

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0164775

(43) 공개일자 2023년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/14 (2006.01) A23K 10/30 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A23L 33/16 (2016.01)
A61K 33/242 (2019.01) A61K 36/28 (2006.01)
A61K 8/02 (2006.01) A61K 8/19 (2006.01)
A61K 8/9789 (2017.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/14 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2022-0063197

(22) 출원일자 2022년05월24일

심사청구일자 2022년05월24일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김연주

경기도 성남시 분당구 동관교로 275, 107동 801호(삼평동, 붓들마을1단지)

김훈

경기도 안성시 대덕면 대학 1길 17-24, 203호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

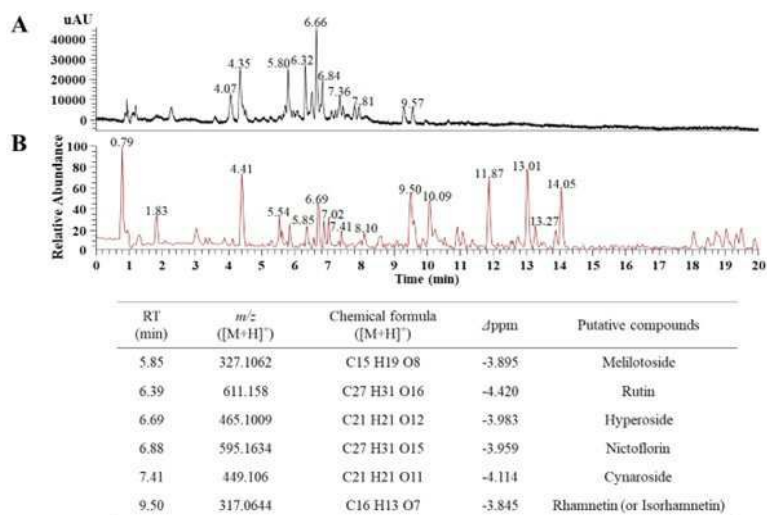
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자 및 이의 용도에 관한 것으로, 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자의 최적화된 합성 조건을 도출하였다. 이를 통해 제조된 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자는 등골나물 추출물 대비 현저히 낮은 세포 독성, 우수한 열 안정성을 가지고 있음을 확인하였으며, 이를 처리한 염증이 유도된 피부 세포에 있어서, ROS 생성 억제, 염증 관련 인자 발현을 억제하는 효과를 보였고, 히알루론산 및 히알루론산 생산에 미치는 인자의 발현을 현저히 증가시켰으며, 히알루론산 가수분해효소의 발현을 현저히 억제시킨 바, 본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자 제조용 조성물, 이의 제조 방법을 제공할 수 있으며, 상기 제조 방법을 통해 제조된 금 나노입자를 피부 질환 예방, 개선 또는 치료를 위한 다양한 용도로 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A23L 33/16 (2016.08)

A61K 33/242 (2022.01)

A61K 36/28 (2013.01)

A61K 8/0245 (2013.01)

A61K 8/19 (2013.01)

A61K 8/9789 (2017.08)

A61P 17/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

(72) 발명자

김진규

강원특별자치도 춘천시 지석로 10, 304동 1002호
(퇴계동, 중앙하이츠빌3단지아파트)

서찬곤

경기도 수원시 영통구 매영로 238번길 9 (원천동),
201호

명세서

청구범위

청구항 1

등골나물 추출물을 포함하는, 금(Au) 나노입자 제조용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 등골나물 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 하나의 용매로 추출된 것을 특징으로 하는, 금 나노입자 제조용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 등골나물 추출물은 4 내지 6 mg/mL 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 금 나노입자 제조용 조성물.

청구항 4

제 1항에 따른 금 나노입자 제조용 조성물과 금 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는, 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자의 제조 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 금 전구체는 1.0 내지 2.5 mM의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 반응은 50 내지 70℃로 수행되는 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 7

제 4항에 있어서,

상기 반응은 30 내지 50분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는, 제조 방법.

청구항 8

제 4항의 제조 방법에 의해 제조된, 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자.

청구항 9

등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 피부 질환은 염증성 피부 질환 또는 피부 건조 질환인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 염증성 피부 질환은 아토피성 피부염, 알레르기성 피부염, 접촉성 피부염, 여드름, 지루성 피부염 및 두드러기로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 12

제 10항에 있어서,

상기 피부 건조 질환은 피부 건조증, 건성 습진, 건선 및 색소성 건피증으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 13

등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 14

등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 개선용 건강보조식품.

청구항 15

등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 개선용 건강기능 식품 조성물.

청구항 16

등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 17

등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 개선용 사료첨가용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 나노 테크놀로지는 전기공학 및 생물공학에서 잠재적인 효과를 가지는 현대과학에서 중요한 분야로 급격하게 성장하고 있다. 그 중에서도 금속 나노입자는 이화학적이고 생물학적인 독특한 입자 크기와 그의 모양 때문에 중요하게 여겨지고 있으며(Colloids Surf B Biointerfaces, 107, 227-34), 특유의 전자성, 자기성, 촉매성 및 광학적인 특성으로 인하여 생의학, 광학 등의 분야에서 다양하게 응용되고 있어 그의 중요성은 점차 높아져 가고 있다.

[0004] 이러한 금속 나노입자는 물리적 방법 또는 화학적 방법으로 제조되어 왔으나, 상기 물리적 방법은 고가의 장비를 필요로 하고, 화학적 방법은 전자공여체 및 유기용매의 유독성으로 인한 후처리 공정이 필요한 문제점이 있었다.

[0005] 최근 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 최근 박테리아 또는 균주에 의한 제조방법이나, 천연 추출물을 유효성분으로 포함하는 친환경적인 금속 나노입자의 제조방법에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 그러나 종래 박테리아 또는 균주에 의해 금속 나노입자를 합성하는 방법은 짧게는 하루에서 길게는 며칠까지 합성을 위한 긴 시간이 필요하고, 합성된 나노입자의 안정화를 위해 부가적인 환원제 또는 안정화제와 같은 캡핑제(capping agent)가 필요하다는 단점이 존재하였다. 이에, 여전히 친환경적이면서 동시에 안정하고, 화학적 또는 물리적인 합성 방법과 비교할 때 제조시간의 한계를 극복한 금속 나노입자에 대한 개발은 계속 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 한편, 등골나물(*Eupatorium japonicum*)는 국화과에 속하는 여러해살이풀로, 한국, 중국 및 일본 등지에 분포하고 있다. 국내에 분포하는 등골나물속(*Eupatorium* spp.)은 등골나물(*E. japonicum*), 골등골나물(*E. lindleyanum*), 별등골나물(*E. makinoi* var. *oppisitifolium*), 서양등골나물(*E. rugosum*)이 주로 알려져 있다. 등골나물은 전체에 가는 털이 있고 줄기는 곧게 서며, 높이는 70cm 정도이다. 밀동에서 나온 잎은 작고 꽃이 필 때쯤이면 없어지며, 중앙부에 커다란 잎이 마주나고 짧은 잎자루가 있고, 상기 중앙부에 나는 잎은 난형 또는 긴 타원형으로, 가장자리에 톱니가 있다. 상기 등골나물의 꽃은 흰자주빛으로 두상꽃차례를 이루고 7 내지 10월에 핀다. 열매는 수과로 11월에 익는다. 등골나물은 발표(發表), 산한(散寒), 투진(透疹)의 효능이 있고 탈항, 발진하지 않는 홍역, 류머티즘의 요통, 감기로 인한 해수를 치료하는데 사용되어 왔으나, 추출물의 경우 세포독성을 갖고 있다는 문제점이 있다.

[0007] 이에 등골나물의 독성을 현저히 감소시키고, 등골나물이 갖는 유용한 효과를 증진시킬 수 있는 기술 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 등골나물이 보유한 세포독성을 완화시키면서도 더 우수한 활성을 보이는 물질을 개발하기 위하여 연구를 수행하던 중 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자를 제조하고, 이의 세포독성, 물리학적 특징 및 염증을 유발한 피부 세포에서의 항염증, 히알루론산 생성 촉진 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 금(Au) 나노입자 제조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 질환 예방 또는 개선용 건강보조식품을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 질환 예방 또는 개선용 건강기능 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 질환 예방 또는 개선용 사료첨가용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는, 금(Au) 나노입자 제조용 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 금 나노입자 제조용 조성물과 금 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는, 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자의 제조 방법을 제공한다.

[0022] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 제조 방법에 의해 제조된, 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자를 제공한다.

[0023] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0024] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0025] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 개선용 건강보조식품을 제공한다.

[0026] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 개선용 건강기능 식품 조성물을 제공한다.

[0027] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0028] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 개선용 사료첨가용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0030] 본 발명에 따르면 최적화된 합성 조건 하에 제조된, 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자는 등골나물 추출물 대비 현저히 낮은 세포 독성, 우수한 열 안정성을 가지고 있으며, 이를 처리한 염증이 유도된 피부 세포에 있어서, ROS 생성 억제, 염증 관련 인자 발현 억제, 히알루론산 생성 촉진 및 히알루론산 가수분해효소의 mRNA 발현을 억제할 수 있음을 확인하였으므로 본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자 제조용 조성물, 이의 제조 방법을 제공할 수 있고, 상기 제조 방법을 통해 제조된 금 나노입자를 피부 질환 예방, 개선 또는 치료를 위한 다양한 용도로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 등골나물 추출물의 주요 파이토케미컬(phytochemical)을 확인한 결과로, 도 1 중 A는 광 다이오드 어레이(Photo diode array, PDA) 결과이고, 도 1 중 B는 TIC(total ion chromatogram) 결과이다.

도 2는 등골나물 추출물의 화합물을 식별한 결과로, 도 2 중 A는 TIC의 각 피크의 분자량(molecular weight) 및 이온화 패턴(ionization pattern)을 MS로 추가 분석한 결과이며, 도 2 중 B는 TIC의 각 피크의 분자량 및 이온화 패턴을 MS/MS로 추가 분석한 결과이다.

도 3은 본 발명에 따른 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자의 합성을 위한 최적화된 조건을 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명에 따른 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자의 물리적 특성 및 크기를 확인한 결과로, 도 4 중 A는 상기 금 나노입자를 UV-Vis 분광광도계로 확인한 결과이며, 도 4 중 B는 상기 금 나노입자의 열적 안정

성을 확인한 결과이고, 도 4 중 C는 상기 금 나노입자의 화학적 작용기(chemical functional group)를 확인한 결과이며, 도 4 중 D는 상기 금 나노입자의 평균 강도 분포(Intensity distribution), 부피 분포(Volume distribution) 및 수 분포(Number distribution)를 확인한 결과이다.

도 5 중 A는 본 발명에 따른 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자의 표면 형태를 확인한 결과이고, 도 5 중 B는 상기 금 나노입자의 결정질 특성을 SAED 분석으로 확인한 결과이며, 도 5 중 C는 상기 금 나노입자의 결정질 특성을 XRD 분석으로 확인한 결과이고, 도 5 중 D 및 E는 상기 금 나노입자의 순도를 원소 맵핑으로 확인한 결과이며, 도 5 중 F는 상기 금 나노입자의 순도를 EDX 분광법으로 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명에 따른 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자와 등골나물 추출물의 세포 독성을 비교한 결과로, 도 6 중 A는 MTT 분석 결과이고, 도 6 중 B 및 C는 생존/사멸 세포 염색 결과이다. 이때 살아있는 세포는 녹색으로 염색하였고, 사멸된 세포는 붉은 색으로 염색하였다. 또한 NC는 배지 단독 처리된 음성 대조군이고, PC는 양성 대조군이며, 별표(*)는 NC와 각 실험군간의 유의미한 차이를 나타낸다. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

도 7은 본 발명에 따른 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자가 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine) 및 케모카인(chemokine) 생성에 미치는 영향을 확인한 결과로, 도 7 중 A는 RANTES mRNA 발현을 확인한 결과이고, 도 7 중 B는 TARC mRNA 발현을 확인한 결과이며, 도 7 중 C는 CTACK mRNA 발현을 확인한 결과이고, 도 7 중 D는 IL-6 mRNA 발현을 확인한 결과이며, 도 7 중 E는 IL-8 mRNA 발현을 확인한 결과이다. 이때 NC는 배지 단독 처리된 음성 대조군이고 T+I는 염증 유발 대조군이며, PC는 양성 대조군(덱사메타손(dexamethasone) 처리 후 염증을 유발)이고, EJ-AuNPs는 본 발명에 따른 금 나노입자를 처리한 후 염증을 유발한 실험군이다. 크로스해치 마크(crosshatch marks)는 NC와 상기 T+I 실험군 간의 유의미한 차이를 나타내고, 별표(*)는 상기 T+I 실험군과 각 실험군간의 유의미한 차이를 나타낸다. *: $p < 0.05$, ** 및 ##: $p < 0.01$, *** 및 ###: $p < 0.001$.

도 8은 본 발명에 따른 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자가 염증 관련 사이토카인 분비(secretion)에 미치는 영향을 확인한 결과로, 도 8 중 A는 IL-6 분비를 확인한 결과이고, 도 8 중 B는 IL-8 분비를 확인한 결과이며, 도 8 중 C는 TRAC 분비를 확인한 결과이고, 도 8 중 D는 ROS 생성에 미치는 영향을 확인한 결과이다. 이때 NC는 배지 단독 처리된 음성 대조군이고 T+I는 염증 유발 대조군이며, PC는 양성 대조군(덱사메타손 처리 후 염증 유발)이고, EJ-AuNPs는 본 발명에 따른 금 나노입자를 처리한 후 염증을 유발한 실험군이다. 크로스해치 마크는 NC와 상기 T+I 실험군 간의 유의미한 차이를 나타내고, 별표(*)는 상기 T+I 실험군과 각 실험군간의 유의미한 차이를 나타낸다. *: $p < 0.05$, ** 및 ##: $p < 0.01$, *** 및 ###: $p < 0.001$.

도 9는 본 발명에 따른 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자에 의한 염증 억제에 있어서, 기본 분자 메커니즘을 확인한 결과로, 도 9 중 A는 MAPK의 인산화를 나타내는 웨스턴 블롯팅 결과와 이를 정량한 결과이고, 도 9 중 B는 NF- κ B의 인산화를 나타내는 웨스턴 블롯팅 결과와 이를 정량한 결과이다. 이때 NC는 배지 단독 처리된 음성 대조군이고 T+I는 염증 유발 대조군이며, PC는 양성 대조군(덱사메타손 처리 후 염증 유발)이고, EJ-AuNPs는 본 발명에 따른 금 나노입자를 처리한 후 염증을 유발한 실험군이다. 크로스해치 마크는 NC와 상기 T+I 실험군 간의 유의미한 차이를 나타내고, 별표(*)는 상기 T+I 실험군과 각 실험군간의 유의미한 차이를 나타낸다. *: $p < 0.05$, ** 및 ##: $p < 0.01$, *** 및 ###: $p < 0.001$.

도 10은 본 발명에 따른 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자가 염증을 유발한 피부 세포에 있어서, 수분 유지에 미치는 영향을 확인한 것으로, 도 10 중 A는 히알루론산 생성을 확인한 결과이고, 도 10 중 B는 HAS1 mRNA 발현을 확인한 결과이며, 도 10 중 C는 HAS2 mRNA 발현을 확인한 결과이고, 도 10 중 D는 HAS3 mRNA 발현을 확인한 결과이며, 도 10 중 E는 HYAL1 mRNA 발현을 확인한 결과이고, 도 10 중 F는 HYAL2 mRNA 발현을 확인한 결과이다. 이때 NC는 배지 단독 처리된 음성 대조군이고, PC는 양성 대조군(염증 유발 후 GlcNAc(N-Acetylglucosamine) 처리)이고, EJ-AuNPs는 염증을 유발한 후 본 발명에 따른 금 나노입자를 처리한 실험군이다. 크로스해치 마크는 NC와 상기 T+I 실험군 간의 유의미한 차이를 나타내고, 별표(*)는 상기 T+I 실험군과 각 실험군간의 유의미한 차이를 나타낸다. *: $p < 0.05$, ** 및 ##: $p < 0.01$, *** 및 ###: $p < 0.001$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는, 금(Au) 나노입자 제조용 조성물을 제공한다.

본 발명의 금 나노입자 제조용 조성물은 천연 추출물인 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하여, 별도의 환원

제 또는 안정제의 부가 없이도 금 나노입자를 제조하는데 사용할 수 있다.

- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 “등골나물 추출물”은 등골나물의 줄기, 잎, 꽃, 열매 및 종자로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상의 부위를 추출한 것일 수 있으며, 바람직하게는 잎을 추출한 것일 수 있다.
- [0037] 상기 등골나물 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:
- [0038] 1) 등골나물 잎에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0039] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및
- [0040] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 농축한 후 건조하는 단계.
- [0041] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 등골나물 잎은 야생, 재배 또는 시판되는 것 등을 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0042] 상기 방법에 있어서, 상기 추출용매는 등골나물 추출물을 제조할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 물, C1 내지 C4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 용매를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 물 또는 에탄올을 사용할 수 있고, 보다 더 바람직하게는 50 내지 99%(v/v), 더욱 바람직하게는 60 내지 80%(v/v), 가장 바람직하게는 70%(v/v) 에탄올을 사용할 수 있다.
- [0043] 상기 방법에 있어서, 추출 방법으로는 여과법, 열수추출, 침지추출, 환류냉각추출 및 초음파추출 등 당업계의 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 추출용매는 건조된 등골나물 잎에 0.1 내지 10배 첨가할 수 있으며, 구체적으로는 0.3 내지 5배 첨가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 추출온도는 구체적으로 20℃ 내지 150℃일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 추출시간은 구체적으로 5분 내지 96시간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 일 실시예에서는 건조된 등골나물 잎을 70% 에탄올에 침지하여 20 내지 25℃에서 3일동안 추출하였다.
- [0045] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 구체적으로 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 건조는 구체적으로 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결 건조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 용어, “금 나노입자”는 금(Au)으로 이루어진, 크기가 1-150nm인 초미세입자로, 작은 크기에서 기인하는 특이하고도 다양한 성질을 보이는 입자를 의미한다. 본 발명에 따른 금 나노입자는 등골나물 추출물을 이용하여 제조하였기 때문에 상기 추출물의 생리활성 물질을 포함하고 있어, 다른 방법으로 제조된 금속 나노입자보다 매우 우수한 생물학적 활성을 가질 수 있다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 등골나물 추출물은 4 내지 6 mg/mL의 농도로 포함되는 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 5 내지 6 mg/mL의 농도로 포함될 수 있으며, 보다 바람직하게는 5 mg/mL의 농도로 포함될 수 있다.
- [0048] 더불어 본 발명은 본 발명에 따른, 등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자 제조용 조성물과 금 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는, 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자의 제조 방법을 제공한다.
- [0049] 본 발명에서 제공하는 금 나노입자의 제조방법은 천연 추출물인 등골나물 추출물을 이용하기 때문에, 종래의 화학적 합성방법 및 물리적 합성방법에 비해 친환경적이고, 동시에 별도의 환원제 또는 안정제 없이 안정화를 유지할 수 있는 금 나노입자를 제조할 수 있어, 다양한 산업 분야에서 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 상기 용어, “금 전구체”는 금 나노입자를 제조하기 위하여 첨가하는 화합물을 의미하며, 해당 활성이 알려진 화합물이라면 제한없이 사용할 수 있다. 상기 금 전구체는 테트라클로로금(III)산(HAuCl_4), AuCl , AuCl_2 , AuCl_3 , NaAuCl_2 , NaAuCl_3 및 $\text{Na}_2\text{Au}_2\text{Cl}_8$ 로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 보다 바람직하게는 테트라클로로금(III)산(HAuCl_4)을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 금염 수화물(gold (III) chloride trihydrate; $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)을 사용하였다.
- [0051] 특히 본 발명은 상기 금 나노 입자의 제조 방법에 있어서, 최적화된 조건을 확립한 기술적 특징이 있다.
- [0052] 상기 금 전구체는 1.0 내지 2.5 mM의 농도로 포함되는 것을 특징으로 한다. 보다 바람직하게는 1.5 내지 2.5 mM의 농도로 포함될 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 2.0 내지 2.5 mM의 농도로 포함될 수 있으며, 더욱더 바람

직하게는 2.0 mM의 농도로 포함될 수 있다.

- [0053] 또한, 상기 반응은 50 내지 70 °C로 수행되는 것을 특징으로 한다. 보다 바람직하게는 60 내지 65 °C로 수행될 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 60 °C로 수행될 수 있다.
- [0054] 또한, 상기 반응은 30 내지 50분 동안 수행되는 것을 특징으로 한다. 보다 바람직하게는 30 내지 40분 동안 수행될 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 40분 동안 수행될 수 있다.
- [0055] 즉, 본 발명의 제조 방법은 바람직한 일 구체예로서, 5 mg/mL의 등골나물 추출물을 포함하는, 금 나노입자 제조용 조성물과 2.0 mM의 HAuCl_4 을 60°C에서 40분동안 반응시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0056] 더불어 본 발명은 본 발명에 따른 제조 방법에 의해 제조된, 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자를 제공한다.
- [0057] 본 발명의 금 나노입자는 의료용, 생물학적 분석용, 연료용, 전자부품 재료의 용도로 사용될 수 있다. 이에 제한되지 않지만, 구체적으로, 금 나노입자는 고유의 빛 전도 특성으로 인해 유기태양전지, 센서프로브, 생물의학용 약물 전달체, 전도재료 및 촉매제로 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 금 나노입자는 크기나 형태, 표면의 화학적 특성 또는 응집상태를 변화시킴으로써, 입자의 광학적, 전자적 특성을 조절할 수 있다.
- [0058] 특히 본 발명에 따른 금 나노입자는 등골나물 추출물이 보유한 다양한 생리활성 물질을 포함하는 바, 상기 생리활성 물질의 효과가 필요한 다양한 분야에 활용할 수 있다. 더욱이 본 발명의 일 실시예에 따르면 본 발명에 따른 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자는 등골나물 추출물 대비 현저히 낮은 세포 독성을 보였고, 우수한 열 안정성을 보임을 확인하였다.
- [0059] 더불어 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면 본 발명에 따른 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자를 염증 반응을 유도한 인간 피부 각질 세포에 처리하였을 때 ROS 생성을 억제하였고, 염증 관련 인자 발현을 억제하는 활성을 보임을 확인하였다. 또한 또 다른 일 실시예에 따르면 본 발명에 따른 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자를 염증 반응을 유도한 인간 피부 각질 세포에 처리하였을 때 히알루론산 생성 촉진 및 히알루론산 가수분해효소의 mRNA 발현을 억제하는 활성을 보임을 확인하였다. 특히 상기 활성에 있어서 본 발명에 따른 금 나노입자의 활성이 등골나물 추출물 자체의 활성보다 현저히 우수함을 확인하였다.
- [0060] 따라서 본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0061] 상기 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자는 상기 기술된 제조방법으로 제조된 것일 수 있다.
- [0062] 본 발명에 있어서, 용어, "예방"은 상기 약학적 조성물의 투여로 피부 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 용어 "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여로 피부 질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [0064] 상기 피부 질환은 피부에 염증 반응이 발생한 모든 종류의 질환 또는 피부 건조에 의해 유발되는 피부 건조 질환을 의미한다. 상기 염증 반응이 발생한 모든 종류의 질환은 염증성 피부 질환을 의미할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니나, 아토피성 피부염, 알레르기성 피부염, 접촉성 피부염, 여드름, 지루성 피부염 및 두드러기로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0065] 상기 피부 건조 질환은 이에 제한되는 것은 아니나, 피부 건조증, 건성 습진, 건선 및 색소성 건피증으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0066] 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 본 발명의 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을

섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순회석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0067] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 1000mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0068] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0069] 본 발명에 있어서, 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 본 발명에 따른 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자 이외에, 항염증 효과의 상승, 보강을 위하여 이미 안전성이 검증되고 보습, 수분 유지 또는 염증 질환의 치료 효과를 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다.

[0070] 더불어 본 발명의 약학적 조성물은 피부 질환의 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0071] 또한 본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물, 건강보조식품 및 건강기능 식품 조성물을 제공한다.

[0072] 상기 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자는 상기 기술된 제조방법으로 제조된 것일 수 있다.

[0073] 더불어 본 발명에 따른 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 분말제, 정제, 캡슐제, 환제 및 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 형태로 제형화 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 당 업계에 공지된 방법을 이용하여 다양한 형태로 제조할 수 있다.

[0074] 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자 자체를 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취하거나 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 할 수 있다. 또한, 본 발명의 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자를 항염증 활성이 있다고 알려진 공지의 물질 또는 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.

[0075] 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마멀레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 젓, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자를 첨가하여 제조할 수 있다.

[0076] 또한 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 "식품 첨가물 공전"에 수제된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제 제류들을 들 수 있다.

[0077] 본 발명의 식품 조성물에 있어, 상기 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자는 바람직하게 식품 조성물 대비 0.00001~50 중량%로 포함될 수 있다. 상기 함량이 0.00001 중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미비하고, 50 중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 비경제적이다.

- [0078] 또한, 본 발명의 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자를 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조하여 사용할 수 있다.
- [0079] 본 발명의 조성물이 음료로 제조될 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g이다.
- [0080] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0081] 본 발명에 있어서, “건강보조식품” 또는 ‘건강기능 식품’이란 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, “기능성”이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0082] 더불어 본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0083] 상기 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자는 상기 기술된 제조방법으로 제조된 것일 수 있다.
- [0084] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함할 수 있다.
- [0085] 본 발명의 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 유액, 크림, 화장수, 팩, 파운데이션, 로션, 미용액, 모발화장료 등을 들 수 있다.
- [0086] 구체적으로, 본 발명의 화장품 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저의 제형을 포함한다.
- [0087] 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.
- [0088] 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.
- [0089] 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.
- [0090] 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.
- [0091] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에

탄올아미드, 식물성유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0092] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 유효성분 이외에 추가로 동일 또는 유사한 항염증 활성을 나타내는 성분을 비롯하여 피부 상태 개선에 도움을 주는 성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 상기 성분은 히알루론산, 부틸렌글라이콜(Butylene Glycol), 글리세린(Glycerin), 아미노산(amino acid), 트레할로스(trehalose), 코지산(kojic acid) 및 이의 유도체, 알부틴(arbutin), 아스코르브산(ascorbic acid) 및 이의 유도체, 하이드로퀴논(hydroquinone) 및 이의 유도체, 레조르시놀(resorcinol), 2,7-디니트로인다졸(2,7-dinitroindazole), 아데노신(adenosine), 레티놀(retinol), 레티닐팔미테이트(retinyl palmitate), 폴리에톡실레이티드레티나마이드(polyethoxylated retinamide), 효모, 다이펩타이드(dipeptide), 팔미토일 올리고펩타이드(Palmitoyl oligopeptide) & 팔미토일 테트라펩타이드-7(Palmitoyl Tripeptide-7), 아세틸 헥사펩타이드(acetyl hexapeptide), EGF(epidermal growth factor) 또는 덩굴굴, 쌀, 감초, 시어버터, 알로에 베라, 코코넛, 올리브, 아보카도와 같은 식물 추출물 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0093] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 팩에 포함되어 제공될 수 있다. 상기 팩은 마스크(mask)팩, 수면팩, 클렌징(cleansing)팩, 워시 오프 팩(wash off) 및 필 오프(peel off) 팩 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조된 것이 바람직하지만 이에 제한되지 않는다.

[0094] 또한 본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는 금(Au) 나노입자를 포함하는, 피부 질환 예방 또는 개선용 사료첨가용 조성물을 제공한다.

[0095] 본 발명의 용어 "사료"란, 동물이 먹는 임의의 천연 또는 인공 구정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미하며, 본 발명에 따른 항산화 활성 증대를 위한 사료 첨가용 조성물을 유효성분으로 포함하는 사료는 당업계에서 공지된 다양한 형태의 사료로 제조가능하며, 바람직하게는 농후 사료, 조사료 및/또는 특수사료가 포함될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0096] 본 발명에 있어서 용어, "사료첨가용 조성물"은 "사료첨가제"를 의미할 수 있으며, 이는 동물에 있어 질병 증상의 완화, 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 유질개선, 번식장애 예방 및 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 목적으로 사료에 첨가하는 물질을 포함한다.

[0097] 본 발명의 사료첨가용 조성물은 사료관리법상의 보조사료에 해당하며, 탄산수소나트륨, 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 A D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 라이신 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0098] 상기 사료 중 농후사료로는 밀, 귀리, 옥수수 등의 곡류를 포함하는 종자열매류, 곡물을 정제하고 얻는 부산물로서 쌀겨, 밀기울, 보릿겨 등을 포함하는 겨류, 콩, 유채, 깨, 아마인, 코코야자 등을 채유하고 얻는 부산물인 깻묵류와 고구마, 감자 등에서 녹말을 뺀 나머진인 녹말찌꺼기의 주성분인 잔존녹말질류 등의 찌꺼기류, 어분, 물고기찌꺼기, 어류에서 얻은 신선한 액상물(液狀物)을 농축시킨 것인 피시솔루블(fish soluble), 육분(肉粉), 혈분, 우모분, 탈지분유, 우유에서 치즈, 탈지유에서 카제인을 제조할 때의 잔액인 웨이(whey)를 건조한 건조웨이 등의 동물질사료, 효모, 클로렐라, 해조류가 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0099] 상기 사료 중 조사료로는 야초, 목초, 풋배기 등의 생초(生草)사료, 사료용 순무, 사료용 비트, 순무의 일종인 루터베어거 등의 뿌리채소류, 생초, 풋배기작물, 곡실(穀實) 등을 사일로에 채워 놓고 젖산발효시킨 저장사료인 사일리지(silage), 야초, 목초를 베어 건조시킨 건초, 종축용(種畜用) 작물의 짚, 콩과 식물의 나뭇잎이 있으며, 이에 제한되지 않는다. 특수사료에는 굴껍데기, 암염 등의 미네랄 사료, 요소나 그 유도체인 디우레이드이소부탄 등의 요소사료, 천연사료원료만을 배합했을 때 부족하기 쉬운 성분을 보충하거나, 사료의 저장성을 높이기 위해서 배합사료에 미량으로 첨가하는 물질인 사료첨가물, 식이보조제가 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0100] 본 발명에 따른 상기 사료첨가용 조성물은 당업계에 공지된 다양한 사료 제조방법에 따라 적절한 유효 농도 범위에서 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자를 첨가하여 제조 가능하다.

[0101] 또한 본 발명에 따른 사료첨가용 조성물은 피부 질환 예방 또는 개선을 목적으로 하는 개체라면 제한없이 적용 가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간 동물, 조류 및 어류 등 어느 개체에도 적용이 가능하다.

[0103] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0105] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0107] 실험예 1. 등골나물 잎 추출물의 준비

[0108] 한국의 비무장지대에 인접한 경기 북부에서 야생 등골나물(*Eupatorium japonicum*, EJ) 잎을 채취하였다. 경기도 경제과학진흥원으로부터 상기 식물이 등골나물임을 최종 확인받은 후 건조하였다. 건조된 잎을 5볼륨(w/v)의 70% 에탄올에 침지해 20 내지 25℃에서 3일동안 추출하였다.

[0109] 추출물은 20 μm의 여과지를 이용해 여과한 후, 회전농축기(rotary evaporator, 뷰키코리아㈜)를 이용해 농축하였다. 그런 후 동결건조기(freeze-drier, 일신바이오베이스)를 이용해 건조하여 21.1% 수율의 EJ 잎 에탄올 추출물을 수득하였다.

[0111] 실험예 2. UPLC-MS/MS(ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry)를 이용한 주요 파이토케미컬(phytochemical)의 정성적 측정.

[0112] UPLC-MS 시스템(LTQ Orbitrap XL, Thermo Electron, Waltham, MA, USA)을 이용하여, 상기 실험예 1에서 추출한 EJ 잎 에탄올 추출물의 주요 파이토케미컬을 정성 측정하였다. 이때 10 mg/mL의 EJ 추출물을 UPLC 시스템에 주입하였고, 하기 표 1의 조건 하에 분석하였다.

표 1

[0113] UHPLC system	LTQ Orbitrap XL (Thermo Electron Co., Waltham, MA, USA)
고정상(Stationary phase)	ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1×150 mm, 1.7 μm; Waters, Co., Milford, MA, USA)
이동상(Mobile phase) 및 기울기 프로그램(gradient program)	A) 0.1% 포름산(formic acid)/물(water) B) 0.1% formic acid/acetonitrile · -3 min → 0 min (5% B, 평형(equilibrium)) · 0 min → 0.5 min (5% B) · 0.5 min → 10 min (5% B → 80% B) · 10 min → 10.1 min (80% B → 100% B) · 10.1 min → 12 min (100% B)
이온화(Ionization)	300℃에서 HESI(Heated electrospray ionization)
분무 전압(Spray voltage)	5.0 kV
네블라이저 시스(Nebulizer sheath) 및 보조가스(auxiliary gases)	50 and 5 arb(arbitrary unit)
질량 비정(Mass range)	100-1000 m/z
CID(Collision-induced dissociation)	45%
데이터 수집(Data acquisition)	Xcalibur (Thermo Electron Co., Waltham, MA, USA)

[0115] 실험예 3. 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자에 대한 최적화된 조건 확인

[0116] EJ 추출물을 포함하는 금 나노입자(AuNP)의 생합성을 위한 최적의 조건을 설정하기 위해 EJ 농도, 금염 수화물(gold (III) chloride trihydrate; HAuCl₄·3H₂O(시그마-알드리치 케미칼(Sigma-Aldrich Chemicals, USA)에서 구입))의 농도, 반응 온도 및 시간의 4가지 매개변수를 확인하였다.

[0117] 보다 구체적으로, HAuCl₄·3H₂O(0.5 내지 2.5 mM)를 함유한 증류수(1mL)를 건조된 EJ(1 내지 6mg)에 첨가하여 혼합하였다. 상기 혼합물을 지정된 온도(30 내지 70 ℃) 및 지정된 시간(20 내지 50분)동안 반응시켰다. 반응 후 색 변화와 흡광도를 육안 또는 UV-Vis 분광기(Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)로 확인

하여 합성된 나노입자의 최적 조건을 확인하였다. 이를 위하여 용해성 물질을 제거하기 위해 혼합물을 원심분리 (12,000rpm, 20분)하고, 침전된 입자를 증류수로 세척하였다. 이 과정을 4회 더 반복하여 입자를 정제하였다. 최종적으로 동결건조기를 이용하여 입자를 건조시켜 EJ 추출물을 이용해 생합성한 AuNP(EJ-AuNP)를 수득하였다.

[0119] 실험예 4. 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자의 물리화학적 특성 확인

[0120] EJ-AuNP의 열적 안정성은 TGA(thermogravimetric analysis, (TGA/DSC 1; 쥘연진에스텍))를 이용해 30 내지 600 °C에서 확인하였다. 더불어 FT-IR 분광법(Fourier transform infrared spectroscopy, (PerkinElmer Inc))를 이용해 500 내지 4000cm⁻¹ 범위에서 EJ-AuNP 표면의 작용기를 확인하였다. 또한 DLS(dynamic light scattering) 입자 크기 분석기(Otsuka Electronics)를 이용해 크기 범위 1 내지 100nm에서 EJ-AuNP의 입자 크기 및 크기 분포를 확인하였다.

[0121] TEM과 달리 DLS는 유기 셸(organic shell)을 고려하여 콜로이드(colloid)에 있는 접합체(conjugate)의 전체 크기 또는 평균 유체역학적 크기(hydrodynamic size)를 결정하는 방법이다. 콜로이드에서 각 나노입자를 덮고 있는 생체 분자의 수가 많기 때문에 DLS 측정으로 얻은 유체역학적 크기는 TEM 분석으로 얻은 크기보다 상당히 크게 측정되는 특징이 있다. 더불어 EJ-AuNP의 입자 크기, 미세한 형태, 원소 조성(elemental composition) 및 결정질 특성(crystalline nature)를 확인하기 위해, SAED(selected area electron diffraction) 및 EDX(energy-dispersive X-ray spectrometry)와 결합된 FE-TEM(Field-emission-transmission electron microscopy, (JEM-2100F))을 200kV의 전압에서 수행하였다. 또한 EJ-AuNP의 순도와 결정성을 확인하기 위하여, 1.54 Å CuK α 방사선과 함께 XRD(A powered X-ray diffractometer, D8 Advance)를 수행하였다.

[0122] 또한 JEM-2100F(JEOL) 기기를 통한 원소 맵핑(elemental mapping)을 수행하였다.

[0124] 실험예 5. 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자의 세포 독성 여부 확인

[0125] 인간 표피 각질세포(Human epidermal keratinocytes, HaCaT, (CLS GmbH))를 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS, (GenDEPOT)), 100U 페니실린(penicillin) 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신(streptomycin, (GenDEPOT))을 함유하는 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, (GenDEPOT))에서 배양하였다. 그런 다음 세포를 5% CO₂/95% 공기와 함께 가습된 배양기(incubator)에서 배양하였다. 배양된 세포(1×10^4 cells)를 96-웰 플레이트(SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)에 플레이팅하고 24시간 동안 안정화시켰다. 그런 후 세포를 PBS(phosphate-buffered saline)로 2회 세척한 후, EJ-AuNP를 함유하는 신선한 무혈청 배지(scrum-free medium, SFM)를 세포에 첨가하고 24시간 동안 더 배양하였다.

[0126] 상기 세포에 신선한 SFM 또는 20 μ g/mL의 상업용 덱사메타손(dexamethasone)을 함유한 SFM를 처리하였다. 그 후 MTT(3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 용액(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 생존/사멸 세포 염색 키트(live/dead cell staining kit, (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, MA, USA))를 사용하여 EJ-AuNP의 세포 독성 여부를 확인하였다.

[0128] 실험예 6. ROS(Reactive oxygen species) 염색

[0129] HaCaT 세포(2×10^5 세포)를 6웰 플레이트(SPL Life Sciences)에 접종하고 24시간 동안 안정화시켰다. 그 후 PBS로 두 번 세척하고 EJ-AuNP를 함유하는 신선한 SFM으로 1시간 동안 처리하였다. EJ-AuNP가 처리된 세포에서 ROS 수준을 비교하기 위하여, SFM만 처리하거나, 또는 20 μ g/mL의 상업용 덱사메타손을 함유한 SFM를 처리하였다. 이어서, 세포를 10ng/mL의 TNF- α (tumor necrosis factor-alpha, (210-TA-100/CF, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)) 및 10 ng/mL IFN- γ (interferon-gamma, (285-IF-100/CF, R&D Systems))를 포함하는 재조합 단백질 혼합물로 처리하였다(이하, T+I 혼합물 또는 T+I라 기재).

[0130] 이를 PBS로 2번 세척한 후, 세포의 ROS 분석 키트(cellular ROS assay kit (ab113851; Abcam, Cambridge, U K))를 이용하여 제조사의 지침에 따라 세포를 염색하였다. 세포내 ROS 수준은 Leica DM 형광 현미경(Leica DM IRB fluorescence microscope, (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany))을 이용하여 시각화하였고, GraphPad 소프트웨어(GraphPad software, (Prism 8; San Diego, CA, USA))를 이용하여 정량화하였다.

[0132] 실험예 7. qRT-PCR(Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction) 분석

[0133] HaCaT 세포를(2×10^5 세포) 60mm 접시(SPL Life Sciences)에 접종하고 24시간동안 안정화시켰다. 세포를 PBS로 2회 세척한 후, EJ-AuNP를 포함하는 신선한 SFM을 1시간 동안 처리하였다. EJ-AuNP가 처리된 세포에서 유전자 발현 수준을 비교하기 위하여, SFM만 처리하거나, 또는 $20 \mu\text{g/mL}$ 의 상업용 텍사메타손을 함유한 SFM를 처리하였다. 이어서 세포를 T+I 혼합물로 24시간 동안 처리하였다. PBS로 두번 세척한 후, TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 총 RNA를 추출하고 마이크로플레이트 분광광도계(microplate spectrophotometer, (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA))를 사용하여 나노드롭 플레이트(nanodrop plate)에서 정량화하였다. AmfiRivert cDNA synthesis kit (GenDEPOT)를 이용하여 동일한 양의 총 RNA를 역전사하고, AmfiSure qGreen Q-PCR master mix (GenDEPOT) 및 SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa Bio Inc., Kusatsu, Japan)를 이용한 Rotor-gene Q real-time PCR detection system을 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 이를 위하여 하기 표 2에 기재된 프라이머를 사용하였다. 표적 유전자의 발현 수준은 내인성 대조군 유전자인 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 발현 수준에 대해 계산하고 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 공식을 사용하여 정규화하였다.

표 2

프라이머	방향	서열 (5'→3')
IL-6	정방향	5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3'
	역방향	5'-TGTACTCCAGGTAGCTATGG-3'
iNOS	정방향	5'-AATGGCAACATCAGGTCGGCCA-3'
	역방향	5'-GCTGTGTGTCACAGAAGTCT-3'
IL-8	정방향	5'-GAGAGTGATTGAGAGTGGACCAC-3'
	역방향	5'-CACAACCCCTCTGCACCCAGTTT-3'
TARC	정방향	5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'
	역방향	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
RANTES	정방향	5'-CATATTCCTCGACACCACACCT-3'
	역방향	5'-ACTCCTGACCTCAAGTGATCCACC-3'
CTACK	정방향	5'-CACTGCCTGCTGACTCAGCTCTA-3'
	역방향	5'-CTTCAGCCCATTTTCCTTAGCATC-3'

[0135] 실험예 8. ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 분석

[0136] 먼저 HaCaT 세포(1×10^4 세포)를 96웰 플레이트에 접종하고 24시간동안 안정화시켰다. 상기 세포를 PBS로 두 번 세척한 후, 신선한 SFM으로 1시간 동안 처리하였다. 이때 대조군으로써 $20 \mu\text{g/mL}$ 의 상업용 텍사메타손을 함유한 SFM를 처리하였다. 이어서 세포를 T+I 혼합물로 24시간 동안 처리하였다. 그 후 상등액을 수집하고 IL-6(interleukin-6, (555220; BD Biosciences, Newark, DE, USA)), IL-8(555244; BD Biosciences) 및 TARC(thymus and activation-regulated chemokine, (DY364; R&D Systems))을 제조사의 지침에 따라 ELISA를 통해 확인하였다.

[0138] 실험예 9. 웨스턴 블랏(Western blot) 분석

[0139] HaCaT 세포(2×10^5 세포)를 6웰 플레이트에 접종하고 24시간 동안 안정화시켰다. 그 후 PBS로 두 번 세척하고 단백질분해효소 억제제(protease inhibitor, (GenDEPOT))를 포함하는 Pierce RIPA 완충 시약(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 세포로부터 총 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 BCA(bicinchoninic acid) 단백질 분석 키트(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 정량화하였다. 총 단백질의 동일한 양을 10% SDS-폴리아크릴 아마이드 겔(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel)에서 분리하고, 분리된 단백질을 겔에서 PVDF 멤브레인(polyvinylidene fluoride membrane), (Thermo Fisher Scientific))으로 옮겼다. 멤브레인은 5% 탈지유(skim milk)를 포함하는 PBST를 이용해 20 내지 25℃에서 2시간동안 블로킹(blocking)한 후 PBST로 세번 세척하였다. 그 후 멤브레인을 1차 항체(Primary antibody)와 함께 4℃에서 밤새 반응시켰다. 상기 1차 항체는 다음과 같다: p38 MAPK(p38 mitogen-activated protein kinase(p38), #8690), JNK(c-Jun N-terminal kinase, #9252),

ERK1/2(extracellular signal-regulated kinase, #4695), NF- κ B p65(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells p65(p65), #8242), I κ B α (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells inhibitor alpha, #4814), β -액틴(β -actin, #3700), p(인산화)-p38 (#4511), p-JNK (#4668), p-ERK (#4370), p-p65 (#3033), 및 p-I κ B α (#9246). 1차 항체와 반응시킨 멤브레인은 PBST를 이용해 3번 세척한 후, 항-마우스/레빗 IgG(anti-mouse/rabbit IgG antibody, #98164)에 대한 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체(secondary antibody)와 20-25°C에서 1시간동안 반응시켰다. 모든 항체는 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 2차 항체와 반응이 완료된 멤브레인을 PBST를 이용해 5번 세척하고 발광 시약(West-Q Pico ECL Solution (GenDEPOT))을 사용하여 단백질 블롯(protein blot)을 시각화하였다. 각 표적 단백질의 발현 수준은 온라인 웹사이트(<https://imagej.nih.gov/ij/>)에서 제공하는 ImageJ 소프트웨어(ImageJ software)를 사용하여 정량화하였다.

[0141] 실험예 10. EJ-AuNP가 히알루론산(Hyaluronic acid) 생산에 미치는 영향 확인

[0142] 더불어 인간 각질세포에서 히알루론산 생산에 EJ-AuNP가 미치는 영향을 확인하였다.

[0143] 히알루론산(Hyaluronic acid, HA)은 피부 수분 유지에 중요한 요소로, 고유한 수분 보유 능력을 가지고 있다. HA는 HAS(hyaluronic acid synthases)를 조절하여 피부 수분을 증가시키는 것으로 보고되었으며, HAS는 3가지 동형(HAS1, HAS2 및 HAS3)을 가지고 있다. 또한 HYAL(hyaluronidase)은 HA를 가수분해하는 효소로 잘 알려져 있다. 따라서 EJ-AuNP가 HA 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 ELISA를 이용해 각 실험군의 HA 생산을 확인하고, HAS1, HAS2, HAS3, HYAL1, HYAL2의 mRNA 발현을 하기 표 3의 프라이머를 이용한 qRT-PCR로 확인하였다. 이를 위하여 HaCaT 세포에 T+I 혼합물을 30분동안 처리하여 사전 자극한 후 24시간 동안 EJ-AuNP(25, 50, 100 μ g/mL)를 처리하였다. 한편 세포 표면에 있는 HA와 케라틴 설페이트(keratin sulfate)의 기본 성분인 GlcNAc(N-Acetylglucosamine)를 양성대조군으로 사용하였다(처리 농도: 5 mg/Ml).

표 3

프라이머	방향	서열(5'→3')
HAS1	정방향	5'-CCTCACCAACCGCATGCT-3'
	역방향	5'-GGACGAGGCGTCTCTGA-3'
HAS2	정방향	5'-CTGGGACGAAGTGTGGATTATG-3'
	역방향	5'-GATGAGGCTGGGTCAAGCAT-3'
HAS3	정방향	5'-GCCCTCGGCGATTTCG-3'
	역방향	5'-TGGATCCAGCACAGTGTGAGA-3'
HYAL1	정방향	5'-CCTCACCAACCGCATGCT-3'
	역방향	5'-TCCTTGATGGCTGACATGA-3'
HYAL2	정방향	5'-GCACTCCCAGTCTACGTCTTCA-3'
	역방향	5'-GCACTCTCGCCAATGGTAGAG-3'
GAPDH	정방향	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
	역방향	5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'

[0147] 실험예 11. 통계 분석(Statistical analysis)

[0148] 모든 실험은 3회 반복 수행하였으며, 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 통계 분석은 ASW Statistics 18 (IBM Co., Armonk, NY, USA)를 이용하여 수행하였다. 두 실험군 간의 통계적 비교는 Student's t-test를 사용하여 수행하였으며, $p < 0.05$, $p < 0.01$, 및 $p < 0.001$ 은 서로 다른 수준에서 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였다.

[0150] 실시예 1. EJ 추출물의 주요 파이토케미칼 식별

[0151] UPLC-MS 시스템을 이용하여 확인한 EJ 추출물의 주요 파이토케미칼 분석 결과는 도 1에 나타내었다. 상기 도 1

에 있어서, 도 1 중 A는 광 다이오드 어레이(Photo diode array, PDA) 결과이고, 도 1 중 B는 도 1 중 B는 TIC(total ion chromatogram) 결과이다.

[0152] 더불어 상기 TIC 결과의 각 피크의 분자량(molecular weight) 및 이온화 패턴(ionization pattern)을 MS(도 2 중 A) 및 MS/MS(도 2 중 B)로 추가 분석하여 보유한 스펙트럼 라이브러리(spectral library) 및 웹 기반 데이터 베이스(web-based database)를 통해 추정 화합물의 정체를 확인하였다.

[0153] 그 결과, TIC에서 5.85분의 이온 피크가 MS의 양이온화 모드에서 m/z 327.0876으로 확인되었으며, MS/MS를 통해 m/z 310.1402($[M+H]^+$)에서 생성 이온(product ion)을 측정하여 멜릴로토시드(melilotoside, CAS No. 618-67-7)의 추정되는 식별(putative identification) 정보를 제공하였다. 동일한 과정을 통해 TIC의 결과에서 5 개의 피크(6.39, 6.69, 6.88, 7.41 및 9.50분)는 각각 m/z 611.1580 ($[M+H]^+$), 465.1009 ($[M+H]^+$), 595.1637 ($[M+H]^+$), 449.1060 ($[M+H]^+$), 및 317.0644 ($[M+H]^+$)을 통해 루틴(rutin (quercetin-3-O-rutinoside)), 하이 퍼로우사이드(hyperoside (quercetin 3-O- β -galactoside)), 닉토플로린(nictoflorin (kaempferol-3-O- β -rutinoside)), 시나로시드(cynaroside (luteolin 7-O- β -D-glucoside)), 및 람네티(rhamnetin (quercetin 7-methyl ether))으로 추정되었다.

[0155] 실시예 2. EJ-AuNP 합성에 대한 최적화된 조건 설정

[0156] EJ-AuNP 생합성을 위한 최적의 조건을 탐색한 결과를 도 3에 나타내었다. 그 결과, 5 mg/mL의 EJ 추출물, 2 mM의 금 염(gold salt) 및 60°C에서 40분동안 반응시킬 때, 흡수 스펙트럼에 있어서 가장 높은 피크(붉은색 실선)가 확인되었다. 따라서 상기 조건을 본 발명에 따른 EJ-AuNP 합성에 있어서 최적의 조건으로 설정하였으며, 이후 실험에서 상기 조건을 통해 합성한 EJ-AuNP를 사용하였다.

[0158] 실시예 3. EJ-AuNP의 물리학적 특성 및 크기 확인

[0159] UV-Vis 분광광도계를 통해 확인한 결과 도 4 중 A와 같이, EJ 추출물에 대한 특정 흡광도는 확인되지 않았지만, EJ-AuNP는 547nm의 흡광도에서 강한 피크를 나타냈다. EJ(투명한 노란색)과 EJ-AuNP(진한 자주색)의 가시적인 색상 차이를 감안할 때, 흡광도 스펙트럼 변화는 합성된 EJ-AuNP의 표면 플라즈몬 밴드(plasmon band)의 변화에서 파생된 것으로 판단된다.

[0160] 더불어 0 ~ 600°C 사이에서 고분자의 열적 안정성을 결정하는 데 사용하는 TGA를 이용하여 EJ-AuNP의 열적 안정성을 확인하였다.

[0161] 그 결과 도 4 중 B에 나타낸 바와 같이, 600°C로 온도가 증가하는 동안 EJ 추출물은 심각한 중량 손실(-68.370%)이 관찰되었지만, EJ-AuNP에서는 약한 중량 손실(-7.642%)이 관찰되어, 본 발명에 따른 EJ-AuNP가 EJ 추출물보다 더 우수한 열 안정성을 가지는 것을 확인하였다.

[0162] 또한 FT-IR 분광법을 통해 EJ-AuNP의 화학적 작용기(chemical functional group)를 확인한 결과를 도 4 중 C에 나타냈다. 그 결과, 보유한 스펙트럼 라이브러리를 기반으로 3346.6 cm^{-1} 에서의 넓은 대칭적인 스트레칭(broad symmetrical stretching)은 알코올의 OH 스트레칭 또는 아민 그룹의 N-H 스트레칭을 나타내는 것으로 파악되었다. 더불어 2921.6 및 2852.2 cm^{-1} 에서의 날카롭고 비대칭적인(asymmetrical) 밴드는 알칸(alkane) 또는 알데히드(aldehyde) 그룹의 C-H 스트레칭에 해당될 것으로 예상되었고, 1728.4 cm^{-1} 의 강한 피크는 카르보닐 그룹(carbonyl group)의 C=O 스트레칭에 해당되는 것으로 파악되었다.

[0163] 더불어 DLS에 의해 분석된 크기 분포 프로파일(size distribution profile) 결과 도 4 중 D에 나타낸 바와 같이, EJ-AuNP의 평균 강도 분포(Intensity distribution), 부피 분포(Volume distribution) 및 수 분포(Number distribution)가 각각 48.4 nm, 174.8 nm 및 69.4 nm임을 확인하였다.

[0164] 이와 더불어 FE-TEM 분석 결과 도 5 중 A에 나타낸 바와 같이, EJ-AuNP의 입자 크기는 31.0-149.1nm였고, 표면 형태는 주로 원형, 구형 및 다각형 모양임을 확인하였다.

[0165] 또한 SAED 및 XRD 분석을 통해 EJ-AuNP의 결정질 특성을 확인한 결과를 도 5 중 B에 나타내었다. SAED 패턴은 격자 평면(lattice planes)에서 관찰된 4개의 링 특징(111, 200, 220, 및 311)을 나타내어 EJ-AuNP의 결정 구조를 확인하였다. 이는 도 5 중 C에 나타낸, (111), (200), (220), 및 (311)에 대해 브래그 방정식(Bragg's

equation)을 이용해 계산된 38.27° , 44.31° , 64.65° 및 77.76° 의 세타 값(theta values)에서 회절 피크(diffraction peaks)를 나타내는 XRD 결과로도 확인할 수 있었다.

[0166] EJ-AuNP의 순도는 원소 맵핑 및 EDX 분광법을 통해 결정하였다. 도 5 중 D 및 E에 나타낸 바와 같이, 금 원소(붉은색 점)의 분포는 나노입자 내부에서 명확하게 식별할 수 있었으므로, EJ-AuNP가 고순도로 합성되었음을 확인하였다. 또한 도 5 중 F에 나타낸 EDX 분광법 결과, 합성된 EJ-AuNP에서 금 원소 피크만 관찰되었으므로, 본 발명에 따른 EJ-AuNP가 불순물 없이 고순도로 합성되었음을 확인하였다.

[0168] 실시예 4. T+I 유도된 인간 각질 세포에서의 세포 독성 확인

[0169] MTT 분석 결과 도 6 중 A와 같이, EJ-AuNP를 처리한 실험군은 음성 대조군(NC)과 비교하여 세포 독성을 나타내지 않았고, 심지어 용량 의존적(dose-dependently) 세포 증식을 촉진하였다($104.3\sim119.2\%$). 반면 EJ 추출물이 처리된 실험군은 NC에 비해 $12.0\sim69.4\%$ 의 생존율을 보여 세포 독성을 나타내었다. 더불어 생존/사멸 세포 염색 결과 도 6 중 B 및 C와 같이, EJ-AuNP가 처리된 실험군은 사멸 세포의 수가 현저히 적었지만, EJ 추출물을 처리한 실험군은 상당히 많은 수의 사멸 세포를 확인할 수 있었다($12.1\sim74.1\%$). 따라서 이를 통해 본 발명에 따른 EJ-AuNP가 EJ 추출물보다 동등한 농도에서 인간 각질 세포에 대해 현저히 우수한 안전성을 보유함을 확인하였다.

[0171] 실시예 5. T+I 유도된 인간 각질 세포에서의 피부 염증 관련 유전자의 발현 수준과 단백질 분비에 미치는 영향 확인

[0172] 각질 세포가 T+I에 노출되면 사이토카인(IL-6(Interleukin-6)) 및 케모카인(예: IL-8, TARC(thymus and activationregulated chemokine), CTACK(cutaneous T cell-attracting chemokine) 및 RANTES(regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) 등)의 비정상적인 발현이 유도되어 T 세포 또는 백혈구가 피부의 염증성 병변으로 침투하게 된다. 따라서 HaCaT 세포에 T+I를 처리하고, 염증성 사이토카인 및 케모카인 생성에 대해 EJ-AuNP가 미치는 영향을 확인하여 도 7에 나타내었다. 이때 공지된 항염증제인 텍사메타손을 양성 대조군으로 사용하였다(도 7 내 PC라 기재).

[0173] 도 7에서 확인한 바와 같이, T+I 처리 실험군은 NC와 비교하였을 때, 정상 T 세포 발현 및 분비(normal T cell expressed and secreted (RANTES/CCL5))(도 7 중 A), TARC (TARC/CCL17)(도 7 중 B), 피부의 T-세포 유도 케모카인(cutaneous T-cell attracting chemokine (CTACK/CCL27))(도 7 중 C), IL-8(CXCL8)(도 7 중 E) 및 IL-6(도 7 중 D)와 같은 전 염증성 케모카인(pro-inflammatory chemokines)이 과도하게 발현되었다.

[0174] 반면, 본 발명에 따른 EJ-AuNP 실험군은 T+I 실험군과 비교하여 RANTES, TARC, CTACK, IL-6 및 IL-8 유전자의 발현 수준이 유의하게 하향 조절되었다.

[0175] 더불어 ELISA를 사용하여 T+I가 처리된 각질세포의 피부 염증 관련 사이토카인 분비에 대한 EJ-AuNP의 억제 효과를 확인하여 도 8에 나타내었다. 그 결과, T+I 자극은 각질세포에서 IL-6(도 8 중 A), IL-8(도 8 중 B) 및 TARC(도 8 중 C)의 상당한 분비를 유도한 반면, 본 발명에 따른 EJ-AuNP 실험군은 T+I 처리 후 증가된 IL-6, IL-8 및 TARC의 수준을 농도 의존적으로 유의하게 감소시켰다.

[0176] 따라서 이를 통해 본 발명에 따른 EJ-AuNP가 유전자 발현 및 단백질 분비 수준에서 피부 염증 관련 매개체를 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0177] 더불어 T+I 처리된 인간 각질세포의 세포 ROS 생산 능력에 대한 EJ-AuNP의 효과를 확인하였다. 그 결과 도 8 중 D에 나타낸 바와 같이, ROS 생성은 T+I 처리에 의하여 증가하였으나, 본 발명에 따른 EJ-AuNP 처리에 의하여 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다. EJ 추출물 실험군 또한 감소 ROS 생성 감소 효과를 보였으나, 본 발명의 EJ-AuNP 처리 실험군이 더 유의미한 ROS 생성 감소 효과를 나타내었다.

[0179] 실시예 5. EJ-AuNP에 의한 피부 염증 억제의 기본 분자 메커니즘 확인

[0180] T+I가 처리된 인간 각질세포에서 본 발명에 따른 EJ-AuNP 처리에 의한 피부 염증 억제와 관련된 신호 전달 경로(signaling pathway)를 확인하여 도 9에 나타내었다. 도 9 중 A는 MAPK의 인산화를 나타내는 웨스턴 블롯팅 결

과와 이를 정량한 결과이고, 도 9 중 B는 NF- κ B의 인산화를 나타내는 웨스턴 블롯팅 결과와 이를 정량한 결과이다. T+I 처리는 인간 각질세포에서 해당하는 총 단백질의 수준을 변경하지 않고, 3 가지 MAPKs(p38, JNK 및 ERK) 및 NF- κ B의 인산화 수준을 유의하게 증가시켰다. 흥미롭게도 T+I 처리는 I κ B α (kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha)의 핵 인자(nuclear factor)의 인산화 수준을 유의하게 증가시켰지만 총 단백질 수준은 유의하게 감소시켰다.

[0181] 텍사메타손 실험군은 인산화된 p38, JNK, ERK, I κ B α 및 p65의 수준이 유의하게 감소된 반면, 온전한 I κ B α 의 발현 수준은 유의하게 상향 조절되었다. 본 발명에 따른 EJ-AuNP 실험군은 3개의 MAPK(p38, ERK 및 JNK)와 2개의 NF- κ B 관련 분자(I κ B α 및 p65)의 인산화 수준이 농도 의존적으로 유의하게 감소되었다. 또한, EJ-AuNP 처리에 의해 온전한 I κ B α 의 발현 수준도 농도 의존적으로 유의하게 상향 조절되었다. 이를 통해 인간 각질세포에서의 T+I로 인해 자극된 염증에 대한 EJ-AuNP 억제 효과가 MAPK 및 NF- κ B 신호전달과 밀접한 관련이 있음을 확인하였다.

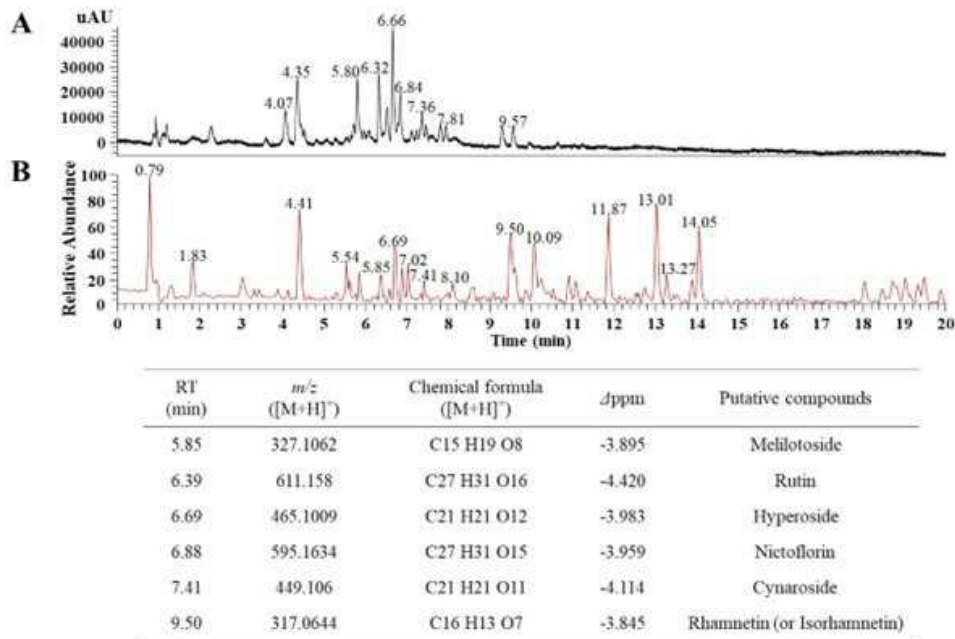
[0183] 실시예 6. 히알루론산(Hyaluronic acid) 생산에 EJ-AuNP가 미치는 영향 확인

[0184] 히알루론산(Hyaluronic acid, HA)은 피부 수분 유지에 중요한 요소로, 고유한 수분 보유 능력을 가지고 있다. HA는 HAS(hyaluronic acid synthases)를 조절하여 피부 수분을 증가시키는 것으로 보고되었으며, HAS는 3가지 동형(HAS1, HAS2 및 HAS3)을 가지고 있다. 또한 HYAL(hyaluronidase)은 HA를 가수분해하는 효소로 잘 알려져 있다. 따라서 HaCaT 세포에서 히알루론산 생산에 EJ-AuNP가 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 도 10 중 A에 나타난 바와 같이, EJ-AuNP는 농도 의존적으로 HA 생성을 증가시켰고, 특히 100 μ g/ml의 EJ-AuNP는 양성 대조군과 유사할 정도의 활성을 나타내었다. 더불어 EJ-AuNP를 처리한 실험군은 T+I를 처리한 실험군(NC) 대비 HAS1(도 10 중 B), HAS2(도 10 중 C) 및 HAS3(도 10 중 D) mRNA 발현을 현저히 증가시켰고, HYAL1(도 10 중 E) 및 HYAL2(도 10 중 F)의 mRNA 발현을 억제하였다. 특히 HAS3의 경우, 그 활성이 양성대조군보다 월등히 우수하였다.

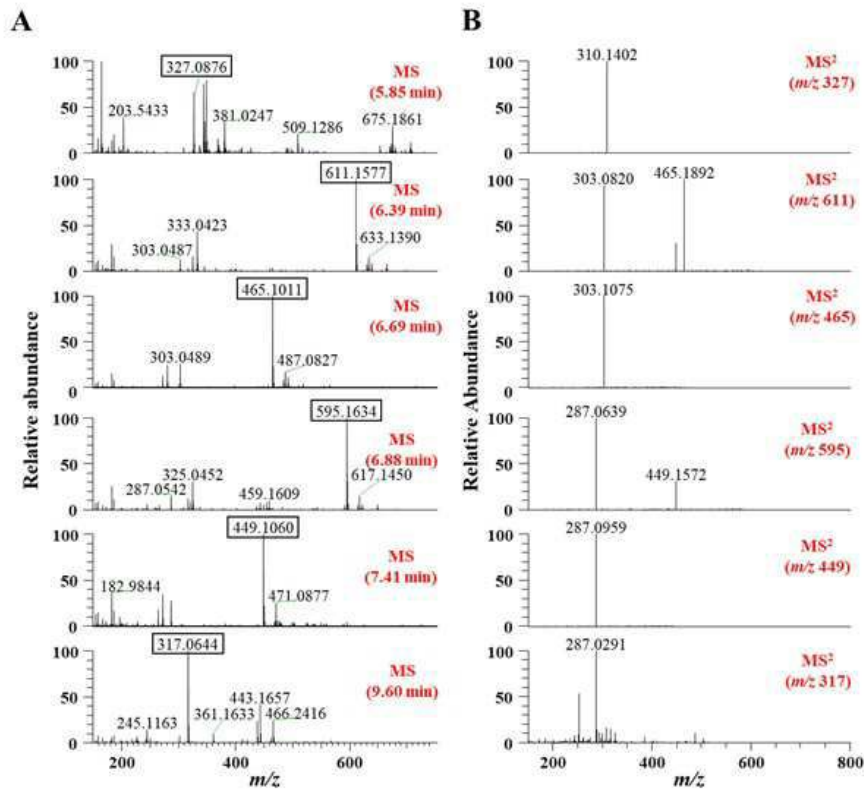
[0186] 종합적으로 본 발명은 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자 및 이의 세포독성, 항염증 효과 및 히알루론산 생산에 미치는 영향을 확인한 것으로, 상기 등골나물 추출물을 포함하는 금 나노입자는 등골나물 추출물 대비 현저히 낮은 세포 독성을 보였으며, 염증 반응에 의한 ROS 생성 억제 효과, 염증 관련 인자 발현을 억제하는 효과를 보였고, 히알루론산 및 히알루론산 생산에 미치는 인자의 발현을 현저히 증가시켰으며, 히알루론산 가수분해효소의 발현을 현저히 억제시킨 바, 이를 아토피와 같은 염증성 피부 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 다양한 용도로 활용할 수 있다.

도면

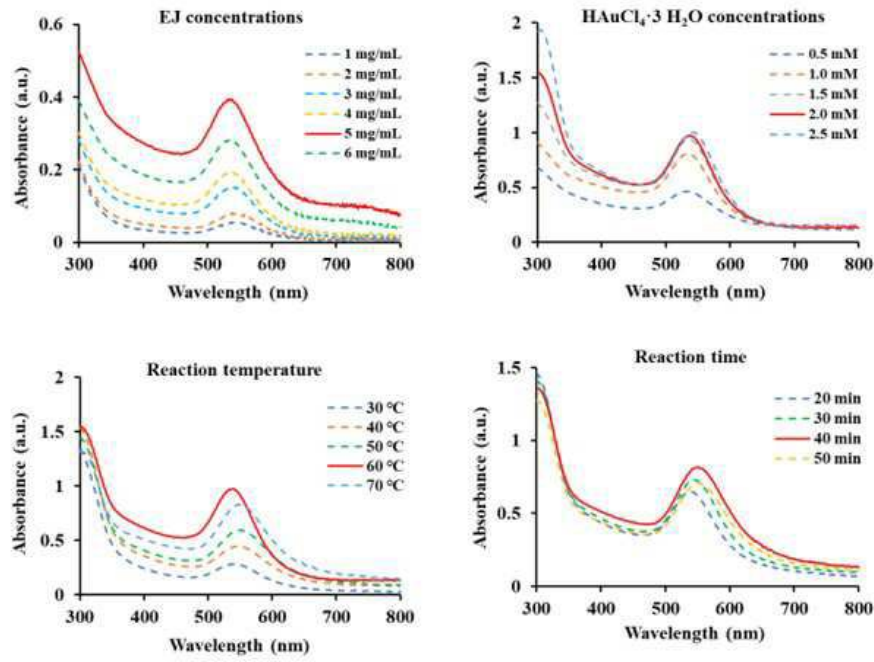
도면1



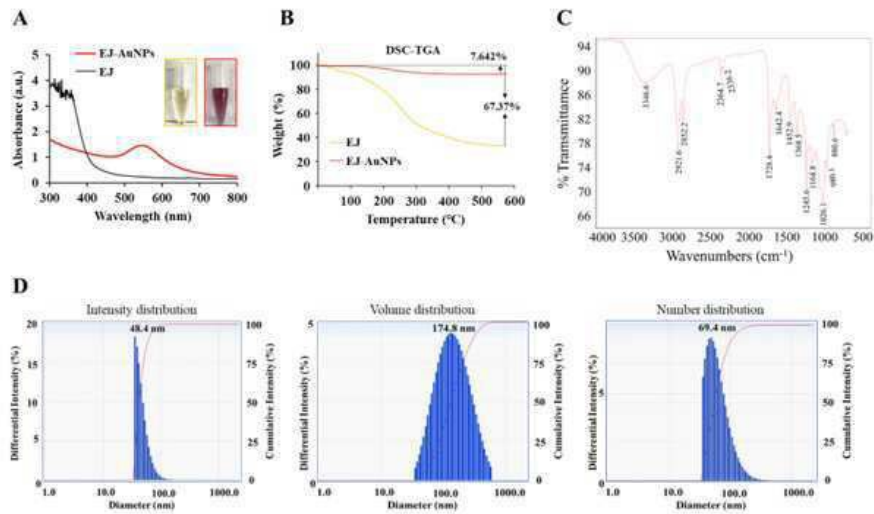
도면2



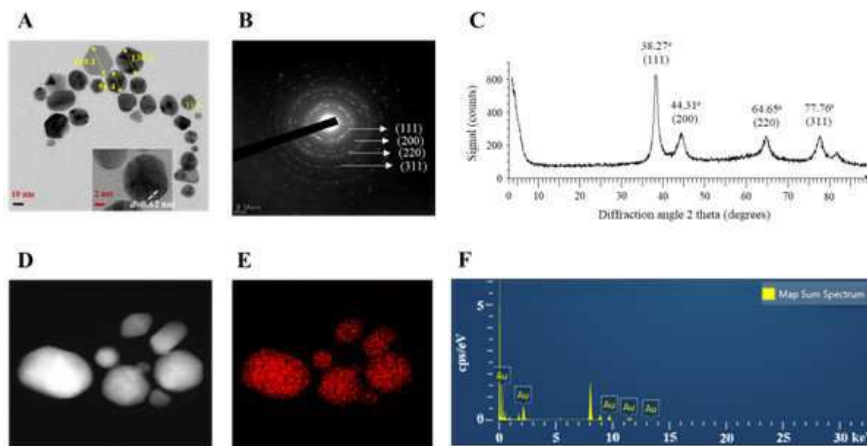
도면3



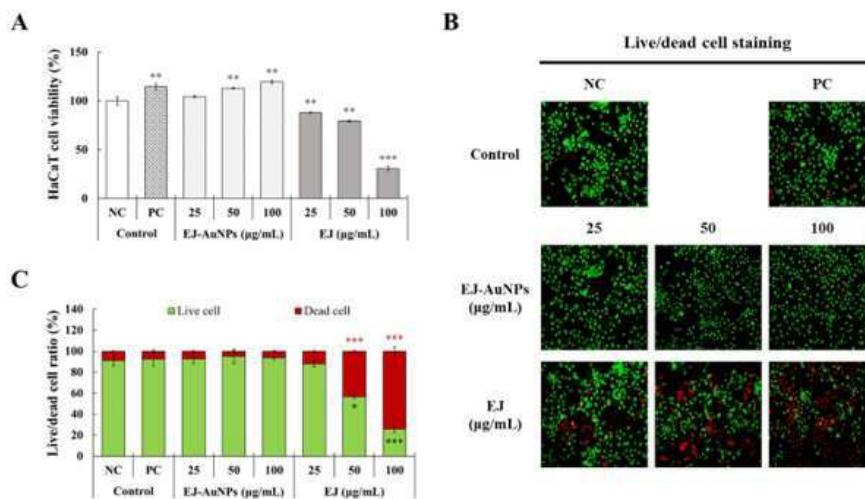
도면4



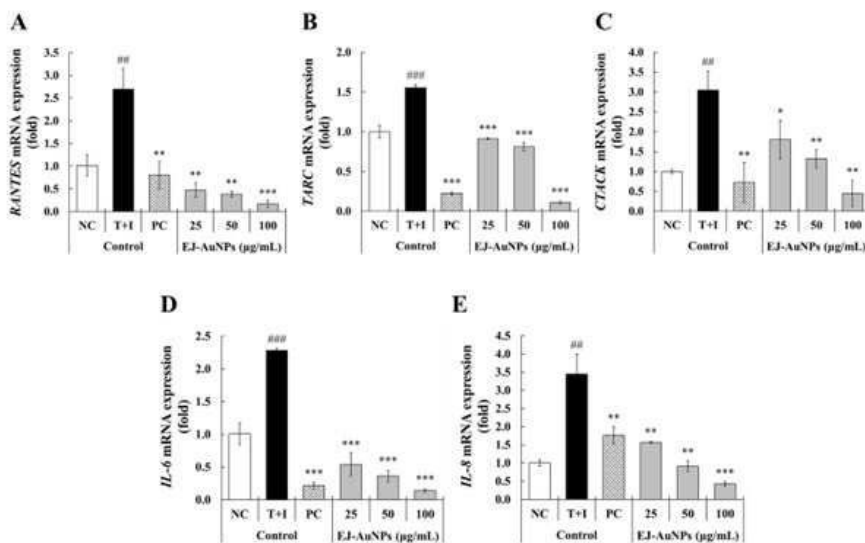
도면5



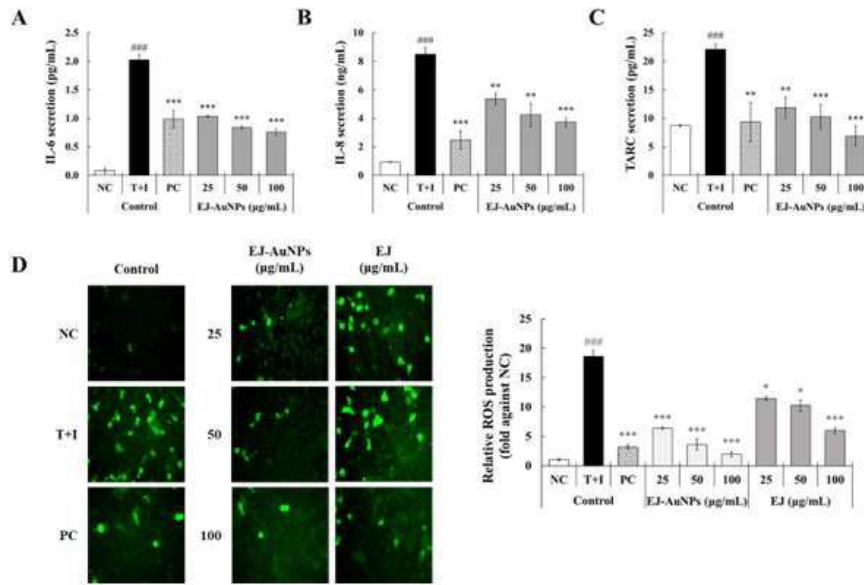
도면6



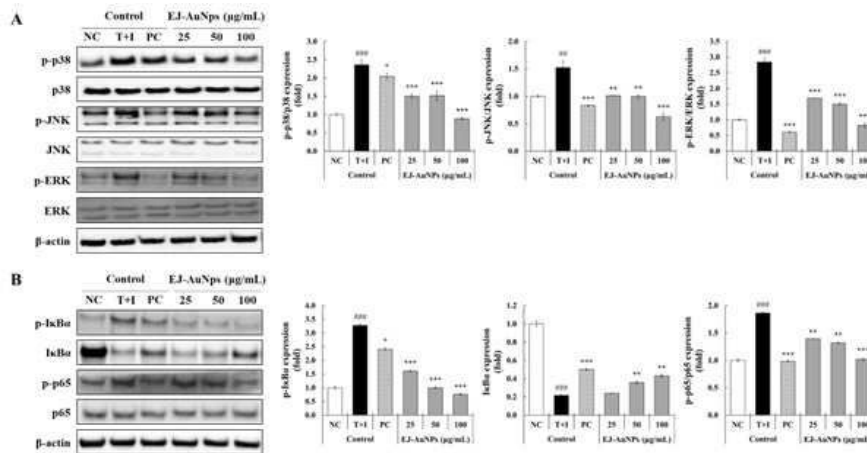
도면7



도면8



도면9



도면10

