



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0015711
(43) 공개일자 2017년02월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2017.01) A61Q 17/04 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A61Q 17/04 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0108201
(22) 출원일자 2015년07월30일
심사청구일자 2015년07월30일

(71) 출원인
(주)새롬바이오
경기도 군포시 공단로 284, 201동 1호 (금정동, 한림벤처타운)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
서형주
서울특별시 용산구 한강대로 205, A동 2003호(한강로1가, 용산파크자이)
박유현
경기도 성남시 분당구 정자일로213번길 19 202동 1203호 (정자동, 아이파크분당)
배송환
경기 군포시 수리산로 33, 834동 802호 (산본동, 계룡아파트)
(74) 대리인
특허법인 대아

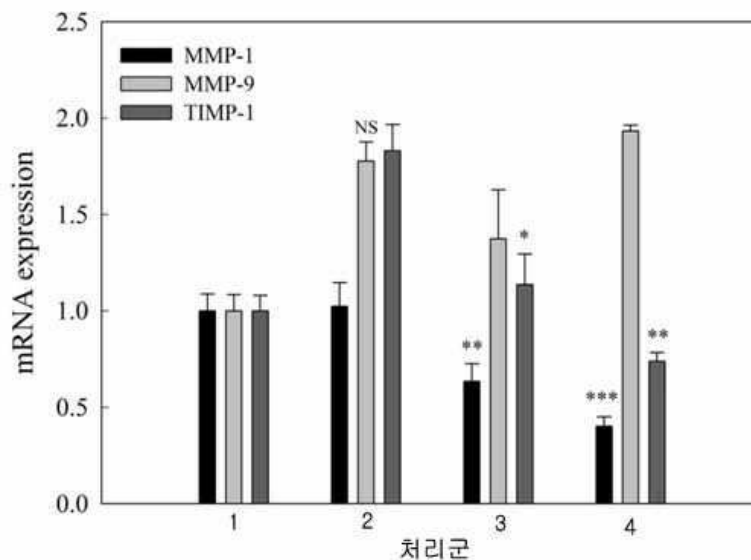
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 유근피 추출물을 포함하며, 자외선으로부터의 피부 보호능을 갖는 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 유근피 추출물을 포함하는 화장품 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A61Q 19/00 (2013.01)

A61K 2800/80 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0217064

부처명 경기지방중소기업청

연구관리전문기관 (사)한국산학연합회

연구사업명 2014년 자율편성형 기술개발사업

연구과제명 유근피 함유 소재를 활용한 Beauty Food 제품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한양대학교산학협력단

연구기간 2014.08.01 ~ 2015.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

유근피 추출물을 포함하는 화장료 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 유근피 추출물은 유근피를 물 또는 탄소수 5 이하의 저급 알코올로 추출하여 제조하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 유근피 추출물은 유근피를 팽화시킨 후 추출하여 제조하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 유근피 추출물은 유근피를 3 내지 11 kgf/cm²의 압력으로 팽화시킨 후 추출하여 제조하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 자외선으로 인한 피부 손상 억제능을 갖는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 자외선으로 인한 피부 콜라겐 분해에 대하여 억제능을 갖는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 화장료 조성물은 자외선에 의한 세포 내 활성 산소의 생성의 억제능을 갖는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 화장품 조성물은 DPPH 라디칼 소거능 또는 ABTS 라디칼 소거능을 갖는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 9

유근피를 준비하는 단계; 및

상기 유근피를 추출하는 단계를 포함하는 화장품 조성물의 제조 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 유근피를 추출하는 단계는 유근피를 팽화시킨 후 추출하여 수행하는 것을 특징으로 하는, 화장품 조성물의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유근피 추출물을 포함하며, 자외선으로부터의 피부 보호능을 갖는 화장품 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 유근피는 느릅나무 속 비술나무 종의 뿌리 껍질로, 비술나무의 학명은 ulmus pumila이고 Siberian elm으로 불린다. 유근피는 한방 약재로 많이 쓰여왔다. 최근 유근피의 항비만, 항암, 효과에 대한 연구가 있으며 또한 아토피 피부염 개선, 자외선에 의한 주름 개선 등 피부와 관련한 연구도 보고되어 있다.

[0003] 피부는 표피와 진피, 피하지방층으로 총 3 개의 조직 층으로 구성되며 피부표피의 기저 층에는 keratinocytes, melanocytes 그리고 Langerhans, merkel cell 등이 분포 되어 있다. 피부노화 현상은 여러 가지 구조적, 기능적 변화를 보이는데 내외적인 여러 가지 스트레스는 피부의 탄력성과 윤택성을 감소시키고, 기미, 주근깨 등 피부 색소를 침착시키며, 주름이 생기게 하는 등 피부노화 현상을 촉진한다. 피부의 진피 조직 속에는 collagen과 피부의 탄력성에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있는데, 이러한 elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부가 처지고 주름이 생기므로 내인성 피부 노화가 발생한다. Elastase는 피부 탄력성에 관련된 elastin을 분해시켜 collagen과 이루어진 피부의 진피 조직의 그물망 구조 결합을 끊어 줌으로써 주름 생성의 주원인 효소로 알려져 있다.

[0004] 단순히 죽은 세포들과 신체의 노폐물만으로 쌓여 있다고 생각되었던 피부각질층은 점차 다양한 성분 및 기능이 밝혀지고 있으며, 외부환경으로부터의 물리화학적 자극 및 미생물 등으로부터 생체를 보호하며 체액, 수분의 증발 등을 적절히 조절함으로써 생체의 항상성을 유지시켜 주고 있다. 그 중 피부를 탄력 있고 부드럽게 해주는 역할을 하는 물질은 주로 각질층에 존재하는 수분에 의해 좌우된다.

[0005] MMP (matrix metalloproteinase)는 ECM (extracellular matrix)과 BM (basement membrane)의 분해에 관여하는 여러 효소로 활성중심부에 아연을 가지는 금속단백분해효소이고 생체 내에서 잠재성 전효소(zymogen)형태로 분비된다. 효소활성을 가지기 위해서 구조적 변형이 일어나 아미노 말단 부위가 절단, 활성화된다. MMP가 활성화되면 MMP가 진피층의 콜라겐을 현저하게 분해시켜 피부 광노화에 매우 중요한 역할을 한다. 광노화를 억제시키려면 활성산소종의 함량을 줄여주는 것이 중요하다. 또 활성산소종의 함량을 줄여줄 수 없을 때에는 MMP의 발현을 억제시켜 주는 것도 하나의 방법이다.

[0006] 한편, 자외선은 피부 노화의 원인 중 하나로, 지금까지 자외선 차단 기능이 있는 화장품 조성물들이 많이 연구되어 왔다(한국공개특허 10-2015-0074774호). 그러나 자외선에 대항하는 화장품 조성물의 대부분은 자외선을 물리적으로 차단하거나, 화학적으로 차단하거나 또는 자외선으로 인하여 자극을 받은 피부에 쿨링 효과를 주는 방식이다. 이에 본 발명자들은 자외선으로 인한 피부 손상을 억제, 예방하는 화장품 소재를 연구하던 중 유근피 추출물의 자외선으로 인한 피부 손상 억제능을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 자외선으로부터의 피부 보호능을 갖는 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 유근피 추출물을 포함하며, 자외선으로부터의 피부 보호능을 갖는 화장품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 화장품 조성물은 자외선으로 인한 피부 손상을 억제, 예방하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 팽화 여부 및 추출 용매에 따른 유근피 추출물들의 총 당 함량을 나타낸다.

도 2는 팽화 여부 및 추출 용매에 따른 유근피 추출물들의 폴리페놀 함량을 나타낸다.

도 3은 팽화 여부 및 추출 용매에 따른 유근피 추출물들의 플라보노이드 함량을 나타낸다.

도 4는 팽화 여부 및 추출 용매에 따른 유근피 추출물들의 DPPH 라디칼 소거능을 나타낸다.

도 5는 팽화 여부 및 추출 용매에 따른 유근피 추출물들의 ABTS 라디칼 소거능을 나타낸다.

도 6은 팽화 여부 및 추출 용매에 따른 유근피 추출물들의 FRAP 활성을 나타낸다.

도 7은 팽화 여부에 따른 유근피 에탄올 추출물의 올레아놀산 함량을 나타낸다.

도 8은 7 kgf/cm² 압력 하 팽화시킨 유근피의 에탄올 추출물(추출물 3)의 농도에 따른 세포 독성 시험 결과를 나타낸다.

도 9 및 도 10은 UV 조사된 HaCaT 세포에서 7 kgf/cm² 압력 하 팽화시킨 유근피의 에탄올 추출물(추출물 3)의 세포 내 활성 산소(Intracellular reactive oxygen species) (ROS) 소거능을 나타낸다.

도 11은 UV 조사된 HaCaT 세포에서 7 kgf/cm² 압력 하 팽화시킨 유근피의 에탄올 추출물(추출물 3) 처리 시 MMP-1, MMP-9 및 TIMP-1의 발현 변화를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명은

[0012] 유근피 추출물을 포함하는 화장품 조성물에 대한 것이다.

[0013] 또한 본 발명은

[0014] 유근피를 준비하는 단계; 및

- [0015] 상기 유근피를 추출하는 단계를 포함하는 화장료 조성물의 제조 방법에 대한 것이다.
- [0016] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.
- [0017] 유근피
- [0018] 본 발명의 유근피는 시판되는 유근피이면 되고 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 유근피 추출 및 유근피 추출물
- [0020] 본 발명은 유근피 추출물을 포함하는 화장료 조성물에 대한 것이다. 본 발명의 유근피 추출물은 유근피를 용매 추출 또는 초임계 추출하여 제조한다. 바람직하게는 본 발명의 유근피 추출물은 유근피를 물 또는 탄소수 5 이하의 저급 알코올로 추출하여 제조한다. 더욱 바람직하게는 본 발명의 유근피 추출물은 유근피를 물 또는 탄소수 3 이하의 저급 알코올로 추출하여 제조하며, 더더욱 바람직하게는 물, 메탄올 또는 에탄올로 추출하여 제조하고, 가장 바람직하게는 에탄올로 추출하여 제조한다.
- [0021] 본 발명의 유근피 추출물은 유근피를 팽화시킨 후 팽화된 유근피를 추출하여 제조할 수 있다. 이 때 본 발명의 유근피 추출물은 유근피를 3 내지 11 kgf/cm²의 압력으로 팽화시킨 후 추출하여 제조할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 유근피 추출물은 유근피를 4 내지 10 kgf/cm²의 압력으로 팽화시킨 후 추출하여 제조할 수 있고, 더욱 바람직하게는 6 내지 8 kgf/cm²의 압력으로 팽화시킨 후 추출하여 제조할 수 있다.
- [0022] 화장료 조성물
- [0023] 본 발명의 화장료 조성물은 자외선으로 인한 피부 손상 억제능, 손상 예방능 등을 갖는다. 바람직하게는 본 발명의 화장료 조성물은 자외선으로 인한 피부 콜라겐 분해에 대하여 억제능을 가지며, 또한 본 발명의 화장료 조성물은 자외선에 의한 세포 내 활성 산소의 생성의 억제능을 갖는다. 또한 본 발명의 화장료 조성물은 DPPH 라디칼 소거능 또는 ABTS 라디칼 소거능을 갖는다.
- [0024] 본 발명의 화장료 조성물은, 당업계의 통상적으로 제조되는 어떠한 제형에도 제조될 수 있으며 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 화장료 조성물은 유연화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 스프레이 또는 파우더 제형으로 제조될 수도 있다.
- [0025] 본 발명의 화장료 조성물은 효과적인 경피 흡수를 위하여 피부 침투 촉진제를 포함할 수 있다. 상기 피부 침투 촉진제는 당 업계에서 화장료 조성물에 사용하는 일반적인 피부 침투 촉진제면 되고, 특별히 제한되는 것은 아니다. 예컨대 본 발명의 피부 침투 촉진제는 디메틸 설펝사이드, oleic acid 등 지방산/에스테르 화합물, 리모넨(limonene) 등이 될 수 있다.
- [0026] 또한 본 발명의 화장료 조성물을 이용 시에는 충격파, 이온삼투요법, 전기침공법, 미세침요법 등 물리적 방법을 병용하여 경피 흡수를 촉진할 수도 있다.
- [0027] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서

로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0028] <재료 및 방법>

[0029] 유근피는 시판되는 제품을 구입하여 이용하였다. 상기 유근피는 건조된 상태의 유근피이다. 본 발명에서 사용한 에탄올은 70%(v/v) 에탄올이다.

[0030] 팽화

[0031] 본 발명에서는 explosion puffing으로 팽화를 수행하였다.

[0032] 추출물 내 성분 분석

[0033] 총 당(Total sugar): 총당 함량 측정은 Dubois et al. (Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28, 350-356., 1956)의 방법을 이용하였다. 황산 1 mL을 시료와 0.2 mL의 5% 페놀용액을 섞은 용액에 첨가한 후 20분 동안 실온에서 반응시킨 후 490 nm파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0034] 폴리페놀(Polyphenol): 벤젠고리(C₆H₆)의 수조 중 하나가 수산기(OH)로 치환된 물질을 페놀이라고 하는데, 수산기를 2개 이상 갖고 있는 물질을 폴리페놀이라 총칭한다. 시료 0.01 mL에 증류수 0.79 mL를 넣은 후 1.8 N phenol을 넣는다. 마지막으로 20% Sodium carbonate solution을 넣어준 후 상온에서 120분 반응 후 750 nm파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0035] 플라보노이드(Flavonoid): 플라보노이드 함량 측정은 Li et al. (The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. Journal of Science of Food and Agriculture, 70, 89-101, 1996)의 방법을 이용하였다. 40 µL의 시료를 200 µL의 DMACA 용액과 실온에서 10분 반응시킨 후 640 nm파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0036] 항산화능 측정

[0037] DPPH 라디칼 소거능: 시료의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능 측정은 Cheung et al. (Antioxidant activity and total polyphenolics of edible mushroom extracts. Food Chem 81: 249-255, 2003)의 방법을 이용하였다. DPPH (Sigma)을 ethanol에 용해시켜 만든 0.2 mM DPPH 용액 800 µl과 시료 200 µl를 가하여 10분간 반응시킨 후 원심분리하여 상등액을 취해 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출액의 농도를 달리하여 소거활성을 정하여 50%의 소거활성을 나타내는 농도인 IC₅₀ 값을 측정하였다.

[0038] ABTS 라디칼 소거능: 시료의 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) 라디칼 소거능 측정은 Re et al. (Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26:1231-1237, 1999)의 방법을 이용하였다. 7 mM ABTS (Fluka, Germany)에 2.45 mM potassium persulfate를 첨가하여 암소에서 실온으로 12시간 방치한 후 414 nm에서 흡광도가 1.4 내지 1.5가 되도록 증류수로 희석시켰다. 시료 12.5 µl에 희석된 ABTS 라디칼 용액 250 µl를 넣어 90분 간 반응시키고 414 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출액의 농도를 달리하여 소거활성을 정하여 50%의 소거활성을 나타내는 농도인 IC₅₀ 값을 측정하였다.

[0039] HPLC 분석을 통한 올레아놀산(oleanolic acid) 함량 측정

- [0040] 팽화 전 후 유근피를 각각 10 mg/mL의 농도로 메탄올에 녹인 후 1:1 비율로 hexane과 섞어 용매분획하였다. 메탄올 층만 얻어 질소 Purging을 통해 농축하여 HPLC 분석을 진행하였다. WATERS HPLC system (HPLC, USA) 기기를 이용하여 측정하였으며 Phenomenex Luna C-18 5 μ m column (4.6 mm x 150 mm i.d.) 컬럼으로 220 nm에서 측정하였다. 용매는 methanol-water-tetrahydrofuran (94:5:1 v/v), pH 5 with acetic acid이고 유속은 1 mL/min, 주입 용량은 20 μ L로 하였다.
- [0041] HaCaT 세포의 배양
- [0042] HaCaT 세포는 Human keratinocyte 인 HaCaT Cell line을 사용하였다. 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High Glucose (WelGENE, Cat. LM 001-05) 배지에 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (WelGENE, Cat. S 001-07), 2% penicillin (WelGENE, Cat. LS 202-02) 을 혼합한 후 여과하여 사용하였다. 37°C에서 5% CO₂와 95% humidity 조건을 항상 유지하도록 하여 100 mm dish에서 배양했으며 70-80%의 confluency에 도달하면 trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)을 사용하여 1:5 내지 1:10의 비율로 subculture를 하였다.
- [0043] UVB 조사
- [0044] UVB 조사 및 시료를 처리 하기 전날 HaCaT Cell을 2.0 x 10⁵ cells/mL 의 농도로 100 mm dish 또는 원하는 plate에 배양하였다. 각 농도의 시료를 처리한 후 세포가 시료를 충분히 흡수할 수 있도록 24시간 incubator에서 방치하였다. 그 후 Dish cover를 연 채로, 10 mJ/cm²으로 UVB를 조사하였다. 정상 대조군의 경우에는 UVB를 조사시키지 않았다.
- [0045] Cell viability의 측정
- [0046] Cell viability는 MTT staining method를 사용하여 측정하였다. 각 농도의 시료를 처리하고 각 well당 50 μ L 씩 MTT시약을 분주하였다. CO₂ incubator 내에서 3 시간 반응시킨 후 20% SDS 을 50 μ L씩 분주한다. Plate를 다시 CO₂ incubator 에 넣고 다음날까지 배양한다. 그 다음날 540 nm으로 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.
- [0047] 세포내 ROS 측정
- [0048] 세포내 ROS(reactive oxygen species) 생성은 하기의 방법으로 측정하였다. 먼저 세포에 DCFH-DA 시약을 넣어 준 후 세포의 Membrane을 통과해 세포 내로 들어가게 된다. 이 시약은 cellular esterase에 의해 DCFH로 변화하게 되고 이 DCFH가 세포가 생산한 ROS를 만나게 되면 DCF로 변화하면서 형광색을 띄게 된다. 이를 FACScalibur™ (Becton Dickinson, Mountain View, USA) 기기를 이용하여 측정하였다.
- [0049] 유전자 레벨에서의 MMP, TIMP 측정
- [0050] 배양 완료된 HaCaT 세포에 시료 처리와 UVB조사 후, 24 시간 동안 incubation을 하고 세포의 mRNA를 추출하기 위해 TRIzol reagents (Invitrogen, USA)을 처리한다. cDNA 합성은 SuperScript®III First Strand Synthesis System (Invitrogen, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 시행하였다. MMP2와 MMP-9의 활성을 측정하기 위해 실시간 정량 PCR 증폭기법 (Real-time quantitative PCR)을 사용하였다.
- [0051] Real-time PCR에서 사용한 MMP2와 MMP9는 TaqMan 방식으로 실험을 진행하였다. 프라이머와 TaqMan 탐침은 관찰하고자 하는 인자의 염기서열 내에서 real-time PCR 제조사의 프로그램 (Primer Express program; Applied Biosystems, Foster, USA)으로 설계하여 Applied Biosystems에서 제작하였으며, house keeping gene으로는 18S 을 사용하였다.

- [0052] 실시간 정량 역전사 중합효소 연쇄 반응은 TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, USA)와 primer와 cDNA 를 섞어서 만들었으며, 이것을 96-웰 optical reaction plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에 넣었다. 사용한 thermal cycler parameters는 첫번째 단계로 50℃에서 2분, 95℃에서 10분, 그리고 두 번째 단계로 denaturation을 위해 95℃에서 15초, annealing과 extension을 위해 60℃에서 1분, 이 과정을 50 cycles 반복하였다. 실시간 정량 중합효소 연쇄 반응의 결과는 ABI PRISM Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용해서 comparative CT (threshold cycles) 방법으로 하기 <식 3>에 따라 계산하였다.
- [0053] <식 3>
- [0054] $\Delta CT (\text{샘플}) = CT (\text{타겟 유전자}) - CT (18S),$
- [0055] $\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{샘플}) - \Delta CT (\text{체내(internal) 대조군})$
- [0056] $\text{Relative Quantitative (RQ)} = 2^{-\Delta\Delta CT}$
- [0057] <시료의 제조>
- [0058] 추출물 1의 제조
- [0059] 유근피에 10배 중량의 70% 에탄올을 첨가하고 2시간 동안 추출하여 추출물 1을 제조하였다.
- [0060] 추출물 2의 제조
- [0061] 유근피를 5 kgf/cm²의 압력으로 팽화(explosion puffing)하였다. 그리고 팽화된 유근피에 10배 중량의 70% 에탄올을 첨가하고 2시간 동안 추출하여 추출물 2를 제조하였다.
- [0062] 추출물 3의 제조
- [0063] 유근피를 7 kgf/cm²의 압력으로 팽화(explosion puffing)하였다. 그리고 팽화된 유근피에 10배 중량의 70% 에탄올을 첨가하고 2시간 동안 추출하여 추출물 3을 제조하였다.
- [0064] 추출물 4의 제조
- [0065] 유근피를 9 kgf/cm²의 압력으로 팽화(explosion puffing)하였다. 그리고 팽화된 유근피에 10배 중량의 70% 에탄올을 첨가하고 2시간 동안 추출하여 추출물 4를 제조하였다.
- [0066] 추출물 5의 제조
- [0067] 유근피에 10배 중량의 물을 첨가하고 2시간 동안 율수 추출하여 추출물 5를 제조하였다.
- [0068] 추출물 6의 제조
- [0069] 유근피를 5 kgf/cm²의 압력으로 팽화(explosion puffing)하였다. 그리고 팽화된 유근피에 10배 중량의 물을 첨가하고 2시간 동안 추출하여 추출물 6을 제조하였다.

[0070] 추출물 7의 제조

[0071] 유근피를 7 kgf/cm²의 압력으로 팽화(explosion puffing)하였다. 그리고 팽화된 유근피에 10배 중량의 물을 첨가하고 2시간 동안 추출하여 추출물 7을 제조하였다.

[0072] 추출물 8의 제조

[0073] 유근피를 9 kgf/cm²의 압력으로 팽화(explosion puffing)하였다. 그리고 팽화된 유근피에 10배 중량의 물을 첨가하고 2시간 동안 추출하여 추출물 8을 제조하였다.

[0074] <실험예 1> 생리활성 변화

[0075] <1-1> 추출 수율

[0076] 추출물 1 내지 8에 대하여, 하기 <식 4>에 따라, 추출 수율을 측정하였다.

[0077] <식 4>

[0078] $\text{추출 수율(\%)} = \frac{\text{추출물의 건물량(g)}}{\text{유근피 시료(g)}} \times 100$

[0079] 그 결과, 유근피를 에탄올로 추출한 경우 팽화 압력이 높을수록 추출 수율이 감소하는 경향을 보였으나, 물로 추출하는 경우 팽화(explosion puffing)의 압력이 증가할수록 증가하는 경향을 보였다. 에탄올 추출의 경우 팽화시키지 않은 유근피의 추출물인 추출물 1이 가장 높은 추출 수율을 보였다(표 1).

표 1

	추출물 1	추출물 2	추출물 3	추출물 4
추출 수율(%)	12.8	10.3	8.8	8.2

	추출물 5	추출물 6	추출물 7	추출물 8
추출 수율(%)	15.2	16.3	17.7	17.9

[0080]

[0081] <1-2> 추출물 내 총당, 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량

[0082] 추출물 1 내지 8에 대하여 추출물 내 총당, 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량을 측정하였다.

[0083] 그 결과, 유근피를 에탄올로 추출하는 경우 팽화(explosion puffing)에 의해 각 시료의 총당 함량이 감소하는 것으로 나타났다(도 1). 또한 에탄올 추출의 경우 팽화에 의하여 총 폴리페놀 함량이 증가하였고, 에탄올 추출 시 물 추출에 비해 많은 양의 폴리페놀 성분이 추출되는 것으로 확인되었다(도 2). 한편, 플라보노이드 함량은 팽화에 의해 감소하는 경향을 보였는데(도 3). 이는 팽화(explosion puffing) 시 압력에 의하여 플라보노이드 성분이 분해되는 것으로 추정되었다.

[0084] <1-3> 라디칼 소거능

[0085] IC50은 라디칼의 50%를 제거할 수 있는 시료의 농도로서 낮을수록 항산화력이 높음을 의미한다. 본 실험에서는 추출물 1 내지 8의 DPPH 라디칼 소거능 및 ABTS 라디칼 소거능을 측정하여, 추출물들의 항산화 활성을 측정하였

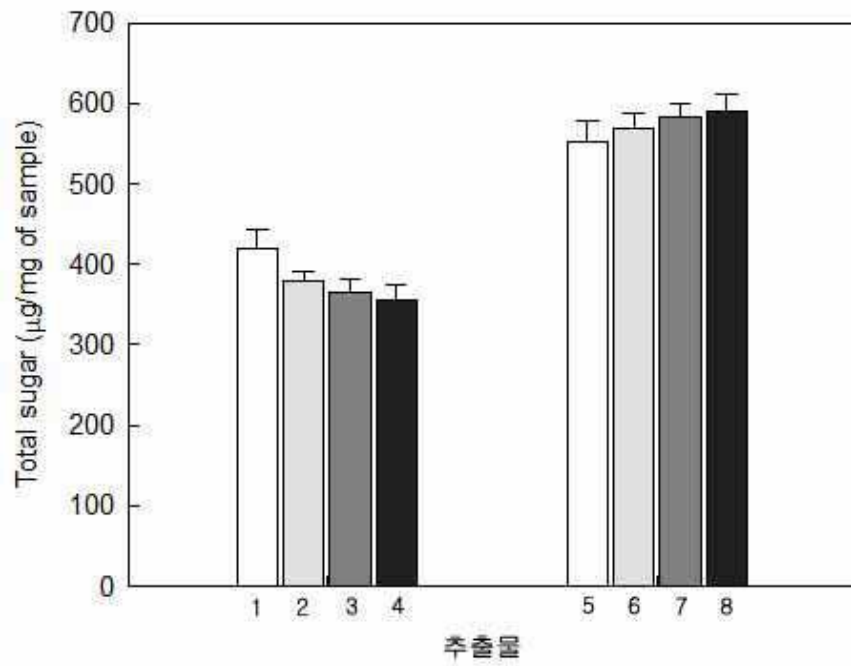
다.

- [0086] 그 결과, 유근피의 에탄올 추출물은 7 kgf/cm^2 압력하에서 팽화(explosion puffing)시킨 추출물(추출물 3)의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능이 가장 우수하였다. 또한 전반적으로 물 추출물보다는 에탄올 추출물에서의 라디칼 소거능이 우수하였다(도 4 및 도 5).
- [0087] 한편, FRAP(ferric reducing/antioxidant power) 실험 결과 역시, 7 kgf/cm^2 압력하에서 explosion puffing 시 유근피 에탄올 추출물(추출물 3)이 그 값이 제일 높았다. 그리고 그 중에서도 팽화 유근피 에탄올 추출물(추출물 2 내지 4)이 팽화하지 않은 유근피 에탄올 추출물인 추출물 1보다 약 1.5배 FRAP value가 높음을 확인하였다(도 6).
- [0088] 상기 <1-1> 내지 <1-3>의 결과를 종합한 결과, 유근피를 팽화한 후 에탄올 추출하여 제조한 추출물들의 경우(추출물 2 내지 4), 팽화에 의하여 다소 추출 수율은 감소하였으나, 활성물질로 알려져 있는 폴리페놀 성분은 증가하는 경향을 보이는 것으로 확인되었다. 특히 유근피 에탄올 추출물의 라디칼소거능은 7 kgf/cm^2 압력하에서 팽화 시 가장 뛰어난 활성증가를 보였다.
- [0089] 그러므로 이하에서는 유근피를 7 kgf/cm^2 압력 하 팽화한 후 이를 에탄올 추출하여 제조한 추출물 3을 이용하여 실험을 진행하였다.
- [0090] <실험예 2> 유근피 속 올레아놀산 함량 측정
- [0091] 상기 <실험예 1>의 실험 결과, 팽화 유근피의 에탄올 추출물의 항산화활성이 우수함을 확인하였다. 이에 7 kgf/cm^2 압력 하 팽화시킨 유근피와 팽화하지 않은 유근피의 에탄올 추출물에 대하여 올레아놀산(oleanolic acid) 함량을 측정하고, 이를 비교하였다.
- [0092]
- [0093] 그 결과, 7 kgf/cm^2 압력 하 팽화시킨 유근피의 에탄올 추출물(추출물 3)의 올레아놀산 함량은 $3.15 \pm 0.35 \mu\text{g/mg}$ 으로 나타났다. 반면 팽화하지 않은 유근피의 에탄올 추출물(추출물 1)의 올레아놀산 함량은 $0.63 \pm 0.42 \mu\text{g/mg}$ 으로 나타나, 7 kgf/cm^2 압력하 팽화에 의하여 약 5배 정도 올레아놀산 함량이 증가하는 것으로 확인되었다(도 7, (A)올레아놀산 표준품, (B) 추출물 1, (C) 추출물 3). 이는 유근피 내 terpenoids 배당체기 팽화에 의해 당이 떨어져 나가면서 oleanolic acid의 함량이 증가하는 것으로 생각되었다.
- [0094] <실험예 3> HaCaT 세포의 인 비트로 실험
- [0095] <3-1> 세포 독성 평가
- [0096] 7 kgf/cm^2 압력 하 팽화시킨 유근피의 에탄올 추출물(추출물 3)에 대하여 세포독성(cytotoxicity)평가를 수행하였다. HaCaT 세포에 자외선을 처리하거나 처리하지 않고, 시료인 추출물 3을 농도별로 첨가하였다.
- [0097] 그 결과, 시료를 첨가하지 않고, 자외선도 처리하지 않은 정상 대조군에 비하여, 자외선을 쬔 시료를 처리하지 않은 실험군은 약 75%정도 viability가 감소하였다. 또한 자외선 처리군의 경우 시료의 농도가 0 내지 100 $\mu\text{g/mL}$ 인 범위에서는 독성을 나타내지 않았으나, 시료의 농도가 250 $\mu\text{g/mg}$ 이후부터는 독성을 나타내었다(도 8). 그러므로 이하의 실험에서는 시료인 추출물 3은 0 내지 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위로 처리하였다.

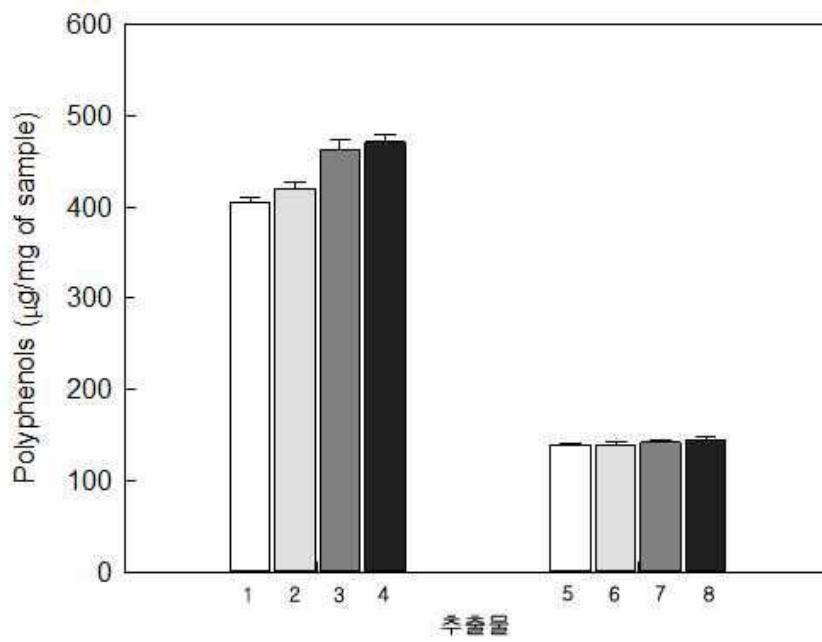
- [0098] <3-2> HaCaT 세포내 라디칼 소거능
- [0099] 자외선에 의해 생성되는 세포내 활성산소(ROS, reactive oxygen species)가 팽화 유근피 에탄올 추출물에 의해 저해되는지 여부를 확인하였다. 구체적인 실험방법은 하기와 같다. 1백만개/ml로 농도를 조절한 HaCaT 세포에 자외선과 시료처리를 하지 않은 정상군 (처리군 1), 자외선만 처리한 군 (처리군 2), 자외선을 쬔고 아스코르브산(ascorbic acid)을 처리한 양성대조군 (처리군 3), 자외선을 쬔고 100 ug/ml의 농도로 추출물 3(7 kgf/cm² 압력 하 팽화시킨 유근피의 에탄올 추출물)을 처리한 실험군 (처리군 4)에서 생성된 ROS를 flow cytometry 로 세포의 형광도를 기록하는 방법으로 산화적 스트레스의 양을 측정하였다. 세포내 산화물이 많을수록 높은 형광도를 나타낸다.
- [0100] 이는 도 9(A)와 같이, Forward scatter (크기) 와 Side scatter (모양, 표면균일도) 값에 따라 대부분을 차지하는 세포군을 지정하고 나머지는 배제하여 측정한다. 그 결과, 각각의 세포가 나타내는 형광도 (가로축)와 그 개수 (세로축)으로 표현하면, UV에 의해 형광도가 증가했으며 (B: 처리군 2), 아스코르브산 및 추출물 3의 처리에 따라 감소했다 (각각 C 및 D). 이를 구체적으로 살펴보면 자외선에 의해 170% 증가한 ROS 수준(처리군 2)이 아스코르브산(ascorbic acid)에 의하여 21%(처리군 3), 팽화 유근피의 에탄올 추출물에 의하여 17% 감소(처리군 4)한 것으로 확인되었다. 그러므로 팽화 유근피의 에탄올 추출물이 자외선에 의한 ROS 생성을 저해하는 것으로 확인되었다(도 9 및 도 10, (A): 처리군 1, (B): 처리군 2, (C): 처리군 3, (D): 처리군 4)).
- [0101] <3-3> mRNA 수준에서의 MMP 및 TIMP 발현 억제
- [0102] MMP (matix metalloproteinase) 및 TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase)는 피부 유지에 중요한 역할을 한다. 자외선 등의 요인에 의해 피부 매트릭스가 손상을 입게 되면 그것을 분해하는 효소가 MMP이며 이러한 효소를 억제하는 것이 TIMP이다.
- [0103] 세포 10,000개를 기준으로 자외선과 시료처리를 하지 않은 정상군 (처리군 1), 자외선만 처리한 군 (처리군 2), 자외선을 쬔고 아스코르브산(ascorbic acid) 10 ug/ml를 처리한 양성대조군 (처리군 3), 자외선을 쬔고 추출물 3(7 kgf/cm² 압력 하 팽화시킨 유근피의 에탄올 추출물)을 처리한 실험군 (처리군 4)을 24시간 동안 배양한 후 세포로부터 mRNA를 추출하여 그 발현량을 분석하였다.
- [0104] 그 결과, 자외선에 의해 MMP와 TIMP 발현 정도가 증가하는 것이 확인되었다(처리군 2). 한편, 처리군 4의 경우 MMP-9에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 MMP-1, TIMP-1의 발현 정도가 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 11). 그러므로 7 kgf/cm² 압력 하 팽화시킨 유근피의 에탄올 추출물은 MMP-1의 발현을 억제함으로써, 자외선으로 인한 콜라겐 분해를 억제하는 것으로 확인되었다.
- [0105] 상기 실험예들의 결과에 의하면 7 kgf/cm² 압력 하 팽화시킨 유근피의 에탄올 추출물은 피부미용 소재 활용시 가장 중요한 라디칼 소거능이 우수하였으며, 피부세포 HaCat Cell 모델에서 피부미용효과를 측정한 결과 자외선에 의한 ROS 생성을 저해하는 것으로 확인되었다.
- [0106] 또한 피부에 자외선 조사 시 MMP가 활성화 되어 피부세포의 매트릭스 성분인 콜라겐의 분해를 유도하여 피부의 노화, 주름 생성의 피부활성을 악화시키는데, 7 kgf/cm² 압력 하 팽화시킨 유근피의 에탄올 추출물은 피부 세포에서 MMP-1의 발현량을 감소시키며, 이로써 자외선으로 인한 콜라겐의 분해 억제능을 갖고, 피부 건전성 유지에 도움이 될 것으로 판단되었다.

도면

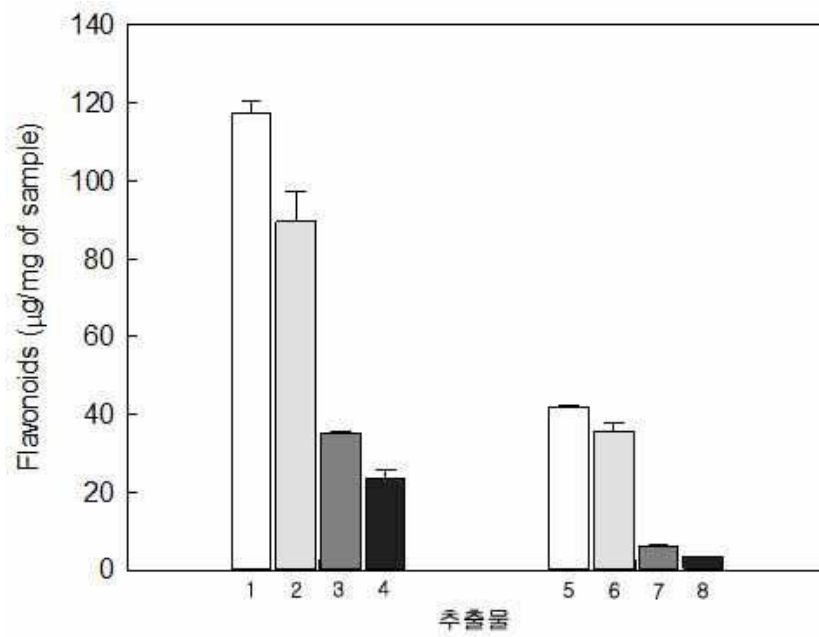
도면1



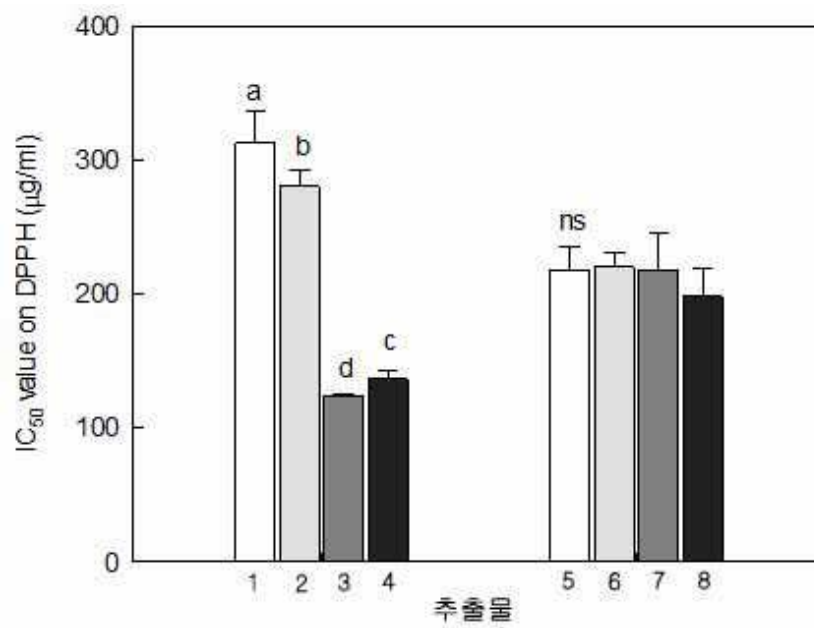
도면2



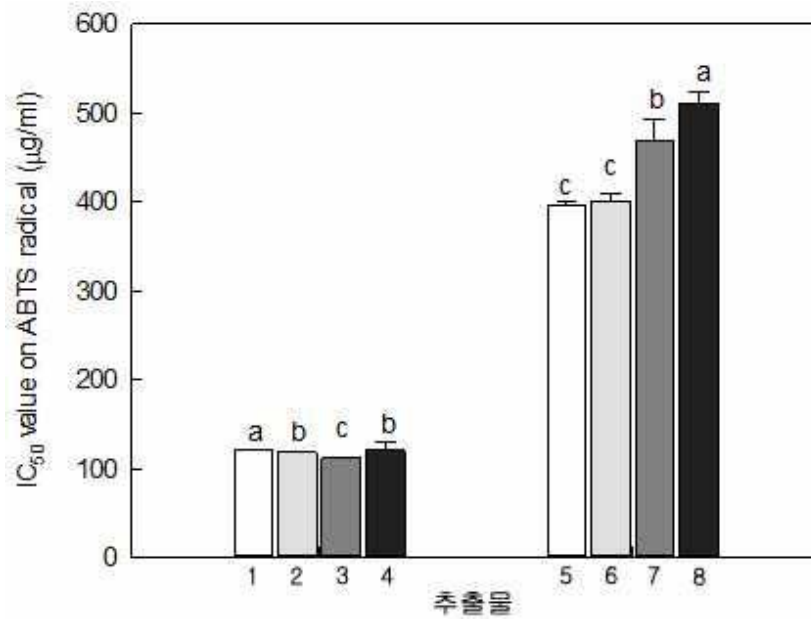
도면3



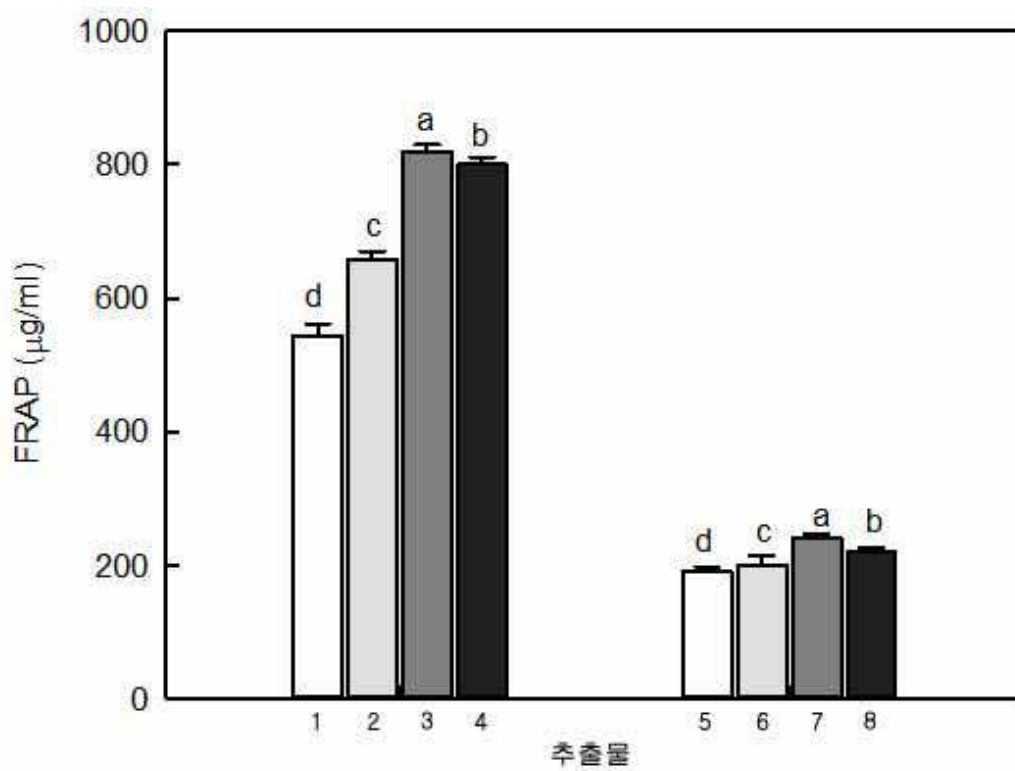
도면4



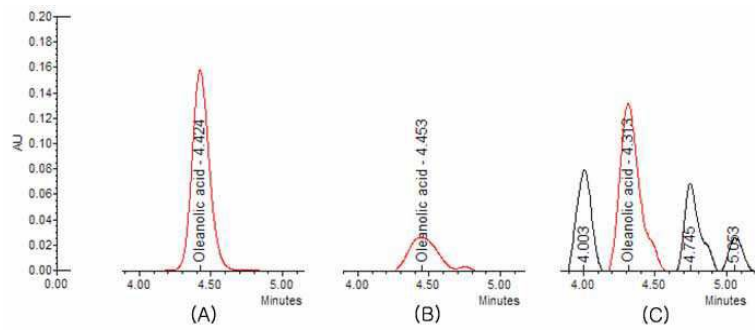
도면5



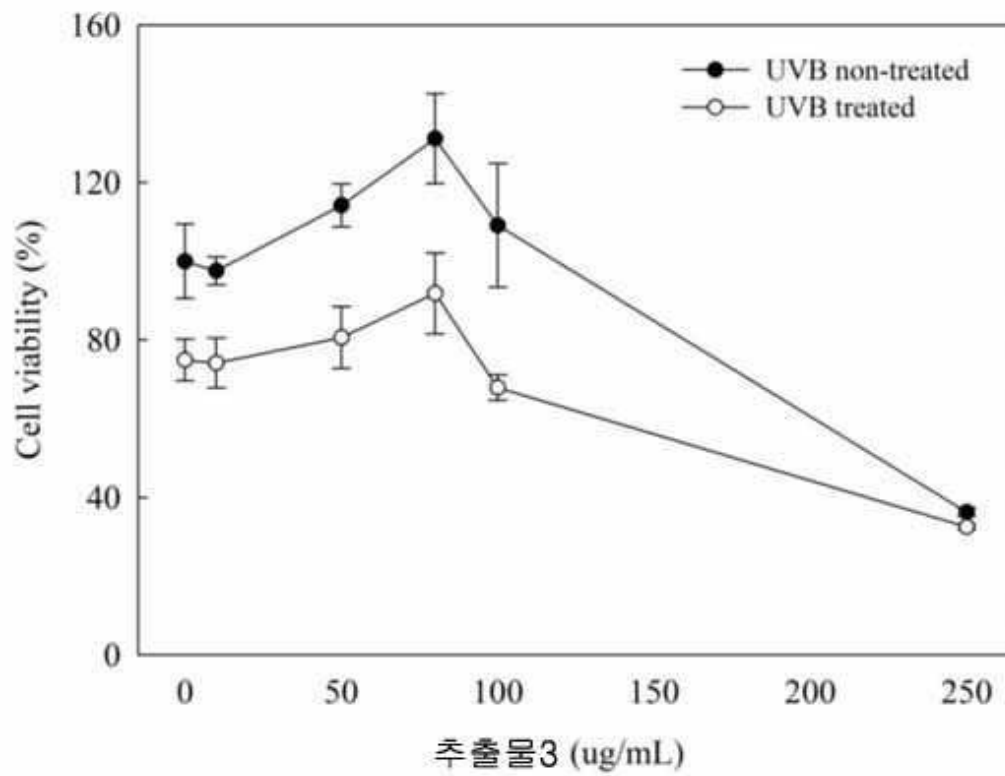
도면6



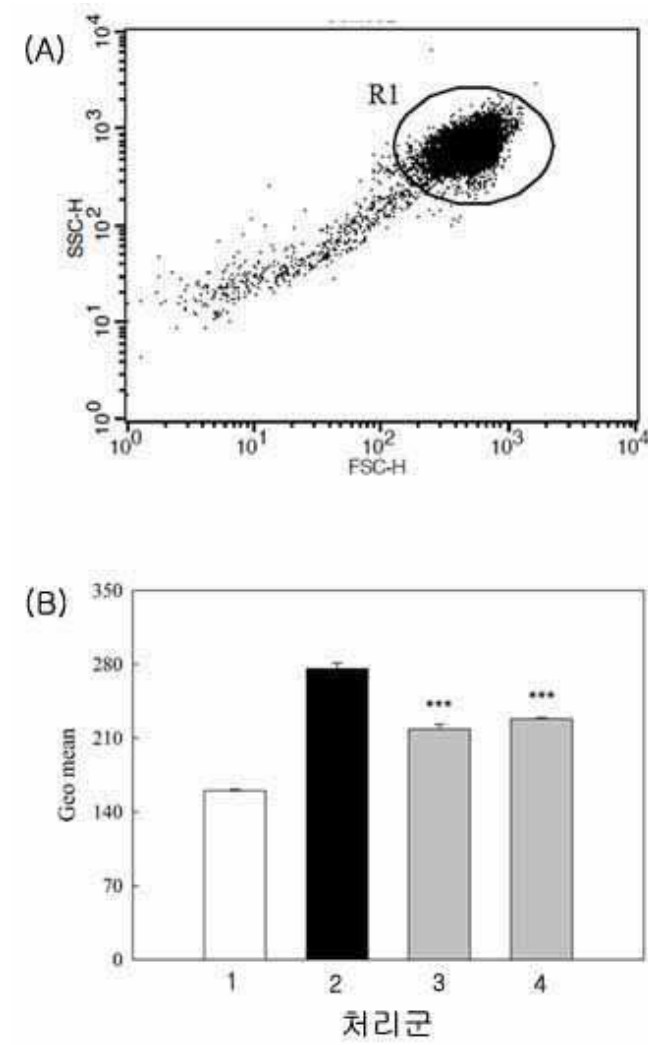
도면7



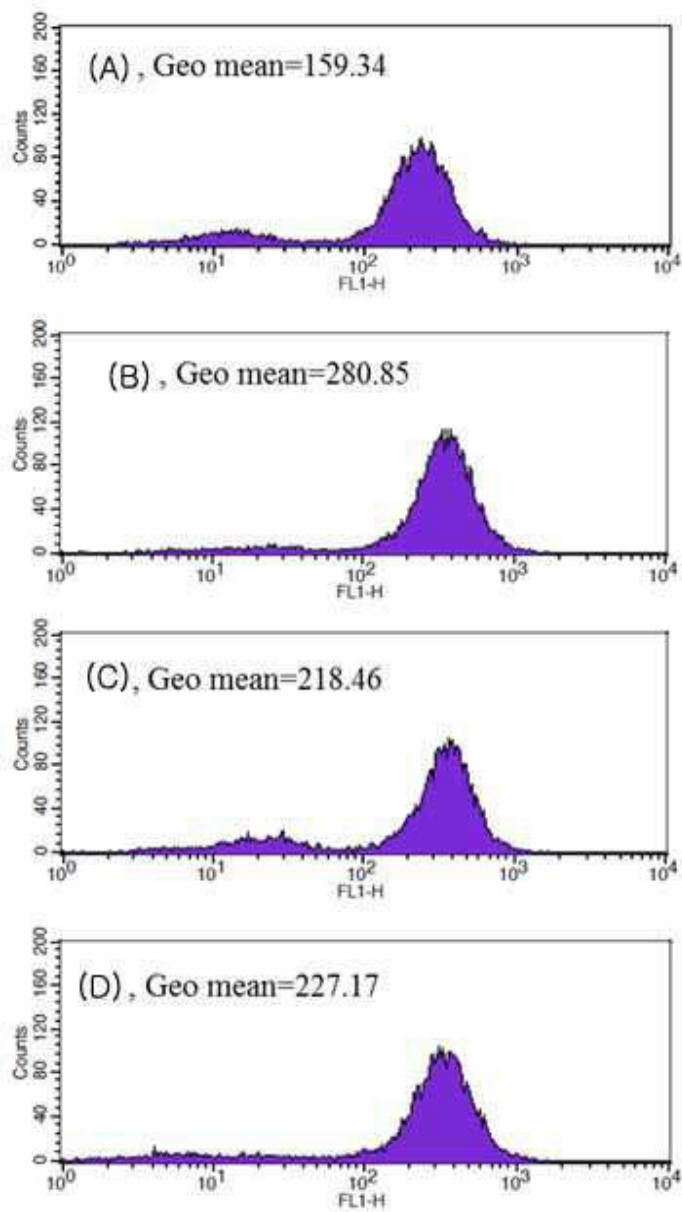
도면8



도면9



도면10



도면11

