(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0025799
(43) 공개일자 2017년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2017.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0122771
(22) 출원일자 2015년08월31일
심사청구일자 2015년08월31일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
김영철
대구광역시 달서구 호산로 125 삼성명가타운 209-1305
박별례
대구광역시 동구 팔공로 322-5 청구새들마을아파트 101동 1203호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

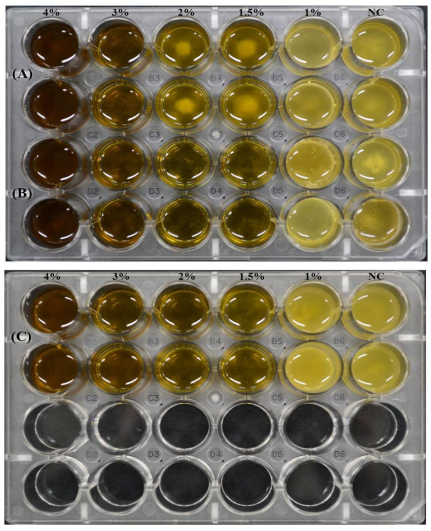
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 방부제 또는 화장료 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 방부제 조성물, 피부 노화 예방 또는 개선용 화장료 조성물 및 건강기능식품 또는 피부 미백용 화장료 조성물 및 건강기능식품에 대한 것으로, 상기 물봉선화 메탄올 추출물은 대장균, 황색포도상구균 및 녹농균에 대해 뛰어난 항균 효과를 보이며 콜라게나아제 및 엘라스타아제 억제 활성과 타입 I 프로콜라겐 합성을 증가시키고 MMP-1 mRNA 및 단백질 발현을 감소시켜 항주름 효과를 보이고, 티로시나아제 활성과 티로시나아제 mRNA 및 단백질 발현을 감소시켜 미백 효과를 보이므로 식품, 화장품 또는 의약품에 방부제로 유용하게 사용할 수 있으며, 피부 노화 개선 및 미백에 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 36/185 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
(72) 발명자
박민아
인천광역시 연수구 새말로 49번길 14 203호
황지연
경상북도 상주시 경상대로 2930-10 명지아파트 110-114

명 세 서

청구범위

청구항 1

물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 방부제 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 추출물은 메탄올, 에탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출하는 것을 특징으로 하는 방부제 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 방부제 조성물은 식품, 화장품 또는 의약품에 사용되는 것을 특징으로 하는 방부제 조성물.

청구항 4

물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 피부 노화는 피부 진피층의 세포외기질 감소로 인해 발생한 주름인 것을 특징으로 하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 추출물은 메탄올, 에탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 용매로 추출하는 것을 특징으로 하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 7

물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 추출물은 메탄올, 에탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출하는 것을 특징으로 하는 피부 노화 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 9

물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 추출물은 메탄올, 에탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 11

물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 건강기능식품.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 추출물은 메탄올, 에탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출하는 것을 특징으로 하는 피부 미백용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 천연물질인 물봉선화(*Impatiens textori*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 방부제, 피부노화 예방 또는 개선용 화장료 조성물 및 건강기능식품 또는 피부 미백용 화장료 조성물 및 건강기능식품에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 방부제(Antiseptic: 防腐劑)란 물질의 부패를 막는 약제를 말한다. 동식물성 유기물이 미생물의 작용에 의해 부패하는 것을 막는 것이 방부이고, 보존을 목적으로 방부하기 위해서 첨가하는 약제가 방부제이다. 부패를 일으키는 미생물에는 진균류에 속하는 곰팡이, 효모와 하등미생물인 세균이 있다.

[0003] 이러한 방부제는 일반적으로 식품, 화장품 또는 의약품 등의 변질을 막고 그것을 사용하거나 보존하는 동안에 그 순도를 유지시키기 위해서 첨가한다. 따라서 인체에 해가 없어야 한다는 것이 필수조건이고, 또 그 첨가로 인해 품질을 손상시키지 않아야 한다.

[0004] 식품방부제는 식품보존제라고도 하며 음식물이 공기 중에 노출될 때 산화되는 것을 막아주거나 곰팡이나 박테리아 같은 미생물이 음식물을 부패시키는 것을 방지해야 한다. 종래 식품 방부제로는 프로피온산 칼슘, 벤조산 나트륨, 아질산 나트륨과 소르브산 등과 같은 화학 방부제가 사용되어 왔다. 프로피온산은 곰팡이가 생기는 것을 막아주며 빵 치즈 초콜릿 등에 사용한다. 벤조산 나트륨은 오렌지주스나 그레이프 프루트 주스에 첨가하면 미생물의 성장을 막는다. 아질산 나트륨은 육류에서 미생물이 자라는 것을 막아준다. 소르브산과 그 염은 특히 치즈에서 곰팡이나 효모가 자라는 것을 억제한다. 그러나 이러한 화학 방부제는 양이 초과되면 사람이나 가축에 모두 유해하므로 법(약사법 및 식품위생법)으로 그 사용이 규제되고 있다.

[0005] 화장품 방부제는 화장품을 오랫동안 상온에서 보관할 수 있게 만든다. 화장품은 개봉 후 오래 두고 써야 하기 때문에 쉽게 변질되지 않도록 소비자 보호를 위해 방부제(보존)를 넣는다. 화장품에 주로 사용되는 방부제는 메틸 파라벤(Metyl Paraben), 에틸 파라벤(Ethyle Paraben), 프로필 파라벤(Propyl Paraben), 부틸 파라벤(Butyl Paraben), 쿼터늄-15(Quaternium-15), 이미다졸리디닐 우레아(Imidazolidinyl Urea) 등이다. 그러나, 화장품은 평생을 두고 인체에 직접 사용하므로 미량의 방부제라 하더라도 인체에 적지 않은 영향을 미칠 수 있다. 실제 피부과 의사들은 피부 트러블 증상 때문에 병원을 찾은 환자의 70%는 그 원인이 화장품 독성(방부제 성분)이라고 말한다. 화장품에 함유된 방부제 성분이 알레르기 반응을 일으키거나 피부에 자극을 줄 수 있다. 최근에는 각종 화장품과 향수에 함유되고 있는 화학물질의 일종인 파라벤(parabens)이 인체 내부에 축적되어 유방암을 일으킬 수 있다는 사실이 밝혀졌다.

[0006] 의약품 방부제로는 벤조산의 나트륨 염 등이 점안제, 수제(水劑), 주사제 등에 첨가되는데, 이러한 화학 방부제는 양이 초과되면 사람에게 치명적 해를 줄 수 있으므로 법(약사법 및 식품위생법)에 의해 그 종류와 사용량이 엄격히 통제되고 있다.

[0007] 상기와 같은 화학방부제들은 인체 안전성에 관한 많은 문제점을 야기하므로, 인체 안전성 측면을 고려하면 자연의 생물로부터 추출하여 얻은 천연 방부제가 사용되는 것이 바람직하다. 지금까지 미생물 오염과 생장을 억제하는 천연 방부제로서 편백나무 추출물인 히노키티올(hinokitiol), 목련 추출물인 메그노놀(megnonol), 자몽종자 추출물인 DF-100 등이 개발되어 있으나 그 규모는 합성 보존제의 17 %에 불과하여 수요를 충족시키지 못하고 있다.

[0008] 피부노화에 따른 가장 뚜렷한 현상 중의 하나는 진피층 세포외기질(extracellular matrix)의 감소이며 이로 인해 주름이 발생한다. 진피층 세포외기질은 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin), 당단백질(glycoprotein) 등 다양한 단백질이 주요 성분으로 포함되어있다. 이들 단백질 중 90% 이상은 콜라겐이며, 그 중에서도 약 90% 정도가 타입 1 콜라겐(type 1 collagen)이다. 노화로 인해 진피층 세포외기질에서 타입 1 콜라겐의 양이 약 70 % 감소하는 현상이 확인되었다.

[0009] 히알루론산(Hyaluronic acid)은 아미노당과 우론산으로 이루어진 다당류의 일종으로 생체의 모든 조직에 분포하며, 체내 총량의 50% 정도가 피부에 분포되어 있다. 히알루론산은 최대 1000배 질량의 물과 결합할 수 있으며, 진피조직 세포외기질을 채워주는 역할을 한다. 또한, 히알루론산은 여러 가지 당단백질과 프로테오글리칸(proteoglycan) 간의 응집(aggregate)을 형성하여 여러 성장 인자(growth factor)들을 저장하거나 보존하는 역할을 한다. 임상연구 결과에 따르면, 히알루론산은 진피 섬유아세포(dermal fibroblast)의 증식 및 콜라겐 생성, 성장 인자의 분비를 증가시키는데, 나이가 증가하면서 피부 중 40% 이상 감소하는 것으로 알려졌다.

[0010] 피부 노화는 크게 내인성 피부노화(intrinsic aging)와 외인성 피부노화(extrinsic aging)의 2가지로 나뉜다. 외인성 피부 노화는 자외선, 흡연 등 주로 외부 환경적인 요인에 의해 야기되며, 내인성 피부 노화는 나이를 먹음에 따라 동반되는 피부 노화이다. 현재 외인성 피부 노화를 방지하기 위해 자외선 차단 기능을 가진 향장품 등 여러 방법이 존재하지만 내인성 피부 노화를 방지하기 위한 방법은 아직 없는 실정이다.

[0011] 더불어 일반적으로 사람의 피부가 검게 되는 원인은 여러가지가 있으나, 특히 주된 원인은 자외선에 의한 피부의 노출이다. 자외선에 피부가 노출되면, 피부 세포의 일종인 멜라닌세포(melanocyte) 내에서 멜라닌(melanin)이 합성되고 방출되어 피부가 검게 된다.

[0012] 멜라닌세포에서 멜라닌이 합성되는 과정을 살펴보면, 세포내의 티로신 (tyrosine)을 기질로 하여 티로시나아제(tyrosinase)라는 효소가 작용하여 도파퀴논(dopaquinone)을 생성시키며, 도파퀴논으로부터 자발적인 반응과 효소반응을 거쳐 공중합체 흑색색소인 멜라닌이 생성된다.

[0013] 따라서 피부가 검게 되는 것을 막기 위하여는 멜라닌 생성과정 중의 일부반응을 저해함으로써 상기 멜라닌의 합성을 감소시키는 방법이 일반적으로 용이하게 행해지고 있다.

[0014] 이러한 용도로서 종래는 아스코르빈산(ascorbic acid), 코지산(kojic acid), 알부틴(arbutin), 히드로퀴논(hydroquinone) 등과 같은 각종 식물 추출물이 사용되는 경우가 많았다. 이들 중 코지산은 티로시나아제 활성부위에 존재하는 구리이온을 킬레이트시켜 효소활동을 저해하는 작용을 하는 것으로, 성능이 좋으나 화장품에 배합시 안전성에 문제가 있어 사용에 제한이 가해지고 있고, 히드로퀴논은 피부에 대한 자극성이 높아, 이 원료 역시 안전성 문제로 인하여 현재 화장료에 적용되지 못하고 있는 실정이다.

[0015] 따라서 뛰어난 항균성, 항주름 또는 피부 미백 효과를 보이는 조성물의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0016] (특허문헌 0001) 1. 한국등록특허 10-1430643호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 따라서 본 발명은 부작용이 적은 천연물질을 포함하는 방부제 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0018] 또한 본 발명은 부작용이 적은 천연물질을 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

[0019] 또한 본 발명은 부작용이 적은 천연물질을 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

[0020] 또한 본 발명은 부작용이 적은 천연물질을 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

[0021] 또한 본 발명은 부작용이 적은 천연물질을 포함하는 피부 미백용 건강기능식품을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0022] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 방부제 조성물을 제공한다.

[0023] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0024] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0025] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0026] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에 따르면, 물봉선화 메탄올 추출물은 대장균, 황색포도상구균 및 녹농균에 대해 뛰어난 항균 효과를 보이며 콜라게나아제 및 엘라스타아제 억제 활성과 타입 I 프로콜라겐 합성 증가와 MMP-1 mRNA 및 단백질 발현을 감소시켜 항주름 효과를 보이고, 티로시나아제 활성과 티로시나아제 mRNA 및 단백질 발현을 감소시켜 미백 효과를 보이므로 방부제 조성물, 피부 노화 예방 또는 개선용 화장료 조성물 및 건강기능식품 또는 피부 미백용 화장료 조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 본 발명에 따른 물봉선화 메탄올 추출물(I. textori methanol extract, ITME)의 항산화 능력을 확인한 결과이고,

도 2는 ITME의 전자공여능을 확인한 결과이고,

도 3은 ITME의 항균성을 확인한 결과이고,

도 4는 1,2-헥산디올(1,2-hexanediol)의 항균성을 확인한 결과이고,

도 5는 메틸 파라벤(methyl paraben)의 항균성을 확인한 결과이고,

도 6은 ITME의 콜라게나아제(Collagenase) 억제 활성을 확인한 결과이고,

도 7은 ITME의 엘라스테아제(Elastase) 억제 활성을 확인한 결과이고,

도 8은 ITME의 최대허용농도((maximum permissible level, MPL)를 확인한 결과이고,

도 9는 인간피부섬유아세포에 다양한 농도의 ITME를 처리한 후 형태학적 변화를 관찰한 결과이고,

도 10은 인간피부섬유아세포에 다양한 농도의 ITME를 처리한 후 타입 I 프로콜라겐(Type I procollagen) 합성 효과를 확인한 결과이고,

도 11은 인간피부섬유아세포에 다양한 농도의 ITME를 처리한 후 기질금속단백분해효소-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1) mRNA의 발현 변화를 확인한 결과이고,

도 12는 인간피부섬유아세포에 다양한 농도의 ITME를 처리한 후 기질금속단백분해효소-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 단백질의 발현 변화를 확인한 결과이고,

도 13은 색소합성세포인 melan-a 세포에 다양한 농도의 ITME를 처리한 후 세포생장률을 확인한 결과이고,

도 14는 melan-a 세포에 다양한 농도의 ITME를 처리한 후 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과이고,

도 15는 melan-a 세포에 다양한 농도의 ITME를 처리한 후 세포의 멜라닌 함량을 관찰한 결과이고,

도 16은 melan-a 세포에 다양한 농도의 ITME를 처리한 후 세포내 티로시나아제 활성을 관찰한 결과이고,

도 17은 melan-a 세포에 다양한 농도의 ITME를 처리한 후 세포내 티로시나아제 mRNA 발현 변화를 확인한 결과이고,

도 18은 melan-a 세포에 다양한 농도의 ITME를 처리한 후 세포내 티로시나아제 단백질의 발현 변화를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0030] 본 발명의 발명자는 천연물 추출물의 효능에 대해 연구하던 중, 물봉선화(*Impatiens textori*) 메탄올 추출물이 대장균, 황색포도상구균 및 녹농균에 대해 뛰어난 항균 효과를 보이며 콜라게나아제 및 엘라스타아제 억제 활성과 타입 I 프로콜라겐 합성 증가와 MMP-1 mRNA 및 단백질 발현을 감소시켜 항주름 효과를 보이고 티로시나아제 활성과 티로시나아제 mRNA 및 단백질 발현을 감소시켜 피부 미백 효과를 보이는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0031] 상기 물봉선화(*Impatiens textori*)는 산골짜기의 물가나 습지에서 무리지어 자란다. 줄기는 곧게 서고, 많은 가지가 갈라지며, 높이는 40~80cm이다. 잎은 어긋나고 길이 6~15cm의 넓은 바소꼴이며 끝이 뾰족하고 가장자리가 톱니모양이며 열매는 삭과이고 길이 1~2cm의 바소꼴로 익으면 터지면서 종자가 튀어나온다. 한국, 일본, 중국 동북부에 분포하고 짙은 자주색의 꽃이 피는 것을 가야물봉선, 흰색 꽃이 피는 것을 흰물봉선이라고 한다.

[0032] 잎과 줄기는 해독과 소종 작용을 하기 때문에 종기의 치료나 뱀에 물렸을 때에 사용하며 뿌리는 강장효과가 있고 멍든 피를 풀어준다고 알려져 있다.

[0033] 그러나 상기 물봉선화 추출물의 항균 효과, 항주름 효과 또는 미백 효과에 대해서는 보고된 바 없다.

[0034] 따라서 본 발명은 물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 방부제 조성물을 제공한다.

[0035] 상기 추출물은 메탄올, 에탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출하며, 메탄올을 사용하는 것이 바람직하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 물봉선화 메탄올 추출물(ITME)은 대장균, 황색포도상구균 및 녹농균에 대하여, 현재 방부제로 사용되는 1,2-헥산디올 또는 메틸 파라벤과 유사한 항균성을 보였다.

[0037] 따라서 상기 방부제 조성물은 식품, 화장품 또는 의약품에 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 물봉선화 메탄올 추출물은 우수한 콜라게나아제 및 엘라스타아제 억제 활성을 보이고, 인간피부섬유아세포에서 타입 I 프로콜라겐 합성 증가와 MMP-1의 유전자 및 단백질 발현을 감소시켰다. 또한 인간피부섬유아세포에 대한 ITME 농도의 MPL은 200 μg/mL 이상인 것을 확인하였다.

[0039] 따라서 본 발명은 물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0040] 상기 피부 노화는 피부 진피층의 세포외기질 감소로 인해 발생한 주름일 수 있다.

[0041] 상기 추출물은 메탄올, 에탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출하며, 메탄올을 사용하는 것이 바람직하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 더불어 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 물봉선화 메탄올 추출물은 색소합성세포인 melan-a 세포에서 티로시나아제 활성과 티로시나아제 mRNA 및 단백질의 발현을 감소시켰다.

[0043] 따라서 본 발명은 물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물을 제공한다.

[0044] 상기 추출물은 메탄올, 에탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출하며, 메탄올을 사용하는 것이 바람직하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 상기 화장료 조성물은 유효성분인 물봉선화 추출물 외에 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0046] 상기 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 썬 크림, 유연 화

장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0047] 상기 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0048] 상기 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.

[0049] 상기 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해 화제 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.

[0050] 상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 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.

[0051] 또한 본 발명은 물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0052] 상기 추출물은 메탄올, 에탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출하며, 메탄올을 사용하는 것이 바람직하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 또한 본 발명은 물봉선화 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 미백용 건강기능식품을 제공한다.

[0054] 상기 추출물은 메탄올, 에탄올, 증류수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출하며, 메탄올을 사용하는 것이 바람직하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품은 유효성분인 물봉선화 추출물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0056] 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0058] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0060] **<참고예 1> 시약 및 실험기구**

[0061] 디메틸설폭시화물(Dimethyl sulfoxide, DMSO), 2,6-디-터트-뷰틸레이트 하이드록시톨루엔(2,6-di-tert-butylate hydroxytoluene, BHT), 3,4-디하이드록시-L-페닐-알라닌(3,4-dihydroxy-L-phenyl-alanine, L-DOPA), 1,1-디페닐-2-피크릴-하이드라질(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, DPPH), 알부틴(arbutin), 탄닌산(tannic acid), L-티로신(L-tyrosine), 폴린-시오칼토 페놀 시약(Folin-Ciocalteu's phenol reagent), 3-(4,5-디메틸-티아졸-2-일)-2,5-디페닐-테트라졸리움 브로마이드(3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 및 12-*o*-테트라데칸오일-포르볼-13-아세테이트(12-*o*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, TPA)는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

[0062] DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), RPMI-1640 배지(Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640

medium), 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 페니실린/스트렙토마이신 혼합물(penicillin/streptomycin mixture, P/S)은 론자(Lonza, Cascade, MD, USA)에서 구매하였다.

[0063] 도립 현미경(Inverted microscope, CKX41, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 세포의 형태를 관찰하였고, 각 세포는 CO_2 배양기(MCO-17AC, Sanyo electric, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

[0065] **<참고예 2> 세포 배양**

[0066] 인간피부섬유아세포(Human dermal fibroblasts)는 아모레 퍼시픽(Amore Pacific Company, Yongin, Korea)에서 분양받았으며, 72시간 동안 5% CO_2, 37℃의 가습 배양기에서 10% FBS, 1% P/S가 보충된 DMEM 배지로 배양하였다.

[0067] 색소합성세포인 melan-a 세포는 도로시 베네트 박사(Dr. Dorothy Bennett, St. George`s Hospital, UK)로부터 얻었으며, 많은 색소를 가진 영속세포는 C57BL/6 마우스로부터 분리하였다. 각 세포들은 RPMI-1640 배지에서 배양하였으며, 10% FBS, 1% P/S 및 200 nM TPA를 보충해주었고 37℃ 및 10% CO_2의 배양기에서 72시간 동안 배양하였다.

[0069] **<참고예 3> 미생물(Microorganisms) 배양**

[0070] 물봉선화 메탄올 추출물(*I. textori* methanol extract, ITME)의 항균성을 확인하기 위해, 대장균(Escherichia coli, ATCC 8739), 황색포도상구균(Staphylococcus aureus, ATCC 6538) 및 녹농균(Pseudomonas aeruginosa, ATCC 9027)을 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 분양받아 박테리아 영양 한천 배지(bacteria nutrient agar medium)에서 24시간 동안 37℃의 조건으로 배양하였다.

[0072] **<실시예 1> 물봉선화 메탄올 추출물 제조**

[0073] 물봉선화(Impatiens textori)는 2014년 5월에 대한민국 경기도 고양시에 소재한 화훼단지(floricultural pot in Goyang, Gyeonggi-do, South Korea)에서 구매하고 분쇄하여 실험에 사용하였다.

[0074] 분상의 샘플 50g을 플라스크에 넣고 80% 메탄올(methanol) 500 mL로 25℃에서 24시간 간격으로 3번 추출하였다.

[0075] 이를 필터 페이퍼(filter paper)로 여과하고 회전식 진공 증발기(rotary vacuum evaporator, BUR-205, BULabortechnik AG, Switzerland)를 이용하여 농축한 후 동결건조하였다.

[0077] **<실시예 2> 항산화 능력 측정**

[0078] **2.1 총 폴리페놀(polyphenol)와 총 플라보노이드(flavonoid) 함량 측정**

[0079] 상기 실시예 1에서 제조한 ITME의 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위하여, 먼저 추출물 0.2 mg을 1 mL 증류수에 용해하고 이를 시험관에 넣은 후, 폴린-시약(1 mL)을 첨가하였고 3분간 방치하였다. 3분이 지나고 1 mL의 10% Na_2CO_3을 넣고 힘차게 흔들어준 후, 60분간 방치하였다. 그런 후, 725 nm에서 폴리페놀 농도를 측정하고 탄닌산을 이용한 표준 곡선으로 정량화하였다.

[0080] 다음으로 플라보노이드 함량을 측정하기 위하여, 추출물 0.2 mg을 1 mL DMSO에 용해하고 이 용액 100 μL를 시험관에 들어있는 1 mL의 디-에틸렌 글리콜 시약(di-ethylene glycol reagent)과 100 μL의 1N NaOH와 혼합하였다. 그런 후 힘차게 흔들어준 후, 60분간 37℃에서 반응시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였고 이를 루틴(rutin)을 이용한 표준 곡선으로 정량하였다.

[0081] 그 결과 도 1과 같이, ITME의 폴리페놀과 플라보노이드의 함량은 각각 193.8 및 146.8 mg/g이었다.

[0083] **2.2 전자-공여능(Electron-donating ability)**

[0084] 상기 실시예 1에서 제조한 ITME의 전자공여능을 측정하기 위하여, ITME을 최종 농도(125, 250, 500 또는 1000 μg/mL)이 되도록 증류수에 용해하였다.

[0085] 그런 후 ITME 1 mL를 시험관에 넣고, 이에 4 mL의 0.4 mM DPPH을 첨가하였다.

[0086] 이를 힘차게 흔들어 혼합한 후 60℃에서 10초간 반응시킨 후, 525 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이때 아스코르브산(Ascorbic acid)을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0087] 각 용액의 DPPH 라디칼-소거 활성(radical-scavenging activity)은 하기 수학식 1을 따라 억제율로써 산출하였다.

[0088] **[수학식 1]**

[0089] % 전자공여능 = $[1 - (A_{sample} / A_{control})] \times 100$

[0090] 상기 $A_{control}$은 대조군(시험 화합물을 제외한 시약)의 흡광도이다.

[0091] 다양한 농도의 ITME의 전자공여능은 도 2와 같이, 1000 μg/mL의 경우 50.4%로, 농도 의존적(dose-dependent manner)으로 증가하는 것을 보여주었다.

[0093] **<실시예 3> 항균성 능력(anti- microbial activity)**

[0094] **3.1 항균성 활성 분석**

[0095] 그람음성균(gram-negative bacteria)인 대장균, 녹농균과 그람양성균(gram-positive bacteria)인 황색포도상구균을 이용하여 ITME의 항균성 활성을 측정하였다.

[0096] 이때 이미 공지된 문헌(*Bioorg Med Chem Lett* 14: 5831-5833, 2004)에 기재된 방사상 확산(radial diffusion)을 기초로 한 한천 연속 희석법(agar streak dilution method)을 통해 결정된 최소 저해 농도(minimal inhibitory concentrations, MICs)를 측정하였다.

[0097] 동일한 0.5 마이코박테리움 아비움 복합체 파랜드(Mycobacterium avium complex(Mac) Farland) 현탁액을 레틴 액체배지(Letheen broth)에 희석하고 24-웰 플레이트에 분주하였다.

[0098] 성장 대조군 웰의 균락수(colony count)에 의해 결정된 최종 전염원(final inocula)은 대략 웰당 1.5×10^6 cells/mL이었다.

[0099] 이에 ITME(4%, 3%, 2%, 1.5% 또는 1%), 1,2-헥산디올(4%, 2%, 1%, 0.5% 또는 0.25%) 및 메틸 파라벤(2%, 1%, 0.5%, 0.25% 또는 0.125%)을 각 웰에 첨가해 준 후 37℃에서 48시간 동안 배양하였다.

[0100] MIC는 미생물의 성장을 억제하는 ITME의 최소저해농도로써 결정하였다.

[0101] 그 결과 도 3과 같이, 대장균(A), 황색포도상구균(B) 및 녹농균(C)에 대한 ITME의 MIC 값은 각각 3%, 1.5% 및 1.5%로 측정되었다.

[0102] 도 4 및 도 5와 같이, 방부제로 사용되는 1,2-헥산디올의 MIC 값은 각각 1%, 2% 및 1%로 측정되었고, 메틸 파라벤의 MIC 값은 각각 0.25%, 0.5% 및 0.25%로 측정되었다.

[0103] 따라서 본 발명에 따른 ITME은 현재 사용되는 방부제와 유사한 항균성 활성을 보여주었다.

[0104]

[0105] **<실시예 4> 항 주름(Anti-winkle) 효과**

[0106] **4.1 콜라게나아제(Collagenase) 활성 분석**

[0107] 염화칼슘(Calcium cloride, 4 mM)을 0.1M Tris-HCL 버퍼(pH 7.5)에 용해한 후, 이를 최종 완충액 및 기질로 사용하였다. 이 버퍼에 4-페닐아조-벤질옥시-카보닐-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg(4-phenylazo-benzyloxy-carbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D -Arg(0.15 mg/mL)을 용해하였다.

[0108] 그런 후, 250 μL의 기질 용액(substrate soultion) 및 100 μL의 ITME를 튜브에 주입하였다.

[0109] 0.2 mg/mL이 되게끔 물봉선화 콜라게나아제를 최종 완충액에 용해한 후, 이 용액 150 μL을 상기 튜브에 첨가해 주었다.

[0110] 이를 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 시트르산(citric acid, 6%)을 첨가하여 반응을 정지시키고 에틸 아세테이트(ethyl acetate)를 넣어 반응 혼합물을 분리한 후, 상층액의 흡광도를 324 nm에서 측정하였다.

[0111] 이때 아스코르브산을 양성 대조군으로 이용하였고, 콜라게나아제 활성은 하기 수학식 2를 통해 산출하였으며 대조군에 대한 상대적인 억제 활성으로써 산출하였다.

[0112] **[수학식 2]**

[0113] 억제 (%)= [(샘플의 OD_{324} - 대조군의 OD_{324}) /대조군의 OD_{324}]× 100

[0114] 도 6과 같이, 다양한 농도의 ITME의 콜라게나아제 억제 활성은 10 mg/mL 농도에서 50.4%이였으며, 농도 의존적으로 증가하는 것을 보였다.

[0116] **4.2 엘라스타아제(Elastase) 활성 분석**

[0117] ITME의 엘라스타아제 활성 억제 효과를 평가하기 위해, 410 nm에서 흡광도를 측정하여 엘라스타아제에 의해 방출된 기질인 N-숙시닐-(L-Ala))$_3$-*p*-니트로아닐라이드(N-succinyl-(L-Ala)$_3$-*p*-nitroanilide)가 가수분해된 *p*-니트로아닐라이드(*p*-nitroanilide)의 양을 확인하였다.

[0118] 먼저, 2.9 mM N-숙시닐-(L-Ala))$_3$-*p*-니트로아닐라이드를 100 mM Tris-HCl 버퍼(pH 8.0)에 준비한 후, 이를 동결건조했던 ITME에 넣어주고 각 샘플 용액을 최종 농도 1.25, 2.5, 5 또는 10 mg/mL로 희석하였다.

[0119] 이를 태핑(tapping)으로 완벽하게 혼합하고 엘라스타제(0.2 unit/mL) 보존 용액(stock solution)을 첨가한 후, 37℃에서 10분간 반응시키고 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0120] 엘라스타제 억제율은 상기 수학식 2에 410 nm에서 측정한 흡광도값을 대입하여 산출하였으며 대조군에 대한 상대적인 억제 활성으로써 산출하였다

[0121] 그 결과 도 7과 같이, ITME는 1.25 mg/mL의 저농도에서도 우수한 엘라스타아제 활성 억제 효과를 보였으며, 이 억제 활성은 농도의존적으로 약간씩 증가하였다.

[0123] **4.3 MTT 분석**

[0124] 세포 생장률은 인간피부섬유아세포에서 ITME의 최대허용농도(maximum permissible level, MPL)를 결정하기 위한 MTT 분석을 통해 확인하였다.

[0125] 먼저, 인간피부섬유아세포를 96웰 플레이트의 각 웰당 1× 10^4 세포/웰만큼 분주하고 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 및 가습의 배양기에서 배양하였다.

[0126] 25, 50, 100 또는 200 μg/mL의 농도로 레드-프리 DMEM(red-free DMEM, PRF-DMEM)에 희석한 ITME(200μL)를 각 웰에 첨가한 후 48시간 더 배양하였다.

[0127] 배양이 끝난 후 MTT(0.5 μg/mL)를 각 웰에 넣어주고 3시간 더 배양하고 이를 1,000 rpm의 속도로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후, DMSO(200 μL)를 각각의 웰에 넣어주었다.

[0128] 15분간 플레이트-쉐이커(plate-shaker)에서 세포를 재현탁시킨 후 마이크로플레이트 리더기로 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포의 생장률은 측정값을 대조군 시약의 흡광도로 나누어 백분율로 산출하였다.

[0129] 그 결과 도 8 중 A와 같이, 아스코르브산은 100 또는 200 μg/mL의 농도로 처리하였을 때 각각 4.5%, 29.9%의 생장저해율을 보였다. 따라서 인간피부섬유아세포에 대한 아스코르브산의 MPL은 100 μg/mL인 것을 확인하였다.

[0130] 반면 도 8 중 B와 같이, ITEM은 100 또는 200 μg/mL의 농도로 처리하였을 때 각각 21.1% 및 27.4%의 생장증가율을 보였다. 따라서 인간피부섬유아세포에 대한 ITME의 MPL은 200 μg/mL 이상인 것을 확인하였다.

[0132] **4.4 인간피부섬유아세포의 형태학적 관찰**

[0133] 인간피부섬유아세포에 ITME를 25, 50, 100 또는 200 μg/mL로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 이후 배지를 교체해 주고 세포를 현미경으로 관찰하여 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0134] 도 9 중 A는 대조군이며, B는 25μg/mL의 ITME를 처리한 실험군, C는 50μg/mL의 ITME를 처리한 실험군, D는 100μg/mL의 ITME를 처리한 실험군이며 E는 200 μg/mL의 ITME를 처리한 실험군이다.

[0135] ITME를 처리한 인간피부섬유아세포는 200μg/mL의 고농도 처리에도 대조군과 마찬가지로 평평하고 방추(spindle)와 유사한 형태를 보여주었다.

[0137] **4.5 타입 I 프로콜라겐 합성 분석(Type I procollagen synthesis assay)**

[0138] 인간피부섬유아세포에 25, 50, 100 또는 200 μg/mL의 ITME를 처리한 후, 상층액을 제거하고 효소면역분석법 키트(enzyme immunoassay kit, EIA kit, Takara, Japan)로 분석하였다.

[0139] 타입 I 프로콜라겐 단백질 생성은 이미 공지된 문헌(*Biol Pharm Bull* 30: 1395-1399, 2007)에 기재된 방법을 따라 산출하였고, 5 ng/mL의 형질전환생장인자-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)를 양성 대조군으로 사용하였다.

[0140] 인간피부섬유아세포는 10% FBS와 1% P/S를 포함하는 DMEM에서 안정화시키고 37℃, 5% CO_2 및 가습의 배양기에서 24시간 배양하였다.

[0141] 이 세포들을 수집하여 6-웰 플레이트의 각 웰당 0.7× 10^5 세포/웰만큼 들어가도록 500-μL 볼륨으로 분주하고 24시간동안 배양하였다.

[0142] 배지를 제거하고 세포를 인산완충식염수(phosphate-buffered saline, PBS)로 세척한 후, 1mL의 PRF-DMEM과 1% P/S를 첨가하고 24시간 더 배양하였다.

[0143] 배양이 끝난 후 세포를 PBS로 세척하고 25, 50, 100 또는 200 μg/mL의 ITME을 포함한 PRF-DMEM 3 mL를 첨가한 후 24시간 배양하였다. 그리고 12,000 rpm의 속도로 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하고, 이를 프로콜라겐 단백질 정량 분석의 샘플로써 사용하였다.

[0144] 100 μL의 항체-퍼옥시다아제-결합 용액(antibody-peroxidase-conjugate solution)을 96웰 EIA 키트의 웰마다 넣어주고 4단계 희석한 샘플 20 μL를 넣어주었다. 그리고 이를 포일(foil)로 감싸서 37℃에서 3시간 배양하였다.

[0145] 세포들을 PBS로 4번 세척하고, 100 μL의 기질 용액을 첨가해준 후, 포일로 감싼 키트를 15분간 실온에서 배양하였다.

[0146] 이에 반응 정지 용액으로 100 μL의 1N H_2SO_4를 첨가해 준 후 마이크로플레이트 리더기로 450 nm에서 흡광도를 3차례 측정하였다.

[0147] 프로콜라겐 단백질의 생성은 기존 공지된 문헌(*J Biol Chem* 193: 265-275, 1951)에 기재된 방법에 따라 분석하였고 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)를 이용하여 정량하였다.

[0148] 그리고 세포 용해 버퍼(80 μL; CelLytic™ B Cell Lysis Reagent, Sigma-Aldrich)를 플레이트에 넣어준 후 -20℃에 동결시켰다가 플레이트에서 혼합물을 제거하기 전에 3 번 해동하였고 이를 1/10으로 희석한 후, BSA 표준곡선을 이용하여 단백질 함량을 정량화하였다.

[0149] 그 결과 도 10과 같이, 25, 50, 100 또는 200 μg/mL의 ITME을 처리한 경우, 각각 16.7%, 22%, 28.1% 및 36.7%($p<0.05$)의 타입 I 프로콜라겐 생성 증가 효과를 보였으며, 이는 농도 의존적으로 증가하였다.

[0151] **4.6 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)**

[0152] 인간피부섬유아세포에 ITME를 25, 50, 100 또는 200 μg/mL의 농도로 처리한 후, 이의 총 RNA를 트리졸 시약(Trizol-reagent, Invitrogen, New York, NY, USA)을 이용하여 제조사의 지침을 따라 추출하였다.

[0153] 이와 더불어 인간피부섬유아세포에 UVA를 처리한 후, 이의 mRNA를 추출하여 대조군으로 사용하였다. 세포를 200 nm에서 배양 접시 면적의 80%만큼 배양한 후, 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 샘플을 FBS를 포함하지 않는 DMEM에서 배양한 1.5× 10^5 cells/mL의 세포에 처리한 후, 6.3 J/cm^2 UVA를 조사하고, 24시간 배양한 후 이의 mRNA를 추출하였다.

[0154] 총 RNA(5 μg)를 8 μL의 몰로니 생쥐 백혈구 바이러스 역전사효소(Molony murine leukemia virus Reverse Transcriptase, M-MLV RT) 5× 버퍼, 3 μL of 10 mM 디옥시리보뉴클레오티드 3인산염(eoxyribonucleotide triphosphates, dNTPs), 0.45 μL의 40 U/μL 리보뉴클레아제 억제제(RNasein inhibitor), 0.3 μL의 200 U/μL M-MLV RT(Promega, Madison, WI, USA) 및 1.5 μL의 50 μM 올리고 dT(oligo dT, Bioneer, Daejeon, Korea)를 포함하는 40 μL 볼륨의 혼합액을 이용하여 역전사하였다.

[0155] 단일가닥 cDNA는 PCR을 이용하여 증폭하였으며, 이때 4 μL 의 5× 그린 Go 태그 플렉시 버퍼(green Go Taq flexi buffer), 0.4μL의 10 mM dNTPs, 0.1 μL의 5 U/μL 태그 폴리머레이즈(Taq polymerase), 1.2 μL의 25 mM $MgCl_2$(Promega)를 이용하였고, 하기 표 1의 금속단백분해효소-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 또는 β-액틴(β-actin)에 대한 프라이머 0.4 μL(20 μM)를 사용하여 증폭하였다.

표 1

[0156]

유전자 명	방향	서열	서열번호
MMP-1	정방향	CGA CTC TAG AAA CAC AAG AGC AAG A	1
	역방향	AAG GTT AGC TTA CTG TCA CAC GCT T	2
β-actin	정방향	ACC GTG AAA AGA TGA CCC AG	3
	역방향	TAC GGA TGT CAA CGT CAC AC	4

[0157] MMP-1 또는 β-액틴의 PCR 생성물의 예상 사이즈는 각각 237 및 248 베이스 페어(base fairs)였다.

[0158] PCR은 다음과 같이 수행하였다. MMP-1은 94℃에서 60초간 변성(denaturation), 50℃에서 60초간 풀림(annealing), 72℃에서 60초간 연장(extension)으로 28 회(cycle) 수행하였다.

[0159] β-액틴은 94℃에서 30초간 변성, 51℃에서 30초간 풀림, 72℃에서 60초간 연장으로 30 회 수행하였다.

[0160] 이를 통해 생성된 PCR 생성물은 1.2% 아가로즈 겔을 이용하여 분석하였으며 β-액틴(β-actin)을 대조군으로 사용하여 MMP-1의 상대적인 발현을 평가하였다.

[0161] 그 결과 도 11과 같이, 25, 50, 100 또는 200 μg/mL의 ITME을 처리한 경우, 각각 15.9%($p<0.05$), 17.4%($p<0.05$), 23.1%($p<0.01$) 및 36.8%($p<0.01$)로 농도 의존적으로 MMP-1 mRNA의 발현을 유의하게 감소시켰다.

[0163] **4.7 웨스턴 블롯**

[0164] 상기 실시예 4 중 6과 같이 UVA를 조사한 인간피부섬유아세포와 25, 50, 100 및 200 μg/mL의 ITME를 처리한 인간 피부 섬유아세포를, 1% 노니데트 P-40(NP-40), 0.01% 도데실황산나트륨(sodium dodecyl sulfate, SDS) 및 단백질가수분해효소 억제제 혼합물(protease inhibitor cocktail, Roche, Mannheim, Germany)을 포함하는 0.1 M Tris-HCl (pH 7.2) 버퍼에서 초음파 분해하였다.

[0165] 세포 용해물의 단백질 농도는 피어스 단백질 분석 키트(Pierce Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA)를 이용해서 측정하였고, 표준으로 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)를 사용하였다.

[0166] 동등한 양의 단백질(10μg)을 각 레인 상에 로딩하고, 10% 폴리아크릴 아미드 겔(polyacrylamide gel) 상에서 전기영동을 통해 분리하였다.

[0167] 이를 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane)으로 이동시키고, ab137332 (1:1,000 dilution, anti-MMP-1, Abcam, Cambridge, UK) 항체와 함께 배양하였다.

[0168] 그런 후, 이를 TBST(Tween 20을 포함하는 Tris-Buffered Saline)으로 세척하고 2차 항체인 항-래빗 IgG(anti-

rabbit IgG, 1:1,000 희석, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)와 함께 배양하였다.

[0169] 면역 반응을 보이는 밴드는 강화된 화학발광(enhanced chemiluminescence, ECL, Amersham, Bucks, UK) 시스템을 이용하여 검출하였다.

[0170] 밴드의 강도는 이미지 J 프로그램(Image J program, NIH, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 측정하였고, 이때 β-액틴을 내부 대조군으로 정하여 밴드 강도를 평가하였다.

[0171] 그 결과 도 12와 같이, 25, 50, 100 또는 200 μg/mL의 ITME을 처리한 경우, 각각 34%, 34.9%, 35.3% 및 37.2%로 농도 의존적으로 MMP-1 단백질의 발현을 유의하게($p<0.01$) 감소시켰다.

[0173] **<실시예 5> 미백 효과**

[0174] **5.1 MTT 분석**

[0175] ITME가 처리된 melan-a 세포의 생장률을 MTT 분석을 통해 확인하였다. melan-a 세포를 96-웰 플레이트에 0.5×10^4 세포/웰만큼 분주하고 24시간 동안 37℃ 및 10% CO_2의 배양기에서 배양하였다.

[0176] 200 μL의 ITME를 RPMI-1640 배지에 25, 50, 100 또는 200 μg/mL의 농도로 희석하고 이를 각 웰마다 넣어준 후 배양기에서 48시간 동안 배양하였다.

[0177] 48시간이 지난 후 세포들을 0.5 μg/mL MTT를 포함하는 배지에 넣은 후 3시간 동안 배양하고, 200×g의 속도로 10분간 원심분리하여 세포를 정착시키고 배지를 모두 제거하였다.

[0178] 이에 200 μL의 DMSO를 각 웰에 첨가해주고 플레이트-쉐이커에서 15분 간 세포를 재현탁시킨 후, 플레이트 리더기(680, Bio-Rad, Tokyo, Japan)을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생장률은 측정값을 대조군 시약의 흡광도로 나누어 백분율로 산출하였다.

[0179] 그 결과 도 13과 같이, 25 내지 100 μg/mL 농도의 ITME를 처리했을 때는 세포의 생장률이 감소되지 않았지만 200 μg/mL 농도의 ITME를 처리했을 때는 세포의 생장률이 약간 감소되는 것을 확인하였다.

[0181] **5.2 melan-a 세포의 형태학적 관찰**

[0182] melan-a 세포에 25, 50, 100 또는 200 μg/mL의 ITME를 각각 처리해주고 48시간동안 37℃ 및 10% CO_2배양기에서 배양한 후, 배지를 교체해주고 도립 현미경(inverted microscope)으로 형태를 관찰하였다.

[0183] 도 14 중 A는 대조군이며, 도 14 중 B는 25μg/mL의 ITME을 처리한 실험군, 도 14 중 C는 50μg/mL의 ITME을 처리한 실험군, 도 14 중 D는 100μg/mL의 ITME을 처리한 실험군이며 도 14 중 E는 200μg/mL의 ITME을 처리한 실험군이다.

[0184] 그 결과 도 14와 같이, 대조군과 비교하였을때 ITME를 처리한 실험군의 멜라닌 축적 및 수상돌기(dendrites)가 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0186] **5.3 멜라닌 합성 분석**

[0187] Melan-a 세포를 48-웰 플레이트에 각 웰당 2×10^4 세포/웰만큼 분주하고 37℃ 및 10% CO_2배양기에서 24시간동안 배양하였다. 이에 100μg/mL의 알부틴(PC)과 다양한 농도(25, 50, 100 또는 200 μg/mL)로 RPMI-1640 배지에 희석한 ITME를 각각 500 μL씩 첨가해준 후 37℃ 및 10% CO_2배양기에서 72시간 배양하고 세척하였다. 그런 후, 한번 더 이 과정을 반복하였다.

[0188] 다음으로 멜라닌을 1N NaOH에 용해시키고, 플레이트 리더기를 이용하여 490 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였고, 멜라닌 함량의 변화는 측정값을 대조군 시약의 흡광도로 나누어 백분율로 산출하였다.

[0189] 그 결과 도 15와 같이, 어떤 처리도 하지 않은 대조군(V)과 비교하였을 때, 25, 50, 100 또는 200 μg/mL 농도로 ITME가 처리된 실험군의 멜라닌 농도는 각각 15.6%, 18.2%, 19.1% 또는 20.5% 유의하게($p<0.05$) 감소된 것

을 확인할 수 있었다.

[0191] **5.4 세포내 티로시나아제(tyrosinase) 활성 분석**

[0192] Melan-a 세포를 60 mm 세포 배양 접시에 4× 10^5 세포/웰만큼 분주하고, 24시간동안 배양한 후, 100 μg/mL의 알부틴(PC)과 다양한 농도(25, 50, 100 또는 200 μg/mL)로 RPMI-1640 배지에 희석한 ITME를 각각 첨가해주고 48시간 더 배양하였다.

[0193] 각 세포들을 인산완충식염수(phosphate-buffered saline, PBS)로 세척한 후, 200 μL의 1% 트리톤 X-100으로 세포를 접시 바닥에서 떼어내어 에펜도르프 튜브(Eppendorf tube)로 옮기고 60분동안 얼음에 두었다. 10분 간격으로 6번, 총 60분 동안 교반하였다.

[0194] 이를 4℃에서 14,000×g의 속도로 20분간 원심분리하고, 100 μL의 0.2% L-도파(L-DOPA)를 첨가해 1시간 동안 37℃ 및 10% CO_2배양기에서 배양한 후, 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0195] 티로시나아제 활성은 측정값을 대조군 시약의 흡광도로 나누어 백분율로 산출하였고, 이 결과를 도 16에 나타내었다.

[0196] 배지를 처리한 대조군과 비교하였을 때, 100 μg/mL 농도의 ITME이 처리된 실험군의 티로시나아제 활성이 8.4%($p<0.05$) 유의하게 감소된 것을 확인하였다.

[0198] **5.5 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)**

[0199] 100 μg/mL의 알부틴(PC)과 다양한 농도(25, 50, 100 또는 200 μg/mL)로 RPMI-1640 배지에 희석한 ITME를 각각 처리한 melan-a 세포의 티로시나아제(tyrosinase)와 β-액틴 mRNA는 상기 실시예 4 중 4.6과 동일한 방법으로 RT-PCR을 이용하여 결정하였다.

[0200] 이때 사용한 티로시나아제 프라이머 시퀀스는 하기 표 2와 같으며, β-액틴의 프라이머 시퀀스는 상기 표 1에 기재된 것과 같다.

표 2

[0201]

유전자 명	방향	서열	서열번호
티로시나아제	정방향	CAT TTT TGA TTT GAG TGT CT	5
	역방향	TGT GGT AGT CGT CTT TGT CC	6

[0202] 티로시나아제 또는 β-액틴의 PCR 생성물의 예상 사이즈는 각각 1192 또는 528 염기쌍(base fairs)이었다.

[0203] PCR은 다음과 같이 수행하였다. 티로시나아제는 94℃에서 60초간 변성(denaturation), 56℃에서 60초간 풀림(annealing), 72℃에서 60초간 연장(extension)으로 28 회(cycle) 수행하였다.

[0204] β-액틴은 94℃에서 30초간 변성, 51℃에서 30초간 풀림, 72℃에서 30초간 연장으로 30 회 수행하였다.

[0205] 이를 통해 생성된 PCR 생성물은 1.2% 아가로즈 겔을 이용하여 분석하였다. β-액틴(β-actin)을 대조군으로 사용하여 티로시나아제의 상대적인 발현을 평가하였다.

[0206] 그 결과 도 17과 같이, 어떤 처리도 하지 않은 대조군(V)과 비교하였을 때 25, 50, 100 또는 200 μg/mL 농도로 ITME이 처리된 실험군의 티로시나아제 mRNA 발현은 각각 8.1%, 13.1%, 17.2%($p<0.05$) 또는 26.3%($p<0.01$)로 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다.

[0208] **5.6 웨스턴 블롯**

[0209] Melan-a 세포에 100 μg/mL의 알부틴(PC)과 다양한 농도(25, 50, 100 또는 200 μg/mL)로 RPMI-1640 배지에 희석한 ITME를 처리하고, 1% NP-40, 0.01% SDS 및 단백질가수분해효소 억제제 혼합물을 포함하는 0.1 M Tris-HCl (pH 7.2) 버퍼에서 초음파 분해하였다.

[0210] 세포 용해물의 단백질 농도는 바이오-라드 단백질 분석 키트(Bio-Rad protein assay kit, Bio-Rad Laboratories USA, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용해서 측정하였고, 표준으로 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)를 사용하였다.

[0211] 동등한 양의 단백질(10㎍)을 각 레인 상에 로딩하고, 10% 폴리아크릴 아미드 겔(polyacrylamide gel) 상에서 전기영동을 통해 분리하였다.

[0212] 이를 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane)으로 이동시키고, 항-티로시나아제(anti-tyrosinase, SC 15341, 1:1,000 희석)항체와 함께 배양하였다.

[0213] 그런 후, 이를 TBST(Tween 20을 포함하는 Tris-Buffered Saline)으로 세척하고 2차 항체인 항-래빗 IgG(anti-rabbit IgG, 1:1,000 희석, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)와 함께 배양하였다.

[0214] 면역 반응을 보이는 밴드는 강화된 화학발광(enhanced chemiluminescence, ECL, Amersham, Bucks, UK) 시스템을 이용하여 검출하였다.

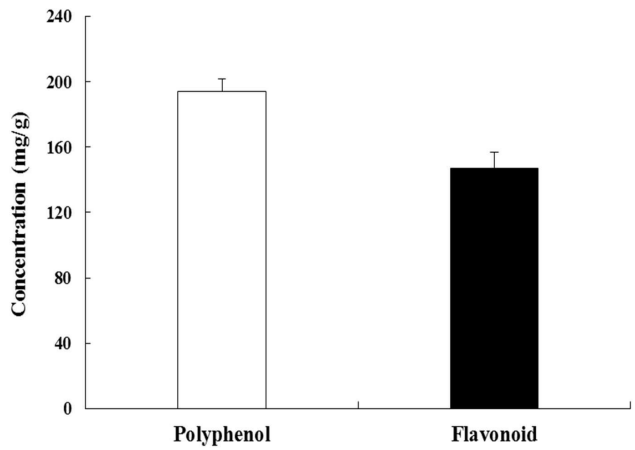
[0215] 밴드의 강도는 이미지 J 프로그램(Image J program, NIH, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 측정하였고, 이때 β-액틴을 내부 대조군으로 정하여 밴드 강도를 평가하였다.

[0216] 그 결과 도 18과 같이, 어떤 처리도 하지 않은 대조군(V)과 비교하였을 때 25, 50, 100 또는 200 ㎍/mL 농도로 ITME이 처리된 실험군의 티로시나아제 단백질 발현은 각각 1.9%, 16.5%($p<0.05$), 22.0%($p<0.01$) 또는 31.2%로 ($p<0.01$) 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다.

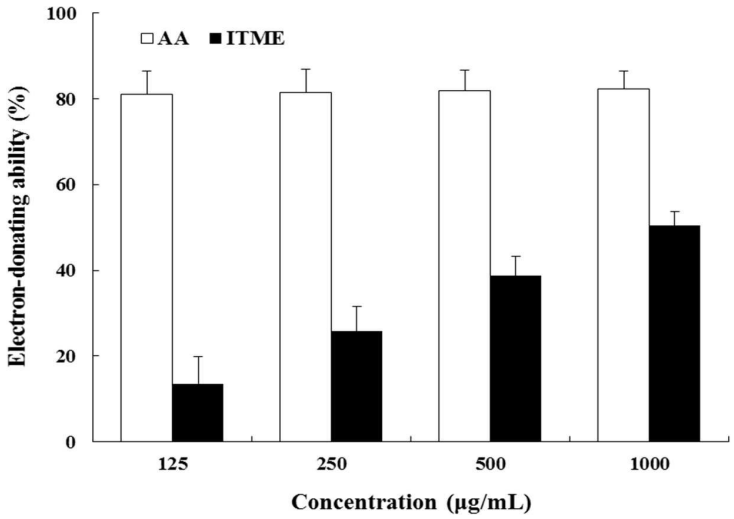
[0218] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

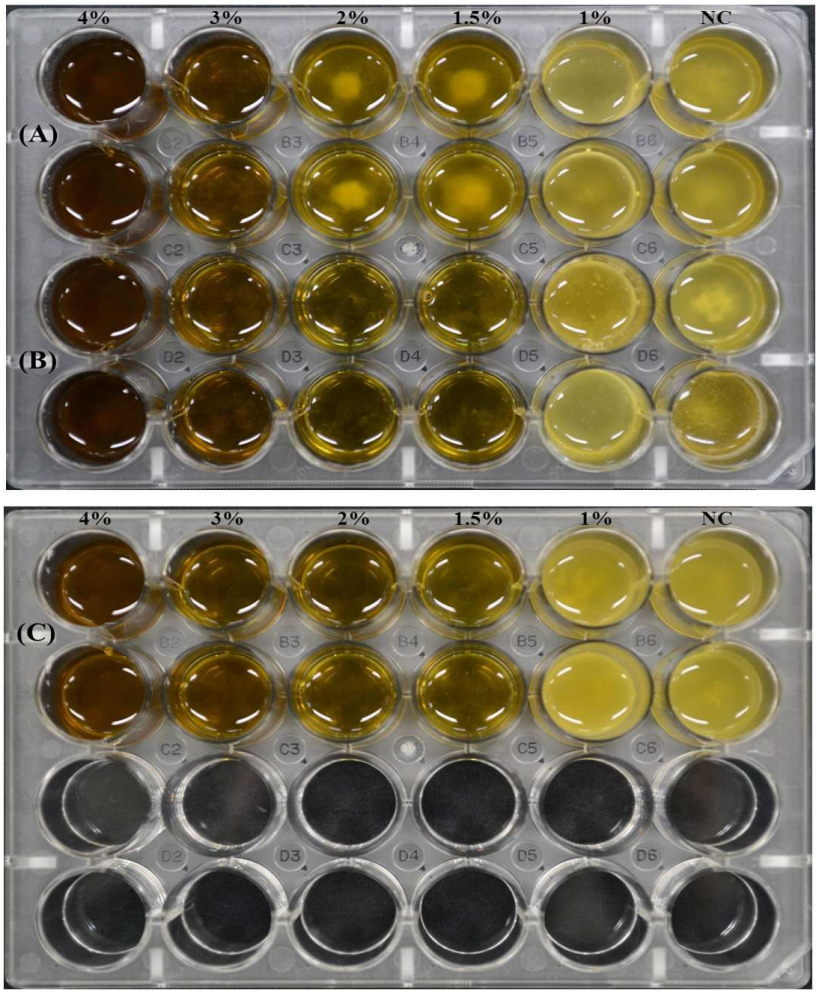
도면1



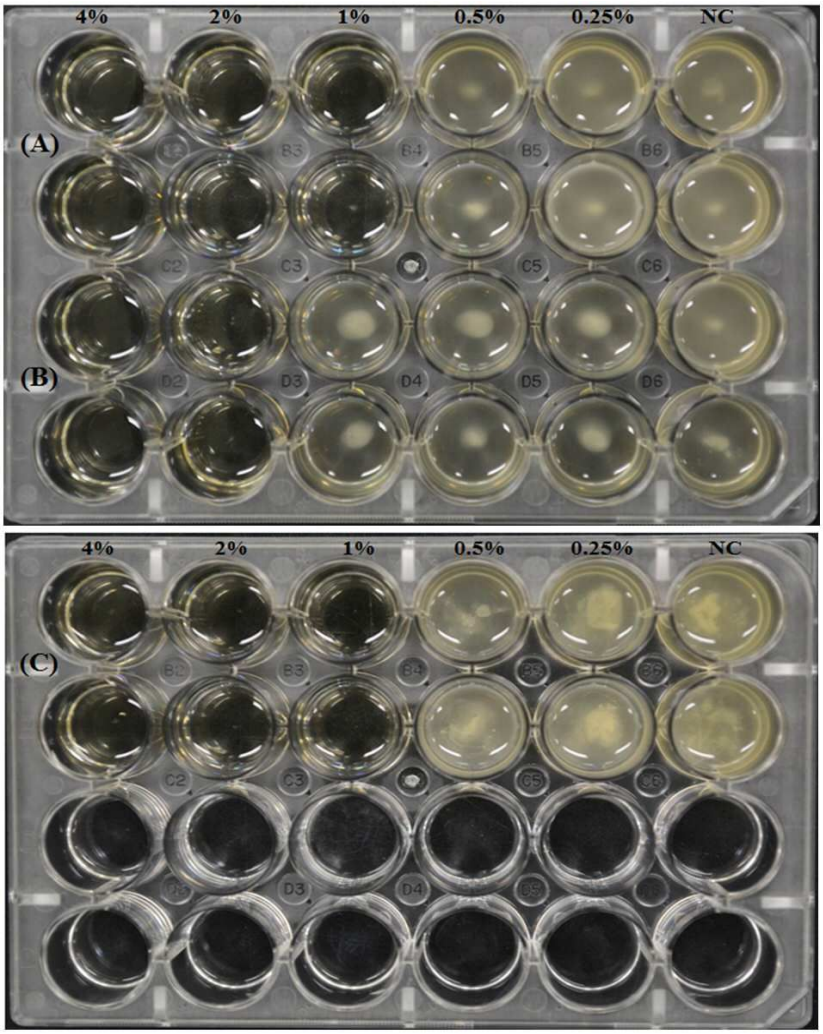
도면2


100
80
60
40
20
0
□AA ■ITME
Electron-donating ability (%)
125
250
500
1000
Concentration (μg/mL)

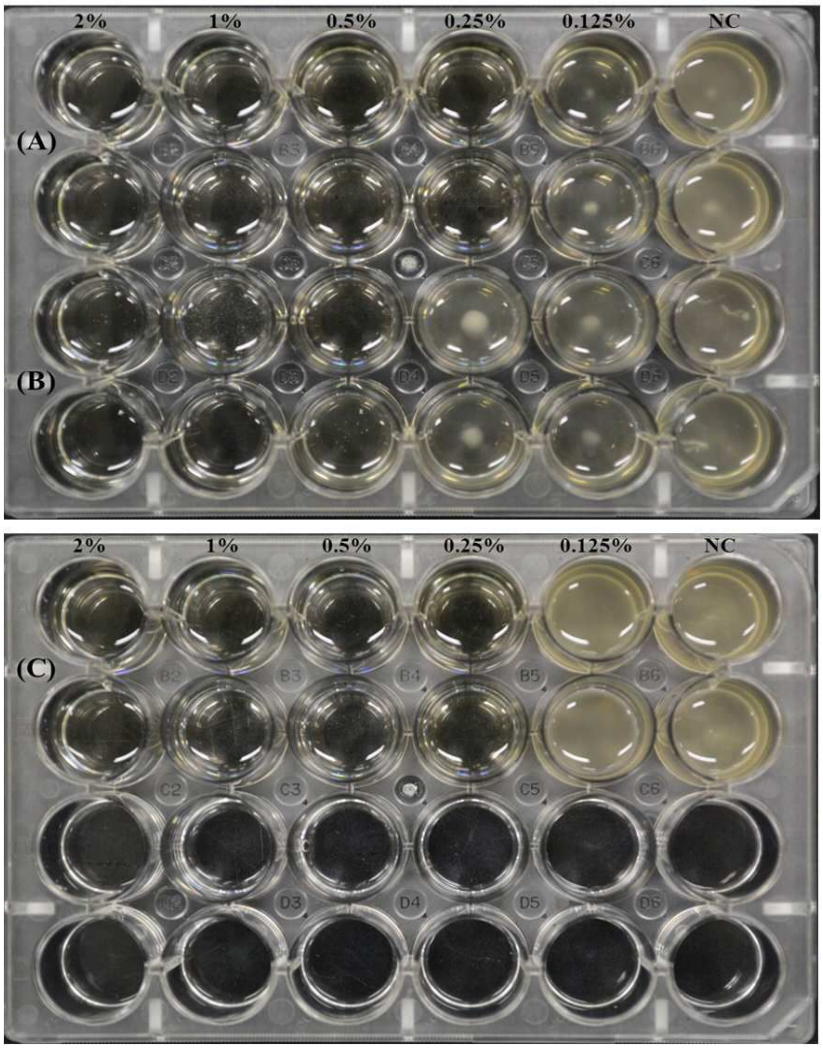
도면3


4%
3%
2%
1.5%
1%
NC
(A)
(B)
(C)

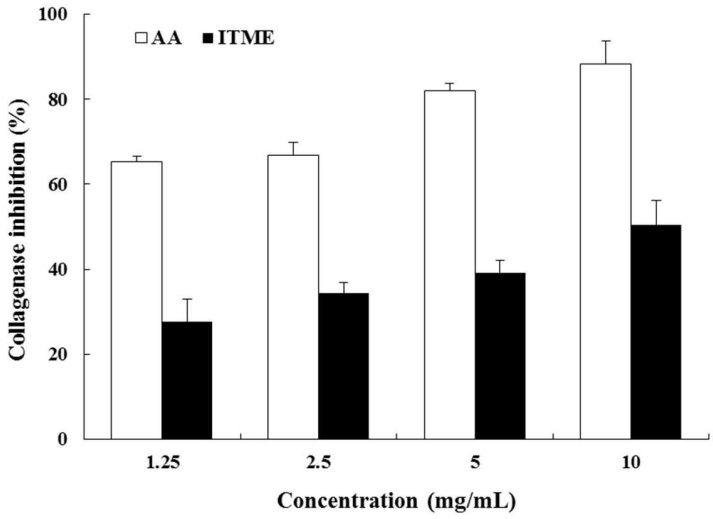
도면4



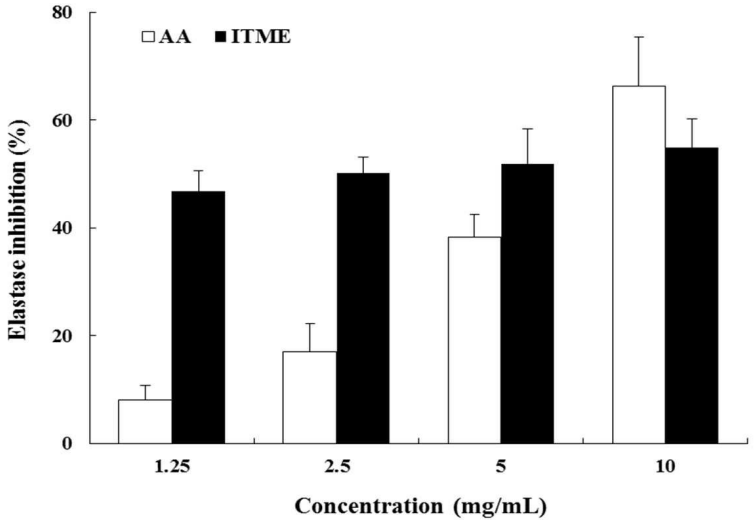
도면5


2%
1%
0.5%
0.25%
0.125%
NC
(A)
(B)
(C)

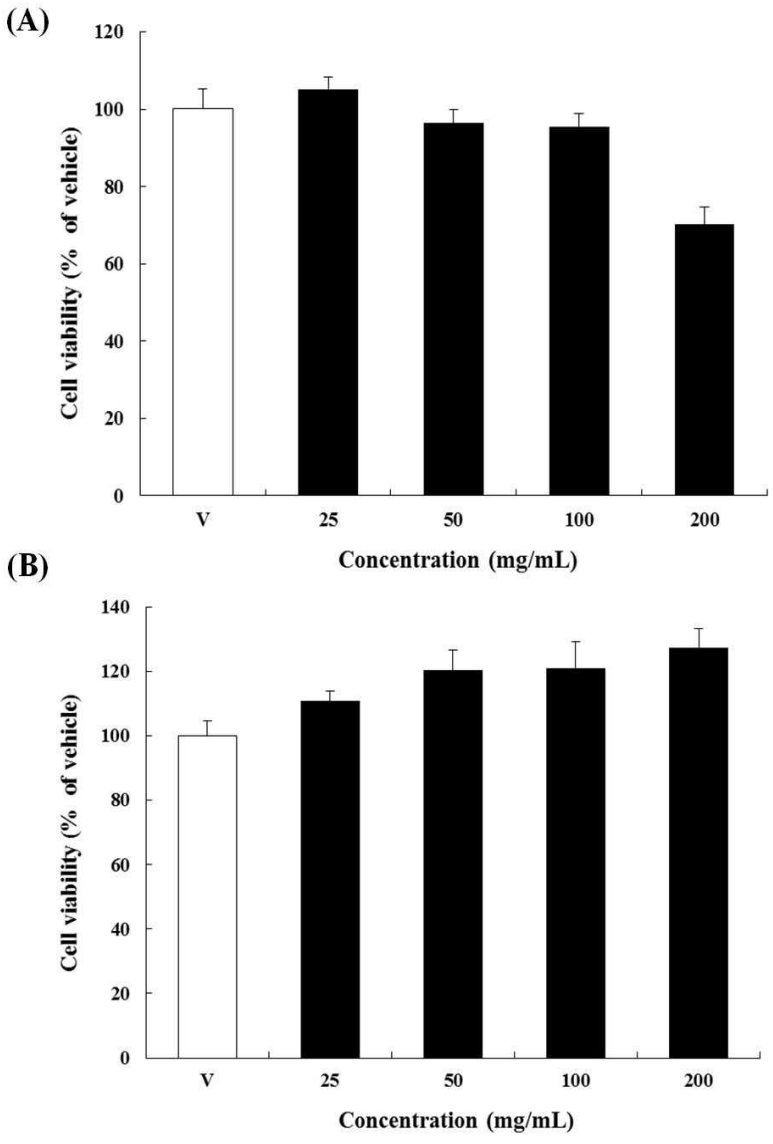
도면6


AA
ITME
Collagenase inhibition (%)
100
80
60
40
20
0
1.25
2.5
5
10
Concentration (mg/mL)

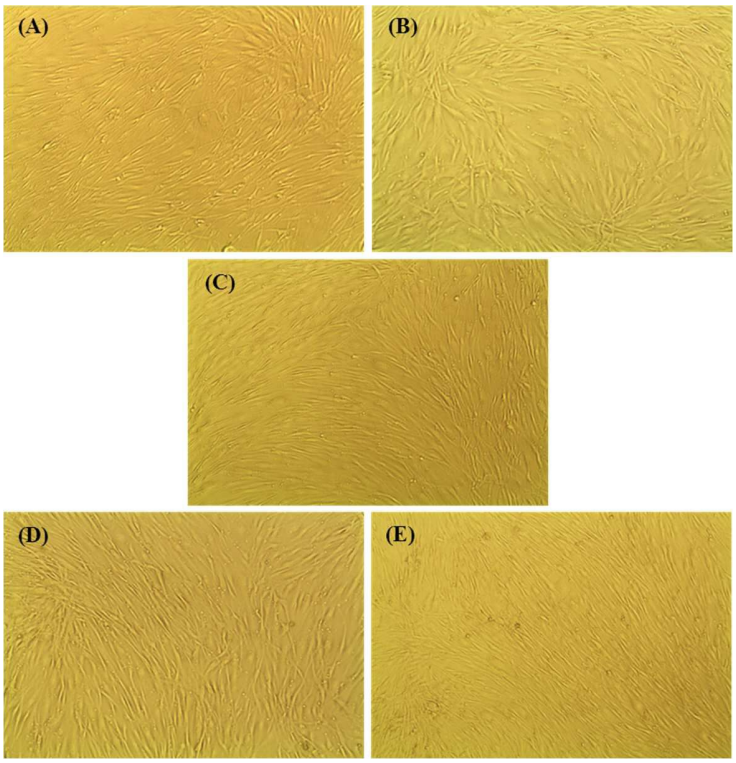
도면7


□AA ■ITME
Elastase inhibition (%)
0
20
40
60
80
1.25
2.5
5
10
Concentration (mg/mL)

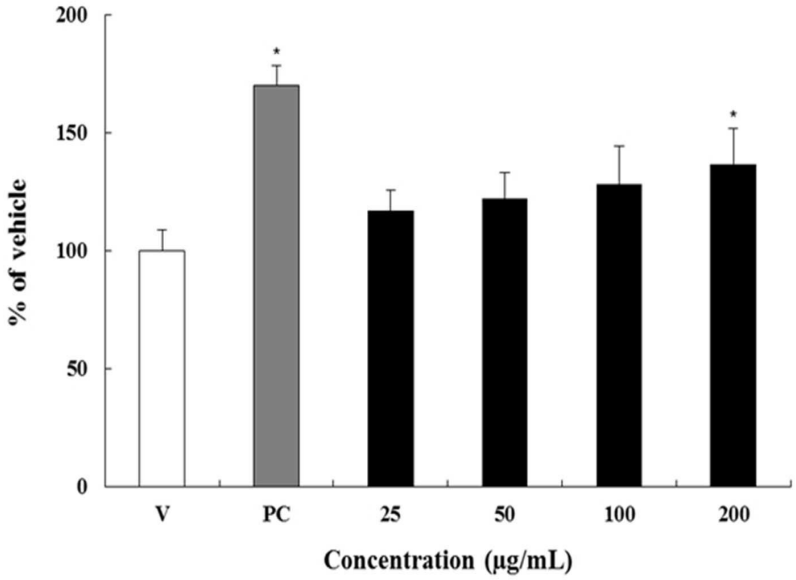
도면8


(A)
Cell viability (% of vehicle)
0
20
40
60
80
100
120
V
25
50
100
200
Concentration (mg/mL)
(B)
Cell viability (% of vehicle)
0
20
40
60
80
100
120
140
V
25
50
100
200
Concentration (mg/mL)

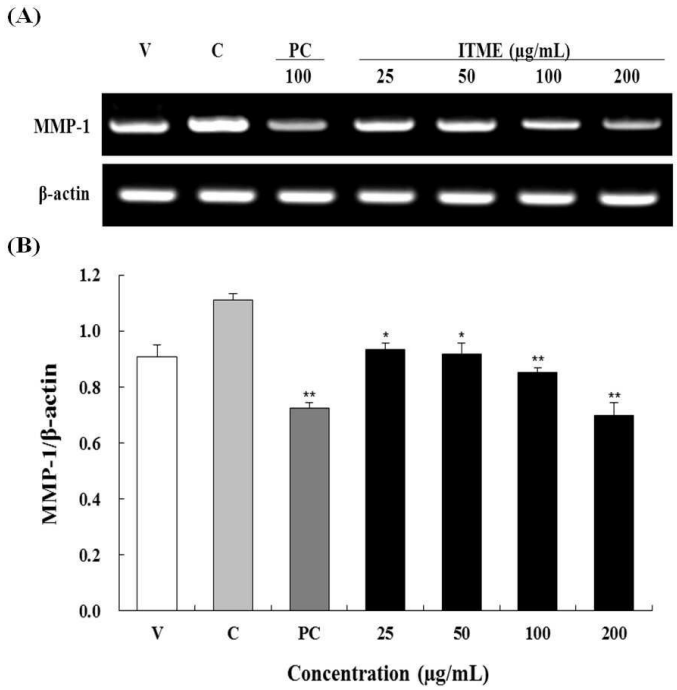
도면9


(A)
(B)
(C)
(D)
(E)

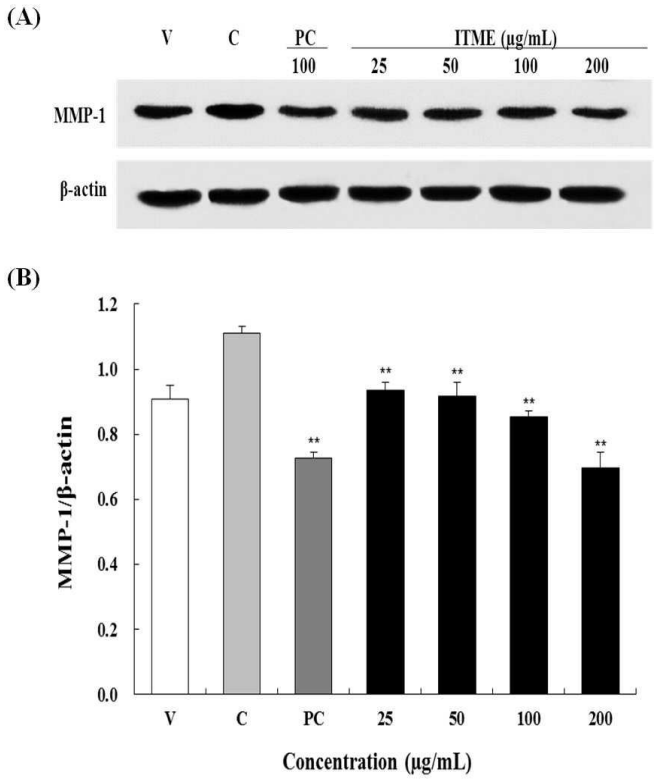
도면10


200
150
100
50
0
% of vehicle
*
*
V
PC
25
50
100
200
Concentration (μg/mL)

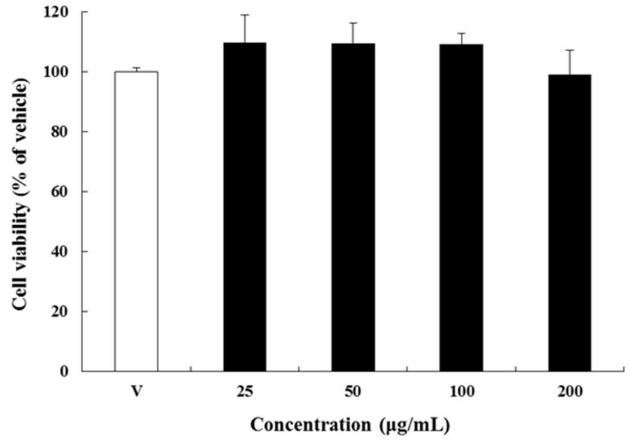
도면11


(A)
V
C
PC
ITME (μg/mL)
100
25
50
100
200
MMP-1
β-actin
(B)
MMP-1/β-actin
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
V
C
PC
25
50
100
200
Concentration (μg/mL)

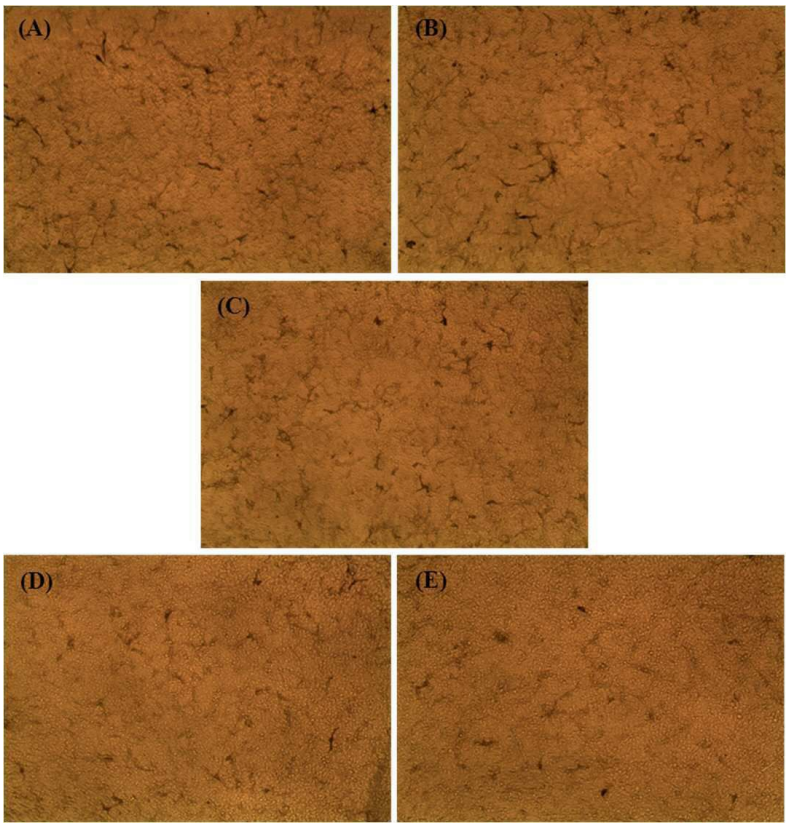
도면12


(A)
V
C
PC
ITME (μg/mL)
100
25
50
100
200
MMP-1
β-actin
(B)
MMP-1/β-actin
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
V
C
PC
25
50
100
200
Concentration (μg/mL)

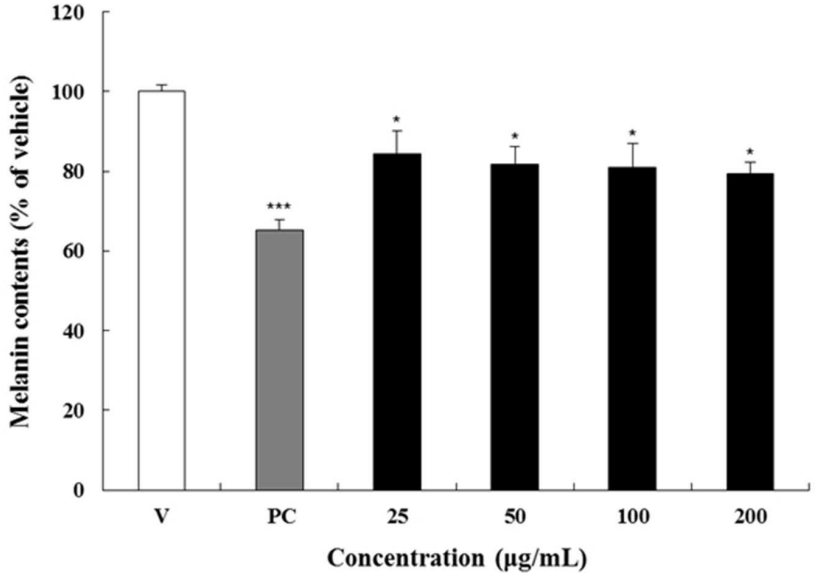
도면13


120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (% of vehicle)
V
25
50
100
200
Concentration (μg/mL)

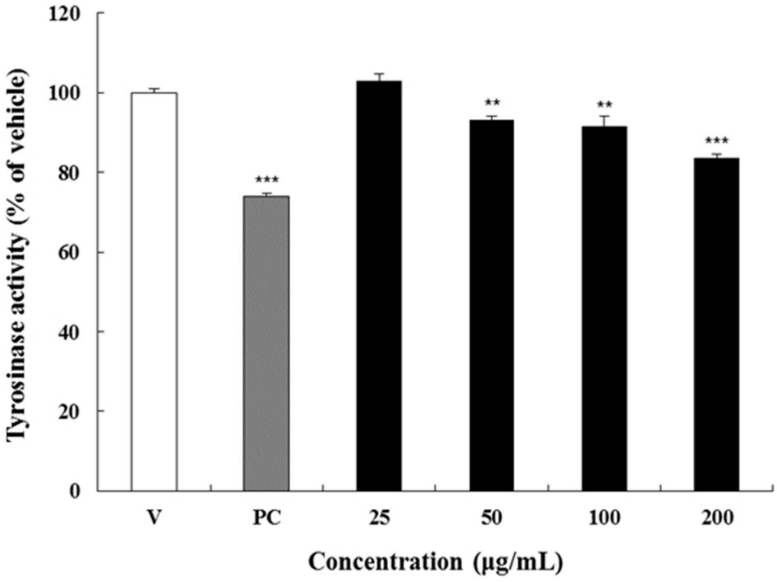
도면14


(A)
(B)
(C)
(D)
(E)

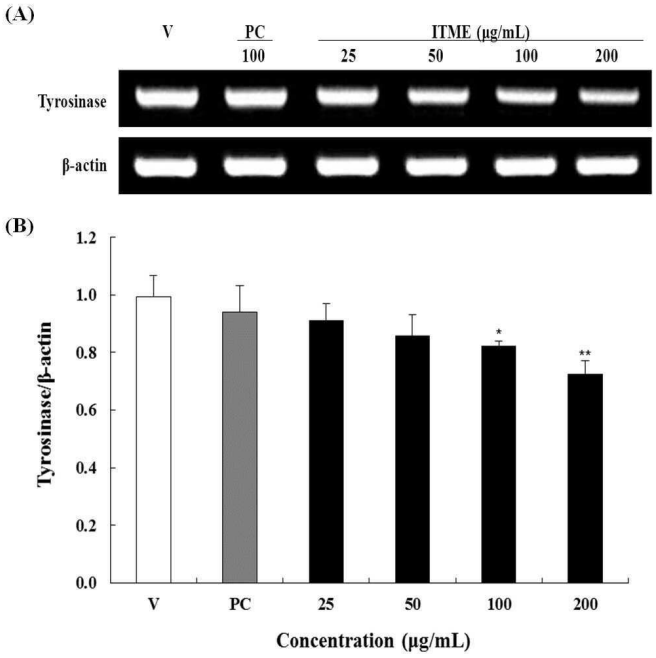
도면15


Melanin contents (% of vehicle)
120
100
80
60
40
20
0
***
*
*
*
*
V
PC
25
50
100
200
Concentration (μg/mL)

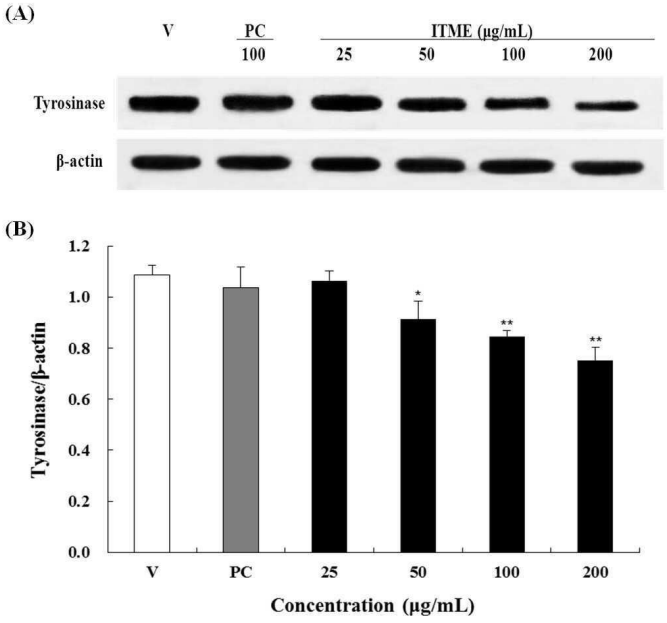
도면16


Tyrosinase activity (% of vehicle)
120
100
80
60
40
20
0
***
**
**
***
V
PC
25
50
100
200
Concentration (μg/mL)

도면17



도면18



서 열 목 록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY

<120> Antiseptic composition or cosmetic composition comprising Impatiens textori extract

<130> ADP-2015-0393

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-1 forward primer

<400> 1

cgactctaga aacacaagag caaga 25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-1 reverse primer

<400> 2

aaggttagct tactgtcaca cgctt 25

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-actin forward primer

<400> 3

accgtgaaaa gatgacccag 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-actin reverse primer

<400> 4

tacggatgtc aacgtcacac 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tyrosinase forward primer

<400> 5

catttttgat ttgagtgtct 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tyrosinase reverse primer

<400> 6

tgtggtagtc gtctttgtcc 20