(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0002567
(43) 공개일자 2020년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2017.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0137401
(22) 출원일자 2018년11월09일
심사청구일자 2018년11월09일
(30) 우선권주장
1020180075266 2018년06월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
주식회사 인투바이오
경기도 화성시 동탄순환대로 823, 605호(영천동, 에이팩시티)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박서연
경기도 화성시 동탄순환대로 823, 에이팩시티 605호(영천동)
하서은
경기도 화성시 동탄순환대로 823, 에이팩시티 605호(영천동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
권혁철

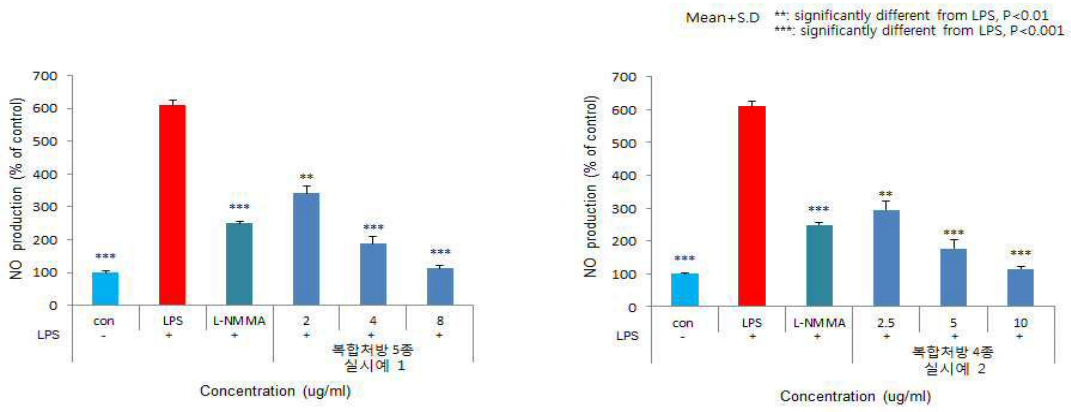
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물을 함유하는 화장료 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물을 함유하는 화장료 조성물에 관한 것으로서, 유효성분으로서의 상기 본 발명에 따른 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물은 미세먼지로 인한 피부염증을 완화하고 주름을 개선하는 효과가 우수하다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61Q 19/08 (2013.01)
A61K 2800/59 (2013.01)
(72) 발명자
최재환
경기도 화성시 동탄순환대로 823, 에이팩시티 605호(영천동)
이승지
경기도 화성시 동탄순환대로 823, 에이팩시티 605호(영천동)
김용재
경기도 화성시 동탄순환대로 823, 에이팩시티 605호(영천동)
장혜성
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 경희대학교국제캠퍼스
이지은
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 경희대학교국제캠퍼스
황재성
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 경희대학교국제캠퍼스

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 D171754
부처명 경기도
연구관리전문기관 경기도 경제과학진흥원
연구사업명 경기도 기술개발사업 (글로벌 유망과제)
연구과제명 미세먼지 수용체 조절을 통한 주름개선 기능성 화장품 개발
기 여 율 1/1
주관기관 코스맥스 주식회사
연구기간 2017.10.01 ~ 2019.09.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물을 함유하는 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 또는 함수알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 부틸렌글리콜로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 추출용매로 추출하여 제조되는 것임을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물은 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무의 추출물이 각각 1~10:1~10:1~10:1~10의 중량비로 혼합되어 이루어지는 것임을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 떡버들 추출물은 떡버들의 잎과 줄기의 혼합추출물인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물은 상기 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 0.001 ~ 20 중량% 포함되는 것임을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 미세먼지로 인한 피부염증완화용 및 주름개선용임을 특징으로 하는 화장료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물을 함유하는 화장료 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물을 함유하여 미세먼지로 인한 염증을 완화하고 및 주름을 개선하는 효과가 우수한 화장료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식생활이나 대기, 수질환경 등이 변화함에 따라 현대인들에게 피부염 즉 피부소양증의 발생이 증가하고 있다. 염증반응은 외부 자극에 대한 신체조직의 방어기작으로서 외부로부터 발생한 물리적, 화학적 자극에 의한 신체 손상을 회복하려는 기전이다. 증상이 심한 피부소양증의 일차치료제로는 항염 효과가 있는 국소 코르티코스테로이드(topical corticosteroids) 제제를 사용할 수 있으나 부작용 등으로 장기간 사용이 불가하다.

[0003] 최근 황사와 미세먼지는 건강에 가장 큰 유해요인으로 여겨지고 있다. 미세먼지는 호흡기뿐만 아니라 피부를 통해서도 몸 속에 침입한다. 피부로 침투한 미세먼지는 각종 피부질환을 일으키는 원인이 된다. 사람의 피부는 크게 표피층과 진피층으로 이루어진다. 표피층은 피부장벽을 형성, 먼지 등의 체내 침투를 막는다. 하지만 중금속, 환경호르몬 등을 함유한 미세먼지는 이 같은 피부장벽을 무너뜨리고 체내에 침투한다. 또한, 지름이 0.01㎜ 안팎인 미세먼지는 지름이 2~5배인 모공도 손쉽게 통과한다.

[0004] 이렇게 침투한 미세먼지는 갖가지 피부 질환의 주요 원인이 된다. 미세먼지에 함유된 유해물질은 세포의 염증성

사이토카인 분비를 촉진하고, 백혈구를 증가시켜 알레르기 반응을 일으키므로 아토피 피부염과 여드름을 악화시키는 것으로 알려져 있다.

[0005] 미세먼지로 인해 피부의 신진대사 기능이 저하됨에 따라, 피부 내 노폐물이 제대로 제거되지 않아 트러블이 생기고, 피부 표면의 지방질 균형이 깨지면서 건조증, 가려움증이 생길 수 있다. 또한 미세먼지는 몸속에서 체내 독성물질인 활성산소를 많이 만들어내는데, 이 활성산소가 피부 내 콜라겐을 파괴하는 등 피부노화를 촉진한다. 이에 따라 최근 미세먼지 차단, 미세먼지 클렌징 등의 보호 효과가 있는 '안티폴루션' 화장품의 사용이 급증하고 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 천연소재들로부터 미세먼지로 인한 염증을 완화하고 피부노화를 방지하는 화장료를 개발하고자 노력하였으며, 이에 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) (0001) 대한민국 공개특허 10-2008-0107565 (2008.12.11.)

(특허문헌 0002) (0002) 대한민국 등록특허 10-1801223 (2017.11.20.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물을 함유하여 미세먼지로 인한 피부염증을 완화하고, 주름을 개선하는 효과가 우수한 화장료 조성물을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따르면, 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물을 함유하는 화장료 조성물이 제공된다. 상기 추출물은, 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 또는 함수알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 부틸렌글리콜로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 추출용매로 추출하여 제조되는 것이다.

[0010] 상기 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물은 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무의 추출물이 각각 1~10:1~10:1~10:1~10의 중량비로 혼합되어 이루어지는 것이다.

[0011] 상기 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물은 상기 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 0.001 ~ 20 중량% 포함되는 것이 바람직하다.

[0012] 상기 화장료 조성물은 미세먼지로 인한 피부염증완화 및 주름개선용인 것을 특징으로 한다.

[0013] 상기 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지 크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더 또는 아이섀도의 제형으로 이루어질 수 있다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물은 미세먼지로 인한 피부 염증을 완화하고, 주름을 개선하는 효과가 우수하므로 항염 및 주름개선용 화장품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 미세먼지로 인한 CYP1A1 유전자 발현 활성여부를 나타내는 그래프이다.

도 2는 본 발명 제조예 추출물의 CYP1A1 유전자 발현 감소활성을 나타내는 그래프이다.

도 3 및 4는 본 발명 실시예의 NO생성 억제 활성을 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명 실시예의 MMP-1 발현 억제활성을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명은 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0018] 본 발명 화장료 조성물의 유효성분 중의 하나인 섬백리향(Thymus quinquecostatus var. japonica)은 통화식물목 꿀풀과의 낙엽 소관목이다. 울릉백리향이라고도 한다. 바닷가의 바위가 많은 곳에서 자란다. 높이 20~30cm로 백리향보다 잎과 꽃이 크다. 가지를 많이 내며 땅 위로 벋는다. 꽃은 6~7월에 연분홍색으로 피는데, 길이 약 1cm로서 이삭꽃차례로 촘촘하게 달리고 작은꽃자루에는 털이 난다. 열매는 분열과로서 9~10월에 검붉게 익는다. 정원수로 심으며 줄기와 잎은 약재로 쓴다. 꽃과 전초에는 Thymol, P-Cymene Pinene, Linalool 등의 성분이 함유되어 백리향 특유의 향기를 내뿜는다. 한국 특산식물로서 경상북도 울릉군 나리동에 분포한다.

[0019] 떡버들(Salix hallaisanensis)은 버드나무목 버드나무과의 낙엽 소교목이다. 한라산에서 처음 발견되었으며 높이 6m 정도이고 어린 가지에 비단같은 털이 있다. 잎은 어긋나고 달걀 모양 또는 타원형이며 길이 3~14cm로 가장자리는 밋밋하거나 뚜렷하지 않은 톱니가 있다. 잎 앞면에는 주름이 많고 뒷면에는 흰색이 돈다. 꽃은 단성화이고 노란색이며 4월에 지난해 가지에서 핀다. 꽃대에는 털이 있고 수술은 2개이고 수술대 기부에 털이 있다. 열매는 5월에 익는다. 잎이 두껍고 크기 때문에 떡버들이라고 한다. 적갈색이 도는 커다란 겨울눈과 커다란 꽃이삭은 관상적 가치가 풍부하지만 아직 활용되지 못하고 있다. 잎이 거꾸로 선 바소꼴 또는 타원형이고 길이가 3~17cm, 너비는 7~60mm이며 뒷면에 털이 없는 것을 긴잎떡버들(var. longifolia)이라고 한다.

[0020] 우리나라에 자생하는 Salix속 식물로는 떡버들 외에 왕버들(Salix chaenomeloides Kimura var. chaenomeloides), 쪽버들(Salix maximowiczii Kom.), 버드나무(Salix koreensis Andersson), 능수버들(Salix pseudolasiogyne H.Lev.), 제주산버들(Salix blinii H.Lev.) 등 30여종이 분포한다.

[0021] Salix속 식물에 대한 연구는 주로 유럽 및 일본에서 단일 페놀성 배당체로서 성분연구가 수행되어 왔다. 떡버들은 우리나라가 원산지인 식물로서, 건조한 곳에 자라는 식물이며, 산중턱 이상의 기온이 낮은 곳에 자생하므로 다른 Salix 속 식물과는 다른 성분이 함유되어 있을 것으로 예상되어 왔다.

[0022] 함박꽃나무(Magnolia sieboldii)는 목련과의 낙엽소교목이다. 함백이꽃, 함박이, 옥란, 천녀목란, 천녀화라고도 한다. 산골짜기의 숲속에서 자란다. 높이 7m로 원줄기와 함께 옆에서 많은 줄기가 올라와 군생한다. 가지는 잿빛과 노란빛이 도는 갈색이며 어린 가지와 겨울눈에 눈털이 있다.

[0023] 잎은 어긋나고 달걀을 거꾸로 세운 듯한 모양 또는 달걀을 거꾸로 세운 듯한 모양의 긴 타원형이다. 잎 끝이 급히 뾰족해지며 가장자리가 밋밋하고 뒷면은 회색빛이 도는 녹색으로 맥 위에 털이 있다. 꽃은 5~6월에 흰색의 양성(兩性)으로 피고 잎이 난 다음 밑을 향하여 달리며 향기가 있다. 꽃은 지름 7~10cm로서 꽃잎은 6~9개이고 수술은 붉은빛이 돌며 꽃밥은 밝은 홍색이다. 열매는 타원형 골돌과로 길이 3~4cm로 9월에 익으면 실에 매달린 종자가 나온다. 관상용으로 심으며 민간에서는 수피를 건위제, 구충제 등으로 약용한다. 한국, 일본, 중국 북동부에 분포한다.

[0024] 제주광나무(Ligustrum lucidum)는 쌍떡잎식물 용담목 물푸레나무과의 상록활엽 소교목으로서, 당광나무로도 불린다. 산지에서 드물게 자라며 가지가 많고 털이 없다. 잎은 마주나고 달걀 모양으로 끝은 뾰족하며 톱니가 없고 가죽같은 질감을 가진다. 꽃은 양성으로 6월에 피고 백색이며 가지 끝에서 겹총상꽃차례를 이룬다. 열매는 핵과(核果)로 타원형이며 9~10월에 검게 익는다. 정원수로 심으며 열매는 약재로 쓴다. 한국(제주), 중국에 분포한다.

[0025] 본 발명에서 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무는 정제수로 깨끗이 세척하여 사용하며, 추출 방법에 따라 건조시켜 세절하거나 가루로 만들어 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 섬백리향은 전초가 사용되고, 떡버들은 잎 및/또는 줄기가 사용되며, 함박꽃나무는 줄기, 제주광나무는 잎이 사용된다.

[0026] 본 발명의 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 추출물의 제조에 사용되는 추출용매로는 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 또는 함수알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 및 부틸렌글리콜로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명의 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 추출물은 통상의 기술자에게 알려진 공지된 추출법에

의해 제조될 수 있다. 또한 본 발명의 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 추출물은 추출 용매로 추출한 추출액을 감압 농축한 농축액, 농축액을 동결 건조한 분말 또는 농축액을 분무 건조하여 건조한 분말일 수 있다.

[0028] 본 발명 화장료 조성물의 유효성분으로서의 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물은 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무의 추출물이 각각 1~10:1~10:1~10:1~10의 중량비로, 더욱 바람직하게는 1:1~2:1:1의 중량비로 혼합되어 이루어지는 것이다. 바람직하게는 상기 떡버들 추출물은 떡버들의 잎과 줄기의 혼

[0029] 합추출물이다. 상기 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물은 건조된 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무를 혼합한 후 추출하여 제조될 수도 있다.

[0030] 본 발명의 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물은 그 혼합에 따른 상승작용에 의하여 더욱 우수한 미세먼지에 대한 염증완화 효과 및 주름개선 효과를 나타내었다.

[0031] 상기 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물은 상기 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 0.001 ~ 20 중량% 포함되는 것이 바람직하다.

[0032] 상기 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지 크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더 또는 아이섀도의 제형으로 이루어질 수 있다.

[0033] 또한, 각 제형의 화장료 조성물에 있어서, 상기의 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물 외에 다른 성분들을 기타 화장료의 제형 또는 사용목적 등에 따라 임의로 선정하여 배합할 수 있다. 예를 들어, 착색제(색소), 착향제(향료), 현탁화제, 유화제, 용해보조제, 안정제, 등장제, pH조절제, 점도조절제, 용제 등을 포함할 수 있다.

[0034] [실시예]

[0035] 이하, 본 발명을 실시예 및 시험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다.

[0036] **제조예 1: 섬백리향 추출물의 제조**

[0037] 섬백리향 전초를 세척 건조한 후 중량대비 10배의 70% 에탄올을 이용하여 5일간 상온에서 추출 및 여과를 총 3회 반복 실시 후, 이를 모두 모아 감압 농축하여 추출 농축액 약 7g을 얻었다.

[0038] **제조예 2: 떡버들 추출물의 제조**

[0039] 제조예 2-1: 떡버들 줄기 추출물의 제조

[0040] 떡버들의 줄기를 세척 건조한 후 중량대비 10배의 70% 에탄올을 이용하여 5일간 상온에서 추출 및 여과를 총 3회 반복 실시 후, 이를 모두 모아 감압 농축하여 추출 농축액 약 9g을 얻었다.

[0041] 제조예 2-2: 떡버들 잎 추출물의 제조

[0042] 떡버들의 잎을 세척 건조한 후 중량대비 10배의 70% 에탄올을 이용하여 5일간 상온에서 추출 및 여과를 총 3회 반복 실시 후, 이를 모두 모아 감압 농축하여 추출 농축액 약 8g을 얻었다.

[0043] **제조예 3: 함박꽃나무 추출물의 제조**

[0044] 함박꽃나무 줄기를 세척 건조한 후 중량대비 10배의 70% 에탄올을 이용하여 5일간 상온에서 추출 및 여과를 총 3회 반복 실시 후, 이를 모두 모아 감압 농축하여 추출 농축액 약 11g을 얻었다.

[0045] **제조예 4: 제주광나무 추출물의 제조**

[0046] 제주광나무의 잎을 세척 건조한 후 중량대비 10배의 70% 에탄올을 이용하여 5일간 상온에서 추출 및 여과를 총 3회 반복 실시 후, 이를 모두 모아 감압 농축하여 추출 농축액 약 11g을 얻었다.

[0047] **실시예 1: 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물의 제조**

[0048] 상기 제조예에서 제조된 추출물들을 하기 표 1의 비율로 혼합하여 혼합추출물 8g을 제조하였다.

[0049] **실시예 2: 섬백리향, 떡버들, 함박꽃나무 및 제주광나무 혼합추출물의 제조**

[0050] 상기 제조예에서 제조된 추출물들을 하기 표 1의 비율로 혼합하여 혼합추출물 10g을 제조하였다.

표 1

[0051]

추출물(중량비)	실시예 1	실시예 2
섬백리향추출물(제조예 1)	1	1
떡버들추출물(제조예 2-1)	-	1
떡버들추출물(제조예 2-2)	1	1
함박꽃나무추출물(제조예 3)	1	1
제주광나무추출물(제조예 4)	1	1

[0052] **시험예 1: 미세먼지의 염증유발 확인**

[0053] 미세먼지가 피부에 염증을 유발하는지 확인하기 위하여 아래와 같이 시험하였다. 미세먼지는 중금속과 PAHs(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)와 같은 유기복합물질을 운반하는 역할을 한다. PAH는 지방친화도가 매우 높아 피부에 손쉽게 침투한다. PAHs에 노출되지 않은 경우에는 CYP1A1의 전사가 이 유전자에 특이적인 억제단백질의 작용으로 발현이 낮은 수준으로 유지된다. 반면, PAHs에 노출되어지면 CYP1A1 유전자 발현이 활성화되어짐을 확인할 수 있다. 위와 같은 결과는 도 1을 통해 확인 가능하다.

[0054] 도 1에서 확인되는 바와 같이 미세먼지 농도 25, 50, 100ug/ml 처리시에 농도 의존적으로 CYP1A1의 발현이 활성화되어지는 결과를 확인할 수 있다. 이를 확인하기 위하여 아래와 같이 시험하였다.

[0055] 추출물 처리

[0056] ㉮ HaCaT 세포를 6well plate에 $3.5x10^5$cells/well농도로 분주하고 세포 배양조건에서 24 시간 배양하였다.

[0057] ㉯ 이 후, 배지를 제거하고 DPBS로 세척한 뒤 FBS가 2%함유되어있는 DMEM 배지에 시험물질을 희석하여 6시간 전처리하였다.

[0058] ㉰ 배지를 제거하고 FBS가 2%함유된 DMEM배지에 시험물질과 미세먼지를 함께 희석하여 3 시간 처리하였다.

[0059] RNA prep

[0060] ㉮ 추출물 처리가 완료된 Plate를 가져와 DPBS 1ml로 세척 후 RNA isoplus를 200 ul 처리해준 뒤 바닥에 부착되어있는 세포를 cell scrapper로 모아주었다.

[0061] ㉯ Chloroform을 RNA isoplus 총량의 1/5되는 양을 넣고 vortexing 하였다.

[0062] ㉰ centrifuge 13000 rpm, 4℃, 20분간 돌려준 뒤 상층액을 새 Tube에 옮겼다.

[0063] ㉱ 상층액에 iso-propanol을 상층액보다 많은 양, 약 400 ul를 더해준 뒤 앞선 같은 조건의 centrifuge 진행하였다.

[0064] ㉲ 상층액을 제거한뒤 pellet을 DEPC DW 10 ul로 희석하였다.

[0065] mRNA 발현확인

[0066] ㉮ prepRNA를 cDNA로 합성하였다.

[0067] ㉯ 합성된 cDNA 1 ul, PCR premix(dnTP, polymerase) 4 ul, DEPC DW 14 ul, CYP1A1 primer 1 ul를 더해준 뒤 Reverse transcriptase PCR 기기에 넣어 25~30 cycle을 맞춰주었다.

[0068] ㉰ 준비된 2% Agarose gel을 전기영동기기에 놓고, RT-PCR을 마친 DNA를 10 ul씩 gel에 로딩하였다.

[0069] ㉱ 로딩이 완료되면 Detection을 통해 발현을 확인하였다.

[0070] **시험예 2: CYP1A1 발현확인**

[0071] 상기 제조예의 추출물들이 미세먼지로부터 활성화 되어지는 CYP1A1 발현에 미치는 감소능을 확인하였다. 이를 확인하기 위하여 아래와 같이 시험하였다.

[0072] 추출물 처리

[0073] ㉮ HaCaT 세포를 6well plate에 $3.5x10^5$cells/well농도로 분주하고 세포 배양조건에서 24 시간 배양하였다.

[0074] ㉯ 이 후, 배지를 제거하고 DPBS로 세척한 뒤 FBS가 2%함유되어있는 DMEM 배지에 시험물질을 희석하여 6시간 전처리 하였다.

[0075] ㉰ 배지를 제거하고 FBS가 2%함유된 DMEM배지에 시험물질과 미세먼지를 함께 희석하여 3 시간 처리하였다.

[0076] RNA prep

[0077] ㉮ 추출물 처리가 완료된 Plate를 가져와 DPBS 1ml로 세척 후 RNA isoplus를 200 ul 처리해준 뒤 바닥에 부착되어있는 세포를 cell scrapper로 모아주었다.

[0078] ㉯ Chloroform을 RNA isoplus 총량의 1/5되는 양을 넣고 vortexing 하였다.

[0079] ㉰ centrifuge 13000 rpm, 4℃, 20분간 돌려준 뒤 상층액을 새 Tube에 옮겼다.

[0080] ㉱ 상층액에 iso-propanol을 상층액보다 많은 양, 약 400 ul를 더해준 뒤 앞선 같은 조건의 centrifuge 진행하였다.

[0081] ㉲ 상층액을 제거한뒤 pellet을 DEPC DW 10 ul로 희석하였다.

[0082] mRNA 발현확인

[0083] ㉮ prepRNA를 cDNA로 합성하였다.

[0084] ㉯ 합성된 cDNA 1 ul, PCR premix(dnTP, polymerase) 4 ul, DEPC DW 14 ul,CYP1A1 primer 1 ul를 더해준 뒤 Reverse transcriptase PCR 기기에 넣어 25~30 cycle을 맞춰주었다.

[0085] ㉰ 준비된 2% Agarose gel을 전기영동기기에 놓고, RT-PCR을 마친 DNA를 10 ul씩 gel에 15min 로딩하였다.

[0086] ㉱ 로딩이 완료되면 Detection을 통해 발현을 확인하였다.

[0087] 그 결과 도 2에서 확인되는 바와 같이, 상기 제조예의 추출물들은 20ppm에서 미세먼지로부터 활성화 되어지는 CYP1A1의 발현을 감소시키는 것을 알 수 있다.

[0088] **시험예 3: 염증개선활성 시험**

[0089] 상기 제조예 및 실시예의 추출물들의 미세먼지로 유발된 염증 억제효과를 확인하였다. 이를 확인하기 위하여 아래와 같이 시험하였다.

[0090] ㉮ Raw 264.7 세포를 48well plate에 $1x10^5$cells/well 농도로 분주하고 세포 배양조건에서 24 시간 배양하였다.

[0091] ㉯ 이 후, 배지를 제거하고 DPBS로 세척한 뒤 DMEM 배지에 시험물질을 희석하여 처리하고 30분 후에 염증 유발제인 LPS를 10ug/mL이 되도록 처리하였다. 24시간 처리 하였다. 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다.

[0092] ㉰ 배양액과 동량의 Griess Reagent를 가하고 15분간 상온에서 반응시킨 후 540nm 에서 흡광도를 측정하였다.

[0093] 그 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0094] 도 3 및 도 4에서 확인되는 바와 같이, 상기 제조예의 추출물들은 8ppm에서 염증 억제효과를 확인할 수 있었지만, 복합추출물에서는 더욱 우수한 농도의존적인 염증 억제효과를 확인할 수 있었다.

[0095] 도 3에서 확인되는 바와 같이 각각의 섬백리향추출물, 떡버들추출물, 함박꽃나무추출물 및 제주광나무 추출물은 농도에 따라 NO 생성이 억제되어 염증개선활성이 증가하는 것을 확인할 수 있지만, 그 활성이 크지는 않음을 확인할 수 있었다.

[0096] 그런데 도 4에서 확인되는 바와 같이, 상기 추출물들을 혼합하여 제조된 실시예의 혼합추출물에서는 그 상승효과에 의하여 우수한 염증개선활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 섬백리향추출물, 떡버들 잎 추출물, 떡버들 줄기추출물, 함박꽃나무추출물 및 제주광나무추출물을 혼합한 실시예 2의 혼합추출물에서 그 활성이 더 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0097] **시험예 4: 주름개선활성 시험**

[0098] 상기 실시예의 추출물들이 미세먼지로부터 활성화 되어지는 MMP-1 발현에 미치는 감소능을 확인하였다. 이를 확인하기 위하여 아래와 같이 시험하였다.

[0099] 추출물 처리

[0100] ㉮ HaCaT 세포를 60mm dish에 2x10^{5}cells/dish 농도로 분주하고 세포 배양조건 에서 24 시간 배양하였다.

[0101] ㉯ 이 후, 배지를 제거하고 DPBS로 세척한 뒤 DMEM 배지에 시험물질을 희석하여 24시간 전처리 하였다.

[0102] ㉰ 배지를 제거하고 DMEM배지에 시험물질과 미세먼지를 4 시간 동시처리 하였다.

[0103] RNA prep, Real-Time PCR

[0104] ㉮ 추출물 처리가 완료된 dish를 가져와 DPBS 3ml로 세척 후 Qiagen kit를 이용하여 40ul의 RNA를 추출하였다.

[0105] ㉯ prepRNA를 cDNA로 합성하였다.

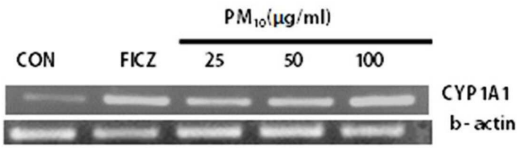
[0106] ㉰ 합성된 cDNA 1 ul, Supermix 10 ul, DEPC DW 8 ul, MMP-1 primer 1 ul를 더해준 뒤 Real-Time PCR 기기에 넣어 35~40 cycle을 실시간으로 확인하였다.

[0107] 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0108] 도 5에서 확인되는 바와 같이 상기 실시예의 혼합추출물에서 우수한 MMP-1 발현 억제활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 섬백리향추출물, 떡버들 잎추출물, 떡버들 줄기추출물, 함박꽃나무추출물 및 제주광나무추출물을 혼합한 실시예 2의 혼합추출물에서 그 활성이 더 우수한 것을 확인할 수 있었다.

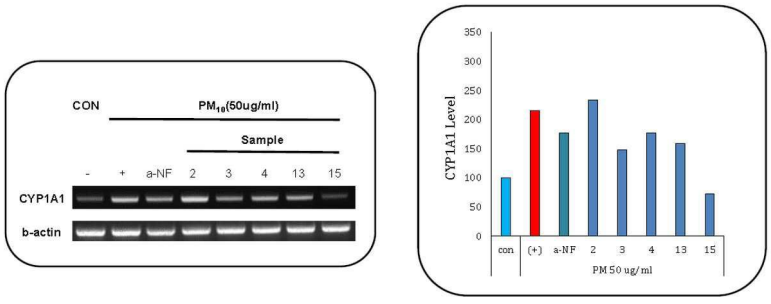
도면

도면1



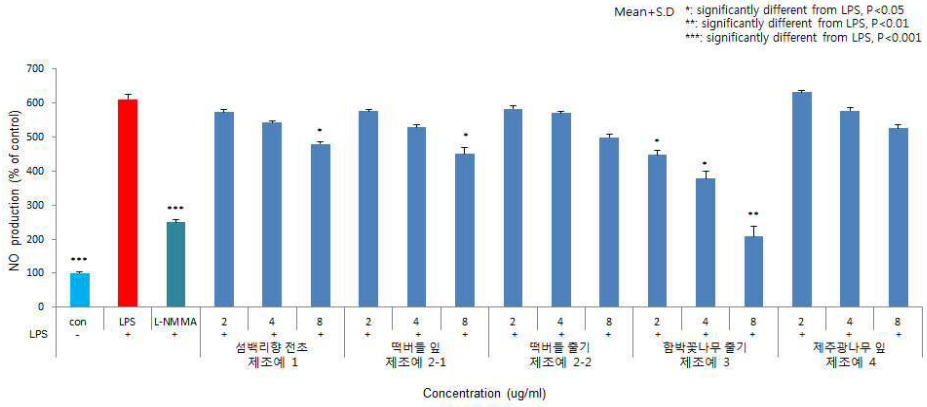
PM(Particulate Matter)
FICZ(5uM)

도면2

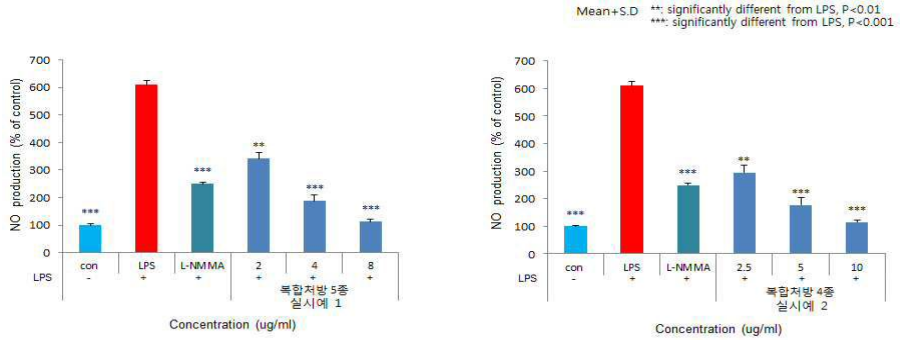


2:섬백리향추출물(제조예 1) 3:떡버들추출물(제조예 2-1) 4:떡버들추출물(제조예 2-2)
13:함박꽃나무추출물(제조예 3) 15:제주광나무추출물(제조예 4)

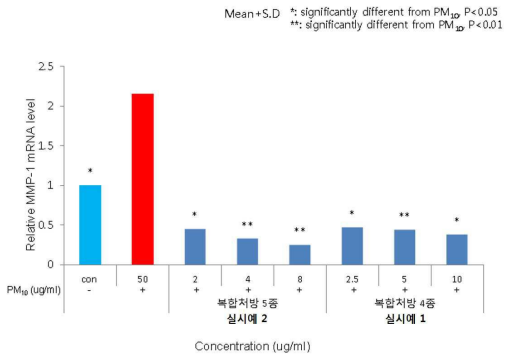
도면3


Mean+S.D *: significantly different from LPS, P<0.05
**: significantly different from LPS, P<0.01
***: significantly different from LPS, P<0.001
NO production (% of control)
LPS
con
LPS
L-NMMA
섬백리향 전초 제조예 1
떡버들 잎 제조예 2-1
떡버들 줄기 제조예 2-2
함박꽃나무 줄기 제조예 3
제주광나무 잎 제조예 4
Concentration (ug/ml)

도면4


Mean+S.D **: significantly different from LPS, P<0.01
***: significantly different from LPS, P<0.001
NO production (% of control)
LPS
con
LPS
L-NMMA
복합처방 5종 실시예 1
Concentration (ug/ml)
복합처방 4종 실시예 2
Concentration (ug/ml)

도면5


Mean+S.D *: significantly different from PM10 P<0.05
**: significantly different from PM10 P<0.01
Relative MMP-1 mRNA level
PM10 (ug/ml)
con
50
복합처방 5종 실시예 2
복합처방 4종 실시예 1
Concentration (ug/ml)