



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년10월25일
(11) 등록번호 10-1194767
(24) 등록일자 2012년10월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0034986
(22) 출원일자 2012년04월04일
심사청구일자 2012년04월04일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110066042 A
논문1: 한국영양학회지
JP2006232794 A
JP09175982 A

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
주식회사 아이피어리스
경기도 안성시 미양면 제2공단1길 104, 제2공단
(72) 발명자
김영부
경기도 수원시 영통구 영통동 947-8 와이티오피스
텔 611호
강인오
경기도 용인시 수지구 죽전동 1003-8 동성2차아파트 105동 703호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 2 항

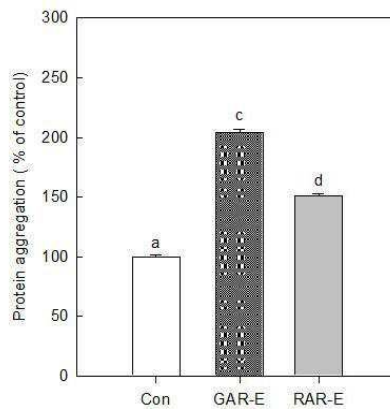
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **꽃사과 추출물을 함유하는 모공 수축 및 피지 분비 억제용 화장료 조성물**

(57) 요약

본 발명은 꽃사과 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 모공 수축용 또는 피지 분비 억제용 화장료 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이선영

서울특별시 서대문구 남가좌2동 삼성래미안2차아파트 106동 1502호

김연경

서울특별시 송파구 잠실4동 파크리오아파트 315동 403호

이광원

경기도 성남시 분당구 이매동 삼환아파트 2동 803호

손다희

충청남도 당진군 고대면 대촌리 474

남미현

대구광역시 동구 율하동 율하휴먼시아7단지아파트 712동 1206호

홍충의

부산광역시 중구 영주2동 239-50 1통 3반

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

꽃사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 모공 수축용 화장료 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

꽃사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 피지 분비 억제용 화장료 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 모공 수축 및 피지 분비 억제용 화장료 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 꽃사과 추출물을 유효성분으로 함유하는 모공 수축 및 피지 분비 억제용 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 피부는 신체의 표면을 덮고 있는 조직으로 표피, 진피, 피하지방층으로 이루어진다. 충격, 온열, 일광과 같은 물리적 자극으로부터 신체를 보호하고, 화학적 자극이나 세균침입 등으로부터 피부를 보호하고, 체온을 일정하게 유지시키는 등 신체를 주위의 변화에 순응시키는 역할을 한다.

[0003] 이러한 피부의 부속기관인 피지선은 모공을 통하여 피지를 피부 최외층으로 분비하여 신체의 방어 작용에 중요한 역할을 하고, 피지선에서 분비된 피지는 각질층의 수분 증발을 막아 피부에 윤기를 준다고 알려져 있다. 그러나 피지의 분비가 지나친 경우에는 피부가 번들거리고 피부에 염증이 잘 생기고 여드름이 호발되며, 세균감염에 의한 모낭염이 생기기도 한다. 반면 피부 표면의 피지 분비가 적은 경우 피부가 건조해지며 이로 인해 피부 질환이 발생하게 된다. 따라서 피지조절이 피부관리에 있어서 매우 중요하다고 할 수 있다.

[0004] 피지를 분비하는 통로인 모공은 얼굴 피부에 전체적으로 분포하나 특히 코와 볼 부위는 육안으로 식별할 수 있고, 모공의 양상은 성별, 유전적, 노화, 여드름, 만성 자외선 노출 등의 내인성과 외인성 요인에 의해 개인차가 있다.

[0005] 사춘기에 접어들면서 남성 호르몬인 안드로겐의 분비가 많아지고 피지선이 활성화되면서 피지 분비가 많아지고 모공이 두드러져 보이기 시작한다. 모공의 크기가 커지는 요인으로서는 피부노화로 인한 콜라겐 섬유와 탄력섬유의 감소로 피부 탄력 저하, 과다한 피지 분비 그리고 각화항진으로 인해 두꺼워진 각질층 등이 있다. 모공이 넓어지면 그 속으로 세균들이 침입하기 쉬우므로 여드름, 뽀루지와 같은 피부 트러블을 유발하기 쉽다. 또한, 화장이 잘 받지 않을 뿐만 아니라 칙칙하고 지저분하게 보인다. 미세한 먼지나 화장 찌꺼기 등 노폐물이 끼어 큰 모공이 더욱 두드러져 보이므로 깨끗한 피부를 가지지 못하고 얼굴이 지저분해 보이는 결과를 낳는다. 이에 따라 많은 이들이 모공 수축(축소)에 큰 관심을 가지게 되어 화장품을 통한 모공의 관리가 중요하게 되었다.

[0006] 한편, 사과는 원산지가 유럽과 서아시아로 세계적으로 가장 많이 재배되고 있는 과일로서 맛과 향기가 뛰어나며

탄수화물, 무기질, 비타민과 펙틴, 페놀계 물질 등 유용 성분을 고루 갖추고 있다. 사과에는 카테킨, 루틴, 플라보노이드, 탄닌 등 여러 가지 페놀 화합물이 포함되어 있다.

[0007] 한편, 천연물을 소재로 한 모공 수축 및 피지 조절에 대한 특허문헌으로는 대한민국 공개특허 제10-2009-0017105호(모공 수축과 피지조절을 위한 식물 추출물을 함유한 팩조성물), 대한민국 공개특허 제10-2003-0047963호(허브 추출물을 포함하는 피지를 억제하는 모공수축 화장료조성물), 대한민국 공개특허 제10-2008-0097314호(참나무 속 식물추출물을 함유하는 모공수축용 화장료조성물) 등이 있다.

[0008] 한편, 사과 추출물을 포함하는 화장료 조성물에 대한 특허문헌으로는 대한민국 공개특허 제10-1996-0000201호(사과추출물을 함유한 화장료 조성물), 대한민국 공개특허 제10-2005-0017426호(사과 증류수를 함유하는 보습 화장료), 미국 공개특허 제2005-0002894호(화장료 또는 약학 조성물에서 사과씨 추출물의 신규한 용도), 일본공개특허 특개2006-232784호(천연 사과 파우더 혼합 화장품), 일본공개특허 특개2000-226597호(사과 납 및 이를 포함하는 화장품) 등이 있다.

[0009] 그러나 아직까지 풋사과 추출물을 함유하는 모공 수축 및 피지 분비 억제용 화장료 조성물에 대해서는 연구된 바가 전혀 없는 실정이다.

[0010]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 천연 추출물을 소재로 하여 안정성이 우수하며 모공 수축 효과 및 피지 분비 억제효과가 매우 뛰어난 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 5- α -reductase의 mRNA 발현을 효과적으로 억제하여 피지 분비 억제 효과가 매우 뛰어난 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 또한, 본 발명은 involucrin 합성 촉진 효과가 있어 모공벽의 탄력 효과, 피부 보습 효과가 있는 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0014] 또한, 본 발명은 콜라겐 합성 촉진 효과가 있어 피부 탄력 효과가 있는 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 풋사과 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 모공 수축용 또는 피지 분비 억제용 화장료 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명에서 상기 풋사과 추출물은 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물인 것을 특징으로 한다.

[0017] 이하에서는 본 발명의 풋사과 추출물을 유효성분으로 함유하는 모공 수축용 화장료 조성물 또는 피지 분비 억제용 화장료 조성물에 대하여 자세히 설명하겠다.

[0018] 본 발명의 풋사과(*maluspumila mill*)는 아직 덜 익은 사과를 의미하는 것으로 그린 애플 또는 초록 사과라고도 불린다.

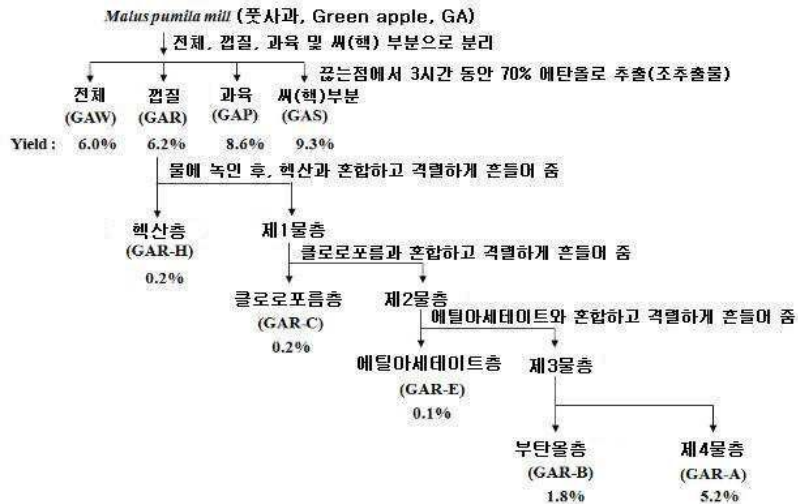
[0019] 본 발명의 풋사과 추출물은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 얻을 수 있으며, 바람직하게는 추출용매를 사용하여 추출될 수 있다. 이때 추출용매의 바람직한 예로는 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올(예: 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등), 아세톤, 에틸 아세테이트, 클로로포름, 1,3-부틸렌글리콜 또는 이들 중 2종 이상의 혼합물이 있으며, 더욱 바람직하게는, 70% 에탄올을 사용할 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명의 풋사과 추출물은 풋사과 껍질의 추출물인 것이 바람직하다. 풋사과 껍질은 풋사과 전체, 과육 또는 핵(씨) 부분에 비하여 총 플라보노이드 함량, 총 폴리페놀 함량, FRAP측정값이 높고, DPPH[?]SC₅₀낮아 항산화

활성이 매우 높다.

[0021] 또한, 본 발명의 풋사과 추출물은 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물인 것이 더욱 바람직하다. 구체적으로 하기의 분획과정을 통해 얻은 것으로 풋사과 껍질의 70%에탄올 조추출물에 대해서 헥산으로 분획을 실시하여 제1물층을 수득하고, 상기 제1물층에 대하여 클로로포름으로 분획을 실시하여 제2물층을 수득하고, 상기 제2물층에 대하여 에틸아세테이트로 분획을 실시하여 수득한 에틸아세테이트 분획물인 것이 바람직하다.

[0022] [풋사과 분획물의 제조과정]



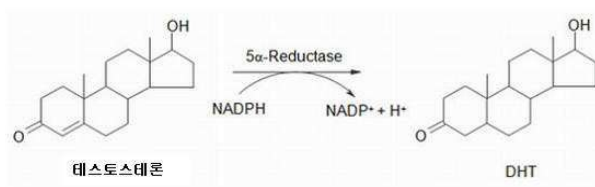
[0023]

[0024] 상기 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물은 다른 분획물에 비하여 총 플라보노이드 함량, 총 폴리페놀 함량, FRAP측정값이 높고, DPPH·SC₅₀낮아 항산화 활성이 매우 높다.

[0025] 또한, 본 발명의 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물은 상기와 같이 총 폴리페놀 함량이 매우 높은데, 이러한 폴리페놀성 화합물이 피부 단백질과 결합을 하여 킬레이트되면서 탁월한 모공 수렴 효과를 나타낸다.

[0026] 또한, 본 발명의 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물은 5- α -reductase의 mRNA 발현을 억제하여 피지 분비를 억제하는 효과가 뛰어나다. 5- α -reductase는 type 1과 type 2의 두 가지 동질효소로 존재하는데 type1은 피부 등의 조직에서 type 2는 전립선에서 주로 발현된다. 남성호르몬인 테스토스테론은 상기 5- α -reductase라는 효소에 의해 Dihydrotestosterone으로 환원되는데 이는 피지선을 자극하면서 피지 분비를 촉진하는 역할을 하고, 피지가 과다 분비되면 피부에 악영향을 준다. 따라서 5- α -reductase의 활성을 억제하면 효과적으로 피지 조절 및 모공 수축 작용을 할 수 있다.

[0027] [5- α -reductase의 작용]

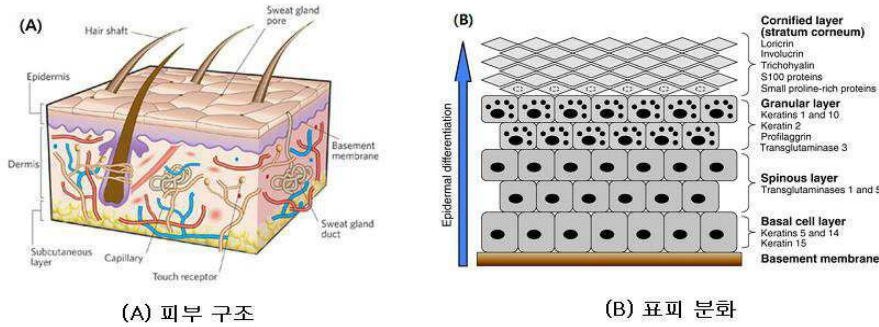


[0028]

[0029] 그런데 본 발명의 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물은 5- α -reductase의 mRNA 발현을 효과적으로 억제하므로 피지 조절 및 모공 수축 작용이 매우 뛰어나다.

[0030] 또한, 본 발명의 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물은 involucrin 합성 촉진 효과가 매우 뛰어나다. 각질형성세포는 분화 단계에서 특이한 단백을 발현시켜 표피의 기저층부터 각질층까지 분화가 이루어지도록 프로그램화되어 있다. 말기 분화과정에서 각화세포피(cornified cell envelope, CE)의 형성에 참여하는 전구물질로서 involucrin, filaggrin 등 여러 구조 단백질들이 알려져 있으며 이들은 transglutaminase의 매개에 의하여 서로 교차 결합되어 단단한 구조를 형성하게 된다. 또한, 이는 피부 보습에 관여하는 유전자로서 수분 및 보습성분들과 각질층 형성세포들의 결합력을 증가시켜 모공벽 탄력을 유지시키는 역할을 한다.

[0031] [피부 구조 및 표피 분화]



[0032]

[0033] 그런데 본 발명의 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물은 involucrin 합성 촉진 효과가 매우 뛰어나 모공벽 탄력을 효과적으로 유지시킬 수 있고 피부 보습에도 매우 효과적이다.

[0034] 또한, 본 발명의 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물은 콜라겐 합성 촉진 효과가 매우 뛰어나므로 피부 탄력에 매우 효과적이다.

[0035] 또한, 본 발명의 모공 수축용 또는 피지 분비 억제용 화장품 조성물은 상기 풋사과 추출물을 화장품 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 30.0 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 20.0 중량%, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 10.0 중량% 함유한다. 상기 최소 함량 미만일 경우에는 뚜렷한 효과를 기대할 수 없고, 상기 최대함량을 초과하는 경우에는 첨가량 대비 모공수축 또는 피지 분비 억제 효과가 크게 상승하지 않아 경제적이지 않으며 피부에 자극을 유발할 가능성이 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 모공 수축용 또는 피지 분비 억제용 화장품 조성물은 상기 유효성분 이외에 피부에 유용한 효과를 부여할 수 있는 유효성분을 더욱 포함할 수 있는데, 상기 유효성분으로는 노화방지 성분, 주름개선 성분, 미백 성분, 보습 성분 및 향균 성분 등이 있으며 특정 성분에 한정되지 않는다. 또한, 상기 성분들 이외에도 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명의 모공 수축용 또는 피지 분비 억제용 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있다. 일례로 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 크림, 에센스, 수중유(O/W)형 및 유중수(W/O)형으로 이루어진 기초화장료 제형과, 수중유형 및 유중수형 메이크업베이스, 파운데이션, 스킨커버, 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이섀도, 치크칼라 및 아이브로우 펜슬류로 이루어진 색조화장료 제형과, 바디로션, 바디오일, 바디에센스, 바디팩 등 바디용 제형 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

발명의 효과

[0038] 본 발명의 화장품 조성물은 풋사과 추출물, 특히 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유함으로써 모공 수축 효과와 피지 분비 억제 효과가 매우 탁월하다.

[0039] 또한, 본 발명의 풋사과 추출물, 특히 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물은 5-alpha-reductase의 mRNA 발현을 효과적으로 억제하여 피지 분비 억제 효과가 매우 뛰어나다.

[0040] 또한, 본 발명의 풋사과 추출물, 특히 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물은 involucrin 합성 촉진 효과가 매우 뛰어나 모공벽의 탄력을 효과적으로 유지할 수 있고 피부 보습에도 매우 효과적이다.

[0041] 또한, 본 발명의 풋사과 추출물, 특히 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물은 콜라겐 합성 촉진 효과가 매우 뛰어나 피부 탄력에 매우 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물의 단백질 응집 효과를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물에 대하여 세포독성을 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물의 5- α -reductase type 1 mRNA 발현 억제 활성을 나타내는 그래프이다.

도 4는 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물에 대하여 세포독성을 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물에 대하여 콜라겐 합성 촉진 효과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물에 대하여 세포독성을 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물에 대하여 involucrin 합성 촉진 효과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 본 발명에 대해 하기 실시예에서 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0044] 제조예 : 풋사과 추출물 및 분획물의 제조

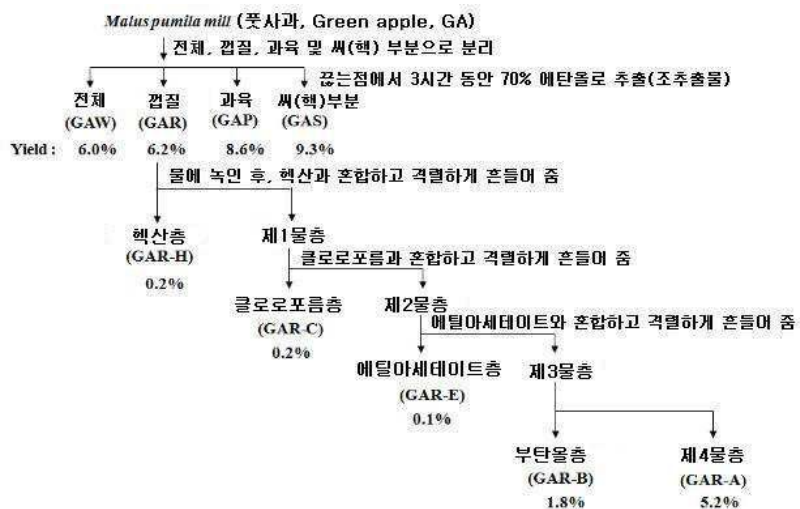
[0045] 풋사과(*Malus pumila mill*, Chungnam, Korea)는 2011년 충청남도 당진시에서 재배된 것을 구입하여 사용하였다.

[0046] 풋사과는 5kg을 구입한 후 껍질, 과육, 핵(씨) 부분과 전체로 분리하고 바로 동결 건조시켰다. 동결 건조한 결과, 각각 15.1%, 23.4%, 14.7%, 25.9%의 수율을 얻었다.

[0047] 풋사과 껍질, 과육, 핵 부분과 전체 각각에 대하여 약 300 g을 70% 에탄올 3 L에 넣고 3시간 동안 환류 추출한 후 여과(Whatman NO 2, Maidstone, England)하여 농축 및 동결 건조하여 조추출물을 제조하였다. 모든 추출물은 실험에 사용하기 전까지 냉장 보관하였다. 얻어진 조추출물의 수율은 껍질(GAR) 6.2%, 과육(GAP) 8.57%, 핵(GAS) 9.3%, 전체(GAW) 6%이었다.

[0048] 풋사과 껍질의 조추출물 100 g을 증류수 1 L에 녹인 용액을 분별깔때기에 넣고, 여기에 헥산 1 L를 같이 넣어 흔들어 주었다. 이를 세 번 반복해주고, 용매는 헥산부터 시작하여 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 분획을 실시하였다. 얻은 분획 용액을 농축 및 동결 건조하여 분획물을 제조하였다. 분획을 실시한 결과, 헥산층(GAR-H) 0.2%, 클로로포름층(GAR-C) 0.23%, 에틸아세테이트층(GAR-E) 0.11%, 부탄올층(GAR-B) 1.77%, 물층(GAR-A) 5.15%의 수율을 얻었다.

[0049] [풋사과 추출물 및 분획물의 제조과정]



[0050]

[0051] 실시예 1 : 풋사과 추출물 및 분획물의 항산화 활성

[0052] 본 실시예에서는 상기 제조예의 풋사과 추출물(전체, 껍질, 과육 및 핵 부분)과 풋사과 껍질의 분획물에 대하여

항산화 활성을 측정하였다.

- [0053] 실험에서 사용된 시약 dimethyl sulfoxide(DMSO), quercetin dehydrate, gallic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2N Folin-ciocalteu reagent는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 2% $\text{AlCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 용액, 20% Na_2CO_3 용액, 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine), 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 용액, 0.3 M sodium acetate buffer를 제조하여 실험에 사용하였으며 그 외의 시약은 특급으로 사용하였다.
- [0054] <총 플라보노이드(Flavonoid) 함량의 측정>
- [0055] 총 플라보노이드 함량을 측정하기 위하여 AlCl_3 colorimetric assay를 수행하였다. 각 추출액 100 μl 에 2% $\text{AlCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 용액을 100 μl 가하고 5분 방치한 후, 흡광도 값을 430 nm에서 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 퀘르세틴 당량(quercetin equivalents, QE)으로 나타내었다.
- [0056] <총 폴리페놀(Polyphenol) 함량의 측정>
- [0057] 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위하여 Folin-Denis법을 일부 변형하여 정량하였다. 추출물 500 μl 에 2N Folin-ciocalteu reagent 0.25 mL를 가한 후 20% Na_2CO_3 용액 1.25 mL를 가하여 잘 섞고, 실온에서 40분간 방치한 후 spectrophotometer(BioTek)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 갈산 당량(gallic acid equivalents, GAE)으로 나타내었다.
- [0058] <FRAP(Ferric-reducing antioxidant power)의 측정>
- [0059] FRAP 분석은 3.6의 낮은 pH에서 Fe^{3+} -TPTZ 복합체가 시료에 의해서 파란색의 Fe^{2+} -TPTZ 복합체로 환원될 때 흡광도를 측정하여 화합물에 대한 환원력(ferric reducing ability)을 보는 것이다. FRAP 시약으로서 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 2.5 mL, 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 용액 2.5 mL과 pH 3.6의 0.3 M sodium acetate buffer 25 mL을 가하였다. 그 후 FRAP reagent 3 mL에 풋사과 추출물 100 μl 를 넣어 혼합한 것을 37°C에서 5분 경과 후에 593 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 곡선으로 $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 를 사용하여 철 이온의 환원력을 산출하였다. 대조군으로는 아스코르브산을 사용하였다.
- [0060] <DPPH·SC₅₀(DPPH-scavenging capacity)의 측정>
- [0061] 에탄올에 녹인 700 μM DPPH 시약 100 μl 에 추출물 100 μl 를 넣고 잘 섞어주고 어두운 상태로 30분간 방치한 후 515 nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였고, 대조군으로 아스코르브산을 사용하였다. 그 값은 초기 DPPH 라디칼 50%를 감소시키는데 필요한 추출물의 농도(SC₅₀)로 나타내었다.
- [0062] 풋사과 추출물(전체, 껍질, 과육 및 핵 부분)과 풋사과 껍질 분획물에 대하여 총 플라보노이드 함량, 총 폴리페놀 함량, FRAP, DPPH·SC₅₀를 측정한 결과는 하기 표 1, 2에 나타내었다.

표 1

	Total flavonoid (μg QE/mg DM)	Total polyphenol (μg GAE/mg DM)	FRAP (mM Fe(II)/mg DM)	DPPH·SC ₅₀ (μg DM/mL)
GAW	0.59±0.03 ^b	23.88±1.25 ^b	0.17±0.01 ^a	1404.75±12.17 ^b
GAR	2.42±0.00 ^a	35.85±4.79 ^{ab}	0.36±0.03 ^b	668.89±12.40 ^c
GAP	0.49±0.03 ^b	34.40±3.57 ^{cd}	0.16±0.01 ^c	1491.74±15.80 ^d
GAS	0.54±0.03 ^b	41.23±2.45 ^{ade}	0.20±0.02 ^c	864.40±16.81 ^e
Vitamin C	-	-	9.85±0.16 ^a	29.14±2.13 ^f

[0063]

표 2

	Total flavonoid (μg QE/mg DM)	Total polyphenol (μg GAE/mg DM)	FRAP (mM Fe(II)/mg DM)	DPPH·SC ₅₀ (μg DM/mL)
GAR-H	8.70 $\pm$ 0.47 ^a	41.07 $\pm$ 4.76 ^a	0.30 $\pm$ 0.02 ^a	555.3 $\pm$ 11.2 ^a
GAR-C	2.81 $\pm$ 0.10 ^b	51.47 $\pm$ 3.48 ^a	0.32 $\pm$ 0.06 ^a	540.9 $\pm$ 39.3 ^a
GAR-E	66.28 $\pm$ 2.87 ^c	198.66 $\pm$ 10.92 ^b	2.63 $\pm$ 0.30 ^b	244.0 $\pm$ 14.5 ^b
GAR-B	0.17 $\pm$ 0.03 ^d	40.51 $\pm$ 3.76 ^a	0.23 $\pm$ 0.04 ^a	1388.7 $\pm$ 359.1 ^c
GAR-A	0.00 $\pm$ 0.00 ^d	12.43 $\pm$ 1.77 ^c	0.04 $\pm$ 0.00 ^a	10686 $\pm$ 2725.5 ^d
Vitamin C	-	-	11.2 $\pm$ 0.25 ^c	50.2 $\pm$ 1.14 ^a

[0064]

[0065]

상기 표 1, 2에 의하면, 풋사과 조추출물의 경우 껍질(GAR)의 활성이 가장 높았으며, 풋사과 껍질의 각각의 분획물의 경우에는 에틸 아세테이트 층에서 가장 높은 활성을 보였다.

[0066]

따라서 아래에서는 풋사과 껍질 추출물의 에틸아세테이트층에 대하여만 실험을 수행하였다.

[0067]

실시예 2 : 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물의 단백질 응집효과

[0068]

본 실시예에서는 상기 제조예의 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 층(GAR-E)에 대하여 단백질 응집효과를 측정하였다. 한편, 상기 제조예와 동일한 방법으로 붉은 사과 껍질의 에틸아세테이트층(RAR-E)을 수득하여 단백질 응집효과를 함께 비교평가하였다.

[0069]

Bovine serum albumin(BSA)와 tannic acid는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입했고, 50 mM citrate acid-phosphate buffer(pH 4.5)를 제조하여 실험에 사용하였다.

[0070]

단백질로 0.3% 알부민이 함유된 50 mM 구연산 완충용액 (pH 4.5) 580 μL 에 추출물 20 μL 를 넣고 잘 흔들어 준 후 5분 동안 정지시킨 뒤 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 시료를 녹인 용매를 사용하였다.

[0071]

그 결과는 도 1에 나타내었는데, 대조군에 비해 GAR-E는 204%, RAR-E는 150%로 풋사과 껍질의 에틸아세테이트층(GAR-E)이 붉은 사과 껍질의 에틸아세테이트층(RAR-E)에 비하여 높은 단백질 응집효과를 나타냈다. 이로부터 본 발명의 풋사과 껍질의 에틸아세테이트층(GAR-E)은 탁월한 모공 수축 효과를 가짐을 알 수 있었다.

[0072]

실시예 3 : 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물의 피지 분비 억제 효과

[0073]

본 실시예에서는 상기 제조예의 풋사과 껍질의 에틸아세테이트층(GAR-E)에 대하여 피지 분비 억제효과를 확인하였다.

[0074]

<세포 독성 확인>

[0075]

풋사과 껍질의 에틸아세테이트층(GAR-E)의 피지 분비 억제효과를 측정하기에 앞서 세포 독성을 확인하였다.

[0076]

Human keratinocytes cell line인 HaCaT은 DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium, WelGENE Inc) 배지에 1% penicillin-streptomycin, 10% FBS(fetal bovine serum)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0077]

Human keratinocytes인 HaCaT을 24-well plates에 1×10^5 cell/well의 농도로 처리한 다음 24 시간 배양하였다. 세포가 바닥에 부착되면 최대 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 농도별로 헥산층(GAR-H)과 에틸아세테이트층(GAR-E)을 3시간 동안 처리하였다.

[0078]

이 후 40 μL 의 MTT 시약과 DMEM media 200 μL 의 조건으로 배지를 3시간 동안 교환하고, DMSO를 이용하여 생성된 formazan 결정을 용해시킨 후, 540 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. MTT 측정법은 하기 수학적 식으로 세포생존율을 계산하였다.

[0079]

[수학적식]

[0080]

세포생존율(%) = [(대조군 O.D. - 실험군 O.D.) / 대조군 O.D.] $\times$ 100 (%)

[0081] 그 결과는 하기 도 2에 나타내었는데, GAR-E는 모든 농도에서 세포 독성이 보이지 않았다.

[0082] <5-alpha-reductase type 1 mRNA 발현 억제 효과>

[0083] Human keratinocytes cell line인 HaCaT은 DMEM 배지에 1% penicillin-streptomycin, 10% FBS(fetal bovine serum)을 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0084] 세포 독성이 보이지 않는 500 µg/mL의 분획물을 HaCaT에 3시간 동안 처리하고, RT-PCR을 통하여 분획물의 5-alpha-reductase type1의 mRNA 발현 억제 활성 실험을 진행하였다. mRNA 발현 정도는 1.5% agarose gel을 red safe로 염색시킨 후 전기 영동시켜 확인하였고, 양성대조군으로는 5-alpha-reductase 효소 발현 저해제로 알려진 CuSO₄를 사용하였다. 각 gene의 primer sequence는 아래와 같다.

표 3

5-alpha-reductase type1 (size : 268bp)	forward : TGGCGCTTCTCTATGGACTT
	reverse : GGAAGCAACTGCAGTTGA
GAPDH (size : 550bp)	forward : AGGTCGGAGTCAACGGATTG
	reverse : ACAGTCTTCTGGGTGGCAGTG

[0086] 그 결과는 도 3에 나타내었는데, 이에 의하면 풋사과 껍질 추출물의 에틸아세테이트층(GAR-E)은 17.9% 효소 발현을 감소시켜 5-alpha-reductase type 1 mRNA 발현 억제 활성을 보임을 알 수 있었다. 이에 풋사과 껍질 추출물의 에틸아세테이트층(GAR-E)은 피지 분비 억제 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0087] 실시예 4 : 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물의 콜라겐 합성 촉진 효과

[0088] 본 실시예에서는 상기 제조예의 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물(GAR-E)에 대하여 콜라겐 합성 촉진 효과를 확인하였다.

[0089] <세포 독성 확인>

[0090] 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물에 대하여 콜라겐 합성 촉진 효과를 확인하기에 앞서 세포 독성을 먼저 확인하였다.

[0091] Human fibroblast cell line인 CCD-986sk는 한국세포주은행(Seoul, Korea)로부터 배양 받아 DMEM 배지에 1% penicillin-streptomycin, 10% FBS(fetal bovine serum)을 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0092] Human fibroblast인 CCD-986sk는 96-well plates에 5×10^3 cell/well로 처리한 다음 24 시간 배양하였다. 세포가 바닥에 부착되면 최대 1,000 µg/mL까지 농도별로 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물을 6시간 처리하였다. 이 후 40 µL의 MTT 시약과 DMEM 200 µL의 조건으로 배지를 3 시간 동안 교환하고, DMSO를 이용하여 생성된 formazan 결정을 용해시킨 후, 540 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. MTT 측정법은 상기 수확식과 동일한 방법으로 세포 생존율을 계산하였다.

[0093] 그 결과는 도 4에 나타내었는데, 모든 농도에서 세포 독성이 보이지 않았으며, 고농도에서 fibroblast를 proliferation을 시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0094] <콜라겐 합성 촉진 효과>

[0095] 표준물질로 Type I collagen (3 mg/ml, pH 3.0, cellmatrix LA; Nitta Gelatin Inc, Osaka, Japan)을 사용하였으며, antibody는 primary antibody인 COL1A1(santa cruz biotechnology, Inc. California, USA)와 secondary antibody인 Rabbit-anti goat(santa cruz biotechnology, Inc. California, USA)를 사용하였다. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0096] Human fibroblast인 CCD-986sk 96-well plates에 5×10^3 cell/well로 처리한 다음 24 시간 배양하였다. 세포

가 바닥에 부착되면 GAR-E를 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 로 6시간 처리하고, 배지만을 취하여 ELISA 실험을 진행하였다. ELISA용 96 well plate에 표준물질과 추출물을 농도별로 처리한 배지를 50 μl 씩 분주한 다음 밀봉하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 방치하였다. 0.05% TBST로 세척한 후 primary antibody인 COL1A1 100 μl 첨가 후 밀봉하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 방치하였다. 다시 0.05% TBST로 세척한 후, secondary antibody 100 μl 첨가 후 밀봉하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 방치하였다. 0.05% TBST로 세척한 후 substrate 100 μl 를 첨가하여 육안으로 색변화가 관찰되면 0.5N H_2SO_4 를 첨가하고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0097] 그 결과는 도 5에 나타내었는데, 이에 의하면 양성 대조군으로 알려진 비타민 C는 대조군과 유의적 차이가 없었으나 GAR-E를 처리하였을 때는 농도 의존적으로 콜라겐 합성이 증가하는 것이 확인되었다.

[0098] **실시예 5 : 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물의 involucrin 합성 촉진 효과**

[0099] 본 실시예에서는 상기 제조예의 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물(GAR-E)에 대하여 involucrin 합성 촉진 효과를 확인하였다.

[0100] <세포 독성 확인>

[0101] 풋사과 껍질의 에틸아세테이트 분획물(GAR-E)에 대하여 involucrin 합성 촉진 효과를 확인하기에 앞서 세포 독성을 먼저 확인하였다.

[0102] Human keratinocytes cell line인 HaCaT은 DMEM 배지에 1% penicillin-streptomycin, 10% FBS(fetal bovine serum)을 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

[0103] Human keratinocytes인 HaCaT을 24-well plates에 1×10^5 cell/well로 처리한 다음 24 시간 배양하였다. 세포가 바닥에 부착되면 최대 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도별로 풋사과 에틸아세테이트 분획물(GAR-E)을 24 시간 처리하였다. 이 후 40 μl 의 MTT 시약과 DMEM 200 μl 의 조건으로 배지를 3 시간 동안 교환하고, DMSO를 이용하여 생성된 formazan 결정을 용해시킨 후, 540 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. MTT 측정법은 상기 수학적식에 의해 세포 생존율을 계산하였다.

[0104] 그 결과는 도 6에 나타내었는데, 이에 의하면 125 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 고농도에서부터 세포 독성이 나타났으므로, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 이하의 농도로 처리하여 실험을 진행하였다.

[0105] <각질형성 마커인 involucrin 합성 촉진 효과>

[0106] Human involucrin ELISA kit (TSZ ELISA, Cat NO. HU8357)를 구입하여 사용하였다.

[0107] Human keratinocyte인 HaCaT에 GAR-E를 농도별로 처리하고, involucrin ELISA kit를 통해 발현된 involucrin 함량을 측정하였다.

[0108] 그 결과는 하기 표 4와 도 7에 나타내었는데, 24 시간 동안 GAR-E 100, 50, 25 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 involucrin 함량이 각각 2.19, 3.23, 4.23 $\mu\text{g/g}$ cell protein으로 저 농도로 갈수록 involucrin 함량이 증가하였다. 고농도에서는 대조군과 유의적인 차이가 없었으나 오히려 저 농도에서 유의적인 차이가 있었으며, 이는 저 농도의 GAR-E 처리만으로도 involucrin 합성 촉진 효과가 있음을 나타낸다.

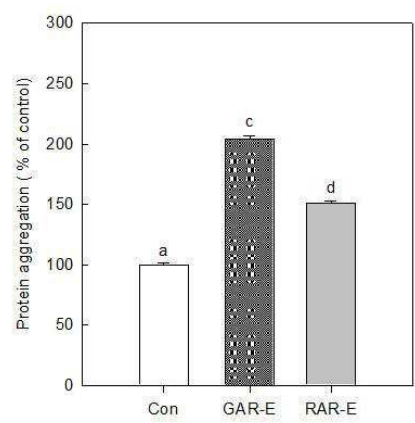
표 4

[0109]

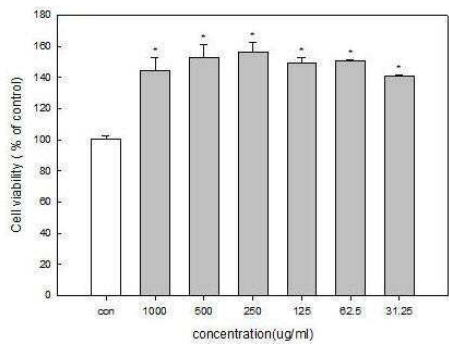
	대조군	GAR-E (100 $\mu\text{g/ml}$)	GAR-E (50 $\mu\text{g/ml}$)	GAR-E (25 $\mu\text{g/ml}$)
Involucrin	2.69 ± 0.34^{ab}	2.19 ± 0.16^{bc}	3.23 ± 0.48^a	4.23 ± 0.11^d

도면

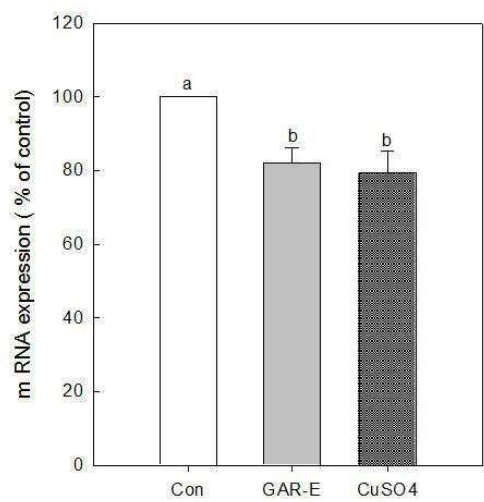
도면1



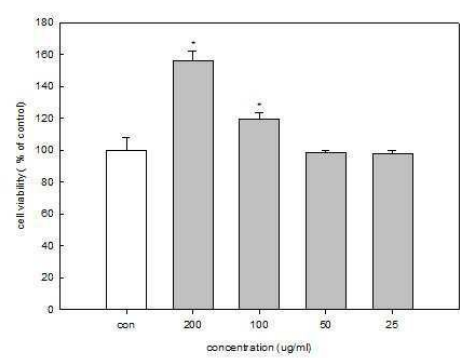
도면2



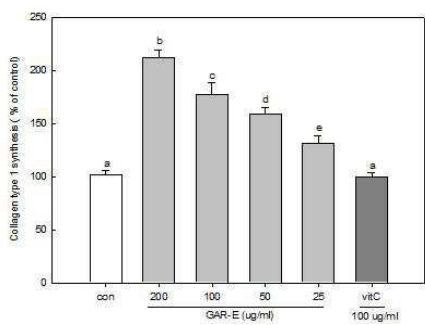
도면3



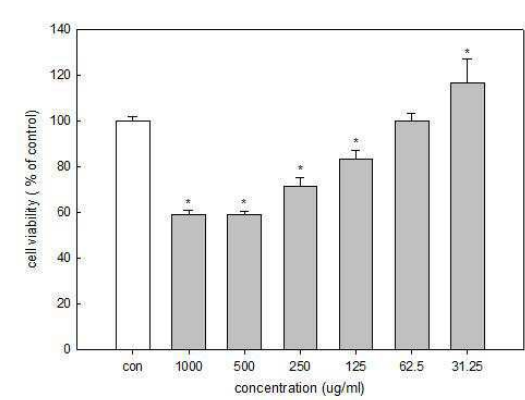
도면4



도면5



도면6



도면7

