



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0074789
(43) 공개일자 2022년06월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9794 (2017.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 36/88 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) A61P 39/06 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 8/9794 (2017.08)
A23L 33/105 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2021-0166124
(22) 출원일자 2021년11월26일
심사청구일자 2021년11월26일
- (30) 우선권주장
1020200163141 2020년11월27일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
- 영광군
전라남도 영광군 영광읍 중앙로 203
- (72) 발명자
정대균
경기도 용인시 수지구 이종무로169번길 11-12 (고기동)
- 이태성
전라남도 영광군 영광읍 단신길1길 9-8, 303호
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 석산(꽃무릇) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습 증진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 석산(꽃무릇)을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 석산(꽃무릇) 추출물을 포함하는 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습증진용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 석산 추출물을 포함하는 조성물은 ABTS 자유라디칼 소거능을 통해 항산화 활성을 나타내며, 산화질소 억제, TNF- α 억제 활성 등의 항염증 활성을 나타내며, IL-8 억제 활성 등의 항아토피 활성, 히알루론산 증진 등의 보습 증진능을 나타내고, 엘라스타제 활성 억제 등 항주름 활성을 나타내는바, 화장품, 의약품, 건강기능식품등에 활용도가 높을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/88 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A61P 39/06 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
A61K 2800/522 (2013.01)

(72) 발명자

김훈

경기도 수원시 장안구 창훈로80번길 50, 202호 (연무동, 효준아파트)

이한솔

서울특별시 구로구 고척로22길 84, 101동 1304호 (개봉동, 동도센트리움아파트)

백영목

전라북도 완주군 이서면 지사제로 29 (혁신도시 에코르 2단지 아파트)

정재욱

전라남도 영광군 영광읍 옥당로 92, A동 302호 (은성그린빌리지)

장지현

전라남도 영광군 영광읍 옥당로 106-5

김유정

전라남도 영광군 법성면 화천길1길 196

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415170372
과제번호	P114000049
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술진흥원
연구사업명	산업혁신기반구축사업(R&D)
연구과제명	바이오소재 데이터 플랫폼 구축 및 실증
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단, 피부생명공학센터(주)
연구기간	2020.06.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

석산 추출물을 유효성분으로 포함하는, 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습 증진용 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 석산을 물, C1 내지 C4의 저급 알콜, 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 것을 특징으로 하는, 화장료 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 석산은 석산의 잎, 줄기 및 뿌리로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 부위인 것을 특징으로 하는, 화장료 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 ABTS 자유라디칼 소거 활성, DPPH 라디칼 소거 활성 또는 FRAP(Fluorescence Recovery After Photobleaching) 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는, 화장료 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 산화질소, TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-6 (Interleukin-6) 및 IL-8 (Interleukin-8)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 화장료 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 히알루론산 (hyaluronic acid, HA) 합성을 증진시키는 것을 특징으로 하는, 화장료 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 엘라스타제(Elastase)의 활성을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 화장료 조성물.

청구항 8

석산 추출물을 유효성분으로 포함하는, 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습 증진용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 추출물은 석산을 물, C1 내지 C4의 저급 알콜, 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 석산은 석산의 잎, 줄기 및 뿌리로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 부위인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 11

석산 추출물을 유효성분으로 포함하는, 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습 증진용 건강기능식품 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 추출물은 석산을 물, C1 내지 C4의 저급 알콜, 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 석산은 석산의 잎, 줄기 및 뿌리로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 부위인 것을 특징으로 하는, 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 석산(꽃무릇)을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 석산(꽃무릇) 추출물을 포함하는 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습 증진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 피부는 외부 환경에 직접적으로 노출되는 신체 부위로서, 과도한 자외선이나 오염물질 등에 노출되면 홍반, 부종, 가려움 등의 피부자극 및 염증반응이 유발된다. 이러한 피부 트러블은 미관상 문제가 될 뿐만 아니라, 염증반응과정에서 생성되는 물질들이 부수적으로 색소 침착을 일으키고, 피부 탄력섬유의 붕괴를 촉진시켜 피부 주름을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한, 피부 손상에는 자유라디칼과 관련된 것으로 알려져 있다. 자유라디칼은 세포를 파괴하거나 피부 진피층의 결합조직을 절단하거나 교차 결합을 일으키므로 주름형성, 피부암, 세포

살상, 류마티스성 관절염, 아토피성 피부염, 여드름 등 여러 가지 문제를 발생시킨다.

- [0004] 염증은 해로운 주위 환경, 즉 세균과 같은 외부 이물질의 침입과 기계적 손상으로부터 생체를 보호하는 생리적인 반응이다. 이 염증 현상은 여러 종류의 다핵형 백혈구(PMNs)와 면역 물질의 많은 증가를 초래하고, 이들 세포들은 염증성 세포 산물인 다양한 종류의 단백질 분해효소와 사이토카인(cytokine)을 분비함으로써 치료 및 방어를 할 수 있게 한다.
- [0005] 과다 염증은 단백질 분해 효소들에 의해 세포 및 결합조직의 손상을 입히고, 결합 조직의 손상은 피부의 탄력을 감소시켜 주름의 원인이 될 뿐 아니라, 세포의 재생 및 증식에도 나쁜 영향을 미치게 되어 빠른 피부노화를 초래하게 되고, 피부에 국소적인 홍반과 부어 오름이 나타나게 된다. 만일, 결합조직이 심각하게 손상되고 염증반응이 지속된다면 정상적인 조직구조와 기능을 회복시키는 일은 훨씬 어렵게 된다.
- [0006] 이에, 피부손상을 개선시키기 위해 자유라디칼 소거활성 및 염증을 억제할 수 있는 물질로 홍차 발효액을 포함하는 항산화, 항염증 및 아토피 개선용 조성물(대한민국 등록특허 제1485896호), 한약재 혼합물을 포함하는 항산화, 항염증 및 아토피 예방 또는 치료용 조성물(대한민국 등록 특허 제1654409호) 등이 연구되고 있다.
- [0007] 한편, 석산(Lycorisradiata)은 수선화과에 따른 여러해살이 알뿌리식물로서, 꽃무릇이라도 불린다. 꽃줄기는 약 30~50cm, 잎은 약 30~40cm, 너비는 1.5cm 정도로 길쭉하며 길이는 약 1m 가량 자란다. 가을에 잎이 올라와 겨울과 봄을 건디고 초여름에 잎이 모두 떨어지고 꽃대가 올라와 9~10월 초가을에 붉은 꽃이 피는 것이 특징이다. 석산은 해독작용이 있다고 알려져 있으며, 등근 뿌리에는 유독한 알칼로이드가 포함되어 있어 사인화, 장폐화, 유행화 또는 피안화라고도 불리며 천연 항균물질을 함유하고 있어 점착제 등에 활용되었으며, 유독물질인 리코린도 포함되어 있어 피부질환 등에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.
- [0008] 석산은 상사화와 같이 수선화과에 속하지만, 상사화의 분양원가가 수천원대인데 반해 석산은 수백원대로 석산을 이용한 식품, 의약품 및 화장품 소재의 활용가능성이 매우 큰 상황이지만, 이를 통한 연구는 미미한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 상기와 같은 문제점을 개선하기 위하여, 본 발명자들은 석산 추출물의 다양한 효능을 연구한 결과, 석산 추출물이 ABTS 자유라디칼 소거 활성, DPPH 라디칼 소거 활성 또는 FRAP 활성을 통해 항산화 활성을 나타내고, 산화질소, TNF- α , IL-6 또는 IL-8을 억제시킴으로써 항염증 또는 항아토피 활성을 나타내고, 히알루론산 증진을 통해 보습 증진 효능을 나타내고, 엘라스타제 활성 억제 등 항주름 활성을 나타내는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 이에, 본 발명은 석산 추출물을 유효성분으로 포함하는, 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습 증진용 화장품 조성물, 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 석산 추출물을 유효성분으로 포함하는, 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습 증진용 화장품 조성물, 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일구현예로, 상기 추출물은 석산을 물, C1 내지 C4의 저급 알콜, 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 석산은 석산의 잎, 줄기 및 뿌리로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 부위일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 ABTS 자유라디칼 소거 활성, DPPH 라디칼 소거 활성 또는 FRAP 활

성을 나타낼 수 있다.

- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 산화질소, TNF- α , IL-6 및 IL-8로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 억제할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 히알루론산 합성을 증진시킬 수 있다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 엘라스타제(Elastase)의 활성을 억제시킬 수 있다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에 따른 석산 추출물을 포함하는 조성물은 ABTS 자유라디칼 소거능을 통해 항산화 활성을 나타내며, 산화질소 억제, TNF- α 억제 활성 등의 항염증 활성을 나타내며, IL-8 억제활성 등의 항아토피 활성, 히알루론산 증진 등의 보습 증진능을 나타내며, 엘라스타제 활성 억제 등 항주름 활성을 나타내며, 화장품, 의약품, 건강 기능식품등에 활용도가 높을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 석산 원료를 기반으로 부위와 용매에 따라 4종의 추출물을 제조한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 도 1에 개시된 4종의 추출물을 대상으로 물과 유기용매에 대한 용해도를 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 석산으로부터 조제된 추출물 4종에 대한 ABTS 라디칼 소거활성을 나타낸 것이다.
- 도 4는 석산으로부터 조제된 추출물 4종에 대한 DPPH 라디칼 소거활성을 나타낸 것이다.
- 도 5는 석산 추출물 처리 후 철이온을 이용하여 환원력을 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 석산으로부터 조제된 추출물 4종에 대한 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 석산추출물 4종을 1.25~10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도범위로 처리하고 세포독성을 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 석산추출물 4종을 1.25~10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도범위로 처리하고 전염증성 물질인 nitric oxide(NO) 생성 억제 활성 평가 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 석산추출물 4종을 1.25~10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도범위로 처리하고 전염증성 물질인 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 생성 억제활성 평가 결과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 석산추출물 4종을 1.25~10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도범위로 처리하고 전염증성 물질인 interleukin-6(IL-6) 생성 억제활성 평가 결과를 나타낸 것이다.
- 도 11은 석산추출물 4종을 1.25~10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도범위로 처리하고 세포독성을 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 12는 석산추출물 4종을 1.25~10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도범위로 처리하고 아토피 관련 물질인 IL-6 생성 억제활성 평가 결과를 나타낸 것이다.
- 도 13은 석산추출물 4종을 처리하고 아토피 관련 물질인 IL-8 생성 억제활성 평가 결과를 나타낸 것이다.
- 도 14는 석산 추출물 4종을 처리하고, HaCaT 세포에서 보습인자인 hyaluronic acid(HA) 생성 증진활성을 평가한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 15 내지 17은 석산 추출물 4종을 10분 간 처리한 경우, 엘라스타제 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 18 내지 20은 석산 추출물 4종을 20분 간 처리한 경우, 엘라스타제 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 21 내지 23은 석산 추출물 4종을 30분 간 처리한 경우, 엘라스타제 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 24 내지 26은 석산 추출물 4종을 130분 간 처리한 경우, 엘라스타제 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명자들은 석산 추출물의 다양한 효능을 연구한 결과, 석산 추출물이 ABTS 자유라디칼 소거 활성, DPPH 라디칼 소거 활성 또는 FRAP 활성을 통해 항산화활성을 나타내고, 산화질소, TNF- α , IL-6 또는 IL-8을 억제시킴으로써 항염증 또는 항아토피 활성을 나타내고, 히알루론산 증진을 통해 보습 증진 효능을 나타내고, 엘라스타제 억제를 통해 항주름 효능을 나타내는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0027] 이에, 본 발명은 석산 추출물을 유효성분으로 포함하는, 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습 증진용 화장품 조성물, 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 용어, “석산(Lycorisradiata)”은 수선화과에 속하는 여러해살이 알뿌리식물로 꽃무릇이라도 불리우며, 본 발명에서는 잎 또는 뿌리를 포함하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 석산 잎일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명에서 사용되는 용어, “추출물”은 물질의 추출 처리에 의하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.
- [0030] 본 발명의 추출물을 제조하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법, 침지 추출법, 고온 및 고압 증기 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2 종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있고, 물과 메탄올, 에탄올, 부탄올 등과 같은 C1 내지 C4의 저급 알코올과 이들의 혼합용매 등을 포함한 다양한 유기용매일 수 있으나, 에탄올을 이용하여 추출하는 것이 바람직하다.
- [0031] 본 발명에서 사용되는 용어, “유효성분”은 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어, “항산화”는 산화의 억제를 의미하며, 체내에서 생성되는 활성산소를 제거하는 것을 의미하며, 구체적으로는 자유라디칼의 소거 활성을 통해 산화를 방지하는 것으로 이해될 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어, “항염증”은 염증의 억제를 의미하며, 본 발명에서는 구체적으로 세포에 대한 독성이 없는 농도범위에서 LPS 처리를 통한 염증을 유발하고 전염증성 물질인 nitric oxide(NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin-6(IL-6) 생성 억제 활성을 나타내는 것으로 이해될 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 사용되는 용어, “항아토피”는 가려움증 및 피부건조증을 주된 증상으로 하는 만성 염증성 피부질환인 아토피피부염을 억제하는 것으로, 아토피 관련 물질인 IL-6 및 IL-8 생성 억제 활성을 나타내는 것으로 이해될 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어, “항주름”은 주름의 생성을 억제하는 것으로 진피층에 있는 콜라겐이나 히알루론산의 저감이 원인이 되는 주름 생성의 원인을 저해시키는 것으로 이해될 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어, “보습 증진”은 피부의 수분을 유지하고 피부를 탄력있고 부드럽게 해주는 것으로써, 본 발명에서는 보습인자인 hyaluronic acid(HA) 생성 증진을 통해 피부의 수분감을 개선시켜주는 것으로 이해될 수 있다.
- [0037] 본 발명은 실시예를 통해 석산 추출물의 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습 증진 용도를 규명하였다.
- [0038] 보다 구체적으로, 본 발명의 일실시예에서는 석산으로부터 조제된 추출물 4종에 대한 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거 활성을 확인하였으며, 철이온을 이용한 환원력 평가 및 폴리페놀 함량 측정을 통해 석산 추출물의 항산화 활성을 확인하였다(실시예 3 참조).
- [0039] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 염증성 물질인 NO, TNF- α , IL-6의 생성 억제 활성을 평가하여 석산 추출물의 항염증 활성을 확인하였으며(실시예 4 참조), 아토피 관련 물질인 IL-6, IL-8의 생성 억제 활성을 평가하여 석산 추출물의 항아토피 활성을 확인하였다(실시예 5 참조), 또한 히알루론산 생성 증진활성을 확인함으로써 석산 추출물의 보습 증진 활성을 확인하였다(실시예 6참조).

- [0040] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 엘라스틴 등을 분해하는 엘라스타제의 활성을 석산 추출물이 억제할 수 있음을 확인함으로써, 석산 추출물의 항주름 활성을 확인하였다(실시예 7 참조).
- [0041] 상기 실시예로부터, 본 발명의 조성물이 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습 증진 용도를 나타냄을 구체적인 실험을 통해 확인하였으며, 이에 본 발명에 따른 조성물은 다양한 용도의 화장품, 의약품 또는 건강기능식품 등에 활용될 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 본 발명에 따른 조성물이 화장료 조성물의 형태로 이용되는 경우, 유효성분인 석산 추출물 이외에, 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습 효과를 상승 또는 보강시킬 수 있도록 알려진 화합물이나 천연 추출물을 더 포함할 수 있다.
- [0043] 한편, 본 발명의 조성물에 있어서, 그 유효성분은 다양한 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습 활성을 나타낼 수 있는 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함할 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001중량 % 내지 99.99중량 % 범위 내에서 포함될 수 있다. 여기서 "유효량"이란 효과를 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 화장료 조성물은 다양한 형태로 제조될 수 있는데, 예컨대, 발명의 피부 국소제 혹은 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 연고, 로션, 파우더, 비누, 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 구체적으로, 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨 토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 립스틱, 메이크업 베이스, 파운데이션, 프레스파우더 및 루스파우더로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형을 가질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 피부 국소제 혹은 화장료 조성물은 그 유효성분 이외에 피부 국소제제 혹은 화장료 제제에 있어서 수용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 여기서 "피부 국소제제 혹은 화장료 제제에 있어서 수용 가능한 담체"란 화장품 제제에 포함될 수 있는 이미 공지되어 사용되고 있는 화합물 또는 조성물이거나 앞으로 개발될 화합물 또는 조성물로서 피부와의 접촉시 인체가 적응 가능한 이상의 독성, 불안정성 또는 자극성이 없는 것을 말한다. 상기 담체는 본 발명의 피부 국소제제 혹은 화장료 조성물에 그것의 전체 중량에 대하여 약 1중량 % 내지 약 99.99중량 %, 바람직하게는 조성물의 중량의 약 5중량% 내지 약 99중량%로 포함될 수 있다.
- [0046] 그러나 상기 비율은 본 발명의 피부 국소제제 혹은 화장료의 제조되는 전술한 바의 형태에 따라 또한 그것의 구체적인 적용 부위(얼굴이나 손)나 그것의 바람직한 적용량 등에 따라 달라지는 것이기 때문에, 상기 비율은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다.
- [0047] 한편, 상기 담체로서는 알코올, 오일, 계면활성제, 지방산, 실리콘 오일, 습윤제, 보습제, 점성 변형제, 유제, 안정제, 자외선 차단제, 발색제, 향료 등이 예시될 수 있다. 상기 담체로서 사용될 수 있는 알코올, 오일, 계면활성제, 지방산, 실리콘 오일, 습윤제, 보습제, 점성 변형제, 유제, 안정제, 자외선 차단제, 발색제, 향료로 사용될 수 있는 화합물/조성물 등은 이미 당업계에 공지되어 있기 때문에 당업자라면 적절한 해당 물질/조성물을 선택하여 사용할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 조성물이 피부 외용제 형태로도 이용될 수 있고, "피부 외용제"는 일반적으로 피부 외용에 사용하는 물질 전반을 포함하는 포괄하는 개념으로, 피부 외용제 제형의 비제한적인 예로는 경고제(PLASTERS), 로션제(LOTIONS), 리니먼트제(LINIMENTS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPENSIONS), 캡슐제(CAPSULES), 크림제(CREAMS), 연질, 경질 젤라틴 캡셀, 첩부제, 또는 서방화제제가 있다. 본 발명에 따른 피부 외용제는 상용되는 무기 또는 유기 담체, 부형제 및 희석제를 가하여 고체, 반고체 또는 액상의 형태로 제제화된 비경구 투여제일 수 있다. 상기 비경구 투여를 위한 제제로는 점적제, 연고, 로션, 젤, 크림, 패취, 스프레이, 현탁제 및 유제로 이루어진 군에서 선택되는 경피 투여형 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 본 발명에 따른 조성물이 약학적 조성물의 형태로 이용되는 경우, 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습을 개선하는 기능을 가질 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습 개선을 위한 통상의 방법에 따라 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸, 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화가 가능하다.

- [0050] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 약학적으로 유효한 양의 석산 추출물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환측의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환측 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0053] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환측의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 1 내지 500 mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명에 따른 조성물이 건강기능식품 조성물의 형태로 이용되는 경우, 본 발명의 건강기능식품은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 항산화, 항염증, 항아토피, 항주름 및 보습 활성 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [0055] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 특정보건용 식품, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학 및 의료효과가 높은 식품으로 제조될 수 있으며, 상기 식품은 경우에 따라, 기능성식품, 건강식품, 건강보조식품으로 혼용될 수 있으며, 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 건강기능식품은 식품 조성물에 통상적으로 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 디히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니솔(BHA), 부틸히드록시 톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아조산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(물신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 건강기능식품을 식품 첨가물로 사용할 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 건강기능식품에 있어서, 석산 추출물의 함량은 특별히 제한되지 않으며, 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 식품의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.

[0060] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0062] [실시예]

[0063] 실시예 1. 실험방법

[0064] 1-1. 석산 추출물 제조

[0065] 영광군 농업기술센터로부터 전달받은 석산(생물) 원료는 피부 생리활성 평가를 위해 각각 잎과 뿌리를 분리한 다음 각각 아래의 방법과 같이 물과 70% 에탄올을 이용하여 각각의 추출물로 제조하였다.

[0066] 먼저, 석산의 열수추출은 분쇄된 석산 부위별(잎과 뿌리) 원료 50g에 각각 20배의 증류수를 첨가하여 decoction 법을 통해 4시간 동안 진행하였다. 추출물은 여과용 거즈를 이용하여 잔사를 제거하였고, 감압농축기로 농축, 원심분리를 통한 잔사의 제거, 2차 여과 후 동결건조를 진행하여 수분이 모두 제거된 열수추출물(hot water extract. HW)로 조제되었다.

[0067] 다음으로, 석산의 에탄올추출은 분쇄된 석산 부위별(잎과 뿌리) 원료 50g에 각각 10배의 70% 에탄올을 첨가하여 reflux법(60℃)을 통해 4시간 동안 진행하였다. 추출물은 여과용 거즈를 이용하여 잔사를 제거하였고, 감압농축기로 농축, 원심분리를 통한 잔사의 제거, 2차 여과 후 동결건조를 진행하여 수분이 모두 제거된 에탄올추출물(ethanol extract. E)로 조제되었다.

[0069] 1-2. 항산화 활성 평가 방법

[0070] 먼저, ABTS 자유라디칼 소거활성을 확인하기 위해 7.4 mM ABTS 용액과 2.6 mM potassium persulphate 용액을 12시간 이상 암실에 방치하여 청록색 라디칼을 형성시킨 다음, 734 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 희석하여 ABTS working solution으로 제조한 후 실험에 사용하였다. 이 용액에 농도별로 희석된 시료 10 μL를 가한 후 상온에서 30분간 반응시켜 반응액의 흡광도 변화를 734 nm에서 측정하였으며, 결과는 ABTS working solution에 대한 inhibitory activity(%)로 나타내었다. 한편, 농도별로 처리된 시료의 ABTS 라디칼 소거활성은 IC₅₀ (Half maximal inhibitory concentration) 값으로 계산하였으며, 표준물질로 사용된 ascorbic acid와 IC₅₀값을 비교함으로써 시료의 항산화 활성을 비교, 평가하였다.

[0072] - ABTS radical inhibitory activity (%) = (Blank O.D-Sample O.D)/(Blank O.D) X 100

[0073] - Blank O.D : 공시료액의 반응 후 흡광도

[0074] - Sample O.D : 시료액의 반응 후 흡광도

[0076] 다음으로, DPPH 자유라디칼 소거활성을 확인하기 위해 0.2 mM DPPH 라디칼 용액에 시료 10 μL를 가한 후 상온에서 30분간 반응시켜 반응액의 흡광도 변화를 514 nm에서 측정하였다. 결과는 DPPH working solution에 대한 inhibitory activity(%)로 나타내었으며, 농도별로 처리된 시료의 DPPH 라디칼 소거활성은 IC₅₀ (Half maximal inhibitory concentration) 값으로 계산하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 ABTS와 마찬가지로 표준물질인 ascorbic acid와 IC₅₀값을 비교함으로써 평가하였다.

[0078] - DPPH radical inhibitory activity (%)=(Blank O.D-Sample O.D)/(Blank O.D) X 100

[0079] - Blank O.D : 공시료액의 반응 후 흡광도

[0080] - Sample O.D : 시료액의 반응 후 흡광도

[0082] 다음으로, 철이온을 이용한 환원력 평가를 확인하기 위하여, Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay 는 ferrous tripyridyl triazine complex에 의해 ferric ion(Fe^{3+})이 ferrous ion(Fe^{2+})로 전환 되는 원리를 이용하여 시료 내의 금속이온 소거활성을 측정하는 방법이다. 300 mM acetate buffer와 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ), FeCl_3 및 증류수를 10 : 1 : 1 : 1.2의 비율로 차례대로 섞어 FRAP reagent를 조제한 후, 이 용액 200 μL 와 농도별 시료 10 μL 를 상온에서 4분 동안 반응시켜 반응액의 흡광도 변화를 593 nm에서 측정하였다. 표준물질인 Iron(II) sulfate heptahydrate($\text{FeSO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$)를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 시료의 FRAP 활성은 표준물질에 대한 mM ferrous sulfate equivalents (FSE)/mL로 나타내었다.

[0083] 다음으로, Folin-Ciocalteu법을 이용한 총 폴리페놀 함량 측정하기 위하여, 시료 10 μL 에 알칼리 조건을 형성하기 위해 2% Na_2CO_3 을 10 μL 를 가한 후 3분간 반응시키고 50%의 Folin-Ciocalteus' reagent 200 μL 를 첨가해 30분간 반응시킨 다음, 750 nm에서 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 시료의 총 폴리페놀 화합물의 함량은 농도(mg/g)로 나타내었다.

[0085] 1-3. 항염증 활성 평가 방법

[0086] 먼저, RAW 264.7 세포에 대한 시료독성 평가를 위해 Mouse macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 구입하였으며, 10% FBS와 1% P/S이 첨가된 DMEM 배지(이하 RAW 배지)를 사용하였으며, 37°C, 5% CO_2 조건이 유지되는 배양기에서 2~3일에 한번씩 계대배양하며 실험에 사용하였다. RAW 264.7 세포는 4×10^4 cells/well 또는 2×10^5 cells/well로 96 well plate에 plating하고 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양하여 세포를 안정화시켰다. 세포 상등액을 모두 제거한 뒤, FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지 160 μL 와 적당히 희석된 시료 20 μL 를 첨가하였으며, 30분 후 염증유발 물질로 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 가한 뒤 24시간동안 재배양하였다. 이후 상등액은 다시 제거하고 0.1 mg/mL의 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide(MTT) 용액 100 μL 를 첨가한 뒤, 30분동안 배양기에서 배양하였다. MTT 용액을 제거한 다음, DMSO 100 μL 를 가하여 생성된 pigment를 용해시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료에 의한 RAW 264.7 세포의 독성은 무처리구에 대한 세포생존율(cell viability, %)로 나타내었다.

[0087] 다음으로, ELISA를 이용한 TNF- α 및 IL-6 억제활성 평가를 위해 RAW 264.7 세포는 4×10^4 cells/well로 96 well plate에 plating하고 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양하여 세포를 안정화시켰다. 세포 상등액을 모두 제거한 뒤, FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지 160 μL 와 적당히 희석된 시료 20 μL 를 첨가하였으며, 30분 후 염증유발 물질로 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 가한 뒤 24시간 동안 재배양하였다. 세포배양 상등액으로 유리된 염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-6의 함량은 sandwich ELISA법으로 측정하여 제조사에서 제공하는 lyophilized recombinant protein을 통해 작성된 표준곡선을 통해 생성량(pg/mL)으로 계산되었다. 한편, 양성대조군(positive control, PC)으로 시료 대신 dexamethasone (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리하였으며, 시료와의 TNF- α 및 IL-6 억제활성 비교에 이용되었다.

[0088] 다음으로, Griess법을 이용한 산화질소 억제활성 평가를 위해 RAW 264.7 세포는 4×10^4 cells/well로 96 well plate에 plating하고 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양하여 세포를 안정화시켰다. 세포 상등액을 모두 제거한 뒤, FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지 160 μL 와 적당히 희석된 시료 20 μL 를 첨가하였으며, 30분 후 염증유발 물질로 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 가한 뒤 24시간 동안 재배양하였다. 세포배양 상등액으로부터 유리된 NO의 함량은 Griess법으로 측정하였으며, sodium nitrite(NaNO_2)를 통해 μM 로 정량되었다. 한편, 양성대조군(positive control, PC)으로 시료 대신 L-NAME(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하였으며, 시료와의 산화질소 억제활성 비교에 이용되었다.

[0090] 1-4. 항아토피 활성 평가 방법

[0091] 먼저, HaCaT 세포에 대한 시료독성 평가를 위해, 항아토피 활성 평가를 위한 HaCaT human skin keratinocyte cell은 고려대학교 기능성식품 연구실에서 분양받아 실험에 이용하였다. 세포는 10% FBS와 1% P/S가 첨가된 DMEM 배지를 사용하였으며, 37℃, 5% CO₂ 조건이 유지되는 배양기에서 2~3일에 한번씩 계대배양하며 실험에 이용하였다.

[0092] HaCaT 세포는 2×10^4 cells/well로 96-well plate에 plating하고 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 세포를 안정화시켰으며, 24시간 후 배양 상등액은 모두 제거한 다음 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지 200 μ L를 넣고 24시간 동안 배양하였다. 이후 배양 상등액은 모두 제거하고, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지 160 μ L와 적당한 농도로 희석된 시료 20 μ L를 첨가한 뒤 재배양하였으며, 30분 후 아토피 유발물질로 TNF- α 및 IFN- γ (T+I)를 각각 10 ng/mL씩 첨가한 다음 24시간동안 배양하였다. 시료에 의한 세포독성의 평가는 상기 언급한 바와 같이 MTT 법으로 측정하였으며, 시료 무처리구에 대한 세포생존율(cell viability, %)로 나타내었다. 한편, 양성대조군(positive control, PC)으로 시료 대신 dexamethasone (20 μ g/mL)을 처리하였으며, 시료와의 IL-6 및 IL-8 억제활성 비교에 이용되었다.

[0093] 다음으로, ELISA를 이용한 IL-6 및 IL-8 억제활성 평가를 위해 HaCaT 세포는 2×10^4 cells/well로 96-well plate에 plating하고 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 세포를 안정화시켰으며, 24시간 후 배양 상등액은 모두 제거한 다음 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지 200 μ L를 넣고 24시간동안 배양하였다.

[0094] 이후 배양 상등액은 모두 제거하고, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지 160 μ L와 적당한 농도로 희석된 시료 20 μ L를 첨가한 뒤 재배양하였으며, 30분 후 아토피 유발물질로 TNF- α 및 IFN- γ (T+I)를 각각 10 ng/mL씩 첨가한 다음 24시간 동안 배양하였다. 배양 상등액을 회수하고 상등액으로 유리된 사이토카인인 IL-6 및 IL-8의 함량은 R&D Systems사의 ELISA set를 통해 측정하였으며, 제조사에서 제공하는 recombinant protein을 통해 작성된 표준곡선을 이용하여 생성량(pg/mL)으로 계산되었다. 한편, 양성대조군(positive control, PC)으로 시료 대신 dexamethasone (20 μ g/mL)을 처리하였으며, 시료와의 IL-6 억제활성 비교에 이용되었다.

[0095]

[0096] 1-5. 보습 효능 평가 방법

[0097] 먼저, ELISA법을 이용한 히알루론산 생성량 평가를 위해 HaCaT 세포는 2×10^4 cells/well로 96-well plate에 plating하고 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 24시간 동안 세포를 안정화시켰으며, 이후 배양 상등액은 모두 제거한 다음 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지 180 μ L와 적당한 농도로 희석된 시료 20 μ L를 첨가한 뒤 재배양하였다. 세포배양 상등액으로 유리된 히알루론산(HA)의 함량은 R&D Systems사의 ELISA set를 통해 측정하였으며, 제공된 standard material을 통해 작성된 표준곡선을 통해 함량(ng/mL)으로 계산되었다.

[0099] 1-6. 통계 처리

[0100] 실험결과는 평균과 표준편차(standard deviation)를 산출하고 평균치 $\pm$ SD로 나타내었으며, 실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 Student's t-test로 계산하여 각각 p<0.05, p<0.01 및 p<0.001 수준에서 유의성을 검정하였다.

[0102] 실시예 2. 석산 추출물의 용해도 평가

[0103] 실시예 1-1에서 조제된 석산 추출물을 도 1에 나타난 바와 같이 ① 뿌리 열수추출물(Lycoris radiata Root Hot Water extract, LR-R-HW), ② 뿌리 70% 에탄올추출물(Lycoris radiata Root Ethanol extract, LR-R-E), ③ 잎 열수추출물(Lycoris radiata Leaf Hot Water extract, LR-L-HW) 및 ④ 잎 70% 에탄올추출물(Lycoris radiata Leaf Ethanol extract, LR-L-E)로 각각 명명하였다.

[0104] 조제한 4종의 추출물을 대상으로 물과 유기용매에 대한 용해도를 평가한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 잎 열수추출물(LR-L-HW)은 물에 대한 용해도가 우수한 반면, 뿌리 열수추출물(LR-R-HW), 뿌리 에탄올추출물(LR-R-E), 잎 에탄올추출물(LR-L-E)은 모두 DMSO에 대한 용해도가 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0106] **실시예 3. 석산 추출물 처리에 따른 항산화 활성 확인**

[0107] **3-1. 자유라디칼 소거 활성**

[0108] 석산으로부터 조제된 추출물 4종에 대한 라디칼 소거활성은 도 3 및 4에 나타난 바와 같이 1.25~5 mg/mL의 농도 범위에서 평가되었으며, 모든 시료들에서 농도-의존적인 경향으로 활성이 증가되는 것을 확인하였다.

[0109] 이에 더하여, 항산화 활성의 상대적인 비교하기 위하여 50%의 억제활성을 나타내는 농도인 IC₅₀(half maximal inhibitory concentration)을 계산한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 ABTS 라디칼 소거활성은 잎 에탄올추출물(5.8 mg/mL) > 잎 열수추출물(6.6 mg/mL) > 뿌리 열수추출물(23.0 mg/mL) > 뿌리 에탄올추출물(23.3 mg/mL) 순으로 확인되었다.

[0110] 나아가, DPPH 라디칼 소거활성 결과도 ABTS와 마찬가지로 잎의 에탄올추출물(4.8 mg/mL)과 열수추출물(6.8 mg/mL)에서 우수한 활성을 나타낸 반면, 뿌리의 열수추출물(n.d.) 및 에탄올추출물(n.d.)에서는 IC₅₀값이 도출되지 않았으며, 이는 석산 뿌리의 경우 항산화 활성이 상대적으로 미약한 것을 확인하였다.

[0112] **3-2. 금속이온을 이용한 환원력 평가 및 총 폴리페놀 함량 측정**

[0113] 먼저, 철이온을 이용한 환원력 시험에서 석산 추출물 4종은 1.25~5 mg/mL의 농도범위에서 평가되었으며, 도 5에 나타난 바와 같이 농도-의존적인 활성증가를 보여주었다. 또한, 대조물질인 ferrous sulfate (FeSO₄)와 비교했을 때, FRAP 활성은 잎 에탄올추출물(156.7 mM/g) > 잎 열수추출물(110.7 mM/g) > 뿌리 에탄올추출물(16.2 mM/g) > 뿌리 열수추출물(8.8 mM/g) 순으로 확인되었다.

[0114] 이에 더하여, 일반적으로 항산화 활성에 우수하다고 알려진 폴리페놀의 함량을 측정한 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 표준물질로 사용된 gallic acid와 비교했을 때, 석산추출물 4종의 총 폴리페놀 함량은 잎 에탄올추출물(31.4 mg/g; 3.1%) > 뿌리 열수추출물(27.9 mg/g; 2.8%) > 잎 열수추출물(15.6 mg/g; 1.6%) > 뿌리 에탄올추출물(6.0 mg/g; 0.6%) 순으로 높게 나타나는 것을 확인하였다.

[0116] **실시예 4. 석산 추출물 처리에 따른 항염증 활성 확인**

[0117] **4-1. RAW 264.7 세포에서 시료 독성 평가 결과**

[0118] 시료 5종의 면역증진 활성을 평가하기 전에 RAW 264.7 세포주를 이용하여 세포독성을 평가하고자 하였는데, 음성대조군(negative control, NC) 대비 80% 이상의 세포생존율을 나타내는 시료에 대해서는 독성이 없을 확인하였다. 또한, 석산추출물 4종을 1.25~10 µg/mL의 농도범위에서 시료독성을 평가한 결과, 도 7a 및 7b에 나타난 바와 같이 LPS 대조군과 비교하여 뿌리 열수추출물 104.9~110.5%, 잎 열수추출물 103.5~117.0%, 뿌리 에탄올추출물 105.6~117.8%, 잎 에탄올추출물 109.9~128.8%의 세포생존율을 나타내어 모든 시료는 시험농도 내에서 세포독성이 없는 것을 확인하였다.

[0120] **4-2. 염증성 물질 생성 억제 활성 확인**

[0121] 세포에 대한 독성이 없는 농도범위에서 LPS 처리를 통한 염증을 유발하고 전염증성 물질인 nitric oxide(NO), tumor necrosis factor-α(TNF-α) 및 interleukin-6(IL-6) 생성 억제활성 평가 결과는 각각 도 8 내지 10에 나타내었다.

[0122] 먼저, 도 8a 및 8b에 나타난 바와 같이 NO 억제활성 평가 결과에서, LPS 처리군(LPS)은 23.4 µM의 NO 생성을 나타내었으며, 이는 무처리군(negative control, NC; 2.1 µM)과 비교하여 약 11.0배의 통계적으로 유의한(p<0.001) 증가로 확인되었다. NO 억제효능이 우수한 것으로 이미 알려진 L-NAME (50 µM)를 처리한 양성대조군(positive control, PC)에서는 7.4 µM의 NO 생성을 나타내었으며, 이는 LPS 대조군 대비 약 75%의 통계적으로 유의한(p<0.001) 억제활성으로 확인되었다. 또한, 모든 석산 추출물은 1.25~10 µg/mL의 농도범위에서 통계학적으로 유의한 수준의 NO 억제효과를 나타냈는데, 잎 에탄올추출물(21.9~98.3% 억제) ≍ 잎 열수추출물(23.2~97.2% 억제) > 뿌리 에탄올추출물(11.2~94.6% 억제) > 뿌리 열수추출물(2.6~74.9% 억제) 순으로 NO 억제

활성이 우수한 것을 확인함으로써, 결론적으로 4종의 석산 추출물 중에서 잎의 에탄올추출물(LR-L-E)에서 가장 우수한 NO 억제활성을 확인할 수 있었다.

[0123] 이에 더하여, 도 9a 및 9b에 나타낸 바와 같이 TNF- α 억제활성 평가 결과에서, LPS 처리군은 75.4~74.8 ng/mL의 TNF- α 생성을 나타내었는데, 이는 NC 대조군(0.04 ng/mL)과 비교하여 약 1922배의 통계적으로 유의한($p < 0.001$) 증가로 확인되었다. 20 μ g/mL의 dexamethasone을 처리한 PC 대조군에서는 42.2 ng/mL의 TNF- α 생성을 나타내어 LPS 대조군 대비 약 43.6~44.0%의 통계적으로 유의한($p < 0.001$) 억제활성으로 확인되었다. 또한, 모든 석산 추출물은 농도-의존적인 경향으로 TNF- α 억제활성이 증가하는 것으로 나타났는데, 잎 에탄올추출물(13.5~44.1% 억제) > 잎 열수추출물(16.0~34.3% 억제) > 뿌리 에탄올추출물(7.7~30.1% 억제) > 뿌리 열수추출물(9.0~17.2% 억제) 순으로 TNF- α 억제활성이 우수한 것으로 평가되었으며, 결론적으로 4종의 석산 추출물 중에서 잎의 에탄올추출물(LR-L-E)에서 가장 우수한 TNF- α 억제활성을 확인할 수 있었다.

[0124] 나아가, 도 10a 및 10b에 나타낸 바와 같이 IL-6 억제활성 평가 결과에서, LPS 처리군은 1012.7~1425.1 pg/mL의 IL-6 생성을 나타내었는데, 이는 NC 대조군(23.5 pg/mL)과 비교하여 약 43.1~60.7배의 통계적으로 유의한($p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$) 증가로 확인되었다. 20 μ g/mL의 dexamethasone을 처리한 PC 대조군에서는 547.0 pg/mL의 IL-6 생성을 나타내어 LPS 대조군 대비 약 47.1~62.6%의 통계적으로 유의한($p < 0.05$ 또는 $p < 0.001$) 억제활성으로 확인되었다. 석산의 열수추출물들(뿌리와 잎)에서는 모든 농도범위에서 LPS 대조군 대비 통계적으로 유의한 IL-6 억제활성을 나타내지 않았다($p > 0.05$). 석산의 뿌리 에탄올추출물에서는 2.5~10 μ g/mL의 농도범위에서 LPS 대조군 대비 19.7~28.3%의 유의한($p < 0.05$) IL-6 억제활성이 확인되었고, 잎의 에탄올추출물에서는 1.25~10 μ g/mL의 범위에서 19.2~31.5%의 유의한($p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$) IL-6 억제활성을 나타내어 잎의 에탄올추출물이 뿌리 에탄올추출물에 비해 상대적으로 우수한 활성을 가지는 것으로 확인되었으며, 결론적으로 4종의 석산 추출물 중에서 잎의 에탄올추출물(LR-L-E)에서 가장 우수한 IL-6 억제활성을 확인할 수 있었다.

[0126] 실시예 5. 석산 추출물 처리에 따른 항아토피 활성 확인

[0127] 5-1. HaCaT 세포에서 시료독성 평가 결과

[0128] 석산추출물 4종을 1.25~10 μ g/mL의 농도범위에서 시료독성을 평가한 결과, 도 11a 및 11b에 나타낸 바와 같이 TNF- α +IFN- γ (T+I) 처리군과 비교하여 뿌리 열수추출물 100.9~108.6%, 잎 열수추출물 103.2~123.8%, 뿌리 에탄올추출물 105.9~121.8%, 잎 에탄올추출물 105.3~121.8%의 세포생존율을 나타내어 모든 시료에서 독성이 없는 것으로 평가되었다.

[0130] 5-2. 아토피 피부염 관련 물질의 억제 활성 확인

[0131] 세포에 대한 독성이 없는 농도범위에서 T+I 처리를 통한 아토피를 유발하고 아토피 관련 물질인 IL-6 및 IL-8 생성 억제활성 평가 결과는 각각 도 12 및 13에 나타내었다.

[0132] 먼저, 도 12 a 및 12b에 나타낸 바와 같이 IL-6 억제활성 평가 결과에서, T+I 처리군은 1779.3~1810.2 pg/mL의 IL-6 생성을 나타내어 NC 대조군(113.8 pg/mL) 대비 약 15.6~15.8배의 통계적으로 유의한($p < 0.001$) 증가를 보였다. 또한, 20 μ g/mL의 dexamethasone을 처리한 PC 대조군에서는 1121.9 pg/mL의 IL-6 생성을 나타내어 T+I 대조군 대비 약 39.5~40.6%의 통계적으로 유의한($p < 0.001$) 억제활성으로 확인되었다. 석산 열수추출물의 경우, 뿌리는 모든 농도범위에서 T+I 처리군 대비 통계적으로 유의한 IL-6 억제활성을 나타내지 않았지만($p > 0.05$), 잎의 경우 10 μ g/mL의 농도에서 10.7%의 유의한 IL-6 억제활성을 나타냈다. 석산 에탄올추출물의 경우, 뿌리는 1.25~10 μ g/mL의 농도범위에서 T+I 대조군 대비 11.9~23.2%의 유의적인 IL-6 억제활성이 확인되었고, 잎은 동일 농도범위에서 16.1~28.3%의 억제활성을 나타내어 잎 에탄올추출물이 뿌리 에탄올추출물보다 IL-6 억제활성이 상대적으로 우수한 것으로 확인되었다. 결론적으로 4종의 석산 추출물 중에서 잎의 에탄올추출물(LR-L-E)에서 가장 우수한 IL-6 억제활성을 확인할 수 있었다.

[0133] 다음으로, 도 13a 및 13b에 나타낸 바와 같이 IL-8 억제활성 평가 결과에서, T+I 처리군은 1441.8~1487.1 pg/mL의 IL-8 생성을 나타내어 NC 대조군(305.7 pg/mL) 대비 약 4.7~4.9배의 통계적으로 유의한($p < 0.001$) 증가로 확인되었다. 20 μ g/mL의 dexamethasone을 처리한 PC 대조군에서는 537.2 pg/mL의 IL-8 생성을 나타내어 T+I 처리군 대비 약 79.6~80.4%의 통계적으로($p < 0.001$) 유의한 억제활성으로 확인되었다. 모든 석산 추출물에서 농도-의존적인 경향으로 IL-8 억제활성이 증가되었는데, 잎 에탄올추출물(30.2~70.8% 억제) > 뿌리 에탄올추출

물(15.5~57.7% 억제) > 잎 열수추출물(-2.6~42.6% 억제) > 뿌리 열수추출물(-3.0~21.3% 억제) 순으로 IL-8 억제활성이 우수한 것으로 평가되었다. 결론적으로 4종의 석산 추출물 중에서 잎의 에탄올추출물(LR-L-E)에서 가장 우수한 IL-6 억제활성을 확인할 수 있었다.

[0135] 실시예 6. 석산 추출물 처리에 따른 보습증진 활성 확인

[0136] HaCaT 세포에서 보습인자인 hyaluronic acid(HA) 생성 증진활성을 평가한 결과는 도 14a 및 14b에 나타난 바와 같이, 무처리구인 NC 대조군에서는 259.9~289.1 ng/mL의 HA 생성량을 나타냈으며, 이미 잘 알려진 보습촉진 물질인 N-acetylglucosamine (5 mg/mL)을 처리한 PC 대조군에서는 469.0 ng/mL로 NC 대조군 대비 약 1.62~1.81배의 유의한(p<0.001) HA 생성 증진활성을 확인할 수 있었다. 모든 석산 추출물에서 농도-의존적인 HA 생성 증진활성이 확인되었는데, 잎 열수추출물(1.15~1.95배 증가) > 뿌리 열수추출물(0.95~1.87배 증가) > 잎 에탄올추출물(1.25~1.78배 증가) > 뿌리 에탄올추출물(0.94~1.28배 증가) 순으로 HA 생성 증진활성이 우수한 것으로 나타났다. 결론적으로 4종의 석산 추출물 중에서 잎의 열수추출물(LR-L-HW)에서 가장 우수한 HA 생성 증진활성을 확인할 수 있었다.

[0138] 실시예 7. 석산 추출물 처리에 따른 항주름 활성 확인

[0139] 최근 연구들에 따르면, 엘라스틴 등을 분해하는 엘라스타제(Elastase)의 활성 증가는 피부의 탄력섬유를 감소시킴으로써 피부 주름 형성에 기여하는 것으로 알려져 있다. 이에 따라, 석산 추출물의 항주름 활성을 확인하기 위하여, 석산 추출물의 엘라스타제의 억제 활성을 확인하였다.

[0140] 구체적으로, 석산 추출물은 상기 실시예 1-1.과 동일하게 제조하되, 석산의 뿌리는 그대로 사용하였으나, 석산의 잎은 석산의 줄기로 대체하여 사용하였고, 샘플은 대조군으로서 DIW(Distilled water: 증류수), 1% DMSO, 10% DMSO/DIW 내 우르솔산(Ursoic acid)을 사용하였다.

[0141] 먼저 96 웰 플레이트에서 샘플 (20 μ L), 2 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) (55 μ L) 및 0.8 mM STANA solution (125 μ L)을 혼합하고, 플레이트 진탕기를 이용하여 진탕하여 O.D (390 nm) 값을 확인하였다. 이 후, 플레이트를 밀봉하고, 37℃에서 15분 간 배양하고, 1 μ g/ml의 Elastase 50 μ L를 첨가하였다. 이 후, 플레이트 진탕기를 이용하여 진탕하여 O.D (390 nm) 값을 확인하였다. 다시 플레이트를 밀봉하고, 37℃에서 10분, 20분, 30분 및 130분 간 배양하여 O.D (390 nm) 값을 확인하였다. 각 구체적인 실험 조건과 실험 결과는 하기 도 15 내지 도 26과 같았다.

[0142] 그 결과, 각 추출물에 농도 의존적으로 엘라스타제 억제율이 증가하였으며, 처리 시간(10, 20, 30, 130분)이 증가함에 따라 엘라스타제 억제율이 감소함을 확인할 수 있었다.

[0143] 또한, 처리 시간(10, 20, 30, 130분)에 관계없이, 석산줄기(EtOH) > 석산뿌리(EtOH) > 석산뿌리 (열수) > 석산줄기 (열수) 순으로 엘라스타제 억제 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

[0144] 제조예

[0145] 상기 실시예에 따른 조성물을 유연화장수, 피부외용제, 캡슐 또는 음료로 제형화하였다.

[0148] 제조예 1. 유연화장수의 제조

[0149] 실시예 2-1의 조성물을 함유한 유연화장수의 제조에는 하기 [표 1]에 나타난 바와 같다.

표 1

성분	함량(중량 %)
실시예 2-1의 조성물	5.00
글리세린	5.00
부틸렌글리콜	2.00

프로필렌글리콜	2.00
폴리옥시에틸렌(60)경화피마자유	2.00
에탄올	10.0
트라이에탄올아민	3.00
방부제	0.50
색소	0.20
향료	0.30
정제수	70.0
합계	100

[0153] 제조예 2. 피부의용제의 제조

[0154] 실시예 2-1의 조성물을 함유한 피부의용제의 제조에는 하기 [표 2]에 나타낸 바와 같다.

표 2

[0156]

성분	함량(중량 %)
실시예 2-1의 조성물	5.10
글리세린	5.00
부틸렌글리콜	0.60
히아루론산 추출물	0.02
베타글루칸	4.00
카보머	0.15
카프릴릭 카프릭 트리글리세라이드	0.50
스쿠알렌	0.20
스테아릴 글루코사이드	5.00
스테아릴 알콜	4.00
소르비탄 스테아레이트	0.10
정제수	75.33
합계	100

[0158] 제조예 3. 캡슐의 제조

[0159] 실시예 2-1의 조성물을 함유한 캡슐의 제조에는 하기 [표 3]에 나타낸 바와 같다.

표 3

[0161]

성분	함량(중량 %)
실시예 2-1의 조성물	50
전분	23
유당	23
탈크	1
스테아린마그네슘	3
합계	100

[0163] 제조예 4. 음료의 제조

[0164] 실시예 2-1의 조성물을 함유한 음료의 제조에는 하기 [표 4]에 나타낸 바와 같다.

표 4

[0166]

성분	함량(중량 %)
실시예 2-1의 조성물	7
비타민	8
식이섬유	6
액상과당	20
유화제	60
레몬향	7
정제수	5
합계	100

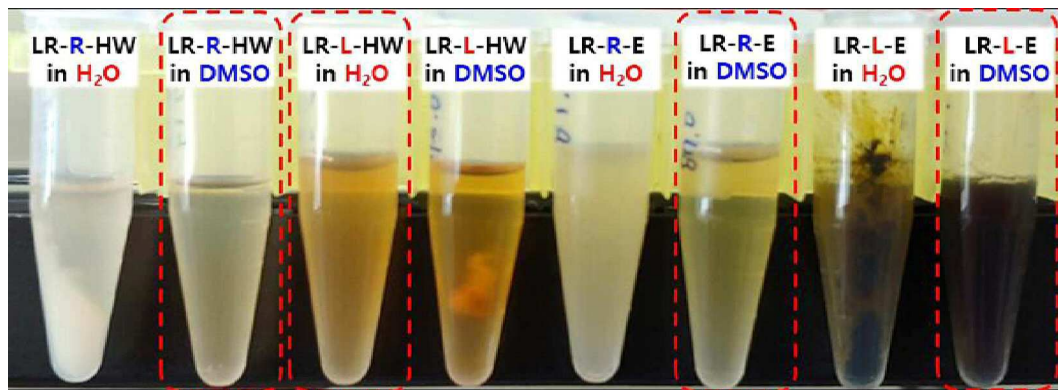
[0168] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

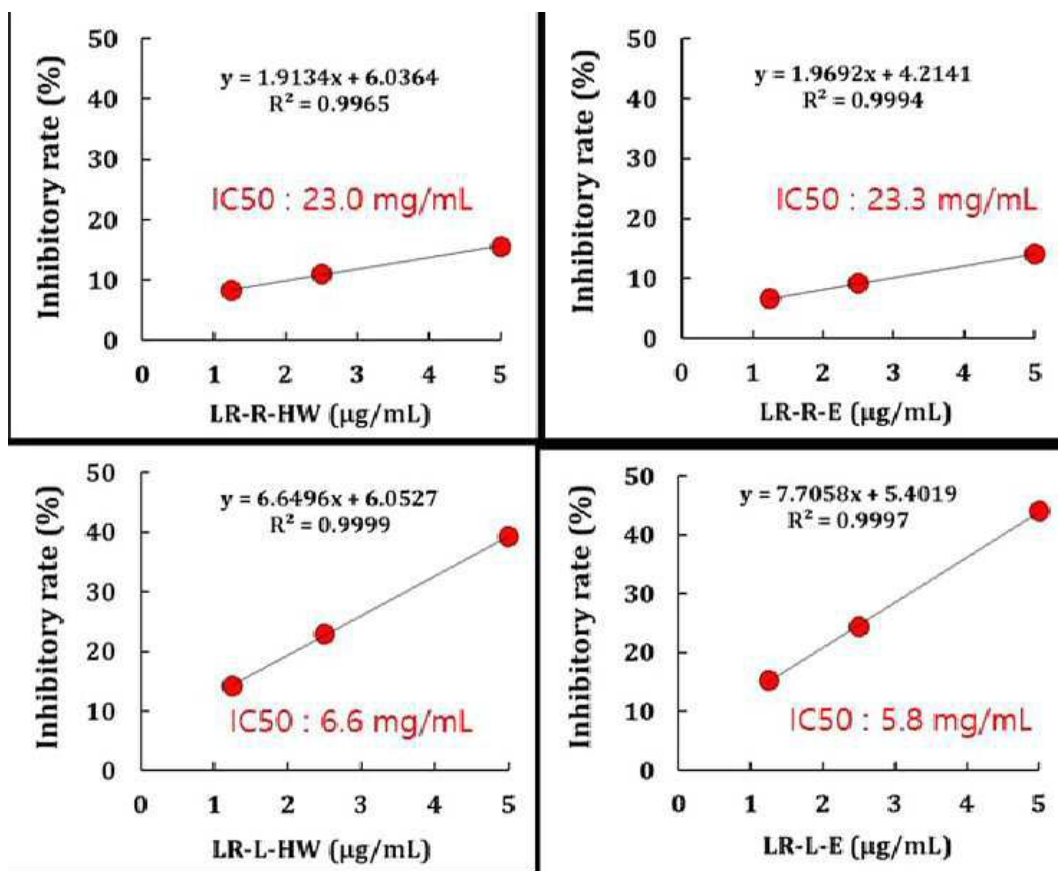
도면1



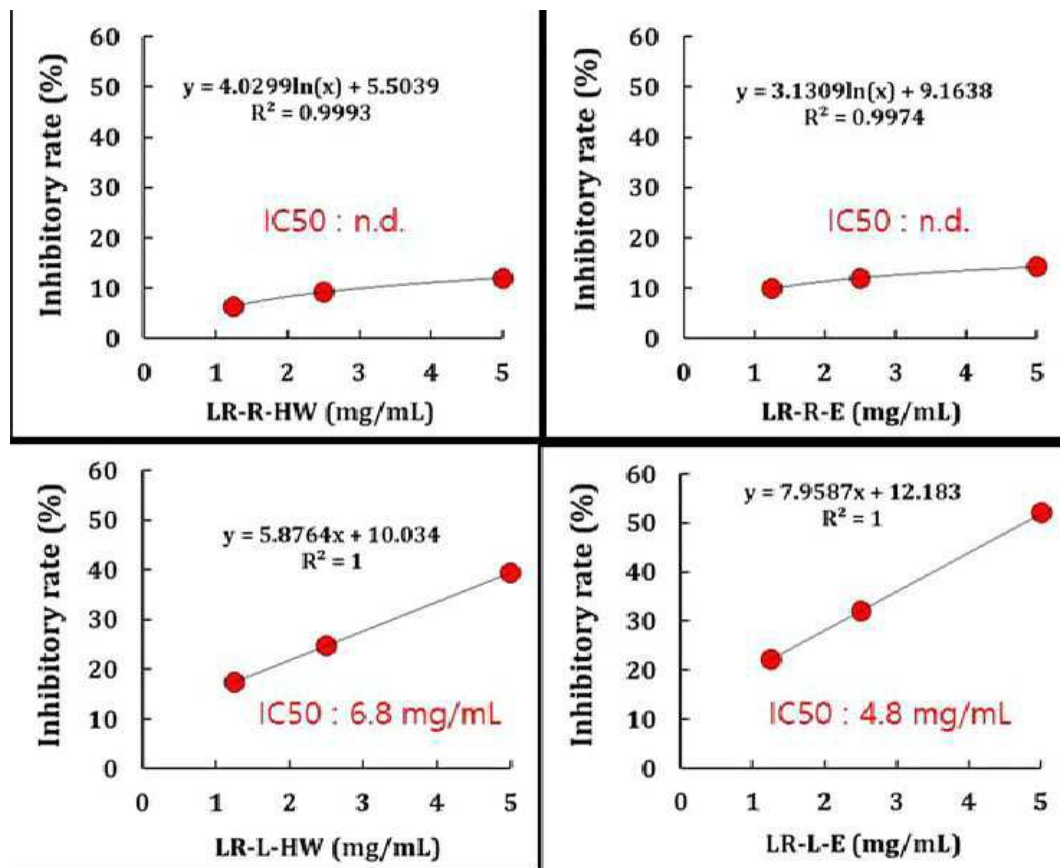
도면2



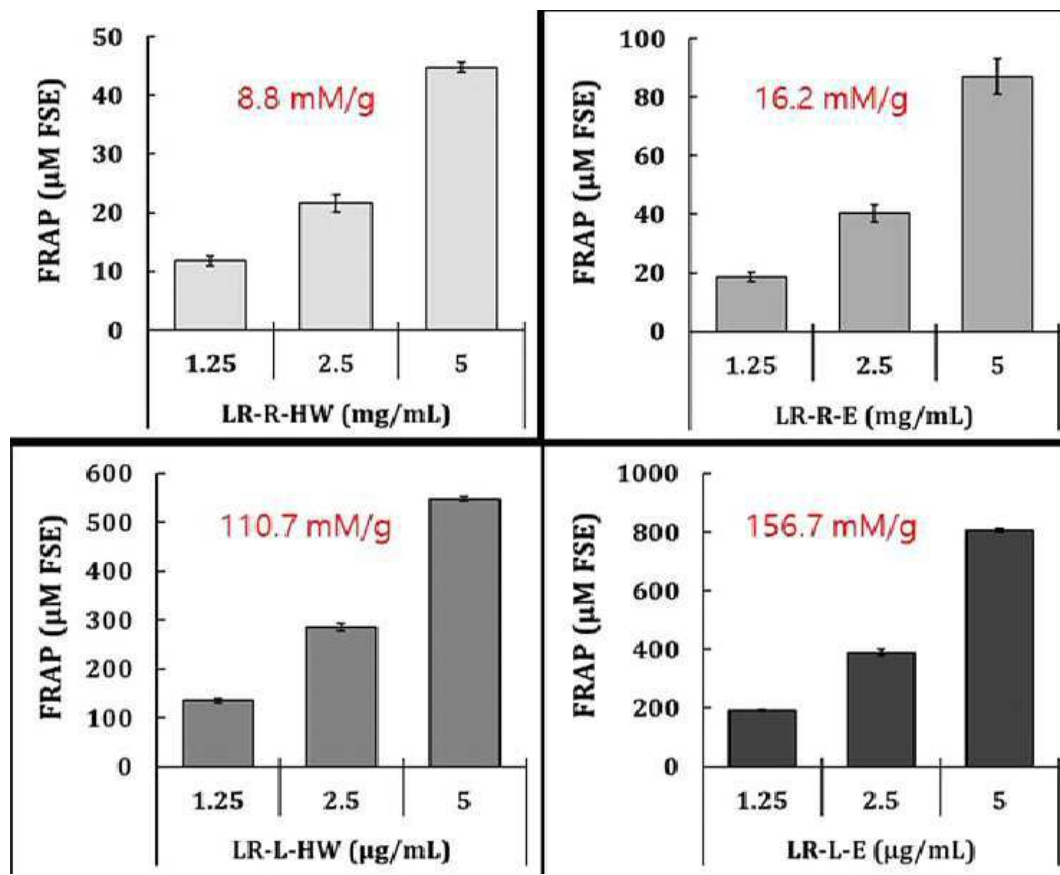
도면3



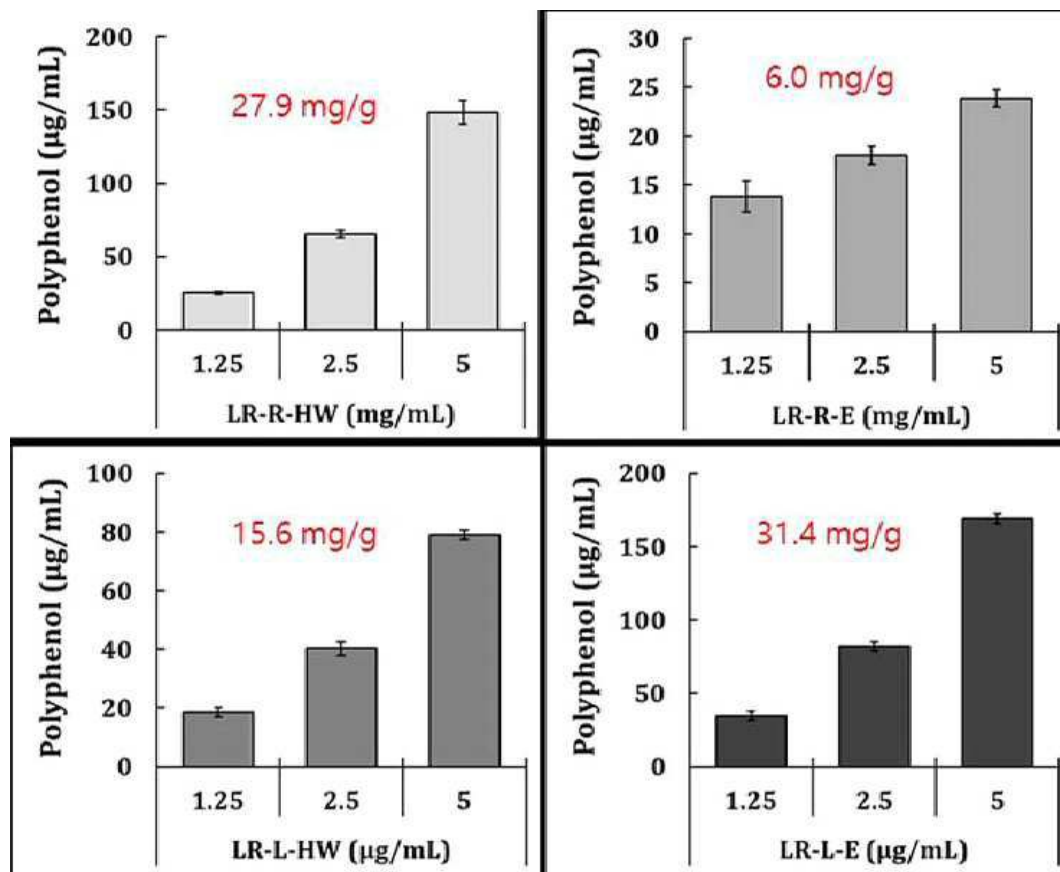
도면4



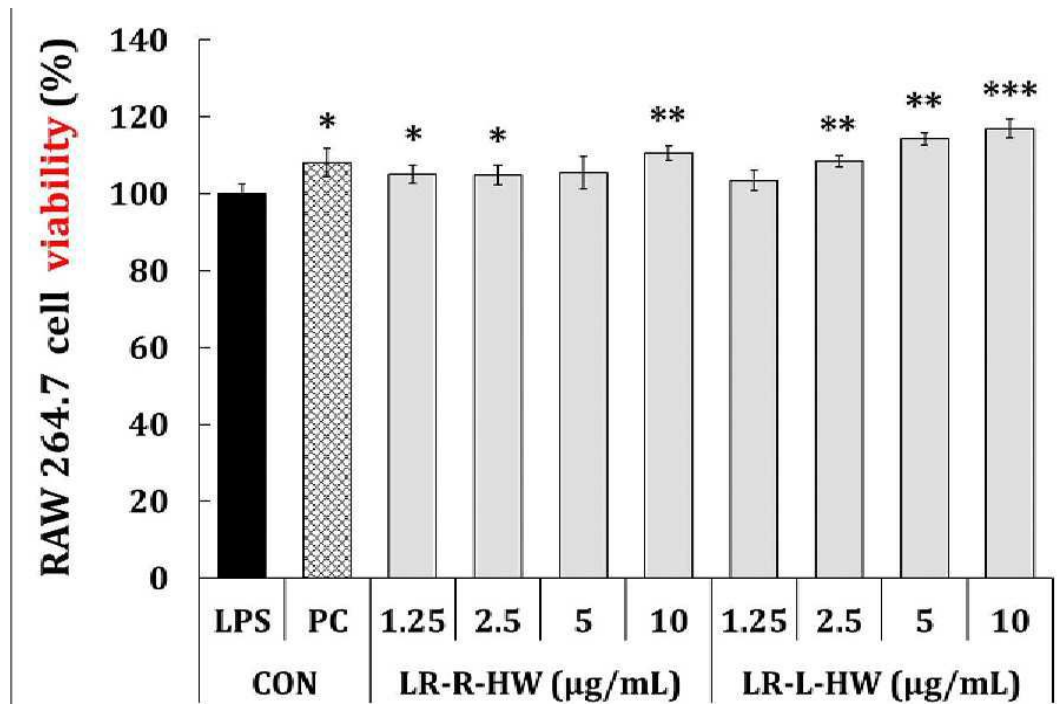
도면5



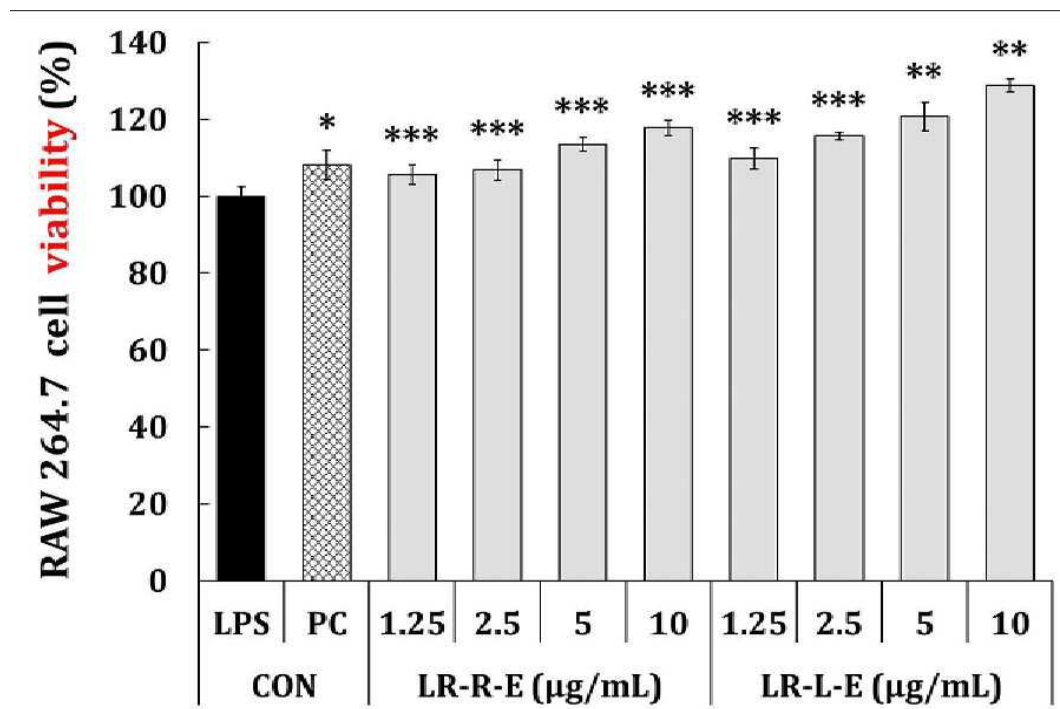
도면6



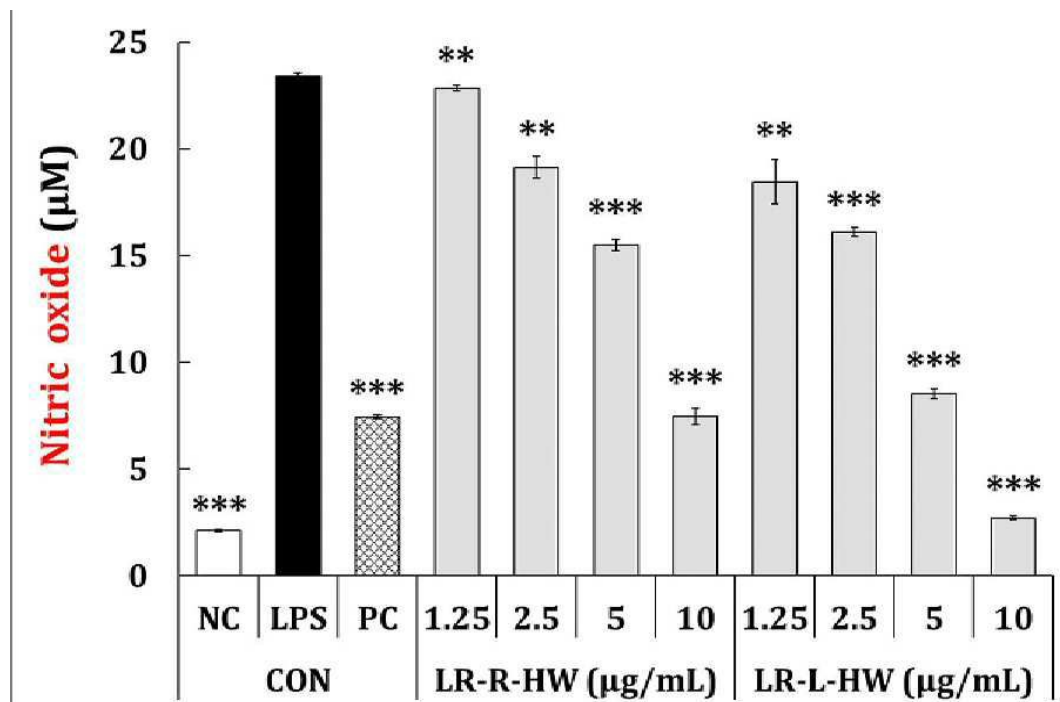
도면7a



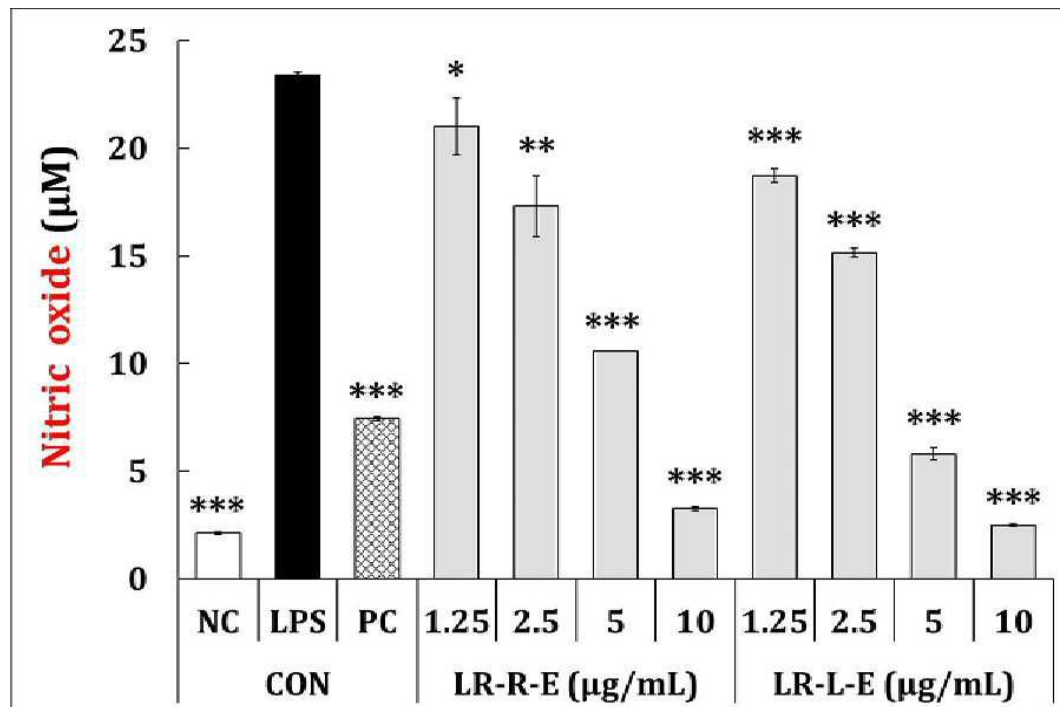
도면7b



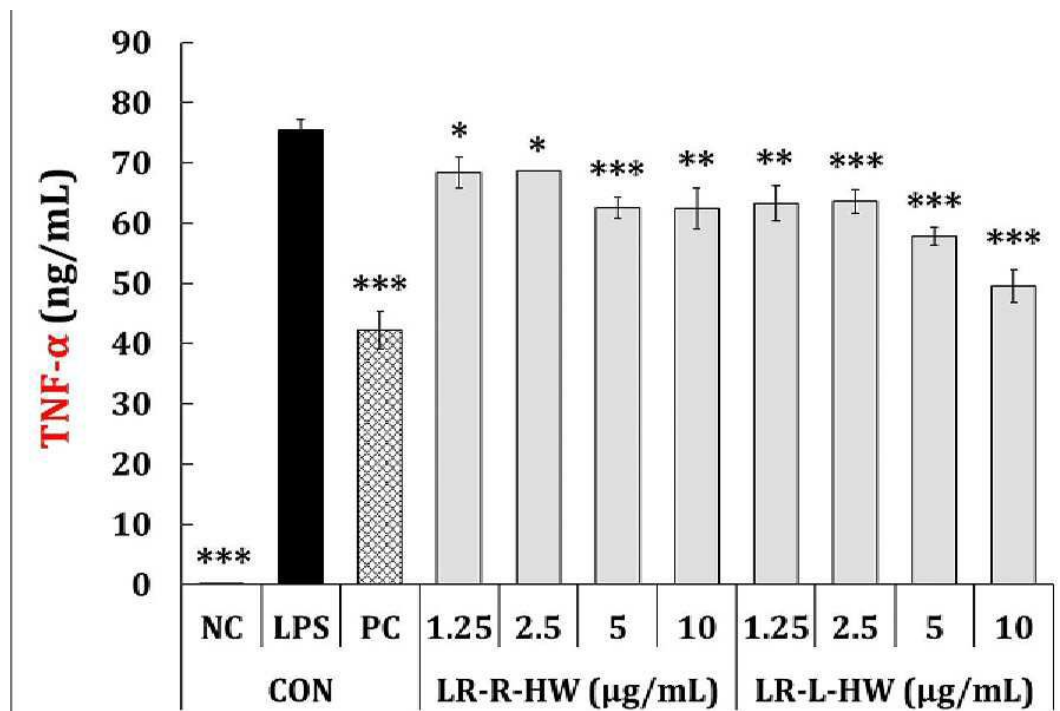
도면8a



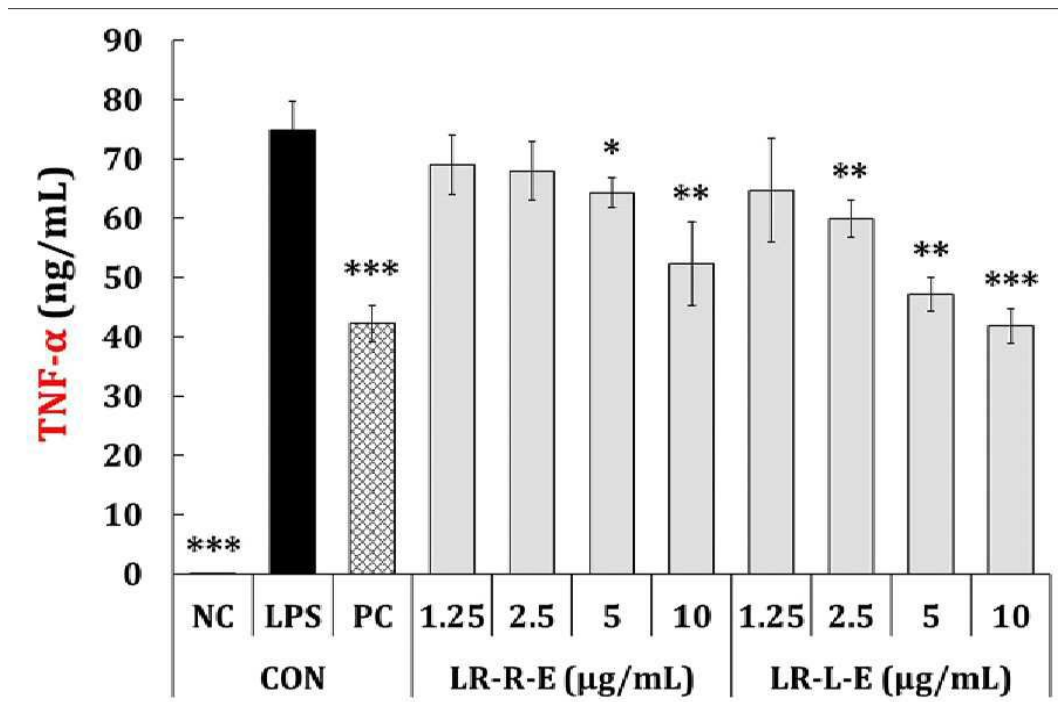
도면8b



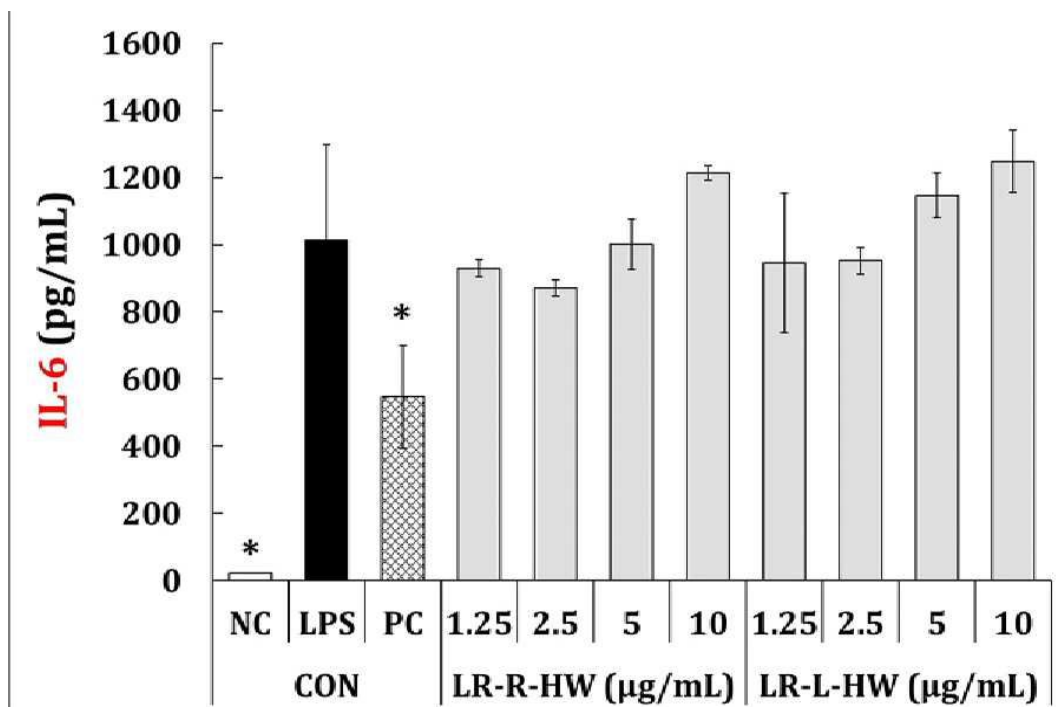
도면9a



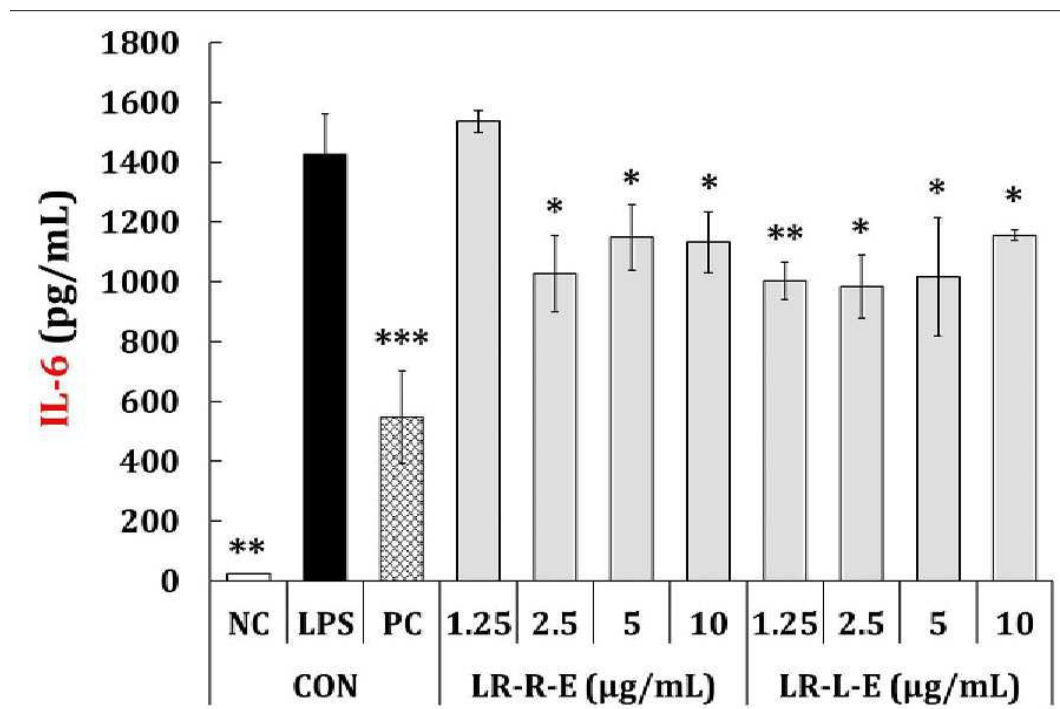
도면9b



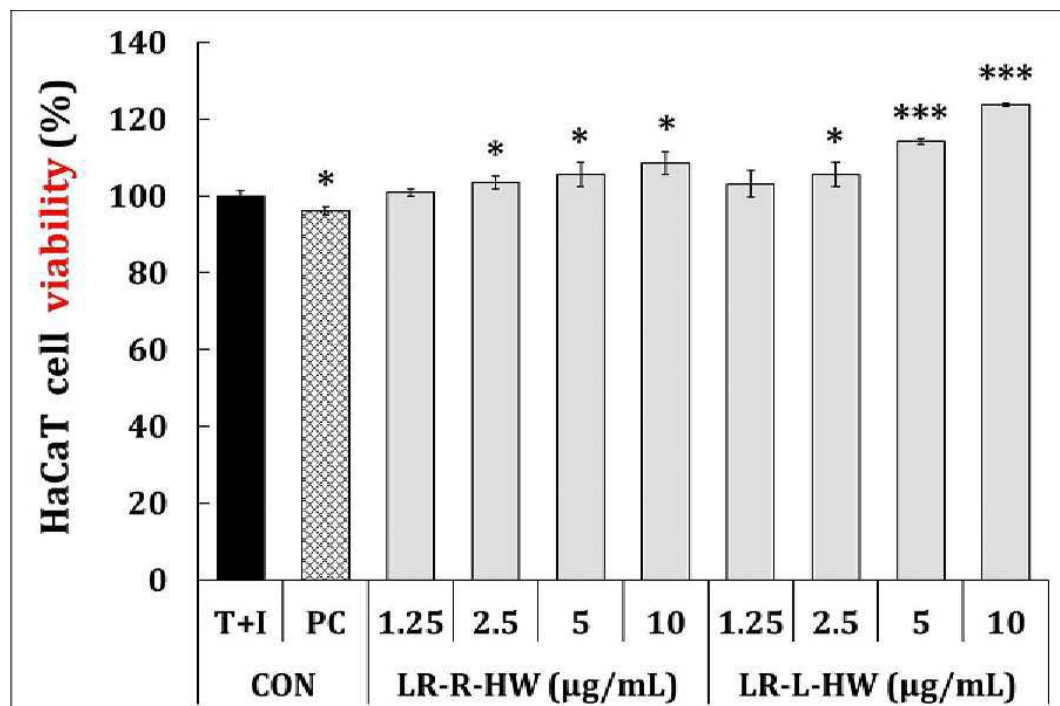
도면10a



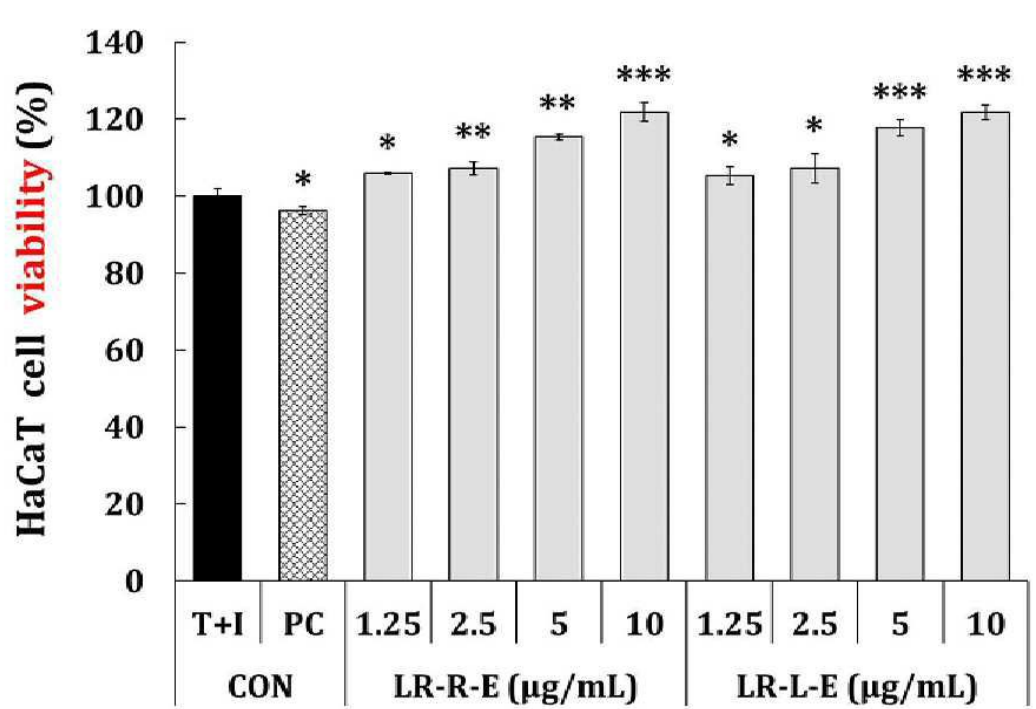
도면10b



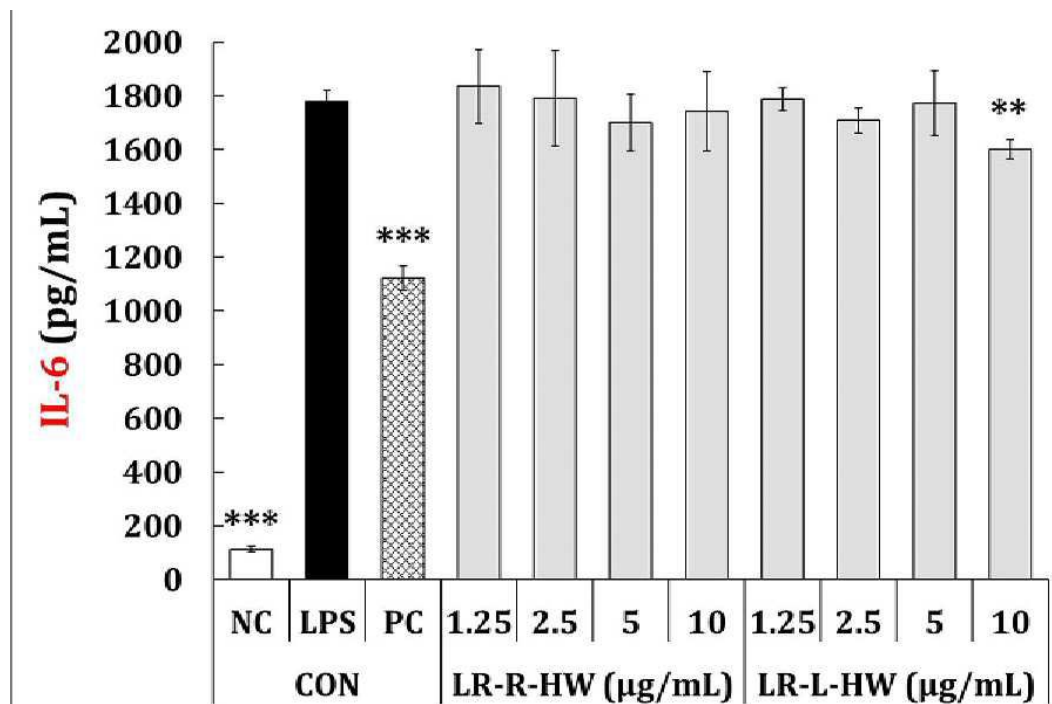
도면11a



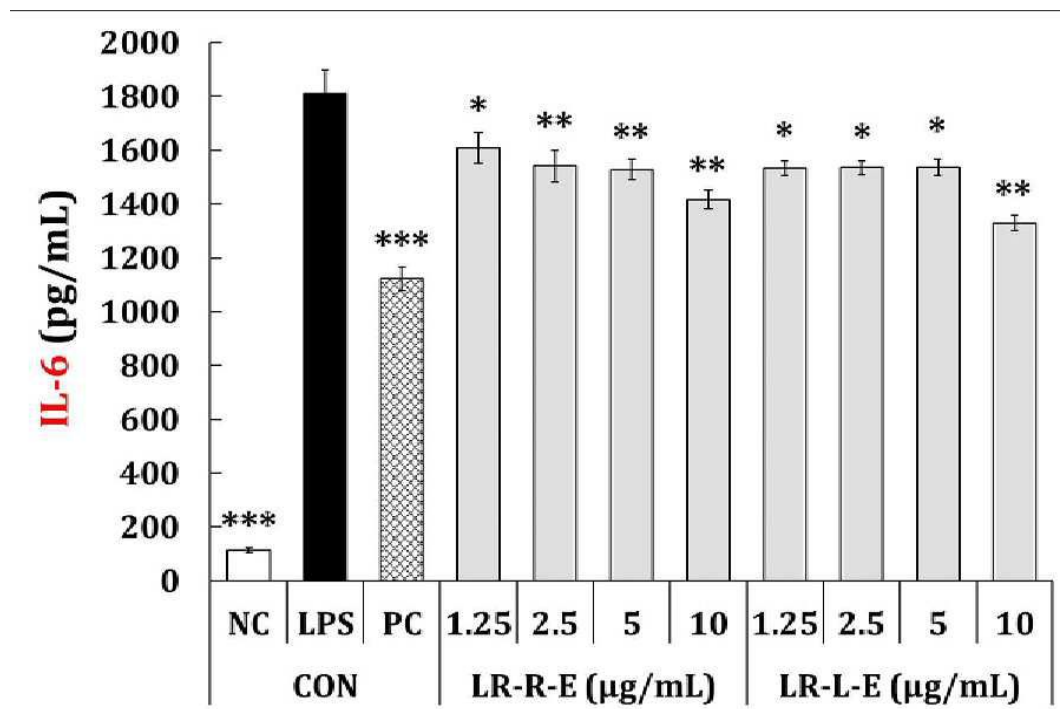
도면11b



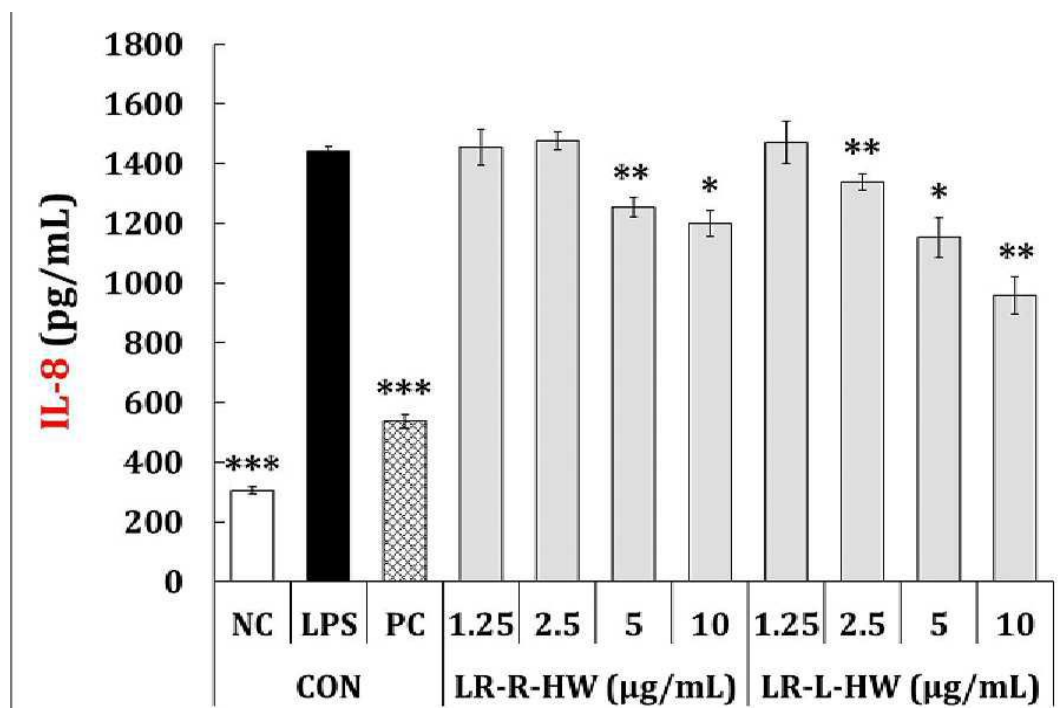
도면12a



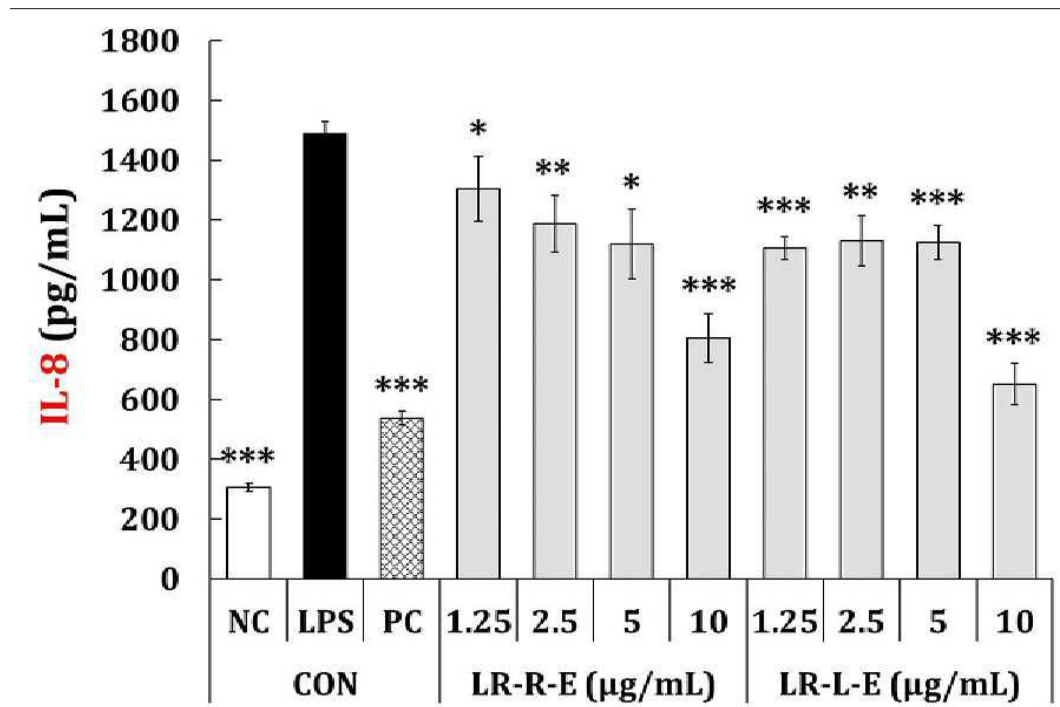
도면12b



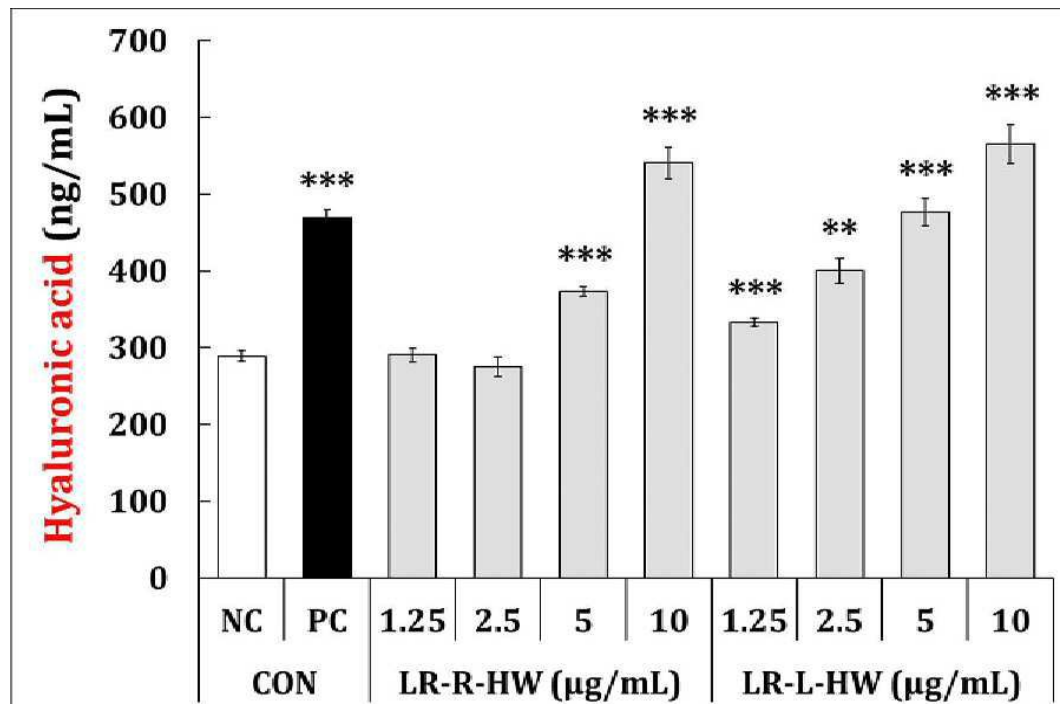
도면13a



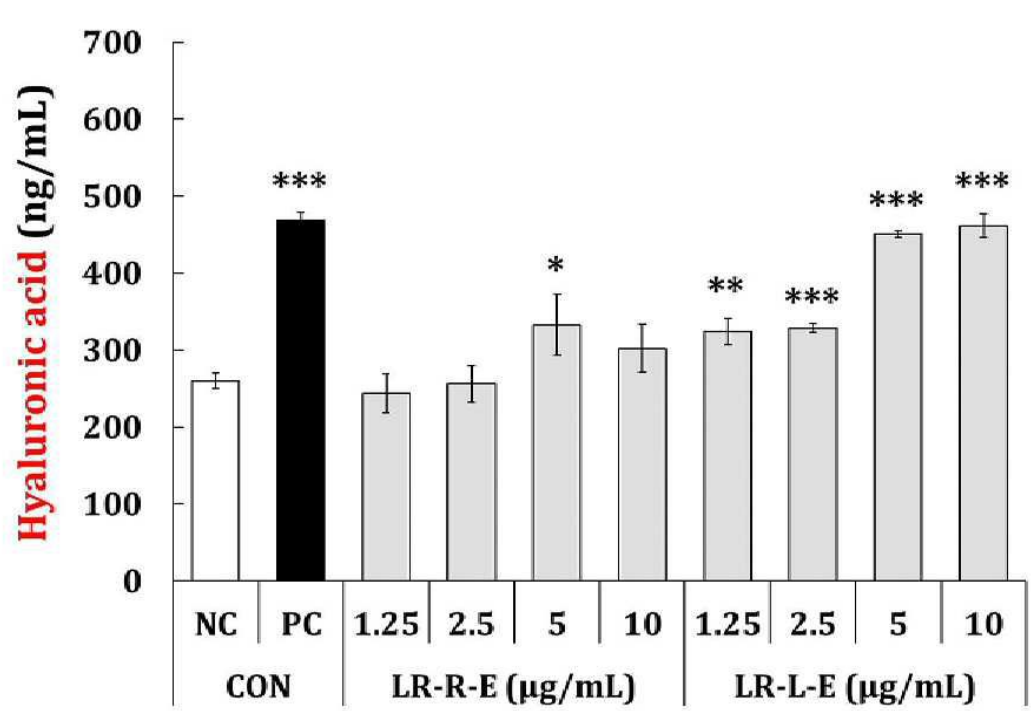
도면13b



도면14a



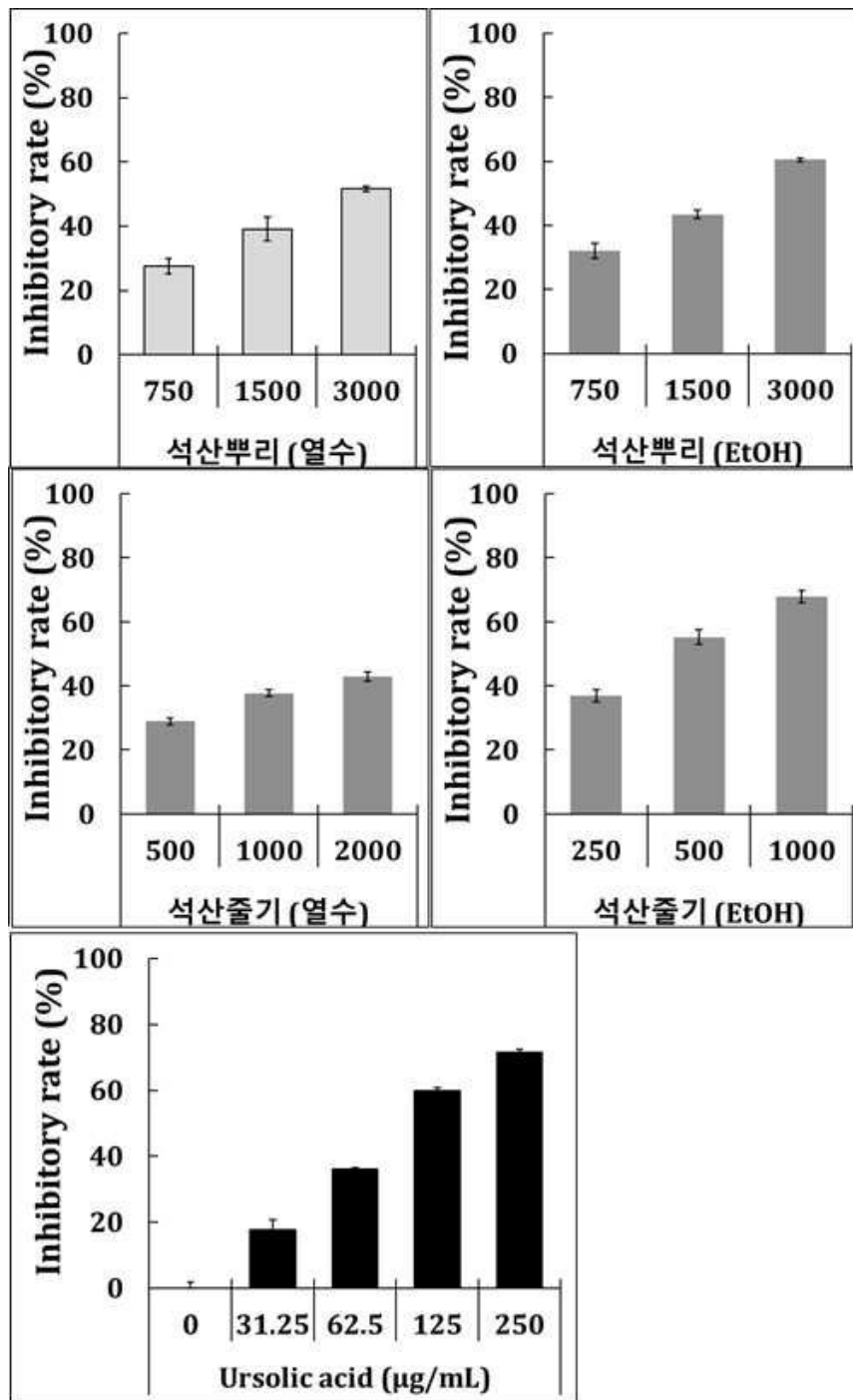
도면14b



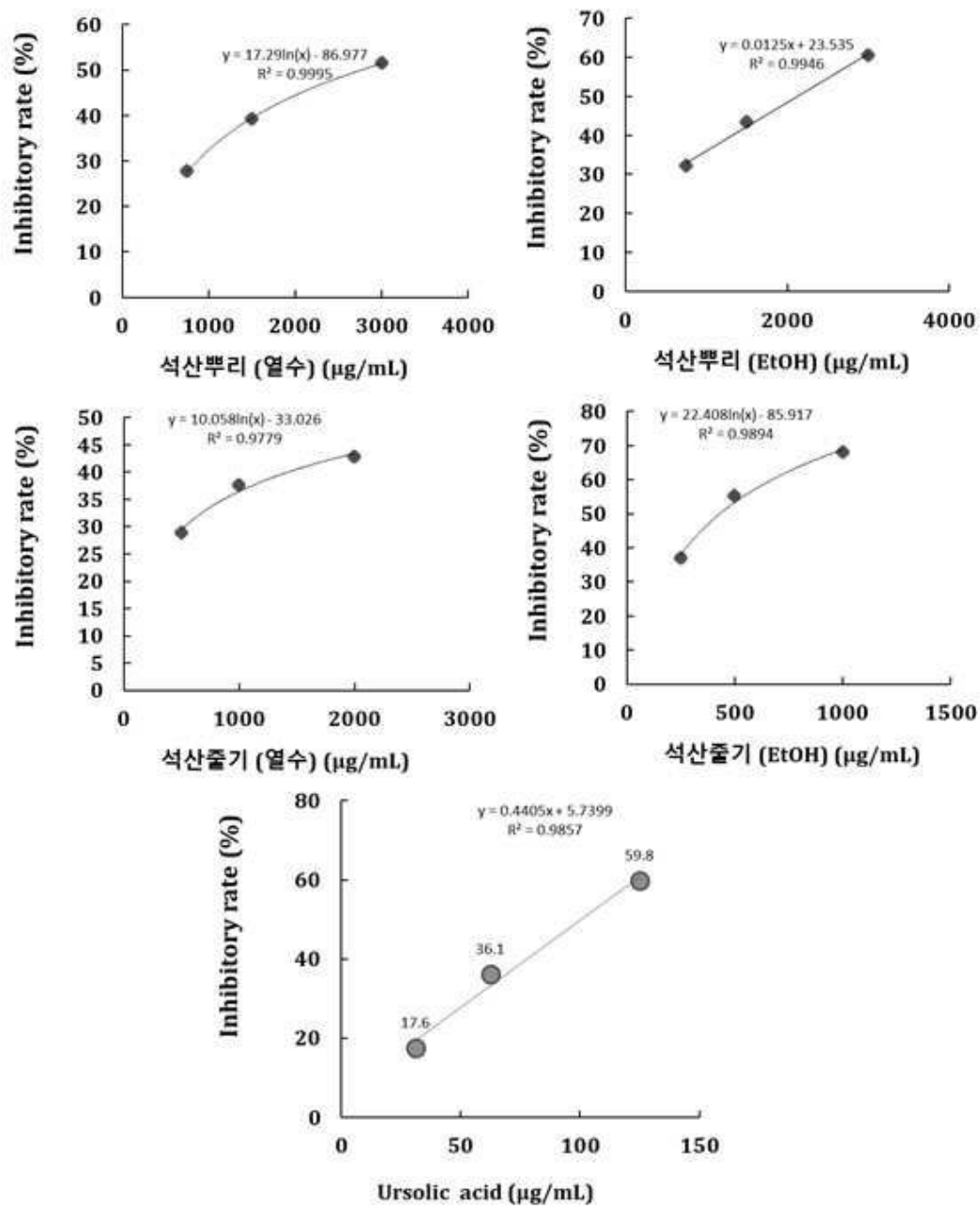
도면15

Elastase activity (10min)																	IC50 (μg/ml)			
ST ANA	1 μg/ml Elastase	Sample	Conc. (μg/ml)	OD (Before Elastase)			OD (10min)			OD (10min Before elastase)			Inhibitory rate (%)							
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	Average	1	2	3	Average	Sider		
○	○	DIW	-	0.292	0.288	0.289	1.114	1.149	1.124	0.822	0.861	0.835	0.839	2.1	-2.6	0.5	0.0	2.4		
		1% DMISO	-	0.293	0.291	0.291	1.112	1.056	1.132	0.819	0.764	0.841	0.808	2.4	9.0	-0.2	3.7	4.7		
		Ureolic acid	0	0.29	0.29	0.291	1.059	1.036	1.065	0.769	0.748	0.774	0.764	-0.7	2.1	-1.4	0.0	1.8		
		In 10% DMISO/DIW	31.25	0.287	0.286	0.288	0.89	0.936	0.924	0.603	0.649	0.636	0.629	21.0	15.0	16.7	17.6	3.1		
		(μg/ml)	62.5	0.288	0.286	0.289	0.774	0.777	0.775	0.486	0.491	0.486	0.488	36.4	35.7	36.4	36.1	0.4		
			125	0.286	0.284	0.285	0.6	0.591	0.584	0.314	0.307	0.299	0.307	58.9	59.8	60.8	59.8	1.0		
			250	0.292	0.287	0.287	0.501	0.506	0.513	0.209	0.219	0.226	0.218	72.6	71.3	70.4	71.5	1.1		
		산신분리 (물속)	750	0.297	0.29	0.29	0.665	0.67	0.696	0.568	0.580	0.606	0.585	29.7	28.2	25.0	27.6	2.4		
			1500	0.302	0.299	0.298	0.824	0.762	0.778	0.522	0.463	0.480	0.492	35.4	42.7	39.4	39.2	3.7		
			3000	0.306	0.296	0.302	0.703	0.688	0.685	0.397	0.393	0.383	0.391	50.9	51.4	52.6	51.6	2.3		
		산신분리 (EtOH)	750	0.29	0.288	0.287	0.86	0.828	0.823	0.570	0.540	0.556	0.549	29.5	33.2	33.7	32.1	2.3		
			1500	0.29	0.288	0.288	0.736	0.756	0.745	0.446	0.468	0.457	0.457	44.8	42.1	43.4	43.4	0.4		
			3000	0.297	0.297	0.3	0.619	0.61	0.621	0.322	0.313	0.321	0.319	60.1	61.5	60.3	60.6	1.6		
		산신분리 (물속)	500	0.298	0.298	0.298	0.87	0.862	0.866	0.572	0.584	0.568	0.575	29.2	27.7	29.7	28.9	1.0		
			1000	0.305	0.304	0.305	0.818	0.807	0.8	0.513	0.503	0.485	0.504	36.5	37.7	38.7	37.7	1.1		
			2000	0.315	0.316	0.313	0.788	0.779	0.793	0.473	0.463	0.480	0.462	41.5	42.7	44.3	42.8	1.4		
			250	0.299	0.3	0.297	0.825	0.808	0.808	0.793	0.526	0.508	0.496	0.510	34.9	37.1	38.6	36.9	1.9	
		산신분리 (EtOH)	500	0.304	0.302	0.302	0.656	0.653	0.685	0.352	0.351	0.383	0.362	56.4	56.6	52.6	55.2	2.3		
			1000	0.314	0.315	0.313	0.558	0.573	0.588	0.244	0.258	0.275	0.259	69.8	68.1	66.0	67.9	1.9		

도면16



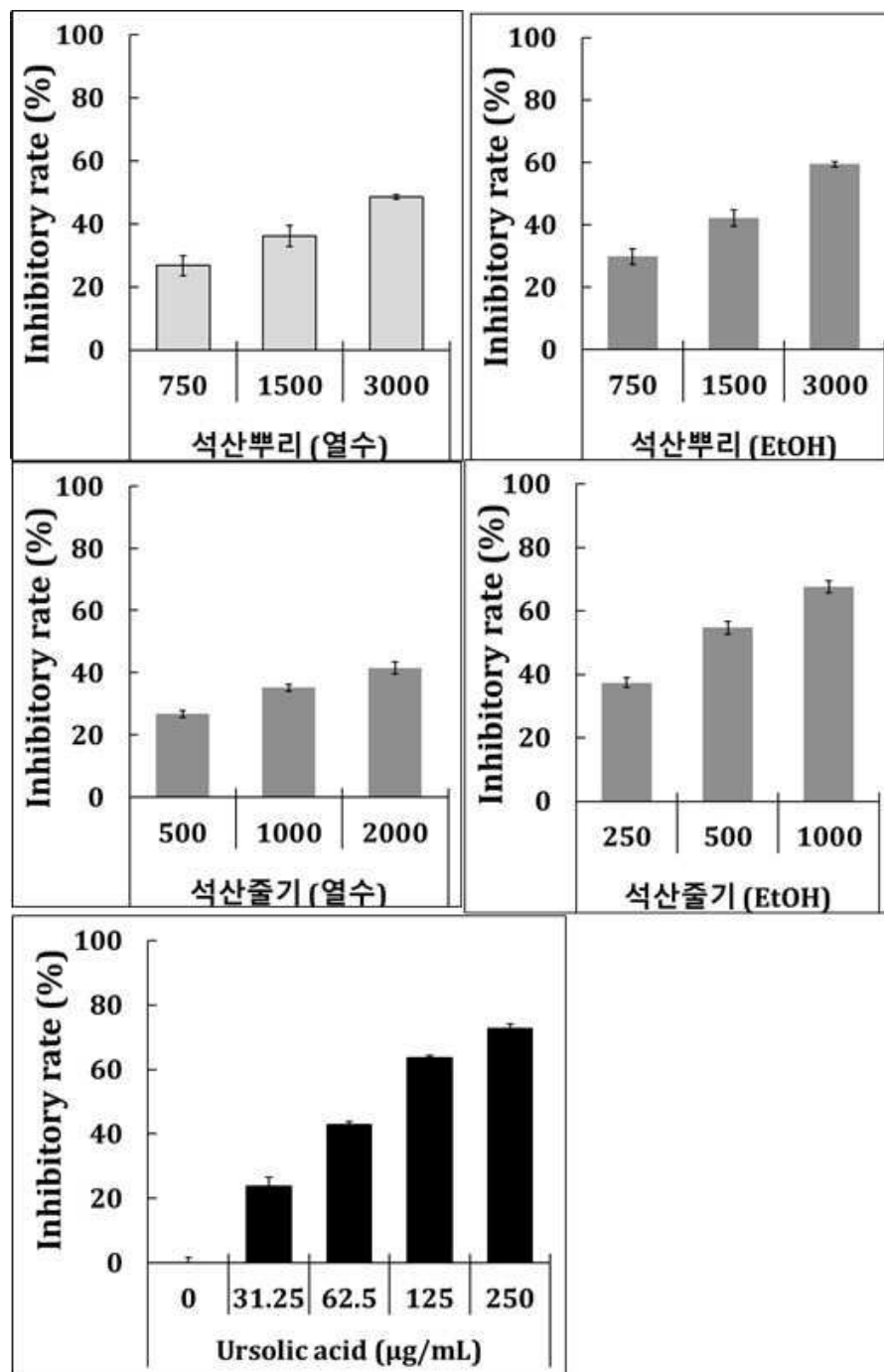
도면17



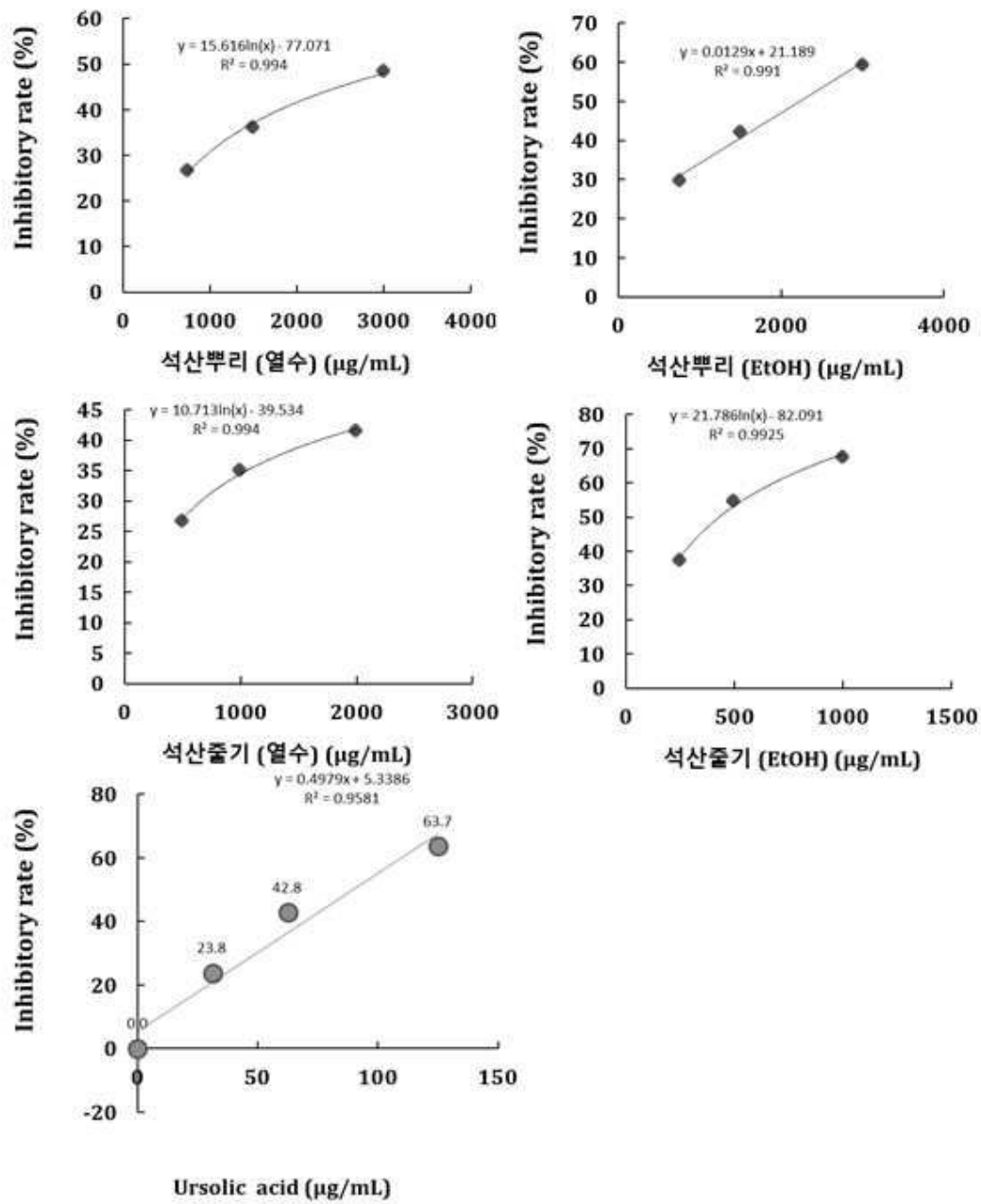
도면18

Elastase activity (20min)																				IC 50 (µg/ml)
STANA	5 µg/mL Elastase	Sample	Conc. (µg/ml)	OD (Before Elastase)			OD (20min)			OD (20min Before elastase)			Inhibitory rate (%)							
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	Average	1	2	3	Average	Stdw		
○	○	DIW	-	0.292	0.288	0.289	1.574	1.631	1.602	1.282	1.343	1.313	1.313	23	-23	0.0	0.0	2.3		
		1% DMSO	-	0.293	0.291	0.291	1.574	1.485	1.627	1.281	1.194	1.336	1.270	24	9.0	-1.8	3.2	5.5		
		Ursolic acid in 10% DMSO/DIW (µg/ml)	0	0.29	0.29	0.291	1.47	1.46	1.5	1.180	1.170	1.209	1.186	05	1.4	-1.9	0.0	1.7		
			31.25	0.287	0.286	0.288	1.153	1.215	1.206	0.866	0.929	0.918	0.904	27.0	21.7	22.6	23.8	2.8		
			62.5	0.288	0.286	0.289	0.954	0.975	0.969	0.666	0.689	0.680	0.678	43.9	41.9	42.7	42.8	1.0		90
			125	0.286	0.284	0.285	0.723	0.718	0.707	0.437	0.434	0.432	0.431	63.2	63.4	64.4	63.7	0.7		
			250	0.292	0.287	0.287	0.599	0.613	0.624	0.307	0.326	0.337	0.323	74.1	72.5	71.6	72.7	1.3		
			750	0.297	0.29	0.29	1.189	1.215	1.263	0.892	0.925	0.973	0.930	29.8	27.2	23.4	26.8	3.2		
		석신부리 (열수)	1500	0.302	0.299	0.288	1.159	1.072	1.091	0.857	0.773	0.803	0.811	32.5	39.1	36.8	36.2	3.4		3419
			3000	0.306	0.296	0.302	0.969	0.952	0.947	0.663	0.657	0.645	0.655	47.8	48.3	49.2	48.4	0.7		
			750	0.29	0.288	0.287	1.215	1.176	1.149	0.925	0.888	0.862	0.882	27.2	30.1	32.1	29.8	2.5		
		석신부리 (EtOH)	1500	0.29	0.288	0.288	0.989	1.051	1.03	0.699	0.763	0.742	0.735	45.0	39.9	41.6	42.2	2.6		2233
			3000	0.297	0.297	0.3	0.826	0.806	0.809	0.529	0.509	0.509	0.516	58.4	59.9	59.9	59.4	0.9		
		석신불기 (열수)	500	0.298	0.298	0.298	1.234	1.24	1.213	0.936	0.942	0.975	0.931	26.3	25.8	28.0	26.7	1.1		4362
			1000	0.305	0.304	0.305	1.144	1.127	1.115	0.839	0.823	0.810	0.824	34.0	33.2	36.2	35.1	1.1		
			2000	0.315	0.316	0.313	1.081	1.059	1.031	0.766	0.743	0.718	0.742	38.7	41.5	43.5	41.6	1.9		
			250	0.299	0.3	0.297	1.115	1.092	1.073	0.816	0.792	0.776	0.795	33.8	37.7	38.9	37.4	1.6		
		석신불기 (EtOH)	500	0.304	0.302	0.302	0.862	0.862	0.906	0.558	0.560	0.604	0.574	56.1	55.9	52.5	54.8	2.0		248
			1000	0.314	0.315	0.313	0.704	0.72	0.751	0.390	0.405	0.438	0.411	69.3	68.1	65.5	67.6	1.9		

도면19



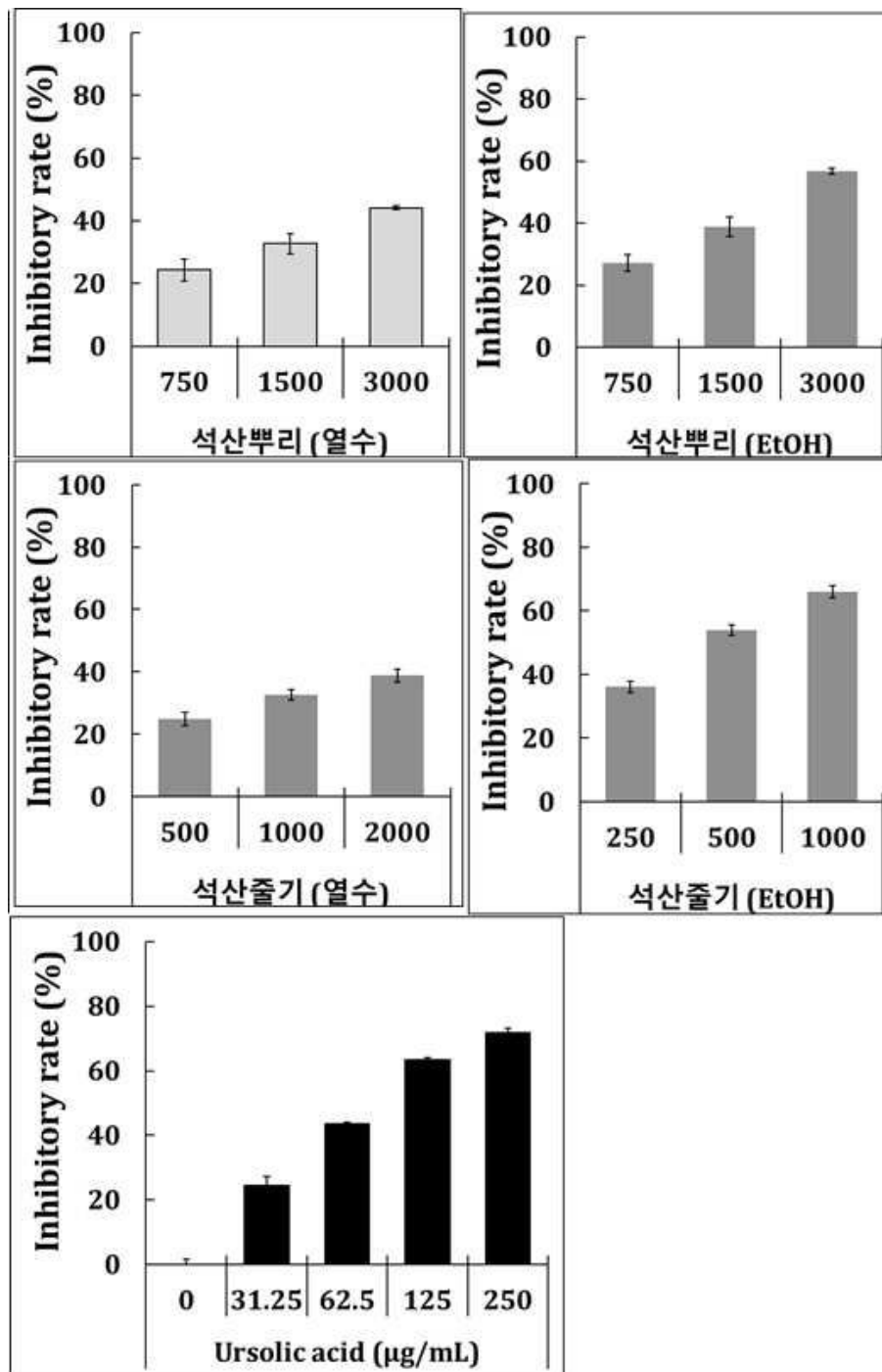
도면20



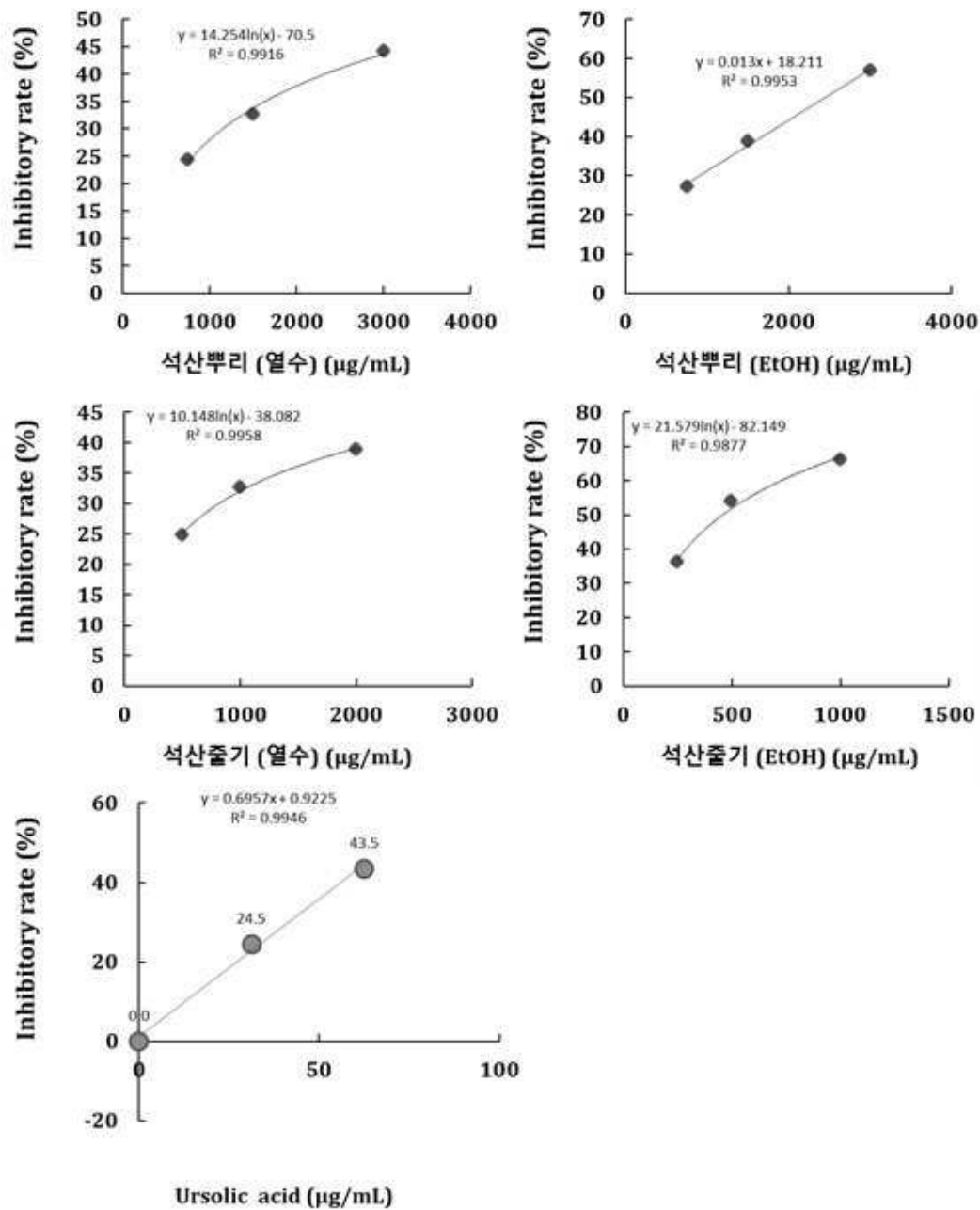
도면21

Elastase activity (30min)																				IC 50 (µg/ml)
ST ANA	5 µg/ml Elastase	Sample	Conc. (µg/ml)	OD (Before Elastase)			OD (30min)			OD (30min Before elastase)			Inhibitory rate (%)						Sider	
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	Average	1	2	3	Average			
○	○	DIW	-	0.292	0.286	0.289	1.628	1.903	1.858		1.615	1.569	1.592		-1.4	1.4	0.0	2.0	71	
		1% DM/ISO	-	0.293	0.291	0.291	1.822	1.729	1.886		1.438	1.595	1.517		9.7	-0.2	4.7	7.0		
		Ursolic acid in 10% DM/ISO/DIW (µg/ml)	0	0.29	0.29	1.709	1.691	1.735	1.419	1.401	1.444	1.421	0.2	1.4	-1.6	0.0	1.5			
			31.25	0.287	0.286	0.288	1.317	1.388	1.375	1.030	1.102	1.087	1.073	27.5	22.5	23.5	24.5	2.7		
			62.5	0.288	0.286	0.289	1.081	1.092	1.1	0.793	0.806	0.811	0.803	44.2	43.3	42.9	43.5	0.7		
			125	0.286	0.284	0.285	0.812	0.806	0.796	0.526	0.522	0.511	0.520	63.0	63.3	64.0	63.4	0.5		
			250	0.292	0.287	0.287	0.672	0.694	0.706	0.380	0.407	0.419	0.402	73.3	71.4	70.5	71.7	1.4		
		석산부리 (濃水)	750	0.297	0.29	0.29	1.397	1.426	1.494	1.100	1.136	1.204	1.147	27.5	25.1	20.6	24.4	3.5		
			1500	0.302	0.299	0.298	1.379	1.284	1.288	1.077	0.985	1.000	1.021	29.0	35.0	34.1	32.7	3.3		
			3000	0.306	0.295	0.302	1.158	1.147	1.139	0.852	0.837	0.837	0.847	43.8	43.8	44.8	44.1	0.6		
		석산부리 (稀水)	750	0.29	0.288	0.287	1.432	1.394	1.351	1.142	1.106	1.064	1.104	24.7	27.1	29.8	27.2	2.6		
			1500	0.29	0.288	0.288	1.161	1.26	1.235	0.871	0.962	0.947	0.927	42.6	36.6	37.6	38.9	3.2		
		석산부리 (EtOH)	3000	0.297	0.297	0.3	0.967	0.948	0.941	0.670	0.651	0.641	0.654	55.8	57.1	57.7	56.9	1.0		
			500	0.298	0.296	0.298	1.455	1.462	1.402	1.157	1.164	1.104	1.142	23.7	23.2	27.2	24.7	2.2		
		석산부리 (濃水)	1000	0.305	0.304	0.305	1.354	1.326	1.304	1.049	1.021	0.999	1.023	30.8	32.7	34.1	32.5	1.7		
○	○	석산부리 (濃水)	2000	0.315	0.316	0.313	1.274	1.245	1.245	1.21	0.959	0.929	0.897	0.928	36.8	38.7	40.9	38.8	2.0	
			250	0.299	0.3	0.297	1.296	1.269	1.241	0.997	0.969	0.944	0.970	34.3	36.1	37.8	36.0	1.7		
			500	0.304	0.302	0.302	0.989	0.988	1.029	0.885	0.886	0.727	0.899	54.8	54.8	53.1	53.9	1.6		
		석산부리 (EtOH)	1000	0.314	0.315	0.313	0.807	0.824	0.86	0.493	0.509	0.547	0.516	67.5	66.4	63.9	66.0	1.8		

도면22



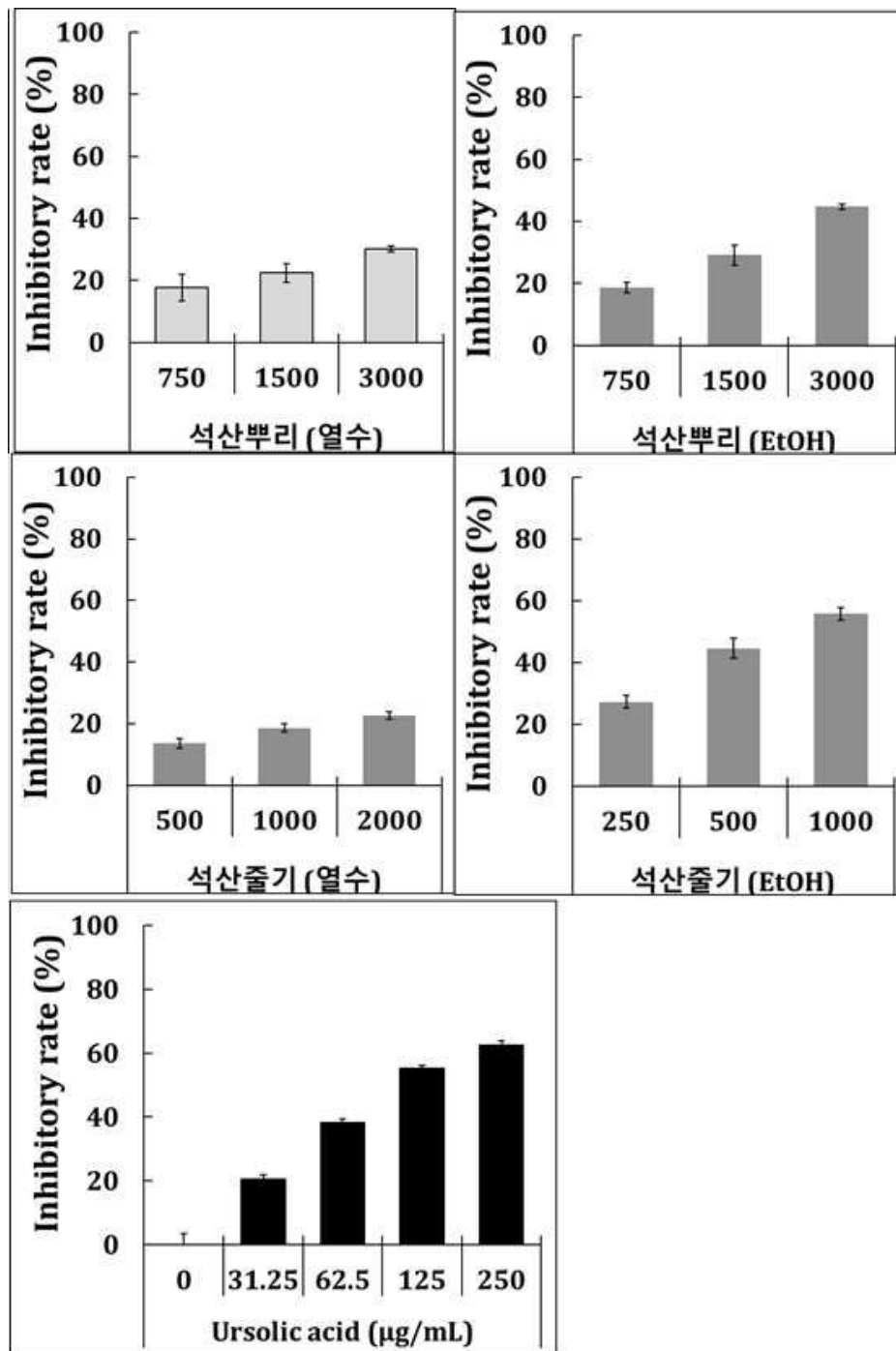
도면23



도면24

Eln stage activity (130min)																	IC 50 (μg/ml)		
ST ANA	5 μg/ml E lastase	Sample	Conc. (μg/ml)	OD (Before E lastase)			OD (130min)			OD (130min Before elastase)			Inhibitory rate (%)				Sider		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	Average	1	2	3		Average	
○ ○	○	DIW	-	0.292	0.288	0.289	2.6	2.737	2.658	2.308	2.449	2.369	2.375	2.8	-3.1	0.3	0.0	3.0	81
		1% DMSO	-	0.293	0.291	0.291	2.615	2.522	2.709	2.332	2.231	2.418	2.334	2.2	6.1	-1.8	2.2	3.9	
		Ursolic acid	0	0.29	0.29	0.291	2.442	2.566	2.586	2.152	2.276	2.295	2.241	4.0	-1.6	-2.4	0.0	3.5	
		31.25	0.287	0.286	0.288	2.038	2.101	2.063	1.752	1.815	1.775	1.781	21.8	19.0	20.8	20.5	1.4		
		62.5	0.288	0.286	0.289	1.673	1.691	1.647	1.385	1.405	1.358	1.383	38.2	37.3	39.4	38.3	1.1		
		125	0.286	0.284	0.285	1.303	1.296	1.264	1.017	1.012	0.979	1.003	54.6	54.8	56.3	55.3	0.9		
		250	0.292	0.287	0.287	1.1	1.145	1.148	0.808	0.858	0.861	0.842	63.9	61.7	61.6	62.4	1.3		
		750	0.297	0.29	0.29	2.12	2.188	2.307	1.823	1.888	2.017	1.913	21.5	18.3	13.2	17.7	4.2		
		1500	0.302	0.299	0.288	2.161	2.083	2.035	1.879	1.784	1.747	1.803	19.1	23.2	24.8	22.4	2.9		
		3000	0.306	0.296	0.302	1.912	1.943	1.918	1.606	1.648	1.616	1.623	30.9	29.1	30.5	30.1	0.9		
		750	0.29	0.288	0.287	2.205	2.201	2.131	1.915	1.913	1.844	1.891	17.6	17.7	20.6	18.6	1.7		
		1500	0.29	0.288	0.288	1.857	2.005	1.94	1.567	1.717	1.652	1.645	32.6	26.1	28.9	29.2	3.2		
		3000	0.297	0.297	0.3	1.602	1.572	1.569	1.305	1.275	1.269	1.283	43.8	45.1	45.4	44.8	0.8		
		적산분리 (EtOH)	500	0.298	0.298	0.298	2.321	2.331	2.261	2.033	2.033	1.963	1.963	12.9	12.5	15.5	13.7	1.6	
		적산분리 (물수)	1000	0.305	0.304	0.305	2.228	2.171	2.166	1.923	1.867	1.881	1.890	17.2	19.7	19.1	18.6	1.3	
		2000	0.315	0.316	0.313	2.128	2.079	2.127	1.813	1.763	1.814	1.797	22.0	24.1	21.9	22.7	1.3		
적산분리 (EtOH)	250	0.299	0.3	0.297	2.042	1.963	1.954	1.743	1.663	1.657	1.688	25.0	28.4	28.7	27.4	2.1			
500	0.304	0.302	0.302	1.546	1.544	1.616	1.342	1.342	1.374	1.286	46.5	46.5	40.9	44.7	3.3				
1000	0.314	0.315	0.313	1.297	1.331	1.39	0.983	1.016	1.077	1.025	57.7	56.3	53.7	55.9	2.1				

도면25



도면26

