



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0039887
(43) 공개일자 2023년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/282 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 36/78 (2006.01) A61K 8/9789 (2017.01)
A61P 11/00 (2006.01) A61P 29/00 (2023.01)
A61Q 17/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/282 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0122657

(22) 출원일자 2021년09월14일

심사청구일자 2021년09월14일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

허호진

경상남도 진주시 초장로 120, 504동 501호(초전동, 이지더원 아파트)

강진용

경상남도 진주시 술밭로92번길 5, 나동 505호(상평동, 축석맨션)

(74) 대리인

위병갑

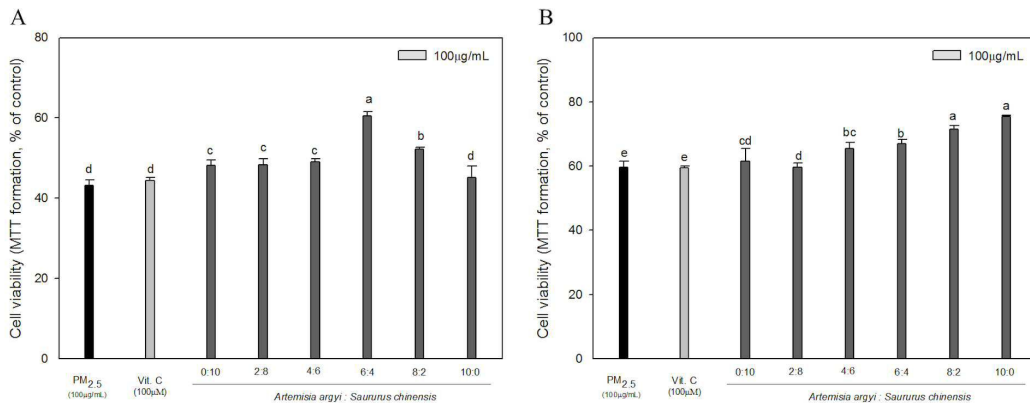
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 쑥 및 삼백초 혼합 추출물을 포함하는 미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 쑥 및 삼백초 혼합 추출물을 포함하는 미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 쑥 및 삼백초 혼합추출물은 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환에 대해 예방, 개선 및 치료 효과가 뛰어나므로 초미세먼지로 인한 호흡기 질환에 대한 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 초미세먼지로 인한 호흡기 질환에 대한 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 또는 초미세먼지로 인한 피부 염증 예방 또는 개선용 화장품 조성물로 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 36/78 (2013.01)
A61K 8/9789 (2017.08)
A61P 11/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A61Q 17/00 (2021.05)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/314 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345313660
과제번호	2018R1D1A3B0704339814
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업
연구과제명	(초)미세먼지 유도성 염증 발생과 뇌신경세포 기능저하와의 연계기전 및 개선 기작

연구

기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상국립대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2023.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

썩 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 혼합추출물은 썩 또는 삼백초를 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 제조되는 것을 특징으로 하는, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 혼합추출물은 썩 및 삼백초가 6:4의 중량비로 혼합된 것을 특징으로 하는, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 호흡기 질환은 폐렴, 천식, 만성 기관지염, 진폐증, 결핵, 폐기종, 만성 폐쇄성 폐 질환, 낭포성 섬유증, 기침, 가래, 인후염, 편도염, 부비동염, 비염, 폐쇄성 세기관지염 및 후두염로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것인, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 혼합추출물은 말론디알데하이드(malondialdehyde)를 억제하고, 슈퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase) 및 환원형 글루타티온(reduced glutathione)을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 혼합추출물은 초미세먼지로 인한 미토콘드리아 기능 장애를 개선하는 것을 특징으로 하는, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 혼합추출물은 초미세먼지로 인한 p-JNK, p-I κ B- α , p-NF- κ B, TNF- α , IL-1 β 및 COX-2의 증가를 억제하는 것을 특징으로 하는, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

쑥 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

쑥 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

청구항 10

쑥 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지에 의한 피부 염증 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 쑥 및 삼백초 혼합 추출물을 포함하는 미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대기 오염은 호흡기 질환, 심혈관 대사 이상, 인지장애 및 유아 발달장애 같은 비전염성질환과 연관성이 높다. 과학 기술의 발전으로 산업이 고도화되면서 삶이 양적으로 팽창하고 편리해졌으나 산업화에 동반된 환경 오염 때문에 인류는 재앙 수준의 건강 위협에 처하면서 역설적으로 삶의 질은 점차 악화하여가고 있다. 2018년 발표된 세계보건기구(World Health Organization, WHO) 자료에 의하면 2016년 기준으로 세계 인구 91% 이상이 WHO 공기 질 권장 기준(WHO air quality guidelines level)에 미치지 못하는 지역에 살고 있으며 대기 오염에 의한 조기 사망이 연간 420만 명에 이른다. 대기 오염 노출은 운동 부족, 고염식, 고지질혈증, 약물 오남용과 같이 일반적으로 알려진 조절 가능 질병 위험인자보다 질병 발생 위험도가 더 높은 것으로 보고되고 있다.

[0003] 미세먼지(particulate matter, PM)는 단일 물질이 아니라 대기 중에 떠 있는 유기질과 무기질 성분의 미세한 고체와 액체 입자로 이루어진 복합 혼합물이다. 입자의 크기가 작을수록 건강에 유해하다는 사실이 밝혀짐에 따라 미세먼지를 PM₁₀(입자 지름이 10 μ m보다 작은 경우)과 PM_{2.5}(입자 지름이 2.5 μ m보다 작은 경우)로 세분화하여 미세먼지와 초미세먼지로 지칭한다.

[0004] 오늘날 미세먼지는 건강에 대한 위해성으로 많은 주목을 받고 있다. 5~10 μ g/m³ 이하의 먼지는 비점막을 통해 체내에 흡수가 가능하며 2~5 μ g/m³ 이하의 먼지는 기도를 통과하고 0.1~1 μ g/m³으로 매우 작은 크기의 먼지는 폐포 손상까지 유발이 가능하다. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에 의하면 PM₁₀에 장기 노출될 경우 호흡기계 건강과 사망률이 증가하는데, PM_{2.5}는 더 강한 위험 인자로 작용한다. 대기 중 PM₁₀이 10 μ g/m³ 증가할 때마다 연간 사망률은 0.2~0.6% 증가하며, PM_{2.5}에 대한 장기 노출의 평균치가 10 μ g/m³ 증가하면 심혈관계 질환으로 인한 사망률이 6~13% 가량 증가한다. 2013년 10월에는 세계보건기구 산하의 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서 미세먼지를 발암물질 1군으로 분류하였다.

[0005] 지름 5~10 μ g/m³이하의 먼지는 코 점막을 통해 체내에 흡수가 가능하며 2~5 μ g/m³이하의 기도(호흡기)를 통과하고, 0.1~1 μ g/m³는 폐포 손상까지 유발하게 된다. 미세먼지가 인체에 흡입되었을 경우, 충돌·중력침강·확

산·정전기적 흡착 등과 같은 다양한 기전에 의해서 조직에 침착될 수 있으며, 일부는 혈액을 따라서 전신을 순환하기도 한다. 또한, 미세먼지와 중추신경계에 대한 연구들은 주로 뇌혈관 질환에 대한 것이다. 미세먼지가 심혈관계 질환을 일으키는 데 기여하는 혈관염증성 기전이 뇌혈관에서도 유사하게 일어나며 이에 따라 뇌혈관 질환의 발생 위험이 높아지며, 최근 연구에서는 미세먼지가 미세아교세포를 활성화하여 pro-inflammatory stimuli에 대한 반응을 증폭함으로써 뇌세포 손상을 일으켜 알츠하이머, 치매 등의 뇌신경질환을 유발하는 것으로 밝혀졌다.

[0006] 한편, 쑥은 전통적으로 우리나라 사람들과 친숙한 식품인 동시에 약용으로 사용되었던 오래된 역사를 가지고 있다. 민간요법에서는 쑥의 따뜻한 성질을 이용하여, 진정제, 경련, 마비, 전신강직 등의 치료에 사용하기도 하였고, 한방에서는 부인병, 만성간염, 만성위장병, 구충, 악취제거, 산후복통, 천식, 한습, 이담, 복통, 토혈, 황달, 식욕부진, 지혈 등의 치료를 위해 쑥을 사용하였다고 한다(허준, 2005; 정보섭, 1990; 전통의학연구소, 1994; 유태종, 1999). 최근 보고에 따르면, 쑥에는 총 페놀과 플라보노이드 등 항산화 성분이 풍부하여 산화적 손상 억제(Lee 등, 2011; Lee 등, 1992; Hong 등, 2007), 항암 효과(Jung 등, 2008; Kim 등, 2012; Kim 등 2005), 항케양 및 소염작용(Jang, 1993; Kwon 등, 2011; Min 등, 2009), 항당뇨(Kang 등 2008; Al-Mustafa와 Al-Thunib, 2008; Kang, 2008), 항균활성(Lee 등, 1999; Lee와 Seo, 2003), 면역증강(Lee, 2013)에 큰 효과가 있다고 하며, 또한 혈압 및 심혈관계 등의 순환기계 질환에도 효능이 있다고 알려져 있다.

[0007] 한편, 삼백초(lizard's tail)는 삼백초과(Saururaceae) 삼백초속(Saururus)에 속하는 다년생 초본으로, 학명은 *Saururus cernuus*이다. 한국 및 중국에서 전통적으로 약용식물로 사용되어온 약초로서, 중약대사전에는 삼백초가 청리습열, 소종해독 작용이 있어, 수종, 각기, 황달, 임탁, 대하, 옹종, 정독에 효과가 있음이 기재되어 있으며, 염증, 각기병, 고혈압, 폐렴, 부종, 황달, 임균감염증 등에 대한 효과에 관한 연구가 보고되어 있다(Oh, K.S. et al, Planta Med. 74:233-238, 2008; 대한민국 등록특허 제 0739398호; 국제특허 WO 2008/082268 A1; 대한민국 공개특허 2006-0018290호).

[0008] 본 발명자들은 쑥 및 삼백초 혼합 추출물이 산화적 스트레스를 감소시키며, 초미세먼지 독성으로 인한 미토콘드리아 기능 장애를 개선하고, 염증 반응을 억제하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 마지막으로, 본 발명의 다른 목적은 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 피부 염증 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 이어서, 본 발명은 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0016] 나아가, 본 발명은 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0017] 아울러, 본 발명은 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 피부 염증 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명의 쑥 및 삼백초 혼합추출물은 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환에 대해 예방, 개선 및 치료 효과가 뛰어나므로 초미세먼지로 인한 호흡기 질환에 대한 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 초미세먼지로 인한 호흡기 질환에 대한 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 또는 초미세먼지로 인한 피부 염증 예방 또는 개선용 화장품 조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 쑥 또는 삼백초 단일추출물의 세포 독성 평가 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 2는 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 세포 독성 평가 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 3은 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 LC/MS-MS 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 4는 폐 조직 및 후각망을 조직에서 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 염증 관련 단백질 발현 조절 분석 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0021] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0022] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 ‘%’는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.
- [0024] 본 발명은 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 용어 “쑥(mugwort)”은 쑥은 국화과에 속하는 번식력이 왕성한 다년생 초본 식물로 약 2,000여종이 있고, 우리나라 자생종도 300여종이나 알려져 있으며, 오래 전부터 한방에서 코피, 자궁출혈 치료 약으로 쓰였으며 소화, 하복부 진통, 구충, 이취제거 등의 효과를 가지고 있다. 또한, 정유 성분인 시네올, 비타민, 무기질 등이 풍부하여 폐 질환, 천식, 피로 회복 등에 효능이 있는 것으로 보고되고 있다.
- [0026] 또한, 상기 쑥은 쑥(*Artemisia princeps*), 개똥쑥(*Artemisia annua*), 인진쑥(*Artemisia capillaris*), 참쑥(*Artemisia dubia*), 황해쑥(*Artemisia argyi*) 등을 포함하며, 바람직하게는 황해쑥(*Artemisia argyi*)일 수 있으나, 쑥속(*Artemisia*)에 속하는 식물이라면 제한되지 않고 모두 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어 “삼백초(lizard's tail)”는 한방에서 한약재로 사용되어온, 후추목 삼백초과의 *Saururus chinensis*를 의미한다. 상기 삼백초는 맛은 쓰고 맵고, 꽃과 뿌리가 백색이며 꽃이 필 무렵에 윗부분의 잎 2 ~ 3개가 백색으로 변하며, 열매가 9 ~ 10월경에 꽃망울에 한 개씩 둥글게 달린다고 알려져 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 “추출물”은 적절한 용매를 이용하여 쑥(*Artemisia argyi*) 및 삼백초(*Saururus chinensis*)로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 상기 쑥(*Artemisia argyi*) 및 삼백초(*Saururus chinensis*)으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 식품학/약학/화장품학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(Methanol), 에탄올

(Ethanol), 프로판올(Propanol), 이소프로판올(Isopropanol), 부탄올(Butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알콜, 아세톤(Acetone), 에테르(Ether), 벤젠(Benzene), 클로로포름(Chloroform), 에틸아세테이트(Ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(Methylene chloride), 헥산(Hexane) 및 시클로헥산(Cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다.

[0029] 본 발명의 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(Thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(High performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다. 따라서, 본 발명에 있어서 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[0030] 또한, 상기 혼합추출물은 썩 및 삼백초가 6:4의 중량비로 혼합된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 또한, 상기 호흡기 질환은 염증성 호흡기 질환으로 폐렴, 천식, 만성 기관지염, 진폐증, 결핵, 폐기종, 만성 폐쇄성 폐 질환, 낭포성 섬유증, 기침, 가래, 인후염, 편도염, 부비동염, 비염, 폐쇄성 세기관지염 및 후두염로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 또한, 상기 썩 및 삼백초 혼합추출물은 말론디알데하이드(malondialdehyde)를 억제하고, 슈퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase) 및 환원형 글루타티온(reduced glutathione)을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 또한, 상기 썩 및 삼백초 혼합추출물은 초미세먼지로 인한 미토콘드리아 기능 장애를 개선하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 또한, 상기 썩 및 삼백초 혼합추출물은 초미세먼지로 인한 p-JNK, p-I κ B- α , p-NF- κ B, TNF- α , IL-1 β 및 COX-2의 증가를 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명에서, 사용된 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환의 발생, 발달 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0036] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 및 이로 인한 합병증의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0037] 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양의 썩 및 삼백초 혼합추출물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 면역질환의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.

[0038] 또한, 본 발명의 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 투여 형태는 경구, 점막(예를 들어, 비강, 설하, 질, 버칼, 또는 직장), 비경구적(예를 들어, 피하, 정맥, 볼루스 주입, 근육내 또는 동맥내), 국소(예를 들어, 눈), 경피(transdermal) 또는 피부통과(transcutaneous) 방식 일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 투여 형태의 예는 정제; 캡릿(caplets); 부드러운 탄성 젤라틴 캡셀과 같은 캡셀제; 캐세트(cachets); 트로키; 로젠즈(lozenges); 분산제; 좌제; 파우더; 에어로솔(예를 들어, 비강 스프레이 또는 인홀러); 젤; 현탁제제(예를 들어, 수상 또는 비-수상 액상 현탁제제, 수중유형 유제, 또는 유중수형 액상 유제) 용액제 및 엘릭실제를 포함하는 환자에게 경구 또는 점막 투여하기에 알맞은 액상 투여 제형; 환자에게 주사 투여하기에 알맞은 액상 투여 제형; 국소 투여하기에 적당한 아이 드랍(eye drop) 또는 다른 안과 제제; 및 환자에게 주사 투여하기에 적당한 액상 투여 형태를 제공하기 위하여 재구성될 수 있는 멸균 고상제제(예를 들어, 결정형 또는 무정형 고체)를 포함하나 이에 한정되는 것은 아

니다. 본 발명의 투여 형태의 종류, 모양, 및 타입은 일반적으로 그들의 사용에 따라 매우 다양하다. 예를 들어, 질환의 급성 치료를 위해 사용된 투여 형태는 동일한 질환의 만성 치료를 위해 사용되는 투여 형태보다 많은 양의 활성 성분을 포함할 수 있다. 또한, 비경구적 투여 형태는 동일 질환을 치료하기 위해 사용된 경구 투여 형태보다 더 적은 양의 활성 성분을 포함할 수 있다. 본 발명에 의해 포함되는 투여 형태 및 방식들은 매우 다양하며, 이는 본 발명이 속한 분야에 있어 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing, Easton PA (1990) 참조.)

- [0039] 또한, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 생리식염수, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜 및 리퀴드 파라핀으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용 가능하다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 쑥 및 삼백초 혼합추출물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥내, 피하, 복강내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- [0041] 또한, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0042] 또한, 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 필요에 따라서 물 혹은 그 이외의 약학적으로 허용할 수 있는 액과의 무균성 용액, 또는 현탁액제의 주사제의 형태로 비경구적으로 사용할 수 있다. 예를 들면, 약리학상 허용되는 담체 혹은 매체, 구체적으로는, 멸균수나 생리 식염수, 식물유, 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정제, 부형제, 비히클(vehicle), 방부제, 결합제 등과 적당히 조합하여, 일반적으로 인정된 제약 실시예 요구되는 단위 용량 형태로 혼화하는 것에 의해 제제화하는 것을 생각된다. 상기 제제에 있어서 유효 성분량은 지시받은 범위의 적당한 용량을 얻을 수 있도록 하는 것이다.
- [0044] 또한, 주사를 위한 무균 조성물은 주사용 증류수와 같은 부형액을 이용해 통상의 제제 실시예에 따라 처방할 수가 있다.
- [0045] 또한, 주사용의 수용액으로서, 예를 들면 생리 식염수, 포도당이나 그 외의 보조약을 포함한 등장용액, 예를 들면 D-소르비톨, D-만노스, D-만니톨, 염화 나트륨을 들 수 있어 적당한 용해 보조제, 예를 들면 알코올, 구체적으로는 에탄올, 폴리 알코올, 예를 들면 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 비이온성 계면활성제, 예를 들면 폴리소르베이트 80(TM), HCO-50으로 병용할 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 유성액으로서, 참기름, 콩기름을 들 수 있어 용해 보조제로서 안식향산벤질, 벤질 알코올과 병용할 수 있다. 또한, 완충제, 예를 들면 인산염 완충액, 초산나트륨 완충액, 무통화제, 예를 들면, 염산 프로 카인, 안정제, 예를 들면 벤질 알코올, 페놀, 산화 방지제와 배합할 수 있다. 조제된 주사액은 통상, 적당한 앰플에 충전시킨다.
- [0047] 또한, 본 발명의 약학적 조성물의 환자의 체내에의 투여는 바람직하게는 비경구투여이며, 구체적으로는 척수강내 1회 내지 3회의 투여가 기본이지만 그 이상의 투여라도 좋다. 또, 투여 시간은 단시간이라도 장시간 지속 투여라도 좋다. 더욱 구체적으로는, 주사제형, 경피투여형등을 들 수 있다. 주사제형의 예로서는 예를 들면, 척수

강내 주사, 정맥내 주사, 동맥내 주사, 선택적 동맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 피하주사, 뇌실내 주사, 뇌내 주사, 골수액강내 주사 등에 의해 투여할 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명의 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 인체에 대한 효과적인 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있다.

[0050] 본 발명의 약학적 조성물은 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환의 예방 또는 치료 효과를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0052] 이어서, 본 발명은 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물을 제공한다.

[0053] 본 발명의 건강기능식품 또는 건강식품 조성물은 상술한 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 쑥 및 삼백초 혼합추출물과 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[0054] 본 발명의 식품 조성물은 정제, 환제, 과립제, 캡슐제, 액상제제, 음료 등 다양한 형태로 제제화되어 식품에 첨가할 수 있다. 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품 및 건강기능성식품을 모두 포함한다.

[0055] 본 발명에 따른 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 함유하는 건강식품 및 건강기능성식품 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 및 건강기능성식품 중의 상기 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 유지를 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명의 건강식품 및 건강기능성식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능성 식품 조성물 100 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0057] 상기 외에 본 발명의 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 함유하는 건강식품 및 건강기능성식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강식품 및 건강기능성 식품 조성물은 천연 과일주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0058] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 함유하는 건강식품 및 건강기능성식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

- [0060] 아울러, 본 발명은 썩 및 삼백초 혼합추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 피부 염증 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0061] 본 발명의 화장료 조성물은 상술한 썩 및 삼백초 혼합추출물을 포함하기 때문에, 상술한 본 발명의 썩 및 삼백초 혼합추출물과 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0062] 본 발명의 “화장료 조성물”은 상술한 본 발명의 썩 및 삼백초에서 추출한 추출물의 화장품학적 유효량(Cosmetically effective amount) 및 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함하여 제조할 수 있다.
- [0063] 본 명세서에서 “화장품학적 유효량”은 상술한 본 발명의 조성물의 표피 각질형성세포의 증식을 통한 피부 재생 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0064] 화장료 조성물의 외형은 화장품학 또는 피부과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유한다. 이는 국소적용에 적합한 모든 제형으로, 예를 들면, 용액, 겔, 고체, 반죽, 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는, 이온형(리포솜) 및 비이온형의 소낭 분산제의 형태로, 또는 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 또한 포말(Foam)의 형태로 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 사용될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 화장료 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며, 예를 들면, 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일 및 바디에센스 등의 화장품으로 제형화될 수 있다.
- [0066] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0067] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0069] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알콜 설페이트, 지방족 알콜 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알콜, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 화장료 조성물은 스킨, 로션, 크림, 에센스, 팩, 파운데이션, 색조화장품, 선크림, 투웨이케이크, 페이스파우더, 콤팩트, 메이크업베이스, 스킨커버, 아이셰도우, 립스틱, 립글로스, 립픽스, 아이브로우 펜슬, 화장수 등의 화장품 및 샴푸, 비누 등의 세정제에 적용될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 일 실시예에 따른 화장료 조성물에는 상기 썩 및 삼백초에서 추출한 추출물 이외에 기능성 첨가물 및 일반적인 화장료 조성물에 포함되는 성분이 추가로 포함될 수 있다. 상기 기능성 첨가물로는 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스펅고 지질 및 해초 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 성분을 포함할 수 있다.

- [0073] 본 발명의 화장료 조성물에는 또한, 상기 기능성 첨가물과 더불어 필요에 따라 일반적인 화장료 조성물에 포함되는 성분을 배합해도 된다. 이외에 포함되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다.
- [0075] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험에는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0077] **<제조예 1> 쑥 추출물의 제조**
- [0078] 본 실험에 사용된 쑥 추출물은 2 g의 동결건조된 쑥을 40℃의 증류수에서 2시간 동안 환류냉각 추출하였으며, 이를 동결건조하여 실험에 사용하였다.
- [0080] **<제조예 2> 삼백초 추출물의 제조**
- [0081] 본 실험에 사용된 삼백초 추출물은 2 g의 동결건조된 삼백초를 40℃의 증류수에서 2시간 동안 환류냉각 추출하였으며, 이를 동결건조하여 실험에 사용하였다.
- [0083] **<실시예 1> 재료 및 방법**
- [0084] **1-1. 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 제조**
- [0085] 본 실험에 사용된 혼합 추출물은 상기 제조예 1의 방법으로 제조된 쑥 추출물과 제조예 2의 방법으로 제조된 삼백초 추출물을 2:8, 4:6, 6:4, 8:2의 중량비로 혼합하여 제조하였다.
- [0087] **1-2. 세포 배양**
- [0088] 본 실험에 사용된 비강세포(RPMI2650)는 한국세포주은행(Seoul, Korea)로부터 구입하여, 10% fetal bovine serum(FBS) 및 1% 페니실린(50 units/mL)/스트렙토마이신(100 µg/mL)이 포함된 Roswell Park Memorial Institute(RPMI1640) 배지를 사용하여 배양하였다. 폐세포(A549)는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양을 받아 10% bovine calf serum(CS) 및 1% 페니실린(50 units/mL)/스트렙토마이신(100 µg/mL)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium을 배양액으로 사용하여 37° C에서 5% CO₂ 조건 하에 배양하였다.
- [0090] **1-3. 세포 생존율 측정**
- [0091] 세포 생존율 측정은 시료와 초미세먼지를 전처리한 세포에 MTT stock solution(10 mg/mL)을 처리하여 2시간 동안 반응시켰다. 생성된 formazan crystal은 배지를 모두 제거하고 dimethyl sulfoxide를 첨가하여 20분간 상온에서 녹여낸 후 microplate reader(EPOCH 2, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 570 nm(determination wave) 및 650 nm(reference wave)에서 흡광도를 측정하였다.
- [0093] **1-4. 세포 내 ROS 생성 함량 측정**
- [0094] 세포 내 ROS 생성 억제 효과는 96-well plate에 1×10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 24시간 후 0.5% FBS 또는 CS가 포함된 배지로 교환하여 시료를 처리하고 30분 후 초미세먼지(PM_{2.5})를 최종농도가

100 $\mu\text{g/mL}$ 되도록 전처리하여 24시간 동안 배양시켰다. 그 후 50 μM dichlorofluorescein diacetate를 처리하여 40분간 반응시켜 형광광도계(Infinite F200, Tecan, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 485 nm(excitation wave) 및 535 nm (emission wave)에서 형광강도를 측정하였다.

[0096] 1-5. 동물모델의 준비

[0097] 본 실험에 사용된 동물은 6주령의 수컷 BALB/c 마우스로 Samtako(Osan, Korea)로부터 구입하였으며, 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 5\%$ 를 유지하며 충분한 물과 사료를 지급하는 일정한 사육환경을 유지하였다. 모든 실험은 경상대학교 동물실험 윤리위원회(IACUC 승인번호: GNU-190530-M0028)의 승인 하에 수행하였다. 실험동물은 반입 1주일 동안의 적응 기간을 거친 후 정상대조군(Control), 초미세먼지군(PM2.5) 및 샘플식이군으로 나누어 15주 동안 사육하였다. 초미세먼지군과 샘플식이군은 whole body exposure 챔버 내에서 미세먼지에 노출시켰으며, 정상대조군은 여과된 공기를 주입시켰다. 샘플군은 음용수에 추출물을 녹인 후 노출 전 50 및 100 mg/kg of body weight 농도로 경구 투여하였다.

[0099] 1-6. 마우스 조직 중의 Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

[0100] Phosphate buffered saline (PBS)으로 조직을 균질화한 균질액을 원심분리($400 \times g$, 5분, 4°C)한 후 상층액을 제거하고 펠렛을 취하였다. 펠렛에 1 $\times$ cel extraction buffer [10 $\times$ SOD buffer 0.5 mL, 20% triton X-100 0.1 mL, distilled water 4.4mL, phenylmethanesulfonyl fluoride in ethanol 5 μL]를 넣고, ice에서 30분 동안 추출하였다. 추출물은 원심분리($10,000 \times g$, 10분, 4°C)되어 상층액의 SOD 함량을 SOD assay kit (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 사용하여 측정하였다.

[0102] 1-7. 마우스 조직 중의 환원형 글루타티온(reduced glutathione, reduced GSH) 활성 측정

[0103] 환원형 GSH 함량 측정은 적출한 폐 조직에 10배 부피의 PBS를 넣고 균질화한 후, 원심분리($10,000 \times g$, 15분, 4°C)하여 얻어진 상층액을 실험에 사용하였다. 상층액에 동일한 양의 30% 메타인산을 넣어 간접 효과를 주는 단백질을 2,000 $\times g$ 에서 원심 분리하여 제거하였고 다시 한번 상층액을 얻어 0.2M 트리스 염산 완충용액(pH 7.8)과 0.65 N 수산화나트륨, 1mg/mL 농도의 OPT(in methanol)을 넣고 15분 동안 상온에서 빛을 차단하여 반응시킨 뒤, 형광광도계를 사용하여 excitation wave 320 nm 및 emission wave 420 nm에서 1분 간격으로 형광을 측정하였다.

[0105] 1-8. 조직 내 지질과산화물 함량 측정

[0106] 조직 내 지질과산화물(malondialdehyde, MDA) 측정을 위하여 실험동물을 희생시켜 폐 조직을 분리하였다. 분리된 폐 조직에 phosphate-buffered saline을 넣고 bullet blender(Next Advance Inc., Averill Park, NY, USA)를 사용하여 균질화하였고, 원심분리($10,000 \times g$, 10분, 4°C) 하여 상층액을 실험에 이용하였다. 상층액에는 1% phosphoric acid와 0.67% thiobarbituric acid(TBA)를 혼합하여 water bath(95°C)에서 1시간 동안 반응시켰고, 생성된 MDA-TBA 복합체는 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 함량은 표준곡선에 대입하여 mg protein에 대한 함량으로 표시하였다.

[0108] 1-9. 혈청 내 바이오마커 분석

[0109] 행동 시험 종료 후, 혈청 내 바이오 바이오마커 분석을 위하여 실험동물의 복대 정맥에서 채혈한 혈액은 원심분리($10,000 \times g$, 10분, 4°C)하여 혈청을 분리하였다. 혈청 내 lactate dehydrogenase(LDH)은 혈청분석기(Fuji dri-chem 4000i, Fuji film Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다. 혈청의 FRAP 활성은 혈청을 FRAP reagent [0.3 M sodium acetate buffer(pH 3) + 10 mM 2,4,6-tripyridyl-S-triazine(TPTZ) solution dissolved in 40 mM HCl + 20 mM FeCl₃ solution]와 혼합한 뒤, 30분 동안 암실에서 반응시키고, 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0111] **1-10. 미토콘드리아 분리 및 활성 측정**

[0112] 조직의 미토콘드리아를 분리하기 위하여 1mM ethylene glycol tetraacetic acid(EGTA)가 포함된 isolation buffer [215 mM manitol, 75 mM sucrose, 0.1% BSA, 20mM HEPES(Na⁺), pH7.2]를 첨가하여 균질화한다. 균질화된 폐 조직은 원심분리(1,300×g, 5분, 4° C)하였다. Pellet이 1mM EGTA와 0.1% digitonin이 포함된 isolation buffer를 첨가하여 5분 동안 얼음 위에서 반응시키고, 원심분리(13,000 × g, 10분, 4° C)하여 최종 pellet을 폐 조직의 미토콘드리아로 활용하여 실험하였다.

[0113] 미토콘드리아에서의 ROS 함량 측정은 분리한 미토콘드리아 추출물을 KCI-based respiration buffer(125mM 염화칼륨, 2mM 인산칼륨, 20mM HEPES, 1mM 염화마그네슘, 500 μM EGTA, 2.5mM malate 및 5mM pyruvate)와 25 μM DCF-DA를 20분간 반응시킨 후, 형광광도계를 이용하여 485nm(excitation wave) 및 535nm(emission wave)에서 측정하였다.

[0114] 미토콘드리아 막 전위(MMP) 측정은 분리된 미토콘드리아에 assay 용액[5 mM pyruvate, 5mM malate in isolation buffer]과 1 μM JC-1 dye를 black 96-well에서 혼합하여, 암실에서 20분간 반응시킨다. 반응 후, 형광광도계를 이용하여 530nm(excitation wave) 및 590nm(emission wave)에서 형광강도를 측정하였다.

[0115] 미토콘드리아 내 ATP 함량은 분리된 미토콘드리아에 1% TCA용액을 첨가하여 얼음 위에서 방치한 후, 25mM sodium acetate buffer(pH 7.4)를 첨가한다. 상층액은 ATP level은 ATP assay kit(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 luminometer에서 측정하였다.

[0117] **1-11. 단백질 발현량 측정**

[0118] 조직을 1% protease inhibitor cocktail(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)이 포함된 RIPA 용액 (ProtinExTM Animal cell/tissue, GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)을 사용하여 균질화하였다. 균질화된 조직은 원심분리(13,000 × g, 15분, 4° C) 하여 상층액을 실험에 사용하였다. Loading buffer(5×)와 혼합된 상층액은 95° C에서 7분간 반응시켜 전처리하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에서 단백질을 분리하였다. 이후 poly-vinylidene difluoride(PVDF) 멤브레인 (Millipore, Billerica, MA, USA)에 이동시켰다. 단백질이 이동된 PVDF 멤브레인은 5% skim milk(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액으로 blocking 하여 희석된 1차 항체(1:1,000)와 10시간 동안 4° C에서 반응시켰다. 반응된 멤브레인은 0.1% Tween 20이 포함된 tris-buffered saline 용액에서 3회 세척하여 상온에서 2차 항체와 반응시켰다. 멤브레인은 chemiluminescence(Bionote, Hwaseong, Korea)를 이용하여 band를 발현시켰고, iBrightTM CL1000 Imaging System(Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)을 이용하여 측정하였다.

[0120] **1-12. 통계처리**

[0121] 모든 실험은 평균±표준편차로 나타냈으며, 각 평균값에 대한 유의성 검증은 SAS Software 9.4(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 실시하고, Duncan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)으로 각 시료 간의 유의차를 5% 수준(p < 0.05)에서 검증하였다.

[0123] **<실시예 2> 실험결과**

[0124] **2-1. 썩 또는 삼백초 단일추출물의 세포 생존율 측정 결과**

[0125] 미세먼지로 인한 독성으로부터 RPMI2650세포(비강), A549세포(폐)에 대한 썩 추출물과 삼백초 추출물의 세포 보호효과를 확인한 결과는 도 1에 나타내었다.

[0126] 실험 결과, 저농도에서 비교하였을 때 썩 추출물의 보호효과가 삼백초 추출물보다 상대적으로 우수한 것으로 확인되었다. 하지만, 썩 추출물의 경우 고농도의 RPMI2650세포에서 세포독성이 있는 것으로 확인되었다(도 1A). 그에 반해, 삼백초 추출물의 세포 보호효과는 썩 추출물에 비해 상대적으로 우수하지 않았지만 고농도에서 세포 독성이 없었고 농도 의존적으로 초미세먼지로 인한 세포독성으로부터 세포 생존율을 증가시키는 것이 확인되었다(도 1C, D).

[0128] **2-2. 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 세포 보호 효과**

[0129] 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 최적 혼합비를 확립하기 위하여, 다양한 비율로 혼합하여 세포 생존율을 측정하였다. 쑥:삼백초가 각각 0:10(단일추출물), 2:8, 4:6, 6:4, 8:2, 10:0(단일추출물)의 중량비로 혼합된 혼합추출물을 동일한 농도(100 µg/mL)로 세포 독성 실험을 수행하였으며, 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0130] 실험 결과, RPMI2650 세포에서 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 경우, 단일 추출물(0:10, 10:0)과 비교하여 세포 생존율이 증가하는 것을 확인하였으며(도 2A), A549 세포의 경우 쑥의 비율이 높을수록 미세먼지로 인한 세포보호 효과가 높은 것으로 확인되었다(도 2B). 특히, 비강세포에서 쑥 및 삼백초를 6:4의 중량비로 혼합한 혼합추출물은 다른 혼합비율(2:8, 4:6, 8:2)의 혼합추출물과 비교해서도 세포 보호 효과가 현저히 우수한 것으로 확인되었다.

[0132] **2-3. 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 LC/MS-MS 분석**

[0133] 상기 실시예 2-2를 통해 미세먼지 독성으로 인한 세포 보호효과가 공통적으로 상대적으로 우수하게 확인된 쑥 및 삼백초가 6:4의 중량비로 혼합된 혼합추출물(AASC)의 물질 분석을 수행하였으며, 그 결과는 다음과 도 3에 나타내었다.

[0134] UPLC/Q-TOF-MS/MS 분석결과, Quinic acid (RT: 0.77, m/z: 192.05), Chlorogenic acid (RT: 2.83, m/z: 354.08), Isoschaftoside (RT: 2.97, m/z: 564.14), Rutin (RT: 3.12, m/z: 478.07), Quercetin-3-Glucuronide (RT: 3.21, m/z: 478.07), 3,4-dicaffeoyl quinic acid (RT: 3.29, m/z: 516.12), 3,5-Dicaffeoyl quinic acid (RT: 3.35, m/z: 516.12), and 4,5-Dicaffeoyl quinic acid (RT: 3.40, m/z: 516.12)을 동정하였으며, 가장 풍부한 물질로는 dicaffeoyl quinic acid의 이성질체들로 확인되었다.

[0136] **2-4. 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 항산화 효능**

[0137] 초미세먼지로 인한 폐 조직의 산화적 스트레스와 관련된 biochemicals의 변화를 확인하였으며, 그 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

[0138] 실험 결과, 폐 조직에서 산화적 스트레스가 증가한 것으로 확인되었다. Malondialdehyde(MDA)는 지질과산화물로서 산화적 스트레스의 주요 마커로도 사용되고 있으며, 초미세먼지군의 폐 조직에서 MDA는 정상대조군 대비 유의적으로 증가한 것이 확인되었으며, superoxide dismutase(SOD) 및 환원형 GSH(reduced glutathione)는 정상대조군 대비 유의하게 감소한 것이 확인되었다. 즉, 초미세먼지가 장기간 노출되는 경우 폐 조직에서 산화적 스트레스가 증가한 것이다. 이와 반대로, AASC투여군에서는 MDA가 유의적으로 감소한 것으로 확인되었고, 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD)와 환원형 GSH(reduced glutathione)가 증가된 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 쑥 및 삼백초 혼합추출물이 초미세먼지로 인해 증가된 산화적 스트레스를 억제시켰다는 것을 의미한다.

표 1

[0140]

	Control	PM	AASC 50	AASC 100
MDA contents (nmole/mg of protein)	1.34 ± 0.04 ^b	1.47 ± 0.05 ^a	1.30 ± 0.10 ^b	1.31 ± 0.08 ^b
SOD contents (U/mg of protein)	5.14 ± 0.41 ^a	4.17 ± 0.17 ^b	4.67 ± 0.39 ^{ab}	4.63 ± 0.31 ^{ab}
Reduced Glutathione (% of control)	100.0 ± 24.0 ^a	61.0 ± 12.1 ^b	77.8 ± 8.4 ^{ab}	74.8 ± 7.2 ^{ab}

[0141] Results are indicated as mean ± SD (n = 9). Different small letters represent statistical difference ($p < 0.05$) of each group in a high order.

[0143] 이어서, 혈청에서의 ferric Reducing Antioxidant Power(FRAP) activity를 확인하였으며 그 결과는 하기 표 2

에 나타내었다. FRAP activity는 혈청의 항산화 활성을 나타내며 lactate dehydrogenase(LDH)는 산화적 손상 정도를 나타낼 수 있는 지표이다.

[0144] 실험 결과, 초미세먼지군의 FRAP activity는 감소하고 LDH의 수준의 증가가 확인되었지만, 쑥 및 삼백초 혼합추출물(AASC) 투여군에서는 FRAP activity의 증가와 함께 LDH 수준의 유의적인 감소가 확인되었다.

표 2

	Control	PM	AASC 50	AASC 100
FRAP activity (Absorbance at 593 nm)	0.43 ± 0.02 ^a	0.28 ± 0.01 ^c	0.31 ± 0.01 ^c	0.35 ± 0.03 ^b
LDH contents(U/L)	187.3 ± 23.8 ^{ab}	256.0 ± 42.8 ^a	146.3 ± 33.3 ^b	186.0 ± 34.4 ^{ab}

[0147] Results are indicated as mean ± SD (n = 9). Different small letters represent statistical difference ($p < 0.05$) of each group in a high order.

[0149] 2-5. 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 미토콘드리아 기능장애 개선 효능

[0150] 폐 조직의 미토콘드리아 기능평가를 수행한 결과는 하기 표 3에 나타내었다. 실험 결과, 초미세먼지군의 경우, 대조군과 비교하여 미토콘드리아 내부의 reactive oxygen species(ROS) 수준의 증가와 mitochondrial membrane potential(MMP)와 ATP 수준의 감소가 확인되었다. 이러한 결과는 초미세먼지로 인해 미토콘드리아의 기능장애가 유발된다는 것을 의미한다. 하지만, 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 경구투여한 쑥 및 삼백초 혼합추출물(AASC) 투여군에서 ROS의 수준 감소와 MMP와 ATP 수준의 유의적 증가가 확인되었고 결국 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 섭취는 폐 조직에서 초미세먼지로 인한 미토콘드리아의 기능장애를 개선하는 것이 확인되었다.

표 3

	Control	PM	AASC 50	AASC 100
ROS contents (% of control)	100.0 ± 26.5 ^b	136.4 ± 25.5 ^a	112.6 ± 32.6 ^{ab}	107.6 ± 20.3 ^{ab}
MMP (% of control)	100.0 ± 14.4 ^{bc}	74.1 ± 26.4 ^c	118.5 ± 31.9 ^{ab}	149.7 ± 5.9 ^a
ATP contents (nmole/mg)	306.8 ± 21.4 ^a	170.2 ± 53.9 ^b	241.1 ± 56.4 ^{ab}	310.0 ± 63.2 ^a

[0153] Results are indicated as mean ± SD (n = 9). Different small letters represent statistical difference ($p < 0.05$) of each group in a high order.

[0155] 2-6. 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 항염증 효능

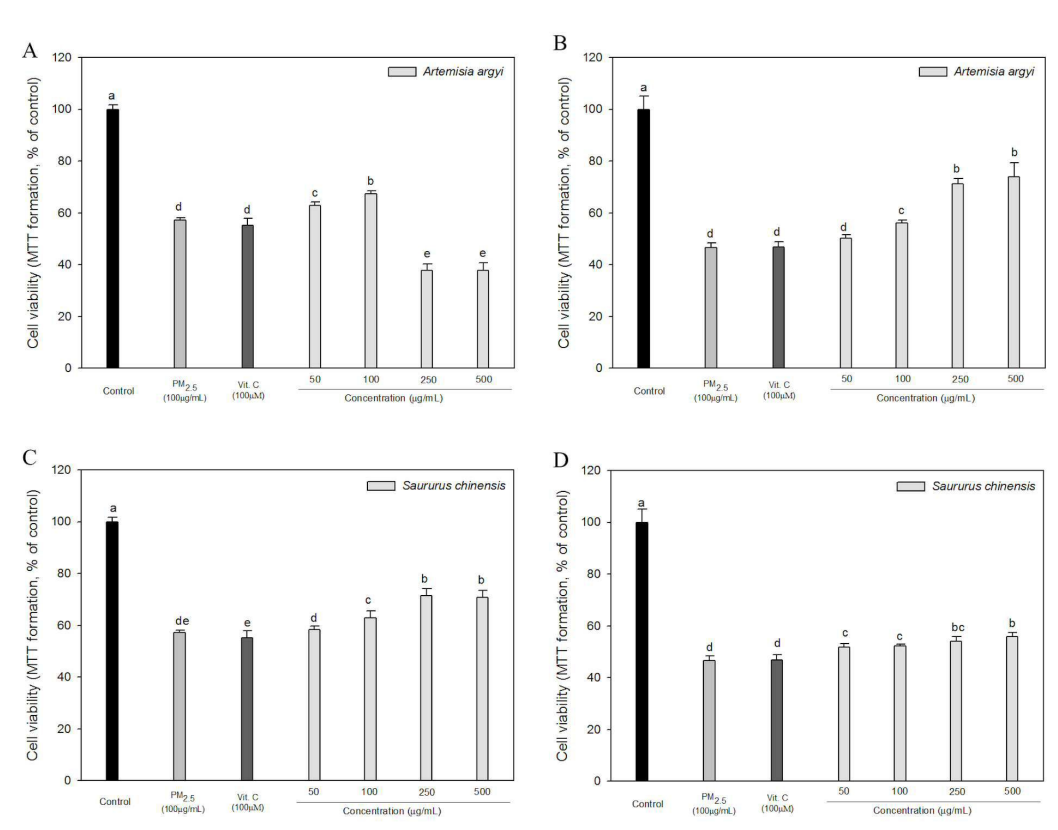
[0156] 폐 조직 및 후각망울 조직에서의 염증 관련 단백질 발현변화를 확인한 결과는 도 4에 나타내었다. 실험 결과, 초미세먼지군에서 p-JNK, p-IκB-α, p-NF-κB 및 염증성 사이토카인의 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 인산화된 JNK의 증가는 염증 반응의 증가를 간접적으로 보여주며, IκB-α와 NF-κB의 인산화 증가 그리고 염증성 사이토카인 TNF-α 및 IL-1β의 증가와 COX-2의 발현증가는 초미세먼지로 인해 염증이 증가하였음을 나타낸다. 반면에, 쑥 및 삼백초 혼합추출물을 섭취한 AASC투여군에서는 초미세먼지로 인한 염증의 증가가 유의적으로 회복되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 쑥 및 삼백초 혼합추출물의 섭취가 초미세먼지로 인한 폐 조직 및 후각망울 조직의 염증 증가를 개선하는 데 효과가 있다는 것을 보여준다. 이러한 결과는 초미세먼지로 인한 독성을 완화시킨 것으로, 쑥 및 삼백초 혼합추출물이 염증성 호흡기 질환의 예방 및 치료에 이용될 수 있다는 것을 의미한다.

[0158]

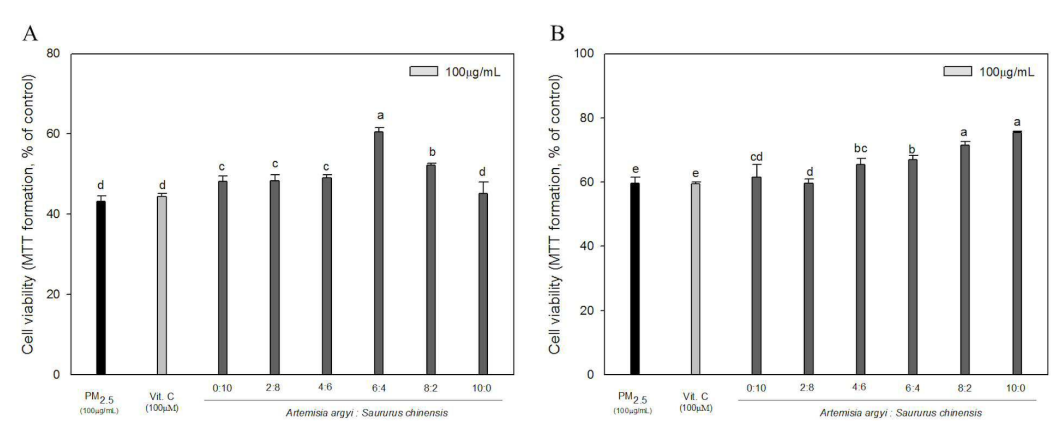
이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

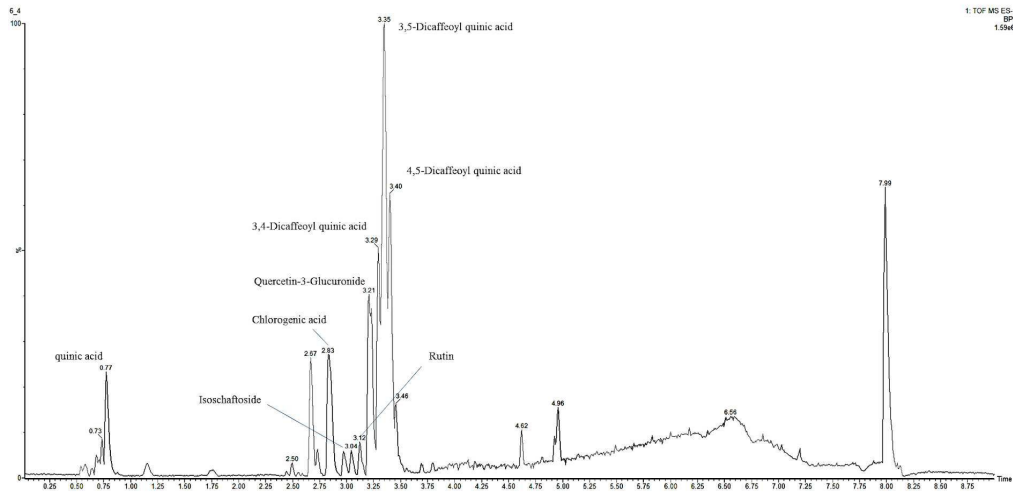
도면1



도면2



도면3



도면4

