(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0119309
(43) 공개일자 2016년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/185 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0046838
(22) 출원일자 2015년04월02일
심사청구일자 2015년04월02일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
김영철
대구광역시 달서구 호산로 125, 209동 1305호(파호동, 삼성명가타운)
박민아
인천광역시 연수구 새말로 49 203호 (연수동)
(74) 대리인
특허법인태백

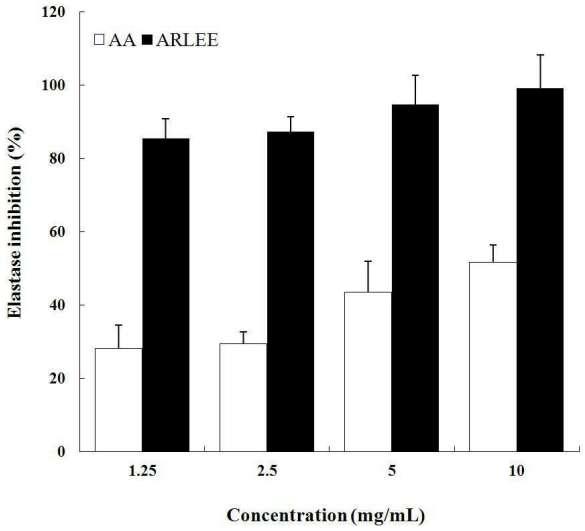
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선 또는 피부미백용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선 또는 피부미백용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 돌단풍 추출물은 천연 추출물로 콜라게나아제 및 엘라스타아제의 활성을 효과적으로 저해시키고, 콜라겐 합성능이 우수한 것으로 확인되었다. 또한, 멜라닌 합성 저해능과 티로시나아제 발현 및 활성 저해능이 우수한 것을 확인됨에 따라, 본 발명의 돌단풍 추출물은 피부주름 개선 및 피부미백용 약학조성물, 건강식품 및 화장료조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부주름 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 돌단풍 추출물은 잎 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 돌단풍 추출물은 물, C 1 내지 4 알콜 및 이의 혼합 용매에 의해 추출된 것을 특징으로 하는 피부주름 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 돌단풍 추출물은 콜라게나아제, 엘라스타아제의 활성 및 MMP-1의 발현을 저해하는 것을 특징으로 하는 피부주름 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 약학조성물, 건강식품 및 화장료조성물로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 피부주름 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 돌단풍 추출물은 잎 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 돌단풍 추출물은 물, C 1 내지 4 알콜 및 이의 혼합 용매에 의해 추출된 것을 특징으로 하는 피부미백용 조성물.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 상기 돌단풍 추출물은 티로시나아제 활성 및 멜라닌 합성을 저해하는 것을 특징으로 하는 피부미백용 조성물.

청구항 10

청구항 6에 있어서, 상기 조성물은 약학조성물, 건강식품 및 화장료조성물로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 피부주름 예방 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선 또는 피부미백용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지속적인 자외선 노출은 피부 광노화의 원인이 되며, 피부 노화는 일반적으로 주름 및 탄력 저하와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

[0003] 자외선에 의한 피부 손상 원인 중 하나는 자외선에 의해 형성된 활성 산소종이다. 이러한 활성 산소종이 세포 신호체계에 신호를 보내어 결국 피부의 세포간물질(extracellular matrix, ECM)의 성분인 콜라겐이나 젤라틴 등을 분해하는 효소인 메트릭스 메탈로프로티나아제(matrix metalloproteinase, MMP)를 생성하여 콜라겐이나 젤라틴을 파괴함으로써 피부에 주름을 형성시킨다.

[0004] 만성적인 자외선의 영향을 받은 피부에서는 외형적으로 피부의 색이 검고 촉감이 뻣뻣하며 깊은 주름이 생긴다. 이 상태가 더욱 심해지면 피부암을 유발하는데 이러한 피부의 변화를 자연노화와 구분하여 광노화라고 한다. 이러한 광노화를 억제할 목적으로 지금까지 많은 기능성 화장품들이 개발되었으며 이들 중에는 비타민A계통의 레티놀을 사용하는 것과 비타민 C계통의 아스코르브산을 사용하는 것이 대부분이다. 그러나 이들 두 가지 성분은 실온에서 불안정하여 화장품을 장기 보존할 경우 쉽게 분해되어 그 효능을 잃게 된다.

[0005] 또한, 멜라닌의 생합성은 표피 기저층에 존재하는 멜라노싸이트(melanocyte)의 멜라노좀(melanosome)에서 티로시나아제(tyrosinase), TRP-1(tyrosinase related protein-1) 등 특이적인 효소의 연속적인 산화반응에 의해 일어나는데, 그 중 멜라닌 합성의 주요 효소인 티로시나아제 활성 저해실험이 멜라닌 중합체 억제제 개발의 초기단계에서 채택되고 있다.

[0006] 현재까지 자외선 흡수제나 산란제, 알부틴(arbutin), 코지산(kojic acid), 하이드로퀴논(hydroquinone) 등과 같은 티로시나아제 활성 저해제, 활성산소종을 소거하는 아스코르브산(ascorbic acid) 및 유도체, 코엔자임 Q10(coenzyme Q10)등이 미백효과가 있다고 알려졌으나, 피부 안정성, 제형 안정성 등의 문제로 사용되지 않거나 제한된 양만 사용되고 있다.

[0007] 돌단풍(Aceriphyllum rossii)은 장미목 범의귀과의 쌍떡잎식물에 속하는 높이가 10~30cm의 다년생 초본으로 돌라기 또는 장장포라고도 불리운다. 잎이 단풍나무와 비슷하고 돌에서 자란다고 돌단풍이라 명명되었다. 돌단풍의 꽃, 손바닥 모양의 잎은 가장자리가 5~7개로 깊게 갈라지고 톱니가 있으며, 표면은 광택이 난다. 특히 어린 잎은 식용으로 사용되는데, 강심, 이뇨작용의 효능이 있어 심계항진, 소변불리에 하루 10~15g을 물에 달여서 복용한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2012-0068423호(2012.06.27)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 천연물인 돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 콜라겐분해 효소의 발현 및 멜라닌 합성을 저해시키는 피부미백 또는 피부주름 개선용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부주름 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 천연물인 돌단풍 추출물은 콜라게나아제 및 엘라스타아제의 활성을 효과적으로 저해시키고, 콜라겐 합성능이 우수한 것으로 확인되었다. 또한, 멜라닌 합성 저해능과 티로시나아제 발현 및 활성 저해능이 우수한 것을 확인됨에 따라, 본 발명의 돌단풍 추출물은 피부주름 개선 및 피부미백용 약학조성물, 건강식품 및 화장료조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 돌단풍의 잎, 줄기 및 뿌리 에탄올 추출물의 전자공여 능력을 확인한 결과로, AA는 대조군으로 사용한 아스코르브산의 전자공여 능력 확인 결과이며, ARLEE는 돌단풍의 잎 에탄올 추출물의 전자공여 능력 확인 결과이며, ARSEE는 돌단풍의 줄기 에탄올 추출물의 전자공여 능력 확인 결과이며, ARREE는 돌단풍의 뿌리 에탄올 추출물의 전자공여 능력 확인 결과이다.

도 2는 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)의 콜라게나아제 억제 활성 효과를 확인 결과로, AA는 대조군으로 사용한 아스코르브산의 콜라게나아제 억제 활성을 나타낸다.

도 3은 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)의 엘라스타아제 억제 활성 효과를 확인 결과로, AA는 대조군으로 사용한 아스코르브산의 엘라스타아제 억제 활성을 나타낸다.

도 4는 25, 50, 100 및 200 μg/mL 농도의 아스코르브산이 처리된 사람 피부섬유아세포의 세포생존도를 확인한 결과로, V는 용매대조군이다.

도 5는 12.5, 25, 50, 100 및 200 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 사람 피부섬유아세포의 세포생존도를 확인한 결과로, V는 용매대조군이다.

도 6은 아스코르브산이 처리된 사람 피부섬유아세포의 세포 형태를 확인한 결과로, A는 비처리된 용매대조군이며, B는 25 μg/mL 농도의 아스코르브산이 처리된 피부섬유아세포군이며, C는 50 μg/mL 농도의 아스코르브산이 처리된 피부섬유아세포군이며, D는 100 μg/mL 농도의 아스코르브산이 처리된 피부섬유아세포군이며, E는 200 μg/mL 농도의 아스코르브산이 처리된 피부섬유아세포군의 세포 형태를 촬영한 사진이다(×200).

도 7은 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 사람 피부섬유아세포의 세포 형태를 확인한 결과로, A는 비처리된 용매대조군이며, B는 25 μg/mL 농도의 돌단풍의 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 사람 피부섬유아세포군이며, C는 50 μg/mL 농도의 돌단풍의 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 사람 피부섬유아세포군이며, D는 100 μg/mL 농도의 돌단풍의 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 사람 피부섬유아세포군이며, E는 200 μg/mL 농도의 돌단풍의 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 사람 피부섬유아세포군의 세포 형태를 촬영한 사진이다(×200).

도 8은 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)의 콜라겐 합성 효과를 확인한 결과로, 사람 피부섬유아세포에 12.5, 25, 50, 100 및 200 μg/mL 농도의 돌단풍의 잎 에탄올 추출물(ARLEE)을 처리한 후, 콜라겐 합성량을 나타낸 결과이며, V는 비처리된 용매대조군의 콜라겐 합성량을 나타낸 결과이며, PC는 5 ng/mL TGF-β1을 처리한 양성대조군의 콜라겐 합성량을 나타낸 결과이다(*; $p<0.05$, **; $p<0.01$).

도 9는 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)의 MMP-1 단백질 발현 억제 효과를 확인한 결과로, 도 9A는 12.5, 25, 50 및 100 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 사람 피부섬유아세포에서 발현된 MMP-1 단백질 발현량을 확인한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 9B는 MMP-1 단백질 발현량을 정량한 결과로, V는 비처리된 용매대조군이며, C는 6.3 J/cm^2 UVA가 조사된 사람 피부섬유아세포군이며, PC는 100 μg/mL 아스코르브산 처리군이다(**; $P<0.01$).

도 10은 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)의 MMP-1 mRNA 발현 억제 효과를 확인한 결과로, 도 10A는 12.5, 25, 50 및 100 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 사람 피부섬유아세포에서 발현된 MMP-1 mRNA 발현량을 확인한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 9B는 MMP-1 mRNA 발현량을 정량한 결과로, V는 비처리된 용매대조군이며, C는 6.3 J/cm^2 UVA가 조사된 사람 피부섬유아세포군이며, PC는 100 μg/mL 아스코르브산 처리군이다(*; $P<0.05$, **; $P<0.01$).

도 11은 25, 50, 100 및 200 μg/mL 농도의 알부틴이 처리된 melan-a 세포의 세포생존도를 확인한 결과로, V는 용매대조군이다.

도 12는 12.5, 25, 50, 100 및 200 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 melan-a 세포의 세포생존도를 확인한 결과로, V는 용매대조군이다.

도 13은 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 melan-a 세포의 세포 형태를 확인한 결과로, A는 비처리된 용매대조군이며, B는 12.5 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 melan-a 세포군이며, C는 25 μg/mL 농도의 melan-a 세포이며, D는 50 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 melan-a

세포군이며, E는 100 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 melan-a 세포군이며, F는 200 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 melan-a 세포군의 세포 형태를 촬영한 사진이다(×200).

도 14는 6.25, 12.5, 25 및 50 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)을 melan-a 세포에 72시간 처리하고 멜라닌 합성 억제 효과를 확인한 결과로, V는 비처리된 용매대조군이며, PC는 50 μg/mL 알부틴 처리군이다(*; P<0.01, **; P<0.001).

도 15는 6.25, 12.5, 25 및 50 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)을 melan-a 세포에 48시간 처리한 후 세포 내 티로시나아제 활성 억제 효과를 확인한 결과로, V는 비처리된 용매대조군이며, PC는 50 μg/mL 알부틴 처리군이다(*; P<0.05, **; P<0.001).

도 16은 6.25, 12.5, 25 및 50 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)을 melan-a 세포에 48시간 처리한 후 세포 내 티로시나아제 단백질 발현 억제 효과를 확인한 결과로, V는 비처리된 용매대조군이며, PC는 50 μg/mL 알부틴 처리군이다(*; P<0.05, **; P<0.01).

도 17은 6.25, 12.5, 25 및 50 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)을 melan-a 세포에 48시간 처리한 후 세포 내 티로시나아제 mRNA 발현 억제 효과를 확인한 결과로, V는 비처리된 용매대조군이며, PC는 50 μg/mL 알부틴 처리군이다(*; P<0.05, **; P<0.001).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부주름 예방 또는 치료용 조성물을 제공할 수 있다.

[0015] 상기 돌단풍 추출물은 잎 추출물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 돌단풍 추출물은 물, C 1 내지 4 알콜 및 이의 혼합 용매에 의해 추출된 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에탄올 추출물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 보다 상세하게는 상기 돌단풍 추출물은 콜라게나아제, 엘라스타아제의 활성 및 MMP-1의 발현을 저해할 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 따르면, 돌단풍 잎 추출물은 도 2 및 도 3과 같이 양성대조군인 아스코르브산보다 콜라겐을 분해시키는 효소인 콜라게나아제 및 엘라스타아제의 활성 저해 효과가 우수하였으며, 도 8 및 도 9와 같이 자외선이 조사된 사람 피부섬유아세포에서 돌단풍 잎 추출물이 처리된 실험군에서는 돌단풍 잎 추출물의 농도의 존적으로 콜라겐 생성이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0019] 또한, 자외선이 조사된 사람 피부섬유아세포에서는 자외선 노출에 의해 발현되는 콜라겐이나 젤라틴 분해 효소인 메트릭스 메탈로프로티나제-1(MMP-1)의 mRNA 및 단백질 발현을 억제하여 콜라겐 분해 활성을 저해시키는 효과를 나타내었다.

[0020] 상기 결과로부터 본 발명의 돌단풍 추출물은 광조사에 의한 피부 주름을 개선하는데 효과적으로 사용될 수 있다.

[0021] 따라서, 본 발명의 돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 조성물은 약학조성물, 건강식품 및 화장료조성물로 사용될 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부미백용 조성물을 제공할 수 있다.

[0023] 상기 돌단풍 추출물은 잎 추출물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 돌단풍 추출물은 물, C 1 내지 4 알콜 및 이의 혼합 용매에 의해 추출된 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에탄올 추출물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 보다 상세하게는 상기 돌단풍 추출물은 티로시나아제 활성 및 멜라닌 합성을 저해할 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 돌단풍 잎 추출물은 도 14 내지 도 17과 같이 양성대조군인 알부틴보다 세포 내 멜라닌 합성의 주요 효소인 티로시나아제 mRNA 및 단백질의 발현을 저해시키는 효과가 뛰어났으며, 멜라닌 합성을 억제하는 효과 또한 우수한 것을 확인하였다.

[0027] 상기 결과로부터 본 발명의 돌단풍 추출물은 효과적인 피부미백용 조성물로 사용될 수 있다.

[0028] 따라서, 본 발명의 피부미백용 조성물은 약학조성물, 건강식품 및 화장료조성물로 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선 또는 피부미백용 약학조

성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0030] 본 발명의 다른 구체예에서, 돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선 또는 피부미백용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0031] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0033] 상기 돌단풍 추출물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명은 돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선 또는 피부미백용 건강식품을 제공할 수 있다.

[0036] 상기 건강식품은 상기 돌단풍 추출물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적 예를들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0037] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 치료제의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0038] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제등을 들 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명은 돌단풍 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부주름 개선 또는 피부미백용 화장료조성물을 제공할 수 있다.

[0040] 상기 화장료조성물은 유효성분인 돌단풍 추출물 외에 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0041] 상기 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 썬 크림, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제

형으로 제조될 수 있다.

[0042] 상기 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜,실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0043] 상기 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0044] 상기 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해 화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0045] 상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0046] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0047] <참고예> 시약 및 기구

[0048] 디메틸 설폭사이드(Dimethyl sulfoxide; DMSO), 1,1-디페닐-2-피크릴 히드라질(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl; DPPH), 3,4-디하이드록시-L-페닐-알라닌(3,4-dihydroxy-L-phenyl-alanine; L-DOPA), 알부틴[arbutin], 탄닌산[tannic acid], L-티로신[L-tyrosine], Folin-Ciocalteu's 페놀 시약, 3-(4,5-디메틸-티아졸-2-일)-2,5-디페닐-테트라졸리움 브로마이드[3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; MTT], 돼지 췌장에서 분리된 엘라스타아제(elastase), N-석시닐-$(L\text{-}Ala)_3$-*p*-나이트로아닐라이드[N-succinyl-$(L\text{-}Ala)_3$-*p*-nitroanilide], 콜라게나아제[collagenase], 및 4-페닐아조벤질록시-카르보닐-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg[4-phenylazobenzyloxy-carbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg]를 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

[0049] DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 배지, 태아소혈청(fetal bovine serum; FBS), 및 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin; P/S)을 Lonza Company(Cascade, USA)에서 구입하여 사용하였다.

[0050] 시료 추출은 회전식 감압농축기(BUCHI R-205, BUCHI Labortechnik AG, Switzerland)를 이용하였으며, CO_2 배양기(MCO-17AC, SANYO electric, Japan)를 사용하여 배양하고 세포성장을 도립현미경(CKX41, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

[0051] **<실시예 1> 돌단풍 에탄올 추출물(*Aceriphyllum rossii* ethanol extract)**

[0052] 돌단풍의 잎, 줄기 및 뿌리를 대한민국 강원도 양구에서 수집하였다.

[0053] 분쇄된 시료 50 g을 플라스크에 넣고 80 % 에탄올 500 mL로 25 ℃에서 24시간 동안 추출하였으며, 상기 방법을 3번 반복하여 추출물을 얻었다.

[0054] 필터 페이퍼에 상기 추출물을 여과하고 동결건조에 의한 회전식 감압농축기를 이용하여 추출물을 농축하여 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE), 돌단풍 줄기 에탄올 추출물(ARSEE) 및 돌단풍 뿌리 에탄올 추출물(ARREE)을 각각 22.8%, 12.0% 및 8.6 % 수율로 얻었다.

[0055] **<실시예 2> 돌단풍 에탄올 추출물(*Aceriphyllum rossii* ethanol extract)의 항산화 활성 확인**

[0056] 1. 전자공여능력(Electron donating ability) 확인

[0057] 이전에 보고된 방법(Blois, 1958)으로 전자공여능력을 확인하였다.

[0058] 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE), 돌단풍 줄기 에탄올 추출물(ARSEE) 및 돌단풍 뿌리 에탄올 추출물(ARREE)을 각각 250, 500 및 1000 μg/mL이 되도록 증류수로 희석한 후, 1 ml씩 테스트 튜브에 담고 각 튜브에 0.4 mM DPPH 4 mL을 첨가하였다. 상기 혼합물을 강하게 흔들어 혼합하고 60 ℃에서 10초간 인큐베이션한 후, 525 nm에서 각 혼합용액의 흡광도를 측정하였으며, 아스코르브산을 양성대조군으로 사용하였다.

[0059] 각 용액의 DPPH 라디칼 소거 능력을 하기식에 따라 억제 백분율로 계산되었다.

[0060] % 공여 능력 = $[1-(A_{sample}/A_{control})]\times 100$

[0061] $A_{control}$은 대조군의 흡광도로 테스트 화합물이 포함되어 있지 않은 시약을 대조군으로 사용하였다.

[0062] 그 결과, 도 1과 같이 1,000μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE), 돌단풍 줄기 에탄올 추출물(ARSEE) 및 돌단풍 뿌리 에탄올 추출물(ARREE)의 전자 공여 능력이 각각 88.7%, 85.1% 및 86.5%로 확인되었으며, 동일한 농도에서 아스코르브산의 공유 능력(90.2%)과 유사한 것으로 확인되었다.

[0063] **<실시예 3> 돌단풍 잎 에탄올 추출물(*Aceriphyllum rossii* leaf ethanol extract; ARLEE)의 효소 활성 억제 효과 확인**

[0064] 1. 콜라게나아제(collagenase) 활성 억제 효과 확인

[0065] 4 mM 염화칼슘을 용해시킨 0.1 M Tris-HCl 버퍼(pH 7.5)를 최종 버퍼로 사용하여 4-페닐아조-벤질록시-카보닐-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg(0.15 mg/mL) 기질을 용해시켰다. 그 다음, 기질 용액 250 μL과 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물을 각각 100 μL씩 튜브에 담고 클로스트리듐 히스톨리티쿰(Clostridium histolyticum) 콜라게나아제를 최종 버퍼에 0.2 mg/mL이 되도록 용해시킨 후, 150 μL을 각 튜브에 첨가하였다.

[0066] 37 ℃에서 30분간 인큐베이션한 후 시트르산(6%)을 첨가하여 반응을 멈추고 반응 혼합물에 에틸 아세테이트를 첨가하여 상층액을 분리시켰다.

[0067] 상층액의 흡광도를 324 nm에서 측정하였으며, 아스코르브산을 양성 대조군으로 비교에 사용하였다.

[0068] 하기식을 이용하여 억제 활성을 대조군의 상대값으로 나타내었다.

[0069] 억제율(%) = $[(\text{시료 } OD_{324} - \text{대조군 } OD_{324})/ \text{대조군 } OD_{324}]\times 100$

[0070] 그 결과, 도 2와 같이 10 mg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 콜라게나아제 활성을 97.1% 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 대조군인 아스코르브산(100%)과 유사한 수준으로 콜라게나아제 활성을 억제하는 것으로 확인되었다.

[0071] 2. 엘라스타아제(Elastase) 활성 억제 효과 확인

[0072] 엘라스타아제 활성 억제 효과를 확인하기 위해, 엘라스타아제에 의해 N-숙신일-$(L\text{-}Ala)_3$-*p*-나이트로아닐린 기질이 가수분해될 때에서 방출되는 *p*-나이트로아닐린(nitroaniline)의 양을 410 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.

[0073] 0.1 M Tris-HCl 버퍼(pH 7.5)에 2.9 mM N-숙신일-$(L\text{-}Ala)_3$-*p*-나이트로아닐린을 용해시킨 후, 상기 용액에 1.25, 2.5, 5 및 10 mg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)을 첨가하였다.

[0074] 상기 용액에 엘라스타아제 0.2 unit/mL를 첨가하고 완전히 혼합한 후, 37 ℃에서 10분간 인큐베이션하고 410 nm에서 흡광도를 확인하였다.

[0075] 엘라스타아제 활성 억제 백분율을 하기식에 따라 계산하였다.

[0076] 억제율(%) = $[(\text{시료 } OD_{410} - \text{대조군 } OD_{410})/ \text{대조군 } OD_{410}]\times 100$

[0077] 그 결과, 도 3과 같이 10 mg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)은 엘라스타아제 활성을 99.2% 억제하였으며, 동일한 농도에서 51.6% 억제 활성을 나타낸 아스코르브산보다 높은 엘라스타아제 활성 억제 효과를 나타내었다.

[0078] **<실시예 4> 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)의 주름 억제 효과 확인**

[0079] 1. 세포배양

[0080] 사람 피부섬유아세포를 아모레 퍼시픽 회사(Korea)에서 얻어 사용하였다. 세포를 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(P/S)이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37 ℃, 5% CO_2 가습 조건에서 72시간 동안 배양하였다.

[0081] 2. 세포 생존도 분석(Cell viability assay)

[0082] 아스코르브산 및 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)의 최대허용수준(maximum permissible level; MPL)을 결정하기 위해, MTT 분석을 수행하여 세포 생존도를 확인하였다.

[0083] 사람 피부 섬유화세포를 96-웰 플레이트의 한 웰 당 1×10^4 세포로 분주하고 37 ℃, 5% CO_2 가습 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE) 200 μL를 PRF-DMEM(phenol red-free DMEM)배지를 이용하여 12.5, 25, 50, 100 및 200 μg/mL 농도로 희석하고 각 웰에 첨가한 후, 48 시간 동안 추가 배양하였다. 또한, 동일한 방법으로 100 및 200 μg/mL의 아스코르브산을 사람 피부 섬유아 세포에 처리하여 배양하였다.

[0084] 그 후, MTT 0.5 mg/mL를 각 웰에 첨가하고 3시간 동안 인큐베이션한 후, 1,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후, 각 웰에 DMSO 200 μL를 첨가하고 플레이트 진탕기에서 15분 동안 세포를 용해시킨 후, ELISA를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0085] 세포 생존도의 백분율은 하기식에 따라 계산되었다.

[0086] % 세포 생존도 = $(A_{sample}/A_{control})\times100$

[0087] 대조군의 흡광도인 $A_{control}$은 테스트 화합물이 포함되어 있지 않은 시약을 사용하였다.

[0088] 그 결과, 도 4와 같이 100 및 200 μg/mL의 아스코르브산을 처리한 경우, 아스코르브산이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 세포 생존도가 각각 6.5% 및 30.2% 감소하였다. 또한, 도 5와 같이 100 및 200 μg/mL의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)을 처리한 경우, 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 세포 생존도가 각각 6.0% 및 31.6% 감소하였다.

[0089] 상기 결과로부터 사람 피부섬유아세포에 적용시킬 수 있는 아스코르브산의 최대허용수준(maximum permissible level; MPL)은 100 μg/mL이었으며, 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)의 최대허용수준(maximum permissible level; MPL) 역시 100 μg/mL으로 확인되었다.

[0090] 3. 세포 형태학적 분석

[0091] 사람 피부섬유아세포에 25-200 μg/mL 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)을 처리하고 37 ℃, 5% CO_2 가습 조건에서 48시간 동안 배양한 후, 배지를 교체하고 도립현미경으로 세포의 형태를 확인하였다.

[0092] 그 결과, 도 6과 같이 낮거나, 중간 농도의 아스코르브산을 처리한 섬유아세포는 아무것도 처리되지 않은 대조군과 유사하게 고른 방추형을 유지하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 200 μg/mL 농도로 처리된 세포는 불규칙적이거나 둥근 모양을 나타내었으며, 세포 밀도가 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0093] 반면, 도 7과 같이 25-200 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 섬유아세포는 대조군과 유사하게 고른 방추형을 유지하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0094] 4. 타입 I 콜라게나아제 합성 효과 확인

[0095] 12.5, 25, 50 및 100 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)을 사람 피부섬유아세포에 처리하고, 상층액을 제거하여 EIA 키트(Takara, Japan)로 분석하였다. TGF-β를 양성 대조군을 사용하여, 타입 I 콜라게나아제 단백질 생산량을 450 nm 흡광도에서 확인하였다.

[0096] 사람 피부섬유아세포를 10% 태아소혈청(FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지로 안정화시키고, 37 ℃, 5% CO_2 가습 조건에서 24시간 동안 배양하였다.

[0097] 세포를 수집하여 6-웰 플레이트의 한 웰당 0.7×10^5 세포가 포함된 배지를 500 μL 부피로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 PBS로 세포를 2번 세척하고 1% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 PRE-DMEM 배지 1 mL을 첨가한 후, 24시간 동안 추가 배양하였다.

[0098] 그 후, 세포를 PBS로 세척하고 12.5, 25, 50 및 100 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 포함된 PRE-DMEM 배지 3 mL을 첨가하여 24시간 동안 배양하였다.

[0099] 배양 후, 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻고 프로콜라겐(procollagen) 단백질 정량 분석에 사용하였다.

[0100] 항체-페록시다아제-결합 용액 100 μL를 96-웰 EIA 키트에 분주하고 상층액을 4 배로 희석하여 첨가하였다. 포일로 감싼 키트를 37 ℃에서 3시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 PBS로 4번 세척하고 기질 용액 100 μL를 첨가한 후, 키트를 포일에 감싸 실온에서 15분간 배양하였다.

[0101] 정지액인 1 N H_2SO_4 100 μL 첨가하고 ELISA 리더기를 이용하여 450 nm에서 3번 반복하여 흡광도를 측정하였다.

[0102] 이미 보고되어진 방법(Lowry et al. 1951)과 같이 단백질 함량으로 프로콜라겐 단백질 수율을 분리하였으며, 소혈청알부민(BSA)를 기준으로 정량하였다.

[0103] 그 결과, 도 8과 같이 아무것도 처리되지 않은 대조군과 비교하여 12.5, 25, 50 및 100 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 세포군에서는 각각 14.2%, 24.4% ($p<0.05$), 32.1% ($p<0.05$) 및 50.7% ($p<0.01$)씩 ARLEE의 용량의존적으로 콜라겐 생성이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0104] 5. MMP-1 mRNA 및 단백질 발현 효과 확인

[0105] 5-1. UVA 조사 및 시료 처리

[0106] 사람 피부섬유아세포가 배양 접시의 80% 정도 분열 성장하면 세포를 수집하였다.

[0107] 배지를 제거하고 세포를 PBS로 세척한 후, FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지로 교체하여 1.5×10^5 cell/mL당 100 μg/mL 아스코르브산 또는 12.5, 25, 50 및 100 μg/mL 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)을 처리하고, 6.3 J/cm^2의 UVA를 조사한 후 24시간 동안 배양하였다.

[0108] 5-2. 웨스턴 블롯 분석

[0109] 12.5, 25, 50 및 100 μg/mL 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 사람 피부섬유아세포를 1% Nonidet P-40, 0.01% SDS 및 프로테아제 억제제 칵테일(Roche, Mannheim, Germany)이 포함된 0.1 M Tris-HCl (pH 7.2) 버퍼와 함께 초음파 처리하여 용해시켰다.

[0110] Pierce Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA) 와 소혈청알부민(bovine serum albumin; BSA)를 기준으로 이용하여 세포 용해물의 단백질 농도를 측정하였다.

[0111] 동량의 단백질(10 mg)을 10% 폴리아크릴아마이드 겔의 각 레인에 적재하고 전기영동하여 분리시켰다. 그 후, 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 옮기고 항-MMP-1 항체(1:1000, ab 137332; Abcam, UK) 및 항-래빗 IgG(1:1000; Santa Cruz Boitechnology, USA)와 반응시켰다.

[0112] ECL Western blotting detection reagents (Amersham, Bucks, UK)를 이용하여 면역 반응성 밴드를 화학발광시켜 확인하였다.

[0113] 밴드 강도는 Image J program (NIH, Bethesda, USA)을 이용하여 밴드 강도를 측정하였으며, β-액틴을 면역블롯팅을 위한, 내부 대조군으로 사용하였다.

[0114] 그 결과, 도 9와 같이 12.5, 25 및 50 μg/mL 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 세포군에서는 UVA가 조사된 대조군보다 MMP-1 단백질 발현이 각각 31.2% ($p<0.01$), 32.2% ($p<0.01$) 및 46.1% ($p<0.01$) 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0115] 상기 결과로부터 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 용량의존적으로 MMP-1 단백질 발현을 감소시키는 것이 확인되었다.

[0116] 5-3.역 전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)

[0117] 제조사의 설명서에 따라 TRIzol (Invitrogen, CA) 1 mL로 12.5, 25, 50 및 100 μg/mL 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 사람 피부섬유아세포로부터 전체 RNA를 추출하였다.

[0118] 추출된 RNA 5 μg를 5×M-MLV RT(Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) 버퍼 8 μL, dNTPs(10 mM) 3

μL, RNase 억제제(40 U/μL) 0.45 μL, M-MLV 역 전사효소(200 U/μL; Promega, USA) 0.3 μL, 및 oligo dT (50 pM/μL; Bioneer, Korea) 1.5 μL가 포함된 반응 혼합물 40 μL로 역전사 시켰다.

[0119] 5×Green Go-Taq Flexi 반응 버퍼 4 μL, dNTPs (10 mM) 0.4 μL, Taq polymerase (5 U/μL) 0.1 μL, $MgCl_2$ (25 mM; Promega, USA) 1.2 μL 및 MMP-1 또는 β-액틴의 특이적 프라이머(20 pM/μL)를 각각 0.4 μL씩 이용한 PCR을 수행하여 단일 가닥 cDNA를 증폭하였다.

[0120] 각 프라이머의 염기서열은 표 1에 나타내었다.

[0121] 94 ℃에서 60초, 50 ℃에서 90초, 72 ℃에서 60초 28 싸이클 조건으로 PCR을 수행하고, PCR 산물을 1.2% 아가로스 젤에서 전기영동하여 내부 대조군인 β-액틴에 대한 MMP-1의 상대적 발현량을 확인하였다.

표 1

[0122]

유전자		프라이머	예상 크기(염기쌍)
MMP-1	정방향(5'→3')	CGACTCTAGAAACACAAGAG(서열번호 1)	237
	역방향(3'→5')	AAAGTTAGCTTACTGTCACACGTT(서열번호 2)	
β-액틴	정방향(5'→3')	ACCGTGAAAAGATGACCCAG(서열번호 3)	248
	역방향(3'→5')	TACGGATGTCAACGTCACAC(서열번호 4)	

[0123] 그 결과, 도 10과 같이 12.5, 25, 50 및 100 μg/mL 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 세포군에서 UVA가 조사된 대조군과 비교하여 각각 12.4% ($p<0.05$), 15.3% ($p<0.05$), 29.6 % ($p<0.01$) 및 36.1% ($p<0.01$) MMP-1 mRNA 발현이 감소하였다.

[0124] 상기 결과로부터 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 용량의존적으로 MMP-1 mRNA 발현을 감소시키는 것이 확인되었다.

[0125] **<실시예 5> 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)의 미백 효과 확인**

[0126] 1. 세포 배양

[0127] Dr. Dorothy Bennett (St. George`s Hospital, UK)로부터 melan-a 세포를 받아 사용하였다. melan-a 세포는 C57BL/6 생쥐로부터 유래된 매우 착색된 무한증식 세포이다.

[0128] 상기 세포를 10% 태아소혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 200 nM TPA(12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate)가 포함된 RPMI-1640 배지를 이용하여 37 ℃ 및 10% CO_2 조건에서 72시간 동안 배양하였다.

[0129] 2. 세포 생존도 분석(Cell viability assay)

[0130] MTT 분석을 통하여 세포 생존도를 확인하였다. melan-a 세포를 96-웰 플레이트에 웰 당 0.5×10^4 세포로 분주하고 37 ℃ 및 10% CO_2 배양기에서 24시간 동안 성장시켰다.

[0131] RPMI-1640 배지를 이용하여 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE) 200 μL를 12.5, 25, 50, 100 및 200 μL/mL의 농도로 희석하여 각 웰에 첨가한 후, 37 ℃ 및 10% CO_2 배양기에서 48시간 동안 성장시켰다. 또한, 동일한 방법으로 25, 50, 100 및 200 μg/mL의 알부틴(arbutin)을 melan-a 세포에 처리하여 배양하였다.

[0132] 48시간 후, 세포에 0.5 μg/mL MTT가 포함된 배지를 첨가하고 37 ℃ 및 10% CO_2 배양기에서 3시간 동안 성장시켰다. 플레이트를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 배지를 제거하고 각 웰에 DMSO 200 μL를 첨가하고 플레이트 진탕기에서 15분 동안 세포를 용해시키고 플레이트 리더기(680, Bio-Rad, Tokyo, Japan)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0133] 세포 생존도의 백분율을 하기식에 따라 계산하였다.

[0134] % 세포 생존도 = $(A_{sample}/A_{blank})\times100$

[0135] A_{sample}은 시료 혼합물의 흡광도이며, A_{blank}는 테스트 화합물이 제거된 모든 시약을 포함하는 대조군 시약의 흡광도이다.

[0136] 그 결과, 도 11과 같이 알부틴은 melan-a 세포의 생존도를 감소시키지 못한 반면, 도 12와 같이 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)은 용량의존적으로 melan-a 세포의 생존도를 감소시키는 것이 확인되었다.

[0137] 상기 결과로부터 상기 결과로부터 melan-a 세포에 적용시킬 수 있는 알부틴의 최대허용수준(maximum permissible level; MPL)은 200 μg/mL 이상이었으며, 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)의 최대허용수준(maximum permissible level; MPL)은 50 μg/mL로 확인되었다.

[0138] 3. 세포 형태학적 분석

[0139] 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)에 의한 세포 형태 변화를 확인하기 위해, 증가되는 농도로 12.5, 25, 50, 100 및 200 μg/mL의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)을 Melan-a 세포에 처리하고 37℃, 10% CO_2 배양기에서 48시간 동안 배양한 후, 배지를 교체하여 도립현미경으로 세포를 관찰하였다.

[0140] 그 결과, 도 13과 같이 12.5 내지 100 μg/mL의 ARLEE를 처리된 malan-a 세포군은 아무것도 처리되지 않은 대조군과 비교하여 수상돌기 및 멜라닌 침착이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0141] 4. 멜라닌 합성 억제 효과 확인

[0142] 48-웰 플레이트에 melan-a 세포를 웰 당 2×10^4 세포로 분주하고 37℃, 10% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE) 500 μL를 PMI-1640 배지로 6.25, 12.5, 25 및 50 μg/mL 농도로 희석하여 각 웰에 첨가하고 37℃, 10% CO_2 배양기에서 72시간 동안 배양한 후, 세포를 세척하고 동일한 방법으로 ARLEE을 한번 더 처리하였다.

[0143] 그 후, 1 N NaOH로 멜라닌을 용해시키고 ELISA 리더기를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0144] % 멜라닌 함량 = $(A_{sample}/A_{blank}) \times 100$

[0145] A_{blank}는 테스트 화합물이 제거된 모든 시약을 포함하는 대조군 시약의 흡광도이다.

[0146] 그 결과, 도 14와 같이 아무것도 처리되지 않은 대조군과 비교하여 6.25, 12.5, 25 및 50 μg/mL 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 세포군에서는 ARLEE의 용량의존적으로 각각 22.3% ($p<0.01$), 24.1% ($p<0.001$) 및 33.0% ($p<0.001$) 멜라닌 합성이 감소된 것을 확인할 수 있다.

[0147] 5. 세포 내 티로시나아제(tyrosinase) 활성 확인

[0148] 60 mm 세포 배양 디쉬에 melan-a 세포를 4×10^5 세포로 분주하고 37℃, 10% CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)을 PMI-1640 배지로 6.25, 12.5, 25 및 50 μg/mL 농도로 희석하여 각 디쉬에 첨가하고 37℃, 10% CO_2 배양기에서 48시간 동안 배양하였다.

[0149] 그 후, 인산완충식염수(PBS)로 세척하고 1% 트리톤 X-100 200 μL를 각 배양 디쉬에 첨가하고, 세포를 재부유시켜 튜브에 옮겨 담고 얼음 위에 놓았다.

[0150] 60분 후, 세포가 담긴 튜브를 10분 동안 6번 교반하고 4 ℃, 14,000 rpm으로 20분간 원심분리하였다.

[0151] 원심분리 후, 0.2% L-DOPA 100 μL를 첨가하고 37℃, 10% CO_2 배양기에서 1시간 동안 배양한 후, 플레이트 리더기를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 티로신 활성을 하기식과 같이 계산하였다.

[0152] % 활성도 = $(A_{sample}/A_{blank}) \times 100$

[0153] A_{sample}은 시료 혼합물의 흡광도이며, A_{blank}는 테스트 화합물이 제거된 모든 시약을 포함하는 대조군 시약의 흡광도이다.

[0154] 그 결과, 도 15와 같이 용매대조군과 비교하여 12.5, 25 및 50 μg/mL 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 세포군에서 세포내 티로시나아제 활성이 ARLEE의 용량의존적으로 각각 3.3%, 9.8%($p<0.05$) 및 48.8%($p<0.001$) 감소하였으며, 특히, 50 μg/mL ARLEE이 처리된 세포군에서는 동일 용량의 알부틴이 처리된 대조군보다 높은 티로시나아제 활성 감소효과를 나타내었다.

[0155] 6. 티로시나아제 mRNA 및 단백질 발현 확인

[0156] 6-1. 웨스턴 블롯 분석

[0157] 6.25, 12.5, 25 및 50 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 melan-a 세포를 1% Nonidet P-40, 0.01% SDS 및 프로테아제 억제제 칵테일(Roche, Mannheim, Germany)이 포함된 0.1 M Tris-HCl (pH 7.2) 버퍼와 함께 초음파 처리하여 용해시켰다.

[0158] Pierce Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA) 와 소혈청알부민(bovine serum albumin; BSA)를 기준으로 이용하여 세포 용해물의 단백질 농도를 측정하였다.

[0159] 동량의 단백질(10 mg)을 10% 폴리아크릴아마이드 겔의 각 레인에 적재하고 전기영동하여 분리시켰다. 그 후, 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 옮기고 항-티로시나아제(tyrosinase) 항체(1:1000, SC 15341; Santa Cruz Boitechnology, USA) 및 항-래빗 IgG(1:1000; Santa Cruz Boitechnology, USA)와 반응시켰다.

[0160] ECL Western blotting detection reagents (Amersham, Bucks, UK)를 이용하여 면역 반응성 밴드를 화학 발광시켜 확인하였다.

[0161] 밴드 강도는 Image J program (NIH, Bethesda, USA)을 이용하여 밴드 강도를 측정하였으며, β-액틴을 면역블롯팅을 위한 내부 대조군으로 사용하였다.

[0162] 그 결과, 도 16과 같이 용매대조군과 비교하여 6.25, 12.5, 25 및 50 μg/mL 농도의 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 세포군에서 티로시나아제 단백질 발현이 ARLEE의 용량의존적으로 각각 9.3%, 11.7%, 19.5% ($p<0.05$) 및 30.5% ($p<0.01$) 감소하였다.

[0163] 6-2. 역 전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)

[0164] 제조사의 설명서에 따라 TRIzol (Invitrogen, CA)로 6.25, 12.5, 25 및 50 μg/mL 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)이 처리된 사람 피부섬유아세포로부터 전체 RNA를 추출하였다.

[0165] 추출된 RNA 5 μg를 5×M-MLV RT(Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) 버퍼 8 μL, dNTPs(10 mM) 3 μL, RNase 억제제(40 U/μL) 0.45 μL, M-MLV 역 전사효소(200 U/μL; Promega, USA) 0.3 μL 및 oligo dT (50 pM/μL; Bioneer, Korea) 1.5 μL가 포함된 반응 혼합물 40 μL로 역전사 시켰다.

[0166] 5×Green Go-Taq Flexi 반응 버퍼 4 μL, dNTPs (10 mM) 0.4 μL, Taq 중합효소(500 U/μL) 0.1 μL, $MgCl_2$ (25 mM; Promega, USA) 1.2 μL 및 티로시나아제(tyrosinase) 또는 β-액틴의 특이적 프라이머(20 pM/μL)를 각각 0.4 μL씩 이용한 PCR을 수행하여 단일 가닥 cDNA를 증폭하였다.

[0167] 각 프라이머의 염기서열은 표 2에 나타내었다.

[0168] 94 ℃에서 60초, 50 ℃에서 60초, 72 ℃에서 60초 28 싸이클 조건으로 PCR을 수행하였으며, PCR 산물을 1.2% 아가로스 젤에서 전기영동하여 내부 대조군인 β-액틴에 대한 티로시나아제의 상대적 발현량을 확인하였다.

표 2

[0169]

유전자		프라이머	예상 크기(염기쌍)
티로시나아제	정방향(5'→3')	CATTTTTGATTTGAGTGTCT(서열번호 5)	1192
	역방향(3'→5')	TGTGGTAGTCGTCTTTGTCC(서열번호 6)	
β-액틴	정방향(5'→3')	ACCGTGAAAAGATGACCCAG(서열번호 3)	528
	역방향(3'→5')	TACGGATGTCAACGTCACAC(서열번호 4)	

[0170] 그 결과, 도 17과 같이 용매대조군과 비교하여 6.25, 12.5, 25 및 50 μg/mL 돌단풍 잎 에탄올 추출물(ARLEE)을 처리한 세포군에서 ARLEE 용량의존적으로 티로시나아제 mRNA 발현이 각각 5.9%, 12.1% ($p<0.05$), 29.0% ($p<0.01$) 및 35.7% ($p<0.01$) 감소하였다.

[0171] 한편, 본 발명에 따른 돌단풍 잎 추출물은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기에서는 본 발명에 따른 돌단풍 잎 추출물을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0172] **<제제예 1> 약학조성물의 처방예**

[0173] <제제예 1-1> 주사제의 제조

[0174] 돌단풍 잎 에탄올 추출물 10 mg, 소디움 메타비설파이트 3.0 mg, 메틸파라벤 0.8 mg, 프로필파라벤 0.1 mg 및 주사용 멸균증류수 적량을 혼합하고 통상의 방법으로 최종 부피가 2 ㎖이 되도록 제조한 후, 2 ㎖ 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.

[0175] <제제예 2-1> 정제의 제조

[0176] 돌단풍 잎 에탄올 추출물 10 mg, 유당 100 mg, 전분 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.

[0177] <제제예 3-1> 캡슐제의 제조

[0178] 돌단풍 잎 에탄올 추출물 10 mg, 유당 50 mg, 전분 50 mg, 탈크 2 mg 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0179] <제제예 4-1> 연고제의 제조

[0180] 돌단풍 잎 에탄올 추출물 100 mg, PEG-4000 250mg, PEG-400 650mg, 백색바셀린 10mg, 파라옥시안식향산메칠 1.44mg, 파라옥시안식향산프로필 0.18mg 및 잔량의 정제수를 혼합한 후 통상의 연고제의 제조방법에 따라서 연고제를 제조하였다.

[0181] **<제제예 2> 화장료 조성물의 제제예**

[0182] <제제예 2-1> 영양 로션의 제조

[0183] 프로필렌글리콜 3.0 중량부, 카르복시폴리머 0.1 중량부, 방부제 미량과 잔량의 정제수를 혼합교반하면서 80 내지 85℃로 가열하여 제조부에 투입한 후 유화기를 작용시키고, 폴리솔베이트60 1.0 중량부, 솔비탄 세스퀴올레이트 0.5 중량부, 유동 파라핀 10.0 중량부, 솔비탄 스테아레이트 1.0 중량부, 친유형 모노스테아린산 글리세린 0.5 중량부, 스테아린산 1.5 중량부, 글리세릴스테아레이트/PEG-400 스테아레이트 1.0 중량부, 트리에탄올아민 0.2 중량부를 80 내지 85℃로 가열하여 투입한 뒤 유화하였다. 유화가 끝나면 교반기를 이용하여 교반하면서 50℃까지 열 냉각한 뒤 향료 미량을 투입하고, 45℃까지 냉각한 뒤 색소 미량을 투입하고, 35℃에서 돌단풍 잎 에탄올 추출물을 투입하여 25℃까지 냉각한 뒤 숙성시켰다.

[0184] <제제예 2-2> 영양 크림의 제조

[0185] 카르복시폴리머 0.3 중량부, 부틸렌글리콜 5.0 중량부, 글리세린 3.0 중량부

[0186] 및 잔량의 정제수를 혼합교반하면서 80 내지 85℃로 가열하여 제조부에 투입한 후 유화기를 작용시키고, 스테아린산 2.0 중량부, 세틸알콜 2.0 중량부, 글리세릴모노 스테아레이트 2.0 중량부, 폴리옥시에틸렌솔비탄모노스테아레이트 0.5 중량부, 솔비탄세스퀴올레이트 0.5 중량부, 글리세릴모노스테아레이트/글리세릴스테아레이트/폴리옥시에틸렌스테아레이트 1.0 중량부, 왁스 1.0 중량부, 유동파라핀 4.0 중량부, 스쿠알란 4.0 중량부, 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드 4.0 중량부를 80 내지 85℃로 가열하여 투입한 뒤 트리에탄올아민 0.5 중량부를 투입하여 유화하였다. 유화가 끝나면 교반기를 이용하여 교반하면서 35℃까지 냉각한 뒤 돌단풍 잎 에탄올 추출물을 투입하여 25℃까지 냉각한 뒤 숙성시켰다.

[0187] **<제제예 3> 건강식품의 제조**

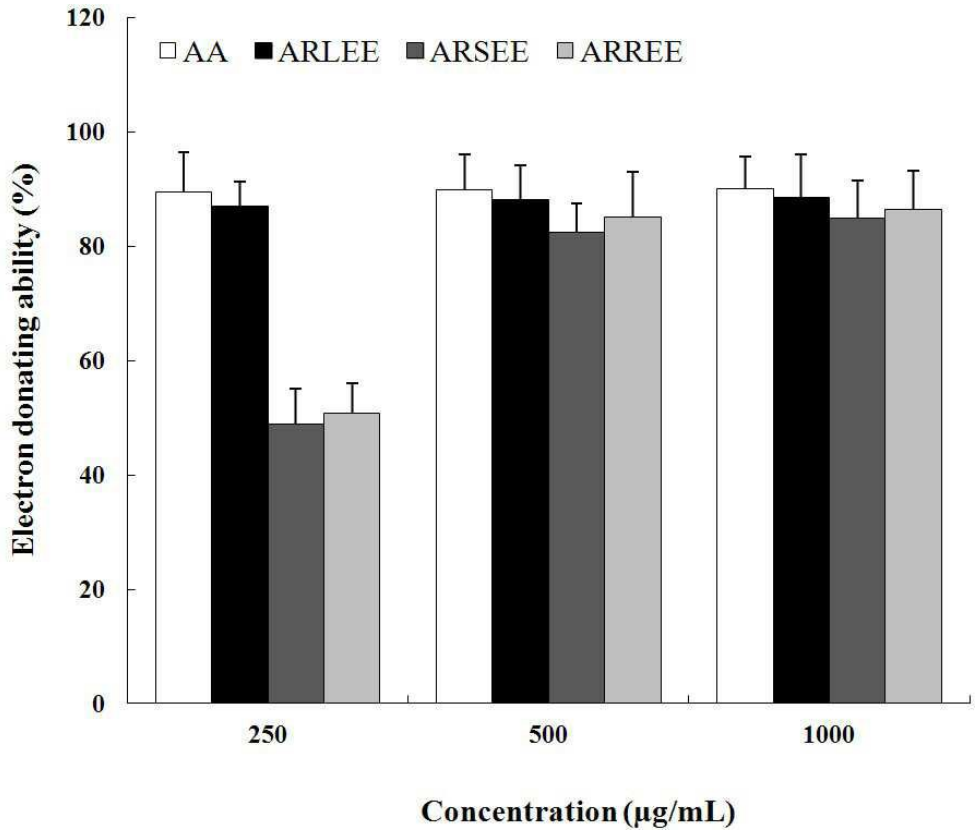
[0188] 돌단풍 잎 에탄올 추출물 0.5 ㎎, 비타민 혼합물 적량(비타민 A 아세테이트 70 ㎍, 비타민 E 1.0 ㎎, 비타민 B 1 0.13 ㎎, 비타민 B 2 0.15 ㎎, 비타민 B 6 0.5 ㎎, 비타민 B 12 0.2 ㎍, 비타민 C 10 ㎎, 비오틴 10 ㎍, 니코틴산아미드 1.7 ㎎, 엽산 50 ㎍, 판토텐산 칼슘 0.5 ㎎) 및 무기질 혼합물 적량(황산제1철 1.75 ㎎, 산화아연 0.82㎎, 탄산마그네슘 25.3 ㎎, 제1인산칼륨 15 ㎎, 제2인산칼슘 55 ㎎, 구연산칼륨 90㎎, 탄산칼슘 100 ㎎, 염화마그네슘 24.8 ㎎)을 혼합한 다음 과립을 제조하고 통상의 방법에 따라 건강식품을 제조하였다.

[0189] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할

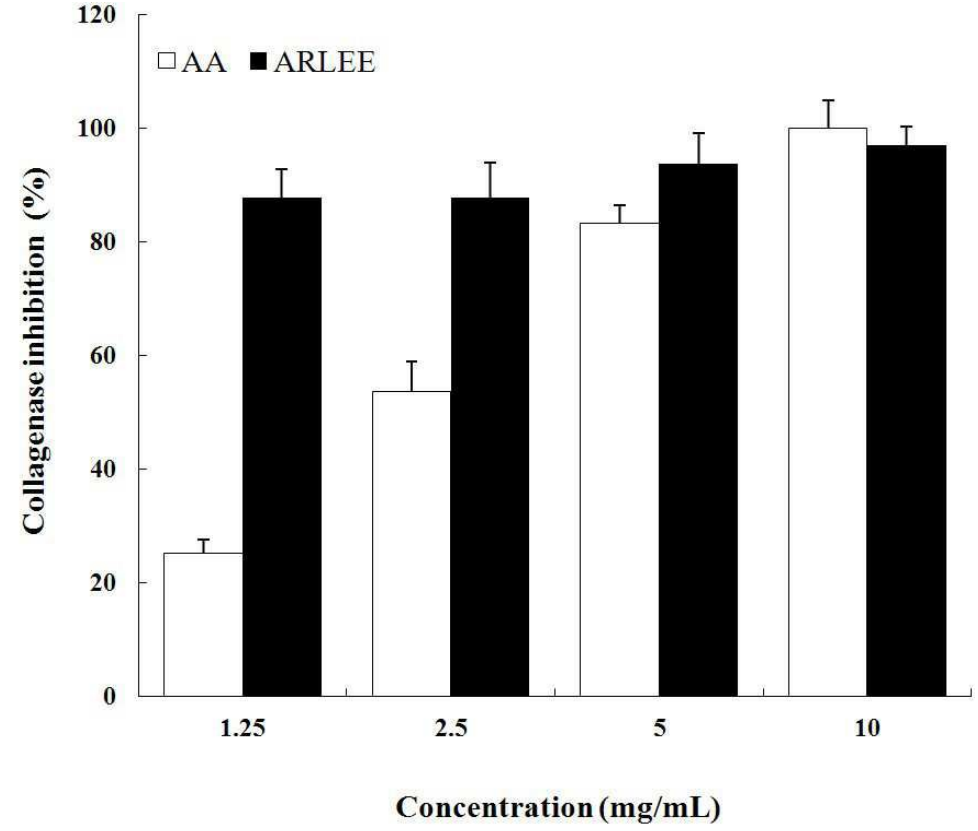
것이다.

도면

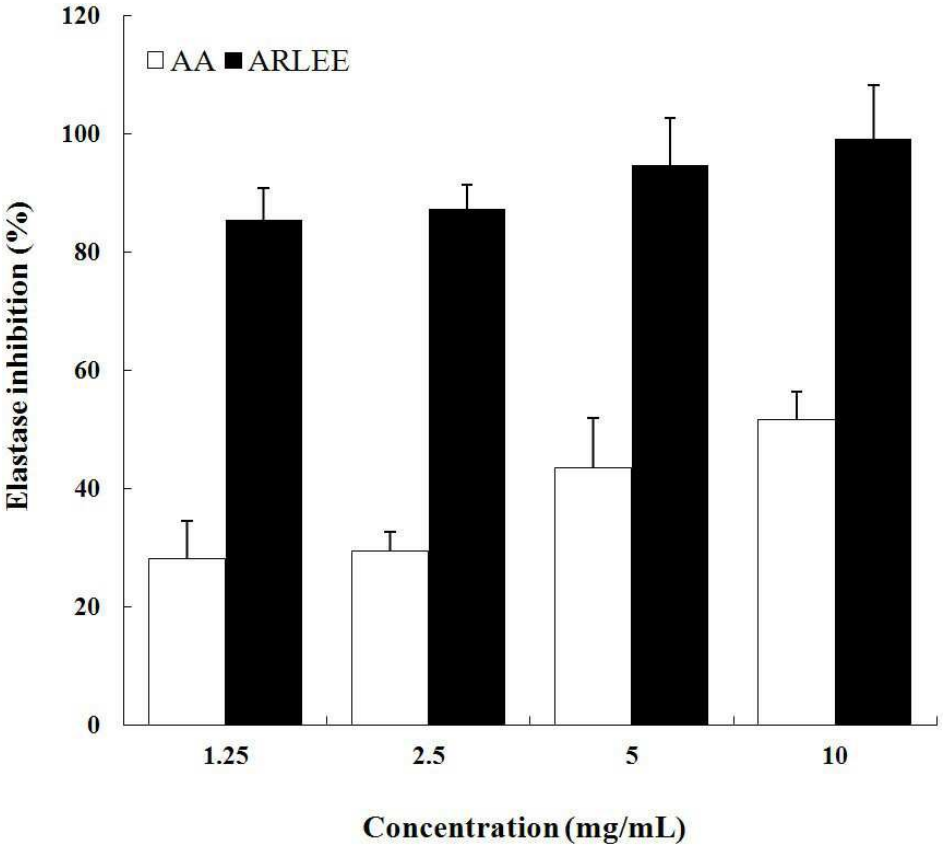
도면1


AA
ARLEE
ARSEE
ARREE
Electron donating ability (%)
120
100
80
60
40
20
0
250
500
1000
Concentration (μg/mL)

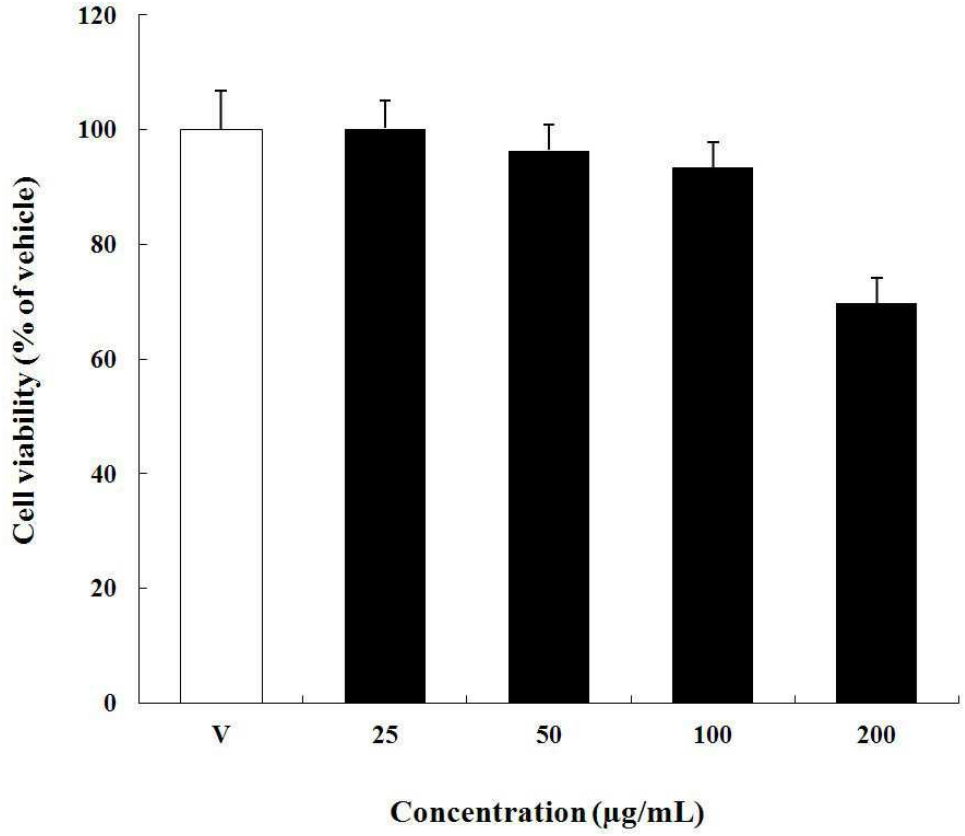
도면2


120
100
80
60
40
20
0
□AA ■ARLEE
Collagenase inhibition (%)
1.25
2.5
5
10
Concentration (mg/mL)

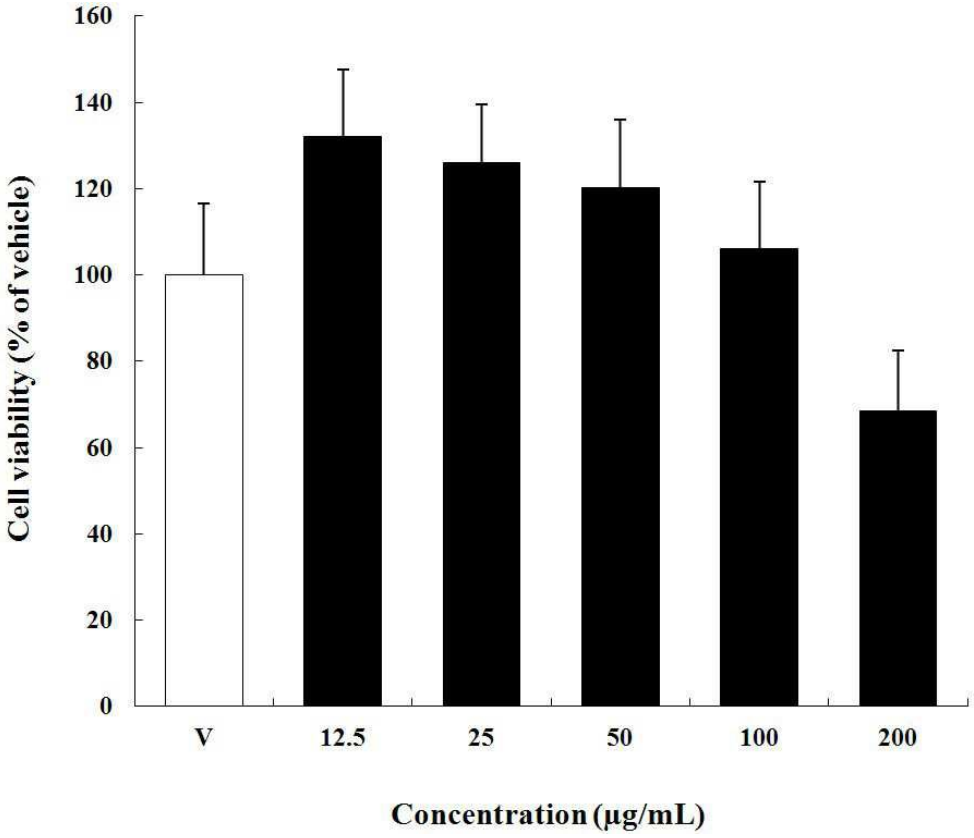
도면3


120
100
80
60
40
20
0
□AA ■ARLEE
Elastase inhibition (%)
1.25
2.5
5
10
Concentration (mg/mL)

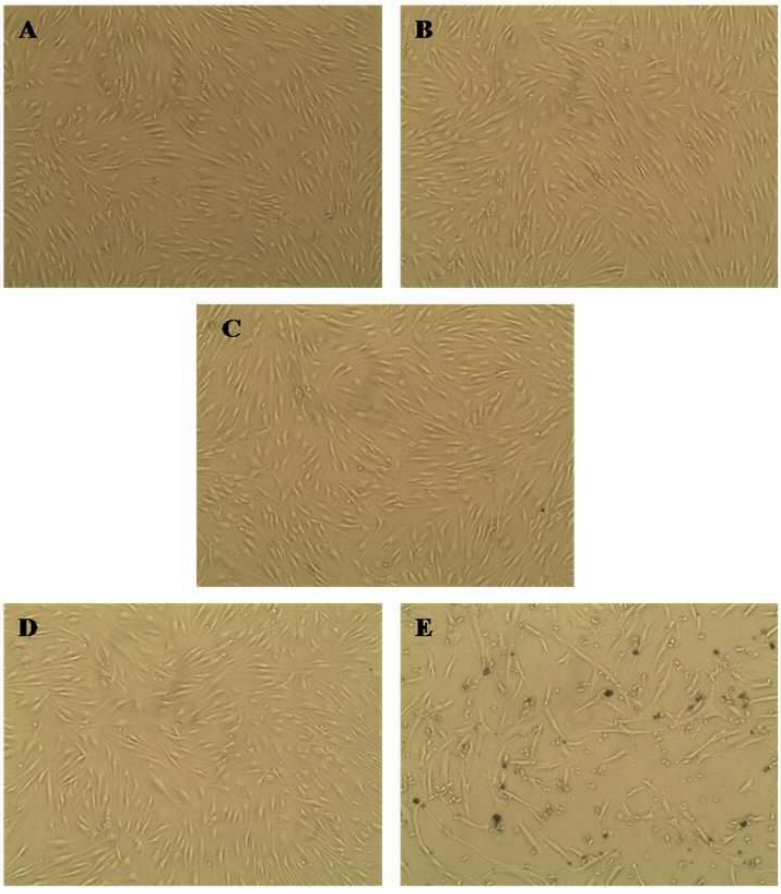
도면4


120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (% of vehicle)
V
25
50
100
200
Concentration (μg/mL)

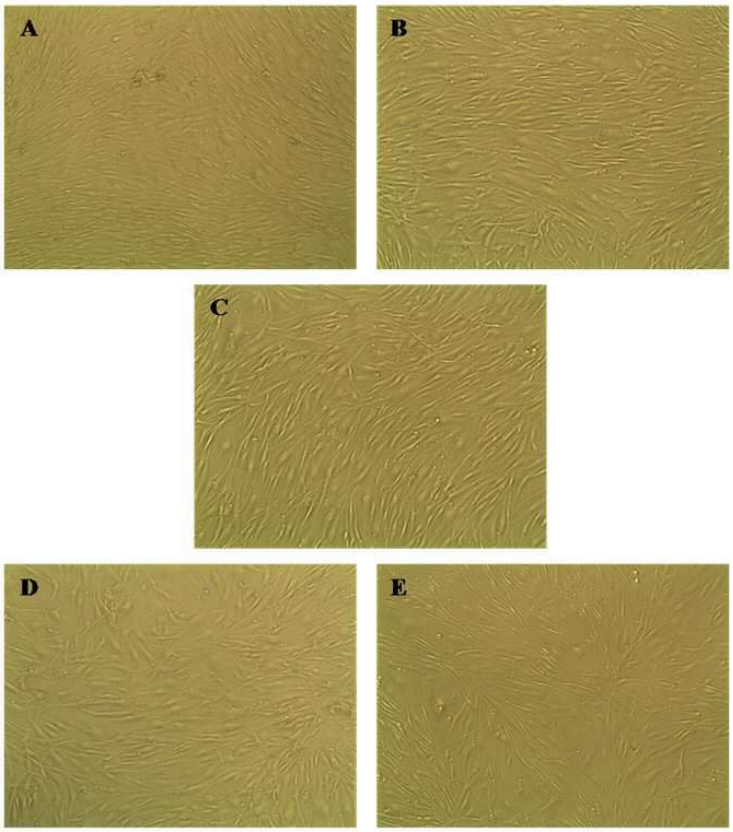
도면5


160
140
120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (% of vehicle)
V
12.5
25
50
100
200
Concentration (μg/mL)

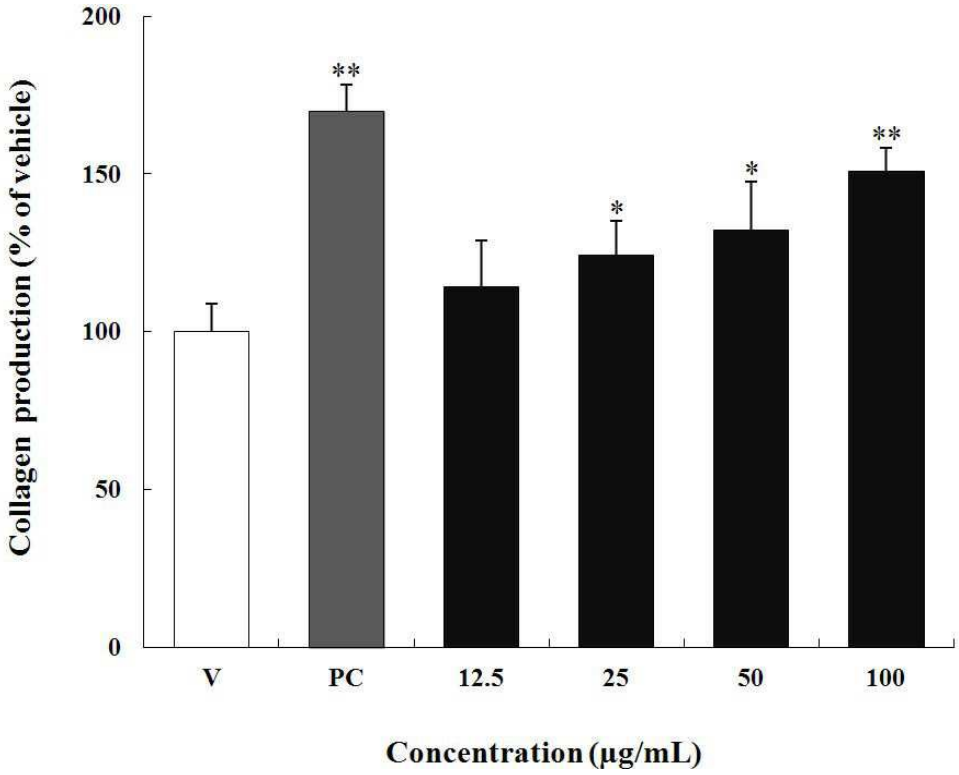
도면6


A
B
C
D
E

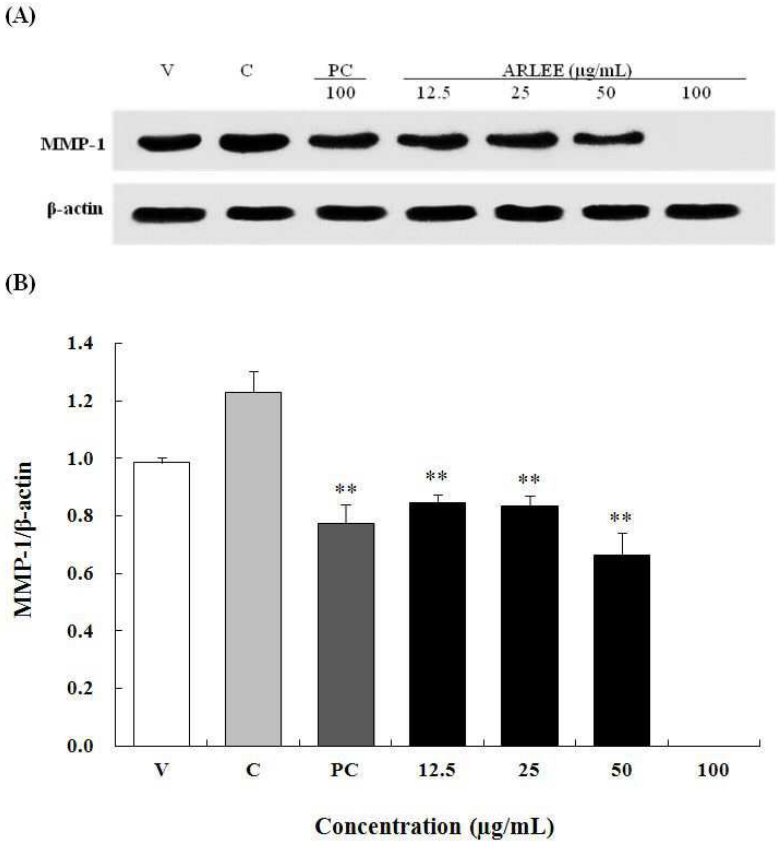
도면7


A
B
C
D
E

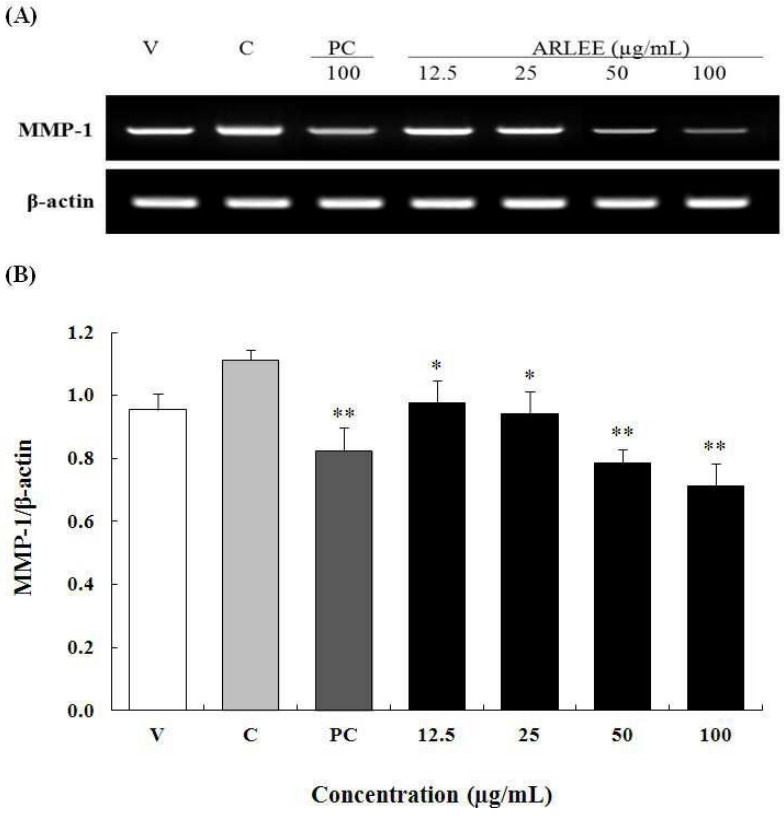
도면8


Collagen production (% of vehicle)
200
150
100
50
0
**
*
*
**
V
PC
12.5
25
50
100
Concentration (μg/mL)

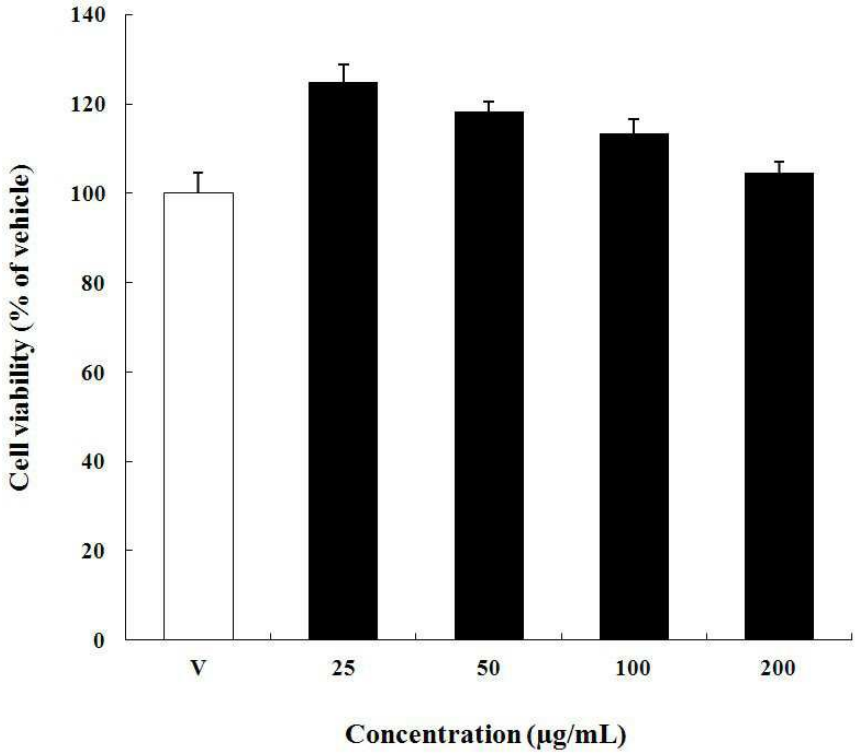
도면9


(A)
V
C
PC
100
ARLEE (μg/mL)
12.5
25
50
100
MMP-1
β-actin
(B)
MMP-1/β-actin
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
**
**
**
V
C
PC
12.5
25
50
100
Concentration (μg/mL)

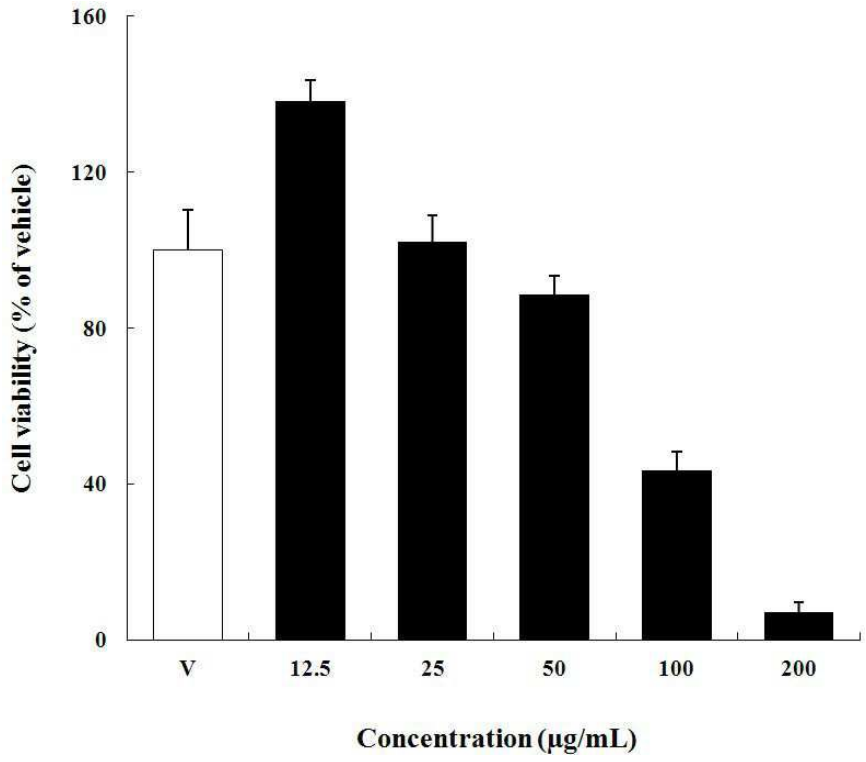
도면10


(A)
V
C
PC
100
ARLEE (μg/mL)
12.5
25
50
100
MMP-1
β-actin
(B)
MMP-1/β-actin
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
*
*
**
**
V
C
PC
12.5
25
50
100
Concentration (μg/mL)

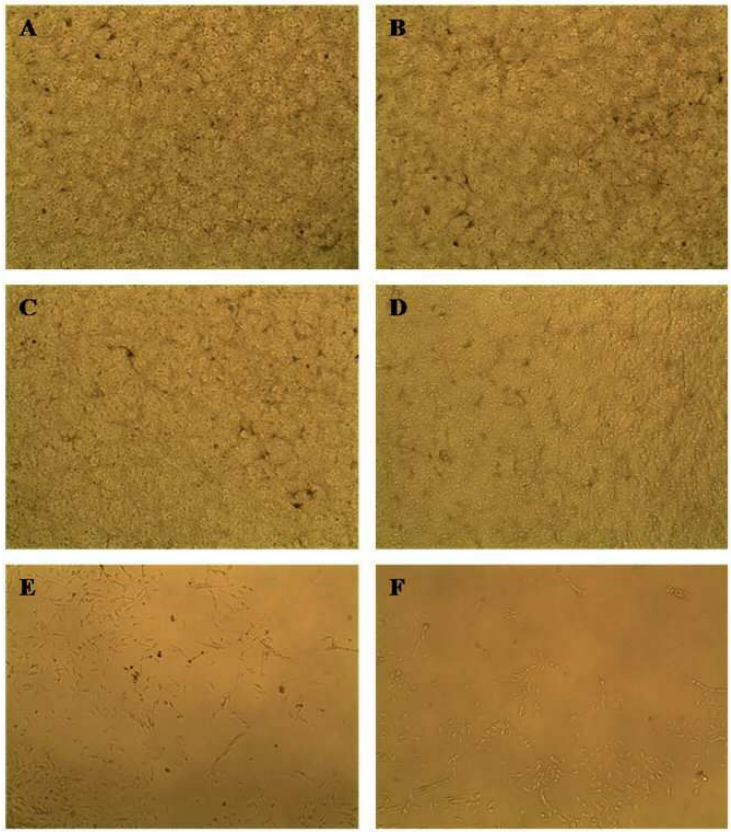
도면11


140
120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (% of vehicle)
V
25
50
100
200
Concentration (μg/mL)

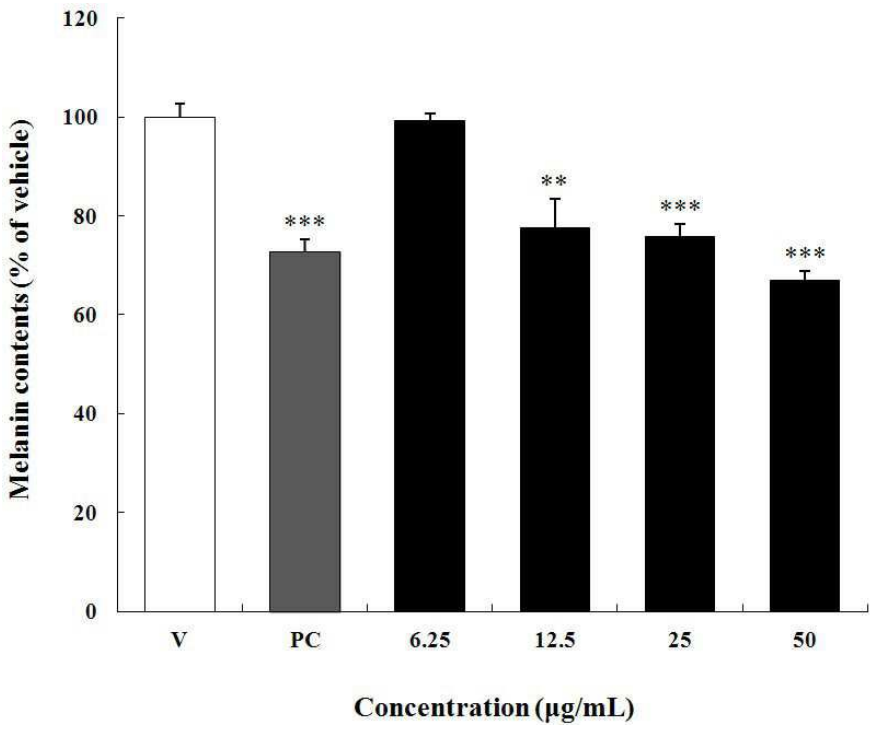
도면12


160
120
80
40
0
Cell viability (% of vehicle)
V
12.5
25
50
100
200
Concentration (μg/mL)

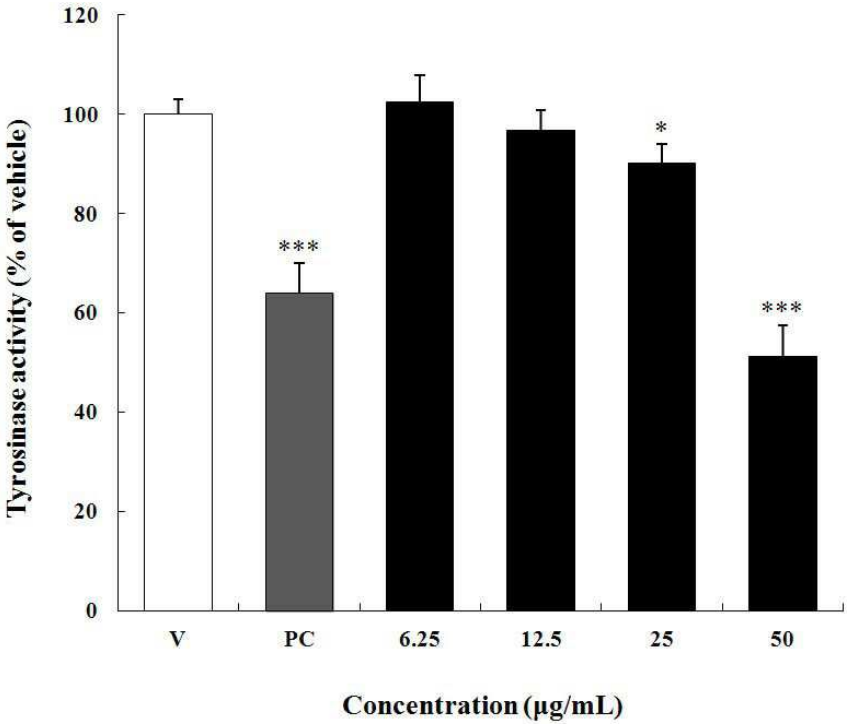
도면13


A
B
C
D
E
F

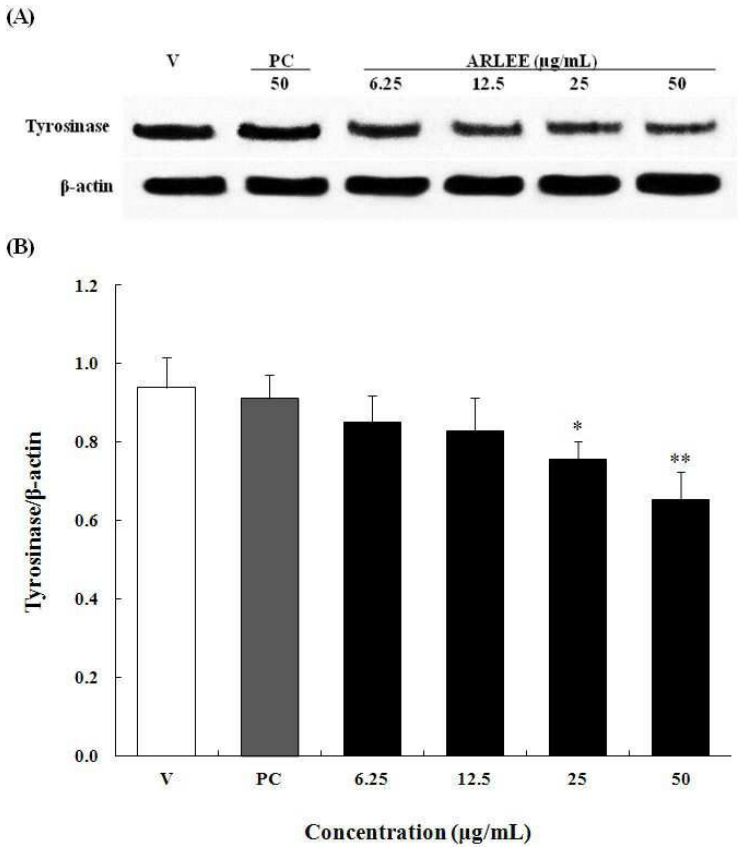
도면14


120
100
80
60
40
20
0
Melanin contents (% of vehicle)
***
**
***
***
V
PC
6.25
12.5
25
50
Concentration (μg/mL)

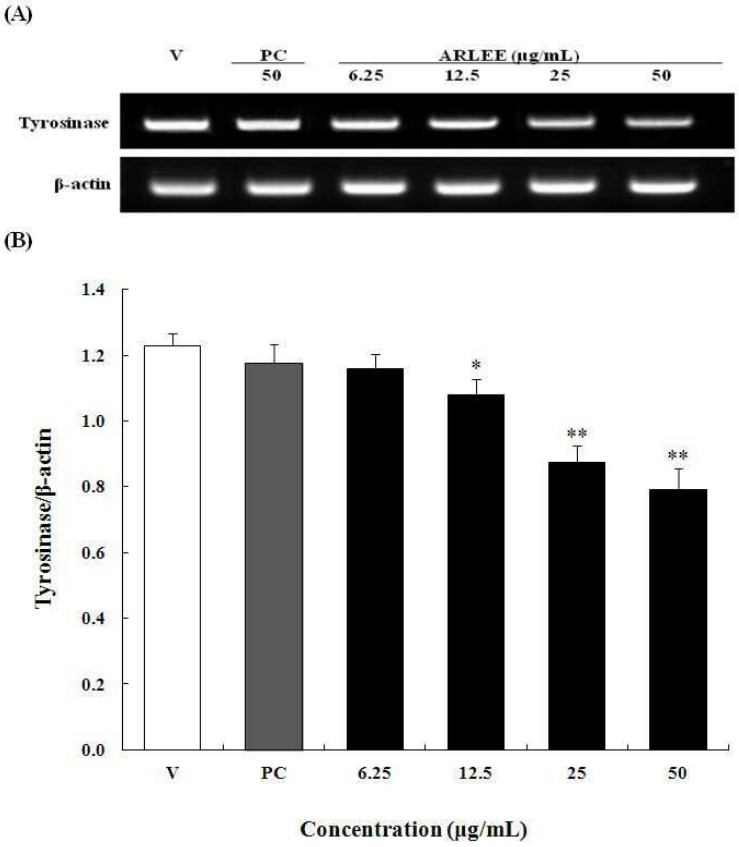
도면15


Tyrosinase activity (% of vehicle)
120
100
80
60
40
20
0
***
*
***
V
PC
6.25
12.5
25
50
Concentration (μg/mL)

도면16


(A)
V
PC
50
ARLEE (μg/mL)
6.25
12.5
25
50
Tyrosinase
β-actin
(B)
Tyrosinase/β-actin
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
**
V
PC
6.25
12.5
25
50
Concentration (μg/mL)

도면17



서 열 목 록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY

<120> Composition for improving skin wrinkle or skin whitening comprising extract of aceriphyllum rossii

<130> ADP-2015-0086

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-1 forward

<400> 1

cgactctaga aacacaagag 20

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-1 reverse

<400> 2

aaagttagct tactgtcaca cgtt 24

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> b-actin forward

<400> 3

accgtgaaaa gatgacccag 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> b-actin reverse

<400> 4

tacggatgtc aacgtcacac 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tyrosinase forward

<400> 5

catttttgat ttgagtgtct 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tyrosinase reverse

<400> 6

tgtggtagtc gtctttgtcc 20