



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0097771
(43) 공개일자 2016년08월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/30 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 1/3002 (2013.01)
A61K 36/44 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0020018
(22) 출원일자 2015년02월10일
심사청구일자 2015년02월10일

(71) 출원인
주식회사 아토큐엔에이
전라북도 전주시 완산구 천잠로 303 벤처창업관 405호
(72) 발명자
장선일
전라북도 전주시 덕진구 송천로 43, 201동 408호 (송천동1가, 서호2차아파트)
조병욱
전라북도 정읍시 학산로 89-71 상동휴먼시아2단지 204동 1304호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

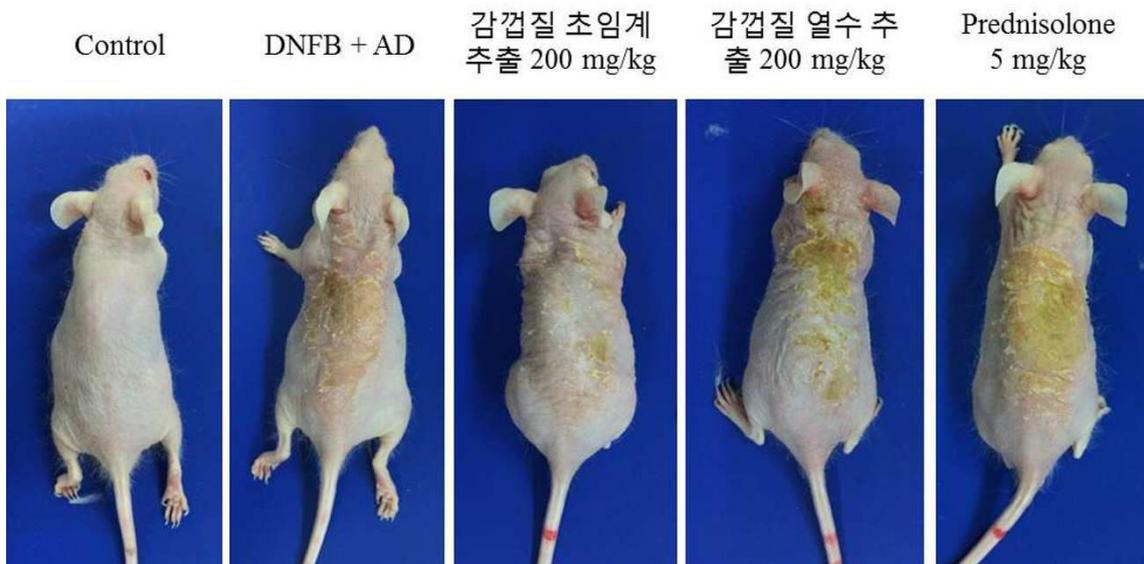
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **감피 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 감피 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물, 약학 조성물 및 화장품 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 버려지는 감피의 활용도를 높일 수 있어 상업적으로 경쟁력이 있고, 아토피 증상의 개선 효과가 증진되어, 아토피 피부염 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품 조성물, 약학 조성물 및 화장품 조성물 등에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)

신재영

전라북도 전주시 완산구 서곡로 8 서곡주공아파트
108동 501호

(72) 발명자

윤홍화

전라북도 익산시 하나로13길 26 우남그랜드타운
106동 114호

하혜옥

전라북도 군산시 하신3길 7, 105동 1006호 (나운동, 보람더하임)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S2173433

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 전라북도중소기업청

연구사업명 2014년 제품·공정개선 기술개발사업

연구과제명 초임계 시스템을 활용한 고순도 및 고기능성 화장품 원료 추출공정 개선개발

기여율 1/1

주관기관 (주)아토큐엔에이

연구기간 2014.05.22 ~ 2015.02.16

명세서

청구범위

청구항 1

감피 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 감피 초임계 추출물은 감피 분말을 초임계 이산화탄소를 용매로 사용하여 30~50℃의 온도 및 250~350 bar의 압력에서 400~470시간 동안 추출하여 제조된 것임을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 감피 분말은 80~120 메쉬의 감피 미세분말인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

감피 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

감피 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 개선용 화장료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 감피 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물, 약학 조성물 및 화장료 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 버려지는 감피의 활용도를 높일 수 있어 산업적으로 경쟁력이 있고, 아토피 증상의 개선 효과가 우수하여 산업적으로 유용하게 이용될 수 있다.

배경 기술

[0002] 아토피 피부염(atopic dermatitis)은 만성 피부염증과 함께 심한 가려움증(pruritus)을 동반한다. 긁고 싶은 감정을 불러일으키는 가려움증은 히스타민과 같은 가려움 매개 물질에 의해서 유도되는데, 정상인의 경우 긁으면 그 증상이 쉽게 완화되지만, 아토피 환자의 경우 긁으면 긁을수록 더욱 긁고 싶은 감정이 형성되어 심하게 긁게 된다. 아토피 환자의 이러한 긁는 행동으로 인해서 피부장벽이 붕괴되고 2차 감염을 유발하여 염증이 더욱 악화된다. 아토피 피부염은 일시적으로 완화될 수 있지만, 환경 및 식품 등 자극원에 의해서 재발되어 악화되며, 악화와 완화가 반복되는 현상으로 그 원인은 아직까지 명확하게 알려지지 않았다. 이와 같이 아토피 피부염에 동반되는 염증은 과도한 면역세포 작용으로 인해 종양괴사인자-알파(TNF- α , tumor necrosis factor- α)와 인터루킨-1(IL-1, interleukin-1) 등의 염증성 사이토카인과 하이드록시 라디칼(\cdot OH), 슈퍼옥사이드 라디칼(\cdot O₂⁻), 과산화수소(H₂O₂) 등과 같은 활성산소류(ROS, reactive oxygen species)를 대량생산하기 때문에 주변 조직의 손상을 야기한다. 그러므로 아토피 피부염과 같은 피부질환을 개선시키기 위해서는 가려움증을 완화시키고 활성산소류를 효과적으로 제거할 수 있는 소재가 필요하다.

[0003] 식용 및 약용으로 재배적 가치가 있는 감나무(*Diosoyros kaki*)의 품종은 크게 단감과 뚝은감으로 분류되는데, 단감나무는 주로 일본에서 재배되고, 뚝은감나무는 우리나라와 중국에서 주로 재배된다. 우리나라에서 재배되고 있는 고유종인 뚝은감나무는 감의 가치를 높이기 위해서 지속적으로 개량되어 왔는데, 그 종류는 고종시, 청도반시, 동시, 사곡시, 단성시, 장등이, 월하시 및 갑주백목 등으로 각 지역의 기온 및 토양의 특성에 따라 다양하게 재배되고 있다. 전라북도 진안군과 완주군의 운장산 일대는 뚝은 재래 품종의 고종시가 대표적으로 재배되고 있다.

[0004] 감은 알칼리성 과일로서, 영양이 풍부하여 포도당, 과당 등의 당질이 풍부하고, 달은맛을 내는 탄닌산이 풍부하며, 비타민 C의 함량은 동량의 사과보다 약 5~20배 높고 무기질이 풍부한 과일이지만, 단감을 제외하고는 숙성시킨 연시(홍시)와 귤감으로 주로 활용된다.

[0005] 감 껍질에 포함되어 있는 탄닌 및 프로안토시아니딘 성분은 수용성의 물질로 항균, 항산화, 항종양 및 중금속 제거와 같은 생리활성이 알려져 있고, 항비만 및 동맥경화 예방 효과가 있는 것으로 보고되었다. 최근에는 감 껍질의 폴리페놀 성분이 항산화 및 항유전독성(antigenotoxic) 효과가 매우 우수함이 알려지면서 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 감 껍질에는 카로티노이드(carotenoid)가 풍부하여 항산화 효과는 물론, 최근에는 카로티노이드류 중 프로안토시아니딘(proanthocyanidin)은 제2형 당뇨병에 대해 항당뇨 효과가 우수한 것으로 알려졌다. 하지만 아토피 피부염에서 나타나는 염증과 가려움증 완화에 대한 감 껍질의 효과에 대한 문헌은 전혀 찾아볼 수 없다.

[0006] 한국등록특허 제1291343호에는 후코이단 및 생약성분 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 증상 개선용 크림이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1418916호에는 톱 추출물을 유효성분으로 하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물이 개시되어 있으나, 본 발명의 감피 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 조성물과는 상이하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 감피 초임계 추출물이 다른 방법으로 추출한 감피 추출물들에 비해 염증 매개 및 염증성 사이토카인 생성을 억제시키며, 아토피 피부염 유도 동물 실험에서 대조구 및 다른 감피 추출물에 비해 유의적으로 높은 아토피 피부염 개선 효과를 나타냄을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 감피 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 감피 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 감피 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 주로 버려지는 자원인 감피를 이용하기 때문에 폐자원의 활용도를 높일 수 있어 상업적으로 경쟁력이 있고, 또한, 감피 초임계 추출물은 항산화 활성이 증진되고 염증 매개 및 염증성 사이토카인 생성을 억제시키며, 대식세포주에 대한 세포독성을 나타내지 않으면서 아토피 피부염 유도 동물 실험에서 대조구 및 다른 감피 추출물에 비해 유의적으로 높은 아토피 피부염 개선 효과를 나타내어, 아토피 피부염 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품, 화장품 및 약학 조성물 등에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 감피 초임계 추출공정을 나타낸 것이다.

도 2는 감피 초임계 추출물 및 메탄올 추출물의 농도별 DPPH 라디칼 소거능을 비교한 그래프이다.

도 3은 감피 초임계 추출물 및 메탄올 추출물의 농도별 ABTS 라디칼 소거능을 비교한 그래프이다.

도 4는 감피 초임계 추출물의 농도별 처리 시 RAW 264.7 세포의 생존율을 비교한 그래프이다.

도 5는 감피 초임계 추출물을 농도별 처리하고 LPS로 자극한 후 NO 생성량을 비교한 그래프이다.

도 6은 감피 초임계 추출물, 메탄올 추출물 및 열수 추출물을 각각 처리하고 LPS로 자극한 후 NO 생성량을 비교한 그래프이다.

도 7은 감피 초임계 추출물, 메탄올 추출물 및 열수 추출물을 각각 처리하고 LPS로 자극한 후 PGE₂ 생성량을 비교한 그래프이다.

도 8은 감피 초임계 추출물, 메탄올 추출물 및 열수 추출물을 각각 처리하고 LPS로 자극한 후 IL-1β 생성량을 비교한 그래프이다.

도 9는 감피 초임계 추출물, 메탄올 추출물 및 열수 추출물을 각각 처리하고 LPS로 자극한 후 I1-6 생성량을 비교한 그래프이다.

도 5 내지 9의 #: LPS를 처리하지 않은 대조구와 비교하여 $p < 0.001$ 수준에서 유의차가 있음, *: LPS 처리구와 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의차가 있음, **: LPS 처리구와 비교하여 $p < 0.01$ 수준에서 유의차가 있음, ***: LPS 처리구와 비교하여 $p < 0.001$ 수준에서 유의차가 있음을 의미함.

도 10은 실험동물에 아토피 피부염을 유도하면서 감피 초임계 추출물, 열수 추출물 및 프레드니솔론(Prednisolone)을 각각 처리한 후 아토피 피부염 개선 여부를 관찰한 결과이다.

도 11은 실험동물에 아토피 피부염을 유도하면서 감피 초임계 추출물, 열수 추출물 및 프레드니솔론(Prednisolone)을 각각 처리한 후 피부병변 정도를 점수화한 그래프이다.

도 12는 실험동물에 아토피 피부염을 유도하면서 감피 초임계 추출물, 열수 추출물 및 프레드니솔론(Prednisolone)을 각각 처리한 후 아토피 피부염 유발 부위의 피부 두께를 측정된 결과이다.

도 13은 실험동물에 아토피 피부염을 유도하면서 감피 초임계 추출물, 열수 추출물 및 프레드니솔론(Prednisolone)을 각각 처리한 후 혈청의 IgE 생성 억제 효과를 비교한 그래프이다.

도 14는 실험동물에 아토피 피부염을 유도하면서 감피 초임계 추출물, 열수 추출물 및 프레드니솔론(Prednisolone)을 각각 처리한 후 혈청의 IL-4 생성 억제 효과를 비교한 그래프이다.

도 10 내지 14의 Control: 무처리 실험동물, DNFB+AD: DNFB(2,4-dinitrofluorobenzene) 및 집먼지 진드기 항원 도포 실험동물을 의미함.

도 11 내지 14의 #: 대조구(Control)와 비교하여 $p < 0.001$ 수준에서 유의차가 있음, *: DNFB+AD 처리구와 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의차가 있음, **: DNFB+AD 처리구와 비교하여 $p < 0.01$ 수준에서 유의차가 있음, ***: DNFB+AD 처리구와 비교하여 $p < 0.001$ 수준에서 유의차가 있음을 의미함.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 감피 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에서, 상기 감피 초임계 추출물은 바람직하게는 감피 분말을 초임계 이산화탄소를 용매로 사용하여 30~50℃의 온도 및 250~350 bar의 압력에서 400~470시간 동안 추출하여 제조된 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 감피 분말을 초임계 이산화탄소를 용매로 사용하여 용매를 유속 50~70 mL/분으로 공급하고 추가로 에탄올을 보조용매로 사용하여, 30~50℃의 온도 및 250~350 bar의 압력에서 400~470시간 동안 추출하여 제조된 것일 수 있으며, 가장 바람직하게는 감피 분말을 초임계 이산화탄소를 용매로 사용하여 용매를 유속 60 mL/분으로 공급하고 추가로 에탄올을 보조용매로 사용하여, 40℃의 온도 및 300 bar의 압력에서 435시간 동안 추출하여 제조된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 감피 초임계 추출물은 다른 방법으로 추출한 감피 추출물에 비해 아토피 피부염 개선 효과를 더욱 향상시킬 수 있었다.
- [0015] 또한, 본 발명의 아토피 피부염 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에서, 상기 감피 분말은 바람직하게는 80~120 메쉬의 감피 미세분말일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 100 메쉬의 감피 미세분말일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 또한, 본 발명의 상기 건강기능식품은 아토피 피부염을 예방하거나 개선하기 위해 섭취할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않는다.
- [0017] 본 발명의 상기 추출물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에

본 발명의 추출물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 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.

- [0018] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0019] 본 발명의 건강 음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르트삼과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0020] 상기 외에 본 발명의 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 감피 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 약학 조성물에서, 감피 초임계 추출물은 상기 건강식품 조성물에서 기재한 바와 같다.
- [0022] 본 발명의 아토피 피부염 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.02 내지 80 중량%, 바람직하게는 0.02 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 추출물을 포함하는 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하여 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 추출물의 약학적 투여 형태는 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 추출물을 포함하는 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 슈크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 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, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 또한, 본 발명에 의한 조성물은 단독으로 투여되거나 다른 약제와 동등하게 또는 다른 약제를 보

조하기 위해 함께 투여될 수 있다. 또한, 각 제형의 조성물에 있어서, 상기한 필수 성분인 조성물 이외의 다른 성분들은 기타 외용제의 제형 또는 사용목적 등에 따라 당업자가 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 이 경우 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.

[0027] 본 발명의 추출물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 감피 초임계 추출물을 유효성분으로 함유하는 아토피 피부염 개선용 화장료 조성물을 제공한다. 본 발명의 화장료 조성물에서, 감피 초임계 추출물은 상기 건강식품 조성물에서 기재한 바와 같다.

[0029] 본 발명의 아토피 피부염 개선용 화장료 조성물에 있어서, 상기 아토피 피부염 개선용 화장료 조성물은 피부외 용연고, 크림, 유연화장수, 영양화장수, 팩, 에센스, 헤어토닉, 샴푸, 린스, 헤어 컨디셔너, 헤어 트리트먼트, 젤, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 마사지 크림, 영양크림, 아이크림, 모이스처 크림, 핸드 크림, 파운데이션, 영양에센스, 선스크린, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디 로션 및 바디 클렌저로 이루어지는 군으로부터 선택된 제형을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이들 각 제형의 조성물은 그 제형의 제제화에 필요하고 적절한 각종의 기재와 첨가물을 함유할 수 있으며, 이들 성분의 종류와 양은 당업자에 의해 용이하게 선정될 수 있다.

[0030] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 진분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산아연 등이 이용될 수 있다.

[0031] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 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.

[0033] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록사이드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0034] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0035] 본 발명의 아토피 피부염 개선용 화장료 조성물에서, 상기 아토피 피부염 개선용 화장료 조성물은 상기 감피 초임계 추출물을 상기 조성물의 총 중량을 기준으로 0.0001 내지 10% 함유되어 있을 수 있고, 바람직하게는 0.005 내지 1% 함유되어 있을 수 있으나, 바람직한 아토피 피부염의 개선 효과를 제공할 수 있는 유효량을 포함한다면 이에 제한되지 않는다.

[0036] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] **1. 감피 추출물 제조**

[0038] **(1) 감 껍질의 미세분말 제조**

[0039] 꽃감용으로 사용되는 신선한 고종시 감(뽕은감)은 전라북도 진안군 정천면 학동마을에서 2014년 11월 10일에 채

취하였다. 채취된 감 껍질은 그늘진 자연 상태에서 15일간 건조한 후 최종적으로 건조기에서 37~40℃로 12시간 동안 충분히 건조하여 수분 함량을 7%로 조정한 감 껍질을 100 메쉬 미세분말로 제조하였다.

[0040] (2) 초임계 추출

[0041] 초임계 추출은 하기 표 1 및 도 1의 공정으로 추출하였다.

표 1

초임계 추출조건

| 추출조건 | | 보조용매 (에탄올) 유량(ml/min) | 분리조 | | 추출시간 (min) | CO ₂ 유량 (ml/min) |
|---------|-------|-----------------------------|---------|-------|---------------|--------------------------------|
| 압력(bar) | 온도(℃) | | 압력(bar) | 온도(℃) | | |
| 300 | 40 | 6 ml/min | 40 | 40 | 435 | 60 ml |

[0043] (3) 초임계 추출물의 동결건조

[0044] 상기와 같이 추출된 초임계 추출물을 -70℃ 상태로 진공 감압하여 동결건조하여 총 20 g을 얻고 실험에 사용하였다.

[0045] 2. 실험방법

[0046] (1) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

[0047] DPPH 라디칼 소거 활성은 Blois(Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200 (1958))의 방법으로 측정하였다. 시료를 메탄올로 녹여 최종 농도가 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1000 µg/mL이 되도록 정량하여 96 웰 플레이트에 각 시료를 100 mL를 주입하고, 동시에 0.3 mM DPPH 100 µl를 넣어 총량이 200 µl가 되도록 하였다. 실온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA 리더(Tecan Group Ltd., Mannedorf, Swizerland)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

[0048] DPPH 라디칼 소거 활성(%) = {1 - (시료 첨가군 흡광도/시료 무첨가군 흡광도)} × 100

[0049] (2) 세포배양

[0050] 본 실험에 사용된 세포는 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포로 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하였다. 10% FBS(fetal bovine serum; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 100 units/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium) 배지(GIBCO-BRL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였으며, 세포 밀도가 90%로 포화되었을 때 계대 배양하며 실험에 사용하였다.

[0051] (3) 세포생존율

[0052] 세포생존율은 Ez-Cytox cell viability assay kit(DAEIL lab, Seoul, Korea)를 사용하였으며, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다. 먼저 RAW 264.7 세포를 96 웰 플레이트에 최종농도가 2×10⁵ cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양한 후 각 추출물을 여러 가지 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 EZ-Cytox 시약 10 µl를 넣고 3시간 동안 배양한 후 마이크로플레이트 리더(Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포생존율은 대조군에 대한 생존율로 나타내었다.

[0053] (4) RAW 264.7 세포주 대상 NO, PGE₂ 및 사이토카인 측정

[0054] RAW 264.7 세포를 96 웰 플레이트에 최종농도가 2×10^5 cells/mL가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양한 후 각 추출물을 처리한 다음, 1시간 후 LPS(1 µg/mL)를 처리하여 18시간 배양하였다. 세포 배양액 100 µl와 그리스 시약 100 µl를 혼합하여 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 마이크로플레이트 리더를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 질산나트륨(sodium nitrate)으로 표준곡선을 작성하여 NO 생성량을 산출하였다.

[0055] 또한 PGE₂와 사이토카인은 상기와 같은 방법으로 각 추출물을 처리하고 LPS로 자극한 후 18시간 배양한 다음 상층액을 대상으로 PGE₂, TNF-α, IL-1β와 IL-6에 대한 각각의 TNF-α, IL-1β, IL-4와 IgE 등은 항-마우스 TNF-α, 항-마우스 IL-1β, 항-마우스 IL-6와 항-마우스 IgE ELISA kit를 활용하여 R&D system사(Minneapolis, USA)가 제공하는 방법으로 측정하고 정량하였다. 요약하면, 세포상층액 100 µl를 각각의 항체가 코팅된 플레이트에 주입하고 반응시킨 후 잘 세척한 다음 고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase)가 부착된 2차 항체를 주입하고 반응시킨 후 발색 기질을 주입하고 반응시켜 ELISA 리더(Molecular Devices, USA)로 측정하였으며, 각 물질에 대한 정량은 각각의 물질을 농도별로 처리하여 반응시켜 표준곡선을 정하고 세포상층액 또는 혈청에 함유된 물질의 양을 계산하였다.

[0056] (5) 실험동물

[0057] 무균환경에서 사육된 7주령의 수컷 헤어리스 마우스는 중앙실험동물(주)(서울시, 대한민국)에서 구입하였고, 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 낮과 밤의 주기를 12시간씩 하였고, 온도(20~22°C)와 습도(50~60%)는 일정하게 유지하였으며, 실험동물위원회의 규정에 준하여 실험하였다.

[0058] (6) DNFB 및 집먼지 진드기 항원 도포에 의한 아토피 피부염 유도

[0059] 화학항원 유도 아토피 피부염 모델 동물을 유도하기 위해서 아세톤과 올리브 오일을 3:1로 제조된 용매에 0.15% DNFB를 제조하여 1일과 4일에 각각 등쪽 피부(100 µl)에 감작(sensitization)하였다. 두 번째 감작일인 4일부터 대조군은 생리식염수를 경구투여하였고, 추출물은 하루에 한번 실험 종료일까지 경구투여하였다. 첫 번째 감작일로부터 7일, 10일과 13일에 3일 간격으로 0.2% DNFB를 도포한 후 완전히 건조 후 마리당 100 mg의 집먼지 진드기 항원 유래 Biostir AD 연고(Biostir, Hyogo, Japan)를 3회 도포하여 공격(challenge)을 하였다.

[0060] (7) 혈청 및 조직의 두께 측정

[0061] 마지막 공격 5시간 후에 마우스의 간 문맥으로부터 혈액을 채취하여 혈청을 얻고, 등 피부조직의 두께는 디지털 캘리퍼(Mitutoyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

[0062] (8) 피부병변의 평가

[0063] 피부상태는 실험 종료 후 사진을 찍어 조사하였다. 피부의 건조상태(dryness)와 스킨링(scaling) 그리고 미란(erosion), 찰과상(excoriation), 출혈 등을 체크하여 병변이 없는 상태를 0점(none), 가벼운 상태를 1점(mild), 중간 상태를 2점(moderate), 심한 상태를 3점(severe)을 주었고 각 단계별로 총점수를 부여하여 평가하였다.

[0064] (9) 혈청의 IgE와 IL-4 사이토카인 측정

[0065] 아토피 피부염 모델 마우스의 IL-4와 IgE 측정은 추출물 투여 종료 후 5시간에 혈청을 취하고 혈청으로부터 IgE, IL-4를 측정하였다. IL-4와 IgE 등은 항-마우스 IL-4와 항-마우스 IgE 등 항체를 사용하여 각각에 특이적으로 작용하는 ELISA kit를 사용하여 R&D Systems사가 제공하는 방법에 준하여 측정하고 정량하였다. 요약하면, 세포상층액 또는 5배 희석 혈청 100 µl를 각각의 항체가 코팅된 플레이트에 주입하고 반응시킨 후 잘 세척한 다

음 고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase)가 부착된 2차 항체를 주입하고 반응시킨 후 발색 기질을 주입하고 반응시켜 ELISA 리더(Molecular Devices, USA)로 측정하였으며, 각 물질에 대한 정량은 각각의 물질을 농도별로 처리하여 반응시켜 표준곡선을 정하고 세포상층액 또는 혈청에 함유된 물질의 양을 계산하였다.

[0066] **실시예 1: 감피 추출물의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능**

[0067] 감피 초임계 추출물 및 메탄올 추출물의 농도별 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능은 도 2 및 3과 같다. 그 결과 추출물의 농도가 높아질수록 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능은 증가하였고, 감피 메탄올 추출물에 비해 감피 초임계 추출물이 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능이 더 높게 나타났다.

[0068] **실시예 2: 세포생존율**

[0069] 배양한 RAW 264.7 세포에 감피 초임계 추출물을 농도별로 처리하여 배양한 후 세포생존율을 측정한 결과, 모든 농도에서 감피 초임계 추출물은 세포생존율에 영향을 주지 않아 독성이 없음을 확인하였다(도 4).

[0070] **실시예 3: 산화질소(Nitric oxide, NO) 및 PGE₂ 생성량**

[0071] 배양한 RAW 264.7 세포에 농도별 감피 추출물을 처리한 다음 LPS를 처리하고 배양하여 NO 생성량을 측정한 결과, 감피 초임계 처리 농도가 높아질수록 NO 생성량이 감소하였다(도 5). 또한, 감피 추출 방법에 따른 NO 및 PGE₂ (Prostaglandin-E2) 생성량을 비교한 결과, 감피 메탄올 추출물 및 열수 추출물에 비해 감피 초임계 추출물의 NO 및 PGE₂ 생성량이 유의적으로 낮음을 확인하였다(도 6 및 7).

[0072] **실시예 4: 사이토카인 생성량**

[0073] 배양한 RAW 264.7 세포에 농도별 감피 추출물을 처리한 다음 LPS를 처리하고 배양하여 사이토카인의 생성량을 측정한 결과, 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 경우 감피 추출물을 처리하지 않은 처리구에 비해 감피 추출물 처리 시 유의적으로 IL-1 β 생성을 억제하였고, 추출물 중 감피 초임계 추출물 처리 시 가장 현저하게 생성을 억제하였다(도 8). 또한, IL-6의 경우 감피 메탄올 추출물 및 열수 추출물은 억제능이 없었으나, 감피 초임계 추출물 처리 시 현저하게 억제하는 효과를 나타내었다(도 9).

[0074] **실시예 5: 아토피 피부염 완화 효과**

[0075] 상기 실시예 3 및 4의 결과, 감피 추출물 중, 메탄올 추출물의 경우 세포 수준에서 염증 매개 및 염증성 사이토카인의 억제 효과가 열수 추출물에 비해 낮아서 열수 추출물을 선택하여 초임계 추출물과 비교하였다.

[0076] 헤어리스 마우스를 대상으로 실험방법에서 나타난 바와 같이 DNFB와 AD를 사용하여 아토피 피부염 모델을 유도 하면서 감피 초임계 추출물, 열수 추출물과 가려움 억제 표준물질로 알려진 프레드니솔론(Prednisolone)을 처리하여 아토피 피부염 유도 억제를 실험한 결과, 감피 초임계 추출물은 열수 추출물과 표준 약물보다 더 아토피 피부염을 완화시키는 데 효과가 있음을 확인하였다(도 10).

[0077] **실시예 6: 피부병변 평가 및 피부두께 측정**

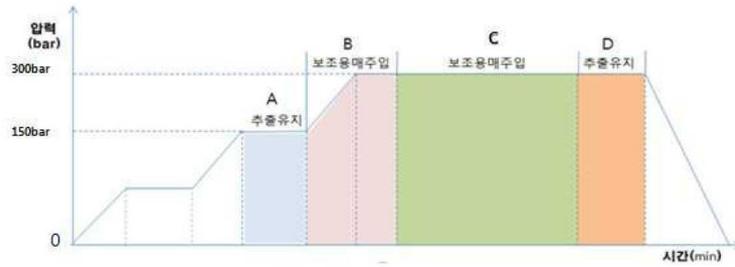
[0078] 헤어리스 마우스를 대상으로 실험방법에서 나타난 바와 같이 DNFB와 AD를 사용하여 아토피 피부염 모델을 유도 하면서 감피 초임계 추출물, 열수 추출물과 가려움 억제 표준물질로 알려진 프레드니솔론(Prednisolone)을 처리한 후 피부병변 및 아토피 피부염 유발 부위의 피부 두께를 측정한 결과, 감피 초임계 추출물 처리 시 열수 추출물 및 표준 약물 처리시보다 낮은 점수를 나타내어, 병변 상태가 더 양호함을 확인하였다(도 11). 또한, 아토피 피부염 유발 부위의 피부 두께를 측정한 결과, DNFB+AD 처리군에 비해 감피 초임계 추출물 처리구의 경우만 감소하는 효과를 얻었다(도 12).

[0079] 실시예 7: 혈청의 IgE 및 IL-4 사이토카인 생성능

[0080] 혈청을 대상으로 아토피 바이오 마커인 IgE와 IL-4의 생성능을 조사한 결과, 감피 초임계 추출물의 경우 열수 추출물과 표준물질인 프레드니솔론(Prednisolone)에 비해 혈청 IgE 및 IL-4의 억제 효과가 우수하였다(도 13 및 14).

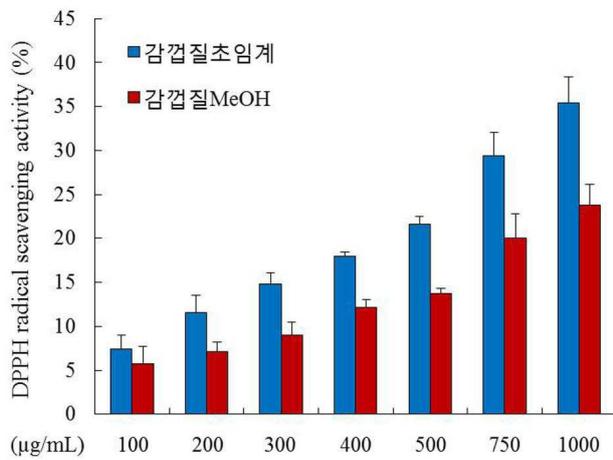
도면

도면1

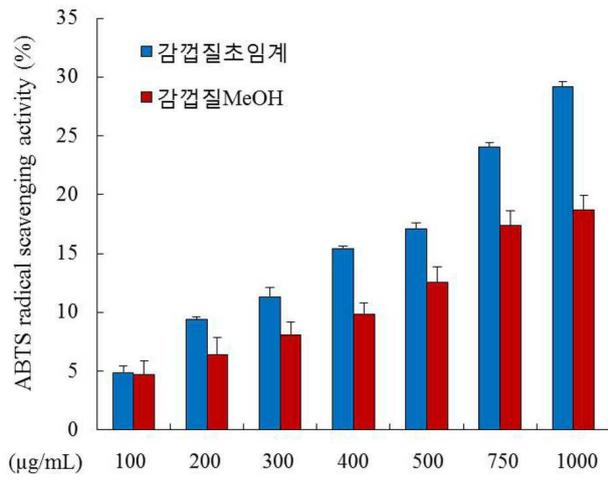


| 추출공정 (분) | 등압 | 피정 | 가압 | 추출 유지 | 보조용매 주입/가압 | 보조용매 주입 | 추출 유지 | 감압 | 총추출 시간 |
|----------|----|----|----|-------|------------|---------|-------|----|--------|
| | 10 | 10 | 10 | 30 | 15 | 360 | 30 | 10 | 435 |

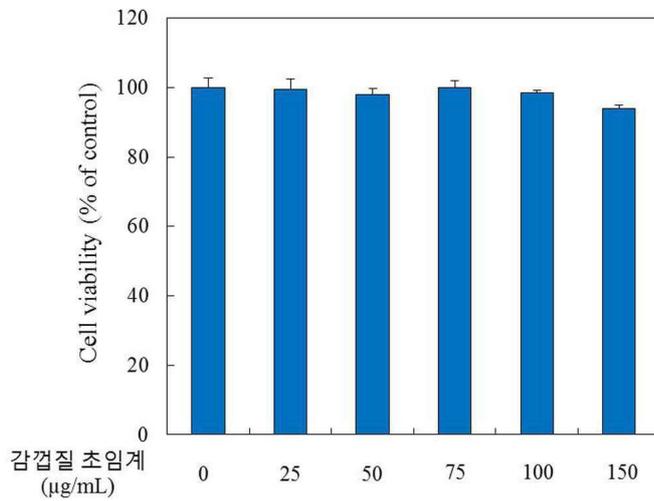
도면2



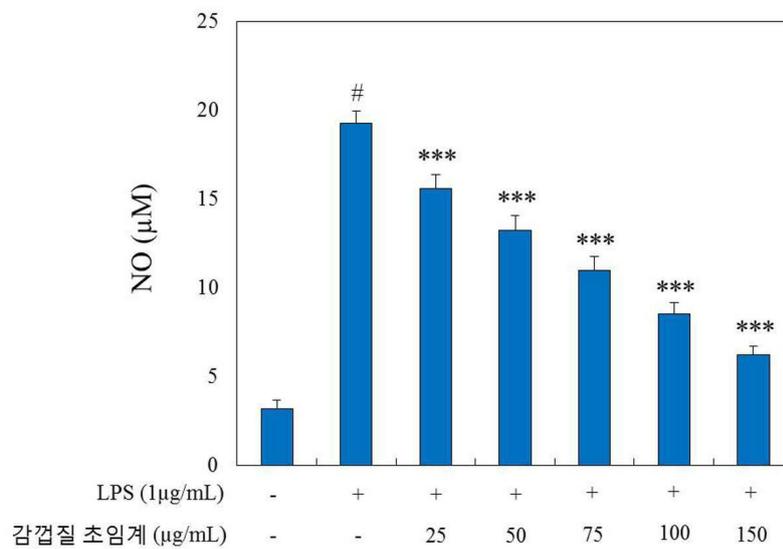
도면3



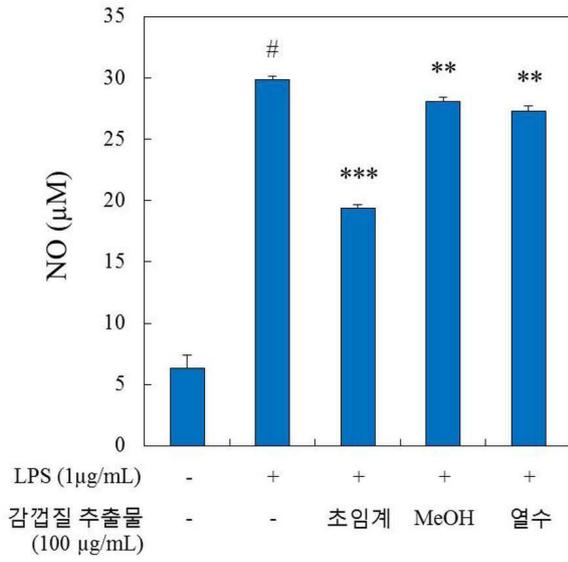
도면4



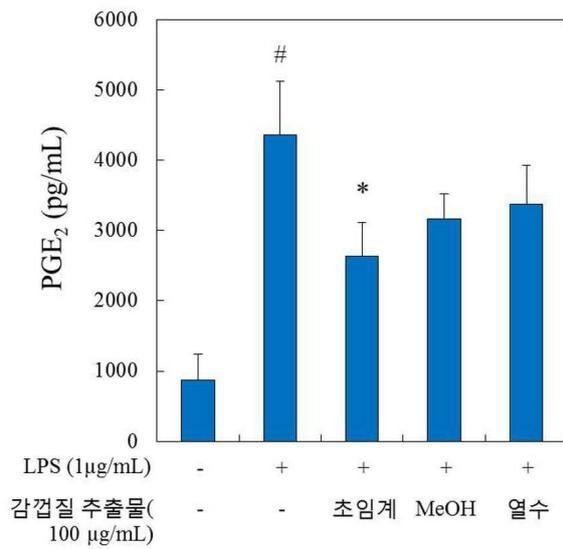
도면5



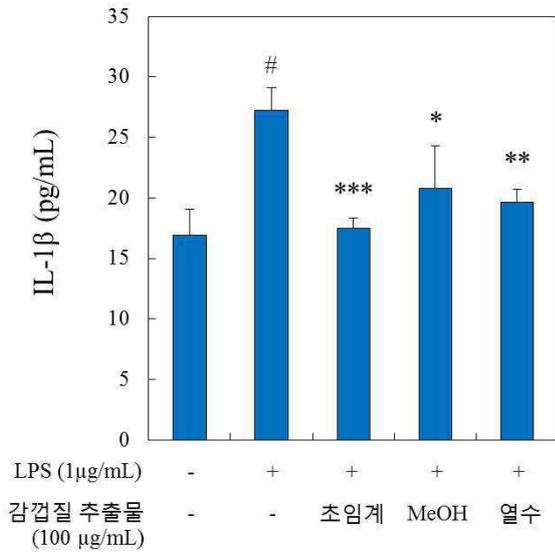
도면6



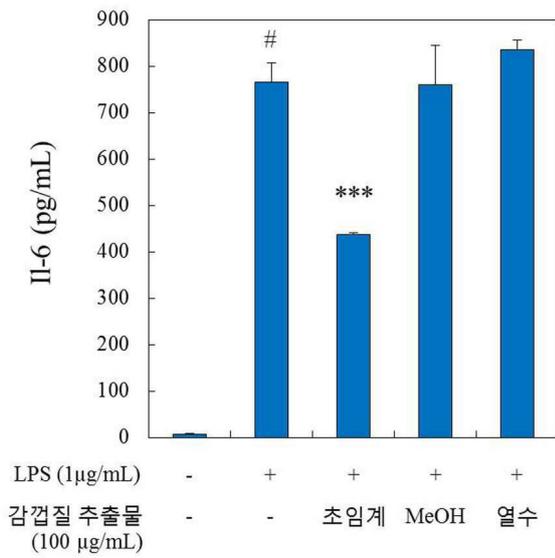
도면7



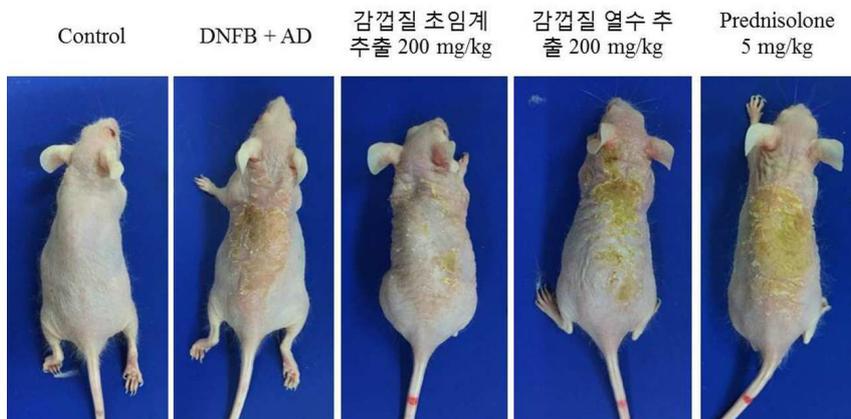
도면8



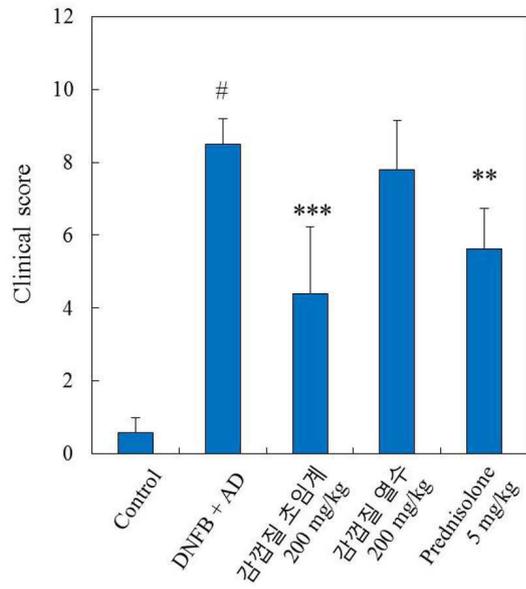
도면9



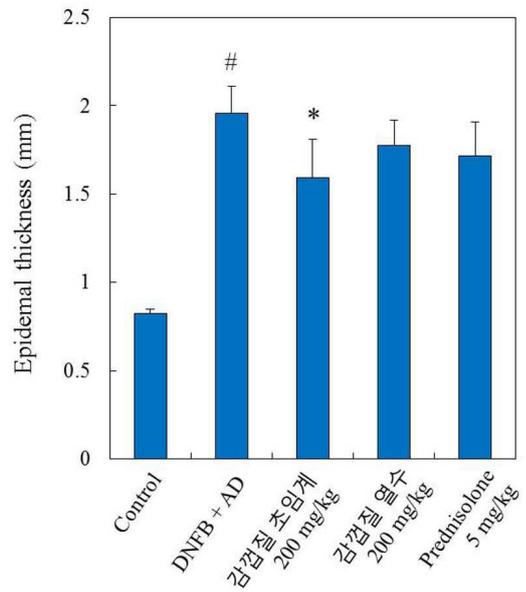
도면10



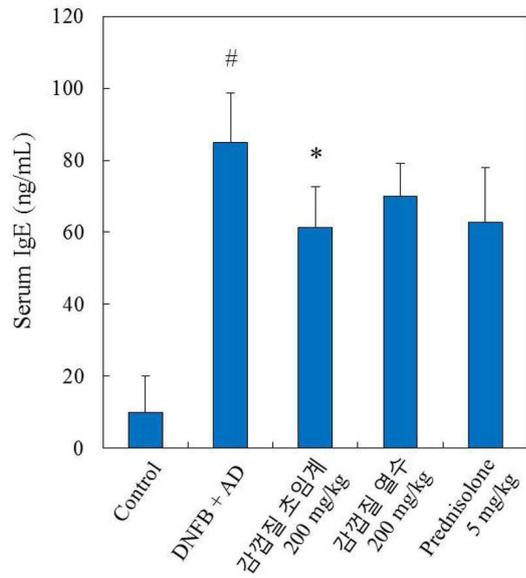
도면11



도면12



도면13



도면14

