(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년05월04일
(11) 등록번호 10-2393324
(24) 등록일자 2022년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A23L 33/14 (2016.01) *A61K 36/068* (2006.01)
A61K 36/758 (2006.01) *A61K 8/9728* (2017.01)
A61P 17/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0092813
(22) 출원일자 2021년07월15일
심사청구일자 2021년07월15일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020040041912 A*
KR1020200101658 A*
KR1020170091804 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
양재경
경상남도 진주시 강변길 31, 103동 402호(가좌동, 가호 에일린의 뜰 아파트)
하시영
경상남도 진주시 내동면 내동로 223, 201호(장미연립)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

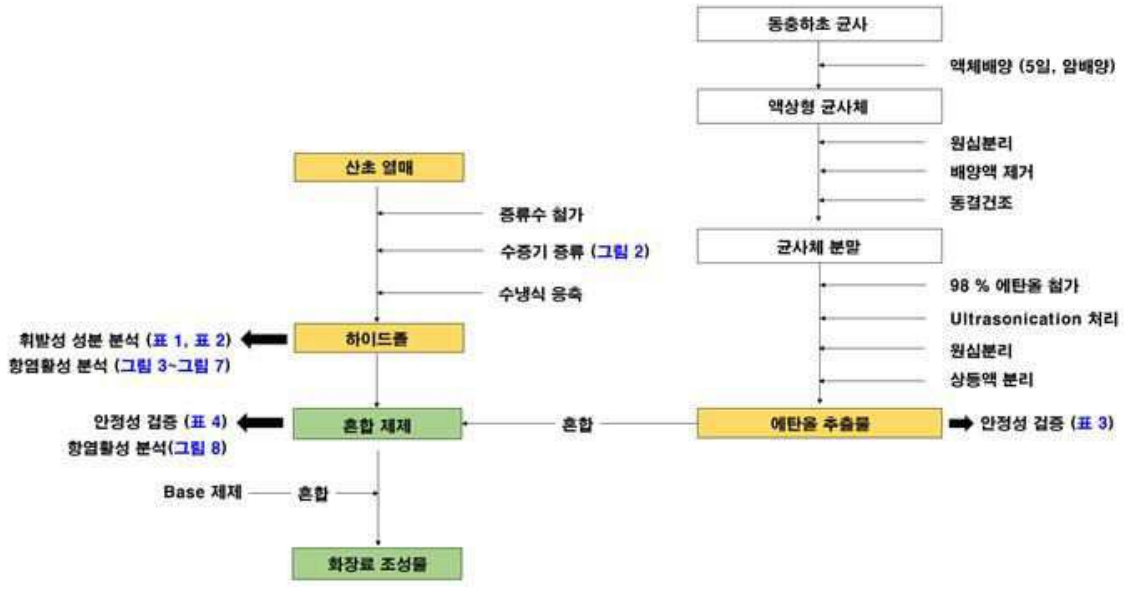
전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 윤미란

(54) 발명의 명칭 **산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물로 이루어진 혼합물을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 산초 열매로부터 추출된 산초 하이드로졸은 염증 매개 단백질인 SNARE 단백질의 발현을 감소시키고, 염증을 유발시키는 활성산소종, NO 및 β-헥사소사미니다아제의 활성을 억제시키는 것이 확인되었으며, 산초 하이드로졸과 동충하초 균사체 추출물이 혼합된 조성물은 산초 하이드로졸의 안정성을 향상시키고 우수한 β-헥사소사미니다아제 활성 억제 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 혼합물은 아토피 피부염을 포함한 염증성 피부 질환을 예방하거나 개선시키기 위한 화장료 조성물, 건강식품 및 약학조성물로 제공될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 33/14 (2016.08)
A61K 36/068 (2013.01)
A61K 36/758 (2013.01)
A61K 8/9728 (2017.08)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61K 2800/5922 (2013.01)
A61K 2800/70 (2013.01)

(72) 발명자
정지영
경상남도 창원시 마산회원구 양덕서로 30, 104동 1702호(양덕동, 메트로시티)

이동환
경상남도 진주시 진주대로879번길 19, A동 1305호 (주약동, 현대성우트리팰리스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1405004440
과제번호	2020186D10-2022-AA02
부처명	산림청
과제관리(전문)기관명	한국임업진흥원
연구사업명	산림융복합전문인력양성(R&D)
연구과제명	항노화 수실류를 이용한 다양한 제품 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상대학교 산학협력단
연구기간	2020.04.01 ~ 2020.12.31

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

산초 하이드로졸 80~90 중량부 및 동충하초 균사체 추출물 10~20 중량부를 유효성분으로 함유하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 산초 하이드로졸은 산초 열매를 수증기 증류하여 생성된 증기를 응축하여 얻은 수용성 하이드로졸인 것을 특징으로 하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 동충하초 균사체 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 염증성 피부 질환은 아토피 피부염, 건선, 접촉성 피부염 및 지루성 피부염으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 산초 하이드로졸은 염증매개 단백질인 SNAP23, Syntaxin4, VAMP7 및 VAMP8의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 조성물 총 100 중량부에 대하여, 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물이 5 내지 10 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 용액, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 보습 크림, 영양 에센스, 젤 및 로션으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 9

산초 하이드로졸 80~90 중량부 및 동충하초 균사체 추출물 10~20 중량부를 유효성분으로 함유하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 건강식품.

청구항 10

산초 하이드로졸 80~90 중량부 및 동충하초 균사체 추출물 10~20 중량부를 유효성분으로 함유하는 염증성 피부 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 약학조성물은 경구용 투여제, 스프레이제, 겔제, 연고제, 크림제 및 외용제로 이루어

진 군에서 선택된 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 염증성 피부 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 아토피 피부염(Atopic dermatitis)은 흔한 피부질환으로 주로 유아기와 소아기에 높은 발생빈도를 보인다. 아토피 피부염의 유병율은 3 %에서 15 % 정도 보고되고 있으며, 2차 세계대전이래 계속 증가추세로 광범위한 역학조사가 실시되었으며, 국내에서도 많은 연구가 진행되었다. 아토피 피부염은 만성 재발성 피부염으로서 심한 소양증, 피부 병변의 특징적인 모양 및 분포, 및 개인적 또는 가족적인 아토피 병력을 갖는 유전적 소인으로 보인다. 최근에는 아토피 피부염이 음식 첨가제나 환경오염의 영향 등으로 증가하는 추세이며, 정확한 병인은 알려져 있지 않지만 유전적, 환경적 및 면역학적 요인이 복잡하게 연관되어 발병하는 것으로 추측되고 있다.

[0003] 아토피 피부염에서는 말초혈액의 $CD8^+$ T 임파구의 감소가 관찰되고 결과적으로 CD4:CD8 비율이 증가하게 된다. 이런 현상이 전신적인 세포매개 면역의 감소를 유도하지는 않지만 피부 면역의 저하를 초래하여 아토피 피부염 환자에게서 바이러스나 세균감염이 빈발하게 되고, 접촉 알레르겐(allergen)에 대한 반응이 저하되는 현상이 발생한다. 또한, $CD4^+$ T 임파구 중에서 INF-γ 와 TNF-β를 분비하여 정상적인 세포매개 면역에 관여하는 Th1의 수는 감소하게 되고 IL-4를 분비하여 알러지 반응을 유발하는 IgE의 생산을 증가시키고 알러지 반응에 직접 관여하는 Th2의 수는 증가하게 된다.

[0004] 한편, 아토피 피부염 환자의 80%는 혈청 IgE가 정상인에 비해 높으며, 증상이 심할수록 그 수치가 높은 경향이 있어 증가된 IgE 자체가 피부 병변에 직접 관여하는지 억제 T 세포의 결함이 IgE 항체의 증가를 초래하는지는 아직 불분명하다. 또한, 아토피 환자에게서 표피 장벽의 손상이 관찰된다. 이는 표피 각질층에서 각질 세포사이의 지질 성분인 세라마이드 (ceramide)의 부족이 아토피 피부염에서 경피 수분손실을 증가시켜 건조함을 유발하는 것으로 추정하고 있다.

[0005] 현재, 아토피를 예방 및/또는 치료하는 것을 목적으로 시판되고 있는 아토피 관련제품으로는 스테로이드계 또는 식물추출물을 소재로 하고 있다. 그러나, 상기 스테로이드계는 부작용과 내성으로 소비자들이 기피하고 있는 실정이고, 대부분의 아토피관련 제품은 식물추출물을 원료로 사용하고 있으나 그 약효는 아토피 환자들을 만족시키지는 못하고 있다. 따라서 아토피 피부염의 예방, 개선, 치료에 관한 공지문헌 및 시제품이 많이 있음에도 불구하고, 여전히 아토피 피부염에 대해 효과가 높고 독성이 없는 새로운 물질 및 제제의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2014-0017761호 (2014.02.12. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물로 이루어진 혼합물을 유효성분으로 함유하여 아토피 피부염과 같은 염증성 피부 질환을 개선하거나 치료하기 위한 화장료 조성물, 건강식품 및 약학조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따르면, 산초 열매로부터 추출된 산초 하이드로졸은 염증매개 단백질인 SNARE 단백질의 발현을 감소시키고, 염증을 유발시키는 활성산소종, NO 및 β-헥사소사미니다아제의 활성을 억제시키는 것이 확인되었으며, 산초 하이드로졸과 동충하초 균사체 추출물이 혼합된 조성물은 산초 하이드로졸의 안정성을 향상시키고 우수한 β-헥사소사미니다아제 활성 억제 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 혼합물은 아토피 피부염을 포함한 염증성 피부 질환을 예방하거나 개선시키기 위한 화장료 조성물, 건강식품 및 약학조성물로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 염증 억제용 화장료 조성물 제조단계를 나타내는 모식도이다.

도 2는 수증기 증류장치를 이용하여 산초열매에서 하이드로졸을 추출하는 과정을 나타내는 모식도이다.

도 3은 산초 하이드로졸의 GC-MS 크로마토그램 및 주요 화합물을 확인한 결과이다.

도 4는 산초 하이드로졸 농도 (25, 37.5, 50, 75 및 100 ppm)에 따른 SNARE 단백질 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 5는 산초 하이드로졸 처리농도 (25, 50 및 100 ppm)에 따른 β-헥사소사미니다아제 (β-hexosaminidase) 억제 활성을 확인한 결과이다. +++: p<0.001 compared DNP-IgE; *: p<0.05 compared DNP-BSA; **: p<0.01 compared DNP-BSA; ***: p<0.001 compared DNP-BSA.

도 6은 산초 하이드로졸 (25, 50 및 100 ppm)의 활성산소종 (ROS) 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 7은 산초 하이드로졸 (25, 50 및 100 ppm)의 LPS에 의해 유도되는 NO 생성 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 8은 산초 하이드로졸과 동충하초 균사체 에탄올 추출물로 이루어진 혼합물의 β-헥사소사미니다아제 억제 활성을 확인한 결과이다. +++: p<0.001 compared DNP-IgE; *: p<0.05 compared DNP-BSA; **: p<0.01 compared DNP-BSA; ***: p<0.001 compared DNP-BSA.

도 9는 산초 오일 및 산초 하이드로졸이 SNARE 단백질 발현 수준에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 10은 산초 오일 및 산초 하이드로졸의 β-헥사소사미니다아제 (β-hexosaminidase) 억제 활성을 확인한 결과이다. +++: p<0.001 compared DNP-IgE; *: p<0.05 compared DNP-BSA; **: p<0.01 compared DNP-BSA; ***: p<0.001 compared DNP-BSA.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0015] 본 발명은 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물로 이루어진 혼합물을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

[0016] 상기 산초 하이드로졸은 산초 열매를 수증기 증류하여 생성된 증기를 응축하여 얻은 수용성 하이드로졸일 수 있다.

[0017] 본 발명에 있어서, 산초 하이드로졸은 수증기 증류법 (steam distillation)으로 획득된 것으로, 수증기 증류법은 물의 수증기를 이용하여 원료로부터 소수성의 오일과 친수성의 하이드로졸을 추출하는 방법으로 커다란 탱크에 원료를 넣고 아랫부분에서 수증기를 가하면 원료의 세포벽이 파괴되면서 세포벽 사이의 오일과 수증기가 수집되는 방법이다.

[0018] 보다 상세하게 상기 산초 하이드로졸은 증류장치(도 2 참조)를 이용하여 250g의 산초 열매를 증류 용기에 넣고 용기 바닥에 끓는 물 750 mL에서 증기를 생성하는 단계; 상기 증기를 응축시켜 수용성 하이드로졸을 획득하는 단계로 추출될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 상기 동충하초 균사체 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출되는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에탄올 수용액일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 보다 상세하게 상기 동충하초 균사체 추출물은 동충하초 균사체를 액체배지에 배양하는 단계; 상기 배양된 동충하초 균사체 배양액을 원심분리 후 균사체를 수득하는 단계; 및 상기 수득된 동충하초 균사체를 98% 에탄올에 혼합 후 60℃에서 1 시간 동안 초음파 처리하여 추출하는 단계; 로 추출될 수 있으나, 이에 되는 것은 아니다.

[0021] 상기 염증성 피부 질환은 아토피 피부염, 건선, 접촉성 피부염 및 지루성 피부염으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0022] 상기 산초 하이드로졸은 염증매개 단백질인 SNAP23, Syntaxin4, VAMP7 및 VAMP8의 발현을 억제하는 것일 수 있다.

[0023] 상기 화장료 조성물은 산초 하이드로졸 80 ~ 90 중량% 및 동충하초 균사체 추출물10 ~ 20 중량%로 혼합되는 것일 수 있다.

[0024] 상기 화장료 조성물은 조성물 총 100 중량부에 대하여, 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물이 5 내지 10 중량부로 포함되는 것일 수 있다.

[0025] 상기 화장료 조성물은 용액, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 보습 크림, 영양 에센스, 젤 및 로션으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형일 수 있다.

[0026] 상기 화장료조성물은 유효성분인 돌단풍 추출물 외에 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0027] 상기 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 썬 크림, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0028] 상기 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜,실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0029] 상기 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0030] 상기 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해 화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0031] 상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0033] 본 발명은 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부 질환 예방 또는 개선용 건강식품을 제공할 수 있다.

[0034] 상기 건강식품은 상기 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0035] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 치료제의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0036] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제등을 들 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0039] 상기 약학조성물은 경구용 투여제, 스프레이제, 겔제, 연고제, 크림제 및 외용제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형일 수 있다.

[0040] 본 발명의 다른 구체예에서, 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물로 이루어진 혼합물을 유효성분으로 함유하는 염증성 피부 질환 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0041] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 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, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0043] 상기 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 추출물로 이루어진 혼합물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 ㎎/㎏, 구체적으로는 0.1 내지 200 ㎎/㎏, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 ㎎/㎏ 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0044] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0048] **<실시예 1> 산초 하이드로졸 추출물 준비 및 활성 확인**

[0049] 1-1. 산초 하이드로졸 추출

[0050] 수증기 증류장치를 이용하여 수증기 증류법으로 도 2와 같은 방법으로 산초열매로 부터 하이드로졸을 추출하였다.

[0051] 먼저, 250g 산초열매를 증류용기에 투입하고 증류수 750 mL를 투입하여 증기를 생성한 후 에션설 오일을 함유하는 수증기를 수냉식 응축기를 통하여 도 2와 같이 응축하였으며, 획득된 하이드로졸을 -4 ℃에 냉장보관하여 연구에 사용하였다.

[0052] 수증기 증류법은 오일 또는 하이드로졸을 획득하기 위한 방법으로, 물의 수증기를 이용하여 원료로부터 소수성 오일과 친수성의 하이드로졸을 추출하는 방법으로, 수증기 증류법으로부터 수집된 오일과 수증기는 파이프를 통해 냉각 탱크 속을 지나는 동안 에센스는 오일로, 수증기는 하이드로졸로 분류된다.

[0053] 상기 수증기 증류법으로 산초 하이드로졸은 원료 대비 16 내지 23 % 가 생산되었으며, 오일은 0.3 내지 1.3 %

로 소량 생산되었다.

[0055] 1-2. 하이드로졸의 휘발성 성분 확인

[0056] 앞선 과정으로 얻은 산초 하이드로졸을 Head space가 장착된 Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC-MS)를 이용하여 표 1과 같은 분석조건으로 구성 성분을 분석하였다.

표 1

[0057]

Apparatus	Item	Condition
Headspace	Instrument	Agilent 7694
	Vial oven temp.	95 ℃
	Loop Temp.	98 ℃
	Transfer line temp.	100 ℃
GC	Instrument	Agilent 7890A
	Column	HP-5MS (Length 30, diam 0.250, film 0.25)
	Carrier gas	He 1.57 mL/min
	Split	splitless
MS	Ion source	EI, 70 eV
	Ms source	230 ℃
	Scan range	50-550 m/s
	Library	w9N11.L
	SPME	SUPELCO SPME Fiber GRAY(DVB/CAR/PDMS)

[0059] 표 2와 같은 하이드로졸 GC-MS 분석 결과, 총 77개의 휘발성 성분이 함유되어 있었으며, 주요 성분으로 도 3과 같이 리날로올 (linalool), 캠퍼 (camphor), 에스트라골 (estragole), R(+)-리모넨 (limonen), 엘레몰 (elemol)이 확인되었다. 이 중 에스트라골이 약 33 %로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 캠퍼는 약 21 %로 두 번째로 높은 함량을 나타내었다.

표 2

[0061]

Peak	RT	Area	Library/ID	Peak	RT	Area	Library/ID
1	2.55	0.01	Octyl acetate	52	14.42	0.09	Carvenone
2	2.69	0.02	2-Propen-1-amine	53	14.55	0.03	1,2-Di(ethylidene)cyclopentane
3	2.81	0.03	1-Butanol	54	14.75	0.04	Anethole
4	2.87	0.02	1-Pentene	55	14.82	0.03	Methyl 6-oxabicyclo
5	2.90	0.02	2-Butanone	56	14.89	0.03	(+)-Isopiperitenone
6	2.95	0.01	3-Methyl acetate	57	15.35	0.92	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol
7	4.27	0.01	3,4-Dihydropyran	58	15.72	0.13	2-Carene
8	4.29	0.01	3-Methyl-2-butenal	59	15.79	0.02	3-Carene
9	4.32	0.01	3,4-Dihydro-2H-pyran	60	15.97	0.06	p-Diisopropylbenzene
10	4.48	0.27	Hexanal	61	16.03	0.04	3,5-Xylidine
11	5.19	0.11	2-Hexenal	62	16.68	0.10	Cyclohexasiloxane
12	5.76	0.01	p-Toluic acid	63	17.31	0.01	1H-Naphthalen-2-one
13	5.80	0.02	Heptanal	64	17.37	0.01	Mentha-1,4,8-triene
14	6.21	0.01	Cyclohexanol	65	17.59	3.75	R(+)-Limonen
15	6.30	0.01	Pyridine	66	18.40	0.01	7-Amino-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen
16	6.69	0.03	2-Heptenal	67	18.55	0.01	α-ylangene
17	6.84	0.03	Benzaldehyde	68	18.90	0.01	Salvial-4(14)-en-1-one
18	7.05	0.03	Amyl vinyl carbinol	69	19.11	0.05	β-elemene
19	7.19	0.04	6-Methyl-5-hepten-2-one	70	19.37	0.01	α-Longipinene
20	7.29	0.95	Cyclotetrasiloxane	71	19.46	0.01	Methyleugenol
21	7.48	0.07	2-Cyclohepten-1-ol	72	19.56	0.01	1,6-Dimethyltricyclo[3.2.1]octane
22	7.64	0.26	3-Fluoro-o-xylene	73	19.91	0.03	Cedrene

23	8.00	0.06	1-Hexanol	74	20.01	0.01	1-Cyclobutylethanol
24	8.13	0.07	DL-Limonene	75	20.15	0.10	Caryophyllene
25	8.22	0.04	2,5-Dihydroanisole	76	20.36	0.01	α-Ionone
26	8.30	0.09	3,4,5-Trimethylpyrazole	77	20.46	0.01	5,6-Decadien-3-yne
27	8.66	0.03	2-Dodecenal	78	20.57	0.14	Thujopsene
28	8.79	0.02	1H-pyrazole	79	20.75	0.01	Isoterpinolene
29	8.93	0.15	Cyclooctane	80	21.09	0.02	(+)-epi-Bicyclosesquiphellandrene
30	9.07	0.08	Pinol	81	21.37	0.05	1,4,7,-Cycloundecatriene
31	9.15	0.02	3,5-Hexadien-2-ol	82	21.72	0.09	β-Cubebene
32	9.28	0.02	1-Vinyl-2-cyclohexen-1-ol	83	21.83	0.01	4,7-Methanoazulene
33	9.51	0.34	4-Ethyl-resorcinol	84	22.17	0.01	γ-Muurolene
34	9.70	1.10	Linalool	85	22.25	0.01	Spiro[5.5]undec-2-ene
35	9.92	0.02	9-Dodecyn-1-ol	86	22.37	0.02	Germacrene
36	9.94	0.01	2,3-Dimethyl-2-cyclopenten-1-one	87	22.47	0.01	2-Cyclohexene-1-butanal
37	9.96	0.01	Cyclohept-4-enone	88	22.56	0.01	α-Guaiene
38	10.07	0.71	Succinic acid	89	22.72	0.01	2H-Isoindole
39	10.20	0.04	D-fenchyl alcohol	90	22.87	0.03	1,4-Dimethyladamantane
40	10.32	0.06	2-Butanone	91	22.98	0.12	1H-Cyclopropazulene
41	10.59	0.11	2-Methylenebornane	92	23.06	0.03	β-Guaiene
42	10.69	0.01	α-Terpinene	93	23.27	0.10	Methyl benzene
43	10.71	0.07	Cyclopentane	94	23.38	0.04	2,4-Di-tert-butylphenol
44	11.19	30.68	Camphor	95	23.55	0.04	α-amorphene
45	11.37	0.33	Isoborneol	96	23.86	0.24	4-Isopropyl-1,6-dimethyldecahydronaphthalene
46	11.42	0.22	5-Tert-butyl-3-hydroxy-3H-furan-2-one	97	24.39	0.01	γ-cadinene
47	11.55	0.69	1,3-Cyclopentadiene	98	24.46	0.01	Isolongifolene
48	11.62	0.76	endo-(-)-Borneol	99	24.60	0.02	α-calacorene
49	11.77	0.06	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one	100	24.85	1.89	Elemol
50	11.89	0.12	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-one	101	25.12	0.01	Germacrene B
51	12.76	50.86	Estragole	102	25.20	0.01	Camphene

[0063] 1-3. 하이드로졸에 의한 RBL-2H3 비만 세포의 SNARE 단백질 (SNAP23, Syntaxin4, VAMP7 및 VAMP8) 발현 변화 확인

[0064] RBL-2H3 비만 세포 (mast cell)를 ATCC (Washington, DC; ATCC number: CRL-2256; 그림 3)에서 구입하여 포도당, 10%의 열적으로 비활성화시킨 태아소혈청 및 항생제를 넣은 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium;Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 배지에서 37 ℃, 5 % CO_2 조건으로 CO_2 인큐베이터(BB15, Thermo Scientific HERAEUS® BB 15)에서 배양하였다.

[0065] 하이드로졸을 DMSO (Dimethyl sulfoxide ;Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에 용해하여 25, 37.5, 50, 75 및 100 ppm 으로 $0.5^{-1} \times 10^{6}$ 의 비만세포가 배양된 6-well에 처리하였다.

[0066] 하이드로졸이 처리된 총 $0.5^{-1} \times 10^{6}$ 세포를 단백질 분해효소 저해제 (Calbiochem, Germany)를 포함하는 1 mL의 용해완충액 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 mM EDTA, pH 7.5)으로 용해시키고, 용해물을 13,000 rpm, 4 ℃에서 원심분리하여 세포 잔해를 제거하였다. 이후 100 μL의 단백질 G 세파로스 (protein G Sepharose, GE healthcare)를 4 ℃에서 2 시간 동안 처리하였다.

[0067] 이후 SNARE 단백질에 대한 항체(SNAP-23, Syntaxin 4, VAMP2, 및 VAMP8)를 용해물에 투입하고 4℃에서 2시간 동안 결합시키고, 항체-항원 복합체를 단백질 G 현탁액을 넣어준 후 하룻밤동안 인큐베이션하였으며, 용해 완충액으로 세척한 후, 침전물의 면역블랏 분석을 수행하였다.

[0068] 면역침전된 단백질들과 세포 용해물들을 12% SDS-PAGE 젤에서 분리하고, 니트로셀룰로스 멤브레인(Whatman, Germany)에 옮긴 후, 5% 탈지분유와 0.5% BSA를 포함한 TBST (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 8.0)로 1 시간 동안 상온에서 블락킹하여 블랏을 SNAP-23의 1차 항체로 밤새 탐침하였다.

[0069] 이후 TBST로 세척하고, 멤브레인에 홀스래디쉬 퍼옥시다제 (horseradish peroxidase)와 혼합된 2차 항-마우스 IgG 항체(A4416, Sigma)를 처리하고, enhanced chemiluminescence (ECL) 용액으로 밴드를 검출하여 하이드로졸에 의한 RBL-2H3 비만세포의 SNARE 단백질 (SNAP23, Syntaxin4, VAMP7 및 VAMP8) 발현 변화를 확인하였다.

[0070] 그 결과, 도 4와 같이 SNAP23, Syntaxin4, VAMP7 및 VAMP8이 농도의존적으로 발현이 억제되는 것이 확인되었다. 특히 단백질 중 VAMP7은 37.5 ppm 이상의 하이드로졸 처리에서 발현이 억제되었으며, VAMP8은 75 ppm 이상의 하이드로졸을 처리했을 때 단백질 발현 억제가 확인되었다.

[0071] 상기 결과로부터 산초 하이드로졸은 염증매개 단백질인 VAMP7 및 VAMP8의 발현 억제에 효과적인 것을 확인할 수 있었으며, NAP23, Syntaxin4, VAMP7 및 VAMP8 모두를 억제할 수 있는 하이드로졸은 염증 개선을 위한 화장료 조성물 원료로 적합한 것이 확인되었다.

[0073] 1-4. 하이드로졸의 처리농도에 따른 β-헥소사미니다아제 (β-hexosaminidase) 억제 효능

[0074] 하이드로졸에 의한 비만세포 SNARE 단백질 발현 억제활성이 비만세포 탈과립화에 미치는 영향을 확인하기 위해, 항-DNP IgE(200 ng/mL)와 DNP-BSA(10 ng/mL)에 의해 유도되는 β-헥소사미니다아제의 분비를 확인하여 RBL-2H3 비만세포의 탈과립화 측정하였다. 또한, 자극물질(anti-DNP IgE + DNP-BSA)에 의해 유도되는 비만세포의 β-헥소사미니다아제 분비를 억제하는 하이드로졸 농도를 확인하였다.

[0075] β-헥소사미니다아제는 비만 세포의 탈과립과 히스타민 (histamine) 방출에 대한 지표로 알려진 효소로써, β-헥소사미니다아제의 억제는 비만 세포의 탈과립과 히스타민 방출로 인한 염증 유발을 감소시킨다.

[0076] 먼저, RBL-2H3 세포들을 24-웰 플레이트에 500 μL의 배양액에 2×10^5 cells/well로 분주하여 배양하였다. 세포들을 HEPES-완충 식염수(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 0.6 mM $MgCl_2$, 0.1% glucose, 0.1% BSA 및 10 mM HEPES)로 세척하고, 항-디니트로페닐 (dinitrophenyl; DNP)-IgE (100 ng/mL, Sigma)에서 3시간동안 배양한 후, 30 분간 하이드로졸 (25 ppm, 50 ppm 및 100 ppm)을 처리 또는 무처리하여 배양하였다.

[0077] 배양 후, 세포들을 항원-유도 탈과립을 위하여, 소혈청 알부민(BSA)과 결합된 DNP-group (200 ng/mL, DNP-BSA)으로 자극하였다. 탈과립은 HEPES-완충 식염수에서 37℃에서 30 분간 비색계 생화학 방법(colorimetric biochemical assay)을 통해서 상층액에서 β-헥소사미니다아제 측정을 통해 정량하였다.

[0078] 상층액을 96-웰 플레이트(50 μL/well)에 옮겨주고 50 μL 기질 용액에 37 ℃에서 3 시간 동안 배양하였다. 100 μL의 $NaCO_3$-$NaHCO_3$ 완충용액 (1:1 mixture, 100 mM $NaCO_3$-$NaHCO_3$, pH 10.0)으로 반응을 중단시킨 후, micro plate reader를 이용해 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분비 활성은 세포 내 상대적 총 β-헥소사미니다아제 함유량으로 계산하였다. 총 β-헥소사미니다아제 함유량은 0.1 % 트리톤 X-100 으로 용해된 세포에 의해 결정되었으며, 상층액 내 β-헥소사미니다아제의 퍼센트는 하기 계산식을 이용하여 계산되었다.

[0080] [계산식]

[0081] β-hexosaminidase 분비(%) = ((T - B - N)/(C - N)) × 100

[0082] T (Test): DNP-BSA (+), 샘플 (+)

[0083] B (Blank): DNP-BSA (-), 샘플 (+)

[0084] C (Control): DNP-BSA (+), 샘플 (-)

[0085] N (Normal): DNP-BSA (-), 샘플 (-)

[0087] 그 결과, 도 5와 같이 비만세포의 DNP-IgE에 DNP-BSA를 투입한 경우, β-헥소사미니다아제가 급격히 증가되었으며, 하이드로졸은 농도의존적으로 β-헥소사미니다아제를 감소시켰다. 특히 100 ppm으로 처리했을 때 $p<0.001$ 수준의 유의성을 나타내는 것이 확인되었다.

[0089] 1-5. 피부각질형성세포 내 활성산소종(ROS) 발생에 대한 하이드로졸의 영향 확인

[0090] ROS (reactive oxigen species)가 비정상적으로 과도하게 생산되면 피부는 산화적 스트레스에 의해 염증 등의

피부질환 및 노화가 유발되는 것으로 알려짐에 따라, 각질형성세포주인 RAW 264.7 세포에 ROS 자극제 H_2O_2를 노출시켜 ROS에 대한 하이드로졸의 효과를 확인하였다.

[0091] RAW 264.7에서 리포다당류 (Lipopolysaccharide, LPS)에 의해 유도되는 NO (nitrite scavenging) 발생에 대한 하이드로졸의 효과를 활성산소와 반응하면 형광을 발산하는 DCF-DA (2′ 7′ -dichloro-fluorescein diacetate) (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 측정하였다.

[0092] 먼저, RAW 264.7 세포를 5×10^4 cells/well 농도로 96-웰 플레이트에 배양한 후에 하이드로졸을 25 내지 100 ppm으로 4 시간 처리하였다. 이후 LPS를 1 μg/mL 농도로 처리하여 24 시간 배양시킨 후 배지를 모두 제거하고 PBS에 DCF-DA 첨가하였다. 37℃에서 30 분 반응시킨 후 방출 파장 (excitation wavelength) 485 nm, 여기 파장 (emission wavelength) 530 nm에서 fluorescence microplate reader를 이용하여 활성산소를 확인하였다.

[0093] 그 결과, 도 6과 같이 LPS가 처리된 RAW 264.7 세포에서 ROS는 150 % 이상 증가한 반면, 25 ppm, 50 ppm 및 100 ppm 하이드로졸이 처리된 RAW 264.7 세포에서는 ROS가 각각 1.9 배, 2.2 배 및 2.6 배 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, 양성 대조군 (positive control)으로 사용된 Bayll-7080 (Sigma-Aldrich, Germany) 이 처리된 RAW 264.7 세포의 ROS 감소 효과와 유사한 수준으로 나타나는 것이 확인되었다.

[0094] ROS는 체내에 고농도로 존재하는 경우 산화적 스트레스를 유발하여 DNA 변이 및 노화를 촉진하고, 여러 가지 전염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokine), 케모카인 (chemokine) 및 에이코사노이드 대사물질 (eicosanoid metabolites)의 분비를 촉진시켜 염증 반응의 지속 및 악화를 유도한다. 이러한 ROS의 증가는 피부가 산화적 스트레스를 받았다는 것을 의미하며, 산화작용이 표피 장벽의 손상과 수분 손실을 유발하여 아토피 등 피부 염증을 악화시킬 수 있다.

[0095] 상기 결과로부터 ROS에 대한 감소 효과를 나타낸 하이드로졸은 염증 개선을 위한 치료제로써 사용 가능함이 확인되었다.

[0097] 1-6. LPS에 의해 유도되는 NO 생성 억제 효과에 대한 하이드로졸의 효과 확인

[0098] 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받아 배양하였다. 세포배양을 위해 10 % FBS과 1 % 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)을 포함하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지를 사용하였으며, 37 ℃, 5 % CO_2의 조건으로 CO_2 인큐베이터 (BB15, Thermo Scientific HERAEUS® BB 15)에서 배양하였다.

[0099] RAW 264.7 세포에 하이드로졸 (25 ppm, 50 ppm 및 100 ppm)을 처리하고 1시간 후 100 ng/mL의 LPS를 처리하여 18시간 배양하고, 배양액 50 μl와 같은 양의 Griess Reagent (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)를 첨가한 후 10 분간 상온에서 반응시키고 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하고, Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액 내의 NO 농도를 확인하였다.

[0100] 그 결과, 도 7과 같이 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의하여 증가된 NO는 25 내지 100 ppm 모든 농도의 하이드로졸 처리에서 NO를 유의성 있게 감소시켰으며, 특히 하이드로졸 100 ppm이 처리된 세포는 양성 대조군으로 사용된 Bayll-7080(구입처)를 처리된 세포 (1.6 배 억제)와 유사한 수준의 NO 억제 효과를 나타내는 것이 확인되었으나, 유의성이 확인되지 않았다.

[0101] 따라서, 하이드로졸은 ROS 및 NO 감소를 위하여 50 ppm으로 처리하는 것이 가장 적합한 것이 확인되었다.

[0103] 1-7. 산초 오일과 산초 하이드로졸의 항염증 효과 확인

[0104] 산초 오일과 산초 하이드로졸의 항염증 효과를 비교하기 위해, 대표적인 R-SNARE 단백질으로써, 세포막에 존재하며 염증물질을 운반하는 매개물질에 관여하는 VAMP7과 VAMP8 발현에 미치는 영향을 상기 1-3의 실험방법으로 확인하였다.

[0105] 그 결과, 도 9와 같이 산초 하이드로졸은 VAMP7과 VAMP8의 확실한 억제를 나타내는 것이 확인된 반면, 산초 오일은 VAMP7의 억제에만 관여하는 것이 확인되었다.

[0106] 또한, 1-4와 같은 방법으로 산초 오일과 산초 하이드로졸이 β-헥소사미니다아제에 미치는 영향을 확인한 결과, 도 10과 같이 DNP-IgE 및 DNP-BSA 처리에 의해 비만세포에서 급격히 증가된 β-헥소사미니다아제가 산초 하이드로졸이 처리된 세포에서는 농도의존적으로 감소하였으며, 특히 100 ppm으로 처리했을 때 $p<0.001$ 수준의 유의성을 나타내는 것이 확인된 반면, 산초 오일에서는 매우 낮은 β-헥소사미니다아제 감소 효과가 확인되었다.

[0107] 상기 결과로부터 산초 오일과 산초 하이드로졸의 항염증 효과가 상이하게 나타내는 것이 확인되었으며, 산초 하이드로졸의 항염증 효과가 산초 오일보다 우수한 것이 확인되었다.

[0109] **<실시예 2> 하이드로졸 안정성 확인**

[0110] 1. 안정성 향상을 위한 혼합물 확인

[0111] 하이드로졸의 안정성을 증가시키기 위해, 토코페롤 (tocopherol), 아스코르빅산 (ascorbic acid), 열처리된 목분 열수/에탄올 추출물 또는 버섯 균사체 열수/에탄올 추출물을 5~20%로 혼합하여 안정성을 확인하였다.

[0112] 먼저, 열처리 목분은 참나무 (*Quercus variabilis* Blume)를 칩으로 제조한 후, 220 ℃에서 1 분 동안 열처리하여 20 mesh pass 80 mesh on으로 분급하여 준비하였으며, 동충하초 균사체 (*Cordyceps militaris*)는 PDB (Potato Dextrose Broth)배지를 이용하여 24 ℃에서 100 rpm으로 7일 동안 배양한 후 원심분리하여 균사체를 획득하였다.

[0113] 열처리된 참나무 목분과 동충하초 균사체의 열수추출은 시료를 전건중량기준으로 1g 칭량한 후 증류수 20 mL에 혼합한 후 60℃에서 30분간 초음파처리 (ultrasonication)하여 얻었다.

[0114] 또한, 열처리된 참나무 목분과 동충하초 균사체의 에탄올 추출은 98% 에탄올을 사용하여 추출하였으며, 시료를 전건중량기준으로 1g 칭량 후 에탄올 20 mL에 혼합 후 60 ℃에서 30 분간 초음파 처리하여 얻었으며, 대조구로 사용된 토코페롤 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)과 아스코르빅산 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)은 에탄올에 용해하여 사용하였다.

[0116] 안정성 측정은 AOCS 분석법(Cd 12b-92)에 따라 전기전도도 측정기를 사용하여 oil stability index (OSI)로 비교하였다. 일정량의 시료 (2.5±0.2 g)를 sampling 후 온도를 100 ℃로 유지하여 표 3과 같은 OSI 값을 확인하였다.

[0117] OSI 측정원리는 지방의 산화에 의해 극성의 휘발성물질이 휘발하여 증류수에 포집되면 전도도가 상승하게 되고 이를 증류수 병에 연결된 전극을 통하여 감지하게 되는데 산화가 급격히 일어나서 휘발성물질이 급격히 증가하는 시점을 포착하여 이때까지의 시간을 OSI(time)로 나타내는 것으로, 결과에서 도출된 시간이 길수록 안정성이 높은 것을 의미한다.

[0118] 그 결과, 표 3과 같이 동충하초 균사체의 에탄올 추출물과 하이드로졸을 혼합하였을 때, 가장 오랜 시간 동안 안정성이 유지되는 것이 확인되었다. 특히 동충하초 균사체의 에탄올 추출물은 일반적으로 안정성 유지에 사용되는 토코페롤 및 아스코르빅산 보다 높은 안정성을 나타내는 것이 확인됨에 따라, 동충하초 균사체의 에탄올 추출물이 하이드로졸의 안정성 유지를 위한 원료로 적합한 것이 확인되었다.

표 3

[0120]

Samples	ppm	전기전도도(μs/cm)/시간								결과 (hours)
		0	12	24	36	48	60	72	84	
Tocopherol (대조구 1)	200	363	355	312	50	51	55	49	50	36
	400	363	357	351	333	50	51	55	49	48
	600	363	394	344	315	49	59	55	44	48
Ascorbic acid (대조구 2)	200	363	355	312	50	51	55	49	50	36
	400	363	357	351	362	50	51	55	41	48
	600	363	357	346	329	45	54	55	50	48
Steam exploded wood chip hot water extract (대조구 3)	200	363	345	50	51	50	52	57	57	24
	400	363	357	48	44	61	62	50	59	24
	600	363	351	61	52	49	50	50	50	24
Steam exploded wood chip ethanol extract (대조구 4)	200	363	345	50	51	50	52	57	57	24
	400	363	388	59	44	61	52	53	59	24
	600	363	372	65	50	49	51	51	48	24
Cordyceps hot water extract (대조구 5)	200	363	357	351	333	50	51	51	49	48
	400	363	394	344	315	49	59	44	41	48
	600	363	394	344	300	312	59	55	49	60

Cordyceps ethanol extract	200	363	394	344	315	332	59	55	44	60
	400	363	313	319	335	329	319	49	52	72
	600	363	313	319	335	329	319	49	52	72

[0122] 2. 안정성 향상을 위한 혼합 비율 확인

[0123] 하이드로졸의 안정성 향상을 위해, 상기 결과로부터 확인된 동충하초 균사체 에탄올 추출물과 하이드로졸의 최적의 혼합비율을 확인하였다.

[0124] 하이드로졸과 동충하초 균사체의 에탄올추출물을 질량 기준 60:40, 70:30, 80:20 및 90:10으로 혼합하여 안정성(OSI, time)을 확인하였다. 안정성의 측정은 AOCS 분석법(Cd 12b-92)에 따라 전기전도도 측정기를 사용하여 총 84 시간 동안 12 시간 간격으로 전기전도도를 측정하여 oil stability index (OSI)로 비교하였다.

[0125] 그 결과, 표 4와 같이 하이드로졸과 동충하초 균사체 에탄올 추출물을 80:20 (w:w) 및 90:10 (w:w)으로 혼합하는 것이 가장 높은 안정성을 나타내는 것이 확인되었으며, 특히 하이드로졸과 동충하초 균사체 에탄올 추출물을 90:10 (w:w)으로 혼합하는 조건이 72 시간으로 높은 안정성을 나타냈으며, 비교적 높은 양의 산초 오일을 혼합하였으므로 아토피피부염 완화를 위한 제품 개발 원료로 가장 적합할 것으로 제안될 수 있다.

표 4

[0126]

Samples	전기전도도(μs/cm)/시간								결과
	0	12	24	36	48	60	72	84	(hours)
80:20[1)]	363	313	325	342	312	319	48	52	72
90:10	361	352	311	346	322	315	49	52	72
95:5	355	364	354	344	322	49	51	42	48
100:0	349	342	361	352	312	59	44	40	48

[0127] [1)] 하이드로졸: 동충하초 균사체 에탄올 추출물 (w:w)

[0129] 3. 하이드로졸과 동충하초 균사체 에탄올 추출물 혼합제제의 β-헥소사미니다아제 억제 효과 확인

[0130] 실시예 1에 기재된 방법으로 하이드로졸과 동충하초 균사체 에탄올 추출물을 원료로하여 혼합된 혼합물의 β-헥소사미니다아제 억제 효과를 확인하였다.

[0131] 그 결과, 도 8과 같이 혼합제제는 $p<0.01$의 유의성으로 β-헥소사미니다아제에 대한 억제 효과를 나타내었다. 특히 하이드로졸과 동충하초 균사체 에탄올 추출물을 원료로 하는 혼합 제제는 DNP-IgE와 DNP-BSA로 발현된 β-헥소사미니다아제를 40% 이상 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0132] 상기 결과로부터 하이드로졸과 동충하초 균사체 에탄올 추출물이 혼합된 제제는 아토피 피부염 완화용 제제의 원료로 적합한 것이 확인되었다.

[0134] **<실시예 3> 하이드로졸과 동충하초 균사체 에탄올 추출물의 혼합 제제를 원료로 하는 화장료 조성물**

[0135] 앞서와 같이 안정성과 염증 치료 효과가 확인된 하이드로졸과 동충하초 균사체 에탄올 추출물의 혼합 제제를 원료로 하는 화장료 조성물 제조하였다.

[0136] 사용한 base 제제는 표 5와 같이 녹차수, 효모발효여과물, 부틸렌글라이콜, 나이아신아마이드, 글리세린, 피이지-60하이드로제네이티드 캐스터오일, 판테놀, 토코페릴아세테이트, 다이소듐이디티에이, 1,2-헥산다이올을 혼합하여 제조하였으며, 산초 하이드로졸 및 동충하초 균사체 에탄올 추출물 혼합물은 베이스 제제 100 중량부에 대하여 5 내지 10 중량부로 첨가하여 균질화하였다.

표 5

[0137]

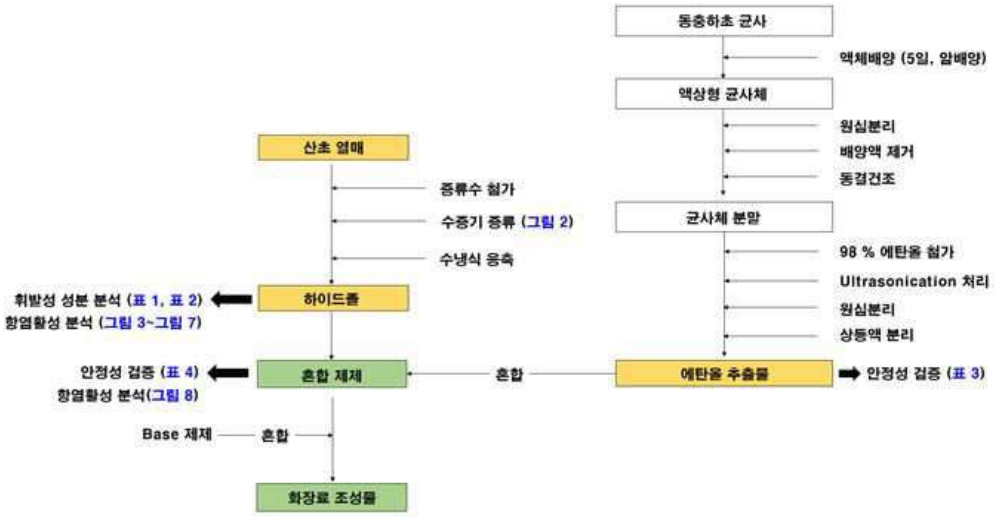
No.	조성물	함량 (중량부)
1	녹차수	53-55
2	효모발효여과물	27-30

3	부틸렌글라이콜	2
4	나이아신아마이드	1
5	글리세린	2
6	피이지-60하이드로제네이티드 캐스터오일	1
7	판테놀	1
8	토코페릴아세테이트	1
9	다이소듐이디티에이	1
10	1,2-헥산다이올	1
11	산초 하이드로졸	4.5-9
12	동충하초 균사체 에탄올 추출물	0.5-1

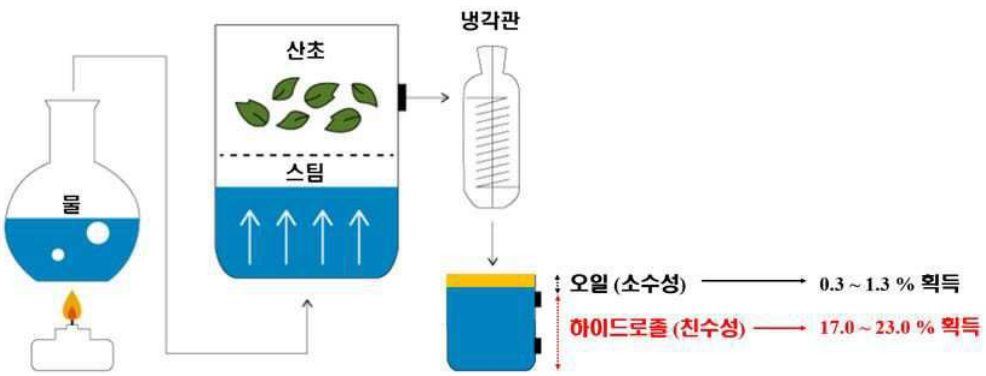
[0139] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

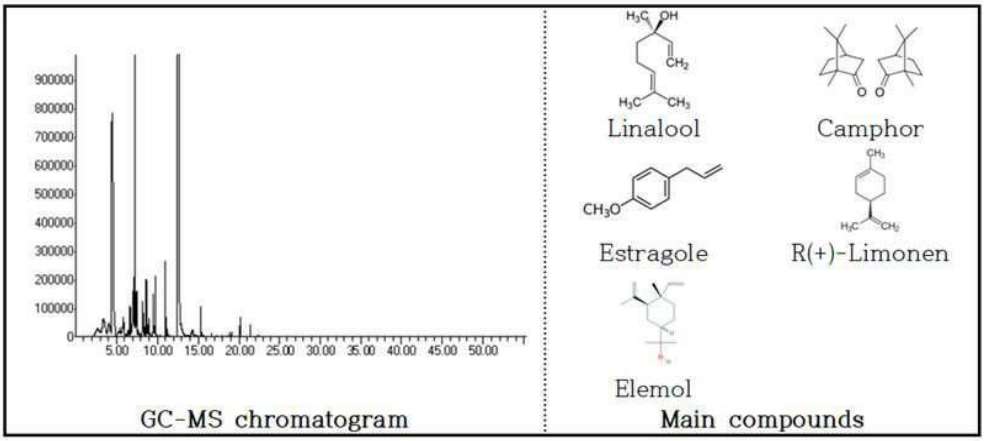
도면1



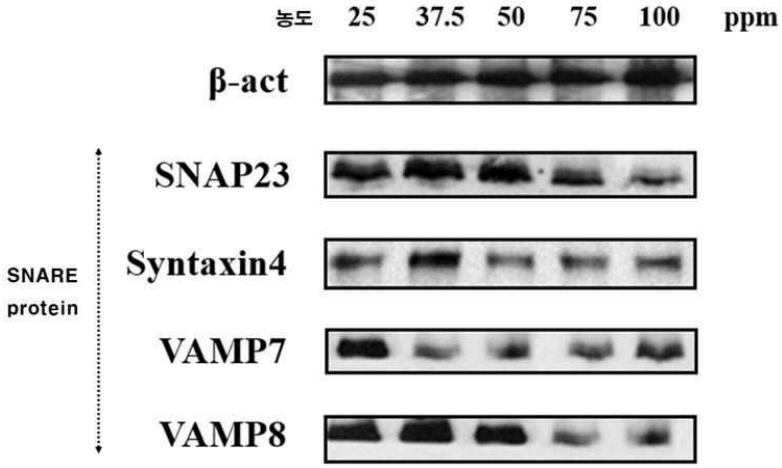
도면2



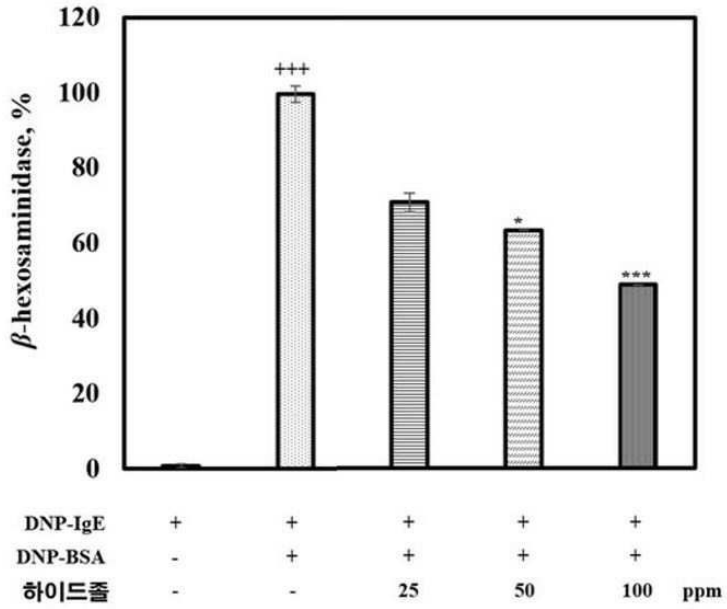
도면3


GC-MS chromatogram
Main compounds
Linalool
Camphor
Estragole
R(+)-Limonen
Elemol

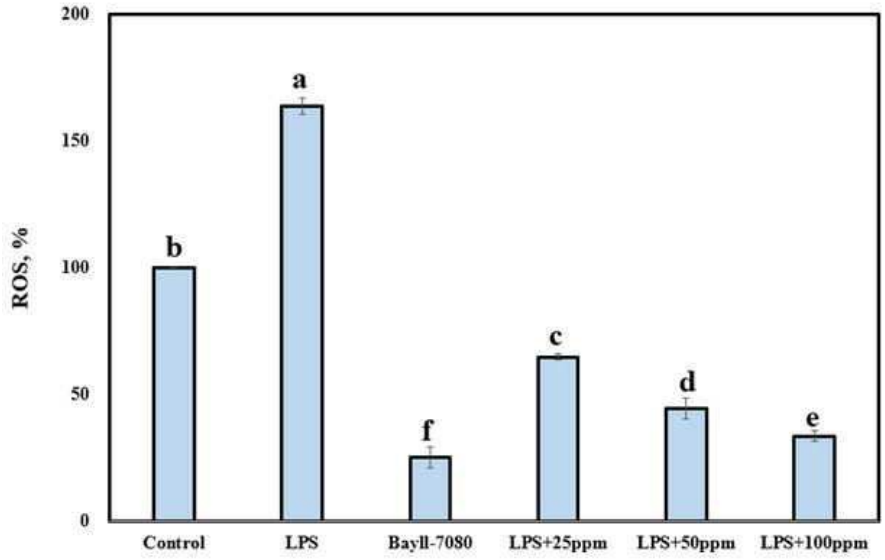
도면4


농도 25 37.5 50 75 100 ppm
β-act
SNAP23
Syntaxin4
VAMP7
VAMP8
SNARE protein

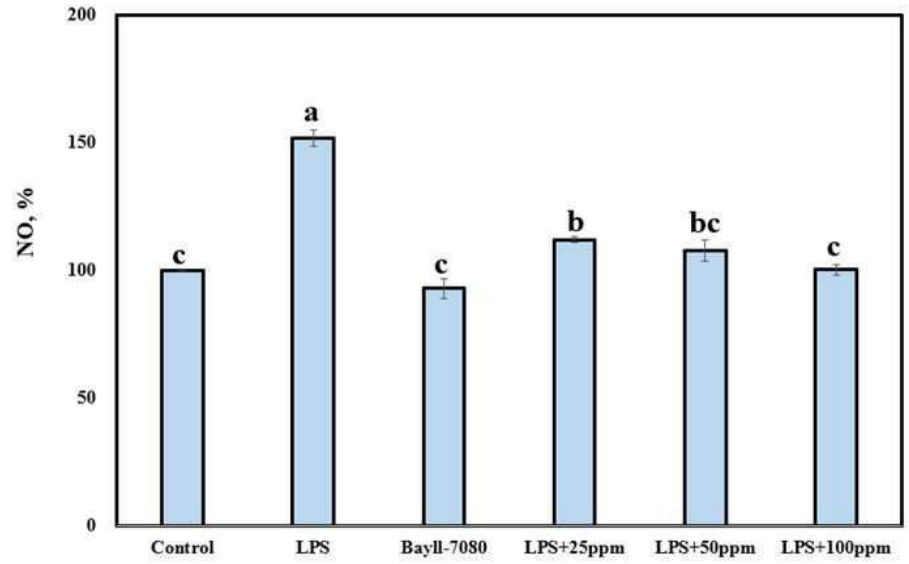
도면5


β-hexosaminidase, %
120
100
80
60
40
20
0
+++
*
***
DNP-IgE + + + + +
DNP-BSA - + + + +
하이드졸 - - 25 50 100 ppm

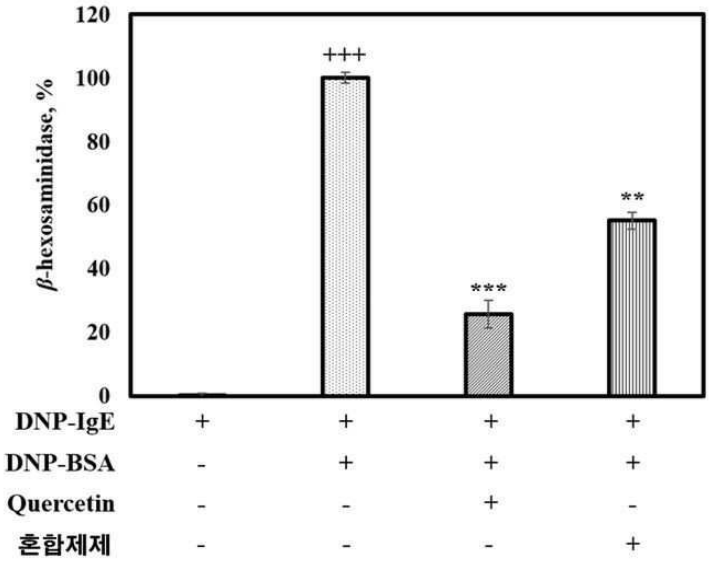
도면6


ROS, %
200
150
100
50
0
a
b
c
d
e
f
Control
LPS
Bayll-7080
LPS+25ppm
LPS+50ppm
LPS+100ppm

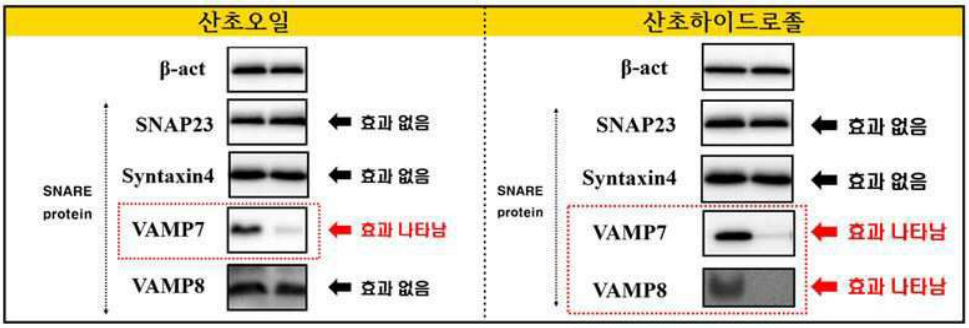
도면7


NO, %
200
150
100
50
0
a
b
bc
c
c
c
Control
LPS
Bayll-7080
LPS+25ppm
LPS+50ppm
LPS+100ppm

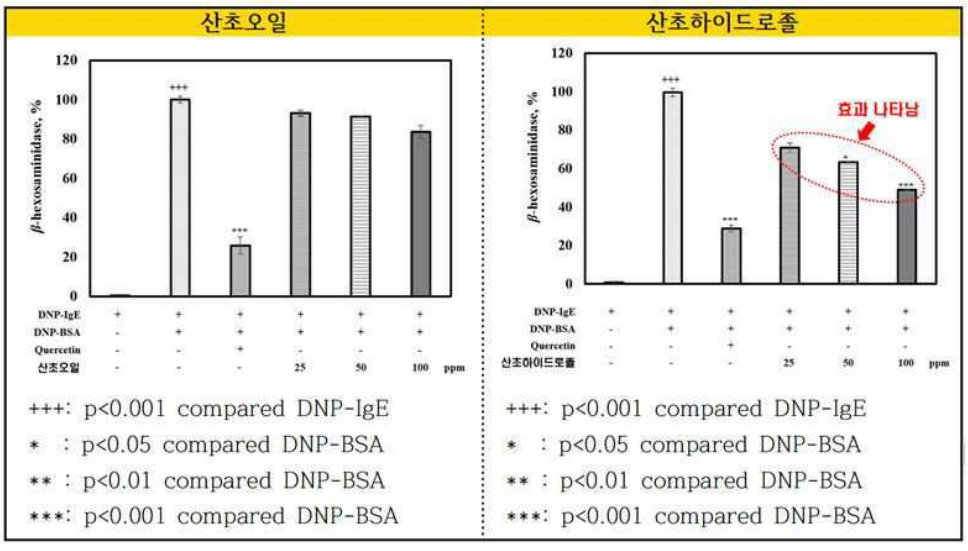
도면8


β-hexosaminidase, %
120
100
80
60
40
20
0
+++
***
**
DNP-IgE + + + +
DNP-BSA - + + +
Quercetin - - + -
혼합제제 - - - +

도면9


산초오일
산초하이드로졸
β-act
SNAP23
Syntaxin4
VAMP7
VAMP8
SNARE protein
효과 없음
효과 나타남

도면10


산초오일
산초하이드로졸
β-hexosaminidase, %
DNP-IgE
DNP-BSA
Quercetin
산초오일
산초하이드로졸
ppm
효과 나타남
+++: p<0.001 compared DNP-IgE
* : p<0.05 compared DNP-BSA
** : p<0.01 compared DNP-BSA
***: p<0.001 compared DNP-BSA