(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년02월27일
(11) 등록번호 10-1115500
(24) 등록일자 2012년02월06일

(51) Int. Cl.
A61K 36/237 (2006.01) *A61K 36/238* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0057168
(22) 출원일자 2009년06월25일
심사청구일자 2009년06월25일
(65) 공개번호 10-2010-0138576
(43) 공개일자 2010년12월31일
(56) 선행기술조사문헌
JP2008517875 A*
Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 41(5), 1993, pp.926-929*
Cancer Letters, 145(1-2), 1999, pp.151-157*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국 한의학 연구원
대전광역시 유성구 유성대로 1672 (전민동)
(72) 발명자
김호경
대전광역시 서구 둔산남로 30, 104동 305호 (둔산동, 녹원아파트)
윤태숙
서울특별시 강남구 남부순환로 2803, 도곡삼성래미안아파트 105동 2001호 (도곡동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

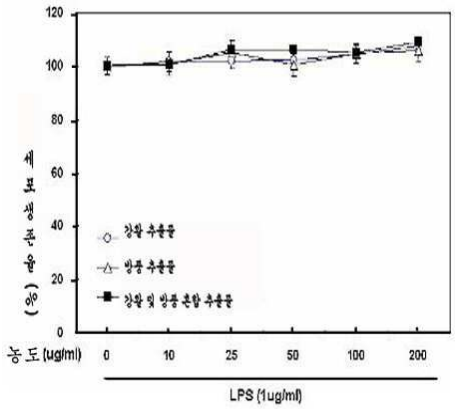
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 김강필

(54) 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 강활(*Notopterygium incisum, N. incisum*) 및 방풍 (*Saposhnikovia divaricata, S. divaricata*)의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 상기 강활 및 방풍의 적정비율의 혼합 추출물은 각 약재 단독에 비하여, 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 염증 관련 인자인 인터루킨-1ß(interleukin-1ß, IL-1ß), 종양괴사인자-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α) 및 일산화질소(nitrogen oxide, NO)의 생성을 더 효과적으로 억제하고, 보다 현저한 부종억제 효과를 가지며, 세포독성이 없는 안전한 물질이므로, 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

전명숙

대전광역시 유성구 가정로 65, 101동 801호 (신성동, 대림두레아파트)

추병길

대전광역시 유성구 유성대로 1672 (전민동)

문병철

대전광역시 유성구 유성대로 1672 (전민동)

야스카와, 켄

일본 274-8555 치바현 후나바시시 나라시노다이 7-7-1 니혼대학 약학연구소

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 K09062

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 한약물 상호작용의 과학화 연구

기여율

주관기관 한국한의학연구원

연구기간 2008년 01월 01일 ~ 2009년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

강활(*Notopterygium incisum, N. incisum*)과 방풍(*Saposhnikovia divaricata, S. divaricata*)의 배합비율이 4:3에서부터 1:2(57%>강활>33% ~ 67%>방풍>43%)인 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 강활 및 방풍 혼합 추출물은 물로 추출한 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 강활 및 방풍 혼합 추출물은 강활과 방풍의 배합비율이 1:1에서부터 2:3인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

강활(*Notopterygium incisum, N. incisum*)과 방풍(*Saposhnikovia divaricata, S. divaricata*)의 배합비율이 4:3에서부터 1:2(57%>강활>33% ~ 67%>방풍>43%)인 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 기능성 식품.

청구항 8

강활(*Notopterygium incisum, N. incisum*)과 방풍(*Saposhnikovia divaricata, S. divaricata*)의 배합비율이 4:3에서부터 1:2(57%>강활>33% ~ 67%>방풍>43%)인 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 피부 외용제.

청구항 9

강활(*Notopterygium incisum, N. incisum*)과 방풍(*Saposhnikovia divaricata, S. divaricata*)의 배합비율이 4:3에서부터 1:2(57%>강활>33% ~ 67%>방풍>43%)인 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 화장료 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한

것이다.

배 경 기 술

[0002] 염증(inflammation)은 다양한 경로를 통한 외부 감염, 생체 내 대사 산물 등 내외적 자극에 대한 생체 내 방어 기전의 발현으로서, 세포 내 다양한 염증 조절인자들이 매개체로서 관여하고 있으며, 알레르기, 아토피, 관절염, 심장병, 뇌질환, 순환기 장애뿐만 아니라 암 등과 같은 다양한 질환의 원인을 제공하게 된다.
구체적으로, 외부 세균이 특정 조직에 침입하여 증식을 하게 되면 생체의 백혈구가 이를 인지하여 증식된 외부 세균을 활발히 공격하게 되는데, 이 과정 중 발생되는 백혈구의 사해가 균에 의하여 침입 받은 조직에 축적됨과 동시에 백혈구에 의하여 사멸된 침입 균의 세포 파괴물이 침입 받은 조직 내로 융해되어 농양이 형성된다. 염증에 의한 농양의 치료는 소염작용을 통하여 촉진될 수 있는데, 소염작용이란 항균제를 이용하여 침입 균의 증식을 억제하거나 농양 중에 축적된 이물질들을 탐식하는 대식세포(macrophage)를 활성화하여 상기 이물질들을 소화 및 배설하는 대식세포의 기능을 항진시키는 등의 염증 치료 촉진작용이다.

[0003] 일반적으로 염증반응은 생체의 세포나 조직에 기질적 변화를 가져오는 침습으로 인한 손상을 수복 및 재생하기 위한 생체방어 반응과정이고, 이 반응과정에는 국소의 혈관, 체액의 각종 조직세포 및 면역세포 등이 작용한다. 정상적으로 외부 침입 균에 의하여 유도되는 염증반응은 생체를 보호하기 위한 방어 시스템인 반면, 비정상적으로 과도한 염증반응이 유도되면 다양한 질환들이 나타나게 되는데, 이러한 질환들을 염증질환이라 한다. 상기 염증질환은 외부자극에 의하여 활성화된 표적세포로부터 분비되는 다양한 염증 매개물질이 염증을 증폭 및 지속시켜 인체의 생명을 위협하는 질환으로서 급성염증, 류마티스 관절염과 같은 관절 내에서의 질환, 건선 등의 형태로 나타나는 피부질환 및 기관지 천식 등의 알레르기성 염증질환 등을 포함한다.

[0004] 많은 염증 관련 질환의 발병에는 대식세포의 활성화와 이에 따른 염증 관련 인자들의 과도한 생성이 연관되어 있는데, 대표적인 염증 관련 인자들로는 인터루킨-1ß(interleukin-1ß, IL-1ß), 종양괴사인사-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α) 및 일산화질소(nitrogen oxide, NO) 등이 있다.

[0005] 염증 반응은 특히 사이토카인(cytokine)에 의해 매개되는데 IL-1ß 및 TNF-α와 같은 사이토카인은 모두 강력한 염증인자들이다. IL-1ß는 강력한 염증 전 활성을 보유하며, 다수의 염증 단계의 선두에 위치한다. 흔히 IL-6 및 IL-8과 같은 다른 사이토카인의 유도를 통해 이루어지는 이들의 작용은 백혈구의 활성화 및 손상된 조직으로의 백혈구의 유입, 혈관 작용성 물질의 국소 생산, 뇌 및 간 급성 단계 반응에서의 열 반응을 유도한다. 증가된 IL-1ß 생산은 류머티즘성 관절염 및 염증성 장 질환의 발병에 관여한다. TNF-α와 같은 다 기능성 사이토카인은 정상조직에서 발현될 뿐만 아니라 병변 과정에서 그 발현 정도가 증가되며, 특히 암 촉진 과정에서 일어나는 피부 염증에 중요한 역할을 한다. TNF-α가 인간의 염증성 피부질환과 관련이 있음은 이미 많이 보고되고 있다(Verhoef, J. et al., *J. Antimicrob. Chemother.*,35, 1996). 여러 염증질환과 알레르기 현상에 TNF-α에 대한 항체를 처리하였을 때 증상이 완화되었다. 염증단계에 중추적 역할을 하고 있는 사이토카인인 TNF-α의 발현을 저해시키면 초기염증성 분자(pro-inflammatory molecule)의 증가를 수반하는 병변 과정을 조절할 수 있을 가능성이 높다.

[0006] 또한, 염증반응 중 활성화된 백혈구(monocytes) 및 대식세포에 의한 NO의 생성이 강력한 염증반응을 개시하고, 세균 병원체에 대한 초기 면역 반응에서 가장 중요한 부분이 된다(Bogdan C, *Nat.Immunol.*, 2:907-916, 2001).

[0007] 또한, 염증반응의 결과로서, 유도성 일산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOS)에 의해 생성된 NO의 상기 생리학적 농도(supraphysiological concentrations)가 다양한 염증질환의 병리생물학에 있어서 역할을 하고 있다고 여겨지고 있다(Clancy RM *et al.*, *Arthritis. Rheum.*, 41:1141-1151, 1998). 염증반응의 유도물질들 중에서 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)는 백혈구와 같은 면역세포와 상호 작용을 하며, 단핵세포의 식세포들에 있어서 NOS 이소형태의 활성화에 의한 NO 농도의 증대에 의한 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다(ManMicking J *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:323-350, 1997).

[0008] 생체에 있어서 염증의 발생 원인으로서는 다양한 생화학적인 현상이 관여하고 있으며, 특히 NO를 발생시키는 효소인 일산화질소 합성효소(Nitrogen Oxide Synthase, NOS)와 프로스타글란딘(prostaglandin, PG)의 생합성과 관련된 효소들은 염증반응을 매개하는데 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 L-아르

기닌(L-Arginine)으로부터 NO를 생성시키는 효소인 NOS 또는 아라키돈산(Arachidonic acid)으로부터 프로스타글란딘류를 합성하는데 관련된 효소인 싸이클로옥시제나제(cyclo-oxygenase, COX)는 염증을 차단하는데 있어서 주된 목표가 되고 있다. 최근의 연구결과에 따르면, NOS는 몇 가지 종류가 존재하는데 신경계에 존재하는 nNOS(neuronal NOS), 혈관계에 존재하는 eNOS(endothelial NOS) 등은 체내에 항상 일정수준으로 발현되고 있으며, 이들에 의해 소량 생성되는 NO는 신경전달이나 혈관 확장을 유도하는 등 정상적인 신체의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는데 반하여, 인터페론γ, TNF-α, 사이토카인이나 외부 자극물질에 의해 유도되는 iNOS에 의해 급격히 과량 발생되는 NO는 세포독성이나 각종 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있다(Miller MJ *et al.*, *Mediators of inflammation*, 4:387-396, 1995: Appleton L *et al.*, *Adv. Pharmacol.*, 35:27-28, 1996).

[0009] 현재 염증 치료제로는 부신피질 호르몬 성분을 이용한 덱사메타손(Dexamethasone) 및 코티손(cortisone) 등이 있다. 그러나 이들은 염증 치료제로서의 작용을 하지만 독성이 강하며 부작용으로서 부종과 같은 증상을 일으키기도 한다. 또한, 염증 원인에 대하여 선택적으로 작용하지 못하여 심한 면역억제를 유발하는 문제가 생기는 경우도 있다(Check WA & Kaliner MA, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141:44-51. 1990). 현재까지 존재하는 항염증제는 부신피질 호르몬 성분을 이용한 스테로이드 약제로 부종과 같은 각종 부작용을 나타내는 단점이 있다. 따라서 부작용이 거의 없어 장기간 사용하는데 무리가 없으면서 항염증 효능에 탁월한 약제의 개발이 널리 요구되고 있으며, 이는 최근 천연 자원으로부터의 효능 검증을 통한 소재 개발 연구가 활성화되고 있는 이유이기도 하다.

[0010] 한편, 강활(*Notopterygium incisum, N. incisum*)은 쌍떡잎식물 산형화목 미나리과의 여러해살이풀이고, 한국(경북, 강원, 경기, 평북 및 함경) 및 중국 북동부 등지의 산골짜기 계곡에 분포한다. 강활의 성분으로는 코레아닌(Koreanin), 안젤리코레아놀(Angelikoreanol) 및 이소임페라토린(iso-imperatorin) 등이 알려져 있으며, 민간에서는 마비된 것을 풀고 뼈가 쑤시고 아픈데 쓰며, 한방에서는 그 뿌리를 감기, 두통, 신경통, 류머티즘, 관절염 및 중풍 등에 처방한다.

[0011] 방풍(*Saposhnikovia divaricata, S. divaricata*)은 쌍떡잎식물 산형화목 미나리과의 세해살이풀로, 중국 북동부, 화베이 및 내몽골이 원산이며 약료 작물로 재배한다. 방풍은 주성분으로 쿠마린(coumarin)계 물질인 임페라토린(imperatorin), 소라렌(psoralen) 및 베르갑텐(bergapten) 등이 알려져 있으며, 봄과 가을에 꽃대가 나오지 않는 것의 뿌리를 채취하여 건조시킨 후에 한약재로 사용하고 있다. 한방에서 발한, 해열, 진통, 진경 등의 목적으로 사용된다. 이와 같이 강활과 방풍은 효능분류상 해표약에 속하지만, 염증성 질환에도 응용되는 공통점이 있다.

[0012] 한편, 한약의 배합 원칙의 하나가 칠정(七情)이며, 그 중 효능이 비슷한 약물끼리 배합하여 상승작용을 유도하는 것이 상수(相須)이다. 강활과 방풍은 모두 체표에 울체된 풍습을 없애는데, 방풍은 사양(瀉陽)하고 강활은 창음(暢陰)하므로 상수가 되어 쓰인다고 알려져 있으며, 실제 처방 구성에서도 강활 또는 방풍이 포함된 처방 중 32% 가량에서 강활과 방풍이 함께 쓰였다.

[0013] 종래, 상기 강활 또는 방풍의 각각 단독의 추출물이 염증성 질환에 효과가 있다는 것이 보고된 바 있으나, 강활 및 방풍의 혼합 추출물이 염증성 질환에 더 탁월한 효과가 있음은 아직까지 보고된 바 없다.

[0014] 이에, 본 발명자들은 독성이 없고 부종과 같은 부작용이 없는 염증성 질환의 치료제를 개발하기 위해 연구하던 중, 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 함유하는 조성물이 상기 추출물을 각각 단독으로 사용하는 경우보다 염증성 사이토카인 발현 및 부종 등의 증상을 더 효과적으로 개선할 수 있고, 세포독성이 없는 안전한 물질이므로, 항염증용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물

을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 다양한 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 기능성 식품을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 피부 외용제를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

효 과

[0021] 본 발명의 강활(*Notopterygium incisum, N. incisum*) 및 방풍 (*Saposhnikovia divaricata, S. divaricata*)의 혼합 추출물은 독성이 거의 없고, 각각 단독으로 적용하는 것에 비해 적정비율로 혼합시 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 IL-1ß, TNF-α 및 NO의 생성을 더 효과적으로 억제하고, 부종 억제 효과가 우수하여, 염증성 질환에 탁월한 효과가 있으므로 상기 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 용어 "염증"이란 외부 감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발물질)의 침입에 의하여 형성되는 농양의 병리적 상태를 뜻한다.

[0024] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 염증성 질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0025] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료" 및 "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 염증성 질환의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "개체"는 본 발명의 조성물을 투여하여 염증성 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0030] 본 발명은 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0031] 상기 강활 및 방풍 혼합 추출물은 강활과 방풍의 배합비율이 4:3에서부터 1:2(57%>강활>33% ~ 67%>방풍>43%)인 것이 바람직하고, 1:1에서부터 2:3인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 상기 염증성 질환에는 부종, 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 궤양성 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 다양한 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명자들은 강활 및 방풍의 혼합 추출물이 항염증 효능을 가지는지 알아보기 위해, 대식세포에서 상기 염증 유발 사이토카인 IL-1ß, TNF-α 및 염증 유발 물질 NO에 대한 억제 효과를 측정하였다. 그 결과, 강활 및 방풍의 각각의 추출물에 비해 본 발명의 혼합 추출물이 현저한 염증 억제 효과를 나타냄을 알 수 있었다(표 1, 표 2, 표 3, 도 2 참조).

[0034] 본 발명자들은 강활 및 방풍의 혼합 추출물이 항부종 효능을 가지는지 알아보기 위해, 상기 혼합 추출물을 처리하여 TPA로 유도된 염증동물모델의 부종 억제 활성을 분석하였다. 그 결과, 부종이 대조군(100%)에 비해 혼합 추출물에서 현저하게 감소(43%)됨을 알 수 있었고, 각 약재 단독에 비해 혼합 추출물에서 탁월한 부종 억제 효능이 있음을 알 수 있었다(도 3 참조).

[0035] 본 발명자들은 강활 및 방풍의 혼합 추출물의 부종 억제 효능에 대한 최적 배합비율을 알아보기 위해, 강활 및 방풍을 다양한 배합비율로 혼합하여 제조한 추출물을 이용하여 부종억제 효능을 비교하였다. 그 결과, 부종억제 효능은 강활 및 방풍 혼합 추출물의 배합비율에 크게 의존함을 알 수 있었다. 강활과 방풍의 배합비율이 4:3에서부터 1:2 사이에 해당하는 혼합 추출물에서 염증성 부종 억제 효과가 탁월한 것으로 나타났다(표 4 참조).

[0036] 본 발명자들은 강활 및 방풍의 혼합 추출물의 세포독성을 알아보기 위해, 혼합 추출물을 대식 세포주에 농도별로 처리하여 MTT 검사를 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물은 항염증 효과를 유도하는, 특히 본 발명에서 사용한 200 ㎍/㎖의 농도에서 세포독성이 전혀 없는 것으로 나타났다(도 1 참조).

[0037] 따라서 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물은 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있다.

[0038] 본 발명의 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0039] 본 발명의 조성물은, 총 중량에 대하여 상기 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 0.1 내지 50 중량부인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨, 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1~90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 즉, 본 발명의 혼합물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 강활 및 방풍의 혼합 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한

단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0043] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 강활 및 방풍의 혼합 추출물의 양을 기준으로 0.0001 내지 100 ㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 ㎎/㎏이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물은 염증성 질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 다양한 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0046] 상기 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.

[0047] 상기 투여방법은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 자궁내 경막 주사, 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0048] 상기 약학적으로 유효한 양이란 0.0001 내지 100 ㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 ㎎/㎏이며, 이에 제한되는 것은 아니다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0049] 상기 염증성 질환에는 부종, 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 궤양성 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 다양한 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물은 독성이 거의 없고, 각각 단독으로 적용하는 것에 비해 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 IL-1ß, TNF-α 및 NO의 생성을 더 효과적으로 억제하며, 적정비율로 혼합시 부종 억제 효과가 우수하여, 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명은 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0052] 상기 염증성 질환에는 부종, 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 궤양성 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 다양한 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0054] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0055] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0056] 상기 외에 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0057] 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물은 독성이 거의 없고, 각각 단독으로 적용하는 것에 비해 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 IL-1ß, TNF-α 및 NO의 생성을 더 효과적으로 억제하며, 적정비율로 혼합시 부종 억제 효과가 우수하여, 염증성 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0058] 또한, 본 발명은 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 피부 외용제를 제공한다.

[0059] 상기 염증성 질환에는 부종, 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 궤양성 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 다양한 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물은 피부 외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 피부용 외용제에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.

[0061] 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

[0062] 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물은 독성이 거의 없고, 각각 단독으로 적용하는 것에 비해 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 IL-1ß, TNF-α 및 NO의 생성을 더 효과적으로 억제하며, 적정비율로 혼합시 부종 억제 효과가 우수하여, 염증성 질환의 예방 및 개선용 피부 외용제에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0063] 아울러, 본 발명은 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0064] 상기 염증성 질환에는 부종, 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 궤양성 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 다양한 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0065] 상기 화장료 조성물은, 예를 들면 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀

젼, 현탁액, 마이크로에멀젼, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포좀), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.

[0066] 상기 화장료 조성물은 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 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, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.

[0067] 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물은 독성이 거의 없고, 각각 단독으로 적용하는 것에 비해 염증 유발에 의해 급격히 증가하는 IL-1ß, TNF-α 및 NO의 생성을 더 효과적으로 억제하며, 적정비율로 혼합시 부종 억제 효과가 우수하여, 염증성 질환의 예방 및 개선용 화장료 조성물에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

실 시 예

[0068] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.

[0069] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0070] **<실시예 1> 강활 및 방풍의 혼합 추출물의 제조**

[0071] 본 발명자들은 (주)옴니허브(대구, 한국)로부터 구입하여 한국한의학연구원 한약자원연구부에서 검정하고 정선한 강활 및 방풍을 사용하였다. 강활과 방풍의 혼합시료는 4:1, 2:1, 3:2, 4:3, 1:1, 3:4, 2:3, 1:2 및 1:4로 혼합한 총 160 g에 5배량의 물을 가한 다음, 2시간씩 2회 환류 냉각 추출하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하여 분말을 얻었다. 강활과 방풍의 1:1 혼합시료의 수율은 20.63%이었다. 각각의 분말은 세포 배양액 및 해당 용매에 녹여 실험에 사용하였다.

[0072] **<비교예 1> 강활 추출물의 제조**

[0073] 본 발명자들은 (주)옴니허브(대구, 한국)로부터 구입하여 한국한의학연구원 한약자원연구부에서 검정하고 정선한 강활을 사용하였다. 강활 시료 160 g에 5배량의 물을 가한 다음, 2시간씩 2회 환류 냉각 추출하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하여 분말을 얻었다. 강활 추출물의 수율은 23.37%이었다. 강활 분말은 세포 배양액 및 해당 용매에 녹여 실험에 사용하였다.

[0074] **<비교예 2> 방풍 추출물의 제조**

[0075] 본 발명자들은 (주)옴니허브(대구, 한국)로부터 구입하여 한국한의학연구원 한약자원연구부에서 검정하고 정선한 방풍을 사용하였다. 방풍 시료 160 g에 5배량의 물을 가한 다음, 2시간씩 2회 환류 냉각 추출하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하여 분말을 얻었다. 방풍 추출물의 수율은 7.77%이었다. 방풍 분말은 세포 배양액 및 해당 용매에 녹여 실험에 사용하였다.

[0076] **<실시예 2> 강활 및 방풍 혼합 추출물의 처리**

[0077] **<2-1> RAW 264.7 대식세포의 배양**

[0078] 10% 우태아혈청(FBS), 페니실린(100 U/㎖) 및 스트렙토마이신(100 ㎍/㎖)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 배지에 BALB/c 마우스 유래의 RAW 264.7 대식세포주(ATCC)를 혼합하여 96 웰 플레이트에 접종하

여 5% CO_2 및 37℃의 조건에서 배양하였다.

[0079] **<2-2> LPS 처리로 염증이 유도되는 RAW 264.7 대식세포에 강활 및 방풍 혼합 추출물의 처리**

[0080] 상기 실시예 <2-1>의 방법으로 배양된 대식세포에 1 ㎍/㎖ 농도의 LPS(lipopolysaccharide)와 200 ㎍/㎖ 농도의 상기 <비교예 1>에서 수득한 강활 추출물, <비교예 2>에서 수득한 방풍 추출물, 및 <실시예 1>에서 수득한 강활 및 방풍 1:1 혼합 추출물을 각각 처리하였다. 대조군은 LPS만을 처리하였고, 상기 강활, 방풍, 및 강활 및 방풍 혼합 추출물은 처리하지 않았다.

[0081] **<실험예 1> 강활 및 방풍 혼합 추출물의 세포독성 실험**

[0082] 강활, 방풍, 및 강활 및 방풍 혼합 추출물의 세포 독성을 확인하고자 상기 실시예 <2-1>의 방법으로 배양된 세포에 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliium bromide] 검사를 수행하였다.

[0083] 구체적으로, 1 ㎍/㎖의 LPS(lipopolysaccharide)에 의해 활성화된 대식세포에 강활, 방풍 및 이들의 1:1 혼합 추출물을 농도별(10, 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖)로 처리하고 24시간 동안 배양한 후, MTT를 최종농도 500 ㎍/㎖이 되도록 각 웰에 가하고, 추가로 1시간 동안 37℃ 세포 배양기에서 반응시켰다. 이후 배양액을 모두 제거하고 DMSO용액을 첨가하여 생성된 포마잔을 용해시킨 뒤, spectaMAX 340 reader(Molecular Devices, Silicon Valley, USA)를 이용하여 570 ㎚ 파장에서의 흡광도를 측정하고 대조군과의 비교를 통해 상대적인 세포생존율(% of control)을 측정하였다. 모든 측정 결과는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 실험군 간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 통계학적 분석을 수행하였으며, $p < 0.05$ 값인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

[0084] 그 결과, 세포생존율에 있어서, 상기 모든 시료의 모든 농도에서 대조군과 비교했을 때 유의적인 차이가 없었다(도 1). 따라서 대식세포에서 본 발명의 강활 및 방풍 혼합 추출물은 200 ㎍/㎖ 농도로 처리하여도 세포독성이 없음을 확인하였다.

[0085] **<실험예 2> 강활 및 방풍 혼합 추출물의 염증성 사이토카인 IL-1β 생성 억제 효과**

[0086] 상기 실시예 <2-2>의 방법으로 처리된 세포를 20시간 동안 배양한 후, 배양 상등액에 포함된 IL-1ß의 양을 ELISA kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)로 측정하였다.

[0087] 구체적으로, 50 ㎕의 분석 희석액을 넣은 후 50 ㎕ 표준용액 또는 배양 상등액을 넣고 1분 동안 잘 흔들어 섞어준 뒤 상온에서 2시간 반응하였다. 반응 후, 반응액을 버리고 400 ㎕의 세척 완충용액으로 5회 세척한 뒤, IL-1ß 결합체 100 ㎕를 넣고 상온에서 2시간 반응하였다. 다시 반응액을 버리고 400 ㎕의 세척 완충용액으로 5회 세척한 후, 100 ㎕의 기질 용액을 넣고 빛을 차단하여 상온에서 30분 동안 반응하였다. 그 뒤, 100 ㎕의 종결용액을 넣고 혼합 후 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 100% 활성은 LPS만 처리된 대조군으로 정의하여 상대적인 생성량(% of control)을 계산하였다. 모든 측정 결과는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 실험군 간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 통계학적 분석을 수행하였으며, $p < 0.05$ 값인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

[0088] 그 결과, LPS로 자극한 대조군과 비교했을 때, 강활은 62%, 방풍은 43%의 억제율을 나타냈고, 강활과 방풍의 혼합 추출물의 경우 77%의 억제율을 보였다. 따라서 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물은 각각의 추출물에 비해 현저한 IL-1ß 생성 억제 효능이 있음을 알 수 있었다(표 1 및 도 2).

표 1

[0089]

종 류	IL-1ß(% of control)
대조군(LPS)	100 ± 5
강활 추출물	38 ± 5
방풍 추출물	57 ± 9
강활 및 방풍 혼합 추출물	23 ± 3

[0090] 각 수치는 평균 ± SD(n=3)로 기재함.

[0091] **<실험예 3> 강활 및 방풍 혼합 추출물의 염증유발 사이토카인 TNF-α 생성 억제 효과**

[0092] 상기 실시예 <2-2>의 방법으로 처리된 세포를 20시간 동안 배양한 후, 배양 상등액에 포함된 TNF-α의 양을 ELISA kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)로 측정하였다.

[0093] 구체적으로, 50 ㎕의 분석 희석액을 넣은 후 50 ㎕표준용액 또는 배양 상등액을 넣고 1분 동안 잘 흔들어 섞어 준 뒤 상온에서 2시간 반응하였다. 반응 후, 반응액을 버리고 400 ㎕의 세척 완충용액으로 5회 세척한 뒤, TNF-α 결합체 100 ㎕를 넣고 상온에서 2시간 반응하였다. 다시 반응액을 버리고 400 ㎕의 세척 완충용액으로 5회 세척한 후, 100 ㎕의 기질 용액을 넣고 빛을 차단하여 상온에서 30분 동안 반응하였다. 그 뒤, 100 ㎕의 종결용액을 넣고 혼합 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 100% 활성은 LPS만 처리된 대조군으로 정의하여 상대적인 생성량(% of control)을 계산하였다. 모든 측정 결과는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 실험군 간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 통계학적 분석을 수행하였으며, $p < 0.05$ 값인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

[0094] 그 결과, LPS로 자극한 대조군과 비교했을 때, 강활은 23%, 방풍은 14%의 억제율을 나타냈고, 강활과 방풍의 혼합 추출물의 경우 27%의 억제율을 보였다. 따라서 강활 및 방풍 각각의 추출물을 단독으로 처리했을 때보다, 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 처리했을 때, 더 강하게 TNF-α의 생성을 억제함을 알 수 있었다(표 2).

표 2

[0095]

종 류	TNF-α(% of control)
대조군(LPS)	100 ± 2
강활 추출물	77 ± 1
방풍 추출물	86 ± 1
강활 및 방풍 혼합 추출물	73 ± 2

[0096] 수치는 평균 ± SD(n=3)로 기재함.

[0097] **<실험예 4> 강활 및 방풍 혼합 추출물의 염증유발 물질 NO 생성 억제 효과**

[0098] 상기 실시예 <2-2>의 방법으로 처리된 세포를 20시간 동안 배양한 후, 배양 상등액에 포함된 NO의 양을 NO 컬러리메트릭 분석(colorimetric assay)(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)으로 측정하였다.

[0099] 이전 문헌(Green LC et al., *Anal Biochem.* 1982 ; 126 : 131-8)에 보고된 구체적인 NO 생성량 측정 방법에 따라 수행하였다. 100% 활성은 LPS만 처리된 대조군으로 정의하여 상대적인 생성량(% of control)을 계산하였다. 모든 측정 결과는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 실험군 간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 통계학적 분석을 수행하였으며, $p < 0.05$ 값인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

[0100] 그 결과, LPS로 자극한 대조군과 비교했을 때, 강활은 35%, 방풍은 17%의 억제율을 나타냈고, 강활과 방풍의 혼합 추출물의 경우는 37%의 억제율을 보였다. 따라서 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물은 강활 및 방풍 각각의 추출물에 비하여 NO의 생성량을 감소시킴을 알 수 있었다(표 3).

표 3

[0101]

종 류	NO(% of control)
대조군(LPS)	100 ± 1
강활 추출물	65 ± 2
방풍 추출물	83 ± 1
강활 및 방풍 혼합 추출물	63 ± 1

[0102] 각 수치는 평균 ± SD(n=3)로 기재함.

[0103] **<실험예 5> 생체 내(in vivo)에서 강활 및 방풍 혼합 추출물의 부종 억제 효과**

[0104] **<5-1> 실험동물의 사육**

[0105] 염증 동물 모델로 가장 많이 사용되고 있는 동물 실험 모델인, 5주령의 C57BL/6J 마우스 수컷을 ㈜대한바이오링크로부터 공급받아, 온도 20-22℃, 상대습도 40-60%, 12시간 간격으로 명암이 조절되는 한국한의학연구원 동물 사육실에서 1주일간 환경에 적응하도록 순화시키거나, 또는 8주령의 ICR 마우스를 Japan SLC Inc.(Shizuoka, Japan)로부터 공급받아 일본대학교(Nihon University, Chiba, Japan) 약학연구소 동물사육실에서 순화시켰으며, 육안적 증상을 관찰하여 정상적인 동물만을 선별하여 각 군당 8마리씩 무작위 분배하여 실험에 사용하였다.

[0106] **<5-2> 강활 및 방풍 혼합 추출물의 TPA로 유도된 마우스 염증성 귀부종에 대한 억제 효과**

[0107] 각 실험군은 8마리의 마우스로 구성되며 MeOH-$CHCl_3$-H_2O(2:1:1)과 이 용매에 녹인 상기 강활 추출물, 방풍 추출물, 및 강활 및 방풍 1:1 혼합 추출물(1 ㎎/ear)을 파이펫을 이용하여 마우스의 오른쪽 귀 안쪽과 바깥쪽 표면에 10 ㎕씩 도포하였다. 1시간 후 아세톤에 TPA(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate)를 1 nM로 녹여서 마우스의 오른쪽 귀 안쪽과 바깥쪽 표면에 10 ㎕씩 도포하였다. 도포 6시간 후, 실험동물을 마취하고 각 귀의 두께를 마이크로미터(micrometer)로 측정하여 부종 지표로서 증가율을 계산하였다. 100% 부종지수는 TPA만 처리된 군으로 정의하여 상대적인 부종율(% of control)을 제시하였다. 모든 측정 결과는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 실험군 간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 통계학적 분석을 수행하였으며, $p < 0.05$ 값인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

[0108] 그 결과, 용매만 도포한 TPA 유발군과 비교했을 때, 강활과 방풍은 각각 23%, 7%의 부종 억제율을 나타냈으며, 강활 및 방풍 혼합 추출물의 경우 43%의 부종 억제율을 나타냈다. 따라서 본 발명의 혼합 추출물은 각각의 추출물에 비해 현저한 부종 억제 효능이 있음을 알 수 있었다(도 3).

[0109] **<5-3> 강활 및 방풍 혼합추출물의 배합비율에 따른 TPA로 유도된 마우스 염증성 귀부종에 미치는 영향**

[0110] 강활과 방풍 혼합 추출물을 1:0, 4:1, 2:1, 3:2, 4:3, 1:1, 3:4, 2:3, 1:2, 1:4 및 0:1(강활:방풍)의 배합비율별로 <실시예 1>에 따라 제조하여 각각 1 ㎎/ear로 마우스에 도포하고, 도포 1시간 후, TPA로 귀부종을 유발시킨 마우스 염증모델에서 각 귀의 두께를 마이크로미터(micrometer)로 측정하여 부종억제지수를 산출하였다. 100% 부종지수는 TPA만 처리된 군으로 정의하여 상대적인 부종율(% of control)을 제시하였다. 모든 측정 결과는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 실험군 간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 통계학적 분석을 수행하였으며, $p < 0.05$ 값인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

[0111] 그 결과, 용매만 도포한 TPA 유발군과 비교하여 강활(1:0)은 27%, 방풍(0:1)은 21%의 부종억제율을 나타냈고, 강활과 방풍의 혼합 추출물은 강활과 방풍의 4:1배합은 28%, 2:1배합은 25%, 3:2배합은 23%, 4:3배합은 23%, 1:1배합은 37%, 3:4배합은 34%, 2:3배합은 31%, 1:2배합은 23% 및 1:4배합은 21%의 부종억제율을 보였다. 따라서, 강활과 방풍의 배합비율이 4:3 에서부터 1:2(57%>강활>33% : 67%>방풍>43%)에 해당하는 배합비율의 혼합 추출물의 염증성 부종 억제 효과는 각 약재 단독에 비해 통계적으로 유의 있는 차이가 있음을 나타냈다(표 4).

표 4

[0112]

배합비율(강활:방풍)	귀부종(% of control)
대조군(TPA)	100 ± 4
1:0	73 ± 4
4:1	72 ± 8
2:1	75 ± 8
3:2	77 ± 8
4:3	77 ± 7
1:1	63 ± 7
3:4	66 ± 6
2:3	69 ± 4
1:2	77 ± 13
1:4	79 ± 8
0:1	79 ± 3

[0113] 각 수치는 평균 ± SD(n=8)로 기재함.

[0114] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

[0115] **<제조예 1> 약학적 제제의 제조**

[0116] **<1-1> 산제의 제조**

[0117] 강활 및 방풍의 혼합 추출물 2 g

[0118] 유당 1 g

[0119] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0120] **<1-2> 정제의 제조**

[0121] 강활 및 방풍의 혼합 추출물 100 mg

[0122] 옥수수전분 100 mg

[0123] 유 당 100 mg

[0124] 스테아린산 마그네 2 mg

[0125] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0126] **<1-3> 캡슐제의 제조**

[0127] 강활 및 방풍의 혼합 추출물 100 mg

[0128] 옥수수전분 100 mg

[0129] 유 당 100 mg

[0130] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0131] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0132] **<1-4> 환의 제조**

[0133] 강활 및 방풍의 혼합 추출물 1 g

[0134] 유당 1.5 g

[0135] 글리세린 1 g

[0136] 자일리톨 0.5 g

[0137] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0138] **<1-5> 과립의 제조**

[0139] 강활 및 방풍의 혼합 추출물 150 mg

[0140] 대두추출물 50 mg

[0141] 포도당 200 mg

[0142] 전분 600 mg

[0143] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60 ℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

[0144] **<제조예 2> 식품의 제조**

[0145] 본 발명의 또한, 본 발명은 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

[0146] **<2-1> 밀가루 식품의 제조**

[0147] 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0148] **<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0149] 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0150] **<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조**

[0151] 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0152] **<2-4> 유제품(dairy products)의 제조**

[0153] 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0154] **<2-5> 선식의 제조**

[0155] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0156] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0157] 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0158] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0159] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0160] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0161] 강활 및 방풍의 혼합 추출물(3 중량부),

[0162] 영지(0.5 중량부),

[0163] 지황(0.5 중량부)

[0164] **<제조예 3> 음료의 제조**

[0165] **<3-1> 건강음료의 제조**

[0166] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0167] **<3-2> 야채주스의 제조**

[0168] 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물 5 g을 토마토 또는 당근주스 1,000 ㎖에 가하여 야채주스를 제조하였다.

[0169] **<3-3> 과일주스의 제조**

[0170] 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물 1 g을 사과 또는 포도주스 1,000 ㎖ 에 가하여 과일주스를 제조하였다.

[0171] **<제조예 4> 화장품의 제조**

[0172] 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장품으로 영양화장수, 크림, 에센스 등의 유화 제형의 화장품 및 유연화장수 등의 가용화 제형의 화장품을 제조하였다.

[0173] **<4-1> 유화 제형의 화장품 제조**

[0174] 표 5에 기재된 조성으로 유화제형의 화장품을 제조하였다. 제조 방법은 하기와 같다.

[0175] 1) 1 내지 9의 원료를 혼합한 혼합물을 65~70℃로 가열하였다.

[0176] 2) 10의 원료를 상기 단계 1)의 혼합물에 투입하였다.

[0177] 3) 11 내지 13의 원료의 혼합물을 65~70℃로 가열하여 완전히 용해시켰다.

[0178] 4) 상기 단계 3)을 거치면서, 상기 2)의 혼합물을 서서히 첨가하여 8,000 rpm에서 2~3분간 유화시켰다.

[0179] 5) 14의 원료를 소량의 물에 용해시킨 후 상기 단계 4)의 혼합물에 첨가하고 2분간 더 유화시켰다.

[0180] 6) 15 내지 17의 원료를 각각 평량한 후 상기 단계 5)의 혼합물에 넣고 30초간 더 유화시켰다.

[0181] 7) 상기 단계 6)의 혼합물을 유화 후 탈기과정을 거쳐 25~35℃로 냉각시킴으로써 유화제형의 화장품을 제조하였다.

표 5

[0182] 유화 제형 1, 2, 3의 조성

조성		유화제형 1	유화제형 2	유화제형 3
1	스테아린 산	0.3	0.3	0.3
2	스테알리 알코올	0.2	0.2	0.2
3	글리세릴 모노스테아레이트	1.2	1.2	1.2
4	밀납	0.4	0.4	0.4
5	폴리옥시에틸렌솔비탄 모노라우린산 에스테르	2.2	2.2	2.2
6	파라옥시안식향산 메틸	0.1	0.1	0.1
7	파라옥시안식향산 프로필	0.05	0.05	0.05
8	세틸에틸헥사노에이트	5	5	5
9	트리글리세라이드	2	2	2
10	사이클로메티콘	3	3	3
11	증류수	~ 100	~ 100	~ 100
12	농글리세린	5	5	5
13	트리에탄올아민	0.15	0.15	0.15
14	폴리아크릴산 중합체	0.12	0.12	0.12
15	색소	0.0001	0.0001	0.0001
16	향	0.10	0.10	0.10
17	강활 및 방풍의 혼합 추출물	0.0001	1	10

[0183] **<4-2> 가용화 제형의 화장품 제조**

[0184] 표 6에 기재된 조성으로 가용화 제형의 화장품을 제조하였다. 제조 방법은 하기와 같다.

[0185] 1) 2 내지 6의 원료를 1의 원료(정제수)에 넣고 아직믹서를 이용하여 용해시켰다.

[0186] 2) 8 내지 11의 원료를 7의 원료(알코올)에 넣고 완전 용해시켰다.

[0187] 3) 상기 단계 2)의 혼합물을 상기 단계 1)의 혼합물에 서서히 첨가하면서 가용화시켰다.

표 6

[0188] 가용화 제형 1, 2, 3의 조성

조성		가용화 제형 1	가용화 제형 2	가용화 제형 3
1	정제수	~ 100	~ 100	~ 100

2	농글리세린	3	3	3
3	1,3-부틸렌글리콜	2	2	2
4	EDTA-2Na	0.01	0.01	0.01
5	색소	0.0001	0.0002	0.0002
6	강활 및 방풍의 혼합 추출물	0.1	5	5
7	알코올(95%)	8	8	8
8	파라옥시안식향산 메틸	0.1	0.1	0.1
9	폴리옥시에틸렌 하이드로제네이디트에스테르	0.3	0.3	0.3
10	향	0.15	0.15	0.15
11	사이클로메티콘	-	-	0.2

산업이용 가능성

[0189] 상기와 같이, 본 발명의 강활 및 방풍의 혼합 추출물은 각각 단독으로 적용하는 것에 비해 적정비율로 혼합 추출시 항염증에 탁월한 효과가 있으므로 염증성 질환의 예방 및 치료에 관련된 약제, 또는 염증 개선용 피부 외용제, 화장료 조성물, 기능성 식품의 개발과 이들을 이용한 개선 또는 치료 방법 연구에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

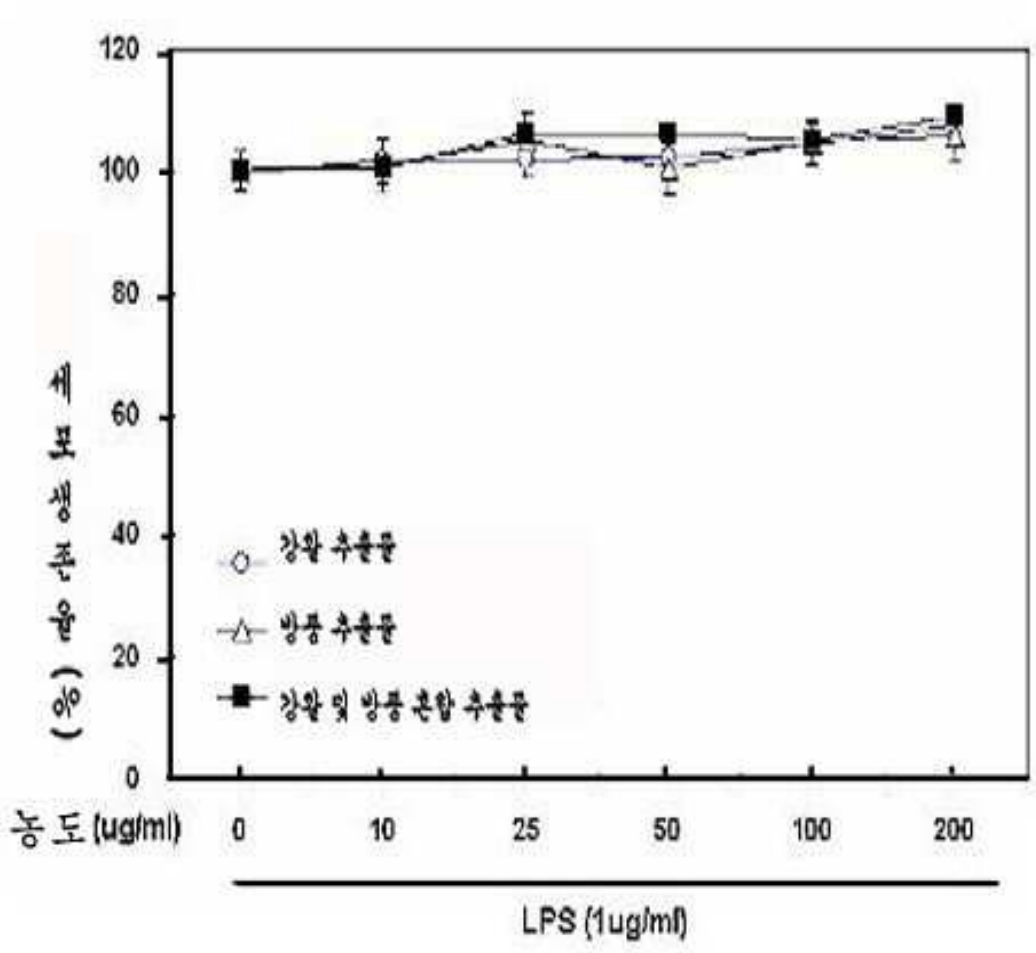
[0190] 도 1은 LPS로 활성화된 RAW264.7 세포의 강활 추출물, 방풍 추출물, 강활 및 방풍의 혼합 추출물에 대한 농도별 세포독성을 나타낸 그래프이다.

[0191] 도 2는 RAW264.7 세포에서 LPS로 유도된 IL-1β의 생성에 대한 강활 및 방풍 혼합 추출물의 억제 효과를 나타낸 그래프이다(*은 대조군과 비교한 $P < 0.01$, **은 강활 추출물 또는 방풍 추출물과 비교한 $P < 0.05$).

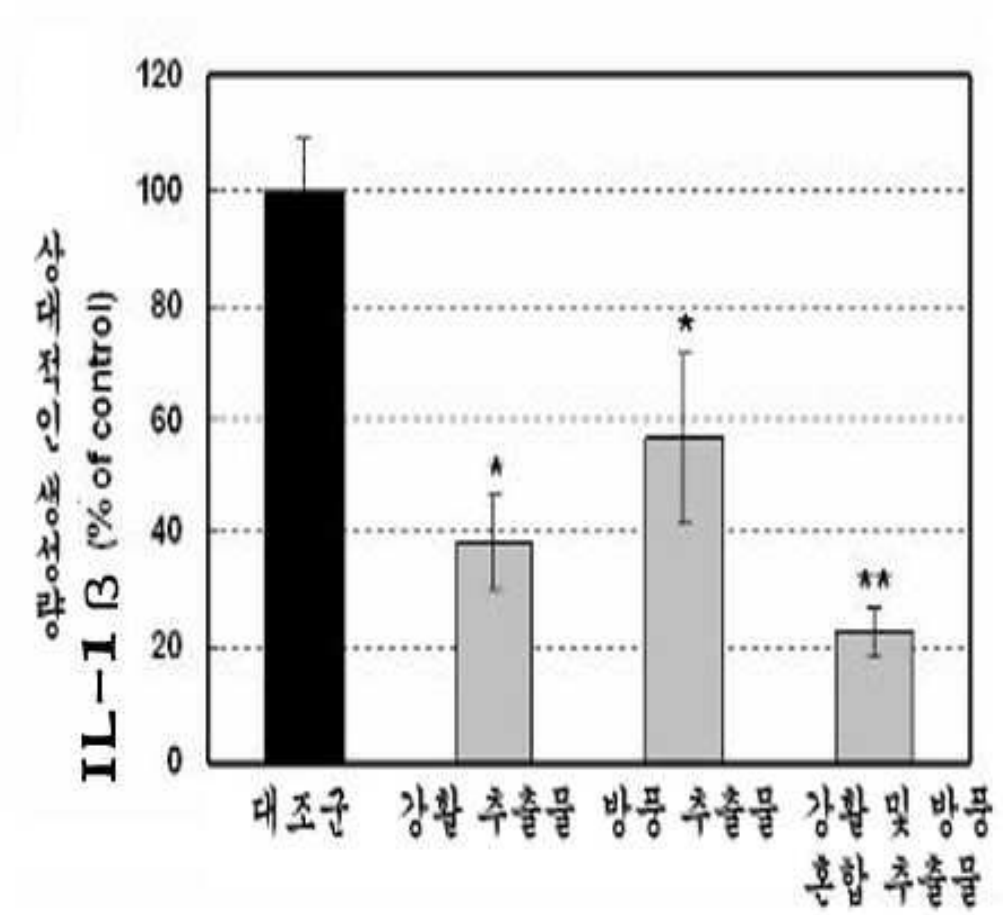
[0192] 도 3은 염증동물 모델에서 TPA로 유도된 귀부종에 대한 강활 및 방풍 1:1 혼합 추출물의 억제 효과를 나타낸 그래프이다(*은 대조군과 비교한 $P < 0.001$, **은 강활 추출물 또는 방풍 추출물과 비교한 $P < 0.001$).

도면

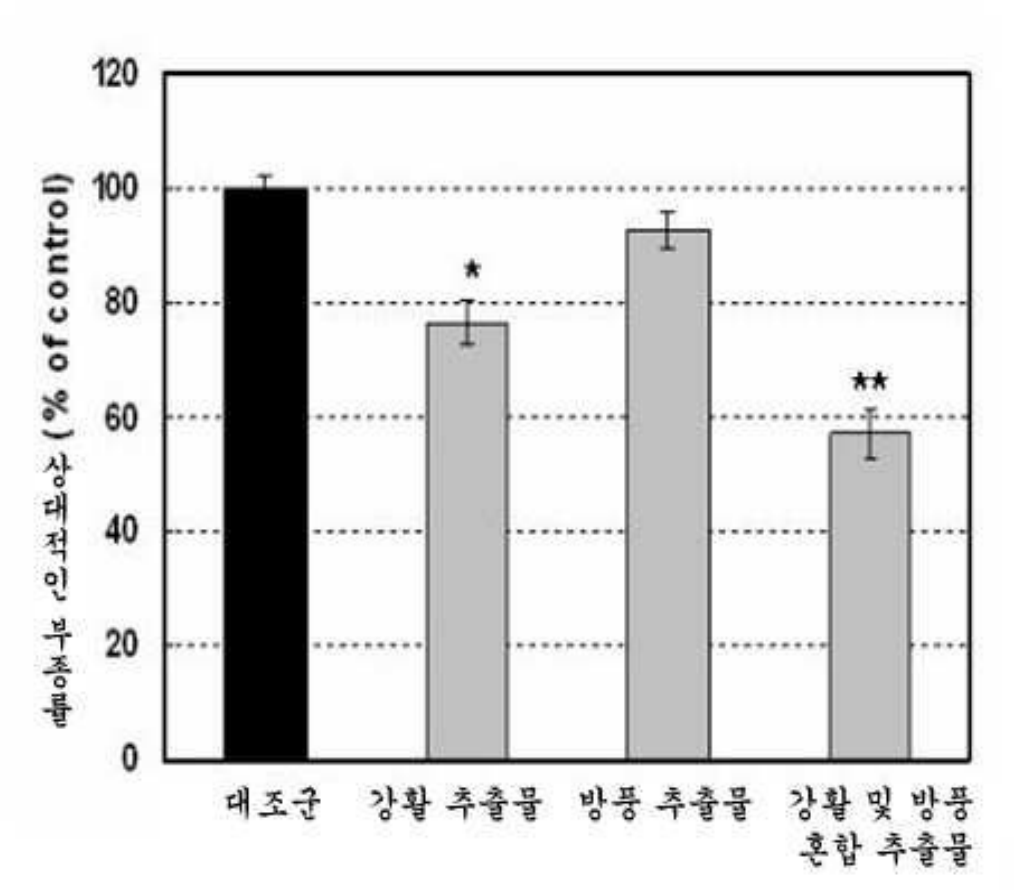
도면1


120
100
80
60
40
20
0
세포 생존율 (%)
강왈 추출물
방풍 추출물
강왈 및 방풍 혼합 추출물
농도 (ug/ml)
0
10
25
50
100
200
LPS (1ug/ml)

도면2


IL-1β 분비량의 상대적 변화율 (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
*
*
**
대조군
강활 추출물
방풍 추출물
강활 및 방풍 혼합 추출물

도면3


120
100
80
60
40
20
0
상대적인 부종률 (% of control)
*
**
대조군
강활 추출물
방풍 추출물
강활 및 방풍
혼합 추출물