(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0004330
(43) 공개일자 2014년01월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/34 (2006.01) *A61K 31/341* (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01) *A61K 9/06* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0071636
(22) 출원일자 2012년07월02일
심사청구일자 2012년07월02일

(71) 출원인
재단법인 한국한방산업진흥원
경상북도 경산시 화랑로 94 (갑제동)
주식회사 코리아나화장품
충청남도 천안시 서북구 성거읍 삼곡2길 6
(72) 발명자
손준호
대구광역시 수성구 달구벌대로641길 31 (매호동, 매호 화성파크드림) 101동 1108호
박태순
대구광역시 중구 중앙대로67길 10 (남산동, 반월당삼정그린코아아파트) 101동 3103호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신동인

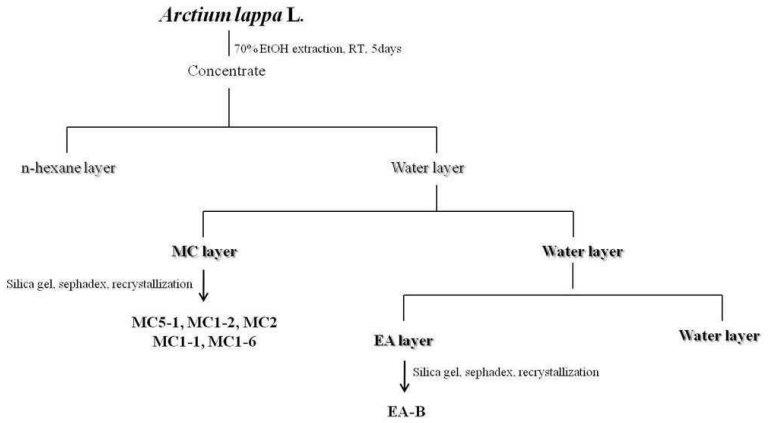
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **우방자 추출물로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 함유하는 주름살 예방 및 개선용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 우방자 추출물로부터 분리된 화합물을 함유하는 조성물로서, 본 발명의 조성물은 광범위한 주름개선에 대한 효과 측정 실험을 통하여 상기 시료들이 강력한 피부노화 및 주름살에 대한 억제활성을 나타냄을 확인하여 상기 조성물은 주름살의 예방 및 치료용 피부외용 약학조성물 또는 화장료 조성물로 유용하다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김동희

대구광역시 달서구 야외음악당로7길 68 (성당동)

황주영

경상북도 경산시 압량면 압독3로2길 4-9, 드림캐슬 203호

심보람

경상북도 안동시 길주길 101-12 (용상동, 현대2차 아파트) 208동 1403호

전동하

경상북도 경산시 삼성현로91길 45 (사동) 108동 1002호

이정노

충청북도 청주시 상당구 율봉로201번길 51-1, 예다움빌 403호 (율량동)

이강태

충청남도 천안시 서북구 성거읍 봉주로 107-6 (성거벽산아파트) 102-1201

이건국

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 108동 1102호(방이동, 올림픽선수기자촌아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	F100002
부처명	보건복지부
연구사업명	한의약산업육성 제품화지원연구개발사업
연구과제명	우방자추출물의 활성물질 추출공정개발 및 이를 적용한 주름개선 한방화장품개발
기 여 율	1/1
주관기관	(재)한국한방산업진흥원
연구기간	2010.07.02 ~ 2012.07.01

특허청구의 범위

청구항 1

우방자 추출물로부터 분리된 디아르크티게닌(Diarctigenin) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 주름살의 치료 및 예방을 위한 피부외용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 제형인 피부외용 약학조성물.

청구항 3

우방자 추출물로부터 분리된 디아르크티게닌(Diarctigenin) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 주름살의 예방 및 개선을 위한 화장료 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 맛사지크림, 에센스, 팩, 샴푸, 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 또는 미용액 형태인 화장료 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 우방자 추출물로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 함유하는 주름살 예방 및 개선용 조성물을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] [문헌 1] Voegeli, R. 1996. Elastase and typtase determination on human skin surface. Cosmetic &Toiletries. 111, 51-58.

[0003] [문헌 2] Aroca, P., et al. 1993. Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. J. Biol Chem 268, 25650-25655.

[0004] [문헌 3] Chin, J. E., et al. 2005. Effects of Houttuynia cordata extracts on tyrosinse gene expression. J. Korean Soc Food Sci Nutr 34, 1284-1288.

[0005] [문헌 4] Oikarinen A, Karvonen J, Uitto J, Hannuksela M., Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation. *Photodermatol.* 2(1), pp.15-26, Review, 1985.

[0006] [문헌 5] Hirobe T., Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res.* 18(1), pp.2-12. Review, 2005.

[0007] [문헌 6] McKay IA, Leigh IM., Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. *Br J Dermatol.* 124(6), pp.513-8, Review, 1991.

[0008] [문헌 7] Kim HH, Cho S, Lee S, Kim KH, Cho KH, Eun HC, Chung JH., Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin in vivo. *J Lipid Res.* 47(5),pp.921-30, 2006.

[0009] [문헌 8] Medina A, Ghaffari A, Kilani RT, Ghahary A., The role of stratifin in fibroblast-keratinocyte interaction. *Mol Cell Biochem.* 305(1-2), pp.255-64, Review, 2007.

[0010] [문헌 9] Wang XJ, Han G, Owens P, Siddiqui Y, Li AG., Role of TGF beta-mediated inflammation in

cutaneous wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 11(1), pp.112-7, Review, 2006.

[0011] [문헌 10] Traidi-Hoffmann C, MI, Ring J, Behrendt H., Impact of desloratadine and loratadine on the crosstalk between human keratinocytes and leukocytes: Implications for anti-inflammatory activity of antihistamines. *Int Arch Allergy Immunol.* 140(4), pp.315-20, 2006.

[0012] [문헌 11] 정보섭외, 도해향약대사전, 영림사,pp.1010-1011, 1998년

[0013] [문헌 12] Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;26:1199-1120.

[0014] [문헌 13] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol. Med. 1999;26: 1231-1237

[0015] [문헌 14] Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* 1969;244(14):3855-3863.

[0016] [문헌 15] Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica.* 1986;3981:517-519.

[0017] [문헌 16] Cannell RJP, Kellan SJ, Owsianks AM, Walker JM. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.* 1988;54(1):10-14.

[0018] [문헌 17] WE, Heindrich HG. Zur quantitativen bestimmung der collagenase. *Hoppe-Seyler's. Physiol. Chem.* 1963;333:149-151.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 피부의 노화는 시간의 흐름에 따라 생리적 노화 과정과 외재적 요인에 의한 노화과정으로 나누어 진다(Claude, S., K. Manabu, M. Laura, and P. Lester. 1999. Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NKκB activation in a human keratinocyte cell line, Free radical Biol. Med. 26, 174-183.). 이 중 외재적 요인으로 작용하는 자외선(UV=ultraviolet)은 각종 피부 트러블 유발로 기미, 주근깨, 피부 색소 침착 등의 노화 현상을 촉진하며(1.Voegeli, R. 1996. Elastase and typtase determination on human skin surface. Cosmetic &Toiletries. 111, 51-58.), 피부암 등 여러 가지 피부 질환의 원인이 되기도 한다(2.Jung, H.S., J.H. Ha., Y.K. Kim., S.H. Oh., S.S. Kim., M.H. Jeong., H.Y. Lee. 2009. Effect of Rubus coreanus extracts on ultraviolet-A irradiated cultured human skin fibroblasts. Korean J. Medicinal Crop Sci. 17(5): 321-327.). 또한 자외선은 피부 탄력 섬유인 콜라겐과 엘라스틴을 분해하여 피부 탄력을 떨어지게 하여 주름을 유발시키고 표면을 거칠게 한다(Gilchrest BA. 1989. Skin aging and photoaging. Journal of the american academy of dermatology. 21:610-613.).

[0020] 피부 탄력성은 진피조직의 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin), 히알루론산(hyaluronic acid) 등에 의해 유지되며, 콜라겐(collagen)을 합성하는 섬유아세포(fibroblast)는 핵심적인 역할을 한다(1). 섬유아세포 기능은 각종 성장인자(growth factor) 뿐만 아니라 케라티노사이트(keratinocyte)나 멜라노사이트(melanocyte)와 같은 피부 세포들에서 분비되는 싸이토카인(cytokine)에 의해서도 조절된다(2-3). 정상적인 상태에서 유리되는 케라티노사이트의 TGF-β, TβRII, SGad3는 피부 섬유아세포(dermal fibroblast)로 부터 프로콜라겐(procollagen), 피브릴린(fibrillin-1), tropoelastin의 발현을 증가시켜 콜라겐 생성을 증가시키며, MMPs의 발현을 억제하여 콜라겐 분해를 억제하는 것으로 보고되었다(4-5).

[0021] UV에 의해 케라티노사이트가 손상되면 TGF-β(transforming growth factor) 외에도 TNF-α(tumor necrosis factor), PGE_2 (prostaglandin E_2), α-MSH(melanocyte stimulating hormone), GSF(granulocyte stimulating factor), IL-1(interleukin-1), IL-6, IL-8, IL-10 등의 유리가 유발한다(6-7). IL-1, TNF-α(tumor necrosis factor) 등은 fibroblast에 작용하여 procollagen 발현을 억제하며, MMP-1 (martrix metalloproteinase-1),

MMP-2, MMP-3, 히알루로니다아제(hyaluronidase)등의 활성을 증가시켜 콜라겐 분해를 촉진하게 된다(9-10). 또한, UV에 의해 직접적으로 섬유아세포 (fibroblast)가 상해를 받는 경우에도 콜라겐 관련 유전자는 억제되고 분해에 관련되는 MMPs류 발현은 촉진되어 주름살은 증가하게 된다. 따라서, 진피 섬유아세포 (dermal fibroblast)의 증식과 콜라겐 합성을 증가시키거나, MMPs을 억제하는 것은 주름살을 생성을 억제하는 수단이 될 수 있다.

[0022] 최근 들어, 미백, 노화방지, 피부개선, 항암 및 항균 등 복합 기능성을 가진 화장료로써 한약재는 제품 유형과 제형에 관계없이 다양하게 이용되어지고 있으며, 화장품에 천연물을 직접 이용한 것은 1973년 아모레 퍼시픽이 인삼을 주원료로 한 진생상미라는 제품을 선보인 것이 원조라 할 수 있고 이 후 산삼, 홍삼, 감초, 녹두, 흑두한란, 단풍잎, 대나무, 닥나무, 주목(朱木), 귤나무, 오가피, 야자수, 생강, 영지버섯, 녹차, 우엉, 뽕나무 등 다양한 식물자원으로부터 효능 성분을 추출하여 화장품 개발에 적극적으로 활용하고 있으며, 소재개발로 이루어지고 있으며, 현재 세계 화장품 시장 규모 05년 약 2,500억불에서 매년 10% 성장세를 보이고 있으며, 단순미용에서 질병치료 개념으로 진화, 고기능 다기능성으로 확대, 한방화장품 시대로 변화고 있는 상황이며, 천연 기능성 소재의 세계시장 규모는 연간 판매액 150억 달러에 달하며 최근 매년 평균 10% 이상의 성장률을 보이고 있다. 피부 천연물 소재의 개발 시 세계적으로 연간 1조 원~2조 원의 매출과 매출의 20 ~ 50%의 순이익 창출이 가능할 것으로 예상됩니다.

[0023] 특히, 주름개선 화장품의 원료개발에 있어 한방에 대한 연구는 우리 전통의학에 기반을 둔 원료개발이라는 점과 우리나라 소비자들의 화장품 선호도와 맞물려 국내 화장품 개발의 주력분야가 되고 있으며, 우리가 경쟁력을 확보할 수 있는 부분이므로 지속적인 개발이 필요하며, 기능성 화장품은 고기능성에 다기능성이 추가되는 방향으로 기술개발이 이루어지고 있으며, 이러한 기능성 소재와 관련 기술의 개발이 활발해질 것으로 예상됨. 피부재생 및 보호 효과가 우수한 한방재료를 이용한 제품화로 미용성형 및 필링 후 민감한 피부를 효과적으로 방어할 뿐만 아니라, 탁월한 피부재생 효과로 인한 기능성 화장품 또는 의약외품으로서의 가치를 지님으로서 상품화의 가치가 크고 피부 신약 개발은 임상 초기에 개발의 성공 여부를 신속하게 판단할 수 있어서 임상 후기 단계의 신약 실패에 따른 위험이 감소한다. 또한 피부질환은 신약개발에 대한 소요기간이 상대적으로 짧아서 개발 성과의 조기 가시화 및 빠른 투자 회수가 가능하므로 신약 개발의 새로운 패러다임 창출이 가능할 것이다.

[0024] 그러나, 상기 문헌의 어디에도 우방자로부터 분리된 화합물의 주름개선효과에 대한 내용이 기재되거나 교시된 바는 없다.

[0025] 한편, 우방자는 국화과(Compositae)에 속하는 인도 원산의 우엉(Arctium luppa L.) 의 괴실로서, 아크티인(arctiin), 아크트게닌(arctigenin), 이소아크트게닌(isoarctigenin) 등을 함유하고, 항균 활성 및 혈당강하작용 등을 나타내는 것으로 알려져 있다(정보섭외, 도해향약대사전, 영림사,pp.1010-1011, 1998년).

[0026] 이에 본 발명자들은 우방자 추출물을 대상으로 유효성분을 대량으로 추출할 수 있는 추출조건을 확립하였을 뿐만 아니라 활성성분들을 분리하였으며, 이러한 시료에 대하여, 전자공여능(electron donating ability) 측정, ABTS radical 소거능 측정등의 항노화 활성 실험; Elastase 저해활성 측정, Collagenase 저해활성 측정 등의 효소억제활성을 통한 주름개선 효능 측정; 세포 생존율 측정, Immunoblot을 이용한 주름에 관여하는 MMP 단백질 발현 억제활성 측정 등의 HS68 Fibroblast 세포를 이용한 주름개선 효능 실험 등의 광범위한 주름개선에 대한 효과 측정 실험을 통하여 상기 시료들이 강력한 피부노화 및 주름살에 대한 억제활성을 나타냄을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0027] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 우방자 추출물로부터 분리된 디아르크티게닌(Diarctigenin) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 주름살의 치료 및 예방을 위한 피부외용 약학조성물을 제공한다.

[0028] 또한 본 발명은 우방자 추출물로부터 분리된 디아르크티게닌(Diarctigenin) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 주름살의 예방 및 개선을 위한 화장료 조성물을 제공한다.

[0029] 본원에서 정의되는 우방자 추출물은 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물, 바람직하게는 비극성 용매 가용추출물임을 특징으로 한다.

[0030] 본원에서 정의되는 조추출물은 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 60~100%

에탄올에 가용한 추출물, 보다 더 바람직하게는 70~90% 에탄올추출용매에 가용한 추출물임을 특징으로 한다.

[0031] 본원에서 정의되는 극성용매 가용 추출물은 물, 메탄올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택되어진 용매, 바람직하게는 물 또는 부탄올, 보다 바람직하게는 부탄올에 가용한 추출물을 포함한다.

[0032] 본원에서 정의되는 비극성용매 가용 추출물은 헥산, 메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 또는 에틸아세테이트, 바람직하게는 헥산, 메틸렌 클로라이드 또는 에틸아세테이트, 보다 바람직하게는, 헥산 또는 메틸렌 클로라이드 용매에 가용한 추출물, 보다 바람직하게는 메틸렌 클로라이드 용매에 가용한 추출물임을 특징으로 한다.

[0033] 상기 화합물은 피부외용 약학조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%으로 포함함을 특징으로 한다.

[0034] 상기 약학 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 제형을 포함한다.

[0035] 또한, 상기 화장료 조성물은 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 팩의 제형을 포함한다.

[0036] 본 발명의 화합물은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 염 및 용매화물로 제조될 수 있다.

[0037] 약학적으로 허용 가능한 염으로는 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동일한 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[0038] 이 때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, *p*-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아 세트산, 시트르산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르빈산, 카본산, 바닐릭산 및 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다.

[0039] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비 용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0040] 본 발명의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 본 발명의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 하이드로브로마이드, 황산염, 수소황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포 네이트(메실레이트) 및 *p*-톨루엔설포네이트(토실레이트) 염이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조 방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

[0041] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0042] 본 발명의 추출물 및 화합물들은 하기와 같은 제조방법으로 수득될 수 있다.

[0043] 예를 들어, 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0044] 본 발명의 우방자 추출물은 하기와 같이 제조될 수 있다. 건조된 우방자를 세척 및 세절 후 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 60~100% 에탄올을 수회 섞은 다음에 30℃ 내지 150℃, 바람직하게는 50℃ 내지 100℃의 온도에서 30분 내지 48시간, 바람직하게는 1시간 내지 12시간 동안 초음파 추

출법, 열수 추출법, 상온 추출법 또는 환류추출법, 바람직하게는 환류 추출법을 약 1 내지 20회, 바람직하게는 2 내지 10회 반복 수행하여 얻은 추출액을 여과, 감압 농축, 및 건조하여 조추출물을 얻을 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명의 극성용매 또는 비극성용매 가용 추출물은 상기에서 얻은 조추출물, 바람직하게는 60 내지 90% 에탄올 조추출물 중량의 약 0.0005 내지 0.005배, 바람직하게는 0.05 내지 0.5배 부피 (v/w%)의 물을 가한 후, n-헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸 아세테이트, 메틸렌 클로리드, 클로로포름 등의 비극성용매를 이용하여 분획을 수행하여 비극성용매 가용 추출물을 얻고 남은 잔사를 아세톤, 부탄올 등의 극성용매를 이용한 통상적인 분획과정을 수행하여 n-헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸 아세테이트, 메틸렌 클로리드, 클로로포름 등의 비극성용매에 가용한 비극성 용매 가용 추출 분획물; 및 부탄올, 물 등의 극성용매에 가용한 극성용매 가용 추출 분획물을 수득할 수 있다.

[0046] 상기에서 수득한 n-헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸 아세테이트 등의 비극성 용매에 가용한 비극성 용매 가용 추출 분획물, 바람직하게는 메틸렌클로리드 가용분획물을 헥산 및 메틸렌클로라이드 혼합용매를 극성을 증가시키는 방법을 이용하여 플래쉬 컬럼크로마토그래피, RP C18 컬럼크로마토그래피 또는 실리카겔 오픈 컬럼크로마토그래피 등의 크로마토그래피를 이용한 정제방법을 선택적으로 수회 반복 수행하여 본 발명의 화합물들 즉 디아르크티게닌(Diarctigenin)을 정제 및 수득할 수 있다.

[0047] 따라서, 본 발명은 건조된 우방자를 세척 및 세절 후 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합용매, 보다 바람직하게는 60~100% 에탄올을 첨가하여 30℃ 내지 150℃, 바람직하게는 50℃ 내지 100℃의 온도에서 30분 내지 48시간, 바람직하게는 1시간 내지 12시간 동안 초음파 추출법, 열수 추출법, 상온 추출법 또는 환류추출법, 바람직하게는 환류 추출법을 약 1 내지 20회, 바람직하게는 2 내지 10회 반복 수행하여 조추출물을 얻는 제 1단계; 상기 제 1단계에서 얻은 조추출물에, n-헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸 아세테이트 등의 비극성 용매에 가용한 비극성 용매 가용 추출 분획물단계, 마지막으로 플래쉬 컬럼크로마토그래피, RP C18 컬럼크로마토그래피 또는 실리카겔 오픈 컬럼크로마토그래피 등의 크로마토그래피를 이용한 정제하는 3 단계를 포함한다.

[0048] 본 발명자들은 우방자 추출물 중 주름살 개선에 뛰어난 유효성분을 대량으로 추출할 수 있는 추출조건을 확립하였을 뿐만 아니라 활성성분들을 분리하였으며, 이러한 시료에 대하여, 전자공여능(electron donating ability) 측정, ABTS radical 소거능 측정, Superoxide anion radical 소거능 측정 등의 항노화 활성 실험; Elastase 저해활성 측정, Collagenase 저해활성 측정 등의 효소억제활성을 통한 주름개선 효능 측정; 세포 생존율 측정, ELISA kit를 이용한 collagen 생합성 측정, ELISA kit를 이용한 MMP-1 발현량 측정, Immunoblot을 이용한 주름에 관여하는 MMP 단백질 발현 억제활성 측정 등의 HS68 Fibroblast 세포를 이용한 주름개선 효능 실험 등의 광범위한 주름개선에 대한 효과 측정 실험을 통하여 상기 시료들이 강력한 피부노화 및 주름살에 대한 억제활성을 나타냄을 확인하여 상기 조성물을 주름살의 예방 및 치료용 피부외용 약학조성물 또는 화장료 조성물로 유용함을 확인하였다.

[0049] 상기 화합물은 피부외용 약학조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%으로 포함함을 특징으로 한다.

[0050] 상기 약학 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 제형을 포함한다.

[0051] 또한, 상기 화장료 조성물은 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 팩의 제형을 포함한다.

[0052]

[0053] 본 발명은 상기의 제조공정으로 얻어진 우방자 추출물로부터 분리된 디아르크티게닌(Diarctigenin) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 주름살의 예방 및 치료용 피부외용 약학조성물 또는 화장료 조성물을 제공한다.

[0054]

[0055] 본 발명의 추출물 또는 화합물을 함유하는 피부외용 약학조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용제 형태의 약학조성물로 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0056] 본 발명의 추출물 또는 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물 또는 화합물은 1일 0.0001 내지 100㎎/㎏으로, 바람직하게는 0.001 내지 10㎎/㎏으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0057] 또한, 본 발명의 추출물 또는 화합물은 피부주름살 개선 효과를 갖는 화장품 및 세안제 등에 다양하게 이용될 수 있다.

[0058] 본 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 맛사지크림, 에센스, 팩 등과 같은 화장품류와 샴푸, 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 미용액 등이 있다.

[0059] 본 발명의 화장료는 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스핑고 지질 및 해초 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 조성물을 포함한다.

[0060] 수용성 비타민으로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B6, 피리독신, 염산피리독신, 비타민 B12, 판토텐산, 니코틴산, 니코틴산아미드, 엽산, 비타민 C, 비타민 H 등을 들 수 있으며, 그들의 염 (티아민염산염, 아스코르빈산나트륨염 등)이나 유도체 (아스코르빈산-2-인산나트륨염, 아스코르빈산-2-인산마그네슘염 등)도 본 발명에서 사용할 수 있는 수용성 비타민에 포함된다. 수용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 수득할 수 있다.

[0061] 유용성 비타민으로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 비타민 A, 카로틴, 비타민 D2, 비타민 D3, 비타민 E (dl-알파 토코페롤, d-알파 토코페롤, d-알파 토코페롤) 등을 들 수 있으며, 그들의 유도체 (팔미틴산아스코르빈, 스테아르산아스코르빈, 디팔미틴산아스코르빈, 아세트산 dl-알파 토코페롤, 니코틴산 dl-알파 토코페롤비타민 E, dl-판토테닐알코올, D-판토테닐알코올, 판토테닐에틸에테르 등) 등도 본 발명에서 사용되는 유용성 비타민에 포함된다. 유용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 취득할 수 있다.

[0062] 고분자 펩티드로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 콜라겐, 가수 분해 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴, 가수 분해 엘라스틴, 케라틴 등을 들 수 있다. 고분자 펩티드는 미생물의 배양액으로부터의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 정제 취득할 수 있으며, 또는 통상 돼지나 소 등의 진피, 누에의 견섬유 등의 천연물로부터 정제하여 사용할 수 있다.

[0063] 고분자 다당으로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 히드록시에틸셀룰로오스, 크산탄검, 히알루론산나트륨, 콘드로이틴 황산 또는 그 염 (나트륨염 등) 등을 들 수 있다. 예를 들어, 콘드로이틴 황산 또는 그 염 등은 통상 포유동물이나 어류로부터 정제하여 사용할 수 있다.

[0064] 스핑고 지질로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 세라미드, 피토스핑고신, 스핑고당지질 등을 들 수 있다. 스핑고 지질은 통상 포유류, 어류, 패류, 효모 또는 식물 등으로부터 통상의 방법에 의해 정제하거나 화학 합성법에 의해 취득할 수 있다.

[0065] 해초 엑기스로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 갈조 엑기스, 홍조 엑기스, 녹조 엑기스 등을 들 수 있으며, 또, 이들의 해초 엑기스로부터 정제된 칼라기난, 아르긴산, 아르긴산나트륨, 아르긴산칼륨 등도 본 발명에서 사용되는 해초 엑기스에 포함된다. 해초 엑기스는 해초로부터 통상의 방법에 의해 정제하여 취득할 수 있다.

[0066] 본 발명의 화장료에는 상기 필수 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분을 배합해도 된다.

[0067] 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다.

[0068] 유지 성분으로서는 에스테르계 유지, 탄화수소계 유지, 실리콘계 유지, 불소계 유지, 동물 유지, 식물 유지 등을 들 수 있다.

[0069] 에스테르계 유지로서는 트리2-에틸헥산산글리세릴, 2-에틸헥산산세틸, 미리스틴산이소프로필, 미리스틴산부틸, 팔미틴산이소프로필, 스테아르산에틸, 팔미틴산옥틸, 이소스테아르산이소세틸, 스테아르산부틸, 리놀레산에틸, 리놀레산이소프로필, 올레인산에틸, 미리스틴산이소세틸, 미리스틴산이소스테아릴, 팔미틴산이소스테아릴, 미리스틴산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 세바신산디에틸, 아디핀산디이소프로필, 네오펜탄산이소알킬, 트리(카프릴, 카프린산)글리세릴, 트리2-에틸헥산산트리메틸롤프로판, 트리이소스테아르산트리메틸롤프로판, 테트라2-에틸헥산산펜타엘리슬리톨, 카프릴산세틸, 라우린산데실, 라우린산헥실, 미리스틴산데실, 미리스틴산미리스틸, 미리스틴산세틸, 스테아르산스테아릴, 올레인산데실, 리시노올레인산세틸, 라우린산이소스테아릴, 미리스틴산이소트리데실, 팔미틴산이소세틸, 스테아르산옥틸, 스테아르산이소세틸, 올레인산이소데실, 올레인산옥틸도데실, 리놀레산옥틸도데실, 이소스테아르산이소프로필, 2-에틸헥산산세토스테아릴, 2-에틸헥산산스테아릴, 이소스테아르산헥실, 디옥탄산에틸렌글리콜, 디올레인산에틸렌글리콜, 디카프린산프로필렌글리콜, 디(카프릴,카프린산)프로필렌글리콜, 디카프릴산프로필렌글리콜, 디카프린산네오펜틸글리콜, 디옥탄산네오펜틸글리콜, 트리카프릴산글리세릴, 트리운데실산글리세릴, 트리이소팔미틴산글리세릴, 트리이소스테아르산글리세릴, 네오펜탄산옥틸도데실, 옥탄산이소스테아릴, 이소노난산옥틸, 네오데칸산헥실데실, 네오데칸산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 이소스테아르산이소스테아릴, 이소스테아르산옥틸데실, 폴리글리세린올레인산에스테르, 폴리글리세린이소스테아르산에스테르, 시트르산트리이소세틸, 시트르산트리이소알킬, 시트르산트리이소옥틸, 락트산라우릴, 락트산미리스틸, 락트산세틸, 락트산옥틸데실, 시트르산트리에틸, 시트르산아세틸트리에틸, 시트르산아세틸트리부틸, 시트르산트리옥틸, 말산디이소스테아릴, 히드록시스테아르산 2-에틸헥실, 숙신산디2-에틸헥실, 아디핀산디이소부틸, 세바신산디이소프로필, 세바신산디옥틸, 스테아르산콜레스테릴, 이소스테아르산콜레스테릴, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 올레인산콜레스테릴, 올레인산디히드로콜레스테릴, 이소스테아르산피트스테릴, 올레인산피트스테릴, 12-스테알로일히드록시스테아르산이소세틸, 12-스테알로일히드록시스테아르산스테아릴, 12-스테알로일히드록시스테아르산이소스테아릴 등의 에스테르계 등을 들 수 있다.

[0070] 탄화 수소계 유지로서는 스쿠알렌, 유동 파라핀, 알파-올레핀올리고머, 이소파라핀, 세레신, 파라핀, 유동 이소파라핀, 폴리부덴, 마이크로크리스탈린왁스, 와셀린 등의 탄화 수소계 유지 등을 들 수 있다.

[0071] 실리콘계 유지로서는 폴리메틸실리콘, 메틸페닐실리콘, 메틸시클로폴리실록산, 옥타메틸폴리실록산, 데카메틸폴리실록산, 도데카메틸시클로실록산, 디메틸실록산·메틸세틸옥시실록산 공중합체, 디메틸실록산·메틸스테알록시실록산 공중합체, 알킬 변성 실리콘유, 아미노 변성 실리콘유 등을 들 수 있다.

[0072] 불소계 유지로서는 퍼플루오로폴리에테르 등을 들 수 있다.

[0073] 동물 또는 식물 유지로서는 아보카도유, 아르몬드유, 올리브유, 참깨유, 쌀겨유, 새플라워유, 대두유, 옥수수유, 유채유, 행인(杏仁)유, 팜핵유, 팜유, 피마자유, 해바라기유, 포도종자유, 면실유, 야자유, 쿠쿠이너트유, 소맥배아유, 쌀 배아유, 시아버터, 월견초유, 마카데이미아너트유, 메도홈유, 난황유, 우지(牛脂), 마유, 밍크유, 오렌지라피유, 호호바유, 캔데리러왁스, 카르나바왁스, 액상 라놀린, 경화피마자유 등의 동물 또는 식물 유지를 들 수 있다.

[0074] 보습제로서는 수용성 저분자 보습제, 지용성 분자 보습제, 수용성 고분자, 지용성 고분자 등을 들 수 있다.

[0075] 수용성 저분자 보습제로서는 세린, 글루타민, 솔비톨, 만니톨, 피롤리돈-카르복실산나트륨, 글리세린, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜B(중합도 n = 2 이상), 폴리프로필렌글리콜(중합도 n = 2 이상), 폴리글리세린B(중합도 n = 2 이상), 락트산, 락트산염 등을 들 수 있다.

[0076] 지용성 저분자 보습제로서는 콜레스테롤, 콜레스테롤에스테르 등을 들 수 있다.

[0077] 수용성 고분자로서는 카르복시비닐폴리머, 폴리아스파라긴산염, 트라가칸트, 크산탄검, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 수용성 키틴, 키토산, 덱스트린 등을 들 수 있다.

[0078] 지용성 고분자로서는 폴리비닐피롤리돈·에이코센 공중합체, 폴리비닐피롤리돈·헥사데센 공중합체, 니트로셀룰로오스, 덱스트린지방산에스테르, 고분자 실리콘 등을 들 수 있다.

[0079] 에몰리엔트제로서는 장쇄아실글루타민산콜레스테릴에스테르, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 12-히드록시스테아르산, 스테아르산, 로진산, 라놀린지방산콜레스테릴에스테르 등을 들 수 있다.

[0080] 계면 활성제로서는 비이온성 계면 활성제, 음이온성 계면 활성제, 양이온성 계면 활성제, 양성 계면 활성제 등을 들 수 있다.

[0081] 비이온성 계면 활성제로서는 자기 유화형 모노스테아르산글리세린, 프로필렌글리콜지방산에스테르, 글리세린지방산에스테르, 폴리글리세린지방산에스테르, 솔비탄지방산에스테르, POE(폴리옥시에틸렌)솔비탄지방산에스테르, POE 솔비트지방산에스테르, POE 글리세린지방산에스테르, POE 알킬에테르, POE 지방산에스테르, POE 경화피마자유, POE 피마자유, POE·POP (폴리옥시에틸렌·폴리옥시프로필렌) 공중합체, POE·POP 알킬에테르, 폴리에테르변성실리콘, 라우린산알카놀아미드, 알킬아민옥시드, 수소첨가대두인지질 등을 들 수 있다.

[0082] 음이온성 계면 활성제로서는 지방산비누, 알파-아실술폰산염, 알킬술폰산염, 알킬알릴술폰산염, 알킬나프탈렌술폰산염, 알킬황산염, POE 알킬에테르황산염, 알킬아미드황산염, 알킬인산염, POE 알킬인삼염, 알킬아미드인산염, 알킬로일알킬타우린염, N-아실아미노산염, POE 알킬에테르카르복실산염, 알킬술포숙신산염, 알킬술포아세트산나트륨, 아실화 가수분해 콜라겐펩티드염, 퍼플루오로알킬인산에스테르 등을 들 수 있다.

[0083] 양이온성 계면 활성제로서는 염화알킬트리메틸암모늄, 염화스테아릴트리메틸암모늄, 브롬화스테아릴트리메틸암모늄, 염화세토스테아릴트리메틸암모늄, 염화디스테아릴디메틸암모늄, 염화스테아릴디메틸벤질암모늄, 브롬화베헤닐트리메틸암모늄, 염화벤잘코늄, 스테아르산디에틸아미노에틸아미드, 스테아르산디메틸아미노프로필아미드, 라놀린 유도체 제 4급 암모늄염 등을 들 수 있다.

[0084] 양성 계면 활성제로서는 카르복시베타인형, 아미드베타인형, 술포베타인형, 히드록시술포베타인형, 아미드술포베타인형, 포스포베타인형, 아미노카르복실산염형, 이미다졸린 유도체형, 아미드아민형 등의 양성 계면 활성제 등을 들 수 있다.

[0085] 유기 및 무기 안료로서는 규산, 무수규산, 규산마그네슘, 탤크, 세리사이트, 마이카, 카올린, 벵갈라, 클레이, 벤토나이트, 티탄피막운모, 옥시염화비스무트, 산화지르코늄, 산화마그네슘, 산화아연, 산화티탄, 산화알루미늄, 황산칼슘, 황산바륨, 황산마그네슘, 탄산칼슘, 탄산마그네슘, 산화철, 군청, 산화크롬, 수산화크롬, 칼라민 및 이들의 복합체등의 무기 안료 ; 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리우레탄, 비닐수지, 요소수지, 페놀수지, 불소수지, 규소수지, 아크릴수지, 멜라민수지, 에폭시수지, 폴리카보네이트수지, 디비닐벤젠·스티렌 공중합체, 실크파우더, 셀룰로오스, CI 피그먼트옐로우, CI 피그먼트오렌지 등의 유기 안료 및 이들의 무기 안료와 유기 안료의 복합 안료 등을 들 수 있다.

[0086] 유기 분체로서는 스테아르산칼슘 등의 금속비누; 세틸린산아연나트륨, 라우릴린산아연, 라우릴린산칼슘 등의 알킬인산금속염; N-라우로일-베타-알라닌칼슘, N-라우로일-베타-알라닌아연, N-라우로일글리신칼슘 등의 아실아미노산 다가금속염; N-라우로일-타우린칼슘, N-팔미토일-타우린칼슘 등의 아미드술폰산 다가금속염; N-엡실론-라우로일-L-리진, N-엡실론-팔미토일리진, N-알파-파리토일올니틴, N-알파-라우로일아르기닌, N-알파-경화우지지방산아실아르기닌 등의 N-아실염기성아미노산; N-라우로일글리실글리신 등의 N-아실폴리펩티드; 알파-아미노카프릴산, 알파-아미노라우린산 등의 알파-아미노지방산; 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 나일론, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리스티렌, 디비닐벤젠·스티렌 공중합체, 사불화에틸렌 등을 들 수 있다.

[0087] 자외선 흡수제로서는 파라아미노벤조산, 파라아미노벤조산에틸, 파라아미노벤조산아밀, 파라아미노벤조산옥틸, 살리실산에틸렌글리콜, 살리신산페닐, 살리신산옥틸, 살리신산벤질, 살리신산부틸페닐, 살리신산호모멘틸, 계피산벤질, 파라메톡시계피산-2-에톡시에틸, 파라메톡시계피산옥틸, 디파라메톡시계피산모노-2-에틸헥산글리세릴, 파라메톡시계피산이소프로필, 디이소프로필·디이소프로필계피산에스테르 혼합물, 우로카닌산, 우로카닌산에틸, 히드록시메톡시벤조페논, 히드록시메톡시벤조페논술폰산 및 그 염, 디히드록시메톡시벤조페논, 디히드록시메톡시벤조페논디술폰산나트륨, 디히드록시벤조페논, 테트라히드록시벤조페논, 4-*tert*-부틸-4'-메톡시디벤조일메탄, 2,4,6-트리아닐리노-*p*-(카르보-2'-에틸헥실-1'-옥시)-1,3,5-트리아진, 2-(2-히드록시-5-메틸페닐)벤조트리아졸 등을 들 수 있다.

[0088] 살균제로서는 히노키티올, 트리클로산, 트리클로로히드록시디페닐에테르, 크로르헥시딘글루콘산염, 페녹시에탄올, 레조르신, 이소프로필메틸페놀, 아줄렌, 살리칠산, 진크필리티온, 염화벤잘코늄, 감광소 301호, 모노니트로과이어콜나트륨, 운데시렌산 등을 들 수 있다.

[0089] 산화 방지제로서는 부틸히드록시아니솔, 갈릭산프로필, 엘리소르빈산 등을 들 수 있다.

[0090] pH 조정제로서는 시트르산, 시트르산나트륨, 말산, 말산나트륨, 프말산, 프말산나트륨, 숙신산, 숙신산나트륨,

수산화나트륨, 인산일수소나트륨 등을 들 수 있다.

[0091] 알코올로서는 세틸알코올 등의 고급 알코올을 들 수 있다.

[0092] 또한, 이외에 첨가해도 되는 배합 성분은 이에 한정되는 것은 아니며, 또, 상기 어느 성분도 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 배합 가능하지만, 총중량에 대하여 바람직하게는 0.01-5 %중량, 보다 바람직하게는 0.01-3%중량으로 배합된다.

[0093] 본 발명의 화장료는 용액, 유화물, 점성형 혼합물 등의 형상을 취할 수 있다.

[0094] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 우방자 추출물 및 diarctigenin 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함한다.

[0095] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 유액, 크림, 화장수, 팩, 파운데이션, 로션, 미용액, 모발화장료 등을 들 수 있다.

[0096] 구체적으로, 본 발명의 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스쳐 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저의 제형을 포함한다.

[0097] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0098] 본 발명의 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.

[0099] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 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.

[0100] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 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.

[0101] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0102] 상기에 언급한 바와 같이, 본 발명의 디아르크티게닌(Diarctigenin)은 전자공여능(electron donating ability) 측정, ABTS radical 소거능 측정 등의 항노화 활성 실험; Elastase 저해활성 측정, Collagenase 저해활성 측정 등의 효소억제활성을 통한 주름개선 효능 측정; 세포 생존율 측정, ELISA kit를 이용한 collagen 생합성 측정, Immunoblot을 이용한 주름에 관여하는 MMP 단백질 발현 억제활성 측정 등의 HS68 Fibroblast 세포를 이용한 주름개선 효능 실험 등의 광범위한 주름개선에 대한 효과 측정 실험을 통하여 상기 시료들이 강력한 피부노화 및 주름살에 대한 억제활성을 나타냄을 확인하여 상기 조성물을 주름살의 예방 및 치료용 피부외용 약학조성물 또는 화장료조성물로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0103] 도 1는 우방자로부터 추출물 및 화합물을 분리하는 과정을 나타낸 도이며;

도 2는 시료 처치후 HS68 섬유아세포의 세포 생존율을 나타낸 도이며(diarctigenin);

도 3는 시료 처치 후 인체 진피 섬유아세포 프로콜라겐 합성율을 나타낸 도이며(ELISA method; diarctigenin)

도 4는 UVB 조사된 섬유아세포의 MMP-1 발현에 미치는 시료의 영향을 나타낸 도이며 (ELISA method; B : diarctigenin)

도 5는 시료의 섬유아세포(HS68) MMP-1 단백질 발현율에 미치는 영향을 나타낸 도이며(B : diarctigenin);

도 6는 시료의 섬유아세포(HS68) MMP-9 단백질 발현율에 미치는 영향을 나타낸 도이며(B : diarctigenin);

도 7는 시료 화장품 제제의 인체 패취 시험과정을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0104] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

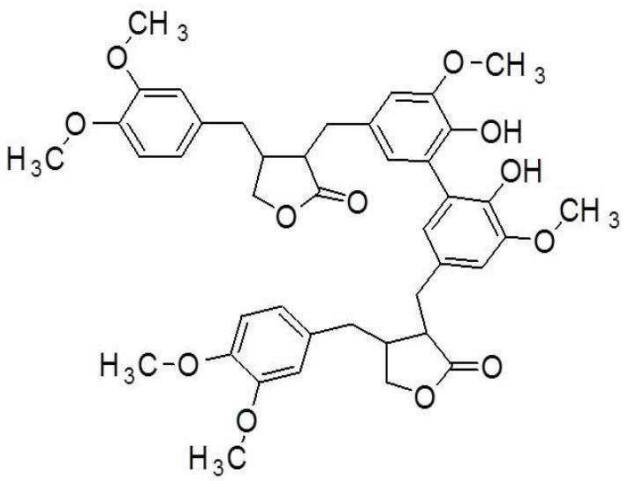
[0105] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 참고예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0106] **실시예 1. 우방자 추출물로부터 분리된 화합물의 분리**

[0107] 우방자 추출물의 활성 성분을 찾기 위해 극성도가 가장 높은 70% ethanol을 용매로 하여 상온에서 5일간 추출 후 농축하였다. 이후 liquid-liquid extraction method에 의해 극성도에 따라 n-hexane, methylene chloride(MC), ethyl acetate(EA), 및 water layer로 분획하였다. 이렇게 얻어진 메틸렌클로리드 (MC) 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법(silicagel chromatography; MC:MeOH=30:1-->5:1), 세파덱스 컬럼 크로마토그래피법(sephadex column chromatography; MeOH:MC=1:1), 및 재결정법(recrystallization method; 1%water, 99%EA)를 이용하여 EA 분획으로부터 하기와 같은 물성치를 나타내는 디아르크티게닌(Diarctigenin) 화합물(EA-B)을 얻었다(도 1).

화학식 1

[0108]



[0109] Diarctigenin (EA-B)

[0110] ^{1}H-NMR (CD_3OD, 400mHz) δ6.80(d, J=8.8Hz), 6.62(dd, J=8.0,2.0Hz), 6.60(dd, J=8.0,2.0Hz)6.74(d, J=2.0Hz)6.84(d, J=8.0Hz) 4.09(dd, J=8.8,7.5Hz), 3.87(dd, J=8.3,7.5Hz) ,3.73(s), 3.71(s), 3.70(s), 2.82(dd, J=14.0,5.5Hz), 2.74(dd, J=14.0,7.0Hz), 2.47(m),

[0111] ^{13}C-NMR (CD_3OD, 100mHz) δ131.27, 111.82, 148.68, 147.33, 113.43 120.38, 36.92, 40.84, 70.71, 128.91, 112.37, 147.44, 145.14, 121.59, 33.75, 45.68, 178.48, 55.54, 55.45, 55.34

[0112] **실험예 1. 항산화 효과실험**

[0113] 상기 실시예에서 수득한 시료들의 항산화효과를 확인하기 위하여 하기와 같이 실험을 실시하였다.

[0114] **1-1. 전자공여능(electron donating ability) 측정**

[0115] 전자공여능(EDA: electron donating ability)은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다.

[0116] 각 시료용액 2mL에 0.2mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 1mL 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다. DPPH radical 소거활성은 하기 수학식 1과 같이 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC_{50}값으로 나타내었다.

수학식 1

[0117]
$$\text{전자공여능}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

[0118] **측정 결과**

[0119] 전자공여능 측정에 사용된 1-1-diphenyl-2-picry-hydrazyl(DPPH)는 짙은 자색을 띄는 비교적 안정한 free radical로서 cystein, glutathion과 같은 함유황아미노산과 ascorbic acid, BHA 등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연 소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. DPPH를 첨가하여 반응시켜 추출물이 DPPH의 비공유전자를 소거하였을 때 그것의 비공유전자로 인해 517nm 부근에서 최대 흡수치를 나타낸다. 전자 또는 수소를 받으면 517nm 부근에서 흡광도가 감소하여, 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데 페놀성 화합물의 경우 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 free radical에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다. 실험결과 표준물질인 BHA의 42.6ppm에서 RC_{50}값이 관찰되었고, 우방자 추출물로부터 분리된 Diarctigenin은 최대 33%의 항산화효과가 있는 것을 확인하였다.(표 1).

표 1

[0120] DPPH 라디칼 소거능

Samples	Concentrate(ppm)	Scavenging rate(%)	RC_{50} [1] (ppm)
Diarctigenin	1000	12.57±0.19	-
	2500	13.17±1.03	
	5000	22.18±0.16	
	7500	27.00±1.32	
	10000	33.48±1.61	
BHA[2]	10	26.79±1.12	42.6
	25	45.30±0.64	
	50	60.11±0.87	
	75	64.59±2.44	
	100	77.28±0.45	

[1] RC_{50}: Concentration required for 50% reduction of DPPH at 10 min after starting the reaction

[2] BHA : Butylated Hydroxy Anisole

[0121] **1-2. ABTS radical 소거능 측정**

[0122] ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 $ABTS^{+}$ cation decolourisation assay 방법에 의하여 시행하였다 (Roberta, R., P. Nicoletta, P. Anna, P. Ananth, Y. Min, and R. E. Catherine. 1999. Antioxidant acitivity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.

Freeradicalbiology&Medicine.26:1231-1237).

[0123] 7mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-e-6-sulfonic acid) (ABTS, Wako Chemical Co., Japan) 와 2.45mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 $ABTS^{+}$을 형성시킨 후 734nm에서 흡광도 값이 0.70(± 0.02) 이 되게 phosphate buffer saline (PBS, pH7.4) 로 희석하였다. 희석된 용액 100㎕에 시료 50㎕를 가하여 5분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거활성은 하기 수학식 2와 같이 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC_{50}값으로 나타내었다.

수학식 2

[0124] $$\text{ABTS radical 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

[0125] **결과**

[0126] ABTS radical cation 소거능은 2,2-azino-bis(3-ethyl-benthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS)와 potassium persulfate와의 반응으로 ABTS+radical이 생성되면 특유의 색인 청록색을 띄게 되며 hydrogen donating antioxidant와 chain breaking antioxidant 모두를 측정할 수 있다.

[0127] ABTS radical cation 소거능 측정 결과 비교물질인 trolox는 47.4ppm에서 RC_{50} 값이 관찰 되었고 우방자 추출물로부터 분리된 Diarctigenin은 최대 약 59%의 ABTS 소거능이 있는 것을 확인하였다.(표 2).

표 2

[0128] ABTS 라디칼 소거능

Samples	Concentrate(ppm)	Scavenging rate(%)	RC_{50} [1] (ppm)
Diarctigenin	1000	25.55±0.96	6815.5
	2500	37.87±0.29	
	5000	47.39±1.36	
	7500	50.26±0.29	
	10000	59.07±2.35	
Trolox	10	22.42±1.02	47.4
	25	37.76±1.08	
	50	56.97±0.25	
	75	69.05±1.97	
	100	77.70±1.18	

[1] RC_{50}: Concentration required for 50% reduction of ABTS at 5 min after starting the reaction

[0129] **실험예 2. 주름개선 효능 검증 실험**

[0130] 상기 실시예에서 수득한 시료들의 주름개선효능을 확인하기 위하여 하기와 같이 실험을 실시하였다.

[0131] **2-1. 엘라스타제(Elastase) 저해활성 측정**

[0132] 엘라스타제(Elastase)는 진피 내 피부탄력을 유지시키는 데 중요한 기질인 엘라스틴을 분해하는 효소이다. 또한 elastase는 다른 중요한 기질단백질인 collagen을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다. 따라서 elastase 저해제는 피부주름을 개선하는 작용을 나타내며, ursolic acid 등이 elastase 저해제로서 이용되고 있다. Elastase는 동물 결합조직의 불용성 탄성 섬유 단백질인 elastin을 분해시켜 피부의 진피조기의 그물망 구조 결합을 끊어줌으로서 주름생성의 주원인인 효소로 알려져 있다. 피부의 진피 조직 속에는 collagen과 피부의 탄력성에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있는데, 이러한 그물망 구조가 깨어지면서 즉 elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부가 처지고 주름이 생기므로 내인성 피부노화가 발생한다. 그러므로 피부노화의

주원인 중의 하나인 elastin 분해효소인 elastase의 활성을 저하시킴으로서 피부노화를 억제할 수 있다(Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G. 2001. The role of elastases secred by fibroblasts in wrinkle formation : implication through selective inhibition of elastase activity. Photochem. Photobiol 74(2), 283-290).

[0133] 상기한 실시예 시료를 대상으로 문헌에 기재된 방법을 이용하여 엘라스타제 저해활성을 하기와 같이 실험을 수행하였다. (Cannell RJP, Kellan SJ, Owsianks AM, Walker JM. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.* 1988;54(1):10-14.) 등의 방법에 따라 측정하였다.

[0134] 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)$_3$-p-nitroanilide, S4760, Sigma)를 사용하여 37℃에서 20분간 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 445nm에서 측정하였다. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 500㎕씩 시험관에 취하고, 50mM tris-HCl buffer (pH8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase(E1250, Sigma)2.5U/mL)용액 500㎕을 가한 후 기질로 50mM tris-HCl buffer(pH8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)$_3$- p-nitroanilide (500㎍/mL)을 첨가하여 20분간 반응시켜 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 하기 수학식 3에 따라 계산하여 나타내었다.

수학식 3

[0135]
$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

[0136] 비교물질인 EGCG는 7121.8ppm에서 50% 저해 효과를 보였고, 우방자 추출물로부터 분리된 Diarctigenin은 최대 약 44%의 엘라스타제 활성억제효과가 있는 것을 확인하였다.(표 3).

표 3

[0137] 엘라스타제의 활성억제효과

Samples	Concentrate(ppm)	Inhibition rate(%)	IC_{50} [1] (ppm)
Diarctigenin	1000	23.6±3.3	-
	2500	25.4±0.3	
	5000	33.0±3.0	
	7500	36.8±2.0	
	10000	44.1±2.5	
EGCG[2]	1000	27.4±1.4	7121.8
	2500	35.9±3.3	
	5000	44.3±1.4	
	7500	49.3±2.4	
	10000	60.1±0.2	

[1] IC_{50}: Concentration required for 50% inhibition of Elastase at 20 min after starting the inhibition.
[2] EGCG : Epigallocatechin gallate

[0138] **2-2. 콜라게나제(Collagenase) 저해활성 측정 결과**

[0139] 세포 외 기질(extracellular matrix)의 주요 구성 성분인 collagen은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질이다. 또한 생체 단백질 총 중량의 약 30%를 차지하는 중요한 단백질로서 견고한 3중 나선구조를 가지고 있다. Collagen은 피부, 건(tendon), 뼈 및 치아의 유기 물질의 대부분을 형성하는데, 특히 뼈와 피부의 진

피에 그 포함량이 높다. Collagen의 주된 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포 접착의 지탱, 세포 분할과 분화의 유도 등이 알려져 있다. 이러한 collagen은 연령 및 자외선 조사에 의한 광노화에 의해 감소하며, 이는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다. 또한 collagen은 트립신 등의 단백질 분해효소의 작용을 받지 않으나, collagenase에 의해 분해된다는 보고가 있다(참고 문헌: Grant NH, Alburn He. 1959. Studies on the collagenases of clostridium histolyticum. Arch. Biochem. Biophys 82(2), 245-255).

[0140] 상기한 실시예 시료를 대상으로 문헌에 기재된 방법을 이용하여 콜라게나제 저해활성을 하기와 같이 실험을 수행하였다.(WE, Heindrich HG. Zur quantitativen bestimmung der collagenase. *Hoppe-Seyler's. Physiol. Chem.* 1963;333:149-151.) 등의 방법에 따라 측정하였다.

[0141] 즉 반응구는 0.1Mtris-HClbuffer(pH7.5)에 4mM$CaCl_2$를 첨가하여,4-phenylazo-benzyloxy-carbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (P8383, Sigma) 300㎍/mL)를 녹인 기질액 250㎕ 및 시료용액 100㎕의 혼합액에 collagenase (C0130, Sigma)200㎍/mL) 150㎕를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6%citric acid(81G261, Ducsan) 500㎕을 넣어 반응을 정지 시킨 후, ethyl acetate 1.5mL을 첨가하여 320nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

[0142] Collagenase 저해활성 측정 결과, 비교물질인 ursolic acid로 445.4ppm에서 collagenase 50% 저해활성을 관찰하였고, 우방자 추출물로부터 분리된 Diarctigenin은 IC_{50} (ppm)가 약 2505.4 ppm으로 효과가 있는 것을 확인 하였다.(표 4).

표 4

[0143] 콜라게나제의 활성억제효과

Samples	Concentrate(ppm)	Inhibition rate(%)	IC_{50} [1] (ppm)
Diarctigenin	1000	17.3±0.7	2505.4
	2500	45.6±1.4	
	5000	92.8±0.6	
	7500	-	
	10000	-	
Ursolic acid	100	9.5±2.62	445.4
	250	30.0±0.55	
	500	66.5±0.14	
	750	75.0±0.71	
	1000	79.0±0.86	

[1] IC_{50}: Concentration required for 50% inhibition of Collagenase at 20 min after starting the inhibition

[0144] **실험예 3. HS68 섬유아세포(Fibroblast)를 이용한 주름개선 효능 측정 실험**

[0145] 상기 실시예에서 수득한 시료들의 HS68 섬유아세포를 이용한 주름개선효능을 확인하기 위하여 하기와 같이 실험을 실시하였다.

[0146] **3-1. HS68 세포에 대한 우방자 정제물의 독성 검증**

[0147] 우방자 정제물의 HS68 fibroblast 세포 생존율을 확인하기 위한 MTT 검색법은 96 well plate를 사용하였으며, 검사결과를 ELISA reader(multiwell microplate reader)를 이용하여 많은 시료를 간단하게 판독할 수 있어 세포독성 및 세포증식 검색법으로서 널리 사용되고 있는 방법 중의 한 방법이다(Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *CancerRes*.47:936-942).

[0148] 암세포의 경우 대사 과정에서 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주

색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. MTT formazan의 흡광도는 550nm 근처 파장에서 최대가 되며, 이는 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하는 것이다.

[0149] 상기한 실시예 시료를 대상으로 문헌에 기재된 방법을 이용하여 MTT 검색법을 하기와 같이 실험을 수행하였다.(Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *CancerRes*.47:936-942.)

[0150] 세포 독성 측정은 Carmichael (Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *CancerRes*.47:936-942.)등의 방법에 따라 측정하였다. HS68 세포(#CRL-1635, ATCC)를 96 well plate에 1×10^4 cells/well이 되게 180㎕ 분주하고, 시료를 농도 별로 조제하여 20㎕ 첨가한 후 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액(M2128, Sigma) 20㎕를 첨가하여 3시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군와 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

[0151] 세포의 생존율을 확인한 결과 우방자 정제물에 대한 HS68 세포의 생존 능력은 diarctigenin은 50ppm이하의 농도에서 세포 생존을 확인 하였다.(도 2).

[0152] **3-2. ELISA kit를 이용한 콜라겐(collagen) 생합성 측정 결과**

[0153] 상기한 실시예 시료를 대상으로 문헌에 기재된 방법을 이용하여 콜라겐 생합성 측정실험을 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[0154] HS 68세포(#CRL-1635, ATCC)를 $1x10^4$ cells/well 농도로 96 well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 첨가하여 CO_2 배양기(MCO18AICS, SANYO)에서 24시간 배양하였다. 이렇게 실험한 세포의 배양액을 모아서 실험에 사용하였다. 세포배양액내 콜라겐 생합성 정도는 procollagen type-ⅠC peptide(PIP) EIA kit(MK101,Takara)을 사용하여 propeptide의 양을 측정하였다.

[0155] 콜라겐 생합성 측정은 세포생존능력 결과를 참고하여 정제물의 생존최고 농도 diarctigenin 50 ppm로 측정하였다. 측정 결과, UV를 조사한 시료 무첨가군을 기준으로 하였을 때 UV를 조사하지 않은 정상 세포의 상등액에서 콜라겐 생합성량이 148%로 측정되었다. UV조사 후 우방자 정제물을 첨가하였을 때 diarctigenin이 145%로 생합성능이 우수하였다.(도 3)

[0156] **3-3. Immunoblot을 이용한 주름에 관여하는 단백질의 측정**

[0157] 상기한 실시예 시료를 대상으로 문헌에 기재된 방법을 이용하여 MMP-1 및 MMP-9 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여 하기와 같이 실험을 수행하였다.(Kwak YJ, Lee DH, Kim NM, Lee JS. Screening and extraction condition of anti-skin aging elastase inhibitor from medicinal plants. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2005;13(6):213-216)

[0158] 본 기술로 생성된 MMP-1, MMP-3, MMP-9의 단백질 양을 측정한다. HS-68(#CRL-1635, ATCC)세포를 이용하여 culture dish에 배양한 뒤 sample 처리를 한 다음 24시간 후에 PBS로 세척한 후 원심분리하여 세포를 수집하고 RIPA buffer(R0278, Sigma)를 사용하여 cell lysate을 제조하였다. 세포 lysate에 함유된 단백질의 양은 Bradford 법(Shim JS, Han YS and Hwang JK. (2009) The effect of 4-hydroxypanduratin A on the mitogen-activated protein kinase-dependent activation of matrix metalloporteinase-1 expression in human skin fibroblasts. *J. Dermatological science*. 53, 129-134.)으로 측정하였다. 단백질 20㎍을 10% polyacrylamide

를 함유한 SDS-PAGE(SE250, HOFER)로 분리하고 PVDF membrane으로 electroblot 120V(18-1130-01, GE Healthcare)에서 1시간을 실시하였다. 이어 PVDF membrane을 5% skim milk(232100, Gibco)에서 1시간 방치한 후에 primary antibody에서 4℃에서 overnight하였다. 다시 완충용액으로 세 번 세척한 후에 secondary antibody를 상온에서 1시간 반응 시킨 후에 TBST로 세 번 세척하고 ECL kit (RPN2109, Amersham-Pharmacia)와 반응시켜 현상되어진 밴드를 LAS 4,000(IQ LAS 4000, GE Healthcare)을 이용하여 정량화 하였다.

[0159] UV조사에 피부 내 MMP활성이 증가되며 피부 내 콜라겐을 현저하게 붕괴시킴으로써 MMP들이 진피층의 콜라겐 붕괴에 영향을 미치며 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보고한 바 있다. 주름과 관계되어진 전사인자들의 단백질 발현을 측정해 본 결과, 도 4 내지 도 6과 같이 나타내었다. MMP-1의 발현을 측정한 결과 diarctigenin이 우수한 저해율을 나타내었다. MMP-9의 발현 억제는 억제수준이 미미하였다.

[0160] **실험예 4. 안정성 및 안정성 실험**

[0161] 상기 실시예에서 수득한 시료들의 피부 안전성을 확인하기 위하여 하기와 같은 시험 조건으로 실험을 실시하였다.

[0162] **4.1. 시험 조건**(도 7)

[0163] ① 시험기관: 코리아나화장품

[0164] ② 시험자: 24~39세 남녀 15명

[0165] ③ 시험시간: 24시간 첩포, 24시간후, 48시간후 판독

[0166] 실험결과, 본 발명의 시료는 피부 안전성 및 안정성 면에서 우수한 것으로 확인되었다(표 5).

표 5

[0167] 본 발명의 화장품 제제의 인체 패취 시험결과

Sample	P/T	
diarctigenin 5.0%	결과	자극도
	0.55	미자극 4

[0168] 이하, 본 발명의 제형예로서 크림, 맛사지크림, 로션, 스킨로션, 에센스, 팩, 클렌징폼의 제형을 예시하고 있으나, 본 발명의 화장품 조성물을 포함하는 제형은 이에 한정되는 것은 아니다.

[0169] **제형예 1. 크림조성물**

[0170] 유상과 수상을 각각 75 ℃로 가열 혼합한 후 실온으로 냉각한다.

[0171]

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	1.0
2	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	1.0
3	친유형 모노스테아린산 글리세린	2.5
4	마이크로 스탈린 납	2.0
5	파라옥시안식향산메틸	0.2
6	파라옥시안식향산프로필	0.1
7	밀납	2.0
8	모노스테아린산 폴리에틸렌글리콜	2.0
9	모노스테아린산 소르비탄	1.0
10	트리 (카프릴, 카프린산) 글리세린	5.0
11	액상 리놀린	5.0
12	미리스틴산 옥틸도데실	8.0
13	스쿠알란	8.0
14	농글리세린	5.0
15	1,3-부틸렌글리콜	5.0
16	알란토인	0.1
17	Diarctigenin	10.0
18	향료	미량
19	황색4호	미량
20	정제수	잔량

[0172] **제형예 2. 맛사지크림 조성물**

[0173] 유상과 수상을 각각 75 ℃로 가열 용해 혼합한 후 실온으로 냉각한다.

[0174]

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	2.0
2	친유형 모노스테아린산 글리세린	2.5
3	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	1.5
4	파라옥시안식향산메틸	0.2
5	파라옥시안식향산프로필	0.1
6	바셀린	3.5
7	모노스테아린산 폴리에틸렌글리콜	3.5
8	세스퀴올레인산 소르비탄	1.8
9	유동 파라핀	35.0
10	트리 (카프릴, 카프린산) 글리세린	3.0
11	옥틸도데칸올	5.0
12	스쿠알렌	2.0
13	농글리세린	5.0
14	diarctigenin	5.0
15	히아루로닉애씨드추출물	1.0
16	향료	미량
17	정제수	잔량

[0175] **제형예 3. 로션 조성물**

[0176] 유상과 수상을 각각 75 ℃로 가열 혼합 유화한 후 실온으로 냉각한다.

[0177]

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	2.0
2	스테아린산	1.0
3	친유형 모노스테아린산 글리세린	1.0
4	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	2.0
5	바셀린	1.0
6	모노스테아린산 폴리에틸렌글리콜	1.5
7	세스퀴올레인산 소르비탄	1.0
8	유동 파라핀	5.0
9	스쿠알렌	5.0
10	파라옥시안식향산프로필	0.2
11	파라옥시안식향산메틸	0.2
12	농글리세린	5.0
13	diarctigenin	15.0
14	트리에탄올아민	0.5
15	카르복시비닐폴리머	0.2
16	향료	미량
17	정제수	잔량

[0178] **제형예 4. 스킨로션 조성물**

[0179] 수상과 에탄올상을 각각 제조 혼합한 후 여과한다.

[0180]

번호	원료명	중량 %
1	글리세린	2.0
2	1,3-부틸렌글리콜	2.0
3	구연산	0.01
4	에탄올	15.0
5	폴리옥시에틸렌경화피마자유	1.0
6	diarctigenin	2.5
7	향료	미량
8	위치하젤추출물	1.0
9	정제수	잔량

[0181] **제형예 5. 에센스 조성물**

[0182] 수상과 에탄올상을 각각 제조 혼합한 후 여과한다.

[0183]

번호	원료명	중량 %
1	농글리세린	15.0
2	1,3-부틸렌글리콜	5.0
3	알란토인	0.1
4	에탄올	7.0
5	파라옥시안식향산메틸	0.15
6	트리에탄올아민	0.15
7	폴리옥시에틸렌경화피마자유	1.0
8	초산토코페롤	0.5
9	카르복시비닐폴리머	0.15
10	diarctigenin	30.0
11	향료	미량
12	정제수	잔량

[0184] **제형예 6. 팩 조성물**

[0185] 수상과 에탄올상을 각각 분산 용해하여 혼합시킨 후 실온으로 냉각한다.

[0186]

번호	원료명	중량 %
1	폴리비닐알코올	15.0
2	카르복시메틸셀룰로이스나트륨	0.3
3	농글리세린	3.0
4	알란토인	0.1
5	에틸렌디아민테트라초산디나트륨	0.01
6	폴리에틸렌글리콜	1.0
7	에탄올	6.0
8	파라옥시안식향산메틸	0.15
9	타라옥시안식향산프로필	0.05
10	디엘판테놀	0.1
11	폴리옥시에틸렌(12)노닐페닐에테르	0.5
12	diarctigenin	45.0
13	향료	미량
14	정제수	잔량

[0187] **제형예 7. 클렌징폼 조성물**

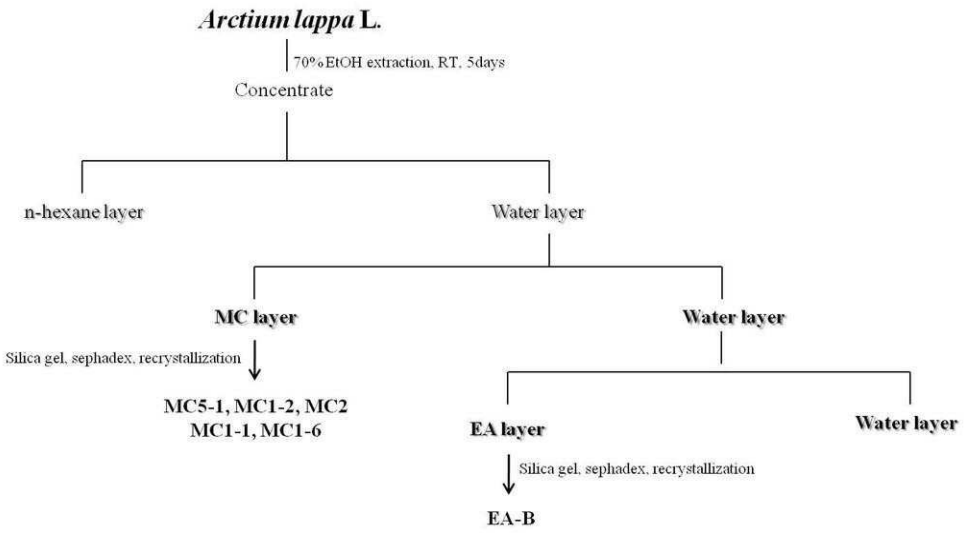
[0188] 수상과 오일상을 각각 분산 용해하여 혼합 검화한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	스테아린산	6.5
2	미리스틴산	28.0
3	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	3.0
4	프로필렌 글리콜	5.0
5	농글리세린	10.0
6	수산화나트륨	7.0
7	에틸렌디아민테트라초산나트륨	0.1
8	태반 추출물	0.5
9	diarctigenin	15.0
10	향료	미량
11	정제수	잔량

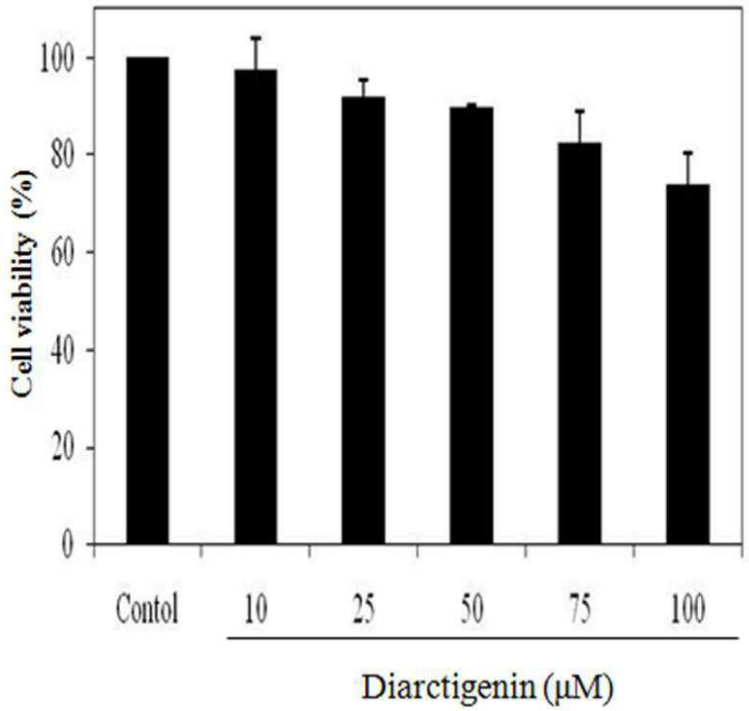
[0189]

도면

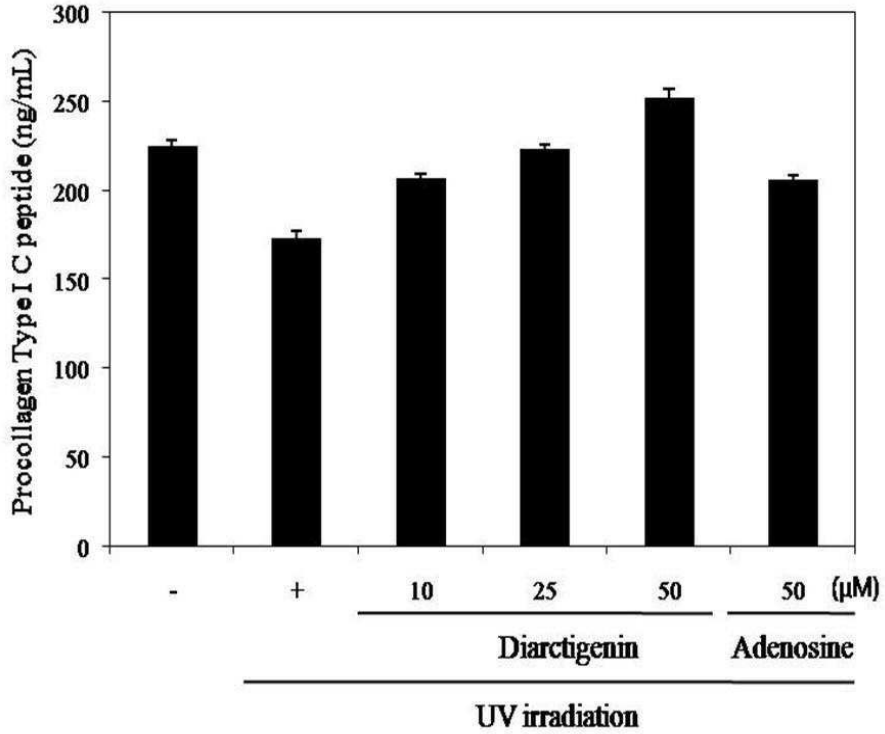
도면1



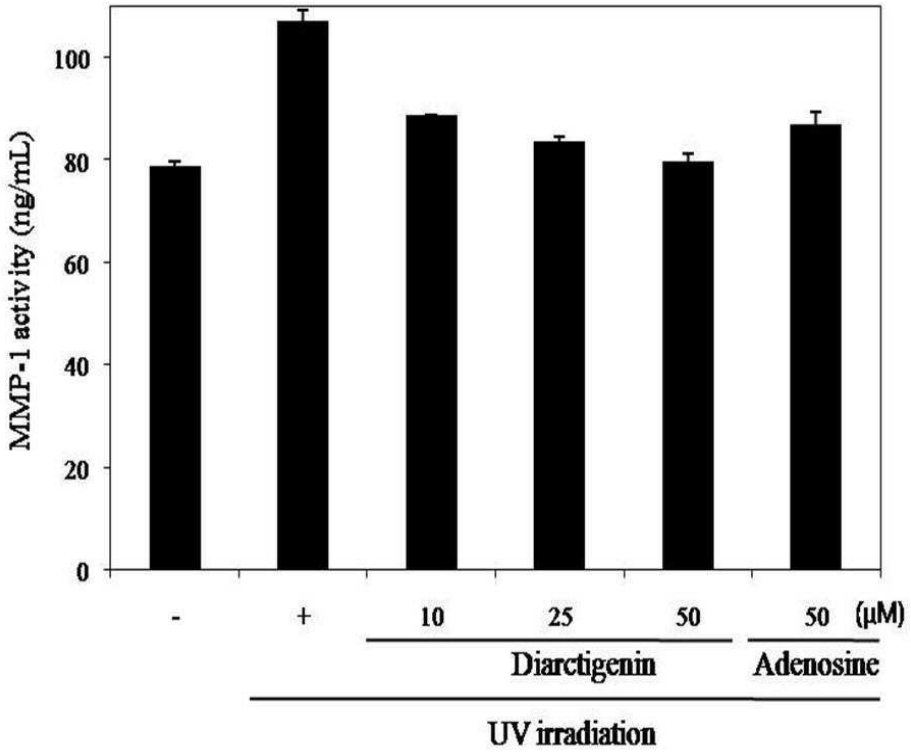
도면2


Cell viability (%)
100
80
60
40
20
0
Contol
10
25
50
75
100
Diarctigenin (μM)

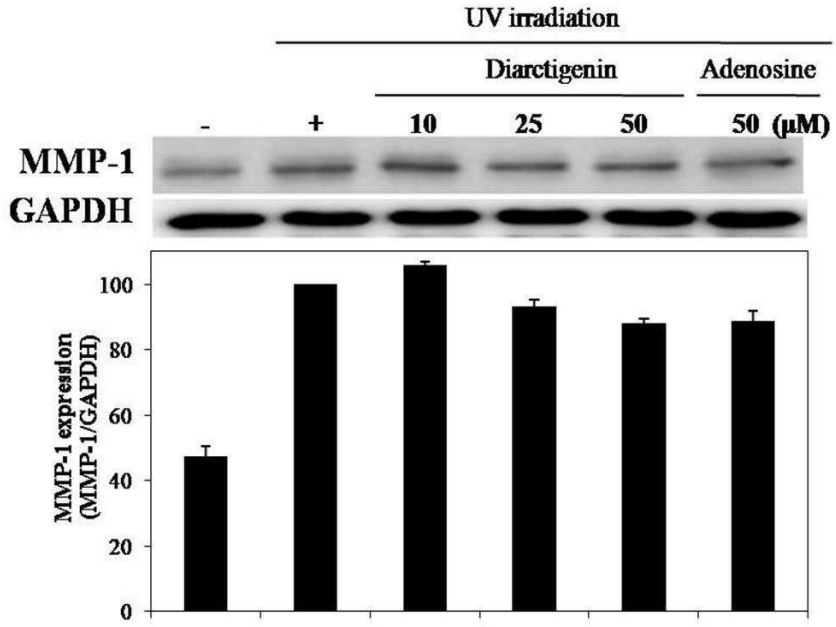
도면3


Procollagen Type I C peptide (ng/mL)
300
250
200
150
100
50
0
-
+
10
25
50
50
(μM)
Diarctigenin
Adenosine
UV irradiation

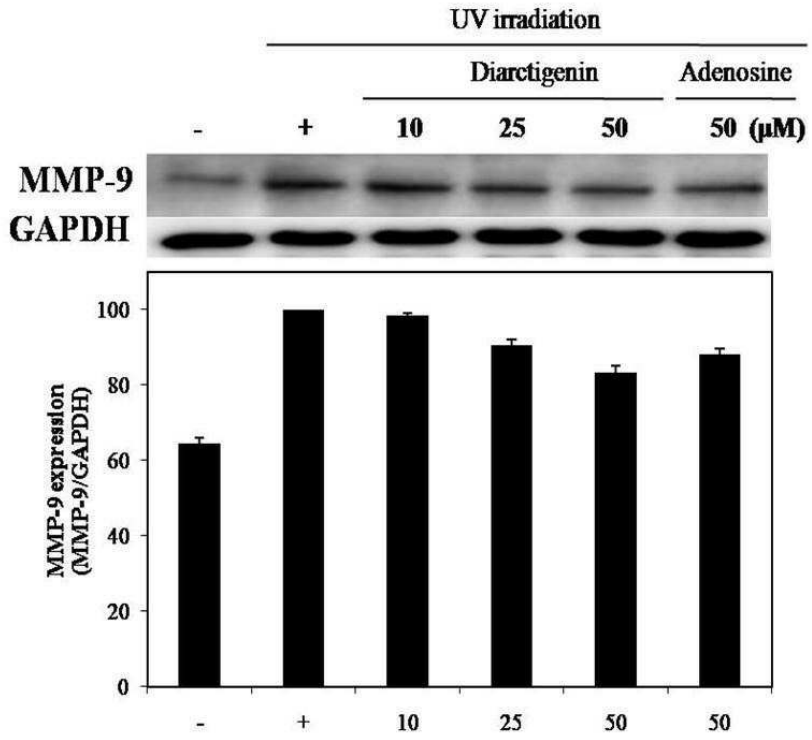
도면4


MMP-1 activity (ng/mL)
100
80
60
40
20
0
-
+
10
25
50
50 (μM)
Diarctigenin
Adenosine
UV irradiation

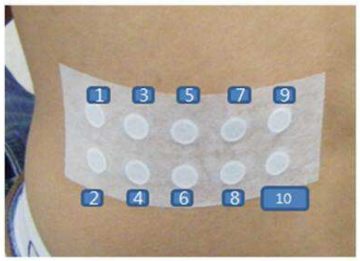
도면5


UV irradiation
Diarctigenin
Adenosine
-
+
10
25
50
50 (μM)
MMP-1
GAPDH
MMP-1 expression (MMP-1/GAPDH)
100
80
60
40
20
0

도면6


UV irradiation
Diarctigenin
Adenosine
-
+
10
25
50
50 (μM)
MMP-9
GAPDH
MMP-9 expression
(MMP-9/GAPDH)
100
80
60
40
20
0
-
+
10
25
50
50

도면7



판정