



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월09일

(11) 등록번호 10-1575722

(24) 등록일자 2015년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/40 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0128604

(22) 출원일자 2013년10월28일

심사청구일자 2013년10월28일

(65) 공개번호 10-2015-0048478

(43) 공개일자 2015년05월07일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020100066784 A

KR1020130114502 A

(73) 특허권자

명지대학교 산학협력단

경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)

(72) 발명자

서주원

경기 용인시 처인구 포곡읍 석성로850번길 84, 에버힐스 1단지 1호

이지언

경기 용인시 처인구 용문로 30-8, 604호 (역북동, 라이프청수아파트)

이동령

경기 수원시 팔달구 장다리로306번길 13, 105동 206호 (인계동, 한신아파트)

(74) 대리인

이우영

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 산수유 추출물을 함유하는 향산화, 향균, 항염 조성물

(57) 요약

본 발명은 산수유 추출물을 함유하는 향산화, 향균 또는 항염 조성물에 관한 것이다.

상기와 같은 본 발명에 따르면, 산수유 추출물을 유효성분으로 함유하는 향산화, 향균 및 항염 효과가 우수한 조성물을 피부 외용제 조성물로 이용함으로써, 여드름, 아토피, 무좀, 건선, 습진 또는 피부염 등과 같은 피부질환을 개선하는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009007

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농생명바이오식의약소재개발사업단

연구사업명 차세대 바이오그린21 사업

연구과제명 생체 기능성 물질 선별 및 epitope tag 개발 연구

기 여 율 1/1

주관기관 명지대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 산수유(*Cornus officinalis*) 꽃을 세척하고 건조시키는 단계;
- (2) 상기 건조된 산수유 꽃을 추출용매에 침지시켜 5 내지 100 ℃의 온도에서 12 내지 36시간 동안 추출하여 산수유 꽃 추출물을 제조하는 단계; 및
- (3) 상기 제조된 산수유 꽃 추출물을 여과 및 농축시키는 단계에 따라 제조된 산수유 꽃 추출물을 유효성분으로 함유하며, 스타필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*) 균주의 생장을 억제하는 것을 특징으로 하는 향균 또는 항염 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 산수유 추출물을 함유하는 향산화, 향균 또는 항염 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 여드름은 모든 연령대에서 대부분의 사람들에게 발생하며, 면포 또는 농포 등을 형성하는 피부질환이다. 여드름의 발생원인은 과도한 피지분비, 호르몬 불균형, 모낭 내 이상 각화 및 *Propionibacterium acnes*의 증식 및 염

증반응 등의 복합적인 요인으로 발생한다. 여드름 원인균인 *P. acnes*는 혐기성 피부 상재균으로 모낭 내에서 증식하며, 피지의 트리글리세라이드를 리파아제가 가수분해하여 생성되는 유리지방산과 이에 의한 모낭의 자극으로 화학주성인자(chemotactic factor)가 발생하여 염증반응을 일으킨다. *P. acnes* 감염에 의한 여드름의 치료방법은 항생제 투여가 가장 많이 사용되고 있으나, 항생제의 내성 등에 의해 치료 효과가 떨어질 수 있다. 이에, 여드름 치료에 생약 유래 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0003] 최근 여러 가지 화학물질 등에 의한 피부자극을 줄이기 위해 천연물을 사용한 화장품이 다양하게 개발되고 있으며, 천연재료는 피부에 부작용이 적을 뿐만 아니라 소비자들의 호응이 높아 화장품 원료로써 개발가치가 증가하고 있는 추세이다.

[0004] 대한민국 등록특허 제10-1253374호(여드름 피부 개선용 화장료 조성물)는 여드름 피부 개선을 위한 화장료 조성물로 김치유산균발효추출물과 대두발효추출물을 이용하고, 대한민국 등록특허 제10-0879032호(천연 항균 및 항염 효과가 있는 항균, 항산화 및 항염억제제 및 이를 함유하는 화장료 조성물)는 한약재 감초, 지모, 독활, 황백, 황련, 고삼, 황금, 괴화, 자초 혼합 추출물을 이용하여, 항균 효과가 있는 화장료 조성물을 제공하고 있다.

[0005] 산수유는 층층나무과(Comaceae)에 속하는 약용식물로서 그 열매는 길이 1.5 cm 내외의 중추원형 모양이며, 신맛이 두드러져 축산초라고도 불리고 자양강장 효과를 가진 천연식품으로 널리 이용되고 있다. 산수유에는 결정성 유기산, 물식자산, 사과산, 포도주산 등이 있으며, 모르로니시드, 로가닌 등 이리도이드 배당체가 알려져 있다. 한방자료 기록에 의하면 산수유는 그 맛이 시고 성질이 따뜻하며, 당뇨증, 요통, 이명, 폐결핵 등의 치료제로 사용되어 왔고, 이뇨작용, 혈압강화작용, 항암 등의 약리작용이 있다고 알려져 있다.

[0006] 그러나, 산수유를 화장료 조성물이나 피부 외용제 조성물의 소재로 적용한 예는 많지 않으며, 열매를 중심으로 그 효능이 연구되어 산수유 꽃에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 산수유 꽃은 차로 음용이 가능하기 때문에 인체에 미치는 독성이 거의 없다. 또한, 선행기술은 산수유를 다른 천연소재와 혼합하여 혼합물의 효과만을 제시하고 있을 뿐, 산수유 자체의 효능을 이용하여 여드름, 아토피 등의 피부염에 적용한 예는 없다.

[0007] 대한민국 등록특허 제10-0361040호(황백, 산수유, 대황, 행인, 당귀, 정향 및 띠 추출물을 안정화한 니오솜을 함유하는 화장료 조성물)는 황백, 산수유, 대황, 행인, 당귀, 정향 및 띠의 추출물을 니오솜에 효과적으로 안정화함으로써 피부 침투 효과를 증진시켜 피부 탄력 증진 및 지속적인 보습 효과를 제공한 것으로서, 선행기술은 산수유 열매를 다른 천연소재와 혼합하여 이용하고 있을 뿐이다. 이에, 본 발명자들은 산수유 추출물, 더 나아가 산수유 꽃 추출물의 새로운 용도를 제공하고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 부작용이 없는 천연물 소재인 산수유 추출물의 새로운 용도를 제공하여, 산수유 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 항균 및 항염 효과가 있는 조성물을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 산수유(*Cornus officinalis*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 항균 또는 항염 조성물을 제공한다.

[0010] 상기 산수유 추출물은 산수유 꽃 추출물인 것을 특징으로 한다.

[0011] 상기 산수유 추출물은 용매 추출법, 초임계 추출법 또는 초음파 추출법으로 추출된 것을 특징으로 한다.

[0012] 이때, 상기 용매 추출법은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 디프로필렌글리콜, 글리세린, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 부틸아세테이트, 디에틸에테르, 디클로로메탄 및 헥산을 포함하는 군에서 선택되는 1 이상의 추출용매를 이용한 것을 특징으로 한다.

[0013] 상기 산수유 추출물은 항산화, 항균 또는 항염 조성물에 대하여 1 내지 99 중량%로 함유된 것을 특징으로 한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 항산화, 항균 또는 항염 조성물을 함유하는 피부 외용제 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 피부 외용제 조성물은 여드름, 아토피, 무좀, 건선, 습진 및 피부염을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나의 피부질환을 개선하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 상기 피부 외용제 조성물은 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) 또는 스태필로코커스 에피

더미디스(*Staphylococcus epidermidis*) 균주의 성장을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 상기 피부 외용제 조성물은 연고제, 용액, 크림, 유액, 화장수, 로션, 젤, 에센스, 파운데이션, 팩, 스틱, 입욕제 또는 비누의 제형으로 제조된 것을 특징으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 항산화, 항균 또는 항염 조성물을 함유하는 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 상기와 같은 본 발명에 따르면, 산수유 추출물을 유효성분으로 함유함으로써, 항산화, 항균 및 항염 효과가 우수한 조성물을 제공하여 여드름, 아토피, 무좀, 건선, 습진 또는 피부염 등과 같은 피부질환을 개선하는 효과가 있다.

[0020] 본 발명에 따른 산수유 추출물을 함유하는 조성물은 여드름 원인균인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)뿐만 아니라, 여드름균 감염 이후 2차 피부 감염균인 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*)에 대하여 항균 작용이 우수해 여드름 개선에 뛰어난 효과가 있고, 대식세포에서 염증 관련 사이토카인 TNF- α 를 억제시킴과 동시에 LPS 자극 후 대식세포에서 분비되는 NO 생성을 억제하는 우수한 항염증 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 산수유 추출물의 제조공정.

도 2는 산수유 추출물의 DPPH를 이용한 항산화 활성 결과.

도 3은 산수유 추출물의 TNF- α 억제 활성 결과.

도 4는 산수유 추출물의 NO(Nitric Oxide) 억제 활성 결과.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0023] 본 발명은 산수유(*Cornus officinalis*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 항균 또는 항염 조성물을 제공한다.

[0024] 상기 산수유 추출물은 산수유 꽃 추출물인 것이 바람직하다.

[0025] 상기 산수유 추출물은 용매 추출법, 초임계 추출법 또는 초음파 추출법으로 추출된 것이 바람직하며, 냉침추출, 열수추출, 환류냉각추출 또는 가열추출에 의해 추출될 수 있다. 용매 추출법은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 디프로필렌글리콜, 글리세린, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 부틸아세테이트, 디에틸에테르, 디클로로메탄 및 헥산을 포함하는 군에서 선택되는 1 이상의 추출용매를 이용하는 것이 바람직하다.

[0026] 더욱 구체적으로, 본 발명에 따른 산수유 추출물은 (1) 산수유 열매, 꽃 또는 이들의 혼합원료를 세척 및 건조시키는 단계; (2) 상기 건조된 산수유 원료를 추출용매에 침지시켜 산수유 추출물을 제조하는 단계; 및 (3) 상기 제조된 산수유 추출물을 여과 및 농축시키는 단계;를 포함하여 제조될 수 있다.

[0027] 상기 (1)단계에서 건조는 20 내지 60 °C에서 1 내지 2일 동안 건조시키는 것이 바람직하다.

[0028] 상기 (2)단계에서 추출공정은 산수유 원료 무게의 10 내지 20 배, 바람직하게는 10 내지 15 배에 해당하는 물, 탄소수 1 내지 4의 무수 또는 함수 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 디프로필렌글리콜, 글리세린, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 부틸아세테이트, 디에틸에테르, 디클로로메탄, 헥산 또는 이들을 혼합한 추출용매를 가하여 5 내지 100 °C, 바람직하게는 20 내지 100 °C, 더욱 바람직하게는 50 내지 90 °C의 온도에서 12 내지 36 시간 동안 추출하는 것이 최적의 효과를 나타낸다. 상기 추출공정은 1 내지 5 회 반복하여 추출하는 것이 바람직하며, 상기 저급 알코올로 메탄올, 에탄올 또는 부탄올을 이용할 수 있다.

[0029] 상기 산수유 추출물은 항산화, 항균 또는 항염 조성물에 대하여 1 내지 99 중량%, 바람직하게는 20 내지 40 중량%로 함유된 것이 최적의 효과를 나타낸다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 항산화, 항균 또는 항염 조성물을 함유하는 피부 외용제 조성물을 제공한다.

- [0031] 상기 피부 외용제 조성물은 피부 개선용 화장품 조성물로 이용될 수 있고, 여드름, 아토피, 무좀, 건선, 습진 및 피부염을 포함하는 군에서 선택되는 어느 하나의 피부질환을 개선하며, 피부의 노화, 주름 또는 탄력 소실을 예방하는 효과가 있다.
- [0032] 상기 피부 외용제 조성물은 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*) 또는 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*) 균주의 성장을 억제하는 효과가 있다.
- [0033] 본 발명은 산수유 꽃에서 추출한 추출물이 여드름 원인균인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)뿐만 아니라, 여드름균 감염 이후 2차 피부 감염균인 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*)에 대하여 항균 작용이 우수해 여드름 개선에 뛰어난 효과가 있고, 대식세포에서 염증 관련 사이토카인 TNF- α 를 억제시킴과 동시에 LPS 자극 후 대식세포에서 분비되는 NO 생성을 억제하는 우수한 항염증 효과가 있음을 제공한다. 테트라사이클린과 같은 항생제는 부작용 및 내성균의 출현 등 사용상의 한계점이 있는 반면, 본 발명에 따른 산수유 꽃 추출물은 안전하고 부작용이 없어 피부 외용제 조성물로 적합하다.
- [0034] 상기 피부 외용제 조성물은 연고제, 용액, 크림, 유액, 화장수, 로션, 젤, 에센스, 파운데이션, 팩, 스틱, 입욕제 또는 비누의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 항산화, 항균 또는 항염 조성물을 함유하는 건강기능식품을 제공한다.
- [0036] 하기에 본 발명의 산수유 꽃 추출물을 포함하는 여러 가지 제형예를 설명하고 있으나, 이는 본 발명을 제한하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.
- [0037] **제형예 1. 유연 화장수(스킨 로션)**
- [0038] 실시예의 산수유 꽃 추출물.....5.0
- [0039] 글리세린.....3.5
- [0040] 올레일알코올.....1.5
- [0041] 에탄올.....5.5
- [0042] 폴리솔베이트 80.....3.2
- [0043] 카르복실비닐폴리머.....1.0
- [0044] 부틸렌 글리콜.....2.0
- [0045] 프로필렌 글리콜.....2.0
- [0046] 방부제, 향료.....적량
- [0047] 정제수.....잔량
- [0048] 계.....100
- [0049] 상기의 조성에 따라 통상적인 방법으로 유연 화장수를 제조하였다(단위 중량%).
- [0050] **제형예 2. 영양 화장수(밀크 로션)**
- [0051] 실시예의 산수유 꽃 추출물.....5.0
- [0052] 글리세린.....3.0
- [0053] 부틸렌글리콜.....3.0
- [0054] 프로필렌글리콜.....3.0
- [0055] 카르복시비닐폴리머.....0.1
- [0056] 밀납.....4.0
- [0057] 폴리솔베이트 60.....1.5
- [0058] 카프릴릭/카프릭 리글리세라이드.....5.0
- [0059] 스쿠알란.....5.0

[0060]	솔비타세스퀴올레이트.....1.5
[0061]	세테아릴 알코올.....1.0
[0062]	트리에탄올아민.....0.2
[0063]	방부제, 향료.....적량
[0064]	정제수.....잔량
[0065]	계.....100
[0066]	상기의 구성에 따라 통상적인 방법으로 영양 화장수를 제조하였다(단위 중량%).
[0067]	제형예 3. 영양 크림
[0068]	실시예의 산수유 꽃 추출물.....3.0
[0069]	글리세린.....3.5
[0070]	부틸렌글리콜.....3.0
[0071]	유동파라핀.....7.0
[0072]	베타글루칸.....7.0
[0073]	카보머.....0.1
[0074]	카프릴릭/카프릭 리글리세라이드.....3.0
[0075]	스쿠알란.....5.0
[0076]	세테아릴 글루코사이드.....1.5
[0077]	소르비탄 스테아레이트.....0.4
[0078]	폴리솔베이트 60.....1.2
[0079]	트리에탄올아민.....0.1
[0080]	방부제, 향료.....적량
[0081]	정제수.....잔량
[0082]	계.....100
[0083]	상기의 구성에 따라 통상적인 방법으로 영양 크림을 제조하였다(단위 중량%).
[0084]	제형예 4. 팩
[0085]	실시예의 산수유 꽃 추출물.....8.0
[0086]	글리세린.....4.0
[0087]	폴리비닐알콜.....15.0
[0088]	히알루론산 추출물.....5.0
[0089]	베타글루칸.....7.0
[0090]	알란토인.....0.1
[0091]	노닐 페닐에테르.....0.4
[0092]	폴리솔베이트 60.....1.2
[0093]	방부제, 향료.....적량
[0094]	정제수.....잔량
[0095]	계.....100

- [0096] 상기의 구성에 따라 통상적인 방법으로 팩을 제조하였다(단위 중량%).
- [0097] **제형예 5. 국소 투여용 약제(패취제)**
- [0098] 실시예의 산수유 꽃 추출물.....4.0
- [0099] 베타-1,3-글루칸.....3.0
- [0100] 디에틸아민.....0.7
- [0101] 아황산나트륨.....0.1
- [0102] 폴리옥시에틸렌라우릴에테르(E.O=9).....1.0
- [0103] 폴리히드록시에틸렌세틸스테아릴에테르(Cetomacrogol 1000).....1.0
- [0104] 점성의 파라핀 오일.....2.5
- [0105] 카프릴산에스테르/카프르산에스테르(Cetiol LC).....2.5
- [0106] 폴리에틸렌글리콜 400.....3.0
- [0107] 폴리아크릴산(Carbopol 934P).....1.0
- [0108] 정제수.....잔량
- [0109] 계.....100
- [0110] 상기의 구성에 따라 통상적인 방법으로 국소 투여용 약제를 제조하였다(단위 중량%).
- [0111] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0112] **실시예 1. 산수유 추출물의 제조**
- [0113] 산수유 꽃을 증류수로 1~2회 세척한 후 20 내지 60 ℃에서 1~2일간 건조시켜 추출원료를 준비하였다.
- [0114] 준비한 산수유 꽃 50 g을 750 ml의 증류수, 메탄올 및 70 % 에탄올에 각각 침지시켜 50 내지 70 ℃에서 12 내지 36 시간 동안 추출하였다. 이후, 불용성 성분을 1~2배의 물로 세척하면서 5 μ m 이하의 공극 크기를 갖는 여과지로 자연여과한 다음, 당도 측정기로 측정하였을 때 약 3 내지 6 브릭스(Brix)가 될 때까지 감압 농축기로 농축하고 동결건조하여 습기가 없는 곳에서 믹서기로 균질화하였다(도 1).
- [0115] 상기 제조된 산수유 꽃 추출물 시료를 이용하여 하기와 같은 실험을 진행하였다.
- [0116] **준비예. 실험균주 및 배양**
- [0117] 본 발명에 따른 실험예에서는 여드름 원인균인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes* KCTC3314)와 그람 양성 피부상재균인 스태필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis* KCTC12228)를 이용하였다.
- [0118] *P. acnes*는 Reinforced clostridial(RC) 배지에 접종한 후 혐기성 배양조에서 Gaspack system을 이용하여 밀봉한 다음, 37 ℃에서 3 일 동안 혐기성 배양하였고, 호기성 균주인 *S. epidermidis*는 Mueller-Hinton 배지에 접종한 후 37 ℃에서 24 시간 동안 배양하여 사용하였다.
- [0119] **실험예 1. 산수유 추출물의 항산화 활성**
- [0120] 항산화 활성 측정은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)법을 이용하여 자유 라디칼(free radical) 소거능으로 측정하였으며 비교물질로 L-ascorbic acid를 사용하였다. DPPH와 양성대조균인 L-ascorbic acid는 시그마(Sigma)사의 것을 사용하였고, DPPH는 짙은 자색을 띄는 비교적 안정적인 자유 라디칼로서 시료에 의해 환원되어 탈색되므로 항산화 활성을 측정하는데 이용된다.
- [0121] 0.2 mM DPPH 에탄올 용액 200 μ l에 2 배씩 연속적으로 희석(1000 μ g-0 μ g)시킨 추출물 시료를 실온에서 30 분간 반응시키고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 하기 계산식을 사용하여 자유 라디칼 소거능을 구하였으며, 전자공여능은 시료의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

[0122] 자유 라디칼 소거능(%) = (1-시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도) × 100

[0123] 자유 라디칼인 DPPH를 환원 또는 상쇄시키는 능력, 즉 산화를 억제하는 추출물 시료의 효과를 자유 라디칼 소거능으로 측정한 결과, 양성대조군인 L-ascorbic acid의 항산화 활성과 비교하여 보았을 때, 70 % EtOH 추출물의 경우에는 62.5 ug/ml 이상의 처리 농도까지 약 80 % 이상의 항산화 활성을 나타내었고, MeOH 추출물의 경우에는 31.25 ug/ml 이상의 처리 농도에서 약 85 % 이상의 항산화 활성 효과가 나타났다(도 2). 따라서, 산수유 추출물은 우수한 항산화 효과를 갖는 것을 확인하였다.

[0124] **실험예 2. 산수유 추출물의 항균 활성**

[0125] 항균 활성 측정은 디스크 확산법(paper disk diffusion method)을 이용하였다.

[0126] 여드름 원인균 *P. acnes*를 Reinforced clostridial(RC) 액체배지에서 3 일간 배양한 다음, 일정한 농도(optical density 620 nm에서 흡광도 0.5)로 조절된 균 현탁액을 멸균된 면봉을 이용하여 RC 한천플레이트(agar plate)에 균일하게 도말하였다. 이후, 플레이트를 건조시키고 paper disk(Φ 8mm, Adventec. USA)를 균주를 접종한 플레이트 표면 위에 올려놓고 추출물 시료를 농도별로 흡수시켰다. 시료가 처리된 플레이트를 혐기성 배양조에서 Gaspack system을 이용하여 3 일간 배양한 후 디스크 주위의 생육 억제환(inhibition zone) 크기로 항균 활성을 측정하였다.

[0127] 호기성 균주인 *S. epidermidis*에 대한 항균 활성 평가는 Muller-Hinton 배지를 사용하여 37 °C에서 24 시간 동안 배양하는 것을 제외하고 상기 *P. acnes*와 동일한 방법으로 측정하였다.

[0128] 그 결과, 양성대조군인 테트라사이클린을 1 mg 처리하였을 때 억제환의 지름이 약 12 mm인 것으로 미루어 볼 때, 산수유 추출물은 *P. acnes*와 *S. epidermidis* 모두에 우수한 항균 효과가 있는 것을 알 수 있다. 테트라사이클린과 같은 항생제는 부작용 및 내성균의 출현 등 사용상의 한계점이 있는 반면, 본 발명에 따른 산수유 추출물은 안전하고 부작용이 없어 피부 외용제 조성물로 적합하다.

표 1. 산수유 추출물의 여드름 원인균(*P. acnes*, *S. epidermidis*)에 대한 항균 활성 결과

Concentration	Zone of inhibition (diameter in mm)					
	2.0mg	1mg	0.5mg	0.25mg	0.125mg	0mg
<i>P. acnes</i> (KCTC 3314)	15	12	11	9	-	-
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	14	11	10	9	-	-

[0129]

[0130] **실험예 3. 산수유 추출물의 세포 독성**

[0131] 우태아 혈청(FBS)이 없는 RPMI-1640 배지에서 배양하고 있는 인간 급성 단구성 백혈병세포 THP-1(Human acute monocytic leukemia)을 96 웰 마이크로 플레이트에 5×10^4 cells/well의 농도로 배양하였다. 추출물 시료를 농도별로 투여하여 24 시간 동안 배양한 후 상등액을 제거하고 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 측정방법에 따라 MTT 용액 100 ul를 36 °C에서 4 시간 동안 처리하였다. 배양액을 제거하고 DMSO 50 ul를 처리한 후 흡광도 측정기(ELISA) 540 nm로 측정하여 측정값을 하기 식으로 계산하여 나타내었다.

[0132] 세포 독성(%) = (1-시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도) × 100

[0133] **실험예 4. 산수유 추출물의 항염 활성 - TNF-α 억제**

[0134] 우태아 혈청(FBS)이 없는 RPMI-1640 배지에서 배양하고 있는 인간 급성 단구성 백혈병세포 THP-1(Human acute monocytic leukemia)을 96 웰 마이크로 플레이트에 5×10^4 cells/well의 농도로 배양하였다. 추출물 시료를 농도별로 투여하여 24 시간 동안 배양한 후, FBS를 포함한 배지로 3 번 씻어 추출물 시료를 농도별로 처리하여 2 시간 동안 전 배양하였다. 이후, 지질다당류(Lipopolysaccharide, LPS)를 6 시간 동안 처리하고, 원심분리 후 상등액을 TNF-α ELISA Kit(BD 555212)에 분주하여 흡광도 측정기 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0135] LPS로 유도된 염증반응에서 세포의 염증 지표물질인 사이토카인(Cytokine) 중 대표적인 TNF-α의 억제 정도를 측정하였다. LPS로 유도된 염증반응에서 분비되는 사이토카인 TNF-α의 양을 측정하여 이 값을 100으로 하였을 때 추출물 시료 처리군에서 분비되는 TNF-α의 양을 %로 환산하여 나타내었다. 또한, 추출물이 LPS로 유도된 TNF-α 생성을 감소시킨 것인지, 추출물의 세포 독성으로 인해 cell population 저하를 유발한 것인지 확인하기

위해 추출물 시료의 세포 독성과 비교하였다.

[0136] 그 결과, 각 추출물을 100 ug/ml의 농도로 세포에 처리하였을 때 세포의 생존율이 95 % 이상인 것으로 보아 산수유 추출물이 세포의 생존에는 영향을 미치지 않으면서 TNF- α 를 억제하여 항염 효과를 발휘하는 것을 알 수 있었다(도 3).

[0137] **실험예 5. 산수유 추출물의 항염 활성 - NO(nitric oxide) 억제**

[0138] RAW 264.7 세포주를 사용하여 10 %(v/v) FBS, 100 units/ml 페니실린, 100 ug/ml 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM에 5×10^4 cells/well의 밀도로 96 웰 플레이트에 200 μ l씩 분주하여 6 시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이후, LPS를 첨가한 추출물 시료를 각기 첨가량을 달리하여 첨가한 다음 16 시간 동안 배양하였다.

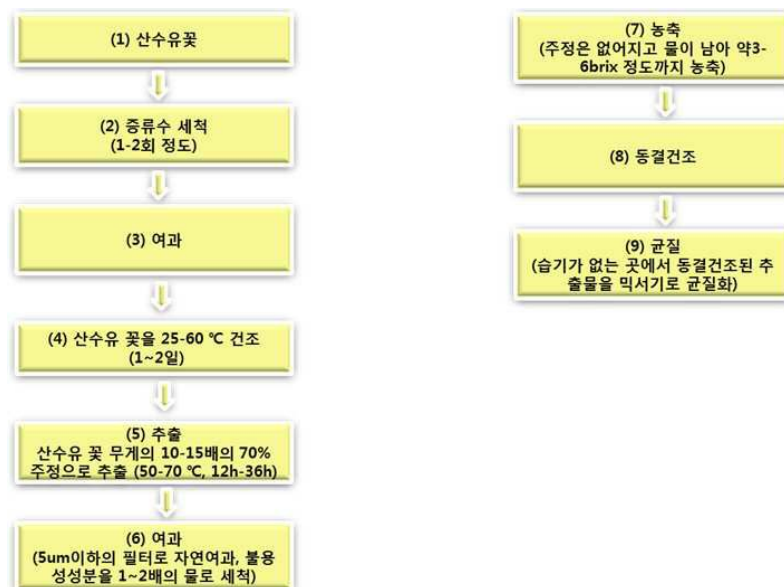
[0139] NO 분석을 위해 세포배양시 생성된 nitrate의 양을 측정하였다. 세포배양 상등액 150 μ l를 취하여 원심분리한 후 상층액 100 μ l와 Griess 시약 100 μ l를 5 분간 반응시킨 다음, ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 표준품 NaNO₂를 기준으로 최종적으로 생산된 NO의 상대적인 양을 비교하여 처리별 NO 억제 활성을 구하고 항염증 활성의 지표로 삼았다. 염증반응이 유도되면 NO 생성이 유도되는데 이를 nitrite에 대한 nitrate로 환원된 후의 안정된 형태를 greiss reagent로 측정한 것이다. LPS만 첨가한 군에서 생성된 NO의 양을 100 %로 하여 시료가 첨가된 것을 %로 환산하여 평가하였다.

[0140] 그 결과, LPS는 염증반응을 유도한 대조군이므로 NO 억제 효과가 없고, LPS를 처리하지 않은 normal cell은 염증반응이 유도되지 않았으므로 NO 억제 효과가 100 %에 가까웠다. 각각의 추출물 시료의 NO 억제 효과는 50ug-200ug으로 농도가 높아질수록 높아짐을 알 수 있었다. MeOH 추출물 200 ug/ml 처리시 NO 억제 효과가 약 32 %인 것으로 나타났다(도 4).

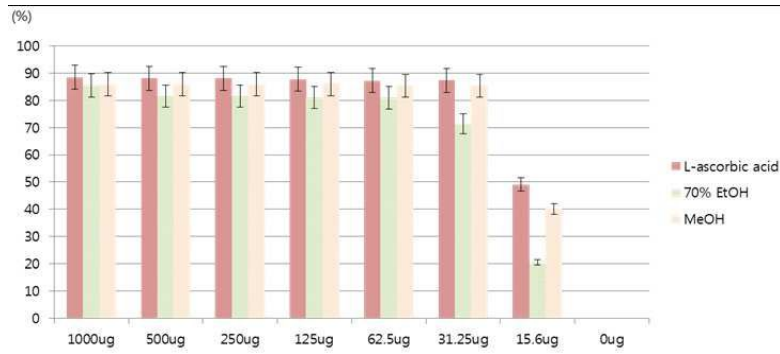
[0141] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

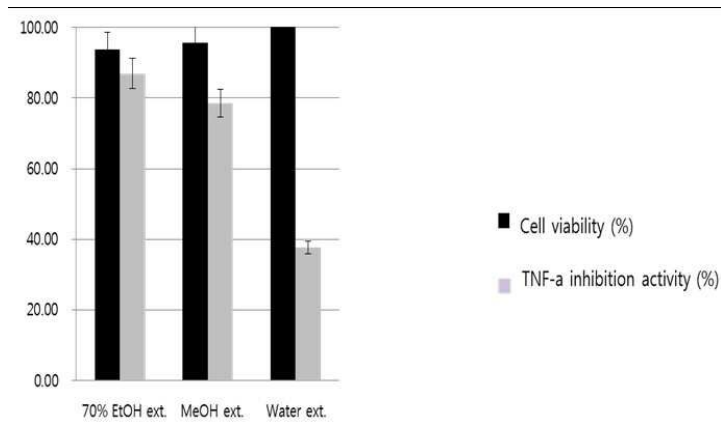
도면1



도면2



도면3



도면4

