



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호10-2008-0087661

(22) 출원일자2008년09월05일

심사청구일자2008년09월05일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

김은기

인천 남구 용현3동 인하대학교 생명화학부

김영범

인천 계양구 작전동 도두리동남아파트 518-2003

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 밀통화 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부 개선용 화장품 조성물

(57) 요 약

본 발명은 밀통화 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부 개선용 화장품 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 질소 산화물(NO), 프로스타글란딘 E₂(PGE₂) 및 인터루킨-6(IL-6)의 생성을 억제하고, 항산화 활성을 나타내며, 세포 독성이 없어 안전하므로 아토피성 피부를 개선하는데 유용하게 사용될 수 있다.

(72) 발명자

김정현

인천 연수구 옥련동 벽산빌라 11동 308호

김동준

서울 강서구 화곡7동 353-18번지 진형빌라 나동
102호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 38048-1

부처명 한국과학재단(교육과학기술부)

연구사업명 국가지정연구실사업

연구과제명 미백신규타겟 및 소재개발

주관기관 인하대학교

연구기간 2007년 07월 01일 ~ 2010년 6월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

질소 산화물(NO), 프로스타글란딘 $E_2(PGE_2)$ 및 인터루킨-6(IL-6)의 생성을 억제하고, 항산화 활성을 가지며, 세포 독성이 없는 밀통화(*Brandisia hancei* Hook) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부 개선용 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 밀통화 추출물은 밀통화를 물, 메탄올, 에탄올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것임을 특징으로 하는 아토피성 피부 개선용 화장품 조성물.

청구항 3

제1항의 화장품 조성물은 연고, 로션, 크림, 에센스, 화장수, 비누, 팩 또는 첵포제인 것을 특징으로 하는 아토피성 피부 개선용 화장품 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 밀통화 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부 개선용 화장품 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 질소산화물(NO) 생성 억제 효과, 프로스타글란딘 $E_2(PGE_2)$ 생성 억제 효과, 인터루킨-6(IL-6) 생성 억제 효과 및 항산화 효과를 나타내는 밀통화 추출물을 함유하는 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 아토피성 피부염은 심한 가려움증을 가지는 재발성 만성 피부염으로, 어린이의 약 10-15%가 아토피성 피부염을 가지고 있으며, 90%는 5년 내 저절로 호전되는 것으로 보고되어 있다. 이러한 아토피성 피부염은 성인기에는 대체로 호전되어 약 30-40%는 외관상으로 피부염이 재발되지 않으나, 나머지는 성인이 되어서도 피부 건조, 자극성 물질에 의한 피부 자극, 주부 습진 등의 피부염으로 어려움을 겪는 것으로 알려져 있다. 또한, 민감성 피부의 경우, 수분 보유력 및 그 회복력이 낮고, 피부 각질화, 가려움증 등이 나타나기 쉽기 때문에 아토피성 피부로 될 확률이 높다.

[0003] 아토피의 원인은 여러 가지가 있다. 첫째로, 유전적 원인에 의한 것으로, 피부보호기능을 담당하는 피부 보호막인 세포막의 인지질과 각질세포간의 결합물질인 세포간지질을 구성하는 필수지방산인 감마-리놀레산(γ -linoleic acid;GLA)의 부족으로 인하여 피부 보호막이 약화되고, 피부표면의 수분이 쉽게 소실되어 외부자극에 의해 알러지가 발생하게 된다. 둘째로, 환경적 요인에 의한 것으로, 현대인의 주거환경의 변화로 아파트생활이 보편화되면서 생활 환경이 건조해지고, 이로 인하여 피부의 수분 보유력이 저하되고 피부보호기능이 상실되어 적은 자극에도 민감하게 반응하여 알러지가 발생하게 된다. 셋째로, 활성산소에 의한 것으로, 활성산소에 의해 과산화지질이 생성되며, 상기 과산화지질로 인하여 아토피 피부가 유도되고, 또한 세균, 바이러스 또는 곰팡이의 감염이 더해져 아토피가 악화되게 된다. 현재 통설은 상기 3가지 원인들이 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 추측되고 있다.

[0004] 이러한 아토피 피부를 개선하기 위하여, 종래 세라마이드, 리놀레산, 식물유 또는 광물성 오일 등의 성분들, 하이드로코티손(hydrocortisone) 등의 스테로이드(steroid) 제제 또는 이들에 항균 및 항염 기능을 강화한 물질들이 제안된 바 있다. 하지만, 상기 스테로이드 제제는 표피의 성장억제나 부작용 등의 역효과를 유발할 수 있으며, 우레아 퍼옥사이드 등은 피부의 과다 자극을 야기할 수 있고, 항히스타민제 등의 항생물질은 균의 내성(resistance) 및 광과민 등의 부작용을 유발할 가능성이 높은 문제점이 있다. 또한, 장기간 피부에 적용시 모세혈관 확장증 및/또는 각질층의 두께 증가 내지 확장을 유발하는 등의 심각한 부작용을 발생시킬 염려가 있으며, 최근 아토피성 피부염 완화에 많이 쓰이는 감마-리놀레산(한국특허공개 2000-0046633호)은 쉽게 산화되므로 안정성이 열등함과 아울러, 피부 자극성이 비교적 강하여 민감한 피부에는 사용하기 곤란한 등의 문제점이 있다.

- [0005] 이에 최근에는 아토피 피부에 효과를 갖는 천연물질을 탐색하는데 초점을 맞추고 있다. 대표적으로, 쑥 추출물(대한민국 특허등록 제10-0377262호), 영지버섯, 유근피, 감초, 백봉령, 백지마 및 백년초의 추출물(대한민국 특허등록 제10-0517465호), 달맞이유, 알로에, 목초액, 제비꽃, 대추, 송이버섯, 두릅, 인삼, 녹차, 두충, 복분자, 오미자, 쑥, 포공영, 삼백초, 황기, 하고초, 해송, 황금 및 우슬의 추출물(대한민국 특허등록 제10-0451444호), 청자소엽(靑紫蘇葉)과 적자소엽(紫蘇葉)의 추출물(대한민국 특허등록 제10-0454752호), 건물, 의이인, 오미자, 길경, 나복자, 맥문동 및 석창포의 추출물(대한민국 특허등록 제10-0483539호), 라벤더, 유칼립투스 및 티트리 오일(대한민국 특허등록 제10-0597997호) 등이 있고, 그 외에도 상기생, 함환피, 창이자, 맥아 등이 효과가 있다고 알려져 있다. 하지만, 상기 천연물질들 역시 소양증상(가려움증)이 해소되지 않아 계속 손으로 긁어대므로 증세의 악화가 줄어들지 않는 등 그 효능이 미미하거나, 효과는 있더라도 민감성 피부에 있어서는 알레르기 과민반응을 보여 그 사용이 제한되는 단점이 있었다.
- [0006] 따라서, 종래 알려진 아토피성 피부 개선제에 비하여 보다 효과가 뛰어나고 안전한 물질을 개발하는 것이 요구된다.
- [0007] 본 발명자는 이러한 천연물질을 탐색하던 중 티벳 약용 식물인 밀통화에 주목하게 되었다.
- [0008] 밀통화(蜜桶化)는 학명이 브랜드시아 한세이(*Brandisia hancei* Hook)로서, 꽃의 한 종류로서 중국지역에서는 전통적으로 한방에서 해독작용이 있으며, 담낭 간염 치료 등에 사용되어지고 이를 약으로 만들어 환자들이 복용하는 것으로 알려져 있다.
- [0009] 하지만, 그 외의 용도는 전혀 알려진 바 없으며, 특히 아토피 피부에 관련된 효과 역시 전혀 알려진 바 없다.
- [0010] 이에 본 발명자는 상기 천연물질에 관한 실험을 거듭한 결과, 밀통화 추출물이 질소산화물(NO) 및 프로스타글란딘 E_2 (PGE₂) 생성을 억제하고, 항산화 활성을 가지며, 아토피 피부 환자 대상으로 개선 효과를 보임을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 아토피성 피부 개선용 화장품 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 밀통화 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

효 과

- [0013] 본 발명은 밀통화 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피성 피부 개선용 화장품 조성물에 관한 것으로, 질소산화물(NO), 프로스타글란딘 E_2 (PGE₂) 및 인터루킨-6(IL-6)의 생성을 억제하며, 항산화 활성을 나타내고, 아토피성 피부 환자들 대상으로 직접적인 피부 개선효과를 나타내는 바, 아토피성 피부를 개선하는데 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0015] 본 발명은 밀통화(*Brandisia hancei* Hook) 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피성 피부 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0016] 상기 밀통화 추출물은 건조시켜, 마쇄기로 조분쇄한 후, 추출 용기에 넣고, 추출용매를 가한 후 적절한 온도에서 일정 시간동안 추출하여 수득할 수 있다. 상기 추출 후 추가적으로 여과하거나 농축할 수 있다.
- [0017] 상기 추출용매는 물, C₁ 내지 C₃의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용액을 사용하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올일 수 있다.
- [0018] 상기 추출 용매의 양은 생약 건조 중량의 2 내지 10배로 사용할 수 있으며, 바람직하게는 4 내지 5배일 수

있다.

- [0019] 상기 추출 방법은 열 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 열 추출의 추출방법으로 1회 내지 5회 추출될 수 있다.
- [0020] 상기 추출 온도는 50 내지 100℃이며, 보다 바람직하게는 70 내지 90℃이며, 가장 바람직하게는 80℃이다.
- [0021] 상기 추출 시간은 10 내지 48 시간이며, 바람직하게는 24 시간이다.
- [0022] 당업자의 관점에서 상기 추출 후 여과 또는 농축을 수행할 수 있으며, 일례로 상기 추출물을 400 메쉬 여과포로 일차여과하고 0.45 μm의 미세 필터로 이차여과한 후, 감압농축을 수행할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 추출물은 100 μg/mL의 높은 농도에도 세포 독성을 전혀 나타내지 않아 매우 안전한 것으로 판단되었다(표 1 참조). 아토피 개선 효과와 관련된 염증 인자인 질소 산화물(NO)의 생성에 있어서, 본 발명의 추출물은 미처리구 대비 58.90%의 저해 활성을 나타내었고(표 2 참조), 프로스타글란딘 E₂(PGE₂)의 생성에 있어서도, 미처리구 대비 35.54%의 저해 활성을 나타내었다(표 3 참조). 또한, 인터루킨-6(IL-6)의 생성에 있어서도 미처리구 대비 39.7%의 저해 활성을 나타내었다(표 4 참조). 나아가, 항산화 활성에 있어서도 39.97%의 활성을 나타내었고(표 5 참조), 아토피 증상이 있는 20명을 대상으로 실험한 결과, 홍반의 개선효과는 80%, 염종의 개선효과는 100%, 가려움의 개선효과는 80%, 피부 자극에 대해서는 피부 자극이 전혀 없는 것으로 나타났다(표 7 참조). 따라서, 본 발명의 조성물은 아토피 개선용으로 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다.
- [0024] 본 발명의 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조될 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다. 또한, 본 발명의 추출물을 함유하는 화장품 이외에도 피부 과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유함으로써 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 국소 적용 또는 전신 적용할 수 있는 보조제 형태로 제조될 수 있다.
- [0025] 적합한 화장료의 제형으로는 예를 들면, 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱(conceal stick)의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 폼(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 추출물에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 그리고, 상기의 성분들은 피부과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 화장료 조성물의 구체적인 제형으로서는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도, 비누, 첩포제 또는 미세 주사 바늘이 장착된 패치형 투여기구 등을 포함한다.
- [0028] 이하 본 발명이 구체적인 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만, 본 발명의 권리범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] **실시예 1: 밀통화 추출물의 제조**
- [0030] 밀통화는 중국의 고산지방에서 채취한 것을 사용하였다. 상기 채취한 밀통화를 건조하고, 세절하여 추출용기에 넣고, 상기 건조 중량의 4배 부피의 100% 메탄올을 이용하여 24시간동안 추출하였다. 상기 추출액을 실온으로 냉각시키고 거름종이로 여과하여 상등액을 취하였다. 질소를 사용하여 상등액 중의 메탄올을 증발시켜 농축하여 메탄올 추출물을 수득하였다. 상기 수득한 추출물은 10% 메탄올에 녹인 상태로 이 후 실험에 적용하였다.
- [0031] **실험예 1: 밀통화 추출물의 세포 독성 측정**
- [0032] 화장료 조성물로 사용하기 위하여는 인체에 무해하여야 함은 물론이다. 이에 실시예 1에서 제조된 밀통화 추출물에 대하여 세포 독성 여부를 측정하였다.

[0033] 실험 세포는 면역반응에 관련된 세포주로서 통상적으로 염증 완화 작용을 하는 물질을 탐색하는데 사용되는 LPS로 염증반응이 유도된 BALB/c 마우스 유래의 RAW 264.7 대식세포주를 이용하였다.

[0034] 먼저, 10% 우태아혈청(FBS), 페니실린(100 U/mL) 및 스트렙토마이신(100 µg/mL)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 배지용액을 RAW 264.7 세포와 혼합하여 96 웰 플레이트에 웰 당 5×10^4 세포를 넣어 6 시간 동안 5% 이산화탄소 및 37°C의 조건에서 배양하였다.

[0035] 세포가 안정화 된 후에 음성 대조군은 아무것도 처리하지 않은 동일 배지로 바꾸어준 후 배양하였고, 양성 대조군은 아토피 피부에 효과가 있다고 알려진 카모마일(charmomeil; apigenin 98% 함유)을 세포 독성이 없다고 알려진 농도인 1 µg/mL을 포함한 배지로 바꾸어 준 후 배양하였고, 실험군은 실시예 1에서 수득한 밀통화 추출물을 100 µg/mL의 농도로 포함한 배지로 바꾸어 준 후 24시간 동안 5% 이산화탄소 및 37°C의 조건에서 배양하였다. 측정결과는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0036] 밀통화 추출물의 세포독성 측정 결과

시료명	미처리구	카모마일 1 µg/mL	카모마일 10 µg/mL	밀통화 추출물 100 µg/mL
세포 양	100%	106.45%	34.40%	108.24%

[0037] 측정결과, 카모마일의 경우 미처리구에 비하여 1 µg/mL 처리시 세포의 양이 106.45%로 증가하였지만, 10 µg/mL 처리시 34.40%로 감소하였다. 따라서, 세포독성이 없는 농도는 1 µg/mL임을 알 수 있었다.

[0038] 이에 반하여 밀통화 추출물은 100 µg/mL의 농도에서도 세포의 양이 121.25%로 미처리구에 비하여 증가하였음을 알 수 있었다.

[0039] 이로써 밀통화 추출물은 100 µg/mL의 높은 농도임에도 불구하고 표 1에서와 같이 세포 수가 거의 줄어들지 않는 것으로 보아 세포독성이 적은 것을 알 수 있다.

[0040] 이 후 실험에서는 상기 결과를 바탕으로 세포 독성이 없는 범위에서 수행하였고, 구체적으로 카모마일의 경우는 1 µg/mL의 농도로, 밀통화 추출물은 100 µg/mL의 농도를 기준으로 아토피 관련 실험을 수행하였다.

[0041] 실험예 2: 밀통화 추출물의 질소 산화물(NO) 생성 억제 효과

[0042] 과다 생성된 질소산화물은 슈퍼옥사이드(superoxide)와 반응하여 퍼옥시니트라이트(peroxynitrite)를 형성하며 이는 강력한 산화제로 작용하여 세포에 손상을 입히고, 염증성 자극에 의해 활성화된 대식세포에서 NF-κB를 활성화시켜 염증반응을 악화시키는 것으로 알려져 있다(Lawrence *et al.*, Nat Med., 7:1291-1297, 2001; Riehemann *et al.*, FEBS Lett., 442:89-94, 1999; Stamler *et al.*, Science, 258:1898-1902, 1992). 따라서, 질소산화물 양의 변화를 측정함으로써, 염증 질환의 하나인 아토피 피부에 효과가 있는 물질을 탐색할 수 있다.

[0043] 이에 본 실험예에서는 상기 실시예 1에서 수득한 10% 메탄올에 용해시킨 밀통화 추출물을 대상으로 염증성 질환 개선용 효과 지표 중 하나인 질소산화물(NO) 생성 억제 효과를 측정하였다. 실험 세포는 면역반응에 관련된 세포주로서 통상적으로 염증 완화 작용을 하는 물질을 탐색하는데 사용되는 LPS로 염증반응이 유도된 BALB/c 마우스 유래의 RAW 264.7 대식세포주를 이용하였다.

[0044] 먼저, 10% 우태아혈청(FBS), 페니실린(100 U/mL) 및 스트렙토마이신(100 µg/mL)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 배지용액을 RAW 264.7 세포와 혼합하여 24 웰 플레이트에 웰 당 5×10^4 세포를 넣어 6 시간 동안 5% 이산화탄소 및 37°C의 조건에서 배양하였다. 세포가 안정화 된 후에 음성 대조군은 아무것도 처리하지 않은 동일 배지로 바꾸어준 후 배양하였고, 양성 대조군은 아토피 피부에 효과가 있다고 알려진 카모마일(charmomeil; apigenin 98% 함유)을 1 µg/mL의 농도로 포함한 배지로 바꾸어 준 후 배양하였고, 실험군은 실시예 1에서 수득한 밀통화 추출물을 100 µg/mL의 농도로 포함한 배지로 바꾸어 준 후 24시간 동안 5% 이산화탄소 및 37°C의 조건에서 배양하였다. 배양 종료 후 50 µL의 배양액을 취하여 동일 부피의 그리에스(Griess) 시약과 혼합하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 ELISA를 이용하여 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 측정 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

밀통화 추출물의 질소산화물(NO) 억제 측정 결과

시료명	미처리구	카모마일 1 μ g/mL	밀통화 추출물 100 μ g/mL
NO양	100%	87.70%	41.10%

상기 표 2에서 알 수 있는 바와 같이, 종래 아토피 피부 개선제로 알려진 카모마일 처리군(양성 대조군)의 경우, 음성 대조군인 미처리구 대비 NO의 양이 87.70%로서, 12.30% 저해 활성을 나타내었다. 이에 반하여 본 발명의 밀통화 추출물은 NO의 양이 미처리구 대비 41.10%로서, 58.90%의 저해 활성을 나타내었다.

따라서, 본 발명의 밀통화 추출물의 경우, 상기 피부 염증에 관여하는 질소산화물의 생성을 효과적으로 억제하는 바, 아토피성 피부 개선에 유용할 것으로 판단된다.

실험예 3: 밀통화 추출물의 프로스타글란딘 E₂ 생성 억제 효과

프로스타글란딘은 환상구조를 지닌 20개의 탄소를 포함하고 있는 불포화 지방산 유도체로 주로 만성 염증 질환에 관여하는 화학 전달물질이며 천식 등의 자가면역질환에도 관여한다(Ruf *et al.*, Eur. J. Biochem., 204:1069-1073, 1992). 따라서, 상기 물질의 생성을 억제하면, 아토피 피부 개선에 효과가 있다고 판단할 수 있다.

이에 본 실험예에서는 상기 실시예 1에서 수득한 10% 메탄올에 용해시킨 밀통화 추출물을 대상으로 염증성 질환 개선용 효과 지표 중 하나인 프로스타글란딘 E₂(PGE₂) 생성 억제 효과를 측정하였다. 실험 세포는 면역반응에 관련된 세포주로서 통상적으로 염증 완화 작용을 하는 물질을 탐색하는데 사용되는 LPS로 염증반응이 유도된 BALB/c 마우스 유래의 RAW 264.7 대식세포주를 이용하였다.

먼저, 10% 우태아혈청(FBS), 페니실린(100 U/mL) 및 스트렙토마이신(100 μ g/mL)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 배지용액을 RAW 264.7 세포와 혼합하여 24 웰 플레이트에 웰 당 2×10^5 세포를 넣어 24 시간 동안 5% 이산화탄소 및 37°C의 조건에서 배양하였다. 세포가 안정화 된 후에 음성 대조군은 아무것도 처리하지 않은 동일 배지로 바꾸어준 후 배양하였고, 양성 대조군은 아토피 피부에 효과가 있다고 알려진 카모마일(charmornile; apigenin 98% 함유)을 1 μ g/mL의 농도로 포함한 배지로 바꾸어 준 후 배양하였고, 실험군은 실시예 1에서 수득한 밀통화 추출물을 100 μ g/mL의 농도로 포함한 배지로 바꾸어 준 후 24시간 동안 5% 이산화탄소 및 37°C의 조건에서 배양하였다. 배양 종료 후 PGE₂ ELISA kit를 이용하여 PGE₂ 농도를 측정하였다. 측정 결과는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

밀통화 추출물의 프로스타글란딘 E₂(PGE₂) 억제 측정 결과

시료명	미처리구	카모마일 1 μ g/mL	밀통화 추출물 100 μ g/mL
PGE ₂ 양	100%	64.50%	64.46%

상기 표 3에서 알 수 있는 바와 같이, 종래 아토피 피부 개선제로 알려진 카모마일 처리군(양성 대조군)의 경우, 음성 대조군인 미처리구 대비 PGE₂의 양이 64.50%로서, 35.50% 저해 활성을 나타내었다. 이에 반하여 본 발명의 밀통화 추출물은 NO의 양이 미처리구 대비 64.46%로서, 35.54%의 저해 활성을 나타내었다.

따라서, 본 발명의 밀통화 추출물의 경우, 카모마일과 유사한 수준으로 피부 염증에 관여하는 프로스타글란딘의 생성을 억제하는 바, 아토피성 피부 개선에 유용할 것으로 판단된다.

실험예 4: 밀통화 추출물의 인터루킨-6(IL-6) 생성 억제 효과 측정

상기 실시예 1에서 제조한 밀통화 추출물의 항염증 효과 지표 중 하나인 인터루킨-6(IL-6) 발현 억제 효과를 측정하기 위하여 BALB/c 마우스 유래의 RAW 264.7 대식세포주를 대상으로 하는 실험을 수행하였다. 먼저, 10% 우

태아혈청(FBS), 페니실린(100 U/mL) 및 스트렙토마이신(100 μ g/mL)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 배지용액을 RAW 264.7 세포와 혼합하여 24 웰 플레이트에 웰 당 5×10^5 세포를 넣어 3시간 동안 5% 이산화탄소 및 37℃의 조건에서 배양하였다. 세포가 안정화 된 후에 음성 대조군은 아무것도 처리하지 않은 동일 배지로 바꾸어준 후 배양하였고, 양성 대조군은 아토피 피부에 효과가 있다고 알려진 카모마일(charmomeil; apigenin 98% 함유)을 1 μ g/mL의 농도로 포함한 배지로 바꾸어 준 후 배양하였고, 실험군은 실시예 1에서 수득한 밀통화 추출물을 100 μ g/mL의 농도로 포함한 배지로 바꾸어 준 후 24시간 동안 5% 이산화탄소 및 37℃의 조건에서 배양하였다. 배양 종료 후 IL-6 ELISA kit를 이용하여 IL-6 농도를 측정하였다. 측정 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

밀통화 추출물의 인터루킨-6 억제 측정 결과

시료명	미처리구	카모마일 1 μ g/mL	밀통화 추출물 100 μ g/mL
IL-6	100%	60.12%	62.4%

상기 표 4에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 밀통화 추출물은 음성 대조군인 미처리구 대비 IL-6의 함량이 62.4%로서, 37.6%의 저해 활성을 나타내었다. 이는 종래 아토피 피부 개선제로 알려진 카모마일 처리군(양성 대조군)이 39.88%의 저해활성을 나타내는 것과 비교하여도 동등한 수준임을 알 수 있었다.

따라서, 본 발명의 밀통화 추출물의 경우, 카모마일과 유사한 수준으로 피부 염증에 관여하는 인터루킨-6의 생성을 억제하는 바, 아토피성 피부 개선에 유용할 것으로 판단된다.

실험예 5: 항산화 활성 측정

항산화 활성을 갖는 물질은 피부 질환의 활성산소를 제거하여 아토피 피부의 개선에 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 이에 본 발명의 밀통화 추출물이 항산화 활성을 갖는지를 확인하기 위하여 DPPH 용액을 이용하여 통상적인 방법으로 항산화 활성을 측정하였다. 대조구로 항산화제로 알려진 비타민C를 사용하여 비교하였다. 측정결과 는 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

밀통화 추출물의 항산화 활성 측정 결과

시료명	비타민 C 100 μ g/mL	밀통화 추출물 100 μ g/mL
항산화 활성	85.93%	39.97%

측정 결과, 본 발명의 밀통화 추출물은 항산화 효과가 매우 뛰어난 것으로 알려진 비타민 C에 비하여 낮기는 하지만 39.97%로서 높은 수준의 항산화 활성을 갖는 것으로 나타났다.

따라서, 본 발명의 추출물은 항산화 작용으로 아토피성 피부를 개선하는데 유용할 것으로 판단된다.

실험예 6: 아토피 피부 개선 효과

본 발명의 밀통화 추출물을 직접 아토피 피부 환자들에게 적용하여 그 효과를 살펴보았다. 우선, 밀통화 추출물을 이용하여 하기 표 6에 나타낸 바와 같이 화장품 조성물(로션 타입)을 제조하였다.

표 6

밀통화 추출물 함유 화장품 조성물의 조성비

	본 발명의 밀통화 추출물을 포함한 화장품 조성물	본 발명의 추출물을 포함하지 않은 화장품 조성물(대조군)
밀통화 추출물	2	-
폴리솔베이트	1.3	1.3
솔비탄세스퀴올레이트	0.9	0.9

유동과라핀	6	6
카프릴릭/카프릭트리글리세라이드	4	4
글리세린	2	2
부틸렌글리콜	4	4
프로필렌글리콜	3	3
카르복시비닐폴리머	0.1	0.1
트리에탄올아민	0.2	0.2
레티놀	4000 IU	4000 IU
밀납	4	4
보존료	적량	적량
정제수	To 100(%)	To 100(%)

[0068] 상기 피부 외용 조성물을 아토피 환자에게 직접 적용하여 아토피 개선 효과를 살펴보았다. 실험대상자는 실험에 들어가기 한 달 전에 비스테로이드성 항염증제 및 기타 스테로이드 제제를 적용하지 않은 사람들로 선정하였고, 5세부터 40세 정도 아토피 환자로서, 2년 이상 아토피 피부를 고생하고 있는 환자 20명을 대상으로 본 발명물의 조성물을 적용하도록 하였다. 실험 방법은 동일인에게 동일한 위치의 환부를 둘로 나눠 한쪽에는 발명 조성물이 포함된 피부 외용 조성물(로션 타입)을 바르고 다른 한쪽에는 발명 조성물이 포함되지 않은 조성물을 바르게 하였다. 1일 1회 2달 정도 도포한 후 아토피 피부의 개선 상태를 확인하였다.

[0069] 그 결과는 하기 표 7에 나타내었다. 평가 점수는 5점 평가법을 이용하였는데, 다음과 같다.

[0070] 점수기준 : 1점 아주 악화되었다.(처음보다 50% 이상 악화) 2점 조금 악화되었다.(조금이나마 악화) 3점 차이가 없었다. 4점 약간 개선된 거 같다.(조금이나마 개선) 5점 아주 많이 개선되었다.(처음보다 50% 이상 개선), 단 경피실험의 자극 실험은 다음과 같이 3점 평가법을 하였다. 점수 기준 : 1점 있음. 2점 모름. 3점 없음.

표 7

[0071] 본 발명의 피부 외용 조성물의 적용 결과

		본 발명의 조성물		대조군	
홍반	아주 개선	6명	30%	0명	0%
	조금 개선	10명	50%	3명	15%
	차이 없음	4명	20%	14명	70%
	조금 악화	0명	0%	3명	15%
	아주 악화	0명	0%	0명	0%
염증	아주 개선	18명	90%	0명	0%
	조금 개선	2명	10%	6명	30%
	차이 없음	0명	0%	12명	60%
	조금 악화	0명	0%	2명	0%
	아주 악화	0명	0%	0명	0%
가려움증	아주 개선	10명	50%	0명	0%
	조금 개선	6명	30%	1명	5%
	차이 없음	4명	20%	19명	95%
	조금 악화	0명	0%	0명	0%
	아주 악화	0명	0%	0명	0%
자극	있음	0명	0%	0명	0%
	모름	0명	0%	0명	0%
	없음	20명	100%	20명	100%
[주] 각각의 백분율은 총시험자에 대한 변화된 사람의 비율을 나타낸다.					

[0072] 상기 표 7에 나타난 바와 같이, 본 발명의 화장료 조성물을 아토피 증상이 있는 20명을 대상으로 실험한 결과, 홍반의 개선효과는 80%, 염증의 개선효과는 100%, 가려움의 개선효과는 80%, 피부 자극에 대해서는 피부 자극이 전혀 없는 것으로 나타났다. 이는 대조군이 전혀 효과를 나타내지 않은 것과 비교하여 볼 때, 상당한 효과를 보이는 것으로 판단된다. 따라서, 본 발명의 조성물은 아토피 개선용으로 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다.