화장방법을 제공한다. 본 발명의 화장료 조성물을 인간의 피부에 도포하게 되면, 화장료 조성물의 유효성분인 전복내장 추출물에 의해 피부주름 개선 효과를 볼 수 있다.

[22] 본 발명의 화장료 조성물을 단독 또는 중복 도포하여 사용하거나, 본 발명 이외의 다른 화장료 조성물과 중복 도포하여 사용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 피부 주름 개선 효과가 우수한 화장료 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다.

[23] 본 발명의 화장료 조성물이 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 에센스, 아이 크림, 스프레이 또는 파우더의 제형일 경우, 피부에 1일 1회, 2회 또는 3회 정도 적당량을 도포할 수 있다. 또한, 본 발명의 화장료 조성물이 마사지 크림, 계면활성제 함유 클렌징 제형 또는 계면활성제 비함유 클렌징 제형, 비누, 팩의 제형일 경우, 피부에 도포한 후 닦아내거나 떼거나 물로 씻어낼 수도 있다. 구체적인 예로서, 상기 비누는 액상비누, 가루비누, 고형비누 및 오일비누이며, 상기 계면활성제 함유 클렌징 제형은 클렌징 폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비함유 클렌징 제형은 클렌징크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 젤이며, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[24] 상기한 과제 해결 수단에 의한 본 발명에 따르면, 고 단백질의 전복 내장 추출물을 함유하는 화장료 조성물은 항산화 활성 및 콜라겐의 생성, 및 콜라겐, 엘라스타아제 분해효소(MMP-1)의 저해 효과가 우수하여 피부의 주름 개선용도로 우수하다.

도면의 간단한 설명

[25] 도 1은 전복내장 추출물(메탄올, 에탄올, 열수 및 4°C)의 DPPH 항산화 활성을 나타낸 것이다.

[26] 도 2는 전복내장 추출물(메탄올, 에탄올, 열수 및 4°C)의 엘라스타아제 저해 활성을 나타낸 것이다.

[27] 도 3은 전복내장 추출물(메탄올, 에탄올, 열수 및 4°C)의 농도에 따른 세포 성장률을 나타낸 것이다.

[28] 도 4는 전복내장의 에탄올 추출물 농도에 따른 프로콜라겐 생성량을 나타낸

것이다.

[29] 도 5는 전복내장의 에탄올 추출물 농도에 따른 MMP-1 저해 평가를 나타낸 것이다.

[30] 도 6은 본 발명에 따른 주름개선 크림의 엘라스타아제 저해 활성을 나타낸 것이다.

[31] 도 7은 본 발명에 따른 주름개선 크림의 콜라겐 생합성 정도를 나타낸 것이다.

[32] 도 8은 본 발명에 따른 주름개선 크림의 MMP-1 활성 저해도를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[33] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[34] 실시예

[35] 실시예 1: 실험 준비

[36] 전복은 전라남도 완도군에서 생전복을 구입하여 육과 내장을 분리하여 수세하였으며, -20°C에서 급속냉동 보관하여 동결건조 후 분쇄하여 분말 형태로 제조하였다. 상기 제조된 동결건조 전복육과 내장의 일반성분 분석은 A.O.A.C.법(AOAC 2000)에 준하여 측정하였다. 즉, 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 자동질소증류장치(KJELTEC 2200 SYSTEM, Foss, Sweden)를 이용하여 킬달(Kjeldahl)법, 조지방은 자동지방추출장치(SOXTEC AVANTI 2055 SYSTEM, Foss, Sweden)를 이용하여 조지방정량(Soxhlet추출)법으로, 조회분은 건식 회화법으로 측정하였다.

[37] 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, 수분은 전복육 분말 3.7% 및 전복내장 분말 2.6%, 회분은 3.1% 및 5.3%, 지방은 20.7% 및 1.5%, 총 탄수화물은 30.7% 및 20.3%로 낮은 값을 나타내었다. 또한, 단백질은 전복육 분말 58.5% 및 전복내장 분말 53.3%으로 가장 높았다. 따라서, 전복 분말은 육 및 내장 모두 단백질을 50% 이상을 함유하고 있는 바, 고 단백질소재로서의 활용이 가능함을 알 수 있었다.

[38] 표 1

	수분(%)	조회분(%)	조단백질(%)	조지방(%)	총 탄수화물(%)
전복육 분말	3.7±0.11	5.3±0.17	58.5±0.42	1.5±0.42	30.7±0.52
전복내장 분말	2.6±0.12	3.1±0.04	53.3±0.36	20.7±0.36	20.3±0.35

[39] 한편, 본 발명에서 유기용매는 1등급 및 특등급을 사용하였으며, 추출물의 평가에 사용한 시약들은 모두 생화학용(Biochemical grade)이었다.

[40] 실시예 2: 전복 내장 추출물의 분리

[41] 동결건조한 전복 내장의 분말 50g 당 각각의 용매(메탄올, 에탄올, 증류수)를

20배 가하여 60°C에서 6시간, 3회 반복 추출하고, 5 μ m 종이 여과지(Advantec, No.2)를 이용하여 감압여과하였다. 후속하여, 감압농축기(Eyela, 일본)를 사용하여 농축한 다음 완전건조시키고, 그 수율을 측정하였다.

- [42] 또한, 동결건조한 전복내장 20g에 0.2M 트리스(Tris)-HCl 완충용액(pH 8.0)을 20배 가하여 분쇄한 후, 원심분리하여 그 상등액을 취하여 4°C 추출물을 수득하였다.

[43] 실시예 3: 전복 내장 추출물의 생리활성 평가

[44] **<3-1> 항산화 활성**

- [45] 전복내장 추출물의 항산화 활성으로 측정하기 위하여, DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능을 사용하였다.

- [46] 상기 실시예 2에서 제조된 시료를 취하여 0.2mM DPPH 용액과 혼합하고, 이 반응 혼합액을 실온에서 10분간 방치한 후, 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 대조군은 BHT를 사용하였다.

- [47] 따라서, 도 1에 나타낸 바와 같이, 합성 항산화제인 BHT는 60.9%로 가장 높은 활성을 나타냈으며, 전복내장 추출물 중 4°C 추출물은 이와 유사한 58.6%의 높은 활성을 나타내었다. 또한, 메탄올, 에탄올 및 열수 추출물은 30% 정도의 활성을 나타내었다.

[48] **<3-2> 엘라스타아제(Elastase) 저해 활성**

- [49] 피부 주름 개선에 대한 활성을 측정하기 위하여, 피부 탄력과 연관성이 높은 엘라스타아제의 저해 활성을 측정하였다.

- [50] 0.2M 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)에 1 unit 엘라스타아제 및 0.8 mM suc-(ala)₃-p-니트로아닐리드(nitroanilide)를 넣어 25°C에서 30분간 반응시킨 후, 410nm에서 흡광도를 측정하여 기질로부터 생성되는 p-니트로아닐리드의 양을 정량하였다. 이때, 대조군은 우르솔릭산(Ursolic acid)을 사용하였다.

- [51] 따라서, 도 2에 나타낸 바와 같이, 엘라스타아제의 저해 활성 물질인 우르솔릭산의 경우 77.7 %의 높은 활성을 보였으나 메탄올, 에탄올, 열수 및 4°C로 추출된 전복내장 추출물(시료 농도 100 μ g/ml)은 이에 비해 다소 낮은 엘라스타아제 저해 활성을 나타내었다. 즉, 전복내장의 에탄올 추출물은 36.2 %, 메탄올 추출물 18.5 % 및 4°C 추출물 24.4 %로 나타났으며, 그 중에서도 에탄올 추출물이 가장 높은 엘라스타아제 저해 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 한편, 열수 추출물의 경우에는 1 %로 거의 엘라스타아제 저해 활성이 낮음을 알 수 있다.

[52] 실시예 4: 주름 개선 효과의 평가

[53] **<4-1> 세포배양**

- [54] 인체섬유아세포(Human dermal fibroblast)는 CCD-1064SK(Momal human dermal fibroblast, ATCC CRL-2076, USA)를 사용하였으며, IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Midium) 배지에 10% FBS(fetal bovine serum)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 매 3일 간격으로 배지를 교체하며 계대배양하였다. 이때, 세포주(cell

line)는 해동 후 3 ~ 7회 내로 계대배양한 것이다.

[55] <4-2> 세포독성 평가(MTT assay)

[56] 세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA)에서 구입하여 사용하였다. CCD-1064SK(Momal human dermal fibroblast, ATCC CRL-2076, USA)를 1×10^5 세포/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 $200 \mu\text{l}$ /웰 분주한 후, 각 추출물의 최종농도가 50, 100 및 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 되도록 처리하고, 24시간동안 37°C , 5% CO_2 조건하에서 배양하였다. 상기 배양된 세포에 $2 \text{mg}/\text{mL}$ 의 농도로 조제한 MTT 용액을 $20 \mu\text{l}$ 씩 넣고, 4시간 반응시킨 후 형성된 포마잔(Formazan)을 $100 \mu\text{l}$ 의 DMSO(Dimethylsulfoxide, Sigma, USA) 첨가하여 녹인 후 효소면역활성측정기(ELISA reader)로 540nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 측정하였다. 이때, 대조군에 대한 흡광도를 100%로 하여 상대적인 세포 성장률(Cell viability)을 구하였다.

[57] 하기 표 2에 나타낸 바와 같이, 대조군에 비하여 메탄올 추출물은 125 ~ 131%, EtOH 추출물 137 ~ 146% 및 열수 추출물은 134 ~ 139%의 성장률을 나타내었고, 양성 대조군인 레티노익산은 117 ~ 125%의 성장률을 나타냄으로써 시료 간의 차이 없이 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다(도 3 참조).

[58] 표 2

물질	농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)	세포 성장률(%)
대조군		100
메탄올 추출물	50	100 $\pm$ 0.004
	100	125.30 $\pm$ 0.027
	200	131.99 $\pm$ 0.011
에탄올 추출물	50	137.51 $\pm$ 0.014
	100	134.28 $\pm$ 0.020
	200	146.27 $\pm$ 0.007
열수 추출물	50	134.67 $\pm$ 0.015
	100	131.05 $\pm$ 0.026
	200	139.72 $\pm$ 0.017
레티노익산(Retinoic acid)	50	117.49 $\pm$ 0.024
	100	129.47 $\pm$ 0.007
	200	125.29 $\pm$ 0.007

[59] <4-3> 콜라겐 생합성 평가

[60] 세포를 1×10^5 세포/웰 농도로 96-웰 플레이트에 접종한 후, 웰에 각 시료별로 3.125, 6.25, 10, 12.5, 25, 50, 100 및 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하여 CO_2 배양기에서

24시간 배양하였다. 양성대조군으로 사용한 레티노익산은 50 μ g/ml의 농도로 첨가하였으며, 세포배양액 내의 콜라겐 생합성 정도는 프로콜라겐 타입-1 C 펩타이드(PIP) EIA 키트(Takara)를 사용하였다. 항체-PoD 공액용액(conjugate solution) 100 μ l를 각 웰에 넣은 다음 샘플 배양액과 표준액 20 μ l 넣고, 37°C에서 3시간 배양하였다. 후속하여, 배양액을 제거한 후 PBS로 4회 세척하고, 발색시약 100 μ l 주입한 다음, 상온에서 15분간 배양하고, 스탑 용액(Stop solution) 100 μ l를 넣은 후 450nm 효소면역활성측정기(ELISA reader)로 측정하였다.

- [61] 도 4는 인체섬유아세포에 에탄올 추출물을 상기의 농도별로 처리하여 배양 한 후 배양액을 취하여 콜라겐 생합성량을 조사한 결과를 나타낸 것이다. 레티노익산을 0.02 μ g/ml의 농도로 처리한 경우, 콜라겐 생합성량은 453.9 ng/ml이었다. 또한, 세포에 3.125, 6.25, 10, 12.5 및 25 μ g/ml의 농도별로 처리된 에탄올 추출물은 686.6ng/ml, 697.6ng/ml, 706.9ng/ml, 718ng/ml 및 677.1 ng/ml의 결과를 나타냈다. 이와 같이, 에탄올 추출물을 고농도보다 저농도로 처리한 경우 특이적으로 콜라겐 생성량이 증가하였음을 알 수 있었다.

[62] **<4-4> MMP-1 저해 평가**

- [63] 세포를 1 $\times$ 10⁵ 세포/웰 농도로 96-웰 플레이트에 접종한 후, 웰에 각 시료별로 3.125, 6.25, 10, 12.5, 25, 50, 100 및 200 μ g/ml의 농도로 첨가하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이때, MMP-1 활성을 높이기 위하여 TNF- α (AbFRONTIER)를 4 μ g/ml의 농도로 첨가하였다. 세포의 배양액을 수거하여 실험에 사용하고, MMP-1 면역측정 키트(Immunoassay kit, R&D)를 이용하여 플레이트 리더기로 흡광도 측정하였다.

- [64] 도 5에 나타낸 바와 같이, TNF- α 처리한 대조군의 MMP-1활성은 39.4ng/ml 이었으며, 3.125 μ g/ml로 시료를 처리한 경우에는 47.0ng/ml, 10 μ g/ml는 45.3ng/ml, 25 μ g/ml은 47.3ng/ml으로 MMP-1 활성 저해 효과가 나타나 대조군과 비교하여 높게 나타났다. 이와 같이, MMP-1의 활성 저해는 고농도보다 저농도에서 높았음을 알 수 있었으며, 이는 콜라겐 생합성 실험과 유사한 결과를 나타내었다.

[65] **실시예 5: 전복내장 추출물을 함유하는 조성물의 평가**

- [66] 현재 시판되고 있는 주름개선 크림을 대조군으로 하여, 본 발명에 따른 전복내장 추출물을 유효성분으로 함유하는, 화장품 조성물의 피부 주름개선 효과를 평가하였다.

[67] **<5-1> 엘라스타아제 저해 활성**

- [68] 실시예 <3-2>와 동일한 방법으로 엘라스타아제 저해 활성을 측정하였다.

- [69] 도 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 주름개선 크림은 엘라스타아제 저해활성이 65.2 %로, 대조군과 비교하여 42.1 % 증가되었음을 알 수 있었다.

[70] **<5-2> 콜라겐 생합성 평가**

- [71] 실시예 <3-3>과 동일한 방법으로 콜라겐 생합성 평가를 수행하였다.

- [72] 도 7에 나타낸 바와 같이, 대조군과 비교하여 본 발명에 따른 주름개선 크림은

콜라겐 생합성이 높게 나탐을 알 수 있었다.

[73] **<5-3> MMP-1 저해 평가**

[74] 실시예 <4-4>와 동일한 방법으로 MMP-1 저해 평가를 수행하였다.

[75] 도 8에 나타난 바와 같이, 대조군은 3.125 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 36.391 ng/ml, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 40.378ng/ml, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 49.262ng/ml, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 44.048ng/ml, 및 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 46.123ng/ml을 나타내었다. 또한, 본 발명에 따른 주름개선 크림은 3.125 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 37.544ng/ml, 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 41.568ng/ml, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 46.276ng/ml, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 45.235ng/ml, 및 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 47.936ng/ml을 나타내었다. 이와 같이, 처리 농도가 증가함에 따라 MMP-1 저해 능력이 증가하는 것을 알 수 있었다.

[76]

[77] **제형 예 1: 유연 화장수(스킨)의 제조**

[78] 실시예 2의 전복내장 추출물.....1.0 중량%

[79] 1,3-부틸렌글리콜.....5.2 중량%

[80] 올레일알코올.....1.5 중량%

[81] 에탄올.....3.2 중량%

[82] 폴리솔베이트 20.....3.2 중량%

[83] 벤조페논-9.....2.0 중량%

[84] 카르복실비닐폴리머.....1.0 중량%

[85] 글리세린.....3.5 중량%

[86] 향.....미량

[87] 방부제.....미량

[88] 정제수.....미량

[89]

[90] **제형 예 2: 밀크로션의 제조**

[91] 실시예 2의 전복내장 추출물.....1.0 중량%

[92] 글리세린.....5.1 중량%

[93] 프로필렌글리콜.....4.2 중량%

[94] 토크페릴아세테이트.....3.0 중량%

[95] 유동파라핀.....4.6 중량%

[96] 트리에탄올아민.....1.0 중량%

[97] 스쿠알란.....3.1 중량%

[98] 마카다미아너트오일.....2.5 중량%

[99] 폴리솔베이트 60.....1.6 중량%

[100] 솔비탄세스퀴를레이트.....1.6 중량%

[101] 프로필파라벤.....0.6 중량%

[102] 카르복실비닐폴리머.....1.5 중량%

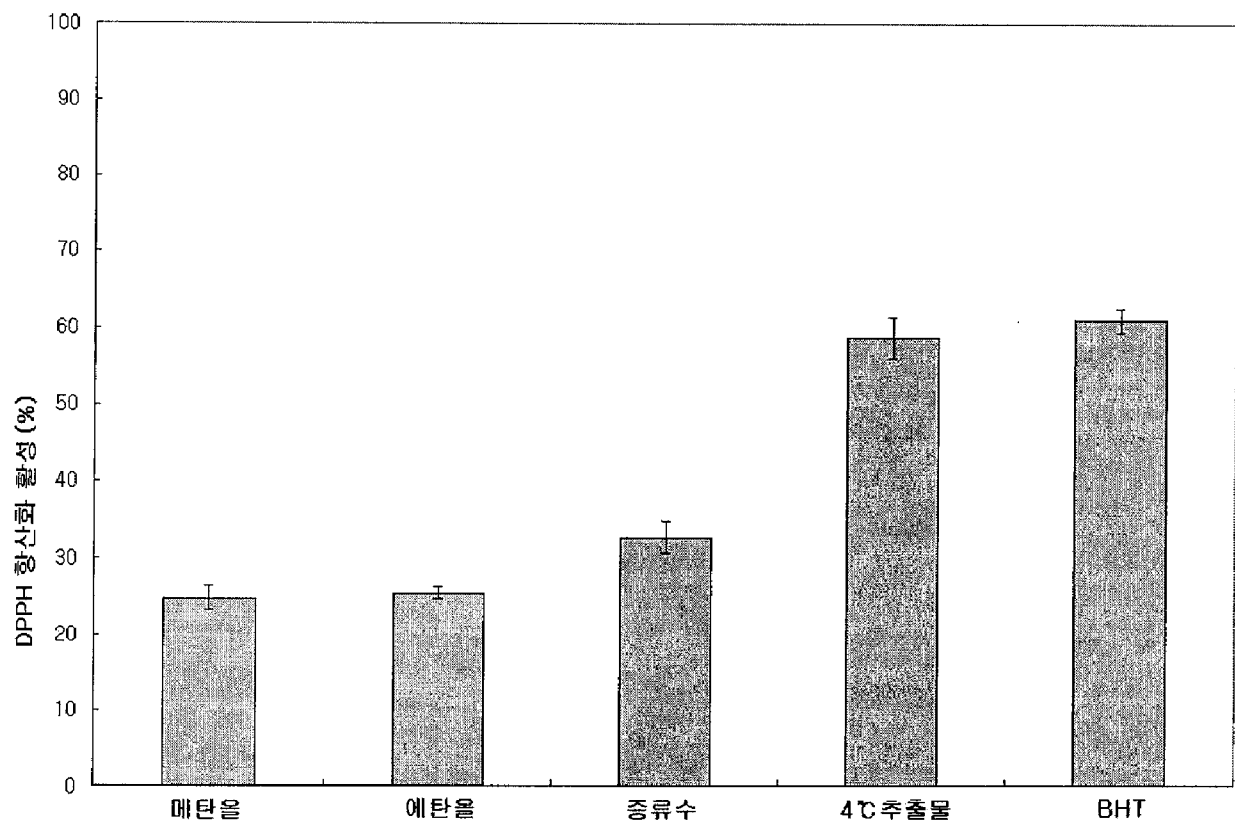
[103] 향.....미량

[104]	방부제.....	미량
[105]	정제수.....	미량
[106]		
[107]	제형 예 3: 영양크림의 제조	
[108]	실시예 2의 전복내장 추출물.....	2.0 중량%
[109]	글리세린.....	4.0 중량%
[110]	바셀린.....	3.5 중량%
[111]	트리에탄올아민.....	2.1 중량%
[112]	유동파라핀.....	5.3 중량%
[113]	스쿠알란.....	3.0 중량%
[114]	밀납.....	2.6 중량%
[115]	토코페릴아세테이트.....	5.4 중량%
[116]	폴리솔베이트 60.....	3.2 중량%
[117]	카르복실비닐폴리머.....	1.5 중량%
[118]	솔비탄세스퀴올레이트.....	3.1 중량%
[119]	향.....	미량
[120]	방부제.....	미량
[121]	정제수.....	미량

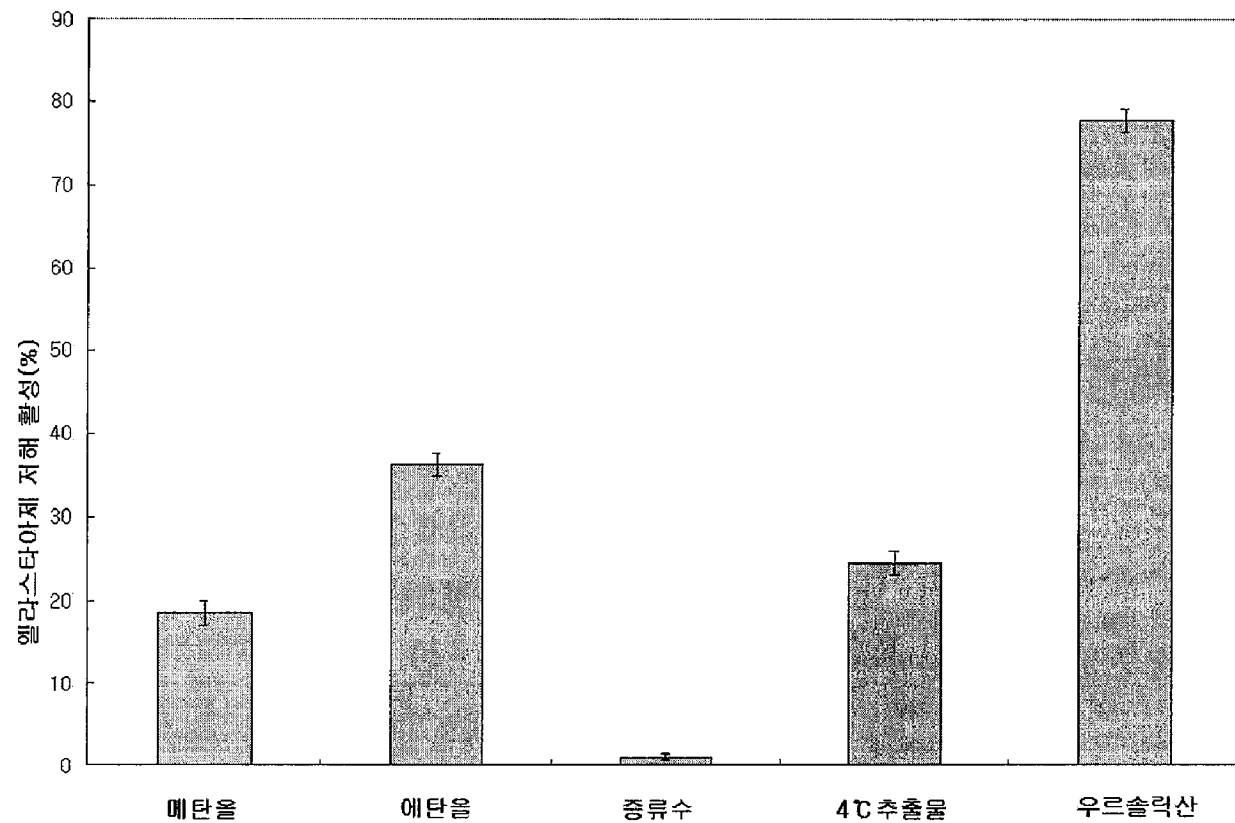
청구범위

- [청구항 1] 전복 추출물을 유효성분으로 함유하는, 피부 주름 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
전복 추출물이 전복 내장의 추출물임을 특징으로 하는, 피부 주름 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
전복 내장 추출물이 메탄올, 에탄올, 열수 및 4°C 추출 중에서 선택된 어느 하나의 추출 방법에 의한 추출물임을 특징으로 하는, 피부 주름 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
전복 내장 추출물이 에탄올 추출물임을 특징으로 하는, 피부 주름 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 5] 제2항에 있어서,
전복 내장 추출물이 1 ~ 3.5 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는, 피부 주름 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 화장품 조성물이 유연 화장수(스킨), 영양 화장수(밀크로션), 영양 크림, 마사지 크림, 에센스 및 팩으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 제형임을 특징으로 하는, 피부 주름 개선용 화장품 조성물.

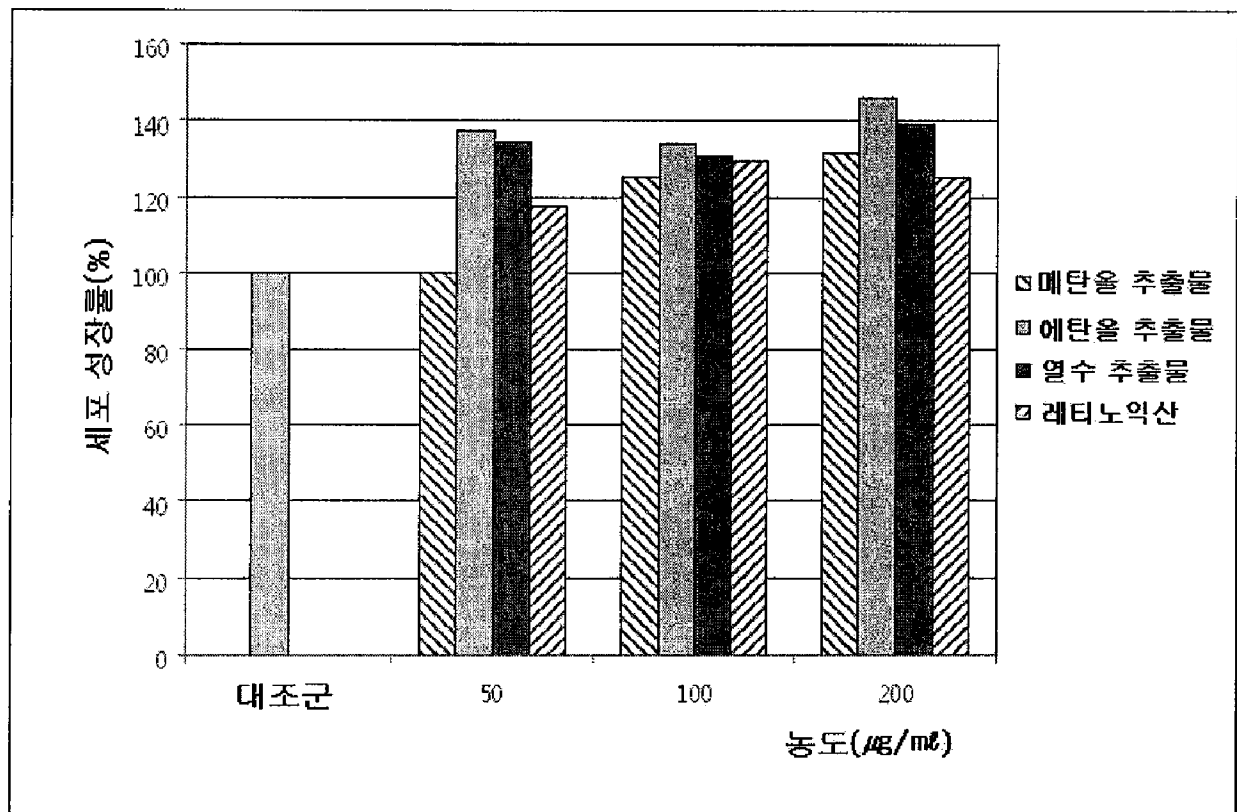
[Fig. 1]



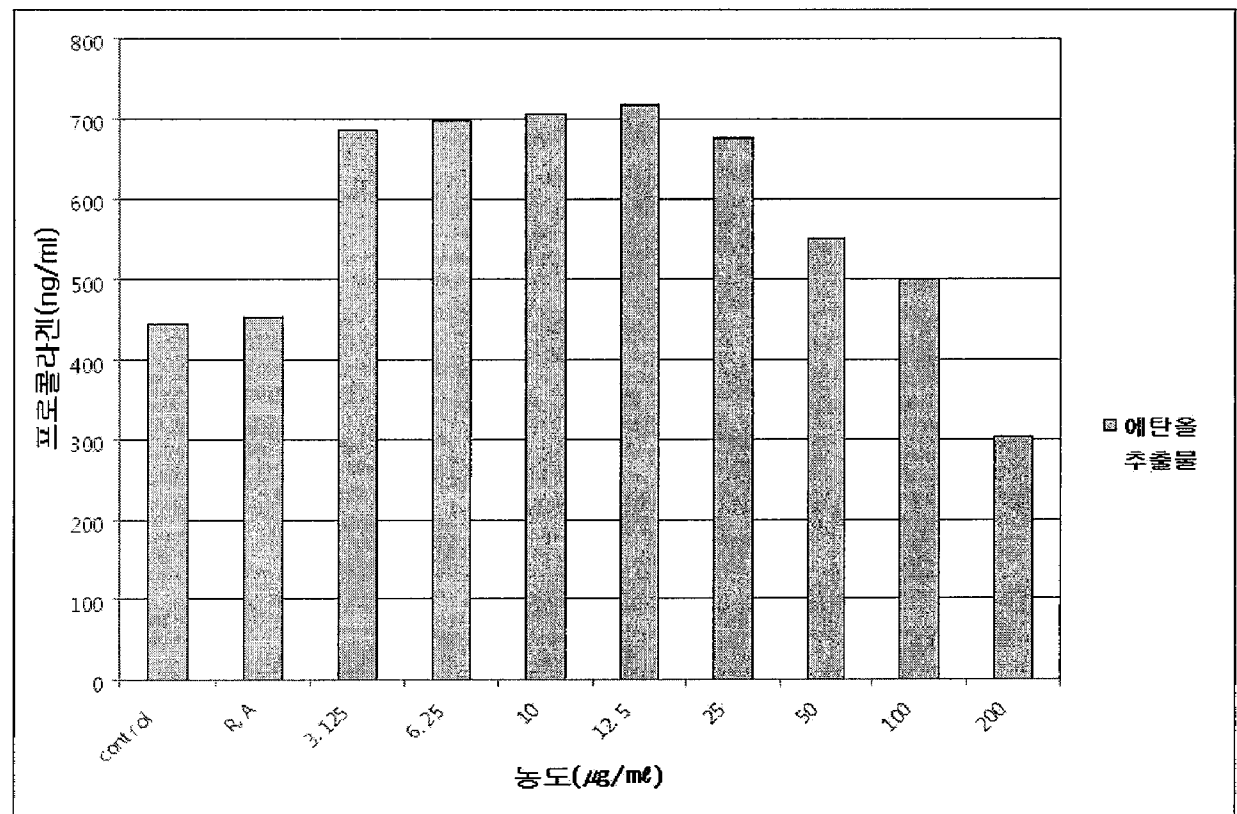
[Fig. 2]



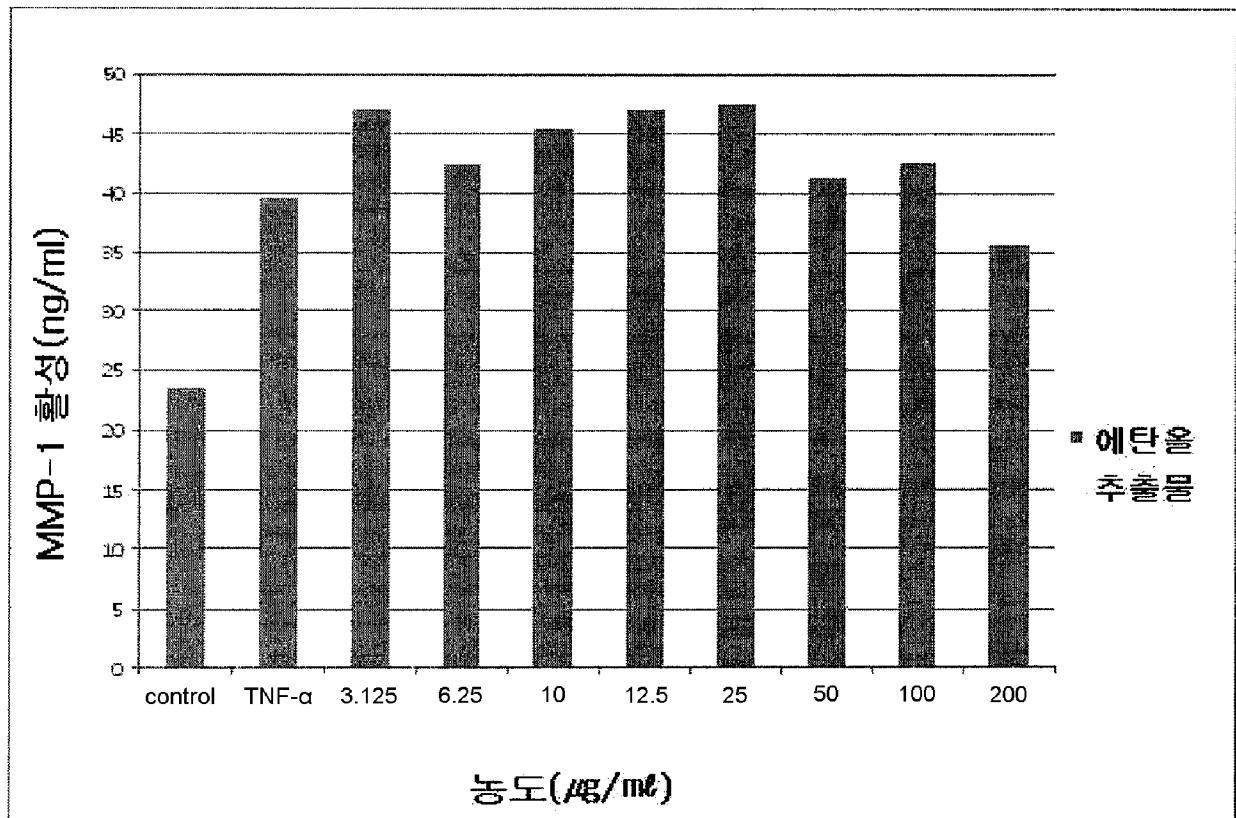
[Fig. 3]



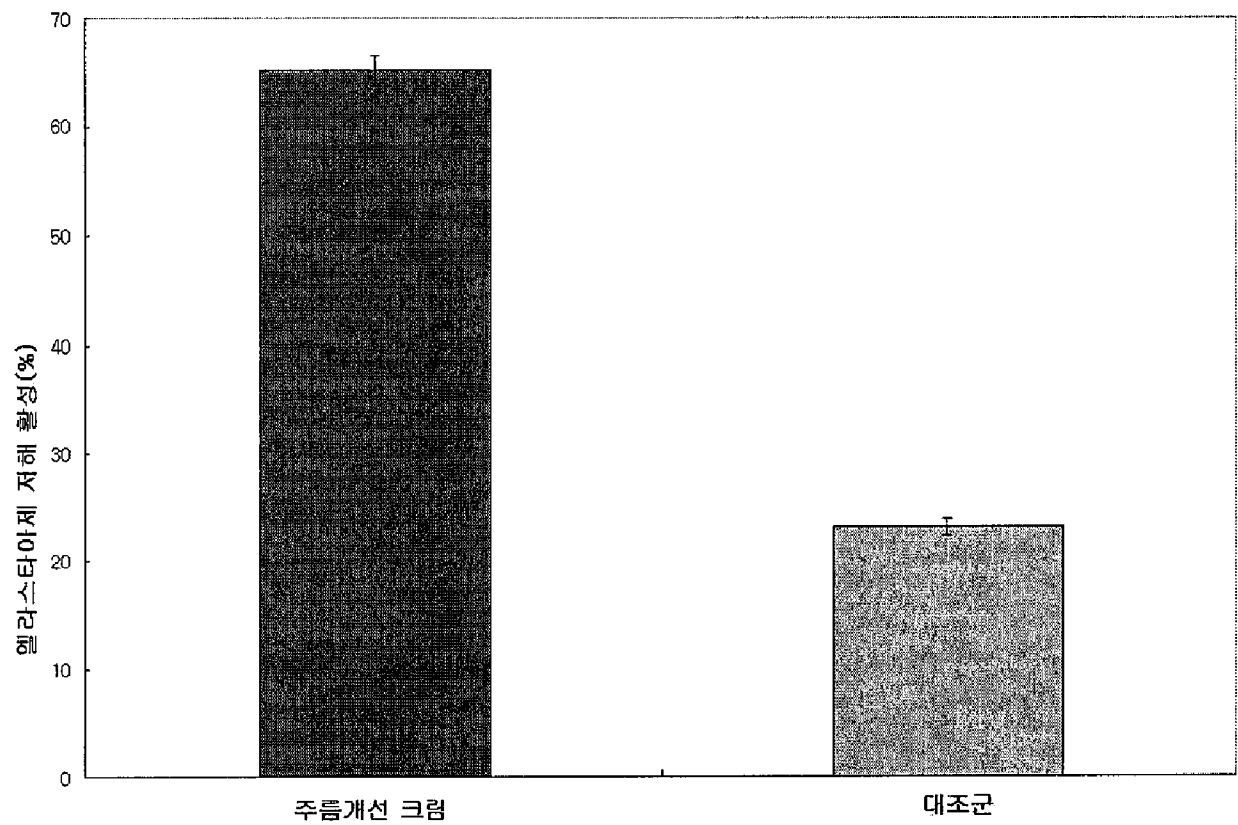
[Fig. 4]



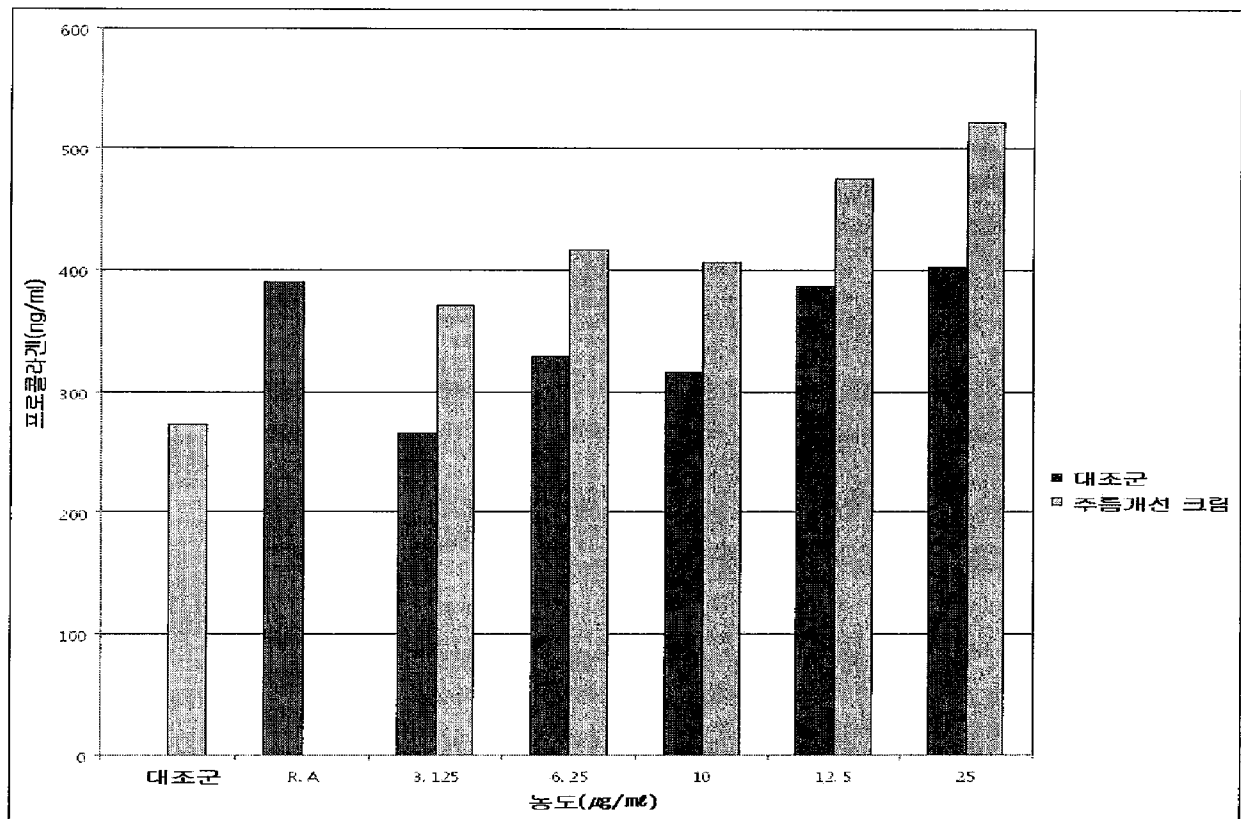
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

