(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월28일
(11) 등록번호 10-1321854
(24) 등록일자 2013년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0090029
(22) 출원일자 2013년07월30일
심사청구일자 2013년07월30일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020100102389 A
JP2001278769 A
KR1020080071386 A
KR1020080001031 A

(73) 특허권자
주식회사 더마랩
강원도 원주시 문막읍 문막공단길 231
(72) 발명자
김다애
강원도 속초시 교동로 6길 35
이대우
강원도 원주시 명륜2동 청구아파트 207동 1205호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
권혁철

전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 박정민

(54) 발명의 명칭 **효소 처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 주름개선 및 피부 탄력증진용 화장료조성물**

(57) 요 약

본 발명은 효소 처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 주름개선 및 피부 탄력 증진용 화장료 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 화장료 조성물은 피부 내 콜라겐생성 촉진효과, 콜라게나아제 발현 저해, MMP-1 생성 억제 효과 및 엘라스타제 저해활성효과를 통해 우수한 주름개선 및 피부 탄력 증진 효과를 가진다.

(72) 발명자

최성규

경기도 안양시 동안구 범계동 평촌목련2단지대우선경아파트 208동 1303호

하정욱

인천광역시 부평구 삼산1동 서해그랑블 202동 2801호

백태선

인천광역시 남동구 구월1동 1237-15호

특허청구의 범위

청구항 1

효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물을 포함하는 주름개선 및 피부 탄력증진용 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물은 블래더랙과 꿀풀을 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합물 중에서 선택된 용매로 추출한 후, β-글루코시다아제 효소로 가수분해하여 제조되는 것임을 특징으로하는 주름개선 및 피부 탄력증진용 화장료 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물은 화장료 전제 중량에 대하여 0.0005 ~ 50 중량% 포함되는 것임을 특징으로 하는 주름개선 및 피부 탄력증진용 화장료 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 콜라겐생성 촉진에 의하여 주름을 개선하는 것임을 특징으로 하는 주름개선 및 피부 탄력증진용 화장료 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 엘라스타제 저해활성 및 MMP-1 생성 억제에 의하여 주름을 개선하고 피부탄력을 증진하는 것임을 특징으로 하는 주름개선 및 피부 탄력증진용 화장료 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 화장료는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지 크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징 폼, 클렌징 로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더 및 아이섀도로 구성된 그룹에서 선택된 어느 하나의 제형을 가지는 것임을 특징으로 하는 주름개선 및 피부탄력 증진용 화장료 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 효소 처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물을 함유하는 주름개선 및 피부 탄력증진용 화장료 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로는 효소분해하여 제조된 블래더랙 추출물 및 꿀풀 추출물을 유효성분으로 함유하여 기존의 피부 개선 함유 화장료에 비해 콜라겐생성 촉진효과, 콜라게나아제 발현 저해, MMP-1 생성 억제 효과 및 엘라스타제 저해활성 효과가 향상된 주름개선 및 피부 탄력증진용 화장료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 경제 발전이 지속되면서 개인의 경제 수준이 높아져 개개인의 행복 추구와 노화방지에 대한 관심이 높아지고 있다. 또한 경제활동에 참여하고 있는 여성의 기회가 많아지면서 외적 미에 대한 욕구가 높아져 피부에 대한 중요성이 각광받고 있다. 안면 피부의 경우 타인이 볼 수 있는 가장 큰 요소로 연결되어 아름다움을 표현하는 중요한 요소이다. 아름다움을 표현하는 수단으로는 화장품이 있으며 그 기능으로는 미적기능 뿐만 아니라, 환경 공해 물질과 스트레스, 자외선 등의 외적인 요인과 면역세포의 기능저하, 세포 활성의 저하 등의 내적 요인에 기인한 자유 라디칼(Free Radical), 활성산소, 과산화물 등에 의한 단백질, 핵산, 세포막 지질 파괴 등의 피부 노화의 원인을 억제하는 기능이 중요시 되고 있다.

[0003] 피부노화의 원인으로는 피부 세포에 있어서 지질, 단백질 및 DNS 등의 구성은 산화적 손상과 UVA에 의한 유전자 활성화에 활성 산소종이 영향을 주어 피부 진피층의 콜라겐 섬유의 생합성과 분해에 영향을 주어 노화가 진행되며 주름이 생성된다. 한편, 엘라스타제(elastase)는 동물 결합 조직의 불용성 탄성 섬유 단백질인 엘라스틴(elastin)을 분해하는 효소인데, 콜라겐과 엘라스틴 같은 결합조직을 지지하고 구성하는 단백질을 포함한 모든

단백질들을 가수 분해한다. 엘라스타제류의 단백질 분해효소는 다행핵 백혈구와 췌장 이외에도 혈소판, 단핵 백혈구, 거식세포 환경의 배지 그리고 평활근 세포들에서도 확인되었다. 백혈구 엘라스타제는 세린 프로티나아제(serine proteinase)에 속한다. 즉, 효소의 1차 배열에서 195번 위치에 있는 세린(serine)잔기의 수산화기가 기질의 발린(valine)이나 알라닌(alanine)의 a 탄소(a-carbonyl)를 공격하는 핵친화적인(nucleophilic) 그룹으로 작용한다. 반면, 섬유아세포 엘라스타제는 활성자리에 금속 이온을 포함하는 메탈로프로티나아제(metalloproteinase)에 속한다. 다행핵 백혈구의 엘라스타제 활성의 일부는 보체, 림프구의 활성화등과 같이 생체에 유용하게 작용하기도 하지만, 과다한 엘라스타제 활성은 피부에 해롭게 작용한다.

[0004] 이러한 피부노화를 억제하기 위해서 항노화 성분을 함유하는 화장품의 개발이 활발하게 이루어져 왔다. 대한민국공개특허 제2012-0007170호 "닥나무 또는 그 추출물의 발효방법, 그 발효 추출물 및 이를 포함하는 화장료 조성물"에는 '닥나무 또는 그 추출물을 자연발효시키거나, 발효 균주 또는 일정량의 소금을 첨가하여 발효시킨 후 이를 용매로 추출함으로써 인체에 유해한 부패균, 대장균 및 혐기성 세균 등의 잡균의 번식을 막고 악취 등을 없애고 기존의 추출물 보다 미백, 항노화, 항주름, 보습 또는 탄력 개선 효과를 높이는 닥나무 또는 그 추출물의 발효방법, 그 발효 추출물 및 이를 포함하는 화장료 조성물'이 개시되어 있으며, 대한민국 공개특허 제2011-0089580호 "비타민나무 발효 추출물을 함유하는 화장료 조성물"에는 '비타민나무의 가지, 잎, 열매를 효모균(Saccharomyces cerevisiae), 누룩균(Aspergillus oryzae), 고초균(Bacillus subtilis) 또는 유산균(Lactobacillus bulgaricus) 을 접종하여 발효시키거나, 자연발효시켜 숙성하여 얻은 추출물을 사용하여 피부의 치유 개선 효과, 보습, 미백 및 항노화 등에서 우수한 효과를 갖는 안전한 화장료 조성물'이 개시되어 있다.

[0005] 본 발명자들은 주름개선 및 피부 탄력증진에 효능이 있는 천연물을 탐색하던 중 블래더랙과 꿀풀을 효소분해하여 제조된 추출물에서 우수한 주름개선 효과 및 피부탄력 증진효과 있음을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 효소처리 블래더랙(Fucus Vesiculosus) 및 꿀풀(Prunella Vulgaris) 혼합추출물을 함유하여 주름개선 및 피부 탄력증진 효과가 있는 화장료조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 특히, 엘라스타제(elastase)의 활성을 억제하고, 콜라게나아제 발현 저해하며, MMP-1 생성을 억제하고, 콜라겐의 생합성을 촉진함으로써 주름개선 및 피부 탄력을 증진시키는 화장료조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따르면, 효소처리 블래더랙(Fucus Vesiculosus) 및 꿀풀(Prunella Vulgaris) 혼합추출물을 함유하는 주름개선 및 피부 탄력증진 화장료 조성물이 제공된다. 상기 효소로는 바람직하게는 β-글루코시다아제가 사용된다. 상기 혼합추출물은 블래더랙 추출물 및 꿀풀 추출물이 1:10~10:1의 중량비로 혼합되는 것이며 바람직하게는 블래더랙 추출물 및 꿀풀 추출물이 1:1의 중량비로 혼합되는 것이다.

[0008] 상기 효소처리 블래더랙(Fucus Vesiculosus) 및 꿀풀(Prunella Vulgaris) 혼합추출물은 화장료 조성물 총중량에 대해서 0.005~50중량%, 바람직하게는 0.01~20중량% 함유된다.

[0009] 상기 혼합 추출물을 함유하는 화장료조성물은 콜라겐생합성을 촉진하며, 피부 내에서 MMP-1 생성을 억제하고 엘라스타제의 활성을 저해함으로써 주름개선 및 피부 탄력을 증진하는 특징을 가진다.

[0010] 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물을 함유하는 상기 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지 크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징 폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더 및 아이섀도로 구성된 그룹에서 선택된 어느 하나의 제형으로 적용되어질 수 있다.

발명의 효과

[0011] 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물을 함유하는 화장료 조성물은 피부 주름개선 및 탄력증진에 효과가 있으며, 특히, 엘라스타제 저해활성 효과, MMP-1 생성 억제 효과 및 콜라겐 생합성 촉진효과가 우수하다. 이러한 블래더랙 추출물이 함유된 화장료 조성물은 주름개선 효과를 통한 피부노화방지용 화장료 조성물에 유용하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물의 콜라겐 생성촉진, MMP-1 생성 억제 및 엘라스타제 활성저해 효과를 이용한 주름개선 및 피부탄력 증진용 화장료에 관한 것이다.

[0013] 블래더랙(Fucus vesiculosus)은 뜸부기과(Fucaceae)의 갈색 해조로서, 키는 1미터 이상 자라며 3년 정도면 2미터에 이른다. 질긴 잎에는 공기주머니가 있다. 북해, 발트 해, 대서양, 태평양 등지에 분포한다. 요오드와 점액질이 많다. 주요성분으로는 알루미늄, 바륨, 비스무스, 붕소, 칼슘, 크롬, 코발트, 구리, 갈륨, 요오드, 철, 리튬, 마그네슘, 망간, 니켈, 인, 칼륨, 실리콘, 은, 소디움, 스트론튬, 황, 주석, 티타늄, 바나디움, 비타민 A, 비타민 B-컴플렉스, 비타민 C, E, G, S, K, 아연, 지르코늄 등이 함유되어 있다.

[0014] 꿀풀(Prunella vulgaris)은 꿀풀과(Labiatae)의 여러해살이풀(Prunella vulgaris var. lilacina)이다. 줄기는 높이가 30~40센티미터이며, 온몸에 털이 있다. 잎은 마주나고 긴 타원형이며 톱니가 있다. 여름에 짙은 보라색 꽃이 이삭 모양으로 핀다. 밀원 식물이며 한약재로 쓰고 어린잎과 어린순은 식용한다. 들에서 자란다. 한국이 원산지로, 한국, 일본, 대만 등지에 분포한다. 전초에 루틴, 히페로시드, 트리테르펜사포닌(우르솔산과 그 배당체 프루넬린)이 있다. 잎에서 0.56%의 우르솔산, 꽃이삭에서 0.5%의 정유를 얻고 있다. 정유는 캄포르(약 50%), 펜콘으로 되었다. 또한 전초에는 트리테르페노이드, 배당체, 플라보노이드, 프루넬린, 쓴맛물질, 수지, 0.98%의 탄닌질, 알칼로이드, 30mg%의 아스코르빈산, 6mg%의 카로틴, 비타민 K가 있다. 물에 풀리는 무기물질은 약 3.5% 들어 있는데 그 가운데서 68%는 칼륨염이다. 뿌리줄기에는 스타키오즈가 있다.

[0015] 본 발명 주름개선 및 피부 탄력 증진용 화장료조성물은 유효성분으로서 효소처리 블래더랙(Fucus Vesiculosus) 및 꿀풀(Prunella Vulgaris) 혼합추출물을 함유한다. 상기 추출물은 화장료 조성물 총중량에 대해서 0.005~50중량%, 바람직하게는 0.01~20중량% 함유된다. 0.005중량% 미만으로 함유되는 경우에는 활성이 약하며, 50중량%를 초과하는 경우 제형에 있어 불안정하다.

[0016] 본 발명의 일 구체예에 따르면 혼합추출물은 다음과 같이 제조할 수 있다. 먼저, 블래더랙 및 꿀풀을 물로 깨끗이 세척한 후, 그늘에서 건조한다. 건조물을 추출용기에 넣고, 적당량의 추출 용매에 적절한 온도에서 일정 시간 추출한다. 상기 추출물은 여과되고, 진공회전증발기 등을 이용하여 농축될 수 있다.

[0017] 상기 추출 용매로는 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 또는 함수 저급 알콜, 아세톤, 클로로포름, 헥산, 아세토나이트릴 또는 이들의 혼합 용매로부터 선택된 용매를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 에탄올을 첨가하여 열수 추출하는 것을 특징으로 한다. 상기 추출 용매의 양은 생약 건조 중량의 1 ~ 15배, 바람직하게는 7 ~ 8배로 한다.

[0018] 상기 추출 방법은 중탕 추출, 환류냉각 추출, 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 중탕 추출의 추출방법으로 1회 내지 5회 추출될 수 있다. 침적 온도는 40 ~ 70℃ 정도로, 더욱 바람직하게는 60℃로 유지하는 것이 부패, 변색 및 변취의 예방에 가장 효과적이다. 상기 침적 시간은 2 ~ 7시간, 바람직하게는 3시간을 유지하는 것이 좋다. 상기 침적에 의하여 수득한 추출물을 1~3일, 바람직하게는 1일 방치한 후 여과포와 여과지를 이용하여 여과하고 회전감압 증발기로 건조하여 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물에 해당하는 파우더를 얻는다. 상기 블래더랙과 꿀풀의 혼합추출물은 각각의 추출물의 제조 후에 혼합하여 제조하거나, 블래더랙과 꿀풀을 먼저 혼합한 후 추출하여 제조할 수 있다. 이때 블래더랙과 꿀풀은 1:10~10:1의 중량비로 혼합될 수 있으며, 바람직하게는 1:1의 중량비로 혼합된다.

[0019] 본 발명의 화장료 조성물에서 상기 블래더랙 및 꿀풀 혼합 추출물은 추출 후 효소처리에 의해 가수분해된다. 이때 효소로서는 β-글루코시다아제를 포함하는 효소에 의해 가수분해되는 것이 바람직하다. 상기 효소는 블래더랙 및 꿀풀 추출물 내에서 주름개선 및 탄력증진 효능을 가지는 다수의 배당체를 비당체로 전환시켜 주름개선 및 탄력증진 효능을 증가시킨다. β-글루코시다아제는 β-1,4 결합으로 연결된 포도당을 절단하여 섬유소와 배당체의 당사슬을 절단한다.

[0020] 본 발명 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물은 블래더랙 추출물과 꿀풀 추출물의 상승작용에 의하여 매우 우수한 항노화 효과를 나타낸다. 구체적으로는 피부 내에서 엘라스틴의 분해효소인 엘라스타제의 활성을 억제하고, MMP-1 생성을 억제하며, 콜라겐의 생합성을 촉진하여 피부의 주름을 개선하고 탄력을 증진시킨다.

[0021] 본 발명에서 화장료 조성물에는 유효 성분으로서의 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 더욱 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데

이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 맛사지 크림, 에센스, 팩, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 포옴, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0023] [실시예]

[0024] 이하, 하기의 실시예와 시험예들을 통하여 본 발명을 상세하게 설명하지만, 본 발명이 하기의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0025] **제조예 1: 블래더랙 추출물의 제조**

[0026] 북미(캐나다)에서 수입, 구매한 블래더랙을 정제수로 세척한 뒤 건조시키어 100g을 증류수 2㎏에 넣고 냉각 콘덴서가 달린 추출기(제품명 : Cosmos-660, 제조사:경서기계)에서 80℃~100℃로 가열하여 2 시간씩 총 3회 추출하였다.

[0027] 위의 방법으로 블래더랙을 추출한 후, 추출액을 300메쉬 여과지로 여과하고 침전물을 에드벤텍 5번 여과지와 와트만 GFC 150㎜ 여과지로 2번 여과하였다. 그리고 감압 농축기기(제품명: Coolace CCA-1100, 제조사: EYELA)를 이용하여 40℃~50℃의 온도에서 농축한 후, 스프레이드라이어(모델명:B-290, BUCHI사 제품)를 이용하여 인렛(Inlet) 온도 : 180 ℃, 흡입기(Aspirator) 효율 : 100% (35㎥/시간), 펌프(Pump) 효율 : 25% (7.5㎖/분), 노즐 클리너 4(Nozzle Cleaner 4) 및 유량계(Rotameter) : 30㎜ (357리터/시간)의 조건으로 건조시켜 표제의 추출 분말 5g을 얻었다.

[0028] **제조예 2: 꿀풀 추출물의 제조**

[0029] 구매한, 국내 자생 꿀풀을 정제수로 세척한 후 건조시킨 꿀풀 100g을 정제수로 세척한 뒤 건조시켜 100g을 증류수 2㎏에 넣고 냉각 콘덴서가 달린 추출기(제품명 : Cosmos-660, 제조사:경서기계)에서 80℃~100℃로 가열하여 2 시간씩 총 3회 추출하였다.

[0030] 위의 방법으로 꿀풀을 추출한 후, 추출액을 300메쉬 여과지로 여과하고 침전물을 에드벤텍 5번 여과지와 와트만 GFC 150㎜ 여과지로 2번 여과하였다. 그리고 감압 농축기기(제품명: Coolace CCA-1100, 제조사: EYELA)를 이용하여 40℃~50℃의 온도에서 농축한 후, 스프레이드라이어(모델명:B-290, BUCHI사 제품)를 이용하여 인렛(Inlet) 온도 : 180 ℃, 흡입기(Aspirator) 효율 : 100% (35㎥/시간), 펌프(Pump) 효율 : 25% (7.5㎖/분), 노즐 클리너 4(Nozzle Cleaner 4) 및 유량계(Rotameter) : 30㎜ (357리터/시간)의 조건으로 건조시켜 표제의 추출 분말 5g을 얻었다.

[0031] **실시예 1: 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물 제조**

[0032] 제조예 1과 2에서 제조한 블래더랙 추출물과 꿀풀 추출물을 각각 1:1로 혼합한 추출 분말 10g을 아세테이트 버퍼(acetate buffer, pH 4.0) 500ml와, β-글루코시다아제 효소 25ml을 넣어 55℃에서 100rpm으로 4시간 동안 반응 시켰다. 다음으로 90℃로 5분간 가온하여 효소반응을 완료한 후, 반응물을 진공 농축하였다. 농축물은 60℃에서 30시간 건조하였다.

[0033]

[0034] **시험예 1 : 엘라스타제 억제 활성시험**

[0035] 0.1 중량% Elastin-Congo red(Sigma, USA)가 포함된 2.5 중량% agar에 시험시료 및 엘라스테이즈 효소 용액(1,000 units/mL, Sigma, USA)을 혼합하고 상온에서 10분간 반응시킨 용액 10 ul 씩 주입 후 37℃에서 18시간 배양하였다. 배양 종료 후 엘라스테이즈의 활성에 의해 Elastin-Congo red agar 주변에 투명대가 형성되면 그 헤일로(halo)의 직경을 측정하여 엘라스테이즈 활성 저해 효과를 측정할 수 있다.

[0036] 엘라스틴을 포함하는 한천배지에 엘라스타제만을 적가하는 한편, 블래더랙 추출물, 꿀풀 추출물, 이들 추출물의 1:1 중량비의 혼합물 그리고 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합 추출물의 농도가 0.01, 0.05, 0.1 및 0.5%되는 용

액을 시료로 하여 엘라스타제와 함께 적가하여 배지 상에 나타나는 헤일로(halo)의 직경을 측정하여 위의 추출물들의 엘라스타제 저해활성을 측정하였으며, 대조예로서 retinol crystal을 엘라스타제와 함께 적가하여 비교하였다.

[0037] 상기 시험결과 하기의 표 1과 같은 결과를 얻었다.

표 1

[0038]

시료 농도 (%)	Halo diameter(cm)					
	블래더랙 추출물	꿀풀 추출물	블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물	효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물	Elastase	Retinol crystal
0.01	1.7	1.9	1.5	1.3	1.9	0.8
0.05	1.6	1.8	1.4	1.1		
0.10	1.4	1.7	1.2	1.0		
0.50	1.4	1.5	1.2	0.9		

[0039] 헤일로 직경(Halo diameter)이 클수록 엘라스틴의 분해가 많이 된 것인데, 상기 표 1에서 확인되는 바와 같이, 각각의 추출물 처리군에 비해 블래더랙 및 꿀풀 혼합 추출물에서 헤일로 직경(halo diameter)이 더욱 감소하였으며, 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물에서 가장 우수한 엘라스타제 억제 효과가 나타났다.

[0040] **시험예 2: 콜라겐 생합성 촉진효과시험**

[0041] 섬유아세포를 10% FBS를 첨가한 IMDM 배지에 5×10^5의 세포농도로 접종하여 37℃, 5% CO_2배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양하여 상기 제조예와 실시예 1에서 제조한 추출물들을 농도가 50, 100, 500, 1000㎍/㎖가 되도록 디메틸설폭시드에 희석하여 제조한 희석용액을 첨가하여 18시간 동안 동일 조건에서 배양 후 1시간 동안 UV를 조사시켜 세포에 스트레스를 주었다. 이후 Trizol reagent(invitrogen, USA)를 이용하여 섬유아세포를 회수하여 mRNA를 추출하여 일련의 과정을 거쳐 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA로부터 PROCOLLAGEN TYPE I 유전자 부위를 증폭시켜 전기영동을 통해 유전자 발현 양을 확인하였으며, 유전자 증폭은 thermal cycler (GenePro, Hangzhou bioer tech., CHINA)를 사용하여 10x taq polymerase buffer, 10 mM dNTP, 10 pmol primer (F: AGC CAG CAG ATC GAG AAC AT, R: TCT TGT CCT TGG GGT TCT TG), taq polymerase를 혼합하고 증류수를 더하여 50 uL로 조정 후 95도 5분 1cycle/95도 1분/51도 2분/72도 1분 28 cycle 증폭, 72도에서 5분간 반응하는 조건으로 수행하였다. 생성된 procollagen의 발현율은 아래식에 따라 계산하였으며 대조구로는 시료를 처리하지 않고 UV를 조사하지 않은 정상 섬유아세포를 사용하였다.

[0042] procollagen 발현율(%) = B/A × 100(%)

[0043] A: 상기 대조군에서의 procollagen 발현 량

[0044] B: 시료 처리 및 UV조사 섬유아세포의 procollagen 발현 량

[0045] 상기 시험결과 하기의 표 2와 같은 결과를 얻었다.

표 2

[0046]

시료 농도 (㎍/㎖)	procollagen 발현율(%)			
	블래더랙 추출물	꿀풀 추출물	블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물	효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물
0	3.25	2.53	3.11	10.97
50	29.55	15.32	31.33	48.45

100	48.27	21.68	58.65	79.63
500	67.89	52.33	89.77	115.68
1000	97.65	61.57	152.46	184.23

[0047] 상기 표 2의 결과에서 보는 바와 같이, 블래더랙 추출물과 꿀풀 추출물을 단독으로 적용한 경우보다 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물의 시료에서 콜라겐 생합성 촉진 효과가 높았으며, 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물의 경우에는 보다 우수한 효과가 나타남을 확인하였다.

[0048] **시험예 3: MMP-1 생성 억제 효과**

[0049] 인간 정상 피부세포인 섬유아세포(한국 세포주 은행, 대한민국)를 48-웰 마이크로 플레이트(Nunc. 덴마크)에 각 웰 당 1st 10^6세포가 되도록 접종하고, DMEM 배지(Sigma, 미합중국) 및 37℃의 조건에서 24시간 동안 배양한 후 상기 제조예 및 실시예 1에서 제조한 블래더랙 추출물, 꿀풀 추출물, 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물, 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물을 농도가 50, 100, 500, 1000㎍/㎖가 되도록 디메틸설폭시드에 희석하여 제조한 희석용액을 첨가한 후 무혈청 DMEM 배지에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 각 웰의 상층액을 모아 MMP-1 분석 킷트(Amersham, 미합중국)를 이용하여 새로 합성된 MMP-1의 양(㎍/㎖)을 측정하고, 하기식에 따라 MMP-1 생성 억제율을 계산하였으며, 그 결과는 하기 표 3에 나타내었다. 이때, MMP-1 생성 억제율의 양성 대조군으로 TGF-β(10㎎/㎖, Roche, 미합중국)을 사용하였다.

[0050] $$\text{MMP-1 생성억제율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{실험군의 MMP-1의 양}}{\text{대조군의 MMP-1의 양}}\right) \times 100$$

[0051]

표 3

[0052]

시료 농도 (㎍/㎖)	MMP-1 생성 억제율(%)				
	블래더랙 추출물	꿀풀 추출물	블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물	효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물	TGF-β
50	15.5	12.5	21.2	35.6	43.6
100	24.3	22.4	48.7	61.4	67.5
500	38.4	33.7	52.3	73.6	75.6
1000	56.4	48.2	67.4	89.1	94.3

[0053] 상기 표 3의 결과에서 보는 바와 같이, 블래더랙 추출물과 꿀풀 추출물을 단독으로 적용한 시료보다 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물에서 MMP-1 생성 억제율 더 높았으며, 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물에서는 대조군 TGF-β와 유사할 정도로 우수한 MMP-1 생성 억제율 효과를 나타내었다.

[0054] **시험예 4: 세포 독성 여부 확인**

[0055] 섬유아세포를 10% FBS를 첨가한 IMDM 배지에 5×10^5의 세포농도로 접종하여 37℃, 5% CO_2배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 제조예 및 실시예 1에서 제조한 블래더랙 추출물, 꿀풀 추출물, 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물, 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물을 농도가 50, 100, 500, 1000㎍/㎖가 되도록 디메틸설폭시드에 희석하여 제조한 희석용액을 처리하여 24시간 배양한 후에 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium boromide, Sigma, U.S.A.)용액을 각 well에 100㎕씩 첨가한 후(3㎎/㎖) 4시간 동안 더 배양하였다. 이후 상층액을 제거하고, 150㎕의 디메틸설폭시드를 첨가한 후, 30분간 shaking하여 생성된 formazan을 녹여 multimicroplate reader(Molecular device Spectra max190)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 아래의 식에 따라 계산하였으며 그 결과는 하기의 표 4에 나타내었다.

[0056] 세포 생존율(%)=시료첨가군의 흡광도 / 대조군의 흡광도 × 100

표 4

[0057]

시료 농도 (㎍/㎖)	세포 생존율(%)			
	블래더랙 추출물	꿀풀 추출물	블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물	효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물
0	100	100	100	100
50	100	100	100	100
100	100	100	100	100
500	100	100	100	100
1000	95.7	97.6	98.9	98.5

[0058] 상기 표 4의 결과에서 보는 바와 같이, 블래더랙 추출물, 꿀풀 추출물, 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물 그리고 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물을 적용한 시료 모두 500㎍/㎖ 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았으며 사용 농도가 1000㎍/㎖에서는 세포 생존율이 감소하였으나 안전에는 문제가 없는 것을 확인하였다.

[0059] **실시예 2:효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물 함유 에멀젼 베이스 제조**

[0060] 본 발명의 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물(실시예 1)을 함유하는 피부 주름개선 및 탄력 증진 효능이 있는 에멀젼 베이스를 하기 표 5의 조성에 따라 제조하였다.

표 5

[0061]

원료	함량(중량%)
효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물	1.0
밀납	1.0
폴리솔베이트 60	1.5
솔비탄 세스퀴올레이트	0.5
미네랄오일	8.0
소르비탄세스퀴올리에이트	0.4
친유형 모노스테아린산 글리세린	0.5
스테아린산	1.0
글리세릴스테아레이트/ 피이지-400 스테아레이트	1.0
프로필렌글리콜	5.0
카르복시폴리머	0.1
트리에탄올아민	0.16
페녹시에탄올	미량
향료	미량
정제수	잔량

[0062] **실시예 3:효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물 함유 세럼 베이스 제조**

[0063] 상기 실시예 1에서 제조된 효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물(실시예 1)을 함유하는 세럼 베이스를 하기의 표 6의 조성에 따라 제조하였다.

표 6

[0064]

원료	함량(중량%)
효소처리 블래더랙 및 꿀풀 혼합추출물	1.0
잔탄검	1.0
폴리솔베이트 60	1.5

소르비탄세스퀴올리에이트	0.5
카프릴릭/카프릭트리글리세라이드	8.0
소르비탄 스테아레이트	0.4
친유형 모노스테아린산 글리세린	0.5
스테아린산	1.0
글리세릴스테아레이트/ 피이지-400 스테아레이트	1.0
부탈렌글리콜	5.0
카르복시폴리머	0.1
트리에탄올아민	0.16
페녹시에탄올	미량
향료	미량
정제수	잔량

[0065] **시험예 5 : 제형 안정도 확인**

[0066] 상시 실시예 2, 3에서 제조한 제형에 대하여 실온(25℃), 냉장(4℃) 및 항온(50℃)으로 일정하게 유지되는 실내, 냉장고 및 인큐베이터에서 불투명 초자 용기에 담아 12주 동안 보관 및 관찰(변색, 변취 및 분리)하며, 안정성을 확인 하였다. 결과는 표 7에 나타내었다.

표 7

[0067]

온도조건	안정성 확인 (변색, 변취 및 분리)	
	실시예 2	실시예 3
실온(25℃)	0	0
냉장(4℃)	0	0
항온(50℃)	0	0

[0068] <제형 안정 등급>

[0069] 0 : 변화 없음, 1 : 미세한 변화, 2 : 변화, 3: 극심한 변화

[0070] 상기 표 7에서 나타낸 바와 같이, 실시예 2 내지 3 제형 모두, 25℃, 4℃ 및 50℃ 온도 조건하에서 변색, 변취 및 분리 현상이 나타나지 않고 안정함이 확인되었다.