



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0049714
(43) 공개일자 2020년05월08일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) A61K 8/60 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A61K 8/602 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-0008144(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2020년01월21일
심사청구일자 2020년01월21일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2018-0148266
원출원일자 2018년11월27일
심사청구일자 2018년11월27일</p> <p>(30) 우선권주장
1020180127494 2018년10월24일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
에스케이바이오랜드 주식회사
충청남도 천안시 동남구 병천면 송정리2길 59</p> <p>(72) 발명자
박진성
경기도 성남시 중원구 희망로 412 102동 1202호
(금광동, 단남아파트)</p> <p>이수연
경기도 화성시 동탄신리천로 1길 74(목동, 호반베르디움 센트럴포레) 1910동 1304호
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인태동</p> |
|--|--|

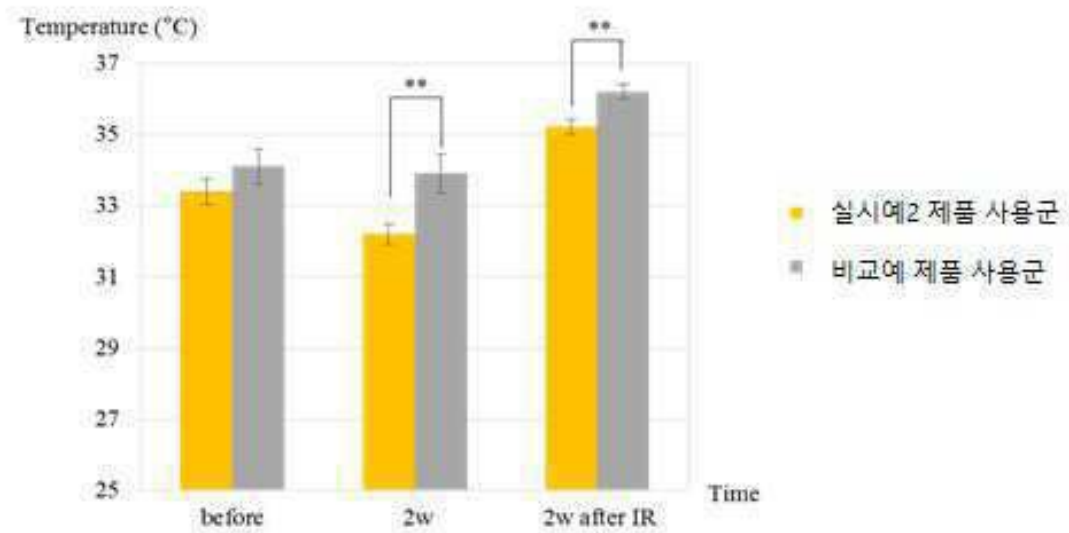
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 두충나무 껍질 추출물을 함유하는 피부 쿨링 또는 피부 홍조 완화용 화장료 조성물

(57) 요약

본 발명은 천연물 유래 물질로 이루어진 화장료 조성물로, 구체적으로는 두충나무 껍질 추출물과 두충나무 껍질 추출물 내 함유되어 있는 제니포사이드, 아우큐빈을 이용하여 외부의 노출 된 열로 인한 홍조 완화용 또는 피부 온도 상승을 억제하는 피부 쿨링용 화장료 조성물 및 그 제조방법을 제공한다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A61Q 19/00 (2013.01)

A61K 2800/782 (2013.01)

(72) 발명자

김예향

충북 청주시 청원구 오창읍 오창중앙로 105, 902동
1004호(쌍용스윗닷홈)

이상일

경기도 성남시 분당구 이매로 54 703동 104호 (이
매동, 이매촌성지아파트)

이태봉

경기도 화성시 병점3로 54, 202동 1306호 (다정마
을신한에스빌2단지아파트)

신송석

경기도 용인시 기흥구 서그내로 16번길 14 102동
503호

명세서

청구범위

청구항 1

아우큐빈(Aucubin)을 유효성분으로 함유하고 있는 것을 특징으로 하는 홍조완화용 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

제니포사이드(Geniposide)을 더욱 함유하고 있는 것을 특징으로 하는 홍조완화용 화장품 조성물.

청구항 3

아우큐빈(Aucubin)을 유효성분으로 함유하고 있는 것을 특징으로 하는 피부 온도 상승 억제용 화장품 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

제니포사이드(Geniposide)을 더욱 함유하고 있는 것을 특징으로 하는 피부 온도 상승 억제용 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 두충나무 껍질 추출물을 함유하는 피부 쿨링 또는 피부 홍조 완화용 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 인체의 약 16%를 차지하고 있는 부위로 인체의 표면을 덮고 있으며, 외부 환경과 직접적으로 접해 있어 온도, 습도와 같은 외부인자들과 밀접한 관계가 있다. 신체의 적정 체온은 36.5℃이며 피부는 5~6℃가 낮은 31℃가 적정 온도로, 적정 온도에서 너무 높거나 낮아지면 피부 건강이 저하될 수 있다.

[0003] 최근 지구는 기상관측 이래 최고 온도를 갱신하면서, 국내를 비롯한 전세계적으로 고온이 지속되었고, 현재 각국의 기후 정책을 이행하더라도 3℃ 이상의 온난화로 이어질 것이라는 분석이 나오고 있다. 지구의 온도가 상승함에 따라 자외선, 적외선 등의 외부 환경에 의해 피부의 온도도 상승되며 이로 인해 피부 노화가 가속화되고 있다. 따라서 외부 자극에 의한 피부 온도 상으로부터 피부 적정 온도를 지키는 것이 필요한 실정이다.

[0004] 피부 및 체온의 증가는 말초 면역 체계와 뇌 모두를 포함하는 복잡한 반응으로, 일반적인 열 경로에서, 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2, PGE2)의 생산에 따라 체온이 상승한다. PGE2는 발열의 주요 매개체로, 전측 시상하부에 있는 체온 조절 뉴런의 수용체에 결합하여 발열 작용을 나타내며, PGE2에 의한 혈관확장과 미세혈관 투과성 증대를 통해 감염된 조직으로의 혈류량이 증가하여 피부 홍조 및 부종이 발생하게 된다. 이와 관련하여 3D 인공 피부 모델을 이용한 실험에서 열 자극에 의해 PGE2의 생성을 증가시킨 연구 및 PGE synthase (PGES)의 발현과 이에 유도된 열충격 단백질 (Heat Shock Protein, HSP)-70의 발현도 연구된 바가 있다.

[0005] 그런데, PGE2와 관련하여 피부 열을 조절하는 것에 대해 천연물질 소재를 이용하는 연구는 미미한 실정이다. 이에 본 발명은 천연 식물 추출물을 함유하여 외부 자극으로 인한 피부 열을 조절해 줌으로써 피부 홍조 완화용 또는 피부 쿨링용 화장품 조성물을 개발하여 제공하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1860426호(등록일자:2018.05.16)는 황백 추출물을 이용한 피부냉감용 생약조성물 및 이의 제조방법과 이를 이용한 피부개선제품에 관한 것으로, 피부 및 피부속의 열화를 방지하며, 발생된 피부속열과 피부외열을 내려주는 효과 및 가려움증, 습진, 냄새, 부스럼, 발진의 예방 및 치료 개선 효과가 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 외부 자극으로 인한 피부 열을 조절해 줌으로써 열에 의해 발생하는 피부 홍조 완화 및 피부 쿨링 효과가 뛰어난 천연물의 추출물을 발굴하고, 이를 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물을 개발하여 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 아우큐빈(Aucubin)을 유효성분으로 함유하고 있는 것을 특징으로 하는 홍조완화용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0009] 한편, 본 발명에 있어서, 바람직하게 제니포사이드(Geniposide)을 더욱 함유하고 있는 것일 수 있다.
- [0010] 본 발명은 아우큐빈(Aucubin)을 유효성분으로 함유하고 있는 것을 특징으로 하는 피부 온도 상승 억제용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0011] 한편, 본 발명에 있어서, 바람직하게 제니포사이드(Geniposide)을 더욱 함유하고 있는 것일 수 있다.
- [0012] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 아우큐빈 또는 제니포사이드는 바람직하게 PGE2 합성 효소 단백질의 발현을 저해시키는 것일 수 있다.
- [0013] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 아우큐빈 또는 제니포사이드는 바람직하게 자외선에 의한 세포사멸을 저해하며, 자외선에 의해 증가된 TRPV4의 발현을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0014] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 아우큐빈 또는 제니포사이드는 바람직하게 화장품 조성물 전체 중량에 대하여 0.1 내지 20 중량%로 함유되는 것일 수 있다.
- [0015] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 화장품 조성물은, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 마디로션 또는 바디클렌저로 구성된 그룹에서 선택된 하나 이상의 제형인 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명은 두충나무 껍질 추출물과 두충나무 껍질 추출물 내 함유되어 있는 제니포사이드, 아우큐빈을 이용하여 외부의 노출된 열로 인한 홍조 완화 및 피부 온도 상승을 억제하는 피부 쿨링용 화장품 조성물 및 그 제조방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 두충나무 껍질 추출물과 두충나무 껍질 추출물 내 함유되어 있는 제니포사이드, 아우큐빈을 이용하여 자외선에 의한 세포 사멸 저해 효과, 자외선에 의해 손상이 일어나는 피부를 보호하는 열 보호 효능 및 열 처리에 의해 증가된 PGE2 합성 효소 단백질의 발현을 저해시킴으로써 항염 효능을 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용한 제니포사이드(Geniposide) 분석 결과 그래프이다.
- 도 2는 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 순도 분석한 두충나무 껍질 추출물 내 제니포사이드

(Geniposide)의 함량 분석 결과 그래프이다.

도 3은 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용한 아우큐빈(Aucubin) 분석 결과 그래프이다.

도 4는 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 순도 분석한 두충나무 껍질 추출물 내 아우큐빈(Aucubin)의 함량 분석 결과 그래프이다.

도 5는 대조군과 두충나무 껍질 추출물과 유효성분 제니포사이드(Geniposide)와 아우큐빈(Aucubin)에 대해 MTT assay를 통한 HaCaT 세포 독성 테스트를 수행한 결과 그래프이다.

도 6은 대조군과 두충나무 껍질 추출물과 유효성분 제니포사이드(Geniposide)와 아우큐빈(Aucubin)에 대해 JC-1 staining에 따른 염색 정도를 비교한 사진이다.

도 7은 대조군과 두충나무 껍질 추출물과 유효성분 제니포사이드(Geniposide)와 아우큐빈(Aucubin)에 대해 UVB에 대한 조사 후, 관련 유전자 TRPV4의 mRNA 발현 정도를 비교한 그래프이다.

도 8은 대조군과 두충나무 껍질 추출물과 유효성분 제니포사이드(Geniposide)와 아우큐빈(Aucubin)에 대한 PGE2 합성 효소 단백질의 발현 정도를 비교한 그래프이다.

도 9는 두충나무 껍질 추출물 함유 겔(실시예 2) 제품 사용군과 두충나무 껍질 추출물 비함유 겔(비교예) 제품 사용군에 대해 각 제품의 사용 전후에 따른 피부 표면 온도의 비교 그래프를 나타낸 것이다.

도 10은 두충나무 껍질 추출물 함유 겔(실시예 2) 제품 사용군과 두충나무 껍질 추출물 비함유 겔(비교예) 제품 사용군에 대해 각 제품의 사용 전후에 따른 피부 혈류량의 비교 그래프를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 아우큐빈(Aucubin)을 유효성분으로 함유하고 있는 것을 특징으로 하는 홍조완화용 화장품 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 아우큐빈(Aucubin)을 유효성분으로 함유하고 있는 것을 특징으로 하는 피부 온도 상승 억제용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0021] 아우큐빈(Aucubin)은 이리도이드 배당체의 성분으로 천연식물에서 주로 발견되는 물질인데, 간 손상 보호, 면역 증진, 통풍 치료 등에 약리효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.
- [0022] 한편, 본 발명에 있어서, 바람직하게 제니포사이드(Geniposide)를 더욱 함유하고 있는 것일 수 있다.
- [0023] 제니포사이드(Geniposide)는 이리도이드 배당체의 성분으로 천연식물의 약 40종에 존재하는 물질인데, 항염, 항산화, 면역조절 등에 약리효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.
- [0024] 한편, 본 발명에 있어서, 바람직하게 상기 아우큐빈 또는 제니포사이드는 두충나무 껍질 유래인 것일 수 있다.
- [0025] 두충나무(*Eucommia ulmoides*)는 두충과에 속하는 낙엽교목으로, 잎은 타원형으로 어긋나며, 열매는 편평한 긴 원형으로 자르면 고무같은 점질의 실이 나오고, 껍질을 건조시킨 것은 한약재로 쓰인다. 두충나무의 껍질은 두충, 어린 잎은 면아라 하며 약용으로 쓰이는데, 요통, 신경통 및 고혈압 치료, 진통 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 본 발명에 있어서, 상기 두충나무 껍질은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 다양한 추출 방법을 이용하여 추출할 수 있다. 예를 들면, 정제수, 메탄올, 에탄올, 글리세린, 에틸아세테이트, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 디클로로메탄, 헥산 용매를 각각 단독 또는 이들을 2종 이상 혼합한 혼합용매를 추출용매로 이용하여 추출할 수 있다. 본 발명에서는 바람직하게는 두충나무 껍질을 건조하고 분쇄한 후 에탄올을 사용하여 두충나무 껍질 추출물을 획득한 후, 여과기로 여과시키고 이를 농축시킨 다음, 부틸렌 글라이콜을 첨가하여 제조된 두충나무 껍질 추출물을 얻을 수 있다.
- [0026] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 아우큐빈 또는 제니포사이드는 바람직하게 PGE2 합성 효소 단백질의 발현을 저해시키는 것일 수 있다. 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2, PGE2)는 생체 내에서 합성된 생리활성물질의 일종으로, 발열의 주요 매개체로 작용하여 전측 시상 하부에 있는 체온 조절 뉴런의 수용체에 결합하여 발열 작용을 나타냄으로써 체온 상승에 역할을 한다. 또한, PGE2에 의한 혈관확장과 미세혈관 투과성 증대를 통해 감염된 조직으로의 혈류량이 증가하여 피부 홍조 및 부종이 발생하게 된다.
- [0027] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 아우큐빈 또는 제니포사이드는 바람직하게 자외선에 의한 세포사멸을 저해하며, 자외선에 의해 증가된 TRPV4의 발현을 감소시키는 것일 수 있다. 이에 본 발명에 있어서, 상기 아우큐빈 또는 제니포사이드는 자외선에 의한 세포 사멸 저해 효과, 자외선에 의해 손상이 일어나는 피부를 보호하는 열 보호

효능을 발휘할 수 있다.

[0028] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 상기 제니포사이드(Geniposide) 또는 아우큐빈(Aucubin)은 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 0.1 내지 20 중량%로 함유하는 것이 좋다.

[0029] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 상기 화장료 조성물은, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 또는 바디클렌저로 구성된 그룹에서 선택된 하나 이상의 제형인 것일 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 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.

[0032] 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.

[0034] [실시예 1 : 두충나무 껍질 추출물의 제조]

[0035] 두충나무 껍질을 건조하고 분쇄한 후 50%의 에탄올에 두충나무 : 50% 에탄올 = 1:5, 바람직하게는 1:8의 중량% 비율로 30~80℃에서 1~5일, 바람직하게는 50℃에서 1일 동안 교반시켜 두충나무 껍질 추출물을 획득하였다. 다음으로, 메시크기 0.1~10 μm, 바람직하게는 1 μm ~ 0.3 μm의 메시크기를 가진 여과기로 두충나무 껍질 추출물을 여과시켰다. 여과된 두충나무 껍질 추출물을 대략 40~70℃, 바람직하게는 60℃ 온도에서 농축시켜 농축액을 제조하였다. 제조된 농축액에 부틸렌 글라이콜을 첨가하여 10~50 중량%, 바람직하게는 30% 중량%가 되도록 첨가하여 두충나무 껍질 추출물을 제조하였다.

[0037] [실험예 1 : 두충나무 껍질 추출물의 함량 분석]

[0038] 본 실험예에서는 상기 실시예 1의 추출물에 대해 두충나무 껍질 추출물의 유효성분인 표 1(제니포사이드), 표 2(아우큐빈) 함량 분석을 실시하였다. 기재된 조건의 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 순도 분석을 하였고, 그 결과를 하기 표 3과 도 1, 도2, 도3, 도4에 나타내었다.

표 1

[0039] 제니포사이드(Geniposide)의 함량 분석을 위한 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용한 순도 분석 조건

컬럼(Column)	Capcell Pak C18 4.6 X 250mm (Shiseido HPLC Column)
컬럼온도(Column temperature)	35℃
유속(Flowrate)	1.0mL/min
측정기(Detector)	UV 239nm
분석시간(Analysis time)	30 min
주입부피(Injection Volume)	20μl
이동상(Mobile phase)	Acetonitrile : Deionize Water= 15 : 85

표 2

[0040] 아우큐빈(Aucubin)의 함량 분석을 위한 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용한 순도 분석 조건

컬럼(Column)	Capcell Pak C18 4.6 X 250mm (Shiseido HPLC Column)
컬럼온도(Column temperature)	35℃
유속(Flowrate)	0.5mL/min
측정기(Detector)	UV 210nm
분석시간(Analysis time)	30 min

주입부피(Injection Volume)	20 μ l
이동상(Mobile phase)	Acetonitrile : Deionize Water= 5 : 95

표 3

고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용한 순도 분석 결과

지표물질	두충나무 추출물(ppm)
Geniposide	250 ~ 350
Aucubin	700 ~ 1,200

[실험예 2 : 두충나무 껍질 추출물의 세포 독성 평가(MTT assay)]

본 실험예에서는 상기 실시예 1의 두충나무 껍질 추출물과 그 유효성분인 제니포사이드(Geniposide), 아우큐빈(Aucubin)의 세포독성을 측정하였다.

24-well plate 에 각질형성 세포(HaCaT)를 접종하여 24 시간 배양한 뒤, 배양된 세포의 배지를 serum free 배지로 교체하고 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 세포에 2.5 mg/ml 의 MTT 용액을 10 배 희석시킨 배지로 교체하여 반응시킨 후 상등액을 제거하고 DMSO 1 ml 을 첨가하여 생성된 MTT-formazan 결정체를 용해시켜 ELISA Reader로 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성은 대조군과 비교하여 흡광도의 백분율로 나타내며, 이는 하기 표 4에 나타내었다.

하기 표 4 및 도 5에 표기된 바와 같이, 두충나무 껍질 추출물과 지표성분 제니포사이드와 아우큐빈의 효능 평가를 위해 시료 농도를 정하기 위하여 MTT assay를 통한 HaCaT 세포 독성 테스트를 수행한 결과, 두충나무 껍질 추출물은 250 ug/ml 농도에서부터 독성이 나타났고 Geniposide, Aucubin은 독성이 나타나지 않았다.

표 4

Sample	Conc. (μ g/ml)	Cell viability (%)	Stdev.
Control		100.0	0.8
두충나무 껍질 추출물	1	101.0	2.8
	10	100.4	0.8
	25	97.8	2.7
	50	105.1	1.9
	100	102.8	1.2
	250	85.2	1.3
	500	61.9	1.2
Geniposide	0.1	101.6	1.3
	1	104.6	4.1
	2.5	101.9	0.8
	5	98.4	0.8
	10	100.8	0.9
	25	97.5	2.2
	50	101.2	1.7
	100	96.3	1.0
Aucubin	0.1	100.4	1.7
	1	103.4	4.4
	2.5	102.2	3.1
	5	101.7	4.7
	10	100.0	2.9
	25	105.9	2.4
	50	105.2	4.6
	100	96.2	2.1

[0049] [실험예 3 : 두충나무 껍질 추출물의 광보호 효능 확인]

[0050] 본 실험예에서는 상기 실시예 1의 두충나무 껍질 추출물과 그 유효성분인 제니포사이드, 아우큐빈의 광보호 효능을 측정하였다.

[0051] 미토콘드리아의 세포막 전위변화를 검증하기 위해, 각질세포(Human keratinocyte)를 35 mm plate 에 분주하여 24 시간 안정화한 후, serum-free medium 으로 교체하고 샘플을 처리하였다. 1시간 뒤, HBSS(Hank's Balanced Salt solution)버퍼로 세척 후 fresh HBSS 를 첨가한 뒤 UVB 50 mJ/cm²을 조사하였다. 그 후, Serum-free medium 으로 배지를 교체한 뒤 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator 에서 24 시간 배양하였다. 배지 제거 후 1 µg/ml 의 JC-1 solution 을 처리하여 37° C, 5% CO₂ incubator 에서 빛이 없는 상태로 2 시간 반응시킨 뒤 배지를 제거하고 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0052] 두충나무 껍질 추출물 및 그 유효성분인 제니포사이드, 아우큐빈을 대조군인 UVB 처리군과 비교하여 염색된 정도를 확인한 결과, 도 6과 같이, 실시예 1의 경우 100 ug/ml 농도에서 Apoptosis 저해효능이 나타났다. 제니포사이드는 처리한 농도 전 범위에서 효능을 보였으며, 특히 저농도에서 UVB 조사군 대비 붉은 형광과 cell수가 크게 증가한 것을 확인하였다. 아우큐빈 역시 Apoptosis 저해효능이 나타났으며, 특히 저농도에서 효능을 나타내었다. 따라서 두충나무 껍질 추출물 및 지표성분 제니포사이드와 아우큐빈은 UVB에 의한 세포사멸을 저해하는 효능이 높은 것으로 판단된다.

[0054] [실험예 4 : 두충나무 껍질 추출물의 열보호 효능 확인]

[0055] 본 실험예에서는 상기 실시예 1의 두충나무 껍질 추출물과 그 유효성분인 제니포사이드, 아우큐빈을 통한 피부 열보호 효능을 측정하였다.

[0056] 6 well multidish에 HEKn cell을 접종하여 24시간 배양한 뒤, 배양된 세포의 배지를 HBSS로 교체 후 UVB 100 mJ/cm² 을 조사를 하였다. 그 후serum-free 배지로 교체하고 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 세포를 TRIzol로 모아 제조사의 방법에 따라 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 뒤 2 µg의 RNA로 cDNA를 합성하여 Real-Time PCR을 실시하였다. 이는 하기 표 5와 6에 나타내었다.

[0057] Real-Time PCR 실험 결과, 도 7과 같이, 두충나무 껍질 추출물은 UVB에 의해 증가된 TRPV4의 발현을 농도의존적으로 감소시켰고, 유효성분으로 사용된 제니포사이드와 아우큐빈도 TRPV4의 발현을 크게 감소시켰다. 따라서 두충나무 껍질 추출물과 지표성분 제니포사이드와 아우큐빈은 자외선에 의해 손상이 일어나는 피부를 보호하는 열보호 효능이 있는 것으로 판단된다.

표 5

Sample	Conc. (µg/ml)	TRPV4 Expression rate (% UVB, Actin 보정)	Stdev.
Control		74.4	2.9
UVB 100mJ/cm ²		100.0	0.0
Vitamin C	10	84.5	2.3
두충나무 껍질 추출물	10	76.7	1.0
	50	64.4	1.9
	100	59.9	4.2

표 6

Sample	Conc. (µg/ml)	TRPV4 Expression rate (% UVB, Actin 보정)	Stdev.
Control		76.3	1.3
UVB 100mJ/cm ²		100.0	0.0
Vitamin C	10	79.0	0.8

Geniposide	0.1	91.6	2.0
	1	82.1	6.2
	2.5	60.6	5.7
	5	56.7	1.9
Aucubin	0.1	71.2	4.0
	1	56.3	1.8
	5	51.6	2.8
	10	50.7	5.6

[0061] [실험예 5 : 두충나무 껍질 추출물의 피부 쿨링 효능 확인]

[0062] 본 실험예에서는 상기 실시예 1의 두충나무 껍질 추출물과 그 유효성분인 제니포사이드, 아우큐빈이 피부 쿨링 효과에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 피부 온도 상승에 관여하는 PGE2 synthase 단백질 발현을 측정하였다.

[0063] 6 well multidish에 normal human dermal fibroblast cell을 접종하여 24시간 배양한 뒤, 배양된 세포의 배지를 HBSS로 교체 후 Infrared ray를 20분 조사하였다. 그 후 serum-free 배지로 교체하고 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 단백질을 분리한 뒤, SDS-PAGE를 통해 두충나무 껍질 추출물과 그 유효성분인 제니포사이드, 아우큐빈의 PGE2 synthase 단백질 발현 저해 효능을 측정하였다. 이는 하기 표 7, 도 8에 나타내었다.

표 7

[0064]

Sample	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PGE2 synthase Expression rate (% IR, GAPDH 보정)
Control		88.53
Infrared ray		100.00
IR + 두충나무 껍질 추출물	25	94.83
	50	89.21
	100	88.20
IR + Aucubin	1.75	96.27
	3.5	94.77
	7	73.89
IR + Geniposide	0.5	74.71
	1	76.85
	2	78.24

[0066] 표 7 및 도 8과 같이, 두충나무 껍질 추출물과 지표성분 제니포사이드와 아우큐빈은 열 처리에 의해 증가된 PGE2 합성 효소 단백질의 발현을 저해시켰다. 따라서 두충나무 껍질 추출물과 지표성분 제니포사이드와 아우큐빈은 열 처리에 의해 증가된 PGE2 합성 효소 단백질의 발현을 저해시킴으로써 피부 쿨링 효능이 있는 것으로 판단된다.

[0068] [실시예 2 : 두충나무 껍질 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제조]

[0069] 본 실시예에서는 본 발명의 화장료 조성물의 일 예로 겔을 제조하였다.

[0070] 상기 실시예 1의 두충나무 껍질 추출물을 5.0 중량% 함유하는 겔을 제조하였다. 한편, 두충나무 껍질 추출물을 함유하는 겔의 효능을 확인하기 위해 두충나무 껍질 추출물을 포함하지 않는 겔(비교예)을 제조하였다. 하기 표 8은 실시예 2 및 비교예의 화장료 조성물에 대한 함량을 나타낸 것이다.

표 8

[0071] 실시예 2 및 비교예의 조성

성분	실시예2 함량 (중량%)	비교예 함량 (중량%)
Glycerin	10.0	10.0
Butylene Glycol	1.5	1.5
Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	0.5	0.5
PEG-60 Hydrogenated Castor Oil	0.5	0.5
Sodium Hydroxide(20% Sol.)	0.3	0.3
Water	81.6	86.6
<i>EUCOMMIA ULMOIDES BARK EXTRACT</i>	5.0	-
1,2-Hexanediol	0.2	0.2
Ethylhexylglycerin	0.1	0.1
Phenoxyethanol	0.2	0.2
향	0.1	0.1
Total	100	100

[0073] [실시예 3 : 두충나무 껍질 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제조]

[0074] 본 실시예에서는 본 발명의 화장료 조성물의 일 예로 크림을 제조하였다.

[0075] 상기 실시예 1의 두충나무 껍질 추출물을 5.0 중량% 함유하는 크림을 제조하였다. 하기 표 9는 실시예 3 및 비교예의 화장료 조성물에 대한 함량을 나타낸 것이다.

표 9

[0076] 실시예 3 및 비교예의 조성

성분	실시예3 함량 (중량%)	비교예 함량 (중량%)
Glycerin	8.0	8.0
Butylene Glycol	2.0	2.0
Carbomer	0.5	0.5
Hydroxyethylcellulose	0.1	0.1
Sodium Hydroxide(20% Sol.)	0.3	0.3
Water	71.3	76.3
<i>EUCOMMIA ULMOIDES BARK EXTRACT</i>	5.0	-
Cetearyl Olivat, Sorbitan Olivat	2.0	2.0
Glyceryl Stearate, PEG-100 Stearate	2.0	2.0
Cyclopentasiloxane, Cyclohexasiloxane	3.0	3.0
Caprylic/Capric Triglyceride	5.0	5.0
1,2-Hexanediol	0.3	0.3
Ethylhexylglycerin	0.1	0.1
Phenoxyethanol	0.3	0.3
향	0.1	0.1
Total	100	100

[0078] [실시예 4 : 두충나무 껍질 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제조]

[0079] 본 실시예에서는 본 발명의 화장료 조성물의 일 예로 선크림을 제조하였다.

[0080] 상기 실시예 1의 두충나무 껍질 추출물을 5.0 중량% 함유하는 선크림을 제조하였다. 하기 표 10은 실시예 4 및 비교예의 화장료 조성물에 대한 함량을 나타낸 것이다.

표 10

[0081] 실시예 4 및 비교예의 조성

성분	실시예4 함량 (중량%)	비교예 함량 (중량%)
Glycerin	2.0	2.0
Butylene Glycol	5.0	5.0
Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	0.5	0.5
Titanium Dioxide	3.2	3.2
Zinc Oxide	1.8	1.8
Sodium Hydroxide(20% Sol.)	0.3	0.3
Water	60.4	65.4
<i>EUCOMMIA ULMOIDES</i> BARK EXTRACT	5.0	-
1,2-Hexanediol	0.3	0.3
Ethylhexylglycerin	0.1	0.1
Phenoxyethanol	0.3	0.3
향	0.1	0.1
Ethylhexyl Methoxycinnamate	7.5	7.5
Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine	3.0	3.0
Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate	1.0	1.0
C12-15 Alkyl Benzoate	5.0	5.0
Cetearyl Olivat, Sorbitan Olivat	3.5	3.5
Polyacrylate-13, Polyisobutene, Polysorbate 20, Sorbitan isostearate	1.0	1.0
Total	100	100

[0083] [실시예 5 : 두충나무 껍질 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제조]

[0084] 본 실시예에서는 본 발명의 화장료 조성물의 일 예로 BB크림을 제조하였다.

[0085] 상기 실시예 1의 두충나무 껍질 추출물을 5.0 중량% 함유하는 BB크림을 제조하였다. 하기 표 11은 실시예 5 및 비교예의 화장료 조성물에 대한 함량을 나타낸 것이다.

표 11

[0086] 실시예 5 및 비교예의 조성

성분	실시예4 함량 (중량%)	비교예 함량 (중량%)
Glycerin	5.0	5.0
Butylene Glycol	5.0	5.0
NaCl	1.0	1.0
1,2-Hexanediol	0.9	0.9
Ethylhexylglycerin	0.1	0.1
Water	42.9	47.9
<i>EUCOMMIA ULMOIDES</i> BARK EXTRACT	5.0	-
Polyglyceryl-2 Oleate, Polyhydroxystearic acid, Polyglyceryl-2 Stearate	5.0	5.0
Beeswax	2.0	2.0
Sorbitan Olivat	1.0	1.0
Polyglyceryl-3 Polyricinoleate	2.0	2.0
Dicaprylyl Ether	10.0	10.0
Color Base	20.0	20.0
향	0.1	0.1
Total	100	100

[0088] 상기 실시예 2 내지 5와 같이 두충나무 껍질 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제조가 가능하다. 하기 표 12는 실시예 2 내지 5의 화장료 조성물에서의 분류를 나타낸 것이다.

표 12

[0089]

기초	가용화타입(세럼)	실시예 2
	유화타입(크림)	실시예 3
	분산타입(선크림)	실시예 4
색조	BB 크림	실시예 5

[0091]

[실험예 6 : 본 발명 화장료 조성물의 피부 표면 온도 저해 효능 및 피부 혈류량 저해 효능 확인]

[0092]

본 실험예에서는 상기 실시예 2 내지 5의 화장료 조성물 중 일례로 실시예 2의 두충나무 껍질 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 피부 표면 온도 저해능 및 피부 혈류량 저해능을 확인하고자 하였다.

[0094]

(1) 피험자 기본 정보

[0095]

본 인체 적용 시험에 참가한 피험자에 대한 정보는 다음 표 13과 같다.

표 13

[0096]

시험에 참여한 피험자 수 (명)	21명
최종 완료 피험자 수 (명)	20명 (1명 탈락: 추적관찰 불가)
전체 평균 연령 (표준 편차)	31.5 ± 14.63 세
성별	여성

[0098]

(2) 피부 표면 온도 측정 결과

[0099]

제품을 2주간 사용 후 시험 기관을 방문하여 제품 사용 전 (before), 제품 사용 2주 후 (2w)에 측정을 진행하였으며, 제품 사용 2주 후 적외선 램프를 이용하여 인위적으로 피부 온도를 높이는 실험적 온도 조건을 설정한 후 (After IR) 피부 표면 온도의 변화를 측정하였다. 피부 표면 온도 측정 결과는 하기 표 14, 도 9와 같다.

표 14

[0100]

피부표면온도 평균값 (평균±표준오차)

측정시간		Before (℃)	2w (℃)	After IR (℃)
평균	실시예2	33.4±0.36	32.2±0.28 ^{a,c}	35.2±0.22 ^d
	비교예	34.1±0.48	33.9±0.54 ^b	36.2±0.20

[0101]

^a: 실시예2, Before vs. 2w: paired t-test, significant: p<0.001

[0102]

^b: 비교예, Before vs. 2w: paired t-test, no significant

[0103]

^c: 2w, 실시예2 vs. 비교예: independent t-test, significant: p<0.05

^d: After IR, 실시예2 vs. 비교예: independent t-test, significant: p<0.05

표 14 및 도 9의 결과와 같이, 실시예 2 제품 사용군은 사용 전과 비교하여 사용 2주 후 피부 표면 온도가 통계적으로 유의하게 낮았으며, 비교예 사용군은 사용 전과 비교하여 사용 2주 후 통계적인 차이가 없었다. 제품 사용 2주차에 실시예2 사용군의 피부 표면 온도가 통계적으로 유의하게 낮았으며, 제품 사용 2주차에 두 군을 열처리한 후 피부 표면 온도를 비교 평가한 결과, 실시예2 사용군의 피부 표면 온도가 통계적으로 유의하게 낮았다.

따라서, 두충나무 껍질 추출물은 피부 온도 저해 효능을 나타내는 물질로 이용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

(3) 피부 혈류량 측정 결과

제품을 2주간 사용 후 시험 기관을 방문하여 제품 사용 전 (before), 제품 사용 2주 후 (2w)에 측정을 진행하였으며, 제품 사용 2주 후 적외선 램프를 이용하여 인위적으로 피부 온도를 높이는 실험적 온도 조건을 설정한 후 (After IR) 피부 혈류량의 변화를 측정하였다. 피부 혈류량 측정 결과는 다음 표 15 및 도 10과 같다.

표 15

측정시간		Before (℃)	2w (℃)	After IR (℃)
평균	실시예2	216±16.2	181±18.3 ^{a, c}	230±25.6 ^d
	비교예	256±17.3	259±21.3 ^b	334±31.0

^a: 실시예2, Before vs. 2w: paired t-test, significant: p<0.05

^b: 실시예3, Before vs. 2w: paired t-test, no significant

^c: 2w, 실시예2 vs. 비교예: independent t-test, significant: p<0.05

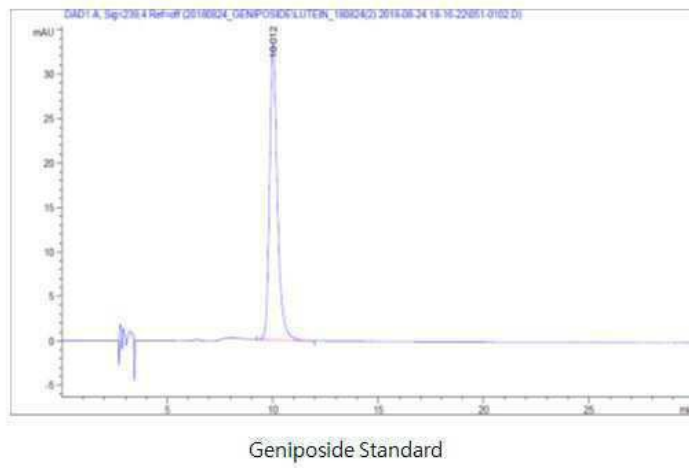
^d: After IR, 실시예2 vs. 비교예: independent t-test, significant: p<0.05

표 15 및 도 10의 결과와 같이, 실시예 2 제품 사용군은 사용 전과 비교하여 사용 2주 후 피부 혈류량이 통계적으로 유의하게 낮았으며, 비교예 사용군은 사용 전과 비교하여 사용 2주 후 통계적인 차이가 없었다. 제품 사용 2주차에 실시예2 사용군의 피부 혈류량이 통계적으로 유의하게 낮았으며, 제품 사용 2주차에 두 군을 열처리한 후 혈류량을 비교 평가한 결과, 실시예2 사용군의 피부 혈류량이 통계적으로 유의하게 낮았다. 따라서, 두충나무 껍질 추출물은 피부 혈류량 저해 효능을 나타내는 물질로서 피부 홍조 완화에 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

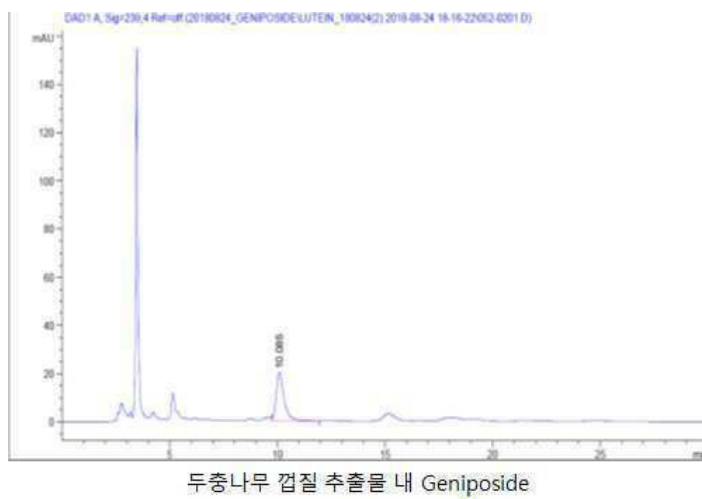
이상 종합하면, 본 발명의 두충나무 껍질 추출물 및 그 유효성분 제니포사이드와 아우큐빈은 자외선에 의한 세포 사멸 저해 효과, 자외선에 의해 손상이 일어나는 피부를 보호하는 열 보호 효능 및 열 처리에 의해 증가된 PGE2 합성 효소 단백질의 발현을 저해시킴으로써 항염 효능이 있는 것을 확인하였다. 또한, 두충나무 껍질 추출물을 함유하는 화장품 조성물은 피부 온도 저해 효능 및 피부 혈류량 저해 효능이 뛰어난 것을 확인하였는데, 이는 두충나무 껍질 추출물 및 그 유효성분의 PGE2와 같은 온도 조절 분자 감소에 따른 것임을 알 수 있다.

도면

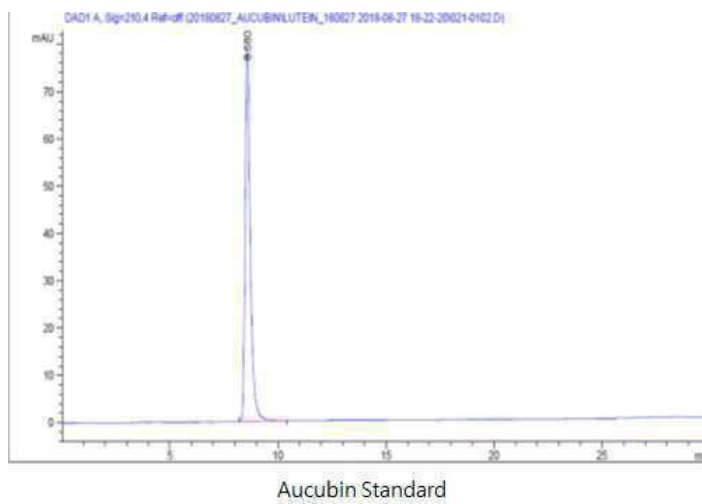
도면1



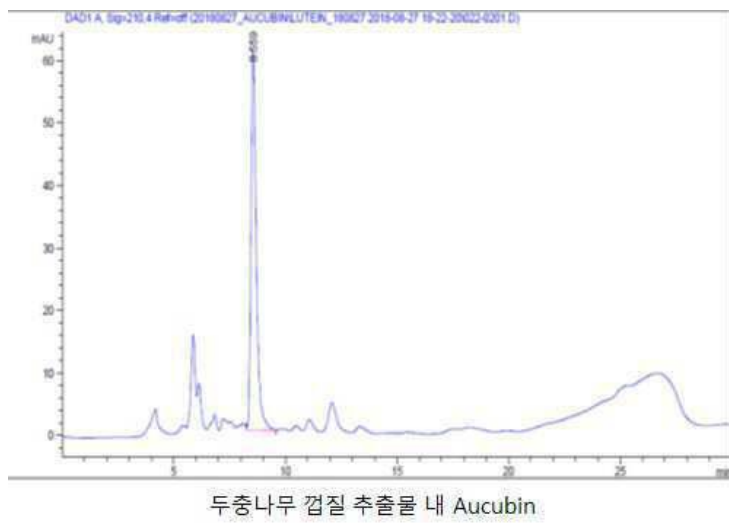
도면2



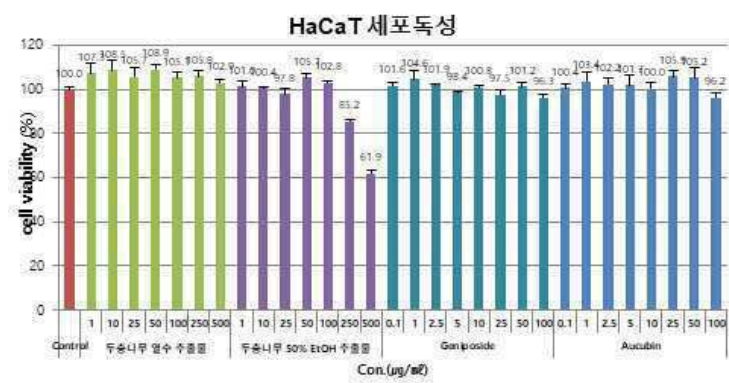
도면3



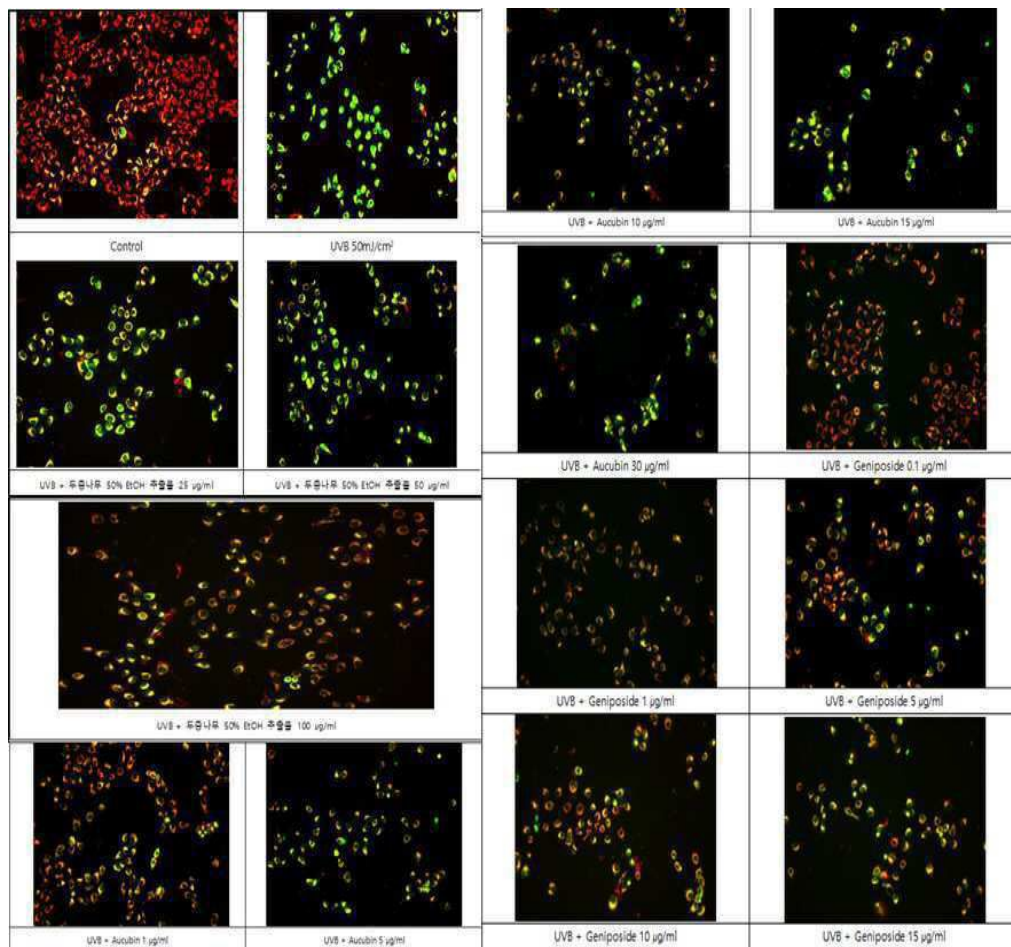
도면4



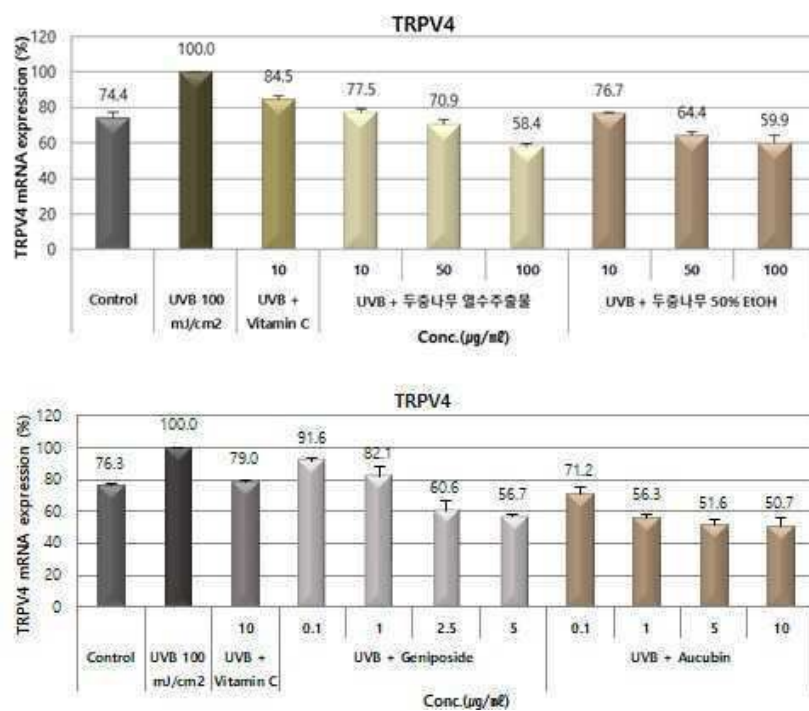
도면5



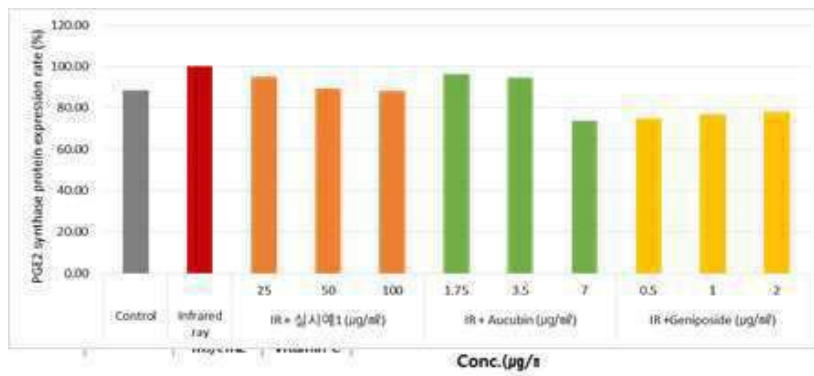
도면6



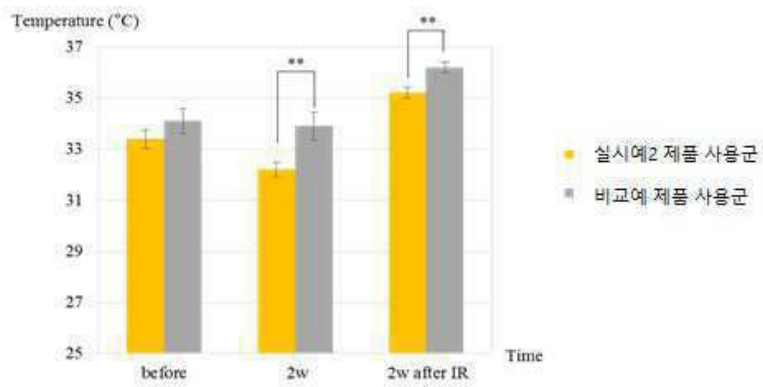
도면7



도면8



도면9



도면10

