【명세서】

【발명의 명칭】

차수를 포함하는 피부 노화 방지용 조성물

【기술분야】

<1> 본 발명은 차수를 포함하는 피부 노화 방지 또는 완화용 조성물에 관한 것이다.

<2>

【배경기술】

<3> 피부의 결합 조직은 주로 콜라겐과 엘라스틴으로 이루어진다. 콜라겐과 엘라스틴은 피부에 탄력을 주므로 이들이 약해지면 피부가 쉽게 손상되고 노화된다. 상기 콜라겐 및 엘라스틴의 분해에 관여하는 효소가 각각 MMP(Matrix Metalloproteinase)와 엘라스타제(elastase)이다. 피부 노화가 진행되면 MMP들 및 엘라스타제의 발현이 증가하고, 증가한 MMP들 및 엘라스타제가 피부의 콜라겐과 엘라스틴을 분해하게 된다. 이런 메커니즘이 반복되면 피부 주름이 생성되고 조기 노화가 진행된다. 따라서 MMP 및 엘라스타제의 분해를 저지하고 더불어 콜라겐 생성을 촉진할 수 있다면 피부 주름을 예방 및 개선하고 나아가 피부 노화를 방지할 수 있을 것이다.

<4> [선행기술문헌]

<5> 한국특허공개 제10-2010-0121352호(2010.11.17.)

<6>

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

<7> 본 발명은 피부 주름 생성을 예방하고 생성된 피부 주름을 개선하여 우수한 피부 노화 방지 효과를 나타내는 조성물을 제공하고자 한다.

<8>

【기술적 해결방법】

<9> 본 발명의 일측면은 효소가 불활성화된 생찻잎에서 유래한 차수(tea water)를 포함하는 피부 노화 방지용 조성물을 제공한다.

<10> 본 발명의 다른 일측면은 효소가 불활성화된 생찻잎에서 유래한 차수(tea water)를 포함하는 피부 노화 방지용 화장료 또는 약학 조성물을 제공한다.

<11>

【유리한 효과】

<12> 본 발명에 따른 차수를 포함하는 조성물은 MMP(Matrix metalloproteinase) 및 엘라스타제의 활성을 저해하며, 콜라겐의 발현을 증가시켜 그 생성을 촉진하여, 피부 주름 생성을 예방하고 생성된 피부 주름을 개선할 수 있다. 나아가 우수한 피부 노화 방지 효과를 가진다. 그리고 상기 조성물은 이온을 실질적으로 포함하지 않으므로 화장료 또는 약학 조성물로의 제조가 용이하다. 더불어 상기 조성물은 피부 자극 성분을 거의 포함하지 않아 피부가 약한 사람도 부담 없이 사용할 수 있다.

<13>

【도면의 간단한 설명】

<14> 도 1은 실시예 1을 가스 크로마토그래피로 정량 분석한 그래프이다.

<15> 도 2는 비교예 1을 가스 크로마토그래피로 정성 분석한 그래프이다.

<16> 도 3은 비교예 2를 가스 크로마토그래피로 정성 분석한 그래프이다.

<17> 도 4는 실시예 1을 가스 크로마토그래피로 정성 분석한 그래프이다.

<18> 도 5는 차수에 의한 세포 독성 정도를 평가한 결과 그래프이다.

<19> 도 6은 차수에 의한 콜라겐 단백질 발현 정도를 보여준다.

<20> 도 7은 차수에 의한 MMP 및 엘라스타제의 억제 정도를 보여준다.

<21> 도 8은 차수에 의한 세포 내 콜라겐 발현 정도를 보여준다.

<22> 도 9는 차수를 포함하는 화장료 조성물과 포함하지 않는 화장료 조성물에 의한 피부 주름 파라미터 R1의 변화 정도를 나타낸 그래프이다.

<23> 도 10은 차수를 포함하는 화장료 조성물과 포함하지 않는 화장료 조성물에 의한 피부 주름 파라미터 R3의 변화 정도를 나타낸 그래프이다.

<24>

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

<25> 본 명세서에서 "피부"라 함은, 동물의 체표를 덮는 조직을 의미하는 것으로서, 얼굴 또는 바디 등의 체표를 덮는 조직뿐만 아니라, 두피와 모발을 포함하는 최광의의 개념이다.

<26> 본 발명의 일측면은 효소가 불활성화된 생찻잎에서 유래한 차수를 포함하는 피부 노화 방지용 조성물을 제공한다. 본 발명의 다른 일측면은 효소가 불활성화된 생찻잎에서 유래한 차수를 포함하는 피부 주름 예방 또는 개선용 조성물을 제공한다.

<27> 본 발명의 다른 일측면은 상기와 같은 효소가 불활성화된 생찻잎에서 유래한

차수를 피부 노화방지용도로서 사용할 수 있다. 또한, 상기와 같은 효소가 불활성화된 생찻잎에서 유래한 차수를 유효성분으로써 대상에 유효량으로 투여하는 것을 포함하는 피부 노화 방지방법을 제공할 수 있다.

<28> 나아가, 본 발명의 또 다른 일측면은 피부 노화 방지에 사용하기 위한 불활성화된 생찻잎에서 유래한 차수를 제공할 수 있다.

<29> 본 명세서에서 노화는 나이가 들면서 일어나는 생체의 쇠퇴적인 변화 현상을 의미하며, 생리 활성 저하, 체내 대사 저하, 피부 노화를 포함한다. 상기에서 피부 노화는 주름이 생성되고, 재생 능력이 상실된 상태를 포함한다.

<30> 본 명세서에서 "찻잎"은 카멜리아 시넨시스(*Camelliasinensis*)의 싹이나 잎을 의미하는 것으로, 그 품질 또는 종류를 구분하지 않는다. 구체적으로 수확 시기에 따른 봄차, 여름, 가을차 모두 사용 가능하며, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 명세서에서 "생찻잎"은 가공하지 않은 찻잎을 의미한다.

<31> 본 명세서에서 "차수(tea water)"란 생찻잎에서 비롯된 액체를 의미하며, 구체적으로 생찻잎을 착즙하여 수득한 차즙, 생찻잎의 물 또는 알코올 추출물을 포함한다. 본 발명에 따른 차수는 건조하지 않은 생찻잎으로부터 수득한 액체라는 점에서 건조 찻잎을 물과 같은 액체에 우려서 얻는 일반적인 녹차물과는 차이가 있다. 본 발명의 일측면에 따른 차수는 생찻잎에 포함된 수분뿐만 아니라 인간에게 유익한 성분을 함유한다.

<32> 본 발명의 일측면에서, 차수는 "비이온성" 차수를 포함한다. 본 발명의 다른 일측면에서 비이온성 차수는 이온을 실질적으로 포함하지 않은 차수를 포함한다. 본 발명의 또 다른 일측면에서, 이온을 실질적으로 포함하지 않는 차수는 이온 농도가 0.01ppm 이하, 구체적으로 0.001 ppm 이하, 더 구체적으로 0.0001 ppm 이하인 차수를 포함한다.

<33> 일반적으로 화장료 조성물을 제조하는 경우 이온의 종류나 함량이 적은 이온 정제수를 사용하는데, 이는 이온이 많이 포함되면 계면 활성제, 유화제 등을 포함하는 화장료 조성물의 효과를 저해하거나 안정성에 영향을 줄 수 있기 때문이다. 또한 다량의 이온은 시간이 흐를수록 점성이 있는 조성물의 점도를 낮아지게 하는 특성이 있어 화장료 조성물에 포함되기에는 적당하지 않다. 일반적으로 가공된 찻잎을 우려낸 액은 F^-,Cl^-,NO_3^-,PO_4^-,SO_4^-를 함유하며, 농도는 각각 물 100g 당 100~3000, 500~2500, 0~200, 200~5000, 50~3000 μg 정도이다. 따라서 가공된 찻잎을 우려낸 액에는 상기와 같은 이온들이 함유되어 있다는 점을 감안하여, 화장료 조성물에 사용하기 위해서는 음용하는 농도 정도가 아니라 가능한 가장 짧은 시간

동안 찻잎을 물에 우려 매우 옅은 농도로 해야 한다. 이러한 경우 차에 함유된 유익한 성분이 찻잎을 우려낸 액에 함유되기 곤란할 수 있다. 반면, 본 발명의 일측면에 따른 조성물은 이온을 미리 제거한 비이온성 차수를 포함하여 화장료 또는 약학 조성물로의 제조가 용이하다.

<34> 본 발명의 일측면에서, 차수는 리날로올의 농도가 5 ㎍/ml 이하, 헥산올의 농도가 0.2 ㎍/ml 이하 및 z-3-헥센올의 농도가 0.2 ㎍/ml 이하 중 적어도 하나를 만족하는 차수를 포함한다. 본 발명의 다른 일측면에서, 차수는 리날로올의 농도가 2 ㎍/ml 이하, 구체적으로 1.5 ㎍/ml 이하, 헥산올의 농도가 0.1 ㎍/ml 이하, 구체적으로 0.05 ㎍/ml 이하 및 z-3-헥센올의 농도가 0.15 ㎍/ml 이하, 구체적으로 0.1 ㎍/ml 이하 중 적어도 하나를 만족하는 차수를 포함한다. 본 발명에 따른 차수는 상기와 같이 피부 자극 성분이 적어 화장료 또는 약학 조성물과 같이 피부에 적용하는 조성물의 성분으로 적합하다.

<35> 본 발명의 일측면에서, 차수는, 생찻잎의 효소를 불활성화하고 착즙하여 차즙을 수득하는 단계; 및 상기 단계에서 수득한 차즙의 이온을 제거하여 비이온성의 차수를 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조한 차수를 포함한다. 상기와 같은 방법으로 제조한 차수는 실질적으로 이온을 포함하지 않아 화장료 또는 약학 조성물로의 제조가 용이하다.

<36> 본 발명의 일측면에서, 상기 차즙을 수득하는 단계 이전에 생찻잎은 전처리 과정을 거칠 수 있는데, 이는 차나무 잎을 채엽하여 정제수로 세척하여 이물을 제거하고, 찻잎 표면에 부착된 물방울을 탈수기를 사용하여 제거하는 과정을 포함할 수 있다. 이후 찻잎에서 발생하는 열을 상쇄하기 위하여는 저온(4~10℃)에서 보관할 수 있다.

<37> 본 발명의 일측면 중 상기 차즙을 수득하는 단계에서는, 생찻잎을 증열 처리, 가열 처리 또는 고압 처리하여 생찻잎의 효소를 불활성화할 수 있다. 생찻잎을 증열 처리하는 경우 증열 처리 온도는 100~150℃일 수 있고, 구체적으로 102~121℃일 수 있으며, 더 구체적으로 105~112℃일 수 있다.

<38> 본 발명 일측면에서 효소가 불활성화된 생찻잎을 착즙하여 차즙을 수득하는 단계 중 착즙하는 방법은 압착 효과를 이용한 기어식 착즙, 프레스식 착즙, 분쇄식 착즙 및 효소 분해식 착즙으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 방법을 포함한다.

<39> 본 발명의 다른 일측면에서, 상기 차즙을 수득하는 단계 이후, 상기 수득한 차즙은 망을 통과하는 단계를 더 거칠 수 있다. 이러한 단계를 통해 차즙의 잔여

고형분이 제거된다. 본 발명의 일측면에서 상기 망의 사이즈는 10~400 메쉬(mesh)일 수 있다. 본 발명의 다른 일측면에서 상기 망의 사이즈는 30~200 메쉬일 수 있다. 본 발명의 또 다른 일측면에서 상기 망의 사이즈는 80~120 메쉬일 수 있다.

<40> 본 발명의 일측면의 상기 차수를 수득하는 단계에서는, 차즙을 기화 및 액화하는 방법 또는 삼투 여과 방법으로 이온을 제거한다. 이를 통해 차즙에서 화장료 조성물의 효과를 방해하거나 안정성에 영향을 주는 이온을 제거할 수 있다. 차즙의 기화는, 차즙을 약 100~121℃ 온도의 가압 상태에서 가열 처리를 함으로써 이루어질 수 있다. 상기 가열 처리는 약 80~100℃ 온도의 상압 상태에서 이루질 수도 있다. 상기 가열 처리는 약 40~80℃ 온도의 감압 상태에서 이루어질 수도 있다.

<41> 본 발명의 일측면에서, 차즙의 이온을 제거하여 차수를 수득하는 단계 이후, 상기 단계에서 수득한 차수를 원심 분리, 막 분리 또는 증류 분리하여 바람직하지 않은 성분을 분리 및 제거하는 단계를 더 거칠 수 있다. 본 발명의 다른 일측면에서 상기 분리 및 제거하는 단계는 수득한 차수에 유기 용매를 일정량 혼합한 후 증류로 유기 용매를 선택적으로 제거하여 기호성이 낮거나 바람직하지 않은 성분을 선별하여 분리 및 제거하는 과정을 포함할 수 있다. 본 발명의 일측면에서 상기 유기 용매는 C_1 내지 C_5의 알코올, 구체적으로 에틸 알코올일 수 있다. 상기에서 유기 용매는 차수의 총 중량을 기초로 5 내지 40 중량%로 혼합할 수 있다.

<42> 본 발명의 일측면에서 상기 차수를 수득하는 단계 이후, 수득한 차수를 숙성하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이러한 숙성을 통해 헥산올, z-3-헥센올 또는 리날로올과 같은 피부 자극 성분이 보다 잘 제거될 수 있다. 상기 수득한 차수를 숙성하는 단계에서, 숙성은 0 내지 120℃에서 12 내지 24시간 동안 이루어질 수 있다. 본 발명의 다른 일측면에서, 숙성은 차수의 수분이 증발하지 않는 조건으로 80~120℃ 온도의 가압 상태에서 12~24시간 동안 이루어질 수 있다. 본 발명의 또 다른 일측면에서, 숙성은 40~80℃ 온도의 상압 상태에서 12~24시간 동안 이루어질 수 있다. 본 발명의 또 다른 일측면에서, 숙성은 4~40℃ 온도의 감압 상태에서 12~24시간 동안 이루어질 수 있다.

<43> 본 발명의 일측면에 따른 조성물은 조성물 전체 부피를 기초로 10 내지 90 부피%, 구체적으로 20 내지 80 부피%, 더 구체적으로 30 내지 70 부피%의 차수를 포함할 수 있다. 상기 부피%로 포함하는 경우 본 발명의 의도한 효과를 나타내기에 적절할 뿐만 아니라, 조성물의 안정성 및 안전성을 모두 만족할 수 있다. 비용 대비 효과의 측면에서도 상기 범위로 포함하는 것이 적절할 수 있다. 구체적으로 상기 부피%의 차수를 포함하는 조성물은 콜라겐 합성 촉진 및 MMP와 엘라스타제 활성

저해 효과가 우수하다. 나아가 피부 주름을 예방 및 개선하며, 노화를 방지하는 효과가 보다 뛰어날 수 있다. 더불어 피부에 대한 자극 및 세포 독성이 낮을 수 있다.

<44> 본 발명의 일측면에 따른 차수를 포함하는 피부 노화 방지용 조성물은 화장료 조성물을 포함한다. 본 발명의 다른 일측면에서, 차수는 화장료 조성물의 베이스 용액 또는 주요 유효 성분으로 포함될 수 있다.

<45> 상기 화장료 조성물은 국소 적용에 적합한 모든 제형으로 제공될 수 있다. 예를 들면, 용액, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀젼, 유상에 수상을 분산시켜 얻은 에멀젼, 현탁액, 고체, 겔, 분말, 페이스트, 포말(foam) 또는 에어로졸 조성물의 제형으로 제공될 수 있다. 이러한 제형의 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.

<46> 상기 화장료 조성물은 상기한 물질 이외에 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 바람직하게는 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분들을 함유할 수 있다. 본 발명에 따른 화장료 조성물은 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당 및 스핑고 지질로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 화장료 조성물은 보습제, 에몰리언트제, 계면 활성제, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, pH 조절제, 유기 및 무기 안료, 향료, 냉감제 또는 제한(制汗)제를 포함할 수 있다. 상기 성분의 배합량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업자가 용이하게 선정 가능하다.

<47> 본 발명의 일측면에 따른 차수를 포함하는 피부 노화 방지용 조성물은 약학 조성물을 포함한다. 본 발명의 다른 일측면에서, 차수는 약학 조성물의 베이스 용액 또는 주요 유효 성분으로 포함될 수 있다.

<48> 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 경구, 비경구, 직장, 국소, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 피하 등으로 투여될 수 있다. 경구 투여를 위한 제형은 정제(錠劑), 환제(丸劑), 연질 및 경질 캅셀제, 과립제(顆粒劑), 산제, 세립제, 액제, 유탁제(乳濁濟) 또는 펠렛제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비경구 투여를 위한 제형은 용액제, 현탁제, 유액제, 겔, 주사제, 점적제, 좌제(坐劑), 패취 또는 분무제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 제형은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 용이하게 제조될 수 있으며, 계면 활성제, 부형제, 수화제, 유화 촉진제, 현탁제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제, 착색제, 향신료, 안정화제, 방부제, 보존제 또는 기타 상용하는 보조제를 적당히 사용할 수 있다.

<49> 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물의 유효 성분은 투여 받을 대상의 연

령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 0.1mg/kg/일 내지 5000mg/kg/일, 보다 구체적으로는 50 mg/kg/일 내지 500 mg/kg/일이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

<50> 본 발명의 일측면은 효소가 불활성화된 생찻잎에서 유래한 차수를 포함하는 조성물; 및 상기 조성물을 80 시간 내지 200시간 동안 대상에게 적용한다는 내용을 개시한 지시서를 포함하는 키트를 제공한다. 본 발명의 다른 일측면에서, 지시서는 상기 조성물을 90 시간 내지 150 시간 동안 대상에게 적용한다는 내용을 포함할 수 있다. 대상에게 차수의 충분한 피부 노화 방지, 피부 주름 생성 예방, 주름 개선 효과가 발현되기 위해서는 일정 시간 이상 적용되는 것이 필요하며, 간편성 증대와 시간 투여 대비 효과 발현 측면에서 그 적용 시간이 제한될 수 있다.

<51>

【발명의 실시를 위한 형태】

<52> 이하, 실시예, 비교예 및 시험예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 실시예, 비교예 및 시험예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

<53>

<54> [실시예 1] 차수의 제조

<55> 수확한 때로부터 수 시간 이내의 생찻잎(제주 설록차 옥록 2번차) 2kg을 100℃에서 발생하는 증기에 2~3분 접촉시켜 효소를 불활성화 시키고, 2개의 스크류 기어 방식의 착즙기에 투입하여 차즙과 차 고형분으로 분리하였다. 상기 차즙을 80메쉬(mesh)의 망에 통과시켜 그의 잔여 고형분을 제거하였다. 상기 차즙을 감압 농축기에 투입하고 40~80℃에서 증류하여 발생하는 증기를 냉각하여 차수(tea water)를 수득하였다. 수득한 차수를 무균상태 클린 벤치에서 0.2마이크로미터 제균 필터로 살균 포장하여 실시예 1을 제조하였다.

<56>

<57> [비교예 1과 비교예 2]

<58> 실시예 1을 제조할 때 사용한 생찻잎과 비슷한 시기에 수확한 찻잎을 증열-조유-유념-중유-정유-건조의 과정을 통해 1차 가공한 찻잎 20g을 70℃ 정제수에 2분간 침지한 후 200메쉬의 망으로 여과하여 비교예 1을 제조하였다. 상기 1차 가공한 찻잎을 가열-체별-절단-줄기선별-혼합의 과정을 통해 2차 가공하고, 그 가공한

찻잎 20g을 70℃ 정제수에 2분간 침지한 후 200메쉬의 망으로 여과하여 비교예 2를 제조하였다.

<59>

<60> [시험예 1] 조성 성분 평가

<61> 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 2를 고체상 마이크로 추출(SPME) 방식으로 가스크로마토그래피 분석을 하였다. 실시예 1을 정량 분석한 가스크로마토그램을 도 1 및 아래 표 1에 나타내었다.

<62> 【표 1】

번호	머무른 시간(분)	화합물
1	2.958	헥산올
2	3.09	2-프로판온
3	3.749	3-부탄
4	3.957	2-에톡시-2-메틸 프로판
5	4.359	3-메틸 부타날
6	4.486	2-메틸 부타날
7	4.735	1-펜텐-3-올
8	4.835	테트라하이드로-2,2,5,5-테트라메틸 퓨란
9	5.514	3-부티로니트릴
10	6.192	1-펜탄올
11	7.879~8.119	z-3-헥센올
12	9.273	4-하이드록시-4-메틸-2-펜탄온
13	9.412	4-메틸-2-헵탄온
14	12.085	리날로올(Linalool)

<63>

<64> 차의 주요 성분 중 감각 역치(sensory threshold)가 낮아 사람이 즉각 구별이 가능한 성분은 헥산올, z-3-헥센올, 리날로올의 3가지를 들 수 있는데, 이 중에서 리날로올은 피부에 직접 닿았을 때 알러지 유발하는 물질로 알려져 있다. 실시예 1의 가스크로마토그래피 분석 결과 중 상기 감각 역치가 낮은 3가지 성분을 중심으로 아래 표에 나타내었다.

<65> 【표 2】

물질	머무른 시간(분)	피크 면적	농도(㎍/ml)
헥산올	2.958	6.22	0.04
z-3-헥센올	7.879~8.119	44.14	0.14
리날로올	12.085	156.02	1.21

<66>

<67> 상기 표에서 볼 수 있듯이, 실시예 1의 차수는 z-3-헥센올의 농도가 0.2 ㎍/ml 이하이고, 헥산올의 농도가 0.2 ㎍/ml 이하이며, 리날로올의 농도가 5 ㎍/ml 이하로 나타나, 피부 자극 성분을 미량으로만 포함하였다.

<68> 한편, 비교예 1 및 2를 정성 분석한 가스 크로마토그램을 각각 도 2와 도 3에 나타내고, 실시예 1의 차수를 정성 분석한 가스 크로마토그램을 도 4에 나타내었다. 도 4의 피크에 대한 성분명은 아래 표에 나타내었다. 도 2와 도 3을 보면 도 4에 존재하지 않은 피크가 있는데, 이는 생찻잎 고유의 성분이 변성되어 생긴 피라진 류의 향기 성분 피크라고 판단된다. 이러한 성분은 피부 자극 요인이 되므로 화장료 조성물 또는 약학 조성물의 성분으로 부적합하다.

<69> 【표 3】

머무른 시간(분)	화합물
14.482	z-3-헥센올
15.769	트랜스 리나노올
16.425	리나노올 옥사이드 A
17.907	1,6-옥타디엔-3-올
19.098	카비톨
20.713	리나루 옥사이드 D
21.013	2H-파이란-3-올
21.992	리날로올
22.895	1,4-부타노디올
22.997	벤질 니트릴
23.111	자스몬
24.668	부틸레이티드 하이드록시톨루엔
25.954	뮤로올
27.942	인돌
28.224	벤조페논

<70>

<71> 이와 같이, 본 발명에 따른 차수는 피부 자극 성분이 적어 화장료 또는 약학 조성물의 성분으로 적합하다.

<72>

<73> [시험예 2] 기초 분석

<74> 실시예 1의 차수에 대한 pH, 굴절률, 비중, 중금속 함량, 균 수 등 기초 성분 분석을 행하고, 그 결과를 아래 표에 나타내었다.

<75> 【표 4】

분석항목	실시예 1
pH	5.82
굴절률	1.333
비중	1.002
납	0.0760 mg/kg
비소	0.0674 mg/kg
세균수	12/ml
진균수	불검출

<76>

<77> 상기에서 확인한 바와 같이 실시예 1의 차수는 화장료 조성물에 이용될 수 있는 규격을 만족한다.

<78>

<79> [시험예 3] 세포 독성 평가

<80> (1) 세포의 배양

<81> 인간 섬유아세포(Human fibroblast cell)는 페니실린/스트렙토마이신 100 유닛/ml과 10% FBS을 함유한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지에서 37℃, 5% CO_2조건의 배양기로 배양하여 준비하였다.

<82> (2) 차수를 포함하는 배지의 준비

<83> 50%(v/v) 및 100%(v/v) 차수를 포함하는 배지를 준비하였다. 구체적으로, 100% 차수를 포함하는 배지는 상기 실시예 1의 차수에 DMEM 파우더(GIBCO, 뉴욕, 미국)를 혼합한 후 항생제(antibiotics)(페니실린/스트렙토마이신 100 유닛/ml)와 10% FBS를 가하여 준비하였고, 50% 차수를 포함하는 배지는 상기 실시예 1의 차수와 3차 증류수를 1:1의 부피비로 혼합한 후, DMEM 파우더를 혼합하고, 항생제(antibiotics)(페니실린/스트렙토마이신 100 유닛/ml)와 10% FBS를 가하여 준비하였다.

<84> (3) 차수에 의한 세포 독성 평가

<85> (1)에서 준비한 인간 섬유아세포를 24-웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후 세럼 없는(serum-free) 배지로 교환하였다. 이후 (2)에서 준비한 50%(v/v) 및 100%(v/v) 차수를 포함하는 DMEM 배지를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후 5 mg/ml 농도의 MTT(Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt) 용액을 처리한 뒤 37℃ 배양기에서 4시간 동안 추가 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 MTT 환원에 의해 형성된 포르마잔(formazan)에 DMSO를 첨가하여 세포를 용해시킨 후 ELISA(Enzyme-linked immuno sorbent assay) 마이크로플레이트 리더(SoftMax Pro5, Molecular Devices, 미국)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 차수를 포함하지 않은 DMEM 배지를 처리한 세포를 대조군으로 하여 대조군 대비 세포 독성 정도(%)를 평가하고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

<86> 도 5에서 볼 수 있듯이, 100%(v/v) 차수를 처리한 세포에서는 15% 정도의 세포 독성이 관찰되었으나, 50%(v/v) 차수를 처리한 세포에서는 독성이 관찰되지 않았다.

<87>

<88> [시험예 4] 차수에 의한 콜라겐 발현 확인

<89> 시험예 3의 (1)에서 준비한 인간 섬유아세포를 24-웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후 세럼 없는 배지로 교환하였다. 24시간 스타베이션(Starvation)이 지난 후 DMEM 배지(대조군) 및 시험예 3의 (2)에서 준비한 50%(v/v)를 포함하는 DMEM 배지를 각각 처리하여 120시간 동안 배양하였다. 배양 후 각 세포에 대해 SDS-PAGE 분석 방법으로 단백질을 분석하였다. 바이오-래드(Bio-Rad) 시약으로 정량한 단백질 10 ㎍을 취해 10% SDS-PAGE에 전기 영동 시킨 후 PVDF 막으로 겔의 단백질을 블로팅(blotting)시켰다. 5% 탈지유(Skim milk)로 블로킹(blocking) 후 콜라겐 I(collagen I)과 GAPDH 1차 항체와 반응시키고, 2차 항체인 토끼와 염소 2차 항체(secondary antibody)를 반응시켰다. 그 다음, ECL 검출 시약(Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, 미국)을 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

<90> 도 6에서 볼 수 있듯이, DMEM 배지만을 처리한 세포에서는 콜라겐 I의 발현에 있어 변화가 없었으나, 50%(v/v) 차수를 처리한 세포에서는 콜라겐 I의 발현이 증가되었다. 즉, 50%(v/v) 차수는 우수한 콜라겐 발현 증진 효과를 가져 뛰어난 피부 주름 예방 및 개선 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

<91>

<92> [시험예 5] 차수에 의한 MMPs(Matrix metalloproteinases) 및 엘라스타제(Elastase)의 단백질 발현 확인

<93> 시험예 3의 (1)에서 준비한 인간 섬유아세포를 24-웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후 세럼 없는 배지로 교환하였다. 24시간 스타베이션(Starvation)이 지난 후 DMEM 배지(대조군) 및 시험예 3의 (2)에서 준비한 50%(v/v)를 포함하는 DMEM 배지를 각각 처리하여 120시간 동안 배양하였다. 배양 후 각 세포에 대해 SDS-PAGE 분석 방법으로 단백질을 분석하였다. 정량한 단백질 10 ㎍을 취해 10% SDS-PAGE에 전기 영동 시킨 후, MMP I, MMP 3, MMP 9, 엘라스타제와 GAPDH 1차 항체와 반응시키고, 2차 항체를 반응시킨 다음, ECL 검출 시약(Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, 미국)을 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

<94> 도 7에서 볼 수 있듯이, 50% 차수를 처리한 세포에서 MMP I, MMP 3, MMP 9 및 엘라스타제의 발현이 감소되었다. 이를 통해 50%(v/v) 차수는 피부 콜라겐의 분해를 촉진하는 MMP들의 발현은 감소시키므로, 피부 주름 예방 및 개선 효과가 있음을 알 수 있다.

<95>

<96> [시험예 6] 차수 처리에 의한 세포 내 콜라겐 발현 확인

<97> 시험예 3의 (1)에서 준비한 인간 섬유아세포를 24-웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후 세럼 없는 배지로 교환하였다. 24시간 스타베이션(Starvation)이 지난 후 DMEM 배지(대조군) 및 시험예 3의 (2)에서 준비한 50%(v/v) 차수를 포함하는 DMEM 배지를 각각 처리하여 120시간 동안 배양하였다. 배양 후 10% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정시킨 다음, 콜라겐 I 항체를 24시간 동안 처리하였다. 24시간 경과 후 FITC-표지된 2차 항체(FITC-labeled secondary antibody)(Santa Cruz, 캘리포니아, 미국)를 2시간 동안 처리하였다. 세포핵을 염색하기 위해 DAPI(4,6-디아미노-2-페닐인돌(4,6-diamino-2-phenylidole), PIERCE, Rockford, 미국)를 처리한 후 마운팅(mounting)하고 DP70 형광 현미경(fluorescence microscope)과 DP컨트롤러(Controller) 소프트웨어(Olympus Optical Co., 도쿄, 일본)로 관찰하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8에서 가장 상단의 사진은 콜라겐 발현 정도를 나타내고, 중단의 사진은 DAPI 염색 결과를 나타내며, 하단의 사진은 상단과 중단의 사진을 병합한 것이다.

<98> 도 8에서 볼 수 있듯이, 120시간 동안 50%(v/v) 차수를 처리한 세포에서 콜라겐 I 발현 정도가 대조군보다 높았다, 따라서 50%(v/v) 차수는 콜라겐 발현을 촉진시켜, 피부 주름을 예방 및 개선할 수 있음을 알 수 있다.

<99>

<100> [실시예 2 및 비교예 3] 화장료 조성물의 제조

<101> 실시예 1의 차수를 시트에 적셔 당업계의 일반적인 방법으로 마스크 시트를 제조한 후 실시예 2로 하였다. 실시예 2와 실질적으로 동일한 방법으로 제조하되, 차수를 포함하지 않는 마스크 시트를 제조하여 비교예 3으로 하였다.

<102>

<103> [시험예 7] 차수에 의한 주름 감소 효과에 대한 임상적 평가

<104> 만 30 내지 65세의 성인 23명을 대상으로 8주간 실시예 2(시험군) 및 비교예 3(대조군)의 마스크 시트를 각각 왼쪽과 오른쪽에 사용하게 하였다. 실시예 2와 비교예 3을 사용하기 전, 사용 4주 및 8주 후에 피험자들의 눈가 주름을 기기로 측정 및 평가하고, 더불어 얼굴 전체의 주름에 대해 전문가가 육안 평가하였다. 자세한 평가 방법 및 결과는 아래와 같다.

<105> (1) 기기에 의한 눈가 주름 평가

<106> 먼저 정확한 측정을 위하여 측정에 앞서 피험자로 하여금 측정 부위를 물로

씻게 한 후 실내 온도 20~25℃, 습도 40~60%의 항온 항습 조건의 대기실에서 30분간 피부 표면 온도와 습도를 측정 장소의 환경에 적응하게 하였으며, 그 동안 수분 섭취를 제한하였다. 또한 보다 객관적인 측정을 위하여 시험자 1인이 계속 측정을 하였으며, 시험 시작 당시, 4주 후 및 8주 후의 각 측정 시에 동일한 부위를 측정하도록 하였다.

<107> 실시예 2와 비교예 3을 사용하기 전, 사용 4주 및 8주 후에 실시예 2와 비교예 3을 적용한 부위에 대하여 제작한 피부 모사판을 비지오미터 SV600(Visiometer SV600)(Courage-Khazaka electronic GmbH, 독일)을 이용하여 트랜스페어런시 프로필로메트리 분석(transparency profilometry analysis)을 실시하고, 주름의 파라미터인 R1, R2, R3, R4 및 R5를 분석하였다.

<108> R1, R2, R3, R4 및 R5의 구체적인 의미는 아래 표 5와 같다.

<109> 【표 5】

R1	피부 주름 정도(Skin roughness)	주름 프로필 중 가장 높은 꼭대기 값과 가장 낮은 계곡의 값의 차이
R2	최대 주름 정도(Maximum roughness)	주름 프로필을 5개로 균등하게 분할한 구역에 대하여 구한 5개의 R1 중 가장 큰 값
R3	평균 주름 정도(Average roughness)	주름 프로필을 X축을 따라 5개의 균등한 분절을 나눈 다음 각 분절 내에서 최대 값과 최소 값의 차이를 측정하여 산술 평균한 값(R1과 R2에 비해 인공음영(artifacts)가 제거된 값)
R4	주름 깊이(Smoothness depth)	주름 프로필 중 가장 꼭대기 값과 프로필이 이루는 면적을 적분하여 프로필의 중간선의 길이로 나눈 값(피부 주름의 평균 깊이)
R5	피부 평균 거칠기(Arithmetic average roughness)	프로필의 중간선과 프로필이 이루는 면적을 적분하여 프로필의 중간선의 길이로 나눈 값

<110>

<111> 시험군(실시예 2) 및 대조군(비교예 3)에 대한 R1(표 6), R2(표 7), R3(표 8), R4(표 9) 및 R5(표 10) 분석 결과는 아래 표와 같다.

<112> 【표 6】

			시험군 (평균±표준편차)	대조군 (평균±표준편차)
0주			53.86±11.30	45.42±12.54
4주			45.45±11.66	46.95±17.64
8주			37.62±7.94	50.51±13.05
군내 비교	유의 확률	0주-4주	0.026†	0.677
		0주-8주	0.000 *	0.214
군간 비교	유의 확률	0주-4주	0.047 **	
		0주-8주	0.000 **	

<113>

<114> *: p < 0.05 (짝지워진 표본 T-테스트(Paired sample's T-test))

<115> †: p < 0.05 (윌콕슨 사인드 랭크 테스트(Wilcoxon signed ranks test))

<116> **: p < 0.05 (독립 표본 T-테스트(Independent sample's T-test))

<117>

<118> 【표 7】

			시험군 (평균±표준편차)	대조군 (평균±표준편차)
0주			35.01±6.58	30.19±7.80
4주			28.13±4.87	27.98±6.59
8주			23.53±3.99	30.76±8.05
군내 비교	유의 확률	0주-4주	0.000 *	0.219
		0주-8주	0.000 *	0.788
군간 비교	유의 확률	0주-4주	0.051	
		0주-8주	0.000 **	

<119> *: p < 0.05 (짝지워진 표본 T-테스트(Paired sample's T-test))

<120> **: p < 0.05 (독립 표본 T-테스트(Independent sample's T-test))

<121>

<122> 【표 8】

			시험군 (평균±표준편차)	대조군 (평균±표준편차)
0주			23.31±4.02	20.37±5.15
4주			18.85±2.58	18.88±4.46
8주			16.24±2.58	20.67±4.87
군내 비교	유의 확률	0주-4주	0.000 *	0.194
		0주-8주	0.000 *	0.831
군간 비교	유의 확률	0주-4주	0.044 #	
		0주-8주	0.000 **	

<123> *: p < 0.05 (짝지워진 표본 T-테스트(Paired sample's T-test))

<124> **: p < 0.05 (독립 표본 T-테스트(Independent sample's T-test))

<125> #: p < 0.05 (만-위트니 U 테스트(Mann-Whitney U test))

<126>

<127> 【표 9】

			시험군 (평균±표준편차)	대조군 (평균±표준편차)
0주			23.00±6.96	19.03±6.53
4주			20.32±7.22	21.15±9.71
8주			16.27±4.49	21.25±6.36
군내 비교	유의 확률	0주-4주	0.294	0.322
		0주-8주	0.000†	0.275
군간 비교	유의 확률	0주-4주	0.110	
		0주-8주	0.001 **	

<128> †: p < 0.05 (윌콕슨 사인드 랭크 테스트(Wilcoxon signed ranks test))

<129> **: p < 0.05 (독립 표본 T-테스트(Independent sample's T-test))

<130>

<131> 【표 10】

			시험군 (평균±표준편차)	대조군 (평균±표준편차)
0주			10.16±3.18	8.38±3.37
4주			8.74±3.13	9.21±4.96
8주			7.09±2.13	9.97±3.53
군내 비교	유의 확률	0주-4주	0.162	0.429
		0주-8주	0.000 *	0.115
군간 비교	유의 확률	0주-4주	0.102	
		0주-8주	0.000 **	

<132> *: p < 0.05 (짝지워진 표본 T-테스트(Paired sample's T-test))

<133> **: p < 0.05 (독립 표본 T-테스트(Independent sample's T-test))

<134>

<135> 또한, 시험군(실시예 2) 및 대조군(비교예 3)에 대한 R1 및 R3 측정 결과를 각각 도 9와 도 10에 나타내었다.

<136> 상기 결과에서 볼 수 있듯이, 차수를 포함하는 마스크 시트인 실시예 2를 사용한 경우에는 주름의 파라미터인 R1, R2, R3, R4 및 R5 값이 모두 유의하게 감소하였으나, 차수를 포함하지 않은 마스크 시트인 비교예 3을 사용한 경우에는 R1, R2, R3, R4 및 R5 값에 변화가 없거나 오히려 증가하였다. 따라서 차수를 포함하는 화장료 조성물을 사용하는 경우 임상적으로도 피부 주름을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 기기에 의한 주름 평가로 확인할 수 있었다.

<137> (2) 전문가 육안에 의한 주름 평가

<138> 실시예 2와 비교예 3을 사용하기 전, 사용 4주 및 8주 후에 2인의 전문가가 글로벌 포토데미지 스코어(global photodamage score)(Br J Dermatol. 2010;162(3):497-502의 표 3 및 도 1 참고)로 피험자의 주름 정도를 점수화하였다. 점수 평가 기준은 아래 표 11과 같고, 평가 결과는 표 12와 같다. 두 전문가의 평가 점수에 차이가 있는 경우 낮은 점수를 선택하였다.

<139> 【표 11】

점수	주름 정도
0	없음
1	없음/온화함
2	온화함
3	온화함/중등도
4	중등도
5	중등도/심각함
6	심각함
7	매우 심각함

<140>

<141> 【표 12】

			시험군 (평균±표준편차)	대조군 (평균±표준편차)
0주			2.96±0.64	2.91±0.67
4주			2.61±0.66	2.91±0.67
8주			2.22±0.74	2.74±0.75
군내 비교	유의 확률	0주-4주	0.005†	1.000
		0주-8주	0.000†	0.046†
군간 비교	유의 확률	0주-4주	0.002 #	
		0주-8주	0.000 #	

<142> †: $p < 0.05$ (윌콕슨 사인드 랭크 테스트(Wilcoxon signed ranks test))

<143> #: $p < 0.05$ (만-위트니 U 테스트(Mann-Whitney U test))

<144>

<145> 상기 결과에서 볼 수 있듯이, 시험군의 전문가 육안 평가 점수 값은 시간이 지날수록 점점 감소하였으며, 대조군의 점수 값은 8주 후에야 비로소 감소하였다. 이를 정규성 검정에 따라 비모수적 검정인 윌콕슨 사인드 랭크 테스트로 분석한 결과, 시험군에서는 0주-4주 및 0주-8주 모두에서 유의 확률 $p<0.05$의 통계적으로 유의한 변화(유의 수준 5%)를 관찰할 수 있었다. 그러나, 대조군에서는 0주-8주에서만 유의 확률 $p<0.05$의 통계적으로 유의한 변화를 관찰할 수 있었다. 또한 주름 점수 값의 변화량이 시험군과 대조군 간에 차이가 있는지를 정규성 검정에 따라 비모수적 검정인 만-위트니 U 테스트로 분석한 결과, 시험군과 대조군 간에 유의 수준 5%에서 0주-4주 및 0주-8주 모두에서 유의 확률 $p<0.05$의 통계적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었다.

<146> 즉, 전문가에 의한 육안 평가를 통해서도 차수를 포함하는 화장료 조성물을 사용하는 경우 피부 주름을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

효소가 불활성화된 생찻잎에서 유래한 차수(tea water)를 포함하는 피부 노화 방지용 조성물.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

조성물은 조성물 전체 부피 기초로 10 내지 90 부피%(v/v %)의 차수를 포함하는 조성물.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서,

차수는 콜라겐 및 엘라스틴의 분해를 저해하는 조성물.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서,

차수는 비이온성인 차수를 포함하는 조성물.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서,

차수는 리날로올의 농도가 5 μg/ml 이하, 헥산올의 농도가 0.2 μg/ml 이하 및 z-3-헥센올의 농도가 0.2 μg/ml 이하 중 적어도 하나를 만족하는 차수를 포함하는 조성물.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서,

조성물은 피부 주름을 예방 또는 개선하는 조성물.

【청구항 7】

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

조성물은 화장료 조성물인 조성물.

【청구항 8】

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

조성물은 약학 조성물인 조성물.