



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0005686
(43) 공개일자 2012년01월17일

(51) Int. Cl.

A61K 36/282 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0066270
(22) 출원일자 2010년07월09일
심사청구일자 2010년07월09일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

김동현

서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)

한명주

서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)

(74) 대리인

안소영

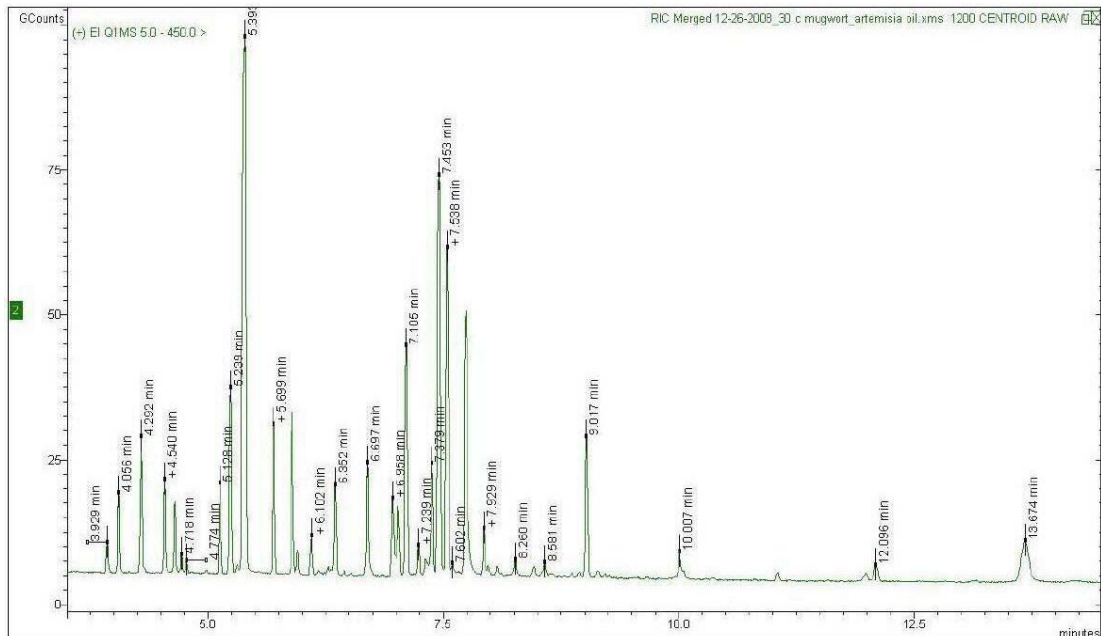
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 미생물 감염증 치료 또는 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 아르테미시아 프린세스(*Artemisia princeps*), 아르테미시아 카필라리스(*Artemisia capillaris*) 및 아르테미시아 이와요모기(*Artemisia iwayomogi*) 중에서 선택된 하나 이상의 쑥에서 추출한 수증기 증류 추출물을 유효성분으로 함유하는 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 와 *Gardnella vaginalis* 및 진균인 *Candida albicans* 중에서 선택된 하나 이상의 미생물 감염증 치료 또는 개선용 조성물, 질염 치료용 약학 조성물, 질염 개선용 세정제 조성물, 1-octen-3-ol을 유효성분으로 포함하는 미생물 감염증 치료 또는 개선용 조성물, 질염 치료용 약학 조성물, 질염 개선용 세정제 조성물, 및 alpha-terpineol 및 eugenol 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 와 *Gardnella vaginalis* 및 진균인 *Candida albicans* 중에서 선택된 하나 이상의 미생물 감염증 치료 또는 개선용 조성물, 질염 치료용 약학 조성물, 질염 개선용 세정제 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae*, *Gardnella vaginalis* 및/또는 진균인 *Candida albicans*를 억제할 수 있고, 질염 치료 또는 개선에 효과적이다. 또한, 유익균인 유산균의 성장에는 영향이 크지 않다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

아르테미시아 프린셉스(*Artemisia princeps*), 아르테미시아 카필라리스(*Artemisa capillaris*), 및 아르테미시아 이와요모기(*Artemisia iwayomogi*) 중에서 선택된 하나 이상의 쑥에서 추출한 수증기 증류 추출물을 유효성분으로 함유하는 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 와 *Gardnella vaginalis* 및 진균인 *Candida albicans* 중에서 선택된 하나 이상의 미생물 감염증 치료 또는 개선용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아르테미시아 프린셉스는 사자발쑥 또는 싸주아리쑥 중에서 선택된 하나 이상인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 수증기 증류 추출물은 가압수증기 증류 추출물인 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 가압수증기는 포화수증기압이 대기압 보다 큰 수증기인 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 가압수증기 증류 추출물은 *trans*-sabinene hydrate, *cis*-sabinene hydrate, terpinene-4-ol, beta-caryophyllene, 1-octen-3-ol, alpha-terpineol, germacrene D, valencene, 및 cryophylene oxide 중에서 선택된 하나 이상의 활성성분을 포함하는 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수증기 증류 추출물은 밀폐용기에서 섭씨 105~110도로 가열한 수증기로 쑥을 통과시켜 증류 추출한 것인 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추출물은 Eucalyptol, borneol, alpha-terpineol, 1-Octen-3-ol 및 eugenol 중에서 선택된 하나 이상을 활성성분으로 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 활성성분은 전체 추출물 중 50 v/v% 이상 포함하는 것인 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 및 *Gardnella vaginalis*와 진균인 *Candida albicans* 감염증 치료 또는 개선용인 조성물.

청구항 10

아르테미시아 프린셉스(*Artemisia princeps*), 아르테미시아 카필라리스(*Artemisa capillaris*), 및 아르테미시아 이와요모기(*Artemisia iwayomogi*) 중에서 선택된 하나 이상의 쑥에서 추출한 수증기 증류 추출물을 유효성분으로 함유하는 질염 치료용 약학 조성물.

청구항 11

아르테미시아 프린셉스(*Artemisia princeps*), 아르테미시아 카필라리스(*Artemisa capillaris*), 및 아르테미시아 이와요모기(*Artemisia iwayomogi*) 중에서 선택된 하나 이상의 쑥에서 추출한 수증기 증류 추출물을 유효성분으로 함유하는 질염 개선용 세정제 조성물.

청구항 12

1-octen-3-ol을 활성성분으로 함유하는 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 와 *Gardnella vaginalis* 및 진균인 *Candida albicans* 중에서 선택된 하나 이상의 미생물 감염증 치료 또는 개선용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 미생물은 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 및 *Gardnella vaginalis*와 진균인 *Candida albicans*인 조성물.

청구항 14

1-octen-3-ol을 활성성분으로 포함하는 질염 치료용 약학 조성물.

청구항 15

1-octen-3-ol을 활성성분으로 포함하는 질염 개선용 세정제 조성물.

청구항 16

alpha-terpineol, 및 eugenol 중에서 선택된 하나 이상을 활성성분으로 함유하는 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 및 *Gardnella vaginalis* 중에서 선택된 하나 이상의 미생물 감염증 치료 또는 개선용 조성물.

청구항 17

alpha-terpineol, 및 eugenol 중에서 선택된 하나 이상을 활성성분으로 포함하는 질염 치료용 약학 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 질염은 세균성 질염인 조성물.

청구항 19

alpha-terpineol, 및 eugenol 중에서 선택된 하나 이상을 활성성분으로 포함하는 질염 개선용 세정제 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 질염은 세균성 질염인 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 와 *Gardnella vaginalis* 및 진균인 *Candida albicans* 중에서 선택된 하나 이상의 미생물 감염증 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 질염 치료 및/또는 개선에 효과적인 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 쑥은 아시아, 유럽, 미국을 비롯한 북반구에 널리 분포하는 국화과 식물로, 약 400여 종이 알려져 있으며, 우리나라에 약 30여종이 자생하고 있다. 그 종류로는 가는잎쑥 *Artemisia subulata* Nakai / *A. stenophylla* Kitamura, 개똥쑥 *Artemisia annua* Linne, 개사철쑥 *Artemisia apiaceae*, 구름떡쑥 ; *Anaphalis sinica* Hance ssp. *morii* (Nakai) Kitamura, 구와쑥 ; *Artemisia laciniata* Willd, 그늘쑥 *Artemisia sylvatica* Maximowicz, 금떡쑥 *Gnaphalium hypoleucum* DC, 금쑥 *Artemisia aurata*, 넓은잎외쑥 *Artemisia stolonifera* (Max.) Komarov, 난쟁이은쑥 (Silver Mound) *Artemisia schmidtiana*, 더위지기 *Artemisia iwayomogi*, 덩불쑥 *Artemisia rubripes* Nakai, 떡쑥 *Gnaphalium affine* D. Don, 맑은대쑥 *Artemisia keiskeana*, 물쑥 *Artemisia selengensis* TURCZ, 비단쑥 *Artemisia lagocephala* var. *triloba*, 비쑥 *Artemisia scoparia* Waldstein et Kitamura, 뽕쑥 *Artemisia feddei* Leveille et Vaniot, 사철쑥 (Tarragon) *Artemisia capillaris* Thunberg, 산쑥 *Artemisia montana* Pampan, 산토닌쑥 *Artemisia maritima*, 산흰쑥 *Artemisia sieversiana* Willd, 생당쑥 *Artemisia messerschmidtiana* var. *viridis* Bess, 섬쑥 *Artemisia hallaisanensis* Nakai, 실재비쑥 *Artemisia japonica* var. *angustissima*, 쑥(약쑥, 사자발쑥) *Artemisia princeps* var. *orientalis* (Pamp.)

Hara), 약쑥 *Artemisia asiatica* NAKAI, 외쑥 (*A. viridissima* Pamp.), 쓴쑥 (wormwood) *Artemisia absinthium*, 울무쑥 *Artemisia koidzumii* Nakai, 인진쑥 *Artemisa capillaris* THUNB, 제비쑥 *Artemisia japonica* THUNBERG, 참쑥 (*A. lavandulaefolia* DC, *Artemisia mongolica* Fischer), 큰제비쑥 *Artemisia fukudo* Makino, 털산쑥 *Artemisia sacrorum* Ledeb. ssp. *manshurica* Kitamura, 황해쑥 *Artemisia argyi* Leveille et Vaniot, 흰쑥 (Beach wormwood) *Artemisia stelleriana* Bess 등과 같이 다양한 쑥이 있다. 이 외에도 개사철쑥, 섬제비쑥, 흰더위지기쑥, 흰산쑥, 외잎물쑥 등이 알려져 있다. 그 중 강화도에 분포하는 쑥으로 아르테미시아 프린세스(*Artemisia princeps* Pamp.)가 있으며, 통상 싸주아리쑥과 사자발쑥을 통칭한다.

[0003] 우리나라에 서식하고 있는 30여 종의 쑥은 외부형태나 함유하고 있는 성분들간에도 상당한 차이를 보이고 있으며, 그 쓰임새(효능)도 각기 다르다.

[0004] 쑥은 애엽이라 하여 중국의 전국시대 (BC 403-221)에서 저술한 시경에서 애라고 하여 처음 등장하고 있어 이때부터 사용해 온 것으로 추정하고 있다. 한방에서 청호를 학질에 사용하는 것에 기초하여 청호(*A. annua*)로부터 말라리아치료제인 artemisinin을 분리하여 사용하고 있고, 애엽(*Artemisia asiatica*)의 추출물(DA-9601)을 위궤양치료제인 스틸렌으로 개발하여 사용하고 있다.

[0005] 그 외에 민간에서는 지혈약으로 산후하혈, 코피, 자궁출혈, 등에 사용하고, 그 외에도 강장보혈, 부인과 건위, 설사치료 등에 사용한다.

[0006] 쑥을 이용하여 다양한 건강식품 또는 화장품으로 개발되어 왔다. 화장품의 향료, 방부제, 향균화장품, 생리대, 쑥뜸기, 훈증좌욕제, 입욕제 등이 있다. 이런 목적으로 사용하는 쑥은 대부분 한방에서 사용하는 애엽(*A. asiatica*)이다.

[0007] 한편, 질염은 냉, 대하증을 동반하는 대부분의 여성이 흔히 갖고 있는 부인과 질환으로서, 냉, 대하 외에 가려움증, 성관계시 통증, 소변시 쓰라림과 화끈거림 또는 냄새가 나기도 한다. 그 중 감염성 질염은 세균성 질염과 칸디다성 질염이 대부분이다. 세균성 질염은 혐기성 균주인 *Atopodium vaginae* 및/또는 *Gardenella vaginalis* 균주에 의해 발생하고, 그 외에 질의 입구 주위에는 호기성 균주인 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 가 감염되어 있다. 그러므로 질염을 근본적으로 치료를 하기 위해서는 혐기성 균주인 *Atopobium vaginae* 및 *Gardenella vaginalis*를 퇴치해야 한다.

[0008] 진균성 질염은 대부분 칸디다알비칸스(*Candida albicans*)에 의해 발생한다. 그러나, 진균성 질염은 세균성 질염과 다르게 아졸계 항진균제로 개선할 수는 있으나, 이 항균제에 의해 퇴치할 수 없는 질환이므로 새로운 약물의 개발이 요구되고 있다.

[0009] 이런 감염증에 사용되는 항미생물제는 균의 종류에 따라 그 효능이 다르며, 세균성 질염과 칸디다성 질염의 원인균을 동시에 억제하는 항미생물제는 흔하지 않다. 예를 들면, penicillin은 포도상구균을 잘 죽이나, 진균인 칸디다균을 잘 죽이지 못한다. 그러나, itraconazole과 같은 아졸계 제제는 칸디다와 같은 진균은 죽이나 포도상구균과 같은 세균은 잘 죽이지 못한다.

[0010] 본 발명자들은 다양한 질염의 원인이 되는 *Atopobium vaginae* 및 *Gardenella vaginalis* 세균과 *Candida albicans* 진균을 효과적으로 억제하는 천연 약물을 연구한 결과, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명이 해결하고자 하는 하나의 과제는 질염원인균인 혐기성 세균 *Atopobium vaginae* 와 *Gardnella vaginalis* 및 진균인 *Candida albicans* 중에서 선택된 하나 이상의 미생물 감염증 치료 또는 개선에 효과적인 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명이 해결하고자 하는 또 하나의 과제는 질염 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명이 해결하고자 하는 또 하나의 과제는 질염 개선용 세정제 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 아르테미시아 프린세스(*Artemisia princeps*), 아르테미시아 카필라리스(*Artemisa capillaris*), 및 아르테미시아 이와요모기(*Artemisia iwayomogi*) 중에서 선택된 하나 이상의 쑥에서 추출한 수증기 증류 추출물

을 유효성분으로 함유하는 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 와 *Gardnella vaginalis* 및 진균인 *Candida albicans* 중에서 선택된 하나 이상의 미생물 감염증 치료 또는 개선용 조성물을 제공한다.

- [0015] 상기 아르테미시아 프린셉스는 사자발쑥 및/또는 싸주아리쑥 등을 포함하며, 바람직하게는 사자발쑥이다.
- [0016] 상기 수증기 증류 추출물은 수증기를 쑥에 통과시킨 후, 통과한 수증기를 응축시킨 추출물을 의미한다. 상기 수증기 증류 추출물은 바람직하게는 가압수증기 증류 추출물로, 상기 가압수증기는 포화수증기압이 대기압 보다 큰 수증기를 의미한다. 밀폐조건에서 대기압조건에서 섭씨 100도를 넘는 온도로 물을 가열시 포화수증기압은 대기압보다 커지게 되어 가압수증기가 되는 것이다. 수증기 증류 추출물은 통상의 수증기 증류 추출 장치를 이용하여 제조할 수 있으며, 대한민국 등록특허 제10-0820344호에 기재된 장치 등을 사용하여 가압수증기 증류 추출물의 제조가 가능하다.
- [0017] 상기 가압수증기 증류 추출물은 바람직하게는 trans-sabinene hydrate, cis-sabinene hydrate, terpinene-4-ol, beta-caryophyllene, 1-octen-3-ol, alpha-terpineol, germacrene D, valencene, 및 caryophyllene oxide 중에서 선택된 하나 이상의 활성성분을 포함할 수 있다.
- [0018] 상기 수증기 증류 추출물은 이로써 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 밀폐용기에서 섭씨 105~110도로 가열한 수증기로 쑥을 통과시켜 증류 추출한 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 조성물 중 유효성분인 수증기 증류 추출물은 Eucalyptol, borneol, alpha-terpineol, 1-Octen-3-ol 및 eugenol 중에서 선택된 하나 이상을 활성성분으로 포함할 수 있으며, 상기 활성성분은 전체 추출물 중 50 v/v% 이상 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 조성물 중 유효성분은 바람직하게는 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 및 *Gardnella vaginalis*와 진균인 *Candida albicans* 감염증 치료 또는 개선용이며, 질염의 원인균인 세균과 진균을 동시에 억제할 수 있어 다양한 질염에 효과적이다.
- [0021] 상기 치료 또는 개선용 조성물은 약학조성물 또는 세정제 조성물일 수 있으며, 상기 세정제는 바람직하게는 질 세정제일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 조성물 중 추출물은 생육억제시 질염에 효과를 나타내는 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 및/또는 *Gardnella vaginalis* 및/또는 진균인 *Candida albicans* 등을 억제하는 효과가 뛰어나므로, 본 발명은 본 발명 조성물 중 추출물의 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 및/또는 *Gardnella vaginalis* 및/또는 진균인 *Candida albicans* 감염증 치료 또는 개선 용도, 질염 치료 또는 개선 용도를 제공한다.
- [0023] 따라서, 본 발명은 본 발명의 조성물 중 추출물을 유효성분으로 포함하는 질염 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 본 발명의 조성물 중 추출물을 유효성분으로 포함하는 질염 개선용 세정제 조성물을 제공한다. 상기 세정제는 바람직하게는 질세정제일 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 1-octen-3-ol을 활성성분으로 함유하는 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 와 *Gardnella vaginalis* 및 진균인 *Candida albicans* 중에서 선택된 하나 이상의 미생물 감염증 치료 또는 개선용 조성물을 제공한다.
- [0026] 바람직하게는, 상기 미생물은 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 및 *Gardnella vaginalis*와 진균인 *Candida albicans*일 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 1-octen-3-ol을 활성성분으로 포함하는 질염 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 1-octen-3-ol을 활성성분으로 포함하는 질염 개선용 세정제 조성물을 제공한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 alpha-terpineol, 및 eugenol 중에서 선택된 하나 이상을 활성성분으로 함유하는 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 및 *Gardnella vaginalis* 중에서 선택된 하나 이상의 미생물 감염증 치료 또는 개선용 조성물을 제공한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 alpha-terpineol, 및 eugenol 중에서 선택된 하나 이상을 활성성분으로 함유하는 질염 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0031] 또한, 본 발명은 alpha-terpineol, 및 eugenol 중에서 선택된 하나 이상을 활성성분으로 함유하는 질염 개선용 세정제 조성물을 제공한다.

- [0032] 본 발명에 있어서, 질염은 진균성 질염 및/또는 세균성 질염일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 조성물 중 포함되는 활성성분은 바람직하게는 아르테미시아 프린셉스(Artemisia princeps)에서 추출된 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 치료 또는 개선용 조성물은 약학조성물 또는 세정제 조성물일 수 있으며, 상기 세정제는 바람직하게는 질세정제일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 조성물 중 유효성분 및/또는 활성성분은 총 중량 중 0.5~20중량%일 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 본 발명의 조성물 중 유효성분 및/또는 활성성분을 필요로 하는 포유류(인간을 포함함)에게 투여하는 단계를 포함하는 혐기성 세균인 Atopobium vaginae 및 Gardnerella vaginalis와 진균인 Candida albicans 중에서 선택된 하나 이상의 감염증 치료 또는 개선법, 질염 치료법, 질염 개선용 세정법을 제공한다.
- [0037] 별도의 언급이 없는 한, 본 발명의 조성물에 관한 내용은 본 발명의 조성물 중 유효성분과 활성성분의 용도 및 방법에도 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.
- [0038] 본 발명의 조성물, 조성물 중 유효성분, 및 활성성분은 인간을 포함한 포유류에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 유효성분 또는 활성성분을 약학적으로 또는 화장품학적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 제제화하여 투여할 수 있다.
- [0039] 제제화할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 좌제 등이 포함되며, 좌제의 기재로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및/또는 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명의 조성물, 조성물 중 유효성분, 및 활성성분에 약제학적으로 허용 가능한 유화제, 희석제, 부형제 등을 첨가하거나, 화장품 제조용 기재 물질을 첨가할 수 있으며, 제한이 있는 것은 아니나, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 클렌징, 파운데이션, 및 스프레이 중에서 선택된 제형을 갖도록 제조될 수 있다. 약학적 투여 형태는 외용제일 수 있으며, 바람직하게는 스프레이제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타폴라스마제 등의 피부 외용제를 들 수 있다. 본 발명의 조성물, 조성물 중 유효성분, 또는 활성성분을 성인 기준으로 0.01~10mg/회, 1~6회/일 적용부위에 분무, 도포하거나 적용부위를 세척하는 외용으로 적용할 수 있다.
- [0041] 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다.

발명의 효과

- [0042] 본 발명의 조성물은 혐기성 세균인 Atopobium vaginae, Gardnerella vaginalis 및/또는 진균인 Candida albicans를 억제할 수 있고, 질염 치료(개선)에 효과적이다. 또한, 유익균인 유산균의 성장에는 영향이 크지 않다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 일 제조예의 GC-MS 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 이하, 실시예 및 제조예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명하나, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐으로 본 발명의 내용이 하기 실시예나 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0045] <제조예 1> 가압하에서 섭씨 105도까지 끓인 수증기 증류 추출물 제조
- [0046] 아르테미시아 프린셉스(생사자발쑥(또는 생싸주아리쑥); 대한민국, 강화도) 500g을 수증기증류장치(EssenLab-plus, 한일랩테크, 한국)에 넣고, 밀폐용기에서 섭씨 105도까지 가열한 수증기로 쑥을 통과시킨 후, 상기 수증기를 실온(섭씨 10~25도)으로 냉각시켜 정유층을 취하여 수증기 증류 추출물을 제조하였다.
- [0047] <제조예 2> 가압하에서 섭씨 110도까지 끓인 수증기 증류 추출물 제조
- [0048] 섭씨 105도 대신 섭씨 110도까지 밀폐용기에서 끓여 만든 수증기를 사용한 것을 제외하고, 제조예 1과 동일한

방법으로 가압수증기 증류 추출물을 제조하였다.

[0049] <제조예 3> 수증기 증류 추출물 제조

[0050] 섭씨 105도 대신 섭씨 100도까지 가열한 수증기를 사용한 것을 제외하고, 제조예 1과 동일한 방법으로 수증기 증류 추출물을 제조하였다.

[0051] <참고예 1> 에테르 추출물 제조

[0052] 생사자발쑥 1kg을 5리터의 에테르에 실온에서 하룻밤 동안 침지하여 추출한 후, 여과지로 여과하고 회전감압농축기(선일아일라, Eyla KSB201, 한국)로 농축하여 에테르 추출물을 제조하였다.

[0053] <참고예 2> 알코올 추출물 제조

[0054] 생사자발쑥 1kg을 건조하고 80%에탄올 5리터에 2시간 동안 섭씨 100도 수욕상에서 환류추출하고, 그 상등액을 감압농축하여 알코올 추출물을 제조하였다.

[0055] <참고예 3> 물추출물 제조

[0056] 생사자발쑥 1kg을 5리터의 물로 섭씨 100도에서 2시간 수욕상에서 환류 추출하고, 여과지로 여과하고 그 상등액을 감압농축하여 물추출물을 제조하였다.

[0057] <참고예 4> 라벤다 수증기 증류 추출물 제조

[0058] 아르테미시아 프린셉스 대신 라벤다(Herb Mall, 한국)를 사용한 것을 제외하고, 제조예 1과 동일한 방법으로 라벤다 수증기 증류 추출물을 제조하였다.

[0059] <비교예 1> 참쑥의 메탄올 추출물 제조

[0060] 참쑥(*Artemisia mongolica* Fischer, 경동시장, 한국) 0.5 kg을 건조하고 메탄올 2.5리터에 2시간 동안 섭씨 80도 수욕상에서 환류추출하고, 그 상등액을 감압농축하여 메탄올 추출물을 제조하였다.

[0061] <비교예 2> 참쑥의 에탄올 추출물 제조

[0062] 참쑥(*Artemisia mongolica* Fischer, 경동시장, 한국) 0.5 kg을 건조하고 80%에탄올 2.5리터에 2시간 동안 섭씨 100도 수욕상에서 환류추출하고, 그 상등액을 감압농축하여 메탄올 추출물을 제조하였다.

[0063] <비교예 3> 참쑥의 아세톤 추출물 제조

[0064] 참쑥(*Artemisia mongolica* Fischer, 경동시장, 한국.) 0.5kg을 건조하고 아세톤 2.5리터에 24시간 동안 냉침(실온)하여 추출하고, 그 상등액을 감압농축하여 아세톤 추출물을 제조하였다.

[0065] <실험예 1> 추출물 수율 계산

[0066] 제조예 1~3과 참고예 1~3의 추출물에 대하여 수율을 계산하고, 그 결과를 하기 표에 나타내었다. 수율의 계산은 추출에 사용한 양 대비 추출하여 얻은 양으로 계산하였다.

[0067] [표 1]

	추출물 수율(ml/kg)			추출물 수율(g/kg)		
	100도 수증기증류 추출물	105도 가압 수증기 증류 추출물	110도가압 수증기 증류 추출물	물분획	에테르분획	알콜분획
추출수율	5.5	7.5	15.8	4.1	0.8	4.9

[0068] 그 결과 가압수증기 추출물의 수율이 다른 추출물에 비해 현저히 큼을 알 수 있다.

[0069] 이와 같은 결과로 부터 본원 발명의 추출물은 고수율의 추출물임을 알 수 있다.

[0070] <실험예 2> 제조예 2 추출물의 GC-MS 분석

[0071] 하기 조건으로 제조예 2에서 제조한 사자발쑥 추출물의 GC-MS 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 1과 하기 표에

나타내었다. 도 1은 GC-MS 분석 결과로 x축은 retention time(분), y축은 피크의 높이를 나타낸다.

[0073] <GC-MS 분석>

[0074] - 분석장비 : GC/MS Varian GC3800, MS Saturn1200

[0075] - 분석조건 : Column VF-5MS

[0076] 70℃ 1분, 250℃ 6분 (승온 10℃/분)

[0077] Injection vol. 2μl, temp. 200℃, split ratio 50:1

[0078] [표 2]

No	Retention Time (min.)	Components	Area %	Total	Signal/Noise	
1	3.929	alpha-Thujene	0.63	7446000000	0.632	243
2	4.056	alpha-Pinene	1.53	17990000000	1.527	641
3	4.292	Camphene	2.75	32350000000	2.745	986
4	4.540	1-Octen-3-ol	1.77	20880000000	1.772	626
5	4.650	beta-Pinene	1.36	16050000000	1.362	461
6	4.718	unknown	0.31	3596000000	0.305	115
7	5.128	alpha-Terpinene	1.85	21740000000	1.845	489
8	5.239	methyl(1-methylethyl)- Benzene	4.26	50140000000	4.255	1238
9	5.393	Eucalyptol	21.07	248000000000	21.045	3503
10	5.699	gamma-Terpinene	3.33	39250000000	3.331	993
11	5.895	Sabinene hydrate	3.21	37810000000	3.209	913
12	5.954	Artemisia alcohol (cas57590-19-9)	0.51	5979000000	0.507	136
13	6.102	alpha-Terpinolene	0.79	9321000000	0.791	162
14	6.352	trans-sabinene hydrate	1.83	21560000000	1.829	351
15	6.697	1-methyl-4-(1-methylethyl), trans-2-Cyclohexen-1-ol	2.58	30390000000	2.579	457
16	6.958	1-methyl-4-(1-methylethyl),cis-2-Cyclohexen-1-ol	2.33	27400000000	2.325	201
17	7.024	4,6,6-trimethyl-, [1s-(1.alpha,2beta,5.alpha)]-Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol	1.56	18350000000	1.557	173
18	7.105	Camphore	6.17	72640000000	6.164	576
19	7.239	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol	0.66	7823000000	0.664	75
20	7.309	unknown	0.37	4319000000	0.367	37
21	7.379	unknown	2.93	34510000000	2.929	308
22	7.453	Borneol	12.23	143900000000	12.216	1201
23	7.538	1,4-Terpineol	8.74	102900000000	8.731	983
24	7.737	alpha-Terpineol	8.21	96580000000	8.196	770
25	7.929	3-methyl-6-(1-methylethyl)-,trans-2-Cyclohexen-1-ol	1.31	15460000000	1.312	140
26	8.070	2-methyl-5-(1-methylethyl)-,cis-2-Cyclohexen-1-ol	0.29	3443000000	0.292	28
27	8.260	unknown	0.45	5286000000	0.449	60
28	8.581	Chrysanthenyl acetate	0.28	3241000000	0.275	43
29	9.017	Acetic acid	3.67	43150000000	3.662	698
30	10.007	Eugenol	0.92	10880000000	0.923	163
31	13.674	Caryophyllene oxide	2.09	24560000000	2.084	227

[0079] 상기 표에 기재된 성분들이 제조예 2 추출물에 포함되어 있음을 확인하였다.

[0080] <실시에 1> 추출물 항균력 확인

[0081] GAM(general anaerobic medium)배지(일본 Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., 일본)에 Provotella bivia(Atopobium vaginae)(KCTC 생물자원센터, 한국생명공학원, 한국)를 이식한 것, Gardnerella vaginalis(KCTC 생물자원센터, 한국생명공학원, 한국)를 이식한 것, Sabouraud dextrose 한천 배지(Difco 사, 미국)를 만들어 Candida albicans(KCTC 생물자원센터, 한국생명공학원, 한국)를 이식한 것에 각각 멸균한 5 mm Watman 여지 디스크를 적당히 고르게 5개 올려놓는다. 이 여지 디스크에 50 uI 검체를 2회에 걸쳐 흡입(점적)시킨다. 그리고 GAM 배지에 이식한 것은 섭씨 37도에서 혐기적으로 48시간, 나머지 배지에 이식한 것은 섭씨 37도에서 24시간동안 배양한다. 그리고 이식한 균주가 자라지않는 저지zone의 크기(지름)를 측정하였다. 검체는 제조예 1~3과 참고예 1~3의 추출물, 참고예 4의 라벤다 가압 수증기 증류 추출물과 수증기 증류에 의해 추출되는

사자발쑥의 주성분인 유칼립톨(다른 이름이 '신네올'임)(시그마사, 미국) 또는 보르네올(시그마사, 미국), 대조 약물로는 Tetracycline(시그마사, 미국) 또는 cotrimoxazole(시그마사, 미국)을 사용하였다. 또한, 아르테미시아 프린셉스 대신 표 4에 기재된 쑥을 사용한 것을 제외하고, 제조예 2와 동일한 방법으로 제조한 쑥 수증기 가압 추출물과 비교예 1~3의 추출물을 검체로 사용하였다.

그 결과를 하기 표 3 내지 표 5에 정리하였다.

[표 3]

	저지대(Inhibition zone, mm)										
	아르테미시아 프린셉스(사자발쑥)						105도 수증기 증류 라벤더 추출물	1,8-cineole	Bornneol	Tetracycline	Cotrimoxazole
	100도 수증기 증류 추출물	105도 수증기 증류 추출물	110도 수증기 증류 추출물	물분획	에테르 분획	알콜분획					
Atopobium vaginae	0.7	2.2	2.8	<0.5	0.7	<0.5	<0.5	0.7	0.7	1.9	<0.5
Gardnella vaginalis	0.7	2.1	3.3	<0.5	0.7	<0.5	<0.5	0.7	0.7	2.0	<0.5
Bifidobacterium longum	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	0.7	<0.5	<0.5	0.5	0.5	1.8	<0.5
Lactobacillus acidophilus	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	0.7	<0.5	<0.5	0.6	0.5	1.6	<0.5
Candida albicans	0.6	0.8	1.3	<0.5	0.6	<0.5	<0.5	0.6	0.5	<0.5	1.6

그 결과, 물, 에테르, 알콜 추출물이나 종래 항균 활성이 알려져 있는 라벤더 추출물에 비해, 아르테미시아 프린셉스의 수증기 증류 추출물이 유익균인 Bifidobacterium longum과 Lactobacillus acidophilus는 크게 억제하지 않으면서 혐기성 세균인 Atopobium vaginae 와 Gardnella vaginalis 및 진균인 Candida albicans을 효과적으로 억제함을 알 수 있다. 또한, 수증기 증류 추출물 중 주성분인 유칼립톨과 보르네올은 항균력이 크지 않은 것으로 부터 가압 수증기 증류 추출물 중 함유되는 성분이 항균력이 큼을 알 수 있다. 따라서, trans-sabinene hydrate, cis-sabinene hydrate, terpinene-4-ol, beta-caryophyllene, 1-octan-3-ol, alpha-terpineol, germacrene D, valencene, 및 cryophyllene oxide 중에서 선택된 하나 이상을 함유한 가압 수증기 증류 추출물이 혐기성 세균인 Atopobium vaginae 와 Gardnella vaginalis 및 진균인 Candida albicans의 억제에 효과적인 것으로 판단된다.

[표 4]

	저지대(Inhibition zone, mm)			
	아르테미시아 프린셉스	아르테미시아 카필라리스 (인진쑥)	아르테미시아 몽골리카 피셔 (참쑥)	아르테미시아 이와요모기 (더위지기쑥)
Atopobium vaginae	2.8	1.8	0.9	1.1
Gardnella vaginalis	3.2	1.2	1.1	1.2
Candida albicans	1.3	0.8	0.5	0.9

다양한 쑥의 가압수증기 추출물 중 아르테미시아 프린셉스 추출물이 가장 우수하게 세균과 진균을 억제하고, 인진쑥, 더위지기쑥이 세균, 진균에 모두 효과를 나타냄을 알 수 있다. 반면 참쑥은 질염원인 세균과 진균 모두에 효과를 나타내지 못하였다. 따라서, 특히 아르테미시아 프린셉스 가압수증기 추출물은 특히 혐기성 세균인 Atopobium vaginae 와 Gardnella vaginalis 및 진균인 Candida albicans에 의한 감염증에 현저한 효과를 나타냄을 알 수 있다. 특히 참쑥과 비교시 Candida albicans 억제 효과는 6.76배(아시아티카 프린셉스 저지대 면적/

참쭈 저지대 면적=(3.14*1.3²)/(3.14*0.5²)=6.76임을 알 수 있다.

[표 5]

	저지대(Inhibition zone, mm)		
	참쭈		
	아세톤	메탄올	에탄올
<i>Atopobium vaginae</i>	0.6	<0.5	<0.5
<i>Gardnella vaginalis</i>	0.6	<0.5	<0.5
<i>Candida albicans</i>	<0.5	<0.5	<0.5

참쭈의 다양한 용매 추출물은 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 와 *Gardnella vaginalis* 및 진균인 *Candida albicans*을 효과적으로 억제하지 못함을 알 수 있다.

따라서, 다양한 쭈 중 아르테미시아 프린셉스, 아르테미시아 카필라리스, 아르테미시아 이와요모기의 수증기 증류 추출물이 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 와 *Gardnella vaginalis* 및 진균인 *Candida albicans*을 효과적으로 억제할 수 있고, 질염에 효과적임을 알 수 있다.

<실시예 2> 성분별 항균력 확인

실시예 1의 검체 대신 표 6에 기재된 성분을 검체로 사용한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 방법으로 항균력 확인 실험을 하였다. 대조약물로는 Tetracycline 또는 cotrimoxazole을 사용하였다. 표 6에 기재된 성분과 대조약물은 시그마사(미국)에서 구입한 것을 사용하였다.

그 결과를 하기 표 6에 정리하였다.

[표 6]

	저지대(Inhibition zone, mm)											
	α-Pinen e	Cam phe ne	1-O cte n-3 -ol	Euc alyp tol	γ-T erpi nen e	Sabi nen e hydr ate	Cam phor	Born eol	α -Ter pine ol	euge nol	Tetrac ycline	Cotrim oxazol e
<i>Atopobium vaginae</i>	0.6	0.7	1.70	1.0	0.6	0.7	0.6	0.6	2.6	2.5	1.9	<0.5
<i>Gardnella vaginalis</i>	0.6	0.7	1.8	1.0	0.6	0.8	0.6	0.6	2.5	2.5	2.0	<0.5
<i>Bifidobacterium longum</i>	0.6	0.6	1.4	0.7	0.6	0.7	0.7	0.6	1.5	1.6	1.8	<0.5
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.6	0.6	2.7	0.8	0.6	0.6	0.6	0.6	2.5	2.7	1.6	<0.5
<i>Candida albicans</i>	1.4	0.6	2.5	1.2	0.6	0.8	0.8	0.6	3.4	3.0	<0.5	1.6

표 6에 기재된 성분 중 alpha-terpineol, 1-octen-3-ol, eugenol 등이 혐기성 세균인 *Atopobium vaginae* 와 *Gardnella vaginalis* 및 진균인 *Candida albicans*를 효과적으로 억제함을 알 수 있다. 상기 성분은 특히 유익균인 *Bifidobacterium longum*과 *Lactobacillus acidophilus*는 크게 억제하지 않으면서 *Atopobium vaginae*, *Gardnella vaginalis* 및 *Candida albicans*를 효과적으로 억제하므로 질염 치료(개선)에 더욱 효과적임을 알 수 있다.

또한, 상기 결과로 부터도 수증기 증류에 의해서 추출되는 아르테미시아 프린셉스(사자발쭈)의 주성분인 유칼립톨과 보르네올은 항균력이 크지 않음을 알 수 있으며, 수증기 증류에 의해 추출되는 주성분이 아닌 가압 수증기에 의해서 추출되는 성분의 항균력이 큰 것으로 보인다. 따라서, 가압 수증기 증류 추출물 중 함유된 trans-sabinene hydrate, cis-sabinene hydrate, terpinene-4-ol, beta-caryophyllene, alpha-terpineol, germacrene D, valencene, 및/또는 caryophyllene oxide가 유효할 것으로 판단된다.

[0101] <실시예 3> in vivo에서 항균력 확인

[0102] 3-1. *Candida albicans*를 이식한 질염 모델 생쥐에서 항균력 확인

[0103] 암컷 생쥐(BALB/c, 17-25 g)에 0.125 mg을 olive oil에 녹인 beta-estradiol 17-benzoate(Sigma 사, MO, 미국)를 피하주사한다. 3일 후 *Candida albicans*(KCTC 생물자원센터, 한국생명공학원, 한국) 5×10^6 개를 질내로 이식한다. 군을 나누어 각각의 군에 대하여, 하기 표에 기재된 대로 이후 3일 동안 매일 1회씩 10% 가압정유(제조예 2), 10% 증류정유(제조예 3), 10% eugenol, 10% 1-Octen-3-ol, 10% α -Terpineol, 10% Eucalyptol, 10% Borneol, 10% Cotrimazole 용액(0.01% tween 80 및 1% triton X-100에 현탁한 액)을 10 μ l 질내로 투여한다. 각각의 군에 대하여 24시간 후에 다시 0.125 mg을 olive oil에 녹인 beta-estradiol 17-benzoate을 다시 피하주사한다. 이후 24시간, 48시간 후에 질내를 0.5 ml 멸균한 생리식염수로 씻어낸다. 이 상등액을 1% peptone수로 10배씩 계열희석하여 0.1% tetracycline 함유 Sabouraud-dextrose agar (Difco 사, USA)에 이식하여 48시간 배양하고 자라나온 콜로니를 육안으로 직접 계수한다. 또한 질조직을 분리하여 염증지표인 myeloperoxidase 활성을 측정하였다.

[0104] Myeloperoxidase(MPO)활성 측정은 먼저 질조직을 50mM phosphate buffer(pH6.0) 1ml에 넣고 초음파 처리하고 얼리고 녹이는 과정을 3회 실시한 후 원심 분리하여 상층액을 효소액으로 사용한다. 효소액 100 μ l에 o-dianisidine(0.129mg/ml) 398 μ l를 가한 후 H₂O₂가 최종농도로 0.0005% 되게 가하여 25℃, 492nm에서 time course로 UV-spectrometer(Jasco system V-530, 일본)로 활성을 측정하였다. MPO 활성 1 unit은 25℃에서 hydrogen peroxide 1mmole/min을 분해하는 것을 뜻한다. 단백질량은 bovine serum albumin을 standard로 하여 Bradford method로 측정하였다.

[0105] 그 결과를 하기 표에 나타내었다.

[0106] [표 7]

군	균수(log ₁₀ 균수)	Myeloperoxidase 활성 (μ Unit/mg)
정상군	0.3	0.3
<i>Candida albicans</i> 만 투여한군	4.2	1.3
<i>C. albicans</i> +가압정유	3.1	0.7
<i>C. albicans</i> +증류정유	3.1	0.7
<i>C. albicans</i> +eugenol	3.0	0.6
<i>C. albicans</i> +1-Octen-3-ol	3.1	0.7
<i>C. albicans</i> + α -Terpineol	3.0	0.6
<i>C. albicans</i> +Eucalyptol	3.6	1.0
<i>C. albicans</i> +Borneol	3.5	0.9
<i>C. albicans</i> +Cotrimazole	2.2	0.5

[0107]

[0108] 정상군에서는 캔디다 균주는 볼 수 없었고, 캔디다로 질염을 일으킨 군에서는 캔디다가 감염되어 많은 균수와 높은 염증지표(MPO)가 검출되었으나, 수증기 증류 추출물과 추출물 중 포함되는 활성성분을 처리한 군에서는 유의적으로 균주가 감소하고 염증지표인 MPO도 감소하였다. 그 중에서는 α -Terpineol를 처리한 군에서 저해 효과가 가장 우수했다.

[0109] 3-2. *Gardnella vaginalis* 감염 생쥐에서의 항균력 확인

[0110] 암컷 생쥐(BALB/c, 17-25 g)에 0.125 mg을 olive oil에 녹인 beta-estradiol 17-benzoate(Sigma사, MO, 미국)을 피하주사한다. 3일 후 *Gardnella vaginalis*(KCTC 생물자원센터, 한국생명공학원, 한국) 1×10^8 개를 질내로 이식한다. 군을 나누어 각각의 군에 대하여, 하기 표에 기재된 대로 3일 동안 매일 1회씩 10% 가압정유(제조예 2), 10% 증류정유(제조예 3), 10% eugenol, 10% 1-Octen-3-ol, 10% α -Terpineol, 10% Eucalyptol, 10% Borneol, 10% 테트라사이클린 용액(0.01% tween 80 및 1% triton X-100에 현탁한 액)을 10 μ l 질내로 투여한다. 24시간 후에 다시 각각의 군에 0.125 mg을 olive oil에 녹인 beta-estradiol 17-benzoate을 피하주사한다. 이후 24시간, 48시간에 질내를 0.5 ml 멸균한 생리식염수로 씻어낸다. 이 상등액을 1% peptone수로 10배씩 계열희석하여 *Gardnella vaginalis* 선택배지plate(0.004% gentamycin, 0.003% nalidixic acid, 및 0.0002% amphotericin B 함유 Columbia blood agar, MBcell, USA)에 이식하여 48시간 배양하고 자라나온 콜로니를 육안

으로 직접 계수한다. 또한 그 질조직을 분리하여 염증지표인 myeloperoxidase 효소활성을 측정하였다.

[0111] Myeloperoxidase(MPO)활성 측정은 먼저 질조직을 50mM phosphate buffer(pH6.0) 1ml에 넣고 초음파 처리하고 얼리는 녹이는 과정을 3회 실시한 후 원심분리하여 상층액을 효소액으로 사용한다. 효소액 100 μ l에 o-dianisidine(0.129mg/ml) 398 μ l를 가한 후 H₂O₂가 최종농도로 0.0005% 되게 가하여 25℃, 492nm에서 time course로 UV-spectrometer(Jasco system V-530, 일본) 활성을 측정하였다. MPO 활성 1 unit은 25℃에서 hydrogen peroxide 1mmole/min을 분해하는 것을 뜻한다. 단백질량은 bovine serum albumin을 standard로 하여 Bradford method로 측정하였다.

[0112] 그 결과를 하기 표에 나타내었다.

[0113] [표 8]

군	균수(log ₁₀ 균수)	Myeloperoxidase 활성 (μ Unit/mg)
정상군	0.3	0.3
Gardnerella vaginalis만 투여한군	7.7	1.1
Gardnerella vaginalis +가압정유	4.5	0.7
Gardnerella vaginalis +증류정유	7.2	0.6
Gardnerella vaginalis +eugenol	4.0	0.7
Gardnerella vaginalis +1-Octen-3-ol	4.2	0.7
Gardnerella vaginalis + α -Terpineol	3.9	0.6
Gardnerella vaginalis +Eucalyptol	5.9	0.9
Gardnerella vaginalis +Borneol	6.2	0.9
Gardnerella vaginalis +테트라싸이클린	3.5	0.5

[0114]

[0115] 정상군에서는 Gardnella vaginalis 균주는 볼 수없었고, Gardnella vaginalis로 질염을 일으킨 군에서는 Gardnella vaginalis가 감염되어 많은 균수와 높은 염증지표(MPO)가 검출되었으나, 사자발쑥의 정유분획과 정유 성분을 처리한 군에서는 유의적으로 균수가 감소하고 염증지표인 MPO도 감소하였다. 그 중에서는 α -Terpineol를 처리한 군에서 저해 효과가 가장 우수했다.

도면

도면1

