



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0097157
(43) 공개일자 2020년08월18일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 8/9794</i> (2017.01) <i>A23L 33/105</i> (2016.01)
 <i>A61Q 19/08</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 8/9794</i> (2017.08)
 <i>A23L 33/105</i> (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0014587
 (22) 출원일자 2019년02월07일
 심사청구일자 2019년02월07일</p> | <p>(71) 출원인
 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
 오명숙
 서울특별시 강남구 삼성로 151 1동 305호 (대치동, 선경아파트)</p> <p>노동진
 서울특별시 동대문구 이문로6길 39 303호</p> <p>(74) 대리인
 특허법인한얼</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 10 항

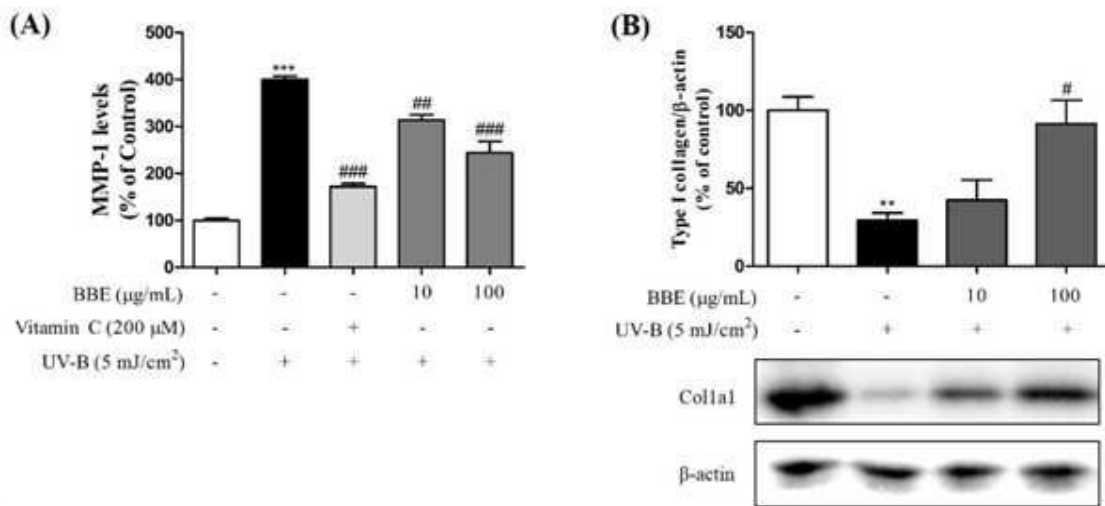
(54) 발명의 명칭 **사간 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 또는 피부 주름 개선용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 사간(Belamcandae Rhizoma) 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 개선용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로는, 사간 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 피부 노화 또는 주름 개선용 화장품 조성물, 피부 개선용 식품 조성물, 의약품 조성물 및 상기 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 피부 노화 방지 또는 주름 개선 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 텍토리제인은 UV-B로 인한 활성 산소 증가, 항산화 활동 감소, 콜라겐 분해 및 세포 자살을 억제 또는 보호 효과가 우수하여 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선을 위한 화장품, 의약품 및 의약품 조성물에 이용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61Q 19/08 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

A61K 2800/522 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

사간(Belamcandae Rhizoma) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 피부노화 또는 피부주름 개선용 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 제조되는 것인, 화장료 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 추출물은 열수 추출물인 것인, 화장료 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 추출물은 전체 조성물 대비 0.0001 내지 10 중량%를 포함하는 것인, 화장료 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 항산화 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 것인, 화장료 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스 트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 페취 및 스프레이로 구성된 군에서 선택되는 제형을 갖는 것인, 화장료 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 피부 노화는 광노화인 것인, 화장료 조성물.

청구항 8

사간(Belamcandae Rhizoma) 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는, 피부 노화 또는 피부 주름 개선용 식품 조성물.

청구항 9

사간(Belamcandae Rhizoma) 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는, 피부개선용 의약품 조성물.

청구항 10

사간 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 사간(Belamcandae Rhizoma) 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 개선용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로는, 사간 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 피부 노화 또는 주름 개선용 화장품 조성물, 피부 개선용 식품 조성물, 의약품 조성물 및 상기 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 피부 노화 방지 또는 주름 개선 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 피부가 자외선에 노출되면 산화 스트레스에 의해 건조, 주름 및 변색과 같은 1차 손상이 발생한다. 상기 피부 노화의 주원인인 UV-B(280-320 nm)는 표피에서 활성산소(ROS)를 생성해 세포 죽음과 주름을 야기한다. 상기 활성산소는 미토콘드리아에서 세포질로 사이토크롬C의 분비를 촉발하고 Caspase-3 수준을 상향 조정함으로써 표피 각질형성세포의 세포 자살을 유도하고 Bcl-2 단백질과 Bcl-2 관련 단백질X(Bax)는 이 과정을 조절한다. 또한, 활성산소는 MMP 패밀리의 주요 콜라겐분해효소인 금속단백분해효소(MMP)-1의 과발현시켜 콜라겐 섬유의 붕괴를 촉진하여 피부 노화와 피부 주름을 일으킨다.

[0004] 한편, 피부는 슈퍼옥사이드 디스뮤타아제(Superoxide dismutase), 글루타티온(GSH) 및 카탈라아제(Catalase)와 같은 항산화 효소와 같은 생리적 방어 시스템을 가지고 있다. 상기 효소들은 활성산소를 H₂O와 O₂와 같은 무독성 물질로 변화시켜 상기 위험으로부터 우리 몸을 보호한다.

[0005] 범부채의 뿌리줄기인 사간은 숙취, 해열, 가래 해소, 구취 및 기침을 치료하는 한국 전통 의약품으로 널리 사용된다. 상기 사간은 항암, 항박테리아 및 항염증 반응에 효과를 보여 혈액 지질 수치를 낮춰주고, 에스트로겐 수용체 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다. 지금까지 사간 추출물의 퇴행성 뇌질환, 기침, 천식 및 피부 미백 효과에 대한 발명은 이루어 졌으나 피부 노화 또는 피부 주름 개선에 대한 효과에 대한 발명은 이루어 지지 않았다.

[0007] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 천연에 존재하는 천연자원들로부터 우수한 피부 개선 효과를 나타내는 물질에 관하여 예의 연구노력한 결과, 사간이 UV-B로부터 각질형성세포의 세포 사멸 또는 콜라겐 저하를 방지함과 세포 내 활성 산소, 항산화 효소, MMP-1, 콜라겐 타입I 및 Bcl-2, Bax, caspase-3와 같은 세포 자살 단백질의 수준을 조절할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 사간 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 또는 피부 주름 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은 사간 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 또는 피부 주름 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

- [0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 사간 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 또는 피부 주름 개선용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 피부 노화 방지 또는 주름 개선 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명자들은 천연에 존재하는 천연자원들로부터 우수한 피부 개선효과를 나타내는 물질을 이용한 다양한 연구 수행 결과, 사간 추출물이 UV-B로부터 케라틴 세포의 세포 자살과 콜라겐 저하를 방지함과 세포 내 활성 산소, 항산화 효소, MMP-1, 콜라겐 타입I, 또는 Bcl-2, Bax, caspase-3와 같은 세포 자살 단백질의 수준을 조절할 수 있음을 확인하였다. 이를 통해 사간이 피부 노화 또는 피부 주름 개선을 위한 화장료 조성물로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 상기 피부 노화 또는 피부 주름 개선 효과를 가지는 사간 추출물을 포함하는 화장료 조성물은 지금까지 전혀 알려지지 않고, 본 발명자에 의해 최초로 개발되었다는 점에서 그 의의가 매우 크다고 할 수 있다.
- [0016] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 사간 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 또는 피부 주름 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명에서 사용된 용어, "사간"은 붓꽃과에 속하는 다년생 초본식물인 범부채의 뿌리줄기로서, 범부채(*Belamcanda chinensis* Leman)는 처음 싹이 나와서부터 질서 있게 퍼지면서 자라는 모양이 부채꼴 같다고 하여 범부채라 불렸다. 고려 때부터 호의선(虎矣扇)이라고 부르던 것이 『동의보감』에 범부채·범부처로 되어 지금에 이르고 있다. 길이 30~50cm, 너비 2~4cm로 끝이 뾰족하고 밑부분이 서로 열썩아난 형태를 보이고, 꽃은 황적색 바탕에 짙은 반점이 있는데 7~8월에 피며, 범부채의 뿌리줄기는 해열·해독·소염작용이 있어서 사간(射干)이라고 하여 약으로 쓰이는데, 숙취, 해열, 가래 해소, 구취 및 기침을 치료하는 한국 전통 의약품으로 널리 사용된다. 상기 사간은 항암, 항박테리아 및 항염증 반응에 효과를 보여 혈액 지질 수치를 낮춰주고, 에스트로겐 수용체 활성을 조절하는 것으로 알려져 있으나, 사간의 피부 노화 혹은 피부 주름 개선 효과에 대해서는 본 발명자가 최초로 규명한 것이다. 상기 사간은 상업적으로 판매되는 것을 구입할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명에서 사용된 용어, "추출물"은 어떤 물질을 추출 처리하여 얻어지는 물질을 의미하는 것으로, 구체적으로 상기 본 발명의 사간의 추출처리에 의하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나, 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.
- [0020] 상기 사간을 추출하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 용매 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 상기 사간의 추출에 사용되는 추출용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출용매의 비제한적인 예로는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합 용매 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 추출용매는 열수일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 사간과 에탄올을 역류 추출기(reflux extractor)에 넣어 침적시킨 후 가열하여 사간 추출물을 수득한 후, 동결건조하여 사간 추출물 시료를 제조하였다.
- [0023] 본 발명의 화장료 조성물은, 상기 추출물을 전체 조성물 대비 0.0001 내지 10 중량% 포함할 수 있고, 구체적으로 0.0005 내지 5 중량%를 포함할 수 있다.
- [0024] 상기 함량이 0.0001 중량% 미만일 경우 본래 목적하는 활성을 충분하게 달성 할 수 없어 바람직하지 못하며, 10 중량%를 초과하는 경우 증가하는 함량만큼 뚜렷한 효과의 증대가 기대되지 않아 비경제적일 수 있다.

- [0025] ??
- [0026] 본 발명에서 사용된 용어, "분획물"은 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.
- [0027] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 분획 방법은 항산화, 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선 효과를 나타낼 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 다양한 용매를 처리하여 수행하는 용매 분획법, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 수행하는 한외여과 분획법, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)를 수행하는 크로마토그래피 분획법 및 이의 조합 등이 될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 데에 사용되는 분획 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 증류수, 알코올 등의 극성 용매; 헥산(Hexan), 에틸 아세테이트(Ethyl acetate), 클로로포름(Chloroform), 디클로로메탄(Dichloromethane) 등의 비극성 용매 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 분획 용매 중 알코올을 사용하는 경우에는 바람직하게는 C1 내지 C4의 알코올을 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 항산화 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0031] 상기 항산화는 산화를 억제하는 작용을 의미하는 것으로, 인체에는 산화촉진 물질(prooxidant)과 산화억제물질(antioxidant)이 균형을 이루고 있으나 여러 가지 요인들에 의하여 이런 균형상태가 불균형을 이루게 되고 산화촉진 쪽으로 기울게 되면, 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되어 잠재적인 세포 손상 및 병리적인 질환을 일으키게 된다.
- [0032] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 사간 추출물이 우수한 DPPH 항산화 활동을 나타냄을 확인하여 사간 추출물이 항산화 활성을 가짐을 알 수 있었다(표 2).
- [0034] 본 발명에서 사용된 용어, "주름"은 피부가 쇠하여 생긴 잔줄을 의미하는 것으로, 유전자에 의한 원인, 피부 진피에 존재하는 콜라겐의 감소, 외부 환경 등에 의해 유발될 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 있어서, 상기 조성물은 MMP-1의 활성을 저해하는 것일 수 있다.
- [0036] 상기 MMP-1는 피부 탄력에 관여하는 콜라겐의 분해하는 역할을 갖는 효소를 의미한다.
- [0037] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 사간 추출물이 농도 의존적으로 MMP-1 저해 활성을 나타냄을 확인하여, 사간 추출물이 주름 개선 활성을 가짐을 알 수 있었다(도 6A).
- [0039] 본 발명에서 사용된 용어, "피부 노화"는 피부의 탄력 감소, 윤기 감소, 주름 생성, 재생력 약화 또는 심한 건조 등의 증상이 나타나는 것으로, 시간의 흐름 또는 외부 환경 등에 의해 유발될 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 피부 노화는 광노화인 것일 수 있다.
- [0041] 상기 광노화는 태양광선의 자외선에 반복적이거나 장기간 노출 시 피부의 탄력 및 수분이 감소되고 주름이 형성되는 등 피부손상이 일어나는 현상을 의미한다.
- [0042] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 인간 HaCaT 세포에 사간 추출물을 첨가한 뒤 UV-B를 조사한 경우, UV-B만 조사한 경우와 비교하여 세포 생존율이 증가함을 확인하여, 사간 추출물이 광노화를 억제하거나 광노화로부터 보호하는 효과를 가짐을 알 수 있었다(도 2B).
- [0044] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"은 본 발명의 조성물을 이용하여 피부 노화 또는 주름의 증상을 억제 또는 저해하거나, 이미 나타난 피부 노화 또는 주름의 증상을 완화시키는 것을 말한다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 화장품 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이

스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 구성된 군에서 선택되는 제형으로 제조 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 본 발명의 상기 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.

[0048] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0049] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리암이드 파우더 등이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로하드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0050] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 수 있으며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0051] 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 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는, 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 다른 하나의 양태는, 사간 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 방지 또는 주름 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0055] 본 발명에서 사용된 용어 "사간", "추출물", "분획물", "피부 노화", 및 "주름"은 상기에서 서술한 바와 같다.

[0056] 본 발명에서 사용되는 용어 "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약외품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.

[0057] 본 발명의 상기 의약외품 조성물은 바디 클렌저, 폼, 비누, 마스크, 연고제, 크림, 로션, 에센스 및 스프레이로 이루어진 군에서 선택되는 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명에 따른 상기 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용 할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0060] 본 발명의 다른 하나의 양태는 사간 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포

함하는 피부 노화 방지 또는 주름 개선 방법을 제공한다.

- [0061] 본 발명에서 사용된 용어 "사간", "추출물", "분획물", "피부 노화", 및 "주름"은 상기에서 서술한 바와 같다.
- [0062] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 조성물이 항산화, 미백, 피부 노화 또는 주름 개선에 효과가 있는 특성상, 상기 조성물의 투여 경로는 피부에 도포하여 투여될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 조성물을 매일 투여 또는 간헐적으로 투여해도 좋고, 1일당 투여 횟수는 1회 또는 2~3회로 나누어 투여하는 것이 가능하다. 또한, 본 발명의 조성물은 항산화, 피부 노화 또는 주름 개선 위하여 단독으로, 또는 다른 약물 치료와 병용하여 사용할 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0064] 본 발명에서 용어, "개체"는 주름 또는 피부 노화가 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 구체적으로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.
- [0065]
- [0066] 종합하면, 사간 추출물이 UV-B로부터 케라틴 세포의 세포 자살과 콜라겐 저해를 방지함과 세포 내 활성 산소, 항산화 효소, MMP-1, 콜라겐 타입I, 또는 Bcl-2, Bax, caspase-3와 같은 세포 자살 단백질의 수준을 조절함으로써, 피부 노화 또는 피부 주름 개선을 위한 화장품 조성물, 의약품 및 의약외품 조성물로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

발명의 효과

- [0068] 본 발명에 따른 사간 추출물은 UV-B로 인한 활성 산소 증가, 항산화 활동 감소, 콜라겐 분해 및 세포 자살을 억제 또는 보호 효과가 우수하여 피부 노화 방지 또는 피부 주름 개선을 위한 화장품, 의약품 및 의약외품 조성물에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0070] 도 1은 사간 추출물의 HaCaT 세포에 대한 세포 독성 및 사간 추출물의 세포 보호 효과를 평가하기 위한 그래프이며, A는 사간을 처리하지 않은 대조군 및 사간 추출물을 처리한 그룹들의 세포 생존율이다. B는 사간 추출물과 25mJ/cm² UV-B를 24시간 조사 후의 세포 생존율이다.
- 도 2는 HaCaT 세포를 통한 사간 70% 에탄올 추출물 (BBE)의 세포 독성 및 세포 보호능력 평가를 MTT를 통해 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 BBE의 UV-B로 인한 HaCaT 세포 내 활성 산소 발현 억제 효과를 형광을 통해 확인하였다.
- 도 4는 BBE의 UV-B로 인한 HaCaT 세포 내 Catalase 및 GSH의 억제 효과를 웨스턴블랏팅 및 GSH 정량 키트를 통해 확인하였다.
- 도 5는 BBE의 UV-B로 인한 HaCaT 세포 내 caspase-3 과발현 및 Bcl-2/Bax 함량비의 조절 효과를 웨스턴블랏팅을 통해 확인하였다.
- 도 6은 BBE의 UV-B로 인한 HaCaT 세포 내 MMP-1 발현 및 콜라겐 저해 억제 효과를 ELISA 키트와 웨스턴블랏팅을 통해 확인하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0071] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0073] **실시예 1: 사간 추출물 준비**

[0074] 사간 추출물을 제조하기 위하여, 하기와 같은 방법들로 열수 추출하였다.

[0075] 상기 사간은 현진 제약(서울)을 통해 중국에서 구매하였으며, 사간의 추출물의 추출 방식을 달리하여 4가지의 하기 시료를 준비하였다. 사간 5g을 증류수에 넣고 역류 추출기(reflux extractor)에서 2시간 동안 끓이고, 여과, 증발 및 동결건조 하여 획득한 분말 시료 BBD, 사간 5g을 70% 에탄올에 넣고 역류 추출기에서 2시간 동안 끓이고, 여과, 증발, 및 동결건조 하여 획득한 분말 시료 BBE, 사간 5g을 증류수에 넣고 상온에서 24시간 동안 반응시키고, 여과, 증발 및 동결건조 하여 획득한 분말 시료 BRD, 사간 5g을 70% 에탄올에 넣고 상온에서 24시간 동안 반응시키고, 여과, 증발 및 동결건조 하여 획득한 분말 시료 BRE를 제조하였다.

표 1

Sample	Extraction method	Solvent	Yield (%)
BBD	Extracted in 100℃ (2+1 h)	DW	32.8
BBE	Extracted in 100℃ (2+1 h)	70% EtOH	28.8
BRD	Extracted in RT (24 h)	DW	20.7
BRE	Extracted in RT (24 h)	70% EtOH	19.0

[0077]

[0079] 실험 결과, 증류수 또는 에탄올을 용매로 이용하여 2가지 추출 방식을 통해 상기의 수득율로 분말 시료를 취하였다.

[0081] **실시예 2: 사간 추출물에 의한 항산화 효과**

[0082] 사간 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위하여, 1,1-디페닐-2-피크릴히드라질(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)와 2,2-아지노-비스-3-에틸벤조시아졸린-6-설폰산(2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, ABST) 분석을 통해 비교하였다.

[0083] 구체적으로, 상기 4가지 추출물들을 각각 0.2mM DPPH 용액과 혼합하였으며(1:1), DPPH 용액을 넣지 않고 사간과 에탄올을 혼합한 시료(블랭크)와, 0.2mM DPPH 용액과 증류수만 혼합한 시료를 제조하여 비교하였다. 상온에서 30분간 반응시킨 뒤, 분광 광도계를 사용하여 517nm에서 시료들의 광 밀도를 측정하였다. 다음으로, 각 시료의 항산화 활성도(%)를 하기의 방법을 통해 산출하였다.

[0085] DPPH 항산화 활동 (%) = (대조군-(샘플-블랭크))/대조군 X 100%.

[0087] 또한, 7.40mM ABTS 용액에 2.60mM 과산화염포타슘(potassium persulfate)을 추가하여 하루 동안 빛이 없는 조건에서 반응시켰다. 그 뒤, 4가지 사간 시료를 0.20mM ABTS 용액에 혼합하고 (1:20), 대조군을 위해 0.20mM ABTS 용액 또는 증류수에 혼합하였다. 30분 동안 상온에서 반응시킨 뒤, 각 시료의 광 밀도를 732nm에서 측정하였다. 각 샘플의 항산화 활성은 하기의 방법을 통해 산출하였다. 이때, 황금이라 불리는 Scutellariae Radix(SR)는 본 실험에서 양성 대조군으로 사용되었다.

[0089] ABTS 항산화 활동 (%) = (대조군-샘플)/대조군 X 100%.

[0091] 상기 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

Sample	IC ₅₀ value in DPPH assay (μg/mL)	IC ₅₀ value in ABTS assay (μg/mL)
BBD	249.75	275.41
BBE	141.42	153.16
BRD	398.93	604.52
BRE	297.51	237.18
SR	15.82	33.54

[0092]

[0094] 실험 결과, DPPH와 AWST 분석을 통해 4가지 추출물들의 항산화 효과를 비교했고, BBE의 항산화 효과가 가장 높았다 (표 2).

[0097] 실시예 3: 사간 추출물의 UV-B로부터 세포 보호 효과 측정

[0098] 사간 추출물의 광노화 억제 또는 보호 효과를 측정하기 위하여, UV-B 조사로 유도되는 세포 자살에 대한 사간 추출물의 억제 또는 보호 효과를 확인하였다.

[0099] 구체적으로, 인간 피부 케라틴 세포 HaCaT를 10% 열 비활성화 된 FBS 및 1% P/S가 포함된 DMEM 배양액에 접종하고, 95% 대기 및 5% CO₂와 37°C 조건에서 배양하였다. 상기 인간 HaCaT 세포는 96-웰 플레이트에 1.0x10⁴ cells/well 농도로 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 그 다음, PBS로 세척하고 25mJ/cm² UV-B로 조사하였으며 UV-B는 7.5cm 거리에서 5 Sankyo Denki 태양등을 사용해 조사하였다. 그 다음, 상기 세포를 DMEM으로 희석한 상기 사간 샘플들(10 μg/mL)에 침지하여 24시간 동안 배양하고 1 μg/mL MTT로 옮겼다. 4시간 뒤, 상등액을 100 μL DMSO로 교체하여 570nm 파장으로 흡광도를 측정하는 MTT 분석법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다.

[0100] 실험 결과, 어떠한 추출물도 인간 HaCaT 세포에는 독성을 보이지 않았다(도 1A). 사간 추출물들을 처리한 뒤 UV-B를 조사한 경우, 모든 추출물에서 세포 생존율이 증가함을 확인하였다. 또한, 4가지 시료 중 BBE를 처리했을 때 세포 생존율이 가장 증가함을 확인하여 이후의 실험은 BBE를 이용해 실험하였다(도 1B).

[0101] 따라서, 사간 추출물이 UV-B가 조사된 인간 HaCaT 세포의 세포 생존율을 증가시키므로, 사간 추출물이 광노화 억제 또는 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0103] 실시예 4: 사간 추출물의 농도 의존도에 따른 세포 보호 효과 측정

[0104] 사간 추출물의 용량에 따른 세포 보호 효과를 확인하기 위하여, UV-B를 조사하여 사간 추출물의 용량에 따른 세포 생존율을 확인하였다.

[0105] 구체적으로, 상기 인간 HaCaT 세포에 25mJ/cm² UV-B를 조사하고 BBE(1, 10, 및 100 μg/mL) 혹은 비타민 C (200 μM)을 24시간 동안 반응시켰다. 비타민C는 양성 대조군으로 사용하였으며, 세포 생존율은 MTT 분석을 통해 확인하였다.

[0106] 실험 결과, UV-B는 상당한 세포 사멸을 유도하였지만 사간 추출물을 처리하고, 또한, 추출물의 용량이 증가할수록 눈에 띄게 생존율이 증가함을 확인하였다(도 2).

[0107] 따라서, 사간 추출물의 농도가 증가할수록 UV-B가 조사된 인간 HaCaT 세포의 생존율을 증가시키므로, 사간 추출물이 농도에 의존하여 광노화 억제 또는 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0109] 실시예 5: 사간 추출물의 UV-B로 인한 활성 산소 생성 억제 측정

[0110] 사간 추출물의 활성 산소 생성 억제 효과를 확인하기 위하여, 사간 추출물의 UV-B를 조사로 유도되는 활성 산소 생성에 대한 억제를 확인하였다.

[0111] 구체적으로, 인간 HaCaT 세포를 검은 96-웰 플레이트에 1.0×10^4 cells/well 농도로 접종 또는 2.0×10^4 cells/well 농도로 24-웰 플레이트 안에 커버슬립을 놓고 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 그 뒤, 배양액을 혈청이 없는 DMEM으로 대체하고, 24시간 후, 상기 세포에 25 mJ/cm^2 UV-B를 조사하였다. 그 다음, 상기 세포들을 DMEM으로 희석한 BBE(1, 10, 및 $100 \mu\text{g/mL}$) 또는 비타민C($200 \mu\text{M}$)로 옮겨 30분간 배양하였다. 그 후, 상기 세포의 배양액을 $20 \mu\text{M}$ DCFH-DA로 교체하여 30분간 추가 배양 후 PBS로 세척하고 형광 마이크로플레이트 해독기(SpectraMax Gemini EM, Molecular Device; Sunnyvale, USA)로 485nm 여기, 535nm 방출로 형광을 측정하였다.

[0112] 실험 결과, DCFH-DA 형광 분석을 사용하여 세포 내 활성 산소가 UV-B 조사 이후, 상당히 증가함을 확인하였으며, 사간 추출물은 UV-B로 인한 세포 내 활성 산소 증가를 억제하였음을 확인하였다(도 3A).

[0113] 따라서, 사간 추출물이 UV-B가 조사된 인간 HaCat 세포 내 활성 산소 증가를 억제하므로, 사간 추출물이 광노화 억제 또는 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0115] 실시예 6: 사간 추출물의 UV-B 손상으로부터 세포를 보호하는 항산화 효소의 분비를 촉진 효과 측정

[0116] 사간 추출물의 항산화 효소 분비를 측정하기 위하여, 항산화 효소인 catalase와 GSH의 분비를 확인하였다.

[0117] 구체적으로, 상기 인간 HaCaT세포를 60mm 배양접시에 1.2×10^6 cells/well 농도로 접종하고 24시간 배양한 뒤, PBS로 3번 세척하고, 25 mJ/cm^2 UV-B를 조사하였다. 상기 세포를 DMEM으로 희석한 BBE($10, 100 \mu\text{g/mL}$)에 옮기고, 2시간 동안 배양하였다. 그 뒤, 원심분리를 하여 세포를 회수하고, 상등액을 실험을 위해 취하였다. SDS-아크릴라마이드 겔에 단백질 샘플을 담지하였다. 모든 항체는 4°C 에서 5% 탈지유에서 배양하였고, 항-래빗 HRP-결합 및 항-마우스 HRP-결합은 2차 항체로 1시간 동안 반응시켰다. ECL 검출 키트를 사용하여 막을 반응시켰고, 밴드 이미지는 LAS-4000 mini system (Fujifilm, Tokyo, Japan)을 사용하여 촬영하였으며, 촬영한 이미지는 Image J (Bethesda, MD, USA)를 통해 정량화하여 β -액틴의 밴드 강도와 비교하였다.

[0118] 또한, 상기 인간 HaCaT 세포를 60mm 배양 접시에 1.2×10^6 cells/well 농도로 접종하고 24시간 동안 배양한 뒤, PBS로 세척하고 5 mJ/cm^2 UV-B로 조사하였다. 상기 인간 HaCaT 세포를 DMEM으로 희석한 BBE($10, 100 \mu\text{g/mL}$)에 옮겨 2시간 추가 배양하고 세포를 회수한 뒤, 글루타티오네 정량화 키트를 이용하여 GSH 함량을 측정하였다.

[0119] 실험 결과, UV-B 조사가 catalase 수준을 약화시켰지만, 사간 추출물은 이러한 약화를 방지함을 확인하였다(도 4A). 또한, UV-B를 조사하면 GSH 수준이 현저히 떨어졌지만 사간 추출물을 투여하면 GSH 수준 감소가 억제됨을 확인하였다(도 4B).

[0120] 따라서, 사간 추출물이 UV-B로 인한 항산화 효소 분비 저하를 억제하므로, 사간 추출물이 광노화의 억제 또는 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0122] 실시예 7: 사간 추출물의 UV-B로 인한 세포 자살-관련 단백질의 과발현 억제 효과 측정

[0123] 사간 추출물의 세포 자살-관련 단백질의 억제를 측정하기 위하여, caspase-3와 Bcl-2/Bax 발현을 확인하였다.

[0124] 구체적으로, 사간 추출물이 UV-B로 인한 세포 자살-관련 단백질인 caspase-3와 Bcl-2/Bax의 발현을 웨스턴블랏팅을 통해 측정하였다. 본 실험에서 사용된 웨스턴블랏팅 방법은 상기에서 서술한 바와 같다.

[0125] 실험 결과, 인간 HaCaT 세포에 UV-B만 조사한 경우, Caspase-3 수준이 증가하는 반면, 사간 추출물을 처리한 뒤 UV-B를 조사한 경우, 상기 단백질의 과발현이 억제됨을 확인하였다(도 5A). 또한, UV-B만 조사할 경우, Bcl-2/Bax 비율이 감소되었으나, 사간 추출물을 처리하고 UV-B를 조사할 경우 상기 감소가 억제되었다(도 5B).

[0126] 따라서, 사간 추출물이 UV-B가 조사된 인간 HaCaT 세포에서 세포 자살-관련 단백질의 과발현을 억제하였으므로, 사간 추출물이 UV-B로 인한 세포 자살의 억제 또는 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0128] 실시예 8: 사간 추출물의 UV-B로 인한 콜라겐 분해 억제 효과 측정

[0129] 사간 추출물의 콜라겐 분해 억제 또는 보호 효과를 측정하기 위하여, UV-B 조사 후 MMP-1과 콜라겐 타입I을 측정하였다.

[0130] 구체적으로, 인간 HaCaT 세포를 24-웰 플레이트에 2.0×10^4 cells/well 농도로 접종하고 배양하였다. 그 다음, 세포에 PBS로 세척하고 5 mJ/cm^2 UV-B를 조사하였다. 세척 후, 세포를 DMEM으로 희석한 BBE(10, 100 $\mu\text{g/mL}$)에 옮겨 24시간 배양하고 상등액을 취하여 MMP-1 ELISA 키트를 사용하여 MMP-1 수준을 측정하였다.

[0131] 또한, 콜라겐 타입 I은 상기 웨스턴블랏팅을 사용하여 측정하였다. 본 실험에서 사용된 웨스턴블랏팅의 방법은 상기에 서술한 바와 같다.

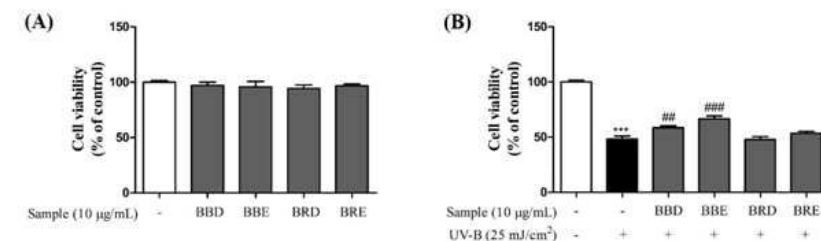
[0132] 실험 결과, 인간 HaCaT 세포에서 UV-B 조사 후 MMP-1 수준은 크게 증가하였다. 반면, 사간 추출물을 투처리하고 UV-B를 조사한 경우, MMP-1 발현이 상당히 억제되었음을 확인하였다(도 6A). 또한, 콜라겐 타입I 수준은 UV-B 조사 후 크게 감소하였으나, 사간 추출물을 처리하고 UV-B를 조사한 경우, 콜라겐 타입I 수준이 유지됨을 확인하였다.

[0133] 따라서, 사간 추출물이 MMP-1의 과발현을 억제하여 콜라겐 타입I이 분해되는 것을 억제 또는 보호 하는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

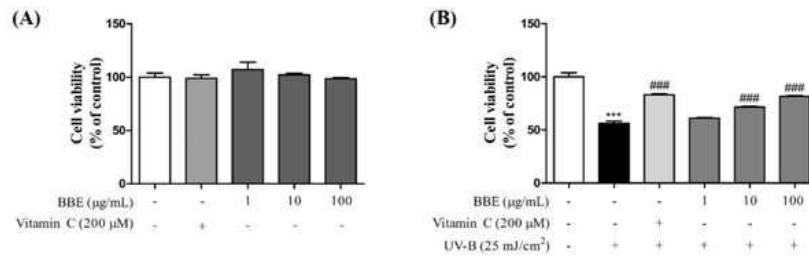
[0135] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

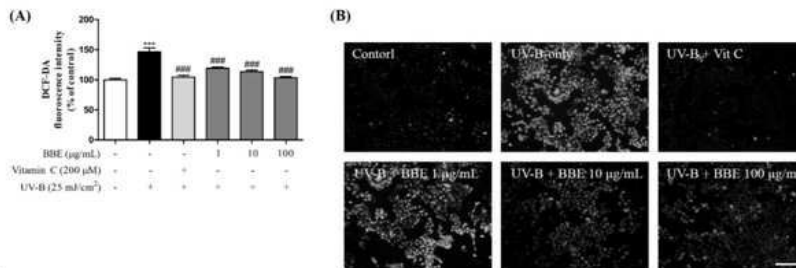
도면1



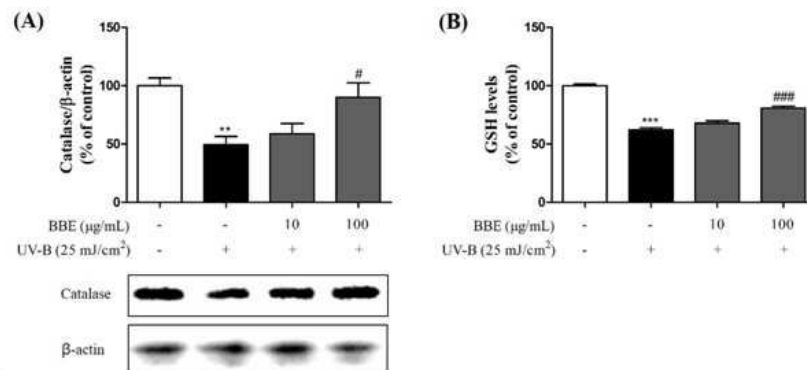
도면2



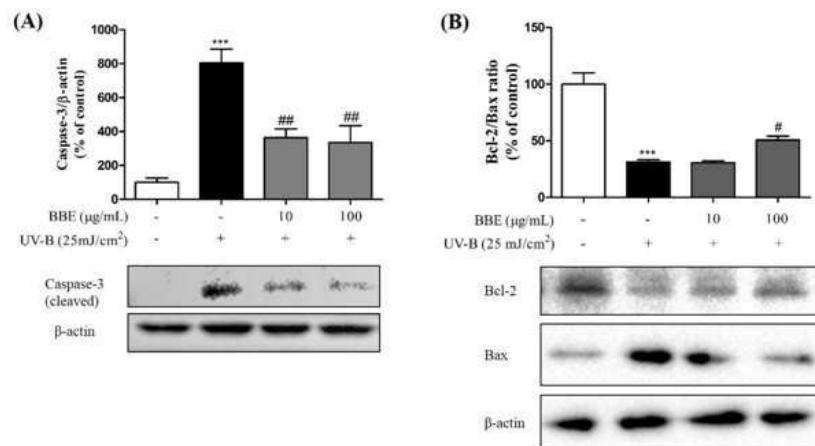
도면3



도면4



도면5



도면6

