



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0067225
(43) 공개일자 2011년06월22일

(51) Int. Cl.

A61K 36/282 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0123729

(22) 출원일자 2009년12월14일

심사청구일자 2009년12월14일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구 달서구 신당동 1000번지

(72) 발명자

양선아

대구 수성구 범어4동 서한두레맨션 102동 1002호

이은정

대구광역시 서구 평리4동 1354-1번지 동서3차 나동 603호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

권혁철

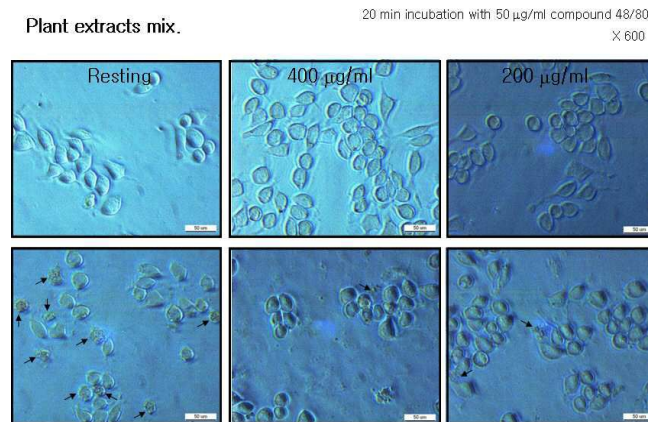
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 생약 추출물을 함유하는 알러지 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 알러지 개선 효과가 뛰어난 조성물에 관한 것으로서, 생약 복합추출물, 구체적으로는 인진쑥, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽 복합추출물을 유효성분으로 포함하는 알러지 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 매우 안전할 뿐만 아니라, 염증과 알러지 반응에 관련된 사이토카인 활성 억제 및 비만세포로부터의 히스타민 방출과 베타-헥소사미니데이스(β -hexosaminidase) 방출을 억제하는 효과가 있어 알러지 증상을 개선하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

임남경

대구 서구 중리동 중리시영2차 12동 103호

이은주

대구광역시 북구 매천동 휴먼시아아파트 211-705

강공원

대전 대덕구 와동 39 주공아파트 105-302

정호순

대전 유성구 지족동 열매마을4단지 410-102

지광환

대구 수성구 범어4동 서한두레맨션 102동 1002호

이인선

대구 수성구 황금동 368번지 롯데화성캐슬골드파크
1416동 1803호

이삼빈

대구 달서구 이곡동 무지개타운 102-306

특허청구의 범위

청구항 1

인진쑈, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 복합추출물은 인진쑈, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽을 각각 1 : 0.005 ~ 0.02 : 0.01 ~ 0.2 : 0.01 ~ 0.05 : 0.005 ~ 0.02의 중량비로 혼합한 후 추출되는 것임을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 복합추출물은 정제수, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 글리세롤, 프로필렌글리콜 및 1,3-부틸렌글리콜로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출하여 제조되는 것임을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 복합추출물은 전 조성물 중량에 대하여 0.02~30중량% 포함되는 것을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 알러지 개선용 조성물은 화장료인 것을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 알러지 개선용 조성물은 피부 외용제인 것을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 알러지 개선용 조성물은 알러지 개선용 건강기능성 식품인 것을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 알러지 개선용 조성물은 편백정유 및 MSM을 추가적인 유효성분으로 함유하는 것임을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항의 어느 한 항에 있어서, 상기 알러지 개선용 조성물은 염증과 알레르기 반응에 관련된 사이토카인 활성 억제, 비만세포로부터의 히스타민 방출과 베타-헥소사미니데이즈(β -hexosaminidase) 방출을 억제함으로써 알러지 증상을 개선하는 것임을 특징으로 하는 알러지 개선용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 생약추출물을 유효성분으로 함유하는 알러지 개선용 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로는 인진쑈, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽 추출물을 유효성분으로 포함하는 알러지 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 일반적으로 알러지(allergy)는 인체에서 아토피성 피부염, 기관지 천식, 알러지성 비염, 알러지성 각막염, 피부 두드러기 등의 형태로 나타나며, 비만세포가 1차적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 알러지 질환의 후반기에

는 염증 관련 세포들이 조직 속으로 침윤되기 시작하므로, 알러지 질환의 치료에 있어서 항히스타민제와 함께 항염증제를 함께 투여하고 있다.

[0003] 피부에서 유발되는 알러지의 기작은 크게 초기 단계(early phase)와 후기 단계(late phase)로 나누어 볼 수 있는데, 초기 단계에서는 조직속의 대식세포(macrophage)에서 외부 항원에 의해 T-보조 세포(T-helper cell)가 활성화되고 B 세포에서 IgE가 생성되면 비만세포막의 고친화성 IgE 수용체(FcRI α)에 결합한 복수의 IgE 항체에 다가 항원이 결합하여 가교를 이루면서 수용체(FcRI α)가 응집하고, 이 수용체(FcRI α)의 가교 및 응집에 의하여 비만세포가 활성화되어 세포질 내의 칼슘 이온(Ca^{2+}) 농도 등이 상승하면서 탈과립이 일어나 비만세포 내에 저장되어 있던 히스타민이 분비되며, 이외에 세포막의 인지질에 작용하는 효소로서 포스포리파제 A2(phospholipase A2)와 포스포리파제 D(phospholipase D)가 있는데, 이들은 각각 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)으로부터 아라키돈산(arachidonic acid)과 포스파티딘(phosphatidine)을 생성하여 탈과립시에 비만세포 내에 미리 저장되어 있던 히스타민(histamine)과 같은 화학전달물질(chemical mediator)이 유리되게 하고, 이와 동시에 새로 합성된 화학전달물질인 프로스타글란딘(prostaglandin)과 류코트리엔(leukotriene) 등이 함께 분비되게 하여 혈관 확장, 혈관 투과성 항진, 기관지 평활근의 수축이나 분비 항진 등의 작용을 함으로써 제 1 형 즉시형 알러지 반응을 유발한다. 후기 단계는 염증 반응이 주가 되며 1 차 유발 물질들이 유리된 다음 히스타민, 세로토닌(serotonin), 류코트리엔 이외에 호산구나 호중구 등 염증 세포의 주화성 인자로 작용하는 NCF, ECF, PAF 등이 조직 내로 침윤이 일어나고 이들에 의해 염증 반응이 진행되어 알러지 유발 부위의 조직학적 변화들이 유발된다.

[0004] 비만세포에 대한 자극은 위에서 언급한 IgE에 의한 자극 이외에 렉틴(lectin)이나 아나필라톡신(anaphylatoxin) 등의 비면역적인 자극이 있다. 그 외에 칼슘 이온 운반체(calcium ionophore A23187), 캄파운드 48/80 등의 히스타민 유리 촉진제, 코테인, 모르핀, 섭스턴스 피(substance P) 등의 약제도 비만세포를 탈과립하여 히스타민을 유리시키는 물질로 알려져 있으며, 분비된 히스타민이 혈관 내피세포와 결합하면 혈관세포의 수축이 일어나서 혈액속의 플라스마(plasma)를 조직으로 삼출(extravasation)시킨다. 이때 혈관 내피세포는 혈관 근육세포를 이완시키는 프로스타사이클린(prostacyclin)과 산화 질소(nitric oxide)와 같은 물질의 합성을 유도하여 혈관 팽창(vasodilation)을 유발한다. 위와 같은 기작에 의한 히스타민 분비에 의해 부종(wheel), 발적(flare), 가려움(itching) 등의 반응을 나타내게 되며, 이는 제 1 형 즉시형 과민 반응의 전형적인 현상이다.

[0005] 현재 일반적으로 상용되는 대표적인 알러지 치료제로는 항히스타민, 스테로이드성 또는 비스테로이드성 항염증용 의약품 등이 있는데, 이들은 주로 외인성에 치료 효과가 있고, 과도한 체액성 면역을 완화하거나 IgE 생산을 억제시키는 알러지의 근본적인 원인을 치료하는 효과는 없는 것으로 알려져 있다.

[0006] 한편 최근 들어 천연물을 소재로하여 알러지 증상을 개선하고자 하는 많은 연구들이 발표되고 있다. 최근 천연물을 이용한 알러지 또는 아토피 피부염의 치료를 위한 많은 연구가 이루어져 있는데, 대한민국 공개특허 제 2004-97026호에는 생솔잎, 느릅나무 유피, 생오가피 등의 각종 천연물을 이용한 아토피성 피부염 예방 및 치료에 관한 조성물이 알려져 있으며, 대한민국 공개특허 제 2005-9172호에도 역시 숙지황(熟地黃), 산약, 산수유 등의 생약 추출물을 이용한 아토피성 피부질환 환자의 체질개선 조성물이 개시되어 있고, 대한민국 공개특허 제 2005-22586호에는 질경이 추출물을 이용한 아토피성 피부염 치료제가 개시되어 있다. 또한 대한민국 공개특허 제 2005-0072378호에는 지부자, 용규, 명아주로부터 추출한 식물추출물을 함유하는 아토피 피부용 화장료 조성물이 개시되어 있다.

[0007] 이에 본 발명자들은 알러지성 피부 질환에 효능이 있는 생약들을 선별하였고, 그 결과 특정 배합비를 가지는 인진쑥, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽의 혼합추출물이 상승효과를 발휘하여 초기 단계의 히스타민 유리 억제 효과뿐만 아니라 후기 단계의 항염증 효과가 탁월함을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 따라서 본 발명은 생약재인 인진쑥, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽 복합추출물을 유효성분으로 함유하여 안전하면서도, 알러지 개선 효과가 뛰어난 생약추출물을 함유하는 알러지 개선용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한 본 발명은 염증과 알레르기 반응에 관련된 사이토카인 활성 억제 및 비만세포로부터의 히스타민 방출과 베타-헥소사미니데이즈(β -hexosaminidase) 방출을 억제함으로써 알러지를 개선하는 생약추출물 함유 조성물을 제

공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따르면, 인진쑥, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 알러지 개선용 조성물이 제공된다. 상기 생약 복합추출물은 인진쑥, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽을 각각 1 : 0.005 ~ 0.02 : 0.01 ~ 0.2 : 0.01 ~ 0.05 : 0.005 ~ 0.02의 중량비로 혼합한 후 추출되는 것임을 특징으로 한다. 상기 생약 복합추출물은 정제수, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 글리세롤, 프로필렌글리콜 및 1,3-부틸렌글리콜로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매로 추출하여 제조될 수 있다.
- [0011] 상기 알러지 개선용 조성물은 피부에 적용하는 화장료, 피부 외용제 또는 알러지 개선용 건강기능성 식품으로 적용되는 것을 특징으로 한다. 상기 알러지 개선용 조성물은 조성물 전체중량에 대하여 상기 생약복합추출물을 0.02 ~ 30 중량% 함유하는 것을 특징으로 한다. 상기 알러지 개선용 조성물은 상기 생약복합추출물을 필수 유효성분으로 함유하며, 기능성 성분으로서 편백정유 및 MSM을 추가적으로 함유할 수 있다.

효 과

- [0012] 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 알러지 개선용 조성물은 생약재인 인진쑥, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽 복합추출물을 유효성분으로 함유하므로 안전하면서도, 염증과 알레르기 반응에 관련된 사이토카인 활성화 억제 및 비만세포로부터의 히스타민 방출과 베타-헥소사미니데이스(β -hexosaminidase) 방출을 효율적으로 억제함으로써 효과적으로 알러지를 개선한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명은 특정비율로 혼합된 인진쑥, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 알러지 개선용 조성물에 관한 것이다. 특정비율로 혼합된 인진쑥, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽은 상승효과를 발휘하여 알러지성 질환을 효과적으로 개선한다. 구체적으로는 염증과 알레르기 반응에 관련된 사이토카인의 활성을 억제하며, 비만세포로부터의 히스타민 방출과 베타-헥소사미니데이스(β -hexosaminidase) 방출을 효율적으로 억제함으로써 알러지 증상을 개선한다.
- [0014] 본 발명의 알러지 개선용 조성물에 있어서 유효 성분으로서 첨가되는 이들 생약의 복합추출물은 이들 식물의 뿌리, 잎, 줄기, 열매 또는 이들의 혼합체로부터 추출될 수 있다.
- [0015] 인진쑥(*Artemisia capillaries* Thunb)은 주요 성분으로 β -피넨(β -pinene), 캐필라린(capillarin), 캐필론(capillone), 캐필린(capilline), 엽산(folic acid) 등을 포함하며, 생명력이 강한 야생초로 항염증작용, 항균작용(Biosci. Biotechnol. Biochem. 1998 Feb;62(2)363-5), 혈관확장작용, 항산화효과(Arch. Pharm. Res. 2000 Jun;23(3):237-9) 등이 있는 것으로 알려져 있다.
- [0016] 홍삼은 수삼을 증숙한 것으로서 홍삼의 주요 성분인 사포닌은 식물의 뿌리, 줄기, 잎, 껍질, 씨 등에 흔히 함유되어 있는 물질로 의약품 및 건강식품등에 널리 활용되고 있다. 홍삼의 주성분인 사포닌은 화학적으로 배당체라 부르는 화합물의 일종으로서 사포닌 함유 식물은 예로부터 세정, 거담, 진해를 목적으로 의약품에 활용되었으며 최근에는 소염, 해열, 건위, 배농, 항종양, 이뇨, 강장, 강정 등에 널리 활용되고 있다. 사포닌은 당부분(sugar 또는 glycone), 비당부분(non-sugar 또는 aglycone)으로 구성되어있는 배당체로서 홍삼 사포닌은 트리테르페노이드(triterpenoid)계의 담마란(dammarane)계의 사포닌으로 인삼속 식물에만 존재한다. 홍삼은 증숙 등 제조과정 중 비효소적 갈색화 반응이 촉진되어 많은 갈색화 반응 생성물이 형성되고 그 중 말톨(maltol) 등과 같은 항산화 성분도 다량 생성되어 암세포 증식을 억제하는 진세노사이드(ginsenoside)와 파낙시트리올(panaxytrol)등과 같은 성분이 생성된다. 사포닌은 도라지나 콩, 은행에도 들어있는 성분으로 특히 인삼, 홍삼, 산삼에 함유된 사포닌 성분을 진세노사이드라고 부른다. 이중 진세노사이드 Rh2와 Rg3는 인삼에는 전혀 없고 산삼과 홍삼에만 극미량 포함되어 있다. 이러한 홍삼 성분의 피부 작용으로는 피부기능을 개선시키고, 피부탄력 및 노화방지, 피부세포 부활, 보습작용, 피부트러블 해결, 지친 피부개선, 유해한 환경으로부터 건강한 피부를 유지할 수 있게 도와 주는 역할을 한다.
- [0017] 형개(*Schizonepeta tenuifolia* Briq)의 주요 성분은 멘쑈(d-menthone 및 dl-menthone), α -리모넨(α -Limonene), α -피넨(α -piene) 등이며, 해열작용, 소염작용, 항균작용, 지혈작용 등이 있는 것으로 보고되어 있다.
- [0018] 회향(*Foeniculum vulgare* Mill)은 회향풀(fennel)로 널리 알려져 있으며, 모유축진 및 배앓이 치료제 등으로 사

용되어 왔다. 그 주요 성분은 휘발성 오일류(anethole, fenchone), 플라보노이드류, 스테롤류, 비타민과 미네랄 등이며 진정작용 외 항염증 및 항균작용(Int J Antimicrob Agents 1997 Jan;9(3):195-9. Phytother Res 1996;10:33-6. Plan Med 2000;66:687-93)이 있는 것으로 보고되어 있다.

- [0019] 측백엽(側柏葉)은 측백과에 속한 상록교목인 측백나무의 잎으로써, 진해거담작용, 기관지평활근 이완, 안정작용, 항균작용 등의 약리작용이 있다. 모낭 상피와 말초혈관에 작용하여 모세포를 활성화시켜 모발 생성을 촉진시키고 두피도 개선시키는 성분이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.
- [0020] 상기 인진쑥, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽을 최적의 혼합비로 혼합 한 후, 정제수, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 글리세롤, 프로필렌글리콜 및 1,3-부틸렌글리콜로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매를 이용하여 추출하여 생약 복합추출물을 제조하였으며, 이 추출물은 알리지 질환에 탁월한 효과를 나타내었다.
- [0021] 상기 최적의 혼합비는 인진쑥, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽이 1:0.005 ~ 0.02 : 0.01 ~ 0.2 : 0.01 ~ 0.05 : 0.005 ~ 0.02의 중량비로 혼합되는 것이다. 더욱 바람직하게는 1 : 0.01 ~ 0.02 : 0.05 ~ 0.15 : 0.02 ~ 0.04 : 0.01 ~ 0.02의 중량비로 혼합되는 것이다.
- [0022] 한편, 본 발명의 생약 복합 추출물은 상기와 같이 각각의 생약재를 혼합 후 추출할 수도 있고, 각각의 생약재 추출물을 얻은 후 혼합할 수도 있다.
- [0023] 상기 추출 용매로는 정제수, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 글리세롤, 프로필렌글리콜 및 1,3-부틸렌글리콜로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 용매를, 바람직하게는 에탄올로 열수 추출하는 것이 바람직하다. 상기 추출 방법은 중탕 추출, 환류냉각 추출, 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 중탕 추출의 추출방법으로 1회 내지 5회 추출될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 알리지 개선용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 생약 복합추출물을 0.02 ~ 30 중량%, 더욱 바람직하게는 1~10 중량% 포함하는 것이 바람직하다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 알리지 개선용 조성물은 바디클렌저, 샴푸, 토닉, 카밍워터 등의 제형을 가지는 화장료로 적용될 수 있다. 본 발명의 알리지 개선용 조성물은 상기 생약복합 추출물에 추가로 지방, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차 단체, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 외용제에 통상 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 알리지 개선용 조성물은 분사형 액제, 연고, 패취 또는 분무제 등의 제형을 가지는 피부외용제로 적용될 수 있다.
- [0027] 또한 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 알리지 개선용 조성물은 알리지 개선용 건강기능식품으로 적용될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 조성물은 상기 생약복합추출물을 필수 구성요소로 하고 알리지 개선에 유용한 다른 기능성 물질을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 편백나무의 잎과 줄기에서 추출한 편백정유, 천연유기유황(Methyl Sulfonyl Methane, MSM)을 더욱 포함할 수 있다. 특정 식물에서 추출한 정유는 세균과 곰팡이 등 다양한 세균에 대한 항균력을 지니고 있는데, 특히 편백나무 추출물인 편백정유는 포도상구균에 대한 살균력을 가지고 있어, 아토피성 피부질환 환자의 치료에 효과적인 것으로 알려져 있다. 편백정유는 스태피로코쿠스 아우레우스를 포함하여 대장균, 마이코박테리움 켈로네이(Mycobacterium chelonae), 슈도모나스 아우레기노사, 칸디다 알비칸스, 리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes), 클렙시엘라 뉴모니아에 등의 균주에 대해서도 강력한 항균활성을 지니고 있으며, 수종과 지역에 따라 성분 및 조성의 차이를 나타낸다. 본 발명에서는 국내산 편백(Chamaecyparis obtusa)나무에서 추출한 편백정유를 사용하였다.
- [0029] MSM은 소나무의 세포벽 속에 존재하는 리그닌으로부터 추출되는 것으로서 피부 조직에서 수분의 손실을 막고, 피부의 탄력성을 유지시켜주는 기능을 한다. 또한, 피부조직에 침착된 유해 물질을 해독시켜 주는 것으로 알려져 예로부터 광물질 유황은 피부병 치료제로 자주 사용되어 왔다.
- [0030] 상기 편백정유는 전 조성물 중량에 대하여 2.5중량% 이내로, MSM은 전 조성물 중량에 대하여 3중량% 이내로 포함되는 것이 바람직하다.
- [0031] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라

다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.1 ~ 500 mg/kg으로, 바람직하게는 1 ~ 200 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[실시예]

이하, 하기의 실시예와 시험예들을 통하여 본 발명을 상세하게 설명하지만, 본 발명이 이 예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

제조예 1: 생약 복합추출물의 제조

인진쑥, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽을 준비하고, 인진쑥, 홍삼, 형개, 회향 및 측백엽을 각각 87 : 1 : 8 : 3 : 1의 중량비로 혼합하였다. 상기 생약혼합물의 건조 중량의 7~8배 가량의 에탄올로 40~60℃에서 5시간 정도 추출한 후, 50℃에서 추출액의 1/8이 되도록 감압 농축하였다.

농축된 추출액에 교반을 하는 동시에, 농축된 추출액 중량의 10배 가량의 정제수를 적가하였다. 정제수 적가를 마치고 5℃에서 30분간 방치 후, 진공 여과를 진행하여, 진공 여과를 통해 석출되어지는 분말을 얻었다. 그 분말을 50~60℃에서 진공 건조하여 생약 복합추출물을 제조하였다.

상기 제조예 1에서 제조된 생약 복합추출물을 용매(DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다.

상기 제조예에 따른 생약복합추출물과 기능성물질로 추가되는 편백정유 및 MSM에 관하여 활성시험을 실시하였다.

시험예 1 : 생약 복합추출물의 항균 효과

Disc diffusion 법

상기 제조예 1에서 제조된 생약 복합추출물을 시료로 하여 하기 표 1에 나타내는 바와 같은 그람 양성균 3종, 그람 음성균 3종, 효모 1종의 모두 7종의 미생물을 이용하여 항균성을 검증하였다.

표 1

	균주	균주번호
Gram(+)	<i>Listeria monocytogenes</i>	KCTC 3710
	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC 1916
	<i>Streptococcus mutans</i>	KCTC 3065
Gram(-)	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KCTC 2508
	<i>Escherchia coli</i> 0157:H7	ATCC 43888
	<i>Vivrio parahaemolyticus</i>	KCCM 11965
Yeast	<i>Pichia sp.</i>	

실험에 사용된 균주는 KCTC와 ATCC를 통하여 일반적으로 항균실험에 많이 사용되는 그람 음성과 양성 각각 3종의 균을 분양받아서 사용하였으며, 비듬균과 유사한 효모로 알려진 *Pichia sp.*를 실험에 사용하였다. *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*는 BHIB (Brain Heart Infusion Broth)배지, *Staphylococcus aureus*는 TSB (Tryptic Soy Broth) 배지, *Acinetobacter baumannii*, *Escherchia coli* 0157:H7, *Vivrio parahaemolyticus*는 NB (Nutrient broth)배지, *Pichia sp.*는 YM 배지에 배양하였으며, 각 균은 37℃에서 24시

간 3회 계대 배양 한 후 실험에 사용하였다. Plate에 균종 접종 후 균주가 배지에 완전히 스며든 다음, 2배 희석한 시료와 양성대조균으로 항생제인 gentamycin 25 μ L를 멸균된 디스크에 떨어뜨린 후 용매를 완전히 휘발시키고, 디스크를 배지에 올려놓았다. 이것을 인큐베이터에서 37℃에서 24시간 배양한 후 나타난 생육 저해환 (clear zone)의 크기를 측정하여 항균 활성 정도를 확인하였다.

또한, 비듬균(Pytirosporom ovale)에 대한 항균효과를 보기 위하여 시료와 양성 대조균으로 Zinc pyrithione 50 μ L를 멸균된 디스크에 떨어뜨린 후 용매를 휘발시키고, 디스크를 배지에 올려놓았다. 이것을 30℃ 인큐베이터에서 48시간 배양한 후 나타난 생육 저해환(clear zone)의 크기를 측정하여 항균활성을 확인하였다.

최소 저해농도 측정 (Minimum inhibition of concentration:MIC)

최소생육저해농도는 paper disc법으로 측정하였다. 탁도배양액 150 μ L를 pityrosporom agar 배지에 도말한 후 멸균된 paper disc 8mm를 놓고, 이에 각각의 시료 농도별로 50 μ L를 처리하여 30℃ 인큐베이터에서 48시간 배양한 후 나타난 생육 저해환(clear zone)의 크기를 측정하여 항균 활성 정도를 확인하였다. 양성대조균으로는 1% Zinc pyrithione를 사용하였다. 시료를 농도별로 처리하여 30℃ incubator에서 48시간 배양 후 육안으로 관찰하였을 때 미생물이 증식되지 않는 농도를 MIC로 결정하였다.

항균활성

생육 저해환(Clear zone) 확인에 의한 항균성 테스트 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

	균 주						
	Gram(+)			Gram(-)			Yeast
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Vivrio parahaemolyticus</i>	<i>Pichia sp.</i>
Control	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E
추출물	11 $\pm$ 0.6 ^{a)}	10 $\pm$ 1.5	13 $\pm$ 3.0	14 $\pm$ 1.0	16 $\pm$ 1.0	14 $\pm$ 1.0	20 $\pm$ 0.7
Gentamycin	15 $\pm$ 0.7	19 $\pm$ 0.3	15 $\pm$ 0.4	16 $\pm$ 0.3	14 $\pm$ 0.5	13 $\pm$ 0.8	N.E

* ^{a)} Inhibition zone in diameter (mm)

* Disc diameter 8 mm

* N.E : No effect

* Gentamycin : 25 mg/disc

추출물에 대한 항균력을 7가지 미생물에 대하여 검증한 결과, 그람 양성균, 그람 음성균, 효모 모두에서 항균효과를 확인할 수 있었다.

비듬균에 대한 항균활성

아토피의 원인균으로 알려진 비듬균(Pytirosporom ovale)과 포도상구균(Staphylococcus uareus)에 대한 추출물의 항균력을 검증하였다. 하기의 표 3에 나타나는 바와 같이 0.1 g/mL 농도의 제조예 1의 생약 복합추출물에서는 비듬균에 대하여 높은 항균력이 나타났으며 편백 정유에서는 미미한 효과가 나타났다. 반면, 편백정유는 포도상구균에 대하여 비교적 높은 항균 효과를 보였다. 따라서 편백정유를 상기 생약 복합추출물과 함께 혼합하는 경우 상호 보완작용에 의하여 우수한 항균효과를 나타낼 것으로 예상된다.

표 3

[0057]

	Pityrosporum ovale	Staphylococcus aureus
생약 복합추출물(0.1 g/mL)	19.3 ± 2.3 ^{a)}	10.0 ± 1.5
편백정유(0.1 g/mL)	8.3 ± 0.6	13.5 ± 1.3
Gentamycin (0.005 g/mL)	-	19.0 ± 0.3
Zinc pyrithione(0.01 g/mL)	29.0 ± 4.6	-

[0058]

* ^{a)} Inhibition zone in diameter (mm)

[0059]

* Disc diameter 8 mm

[0060]

* Zincpyrithione : 500 µg/disc

[0061]

* Gentamycin : 25 µg/disc

[0062]

최소 저해농도 측정(Minimum inhibition of concentration:MIC)

[0063]

Paper disc 법을 통하여 항균력이 검증된 시료인 상기 생약 복합추출물, 편백정유를 선택하여 최소저해 농도를 확인해 보았다. 이를 하기 표 4에 나타내었다. 대조구로 사용된 징크피리치온의 MIC는 0.05 mg/mL과 0.01 mg/mL 사이, 시료인 5종 추출물과 편백정유의 MIC는 각각 25 mg/mL과 10 mg/mL사이, 100 mg/mL과 50 mg/mL사이인 것으로 나타났다.

표 4

[0064]

Sample	MIC (mg/mL)
Zincpyrithione	0.05 > MIC ≥ 0.01
생약 복합추출물	25 > MIC ≥ 10
편백정유	100 > MIC ≥ 50

[0065]

시험예 2 : RBL-2H3 비만세포주의 탈과립 관찰

[0066]

RBL-2H3 세포를 24-well plate(2×10^5 cells/well)에 4시간 배양한 후, 200 µL의 incubation buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM $MgCl_2$, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, 5.6 mM glucose, 1 mM $CaCl_2$, 0.1% bovine serum albumin, pH 7.2)를 넣고 10분간 배양하였다. 0.1% DMSO 용액이나 농도별 생약 복합추출물 및 MSM 시료 25 µL를 각각 넣어 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후, 50 µg/mL compound 48/80(Sigma) 용액과 20분간 반응시켰다. 반응 후, 비만세포주의 형태를 도립현미경(DM IRE2, Leica, Wetzlar, Germany)으로 600배의 배율 하에서 관찰하였다. 200배의 배율 하에서 전체적인 탈과립(degranulation) 정도를 확인하였으며, 3회 실험으로 재현성을 확인하였다.

[0067]

그 결과를 도 1a 및 도 1b에 나타내었다.

[0068]

Compound 48/80은 포름알데히드(formaldehyde)에 의하여 가교된 펜에틸아민(phenethylamine)의 혼합 고분자(mixed polymer)로 비만세포의 막수용체에 작용하여 세포 외의 칼슘을 세포 내로 유입시켜 세포 내 자유칼슘의 양을 증가시켜 비만세포의 탈과립을 유도한다. 도 1에서 화살표는 탈과립 세포를 나타낸다. Compound 48/80을 처리하지 않은 정상 비만세포주의 형태는 원형 또는 난원형으로 세포 윤곽이 뚜렷하고, 매끄러운 표면을 갖는 반면, compound 48/80 처리로 활성화되어 탈과립이 일어난 세포의 형태는 세포 윤곽이 불분명하고 크기가 작으며, 세포질 내 과립들이 돌출되거나 세포주위에 흩어져 있는 것을 볼 수 있다. Compound 48/80으로 처리하지 않고 시료만 처리한 경우, 탈과립은 일어나지 않아 세포의 형태에 변화가 없었으며, compound 48/80만 처리한 경우 수분 이내에 세포의 가장자리가 불규칙하게 되면서 일부 과립들이 세포표면으로 돌출되는 모습을 관찰할 수 있었다. 또한, 200 또는 400 µg/mL의 복합추출물을 미리 처리한 경우에는 compound 48/80에 의한 세포의 탈과립

이 농도 의존적으로 현저하게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다.

[0069] MSM을 처리한 경우에도 탈과립을 억제효과가 있었으나 복합추출물보다는 억제 효과가 적은 것을 알 수 있다.

[0070] **시험예 3 : β -Hexosaminidase 방출에 대한 억제효과 측정**

[0071] RBL-2H3 세포(2×10^5 cells/well)를 450 ng/mL의 IgE와 함께 CO₂ incubator에서 12시간 배양하여 세포를 감작시켰다. 감작시킨 세포를 siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM mgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7.2)로 세척한 후, 각 well당 160 μ L의 siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM mgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 0.1% bovine serum albumin, pH 7.2)를 넣고 20분간 배양하였다. 각 농도별 생약 복합추출물 및 MSM 시료와 5 μ M의 wortmannin (Wako Pure Chemical Industries, Tokyo, Japan)을 넣어 10분간 반응시키고, 10 μ g/mL의 DNP-BSA (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX78244, USA)를 첨가한 후 다시 10분간 배양하여 세포를 활성화시켰으며 ice bath에서 반응을 정지시켰다. 상층액 25 μ L를 96-well plate에 옮기고, substrate buffer (p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide 1 mM in Citrate buffer 0.1 M, pH4.5) 25 μ L를 넣은 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후, 각 well에 stop solution (0.1 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 10) 200 μ L를 첨가하여 반응을 정지시키고, ELISA reader (Spectra MAX 340 pc, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0072] 비만세포가 함유하고 있는 과립에는 히스타민 및 트립타제(tryptase) 등 다양한 알레르기 증상을 유발하는 매개체들이 함유되어 있어 항원에 의한 이러한 매개체들의 분비를 확인하는 것은 매우 중요하다. β -Hexosaminidase는 비만세포가 면역학적으로 활성화될 때 히스타민과 함께 부수적으로 분비되므로 비만세포 탈과립의 표지인자로 널리 사용되고 있다. 따라서 RBL-2H3 세포에서 분비되는 β -hexosaminidase의 활성을 측정하였으며, 생약 복합추출물과 MSM에 의한 β -hexosaminidase 방출 억제 효과를 검색하였다. 그 결과를 도 2a 및 도 2b에 나타내었다.

[0073] 100, 200, 400 μ g/mL 농도의 생약 복합추출물이 처리된 세포에서 유리되는 β -hexosaminidase의 활성은 대조군에 비해 각각 78%, 69%, 66%를 나타내었으며 MSM 전처리의 경우에는 50, 100, 1000 μ g/mL 농도에서 각각 98%, 88%, 80%로 유의적인 억제효과를 나타냈다.

[0074] **시험예 4: TNF- α 생성 억제 효과 측정**

[0075] RBL-2H3 세포를 24-well plate (2×10^5 cells/well)에 분주한 후 12시간 배양한 후 새로운 MEM 배지에 생약 복합추출물 및 MSM 시료를 농도별로 처리하고, A23187(1 μ M)과 PMA(50 ng/mL)를 처리하여 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 상층액을 분리하여 -70°C에 보관하였다가 TNF- α ELISA kit(Invitrogen Corporation, CA, USA)를 사용하여 배지에 방출된 양을 측정하였다. ELISA reader(Spectra MAX 340 pc, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 TNF- α 의 양을 계산하였다.

[0076] TNF- α 는 비만세포와 대식세포 등에서 생성되어 많은 염증반응을 유발하는 인자로, 국소적인 알레르기 염증반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 생약 복합추출물 및 MSM이 활성화된 비만세포로부터 분비되는 염증사이토카인인 TNF- α 의 생성을 억제시켜줄 수 있는지 ELISA 방법으로 조사하였다. 그 결과를 도 3a 및 도 3b에 나타내었다. RBL-2H3 세포에서 분비된 TNF- α 의 양은 아무런 처리를 하지 않은 경우 5.06 pg/mL로 매우 낮았으며, A23187와 PMA를 처리한 경우 87.14 pg/mL로 현저히 증가되는 것을 확인하였다. 반면 100, 400, 1000 μ g/mL의 생약 복합추출물을 처리한 경우 A23187와 PMA만 처리한 대조군에 비해 각각 81.6%, 73.9%, 49.5%로 억제되는 것으로 나타나 농도 의존적으로 TNF- α 의 분비를 억제시켜주는 것을 확인할 수 있었다. 반면, MSM의 처리는 억제 효과를 나타내지 않았다.

[0077] 시험예 5 : 세포독성시험

[0078] 인간 피부 섬유 모세포를 이용한 세포독성 측정

[0079] 인간의 피부 섬유 모세포(HDF, Human dermal fibroblast cell)에 대한 세포독성 측정법은 MTT 법으로 실험하였다. 본 실험에 사용한 세포주 HDF cell은 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)을 통해서 분양 받아 계대배양하면서 실험하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 37℃에서 5% CO₂ incubator에서 2~3일간 배양한 후 사용하였다. 세포독성능을 측정하기 위해 96 well plate의 각 well에 세포를 1 x 10⁴ cells/well 농도로 180 μL씩 분주하고, 24시간 배양하였다. 여기에 생약 복합추출물, 편백정유 및 MSM을 농도별로 조제하여 20 mL씩 첨가한 후 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음 5 mg/mL로 제조한 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide] 시약을 10 μL/well씩 첨가하고 4시간 동안 배양한 후, 100 μL의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 세포 생존율은 다음과 같이 계산하여 나타내었다.

[0080] 세포 생존율(cell viability)(%)

[0081] = 100 - {(대조군의 흡광도 - 시료처리군의 흡광도) / 대조군의 흡광도} × 100}

[0082] 비만세포주에 대한 세포독성 측정

[0083] 세포는 Rat 유래의 호염기성 세포주인 RBL-2H3 cell(KCLB No. 22256)을 Korea Cell Line Bank(Seoul, Korea)로부터 분양받았으며, 10% fetal bovine serum과 1% streptomycin/penicillin이 함유된 MEM 배지를 배양액으로 하여 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. IgE로 감작된 RBL-2H3 세포에 대한 시료의 독성을 MTT assay 방법으로 측정하였다. 먼저 RBL-2H3 세포(3 × 10⁴ cells/well)에 450 ng/mL의 DNP-specific IgE(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 처리하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 하룻밤 배양한 후 여러 농도(10-100 μg/mL)의 생약 복합추출물 시료를 농도별로 세포에 처리하였다. 12시간 후 각 well에 5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 10 μL씩 첨가하고 다시 4시간 동안 37℃ incubator에서 배양하였다. 배지를 제거하고 100 μL의 DMSO로 well에 생성된 포르마잔(formazan) 결정을 완전히 용해시켜 ELISA reader (Spectra MAX 340 pc, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다. 그 결과는 도4a 및 도4b에 나타내었다.

[0084] 시료의 HDF 세포에 대한 독성을 확인하기 위해 MTT assay를 실시한 결과, 생약추출물은 0.01, 0.1, 1, 10 mg/mL의 농도로 처리한 결과 10 mg/mL의 농도에서 대조군에 비해 약 30%의 세포사멸이 있었으나 1 mg/mL 이하의 농도에서는 독성이 없는 것으로 나타났다. 10 mg/mL은 통상의 다른 세포 실험과 비교시 약 100~1000배가량 높은 농도이므로 상기 시료에 의한 세포독성은 없는 것으로 판단된다.

[0085] 시료의 RBL-2H3 세포에 대한 독성을 확인하기 위해 IgE로 감작시킨 세포주를 이용하여 MTT assay를 실시한 결과, 생약 복합추출물의 경우 1.0 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 대조군에 비해 약 30%의 세포사멸이 있었으며 0.5 mg/mL 이하의 농도에서는 독성이 없는 것으로 나타났다. 시료 처리에 의하여 세포의 생존율이 증가하는 경향을 나타내었다.

[0086] 통상적인 방법에 따라 하기와 같은 조성비로 본 발명의 생약 복합추출물, 편백정유, MSM을 포함하는 제제를 제조하였으나, 본 발명은 하기의 제형예에만 한정되는 것은 아니다.

[0087] 실시예 1: 바디로션

[0088] 하기의 표 5와 같은 조성을 가지는 바다로션을 제조하였다.

표 5

[0089]

성 분	함량(중량%)
생약 복합추출물	20
편백정유	2.5
MSM	3
C14~22 알코올/C12~20 알킬글루코시드	1.5
베헤닐 알코올	1.0
스쿠알란	8.5
1,3-부틸렌글리콜	4.0
향, 색소	미량
정제수	잔량
합계	100

[0090] 실시예 2: 샴푸

[0091] 하기의 표 6과 같은 조성을 가지는 샴푸를 제조하였다.

표 6

[0092]

성 분	함량(중량%)
암모늄 라우레스 설페이트	12.0
암모늄 라우릴 설페이트	4.0
코카미도프로필 베타인	7.0
알킬폴리글리코사이드	1.5
폴리쿼터늄 10	0.5
글리세린	1.5
생약 복합추출물	20.0
편백정유	2.0
MSM	2.5
향료	0.2
정제수	잔량
합계	100

[0093] 실시예 3: 건강 기능성음료

[0094] 하기의 표 7과 같은 조성을 가지는 건강 기능성 음료를 제조하였다.

표 7

[0095]

성 분	함량
생약 복합추출물	1000mg
구연산	1000mg
올리고당	100g
타우린	1g
정제수	잔량
합계	900ml

[0096] **시험예 6: 알러지 완화효과**

[0097] 상기 실시예 1, 2에서 제조한 바디로션 및 샴푸 조성물의 항알러지 효과를 평가하기 위하여 10세~20세 사이의 피부 알러지 소인을 가진 피시험자를 대상으로 상기 바디로션과 샴푸를 1일 1회 2개월간 사용하게 한 다음 피부 알러지 및 소양증의 예방 및 완화 만족도를 5점 척도로 평가하여 하기 표 8에 나타내었다.

[0098] [매우 불만족:1 다소불만:2 보통:3 만족:4 매우 만족:5]

표 8

	실시예 1	실시예 2
평균점수	4.2	4.3

[0100] 상기 표 8에 나타나는 바와 같이, 본 발명 실시예의 조성물을 사용하였을 경우 우수한 알러지증상 완화 효과가 있음을 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0101] 도 1a 및 도 1b는 본 발명 생약 복합추출물 및 MSM의 탈과립활성 억제효과를 나타내는 사진도이다.

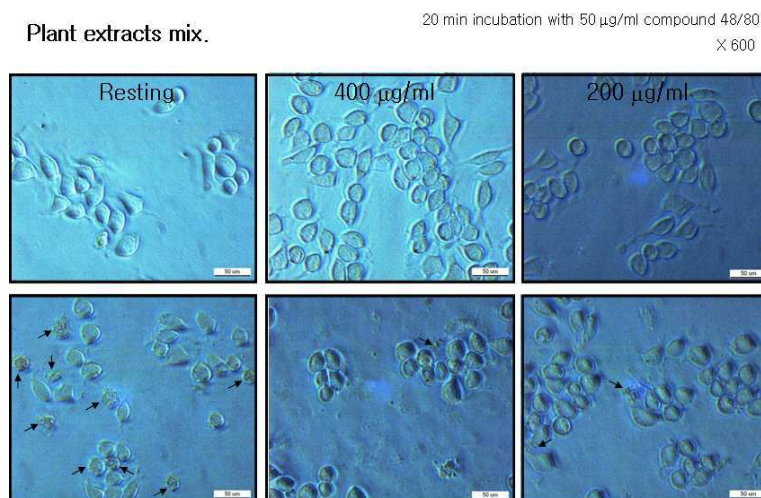
[0102] 도 2a 및 도 2b는 본 발명 생약 복합추출물 및 MSM의 베타-헥소사미니데이즈(β -hexosaminidase) 방출 억제효과를 나타내는 그래프이다.

[0103] 도 3a 및 도 3b는 본 발명 생약 복합추출물 및 MSM의 사이토카인 활성 억제효과를 나타내는 그래프이다.

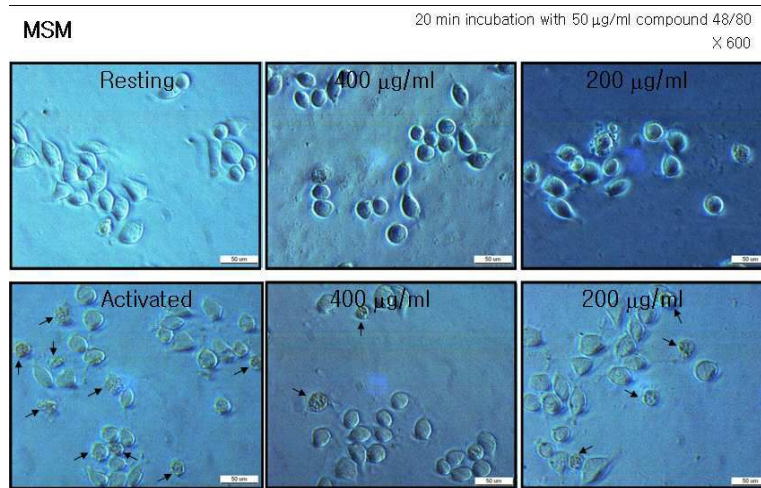
[0104] 도 4a는 인간 피부 섬유 모세포 (HDF cell)에 대한 본 발명 생약 복합추출물, 편백정유 및 MSM의 독성시험결과이며, 도 4b는 Rat 유래의 비만세포주인 RBL-2H3 cell에 대한 본 발명 생약 복합추출물의 독성시험결과를 나타내는 그래프이다.

도면

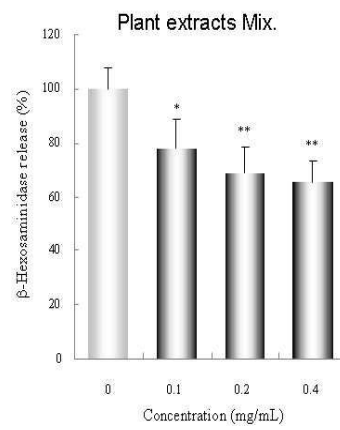
도면1a



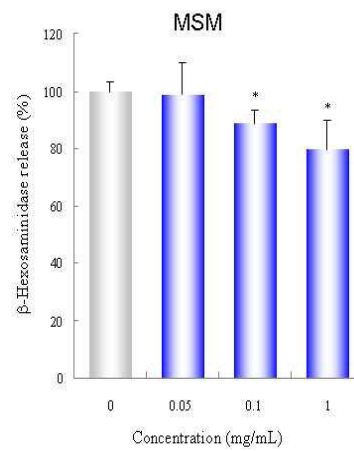
도면1b



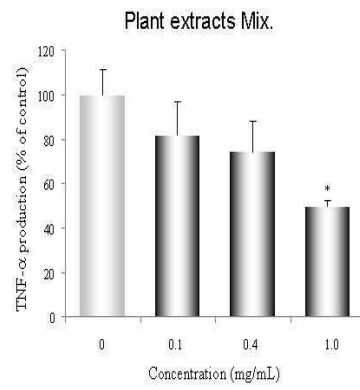
도면2a



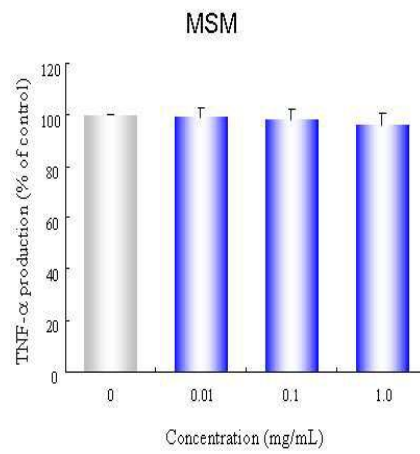
도면2b



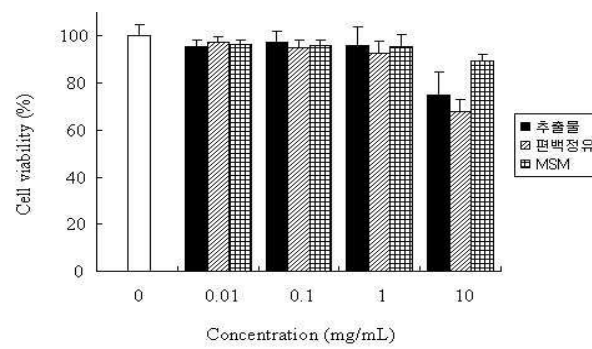
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

