



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월01일
 (11) 등록번호 10-1863297
 (24) 등록일자 2018년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 8/37 (2006.01) A61K 31/216 (2006.01)
 A61K 31/7048 (2006.01) A61K 8/02 (2006.01)
 A61K 8/60 (2006.01) A61K 8/97 (2017.01)
 A61K 9/06 (2006.01) A61K 9/70 (2006.01)
 A61Q 19/08 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
 A61K 8/37 (2013.01)
 A61K 31/216 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2016-0039997
 (22) 출원일자 2016년04월01일
 심사청구일자 2016년04월01일
 (65) 공개번호 10-2017-0112651
 (43) 공개일자 2017년10월12일
 (56) 선행기술조사문헌
 [논문] Chem.Pharm.Bull. 2011, Vol.59(6),
 pp.793-796 (2011.03.15. 온라인공개)
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자
 (주)에스디생명공학
 서울특별시 강서구 공항대로61길 29, c동 301호(등촌동, 신기술창업센터)
 (72) 발명자
 이태후
 서울특별시 강남구 논현로 807 정지행한의원
 황은선
 경기도 용인시 기흥구 서천로172번길 21-3 202호
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 안창우

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 이연주

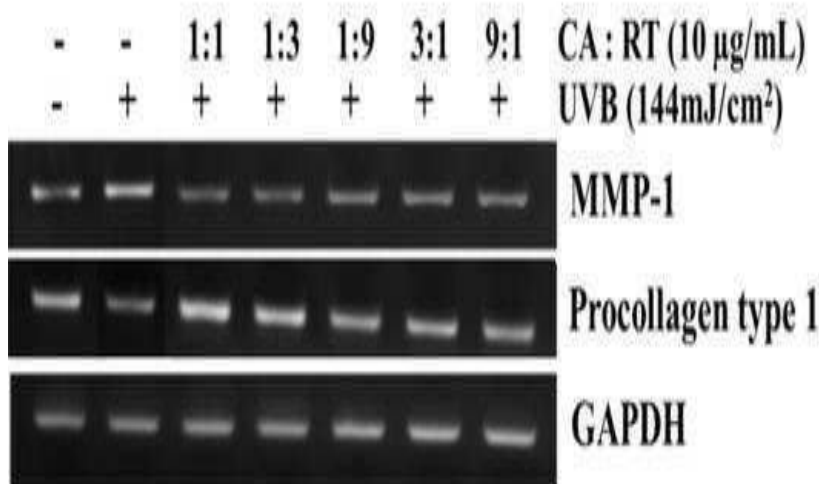
(54) 발명의 명칭 **클로로젠산 및 루틴 화합물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 예방 또는 개선용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 클로로젠산 및 루틴 화합물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 인간 진피 섬유 아세포들에서 MMP-1의 발현을 억제하고, 타입 I 프로콜라겐의 발현을 현저하게 증가시킴으로써, 피부 주름의 발생을 예방하고, 손상된 피부의 주름을 개선하는 효능을 나타낸다. 종합적으로, 본 발명의 조성물은 피부 주름을 예방하고 크게 개선시킬 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 31/7048 (2013.01)
A61K 8/02 (2013.01)
A61K 8/602 (2013.01)
A61K 8/97 (2013.01)
A61K 9/06 (2013.01)
A61K 9/70 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)

(72) 발명자

박상용

경기도 수원시 영통구 광고중앙로 247, 3201동 90
7호

김슬아

경기도 용인시 기흥구 서천동로43번길 9-11, 만성
빌 301호

박봄

경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 76, 6103동
701호

서슬아

전라북도 군산시 미장13길 33 (미장동, 제일풍경채
아파트) 108동 603호

박재희

서울특별시 송파구 풍성로14길 15-1, 102호

(56) 선행기술조사문헌

[논문] Evidence-based complementary and
alternative medicine, 2013, Article ID:
827248, pp. 1-10 (2013 공개)

[논문] Moleculaes 2014, Vol.19, pp.12940-12948
(2014.08.25. 온라인공개)

[논문] J. Korean. Soc. Appl. Biol. Chem. 2010,
Vol.53(6), pp.677-684 (2010 공개)

W02008134712 A2

명세서

청구범위

청구항 1

클로로젠산 및 루틴 화합물을 유효성분으로 포함하고,

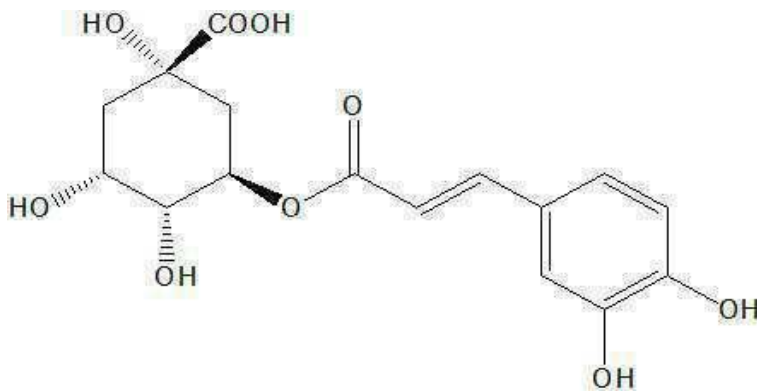
상기 클로로젠산 및 상기 루틴 화합물의 혼합비율은 중량기준으로 9:1 내지 1:9의 비율인 것을 특징으로 하는 피부 주름 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 2

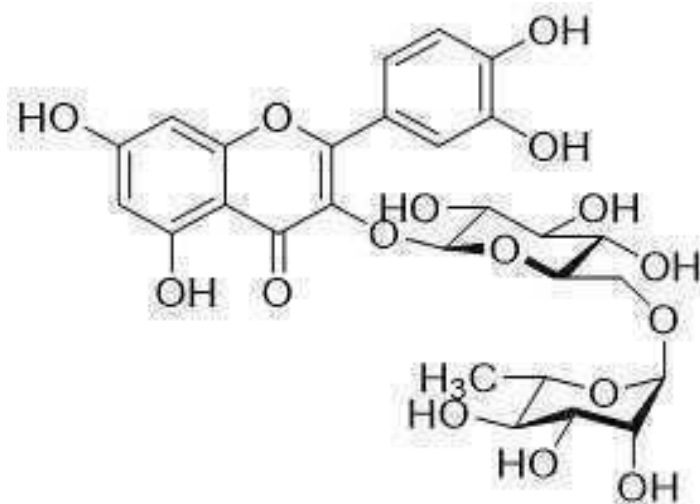
제1항에 있어서,

상기 클로로젠산은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이고, 상기 루틴은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 피부 주름 예방 또는 개선용 화장품 조성물

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 캐모마일 꽃 추출물, 로즈마리 잎 추출물, 할미꽃 잎 추출물, 어스니아 추출물, 인삼 추출물, 유카리투스 잎 추출물, 제라늄 꽃 추출물, 고삼 추출물 유칼립투스 추출물, 타임 추출물, 성모초 추출물, 썬기풀 추출물, 야로우 추출물, 클로브 추출물, 펜넬 추출물, 파파야잎 추출물, 해바라기 추출물, 및 안젤리카 추출물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 식물 추출물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 주름 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맞사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저에서 선택된 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 피부 주름 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피부 주름 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 클로로겐산 및 루틴 화합물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 예방 또는 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 피부의 일차적인 기능은 온도, 습도 및 자외선 등과 같은 외부자극으로부터 인체를 보호하고, 체온조절, 호흡 및 배출작용 등의 다양한 역할을 수행하는 중요한 기능을 담당한다. 그러나 나이가 들면서 이러한 기능들이 점차 약화되고 피부의 노화가 진행된다. 특히, 피부 장벽의 기능을 수행하는 지질층의 지질조성과 함량이 변화하면서 그 기능이 급격히 저하되어 피부 수분 함량이 감소하게 되면서 피부가 건조해지고 기미, 주근깨, 색소 침착 및 다양한 피부 병변이 유발된다. 또한 피부가 외부로부터 강한 자외선, 스트레스 및 영양결핍 등과 같은 자극을 받게 되면 주름생성, 탄력손실 및 각화 등과 같은 피부의 노화가 더욱 가속화된다.

[0004] 한편, 피부 주름은 피부 수분함량, 콜라겐 함량 및 외부 환경에 대한 면역력 등 여러 가지 요소들에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 이중 주름의 형성에 가장 큰 영향을 미치는 것은 콜라겐의 생성량 및 콜라겐 분해 효소인 콜라게네이스의 발현과 활성이다. 콜라겐은 피부 진피층에 존재하는데, 피부 전체 건조 중량의 약 70 내지 80%를 차지하는 엘라스틴과 함께 피부에 탄력을 부여하는 주요 성분으로 알려져 있다. 콜라겐은 자연 노화에 따른 세포활성 저하와 같은 내부 요인에 의해 감소되고, 여러 유해 환경에서의 스트레스 증가나 태양 광선에 의한 활성 산소 종의 증가와 같은 외부 요인에 의하여 생합성이 감소되거나, 분해가 촉진되고 있다.

[0005] 이와 같이 콜라겐 감소를 저해하여 피부 주름개선에 효과가 있는 천연물질을 탐색하고자 하는 여러 다양한 시도가 있었다. 콜라겐의 주름개선 효과를 이용하기 위하여 화장품 또는 연고 등과 같은 피부외용제 조성물에 콜라겐을 배합한 제품들이 출시되었으나, 이들 제품들은 콜라겐 자체를 피부 표면에 도포하는 것으로 고분자 물질인 콜라겐의 경피 흡수가 어려워 본질적인 주름개선 효과를 나타낼 수 없었다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 콜라겐합성 촉진물질에 대한 관심이 높아졌으며, 종래 알려진 콜라겐합성 촉진물질로는 비타민C, 레티노익산, 형질전환성장인자(transforming growth factor, TGF), 동물태반 유래의 단백질(JP8-231370), 베틀린산(betulinic acid, JP8-208424), 클로렐라 추출물(JP9-40523, JP10-36283, 섬유아세포 증식 촉진작용) 등이 있다. 그러나 상기 물질은 피부 적용시 자극과 발적 등 안전성 문제로 사용량에 제한이 있거나 그 효과가 미미하여 실질적으

로 주름개선 효과를 기대할 수 없다는 문제점이 있다. 따라서 종래 주름개선용 조성물보다 생체에 안전하고 주름개선 효과가 높은 새로운 주름개선 조성물의 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0006] 그러나, 단일 성분으로 효과가 있는 천연 물질이 개발되어 상용화 되지는 못하고 있는 실정이고, 시중에서는 하나 이상의 천연 물질을 혼합하여 사용되고 있다.

[0007] 실제 시장에서 판매되고 있는 대다수의 복합 성분 제품들을 실제 구입하여 사용하는 경우에도 실험실 단계에서 검증되었던 효과에 크게 못 미치는 효과를 나타내고, 이로 인해 소비자의 기대치에 부응하지 못하고 사라지고 있으며, 지금까지는 피부 주름개선에 효과를 나타내는 천연물질이 대중화되어 시장에서 널리 사용되지 못하고 있는 실정이다.

[0009] 한편, 카페익산과 퀘산의 에스테르인 클로로젠산은 커피콩 및 커피콩으로 만든 식품에서 추출되는 대표적인 페놀레익 복합체[Olthof MR. et al. J. Nutr., 131 (2001) 66-71]로서 강력한 항산화제로 알려져 있으며[Iwai K. et al. Food Chem., 52 (2004) 4893-4898] 항염제, 진통제 및 해열제[dos Santos MD. et al. Biol. Pharm. Bull., 29 (2006) 2236-2240]로서의 그 기능이 보고되었다.

[0010] 또한, 루틴(Rutin)은 콩과(Leguminosae) 식물인 회화나무(Sophora japonica)의 꽃봉오리 또는 마디풀과(Polygonaceae)의 식물인 메밀(Fagopyrum esculentum) 등에서 추출되는 물질로, 연한 노란색의 바늘 모양결정 형태이다. 이러한 루틴은 모세혈관을 강화시키는 효능이 있어 동맥경화, 고혈압, 뇌출혈 등과 같은 심장계 질환을 예방하고, 당뇨병이나 비만 등을 치료하는 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 상기 클로로젠산, 루틴의 여러 가지 이로운 생리적 작용에 대한 선행연구는 있지만, 클로로젠산 및 루틴의 조합이 자외선 유도된 피부 주름에 예방 및 개선에 대한 연구는 지금까지 진행된바 없었다.

[0012] 이에, 본 발명자들은 피부 주름개선에 효과를 나타내는 천연물질을 탐색하여 제품화 하고자 예의 연구 노력한 결과, 상기 클로로젠산과 루틴 화합물을 혼합하여 피부에 사용하는 경우, 콜라겐의 분해 저해와 합성 증진을 통해 피부 주름개선에 뛰어난 시너지 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 하나 이상의 천연물질을 조합하여 피부 주름 예방 또는 개선에 시너지 효과를 갖는 조성물을 제공하는 데 있다.

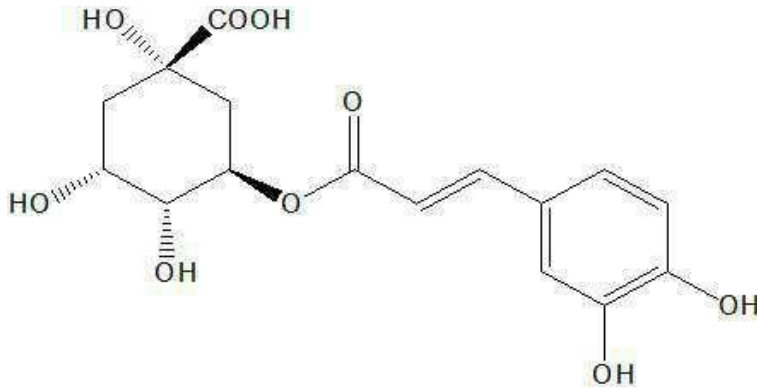
과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 클로로젠산 및 루틴 화합물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명자들은 피부 주름개선 및 피부노화 방지에 효능이 있는 물질을 찾고자 여러 가지 천연물질들 중에서 유효한 물질을 검색한 결과, 상기 성분들을 혼합한 조성물이 우수한 피부 주름 예방 및 개선 작용의 효과가 있음을 발견하였고, 또한 피부에 적용시 안전성에도 문제가 없음을 확인하였다.

[0018] 본 발명에서 사용되는 용어 "클로로젠산(chlorogenic acid)"은 C₁₆H₁₈O₉의 화학식을 가지며 분자량이 약 354.31인 물질로서, 바람직하게는 하기 화학식 1의 화합물로 표시될 수 있다.

[0019] [화학식 1]

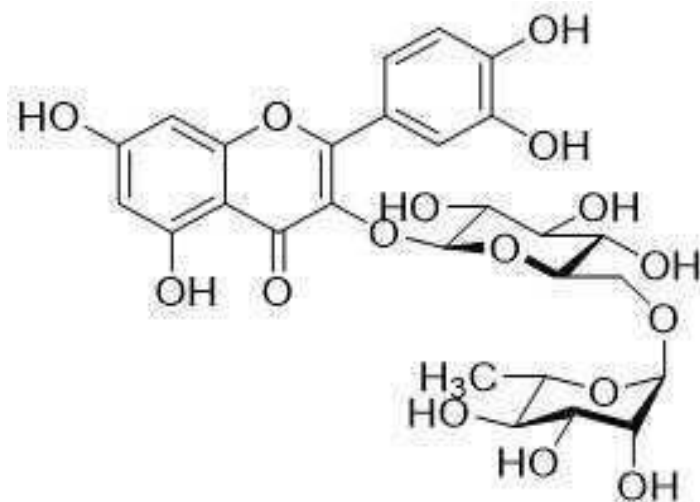


[0020]

[0022] 본 발명에서 제시하는 클로로젠산은 특별한 언급이 없는 한 클로로젠산 염 및 이의 광학 이성질체를 모두 포함하며, 주름개선 소재로 사용될 수 있다. 상기 클로로젠산이 염의 형태로 사용하는 경우, 유효성분인 클로로젠산에 관하여 존재하는 염 중에서 항박테리아제, 항진균제, 식품보존첨가제, 화장품 첨가제 또는 항진균용 농약으로서 허용되는 염을 선택하면 양호하다. 대표적으로, 상기 염으로는 염산염, 황산염, 질산염, 인산염, 브롬화수소산염, 요드화수소산염 등의 무기산의 산부가염, 또는 아세트산염, 옥살산염, 마론산염, 숙식산염, 마레인산염, 푸말산염, 젯산염, 말산염, 시트르산염, 타르타르산염, 메탄술폰산염, 에탄술폰산염 등의 유기산의 부가염을 들 수 있다. 클로로젠산의 인체에 대한 독성 여부는 선행 기술을 통해 항염제, 진통제 및 해열제, 백혈병 치료제, 당뇨병 치료제, 심혈관 질환 치료제 등의 용도가 공지되어 있는 바, 이들 용도를 통해 인체에 대한 독성이 없음을 알 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "루틴(rutin)"은 $C_{27}H_{30}O_{16}$ 의 화학식을 가지며 분자량이 약 611인 플라보노이드의 일종으로 메밀이나 콩과 식물의 추출물로부터 또는 합성으로부터 얻을 수 있으며, 바람직하게는 하기 화학식 2의 화합물로 표시될 수 있다.

[0025] [화학식 2]



[0026]

[0028] 본 발명의 루틴 화합물은 피부 주름개선에 효과를 가지고 있을 뿐만 아니라, 뛰어난 피부 매트릭스 구성성분의 합성 능력을 통해 전반적인 피부 상태를 개선해 줄 수 있다. 본 발명의 조성물은 상기 루틴 화합물의 화장품학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명은 다양한 주름개선 소재를 조합하여 시너지적인 효과를 가지는 조합을 규명하기 위해 노력한 결과, 상기와 같이 클로로젠산 및 루틴의 시너지적인 효과를 규명하여 완성된 것이다. 따라서 클로로젠산 또는 루틴을 각각 포함하는 조성물보다 본 발명의 클로로젠산 및 루틴을 모두 포함하는 조성물은 피부주름의 예방 또는 개선에 현저한 효과, 즉 시너지적인 효과를 가진다.

[0030] 본 발명에서 용어, "피부 주름"이란, 피부가 쇠하여 생긴 잔줄을 의미하는데, 유전자에 의한 원인, 피부 진피에

존재하는 콜라겐의 감소, 외부 환경 등에 의해 유발될 수 있다.

- [0031] 본 발명에서 "피부 주름 예방 또는 개선"이란, 피부에 주름이 생성되는 것을 억제 또는 저해하거나, 이미 생성된 주름을 완화시키는 것을 말한다.
- [0032] 피부 섬유아세포의 주된 기능으로 세포외기질 합성과 증식을 통한 손상된 피부 조직 재생 등을 들 수 있는데, 광노화와 같은 외인성노화 요인 또는 유리 산소에 의한 손상 누적, 텔로미어 단절로 인한 세포 노화 등에 따른 내인성 노화 요인들은 진피층 내에 있는 피부섬유아세포의 생리 활성 기능을 저하시키게 된다. 피부 세포외기질 중 95% 이상을 차지하고, 세포의 부착분자(adhesion molecule) 및 세포 골격(cytoskeleton) 등과의 상호 작용과 신호 교류를 통해 섬유아세포의 생리 활성에 매우 주요한 부분을 담당하는 제I형 콜라겐의 합성이 저하될 경우, 피부 조직 내 콜라겐 양이 감소되고, 이에 따라 표면 장력이 감소되어 피부 탄력이 저하되고 피부 주름이 형성될 뿐만 아니라, 세포의 증식 및 재생 기능을 포함하는 생리 활성 기능이 감소하는 악순환의 원인이 된다.
- [0033] 따라서, 피부섬유아세포의 콜라겐은 피부 재생, 피부 탄력, 피부 주름 형성 및 피부 손상 시 조직의 수복 또는 재생과 직접적인 관련이 있다고 볼 수 있다.
- [0034] 즉, 피부 섬유아세포의 콜라겐 또는 프로콜라겐의 합성이 촉진되면, 피부 탄력 개선, 피부 재생, 피부 주름 개선, 상처 치유, 손상된 피부 조직의 수복 및 재생; 및 피부 노화 방지 등의 효과를 얻을 수 있다.
- [0035] 따라서 본 발명의 상기 클로로겐산 및 루틴을 포함하는 조성물은 자외선 조사된 정상 인간 진피 섬유아세포(NHDF)에서 세포 독성을 저감시키고, 콜라겐 분해를 촉진시키는 기질 단백질 분해효소(matrixmetalloproteinase, 이하 'MMP'라 칭함)의 발현을 억제시키면서, 타입 I 프로콜라겐 레벨을 증가시키는 바, 피부 탄력 증가, 피부 재생, 피부 주름 개선, 상처 치유, 손상된 피부 조직의 수복 및 재생; 및 피부 노화 방지 등의 효과 등을 가질 수 있다. 구체적으로는 피부주름의 예방 또는 개선의 효과를 가질 수 있다(도 3 및 도 4 참조).
- [0036] 본 발명에서 상기 클로로겐산 및 상기 루틴 화합물의 혼합비율은 중량기준으로 바람직하게는 9 : 1 내지 1 : 9 일 수 있고, 상기 혼합 조성물은 바람직하게는 0.01 μ g/ml 내지 25 μ g/ml의 용량으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 바람직한 실시예에서는 상기 클로로겐산 및 상기 루틴 화합물의 혼합비율을 9 : 1 내지 1 : 9 의 비율로 혼합하여 처리한 시험군에서 이들을 각각 단독으로 사용하는 경우에 비해 현저히 개선된 주름생성의 예방 및 생성된 주름의 개선에 효과가 있음을 확인할 수 있었다(도 5 및 6 참조).
- [0038] 본 발명의 피부 주름 예방 또는 개선용 화장품 조성물에 함유된 클로로겐산 및 루틴 화합물은 그 자체로 피부 주름을 제거하는 효과가 있으며, 기존에 알려진 피부 주름 예방 및 개선에 효과가 있다고 공지된 물질들과 혼합하여 사용하는 경우에도 피부 주름의 예방 및 개선 효과를 지속적으로 유지할 수 있다.
- [0039] 상기 피부 주름개선에 효과가 있는 물질로는 이에 제한되지는 않으나, 캐모마일 꽃 추출물, 로즈마리 잎 추출물, 할미꽃 잎 추출물, 어스니어 추출물, 인삼 추출물, 유카리투스 잎 추출물, 제라늄 꽃 추출물, 고삼 추출물, 유칼립투스 추출물, 타임 추출물, 성모초 추출물, 췌기풀 추출물, 야로우 추출물, 클로브 추출물, 펜넬 추출물, 파파야잎 추출물, 해바라기 추출물, 및 안젤리카 추출물 등이 있다.
- [0040] 이외에도 본 발명의 화장품 조성물은 수용성 비타민, 지용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스펅고 지질 및 해초 엑기스 등을 더 포함할 수 있다.
- [0041] 상기 수용성 비타민으로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것도 될 수 있으나, 바람직하게는 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B6, 피리독신, 엽산피리독신, 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. 상기 수용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 수득할 수 있다.
- [0042] 상기 지용성 비타민으로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것도 될 수 있으나, 바람직하게는 비타민 A, 카로틴, 비타민 D2, 비타민 D3, 비타민 E (d1-알파 토크페롤, d-알파 토크페롤, d-알파 토크페롤) 등을 들 수 있으며, 그들의 유도체(팔미틴산아스코르빈, 스테아르산아스코르빈, 디팔미틴산아스코르빈, 아세트산d1-알파 토크페롤, 니코틴산d1-알파 토크페롤비타민 E, DL-판토텐닐알코올, D-판토텐닐알코올, 판토텐닐에틸에테르 등) 등

도 본 발명에서 사용되는 지용성 비타민에 포함된다.

- [0043] 상기 고분자 펩티드로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것도 될 수 있으나, 바람직하게는 콜라겐, 가수분해 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴, 가수분해 엘라스틴, 케라틴 등을 들 수 있다. 상기 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.
- [0044] 상기 고분자 다당으로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것도 될 수 있으나, 바람직하게는 히드록시에틸셀룰로오스, 크산탄검, 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.
- [0045] 상기 스펅고 지질로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것도 될 수 있으나, 바람직하게는 세라미드, 피토스핑고신, 스펅고당지질 등을 들 수 있다. 상기 스펅고 지질은 통상 포유류, 어류, 패류, 효모 또는 식물 등으로부터 통상의 방법에 의해 정제하거나 화학 합성법에 의해 취득할 수 있다.
- [0046] 상기 해초 엑기스로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것도 될 수 있으나, 바람직하게는 갈조 엑기스, 홍조엑기스, 녹조 엑기스 등을 들 수 있으며, 또한, 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.
- [0047] 본 발명의 화장료에는 상기 필수 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분을 배합할 수 있다.
- [0048] 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 자외선 흡수제, pH 조정제, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한제, 정제수 등을 들 수 있다.
- [0049] 상기 유지 성분으로는 에스테르계 유지, 탄화수소계 유지, 실리콘계 유지, 불소계 유지, 동물 유지, 식물 유지 등을 들 수 있다.
- [0050] 상기 에스테르계 유지로는 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-에틸헥산산트리메틸올프로판, 트리아이소스테아르산트리메틸올프로판, 테트라2-에틸헥산산펜타엘리글리콜, 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, 트리아이소팔미틴산글리세릴, 트리아이소스테아르산글리세릴, 네오펜탄산옥틸도데실, 옥탄산이소스테아릴, 이소노난산옥틸, 네오데칸산헥실데실, 네오데칸산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 이소스테아르산이소스테아릴, 이소스테아르산옥틸데실, 폴리글리세린올레인산에스테르, 폴리글리세린이소스테아르산에스테르, 시트르산트리아이소세틸, 시트르산트리아이소알킬, 시트르산트리아이소옥틸, 락트산라우릴, 락트산미리스틸, 락트산세틸, 락트산옥틸데실, 시트르산트리에틸, 시트르산아세틸트리에틸, 시트르산아세틸트리부틸, 시트르산트리옥틸, 말산디아소스테아릴, 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.
- [0051] 상기 탄화 수소계 유지로는 스쿠알렌, 유동 파라핀, 알파-올레핀올리고머, 이소파라핀, 세레신, 파라핀, 유동이소파라핀, 폴리부텐, 마이크로크리스탈린왁스, 왁셀린 등의 탄화 수소계 유지 등을 들 수 있다.
- [0052] 상기 실리콘계 유지로는 폴리메틸실리콘, 메틸페닐실리콘, 메틸시클로폴리실록산, 옥타메틸폴리실록산, 데카메틸폴리실록산, 도데카메틸시클로실록산, 디메틸실록산·메틸세틸옥시실록산 공중합체, 디메틸실록산·메틸스테알

록시실록산 공중합체, 알킬 변성 실리콘유, 아미노 변성 실리콘유 등을 들 수 있다.

- [0053] 상기 불소계 유지로는 퍼플루오로폴리에테르 등을 들 수 있다.
- [0054] 상기 동물 또는 식물 유지로는 아보카도유, 아르몬드유, 올리브유, 참깨유, 쌀겨유, 새플라워유, 대두유, 옥수수유, 유채유, 행인유, 팜핵유, 팜유, 피마자유, 해바라기유, 포도종자유, 면실유, 아자유, 쿠쿠이너트유, 소맥 배아유, 쌀 배아유, 시아버터, 월견초유, 마커데미아너트유, 메도홍유, 난황유, 우지(牛脂), 마유, 명크유, 오렌지라피유, 호호바유, 캔테리러왁스, 카르나바왁스, 액상 라놀, 경화피마자유 등의 동물 또는 식물 유지를 들 수 있다.
- [0055] 상기 보습제로는 수용성 저분자 보습제, 지용성 분자 보습제, 수용성 고분자, 지용성 고분자 등을 들 수 있다.
- [0056] 상기 수용성 저분자 보습제로는 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.
- [0057] 상기 지용성 저분자 보습제로는 콜레스테롤, 콜레스테롤에스테르 등을 들 수 있다.
- [0058] 상기 수용성 고분자로는 카르복시비닐폴리머, 폴리아스파라긴산염, 트라가칸트, 크산단검, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 수용성키틴, 키토산, 텍스트린 등을 들 수 있다.
- [0059] 상기 지용성 고분자로는 폴리비닐피롤리돈·에이코센 공중합체, 폴리비닐피롤리돈·헥사데센 공중합체, 니트로셀룰로오스, 텍스트린지방산에스테르, 고분자 실리콘 등을 들 수 있다.
- [0060] 상기 에몰리엔트제로는 장쇄아실글루타민산콜레스테릴에스테르, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 12-히드록시스테아르산, 스테아르산, 로진산, 라놀린지방산콜레스테릴에스테르 등을 들 수 있다.
- [0061] 상기 자외선 흡수제로는 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.
- [0062] 상기 pH 조정제로는 시트르산, 시트르산나트륨, 말산, 말산나트륨, 프말산, 프말산나트륨, 숙신산, 숙신산나트륨, 수산화나트륨, 인산일수소나트륨 등을 들 수 있다.
- [0063] 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 내지 5 중량부, 보다 바람직하게는 0.01 내지 3 중량부로 배합될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 조성물을 함유하여 제조된 화장료는 용액, 유화물, 점성형 혼합물 등의 형상을 취할 수 있다.
- [0065] 또한, 본 발명의 상기 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 성분 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 안료 및 천연향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함할 수 있다.
- [0066] 상기 천연향료로는 레몬 오일, 로즈 오일, 라벤더 오일, 베가모트 오일, 서양 박하 오일, 유칼립투스오일, 제라늄 오일, 정향 오일, 신나몬 오일, 오렌지 오일, 자스민 오일, 로즈마리 오일, 아니스 열매 오일, 페퍼민트 오일, 백단 오일, 일랑일랑 오일, 1,8-시네올레, 멘톨, 테르피놀 하이드레이트, 리모넨, α-피넨 및 에우게놀로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 천연 향료일 수 있다.
- [0067] 본 발명의 조성물은 피부 주름 예방 및 개선 효과를 갖는 화장품 또는 세안제 등에 다양하게 이용될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩 등과 같은 화장품류와 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저

등이 있다.

- [0069] 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.
- [0070] 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.
- [0071] 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.
- [0072] 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.
- [0074] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 클로로겐산 및 루틴 화합물을 유효성분으로 포함하는 피부 주름 예방 또는 개선용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0075] 상기 클로로겐산 및 루틴 화합물은 각각 상기 화학식 1 및 화학식 2의 화합물로 표시될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 피부 주름 예방 또는 개선용 약학적 조성물에서, 상기 클로로겐산 및 상기 루틴 화합물의 혼합비율은 중량기준으로 바람직하게는 9 : 1 내지 1 : 9 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0077] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0078] 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합하여 사용될 수 있다.
- [0079] 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0080] 본 발명의 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0081] 본 발명의 조성물은 피부에 적용할 수 있는 피부 외용제 제형으로서 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용제 형태로 피부에 직접 투여될 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0082] 본 발명의 혼합 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있으며, 바람직하게는 0.01 μ g/ml 내지 25 μ g/ml의 용량으로 투여될 수 있다. 외용투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0084] 본 발명의 화장료 및 약학적 조성물은 그 자체적으로 피부 주름 예방 또는 개선의 효과가 있으므로 피부 주름 예방 또는 개선용 조성물로 바로 이용될 수 있고, 피부 주름 예방 및 개선에 효과가 있는 천연 추출물들을 함유하는 다른 성분과 혼합하여 사용하는 형태로도 이용이 가능하여 기존의 피부 주름 예방 또는 개선 효과를 좀 더 높여줄 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 효과

- [0086] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명의 조성물은 인간 진피 섬유 아세포들에서 MMP-1의 발현을 억제하고, 타입 I 프로콜라겐의 발현을 현저하게 증가시킴으로써, 피부 주름의 발생을 예방하고, 손상된 피부의 주름을 개선하는

효능을 나타낸다. 종합적으로, 본 발명의 조성물은 피부 주름을 예방하고 크게 개선시킬 수 있다.

[0087] 또한, 본 발명의 조성물은 인체에 매우 안전할 뿐만 아니라, 안정성도 매우 탁월하다.

도면의 간단한 설명

[0089] 도 1은 쾨넬(*Foeniculum vulgare*)에서 클로로젠산 및 루틴을 추출하고 분석한 결과를 보여주는 그림이다.

도 2는 UVB 조사 전, 무처리(음성 대조군)된 인간 진피 섬유상세포들에서 세포 독성; 및 UVB 조사 전, 클로로젠산, 루틴 및 그의 조합 처리(10 μ g/ml)된 인간 진피 섬유상세포들에서 세포 독성을 측정된 그래프이다.

도 3은 UVB 조사 전, 무처리된 인간 진피 섬유상세포들에서 MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 mRNA 레벨; UVB 조사 후, 무처리된 인간 진피 섬유상세포들에서 MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 mRNA 레벨; 및 UVB 조사 후, 클로로젠산, 루틴 및 그의 조합이 처리(10 μ g/ml)된 인간 진피 섬유상세포들에서 MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 mRNA 발현 수준을 측정된 사진이다.

도 4는 UVB 조사 전, 무처리된 인간 진피 섬유상세포들에서 MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 mRNA 레벨; UVB 조사 후, 무처리된 인간 진피 섬유상세포들에서 MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 mRNA 레벨; 및 UVB 조사 후, 클로로젠산, 루틴 및 그의 조합이 처리(10 μ g/ml)된 인간 진피 섬유상세포들에서 MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 mRNA 발현 수준을 도식화하여 나타낸 그래프이다.

도 5는 UVB 조사 전, 무처리된 인간 진피 섬유상세포들에서 MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 mRNA 레벨; UVB 조사 후, 무처리된 인간 진피 섬유상세포들에서 MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 mRNA 레벨; 및 UVB 조사 후, 클로로젠산 및 루틴의 배합 비율을 달리하여 처리(10 μ g/ml)된 인간 진피 섬유상세포들에서 MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 mRNA 발현 수준을 측정된 사진이다.

도 6은 UVB 조사 전, 무처리된 인간 진피 섬유상세포들에서 MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 mRNA 레벨; UVB 조사 후, 무처리된 인간 진피 섬유상세포들에서 MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 mRNA 레벨; 및 UVB 조사 후, 클로로젠산 및 루틴의 배합 비율을 달리하여 처리(10 μ g/ml)된 인간 진피 섬유상세포들에서 MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 발현 수준을 도식화하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0090] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0092] <실험재료 및 방법>

[0093] 1. 쾨넬 추출물로부터 클로로젠산 및 루틴 분석

[0094] 시중에서 구입한 쾨넬(*Foeniculum vulgare*)에서 클로로젠산 및 루틴을 추출하고 분석하였다. 건조된 쾨넬은 트위스트 셰이커(BioFree, 한국)를 이용하여 12시간 동안 50% 에탄올을 사용하여 추출하였다. 추출 후, 추출물은 10분 동안 4 $^{\circ}$ C, 3000rpm으로 원심분리한 후 여과 하였다. 상청액 1ml을 분리하여 고속 진공 농축기(Biotron, 한국)를 사용하여 12시간 동안 완전히 건조시켰다. HPLC 분석을 위하여, 건조된 샘플은 50% 메탄올 10 mg/ml의 농도로 용해시켰고, 0.2 μ m의 폴리 테트라플루오르에틸렌 필터를 통과시켜 여과하였다.

[0095] HPLC 분석에는 PDA HPLC system 기기와 Eclipse XDB-C18 column(4.6 X 250 mm, ID 5 μ m)을 사용하였으며, 이동상은 물(H₂O, 100%)와 아세트나이트릴(CH₃CN, 100%)를 혼합하여 사용하였다. 기울기 용리(Gradient elution) 비율(물:아세트나이트릴)이 75:25, 68:32, 45:55, 40:60, 0:100, 0:100 및 75:25분일 때, 각각 0-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-27, 27-30 및 30-40로 조절하였다.

[0096] 이동상의 유속은 1.2ml/min으로 흘려주었으며, UV 탐지기(UV detector)를 이용하여 280nm에서 성분을 분석하였다(도 1 참조). 화합물(클로로젠산, 루틴)은 질량 스펙트럼 및 보유 시간을 모두 비교함으로써, 표준 화합물을 사용하여 확인하였다.

[0098] 2. 세포 배양

[0099] 건강한 젊은 남성 지원자(MCTT Core사, 서울, 한국)를 선발하고, 피부 생검하여 정상 인간 진피 섬유아세포(NHDF)들을 획득하였다. 세포들은 100-mm조직 배양 플레이트에서 플레이트팅 되었고, 5% CO₂를 함유하는 습기 환

경, 37°C 에서 10%의 열-비활성화된 FBS 및 1%의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 DMEM 배지에서 배양되었다. 모든 실험은 오직 계대 6 내지 10 사이의 세포들을 사용하여 수행하였다.

[0101] **3. UVB 조사 및 클로로겐산, 루틴 또는 그의 조합 처리**

[0102] 정상 인간 진피 섬유아세포들은 40-mm 조직 배양 플레이트들(1.2×10^5 세포들)에 시드하였다. 정상 인간 진피 섬유아세포들이 80% 융합에 도달할 때, 그들을 인산 완충 식염수(PBS)로 두차례 씻어내었고, 모든 조사는 PBS의 얇은 층 아래에서 수행되었다. 플레이트들은 조사 동안 닫혀 있었다. UVB 조사는 7.5cm 거리에서 일정한 조사를 전달하는 태양전등(Sankyo Denki 사) 다섯 개를 밀접하게 배치하여 조사하였다. 조사($144 \text{mJ}/\text{cm}^2$)는 UVB 광도계(IL1700 광도계, International Light)를 사용하여 측정하였다.

[0103] 조사 후 즉시, 신선한 세럼-프리 배지 $1980 \mu\text{l}$ 와 샘플 $20 \mu\text{l}$ 는 각 웰에 첨가된 후, 정상 인간 진피 섬유아세포들은 따뜻한 PBS로 세차례 세척하였다.

[0104] UVB 노출 없는 대조군 정상 인간 진피 섬유아세포들은 같은 배양 조건에서 보관되었다. MMP-1(매트릭스 메탈로 프로테이나제)은 UVB 조사 후 72시간 채취된 상청액에서 평가되었다. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)의 분석을 위해, 정상 인간 진피 섬유아세포들은 UVB 조사 후 24시간 채취되었다.

[0106] **4. 통계학적 분석**

[0107] 모든 실험은 3회 반복하여 수행되었다. 데이터는 평균±값으로 표현되었다. 상이한 처리 간의 통계학적 비교는 Duncan's test에 의한 분산 분석의 한 방법으로 수행되었다. 통계학적 분석을 위해, 대조군에 개별적인 처리를 비교하기 위한 Student's T-test가 수행되었다. 통계학적 의미는 $p < 0.05$ 로 정하였다.

[0109] **실험예 1. 클로로겐산, 루틴 또는 그의 조합이 처리된 세포들의 세포 독성 확인**

[0110] 세포독성은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 비색정량분석법(colorimetric assay)을 사용하여 측정하였다. MTT(Methyl thiazol tetrazolium) 분석은 세포 생존 능력을 측정하기 위해 사용되는 것으로, MTT가 보라색을 생성하는 포마르잔 염색으로 바꾸는 것이다. 인큐베이션 72시간 후, 배지의 부피는 1ml로 감소하였고, 1mg/ml MTT의 $100 \mu\text{l}$ 는 각 벽에 첨가되었다. 이후, 세포는 37°C에서 2시간 동안 5%의 CO_2 및 95%의 O_2 존재 하에 배양되었다. 기질-함유 배지는 제거되었고, 1ml의 DMSO는 포마르잔 결정을 용해시키기 위해 각 벽에 첨가되었다. 또한, 상온에서 30분 동안 오비탈 셰이커로 플레이트를 흔들었다. $100 \mu\text{l}$ 의 부분 표본의 흡수율은 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices E09090; 샌프란시스코, CA, 미국)를 사용하여 570nm에서 흡수율을 측정함으로써 정량화하였다. 클로로겐산, 루틴 및 그의 조합이 처리된 세포(처리 후 72시간)들의 세포 독성을 확인하고자, UVB 조사된 정상 인간 진피 섬유 아세포들에서 MTT 분석을 실시하였다.

[0111] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, UVB 조사 전 및 UVB 조사 후 클로로겐산, 루틴 및 그의 조합이 처리된 인간 진피 섬유상세포들의 세포 생존을 억제하지 않음을 확인할 수 있었다.

[0114] **실험예 2. MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 mRNA 발현 변화 조사**

[0115] UVB 조사 후, 클로로겐산, 루틴 및 그의 조합이 처리된 정상 인간 진피 섬유아세포(NHDF)들로부터 RNA의 분리는 TRIZOL 시약(Invitrogen Life Technologies, 갈즈베드, 캐나다)을 사용하여 제조사의 지시에 따라 수행되었다.

[0116] RNA($5 \mu\text{g}$)은 역전사효소 200 단위와 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 올리고-(dT)15 프라이머(Bioneer사, 한국)로 역전사하였고, 반응은 60분 동안 42°C에서 수행되었으며, 5분 동안 94°C에서 열을 가하여 종결되었다.

[0117] cDNA 주형의 PCR 증폭은 PCR premix(Bioneer) 및 하기 프라이머 쌍들을 사용하여 수행되었다:

[0118] - MMP-1(정방향 5'-ATT CTA CTG ATA TCG GGG CTT TGA-3', 역방향 5'-ATG TCC TTG GGG TAT CCG TGT AG-3')

[0119] - 타입 I 프로콜라겐(정방향 5'-CTC GAG GTG GAC ACC ACC CT-3', 역방향 5'-CAG CTG GAT GGC CAC ATC GG-3')

[0120] - 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로제네이즈(GAPDH)(정방향 5 'ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', 역방향 5 'CCA CCC TGT TGC TGT AC-3').

[0122] PCR 생성물은 상대적으로, 30사이클 동안 Veriti Thermal Cycler(Applied Biosystems, 포스터 시티, CA, 미국)에서 수행되었다. PCR 생성물은 UV 조명 하에 브롬화 에티늄 염색된 2.0% 아가로오스 겔 전기영동에 의해 분리되었다. GAPDH는 대조군으로 사용되었다. 각 실험은 적어도 3회 반복되어 수행되었다.

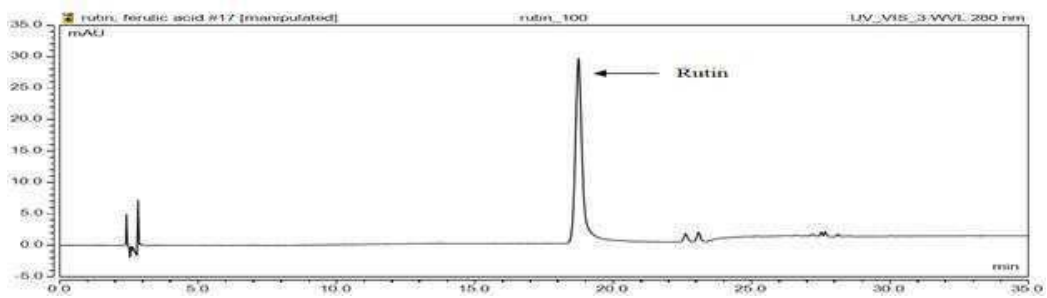
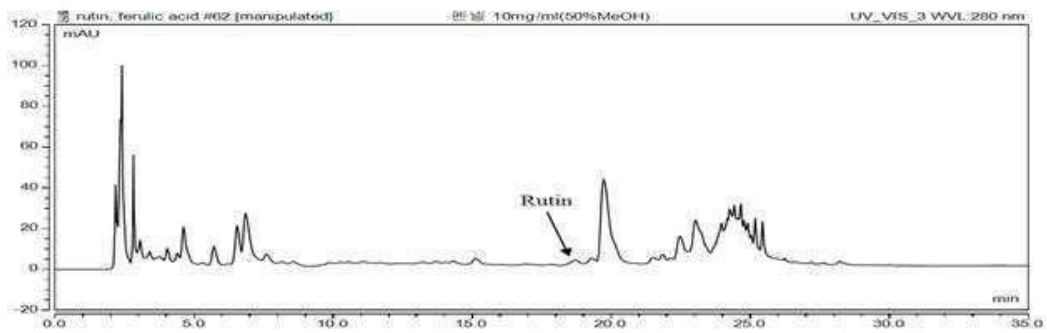
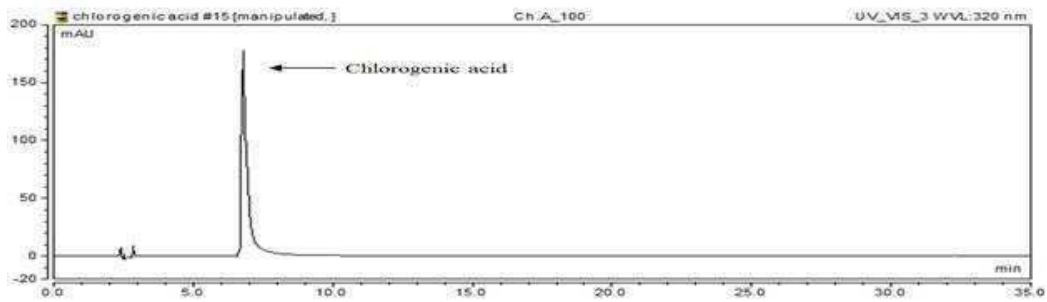
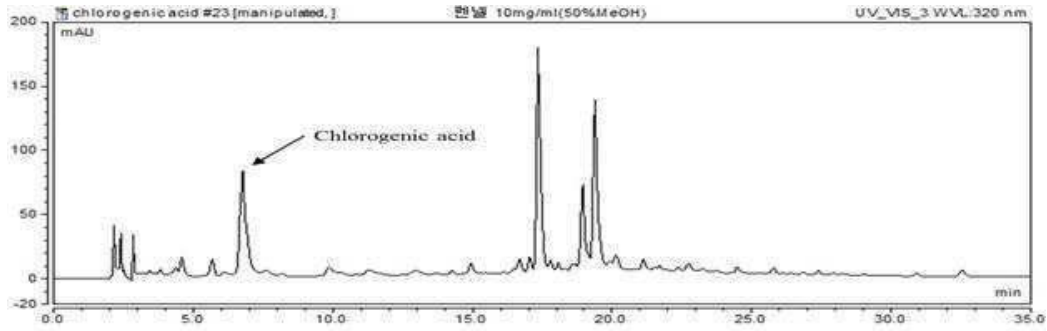
[0123] 클로로겐산, 루틴 및 그의 조합(각각 10ug/mL)이 처리된 세포(처리 후 24시간)의 mRNA 레벨을 확인하고자, UVB

조사된 정상 인간 진피 섬유 아세포들에서 MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 발현을 측정하였다. 데이터를 정량화 하고자, 밴드 신호 강도에 근거하여 정상 인간 진피 섬유 아세포들에서 MMP-1/GAPDH 및 타입 I 프로콜라겐 /GAPDH의 비율을 1.0으로 임의 세팅하였다.

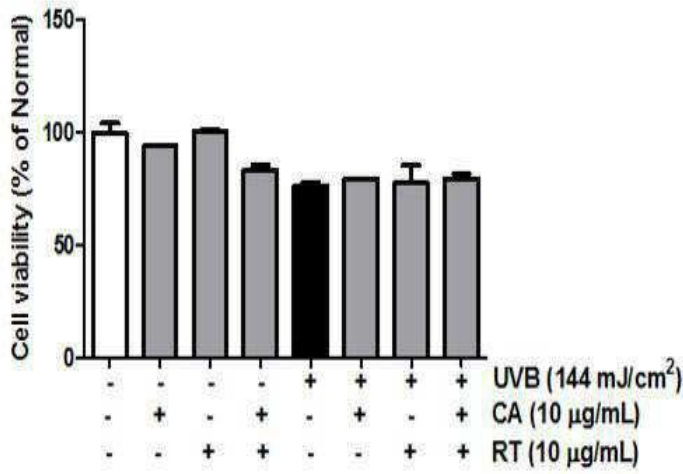
- [0124] 그 결과, 도 3 및 도 4를 참조하면, 무처리군에서는 UVB 조사 후 24시간 이내에 MMP-1의 mRNA 발현 수준이 증가되었고, 타입 I 프로콜라겐의 mRNA 발현 수준은 저해됨을 알 수 있었다.
- [0125] 이와는 달리, 클로로젠산, 루틴 및 그 조합이 각각 10ug/mL 처리된 정상 인간 진피 섬유 아세포들에서는 UVB 조사에 의해 증가된 MMP-1의 mRNA 발현이 감소되었고, UVB 조사에 의해 감소된 타입 I 프로콜라겐의 mRNA 발현이 크게 증가됨을 알 수 있었다.
- [0126] 특히, 클로로젠산 및 루틴을 각각 10ug/mL 용량으로 하여 1:1의 비율로 조합 처리된 군에서는 무처리군, 클로로젠산 단독 처리군, 및 루틴 단독 처리군에 비해 MMP-1의 mRNA 발현에서는 각각 46%, 14%, 및 31%가 감소되었고, 프로콜라겐의 mRNA 발현에 있어서는 각각 292%, 145%, 및 124%가 증가되어, 단독 처리군에 비해 현저히 증가된 시너지 효과가 있음을 알 수 있었다(도 3 및 4 참조).
- [0128] 더 나아가, 클로로젠산 및 루틴의 배합비율의 최적 조건을 탐색하기 위해, 클로로젠산과 루틴의 중량 비율을 1:9 내지 9:1의 범위에서 조절하고, 이들 혼합물의 투여량을 10ug/mL로 고정하여 인간 진피 섬유 아세포들에서 MMP-1 및 타입 I 프로콜라겐의 발현을 측정하였다.
- [0129] 그 결과, 클로로젠산과 루틴의 중량 비율을 각각 9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 및 1:9의 혼합 비율로 혼합하여 투여한 투여군에는, UVB 조사후 무처리군에 비해 MMP-1의 mRNA 발현이 각각 45%, 43%, 44%, 54%, 및 53% 감소되어, 클로로젠산과 루틴의 중량 비율을 각각 9:1 내지 1:9의 비율로 혼합한 시험군에서 MMP-1의 mRNA 발현 억제 효과가 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 5 및 6 참조).
- [0130] 또한, 클로로젠산과 루틴의 중량 비율을 각각 9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 및 1:9의 혼합 비율로 혼합하여 투여한 시험군에는, UVB 조사 없는 무처리군에 비해 프로콜라겐의 mRNA 발현이 각각 238%, 244%, 312%, 298%, 및 233% 증가되어, 클로로젠산과 루틴의 중량 비율을 각각 9:1 내지 1:9의 비율로 혼합한 시험군에서의 프로콜라겐의 mRNA 발현 증가 효과가 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 5 및 6 참조).
- [0131] 상기와 같은 결과를 통해, 클로로제닉 및 루틴이 UVB 조사로 인해 발생하는 광노화 효과 중 주름생성 기작을 억제하고, 주름 개선에 효과가 있음을 알 수 있었으며, 특히, 클로로제닉 및 루틴을 9:1 내지 1:9의 비율로 혼합하여 사용하는 경우에는 이들을 각각 단독으로 사용하는 경우에 비해 현저히 개선된 주름생성의 예방 및 생성된 주름의 개선에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.
- [0133] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다.
- [0134] 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

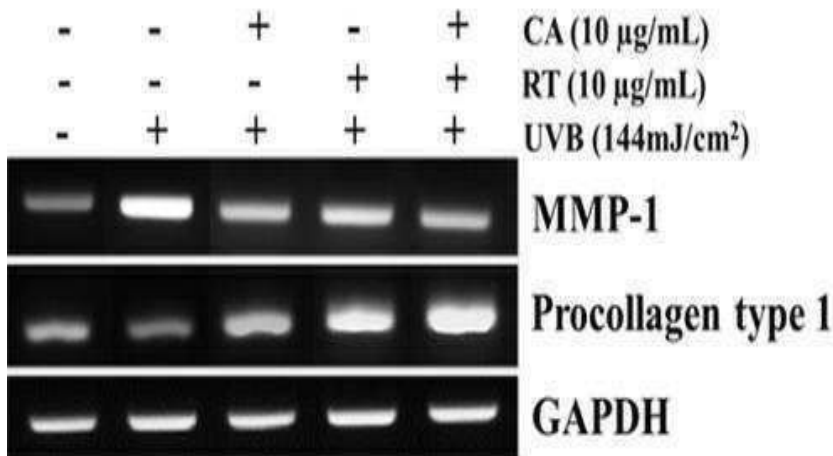
도면1



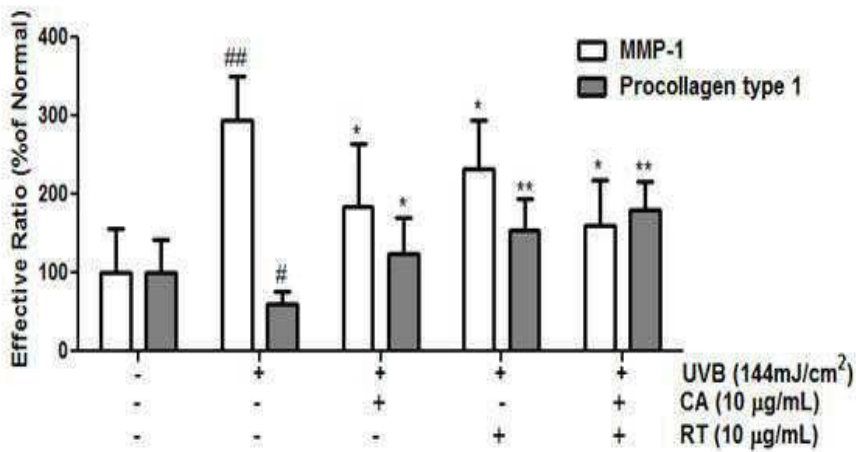
도면2



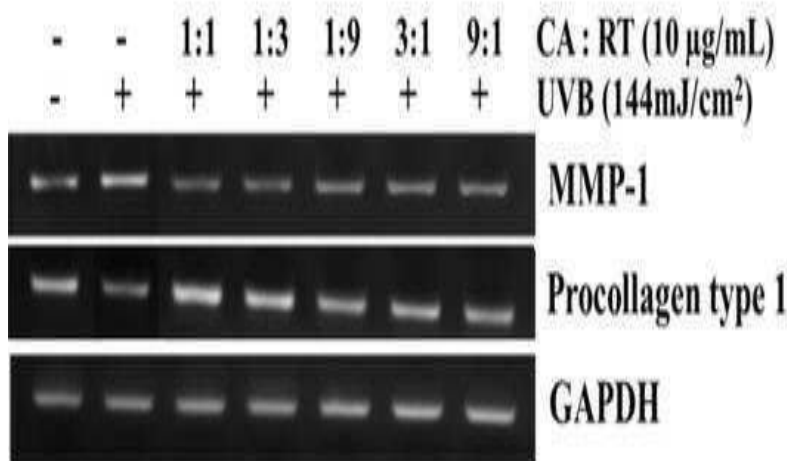
도면3



도면4



도면5



도면6

