



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월06일  
(11) 등록번호 10-2704001  
(24) 등록일자 2024년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 8/9789 (2017.01) A61K 8/49 (2006.01)  
A61K 8/86 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 8/9789 (2017.08)  
A61K 8/498 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2023-0122934  
(22) 출원일자 2023년09월15일  
심사청구일자 2023년09월15일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020150101162 A\*  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
주식회사 함소아제약  
서울특별시 강남구 논현로149길 67-13, 5층2호,  
4층2호(논현동, 함소아빌딩)  
(72) 발명자  
최혁용  
서울특별시 강남구 도산대로16길 13-16 (함소아  
빌딩)  
조현주  
서울특별시 강남구 학동로19길 40, 401호 (논  
현동, 크레인파크빌)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인부경

전체 청구항 수 : 총 3 항

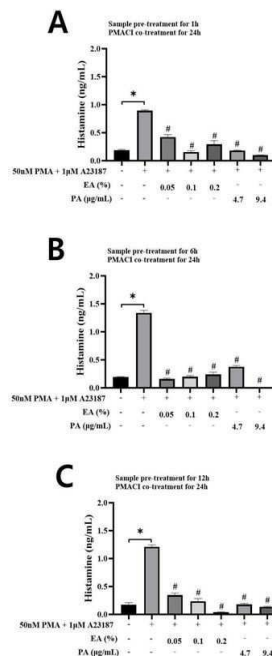
심사관 : 성다은

(54) 발명의 명칭 개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장품 조성물 제조방법 및 이에 따라 제조된 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 개망초(*Erigeron annuus*)의 꽃, 잎, 줄기, 가지를 포함하는 지상부를 수세하고 건조하여 개망초 건조물을 수득하는 단계; 상기 개망초 건조물을 상기 개망초 건조물 중량의 20~40 배수의 정제수에 투입한 뒤 10~30 °C 에서 교반하며 냉침 추출하여 개망초 추출액을 제조하는 단계; 상기 개망초 추출액을 농축하여 개망초 추출물 (뒷면에 계속)

대표도 - 도10



을 제조하는 단계; 및 상기 개망초 추출물에 에틸렌글리콜알킬에테르계 용해 보조제를 첨가 및 혼합하여 화장료 조성물을 제조하는 단계;를 포함하고, 상기 화장료 조성물은 상기 개망초 추출물에 의한 항히스타민 기능을 갖는 것을 특징으로 하는, 개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물의 제조방법 및 이에 따라 제조된 화장료 조성물을 제공한다.

본 발명의 개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물 제조방법은 개망초 전초를 이용하고 냉침 추출하여 개망초 추출물의 유효성분인 피로메콘산의 함량을 높여 항히스타민 작용으로 가려움증을 개선하는 효과가 우수하고, 에틸렌글리콜알킬에테르계 용해 보조제를 첨가 및 혼합하여 상기 피로메콘산의 피부 흡수율을 개선 시킴에 따라 가려움증 개선 효과가 우수하다.

(52) CPC특허분류

- A61K 8/86 (2013.01)
- A61Q 19/00 (2013.01)
- A61K 2800/49 (2013.01)
- A61K 2800/522 (2013.01)
- A61K 2800/805 (2013.01)

(72) 발명자

**김연선**

경기도 고양시 일산동구 장백로 13 (백석동)

**김태희**

경상남도 진주시 소호로 39, 113동 703호 (충무공동, 한림플에버)

**정성운**

전라북도 전주시 덕진구 출판로 69, 606동 804호 (장동, 호반베르디움 더센트럴 2)

**백설지**

전라북도 익산시 중앙로5길 17, 1동 1613호 (창인동1가, 익산역 시그니처-S 주상복합)

**오상남**

전라북도 전주시 덕진구 틀뚝1길 15, 503동 503호 (장동, 호반베르디움 더센트럴 1)

**강민경**

전라북도 전주시 완산구 만내로 37, 201동 305호 (평화동2가, 평화2차 골드클래스)

(56) 선행기술조사문헌

- KR1020080023827 A\*
- KR1020070108688 A
- JP2015172017 A
- JP2013227356 A
- KR1020180051821 A
- JP2000516219 A

European Journal of Medicinal Chemistry, January 14, 2023, Vol 248, pp. 115120

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

개망초(*Erigeron annuus*)의 꽃, 잎, 줄기, 가지를 포함하는 지상부를 수세하고 건조하여 개망초 건조물을 수득하는 단계;

상기 개망초 건조물을 상기 개망초 건조물 중량의 20~40 배수의 정제수에 투입한 뒤 10~30 °C 에서 교반하며 냉침 추출하여 개망초 추출액을 제조하는 단계;

상기 개망초 추출액을 농축하여 개망초 추출물을 제조하는 단계; 및

상기 개망초 추출물에 에틸렌글리콜알킬에테르계 용해 보조제를 98~99 : 2~10의 중량비로 첨가 및 혼합하여 화장료 조성물을 제조하는 단계;를 포함하고,

상기 냉침 추출 및 농축을 통해 제조된 개망초 추출물은, 유효성분으로서 피로메콘산을 포함하되, 상기 피로메콘산(pyromeconic acid) 함량은 고형분을 기준으로 적어도 40 mg/g이고,

상기 개망초 추출물에 에틸렌글리콜알킬에테르계 용해 보조제를 첨가 및 혼합하여 제조되는 화장료 조성물은, 상기 피로메콘산에 의한 항히스타민 기능성을 가지는 것을 특징으로 하는,

개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물의 제조방법.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제1 항에 있어서,

상기 에틸렌글리콜알킬에테르계 용해 보조제는,

폴리옥시에틸렌알킬에테르, 폴리옥시에틸렌라우릴에테르, 폴리옥시에틸렌팔미토일에테르 및 폴리옥시에틸렌스테아릴에테르로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는,

개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물의 제조방법.

#### 청구항 4

제1 항 또는 제3 항에 따라 제조되는 것을 특징으로 하는, 개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물.

## 발명의 설명

### 기술분야

[0001] 본 발명은 개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물 제조방법 및 이에 따라 제조된 화장료 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 알러지성 피부염은 알러지 면역반응에 의해 나타나는 피부증상으로 아토피피부염, 접촉성 피부염, 두드러기, 곤충 알러지, 식품 또는 약물 알러지 등이 포함된다. 아토피성 피부염 및 알러지성 피부염은 염증성 피부질환으로 염증억제가 치료의 주요 타겟이 되고 있다.

[0003] 특히 아토피는 1970년대 이후 선진국을 중심으로 발병되는 중요 질병 중의 하나로, 전 세계적으로 증가하는 추

세이며 유병률이 인구의 20%라는 보고가 있다. 미국에서는 1,500만 명의 사람들이 아토피를 앓고 있으며, 한국에서도 초중고생의 16.3%가 아토피를 앓고 있다 (Ahn S.Y. et al., J. Skin Barrier Res., 8, 47-51, 2006).

- [0004] 아토피성 피부염 치료제로는 스테로이드 제제, 국소 면역억제제 및 항히스타민 등이 사용되고 있으나, 상기 약물제제를 장기적으로 사용하는 경우 피부가 얇아지거나 피부색의 변색, 골다공증, 동맥경화, 발암 가능성 및 내성으로 인한 증상 악화 등의 문제점이 있다.
- [0005] 이에 따라 천연 소재를 이용하여 가려움증을 개선하고자 하는 연구가 진행되고 있으며, 피부 가려움증을 가진 소비자들이 사용효과를 직접적으로 느끼기를 원하기 때문에 천연 소재 유효성분의 피부 흡수율을 증진시켜 즉효성을 제공할 필요가 증가하고 있다.
- [0006] 한편 개망초(*Erigeron annuus* (L.) Pers.)는 국화와 개망초속의 두해살이풀로, 북아메리카가 원산이며 전 세계적으로 분포한다. 북아메리카에만 173종의 개망초속 식물이 자생하고 있어 가장 다양성이 높은 식물속이다. 개망초는 베타시토스테롤 ( $\beta$ -sitosterol), 다이드제인 (daidzein), 아피제닌 (apigenin), 퀘르세틴 (quercetin), 프로토크테추익산 (protocatechuic acid), 피로메콘산 (pyromeconic acid), 브레비스카핀 (breviscapine) 등의 생리활성물질을 함유하고 있어, 민간에서 개망초는 위장염, 소화불량, 전염성 간염, 혈뇨, 학질 및 말라리아 등에 사용되어 왔다.
- [0007] 그러나 피부 개선과 관련하여서는 대한민국 등록특허 제10-1888258호와 같이 개망초 꽃만 이용하거나, 식용 나물로도 개망초의 일부만 사용하고 있어 나머지 전초는 잡초와 같이 버려지는 문제가 있다.
- [0008] 이에 본 발명자들은 천연 소재인 개망초 전초를 이용하여 유효성분의 함량을 높여 항히스타민 작용에 따른 가려움증을 개선하고, 용해 보조제를 이용하여 피부 흡수율을 높이는 화장료 조성물 제조방법 및 이에 따라 제조된 화장료 조성물을 개발하고, 본 발명을 완성하였다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1888258호

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물 제조방법을 제공하는 것을 기술적 해결과제로 한다.
- [0011] 본 발명은 개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것을 다른 기술적 해결과제로 한다.

#### 과제의 해결 수단

- [0012] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여,
- [0013] 본 발명은 개망초(*Erigeron annuus*)의 꽃, 잎, 줄기, 가지를 포함하는 지상부를 수세하고 건조하여 개망초 건조물을 수득하는 단계;
- [0014] 상기 개망초 건조물을 상기 개망초 건조물 중량의 20~40 배수의 정제수에 투입한 뒤 10~30 °C 에서 교반하며 냉침 추출하여 개망초 추출액을 제조하는 단계;
- [0015] 상기 개망초 추출액을 농축하여 개망초 추출물을 제조하는 단계; 및
- [0016] 상기 개망초 추출물에 에틸렌글리콜알킬에테르계 용해 보조제를 첨가 및 혼합하여 화장료 조성물을 제조하는 단계;를 포함하고,
- [0017] 상기 화장료 조성물은 상기 개망초 추출물에 의한 항히스타민 기능성을 갖는 것을 특징으로 하는,
- [0018] 개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물의 제조방법을 제공한다.

- [0019] 또한 상기 다른 기술적 과제를 달성하기 위하여,
- [0020] 상기 제조방법에 따라 제조되는 것을 특징으로 하는, 개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

**발명의 효과**

- [0021] 본 발명의 개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물 제조방법은 개망초 전초를 이용하고 냉침 추출하여 개망초 추출물의 유효성분인 피로메콘산의 함량을 높여 항히스타민 작용으로 가려움증을 개선하는 효과가 우수하고, 에틸렌글리콜알킬에테르 용해 보조제를 첨가 및 혼합하여 상기 피로메콘산의 피부 흡수율을 개선시킴에 따라 가려움증 개선 효과를 더 높일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 제조방법에 따라 제조되는 개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물은 용해 보조제로 에틸렌글리콜알킬에테르 용해 보조제를 포함하여 피부 흡수율이 우수하고, 개망초 추출물의 유효성분인 피로메콘산의 함량이 높아 항히스타민 작용에 따른 가려움증 개선 효과가 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0024] 도 1은 본 발명에 따른 대조군(개망초 추출물)의 인공피부를 이용한 투과도 시험 결과이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 실험군 1(개망초 추출물 + BT-12 2%)의 인공피부를 이용한 투과도 시험 결과이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 실험군 2(개망초 추출물 + BT-12 10%)의 인공피부를 이용한 투과도 시험 결과이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 실험군 3 (개망초 추출물 + BT-12 5%)의 인공피부를 이용한 투과도 시험 결과이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 실험군 4 (개망초 추출물 + Butylene glycol 5%)의 인공피부를 이용한 투과도 시험 결과이다.
- 도 6은 본 발명에 따른 실험군의 투과 시간대별 피로메콘산의 평균 농도 및 함량 결과이다.
- 도 7은 본 발명에 따른 개망초 추출물의 세포 독성 및 유효 농도 평가 결과 그래프이다.
- 도 8은 본 발명에 따른 개망초 추출물의 항산화 효능 평가 결과이다.
- 도 9는 본 발명에 따른 개망초 추출물의 HaCaT 세포주에 대한 항산화 효능 평가 결과이다.
- 도 10은 본 발명에 따른 개망초 추출물의 HMC-1 세포에서의 항히스타민 효능 평가 결과이다.
- 도 11은 본 발명에 따른 개망초 추출물의 HMC-1 세포에서의 항염증 효능 평가 결과이다.
- 도 12는 본 발명에 따른 개망초 추출물의 HaCaT 세포에서의 항염증 효능 평가 결과이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0025] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 각 도면을 설명하면서 유사한 참조부호를 유사한 구성요소에 대해 사용하였다.
- [0026] 본 명세서 및 청구범위의 전반에 걸쳐, 다른 언급이 없는 한 포함(comprise, comprises, comprising)이라는 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 반응, 구성요소 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 반응, 구성요소 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0027] 본 발명에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.
- [0028] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인

의미로 해석되지 않는다.

- [0030] 본 발명의 일 측면에 따르면 개망초(*Erigeron annuus*)의 꽃, 잎, 줄기, 가지를 포함하는 지상부를 수세하고 건조하여 개망초 건조물을 수득하는 단계; 상기 개망초 건조물을 상기 개망초 건조물 중량의 20~40 배수의 정제수에 투입한 뒤 10~30 °C 에서 교반하며 냉침 추출하여 개망초 추출액을 제조하는 단계; 상기 개망초 추출액을 농축하여 개망초 추출물을 제조하는 단계; 및 상기 개망초 추출물에 에틸렌글리콜알킬에테르계 용해 보조제를 첨가 및 혼합하여 화장료 조성물을 제조하는 단계;를 포함하고, 상기 화장료 조성물은 상기 개망초 추출물에 의한 항히스타민 기능성을 갖는 것을 특징으로 하는, 개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0031] 먼저 개망초 건조물을 수득한다.
- [0032] 본 발명에서 개망초 건조물은 개망초의 꽃, 잎, 줄기, 가지를 포함하는 지상부를 이용하여 수득된다. 종래 피부 개선과 관련하여 개망초 꽃만 이용하거나, 식용 나물로도 개망초의 일부만 사용하는 것과 달리 본 발명은 개망초의 지상부 전체를 이용하여 개망초의 유효성분의 함량을 높였다.
- [0033] 본 발명에서 개망초 추출물은 특히 피로메콘산 함량을 높이고자 하였고, 본 발명자들이 개망초의 부위별 추출물의 피로메콘산 함량을 측정한 결과 꽃의 잎은 10.745 mg/g, 꽃 대는 15.944 mg/g, 잎은 20.000 mg/g, 줄기는 10.507 mg/g, 가지는 16.349 mg/g의 피로메콘산이 포함된 것으로 확인되었다. 따라서 꽃 외 개망초 지상부 전체를 이용하여 피로메콘산의 함량을 높임이 바람직한 것으로 확인되었다.
- [0034] 다음으로 상기 개망초 건조물을 정제수에 투입한 뒤 10~30 °C 에서 교반하며 냉침 추출하여 개망초 추출액을 제조한다.
- [0035] 본 발명에서 개망초 건조물은 열수 추출, 주정 추출보다 냉침 추출을 이용하여 추출액을 제조하여 유효성분인 피로메콘산의 추출 함량을 높이는 것이 바람직하다. 냉침 추출을 진행하여 열수 추출보다 3.5배 이상, 주정 추출보다 2.5배 이상의 피로메콘산 고형분을 추출할 수 있다. 냉침 추출은 상기 개망초 건조물 중량의 20~40 배수의 정제수에서 10~30 °C 의 온도로 진행할 수 있다.
- [0036] 상기 개망초 건조물 중량의 20배 이하로 정제수 투입 시 개망초 건조물이 정제수에 충분히 잠기지 않아 추출 효율이 낮아지며, 40배 초과 정제수 추출 시 이후 추출액 농축 시간이 늘어나는 등 개망초 원물 투입량 대비 생산 비용이 증가하여 바람직하지 못하다. 온도의 경우, 30 °C 를 초과하면 냉침 추출이라 보기 어렵다.
- [0037] 다음으로 상기 개망초 추출액을 농축하여 개망초 추출물을 제조한다.
- [0038] 본 발명에서 상기 추출액은 1 브릭스 정도의 당도, 고형분 함량이 1 중량%가 되는데 이를 농축하여 보관과 이송함을 용이하게 하고 유효성분의 함량을 높일 수 있다.
- [0039] 개망초 추출액은 진공 조건에서 감압하여 농축을 진행할 수 있고, 농축액의 브릭스(brix) 당도가 10 ~ 20 brix, 고형분의 함량이 10 ~ 20 중량%이 될 때까지 농축함이 바람직하다.
- [0040] 상기 농축액의 브릭스 당도가 상기 범위를 초과하거나 미만이 되는 경우 고형분 함량이 증가하여 장기간 보관시 침전물 발생 가능성이 높거나 향후 화장품 조성물을 제조하는 경우 다른 원료와의 배합 비율 조절에 제약이 생길 수 있어 바람직하지 못하다.
- [0041] 상기 농축에 따라 본 발명의 개망초 추출물은 고형분 기준 피로메콘산(pyromeconic acid)의 함량이 적어도 40 mg/g인 것을 특징으로 한다. 개망초 지상부를 이용하고, 냉침 추출을 진행함에 따라 유효성분인 피로메콘산의 함량을 보다 더 높일 수 있다.
- [0042] 마지막으로 상기 개망초 추출물에 에틸렌글리콜알킬에테르계 용해 보조제를 첨가 및 혼합하여 화장료 조성물을 제조한다.
- [0043] 화장료 조성물의 유효성분이 효과적으로 작용하기 위해서는 피부 조직의 투과, 흡수율이 중요한 바, 본 발명에서는 개망초 추출물의 피부 흡수율을 개선할 수 있는 에틸렌글리콜알킬에테르 용해 보조제를 선택하여 첨가 및 혼합하였다.
- [0044] 본 발명에서 에틸렌글리콜알킬에테르 용해 보조제는, 폴리옥시에틸렌알킬에테르, 폴리옥시에틸렌라우릴에테르, 폴리옥시에틸렌팔미토일에테르 및 폴리옥시에틸렌스테아릴에테르로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 또한 에틸렌글리콜알킬에테르는 시판품도 사용할 수 있고, 이러한 제품으로는, 예를 들어 닛코케미칼즈

(주)의 NIKKOL(등록상표)시리즈(NIKKOL BT-5, NIKKOL BT-7, NIKKOL BT-9, NIKKOL BT-12)를 선택할 수 있다.

- [0045] 상기 개망초 추출물과 상기 용해 보조제는 98 ~ 90 : 2 ~ 10의 중량비로 혼합될 수 있다. 이에 따라 본 발명에서 용해 보조제는 2 ~ 10 중량%로 첨가됨이 바람직하다. 용해 보조제의 함량이 2 중량% 미만일 경우에는 용해율이 낮아질 수 있으며, 10 중량% 초과일 경우 개망초 추출물의 농도가 낮아져 개망초 추출물의 기능이 저감될 수 있어 바람직하지 못하다.
- [0046] 본 발명은 개망초 추출물을 상기 에틸렌글리콜알킬에테르계 용해 보조제와 혼합하여 화장료 조성물을 제조함에 따라 상기 개망초 추출물의 유효성분인 피로메콘산이 24시간 이내에 적어도 97%가 피부에 흡수되게 하는 점에 특징이 있다.
- [0047] 이 때 상기 개망초 추출물의 투과속도(flux,  $\mu\text{g/hr/cm}^2$ )는 적어도  $60 \mu\text{g/hr/cm}^2$ 이고, 투과계수( $K_p$ , cm/hr)는 적어도 6 cm/hr인 것을 특징으로 한다. 상기 투과속도는 단위시간 당 일정한 피부의 넓이를 통과하는 시료의 양으로 계산되고 상기 투과계수는 상기 투과속도 값을 물질의 초기 농도 값을 나눈 값으로 각 물질 고유의 투과특성이다.
- [0048] 상기와 같이 본 발명의 화장료 조성물 제조방법은 개망초 전초를 이용하고 냉침 추출하여 개망초 추출물의 유효성분인 피로메콘산의 함량을 높임에 따라 항히스타민 작용 효과가 우수하고, 항산화, 항염 효과 역시 우수한 화장료 조성물을 제조한다. 또한 에틸렌글리콜알킬에테르 용해 보조제를 첨가하여 상기 피로메콘산의 피부 흡수율을 개선시켜 상기 기능성 작용 효과를 더 높일 수 있는 점에 기술적 특징이 있다.
- [0050] 본 발명의 다른 일 측면에 따르면, 본 발명의 제조방법에 따라 제조되는 것을 특징으로 하는, 개망초 추출물을 포함하는 가려움증 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0051] 본 발명의 화장료 조성물은 개망초 추출물을 포함하되, 상기 개망초 추출물은 개망초 지상부를 이용하고, 냉침 추출 조건을 제어하여 추출 효율을 높여 제조됨에 따라 유효성분인 피로메콘산의 함량이 높은 점에 특징이 있다.
- [0052] 또한 에틸렌글리콜알킬에테르계 용해 보조제와 혼합하여 개망초 추출물의 피부 흡수율을 높임에 따라 상기 개망초 추출물에 따른 항히스타민 작용 효과가 우수하다. 본 발명의 화장료 조성물은 개망초 추출물과 상기 에틸렌글리콜알킬에테르계 용해 보조제가 혼합되어 투과속도(flux,  $\mu\text{g/hr/cm}^2$ )가 적어도  $60 \mu\text{g/hr/cm}^2$ 이고, 투과계수( $K_p$ , cm/hr)는 적어도 6 cm/hr인 것이 바람직하다. 이에 따라 유효성분인 피로메콘산은 24시간 이내 적어도 97%가 흡수되어 용해 보조제를 포함하지 않는 경우(24시간 이내 95% 흡수)보다 피부에 흡수되는 피로메콘산의 농도 및 함량이 높은 것을 기술적 특징으로 한다.
- [0053] 본 발명의 화장료 조성물은 개망초 추출물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함한다. 예컨대 항산화제, 안정화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [0054] 상기 화장료 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제 함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 스프레이, 영양 크림, 수렴 화장수, 유연 화장수, 로션, 에센스, 영양젤 또는 마사지 크림 등으로 제형화될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 즉, 본 발명의 화장료 조성물은 용해 보조제로 에틸렌글리콜알킬에테르 용해 보조제를 포함하여 피부 흡수율이 우수하고, 개망초 추출물의 유효성분인 피로메콘산의 함량을 높아 항히스타민 작용에 따른 가려움증 개선 효과가 우수한 점에 기술적 특징이 있다.
- [0057] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 상세히 설명하기로 한다. 다만, 이하의 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 예시일 뿐, 이에 의하여 본 발명의 권리범위가 한정되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명의 실시예들은 명확한 반대의 지적이 없는 한 그 외의 어떤 다른 실시예들과 결합될 수 있다. 특히 바람직하거나 유리하다고 지시하는 어떤 특징도 바람직하거나 유리하다고 지시한 그 외의 어떤 특징들과 결합될 수 있다.
- [0060] **<실시예>**
- [0061] **개망초 추출물 제조**
- [0062] 개망초는 전라북도 남원시에서 자생하는 것으로 7월초 경 채취하여 압과 수를 별도 분리 후 건조시켜 실험 재료

로 사용하였다. 개망초는 꽃 잎, 꽃 대, 잎, 굵은 가지 및 잔 가지를 포함하는 개망초 지상부를 이용하였다. 유효성분인 피로메콘산의 추출 효율을 높이기 위하여 추출 공정 조건을 달리하여 개망초 추출액을 제조하였다.

- [0063] 냉침 추출은 건조된 개망초 전초(지상부)를 상기 개망초 전초의 20배수의 정제수에 투입한 뒤 30 °C 이하에서 7시간 교반하며 추출을 진행하였다.
- [0064] 열수 추출은 개망초 전초(지상부)를 상기 개망초 전초의 20배수의 정제수에 투입한 뒤 90 °C 에서 7시간 교반하며 추출을 진행하였다.
- [0065] 주정(70%) 추출은 개망초 전초(지상부)를 상기 개망초 전초의 20 배수의 에탄올에 투입한 뒤 30 °C 이하에서 7시간 교반하며 추출을 진행하였다. 또한 동일한 조건에서 교반 대신 초음파를 이용한 추출도 진행하였다.
- [0066] 상기 추출에 따른 추출액 확보 후 회전 증발 농축기를 이용하여 고형분 함량이 10 중량%(10 brix 농도) 이상이 되도록 농축된 개망초 추출물을 제조하였다.
- [0067] 상기 추출 조건에 따른 피로메콘산의 함량(고형분 기준, mg/g)을 확인한 결과, 하기 표 1과 같이 냉침 추출의 효율이 가장 높은 것으로 확인되어 이하 냉침 추출에 따른 개망초 추출물을 이용하였다.

**표 1**

추출 방식	피로메콘산 함량(고형분 기준, mg/g)
열수 추출	11.64
냉침 추출	41.53
주정 추출	17.77
	17.76

- [0070] 용해 보조제
- [0071] 용해 보조제로 BT-12(C12-14 ALKETH-12)은 (주)NIKKOL사에서 구입하여 사용하였고(Lot no. 0415), Butylene glycol은 OQ Chemicals Corporation에서 구입하여 사용하였다(Lot no. 4000067106).
- [0073] 대조군 제조
- [0074] 상기 개망초 추출물을 190  $\mu$ l을 Franz 세포의 donor chamber에 로딩하고 24시간까지 샘플링하여 투과된 양을 확인하였다.
- [0076] 실험군 제조
- [0077] 용해 보조제를 15 ml conical tube에 넣고 개망초 추출물을 첨가하여 5 ml가 되도록 하였다. 용해 보조제의 첨가 비율에 따라 농도가 2 ~ 10 wt%가 되도록 실험군을 제조하였다. 5분간 vortexing 한 뒤 상기 액 200  $\mu$ l을 Franz 세포의 donor chamber에 로딩하고 24시간까지 샘플링하여 투과된 양을 확인하였다.
- [0078] 각 실험군별 사용한 용해 보조제 및 농도는 표 1에 정리하였다.

**표 2**

	용해 보조제	농도
대조군	-	-
실험군 1	BT-12	2 wt%
실험군 2		10 wt%
실험군 3		5 wt%
실험군 4	Butylene glycol	5 wt%

- [0081] <실험예>
- [0082] (1) In vitro 피부흡수시험
- [0083] In vitro 피부흡수시험으로 적출피부(Franz diffusion 세포)를 이용해 시험 물질의 흡수도 및 투과도를 측정하였다.
- [0084] Receptor chamber에 receptor fluid(3차 증류수 100 ml에 에탄올 100 ml을 넣고 마그네틱 바를 사용하여 교반

하여 제조)를 15 ml 충전한다. Receptor fluid와 인공피부 하단이 밀착되도록 올려놓은 뒤 donor chamber를 덮고 clamp로 단단히 고정한다. Receptor fluid는 300 rpm으로 섞어 주었으며, 실험기간 동안 circulation water bath를 이용하여 25 °C의 물을 순환시켰다.

[0085] 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24시간 마다 sampling port를 이용하여 receptor fluid를 채취하여 분석하였다. 채취 후엔 receptor fluid를 sampling port의 절반까지 채운다.

[0086] 24시간 샘플링 후 투과되지 않고 조직에 남은 시험물질의 양을 확인하기 위해 15 ml conical tube에 조직을 넣고 메탄올을 가해 10 ml가 되게 한 뒤 5분간 볼텍싱(vortexing)하여 그 용액을 분석하였다.

[0087] 개망초 추출물의 유효성분인 피로메콘산의 분석을 위한 HPLC 조건은 표 3에 정리하였다.

표 3

[0088] Column	Agilent Eclipse plus C18 (5 um, 4.6 x 250 mm)
Mobile Phase	10 % ACN in D.W. (0.1 % phosphoric acid)
Over Temp	25 °C
Flow Rate	0.8 ml/min
Injection volume	10 µl
Run time	10 minutes
Wavelength	270 nm

[0090] (2) 세포독성 및 유효 농도 평가

[0091] 인간 유래 비만세포인 HMC-1와 인간 각질형성세포 HaCaT 세포주를 이용하여 개망초(*Erigeron annuus*) 추출물을 각각 0.05 - 1% (원액 10.58 Brix의 함유량, %)의 농도를 처리하여 MTT 및 MTS assay를 통해 세포 독성을 평가하였다. HaCaT 세포에서 개망초 추출물의 항산화 효능 평가 시 양성 대조군(positive control)으로써 항산화능이 탁월한 것으로 잘 알려져 있는 플라보노이드(flavonoids)인 퀘르세틴(querctetin)을 1 - 100 µmol/L의 농도로 처리하여 동일하게 평가하였으며, 각 세포주에 24 또는 48 시간 노출시켰다. 96well plate에 1x10<sup>5</sup> cells/ml (HMC-1), 1x10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> (HaCaT)의 농도로 세포를 각각 분주하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하여 실험을 진행하였다.

[0093] (3) 항산화 효능 평가

[0094] 3-1. DPPH, ABTS 시험법

[0095] 개망초 추출물을 여러 농도로 희석하여 DPPH, ABTS 시험법으로 항산화 효능을 평가하였다. 표준 물질(standard)으로써 ascorbic acid, trolox를 사용하여 추출물의 항산화능을 비교하였다.

[0096] 추출물에 함유된 항산화 활성을 담당하는 산화 환원 특성을 가진 성분 함량을 확인 함으로써, 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 시약 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 측정하였다. 시료 0.1 mL에 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액을 2 mL 첨가하고 3분 후 Folin-Ciocalteu 시약 0.1 mL를 혼합하고, 30분 동안 방치 후 750 nm에서 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid (GAE) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 표준물질로 하여 검량선을 작성한 후 gallic acid 기준으로 환산하여 mg (GAE)/L 단위로 나타내었다.

[0098] 3-2. HaCaT 세포실험

[0099] Oxidative stress를 유도하기 위해 과산화수소를 이용하였으며 다양한 농도를 처리하여 세포를 약 50% 정도 사멸시키는 농도를 선정하여 시료 6시간 전처리 후에 12시간 동안 250 µM 과산화수소와 함께 처리하였다.

[0100] ROS assay의 경우 시료를 24시간 전처리 후에 250 µM 과산화수소 1시간 처리하여 산화스트레스를 유도하고 세포 내 ROS 수준의 변화를 측정하기 위해 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하였다. 각 시료 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 10 µM의 DCF-DA를 첨가하여 20분 동안 37 °C에서 염색한 후 세포를 수집하여 형광현미경을 이용하여 세포 내 ROS 수준의 변화를 측정 및 관찰하였고, Image J 프로그램을 사용하여 관찰한 이미지에 대한 형광을 정량적으로 표현하였다.

[0101] 항산화 효소 측정을 위해 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) 및 total malondialdehyde (MDA)를 두젠바이오 (Dogenbio, Seoul, Korea) kit를 사용하였으며, 모두 cell lysate를 얻어 제조회사의 프로토콜에 따라 평가하였다.

[0103] (4) 항히스타민 효능 평가

[0104] HMC-1 세포에 개망초 추출물 0.05, 0.1, 0.2%와 피로메콘산 4.7 (EA 0.1%에 해당), 9.4 (EA 0.2%에 해당)  $\mu$ g/mL를 1, 6, 12시간 동안 37 °C 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 전처리 배양하였다. 이후 PMACI를 24시간 처리하여 히스타민 분비를 유도하고 세포배양 상등액을 수집하여 원심분리 후 Histamine ELISA kit (Abcam, Cambridge, UK, #ab213975)를 이용해 microplate spectrophotometer (Biotek, South Korea) 로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0106] (5) 항염 효능 평가

[0107] HMC-1 세포의 경우, Total RNA 추출은 개망초 추출물 및 피로메콘산 전처리 1시간 후 PMACI가 24시간 처리된 HMC-1 세포로부터 RNA Extraction kit (Bioneer, K-3140)를 이용하여 RNA를 추출하였다.

[0108] HaCaT 세포의 경우, Total RNA 추출은 개망초 추출물 및 피로메콘산 전처리 6시간 후 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 가 24시간 처리된 HaCaT 세포로부터 RNA Extraction kit (Bioneer, Seoul, Korea, #K-3140)를 이용하여 RNA를 추출하였다.

[0109] cDNA는 1  $\mu$ g의 total RNA를 cDNA synthesis kit (Bio-Rad, California, USA)를 이용하여 제조하여 수행되었고, 사용된 primer는 하기 표 4에 나타내었다.

[0110] 항염증 효능 평가를 위한 사이토카인 단백질 정량을 위해 같은 방법으로 시료를 세포에 처리한 후 세포 배양 상등액을 얻어 제조회사의 프로토콜에 따라 실험을 수행하였고, 모든 ELISA kit는 ProteinTech kit를 사용하였다.

표 4

Gene name	Sequence	
IL-1 $\beta$	Forward	ACGCTCCGGGACTCACAGCA
	Reverse	TGAGGCCCAAGGCCACAGGT
IL-6	Forward	GACAGCCACTCACCTCTTCA
	Reverse	AGTGCCCTCTTGCTGCTTTC
IL-8	Forward	ATGACTTCCAAGCTGGCC GTGGCT
	Reverse	TTATGAATTCTCAGCCCTCTCAAAAA
IFN- $\gamma$	Forward	TGACCAGAGCATCCAAAAGA
	Reverse	CTCTTCGACCTCGAAACAGC

[0113] <결과 및 평가>

[0114] (1) 피부흡수시험 결과

[0115] 피부흡수시험 결과를 해석하기 위해 투과 속도를 의미하는 flux( $\mu$ g/hr/cm<sup>2</sup>)값과 투과계수를 나타내는  $K_p$ (cm/hr)값으로 표현하였다. Flux는 단위시간 당 일정한 피부의 넓이를 통과하는 시료의 양으로 계산되고  $K_p$ 는 flux 값에서 물질의 초기 농도 값을 나눈 값으로 각 물질 고유의 투과특성이다.

[0116] 인공피부를 이용한 투과도 시험에 대조군(개망초 추출물)의 시간대별 피로메콘산의 농도 및 함량은 표 5와 도 1에 나타내었다.

표 5

시간 (h)	대조군 1-1		대조군 1-2		대조군 1-3		대조군 1-4	
	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)
1	0.0023	3.52	0.0018	2.68	0.0020	3.00	0.0019	2.85
2	0.0043	6.48	0.0049	7.51	0.0054	8.28	0.0056	8.47
4	0.0113	17.22	0.0117	17.84	0.0149	22.71	0.0147	22.38

6	0.0200	30.47	0.0193	29.40	0.0243	36.99	0.0251	38.20
8	0.0226	34.49	0.0272	41.50	0.0317	48.26	0.0308	46.96
10	0.0366	55.73	0.0372	56.71	0.0406	61.92	0.0375	57.13
24	0.0412	62.80	0.0449	68.50	0.0456	69.46	0.0488	74.34

[0118] 인공피부를 이용한 투과도 시험에 실험군 1(개망초 추출물 + BT-12 2%)의 시간대별 피로메콘산의 농도 및 함량은 표 6과 도 2에 나타내었다.

표 6

[0119]

시간 (h)	실험군 1-1		실험군 1-2		실험군 1-3	
	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)
1	0.0000	0.00	0.0000	0.00	0.0049	7.46
2	0.0226	34.49	0.0246	37.44	0.0265	40.39
4	0.0485	73.86	0.0461	70.31	0.0466	70.95
6	0.0512	78.05	0.0504	76.78	0.0509	77.51
8	0.0577	87.90	0.0537	81.85	0.0544	82.87
10	0.0643	98.00	0.0645	98.33	0.0640	97.54
24	0.0643	98.07	0.0645	98.35	0.0642	97.83

[0120] 인공피부를 이용한 투과도 시험에 실험군 2(개망초 추출물 + BT-12 10%)의 시간대별 피로메콘산의 농도 및 함량은 표 7과 도 3에 나타내었다.

표 7

[0121]

시간 (h)	실험군 2-1		실험군 2-2		실험군 2-3	
	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)
1	0.0076	11.51	0.0000	0.00	0.0085	12.95
2	0.0319	48.58	0.0322	49.12	0.0329	50.10
4	0.0542	82.60	0.0514	78.29	0.0492	75.01
6	0.0614	93.65	0.0587	89.44	0.0601	91.62
8	0.0632	96.33	0.0610	93.03	0.0635	96.78
10	0.0637	97.09	0.0629	95.85	0.0640	97.54
24	0.0643	97.93	0.0639	97.35	0.0641	97.62

[0122] 인공피부를 이용한 투과도 시험에 실험군 3(개망초 추출물 + BT-12 5%)의 시간대별 피로메콘산의 농도 및 함량은 표 8과 도 4에 나타내었다.

표 8

[0123]

시간 (h)	실험군 3-1		실험군 3-2		실험군 3-3		실험군 3-4	
	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)
1	0.0125	18.98	0.0079	12.03	0.0082	12.44	0.0085	12.89
2	0.0254	38.75	0.0251	38.27	0.0300	45.66	0.0323	49.27
4	0.0459	69.90	0.0443	67.51	0.0497	75.69	0.0524	79.90
6	0.0545	83.05	0.0487	74.24	0.0544	82.89	0.0540	82.32
8	0.0583	88.81	0.0557	84.86	0.0533	81.16	0.0565	86.11
10	0.0609	92.76	0.0634	96.57	0.0616	93.85	0.0629	95.79
24	0.0608	92.66	0.0654	99.64	0.0606	92.39	0.0635	96.85

[0124] 인공피부를 이용한 투과도 시험에 실험군 4(개망초 추출물 + Butylene glycol 5%)의 시간대별 피로메콘산의 농도 및 함량은 표 9와 도 5에 나타내었다.

표 9

[0125]

시간 (h)	실험군 4-1		실험군 4-2		실험군 4-3		실험군 4-4	
	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)
1	0.0018	2.76	0.0013	2.03	0.0023	3.52	0.0019	2.87
2	0.0043	6.56	0.0043	6.55	0.0063	9.65	0.0052	7.86
4	0.0121	18.51	0.0121	18.50	0.0145	22.15	0.0129	19.64
6	0.0199	30.40	0.0187	28.57	0.0233	35.50	0.0200	30.47
8	0.0273	41.67	0.0241	36.80	0.0287	43.72	0.0257	39.16
10	0.0345	52.61	0.0319	48.68	0.0366	55.72	0.0305	46.53
24	0.0517	78.76	0.0512	78.10	0.0608	92.61	0.0566	86.33

[0126]

시간대별 실험군의 피로메콘산의 평균 농도 및 함량은 표 10과 도 6에 정리하였고, 24시간 시험 종료 후 조직 외부에 남아 있는 피로메콘산의 농도 및 함량은 표 11에 정리하였다.

표 10

[0127]

시간 (h)	대조군		실험군 1		실험군 2		실험군 3		실험군 4	
	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)	농도 (mg/ml)	함량 (%)
1	0.0020 ±0.0002	3.01 ±0.31	0.0016 ±0.0023	2.49 ±3.51	0.0054 ±0.0038	8.16 ±5.80	0.0093 ±0.0019	14.09 ±2.84	0.0018 ±0.0003	2.80 ±0.53
2	0.0050 ±0.0005	7.69 ±0.78	0.0246 ±0.0016	37.44 ±2.41	0.0323 ±0.0004	49.27 ±0.63	0.0282 ±0.0031	42.99 ±4.66	0.0050 ±0.0008	7.65 ±1.27
4	0.0131 ±0.0017	20.04 ±2.52	0.0471 ±0.0010	71.71 ±1.55	0.0516 ±0.0020	78.63 ±3.11	0.0481 ±0.0032	73.25 ±4.86	0.0129 ±0.0010	19.70 ±1.49
6	0.0222 ±0.0025	33.76 ±3.87	0.0508 ±0.0003	77.45 ±0.52	0.0601 ±0.0011	91.57 ±1.72	0.0529 ±0.0024	80.62 ±3.70	0.0205 ±0.0017	31.24 ±2.57
8	0.0281 ±0.0036	42.80 ±5.43	0.0553 ±0.0017	84.21 ±2.64	0.0626 ±0.0011	95.38 ±1.67	0.0559 ±0.0018	85.23 ±2.75	0.0265 ±0.0017	40.34 ±2.60
10	0.0380 ±0.0016	57.87 ±2.39	0.0643 ±0.0002	97.96 ±0.32	0.0635 ±0.0005	96.82 ±0.72	0.0622 ±0.0010	94.74 ±1.51	0.0334 ±0.0023	50.89 ±3.54
24	0.0451 ±0.0027	68.77 ±4.10	0.0644 ±0.0001	98.08 ±0.21	0.0641 ±0.0002	97.64 ±0.23	0.0626 ±0.0020	95.39 ±3.03	0.0551 ±0.0039	83.95 ±5.96

표 11

[0128]

	대조군		실험군 1		실험군 2		실험군 3		실험군 4	
	농도 (µg/ml)	함량 (%)	농도 (µg/ml)	함량 (%)	농도 (µg/ml)	함량 (%)	농도 (µg/ml)	함량 (%)	농도 (µg/ml)	함량 (%)
조직	0.0458	4.66	0.0232	2.35	0.0200	2.03	0.0112	1.14	0.0891	9.05
외부	±0.0099	±1.00	±0.0017	±0.17	±0.0031	±0.31	±0.0033	±0.34	±0.0238	±2.42

[0129]

각 실험군의 투과속도 및 투과계수는 표 12에 정리하였다.

표 12

[0130]

	Flux (µg /hr/cm <sup>2</sup> )	K <sub>p</sub> (cm/hr*10 <sup>-4</sup> )
대조군	25.02	2.54
실험군 1	60.73	6.17
실험군 2	74.18	7.54
실험군 3	72.63	7.38
실험군 4	24.13	2.45

- [0131] 표 10에서 24시간 누적 피부 평균 투과량은 실험군 1 ( $0.0644 \pm 0.0001$  mg/ml), 실험군 2 ( $0.0641 \pm 0.0002$  mg/ml)으로 확인되었다. 표 10에서 24시간 누적 피부 평균 투과량은 대조군 ( $0.0451 \pm 0.0027$  mg/ml), 실험군 3 ( $0.0626 \pm 0.0020$  mg/ml), 실험군 4 ( $0.0551 \pm 0.0039$  mg/ml)으로 확인되었다.
- [0132] 표 12에서 각 실험군의 피로메콘산의 투과정도를 분석한 결과 계산된  $K_p$  값은 Marzulli의 정의에 따라 판단하였을 때 인공피부에서 실험군 1(BT-12 2%)은  $6.17 \text{ cm/hr} \cdot 10^{-4}$ , 실험군 2(BT-12 10%)는  $7.54 \text{ cm/hr} \cdot 10^{-4}$ 로, 실험군 3(BT-12 5%)은  $7.37 \text{ cm/hr} \cdot 10^{-4}$ 로 'MODERATE'한 투과정도를 보여주었다. 실험군 4(Butylene glycol)도  $2.45 \text{ cm/hr} \cdot 10^{-4}$ 로 이 역시 'MODERATE'한 투과정도를 보여주었으나 BT-12를 용해 보조제로 이용한 실험군 1 내지 3의 투과정도가 더 우수함을 확인할 수 있었고, 이를 통해 개망초 추출물에 용해 보조제인 BT-12를 적용하여 유효성분인 피로메콘산의 피부투과도를 증가시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0134] (2) 세포독성 및 유효 농도
- [0135] 도 7은 본 발명에 따른 개망초 추출물의 세포 독성 및 유효 농도 평가 결과 그래프이다. (A)는 HMC-1 세포 독성 평가 결과이고, (B)는 HaCaT 세포 독성 평가, (C)는 HaCaT 세포에서 퀘르세틴의 세포 독성 평가 결과이다.
- [0136] 도 7을 참고하여 설명하면, 24 시간 개망초 추출물 처리한 결과 HMC-1 세포주에서 0.05 - 0.5% 까지 세포 독성이 나타나지 않았다. HaCaT 세포에서는 0.05, 0.07% 농도에서 유의적으로 세포증식이 일어났으며, 1% 농도까지 세포독성이 나타나지 않았다.
- [0137] 또한 48 시간 개망초 추출물을 처리하였을 때 HMC-1 세포에서 0.3% 농도에서부터 세포 독성이 있었으며, HaCaT 세포의 경우 0.05 - 1%까지 유의적인 세포독성이 없었다.
- [0138] 항산화 효능 평가에서 positive control로 사용하는 퀘르세틴(QC)의 경우 24시간 처리 하였을 때  $50 \mu\text{M}$ 에서부터, 48시간 처리하였을 때  $25 \mu\text{M}$ 에서부터 세포 독성이 나타났다.
- [0139] 이에 따라 본 발명에서 개망초 추출물의 경우 세포독성이 없는 저농도 0.05, 0.1, 0.2 %를 선정하여 이후 실험을 진행하였다.
- [0141] (3) 항산화 효과
- [0142] 도 8은 본 발명에 따른 개망초 추출물의 항산화 효능 평가 결과이다. (A)는 DPPH 분석, (B)는 ABTS 분석, (C)는 TPC 함량 분석 결과이다.
- [0143] 도 8을 참고하여 설명하면, *E. annuus* (EA)추출물의 IC50 농도는 아스코르빈산(ascorbic acid)을 표준으로 정량한 DPPH assay에서 [ $0.327 \pm 0.034$  %], Trolox를 표준으로 정량한 ABTS assay에서 [ $0.981 \pm 0.078$ ]로 측정되었다. 이러한 결과는 *E. annuus* 추출물의 항산화 활성을 입증하며, DPPH 분석과 ABTS 분석결과를 통해 이후 실험에서 사용하는 농도인 0.1, 0.2%에서도 항산화 활성이 나타날 수 있음을 알 수 있다.
- [0144] 또한 총 페놀함량 분석에서는 galic acid를 표준물질로 하여 평가하였을 때 개망초 추출물(EA)의 총 페놀 함량은 galic acid 기준으로 하여  $3353.4 \pm 131.2$  mg/L 으로 나타났다. 따라서 개망초 추출물(EA)의 총 페놀 함량을 토대로 항산화 효능을 예측할 수 있었다.
- [0145] 도 9는 본 발명에 따른 개망초 추출물의 HaCaT 세포주에 대한 항산화 효능 평가 결과이다. (A)는 과산화수소 농도 설정을 위한 세포 독성 평가, (B)와 (C)는 과산화수소에 대한 개망초 추출물 및 퀘르세틴의 세포 독성 보호 평가 결과, (D)와 (E)는 ROS assay, (F)는 항산화 효소 분석 결과(SOD(superoxide dismutase), CAT(catalase), Total MDA(total malondialdehyde)) 결과이다(\*  $p < 0.01$  compared to control group, # $p < 0.01$  compared to  $\text{H}_2\text{O}_2$  group).
- [0146] 도 9의 A를 참고하면, 과산화수소  $250 \mu\text{M}$  농도에서 약 55% 세포 생존율을 나타내고, B와 C를 참고하면,  $250 \mu\text{M}$  과산화수소에 의해 유발된 세포사멸이 개망초 추출물 처리로 인해 유의적으로 억제되었음을 확인할 수 있다.
- [0147] 또한 D와 E를 참고하면 ROS assay 결과  $250 \mu\text{M}$  과산화수소에 의해 증가한 세포내 ROS 함량이 개망초 추출물(EA) 및 지표물질인 피로메콘산(PA) 처리로 인해 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다.
- [0148] 또한 F에 나타난 바와 같이, 항산화 효소인 SOD, CAT의 양이  $250 \mu\text{M}$  과산화수소에 의해 무처리군과 비교하였을

때 유의적으로 감소, 시료 처리로 인해 유의적으로 증가, 지질과산화 물질인 MDA양의 경우 시료 처리로 인해 유의적으로 감소하여 개망초 추출물과 지표물질 피로메콘산의 항산화 효능을 확인할 수 있었다.

[0150] (4) 항히스타민 효과

[0151] 도 10은 본 발명에 따른 개망초 추출물의 HMC-1 세포에서의 항히스타민 효능 평가 결과이다(\* p < 0.01 compared to control group, #p < 0.01 compared to PMACI group). (A)는 1시간, (B)는 6시간, (C)는 12시간 처리한 결과이다.

[0152] 도 10을 참고하면, 무처리군 (control)과 비교하였을 때 PMACI 처리로 인해 유의적으로 히스타민 생성량이 증가하였으며, 개망초 추출물과 지표물질인 피로메콘산 처리로 인해 모든 시간 조건에서 유의적으로 히스타민 생성량이 억제되었다. 즉, 본 발명에 따른 개망초 추출물은 피로메콘산의 함량이 높아 지표물질과 유사하거나 지표물질보다 우수한 항히스타민 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[0154] (5) 항염 효과

[0155] 도 11은 본 발명에 따른 개망초 추출물의 HMC-1 세포에서의 항염증 효능 평가 결과이다. (A)는 RT-qPCR을 이용한 cytokines의 mRNA level 평가, (B)는 ELISA kit를 이용한 cytokines의 protein level 평가 결과이다(\*p < 0.01 compared to control group, #p < 0.01 compared to PMACI group).

[0156] 도 11을 참고하면, A를 통해 PMACI 처리로 인해 전염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, IFN- $\gamma$ 의 생성량이 유의적으로 증가하고, 개망초 추출물 및 피로메콘산 처리로 인해 그 생성량이 유의적으로 감소함을 확인할 수 있다. 또한 B를 통해 단백질 생성량도 개망초 추출물 및 피로메콘산 처리로 인해 유의적으로 감소하였음을 확인하여 HMC-1 비만세포주에 대한 개망초 추출물 및 지표물질 피로메콘산의 항염증 효능을 확인할 수 있었다.

[0157] 도 12는 본 발명에 따른 개망초 추출물의 HaCaT 세포에서의 항염증 효능 평가 결과이다. (A)는 RT-qPCR을 이용한 cytokines의 mRNA level 평가, (B)는 ELISA kit를 이용한 cytokines의 protein level 평가 결과이다(\*p < 0.01 compared to control group, #p < 0.01 compared to TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  group).

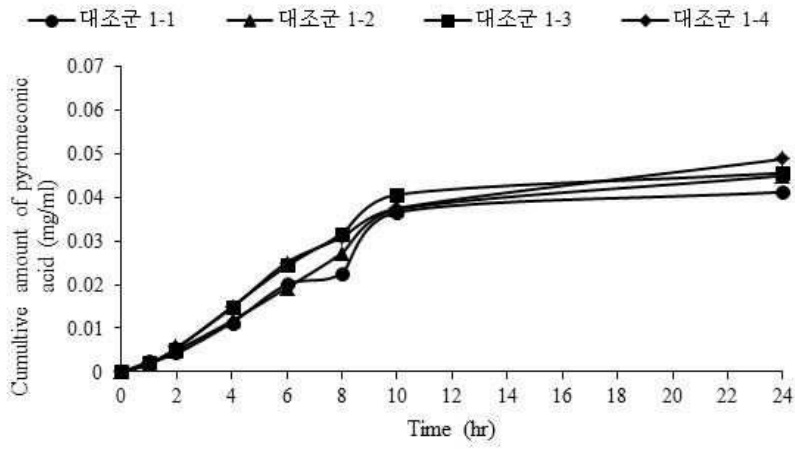
[0158] 도 12를 참고하면, A를 통해 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  처리로 인해 전염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6의 생성량이 유의적으로 증가하고, 개망초 추출물 및 피로메콘산 처리로 인해 생성량이 유의적으로 감소함을 확인할 수 있다. 또한 B를 통해 단백질 생성량도 동일하게 시료 처리로 인해 유의적으로 감소하여 HaCaT 피부 각질세포주에 대한 개망초 추출물 및 지표물질 피로메콘산의 항염증 효능을 확인할 수 있었다.

[0160] 이와 같이, 본 발명의 화장료 조성물 제조방법 및 이에 따라 제조된 화장료 조성물은 개망초 전초를 이용하고, 이를 냉침 추출하여 개망초 추출물의 유효성분인 피로메콘산의 함량을 높임에 따라 항히스타민 작용 효과가 우수하고, 항산화, 항염 효과 역시 우수한 화장료 조성물을 제공한다. 또한 에틸렌글리콜알킬에테르 용해 보조제를 첨가하여 상기 피로메콘산의 피부 흡수율을 개선시켜 상기 기능성 작용 효과를 더 높일 수 있는 점에 기술적 특징이 있다.

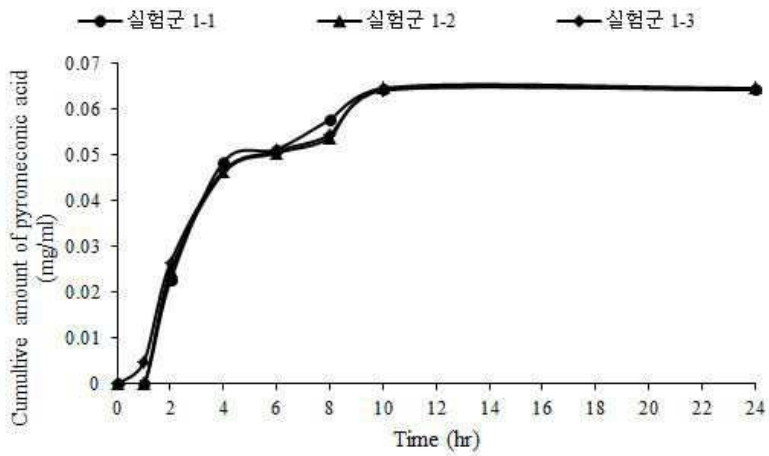
[0162] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 수정 및 변형이 가능할 것이다. 따라서 본 발명에 개신된 실시예는 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라, 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것도 아니다. 본 발명의 보호 범위는 특허청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

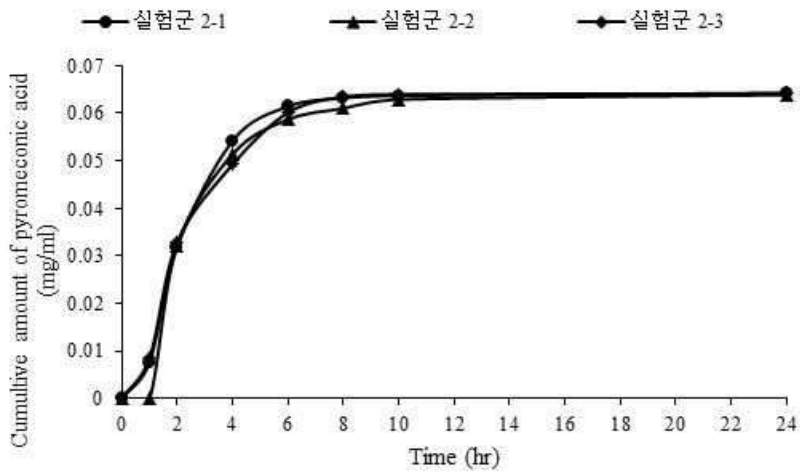
도면1



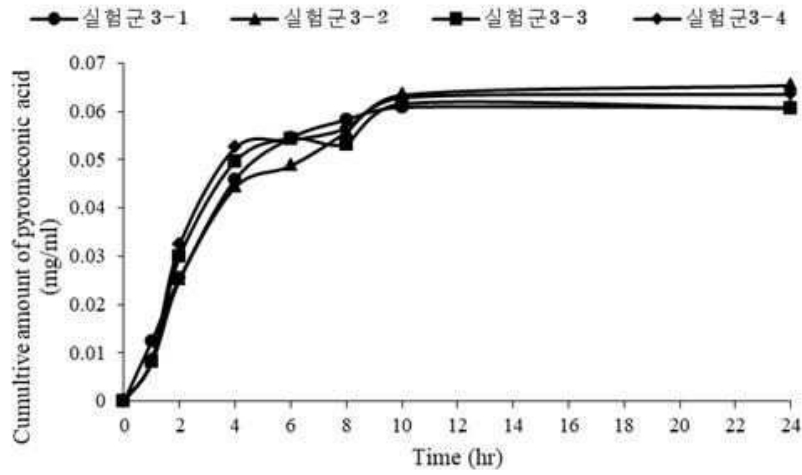
도면2



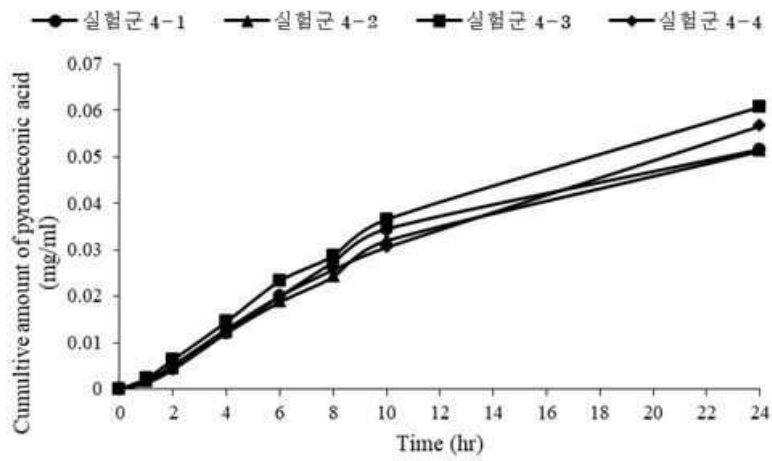
도면3



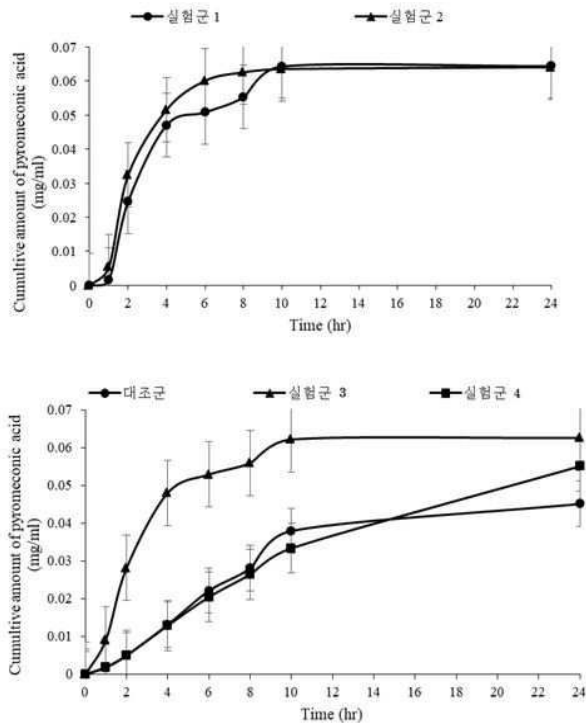
도면4



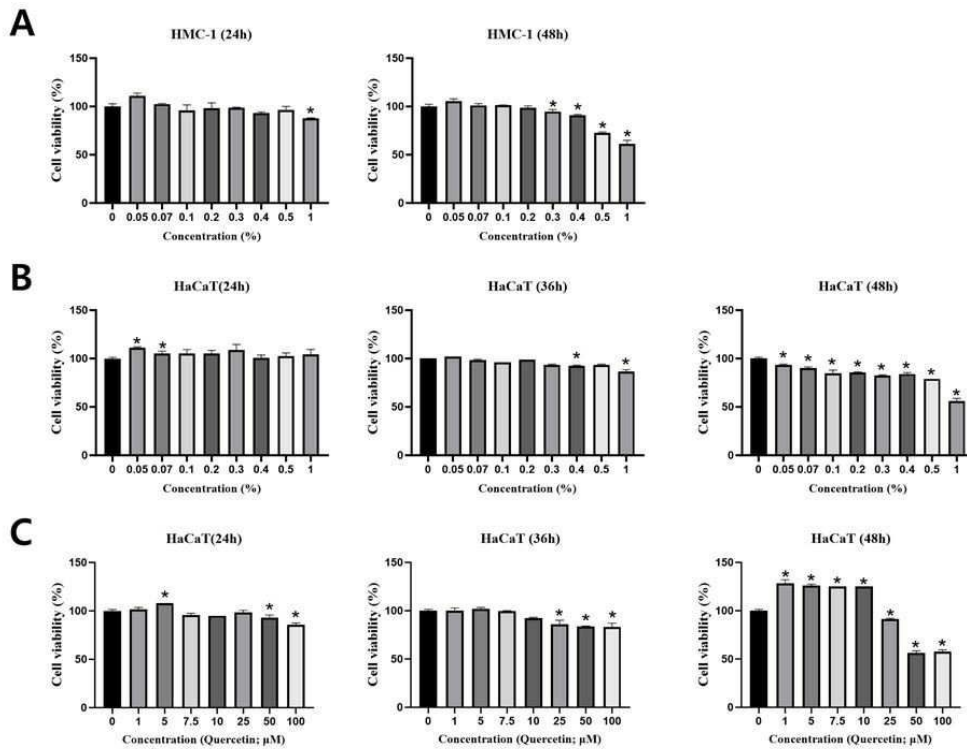
도면5



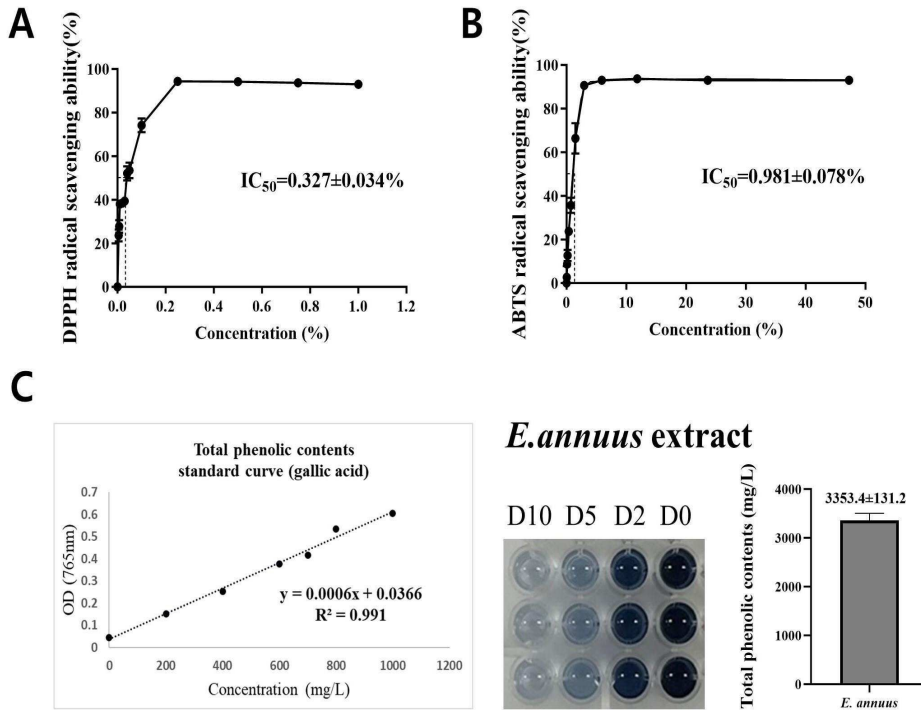
도면6



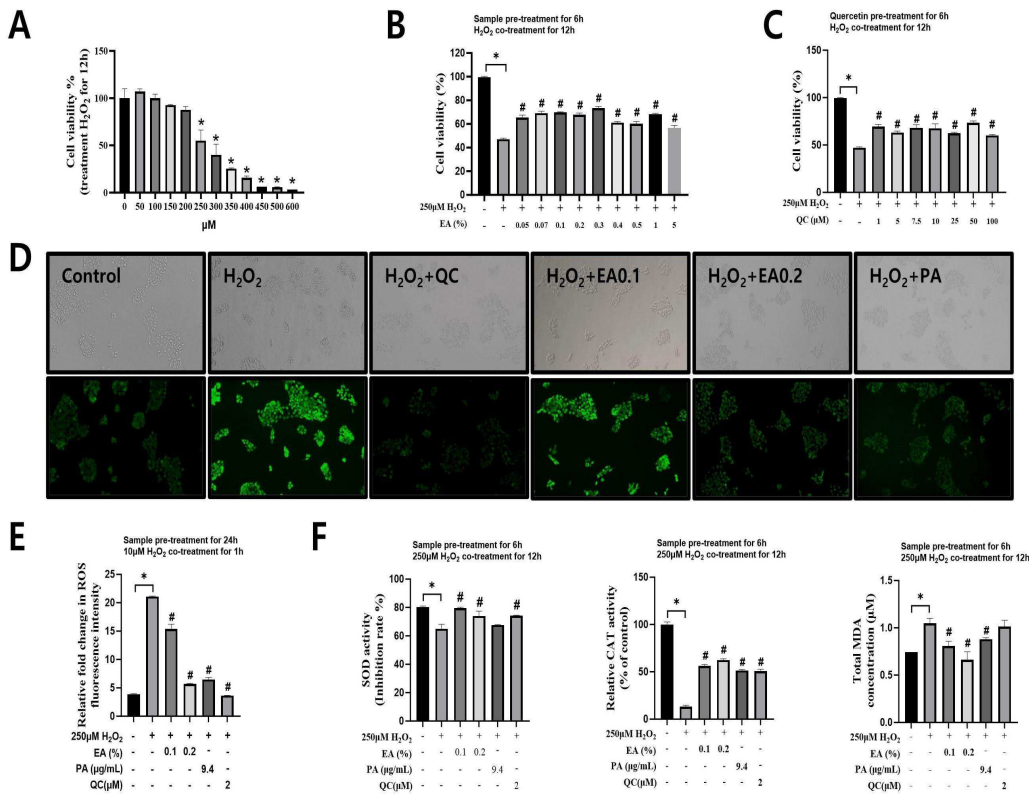
도면7



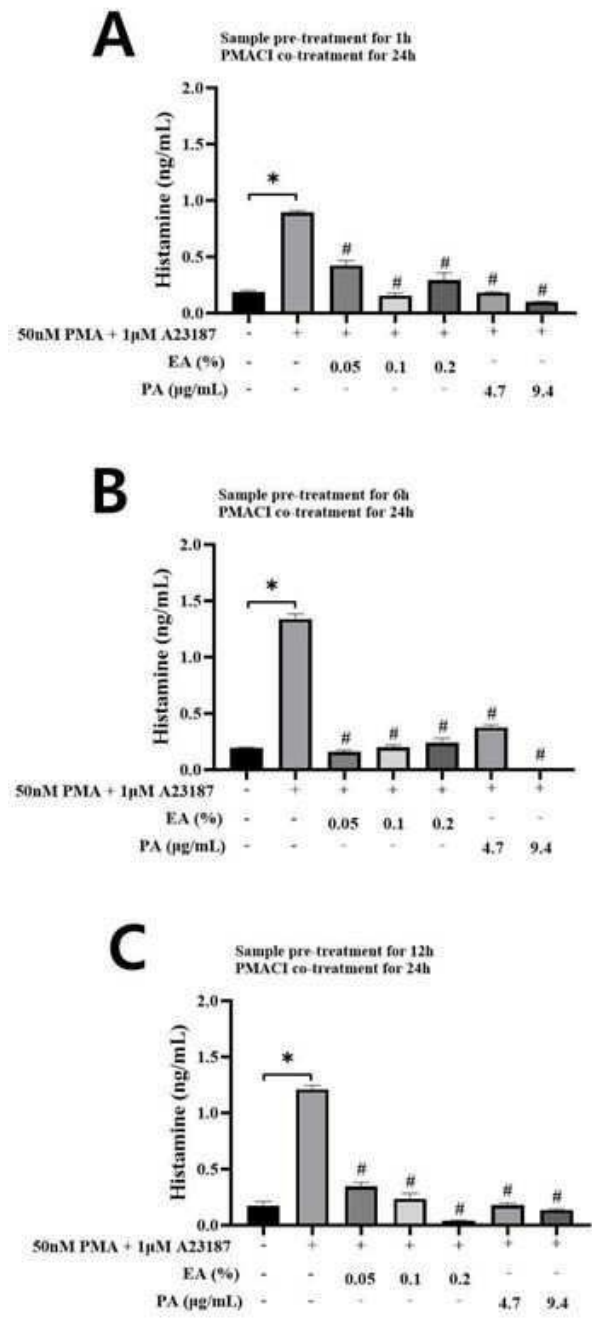
도면8



도면9

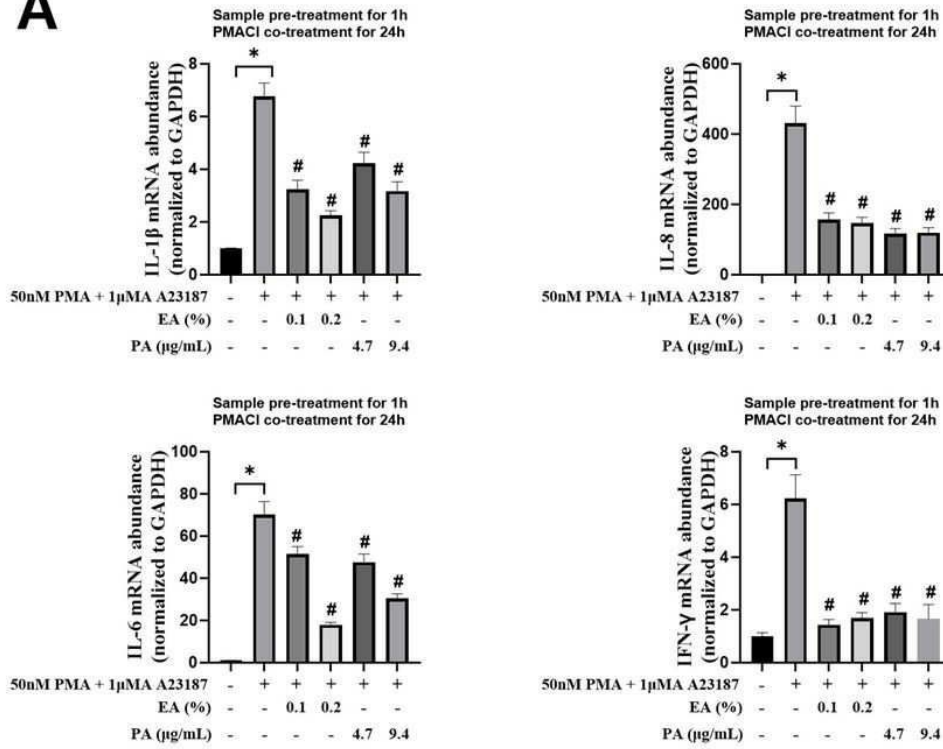


도면10



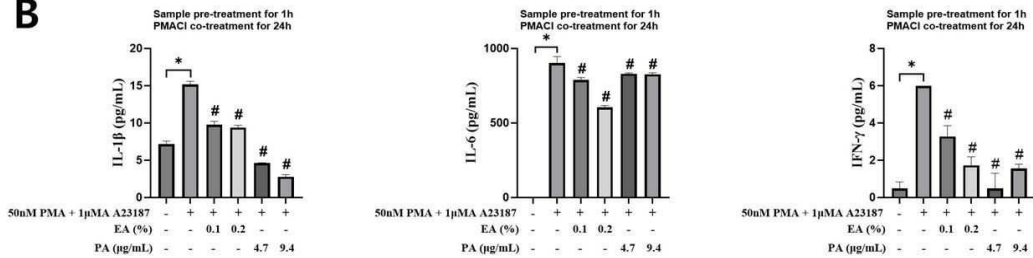
도면11a

**A**



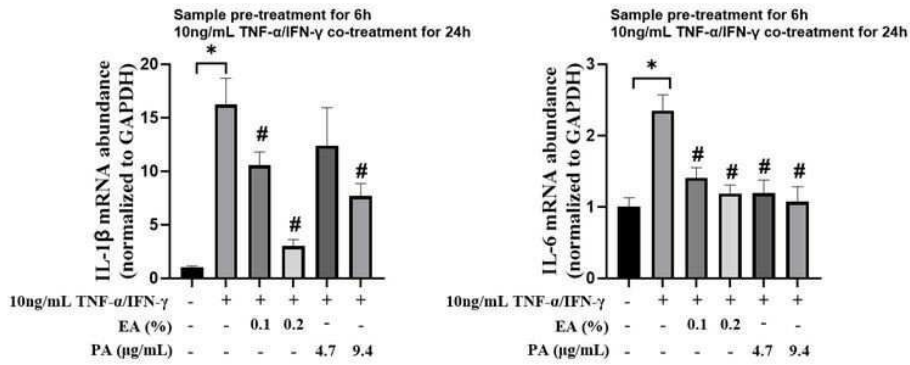
도면11b

**B**



도면12

**A**



**B**

