(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월24일
(11) 등록번호 10-1851284
(24) 등록일자 2018년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2017.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 36/535 (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0123347
(22) 출원일자 2016년09월26일
심사청구일자 2016년09월26일
(65) 공개번호 10-2017-0037570
(43) 공개일자 2017년04월04일
(30) 우선권주장
1020150136238 2015년09월25일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
Molecules, Volume 14, p.133-140(2009)*
Food and Chemical Toxicology, Volume 47, p.386-392(2009)*
International Journal Of Molecular Medicine, Volume 20, p.889-895(2007)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
정진호
서울특별시 용산구 이촌로 347, 신동아아파트 13동 206호
배정수
서울특별시 관악구 양산길 27
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태평양

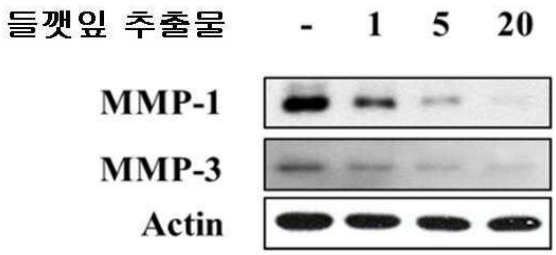
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 이현석

(54) 발명의 명칭 **들깻잎 추출물을 함유하는 피부노화 방지 및 주름 개선용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 피부노화 방지 및 피부주름 개선용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 들깻잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부노화 방지 또는 주름 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 들깻잎 추출물은 UV 노출에 의해 유도된 피부의 섬유아세포의 콜라겐분해효소 활성을 억제함으로써, 피부의 탄력을 향상시키고 주름을 개선하는 효과가 매우 우수하므로, 피부노화 방지, 피부 주름 증가 억제, 탄력성 증가를 위한 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61K 36/535 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
(72) 발명자
한미라
대구광역시 서구 평리로52길 3-15
손동화
경기도 용인시 기흥구 어정로 62-28, 지석마을 그대가 크레던스 106동 1001호
신희순
경기도 안양시 만안구 안양천서로 245, 진흥아파트 121동 105호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI12C1723010014
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 보건복지부
연구사업명 100세사회대응고령친화제품연구개발
연구과제명 피부호르몬 조절을 통한 인지기능증진 및 노화방지 건강기능식품개발
기 여 율 50/100
주관기관 서울대학교산학협력단
연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI14C1277
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 보건복지부
연구사업명 연구중심병원
연구과제명 맞춤형 암-만성염증 극복을 위한 개방형 연구 비즈니스 플랫폼 구축(노화와 만성조직염증의 타깃 치료제 개발 플랫폼 구축)
기 여 율 50/100
주관기관 서울대학교병원
연구기간 2016.02.01 ~ 2017.01.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

들깻잎 알코올 추출물을 유효성분으로 함유하는 광노화 방지 또는 주름 개선용 피부 화장료 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 들깻잎 알코올 추출물은 루테올린-디글루쿠로나이드, 아피게닌-디글루쿠로나이드, 루테올린-글루쿠로나이드 및 로즈마리네이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 포함하는 피부 화장료 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 들깻잎 알코올 추출물은 들깻잎 건조 중량의 2 내지 20배량(w/v)의 알코올을 가하여 추출되는 피부 화장료 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 및 이들의 수용액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 피부 화장료 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 들깻잎 알코올 추출물은 화장료 조성물 총 중량에 대해 0.1 내지 20 중량%의 함량으로 포함되는 피부 화장료 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

청구항 1에 있어서,

유연화장수, 영양화장수, 에센스, 로션, 영양크림, 마사지크림, 팩, 젤, 연고, 패취, 분무제, 리니먼트제, 파스타아제 및 카타플라스마제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형을 갖는 피부 화장료 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

들깻잎 알코올 추출물을 유효성분으로 함유하는 광노화 방지 또는 주름 개선용 건강식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피부노화 방지 또는 주름 개선용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 콜라겐분해효소 활성을 억제하여 피부 주름을 개선하고 탄력을 향상시킬 수 있는 들깻잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부노화 방지 또는 주름 개선용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 피부는 신체조직 가장 넓은 조직으로 외부환경과 자극으로부터 1차적으로 접촉을 하는 기관으로써, 외부 물질과 자극에 대한 최초의 방어기관으로 작용을 할 뿐 아니라 체온 및 체내 수분을 조절하는 신체 내 신진대사에도 매우 중요한 역할을 한다. 또한, 피부는 외부로 보여지는 첫 번째 기관이기 때문에 외적인 아름다움 표현하는 매우 중요한 기관이기도 하다. 이러한 외적인 아름다움은 현대사회에 들어서 건강을 생각하는 것과 유사하게 작용하고 있는 추세이다. 노령인구수가 증가함에 외모의 아름다움이 젊음과 건강을 상징하는 판단의 기준으로 자리잡을 뿐만 아니라 젊은 층의 사람에게 있어서는 이러한 외적인 아름다움이 자신감으로 표출로 드러나게 되고, 본인의 업무능력에 영향을 주는 경쟁력으로 자리잡고 있기 때문이다. 이러한 이유로 학문적, 산업적인 측면에서 피부노화를 억제하기 위한 노력이 활발히 이루어지고 있다.

[0003] 피부노화는 크게 세월이 흘러감에 따라 피할 수 없는 노화 현상인 내인성 노화(intrinsic aging)와 오랫동안 햇빛에 노출된 피부에서 관찰되는 광노화 (photoaging)로 크게 두 가지 형태로 구분되는데, 내인성 노화는 외부 환경과는 무관하게 유전적 요소에 영향을 받아 나이가 들면서 자연스럽게 나타나는 현상으로 인위적인 조절이 어렵지만 광 노화는 외부 환경적인 요인에 의해 유발되는 현상으로 인위적인 조절이 비교적 용이하다. 광노화의 대표적인 인자는 자외선으로, 태양광선에 노출된 피부에서 자외선에 의해 과잉의 활성산소종이 생성되고, 체내의 항산화효소와 비타민 C, E, 글루타치온 및 유비퀴놀 등의 항산화제가 감소함으로 인해 산화와 항산화의 불균형이 야기된다. 이에 따라, 지질 과산화, 단백질 산화, 단백질 분해효소의 활성화, 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합, 히알루론산 사슬절단, 멜라닌 생성반응 촉진, DNA 산화 등에 의해 생체 구성성분들의 손상을 가져오고 결국에는 피부탄력감소, 주름 및 기미, 주근깨 생성 등의 피부노화가 일어나게 된다(비특허문헌 1 및 비특허문헌 2).

[0004] 이러한 피부노화의 주된 외관적인 변화는 주름과 피부탄력의 저하로서, 진피의 구조적인 변화에 기인한 것으로 알려져 있다. 진피는 피부의 최외각인 표피의 아래 존재하는 피부의 구조로 콜라겐과 탄력 섬유가 구성성분으로써 가장 많은 비중을 차지한다. 이러한 콜라겐과 탄력 섬유가 피부탄력을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 조직학적으로 노화된 피부의 진피는 콜라겐 섬유의 굵기가 감소하고, 배열도 엉성해지며, 탄력섬유의 복잡하고 정교한 결합이 끊어져 있다. 이러한 현상은 지속적인 자외선 노출에 따른 콜라겐과 탄력섬유 분해효소의 발현이 그 이유며 노인피부의 주름형성에 가장 주된 원인이다.

[0005] 한편, MMP(matrix metalloproteinase)는 활성 중심부에 아연을 갖는 금속단백분해효소로 생체 내에서 잠재성 전효소(zymogen) 형태로 분비된다. 효소 활성을 갖기 위해서 구조적 변형이 일어나 아미노 말단 부위가 절단, 활성화되며 활성화된 MMP는 2-마크로글로불린(macroglobulin)이나 TIMP(tissue inhibitors of metalloproteinase)와 같은 저해제에 의해 활성이 조절되며, 피부의 각질형성세포, 섬유아세포를 포함하는 대다수의 많은 세포들이 MMP를 분비한다(비특허문헌 3). 단 한번의 자외선 조사에도 피부 내의 MMP 활성이 증가되어 피부 내의 콜라겐을 현저하게 붕괴시키므로, MMP는 진피층의 콜라겐 붕괴에 결정적인 영향을 미치며 광노화에 매우 중요한 역할을 한다.

[0006] 들깨는 꿀풀과에 속하는 1년생 초본으로 한국, 중국, 일본을 포함한 동남아시아에서 많이 섭취되는 식물이다. 이러한 들깨의 씨에서 나오는 정유성분과 잎은 많은 식품의 재료로 사용되고 있으며, 최근 들어 이러한 들깨씨의 정유성분과 들깻잎으로부터 많은 생화학적인 활성물질이 많이 존재한다는 것이 밝혀지고 있다. 특히 들깻잎은 로즈마린산(rosmarinic acid), 루테올린(luteolin), 아피게닌(apigenin), 페룰산(ferulic acid), 카테킨(catechin), 카페산(caffeic acid) 등과 같은 많은 약리 성분을 포함하고 있다고 알려져 있다. 뿐만 아니라 이러한 성분들의 효능에 대한 많은 연구가 이루어지고 있는데, 학술적 자료에 의하면 항암작용, 뇌 대사기능 촉진 작용 등이 대표적인 효능으로 보고되어 있다.

[0007] 그러나, 이러한 노력에도 불구하고 아직까지 피부노화와 관련된 들깻잎의 효능에 대한 실험은 이루어지지 않고 있다. 본 발명은 피부 광노화 방지용 및 식품 또는 화장료 조성물로써 들깻잎의 새로운 기능을 확인하고자 하였고, 이에 대한 효능으로 콜라겐 분해효소의 발현 억제와 콜라겐의 분비 증가를 사실을 확인함으로써 본 발명

을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Oikarinen A., Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., 7(1), 3-4, 1990

(비특허문헌 0002) Yamauchi M., J. Invest. Dermatol., 97, 938-941, 1991

(비특허문헌 0003) Fisher G.J. et al., Photochem. Photobiol., 69, 154, 1999

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 우수한 MMP 유전자 발현 억제 효과를 통한 피부 탄력도 개선 효과 및 피부 주름 개선 효과를 갖는 들깻잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부노화 방지 또는 피부 주름 개선용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 들깻잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부노화 방지 또는 주름 개선용 피부 화장료 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 한 구현예에 따르면, 상기 들깻잎 추출물은 루테올린-디글루쿠로나이드, 아피게닌-디글루쿠로나이드, 루테올린-글루쿠로나이드 및 로즈마리네이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0012] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 들깻잎 추출물은 들깻잎 건조 중량의 2 내지 20배량(w/v)의 추출용매를 가하여 추출되는 것이 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 추출용매는 물, 유기용매, 또는 유기용매의 수용액일 수 있고, 상기 유기용매는 알코올 또는 아세톤일 수 있으며, 상기 알코올은 저급 알코올, 예컨대 메탄올, 에탄올, 프로판올, 또는 부탄올일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 한 구현예에 따르면, 상기 들깻잎 추출물은 화장료 조성물 총 중량에 대해 0.1 내지 20 중량%의 함량으로 포함될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 피부노화 또는 주름은 광노화 또는 자연노화에 의한 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 한 구현예에 따르면, 본 발명의 피부 화장료 조성물은 유연화장수, 영양화장수, 에센스, 로션, 영양크림, 마사지크림, 팩, 젤, 연고, 패취, 분무제, 리니먼트제, 파스타아제, 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 또한, 본 발명은 들깻잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부노화 방지 또는 주름 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 들깻잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부노화 방지 또는 주름 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따르는 피부노화 방지 및 주름 개선용 조성물은 피부 노화 및 주름의 원인인 콜라겐분해효소를 억제함으로써 독성이 적으며 우수한 탄력 증진 및 주름 개선 효과를 가지므로, 피부노화에 따른 피부 주름 및 탄력을 개선하고 피부 노화 방지용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명에 따른 들깻잎 추출물의 제조 과정을 보여주는 순서도이다.

도 2는 본 발명에 따른 들깻잎 추출물의 세포 독성을 보여주는 그래프이다.

도 3은 들깻잎 추출물에 존재하는 주요 화합물들의 질량 스펙트럼 결과를 보여주는 그래프이다.

도 4는 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 MMP-1 및 MMP-3 단백질의 발현에 미치는 영향을 보여주는 웨스턴 블롯 전기영동 사진이다.

도 5는 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 MMP-1 및 MMP-3 단백질의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 6은 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 UV에 의해 증가한 MMP-1 alc MMP-3 단백질의 발현에 미치는 영향을 보여주는 웨스턴 블롯 전기영동 사진이다.

도 7은 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 UV 처리에 의해 증가한 MMP-1 및 MMP-3 단백질의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 8은 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 UV 미처리시에 MMP-1 및 MMP-3 mRNA 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 9는 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 UV 처리시에 MMP-1 및 MMP-3 mRNA 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 10은 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 UV 처리시 들깻잎 추출물의 처리 농도에 따른 MAPK 신호전달 경로의 ERK, JNK 및 p38 단백질의 인산화에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진이다.

도 11은 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 UV 유도성 AP-1의 활성화에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진이다.

도 12는 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 UV 처리시 Fos 및 인산화-Jun의 발현에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진이다.

도 13은 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 UV 처리시 활성산소종의 생성에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 14은 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 프로토콜라겐 단백질의 발현에 미치는 영향을 보여주는 웨스턴 블롯 전기영동 사진이다.

도 15는 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 프로토콜라겐 단백질의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 16은 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 UV에 의해 감소한 프로토콜라겐 단백질의 발현에 미치는 영향을 보여주는 웨스턴 블롯 전기영동 사진이다.

도 17은 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 UV에 의해 감소한 프로토콜라겐 단백질의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 18은 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 세포의 생존률에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 19는 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 UV 처리시 세포의 생존률에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 20은 본 발명에 따른 들깻잎 추출물을 도포한 누드 마우스의 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 피부 염색 사진이다.

도 21은 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 UV 처리시 표피의 두께에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 22는 본 발명에 따른 들깻잎 추출물이 UV 처리시 MMP-13 단백질의 발현에 미치는 영향을 보여주는 전기영동 사진 및 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 들깻잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부노화 방지 또는 주름 개선용 피부 화장료 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 한 구현예에 있어서, 상기 들깻잎 추출물은 루테올린-디글루쿠로나이드, 아피게닌-디글루쿠로나이드, 루테올린-글루쿠로나이드 및 로즈마리네이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 포함할 수

있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 상기 들깻잎 추출물은 들깻잎 건조 중량의 2 내지 20배량(w/v), 바람직하게는 5 내지 15배량(w/v)의 추출용매를 가하여 추출하는 것이 바람직하다. 추출용매로는 물을 사용하는 것이 일반적이지만, 필요에 따라 물 이외에 다른 유기용매를 사용해도 무방하다. 사용될 수 있는 유기용매로는 C_1 내지 C_4의 저급 알코올, 바람직하게는 에탄올, 아세톤, 또는 이의 수용액 등을 들 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에 있어서, 상기 "들깻잎 추출물"은 상기 추출용매를 이용하여 제조된 들깻잎 추출물뿐만 아니라, 상기 들깻잎 추출물에 하나 이상의 "분획화 유기용매"를 추가로 가하여 추출한 분획물도 포괄하는 의미로 사용된다. 상기 분획화 유기용매로는 특별히 한정되는 것은 아니며, 통상의 유기용매가 제한없이 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명의 한 구현예에 있어서, 상기 피부노화 및 주름은 광노화 또는 자연노화에 의한 것일 수 있고, 광노화에 의한 것이 보다 바람직하며, UV 노출에 의한 광노화인 것이 더욱 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 피부노화 및 주름은 MMP 효소의 활성을 기반으로 하는 것이 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 일반적으로, UV 노출 후 피부의 주요 구성 물질인 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP의 발현 및 활성 증가로 인하여 피부노화가 촉진된다. 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서, 들깻잎 추출물이 UV 자극에 의해 증가된 콜라겐 분해 효소인 MMP의 활성을 억제시키며, UV에 의해 분비량이 감소된 콜라겐의 분비를 촉진하여, 광노화를 방지할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0025] 본 발명에서 사용되는 "들깨"란 용어는 꿀풀과에 속하는 1년생 초본의 잎을 의미하는 것으로서, 본 발명에서 사용하는 들깻잎은 국내에서 시판되는 임의의 들깻잎, 바람직하게는 국내산 들깻잎을 제한없이 사용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 들깻잎 추출물은 유효 성분이 파괴되지 않거나 최소화된 조건에서 실온 또는 가온하여 추출할 수 있다. 본 발명의 한 구현예에 따르면, 상기 들깻잎 추출물은 (1) 들깻잎에 물 또는 유기용매, 예컨대 에탄올 용매를 가하여 추출하는 단계, (2) 단계 (1)의 추출물을 여과하는 단계, 및 (3) 단계 (2)의 여과한 추출물을 분말화하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있으나(도 1 참조), 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 또한, 단계 (1)의 들깻잎의 다양한 성분을 추출하기 위하여 물 또는 유기용매, 예컨대 에탄올, 바람직하게는 50% 에탄올을 이용하여 수용성 및 비수용성 성분들을 추출할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 들깻잎 추출물은 들깻잎 건조 중량의 약 2 내지 20배에 달하는 부피의 50% 에탄올 용매를 용출용매로서 사용하고, 추출 온도는 20 내지 100℃, 바람직하게는 22 내지 50℃, 보다 바람직하게는 25℃의 온도에서, 추출 기간은 약 1시간 내지 10일, 바람직하게는 5시간 내지 2일 동안 진탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 임의의 추출 방법을 사용하여 이루어질 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에서는 원료 10 g 내에 포함된 수분 함량을 계산하여 최종 농도 50%에 맞게 에탄올을 첨가하고, 전자레인지에서 90 W에서 5분간 추출하였다. 이때 추출 온도는 약 55-59℃이였으며, 추출 후 필터 페이퍼를 이용하여 여과하고, 농축 및 동결건조하여 추출물을 제조하였다.

[0028] 본 발명의 바람직한 구현예에서, NHDF 세포 배양을 통해 상기 제조된 들깻잎 추출물의 세포 독성 및 UV 자극에 의해 과발현되는 광노화 관련 생체 지표인 MMP 효소의 억제 효과 및 콜라겐의 분비 촉진을 확인하였고, 이를 통해 들깻잎 추출물이 우수한 광노화 방지 효과가 있음을 확인하였다.

[0029] 본 발명의 들깻잎 추출물의 함량은 화장료 조성물 총 중량에 대해 0.0001 내지 99.9 중량%일 수 있고, 바람직하게는 0.01 내지 50중량%일 수 있으며, 보다 바람직하게는 0.1 내지 20 중량%일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 들깻잎 추출물의 함량이 0.0001 중량% 미만일 경우에는 MMP 효소의 억제 및 이를 통한 피부노화 방지 및 피부주름 개선 효과를 얻을 수 없고, 99.9 중량%를 초과할 경우에는 함유량 증가에 따른 뚜렷한 효능 상승효과가 떨어지는 문제점이 있다.

[0030] 본 발명의 조성물이 화장품으로 제제화되는 경우, 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서의 들깻잎 추출물 이외에 본 발명이 목적으로 하는 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 화장료 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되지 않고, 본 기술분야에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 유연화장수, 영양화장수, 에센스, 로션, 영양크림, 마사지크림, 팩, 젤, 연고, 패취, 분무제, 리니먼트제, 파스타아제 또는 카타플라스마제 등의 제형으로 제조될 수 있다. 여기에서, 상기 제형이 연고인 경우에는 들깻잎 추출물 이외에 바셀린 50.0 내지 97.0 중량%, 및 폴리옥시에틸렌 올레일-에테르 포스페이트 0.1 내지 5.0 중량%를 함유하도록 제조되며, 유연화장수는 프로필렌글리콜, 글리세린

등의 다가알코올류 1.0 내지 10.0 중량%, 및 폴리에틸렌올레일에테르, 폴리옥시에틸렌 경화피마자유 등의 계면활성제 0.05 내지 2.0 중량%를 함유하도록 제조된다. 영양화장수 및 영양크림은 스쿠알란, 바셀린, 옥틸도데칸올과 같은 오일류 5.0 내지 20.0 중량%, 및 세탄올, 스테아릴알코올, 밀납 등의 왁스성분 3.0 내지 15.0 중량%를 함유하고, 에센스는 글리세린, 프로필렌글리콜 등 다가알코올류 5.0 내지 30.0 중량%를 함유한다. 마사지크림은 유효성분 이외에 유동파라핀, 바셀린, 이소노닐이소노나노에이트 등의 오일을 30.0 내지 70.0 중량% 함유하여 제조되며, 팩은 폴리비닐알코올을 5.0 내지 20.0 중량% 함유하는 필오프(peel off) 팩 또는 일반유화형 화장료에 카올린, 탈크, 산화아연, 이산화티탄 등의 안료가 5.0 내지 30.0 중량% 함유된 워시오프(wash off) 팩으로 제조될 수 있다.

[0032] 본 발명의 들깻잎 추출물을 함유하는 화장료 조성물을 인간의 피부에 도포하는 화장방법을 수행하면, 자외선에 의해 손상되는 피부기질을 보호, 구체적으로 콜라겐 생성을 증진 및 콜라겐 분해효소의 생합성 억제를 포함하는 피부 광노화 방지 효과를 얻을 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명은 들깻잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부노화 방지 또는 주름 개선용 약학적 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 피부노화 및 주름은 광노화 또는 자연노화에 의한 것일 수 있고, 광노화인 것이 보다 바람직하며, 상기 광노화는 UV 노출로 인한 것이 가장 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 상기 약학적 조성물에 함유되는 상기 들깻잎 추출물의 함량은 약학적 조성물 총 중량에 대해 0.0001 내지 20.0 중량%인 것이 바람직하고, 0.001 내지 1.0 중량%인 것이 더욱 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 들깻잎 추출물의 함량이 0.0001 중량% 미만이면 피부노화 방지 또는 주름 개선 효과를 얻을 수 없고, 20 중량%를 초과하면 필요 이상의 들깻잎 추출물을 사용하여 경제적이지 못한 문제점이 있다.

[0036] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함되고, 비경구 투여가 바람직하고, 보다 바람직하게는 도포에 의한 국부투여(topical application) 방식으로 적용된다. 상기 비경구는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 병소내 주사 또는 주입기술을 포함한다.

[0037] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 들깻잎 추출물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 상기 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0038] 경구투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캅셀제, 환 등이 포함된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀젼, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용 약학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0039] 상기 조성물은 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제형화할 수 있다.

[0040] 본 발명의 약학적 조성물은 개체의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 투여시간, 투여 경로, 배출 속도, 약물 배합 및 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 성인 기준으로 0.001 내지 100 ㎎/㎏ 범위 내이다. 또한 외용제인 경우에는 성인기준으로 1.0 내지 3.0 ㎖의 양으로 1일 1회 내지 5회 도포하여 1개월 이상 계속하는 것이 좋으나, 상기 투

여량은 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

[0042] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0043] 본 발명의 들깻잎 추출물은 인간 섬유아세포에서 UV 노출에 의해 유도되는 콜라겐분해효소인 MMP의 발현을 억제하고, 활성산소종의 생성을 억제하며, 또한 콜라겐의 분비를 촉진하고, 세포독성이 없는 안전한 물질이므로, 피부노화 방지 또는 주름 개선을 위한 약학적 조성물의 유효성분으로서 유용하게 사용할 수 있다.

[0044] 아울러, 본 발명은 들깻잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부노화 방지 또는 주름 개선용 건강식품을 제공한다.

[0045] 상기 피부노화 및 주름은 광노화 또는 자연노화에 의한 것일 수 있고, 광노화인 것이 보다 바람직하며, 상기 광노화는 UV 노출로 인한 것이 가장 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 상기 들깻잎 추출물의 함량은 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 상기 건강식품에 함유되는 들깻잎 추출물의 함량은 건강식품 총 중량에 대해 0.0001 내지 20.0 중량%인 것이 바람직하고, 0.001 내지 1.0 중량%인 것이 더욱 바람직하지만 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 들깻잎 추출물의 함량이 0.0001 중량% 미만이면 피부노화 방지 또는 주름 개선 효과를 얻을 수 없고, 20 중량%를 초과하면 필요 이상의 양을 사용하여 경제적이지 못하며 조성물의 안정성이 낮아지는 문제점이 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 들깻잎 추출물은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 조성물이 건강식품으로 제조되는 경우, 식품 제조시 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상기 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토오스, 수크로오스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기 향미제로는 천연 향미제 타우마틴, 스테비아 추출물 및 합성 향미제를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 건강식품이 드링크제로 제조되는 경우에는 상기 들깻잎 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 천연 추출액 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0048] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 들깻잎 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함하는 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0049] 본 발명의 들깻잎 추출물은 인간 섬유아세포에서 UV 노출에 의해 유도되는 콜라겐분해효소인 MMP의 발현을 억제하고, 활성산소종의 생성을 억제하며, 또한 콜라겐의 분비를 촉진하고, 세포독성이 없는 안전한 물질이므로, 피부노화 방지 또는 주름 개선을 위한 건강식품의 유효성분으로서 유용하게 사용할 수 있다.

[0050] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0051] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0052] 실시예 1. 들깻잎 추출물의 제조

[0053] 들깻잎(perilla leaf)은 대형마트와 전통시장에서 구입하였다. 들깻잎 10 g을 적당한 크기로 절단한 후 50% 에탄올로 전자레인지에서 90 W에서 5분간 추출하였다. 추출물을 와트만 여과지로 여과하였고, 동결건조기를 이용하여 311 ㎎의 건조중량의 추출물을 수득하였다.

[0054] 실험예 1. 들깻잎 에탄올 추출물의 세포독성

[0055] 상기 실시예 1에서 제조한 들깻잎 에탄올 추출물 처리를 통하여 피부 섬유아 세포(NHDF, Human fibroblast)에 대한 세포독성을 확인하였다. 구체적으로, NHDF를 48-웰 플레이트에 2.2×10^4 세포/디쉬로 계대배양한 후, 1일 동안 배양하였다. 1일 후 무혈청 DMEM 배지에 들깻잎 에탄올 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 배양하였다. 48시간 후 세포에 1 ㎎/㎖의 MTT를 처리하고, 3시간 후 세포에서 생성된 포르마잔(formazan)을 DMSO로 용해시킨 후, $OD_{570\ nm}$에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[0056] 그 결과, NHDF 세포에서 들깻잎 에탄올 추출물을 처리한 모든 세포에서 세포의 독성은 나타나지 않았다(도 2).

[0057] 실험예 2. 들깻잎 에탄올 추출물에 존재하는 유효 성분의 확인

[0058] 들깻잎 에탄올 추출물의 유효성분을 확인하기 위하여 UPLC-Q-TOF-MS를 이용하였다. 들깻잎 에탄올 추출물은 포름산을 0.1% 포함하는 아세토니트릴로 0.35 ㎖/분의 속도로 10분간 점차적으로 희석시키고, 희석된 시료를 Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) mass spectrometer (Waters)를 이용하여 전자분무 이온화-양성 모드(electrospray ionization-positive mode)를 사용하여 성분 분석을 하였다. 캐필러리(capillary)와 샘플링 콘(sampling cone)의 전압은 3 kV 와 30 V로, 소스(source)와 디솔베이션(desolvation)의 온도는 110℃와 350℃로, 디솔베이션의 유속은 20 ㎕/분으로 각각 설정하였다. TOF MS 데이터는 스캔 시간 0.1초에서 *m/z* 100-1,200 범위 내에서 획득하였으며, 대사체의 MS/MS 스펙트럼은 충돌 에너지 램프(collision energy ramp)(20-45 eV)로 *m/z* 70-1,200 범위 내에서 획득하였다.

[0059] 그 결과, 들깻잎 에탄올 추출물에는 루테올린-디글루쿠로나이드, 아피게닌-디글루쿠로나이드, 루테올린-글루쿠로나이드, 로즈마리네이트의 4가지 주요 화합물의 질량 스펙트럼이 확인되었다(도 3).

[0060] 실험예 3. NHDF 세포 배양에서의 들깻잎 에탄올 추출물의 MMP-1 및 MMP-3 억제 효과

[0061] 들깻잎 에탄올 추출물이 MMP-1 효소 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, NHDF를 35 ㎜ 디쉬에 5×10^5 세포/디쉬로 계대배양하였다. 1일 후 배지를 제거한 후, 무혈청 DMEM 배지에 에탄올 추출물을 농도별로 48시간 동안 처리하여 배양하였다. 이후, 배지를 수집하여 웨스턴 블롯을 이용하여 배지내 분비된 MMP-1 및 MMP-3의 단백질의 양을 측정하였다.

[0062] 그 결과, 들깻잎 에탄올 추출물은 MMP-1 및 MMP-3 단백질에 대하여 농도 의존적으로 억제 효과를 나타내었다(도 4 및 도 5). 상기 결과로부터, 본 발명의 들깻잎 에탄올 추출물은 콜라겐 분해 효소인 MMP-1 및 MMP-3을 억제함으로써, 광노화를 방지하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0063] 실험예 4. UV 자극에 의한 NHDF 세포 배양에서의 들깻잎 에탄올 추출물의 MMP-1 및 MMP-3 억제 효과

[0064] 들깻잎 에탄올 추출물의 MMP-1 효소 활성에 대한 효과를 확인하기 위하여, NHDF를 35 ㎜ 디쉬에 5×10^5 세포/디쉬로 계대배양하였다. 1일 후 배지를 제거 후 1 ㎖의 PBS를 넣고 100 mJ/㎠의 UV를 조사한 다음, 무혈청 DMEM 배지에 에탄올 추출물을 농도별로 48시간 동안 처리하여 배양하였다. 이후, 배지를 수집하여 웨스턴 블롯을 이용하여 배지내 분비된 MMP-1 및 MMP-3의 단백질의 양을 측정하였다. 상대적인 단백질 발현은 ImageJ 분석 소프트웨어를 이용해 분석하였고, MMP-1 및 MMP-3의 강도는 대응하는 액틴의 강도에 따라 표준화하였다.

[0065] 그 결과, 들깻잎 에탄올 추출물은 UV에 의해 증가한 MMP-1 및 MMP-3 단백질에 대하여 농도 의존적으로 억제 효과를 나타내었다(도 6 및 도 7). 상기 결과로부터, 본 발명의 들깻잎 에탄올 추출물은 UV 자극에서도 콜라겐 분해 효소인 MMP-1 및 MMP-3을 억제함으로써, 광노화를 방지하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0066] 실험예 5. NHDF 세포 배양에서의 들깻잎 에탄올 추출물의 MMP-1 및 MMP-3 mRNA 억제 효과

[0067] 들깻잎 에탄올 추출물의 MMP-1 및 MMP-3 mRNA 억제 활성에 대한 효과를 확인하기 위하여, NHDF를 35 ㎜ 디쉬에 5×10^5 세포/디쉬로 계대배양하였다. 1일 후 배지를 제거 후 1 ㎖의 PBS를 넣고 100 mJ/㎠의 UV를 조사하거나 조사하지 않은 다음, 무혈청 DMEM 배지에 에탄올 추출물을 농도별로 48시간 동안 처리하여 배양하였다. 이후, 세포를 수집하여 정량적 RT-PCT을 이용하여 세포내 발현된 MMP-1 및 MMP-3의 mRNA의 양을 측정하였다.

[0068] 그 결과, UV를 처리한 경우와 처리하지 않은 경우 모두에 있어서 들깻잎 에탄올 추출물의 처리에 의해 MMP-1 및 MMP-3 mRNA의 발현이 농도 의존적으로 감소하였음을 확인하였다(도 8 및 도 9).

[0069] 실험예 6. NHDF 세포 배양에서 들깻잎 에탄올 추출물의 농도에 따른 UV-유도성 MARK 신호전달 경로의 억제 효과

[0070] 들깻잎 에탄올 추출물이 UV-유도성 MARK 신호전달 경로의 효소인 ERK, JUN 및 p-38의 인산화 여부에 미치는 영향을 확인하기 위하여, NHDF를 35 ㎜ 디쉬에 5×10^5 세포/디쉬로 계대배양하였다. 1일 후 배지를 제거 후 1 ㎖의 PBS를 넣고 100 mJ/㎠의 UV를 조사한 다음, 무혈청 DMEM 배지에 에탄올 추출물을 농도별로 15분 동안 처리하여 배양하였다. 이후, 세포를 수집하여 인산화-특이적 ERK, JNK 및 p-38 항체를 이용한 웨스턴 블롯에 의해 시간 경과에 따른 상기 효소들의 인산화 정도를 측정하였다.

[0071] 그 결과, 들깻잎 에탄올 추출물의 처리 농도에 따라 상기 효소들의 인산화 정도가 감소함을 확인하였다(도 10).

[0072] 실험예 7. NHDF 세포 배양에서 들깻잎 에탄올 추출물의 UV-유도성 AP-1 발현의 억제 효과

[0073] 들깻잎 에탄올 추출물이 UV-유도성 AP-1 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, NHDF를 35 ㎜ 디쉬에 5×10^5 세포/디쉬로 계대배양하였다. 1일 후 배지를 제거 후 1 ㎖의 PBS를 넣고 100 mJ/㎠의 UV를 조사한 다음, 무혈청 DMEM 배지에 에탄올 추출물을 농도별로 처리하여 배양하였다. 이후, 세포를 수집하여 핵 분획을 분리하였으며, 바이오틴-표지된 AP-1 올리고뉴클레오티드를 사용하여 AP-1 복합체와 DNA 결합이 증가됨을 확인하고, AP-1 복합체의 구성단백질인 c-Fos 및 c-Jun 을 단백질의 특이적 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 이용하여 핵 내에 존재하는 상기 효소들의 양을 측정하였다.

[0074] 그 결과, 들깻잎 에탄올 추출물 처리 농도가 증가함에 따라 핵 내에서 UV-에 의해 유도되는 AP-1의 활성과 c-Fos 및 인산화-특이적 c-Jun 항체의 발현량이 감소함을 확인하였다(도 11 및 도 12).

[0075] 실험예 8. NHDF 세포 배양에서 들깻잎 에탄올 추출물의 활성산소종 생성 억제 효과

[0076] 들깻잎 에탄올 추출물이 UV에 의해 유도되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, NHDF를 35 ㎜ 디쉬에 5×10^5 세포/디쉬로 계대배양하였다. 1일 후 배지를 제거 후 양성대조군인 N-아세틸시스테인(NAC)(10 ng/㎖)과 무혈청 DMEM 배지에 에탄올 추출물을 농도별로 처리하여 4시간 동안 배양하였고, 이후 100 mJ/㎠의 UV를 조사하였다. 세포를 HBSS로 세척하였고, 20 μM의 DCF-DA로 처리하였다. 30분 동안 인큐베이션한 후, 형광 판독기를 이용해 세포를 분석하였다.

[0077] 그 결과, 들깻잎 에탄올 추출물 처리 농도가 증가함에 따라 세포에서의 활성산소종의 생성이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(도 13).

[0078] 실험예 9. NHDF 세포 배양에서의 들깻잎 에탄올 추출물의 콜라겐 분비 촉진 효과

[0079] 들깻잎 에탄올 추출물의 콜라겐 생성에 대한 효과를 확인하기 위하여, NHDF를 35 ㎜ 디쉬에 5×10^5 세포/디쉬로 계대배양하였다. 1일 후 배지를 제거한 후, 무혈청 DMEM 배지에 들깻잎 에탄올 추출물을 농도별로 48시간 동안 처리하여 배양하였다. 이후, 배지를 수집하여 웨스턴 블롯을 이용하여 배지 내 분비된 프로콜라겐 타입 1 단백질의 양을 측정하였다.

[0080] 그 결과, 들깻잎 에탄올 추출물은 프로콜라겐 타입 1 단백질에 대하여 농도 의존적인 증가 효과를 나타내었다(도 14 및 도 15). 상기 결과로부터, 들깻잎 화합물이 콜라겐 생성에 관여하는 프로콜라겐 타입 1의 단백질의 분비를 촉진시킴으로써, 광노화를 방지하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0081] 실험예 10. UV 자극에 의한 NHDF 세포 배양에서의 들깻잎 에탄올 추출물의 콜라겐 분비 촉진 효과

[0082] 들깻잎 에탄올 추출물의 콜라겐 생성에 대한 효과를 확인하기 위하여, NHDF를 35 ㎜ 디쉬에 5×10^5 세포/디쉬로 계대배양하였다. 1일 후 배지를 제거한 후, 1 ㎖의 PBS를 넣고 UV를 조사한 다음, 무혈청 DMEM 배지에 들깻잎 에탄올 추출물을 농도별로 48시간 동안 처리하여 배양하였다. 이후, 배지를 수집하여 웨스턴 블롯을 이용하여 배지 내 분비된 프로콜라겐 타입 1 단백질의 양을 측정하였다. 프로콜라겐 타입 1의 상대적인 단백질 발현은 ImageJ 분석 소프트웨어를 이용해 분석하였고, 프로콜라겐 타입 1의 강도는 대응하는 액틴의 강도에 따라 표준화하였다.

[0083] 그 결과, 들깻잎 에탄올 추출물은 UV에 의해 감소한 프로콜라겐 타입 1 단백질에 대하여 농도 의존적인 증가 효과를 나타내었다(도 16 및 도 17). 상기 결과로부터, 들깻잎 화합물이 UV 자극에서도 콜라겐 생성에 관여하는 프로콜라겐 타입 1의 단백질의 분비를 촉진시킴으로써, 광노화를 방지하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0084] 실험예 11. UV 자극에 의한 NHDF 세포 배양에서 들깻잎 에탄올 추출물이 세포의 생존률에 미치는 영향

[0085] 들깻잎 에탄올 추출물이 세포의 생존률에 미치는 영향을 확인하기 위하여, NHDF를 35 ㎜ 디쉬에 5×10^5 세포/디쉬로 계대배양하였다. 1일 후 배지를 제거 후 1 ㎖의 PBS를 넣고 100 mJ/㎠의 UV를 조사하거나 조사하지 않은 다음, 무혈청 DMEM 배지에 에탄올 추출물을 농도별로 48시간 동안 처리하여 배양하였다. 이후, MTT 분석에 의해 세포의 생존력을 분석하였다.

[0086] 그 결과, 들깻잎 에탄올 추출물은 세포의 생존률 자체에는 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도 18 및 도 19).

[0087] 실험예 12. 들깻잎 에탄올 추출물이 UV-유도성 표피의 비후 및 MMP-13의 발현에 미치는 영향

[0088] 들깻잎 에탄올 추출물이 누드 마우스에서 UV-유도성 표피의 비후(dermal thickening) 및 MMP-13의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 0.5%의 들깻잎 에탄올 추출물을 UV가 조사되거나 조사되지 않은 누드 마우스의 등 쪽 피부에 도포하였다. 48시간 후, 피부 조직을 취하여 H&E 염색을 하였고, ImageJ 분석 소프트웨어를 이용해 표피의 두께를 분석하였다. 대표적인 H&E 염색 결과는 도 20에 나타나 있다. 또한, 피부 샘플을 용해시킨 후 항-MMP-13 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였고, MMP-13 단백질의 상대적인 발현을 분석하였다.

[0089] 그 결과, 들깻잎 에탄올 추출물은 UV에 의한 표피 두께의 증가를 억제하였고(도 21), 표피에서의 MMP-13의 발현을 감소시켰다(도 22). 상기 결과로부터, 본 발명의 들깻잎 에탄올 추출물은 UV 자극에 의한 피부주름 발생과 광노화를 방지하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0090] 제조예 1. 화장료의 제조

[0091] <1-1> 유연 화장수의 제조

[0092] 본 발명의 들깻잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 유연 화장수는 하기 표 1와 같이 제조하였다.

표 1

[0093]

원료	함량(중량부)
들깻잎 추출물	10.00
1,3-부틸렌글리콜	1.00
디소듐이디티에이	0.05
알란토인	0.10
디포타슘글리시리제이트	0.05
시트릭애씨드	0.01
소듐시트레이트	0.02
글리세레스-26	1.00
알부틴	2.00
하이드로제네이티드캐스터오일	1.00
에탄올	30.00
보존제	미량
착색제	미량
착향제	미량
정제수	잔량

[0094] <1-2> 영양 크림의 제조

[0095] 본 발명의 들깻잎 추출물을 유효성분으로 함유한 영양크림은 하기 표 2의 조성과 같이 제조하였다.

표 2

[0096]

원료	함량(중량부)
들깻잎 추출물	10.0
1,3-부틸렌 글리콜	7.0
글리세린	1.0
D-판테놀	0.1
식물 추출물	3.2
마그네슘알루미늄실리케이트	0.3
PEG-40 스테아레이트	1.2
스테아릭애씨드	2.0
폴리소르베이트 60	1.5
친유형글리세릴스테아레이트	2.0
소르비탄세스퀴올리에이트	1.5
세테아릴알코올	3.0
미네랄오일	4.0
스쿠알란	3.8
카르릴릭/카프릭트리글리세라이드	2.8

식물성 오일	1.8
디메치콘	0.4
디포타슘글리시리제이트	미량
알란토인	미량
소듐 히아루로네이트	미량
토코페릴아세테이트	적량
트리에탄올아민	적량
보존제	적량
착향제	적량
정제수	잔량

[0097] <1-3> 로션의 제조

표 3

[0098]

원료	함량(중량부)
세토스테아릴알코올	1.6
스테아린산	1.4
친유형모노스테아린산글리세린	1.8
피이지-100 스테아레이트	2.6
세스퀴올레인산소르비탈	0.6
스쿠알렌	4.8
마카다이아오일	2
호호바오일	2
초산토코페롤	0.4
메칠폴리실록산	0.2
에칠파라벤	0.1
초산토코페롤	0.4
메칠폴리실록산	0.2
에칠파라벤	0.1
프로필파라벤	0.1
1,3-부칠렌글리콜	4
메칠파라벤	0.1
산탄검	0.1
글리세린	4
d-판테놀	0.15
알란토인	0.1
들깻잎 추출물	3.5
카르보머(2% aq. Sol)	4
트리에탄올아민	0.15
에탄올	3
pt 41891	0.1
p-H20	48.3

[0099] 제조예 2. 약학적 조성물의 제조

[0100] <2-1> 피부 외용 연고의 제조

[0101] 본 발명의 들깻잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 외용 연고를 하기 표 4의 조성과 같이 제조하였다.

표 4

[0102]

원료	함량(중량부)
정제수	100
글리세린	8.0
부틸렌글리콜	4.0
유동파라핀	15.0
베타글루칸	7.0

카보머	0.1
들깻잎 추출물	20
카프릴릭 카프릭 트리글리세라이드	3.0
스쿠알란	1.0
세테아릴 글루코상이드	1.5
소르비탄 스테아레이트	0.4
세테아릴 알코올	1.0
방부제	적량
향	적량
색소	적량
밀납	4.0

[0103] <2-2> 피부 외용 패취제의 제조

[0104] 본 발명의 들깻잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 외용 패취를 하기 표 9의 조성과 같이 제조하였다.

표 5

[0105]

원료	함량(중량부)
들깻잎 추출물	10.0
헥실렌글리콜	20.0
디에틸아민	0.7
폴리아크릴산	1.0
아황산나트륨	0.1
폴리옥시에틸렌라우릴에테르(E.O=9)	1.0
폴리히드록시에틸렌세틸스테아릴에테르	1.0
점성의 파라핀 오일	2.5
카프릴산에스테르/카프르산에스테르(cetiol LC)	2.5
폴리에틸렌글리콜 400	3.0
탈이온수	70

[0106] <2-3> 산제의 제조

[0107] 들깻잎 추출물 ····· 2 g

[0108] 유당 ····· 1 g

[0109] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0110] <2-4> 정제의 제조

[0111] 들깻잎 추출물 ····· 100 mg

[0112] 옥수수전분 ····· 100 mg

[0113] 유 당 ····· 100 mg

[0114] 스테아린산 마그네슘 ····· 2 mg

[0115] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0116] <2-5> 캡슐제의 제조

[0117] 들깻잎 추출물 ····· 100 mg

[0118] 옥수수전분 ····· 100 mg

[0119] 유 당 ····· 100 mg

[0120] 스테아린산 마그네슘 ····· 2 mg

[0121] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0122] <2-6> 환제의 제조

[0123] 들깻잎 추출물 · 1 g

[0124] 유당 · 1.5 g

[0125] 글리세린 · 1 g

[0126] 자일리톨 · 0.5 g

[0127] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0128] <2-7> 과립의 제조

[0129] 들깻잎 추출물 · 150 ㎎

[0130] 대두추출물 · 50 ㎎

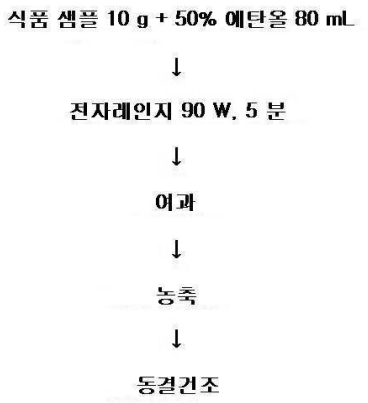
[0131] 포도당 · 200 ㎎

[0132] 전분 · 600 ㎎

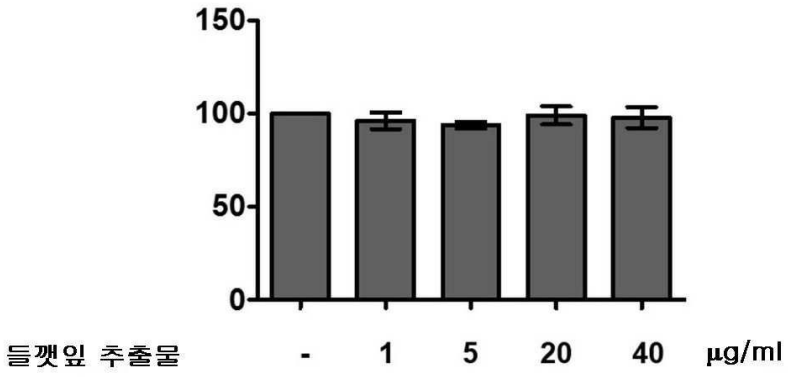
[0133] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 ㎎을 첨가하여 섭씨 60 ℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

도면

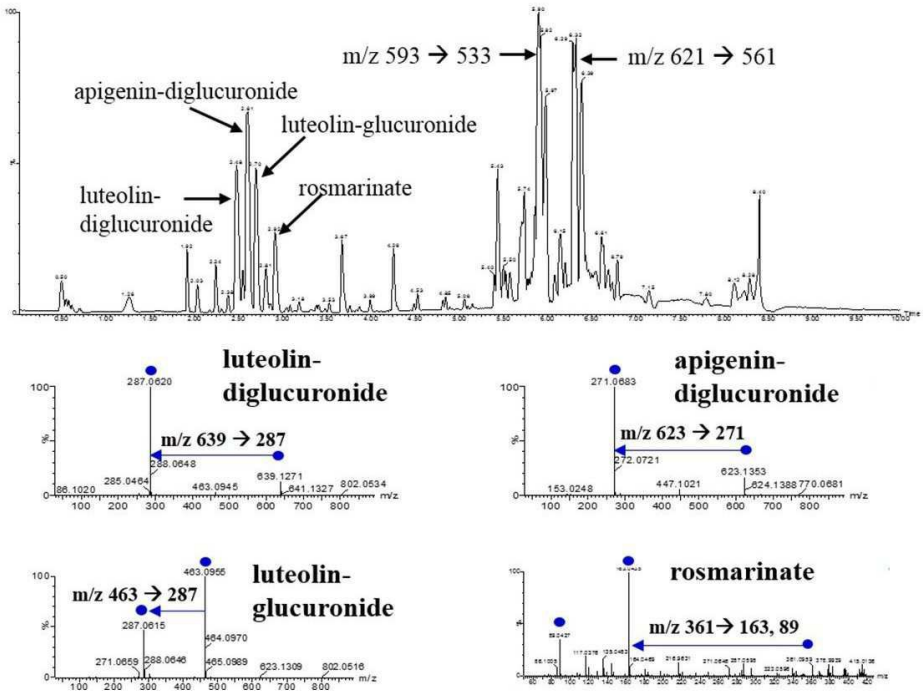
도면1



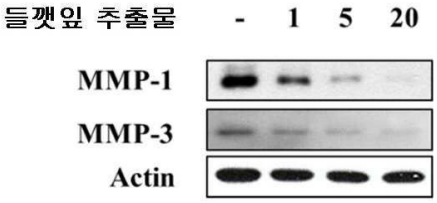
도면2



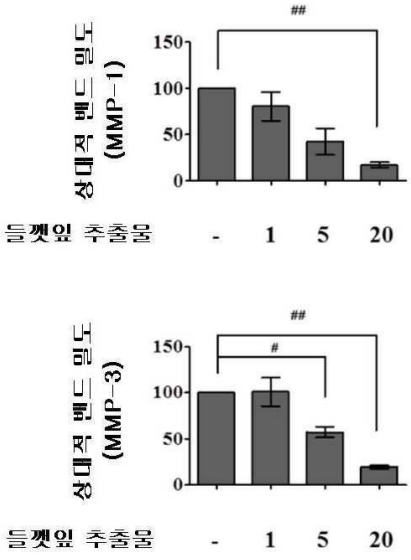
도면3


m/z 593 → 533
m/z 621 → 561
apigenin-diglucuronide
luteolin-glucuronide
luteolin-diglucuronide
rosmarinate
luteolin-diglucuronide
m/z 639 → 287
apigenin-diglucuronide
m/z 623 → 271
m/z 463 → 287
luteolin-glucuronide
rosmarinate
m/z 361→ 163, 89

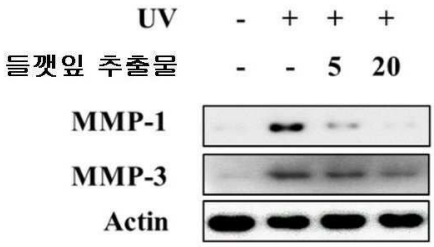
도면4


들깻잎 추출물 - 1 5 20
MMP-1
MMP-3
Actin

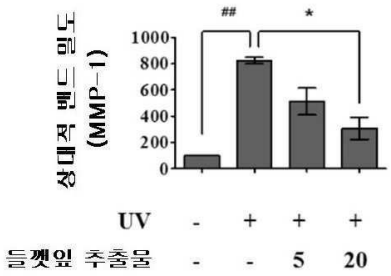
도면5

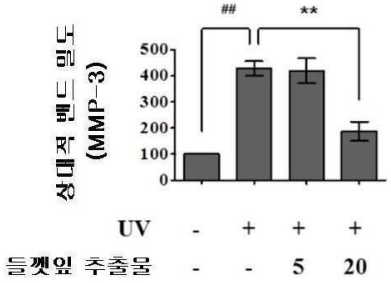

상대적 밴드 밀도 (MMP-1)
##
150
100
50
0
들깻잎 추출물 - 1 5 20
상대적 밴드 밀도 (MMP-3)
##
#
150
100
50
0
들깻잎 추출물 - 1 5 20

도면6

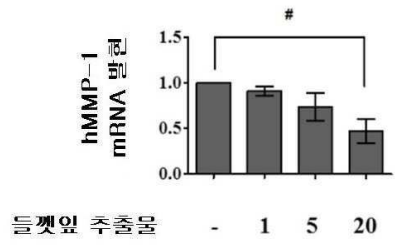

UV - + + +
들깻잎 추출물 - - 5 20
MMP-1
MMP-3
Actin

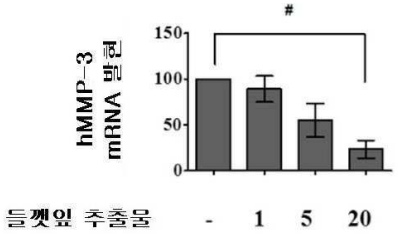
도면7


상대적 밴드 밀도 (MMP-1)
##
*
1000
800
600
400
200
0
UV - + + +
들깻잎 추출물 - - 5 20

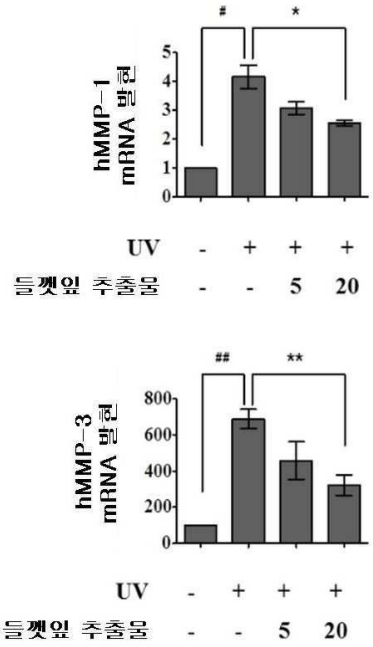

상대적 밴드 밀도 (MMP-3)
##
**
500
400
300
200
100
0
UV - + + +
들깻잎 추출물 - - 5 20

도면8

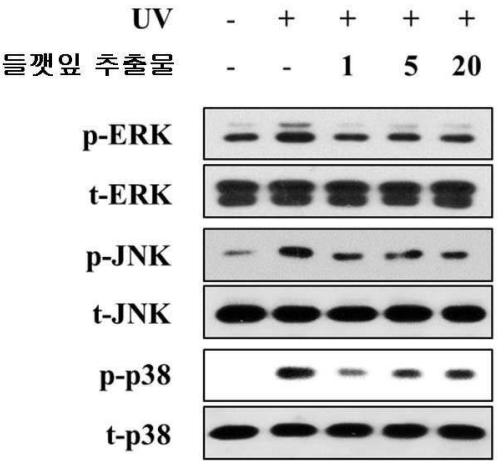

hMMP-1 mRNA 발현
#
1.5
1.0
0.5
0.0
들깻잎 추출물 - 1 5 20


hMMP-3 mRNA 발현
#
150
100
50
0
들깻잎 추출물 - 1 5 20

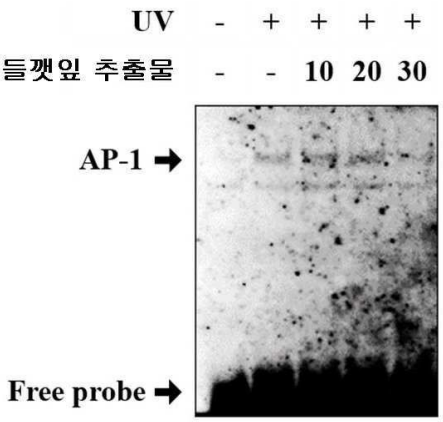
도면9



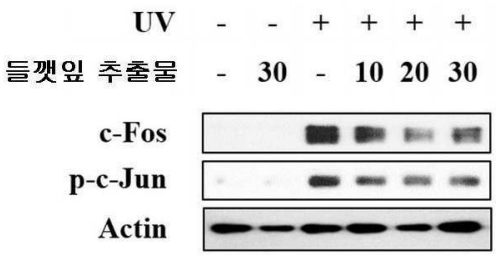
도면10



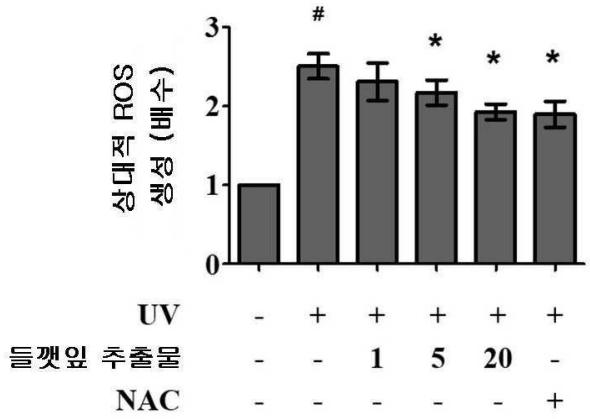
도면11



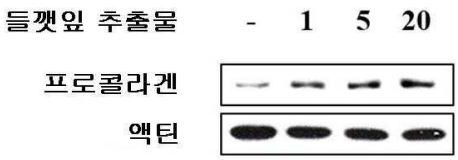
도면12



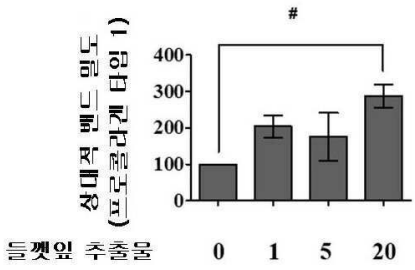
도면13



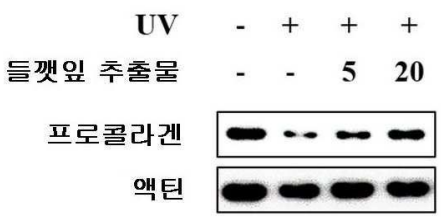
도면14



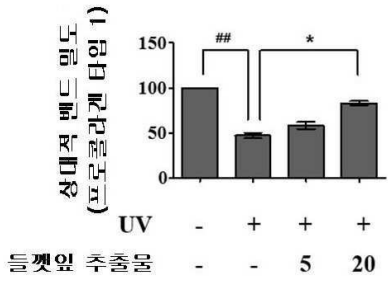
도면15



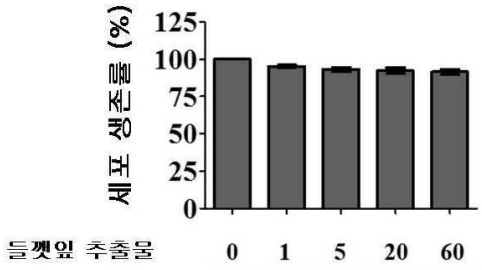
도면16



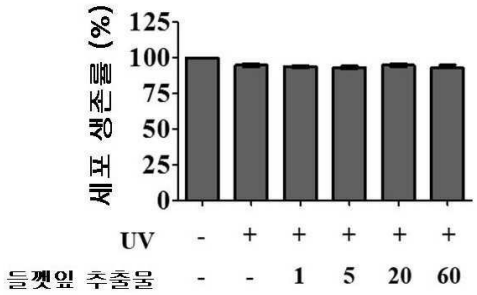
도면17



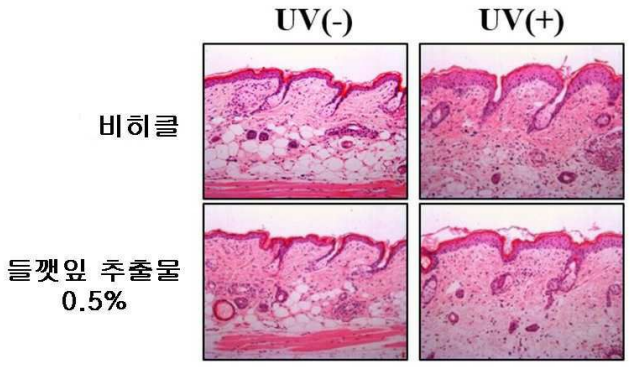
도면18



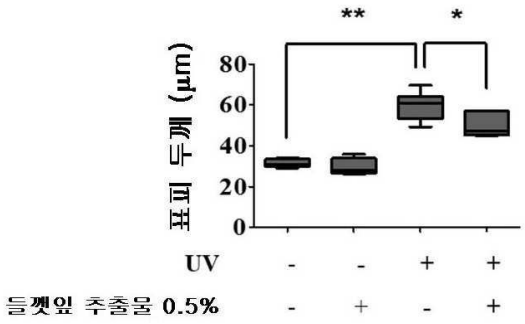
도면19



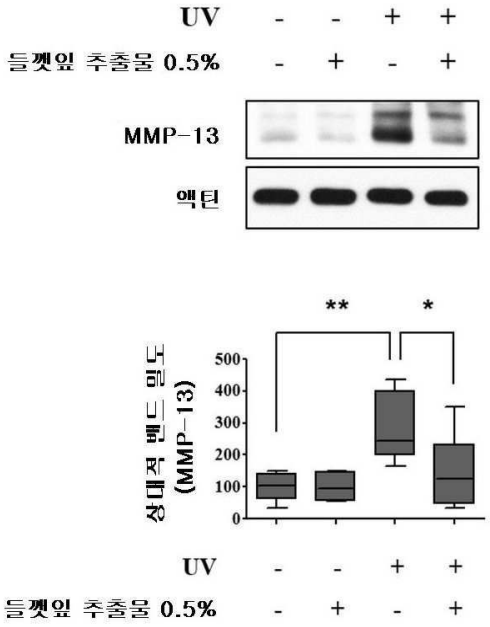
도면20



도면21


**
*
표피 두께 (μm)
80
60
40
20
0
UV - - + +
들깻잎 추출물 0.5% - + - +

도면22


UV - - + +
들깻잎 추출물 0.5% - + - +
MMP-13
액틴
**
*
상대적 밴드 밀도 (MMP-13)
500
400
300
200
100
0
UV - - + +
들깻잎 추출물 0.5% - + - +