



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년05월24일
(11) 등록번호 10-1267321
(24) 등록일자 2013년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/98 (2006.01) A61K 8/19 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0016744
(22) 출원일자 2011년02월24일
심사청구일자 2011년02월24일
(65) 공개번호 10-2012-0097262
(43) 공개일자 2012년09월03일
(56) 선행기술조사문헌
KR1019990024216 A*
KR1020040067377 A*
KR1020080088013 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인 전라남도생물산업진흥재단
전라남도 나주시 동수동 산15-12
(72) 발명자
정용기
전라남도 장흥군 장흥읍 건산리 미래2차아파트
1405호
박성윤
전라남도 화순군 화순읍 광덕로 215, 부영아파트
606동 705호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 3 항

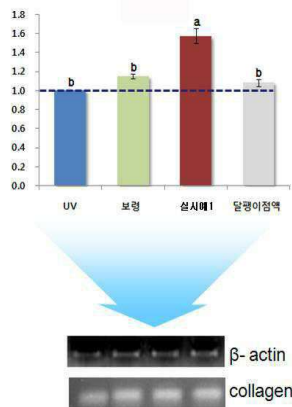
심사관 : 김용원

(54) 발명의 명칭 지렁이 점액 및 머드를 유효성분으로 포함하는 피부재생 및 피부주름개선용 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 지렁이 점액 및 머드를 유효성분으로 포함하는 피부재생 및 피부주름개선용 화장품 조성물에 관한 것으로, 특히 본 발명의 화장품 조성물은 양이온 치환용량 및 전기전도도가 높고, 휴믹산, 펠빅산, 휴민이나 유기물의 함량이 높으며, 칼슘 이온과 마그네슘 이온의 함량이 높은 장흥산 머드와 스트레스를 받지 않고 살아있는 상태에서 추출한 지렁이 점액을 유효성분으로 포함하여 현저히 우수한 피부재생 효과 및 피부주름개선 효과를 나타내고, 이러한 고부가가치의 기능성 화장품 조성물을 통해 전라남도 장흥지역 천연물의 우수성을 널리 알리는 것과 함께 지역소득 증대 및 지역경제 활성화를 달성할 수 있다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

이동욱

전라남도 장흥군 장흥읍 건산리 수창아트빌 203호

김재갑

경기도 부천시 소사구 경인로134번길 27, 2동 507호 (송내동, 삼익아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

지렁이 점액 및 머드를 유효성분으로 포함하고,

상기 지렁이 점액은 지렁이 체내에 있는 변을 배설하게 한 다음 물로 세척하는 전처리 단계; 및 상기 전처리한 지렁이를 물이 담겨진 용기에 넣고 10~30 ℃에서 20~60 분간 침지시켜 지렁이로부터 점액을 추출하는 단계;를 통해 얻은 지렁이 점액인 것을 특징으로 하는 피부재생용 화장품 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 머드는 장홍산 머드인 것을 특징으로 하는 피부재생용 화장품 조성물.

청구항 4

제 1 항 또는 제3항에 있어서, 고형분 기준으로 상기 지렁이 점액 0.001 ~ 0.1 중량% 및 머드 0.5 ~ 10 중량%를 함유하고, 스킨, 로션, 에센스, 영양크림 및 팩 중에서 선택된 어느 하나의 형태로 제조되는 것을 특징으로 하는 피부재생용 화장품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 피부재생 및 피부주름개선이 가능한 천연물을 원료로 한 기능성 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 머드(MUD)는 천연 바다 진흙으로 원적외선이 다량 방출되고 미네랄이 풍부할 뿐만 아니라 게르마늄 및 벤토나이트 등의 유익한 성분이 함유되어 있어 피부세포 호흡촉진으로 피부노화 방지, 수분균형 유지, 피부정정 작용 및 피부노폐물 제거 등의 탁월한 효능을 가지고 있음이 알려져 있다.

[0003] 한국무역협회 통계에 따르면 국내에서 머드의 대부분은 수입에 의존하고 있으며, 특히 그 중에서도 이스라엘 사해머드, 캐나다 콜롬비아 해안의 빙하머드, 러시아 바이칼머드, 캘리포니아 클레이머드, 뉴질랜드 화산머드가 세계적으로 잘 알려져 있으며 최근 보령 및 북한 등지에서 일부 제조되어 제품화되고 있다.

[0004] 머드를 활용한 화장품 관련 기술은 한국공개특허 제2002-0087590호의 원적외선 에너지가 방출하는 화장품 원료 머드 제조 조성물, 한국공개특허 제2001-0090063호의 머드 팩의 조성물, 한국공개특허 제2003-0060426호의 머드를 함유하는 바디페인팅용 색조화장품 조성물, 한국공개특허 제2004-0022868호의 머드를 함유하는 머드 칼라크림 조성물, 한국등록특허 10-0515956호의 머드와 허브 및 흑미분말을 함유한 화장품 조성물, 한국공개특허 제2004-0067377호의 머드추출물과 허브오일을 함유한 화장품 조성물 등 다수의 특허기술이 개시되어 있다.

[0005] 또한 특정 지역의 머드를 이용한 것으로, 보령산 머드를 이용한 기술로는 한국공개특허 제2001-0079027호의 보령산머드로부터 피부 보습효과 및 세포 성장효과를 갖는 화장품원료를 추출하는 방법과, 한국공개특허 제1998-0034570호의 보령산 진흙을 함유하는 피부화장료 조성물과, 한국공개특허 제2010-90533호의 보령산 머드 추출물의 추출방법 및 그 추출물을 함유하는 미백기능성 화장품 조성물과, 영일만산 머드를 이용한 기술로 한국

공개특허 제2005-48792호의 영일만산 암반머드를 이용한 피부화장료 조성물이 있다.

[0006] 전남 장흥지역은 오염되지 않은 천혜의 자연환경을 보유하고 있으며, 이에 개발되지 않은 천연자원들이 도처에 산재해 있고, 해안과 인접해 있어 지역특성상 머드의 생성이 충분히 가능한 지역이지만 과거 장흥 머드를 산업화하려는 노력은 없었다.

[0007] 한편 프로테아제는 파파인, 트립신 등의 단백질 가수분해 활성을 갖는 단백질 분해효소를 총칭하는 것으로, 이들 물질이 표피에 적용될 경우 박리도나 표피의 각질을 이루는 케라틴 등의 단백질을 분해하고 유도단백질의 일종으로 소화 흡수가 용이한 영양성분인 펩톤을 생성하는 등의 작용을 수행함으로써 표피 신진대사상의 원활화를 기하고 피부 기능의 정상화를 유지할 수 있을 뿐만 아니라 보습첨가제로서 탁월한 수분조절작용을 나타내어 화장품 및 첨가제로서 많이 이용되고 있는 물질이다.

[0008] 이러한 프로테아제 성분을 지렁이로부터 효과적으로 추출하기 위한 시도로서 한국 등록특허 제390760호에서는 지렁이를 건조, 분쇄, 용해 후 원심분리를 하는 방법을 개시하고 있으며, 한국 등록특허 제301306호에서는 지렁이가 싫어하는 용매에 지렁이를 침지시켜 체액과 점액을 동시에 추출하는 방법이 개시되어 있고, 한국 등록특허 제557892호에서는 약재로 사용되는 약초의 뿌리와 황토에 지렁이를 함께 분쇄하는 방법, 한국 등록특허 제 833465호에는 지렁이가 살아있는 상태에서 물로 추출하고, 지렁이의 원기를 회복시켜 재사용하는 방법 등이 개시되어 있다.

[0009] 그러나 위와 같은 방법으로 제조된 지렁이 추출물 또는 지렁이 점액은 프로테아제 성분에 의한 피부 기능 정상화나 보습 효과에 대해서만 언급하고 있을 뿐, 피부재생이나 피부주름개선 효과에 대해서는 언급하고 있지 않았다.

[0010] 본 발명자들은 장흥산 머드와 보령산 머드를 비교분석한 결과 장흥산 머드가 색깔과 원적외선 방사량은 유사하지만, 양이온 치환용량 및 전기전도도가 높고, 휴믹산, 펠릭산, 휴민이나 유기물의 함량이 높으며, 천연 미네랄 중에서 해독작용과 스트레스 억제작용을 하는 칼슘 이온의 함량과 노폐물 배설 촉진 및 콜라겐 결합 작용을 하는 마그네슘 이온의 함량이 높아 화장품 조성물의 소재로 적합하고, 이러한 머드를 지렁이가 스트레스를 받지 않는 살아있는 상태에서 추출한 지렁이 점액과 함께 사용하였을 때 피부재생 효과 및 피부주름개선 효과가 현저히 개선됨을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 피부재생 효과 및 피부주름개선 효과가 뛰어난 지렁이 점액 및 머드를 유효성분으로 포함하는 기능성 화장품 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 피부재생 및 피부주름개선용 화장품 조성물은 지렁이 점액 및 머드를 유효성분으로 포함한다.

[0013] 본 발명의 피부재생 및 피부주름개선용 화장품 조성물에서 상기 지렁이 점액은, 지렁이 체내에 있는 변을 배설하게 한 다음 물로 세척하는 전처리 단계; 및 상기 전처리한 지렁이를 물이 담겨진 용기에 넣고 20~60분간 침지시켜 지렁이로부터 점액을 추출하는 단계;를 통해 얻은 지렁이 점액인 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 지렁이 점액은 지렁이 건조 분쇄물이나 유기용매 추출물과 달리 지렁이가 스트레스를 받으며 죽을 때 발생하는 독소를 함유하지 않으며, 또한 통상의 지렁이 건조 분쇄물에 비해 항산화 활성이 20배 정도 뛰어나다.

[0015] 상기 전처리한 지렁이가 지렁이 점액 추출에 한 번 사용된 지렁이일 경우에는 지렁이 원기 회복기에 넣고 5~20℃의 공기를 2~10분간 30~60분 간격으로 1~3일간 공급하여 지렁이의 원기를 회복시키는 원기회복 단계를 거친 후, 원기가 회복된 지렁이를 물이 담겨진 용기에 넣고 20~60분간 침지시켜 지렁이로부터 점액이 배출되도록 하는 점액을 추출하는 것이 바람직하다.

- [0016] 지령이를 물이 담겨진 용기에 넣고 침지시키면, 지령이는 스트레스를 받으면서 자기방어기작의 하나로 다량의 점액을 배출하게 된다. 지령이와 물의 비율은 대략 1:1.5 전후의 비율로 넣으면 충분하다. 지령이는 물에 오래 담가둘수록 많은 양의 점액이 배출되나, 일정시간 이상 물에 지령이를 침지하게 되면 지령이는 표피 호흡을 하는 관계로 죽게 된다. 따라서 지령이의 침지시간은 60분을 초과하지 않도록 하는 것이 좋으며, 바람직하게는 20분 내지 60분간 침지시키는 것이 좋다. 아울러 물의 온도는 지령이가 생육에 적합한 온도범위 즉, 10~30℃의 범위 내의 것을 사용하면 된다.
- [0017] 또한 바람직하게는 지령이 점액 추출을 위해서 상부에 입구가 형성되고, 내부에는 수납공간이 구비되며, 상기 입구의 상단 주연으로 삽입홈이 형성되고, 측면에는 감압펌프로 연결되어 내부의 감압을 유도하는 연결구가 구비된 몸체와; 상기 몸체의 삽입홈에 삽입되는 오링과; 상단부가 상기 몸체의 입구에 걸쳐지면서 하부가 상기 몸체의 수납공간으로 삽입되고, 저면 바닥에는 거름망이 구비되어 있어 내부에 유입되는 지령이와 점액을 포함한 용액에서 액상만을 하부로 통과시켜 분리하는 분리부재;로 이루어지는 지령이 점액 추출장치를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0018] 상기 거름망의 입경은 반드시 제한할 필요는 없으나 지령이를 포함한 이물질을 걸러낼 수 있는 정도의 크기를 만족해야 하므로 0.05~0.5 mm 정도의 크기를 갖도록 하는 것이 좋다.
- [0019] 또한 상기 지령이 점액 추출장치를 이용하여 지령이 점액을 추출함에 있어서, 지령이 점액 추출장치의 연결구를 감압펌프와 연결한 후 감압펌프를 가동시키면서 상기 점액추출 단계에서 얻은 지령이와 점액이 포함된 용액을 분리부재 내부에 부어서 용액만이 거름망을 통과하여 분리되고, 그 분리단계에서 얻은 용액을 원심분리하여 하등액을 취하여 지령이 점액을 회수하는 것이 바람직하다.
- [0020] 또한 얻어진 지령이 점액은 화장료 소재로서 품질의 균일성을 확보하기 위해 건조한 후, 일정 농도로 희석하여 사용하는 것이 바람직하다. 건조 방법은 특별히 한정하지는 않지만 부형제가 필요없고 지령이 점액의 유효성분의 열에 의한 변성을 억제하기 위해 동결건조하는 것이 바람직하다.
- [0021] 본 발명의 피부재생 및 피부주름개선용 화장료 조성물에서, 상기 머드는 머드 시료를 채취하여 건조후 사용한다.
- [0022] 머드는 국내산 머드, 이스라엘 사해머드, 캐나다 콜롬비아 해안의 빙하머드, 러시아 바이칼머드, 캘리포니아 클레이머드, 뉴질랜드 화산머드 등 어느 것이나 사용할 수 있으나, 바람직하게는 국내산 머드, 특히 바람직하게는 장흥산 머드가 보령산 머드와 색깔과 원적외선 방사량은 유사하지만, 양이온 치환용량 및 전기전도도가 높고, 휴믹산, 펠릭산, 휴민이나 유기물의 함량이 높으며, 천연 미네랄 중에서 해독작용과 스트레스 억제 작용을 하는 칼슘 이온의 함량과 노폐물 배설 촉진 및 콜라겐 결합 작용을 하는 마그네슘 이온의 함량이 높아 본 발명의 화장료 조성물에 적합하다.
- [0023] 본 발명의 피부재생 및 피부주름개선용 화장료 조성물에서, 고형분 기준으로 상기 지령이 점액 0.001 ~ 0.1 중량%, 바람직하게는 0.01 ~ 0.5 중량%를 포함한다. 지령이 점액 함량이 상기 하한치 미만인 경우에는 충분한 피부재생 효과와 피부주름개선 효과를 달성할 수 없고, 상기 상한치를 초과하는 경우 지령이 점액의 용해도가 과포화되어 지령이 점액이 희석되지않는 문제가 발생할 수 있다.
- [0024] 또한 본 발명의 피부재생 및 피부주름개선용 화장료 조성물에서, 고형분 기준으로 머드 0.5 ~ 10 중량%, 바람직하게는 1 ~ 5 중량%를 함유하고, 상기 하한치 미만에서는 천연 미네랄 중에서 해독작용과 스트레스 억제 작용을 하는 칼슘 이온의 함량과 노폐물 배설 촉진 및 콜라겐 결합 작용을 하는 마그네슘 이온의 함량이 낮아져서 충분한 피부재생 효과와 피부주름개선 효과를 달성할 수 없는 문제가 있고, 상기 상한치를 초과하는 경우에는 지령이 점액에서와 마찬가지로 머드의 용해도가 과포화되어 더 이상 칼슘, 마그네슘과 같은 유용성분이 용출되지 못하는 문제가 있다.
- [0025] 본 발명의 피부재생 및 피부주름개선용 화장료 조성물은 화장수(스킨), 로션, 에센스, 영양크림 및 팩 중에서 선택된 어느 하나의 형태로 제조될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 화장료 조성물에는 화장품의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0027] 화장료 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알콜, 지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제(humectant), 증점제(thickening agent), 향산화제, 점도 안정화제(viscosity stabilizer), 킬레이팅제, 완충제, 저급 알콜 등이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 필요에

따라 미백제, 보습제, 비타민, 자외선 차단제, 향수, 염료, 향균제가 포함될 수 있다.

[0028]

상기 오일로서 수소화 식물성유, 파마자유, 면실유, 올리브유, 야자인유, 호호바유, 아보카도유가 이용될 수 있으며, 왁스로는 밀랍, 경랍, 카르나우바, 칸델릴라, 몬탄, 세레신, 액체 파라핀, 라놀린이 이용될 수 있다. 지방산으로는 스테아르산, 리놀레산, 리놀렌산, 올레산이 이용될 수 있고 지방산 알콜로는 세틸 알콜, 옥틸 도데칸올, 올레일 알콜, 판텐올, 라놀린 알콜, 스테아릴 알콜, 헥사데칸올이 이용될 수 있으며 지방산 에스테르로는 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 부틸 스테아레이트가 이용될 수 있다. 계면활성제의 예에는 소듐 스테아레이트, 소듐 세틸설페이트, 폴리옥시에틸렌 라우릴에테르 포스페이트, 소듐 N-아실 글루타메이트와 같은 음이온 계면활성제; 스테아릴디메틸벤질암모늄 클로라이드 및 스테아릴트리메틸암모늄 클로라이드와 같은 양이온 계면활성제; 알킬아미노에틸글리신 하이드로클로라이드 및 레시틴과 같은 양성 계면활성제; 글리세린 모노스테아레이트, 소르비탄 모노스테아레이트, 수크로오스 지방산 에스테르, 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 올레일에테르, 폴리에틸렌 글리콜 모노스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노팔미테이트, 폴리옥시에틸렌 코코넛 지방산 모노에탄올아르니드(monoethanol arnide), 폴리옥시프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌 캐스터유, 폴리옥시에틸렌 라놀린과 같은 비이온성 계면활성제 등이 포함된다. 흡습제에는 글리세린, 1,3-부틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜이 이용될 수 있으며 저급 알콜로는 에탄올, 이소프로판올이 이용 가능하다. 증점제의 예에는 알긴산 나트륨, 카제인산 나트륨, 젤라틴 한천, 크산탄 고무, 전분, 셀룰로오스 에테르(예, 하이드록시에틸 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 카르복시메틸 셀룰로오스, 하이드록시 프로필메틸 셀룰로오스), 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스 등이 포함된다. 항산화제로는 부틸레이티드 하이드록시톨루엔, 부틸레이티드 하이드록시아니솔, 프로필 갈레이트, 시트르산, 에톡시퀸(ethoxyquin)이 이용 가능하고, 킬레이팅제로는 디소듐 에테데이트, 에탄하이드록시 디포스페이트가 이용 가능하며, 완충제로는 시트르산, 소듐 시트레이트, 붕산, 보랙스(borax), 디소듐 하이드로젠 포스페이트가 이용 가능하다. 그러나 상기 언급된 담체, 부형제 또는 희석제에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0029]

본 발명은 양이온 치환용량 및 전기전도도가 높고, 휴믹산, 펠릭산, 휴민이나 유기물의 함량이 높으며, 칼슘 이온과 마그네슘 이온의 함량이 높은 장흥산 머드와 스트레스를 받지 않고 살아있는 상태에서 추출한 지렁이 점액을 통해 현저히 우수한 피부재생 효과 및 피부주름개선 효과를 나타내는 고부가가치의 기능성 화장품 조성물을 제공할 수 있고, 이를 통해 전라남도 장흥지역 천연물의 우수성을 널리 알리는 것과 함께 지역소득 증대 및 지역경제 활성화를 달성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030]

도 1은 본 발명의 화장품 조성물의 원료로 사용되는 장흥산 머드와 지렁이 점액이 인간각질형성세포에 세포독성을 나타내는지 확인한 MTT분석결과 그래프이다.

도 2는 도 1의 각 실험군에서 1 및 50 μ 에서의 세포 사진을 나타낸 것이다.

도 3은 지렁이 점액의 농도별 자유라디칼 소거능을 나타낸 그래프이다.

도 4a 및 4b는 농도범위를 달리해서 지렁이 분쇄 분말의 자유라디칼 소거능을 나타낸 그래프이다.

도 5는 실험예 4에서 HR-1 mouse의 한 쪽만 스크래치를 낸 상태의 사진이다.

도 6은 실시예 2와 비교예의 로션의 피부재생 효과를 비교하기 위한 피부 두께 비교 그래프(좌측)와 피부 단면 사진(우측)이다.

도 7은 실시예 3과 비교예의 에센스의 피부재생 효과를 비교하기 위한 피부 두께 비교 그래프(좌측)와 피부 단면 사진(우측)이다.

도 8은 실시예 1과 비교예의 스킨의 피부주름개선 효과를 비교하기 위한 콜라겐 발현량을 나타낸 그래프(좌측)와 웨스턴 블롯 사진(우측)이다.

도 9는 실시예 2와 비교예의 로션의 피부주름개선 효과를 비교하기 위한 콜라겐 발현량을 나타낸 그래프(좌측)

와 웨스턴 블롯 사진(우측)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 참조하여 더욱 구체적으로 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0032] **제조예 1: 머드 원료의 제조**

[0033] 전라남도 관산읍 죽청리(GPS정보 : N34° 34' 27.1" E126° 58' 47.4")의 청정 우수 머드를 채취한 후 전라남도 천연자원연구원 내 습식 토양제조기를 활용하여 머드 원료를 제조하였다. 먼저 채취한 습식 머드를 1차 스크리닝을 통해 불순물을 제거하고, 4시간 이상 교반한 후, 스탁스 법칙에 따라 입자의 분산이 정상적으로 이루어지면서 밀도가 큰 입자부터 자연침전될 수 있도록 설계된 침전탱크 내에서 하루동안 충분한 침전시간을 두고, 고순도의 머드 원료를 채취하였다. 채취한 머드 원료는 원적외선 건조기로 1일 이상 충분히 건조시킨 후, 원료를 분쇄하여 325mesh이하의 입자만을 화장료 조성물 제조에 사용하였다.

[0034] 또한 장흥 머드와 비교를 위하여 보령지역에서 채취한 머드로부터 장흥 머드와 같은 방법으로 보령 머드 원료를 제조하였다.

[0035] **제조예 2: 지렁이 원료의 제조**

[0036] 지렁이를 3일간 방치하여 체내에 있는 변을 모두 배설하게 한 다음 물로 세척한 지렁이 1 kg을 물 1.5 kg이 담겨진 용기에 넣고 40분간 침지시켜 지렁이로부터 점액이 배출되도록 하였다. 배출된 점액과 지렁이를 거름망을 갖춘 감압깔대기에 넣고 감압펌프를 작동시켜 거름망을 통과한 지렁이 점액만을 모은 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 하등액으로 50 g을 얻고, 이 원심분리 하등액을 동결건조하여 지렁이 점액 분말을 제조하였다.

[0037] 또한 지렁이 점액 분말과 비교를 위하여 지렁이를 증류수로 충분히 세척한 후, 분쇄기에 넣고 18,000 rpm에서 5분 분쇄하여 - 80 °C에서 예비 동결시킨 후 2일 동안 동결건조시켰다. 이때 혈액 등 동결건조되지 않는 부분을 제거한 후 다시 1일간 동결건조시켜 지렁이 분쇄 분말을 제조하였다.

[0038] **실험예 1: 장흥산 머드 및 지렁이 점액의 세포독성**

[0039] MTT 분석법은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)가 살아있는 세포에서 물에 녹지않은 formazan이라는 색소 산물을 형성시키므로 이 양을 측정함으로써 시험물질에 대한 세포독성을 측정하는 방법이다.

[0040] 본 발명의 장흥산 머드 및 지렁이 점액이 인간각질형성세포에 독성을 나타내는지 세포독성을 확인하였다. 인간각질형성세포를 96웰 플레이트에 1×10^5 cells/well씩 씩 동일하게 heamacytometer를 이용하여 계수한 후 분주하였다. 본 발명의 제조예의 추출물을 0.7 (w/v)% 각 웰에 1 ~ 50 μ l씩 넣고 DMEM 배지에서 37 °C, 5% 이산화탄소 조건에서 24시간 배양하였다. 그후 플레이트에 상등액을 따로 모은 뒤 2~5 mg/ml의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT, Sigma M5655, USA) 용액을 50 ~ 150 μ l 첨가하고 동일조건에서 3시간 추가로 배양하였다. 그 후, 세포 배양액을 제거하고 200 μ l의 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma D2650, USA)를 각 웰에 처리하여 호일로 싸서 1시간 교반한 후, 200 μ l 씩을 96 웰에 취하여 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 정도(cell viability)는 순수한 물을 사용한 대조군의 흡광 강도를 기준으로 백분율로 표시하여 도 1에 나타내었고, 각 실험군의 1 및 50 μ l에서의 세포사진을 도 2에 나타내었다.

[0041] 상기 결과로부터 본 발명의 화장료 조성물의 원료로 사용하려는 장흥산 머드 및 지렁이 점액은 1 ~ 50 μ l에서 세포독성을 나타내지 않았고, 특히 머드와 지렁이 점액을 함께 첨가한 경우는 지렁이 점액만 첨가한 경우와 달리 세포생육을 오히려 증진시킴을 확인할 수 있었다.

[0042] **실험예 2: 장홍산 머드 및 보령산 머드의 특성 비교**

[0043] 제조예 1의 장홍산 머드와 보령산 머드의 수분 및 회분 함량을 분석하여 표 1에 나타내었다.

표 1

구분	장홍산 머드	보령산 머드
수분 (중량%)	2.5	4.8
회분 (중량%)	92.7	90.1

[0045] 표 1의 결과로부터 장홍 머드에서 수분 함량이 낮고 회분 함량이 높아 순도면에서 다소 우수할 수 있음을 알 수 있었다.

[0046] 장홍산 머드와 보령산 머드의 원적외선 방사율, pH, 양이온 치환용량, 전기전도도를 분석하여 표 2에 나타내었다.

표 2

구분	장홍산 머드	보령산 머드
원적외선 방사율	0.94	0.94
pH	8.3	8.1
양이온 치환용량 (cmol ⁺ /kg)	20.76	11.25
전기전도도 (μS/cm)	78.0	56.5

[0048] 장홍산 머드는 보령산 머드와 원적외선 방사율은 유사했지만, 양이온 치환용량과 전기전도도에서 장홍산 머드가 보령산 머드에 비해 높은 활성을 나타내었다.

[0049] 장홍산 머드와 보령산 머드의 유기물 함량, 휴믹산, 펠빅산, 휴민 함량을 분석하여 표 3에 나타내었다.

표 3

구분	장홍산 머드	보령산 머드
유기물 (중량%)	1.67	1.18
휴믹산 (중량%)	1.08	0.77
펠빅산 (중량%)	0.29	0.21
휴민 (중량%)	0.29	0.21

[0051] 장홍산 머드는 보령산 머드에 비해 유기물 함량은 물론 피부 안정화에 유용한 휴믹산, 펠빅산, 휴민 함량에서 모두 높은 수치를 나타내었다.

[0052] 장홍산 머드와 보령산 머드의 칼륨, 나트륨, 칼슘 및 마그네슘 이온 함량을 분석하여 표 4에 나타내었다.

표 4

구분	장홍산 머드	보령산 머드
칼륨이온 (cmol ⁺ /kg)	2.46	2.20
나트륨이온 (cmol ⁺ /kg)	1.25	1.25
칼슘이온 (cmol ⁺ /kg)	41.3	5.17
마그네슘이온 (cmol ⁺ /kg)	29.8	21.1

[0054] 장홍산 머드는 보령산 머드와 칼륨 및 나트륨 이온 함량에서는 큰 차이가 없었으나, 칼슘 및 마그네슘 함량이 높았고, 특히 칼슘은 장홍 머드가 보령 머드보다 8배 높은 함량을 나타내었다.

[0055] **실�험예 3: 지렁이 점액과 지렁이 분쇄 분말의 항산화 활성 비교**

[0056] 본 발명의 지렁이 점액이 항산화 활성을 나타내는지 지렁이 분쇄 분말과 비교하여 DPPH의 자유라디칼 소거능을 확인하였다.

[0057] 1mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, Sigma D9132-1G, USA)는 에탄올 내에서 자유라디칼을 발생한다. 에탄올을 0.4 ml에 에탄올로 제조된 0.1 mM DPPH 용액 0.5 ml 및 최종농도가 10%에 해당되도록 제조예 2의 지렁이 점액 분말 및 지렁이 분쇄 분말을 농도별로 희석하여 0.1 ml을 첨가하였다. 10초간 강하게 교반하고, 냉암소에서 30분간 보관한 다음, ELISA를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능의 정도는 순수한 물을 사용한 대조군의 흡광도를 기준으로 백분율로 표시하였다.

[0058] 자유라디칼 소거능(%) = [100-(각 시료의 반응 흡광도/대조군의 반응 흡광도)] x 100

[0059] 지렁이 점액과 지렁이 분쇄 분말의 항산화 활성을 0.1 ~ 0.5 중량% 범위에서 비교한 결과 지렁이 분쇄 분말은 항산화 활성을 거의 나타내지 않은 반면, 지렁이 점액은 용량에 의존적으로 강력한 항산화 활성을 나타내었다(도 3 및 도 4a). 또한 지렁이 분쇄 분말의 농도를 10 배 이상 증대시켜도 항산화 활성은 지렁이 점액의 1/2에도 미치지 못했다(도 4b).

[0060] **실시예 1: 스킨(화장수)의 제조**

[0061]	지렁이 점액 분말(0.5% 희석액)	3.00
[0062]	장홍산 머드 분말(50% 희석액)	6.00
[0063]	장홍산 편백오일	0.60
[0064]	히드록시에틸렌셀룰로오스(2% 수용액)	12.00
[0065]	잔탄검(2% 수용액)	2.00
[0066]	1,3-부틸렌글리콜	6.00
[0067]	글리세린	4.00
[0068]	히알루론산나트륨(1% 수용액)	5.00
[0069]	정제수	잔량
[0070]	(단위: 중량%)	

[0071] **실시예 2: 로션의 제조**

[0072]	지렁이 점액 분말(0.5% 희석액)	3.00
[0073]	장홍산 머드 분말(50% 희석액)	6.00
[0074]	장홍산 편백오일	0.60
[0075]	아스코르빈산-2-인산마그네슘염	1.00
[0076]	수용성 콜라겐 (1% 수용액)	1.00
[0077]	시트르산나트륨	0.10
[0078]	시트르산	0.05
[0079]	1,3-부틸렌글리콜	3.00
[0080]	정제수	잔량

[0081]	(단위: 중량%)	
[0082]	실시예 3: 에센스의 제조	
[0083]	지렁이 점액 분말(0.5% 희석액)	2.00
[0084]	장홍산 머드 분말(50% 희석액)	1.00
[0085]	장홍산 편백오일	0.20
[0086]	글리세린	8.00
[0087]	히알루론산나트륨(1% 수용액)	2.50
[0088]	레시틴	0.60
[0089]	마카데미아너트 오일	10.00
[0090]	정제수	잔량
[0091]	실시예 4: 영양크림의 제조	
[0092]	지렁이 점액 분말(0.5% 희석액)	2.50
[0093]	장홍산 머드 분말(50% 희석액)	1.25
[0094]	장홍산 편백오일	0.20
[0095]	글리세린	5.00
[0096]	트리에탄올아민	0.50
[0097]	유동파라핀	5.00
[0098]	스쿠알렌	5.00
[0099]	마카데미아너트 오일	15.00
[0100]	폴리솔베이트 60	1.00
[0101]	솔비탄세스퀴올레이트	1.00
[0102]	카르복실비닐폴리머	0.20
[0103]	정제수	잔량
[0104]	(단위: 중량%)	
[0105]	실시예 5: 팩의 제조	
[0106]	지렁이 점액 분말(0.5% 희석액)	2.50
[0107]	장홍산 머드 분말(50% 희석액)	1.25
[0108]	장홍산 편백오일	0.20
[0109]	폴리비닐알코올	13.00
[0110]	L-아스코르빈산-2-인산마그네슘염	1.00
[0111]	라우로일히드록시프롤린	1.00
[0112]	수용성 콜라겐(1% 수용액)	2.00
[0113]	1,3-부틸렌글리콜	3.00

- [0114] 에탄올 5.00
- [0115] 정제수 잔량
- [0116] (단위: 중량%)

[0117] **비교예**

[0118] 본 발명의 화장품 조성물과의 효과 비교를 위하여 보령산 머드를 원료로 포함하는 스킨, 로션, 에센스, 영양크림, 팩(제조원 한국콜마, 제품명 머드랑)을 구입하여 비교예로 사용하였다.

[0119] 또한 지렁이 분말 또는 지렁이 추출물을 함유한 화장품 조성물은 시중에 판매되고 있는 것이 없기 때문에 프로테아제를 함유한 달팽이 점액을 함유하는 스킨, 로션, 에센스(제조원 다쏘엔컴퍼니, 제품명 스와니코코), 영양크림(제조원 에스겔, 제품명 시크릿키), 팩(제조원 한울생약, 제품명 해피스네일)을 구입하여 비교예로 사용하였다.

[0120] **실험예 4: 피부재생 효과**

[0121] HR-1 mouse를 대상으로 실내에서 1주간 안정화 시킨후, 정상피부와 비교하기 위해 도 5와 같이 스크래치를 낸 후, 각각의 화장품 조성물을 100 μ l 도포한 후 1주일 후에 피부재생 효과를 비교하였다.

[0122] 피부조직을 취하여 수크로스 10, 20, 30%에 1일간 정치시킨 후 꺼내어 20 μ m 씩 조직을 절편하고 H/E(hematoxylin and eosin) staining 방법으로 염색한 뒤, 광학 현미경으로 재생된 조직의 두께를 관찰하였다.

[0123] 도 6은 실시예 2와 비교예의 로션의 피부재생 효과를 비교한 것으로 실시예 2에서 피부재생 효과가 가장 뛰어나고, 다음은 달팽이 점액을 함유한 로션, 보령산 머드를 함유한 로션 순으로 나타났다.

[0124] 도 7은 실시예 3과 비교예의 에센스의 피부재생 효과를 비교한 것으로 실시예 2에서 피부재생 효과가 가장 뛰어나고, 다음으로 보령산 머드를 함유한 에센스였고, 달팽이 점액을 함유한 에센스는 피부재생 효과를 나타내지 않았다.

[0125] **실험예 5: 피부주름개선 효과**

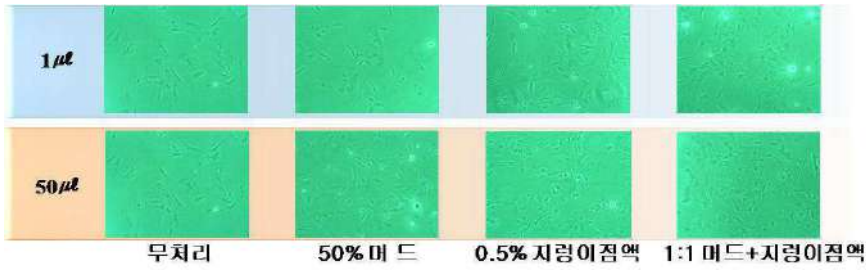
[0126] 피부주름개선 효과를 확인하기 위해 30일간 동물실험을 통해 확인하였다. 피부조직을 취하여 Easy-blue kit로써 조직내 RNA 샘플을 채취한다. 채취한 RNA 샘플은 RT-PCR(역전사중합효소반응)을 이용하여 cDNA로 만들어주며, Col1A1 프라이머를 사용하여 콜라겐 유전자 발현을 시키고, PCR을 이용하여 cDNA를 증폭시킨다. PCR 후에 얻어진 샘플을 겔상으로 전기영동 하고 이미지 분석기를 이용하여 유전자의 발현정도를 확인한다.

[0127] UV처리한 대조군에 비해 실시예 1과 비교예의 스킨 중에서 주름개선 효과는 실시예 1의 스킨에서 유일하게 나타났다(도 8).

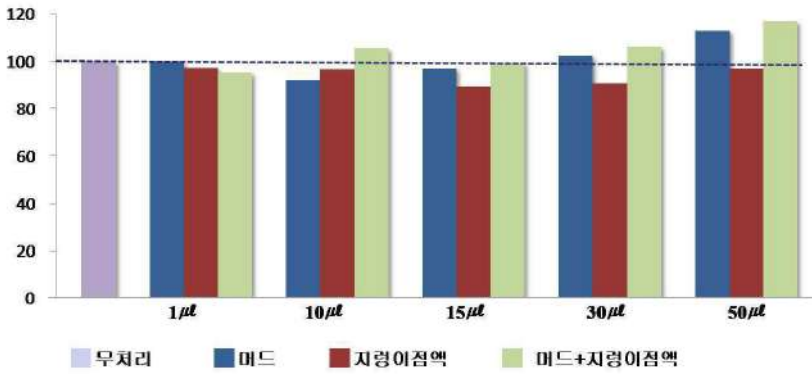
[0128] 또한 실시예 2와 비교예의 로션 중에서 주름개선 효과는 실시예 2와 보령산 머드를 함유한 로션에서 나타났고, 달팽이 점액을 함유한 제품에서는 주름개선 효과가 전혀 나타나지 않았다(도 9).

도면

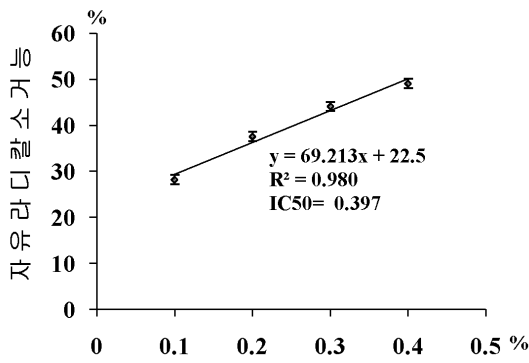
도면1



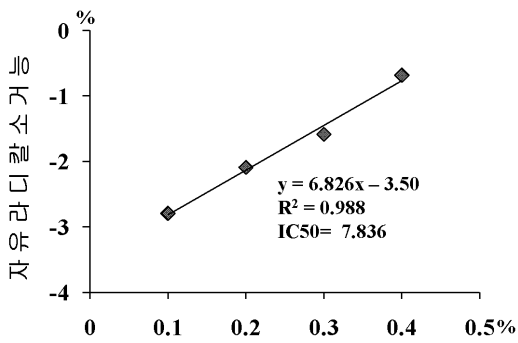
도면2



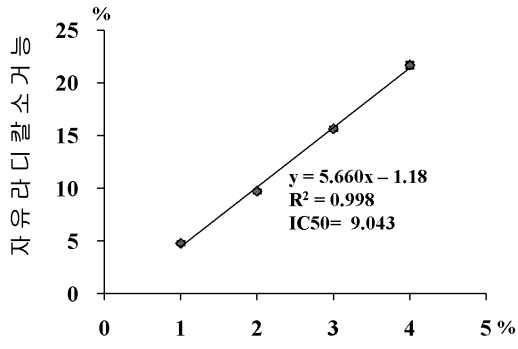
도면3



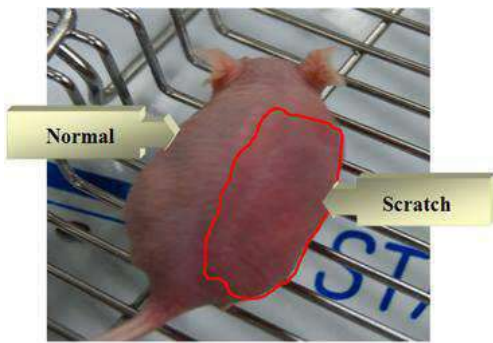
도면4a



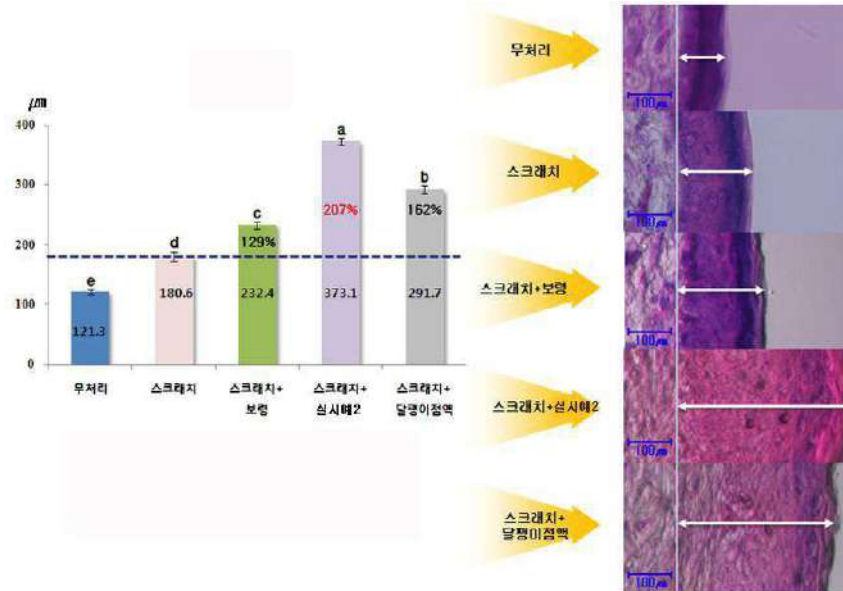
도면4b



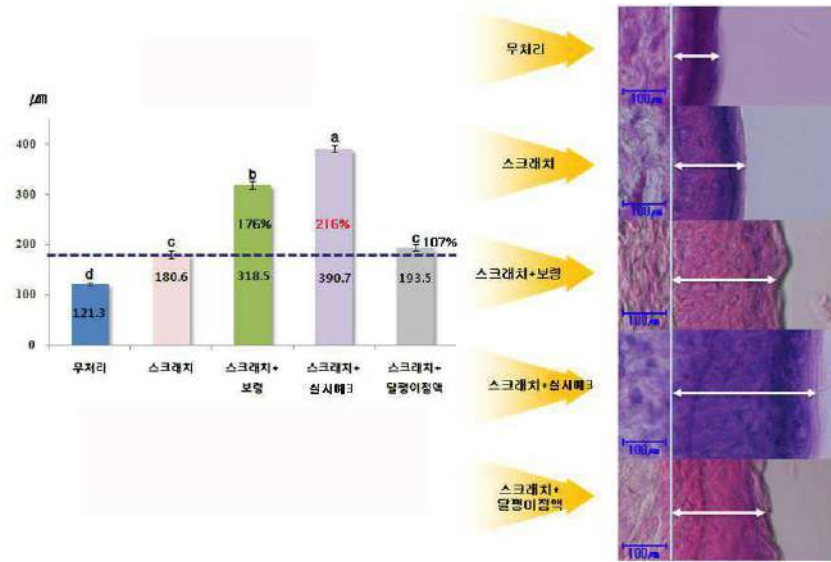
도면5



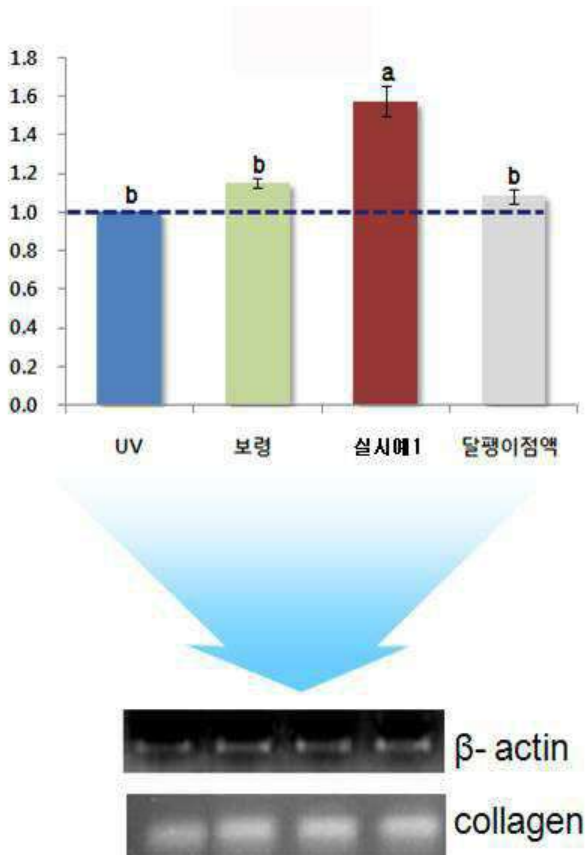
도면6



도면7



도면8



도면9

