

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0073174

(43) 공개일자 2021년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/9711 (2017.01) A23L 33/105 (2016.01)

A61K 8/06 (2006.01) A61K 8/67 (2006.01)

A61K 8/84 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/9711 (2017.08)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0163717

(22) 출원일자 2019년12월10일

심사청구일자 2019년12월10일

(71) 출원인

파이힐(주)

부산광역시 남구 용소로 45, 5334호(대연동, 부경대학교대연캠퍼스자연과학1관)

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

김형락

부산광역시 남구 황령대로319번길 26, 104호동 2102호(대연동, 대연 경동메르빌 아파트)

임권택

부산광역시 부산진구 당감로 118, 105동 1202호(부암동, 협성피닉스타운)

임수진

부산광역시 사하구 승학로19번길 15, 2동 109호(당리동, 호성빌라맨션)

(74) 대리인

위병갑

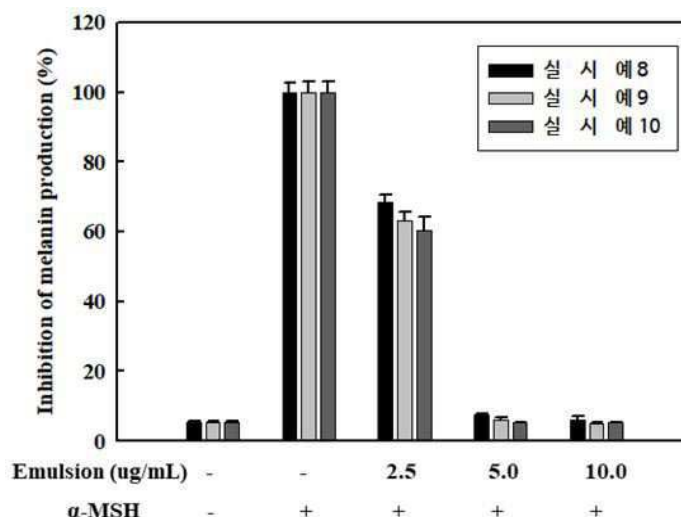
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 미백, 주름개선 및 항염증 화장품 조성물이 봉입된 나노에멀전의 제조방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 미백, 주름개선 및 항염증에 우수한 유효물질로서 톱니모자반 및 폴록사머를 포함하는 나노에멀전, 이의 제조방법, 이를 유효성분으로 함유하는 미백, 주름개선 및 항염증용 화장품 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 톱니모자반, 폴록사머 및 피부침투 촉진제를 포함하는 나노에멀전은, 멜라닌 생합성 억제 및 세포내 멜라닌 축적을 감소시킴으로서 효과적으로 미백효능을 나타내고, MMP-1을 억제하여 피부탄력을 증가시키며, NO를 감소를 확인하여 항염증 효능을 확인하였으며, 유효성분의 산화를 억제함을 확인하였는 바, 저장 안정성이 우수한 복합 기능성 화장품 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61K 8/06 (2013.01)
A61K 8/678 (2013.01)
A61K 8/84 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
A23V 2250/202 (2013.01)
A61K 2800/21 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	S2609893
부처명	중소기업청
과제관리(전문)기관명	중소기업기술진흥원
연구사업명	창업성장 기술개발사업
연구과제명	경피흡수가 용이한 사가하이드로퀴노익산 농축 추출물을 이용한 미백 기능성 화장품
소재 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	파이힐(주)
연구기간	2018.06.29 ~ 2019.06.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	S2661583
부처명	중소기업청
과제관리(전문)기관명	중소기업기술진흥원
연구사업명	산학협력기술개발
연구과제명	토피모자반 주정추출물을 이용한 복합기능성 화장품 소재개발 (기업부설연구소)
기 여 율	1/2
과제수행기관명	파이힐(주)
연구기간	2018.11.30 ~ 2019.11.29

명세서

청구범위

청구항 1

톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서 상기 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)은 에탄올로 추출된 톱니모자반 추출물인 것인, 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 추출물은 에탄올로 더 희석하는 것인, 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서 상기 폴록사머는, 폴록사머 407 (Pluronic F127), 폴록사머 188 (Pluronic F68), 및 폴록사머 338 (Pluronic F108)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서 상기 조성물은 입자크기 15 내지 40 nm의 나노에멀전인 것인, 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서 상기 조성물은 지용성 성분을 더 포함하는 것인, 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서 상기 지용성 성분은 토크페롤, PEG400 및 캐스터 오일로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물.

청구항 8

톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 미백 또는 주름개선용 식품 조성물.

청구항 9

톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 향염증용 화장품 조성물.

청구항 10

톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 향염증용 식품 조성물.

청구항 11

(1) 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)을 추출하는 단계;

(2) 상기 톱니모자반 추출물에 폴록사머(poloxamer)를 추가하는 단계; 및

(3) 상기 (2) 단계에 지용성 성분을 더 추가하여 나노에멀전을 생성하는 단계;를 포함하는, 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물의 제조방법.

청구항 12

- (1) 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)을 추출하는 단계;
- (2) 상기 톱니모자반 추출물에 폴록사머(poloxamer)를 추가하는 단계; 및
- (3) 상기 (2) 단계에 지용성 성분을 더 추가하여 나노에멀전을 생성하는 단계;를 포함하는, 항염증용 화장품 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은, 미백, 주름개선 및 항염증 화장품 조성물이 봉입된 나노에멀전의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 사람의 피부색은 멜라닌, 카로틴 및 헤모글로빈의 양에 따라 결정되어 지는데 이중 멜라닌이 가장 결정적인 요소이다. 멜라닌은 피부(표피)내 기저층에 존재하는 색소세포인 멜라노사이트(melanocyte)에서 합성되며 주변 각질세포(Keratinocyte)로 전이되어 사람의 피부색을 나타낸다. 멜라닌이 비정상적으로 적게 생산되면 백반증(Vitiligo)과 같은 피부 병변이 유발된다. 반대로 과잉 생산은 중년 여성들의 주요 고민 중 하나인 기미, 주근깨를 형성하며 또한 피부안과도 밀접한 관계가 있다.
- [0003] 미백 작용은, 멜라닌의 생성 및 축적을 억제하는 것이다. 멜라닌은 피부 표피의 기저층에 존재하는 멜라노사이트라는 세포에서 티로신(Tyrosine)이 효소 및 비효소적 산화반응을 거쳐 생성되며, 표피를 구성하고 있는 각질세포로 전이된다. 멜라닌의 생합성에 관여하는 중요한 효소로는 티로시나제(Tyrosinase), 티로시나제 관련 프로테인1(Tyrosinase-related protein 1) 및 도파크롬 토토머라제(dopachrome tautomerase)가 있다. 티로시나아제 외에 이 두 효소는 미백효과에 관해서 주목 받고 있는 효소이나, 멜라닌 합성에 결정적인 역할을 하는 효소는 티로시나아제이다. 멜라닌 생합성 첫단계는 티로시나아제에 의하여 유발된다. 티로시나아제에 의해 티로신이 도파(Dopa)로 되고 이 도파를 도파퀴논(Dopa-quinone)으로 만든다. 이 두 반응의 다음단계 과정들은 비효소적인 반응에 의해서도 가능한 것으로 알려져 있으며 티로시나아제 단독으로도 멜라닌 생성이 가능하다고 알려져 있다.
- [0004] 최근에는 피부 세포내의 신호 전달물질의 발현에 따른 멜라닌 형성과정에 대한 새로운 이론이 제시되고 있다. 피부가 자외선에 노출되면 염증을 유발시키는 인터루킨-알파가 케라티노사이트 엔도셀린(Endothelin) 발현을 촉진시킨다. 이러한 일련의 과정이 멜라노사이트의 형성을 증가시키고 멜라노사이트를 활성화시킨다. 이렇게 형성된 멜라노사이트내 멜라노솜에서 티로신이 티로시나아제에 의해 멜라닌이 형성된다.
- [0005] 또, NF- κ B는 여러 가지 자극에 대해 응답적으로 활성화되어, 면역이나 세포증식, 염증 등에 관하여 여러 가지 유전자의 발현을 높여준다. NF- κ B의 과잉 활성화가 암이나 류마티스, 건성 등과 관계있다는 것이 보고되어, 현재 세계적으로 NF- κ B의 활성화를 억제하는 약제의 개발이 활발하게 이루어지고 있다. NF- κ B는 피부의 표피각화세포나 진피 섬유아세포에도 존재하며, 자외선, 세포의 자극이나 염증성 사이토카인 등에 의해 NF- κ B가 과잉으로 활성화됨으로써 염증과 세포사멸에 관련된 유전자들의 전사가 증가되는 것으로 확인되고 있다. NF- κ B의 과잉활성화는 세포에서의 염증성 사이토카인들을 생성시키고 그 사이토카인들에 의해 더욱 NF- κ B의 활성화가 일어난다. 또한, 세포증식인자인 bFGF(basic fibroblast growth factor)나 세포외 매트릭스 분해효소 MMP-1의 합성을 증가시켜 표피각화세포의 과증식이나 각화이상에 의한 표피의 비후, 멜라노사이트의 증식에 의한 색소침착, MMP-1의 진피 콜라겐 분해에 의한 피부 탄력의 저하 등을 일으킴으로써 피부의 광노화에도 관여한다.
- [0006] 피부의 멜라닌 세포로서 색소를 만드는 표피 멜라노사이트 세포는 자외선이나 만성적인 염증 등의 자극에 의하여 피부에서 멜라닌 색소를 과잉으로 생성하여, 흑반, 기미, 주근깨 등의 원인이 되고 있다.
- [0007] 염증이거나 자외선과 같은 외부자극에 의해 표피 각화세포에서는 NF- κ B가 과잉으로 활성화되어 과잉의 멜라닌 생성을 유도하고, 표피 각화세포의 세포증식을 유도하는 bFGF의 생성을 촉진함으로써 표피의 비후, 멜라노사이트의 증식에 의한 색소침착을 유도한다. 따라서, NF- κ B의 작용을 억제하는 물질은 염증이거나 자외선에 의한 기미, 주근깨 등의 색소침착을 막는 효과를 나타낸다.

[0008] 이미 아스코르빈산(특개평 4-9320), 하이드로퀴논(특개평 6-192062), 코직산(특개 56-7710), 알부틴(특개평4-9315) 및 일부의 화합물들이 티로시나제 저해 활성을 가지고 있어 미백 화장료의 원료로 이용되고 있으나, 처방계 중에서 안정성이 떨어져 분해되어 착색되거나, 이취의 발생, 생체 레벨에서의 효능, 효과의 불분명 및 안전성 문제 등으로 그 사용이 제한되고 있는 실정이다. 그리고 티로시나제의 억제 효과는 입증되었으나, 실제 생체 레벨과 유사한 실험에서는 그 효과가 낮게 나타나며 하이드로퀴논은 발암성 물질로 규정되어 사용이 금지되고 있다. 상기와 같은 이유들로 인해, 다양한 연구를 통해서, 염증과 같은 자극 반응을 일으키지 않으면서도 미백 효과가 우수한 천연 추출물을 이용하고자 하는 연구가 진행되어 지고 있으며, 효과적으로 미백효과를 높이기 위한 방법이 개발되고 있다.

[0009] 에멀전은 적어도 두 개 이상의 비혼합성 액체가 서로 섞이지 않고 작은 입자의 형태로 다른 액체에 분산되어 있는 콜로이드 분산계이다. 일반적으로 에멀전은 열역학적으로 불안정한 상태이므로, 시간이 지남에 따라 응집(Flocculation), 침강(Sedimentation), 크리밍(Creaming), 입자성장(Ostwald ripening) 및 유착(Coalescence) 등과 같은 다양한 형태로 상이 분리되는 현상이 발생한다. 이러한 에멀전의 불안정성 문제를 해결하기 위한 가장 단순하지만 효과적인 것으로 입자의 크기를 감소시키는 방법이 있다. 기본적으로 에멀전의 입자 크기가 작아지면 상기에 언급한 다양한 현상을 비롯하여 중력의 영향을 덜 받아 입자들 사이에서 브라운 운동을 하게되고, 따라서 일반적인 에멀전에 비하여 더 나은 분산 안정성을 제공한다.

[0010] 따라서, 본 발명은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여, 미백효과, 주름 효과 및 항염증 효과가 우수한 톱니모자반 및 폴록사머를 나노에멀전으로 제조하였다. 본 발명에 따른 톱니모자반, 폴록사머 및 피부침투 촉진제를 포함하는 나노에멀전은, 멜라닌 생합성 억제 및 세포내 멜라닌 축적을 감소시킴으로서 효과적으로 미백효과를 나타내고, MMP-1을 억제하여 피부탄력을 증가시키며, NO를 감소를 확인하여 항염증 효능을 확인하였으며, 유효성분의 산화를 억제함을 확인하였는 바, 저장 안정성이 우수한 복합 기능성 화장료 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) KR 0562348 B
(특허문헌 0002) KR 0850686 B

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 미백 또는 주름개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은, 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 미백 또는 주름개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 항염증용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 항염증용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은
- [0017] (1) 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)을 추출하는 단계;
- [0018] (2) 상기 톱니모자반 추출물에 폴록사머(poloxamer)를 추가하는 단계; 및
- [0019] (3) 상기 (2) 단계에 지용성 성분을 더 추가하여 나노에멀전을 생성하는 단계;를 포함하는, 미백 또는 주름개선용 화장료 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은
- [0021] (1) 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)을 추출하는 단계;
- [0022] (2) 상기 톱니모자반 추출물에 폴록사머(poloxamer)를 추가하는 단계; 및
- [0023] (3) 상기 (2) 단계에 지용성 성분을 더 추가하여 나노에멀전을 생성하는 단계;를 포함하는, 항염증용 화장품 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0024] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 미백 또는 주름개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 항염증용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 항염증용 식품 조성물을 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명은
- [0029] (1) 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)을 추출하는 단계;
- [0030] (2) 상기 톱니모자반 추출물에 폴록사머(poloxamer)를 추가하는 단계; 및
- [0031] (3) 상기 (2) 단계에 지용성 성분을 더 추가하여 나노에멀전을 생성하는 단계;를 포함하는, 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0032] 또한, 본 발명은
- [0033] (1) 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)을 추출하는 단계;
- [0034] (2) 상기 톱니모자반 추출물에 폴록사머(poloxamer)를 추가하는 단계; 및
- [0035] (3) 상기 (2) 단계에 지용성 성분을 더 추가하여 나노에멀전을 생성하는 단계;를 포함하는, 항염증용 화장품 조성물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0036] 본 발명은 미백, 주름개선 및 항염증에 우수한 유효물질로서 톱니모자반 및 폴록사머를 포함하는 나노에멀전, 이의 제조방법, 이를 유효성분으로 함유하는 미백, 주름개선, 항염증용 화장품 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 톱니모자반, 폴록사머 및 피부침투 촉진제를 포함하는 나노에멀전은, 멜라닌 생합성 억제 및 세포내 멜라닌 축적을 감소시킴으로써 효과적으로 미백효능을 나타내고, MMP-1을 억제하여 피부탄력을 증가시키며, NO의 감소를 확인하여 항염증 효능을 확인하였으며, 유효성분의 산화를 억제함을 확인하였는 바, 저장 안정성이 우수한 복합 기능성 화장품 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0037] 도 1은 본 발명의 톱니모자반 추출물을 에탄올로 회석 및 여과하여 제조한 나노에멀전의 입자크기를 나타낸 도이다. (A: 에탄올로 회석하여 제조한 나노입자의 크기, B: 에탄올로 회석 후 여과하여 제조한 나노에멀전의 크기)
- 도 2는 본 발명의 톱니모자반 추출물을 토코페롤과 혼합 및 여과하여 제조한 나노에멀전의 입자크기를 나타낸 도이다. (A: 톱니모자반 추출물 및 토코페롤 혼합, B: 톱니모자반 추출물 및 토코페롤 혼합 후 여과)
- 도 3은 본 발명의 나노에멀전을 제조에서 크레모포어의 농도에 따른 나노에멀전의 입자크기를 나타낸 도이다. (A: 크레모포어 0.75 g 첨가, B: 크레모포어 1.0 g 첨가 C: 크레모포어 1.25 g 첨가)
- 도 4는 폴록사머 첨가 유무 및 첨가 농도에 따른 나노에멀전의 입자크기를 나타낸 도이다. (A: 폴록사머 무첨가,

B: 폴록사머 0.6 g 첨가, C: 폴록사머 1.0 g 첨가)

도 5는 본 발명의 실시예 8 내지 10에 따라 제조된 나노에멀전의 B16F10세포에 대한 세포독성을 평가한 도이다.

도 6은 본 발명의 실시예 8 내지 10에 따라 제조된 나노에멀전의 처리농도에 따른 B16F10세포의 멜라닌 생합성 억제율 확인한 도이다.

도 7은 본 발명의 실시예 8 내지 10에 따라 제조된 나노에멀전의 HaCaT세포에 대한 세포독성을 평가한 도이다.

도 8는 본 발명의 실시예 8 내지 10에 따라 제조된 나노에멀전의 처리농도에 따른 HaCaT세포의 MMP-1 생합성 억제율 확인한 도이다.

도 9는 본 발명의 실시예 8 내지 10에 따라 제조된 나노에멀전의 RAW254.7세포에 대한 세포독성을 평가한 도이다.

도 10은 본 발명의 실시예 8 내지 10에 따라 제조된 나노에멀전의 처리농도에 따른 RAW254.7세포에서의 NO발생 감소를 확인한 도이다.

도 11는 본 발명의 나노에멀전의 보관 일수에 따른 저장안정성을 육안 관찰한 도이다.

도 12는 본 발명의 나노에멀전의 보관 일수에 따른 멜라닌 생합성, MMP-1생합성 및 NO 발생 억제율을 확인한 도이다. (A: 멜라닌 생합성 억제, B: MMP-1 억제, C: NO발생 억제)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0039] 본 발명은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0040] 본 발명에서 사용되는 용어 “조성물”은 목적 물질을 생산하기 위한 다양한 물질을 혼합한 것으로서, 유효성분, 유효제, 미네랄오일, 향료 및 방부제 등이 포함된 것을 의미한다.

[0041] 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 “미백”은 피부 및 신체의 외적인 부분에 있어서, 하얗게 하는 것을 뜻하며, 멜라닌 생성의 억제 및 멜라닌 축적의 감소가 동반되는 것을 의미한다.

[0042] 본 발명에서 사용되는 용어 “개선”은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0043] 본 발명에 사용한 톱니모자반은 부산시 기장군에서 자생하는 천연산을 스쿠버를 동원하여 채취하였고, 채취한 톱니모자반은, 종 분석을 시행하여 본 발명에 사용하였다.

[0044] 본 발명의 미백용 화장품 조성물은, 멜라닌 생성 및 세포내 축적을 억제하는 조성물로서, 멜라닌은 피부에 존재하는 색소로 자외선 등 외부의 자극으로부터 신체를 보호하는 중요한 기능을 한다. 하지만 이것이 과잉 생성되어 침착되면 기미나 주근깨 등을 형성시켜 피부 외관상 문제를 야기할 수 있으며, 나아가 피부노화를 촉진시켜 피부암을 유발할 수 있기 때문에 멜라닌 과잉생성을 억제할 수 있는 물질의 경우 미백용 화장품 조성물로 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 주름개선용 화장품 조성물은, 우수한 항노화 효과를 나타낸다. 구체적으로는 피부 내에서 엘라스틴의 분해효소인 엘라스타제의 활성을 억제하고, 콜라겐 분해 효소 MMP-1의 생성을 억제하며, 콜라겐의 생합성을 촉진하여 피부의 주름을 개선하고 탄력을 증진시켜, 주름개선용 화장품 조성물로 사용될 수 있다.

[0046] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 톱니모자반 및 폴록사머를 사용하여 제조된 나노에멀전을 B16F10 세포에 처리하여, 멜라닌 생합성이 100% 억제되는 것을 확인하였다(실험예 1 및 도 6). 또한, HaCaT 세포에 처리하였을 때 MMP-1의 생합성이 현저하게 감소하여, 주름개선 및 피부탄력 증진에 효과가 있음을 확인하였고(실험예 2 및 도 8), RAW264.7 세포에서, NO의 발현이 감소한 것으로, 염증유발인자의 조절을 확인하여(실험예 3 및 도 10), 본 발명의 톱니모자반 및 폴록사머를 사용하여 제조된 나노에멀전은 미백, 주름개선 및 항염증 효능이 있는 것을 확인하였다.

[0047] 따라서, 본 발명은 톱니모자반 및 폴록사머를 포함하는 나노에멀전 및 이를 유효성분으로 포함하는, 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물을 제공할 수 있다.

- [0048] 상기 본 발명의 톱니모자반은 에탄올로 추출된 톱니모자반 추출물인 것인 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물일 수 있다.
- [0049] 본 발명에 따른 톱니모자반 추출물은 당업계에서 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 추출물은 적절한 용매를 이용하여 톱니모자반으로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 톱니모자반의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다.
- [0050] 상기 톱니모자반으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 화장품으로서 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 에탄올, 부탄올 또는 에틸아세테이트이며, 더욱 바람직하게는 에탄올이나 이에 제한된 것은 아니다.
- [0051] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 톱니모자반 추출물의 제조 방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- [0052] 본 발명에 있어서 톱니모자반 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 회석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
- [0053] 상기 본 발명의 폴록사머는, 폴록사머는, 폴록사머 407 (Pluronic F127), 폴록사머 188 (Pluronic F68), 및 폴록사머 338 (Pluronic F108)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 미백 또는 주름개선용 조성물일 수 있다.
- [0054] 본 발명의 폴록사머는 비이온성 계면활성제로서, 당업계에서 공지된 어떠한 계면활성제라도 사용될 수 있다. 바람직하게는 음이온성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제이다. 음이온성 계면활성제의 구체적인 예는 알킬아실글루타메이트, 알킬포스페이트, 알킬락타레이트, 디알킬포스페이트 및 트리알킬포스페이트를 포함한다. 비이온성 계면활성제의 구체적인 예는 폴록사머, 알콕시레이티드 알킬에테르, 알콕시레이티드 알킬에스테르, 알킬폴리글리코사이드, 폴리글리세릴에스테르 및 슈가에스테르를 포함한다. 더욱 바람직한 계면활성제는 비이온성 계면활성제에 속하는 폴록사머이나 이에 제한되지는 않는다.
- [0055] 또한 상기 조성물은 입자크기 15 내지 40 nm의 나노에멀전인 것인, 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물일 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 사용되는 용어 “에멀전”은 액체가 다른 액체에 작은 방울처럼 퍼져있는 용액을 뜻하며, 지용성 및 수용성 용액을 혼합하여, 미셀(micelle)이 형성되어 있는 상태를 의미한다.
- [0057] 본 발명에서 나노에멀전은 통상적인 미셀(micelle)의 형태를 가지며 평균 입자 지름이 10 내지 200 nm인 미셀을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 나노에멀전의 평균 입자 지름은 10 내지 80 nm이며, 더욱 바람직하게는 15 내지 40 nm이다. 나노에멀전의 평균 입자 크기가 80 nm를 초과하는 경우에는 피부침투 및 제형 안정성이 감소하게 된다.
- [0058] 본 발명의 나노에멀전의 제조에는 폴리올, 지용성 성분, 계면활성제, 인지질, 지방산 및 물을 포함하는 통상의 나노에멀전 제조에 이용되는 혼합물에 의해 제조될 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 사용되는 용어 “혼합물”은 용매 혹은 용질 등 2이상의 물질이 고르게 분포되어 있는 것을 뜻하며, 용매와 용매의 혼합 및 용매와 용질의 혼합과 같이 다양한 제제가 혼합되어 있는 상태의 물질을 의미한다.
- [0060] 또한 상기 조성물은 지용성 성분을 더 포함할 수 있으며, 토코페롤, PEG400 및 캐스터오일로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 미백용 화장품 조성물일 수 있다. 상기 본 발명의 지용성 성분은 당업계에서 공지된 다양한 오일이 이용될 수 있으며, 헥사데칸 및 파라핀 오일과 같은 하이드로카본계 오일, 캐스터오일, 에스테르계의 합성오일, 디메치콘 및 사이크로메치콘계와 같은 실리콘 오일, 해바라기유, 옥수수유, 대두유, 아보카도유, 참깨유 및 어유와 같은 동식물성 오일, 에톡시레이티드 알킬에테르계오일, 프로폭시레이티드 알킬에

테르계오일, 피토스핑고신, 스펡고신 및 스펡가닌과 같은 스펡고노이드 지질, 세레브로사이드 콜레스테롤, 시토스테롤 콜레스테릴설페이트, 시토스테릴설페이트, C10-40 지방알콜 및 이의 혼합물이나 이에 제한되지는 않는다.

[0061] 본 발명의 지용성 성분 제조에 있어서 지용성 비타민류가 더 포함될 수 있으며, 지용성 비타민으로서는 지용성 용매에 용해 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 비타민 A, 카로틴, 비타민 D2, 비타민 D3, 비타민 E (d1-알파 토크페롤, d-알파 토크페롤, d-알파 토크페롤) 등을 들 수 있으며, 그들의 유도체(팔미틴산 아스코르빈, 스테아르산아스코르빈, 디팔미틴산아스코르빈, 아세트산d1-알파 토크페롤, 니코틴산d1-알파 토크페롤비타민 E, DL-판토텔닐알코올, D-판토텔닐알코올, 판토텔닐에틸에테르 등) 등도 본 발명에서 사용되는 유용성 비타민에 포함되며 더욱 바람직하게는 토크페롤이나 이에 제한되지는 않는다. 유용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 취득할 수 있다.

[0062] 본 발명의 나노에멀전 제조에 있어서, 폴리올이 더 포함될 수 있으며, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 프로필렌글리콜, 디프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세린, 메틸프로판디올, 이소프로필렌글리콜, 펜틸렌글리콜, 에리스리톨, 자일리톨, 솔비톨 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상이며, 바람직하게는 PEG이나, 이에 제한되지는 않는다.

[0063] 본 발명의 나노에멀전 제조에 이용되는 물은 일반적으로 탈이온화된 증류수이일 수 있다.

[0064] 이와 같이 톱니모자반 및 폴록사머를 유효성분으로 함유하는 나노에멀전은 화장품 조성물로 제조되는 경우, 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 미타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0065] 또한, 본 발명의 조성물은 상술한 나노에멀전 이외에, 나노에멀전과 반응하여 피부보호효과를 손상시키지 않는 한도에서 종래부터 사용되어 오던 유기 자외선 차단제를 혼합하여 사용할 수도 있다.

[0066] 유기 자외선 차단제로는 글리세릴파바, 드로메트리졸트리실록산, 드로메트리졸, 디갈로일트리올리에이트, 디소듐페닐디벤즈이미다졸테트라설포네이트, 디에칠헥실부타미도트리아존, 디에칠아미노하이드록시벤조일헥실벤조에이트, 디이에이-메톡시신나메이트, 로우손과 디하이드록시아세톤의 혼합물, 메칠렌비스-벤조트리아졸틸테트라메칠부틸페놀, 4-메칠벤질리덴캠퍼, 멘틸안트라닐레이트, 벤조페논-3(옥시벤존), 벤조페논-4, 벤조페논-8(디옥시페벤존), 부틸메톡시디벤조일메탄, 비스에칠헥실옥시페놀메톡시페닐트리아진, 시녹세이트, 에칠디하이드록시프로필파바, 옥토크릴렌, 에칠헥실디메칠파바, 에칠헥실메톡시신나메이트, 에칠헥실살리실레이트, 에칠헥실트리아존, 이소아밀-p-메톡시신나메이트, 폴리실리콘-15(디메치코디에칠벤잘말로네이트), 테레프탈틸리덴디캠퍼설포닉에씨드 및 그 염류, 티이에이-살리실레이트 및 아미노벤조익에씨드(파바)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.

[0067] 또한, 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 클렌징, 오일, 분말과 운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 본 발명의 화장료 조성물은 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.

[0068] 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.

[0069] 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, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0070] 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, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

- [0071] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리이미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0073] 본 발명의 화장료 조성물은 단독 또는 중복하여 사용하거나, 본 발명 이외의 다른 화장료 조성물과 중복하여 사용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 화장료 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다.
- [0075] 또한 본 발명은, 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 미백 또는 주름개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0076] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 톱니모자반 및 폴록사머를 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0077] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0078] 본 발명의 식품 조성물은 상기 화장료 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.
- [0079] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0081] 또한, 본 발명은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 항염증용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0082] 본 발명의 항염증 화장료 조성물은, 염증유발인자의 조절인자인 NF- κ B 및 산화 질소(NO) 매개염증에 의해 유도되는 피부 자극 및 염증을 완화시키는 효과를 가지며, 항염증 화장료 조성물로 사용될 수 있다.
- [0083] 본 발명에서 용어, “염증” 이란 외부 세균의 침입 및 물리 화학적 자극에 의하여 형성되는 농양의 병리적 상태를 뜻하며, 염증반응은 생체의 세포나 조직에 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습으로 인한 손상을 수복 재생하기 위한 생체 방어 반응과정으로, 이 반응과정에는 국소의 혈관, 체액의 각종 조직세포 및 면역세포 등이 작용한다. 일반적으로 염증반응은 감염, 허혈, 상처 등과 같은 자극에 의해 유도되며 홍반, 부종, 통증 등과 같은 임상증상을 나타낸다. 이런 염증 반응에 관여하는 물질에는 NO(nitric oxide), 프로스타글란딘 E2, 트롬복산 등이 있다. NO는 iNOS(inducible nitric oxide)에 의해 합성되며 대식세포에서 만들어지는 슈퍼옥사이드 음이온(superoxide anion)과 결합하여 강력한 페록시니트리트(peroxynitrite)와 히드록시페록사이드(hydroxyperoxide)를 생성하여 조직을 손상시킨다. 이러한 분자물질들의 발현은 전사유도인자(inducible transcription factor)인 NF- κ B(nuclear factor- κ B)의 신호전달에 의해 조절된다. NF- κ B는 Rel 유전자과(Rel gene family)의 핵단백질이며 세포질에서는 I κ B와 결합되어 불활성인 형태로 존재하나 활성산소(reactive oxygen), TNF- α , IL-1과 같은 케모카인(chemokines) 및 LPS(lipopolysaccharide)와 같은 다양한 자극에 의해 활성화된 후 핵으로 이동하여 염증반응을 유도하는 유전자 발현을 촉진시킨다.

[0085] 또한, 본 발명은 톱니모자반(*Sargassum serratifolium*) 및 폴록사머(poloxamer)를 포함하는, 항염증용 식품 조성물을 제공한다.

[0087] 또한 본 발명은, (1)톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)을 추출하는 단계;

[0088] (2)상기 톱니모자반 추출물에 폴록사머(poloxamer)를 추가하는 단계; 및

[0089] (3) 상기 (2) 단계에 지용성 성분을 더 추가하여 나노에멀전을 생성하는 단계;를 포함하는, 미백 또는 주름개선용 화장품 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0091] 또한 본 발명은, (1)톱니모자반(*Sargassum serratifolium*)을 추출하는 단계;

[0092] (2)상기 톱니모자반 추출물에 폴록사머(poloxamer)를 추가하는 단계; 및

[0093] (3) 상기 (2) 단계에 지용성 성분을 더 추가하여 나노에멀전을 생성하는 단계;를 포함하는, 항염증용 화장품 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0095] 이하 본 발명을, 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다.

[0096] 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[0098] <준비예 1> 톱니모자반 에탄올 추출물의 제조

[0099] 본 발명에 사용한 톱니모자반은 부산시 기장군에서 자생하는 천연산을 스쿠버를 동원하여 채취하였고, 기장산의 종확인은 부경대학교 생태공학과 최창근 교수가 수행하였다. 톱니모자반을 양지에서 자연건조 후, 마쇄하여 얻은 분말 2kg을 95% 에탄올 8 L에 넣고 70℃에서 3시간 3회 반복하여 환류냉각 추출한 후, 한외여과기(니또덴코, 일본)로 이물질을 제거하였다. 여과 추출물은 진공회전농축기로 40℃에서 에탄올을 제거한 후, 추출된 잔사로서 조추출물 200±25g을 수득하였다. 이렇게 수득한 톱니모자반 에탄올 추출물은 4℃온도에서 냉장보관하면서 나노에멀전의 제조, 미백, 주름개선 및 항염증효과 확인 및 세포독성 평가에 사용하였다.

[0101] <실시예 1~2> 에탄올 회석 및 여과 처리에 따른 나노에멀전의 크기

[0102] 본 발명에서, 에탄올 회석 및 여과에 따른 나노에멀전의 크기를 확인하기 위하여, 톱니모자반 에탄올 추출물 0.5 g을 4.5 ml의 에탄올과 혼합하고(실시예 1), 같은 방법으로 상기의 톱니모자반 에탄올 추출물을 제조하여, 여과하여 준비하였다(실시예 2). 각각의 톱니모자반 에탄올 추출물은, PEG 0.3 g, 폴리옥실-35-캐스터오일 1.25g과 혼합하여, 지용성 혼합물을 제조하였다. 제조된 지용성 혼합물을, 폴록사머 407이 0.8g 혼합된 100 ml의 60 ℃ 증류수에 분사하여, 나노에멀전을 제조하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다. 그 결과, 단순히 에탄올로 회석된 나노에멀전의 크기는 1535 nm와 21.92 nm였으며(도 1A), 여과과정을 거친 후 제조된 나노에멀전의 크기는 1535 nm 가 제거되고, 20 nm의 나노에멀전이 제조되었다(도 1B).

[0104] <실시예 3~4> 토코페롤 농도 및 여과 따른 나노에멀전의 크기

[0105] 본 발명에서, 토코페롤 첨가 및 여과에 따른 나노에멀전의 크기를 확인하기 위하여, 톱니모자반 에탄올 추출물 0.5 g을 0.1 g의 토코페롤(실시예 3)과 함께 4.5 ml의 에탄올에 혼합하고, 같은 방법으로 상기의 톱니모자반 에탄올 추출물을 제조하여, 여과하여 준비하였다(실시예 4). 각각의 톱니모자반 에탄올 추출물은, PEG 0.3 g, 폴리옥실-35-캐스터오일 1.25g과 혼합하여, 지용성 혼합물을 제조하였다. 제조된 지용성 혼합물을, 폴록사머 407이 0.8g 혼합된 100 ml의 60 ℃ 증류수에 분사하여, 나노에멀전을 제조하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 그 결과, 토코페롤을 포함하는 나노에멀전의 크기는 2777 nm 와 24.81 nm였으며(도 2A), 토코페롤 첨가 및 여과

과정을 거친 후 제조된 나노에멀전의 크기는 2777nm의 입자가 제거된 20.22 nm의 나노에멀전이 제조되었다(도 2B).

[0107] <실시예 5~7> 크레모포어 첨가에 따른 나노에멀전의 크기

[0108] 본 발명에서, 크레모포어 첨가에 따른 나노에멀전의 크기를 비교하기 위하여, 톱니모자반 에탄올 추출물 0.5 g을 4.5 ml의 에탄올을 이용하여 희석하고, 크레모포어 RH40(polyoxyl 40 hydrogenated castor oil)을 0.75 g, 1 g 및 1.25 g와 혼합하여, 지용성 성분을 제조하고, 폴록사머 407 0.8 g이 혼합된 60℃의 증류수 100 ml에 분사하여, 나노에멀전을 제조하였다. 그 결과, 크레모포어가 0.75 g가 첨가되어 제조된 나노에멀전의 입자크기는 (도 3A, 실시예 5)168.9 nm였으며, 크레모포어 1 g 첨가군은 18.21 nm(도 3B, 실시예 6), 크레모포어 1.25가 포함된 나노에멀전의 입자크기는 16.32 nm(도 3C, 실시예 7)인 것을 확인하였다.

[0110] <실시예 8~10> 폴록사머 농도에 따른 나노에멀전의 크기

[0111] 본 발명에서, 폴록사머 농도에 따른 나노에멀전의 크기를 비교하기 위하여, 폴록사머 407를 각각 0 g, 0.6 g 및 g씩 100 ml의 증류수에 혼합하여 수용액을 제조하였다. 그 후 톱니모자반 에탄올 추출물 0.5 g을 4.5 ml의 에탄올에 희석하고, 토크페놀 0.1 g, PEG400 0.3 g과 함께 폴리옥실-35-캐스터오일 1.25 g에 혼합하여 지용성 성분을 제조하였다. 제조된 지용성 성분을 상기의 수용액에 각각 분사하여, 나노에멀전을 제조하였으며, 그 결과들도 4에 나타내었다. 그 결과, 폴록사머가 포함되지 않은 나노에멀전은 19.02 nm였으며(도 4A, 실시예 8), 0.6 g의 폴록사머가 포함된 그룹은 21.16 nm(도 4B, 실시예 9), 1 g의 토크페놀이 첨가된 배양 배지는 19.80 nm의 입자크기(도 4C, 실시예 10)가 나타남을 확인하였다.

[0113] <실험예 1> 나노에멀전의 미백효능

[0114] 1-1. B16F10 세포에서의 세포독성 평가

[0115] 본 발명에서, 실시예 8 내지 10에서 제조된 나노에멀전의 세포독성을 평가하기 위하여, 제조된 나노에멀전을 0, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 B16F10 세포에 처리하여 세포 생존율을 통한 세포독성을 평가하였다. 세포생존율을 MTS kit를 사용하여 분석하였다. 더욱 자세하게는 96 well plate에 B16F10 세포를 6×10^3 cell 농도로 세포를 분주하여 24 시간 배양 후, 각각의 나노에멀전을 농도별로 1시간 동안 전처리 한 뒤, α -MSH 1 μM 로 24 시간 처리 및 배양 후, 95 μl 의 배지와 5 μl 의 MTS 용액을 가한 뒤 3시간 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0116] 그 결과, 본 발명에서 제조된 나노에멀전은 20 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도범위에서 세포독성이 나타나지 않음을 확인하였다(도 5).

[0118] 1-2. 나노에멀전의 B16F10세포에 대한 멜라닌 생합성 저해 효과

[0119] 본 발명에서 나노에멀전이 멜라닌 생합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16F10 세포에 실시예 8 내지 실시예 10의 방법대로 제조된 나노에멀전을 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 세포 내 멜라닌 함량을 측정하였다. 보다 자세하게는 B16F10세포를 12 well plate에 well당 8×10^4 세포로 분주한 후 24시간 뒤 나노에멀전을 농도별로 1시간 동안 전처리한 뒤, α -MSH 1 μM 로 72시간 동안 처리하고 72시간 뒤에 PBS로 2번 세척하였다. 세척된 세포는 1N NaOH로 세포를 파쇄한 후 EP 튜브에 담아서 30분간 60℃에서 가열하였다. 세포 용해물을 5000 x g에서 5분간 원심분리한 후 상층액의 흡광도를 405 nm에서 측정하였다.

[0120] 그 결과, 본 발명의 실시예 8 내지 10의 방법으로 제조된 나노에멀전은 모두, B16F10세포에서 멜라닌 생합성을 농도의존적으로 억제하는 것을 확인하였다(도 6).

[0122] <실험예 2> 나노에멀전의 주름개선 효능

[0123] **2-1. HaCaT세포에서의 세포독성 평가**

[0124] 본 발명에서, 실시예 8 내지 10에서 제조된 나노에멀전의 세포독성을 평가하기 위하여, 제조된 나노에멀전을 0, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 HaCaT 세포에 처리하여 세포 생존율을 통한 세포독성을 평가하였다. 세포생존율을 MTS kit를 사용하여 분석하였다. HaCaT세포를 10% FBS-DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco)에 배양한 후, 5×10^4 cells/ml의 세포농도로 96-well plate에 200 μl 씩 분주하고, 이를 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 인큐베이터에서 24시간 배양시켰다. 배양 후, 배지를 제거한 후, 10% FBS-DMEM으로 조제한 농도별 나노에멀전 100 μl 와 FBS-free DMEM 100 μl 를 다시 첨가하여 동일 조건에서 24시간 반응시켰다. 이때 FBS-free DMEM만을 사용한 실험구를 대조구로 사용하였다. 반응 완료 3시간 전, 5 mg/ml MTS 용액(in 1x PBS(-), (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium))을 5 μl 씩 첨가한 뒤, 다시 3시간 반응을 진행, 완료하였다. MTS 반응액을 제거한 후, DMSO(Dimethyl sulfoxide) 150 μl 씩 첨가한 뒤 5분간 상온에서 교반하고 이를 마이크로플레이트 계수기를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0125] 그 결과, 본 발명에서 제조된 나노에멀전은 20 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도까지 세포독성이 전혀 나타나지 않음을 확인하였다(도 7).

[0127] **2-2. 나노에멀전의 HaCaT세포에 대한 MMP-1 억제 효과**

[0128] 본 발명의 나노에멀전 8, 9, 10의 주름개선 활성을 알아보기 위하여, 타입 I 콜라겐을 분해하는 MMP-1의 생성 억제 효능을 ELISA를 이용하여 확인하였다. HaCaT 세포를 4×10^5 cells/ml 농도로 6 well에서 배양하였으며 상기 실시예 8 내지 10의 나노에멀전을 각각 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 UVB로 30분간 처리 하여 72시간 배양하였다. 배양된 배지중의 MMP-1의 함량은 ELISA로 분석하였다. 그 결과, HaCaT 세포에 UVB를 조사한 결과 MMP-1의 발현이 모두 증가하였지만, 본 발명의 나노에멀전을 각각 2.5, 5.0, 10.0 및 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 경우 세포배양액에서의 MMP-1 농도가 무첨가군에 비하여 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 8).

[0130] **<실험예 3> 나노에멀전의 항염증 효능**

[0131] **3-1 RAW264.7세포에서의 세포독성 평가**

[0132] 본 발명에서는 상기 실시예 8 내지 10을 통해 제조된 나노에멀전이 세포독성임을 확인하기 위하여, 대식세포인 RAW264.7 세포에 본 발명의 나노에멀전을 농도별로 처리한 후 세포생존율의 변화를 MTS assay로 분석하였다. 자 세하게는, RAW264.7 세포를 10% FBS-DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco)에 배양한 후, 5×10^4 cells/ml의 세포농도로 96-well plate에 200 μl 씩 분주하고, 이를 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 인큐베이터에서 24시간 배양시켰다. 24시간 배양 후, 배지를 제거한 후, 10% FBS-DMEM으로 조제한 농도별(0, 2.5, 5.0, 10 및 20 $\mu\text{g/ml}$) 나노에멀전 100 μl 과 FBS-free DMEM 100 μl 를 다시 첨가하여 동일 조건에서 24시간 반응시켰다. 이 때 FBS-free DMEM만을 사용한 실험구를 시료의 대조구로 사용하였다. 반응 완료 3시간 전, 5mg/ml MTS 용액(in 1 $\times$ PBS(-), (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium))을 5 μl 씩 첨가한 뒤, 다시 3시간 반응을 진행, 완료하였다. MTS 반응액을 제거한 후, DMSO(Dimethyl sulfoxide) 150 μl 씩 첨가한 뒤 5분간 교반(상온)하고 이를 마이크로플레이트 계수기(microplate reader)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0133] 그 결과, 실시예 8 내지 10의 나노에멀전은 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 세포독성이 전혀 나타나지 않았다(도 9).

[0135] **3-2. RAW 264.7세포에서의 항염증효과 확인**

[0136] RAW 264.7 세포 (1.0×10^5 cells/well)를 DMEM 배지를 이용하여 96 well plate에 접종하고, 실시예 8, 9, 10에서 얻은 나노에멀전 각각 농도별로 처리하고 1시간 뒤 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)를 함유한 새로운 배지를 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 아질산의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μl 와 Griess시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylenediamine in 5% phosphoric acid) 100 μl 를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 plate reader를 이용하여 540

nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 곡선은 sodium nitrite (NaNO_2)를 연속 희석하여 상기와 같은 방법으로 흡광도를 측정하여, 표준농도 곡선을 얻어 본 발명의 NO 농도 계산에 사용하였다.

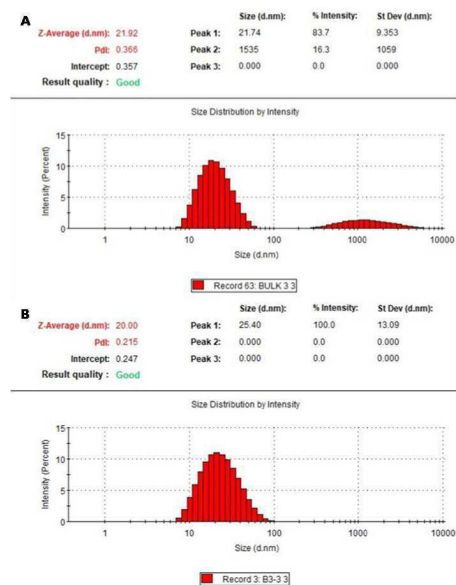
[0137] 그 결과, 실시예 8 내지 10에서 제조된 나노에멀전의 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 농도 의존적으로 감소시킴을 확인할 수 있었다(도 10).

[0139] <실험예 4> 나노에멀전 저장안정성 평가

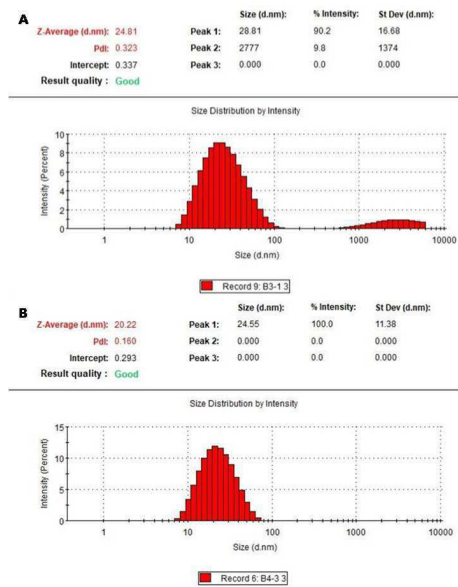
[0140] 본 발명에서, 실시예 8 내지 10에서 제조된 나노에멀전의 안전성을 평가하기 위하여, 제조된 나노에멀전을 싸이클챔버에 넣어서 저장안정성을 분석하였다. 싸이클챔버의 저장 조건은 -15, 0, 5, 15, 25, 35, 45 °C에서 각각 24시간씩 5 싸이클 저장한 후 탁도를 측정하였다. 측정한 결과 침전물은 생성되지 않은 것으로 나타났다(도 11). 또한, 저장된 나노에멀전을 상기 실험예 1 내지 3의 방법으로 각각 미백, 주름개선 및 항염증 효과를 평가한 결과, 5 싸이클 동안 본 발명의 나노에멀전의 미백, 주름개선 및 항염증 효과는 감소되지 않는 것으로 나타났다(도 12).

도면

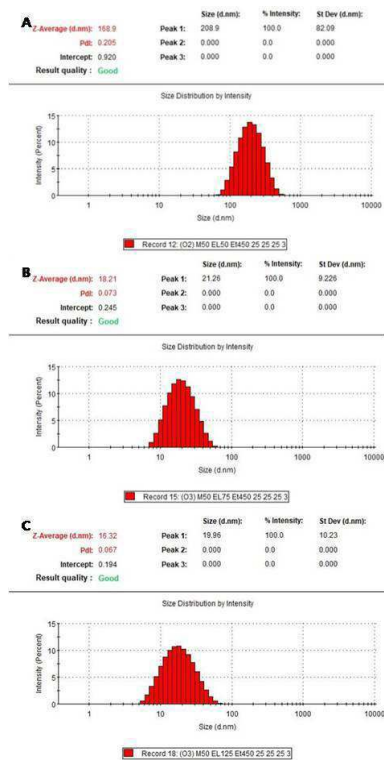
도면1



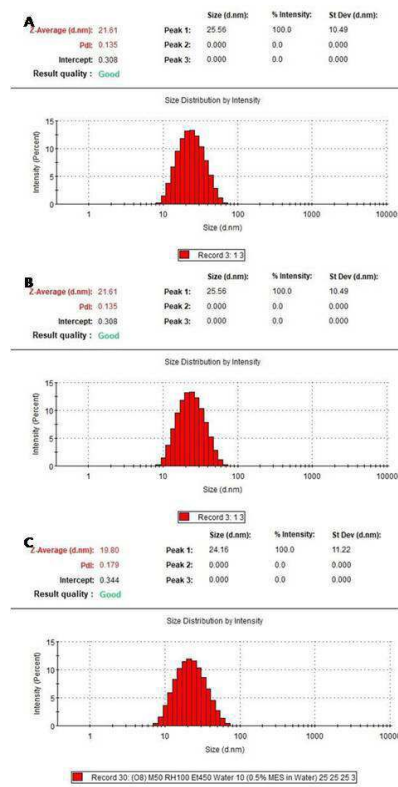
도면2



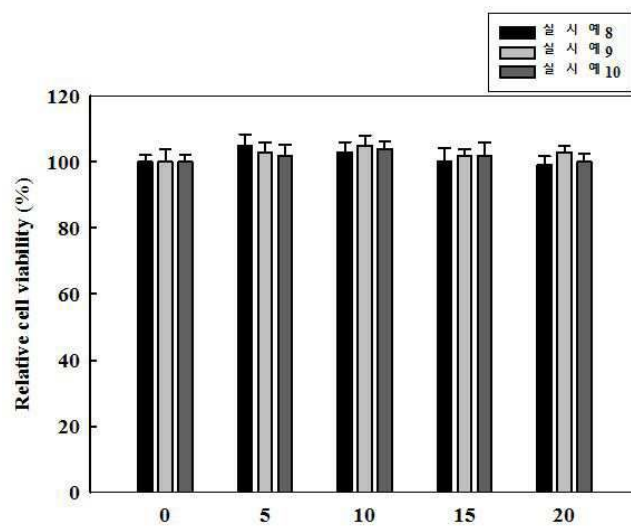
도면3



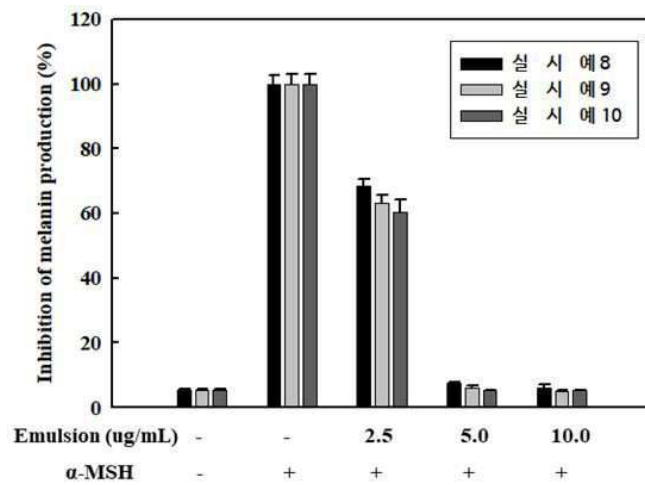
도면4



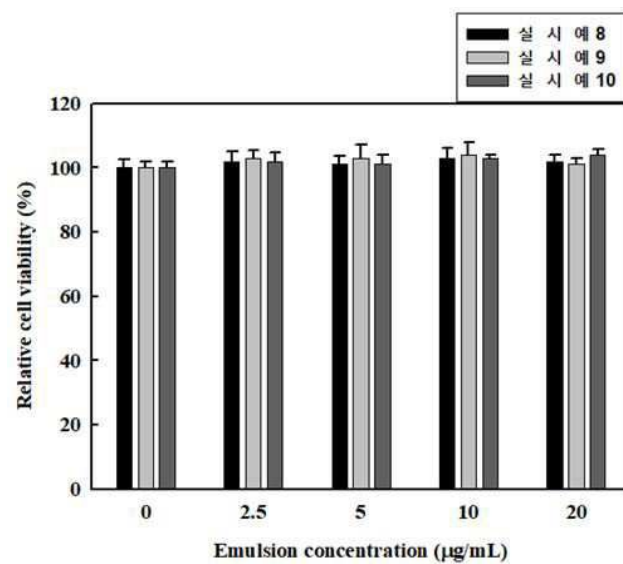
도면5



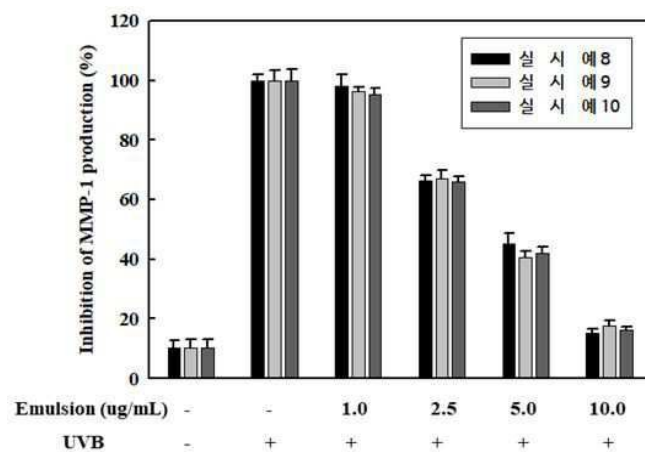
도면6



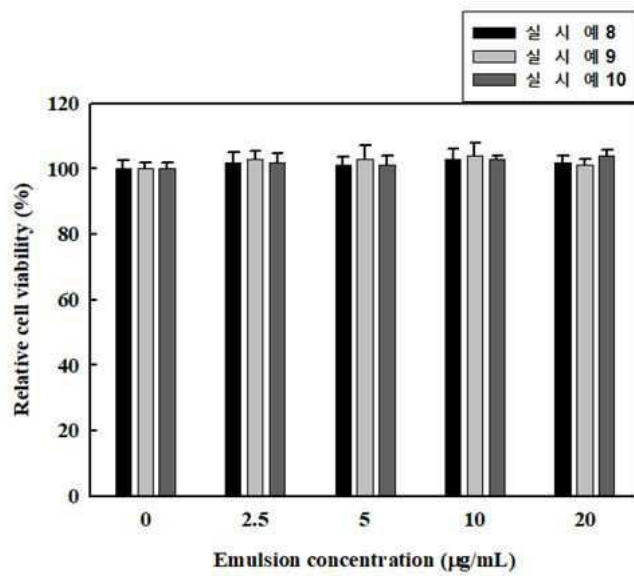
도면7



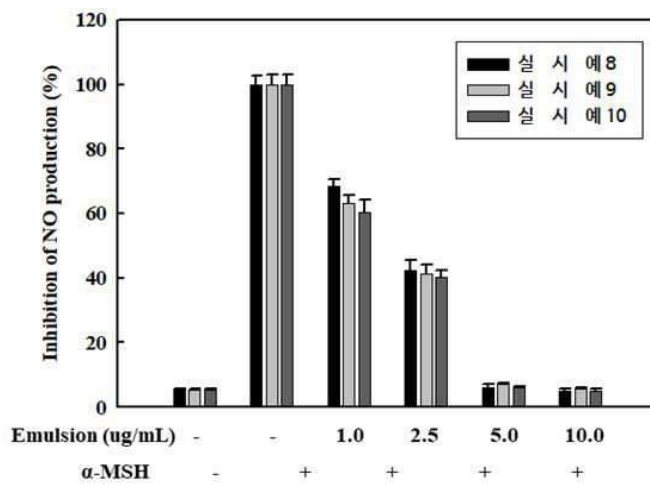
도면8



도면9



도면10



도면11



도면12

