(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0080284
(43) 공개일자 2024년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/738 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 36/634 (2006.01) *A61K 8/9789* (2017.01)
A61P 17/00 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/738 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0162815
(22) 출원일자 2022년11월29일
심사청구일자 2022년11월29일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이태후
경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 27, 903동 204호(영통동, 벽적골9단지 주공아파트)
유두나
경기도 성남시 분당구 동판교로 91, 408동 1004호(백현동, 백현마을4단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 13 항

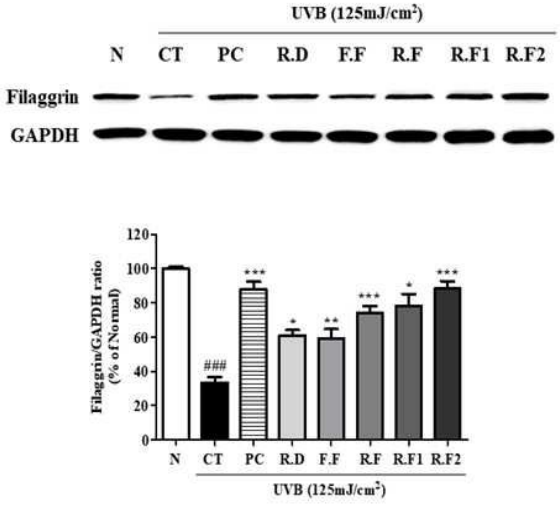
(54) 발명의 명칭 **생열귀 및 연교 추출물을 함유하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 생열귀(*Rosa davurica*) 및 연교(*Forsythia fructus*) 추출물을 함유하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 상기 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 조성물은 자유라디칼 소거 활성을 통한 항산화 효과가 뛰어나며, 활성산소종 생성 억제, 필라그린(Filaggrin) 발현 증가, 엘라스타제(Elastase) 또는 히알루로니다아제(Hyaluronidase)억제 활성, 콜라겐 분해 효소-1(MMP-1, matrix metalloproteinase-1) 억제 활성이 뛰어나 피부 장벽 강화 및 주름 개선에 우수한 효과를 나타낸다.

또한, 본 발명의 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 조성물은 천연 식물 추출물 유래 성분을 주원료로 하여 인체에 매우 안전할 뿐만 아니라, 안정성도 매우 탁월하여 화장품, 피부외용제, 의약외품, 식품 및 의약품 분야에서 유용하게 이용가능하다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
A61K 36/634 (2013.01)
A61K 8/9789 (2017.08)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/318 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)
A61K 2800/92 (2013.01)

(72) 발명자
김명주
경기도 성남시 분당구 양현로 88, 502동 1402호(이매동, 이매촌동부코오롱아파트)
정제용
경기도 수원시 영통구 청명로 8, 402호(영통동, 마이온)
임서준
경기도 용인시 처인구 원삼면 하사로 20, 104호
김홍룡
서울특별시 영등포구 문래로 82, 103동 1002호(문래동3가, 문래힐스테이트)
오사랑
경기도 수원시 영통구 청명로 20, 604호(영통동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1405005376
과제번호	2021392B10-2223-0104
부처명	산림청
과제관리(전문)기관명	한국임업진흥원
연구사업명	농림 해양 기반 스마트 헬스케어 기술개발 및 확산(RnD)
연구과제명	로즈힙의 피부질환 치유물질 및 표준화 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

생열귀(*Rosa davurica*) 및 연교(*Forsythia fructus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 생열귀 및 연교 추출물은 생열귀 추출물과 연교 추출물의 혼합물 또는 생열귀와 연교의 혼합 추출물인 것을 특징으로 하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 생열귀 및 연교 추출물은 생열귀와 연교의 배합비율이 1:3 내지 3:1인 것을 특징으로 하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 항산화 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 엘라스타제 및 히알루로니다아제으로 이루어진 군에선 선택된 1종 이상을 억제하는 것을 특징으로 하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 콜라겐 분해 효소(MMP-1) 생성을 저해하는 것을 특징으로 하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 필라그린 단백질 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 약학 조성물.

청구항 8

생열귀(*Rosa davurica*) 및 연교(*Forsythia fructus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 조성물은 이너 뷰티(inner beauty)용인 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 생열귀 및 연교 추출물은 생열귀와 연교의 배합비율이 1:3 내지 3:1인 것을 특징으로 하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

생열귀(*Rosa davurica*) 및 연교(*Forsythia fructus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 화장료 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 생열귀 및 연교 추출물은 생열귀와 연교의 배합비율이 1:3 내지 3:1인 것을 특징으로 하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 화장료 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 추출물은 유연화장수, 영양화장수, 수분크림, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 앰플, 젤, 아이크림, 클렌징 크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 스프레이 및 파우더로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상으로 제형화되는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생열귀 및 연교 추출물을 함유하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 피부는 기본적인 신진대사 과정을 통하여 우리 몸의 항상성을 저해하는 다양한 외부 요인으로부터 위해를 막아주는 일차적인 기능을 담당하고 있다. 즉, 피부는 신체 가장 바깥쪽에 위치함으로써 물리적, 화학적, 생물학적 장벽기능을 통한 보호작용, 체온조절작용, 감각작용, 분비 및 배설작용, 흡수작용, 저장작용, 재생작용 등의 다양한 역할을 수행하고 있지만, 지속적인 외부 스트레스가 가해지는 경우 가장 손상을 받기 쉽다. 이러한 외부 스트레스의 주요 원인으로는 자외선 노출, 배기가스, 황사, 환경오염물, 중금속, 온도변화, 미생물을 대표적인 예로 들 수 있으며, 외부로부터 가해지는 자외선, 환경오염물질, 급격한 기온의 변화 등과 같은 자극들은 피부 세포내에서 다양한 생화학적 변화를 유도함으로써, 세포 손상 및 사멸을 야기한다.

[0003] 피부는 크게 바깥의 얕은 층인 표피(epidermis)와 표피 밑의 보다 깊은 층인 진피(dermis)의 두 부분으로 구성되어 있고, 진피의 밑에는 피부밑 조직(subcutaneous tissue)이라고 불리는 별도의 결합조직층(피하조직)이 있다. 표피의 가장 아래에 있는 기저 층에서 새로이 형성된 각질 형성세포는 표피 아래층에서 위층으로 서서히 이동하면서, 약 14일 이후에 각질로 변하게 되고, 다시 14일 정도 뒤에는 완전히 노화되어 허물이나 때가 되어 벗겨져 나간다. 피부는 이와 같이 지속적으로 재생 및 회복된다.

[0004] 피부층 중 가장 바깥층을 이루는 표피세포(Epithemal cell)는 외부환경의 다양한 자극으로부터 체내를 보호하는 방벽 역할을 수행하고, 동시에 피부에서 과량의 수분 손실 및 건조가 일어나는 것을 방지한다. 표피세포 중에서도 가장 바깥에 존재하는 각질층(Stratum cormeum)은 각질형성세포가 분화되어 형성된 것으로, 분화가 완료된 각질 세포와 이를 둘러싼 지질층으로 구성된다. 이렇듯 각질층 형성에 중요한 역할을 하는 각질형성세포는 표피의 제일 아래층인 기저층(Basal layer)에서 증식되다가 일정 시점이 되면 증식을 멈추고 표피층으로 이동하면서 분화가 된다. 이러한 과정을 각화(Keratinization)라고 부른다. 각화 과정에서 각질형성세포는 피부 장벽을 형성하게 되는데, 피부장벽은 표피세포의 보호 역할에 있어 가장 핵심적인 요소이다.

[0005] 표피의 상부층으로 각질형성세포로 이루어진 각질층 즉, 피부 장벽은 벽돌을 쌓아놓은 형태이며, 포스포리피드,

세라마이드, 및 콜레스테롤 등으로 구성된 이중막의 지질이 피부장벽 구조를 지지하는 역할을 한다. 피부장벽은 독성물질이나 미생물, 기계적 자극, 자외선에 대해 가장 중요한 일차방어선이며, 피부를 통한 전해질이나 수분 손실을 억제하여 피부가 정상적인 기능을 수행할 수 있는 환경을 제공한다. 따라서 피부장벽이 손상되면 피부가 건조하고 거칠어지며 유해환경에 쉽게 노출되므로 공격적인 화학물질과 미생물들이 피부 속으로 쉽게 침투하여 문제성 피부 예컨대, 아토피피부염, 접촉성 피부염, 건선, 노인성 건조피부 등을 유발할 수 있다. 이와 같은 피부장벽의 중요성에 대한 인식이 높아지면서 피부장벽 강화는 화장제, 스킨케어의 새로운 컨셉으로 주목받아 왔으며, 피부질환을 치료하기 위해 피부 장벽 기능 개선용 치료법들이 연구되고 있다. 최근 들어 피부 생성을 저해하는 요인들이 증가되어 각질층의 생성 및 탈락 속도가 늦어짐으로써 각질 형성세포가 제 기능을 발휘하지 못하고, 이로 인해 피부 장벽의 기능이 현저하게 떨어지는 인구가 증가되는 추세이다. 그러나 종래에는 피부 장벽 기능을 강화할 수 있는 것들이 보습제가 대부분이며 근본적인 치료가 이뤄지지 못하고 있는 실정이다.

[0006] 생열귀나무(*Rosa davurica Pall.*)는 장미속 장미과에 속하는 다년생 식물로, 우리나라 중부 및 북부, 일본, 만주 및 시베리아 등에 분포하는 낙엽활엽관목으로, 산록이나 계곡의 암석지에서 자라며 추위에 강하고 양지와 음지, 바닷가 또는 도심지에서도 생장이 양호하며, 습기가 있는 비옥한 땅에서 잘 자라는 특징이 있다. 높이는 주로 1~1.5m이며 줄기는 곧게 서고 적갈색이며, 가시가 있고, 구형의 열매를 맺는다. 생열귀나무는 식용 또는 약용으로 널리 쓰이는데, 소화촉진, 이기, 양혈 효능이 있어 주로 소화불량, 위통, 월경불순을 치료하는 것으로 알려져 있다. 또한, 뿌리는 당뇨병에 효능이 탁월한 것으로 알려져 있다. 최근 연구에 따르면, 생열귀나무의 잎과 열매에 비타민 C가 풍부하여 항암 및 노화방지에 탁월한 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 성인병 예방 및 치료 효과를 기대하고 있는 식물 자원이기도 하다. 이러한 생열귀나무는 서양에서부터 로즈힙(Rose Hip)이라는 이름으로 천연 비타민과 오일 등의 건강식품 및 건강제품으로 널리 알려지며 실생활 속 건강을 지키는 데 주요한 자리를 차지하고 있다.

[0007] 연교(連翹, *Forsythia* fructus)는 물푸레나무과(Oleaceae)에 속하는 의성개나리(*Forsythia viridissima* Lindle)의 열매로 신농본초경에 기재되어 있으며, 한방과 민간에서 종창, 임질, 통경, 이뇨, 치질, 결핵, 나력, 옴, 해독 등에 널리 사용되고 있다. 연교에 함유되어 있는 성분에는 lignan류(phillygenin, pinoresinol, arctigenin, matairesinol), lignan glucoside류(phillyrin, pinoresinol-D-glucose, arctiin, matairesinoside), flavonoid (rutin) 및 3,4-dihydroxyphenethyl alcohol의 caffeoyl glycoside류(forsythiaside, acteoside, suspensaside 및 hydroxy acteoside) 등이 있다. 연교의 생리활성작용에 대해서는 *in vitro*에서 우수한 항산화 활성, 항바이러스성, 항염증효과, 항균작용, 혈압강하작용 등의 보고가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2017-0135396호 (2017.12.08 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 천연물 유래 물질을 함유하여 안전하고 피부 장벽 강화 및 주름 개선에 효과를 나타낼 수 있는 생열귀 및 연교 추출물을 함유하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 생열귀(*Rosa davurica*) 및 연교(*Forsythia fructus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 생열귀(*Rosa davurica*) 및 연교(*Forsythia fructus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 생열귀(*Rosa davurica*) 및 연교(*Forsythia fructus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 조성물은 자유라디칼 소거 활성을 통한 항산화 효과가 뛰어나며, 활성산소종 생성 억제, 필라그린(Filaggrin) 발현 증가, 엘라스타제(Elastase) 또는 히알루로니다아제(Hyaluronidase)억제 활성, 콜라겐 분해 효소-1(MMP-1, matrix metalloproteinase-1) 억제 활성이 뛰어나 피부 장벽 강화 및 주름 개선에 우수한 효과를 나타낸다.

[0014] 또한, 본 발명의 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 조성물은 천연 식물 추출물 유래 성분을 주원료로 하여 인체에 매우 안전할 뿐만 아니라, 안정성도 매우 탁월하여 화장품, 피부외용제, 의약외품, 식품 및 의약품 분야에서 유용하게 이용가능하다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 생열귀 및 연교 혼합추출물 처리 농도에 따른 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명의 생열귀 및 연교 혼합추출물 처리 농도에 따른 $ABTS^{+}$ 라디칼 소거 활성을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명의 생열귀 및 연교 혼합추출물 처리에 따른 엘라스타제(elastase) 억제 활성을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 생열귀 및 연교 혼합추출물 처리에 따른 히알루니다아제(hyaluronidase) 억제 활성을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 5는 HaCaT keratinocytes 세포주를 대상으로 본 발명의 생열귀 및 연교 혼합추출물의 세포 독성 여부를 MTT 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 HaCaT keratinocytes 세포주를 대상으로 UVB로 자극되어 유도된 활성산소종(ROS)에 미치는 본 발명의 생열귀 및 연교 혼합추출물 처리에 따른 영향을 분석한 그래프이다.

도 7은 HaCaT keratinocytes 세포주를 대상으로 UVB로 자극되어 유도된 콜라겐 분해 효소-1(MMP-1, matrix metalloproteinase-1)에 미치는 본 발명의 생열귀 및 연교 혼합추출물 처리에 따른 영향을 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 HaCaT keratinocytes 세포주를 대상으로 UVB로 자극되어 유도된 필라그린(filaggrin)에 미치는 본 발명의 생열귀 및 연교 혼합추출물 처리에 따른 영향을 RT-PCR(reverse transcription-PCR)을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.

[0018] 본 발명자들은 피부 장벽 강화 및 주름 개선에 안전하면서도 효과를 나타낼 수 있는 제제를 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 생열귀 및 연교 혼합추출물에 대한 피부 장벽 개선 및 주름 개선 효과를 검증함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0019] 또한, 본 발명자들은 생열귀 및 연교 혼합추출물의 유용성에 관한 연구를 수행한 결과, 생열귀 및 연교 혼합추출물이 자유라디칼 소거 활성을 통한 항산화 효과가 뛰어나며, 활성산소종 생성 억제, 필라그린(Filaggrin) 발현 증가, 엘라스타제(Elastase) 또는 히알루로니다아제(Hyaluronidase)억제 활성, 콜라겐 분해 효소-1(MMP-1, matrix metalloproteinase-1) 억제 활성을 갖는 조성물로서 우수한 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0021] 본 발명은 생열귀(*Rosa davurica*) 및 연교(*Forsythia fructus*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 약학 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 생열귀나무(*Rosa davurica Pall.*)는 장미과에 속하는 다년생 식물로서 일본, 만주, 시베리아 등에 분포하는 낙엽활엽관목이다. 우리나라에서는 강원도 이북 해발 200~1,200m에 자생하며, 추위에 강하고 습기가 있는 비옥한 토양에서 잘 자란다. 민간에서는 식용으로 쓰이고 뿌리와 꽃은 건위위기와 양혈조경에 쓰이며, 소화불량, 기대복사, 위통, 월경부조 등의 치료에 사용하는 유용한 약용자원 식물이다.

[0023] 본 발명의 연교(連翹, *Forsythia* fructus)는 물푸레나무과(Oleaceae)에 속하는 의성개나리(*Forsythia viridissima* Lindle)의 열매로 신농본초경에 기재되어 있으며, 한방과 민간에서 종창, 임질, 통경, 이뇨, 치질, 결핵, 나력, 옴, 해독 등에 널리 사용되고 있다. 한국연교(*Forsythia koreana, Forsythia viridissima* Lindley var. *koreana* Nakai)sms 의성개나리 또는 금종화라고도 하는데, 우리나라 일부와 중국 등지에서 자생하고 있다.

[0024] 본 발명의 조성물 내 유효성분인 생열귀 및 연교 추출물은 생열귀 추출물과 연교 추출물의 혼합물 뿐 아니라 생열귀와 연교의 혼합추출물을 모두 포함한다. 따라서, 생열귀 및 연교 추출물은 생열귀와 연교 (혹은 이 둘의 건조물, 또는 건조물의 분쇄물)을 함께 추출하여 얻어지는 추출물 뿐 아니라 이들 각각을 단독으로 추출하여 얻은 추출물들의 혼합물을 모두 포함한다.

[0025] 상기 생열귀 전초 및 연교 부위에서 추출이 가능하다. 또한, 상기 생열귀 및 연교 추출물은 천연, 잡종 또는 변종 식물로부터 추출될 수 있고, 식물 조직 배양물에서도 추출이 가능하다.

[0026] 상기 생열귀 및 연교 추출물에 있어서 생열귀와 연교의 배합비율은 중량 기준으로 1:3 내지 3:1이며, 구체적으로는 1:2 내지 2:1이며, 보다 구체적으로는 2:1이다.

[0027] 상기 생열귀 및 연교 추출물은 생열귀와 연교를 당 분야에서 사용되는 적절한 추출용매, 예컨대, 물, C1~C4 의 알콜, 및 물과 C1~C4 의 알콜의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 추출용매(1차 추출용매)로 추출하는 단계를 포함하는 추출공정을 수행하여 얻어질 수 있다. 구체적으로, 상기 1차 추출용매는 에탄올 수용액, 보다 구체적으로는 70% 에탄올 수용액이다. 생열귀 및 연교 추출물은 또한 생열귀와 연교를 각각 위의 방법으로 추출하여 생열귀 추출물과 연교 추출물을 각각 얻은 후, 이들을 혼합하여 얻어질 수 있다.

[0028] 상기 추출공정은 생열귀와 연교의 무게에 대하여 약 1 내지 20 배, 바람직하게는 약 10 배의 상기 1차 추출용매, 바람직하게는 물과 에탄올의 혼합용매로 추출함으로써 수행할 수 있다. 추출 공정은 당 분야에 알려진 추출방법, 예컨대, 냉침, 열수추출, 초음파 추출, 환류 냉각 추출 등의 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 추출 온도는 추출 방법에 적절한 다양한 온도 범위를 당 분야의 통상의 기술자가 채택가능하며, 예를 들어, 20 ℃ 내지 100 ℃ 등에서 수행될 수 있으나, 이에 국한되지 않는다. 추출시간 역시 채택된 추출방법에 따라 상이하며, 적절한 추출시간은 당 분야의 통상의 기술자의 기술 수준 범위 내이며, 이에 국한되지 않으나, 약 1 시간 내지 10 일의 범위에서 단회 또는 복수회로 수행될 수 있다. 바람직하게는 상기 추출은 약 70 ℃ 에서 약 3 내지 5 시간 동안 1차 추출용매로 추출함으로써 수행될 수 있다. 상기 1차 추출용매로 추출을 수행하여 얻어진 추출물은 통상의 방법에 따라 여과하여 불순물을 제거한 액상 형태로 얻거나, 얻어진 액상 형태의 추출물을 통상의 방법에 따라 감압농축 및/또는 건조하여 분말 형태로 얻을 수 있다.

[0029] 또한, 상기 추출공정은 필요에 따라, 유효성분의 함량이 높은 분획을 얻는 단계를 더 포함할 수 있다. 즉, 상기 1차 추출용매로 추출하여 얻어진 추출물을 물에 분산시킨 후, 적절한 2차 추출용매, 예컨대, 수포화 C4의 알콜 등으로 추출하는 단계를 수행함으로써, 생성되는 추출물 중의 유효성분 함량을 더욱 높일 수 있다.

[0030] 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 생열귀와 연교 (혼합)추출물을 0.001 내지 99 중량%로 포함할 수 있다.

[0031] 상기 조성물은 DPPH 라디칼 및 $ABTS^{+}$ 라디칼 생성을 억제하여 항산화 활성을 나타낼 수 있다.

[0032] 상기 조성물은 엘라스타제 및 히알루로니다아제으로 이루어진 군에선 선택된 1종 이상을 억제하여 피부 주름 개선 효과를 나타낼 수 있다.

[0033] 상기 조성물은 콜라겐 분해 효소(MMP-1) 생성을 저해하여 피부 주름 개선 효과를 나타낼 수 있다.

[0034] 상기 조성물은 필라그린 단백질 발현을 증가시켜 피부 장벽 강화 효과를 나타낼 수 있다.

[0035] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0036] 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스,

솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.

[0038] 상기 약학 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 피부 외용제 형태로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 약학 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 전분, 당 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 윤활제, 포비돈 및 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 대상체에게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀젼, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽, 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000mg/kg의 범위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.

[0042] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 약학적 유효량 및 유효 투여량은 약학 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간, 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.

[0044] 또한, 본 발명은 생열귀 및 연교 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0045] 상기 조성물은 이너 뷰티(inner beauty)용인 것을 특징으로 한다.

[0046] 상기 "이너 뷰티(inner beauty)"란, 먹는 화장품을 의미하는 것으로, 화장품을 바르는 등 인위적인 방법으로 피부 표면만을 일시적으로 좋게 만드는 것이 아니라, 식품 등을 통해 피부 속, 내부에서부터 건강한 피부를 가꾸는 것을 의미한다.

[0047] 바람직하게는, 상기 조성물은 항산화, 항염증, 항균, 피부 장벽 강화 및 피부 주름 개선 효과를 가질 수 있다.

[0048] 이에 상응하는 특징들은 상술된 부분에서 대신할 수 있다.

[0049] 발명에 따른 이너 뷰티용 조성물은 연화제, 항산화제, 현탁화제, 발포제, 계면활성제, 정제수, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제 중에서 선택된 어느 하나 이상의 보조제를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 화장품학적으로 허용가능한 화장품 보조제, 약학적으로 허용가능한 약학 보조제, 식품학적으로 허용가능한 식품 보조제, 생물학적 활성 화합물, 흡수성 물질, 퍼스널 케어 화합물(personal care compound), 활성 성분, 미용 보조제 중 어느 하나 또는 이

들의 조합을 더 포함할 수 있다.

[0050] 상기 조성물은 구강 점막용 필름, 정제, 시럽, 캡슐, 환제, 과립, 분말, 에어로졸 중에서 선택된 어느 하나 이상의 제형으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0053] 상기 건강기능식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0054] 상기 "식품 첨가물 공전"에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

[0055] 본 발명의 식품 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다. 예를 들어, 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합 및 충진 하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합하고 젤라틴 등 캡슐기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0056] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의 는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 통상적인 의미에서의 건강 기능식품을 모두 포함한다.

[0058] 또한, 본 발명은 생열귀 및 연교 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 장벽 강화 및 주름 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0059] 상기 추출물은 유연화장수, 영양화장수, 수분크림, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 앰플, 젤, 아이크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 스프레이 및 파우더로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상으로 제형화되는 것을 특징으로 하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 구체적으로, 상기 화장료 조성물은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형으로 제조할 수 있다. 예컨대, 유연 화장수 또는 영양 화장수 등의 화장수; 훼이셜 로션, 바디로션 등의 유액; 영양 크림, 수분 크림, 아이 크림 등의 크림; 에센스; 화장연고; 스프레이; 젤; 팩; 선 스크린; 메이크업 베이스; 액체 타입, 고체 타입 또는 스프레이 타입 등의 파운데이션; 파우더; 클렌징크림, 클렌징 로션, 클렌징 오일 등의 메이크업 제거제; 또는 클렌징 폼, 비누, 바디워시 등의 세정제로 제형화될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 상기 피부 외용제는, 연고, 패치, 겔, 크림 또는 분무제로 제형화될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 상기 화장료 조성물은 각각의 제형에 있어서 상기 필수성분 외에 제형의 종류 또는 사용 목적 등에 따라 본 발명에 따른 목적을 저해하지 않는 범위 내에서 다른 성분들이 적절히 배합될 수 있다.

[0062] 상기 화장료 조성물은 통상적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있으며, 예컨대 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 상기 허용 가능한 담체는 제형에 따라 달리할 수 있다. 예컨대, 연고, 페이스트, 크림 또는 젤로 제형화될 때 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화아연 또는 이들의 추출물이 사용될 수 있다.

[0064] 상기 화장료 조성물은 파우더 또는 스프레이로 제형화될 때, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리아미드 파우더 또는 이들의 추출물이 사용될 수 있고, 스프레이의 경우 클로

로플루오로히드로카본, 프로판, 부탄 또는 디메틸에테르와 같은 추진제를 더 포함할 수 있다.

[0065] 상기 화장료 조성물은 용액 또는 유탁액으로 제형화될 때, 담체 성분으로서 용매, 용해화제, 또는 유탁화제가 사용될 수 있고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-브틸글리콜 오일이 사용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 사용될 수 있다.

[0066] 상기 화장료 조성물은 현탁액으로 제형화될 때, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리 옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 사용될 수 있다.

[0067] 상기 화장료 조성물이 비누로 제형화될 때, 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속 염, 지방산 헤미에스테르염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 사용될 수 있다.

[0068] 상기 화장료 조성물은 최종 제품의 품질이나 기능에 따라 업계에서 통상적으로 사용되는 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉 쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 차단제, 습윤화제, 필수오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 추가적으로 함유할 수 있다.

[0069] 다만, 상기 보조제 및 그 혼합 비율은 본 발명에 따른 화장료 조성물의 바람직한 성질에 영향을 미치지 않도록 적절히 선택할 수 있다.

[0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0073] **실시예 1. 생열귀 및 연교 혼합추출물 제조**

[0074] 제조예 1-1. 생열귀 추출물의 제조(R.D : Rosa davurica)

[0075] 생열귀의 전초를 흐르는 물에 세척하여 불순물을 제거한 후, 생열귀의 전초 1kg에 30% 에탄올 수용액 10L를 가하여 실온에서 24시간 교반추출을 진행하였다. 상기 과정은 3-Batch로 진행하였다. 얻어진 추출액을 모은 후, 40℃ 이하에서 감압 농축한 후, 동결건조하여 분말형태로 제조하였으며, 수득율은 15.65% 였다.

[0076] 제조예 1-2. 연교 추출물의 제조(F.F : Forsythia fructus)

[0077] 연교를 흐르는 물에 세척하여 불순물을 제거한 후, 연교 1kg에 30% 에탄올 수용액 10L를 가하여 실온에서 24시간 교반추출을 진행하였다. 상기 과정은 3-Batch로 진행하였다. 얻어진 추출액을 모은 후, 40℃ 이하에서 감압 농축한 후, 동결건조하여 분말형태로 제조하였으며, 수득율은 9.22% 였다.

[0078] 제조예 1-3. 생열귀 및 연교 혼합 추출물의 제조(R.F : Rosa davurica + Forsythia fructus (ratio 1:1))

[0079] 생열귀의 전초 및 연교를 흐르는 물에 세척하여 불순물을 제거한 후, 생열귀의 전초 및 연교 각각 500g에 30% 에탄올 수용액 10L를 가하여 실온에서 24시간 교반추출을 진행하였다. 상기 과정은 3-Batch로 진행하였다. 얻어진 추출액을 모은 후, 40℃ 이하에서 감압 농축한 후, 동결건조하여 분말형태로 제조하였으며, 수득율은 10.22% 였다.

[0080] 제조예 1-4. 생열귀 및 연교 혼합 추출물의 제조(R.F1 : *Rosa davurica* + *Forsythia fructus* (ratio 1:2))

[0081] 생열귀의 전초 및 연교를 흐르는 물에 세척하여 불순물을 제거한 후, 생열귀의 전초 250g 및 연교 500g에 30% 에탄올 수용액 7.5L를 가하여 실온에서 24시간 교반추출을 진행하였다. 상기 과정은 3-Batch로 진행하였다. 얻어진 추출액을 모은 후, 40℃ 이하에서 감압 농축한 후, 동결건조하여 분말형태로 제조하였으며, 수득율은 12.16% 였다.

[0082] 제조예 1-5. 생열귀 및 연교 혼합 추출물의 제조(R.F2 : *Rosa davurica* + *Forsythia fructus* (ratio 2:1))

[0083] 생열귀의 전초 및 연교를 흐르는 물에 세척하여 불순물을 제거한 후, 생열귀의 전초 500 g 및 연교 250g에 30% 에탄올 수용액 7.5L를 가하여 실온에서 24시간 교반추출을 진행하였다. 상기 과정은 3-Batch로 진행하였다. 얻어진 추출액을 모은 후, 40℃ 이하에서 감압 농축한 후, 동결건조하여 분말형태로 제조하였으며, 수득율은 13.35% 였다.

[0085] **실험예 1. 생열귀 및 연교 혼합추출물의 항산화 활성**

[0086] 1-1. DPPH 라디칼 소거 활성

[0087] 산화적 스트레스는 과산화수소 등의 활성산소종(ROS)의 발현을 증가시키고 신경세포의 신호전달 체계를 작동시키며, 항산화 효소의 발현을 감소시킨다. 이러한 활성산소종의 증가는 단백질과 유전자의 구조를 변형시켜 세포 외 및 세포 내의 항상성을 파괴하게 되고, 이는 신경세포의 손상과 염증을 유발하게 된다. 따라서 신경세포를 손상시키고 염증성 질환을 유발의 원인이 될 수 있는 활성산소종의 하나인 DPPH 라디칼의 억제 활성은 항산화 효능을 평가하는 중요한 지표가 된다.

[0088] DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma, USA)의 환원력을 이용하는 상등의 문헌(Sang S et al., J.Agric. Food Chem. 50(8), p2459-2463, 2002)에 기재된 방법에 따라, 본 발명에 따른 생열귀 및 연교 혼합추출물의 항산화 활성을 측정하였다.

[0089] 실시예 1에서 준비한 생열귀 및 연교 혼합추출물을 각각 10, 50 및 100㎍/㎖ 농도로 96 well plate에 넣고 37℃에서 30분간 배양한 후, 환원된 DPPH의 양을 분광 광도계(Precision microplate reader; Molecular Devices, VersaMax)를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정하여 시료를 가하지 않은 무첨가 대조군과 활성을 비교하였다. 상기 시험은 3회 반복하였으며, 측정 결과를 도 1에 나타내었다. 비교 실험을 위해 아스코르브산(Ascorbic acid)을 양성대조군으로 사용하였다(도 1).

[0090] 실험 결과에서 A.A는 아스코르브산(Positive control; PC), R.D는 생열귀 추출물(*Rosa davurica*), F.F는 연교 추출물(*Forsythia fructus*), R.F는 생열귀 및 연교 1:1 추출물(*Rosa davurica* + *Forsythia fructus* (ratio 1:1)), R.F1는 생열귀 및 연교 1:2 추추물(*Rosa davurica* + *Forsythia fructus* (ratio 1:2)), R.F2는 생열귀 및 연교 2:1 추출물(*Rosa davurica* + *Forsythia fructus* (ratio 2:1))을 의미한다.

[0092] 1-2. $ABTS^+$ 라디칼 소거 활성

[0093] 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산)(ABTS) 라디칼 양이온 소거능은 디암모늄염과 과황화칼륨과의 반응으로 $ABTS^+$ 라디칼이 생성되면 특유의 색인 청록색을 띄게 되는데, 항산화 효과를 나타내는 시료를 첨가함에 따라 연한 녹색으로 탈색(decolorization)되는 것을 측정하는 방법이다.

[0094] $ABTS^+$ 라디칼을 이용한 항산화능 측정 시험은 7mM 2,2'-아지노-bis(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산)과 2.4mM 과황화칼륨을 혼합하여 사용 전 16시간 동안 빛을 차단하고 실온에서 반응시켰다.

[0095] 실시예 1에서 준비한 생열귀 및 연교 혼합추출물을 각각 10, 50 및 100㎍/㎖ 농도로 96 well plate에 넣고 37℃에서 30분간 배양한 후, 환원된 $ABTS^+$의 양을 분광 광도계(Precision microplate reader; Molecular Devices, VersaMax)를 이용하여 734nm에서 흡광도를 측정하여 시료를 가하지 않은 무첨가 대조군과 활성을 비교하였다. 상기 시험은 3회 반복하였으며, 측정 결과를 도 2에 나타내었다. 비교 실험을 위해 아스코르브산(Ascorbic acid)을 양성대조군으로 사용하였다(도 2).

[0096] 도 1 및 도 2를 살펴보면, 생열귀 및 연교 1:1 혼합추출물이 처리된 실험군은 생열귀 추출물 및 연교 추출물 단독 처리군보다 더욱 우수한 항산화 효과를 보이는 것을 관찰할 수 있었다. 특히, 생열귀 및 연교 추출물의 2:1 비율이 DPPH 및 ABTS 각 각 81.3%, 91.4% 소거율을 보이며, 양성대조군인 아스코르브산 보다 더 높은 항산화 효과를 보이는 것을 관찰할 수 있었다.

[0098] **실험예 2. 생열귀 및 연교 혼합추출물의 엘라스타제(elastase) 억제 활성**

[0099] 엘라스타제(elastase)는 피부의 노화에 관여하는 대표적인 효소 중에 엘라스타제가 있는데 이 효소는 조직 내의 용수철 작용을 하는 엘라스틴을 분해하는 효소이다. 엘라스타제는 연령이 증가하거나 자외선 등의 외부 자극에 의해 과잉 생성된다. 따라서 이러한 엘라스타제의 활성을 억제함으로써 피부의 주름생성을 억제할 수가 있다.

[0100] 본 발명의 생열귀 및 연교 혼합추출물에 대한 엘라스타제 억제 활성을 상기 추출물 존재 시 엘라스타제 활성의 감소 정도를 측정함으로써 분석하였다. 엘라스타제 활성은 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide를 사용하여 생성된 p-nitroaniline을 측정하여 확인하였으며, 이를 위한 반응액으로는 100㎕의 0.2M Tris buffer(pH8.0), 100㎕ 의 0.8mM N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide, 0.1U/㎖ elastase 50㎕ 및 50㎕ 생열귀 및 연교 혼합추출물(100㎍/㎖)을 첨가하여 혼합하였다. 본 발명의 추출물은 미리 엘라스타제와 37℃에서 20분 동안 반응시켰고, 이후 효소 반응은 100㎕의 기질을 첨가함으로써 시작되도록 하였다. 이후 410nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 시험은 3회 반복하였으며, 결과를 도 3에 나타내었다. 아스코르브산(ascorbic acid)을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0101] 도 3을 살펴보면, 생열귀 및 연교 1:1 혼합추출물이 처리된 실험군은 엘라스타제 활성이 생열귀 추출물 단독 처리군에 비해 6.8%, 연교 추출물 단독 처리군에 비해 12.4% 활성이 낮음을 관찰할 수 있었다. 생열귀 및 연교 1:2 혼합추출물의 경우 거의 비슷한 효과를 나타낸 반면, 생열귀 및 연교 2:1 혼합추출물은 엘라스타제 활성이 생열귀 추출물 단독 처리군에 비해 16.8%, 연교 추출물 단독 처리군에 비해 22.5% 활성이 더 낮음을 관찰할 수 있었다.

[0103] **실험예 3. 생열귀 및 연교 혼합추출물의 히알루로니다아제(hyaluronidase) 억제 활성**

[0104] 히알루로니다아제(Hyaluronidase)는 히알루론산(hyaluronic acid)을 가수분해하는 효소로서 히알루론산은 피부의 보습 기능에 있어서 중요한 작용을 하는 물질로 다량의 수분을 함유할 수 있는 능력을 가지고 있어 피부에서 히알루론산이 감소되면 피부가 건조해지는 원인이 될 수 있으며 주름을 초래하는 원인이 된다.

[0105] 히알루로니다아제의 억제 활성은 본 발명의 추출물에 따른 히알루로니다아제 활성의 감소 정도를 분석하는 것으로 확인하였는데, 이를 위한 반응액으로는 100㎍/㎖ 생열귀 및 연교 혼합추출물 10㎕에 20㎕ 585U/㎖ hyaluronidase 용액을 첨가하고 37℃에서 10분 동안 반응시켰고, 이후 동량 부피의 0.2mg/㎖ HA용액을 첨가한 후, 45분 후에 240㎕의 acidic albumin 용액 (24mM sodium acetate, 79mM acetic acid with 0.1% (w/v) BSA, pH3.8 at 25℃)을 첨가하여 상온에서 10분 동안 추가 반응시켰다. 이후 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 시험은 3회 반복하였으며, 결과를 도 4에 나타내었다.

[0106] 도 4를 살펴보면, 생열귀 및 연교 1:1 혼합추출물이 처리된 실험군은 히알루로니다아제 저해활성이 생열귀 추출물 단독 처리군에 비해 167.7%, 연교 추출물 단독 처리군에 비해 318.7% 더 억제함을 관찰할 수 있었다. 생열귀 및 연교 1:2 혼합추출물과 생열귀 및 연교 2:1 혼합추출물도 히알루로니다아제 저해활성이 생열귀 추출물 단독 처리군에 비해 각각 220.5%, 290.9%, 연교 추출물 단독 처리군에 비해 각각 371.5%, 441.9% 더 활성을 억제함을 관찰할 수 있었다.

[0108] **실험예 4. 생열귀 및 연교 혼합추출물의 세포 독성**

[0109] 상기 실시예 1에서 제조한 본 발명의 생열귀 및 연교 혼합추출물의 HaCaT keratinocytes 세포주에 대한 세포독성을 확인하였다. 구체적으로, HaCaT keratinocytes 세포주를 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS)이 함유된 DMEM을 이용하였고, 37℃, 5% CO_2 조건의 배양기에서 배양하였다. 세포 배양용 96-웰 플레이트에 합류(confluent) 상태까지 배양한 후, 제조예 1-3에서 제조한 생열귀 및 연교 혼합추출물을 100㎍/㎖ 농도로 처리하고, 48시간 후에, MTT(tetrazolium bromide salt)를 처리하여 2시간 동안 배양시켰다. 배양 후, 모든 배양액을 제거하고 DMSO 100㎕를 분주하여 생성된 포르마진(formazin)을 녹인 뒤 마이크로플레이트 리더기(microplate reader)로 570nm(determination wave) 및 690nm(reference wave) 파장에서 흡광도를 측정하였다(도 5).

[0110] 도 5를 살펴보면, 생열귀 및 연교 1:1, 1:2, 2:1 모든 혼합추출물이 처리된 실험군은 생열귀 추출물 및 연교 추출물 단독 처리군보다 HaCaT keratinocytes 세포주 산화 스트레스에 대해 뛰어난 세포보호 효과를 나타내는 것

을 확인할 수 있었다.

[0112] **실험예 5. 생열귀 및 연교 혼합추출물의 활성산소종(ROS) 억제 활성**

[0113] 피부가 자외선에 노출되면 자외선에 의한 자극이 반복되면서 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)을 발생시키고 전염증성 사이토카인의 생성이 촉진되어 여러 가지 신호전달 체계를 활성화함으로써 activator protein(AP-1)과 nuclear factor κB(NF-κB)의 활성화에 의한 염증반응이 증가되며, 몇몇 MMP의 발현이 증가되어 collagen의 분해도 증가한다. 이러한 피부 조직 내 변화는 외부 물질의 피부 흡수 및 수분 증발을 조절하는 정상적인 피부장벽 기능에 손상을 입히고, 피부 두께를 증가시키며 진피층의 구조를 손상시켜 궁극적으로 주름을 유발시키게 된다.

[0114] HaCaT keratinocytes 세포주를 1.2×10^5 내지 10^6 농도로 분주하고, 본 발명의 생열귀 및 연교 혼합추출물(제조예 1-3)을 100㎍/㎖ 농도로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 양성대조군으로는 Ascorbic acid를 사용하였다. 배양 후, 멸균된 PBS(pH7.4)를 이용하여 2회 세척 후 DCFDAFL-2로 30분 동안 세포를 염색시킨 뒤 차가운 PBS로 2회 세척한다. 0.05% TE를 넣어 세포를 떼어내준 뒤, 차가운 PBS로 세포를 모아 튜브로 옮겨준다. 원심분리기를 통해 세포를 가라앉힌다. 상층액은 제거하고 차가운 PBS로 세포를 풀어준 뒤 튜브에 담아 아이스박스에서 차갑게 유지한다. FACs로 ROS를 측정한다(도 6).

[0115] 도 6을 살펴보면, 생열귀 및 연교 1:1, 1:2, 2:1 모든 혼합추출물이 생열귀 추출물 및 연교 추출물 단독 처리군보다 ROS 억제 활성이 컨트롤 군과 비교하였을 때 각 각 60.2%, 60.0%, 64.7% 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 2:1 혼합추출물의 활성이 가장 뛰어난 것을 관찰할 수 있었다.

[0117] **실험예 6. 생열귀 및 연교 혼합추출물의 콜라겐 분해 효소-1(MMP-1) 저해 활성**

[0118] MMPs는 단백질 분해 활성을 갖는 효소로, 세포외기질을 구성하는 단백질들을 분해하여 세포외기질을 구성하는 단백질과 세포의 결합에 중요한 영향을 미치게 된다. MMPs는 28개의 타입으로 존재하는데 그중에서 collagen 분해에 관여하는 MMP-1으로 알려져 있다.

[0119] HaCaT keratinocytes 세포주의 MMP-1 저해에 따른 피부 주름 개선을 확인하기 위하여 HaCaT keratinocytes 세포주를 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 1% penicillin 을 포함하는 DMEM 배지에 접종하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 24~48시간 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 구체적으로, 본 발명의 생열귀 및 연교 혼합추출물을 각각 100㎍/㎖로 사용하였다. 실험 진행 하루 전 Capture Antibody를 이용하여 96well plate를 코팅시킨다. 24시간 뒤 Washing buffer로 코팅된 플레이트를 Washing해준다. Reagent Diluent를 이용하여 1시간 동안 Blocking 해준다. Washing buffer로 플레이트를 Washing해준다. 샘플과 standard를 넣고 2시간 기다린다. Washing buffer로 플레이트를 Washing해준다. 이후 Detection Antibody를 넣고 2시간 기다린다. Washing buffer로 플레이트를 Washing해준다. Streptavidin-HRP를 넣고 어두운 곳에서 20분간 기다린다. Washing buffer로 플레이트를 Washing해준다. Substrate Soluction을 넣고 어두운 곳에서 20분간 기다린다. 마지막으로 Stop soluction을 넣고 살짝 흔들어 준 뒤 450nm에서 ELISA기계로 MMP-1 활성 저해능을 측정하였다(도 7).

[0120] 도 7을 살펴보면, 생열귀 및 연교 1:1, 1:2, 2:1 모든 혼합추출물이 생열귀 추출물 및 연교 추출물 단독 처리군보다 MMP-1 저해 활성이 컨트롤 군과 비교하였을 때 각각 65.3%, 53.8%, 66.9% 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 생열귀 및 연교 2:1 혼합추출물의 활성이 가장 뛰어난 것을 관찰할 수 있었다.

[0122] **실험예 7. 생열귀 및 연교 혼합추출물의 필라그린(Filaggrin)단백질 발현**

[0123] 필라그린(Filament aggregating protein; filaggrin)이란 케라틴, 인볼루크린(involucrin), 로시크린(locicrin) 등의 단백질과 함께 각질층(stratum corneum)의 형성에 중요한 역할을 하는 단백질이다. 필라그린의 발현 양의 감소는 피부장벽의 기능과 보습에 변화를 가져오게 되고 여러 가지 병변으로 이어지게 된다.

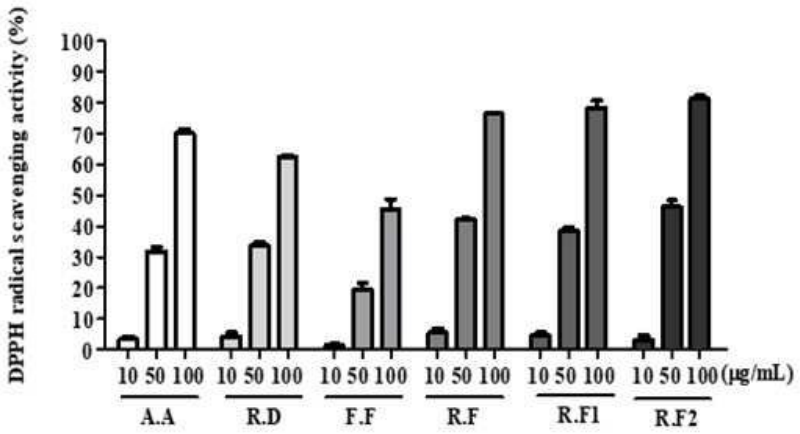
[0124] HaCaT keratinocytes 세포주의 필라그린 증가에 따른 피부 장벽 개선을 확인하기 위하여 HaCaT keratinocytes 세포주를 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 1% penicillin 을 포함하는 DMEM 배지에 접종하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 24~48시간 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 구체적으로, 본 발명의 생열귀 및 연교 혼합추

출물을 각각 100㎍/㎖로 사용하였다. lysis buffer를 이용하여 단백질을 추출한 후, 추출한 단백질을 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하였으며, 20㎕의 단백질을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고 PVDF membrane에 옮겼다. Membrane은 1차 항체와 반응시키고 TBS-T로 10분간 3회 세척 후 membrane을 2차 항체로 1시간 반응시킨다. 항체들에 대한 발현 분석은 horseradish peroxidase-linked(HRP) 이차 항체에 의해 발현되는 enhanced chemiluminescence(ECL)을 이용하였으며, Imaging system을 이용하여 비교 분석하였다(도 8).

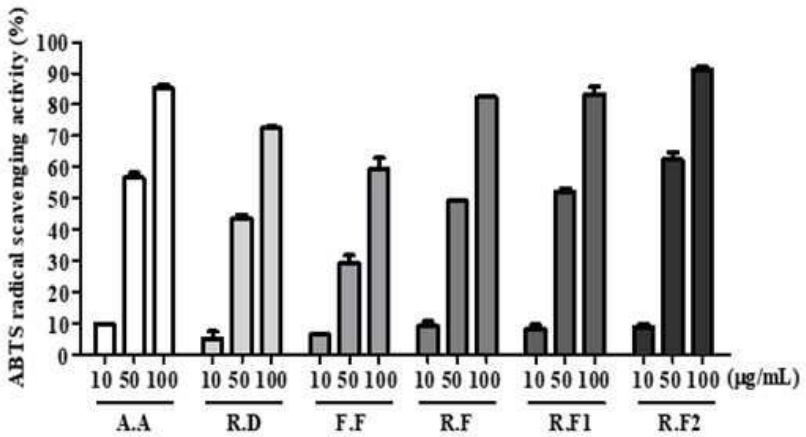
[0125] 도 8을 살펴보면, 생열귀 및 연교 1:1 혼합추출물이 생열귀 추출물 단독 처리군에 비해 69.9%, 연교 추출물 단독 처리군에 비해 74.8% 필라그린 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 생열귀 및 연교 1:2 혼합추출물과 생열귀 및 연교 2:1 혼합추출물도 필라그린 발현이 생열귀 추출물 단독 처리군에 비해 각 각 52.7%, 82.4%, 연교 추출물 단독 처리군에 비해 각 각 57.5%, 87.2% 더 발현이 증가함을 관찰할 수 있었다.

도면

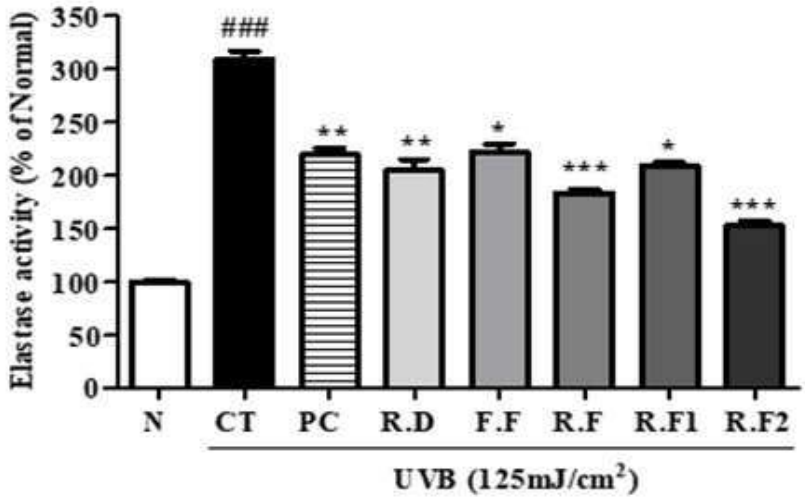
도면1



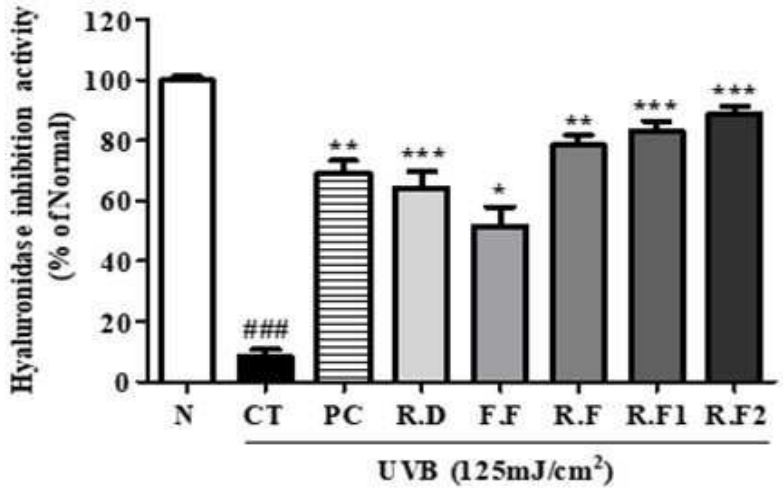
도면2



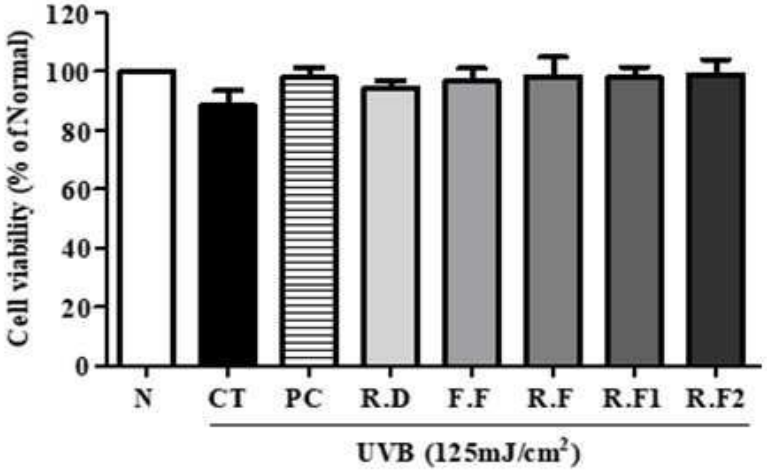
도면3


Elastase activity (% of Normal)
350
300
250
200
150
100
50
0
###
**
**
*
***
*
***
N
CT
PC
R.D
F.F
R.F
R.F1
R.F2
UVB (125mJ/cm²)

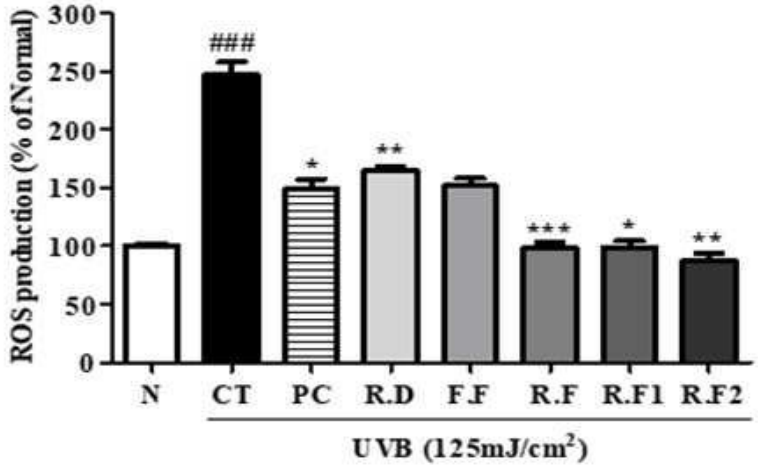
도면4


Hyaluronidase inhibition activity (% of Normal)
120
100
80
60
40
20
0
###
**
***
*
**
***
***
N
CT
PC
R.D
F.F
R.F
R.F1
R.F2
UVB (125mJ/cm²)

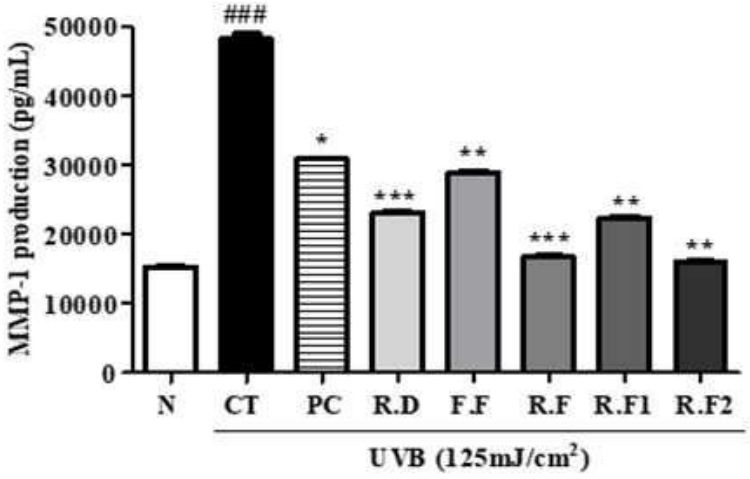
도면5


Cell viability (% of Normal)
120
100
80
60
40
20
0
N
CT
PC
R.D
F.F
R.F
R.F1
R.F2
UVB (125mJ/cm²)

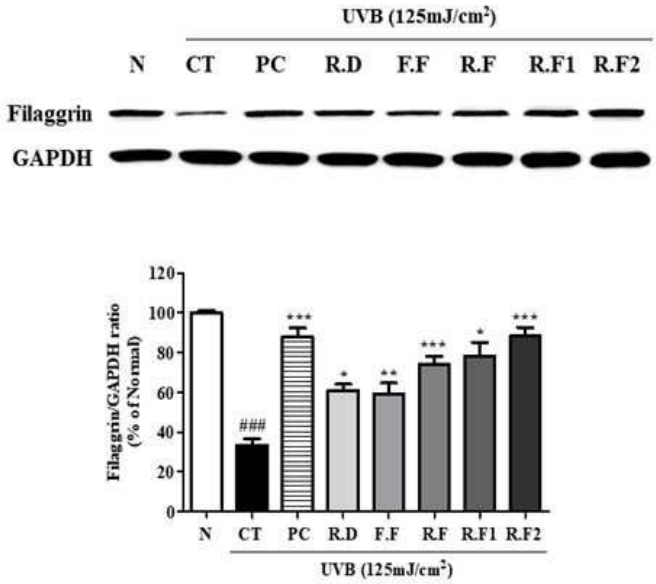
도면6


ROS production (% of Normal)
300
250
200
150
100
50
0
###
*
**
***
*
**
N
CT
PC
R.D
F.F
R.F
R.F1
R.F2
UVB (125mJ/cm²)

도면7


MMP-1 production (pg/mL)
50000
40000
30000
20000
10000
0
###
*
***
**
***
**
**
N
CT
PC
R.D
F.F
R.F
R.F1
R.F2
UVB (125mJ/cm²)

도면8


UVB (125mJ/cm²)
N
CT
PC
R.D
F.F
R.F
R.F1
R.F2
Filaggrin
GAPDH
Filaggrin/GAPDH ratio (% of Normal)
120
100
80
60
40
20
0
###
*
**
***
*
***
N
CT
PC
R.D
F.F
R.F
R.F1
R.F2
UVB (125mJ/cm²)