

보안과제(), 일반과제(O)

과제번호 : 106027-03-3-CG000

황토국화를 이용한 아토피 치료용 기능성
화장품의 개발

Development of atopic cosmetics from
mud chrysanthemum

성균관대학교 산학협력단

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “황토국화를 이용한 아토피 치료용 기능성 화장품의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2009 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 성균관대학교

총괄연구책임자 : 지옥표

연 구 원 : 최 한

강세찬

이창민

박종혁

이종욱

김현정

최형진

안은환

김희정

김동수

김종성

윤재웅

협동연구기관명 : (주)더마랩

협동연구책임자 : 정의수

위탁연구기관명 : 한국한의학연구소

위탁연구책임자 : 마진열

요 약 문

I. 제 목

황토국화를 이용한 아토피 치료용 기능성 화장품의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1) 아토피성 피부질환의 확대

- 현대사회는 산업화로 지구환경에 급격한 변화가 초래되어 사람의 건강에 심각한 영향을 미치게 됨. 그 결과 각종 만성 및 난치성 질환이 급속히 증가하고 있으며 사람의 몸을 둘러싸고 있는 피부에도 여러 질환들이 유발되고 있음.
- 아토피성 피부염은 원인을 알기 어렵고 따라서 치료가 힘든 난치성 질환임. 흔히 태열이라고 부르는 유아습진으로 시작하여 나이가 들면서 증상이 대체로 호전되나 최근에는 성인기까지 중증의 피부염이 지속되고 있으며 그 수가 폭증하고 있음
- 아토피피부염은 천식, 비염과 함께 지난 수십년 동안 증가하고 있으며 2000년 발표된 오레곤주의 학생들을 대상으로 조사한 결과는 17%가 앓고 있고 2003년 발표에 따르면 핀란드의 다섯 살까지 아기에서 16%가 아토피피부염을 앓고 있음
- 우리나라의 아토피 환자수가 최근들어 급증하고 있는 점과 이미 선진화, 공업화가 일찍 진행된 일본의 경우 아토피 환자수가 1000 만명에 육박하고 있다는 점, 미국의 경우 과거 30년동안 30% 이상 증가해 전 인구의 5~12%가 이 질병을 앓고 있다는 점을 볼때 환경적인 요인이 가장 큰 것으로 예상됨

- 아토피성 피부염은 심한 가려움증 때문에 집중력이 떨어져 학습 장애 및 작업 능력의 저하를 초래하고 경우에 따라서는 불면증을 비롯한 정서 및 성격 장애를 유발하기도 함.
- 색소침착이 동반되는 습진성 피부 병변이 주요 증상인 아토피 피부염은 정상적인 대인관계나 사회활동에 지장을 줄수 있고 건조하고 민감한 피부 때문에 직업 선택에도 제한요인이 되어 매우 심각한 사회적 문제를 야기 하고 있음
- 이 질환에 대한 확실한 원인 규명이나 만족할 만한 치료방법이 없는 상황이며 지금까지의 치료방법으로는 대체적으로 피부수분을 유지시켜주기 위한 방법, 면역계의 염증반응을 조절하기 위한 스테로이드 호르몬제제의 사용, 피부자극제, 알레르겐, 감염성균 등의 악성인자를 제거하는 방법 등이 적절히 병용되어 왔음. 이러한 치료법은 가벼운 환자의 경우는 어느정도 효과를 나타내지만, 중증의 환자의 경우는 제대로 치료가 되지 않으며 스테로이드 제제와 같은 치료약제는 과용 및 오용에 의한 심한 부작용이 나타날 수도 있음.

2) 황토국화의 아토피성 질환 유효 천연물로의 개발가능성

- 주관기관인 성균관대학교 생약학연구실에서는 수백여종의 천연식물로부터 *S.aureus*, *P. ovale* 등의 염증성 세균을 억제하는 추출물을 검색하여 인체 혈액으로부터 분리, 배양된 림프구 성장조절을 통한 면역조절 가능성을 시험적으로 확인 및 세포내 free radical 생성억제를 통하여 NF-kB 활성억제 가능성 등 아토피 질환 치료에 필수적인 작용기전을 확인하여 제품개발의 성공 가능성이 매우 높은 수십여종의 천연추출물을 보유하고 있음.
- 황토국화는 본 연구의 참여기업인 국화향산업에서 확보한 서해안 지역 40여만평 규모의 황토지역에서 재배하고 있는 식용국화

(*Chrysanthemum morifollum* Ramat)로 잎, 줄기, 꽃, 뿌리가 식용가능하며 10~11월에 가지 끝에 노란 꽃이 피어 꽃은 약재, 향료 및 국화주를 만드는데 쓰임. 본연구는 참여기업을 통하여 안정된 원물의 공급이 확보되었음.

- 황토국화는 아토피의 원인이되는 스트레스 및 염증작용에 유효한 연구 결과로 아토피 질환에 효능을 가지는 화장품 원료로의 개발가능성이 있을것으로 사료됨.
- 황토국화는 체내 육체적, 사회심리적 스트레스에 의해 증가되는 Corticosteron을 감소시켜주고 신경전달물질인 Noradrenaline을 증가시키며 Noraderenaline의 대사산물인 MHPG-SO₄의 감소효과를 가져와 유효한 항스트레스 효과를 나타냄(생명과학회지, 9권, 5호, 604~611, 1999)
- 황토국화의 Hemistepsin B, cumambrin B, tullpinolide, costunolide 성분 등은 미생물 감염에 대한 숙주의 방어화 항상성 유지에 역할을 하는 대식세포에 있어서 전염증인자(proinflammatory mediator)인 NO(nitric oxide) 생성량을 감소시킴(생약학회지, 30(1), 74~78, 1999).

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 식용국화(감국, 본 연구에서 황토국화로 명명)으로부터 아토피 치료 활성을 지닌 황토국화 추출물을 개발하고자 피부 면역 활성 효능을 규명하기 위한 유효성 시험 및 안전성을 확인하기 위한 독성시험을 실시하였고, 유효성과 안전성을 확인한 후 이를 응용한 시제품을 제작하였다. 이를 위하여 시제품 제작 시 고품질의 황토국화 추출물 생산을 위한 각 연구 및 생산단계 별로 기능성 및 기초 독성을 check하였고, 시제품을 대상으로 한 화장품원료 등재 시험(독성/문헌자료)을 실시하였으며, 응용제품을 대상으로 하여 기능성 화장품 등록시험을 실시(기능성, 독성, 문헌자료)하였다. 또한 특허보완과 국제 특허출원을 위한 기능성 연구보완 및 특허청구 범위를 확대하였고 황토국화 추출물의 성분을 분석 및 규명하고, 유효 성분, 지표성분을 확인하고 이에 대한 아토피 치료 효과의 임상을 실시하였다. 본 연구의 결과물을 사업화하기 위하여 국제 화장품 원료 규격집 등재를 위한 독성 및 기능성 시험을 보완하였고, 각종 학회 등 전시회 출품을 위한 문헌 및 조사연구를 병행하였으며, 생산 시설 확충 및 고품질의 황토국화 추출물 생산을 위한 생산단계 별 기능성/독성 연구를 진행하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 황토국화 추출물의 생물학적 활성규명

연구에 사용된 국화를 명확히 하기위하여 국화 ITS 부위의 염기서열분석 결과를 바이오스텸으로부터 수령하여 alignment를 수행한 결과 *Chrysanthemum vestitum* (100%), *Chrysanthemum lavandulifolium* (100%),

Chrysanthemum x morifolium (99%)로 나타났다. 따라서, 시험에 사용된 황토국화는 *Chrysanthemum vestitum* 으로 식품 및 화장품 원료로의 사용에 적합하였다.

(1) 항산화 작용 및 면역세포 탈과립화 억제

황토국화의 생물학적 활성 및 유효성분을 규명하기 위하여 면역세포 탈과립화 억제 평가 결과 hexane층에서 매우 우수하였고, ORAC측정법을 통하여 항산화 활성을 평가한 결과 EA층에서 가장 우수한 활성이 나타났다.

(2) 면역세포 탈과립화 억제를 통한 항알러지 효과

hexane층에서 면역세포 탈과립화 억제 및 systemic anaphylaxis 시험결과 매우 우수한 효과가 나타났다(93% 억제율). 그러나, hexane층에서 유효성분 분리시 유효성분의 활성이 나타나지 않아, 항산화 및 면역세포 탈과립화 억제 (63%)가 우수한 EA층으로부터 지표성분을 분리하였다.

(3) EA층으로부터 소분획을 실시하여 이 중 가장 우수한 활성이 나타난 E1 소분획으로부터 amyrin성분을 분리하였다. amyrin성분은 항산화 활성이 우수하여 alpha-amyrin, beta-amyrin과 함께 지표성분으로 설정하여 표준추출공정을 개발하였다.

(4) IgE 억제를 통한 피부 알러지 보호

IgE 생성억제를 측정하기 위하여 비만세포 (RBL2HB)에 황토국화 추출물을 첨가한 결과 세포탈과립화가 억제됨을 확인하였다. 국화 꽃 추출물 EA층, 125ug/ml에서 약 61% 억제, 줄기 추출물 Hexane층 125ug/ml에서 약 93% 억제 효과를 타냄. 따라서 hexane층이 면역세포 탈과립화억제효과, EA 층

에서 항산화효과가 있었다. 따라서 황토국화 추출물에 함유되어 있는 성분은 비극성 화합물일 것으로 추정되며 약 93%의 탈과립화 억제효과가 나타났다.

(5) Systemic anaphylaxis 억제 효과

Mouse model에서 anaphylaxis를 유발한 쥐에 황토국화 추출물을 복강주사 하였을 때 anaphylaxis가 억제됨을 확인하였으며, 혈청에서도 histamine 분비가 억제됨을 확인하였다.

2. 황토국화 추출물의 생산공정 연구

(1) 황토국화 추출물 생산공정 연구

황토국화의 활성 연구 결과로부터 아토피의 유효성을 확인하여 이를 근거로 황토국화로부터 아토피에 효과가 있는 유효 추출물을 최대한 추출하였다. 그 방법으로 황토국화의 건조건 생줄기를 스팀으로 증류하여 1차적으로 오일을 추출분리하고 또한 오일과 함께 증류된 에센셜오일이 함유된 증류수 및 잔사를 추출한 추출물을 생산하는 공정을 설정하였다. 또한 황토국화를 건조와 생초로 나누어 증류 추출공정을 적용하여 에센셜오일, 에센셜오일을 함유하는 증류수, 황토국화 추출물의 생산 수율을 비교한 결과 건조 100kg에서는 에센셜오일이 증류되지 않았으며, 증류수에서도 에센셜오일이 함유되지 않았으며, 추출물의 정상 및 추출 수율도 150kg으로 매우 차이가 있었다.

(2) 최적 생산공정

따라서 생초 황토국화 100kg으로 스팀 증류법을 이용하여 에센스 오일 200ml, 에센셜오일을 함유하는 증류수 190kg을 얻었으며, 또한 잔사를 추출한 추출물을 220kg을 추출하였다. 따라서, 본 생산을 통하여 최종적으로 에센

스 오일, 황토국화 추출물, 황토국화 증류수를 생산할 수 있었으며, 이를 specification을 설정하고 표준 규격화를 하였다.

3. 국화로부터 아토피 화장품 개발 및 효력/독성 전임상

(1) 국화추출물 및 시제품의 단회 투여 독성 평가

본 시험에서 시험물질 투여와 관련된 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았으며 LD₅₀값은 50ml/kg을 훨씬 상회할 것으로 생각되었다. 이상의 결과에서 황토국화 추출물 및 시제품은 수컷 마우스에 의한 경구투여를 통한 단회 투여 독성시험에서 안전한 물질인 것으로 판단되었으며, 따라서 식품 및 화장품 소재로의 이용에 적합할 것으로 사료된다.

(2) 안점막 시험

안검사에 있어서는 시험물질 투여 후 1, 24, 48, 72, 96 시간 및 7일째에 관찰을 실시하였는데, 모든 동물에서 투여 후 7일째까지 각막, 홍채, 결막에서 모두 이상소견이 전혀 관찰되지 않았다.

(3) 국소독성시험

시험물질인 국화추출물을 New Zealand White계 토끼 등 피부의 찰과·비찰과부위에 경피도포한 결과, 시험물질에 기인한 일반증상의 변화는 관찰되지 않았으며 사망동물도 없었다. 또한, 시험물질 적용 후 7일째에는 홍반과 가피형성정도가 대체적으로 뚜렷한 회복 경향을 나타내었으며 찰과와 비찰과 피부 모두에서 부종은 관찰되지 않았다.

(4) 면역세포 탈과립화 억제 평가결과, hexane층에서 억제효과가 뚜렷하였으나, 유효성분 규명시 소분획 및 추출물에 비해 성분에서 효능이 나타나지

않아, 항산화 효과가 뚜렷한 EA층으로부터 지표성분을 분리하여 추출공정을 개발하였다. (amryn성분과 luteolin성분을 지표성분으로 설정)

(5) 개발된 추출공정으로부터 지표성분에 대한 분석으로 통하여 표준화/규격화 하였다.

(6) 표준화 원료를 이용하여 아토피 화장품 시제품을 생산하고, 이에대한 간이임상을 실시한 결과 대조군은 도포전 26.15 ± 5.06 점, 도포 4주후 23.08 ± 4.80 으로 감소하였고, 실험군인 HGA (국화추출물 함유)의 경우 도포전 27.33 ± 4.58 , 도포 4주후 20.00 ± 5.35 으로 감소하였다. 대조군과 실험군 모두 유의성 있는 감소를 나타냈으나, 실험군이 대조군에 비해 매우 유의성 있게 나타났다.

4. 활용 방안

황토국화는 버릴것이 없는 식물이다. 황토국화는 늦가을까지 성장을 하고 꽃을 피워 눈이 내린 초겨울에도 그 꽃과 향을 느낄 수 있는 것이다. 이러한 황토국화의 재배지역을 관광 상품화하며, 봄부터 가을까지 재배중에 발생하는 가지치기 및 분화를 통하여 발생하는 재배 부산물을 이용한 에센셜오일, 에센셜오일을 함유하는 증류수, 추출물을 생산하여 이를 이용한 화장품 및 입욕제를 개발하며, 또한 가을에 피는 꽃은 관광상품을 마칠무렵 잘 수확하여 국화 차로 개발하여 지역 및 관광상품으로 제품화를 빨리 진행할 수 있다. 또한 본 과제의 수행결과 황토국화는 아토피에 탁월한 효과가 있음을 임상적으로도 확인이 되었다. 현재 급증하는 아토피 환자에게 절실하게 필요한

천연의 아토피 전용화장품, 아토피 전용 입욕제, 아토피 치료제를 개발함으로써 부가가치를 크게 향상시킬 수 있다. 이러한 황토국화의 재배를 통하여 지역사회의 관광 및 특산품화, 재배를 통한 농가의 소득향상, 황토국화의 화장품 및 의약품 소재화를 통한 수입대체 효과가 발생한다.

본 과제를 통하여 얻어진 연구결과를 이용하여 현 판매되는 입욕제, 클린싱 크림을 비롯하여 증상에 따라 다르게 사용할 수 있는 아토피 전용 크림, 로션, 스킨, 클린싱, 보습제, 향균제등을 출시할 것이며, 또한 현재의 차와 함께 아토피 전용 세트를 구성하여 “마시고, 씻고, 바르는 아토피 전용 황토국화 제품”을 출시할 것입니다. 또한 황토국화의 재배지를 더욱 확대하여 농가의 대체 작물로서의 활용성을 증가 시켜 농가 소득향상에 기여할 것이며, 연구 결과를 근거로 해외 화장품 및 아토피 전용 제품을 출시하는 기업에 원료 및 아토피 치료제를 판매할 계획입니다.

특히, 본 연구결과를 토대로 아토피 전용화장품 및 아토피 치료제로만의 국한이 아닌 민감성 피부를 위한 화장품, 10대의 주니어를 위한 전용화장품, 베이비 전용화장품 등으로 차별화 연구를 진행하여 황토국화를 다양한 제품 개발로 활용할 것이며, 에센셜 오일을 이용한 아토피 및 민감성 방향성 제품 및 부가가치가 높은 향료개발에 활용할 것입니다.

SUMMARY

I. Title

Development of atopic cosmetics from mud chrysanthemum

II. Major Results and Conclusion

1. Biological examination of extracts from mud chrysanthemum

(1) Anti-oxidative activity

We used ORAC method for investigating for anti-oxidative effect of mud chrysanthemum. As a result, anti-oxidative effects were increased on treatment of EtOAc and Hexane layers.

(2) Identification of mud chrysanthemum

Sequence analysis of ITS part was carried out to 1 kind of samples, as a result, they had a homology with *Chrysanthemum vestitum* (100%), *Chrysanthemum lavandulifolium* (100%), *Chrysanthemum x morifolium* (99%)), respectively.

(3) Anti-allergic activation by suppression of IgE

To investigate the suppression of IgE production, extracts from *Chrysanthemum lavandulifolium* were treated to mast cell (RBL2H3). As a result, degranulation was suppressed by extracts from *Chrysanthemum lavandulifolium*

. Especially, hexane layer showed the highest activity (93%) and these results suggested that effective ingredient in extracts from *Chrysanthemum lavandulifolium* might be nonpolar compound.

(5) Systemic anaphylaxis

When extracts from *Chrysanthemum lavandulifolium* was administered to anaphylactic shock-induced mice by IP, anaphylaxis was attenuated and histamine release in serum was also decreased.

2. Development, effect and safety of extracts from *Chrysanthemum lavandulifolium* (preclinical and clinical study)

(1) Acute toxicity of extracts from *Chrysanthemum lavandulifolium* and prototype

There were neither dead animals nor significant changes of body weights during the experimental period. In addition to, no significant extracts from *Chrysanthemum lavandulifolium* and prototype related changes were found in clinical sign and other findings. No histopathological lesions were observed in both control and treated animals. Above data suggested that no observed adverse effect level (NOAEL) of test materials in ICR mice might be over 50ml/kg in this study.

(2) Ocular irritation

The extracts from *Chrysanthemum lavandulifolium* did not affect on clinical sign, mortality, body weight, and irritation in case of the ocular application throughout this study.

(2) Local irritation

This study was performed to evaluate irritation potential of the extracts from *Chrysanthemum lavandulifolium* in male New Zealand White Rabbits. The test substance was topically applied on both normal and scratched dorsal skin. Then the skin was evaluated for signs of irritation. No toxic sign and significant body weight were observed relating to test substance treatment. On the abraded skin of treated section, 1 and 24 hours after application, slight erythema was observed in all three animals. 48 hours after application, slight erythema was observed in two animals. 72 hours after application, slight erythema was observed in one animals. On the intact skin of treated section, no abnormal signs were observed throughout the study. On the basis of the above results, the extracts from *Chrysanthemum lavandulifolium* was classified as a non-irritant in this study.

(3) Identification of standard constituents

The air-dried aerial parts were extracted with 70% EtOH to give the 70% EtOH extract(120g). The 70% EtOH extract was partitioned between equal volumes of n-Hexane and 50% MeOH. The n-Hexane soluble fraction(9.5g) was subjected to silica gel column chromatography with a n-Hexane-EtOAc(14:1~4:1, step gradient) mixture to give sixteen fractions (Fr.1-16). Fraction 7 (1g) was subjected to silica gel column chromatography (elution with n-Hexane-EtOAc, 20:1 to 14:1) to give eight subfractions (Fr. 1-8). Subfraction 3 (618mg) was subjected to recrystallization(with CHCl₃-MeOH) to yield Compound **1** (131.2mg) and one subfraction (Fr. 1). Subfraction 1(418.2mg) was fractionated by ODS column chromatography with MeOH-H₂O (4:1~9:1, step gradient) to yield Compound **2** (120mg).

α -amyrin (**1**): ($C_{30}H_{50}O$), ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100MHz) : 139.47 (C-13), 124.32 (C-12), 78.89 (C-3), 58.95 (C-18), 55.10 (C-5), 47.62 (C-9), 41.96 (C-14), 41.46 (C-22), 39.91 (C-8), 39.58 (C-19), 39.52 (C-20), 38.71 (C-4), 38.68(C-1), 36.79(C-10), 33.66 (C-17), 32.85 (C-7), 31.18 (C-21), 28.69 (C-28), 28.07 (C-23), 27.90 (C-16), 27.15 (C-2), 26.53 (C-15), 23.29 (C-11), 23.20 (C-27), 21.36 (C-30), 18.28 (C-6), 17.43 (C-29), 16.78 (C-26), 15.62 (C-25), 15.60 (C-24).

β -amyrin (**2**): ($C_{30}H_{50}O$), ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100MHz) : 145.07 (C-13), 121.64 (C-12), 78.89 (C-3), 55.10 (C-5), 47.54 (C-9), 47.12 (C-18), 46.73(C-19), 41.60(C-14), 39.69(C-8), 38.71(C-4), 38.51(C-1), 37.07(C-22), 36.84(C-10), 34.65(C-21), 33.30(C-29), 32.56(C-17), 32.40(C-7), 31.00(C-20), 28.34(C-28), 28.02(C-23), 27.11(C-2), 26.85(C-16), 26.07(C-15), 25.93(C-27), 26.63(C-30), 23.45(C-11), 18.28(C-6), 16.72(C-26), 15.56(C-25), 15.43(C-24)

(4) Extraction process study

When it was extract essential oil from *Chrysanthemum lavandulifolium* which was not dry, could extract 50ml/100kg. but it was not essential oil in the drying *Chrysanthemum lavandulifolium*. It is cheaper and more advantage to extract essential oil, water and extracts from from the no dry *Chrysanthemum lavandulifolium*. at the same time by the distillation process

(5) Clinical study

The clinical research was conducted to test patients with atopic dermatitis by external application with extracts from *Chrysanthemum lavandulifolium* in cosmetics, HGA. After 4 weeks of external application treatment, HGA showed significant effect on SORAD method.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	17
Chapter 2. Current Status on Domestic and Foreign Technology	23
Chapter 3. Experiment and Results	28
Chapter 4. Achievements of objects and contribution	129
Chapter 5. Future plan	130
Chapter 6. References	143

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	17
제 1 절 개발경위	17
제 2 절 기술개발(제품)의 중요성 및 전망	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황	23
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	28
제 1 절 황토국화 추출물의 생물학적 활성규명	28
제 2 절 황토국화 시제품의 생물학적 활성규명	47
제 3 절 황토국화 추출물의 성분분석 연구	54
제 4 절 황토국화 추출물의 생산공정 표준화 및 제제화 연구	64
제 5 절 황토국화 추출물 및 시제품의 독성 전임상	79
제 6 절 황토국화 추출물 적용 제품의 효력(간이임상)	103
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	129
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	130
제 6 장 참고문헌	143

제 1 장 연구개발과제의 개요

황토국화는 식용국화인 감국으로서 고창지역에서 재배한 감국(황토국화로 본 과제에서 명명)를 추출하고 추출물의 유효, 지표 성분을 확인하여 이의 생물학적 작용(특히, 피부면역활성)을 규명하여 상품화한 것이다.

대상제품	황토국화 추출물을 적용한 아토피 전용 화장품
용도	아토피 치료용 황토국화 추출물 적용 화장품 조성제
기능	<ul style="list-style-type: none"> - 면역세포 B cell의 외부 알러지 유발물질에 대한 항체형성 증대 - 알러지 유발 물질에 의한 염증반응 예방 및 완화 - 피부보습 및 항산화, 노화방지 - 피부 자극완화 및 항아토피 효과
특성	<ul style="list-style-type: none"> - 감국의 일종인 황토국화로부터 에센셜오일, 에센셜오일 함유 증류수, 추출물을 동시에 추출 - 아토피 치료용으로 마시고, 씻고, 바르는 황토국화 - 피부면역활성에 대한 기초연구 완료 - 급성독성 및 아토피 치료 효과 확인 - 일반 추출물에 비하여 에센셜오일, 증류수, 추출물의 활용가치가 매우 높은 천연 소재임
기대효과	<ul style="list-style-type: none"> - 공해, 병원성세균 등 알러지 유발물질에 의한 질환 예방 - 무독성, 비자극 메커니즘에 의한 유아/어린이 아토피성 질환예방 - 황토국화의 아토피 효과 및 무독성 물질이므로 화장품 및 음료용으로 상품 개발의 다양화가 이루어질 수 있음 - 에센셜오일, 에센셜오일이 함유된 증류수, 추출물을 화장품, 입욕제, 세척 및 차로 제품화 함으로써 파생적 상품개발이 용이하여 산업적 활용가치 매우 우수 - 황토국화를 재배함으로써 관광 소득화, 재배과정에서 발생하는 가지 및 부산물을 이용한 아토피 치료용 소재 개발로 농가의 소득향상

제 1 절 개발경위

1. 개발배경

- 현대사회는 산업화로 지구환경에 급격한 변화가 초래되어 사람의 건강에 심각한 영향을 미치게 됨.
- 그 결과 각종 만성 및 난치성 질환이 급속히 증가하고 있으며 사람의 몸을 둘러싸고 있는 피부에도 여러 질환들이 유발되고 있음.
- 아토피성 피부염은 원인을 알기 어렵고 따라서 치료가 힘든 난치성 질환임. 흔히 태열이라고 부르는 유아습진으로 시작하여 나이가 들면서 증상이 대체로 호전되나 최근에는 성인기까지 중증의 피부염이 지속되고 있으며 그 수가 폭증하고 있음
- 아토피피부염은 천식, 비염과 함께 지난 수십 년 동안 증가하고 있으며 2000년 발표된 오레곤주의 학생들을 대상으로 조사한 결과는 17%가 앓고 있고 2003년 발표에 따르면 핀란드의 다섯 살까지 아기에서 16%가 아토피피부염을 앓고 있음
- 우리나라의 아토피 환자수가 최근들어 급증하고 있는 점과 이미 선진화, 공업화가 일찍 진행된 일본의 경우 아토피 환자수가 1000 만명에 육박하고 있다는 점, 미국의 경우 과거 30년동안 30% 이상 증가해 전 인구의 5~12%가 이 질병을 앓고 있다는 점을 볼때 환경적인 요인이 가장 큰 것으로 예상됨
- 아토피성 피부염은 심한 가려움증 때문에 집중력이 떨어져 학습 장애 및 작업 능력의 저하를 초래하고 경우에 따라서는 불면증을 비롯한 정서 및 성격 장애를 유발하기도 함.
- 색소침착이 동반되는 습진성 피부 병변이 주요 증상인 아토피 피부

염은 정상적인 대인관계나 사회활동에 지장을 줄 수 있고 건조하고 민감한 피부 때문에 직업 선택에도 제한요인이 되어 매우 심각한 사회적 문제를 야기하고 있음

- 이 질환에 대한 확실한 원인 규명이나 만족할 만한 치료방법이 없는 상황이며 지금까지의 치료방법으로는 대체적으로 피부수분을 유지시켜 주기 위한 방법, 면역계의 염증반응을 조절하기 위한 스테로이드 호르몬제제의 사용, 피부자극제, 알레르겐, 감염성균 등의 악성인자를 제거하는 방법 등이 적절히 병용되어 왔음. 이러한 치료법은 가벼운 환자의 경우는 어느정도 효과를 나타내지만, 중증의 환자의 경우는 제대로 치료가 되지 않으며 스테로이드 제제와 같은 치료약제는 과용 및 오용에 의한 심한 부작용이 나타날 수도 있음.

2. 황토국화의 아토피성 질환 유효 천연물로의 개발가능성

- 주관기관인 성균관대학교 생약학연구실에서는 수백여종의 천연식물로부터 *S.aureus*, *P. ovale* 등의 염증성 세균을 억제하는 추출물을 검색하여 인체 혈액으로부터 분리, 배양된 림프구 성장조절을 통한 면역조절 가능성을 시험적으로 확인 및 세포내 free radical 생성억제를 통하여 NF-kB 활성억제 가능성 등 아토피 질환 치료에 필수적인 작용기전을 확인하여 제품개발의 성공 가능성이 매우 높은 수십여종의 천연추출물을 보유하였음.
- 황토국화는 본 연구의 참여기업인 국화향산업에서 확보한 서해안 지역 40여만평 규모의 황토지역에서 재배하고 있는 식용국화 (*Chrysanthemum morifollum* Ramat)로 잎, 줄기, 꽃, 뿌리가 식용가능하며 10~11월에 가지 끝에 노란 꽃이 피어 꽃은 약재, 향료 및 국화주를 만드는데 쓰임. 본연구는 참여기업을 통하여 안정된 원물의 공급이 확보되었음.

- 황토국화는 아토피의 원인이되는 스트레스 및 염증작용에 유효한 연구 결과로 아토피 질환에 효능을 가지는 화장품 원료로의 개발가능성이 있을 것으로 사료됨.
- 황토국화는 체내 육체적, 사회심리적 스트레스에 의해 증가되는 Corticosteron을 감소시켜주고 신경전달물질인 Noradrenaline을 증가시키며 Noradrenaline의 대사산물인 MHPG-SO₄의 감소효과를 가져와 유효한 항스트레스 효과를 나타냄(생명과학회지, 9권, 5호, 604~611, 1999)
- 황토국화의 Hemistepsin B, cumambrin B, tullpinolide, costunolide 성분 등은 미생물 감염에 대한 숙주의 방어화 항상성 유지에 역할을 하는 대식세포에 있어서 전염증인자(proinflammatory mediator)인 NO(nitric oxide) 생성량을 감소시킴(생약학회지, 30(1), 74~78, 1999).

제 2 절 기술개발(제품)의 중요성 및 전망

1. 경제적 측면

- 황토국화는 서정주문학과 연계하여 고창군에서 지역특산 산업으로 육성하고 있으며 이러한 국화산업과 연계되어 관상용 외에 식품등으로의 유용성을 확대하여 산업적 가치를 창출하게 되면 고창지역 및 국내 타지역의 유향 농지에도 적용될수 있는 우수한 대체 원예작물이 될것으로 사료됨.
- 정부는 최근 차세대성장동력기술로 “바이오신약/장기” 부문을 선정하여 기존사업을 통한 지원으로 다양한 “바이오신소재”의 개발과 신규추진분야로 “면역기능제어/면역치료제”를 장기 중점지원분야로 선정하여 국가 정책과도 부합됨.

2. 사회적 측면

- 아토피성 피부질환은 심한 가려움증에 의한 집중력 및 학습력 저하와 소아에서는 불면증에 의한 정서 및 성격 장애를 유발하게 됨으로써 교육과 육아 문제에서 심각한 문제로 대두되고 있어 안전성과 효능이 우수한 천연물 치료물질의 개발이 시급함.
- 아토피성 피부질환 치료과정에서 습진성 피부 병변에 의한 색소피부 침착등에 의한 외모 자신감 저하, 건조하고 민감한 피부 때문에 직업선택에도 제한되는 등의 문제점이 있어 이러한 문제점이 극복될수 있는 우수한 천연물 치료물질이 요구됨.

3. 기술적 측면

- 급격한 산업화에 따른 환경오염의 증가에 따라 발생율이 증가하고 있는 아토피성 피부질환은 알러지, 자가면역질환으로 악성종양 및 AIDS 등과 함께 현대 보건분야의 가장 중요한 의학적 문제로 대두되고 있으나 아직까지 획기적인 치료법이 개발되지 않고 있으며, 항히스타민제, 국소부신피질호르몬제, 면역억제제 등이 이용되고 있으나 간기능 등에 치명적인 부작용으로 인하여 그 사용이 매우 제한됨.
- 가장 대표적인 아토피성 피부질환 유발인자는 IgE의 과잉분비, *Staphylococcus aureus* 또는 *Pityrosporum ovale*의 감염, 세포성 면역결핍, 염증반응에 관여하는 NF- κ B의 활성화증가 등이며 이에 따라 IgE 분비억제제, NF- κ B활성저해제, 항균제 등이 연구되고 있으나 아토피 발생원인은 매우 광범위하여 항산화, 항균력, 항염, 면역조절 등 각 세부기술 분야에 대한 부분적 치료기능으로는 아토피의 원인치료가 불가능하여 상기의 주요작용기전에 대해 광범위하게 적용될수 있고 부작용이 없는 혁신적 천연소재개발이 필수적임

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내연구동향분석

1. 아토피치료제 개발 기술 현황

- 아토피 피부염을 정확히 진단할 수 있는 실험적 방법이 없어 임상적인 기준에 의한 판단으로 의사처방에 의존하고 있으며, 특히 유아의 경우 국소부신피질호르몬이 함유(약 1%)된 수입화장품제제 또는 국내산 연고제를 처방하고 있음.
- 화장품의 경우에도 세라마이드, 동백유 등 보습기능에 초점을 맞추어져 치료개념보다는 예방차원의 경우가 대부분으로 알려지 질환에서의 면역반응에 기초하여 아토피 피부염 진단 및 이를 통한 치료제 개발 방법이 연구되고 있으며 가장 많이 연구되고 있는 분야는 아토피 환자에서 증가하는 IgE의 억제, IgE의 증가를 유도하는 IL-4의 조절, IL-4 receptor의 조절 및 관련 염증반응의 TNF- α , INF- γ 등의 분야임.

표2-1. 국내 아토피성 질환치료용 제품 개발동향

회사명	브랜드	제품특징	유통	비고
동아제약	프로토픽	면역조절(억제), 타크로리무스	개인, 준종합병원	20여국 시판
동화약품	아토팜	유사세라마이드, 보습/보호	약국, 인터넷	네오팜 개발
녹십자 PBM	탈스	10여가지 생약, 항균, 홍반제어	약국, 인터넷	바이오스펙트럼 개발
보령메디앙스	아토피스	동백유, 보리추출물, 세라마이드	약국, 백화점, 인터넷	일본원료
유한양행	아더마	오메가6, 귀리추출물 등	약국	프랑스 수입
중외제약	수라진A	생약 + 양약, 항히스타민제	약국	일본 사토사
동성제약	아토크리어	비스테로이드 염증 완화	약국	
남양알로에	아토크알로에	피부트러블 개선	방판, 인터넷	
로레알	로슈	중앙아프리카토착식물추출물	병원	프랑스수입

2. 국내특허동향(화장품 산업을 중심으로)

- 아토피용 치료제의 경우 스테로이드호르몬 계열이 대부분이며 천연 물체제의 경우 화장품첨가제로 개발된 경우가 대부분임.
- 아토피용 화장품의 용도별 특허출원 현황은 보습제, 항소양제, 항균제, 면역조절제, 세정제, 항자극제, 스테로이드로 구분해 볼수 있는데 먼저 보습제의 특허출원은 34건으로 전체대비 27.9%를 차지하여 가장 큰 비중을 차지하고 있는데 여기서 보습제는 피부에 존재하는 수분을 유지하거나 보존하기 위해 바르는 외용제를 말하는 것으로서, 피분건조방지, 피부장벽회복 기능 등을 포함함
- 항소양제의 경우에는 가려움증을 개선하는 것으로 가려움증을 억제하고 완화하며, 피하의 혈관에 분포하여 가려움을 불러일으키는 히스타민을 억제하는 것을 포함하는데 이러한 항소양제의 특허출원은 30건으로 전체 대비 24.6%을 차지함

- 항균제의 특허출원은 30건으로 전체대비 24.6%를 차지하고 있는데, 여기에는 표피포도상구균 등 항균 작용 및 피부 염증을 억제하는 항염증 기능을 포함함.
- 면역조절제는 피부염증에 관련된 일련의 세포군의 활성을 저해하며 염증에 관련된 사이토카인의 생성을 억제하는 기능을 갖고 있는 면역억제제 등 면역관련 피부반응을 조절하여 아토피성 피부 질환을 개선함, 면역조절제의 특허출원은 14건으로 전체 대비 11.5%을 차지함
- 세정제의 특허출원은 10건으로 전체 대비 8.2%로 차지하였고 여기에는 아토피성 피부에 대한 가장 기초적인 방법인 피부를 청결하게 유지하기 위한 입욕제를 포함함
- 스테로이드 특허출원은 1건으로서 전체 대비 0.8%를 차지함

표2-2. 아토피화장품 용도별 국내 특허출원 현황

구 분	보습제	항소양제	항균제	면역조절제	세정제	저자극제	스테로이드	계
출원건수	34	30	30	14	10	3	1	122
비 율	27.9	24.6	24.6	11.5	8.2	2.4	0.8	100

출처 : 보건산업기술동향 2004

- 아토피 화장품의 성분별 특허출원 현황을 살펴보면 아토피용 화장품에 사용된 성분중에서 화합물을 단독으로 사용한 경우가 54건으로서 33.6%을 차지하며 가장 큰 비중을 차지하였으며 생약추출물을 단독으로 사용한 경우에는 41건으로서 25.5%, 생약추출물과 화합물을 함께 사용한 경우에는 11건, 효소 6건, 스테로이드 2건, 오일 2건, 화장품에 사용되는 일반적인 성분을 혼합한 복합성분이나 제조방법, 온천수 등

을 사용한 경우가 6건임

- 최근 바이오벤처기업의 활동이 활발한 분야이며 아토피 관련시장은 매년 성장하고 있으며 수요가 급증하고 있음.

3. 국외연구동향분석

- 최근 미국 피부학술원은 피부과의 전문가를 통해 아기들의 AD와 관련한 과제와 앞으로 우선적으로 연구할 문제들을 정의한 바 있는데, 2003년 아토피 피부염에 대한 consensus conference에서 합의한 내용은 그 진단기준을 소염증(pruritus)과 습진(eczema)으로 하였고 대부분이 어린아기에게서 나타남.
- 서구의 경우 역학조사에서 일찍이 애완견 사육으로 인한 아토피 환자의 증가에 따라, 애완견의 아토피 질환 유발요인과 인체의 아토피 질환 유발요인과 인체의 아토피 질환 유발요인으로 IgE 및 IgGD의 증가로 파악되므로 동시 유발되어 이와 관련된 STAT6, STAT3, STAT4에 대한 조절연구, 체내 NO생성억제 등이 연구되고 있으며, 특히, 아토피 유발 환경원인을 제거하는 연구를 진행하고 있음
- 어린아기에게 담배연기는 알레르기형 기관지염을 유발하는 인자로 생각하고 있으며 독일에서 1669명의 학교아동을 대상으로 알레르기 증상을 조사한 바 있는데, 이 중 1221명은 nicotine 대사물인 cotinine을 조사해 creatinine과 비를 측정한 결과 담배연기와 아토피피부염은 관련이 있음을 확인함. 일본에서도 담배연기 노출 등 환경적 요소의 알러지 유발물로 인한 아토피 발생원인 및 치료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음.

- 최근 아토피피부염의 가장 관심있는 병리학의 내용으로는 유전학과 면역학 분야로 아토피피부염을 유발하는 가족을 중심으로 유전자와 염색체를 조사하는 연구를 수행하고 있으며 아토피피부염을 일으키는 데는 면역계의 변화가 생기는 것으로 많은 연구에서 각질세포, 중성구, 비만세포에서 나오는 세포활성물질이 관찰됨
- 일본 후지사의 FK 506(프로토픽, 타크로리무스)과 노바티스의 SDZ-ASM 981(엘리텔, ascomycin 유도체)은 부작용이 경미한 비스테로이드 제제인 면역억제제로 염증과 관련된 사이토카인 방출억제로 임상에서도 높은 효과를 나타낸 새로운 치료제이나 100g에 165달러 정도의 고가의 약품이어서 경제성에 문제가 있음
- 중국에서는 면역계에 영향을 미치는 한약제제인 TDM(traditional chinese medicine)이 있으나 효능이 불확실하며 국내의 경우는 기존개발 약물의 안전성, 부작용 방지, 효능보완등의 개발을 하거나 천연 혹은 슈도 세라마이드, 스쿠알렌, 칼렌듀라, 정제 동백유, 알몬드 등의 천연물 추출물을 활용하여 고보습, 저자극성, 가려움증 완화 및 억제, 장벽보구, 보호 및 보습효과에 목적을 두고 개발되고 있음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 황토국화 추출물의 생물학적 활성규명

1. 표준 재배원료

- 본 연구에서 사용한 국화원물은 고창의 황토지대 50만평에 재배되고 있으며 년 1회 수확으로 표준재배를 수행하고 있음



그림3-1. 황토국화 재배지 : 전라북도 고창군 석정온천 일대

2. 국화 염기서열 분석을 통한 종분석

○ 국화의 경우 다양한 변종에 의하여 고창지역의 식용국화의 향후 연구에서종을 확정하여 표준원료의 개발을 위하여 DNA 염기서열 분석을 통한 유전자분류로 종을 확인하였다.

○ 실험방법

국화 DNA extraction은 국화잎을 액체질소에 넣어 마쇄하고, DNeasy plant mini kit를 사용하여 추출하였다.

PCR은 ITS 부위를 증폭할 수 있는 ITS5F (5'-GGAAGTAAAAGTGGTAACAAGG-3')와 ITS5R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primer를 사용하여 증폭하였으며, Gel purification kit를 사용해 DNA를 elution 하였다.

○ 실험결과

국화 ITS 부위의 염기서열분석 결과를 마이오스텝으로부터 수령하여 alignment를 수행한 결과 *Chrysanthemum vestitum* (100%), *Chrysanthemum lavandulifolium* (100%), *Chrysanthemum x morifolium* (99%)로 나타남

표3-1. 국화 종분석 결과

학 명	Gene bank ID #	alignment (%)		E-value	
		R-primer	F-primer	R-primer	F-primer
<i>Chrysanthemum x morifolium</i> (국화)	AB064285	221/221 (100%)	171/173 (98%)	3e-120	2e-84
	AB064284	221/221 (100%)	170/172 (98%)	3e-120	3e-86
	AB064282	221/221 (100%)	178/179 (99%)	3e-120	2e-90
	AB064281	221/221 (100%)	172/173 (99%)	3e-120	7e-87
	AB064280	221/221 (100%)	177/178 (99%)	3e-120	3e-92
	AB064278	221/221 (100%)	177/179 (98%)	3e-120	4e-88
	AB064277	221/221 (100%)	170/172 (98%)	3e-120	3e-86
	AB064276	221/221 (100%)	171/173 (98%)	3e-120	2e-84
	AB064274	221/221 (100%)	177/178 (99%)	3e-120	3e-92
	AF314598	217/217 (100%)	177/178 (99%)	8e-118	7e-93
	AF314599	217/217 (100%)	177/178 (99%)	8e-118	3e-92
	AF314597	216/217 (99%)	177/178 (99%)	5e-116	3e-92
	AB064283	220/221 (99%)	172/173 (99%)	2e-115	7e-87
	AB064279	220/221 (99%)	172/173 (99%)	2e-115	7e-87
	AB064275	220/221 (99%)	178/179 (99%)	2e-115	2e-90
	AB064273	220/221 (99%)	176/179 (98%)	2e-115	1e-85
<i>Chrysanthemum vestitum</i>	AF314602	217/217 (100%)	178/178 (100%)	8e-118	1e-94
<i>Chrysanthemum lavandulifolium</i>	AF314600	217/217 (100%)	178/178 (100%)	8e-118	1e-94
<i>Chrysanthemum indicum</i>	AF314601	217/217 (100%)	177/178 (99%)	8e-118	3e-92
<i>Chrysanthemum nankingense</i>	AF314604	217/217 (100%)	175/178 (98%)	8e-118	1e-88
<i>Chrysanthemum chanetii</i>	AF314596	217/217 (100%)	177/178 (99%)	8e-118	3e-92
<i>Chrysanthemum naktongense</i>	AF314595	217/217 (100%)	177/178 (99%)	8e-118	3e-92
<i>Chrysanthemum monogolicum</i>	AF314593	217/217 (100%)	177/178 (99%)	8e-118	3e-92
<i>Chrysanthemum zawadskii</i>	AF314594	216/217 (99%)	177/178 (99%)	2e-115	3e-92
<i>Chrysanthemum rhombifolium</i>	AF314603	215/217 (99%)	176/178 (98%)	5e-113	7e-90

3. 수추출 및 에탄올 추출물 항산화 시험

표3-2. Relative ORAC Value 및 DPPH IC₅₀

Name	ORACPE value	DPPH IC ₅₀ (ug/ml)
G2-100E(100EtOH)	0.584	200<
G2-70E(70EtOH)	<u>0.852</u>	200<
G2-50E(50EtOH)	0.737	200<
G2-30E(30EtOH)	0.567	200<
G2-W (water)	0.393	200<

– ORAC Value (기준물질 : Trolox, Vitamin E analogue)

- (1) Trolox 대비하여 Trolox와 동일 이상의 항산화 수치를 가지는 천연물 : 없음
- (2) Trolox 대비하여 0.8 이상의 ORAC Value를 가지는 천연물로 비교적 높은 항산화력을 가진 Group : G2-70E

– DPPH IC₅₀ (기준물질 : Ascorbic Acid)

- (1) 노란색: IC₅₀이50 이하인 천연물로서 높은 항산화력을 가진 물질 : 없음
- (2) 연두색: IC₅₀이50~100인 천연물 : 없음

– 국화 5종 분획 중 G2-70E만 ORAC value 값 항산화능 있음.

– 국화 5종 분획 모두 DPPH 값 항산화능 없음.

– 화장품 외에 식품적용을 위한 수추출물 및 주정에탄올 추출물의 항산화능 결과는 70% 에탄올 추출물에서만 항산화능이 관찰되어 식품으로의 개발에서는 다소 경제성이 떨어질것으로 판단되었음.

4. IgE 억제를 통한 피부알러지 보호

IgE 생성 억제를 측정하기 위하여 면역세포(RBL2H3)에 황토국화 추출물을 첨가하여 세포탈과립화 억제 시험 (그림 3-2 참조)

- [시험방법]
- ① 24 well plate 한판씩 cell을 seeding한다. (500 μ l 씩)
 - ② 24시간 후 phenol red 無첨가 배지로 배지를 교환해준다
 - ③ 배지교환 10분 후 Rat ant-DNP BSA를 3~4시간 처리를 한다.
 - ④ Tyrode B 500 μ l washing 3회, Tyrode B 160 μ l 처리 후 10분 pre-incubation
 - ⑤ Sample(BuOH, DW, EtOAc, MC, hexane) 20 μ l 처리 후 20분 pre-incubation
 - ⑥ DNP BSA 처리 후 30분 incubation, ice에 10분간 incubation
 - ⑦ 4 $^{\circ}$ C 2000rpm에서 10분 원심분리
 - ⑧ 상층액을 25 μ l씩 따서 96well plate 에 옮긴다
 - ⑨ 즉시 pNAG 25 μ l 씩 넣는다 - 37 $^{\circ}$ C incubation 1시간
 - ⑩ Stop sol. 200 μ l - 405nm 측정

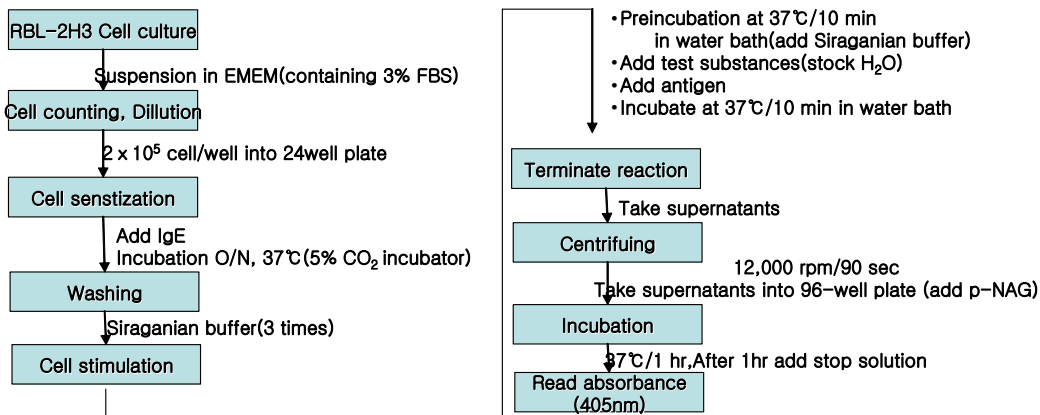


그림. 3-2. 면역세포 탈과립화 억제 시험방법

- Murine mast cell인 RBL-2H3의 탈과립화 억제를 통하여 국화추출물의 항알러지 작용을 평가
- 황토국화추출물은 RBL-2H3 세포주(Rat mast cell line)에 처리하여 안티젠에 의한 탈과립화를 억제하는 효과를 나타냄. RBL-2H3 세포주를 활성화인자(Dinitrophenol-conjugated human serum albumin, (DNP-HSA)-specific IgE)로 활성화 시킨 후 활성화된 세포에 안티젠(DNP-HSA)을 처리하고 추출물 처리후 배양하여 ELISA reader를 이용하여 배지내로 분비된 β -hexosaminidase 양을 측정하여 억제됨을 관찰하였고 이는 면역세포의 탈과립화를 방지함을 의미함.
- 시험결과, 국화 전초 추출물 유층, 125ug/ml에서 약80%의 억제효과(과립화도 0.21 ± 0.019)를 나타내어 그 효과가 매우 우수함

가. 국화추출물의 부위별 탈과립화 억제 효과

국화추출물	control	PP2 15uM	농도		
			5ug/ml	25ug/ml	125ug/ml
줄기유층	1	0.56 ± 0.068	0.99 ± 0.016	0.98 ± 0.017	0.72 ± 0.015
줄기수층	1	0.56 ± 0.068	0.99 ± 0.008	0.94 ± 0.024	0.92 ± 0.015
꽃유층	1	0.56 ± 0.068	0.99 ± 0.021	0.92 ± 0.025	0.75 ± 0.017
꽃수층	1	0.56 ± 0.068	0.99 ± 0.017	0.98 ± 0.012	0.96 ± 0.013

나. 국화 전초 추출물의 탈과립화 억제 효과

국화추출물	control	PP2 15uM	농도		
			5ug/ml	25ug/ml	125ug/ml
유층	1	0.45±0.08	0.99±0.011	0.80±0.009	0.21±0.019
수층	1	0.45±0.08	0.99±0.009	0.95±0.029	0.64±0.010

다. 국화 기관 및 분획별 추출물의 탈과립화 억제 효과

국화추출물		농도			IC50(mg/ml)
		5ug/ml	25ug/ml	125ug/ml	
꽃	MeOH	21.41±2.49 %	20.72±2.20 %	29.10±0.80 %	>125
	Hexane	5.68±0.270 %	5.61±1.53 %	29.10±0.80 %	>125
	MC	-9.14±0.36 %	6.57±0.21 %	52.34±1.28 %	119.2±2.41
	EA	0.44±3.20 %	29.18±2.81 %	61.77±1.08 %	88.75±2.262
	BuOH	4.41±4.99 %	15.83±2.28 %	3.72±1.44 %	>125
	H2O	7.65±1.95 %	6.57±5.137 %	1.42±2.86 %	>125
줄기	MeOH	32.42±0.91 %	70.50±0.355 %	80.87±1.61 %	48.54±2.57
	Hexane	-5.72±2.24 %	30.97±1.54 %	93.67±1.72 %	65.23±1.49
	MC	-2.84±3.01 %	16.52±0.87 %	85.54±0.48 %	75.09±1.36
	EA	-15.08±1.15 %	44.53±1.43 %	53.18±1.75 %	118.93±3.64
	BuOH	-21.77±2.98 %	15.14±2.74 %	30.67±2.29 %	>125
	H2O	-17.86±5.40 %	-12.73±4.07 %	-8.97±5.30 %	>125

- 국화 꽃 추출물 EA층, 125ug/ml에서 약 61% 억제, 줄기 추출물 Hexane층 125ug/ml에서 약 93% 억제 효과를 타냄. 따라서 hexane층이 면역세포 탈과립화억제효과, EA 층에서 항산화효과가 있었다.

5. 아토피 유발물질 억제효과

- 생쥐 혈액 내 히스타민 방출억제효과를 알기 위하여 생쥐(CD-1)에 국화추출물을 복강 및 경구투여하고 알러지 유발물질(compound 48/80)을 투여하여 1시간 후 혈액을 채취 혈청분리 후 히스타민 농도를 측정하여 억제됨을 관찰하였다.

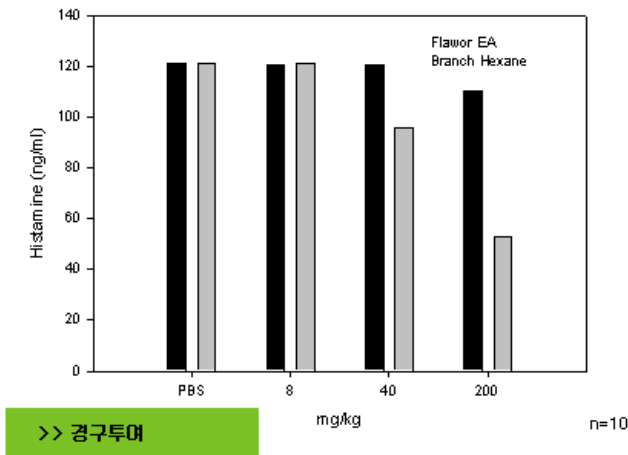
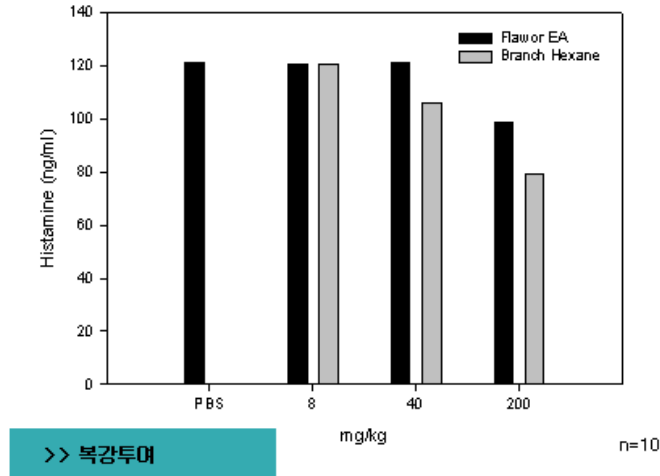


그림 3-3, 3-4. 혈액 내 히스타민 방출억제효과

- 국화에서 꽃 EA 추출물 보다 가지 Hexane 추출물에서 히스타민 억제효과가 우수하며 복강투여보다 경구투여가 더 우수함

6. 과민반응 억제

- 생쥐위 과민반응 억제효과를 알기 위하여 생쥐(CD-1)에 국화추출물을 복강 및 경구투여하고 과민반응 유발물질(compound 48/80)을 투여하여 생쥐의 생존율을 확인하였다.

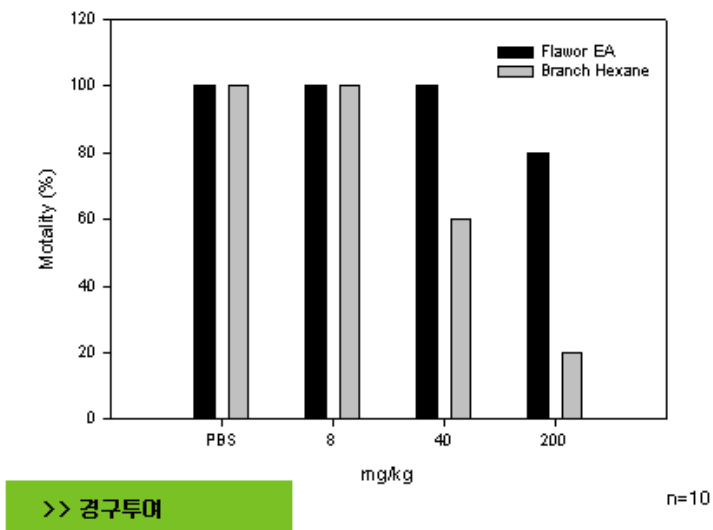
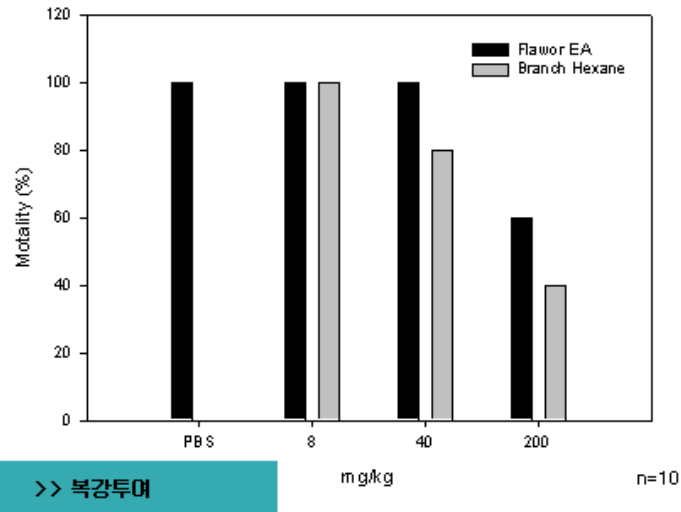


그림 3-5, 3-6. 과민반응 억제효과

- 국화 꽃 보다 가지에서 복강 투여보다 경구투여에서 활성이 좋았음

7. 피부보습효과시험 : 국화 Ethanol 추출물의 기니픽을 이용한 피부보습효과시험

시험제목	국화 Ethanol 추출물(4종)의 기니픽을 이용한 피부보습효과 시험
시험기관	한국한의학연구원
시험방법	양쪽 옆구리(flank)를 제모한 후 2 % SLS (Sodium Lauryl sulfate)로 피부건조를 유발하고 시험물질을 도포하면서 corneometer를 사용하여 피부보습상태를 측정하였다. 피부보습 측정법은 참고문헌에 준하여 실시하였다
시험일정	시험 개시일: 2008 년 02 월 05 일 동물 입수일: 2008 년 02 월 13 일 피부건조증 유발 개시일: 2008 년 02 월 19 일 시험물질 도포 및 피부보습 측정 개시: 2008 년 02 월 21 일 피부보습 측정 및 종료일: 2008 년 02 월 27 일 최종보고서 제출일: 2008 년 03 월 06 일
동물사육실	제1동물사육구역 06 호실

본 시험은 기니픽을 이용하여 제모한 피부에 피부건조증을 유발한 후 국화 Ethanol 추출물(4종)에 의한 피부보습상태의 개선 효능을 검증하기 위하여 실시하였다. 피부보습상태의 개선은 제모 및 피부건조증을 유발한 후 시험물질을 도포한 부위와 부형제를 처치한 대조군의 보습도를 비교하여 평가하였다. 시험군으로는 부형제 대조물질과 국화추출물 4 종을 5 % 용액으로 조제하여 각각 200 μ l/head를 투여하는 군을 설정하여 각 군당 4 마리의 동물을 사용하였다. 시험물질은 1 일 1 회 6 일간 도포하고, 보습도는 2~3 일 간격으로 총 4 회 측정하였을 때 시험물질의 투여에 의한 이상증상은 관찰되지 않았으며 시험물질의 투여에 의한 체중 변화는 없었다. 부형제대조군에 비한 보습도는 모든 시험물질 투여군에서 통계적인 유의성을 보인 변화는 관찰되지 않았으나 30% 에탄올 추출물 및 70 % 에탄올 추출물 투여 군에서 투여 6 일째에 증가한 경향이 관찰되었다.

이상의 결과로 보면, 국화의 물추출물과 10% 에탄올추출물은 보습에 영향이 없는 것으로 생각되었으나 30% 및 70% 에탄올 추출물에서는 반복적으로 적용하였을 때 일정부분 보습효과가 있는 것으로 추정되었다.

따라서 향후 보습에 관한 추가시험을 수행한다면 30 또는 70 % 에탄올 추출물을 이용하여 보다 장기적으로 적용하면서 용량상관성을 관찰할 수 있는 시험을 수행함으로써 정확한 효능을 판정할 수 있을 것으로 사료된다.

가. 시험재료

1) 시험물질

- (1) 명칭: 국화 Ethanol 추출물 4 종
- (2) 공급자: 성균관대학교
- (3) 로트번호: 기재 없음
- (4) 성상: 짙은 갈색의 고형 엑스
- (5) 입수량: 각 물질 모두 용기 포함하여 약 20 g
- (6) 입수일: 2008 년 01 월 30 일
- (7) 보관조건: 실온보관

2) 부형제

- (1) 명칭: 멸균주사용수
- (2) 공급자: 대한약품공업주식회사

나. 재료 및 방법

(1) 시험계

- 종 및 계통 : 기니픽-Hartley계(Albino guinea pigs)
- 공 급 원 : (주)대한바이오링크(충청북도 음성군 삼성면 대야리 113)

- 시험계의 선택이유

본 시험에 사용된 기니픽은 피부시험과 관련하여 일반적으로 사용되는 동물계통으로 풍부한 기초 자료를 가지고 있어 본 시험에 사용하였다.

- (2) 주령 및 동물수

- 입수시 성별 및 체중 범위: 수컷 250 ± 20 g
- 입수시 동물수: 22 마리
- 시험물질 도포개시시 동물수: 20 마리

- (3) 검역 및 순화

- 동물 입수시 외관을 육안적으로 검사한 후 시험을 실시할 동물실에서 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만 시험에 사용하였다.

다. 사육조건

- (1) 동물사육실: 제1동물사육구역 6 호실
- (2) 온, 습도 범위: 온도 23 ± 3°C, 상대습도 55 ± 15%
- (3) 환기횟수: 10~20 회/hr (전외기 공조방식)
- (4) 명암 Cycle: 형광등조명 12 hrs/day (08:00 점등~20:00 소등)
- (5) 조 도: 150~300 LUX
- (6) 사육상자의 크기: 순화, 검역 및 관찰기간 중 철망사육 (240W x 390L x180H mm)에 동물을 수용하여 사육하였다.
- (7) 사육상자 당 동물수: 검역 기간 및 투여기간에 1 마리씩 사육하였다.
- (8) 물
 - 가) 종류: 음용지하수
 - 나) 급수법: 미세여과기와 자외선을 이용하여 소독한 지하수를 물병을 이용하여 자유 섭취토록 하였다.
 - 다) 오염물질의 분석
 - 위트랩생활환경연구원(경기도 수원시 권선구 서둔동 14-3))에서 실시한 자료를 참조하였다.

(9) 사료

가) 종류: 기니픽용 고품사료

나) 생산자: 에그리브랜드 푸리나코리아

다) 급여법: 급이기를 이용하여 자유섭취토록 하였다.

라) 오염물질의 확인: 사료생산자로부터 공급된 자료를 참조하였다.

라. 투여량 및 시험군의 구성

(1) 시험물질을 부형제를 사용하여 희석하지 않고, 도포하는 양을 달리하여 사용하였다. 시험군의 구성은 다음과 같았다.

군	성별	동물수(마리)	동물번호	농도 (%)	도포량 (μ l/마리)
G1 (VC)	Male	4	1~4	0	200
G2	Male	4	5~ 8	5	200
G3	Male	4	9~ 12	5	200
G4	Male	4	13~16	5	200
G5	Male	4	17~20	5	200

G1; 부형제 대조군, G2; 물추출물, G3; 에탄올 10% 추출물, G4; 에탄올 30 % 추출물, G5; 에탄올 70% 추출물

(2) 군 분리 및 동물식별: 측정된 체중을 순위화 하였고, 순위화된 체중을 이용하여 4마리씩 5군으로 분리하였다. 개체식별은 사육상자 앞에 부착되는 개체식별라벨을 이용하여 표시하였다.

마. 시험물질의 투여

(1) 시험물질의 조제 방법

- 각각의 시험물질을 부형제인 멸균주사용수에 용해하여 5 % W/V 용액으로 조제하였다.

(2) 투여경로 및 투여방법

- 도포량을 피펫을 이용하여 칭량한 후 제모 부위에 고루 도포하였다.

(3) 투여경로 선택이유

- 임상적용 예상 경로로서 피부도포를 선택하였다.

(4) 투여횟수 및 투여기간

- 시험물질은 1 일 1 회 도포하였다.

바. 시험방법

(1) 시험물질의 적용 전 제모 및 피부건조 유발법

(가) 제모

기니픽의 양쪽 옆구리(flank)를 clipper로 1차 제모하고, 전기면도기를 이용하여 2차 제모를 하였다.

(제모면적은 3.0 cm x 3.0 cm으로 함)

(나) 제모 후 2 % SLS (Sodium Lauryl Sulfate)를 적신 면패드를 오른쪽 옆구리 부분에 5분간 접촉하였다. 1 일 후에 동일한 방법으로 SLS를 오전과 오후 총 2회 적용하여 피부건조증을 유발하였다.

(다) 위의 방법과 같이 3 회차 2 % SLS를 적용한 후 익일부터 시험물질을 적용하였다.

(2) 시험물질의 적용 및 보습도 측정

(가) 1 일째(2 % SLS 2 회차 적용 다음날 1 차 보습도 측정)

전기면도기로 양쪽 flank부분을 면도한 후 흐르는 물로 세척을 하

였다. 세척 후 제모한 동물이 들어 있던 사육상자 내에서 2 시간 방치하였다. Corneometer (CM 825, Germany)로 양쪽 flank 부분의 보습도(정전용량; capacitance)를 측정하였다. 보습의 측정은 한 부위를 2 회 측정하여 평균치를 기록하였다. 보습도 측정 후 2 % SLS를 처치한 부위에 시험물질을 도포하였다.

(나) 2 일째

전기면도기로 제모하고 흐르는 물로 세척을 한 후, 1 시간 30 분 후에 피부보습 측정기(corneometer)로 보습도를 측정하였다. 측정 후 시험물질을 적용하였다. 측정시 왼쪽을 대조로 하고 오른쪽은 시험물질을 처리하여 양쪽의 보습차이를 측정하였다. 1 일째와 같은 방법으로 시험물질을 도포하였다.

(다) 3 일째

위의 1 일째와 같은 방법으로 시험물질을 도포하였다.

(라) 4 일째

위의 1 일째와 같은 방법으로 시험물질을 도포하였다.

(마) 5 일째(3 차 보습도 측정)

2일째 보습도 측정과 같은 방법으로 보습도를 측정하였다. 보습도 측정 후 시험물질을 도포하였다.

(바) 6 일째

위의 1 일째와 같은 방법으로 시험물질을 도포하였다.

(사) 7 일째(4 차 보습도 측정)

5 일째와 같은 방법으로 제모 후 보습도를 측정하고 실험을 종료하였다.

사. 관찰 및 검사항목

(1) 일반증상관찰

전 동물에 대하여 매일 1 회 이상 증상관찰을 실시하였다. 일반증상에서 이상이 관찰된 동물들은 동물번호를 기록하고 그 상태를 상세하게 기록하였다. 일반증상관찰은 부검 전까지 매일 실시하였다.

(2) 체중측정

모든 동물에 대하여 투여 개시일, 투여 4 일째 및 마지막 부검일에 측정하였다.

(3) 측정된 보습도 수치는 시험물질이 처리되지 않은 왼쪽과 피부 건조증이 유발된 오른쪽과의 차이를 시험자료로 처리하였다.

아. 통계학적 방법

측정된 보습도 수치의 통계처리는 상용통계 프로그램인 SPSS 10.1을 이용하여 대조군과 각 처치군간의 비교를 T-test를 통하여 실시하였다.

다. 결 과

(1) 일반 증상

시험물질 투여와 관련된 이상증상은 관찰되지 않았다.

(2) 체중의 변화 (Figure 3-7)

시험물질 투여와 관련된 통계학적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았다.

(3) 피부 수분의 변화 (Figure 3-8)

건조증을 유발한 곳과 그렇지 않은 곳의 전기전도도의 차이를 표3-3에 나타내었다. 전기전도도의 차이가 적을수록 보습효과가 있는 것이다.

표에서 보듯이 부형제 대조군과 각 물질 처치군간에 통계적인 유의성이 관찰되지 않았다. 그러나 4 차 측정에서 30% 에탄올 추출물 투여군과 70 % 에탄올 추출물 투여군에서 대조군에 비하여 감소한 경향이 관찰되었다. 또한 3 차 측정에 비하여 30% 에탄올 추출물은 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었고 70 %에탄올 추출물에서도 뚜렷한 감소경향이 관찰되었다.

표 3-3. 전기 전도도

	1 차 측정	2 차 측정	3 차 측정	4 차 측정
Control	21.8±2.63 ^{a)}	20.3 ± 3.52	23.5 ± 4.02	16.1 ± 4.37
물추출물	18.8 ± 4.73	19.0 ± 3.58	17.5 ± 2.74	17.9 ± 3.71
10%에탄올추출물	14.4 ± 3.54	19.6 ± 5.94	22.5 ± 2.58	17.4 ± 1.75
30%에탄올추출물	19.6 ± 2.78	21.3 ± 1.55	23.1 ± 5.17	12.6 ± 1.93*
70%에탄올추출물	24.4 ± 5.62	22.8 ± 5.81	21.3 ± 4.57	13.0 ± 3.11

a) 좌측 대조부위와 피부건조증을 유발한 우측부위의 보습도(정전용량) 차이; Mean ± S.D

* Significant difference from the 3rd measurement of 30 % Ethanol extracts treatment group, p<0.05

다. 고찰 및 결론

본 시험은 기니픽을 이용하여 제모한 피부에 피부건조증을 유발한 후 국화의 에탄올 추출물(4종)을 도포하여 건조증의 개선 효능을 알아보기 위하여 실시하였다. 피부 보습상태는 피부건조증을 유발한 부위와 유발하지 않은 부위의 전기전도도 차이를 이용하여 평가하였다.

이렇게 실험한 결과 시험물질을 투여한 초기에는 부형제 대조군과 유의한 차이가 관찰되지 않았으나, 7 일째 측정된 결과에서는 대조군에 비하여 30 및 70 % 에탄올 추출물 투여군에서 보습도가 증가한 경향이 관찰되었고 특히 30% 에탄올추출물 투여군에서는 투여 4 일째의 값에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보였고 70 % 에탄올추출물 투여군에서도 투여 4 일째의 값에 비해 차이를 보여 보습도의 개선효과를 보인 것으로 사료되었다.

이상의 결과로 보면, 국화의 물추출물과 10% 에탄올추출물은 보습에 영향이 없는 것으로 생각되었으나 30% 및 70% 에탄올 추출물에서는 반복적으로 적용하였을 때 일정부분 보습효과가 있는 것으로 추정되었다.

따라서 향후 보습에 관한 추가시험을 수행한다면 30 또는 70 % 에탄올 추출물을 이용하여 보다 장기적으로 적용하면서 용량상관성을 관찰할 수 있는 시험을 수행함으로써 정확한 효능을 판정할 수 있을 것으로 사료되었다.

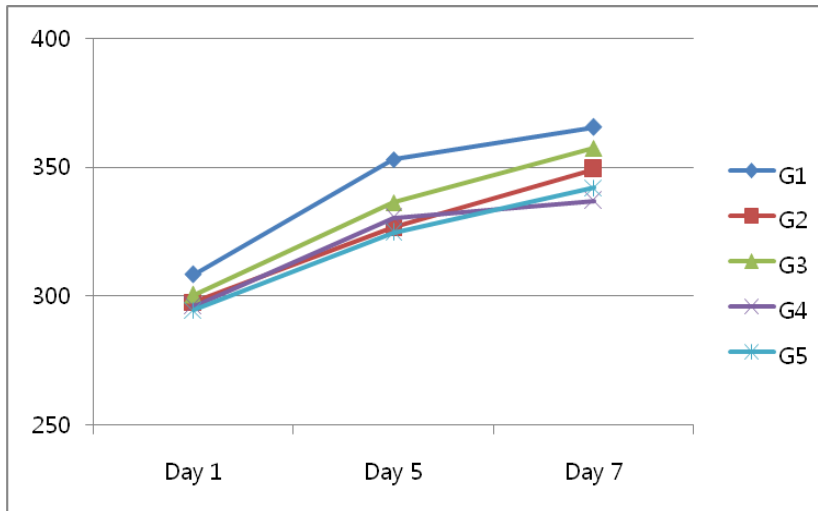


Figure 3-7. Change of body weight in guinea pigs
 G1; Vehicle control, G2; Water extracts, G3; 10 % Ethanol extracts
 G4; 30 % Ethanol extracts, G5; 70 % Ethanol extracts

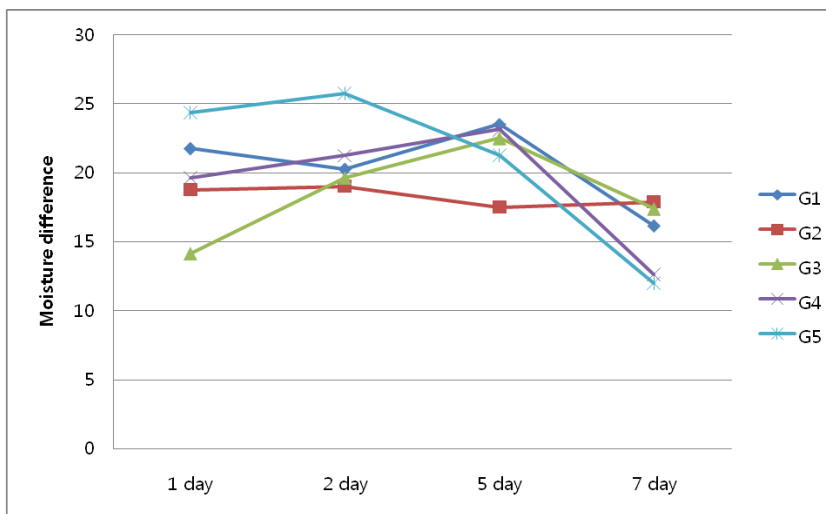


Figure 3-8. Change of moisture difference in guinea pigs.
 G1; Vehicle control, G2; Water extracts, G3; 10 % Ethanol extracts,
 G4; 30 % Ethanol extracts, G5; 70 % Ethanol extracts
 * Significant difference from the 3rd measurement of 30 % Ethanol extracts treatment group $p < 0.05$

제 2 절 황토국화 시제품의 생물학적 활성규명

1. 아토피치료 유효분획에 대한 성분연구

고창지역에서 수급된 국화건조물 전초 500g을 세절하여 상온에서 8L (x16) 80% Ethanol 용액으로 추출하여 완전건조하여 119g을 얻었다(회수율 23.8%).

3L 물에 녹인 후 Hexane, Methylene chloride, Ethyl acetate, n-Butanol 순으로 순차적으로 용매상에 따른 Fractionation을 실시한다. 각 fraction의 회수율은 1차 extract 대비 Hexane (16.15g, 13.57%), MC(5.21g, 4.37%), EA(6.77g, 5.68%), BuOH(22.95g, 19.28%), Water(52.76g, 44.33%)로 나타났으며 약효시험결과 Hexane fraction은 Atopy 치료효과를 나타냈으며 EA fraction은 항산화능이 강하여 향후 시험을 진행하였다.

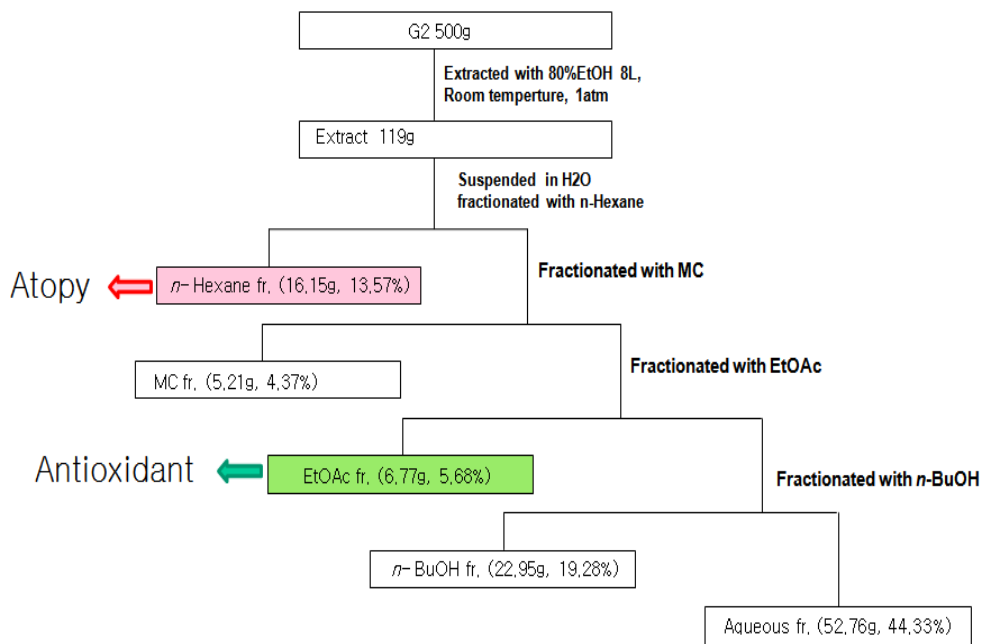


그림 3-9. 황토국화의 용매 Fractionation

비만세포의 탈과립화 억제실험을 통하여 Hexane fraction이 아토피치료 효과가 높을것으로 예상되었으며 탈과립화 억제와 더불어 항알러지 치료제를 목적으로 항산화 평가를 하였음. 일반적으로 비만세포 탈과립화 억제 성분과 항산화 성분이 일치하므로 1차적으로 항산화 평가후 비만세포 탈과립화 DATA와 비교하였을때 Buthanol 층에서도 항산화 활성이 있으나 ORAC, DPPH 공히 EA층에 비해 약하므로 우선적으로 EA층에 대하여 Activity-guided fracitonation 실시하는 것으로 하였음. EA층에 대하여 Activity-guided fracitonation 한 결과는 지표성분 설정을 위한 분석 결과에 있음. 상기에서도 밝혔듯이 아토피의 유효성분은 Hexnae으로부터 유효성분을 규명하고자 하였으나, 유효성분에서 effect가 떨어짐으로 이는 국화의 다양한 성분의 additive효과로 보임. 따라서 지표성분으로 탈과립화 억제효능우수한 Oil(Hexane층)과 항산화활성이 우수한 EA층에서 지표 성분 분석을 실시하였음.

표 3-4. 국화 용매분획별 항산화력 시험

Fraction	DPPH (EC50, $\mu\text{g}/\text{mL}$)	ORAC ^{PE} value
n-Hexane	200<	0.497
CH ₂ Cl ₂	200<	0.987
EtOAc	31.44	1.860
BuOH	68.98	0.862
H ₂ O	200<	0.237

2. Subfraction과 항알러지 효능 검증

Hexane 층의 subfraction의 Allergy에 효과를 알아보기 위하여 mast cell의 탈과립 억제능을 측정하였다. β -hexosaminidase assay test를 실시하였을때 hexane fraction에서 전반적으로 125ug/ml 농도에서 항알러지 효과가 있는 것으로 관찰되었다.

그림 3-10. Hexane 층의 subfraction

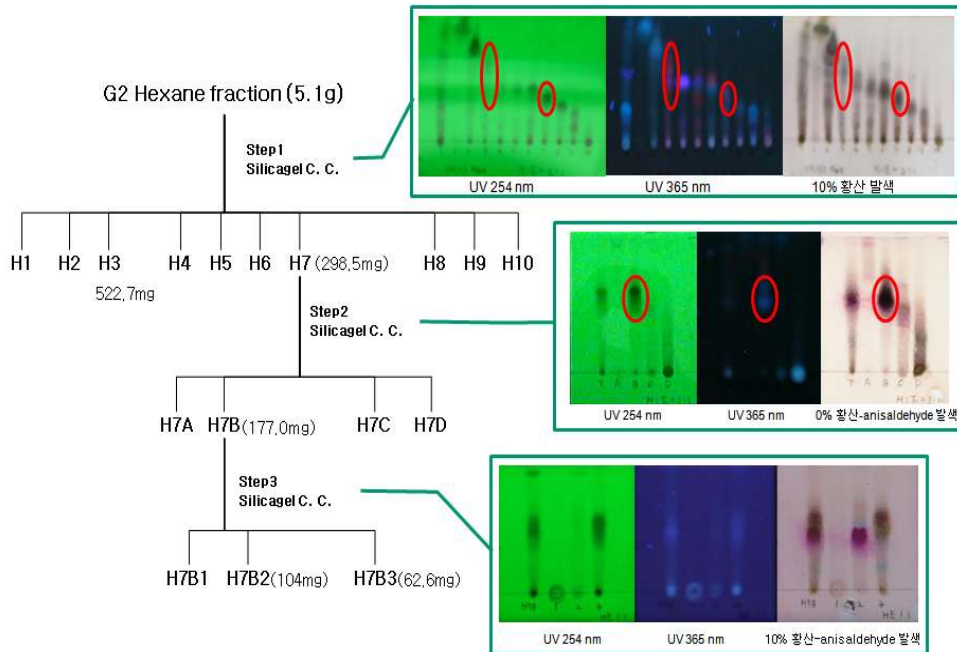


표 3-5. 국화 활성시료의 inhibition rate 측정

sample	5ug/mL	25ug/mL	125ug/mL
G2-H7	7.7633±2.1945	15.5100±2.5275	50.9666±1.4007
G2-H7A	0.8100±1.9022	14.3733±0.2203	44.9933±1.6216
G2-H7B	3.4166±27616	15.1700±1.8658	53.1166±3.4225
G2-H7C	6.3666±0.7225	15.6133±1.1788	53.7500±1.6891
G2-H7D	2.7900±1.8757	10.0733±0.3338	41.2733±2.6438

* β -hexosaminidase assay에서 inhibition 50% 넘으면 항알러지 효과가 있음.

3. 황토국화 추출물의 anaphylaxis 시험

시험물질 국화 70% ethanol 추출물의 active systemic anaphylactic shock 반응을 조사하기 위하여 시험물질을 농도별로 각각 5마리의 ICR 수컷 mouse에 피하주사한 후 치사율과 혈중 histamine 함량을 측정하였다. Compound 48/80에 의한 치사율은 100 및 50 mg/kg에서 40%, 25 mg/kg에서 80%로 50 및 100 mg/kg에서 치사율이 억제되었고 혈중 histamine 함량은 100 mg/kg에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다.

가. 실험재료 및 방법

(1) 시험물질

시험물질은천염물실에서 공급받은 70% ethanol 용매에서 추출한 국화 추출물을 사용하였다.

(2) 실험동물 및 사육조건

실험동물은 6주령 수컷 ICR mouse를 중앙실험동물(주)로부터 분양하여 일주일간 본 사육장의 조건에 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 배기 10-12회, 형광등 명암 12hr cycle, 조도 150-160 Lux로 전 시험기간동안 폴리카보네이트 사육상자(275W×420L×190H mm)에 5마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간 동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121°C 에서 15분간 멸균하여 사용하였고, 멸균된 사료와 물은 자유섭취시켰다.

(3) 시험군의 구성

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고, 평균 체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였으며 각 군의 평균체중에 대한 군간 차이는 ANOVA 검정으로 통계학적 검증을 실시하여 확인하였다. 동물의 개체식별은 피모색소표시법 및 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 각 군은 수컷 5마리로 구성

하였으며, 투여용량의 설정은 예비시험결과 및 시험물질의 용해도 등을 고려하여 3단계의 등비용량(공비 2)으로 고용량군(100 mg/kg), 중용량군(50 mg/kg) 및 저용량군(25 mg/kg)으로 설정하였으며, 대조군은 용매처치군으로 설정하였다.

(4) 시험방법

ICR mouse에 sample을 농도별로 0.2 ml씩 피하주사하고 대조군은 동량의 saline을 처치하였다. 2시간 후 compound 48/80 (8 mg/kg)을 복강 내에 투여하고 mouse의 치사율을 60분 동안 관찰하였다. 혈중 histamine 함량의 측정은 60분 동안 관찰시 폐사하는 경우에는 폐사 직후, 폐사하지 않은 경우에는 60분경과 후에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 혈장 histamine 함량을 측정하였다.

[시험방법]

-Systemic anaphylaxis

- ① Test 시료(BuOH)를 농도별(5, 25, 125, 625 mg/kg) 복강 투여한다.
- ② 시료처리 1시간 후, compound 48/80을 8mg/kg로 복강 투여한다.
- ③ 1시간 동안 관찰하여 사망하는 mouse수를 기록하고 혈액을 취하여 혈청분리
- ④ 분리된 혈청으로 histamine에 대한 ELISA assay 실시

- Anaphylaxis 시험에서 얻어진 혈청으로부터 histamine에 대한 분석

- ① Systemic anaphylaxis에서 얻은 혈청을 ice에 둔다
- ② Histamine ELISA kit을 이용하여 sample을 acetylation 시킨다.
- ③ Sample 50 μ l을 96 well assay plate에 각각 분주한다. 1hr R.T
- ④ 3회 wash 한다.
- ⑤ Histamine 항체를 처리한다. 3hrs R.T
- ⑥ 3회 wash 한다.
- ⑦ TMB substrate solution을 처리한다. 40min R.T 200rpm
- ⑧ 100 μ l의 stop solution 처리 450nm에서 흡광도 측정

나. 결 과

- Active systemic anaphylatic shock 반응에 미치는 효과
대조군에서는 anaphylatic shock으로 100%의 치사율을 나타내었고, 25, 50 및 100 mg/kg의 국화추출물을 전처치한 경우 치사율이 25 mg/kg에서는 80%, 50과 100 mg/kg에서는 40%로 감소하였다 (Table 3-1).

- 혈중 histamine 함량에 미치는 영향
100 mg/kg에서 histamine의 함량이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 1-1).

다. 고찰 및 결론

Anaphylaxis는 즉시형 과민반응 중 가장 전격적이고 중한 반응으로 즉각적인 응급 처치가 필요한 질환이다. Anaphylaxis는 원인 물질에 노출된 후 수분에서 20-30분 이내에 증상이 나타나며, 일반적으로 증상의 발생까지의 시간이 짧을수록 더 심한 반응이 일어난다. 증상발생의 초기에 국소적 혹은 전신적인 소양증, 피부발적이 생기거나 따끔거리는 느낌을 호소하다가 전신적인 담마진 및 혈관 부종이 발생하며, 후두부종이나 기관지 수축으로 인한 심한 호흡곤란으로 이어져 있다. 심한 경우는 심혈관 허탈, 의식소실, 청색증, 경련, 치명적인 부정맥이 발생하고 사망할 수도 있다. 전신 anaphylaxis는 신체의 어느 장기라도 영향을 줄 수 있으며, 특히 폐, 순환기, 피부, 신경계, 소화기에 빈번하게 증상이 발생한다. 본 시험에서는 active systemic anaphylatic shock 반응을 실시한 결과, 25, 50 및 100 mg/kg의 국화추출물을 전처치한 경우 치사율이 25 mg/kg에서는 80%, 50과 100 mg/kg에서는 40%로 감소하였고, 혈중 histamine 함량은 100 mg/kg에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 이상의 실험결과에서 국화추출물은 active systemic anaphylaxis에 유의한 효과가 있는 것으로 나타났다.

Table 3-6 Effect of loess chrysanthemum on the compound 48/80 induced active systemic anaphylactic shock

Dose (mg/kg)	Lethality (%)
0	100
25	80
50	40
100	40

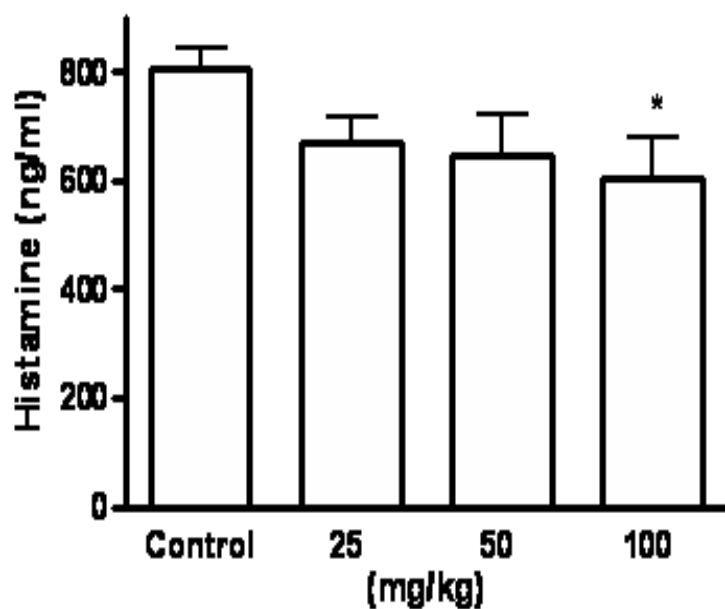


Fig. 3-11. Effect of loess chrysanthemum on compound 48/80 induced serum histamine release. Data represents the mean \pm SE from 5 mice. *, significantly different compared to control ($p < 0.05$)

제 3절 황토국화 추출물의 성분분석 연구

1. 유효 분획 연구

80% 에탄올로 1차 추출후 Hexane, Methylene chloride, Ethyl acetate, Butanol 등의 용매를 순차적으로 처리하여 분획하여 각 분획의 활성을 측정하여 유효성분이 존재하는 분획을 검증하고 분획내에 존재하는 성분을 연구하고자 하였다. 1차 추출물의 초기 수율은 18%이며 초기 추출물 대비 용매 분획의 수율은 아래의 그림3-12의 내용과 같다.

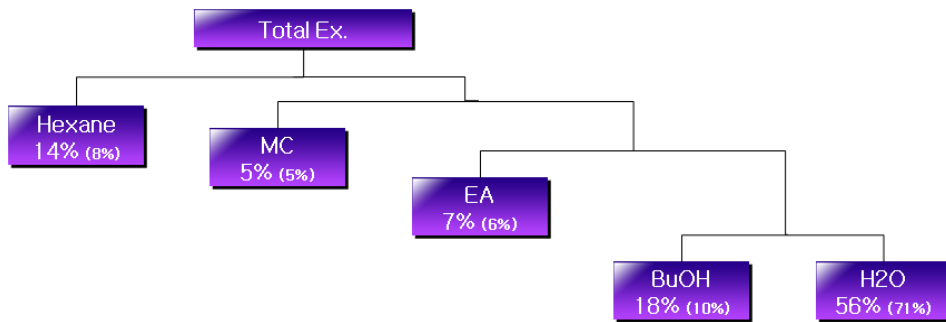


그림3-12. 초기 추출물 대비 용매 분획의 수율

이중 EA층에서 가장 강한 항산화 활성이 나타난 반면, 면역세포 탈과립화 억제효능은 Hexane층에서 나타났다.

따라서, Hexane 및 EA층으로부터 소분획을 실시하여 지표성분을 분리하고자 하였다. 그러나 상기에서도 밝혔듯이 아토피의 유효성분은 Hexane으로부터 유효성분을 규명하고자 하였으나, 유효성분에서 effect가 떨어짐으로 이는 국화의 다양한 성분의 additive효과로 보임. 따라서 지표성분으로 탈과립화 억제효능우수한 Oil(Hexane층)과 항산화활성이 우수한 EA층에서 지표성분 분석을 실시하였다.

2. 유효 국화 추출물의 지표성분 연구

분획연구를 통하여 유효성을 가지고 있는 Hexane 및 EA layer를 가지고 Column chromatography를 수행하여 아래의 6개의 subfraction을 얻었다.

표 3-7. Hexane 및 EA layer층의 subfraction별 항산화 효과

Name	ORAC _{PE} value	DPPH IC ₅₀ (ug/ml)
Total	1.419	24.9
H1	1.860	60.58
H2	1.470	23.21
E1	2.133	30.41
E2	1.716	190.35
E3	1.147	130.35
E4	0.541	27.23

이중에서 항산화활성이 가장 강한 E2소분획으로부터 물질 분리를 하여 성분을 규명하였다.

Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(Merck, Darmstadt, Germany)을 octadecyl silica(ODS) gel은 LiChroprep RP-18(Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였다.

Thin layer chromatography(TLC)는 Kieselgel 60 F254와 RP-18 F254S를 사용하였고, TLC상의 물질 검출에는 UV lamp와 10% aq. H₂SO₄를 사용하였다. 시료의 추출과 분획에 사용한 유기 용매는 대정화학주식회사에서 생산한 1급 시약을 사용하였다. Nuclear magnetic resonance(NMR) spectrum은 Bruker Avance II 400(Bruker Biospin, USA)으로 측정하였다.

α, β -amyrin의 분리. 감국(*Chrysanthemum indicum*) 전초에 대해서, 70% aqueous EtOH로 24시간씩 추출하고, 이를 감압농축하여, 120g의 EtOH 추출물을 얻었다. 이 추출물을 1L의 50% MeOH 수용액으로 현탁하고, 동일량 (1L×3)의 n-hexane로 용매분배추출을 하였다. n-hexane 분획을 감압농축하여 10.9g을 얻었으며, G2H라 명칭하였다.

G2H분획 (9.5g)을 silica gel (SiO₂) column chromatography (cc, Φ 6.5×35cm, n-hexane-EtOAc = 14:1→10:1→6:1→5:1→4:1)를 실시하여 16개의 분획을 얻었다(G2H-1~G2H-16). 위에서 얻어진 G2H-7(1g)에 대해서, SiO₂ cc (Φ 6.5×35cm, n-hexane-EtOAc = 20:1→16:1→14:1)을 실시하여 6개의 분획 (G2H-7-1~G2H-7-6)을 얻었다. 이 중에서 G2H-7-3분획 (618mg)에 대하여, 40℃에서 5mL의 CHCl₃으로 녹이고, 천천히 식히면서, 수집 방울의 MeOH로 가하여, 흰색으로 결정되어지는 물질을 filter paper (Whatman, USA)로 모으고 이를 G2H-7-3c로 명칭하였다. 그리고, 여액을 모아서 감압농축하여, G2H-7-3f (418mg)를 얻었다. G2H-7-3f에 대하여 ODS cc (Φ 3×13 cm, MeOH-H₂O = 4:1→9:1)를 실시하여 12개의 분획 (G2H-7-3f-1~G2H-7-3f-12)을 얻었다. G2H-7-3c와 G2H-7-3f-12를 Kieselgel 60 F254의 TLC plate에 n-hexane-EtOAc (7:1)과 RP-18 F254S의 역상 TLC plate에 MeOH-H₂O (12:1)로 비교 분석해 본 결과, 동일한 화합물로 확인되었고, 이들에 대하여 NMR을 측정하여 본 결과, 동일한 화합물로 구조결정되었다.

이들의 NMR 구조분석 결과, ursane skeleton의 α -amyrin과 oleanane skeleton의 β -amyrin이 각각 69:31의 비율로 mixture상태로 존재하는 triterpene 화합물로 구조동정되었다. 이에 대한 NMR data를 첨부하였다.

Table. 3-8. ^{13}C -NMR chemical shifts of α -amyrin and β -amyrin in CHCl_3 solution 1)2)3)

Carbon	α -amyrin	β -amyrin
C-1	38.687	38.516
C-2	27.153	27.113
C-3	78.899	78.899
C-4	38.719	38.719
C-5	55.103	55.103
C-6	18.285	18.285
C-7	32.850	32.405
C-8	39.911	39.693
C-9	47.621	47.542
C-10	36.795	36.845
C-11	23.291	23.451
C-12	124.328	121.644
C-13	139.478	145.077
C-14	41.968	41.602
C-15	26.536	26.070
C-16	27.909	26.851
C-17	33.666	32.563
C-18	58.957	47.122
C-19	39.580	46.731
C-20	39.524	31.005
C-21	31.188	34.656
C-22	41.462	37.072
C-23	28.075	28.024
C-24	15.600	15.438
C-25	15.621	15.562
C-26	16.788	16.729
C-27	23.206	25.938
C-28	28.696	28.348
C-29	17.434	33.300
C-30	21.368	23.637

- 1) Knight, S. A., Org. Magn. Reson. 6, 603 (1974)
- 2) Seo, S., Tomita, Y., and Tori, K., Tetrahedron Lett. 16(1), 7 (1975)
- 3) Kang, S. S., Kor. J. Pharmacogn. 18(3), 151 (1987)

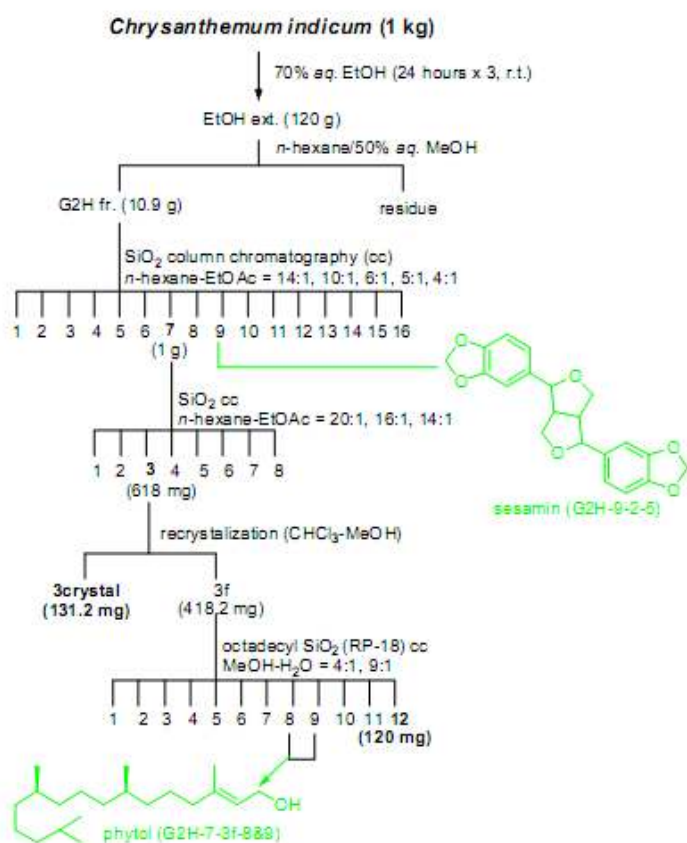


Fig. 3-13. Isolation procedure of α -amyrin (ursane skeleton) and β -amyrin (oleanane skeleton) with phytol and sesamin from the n-hexane fraction of mud *Chrysanthemum morifolium*.

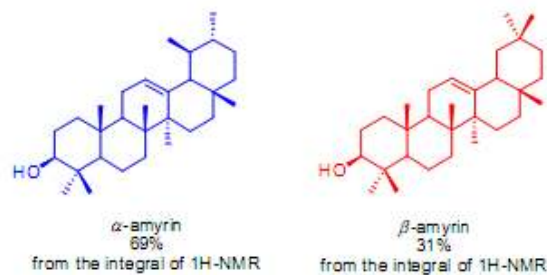


Fig. 3-14 . The chemical structures of α -amyrin (ursane skeleton) and β -amyrin (oleanane skeleton) from the n-hexane fraction of mud *Chrysanthemum morifolium*.

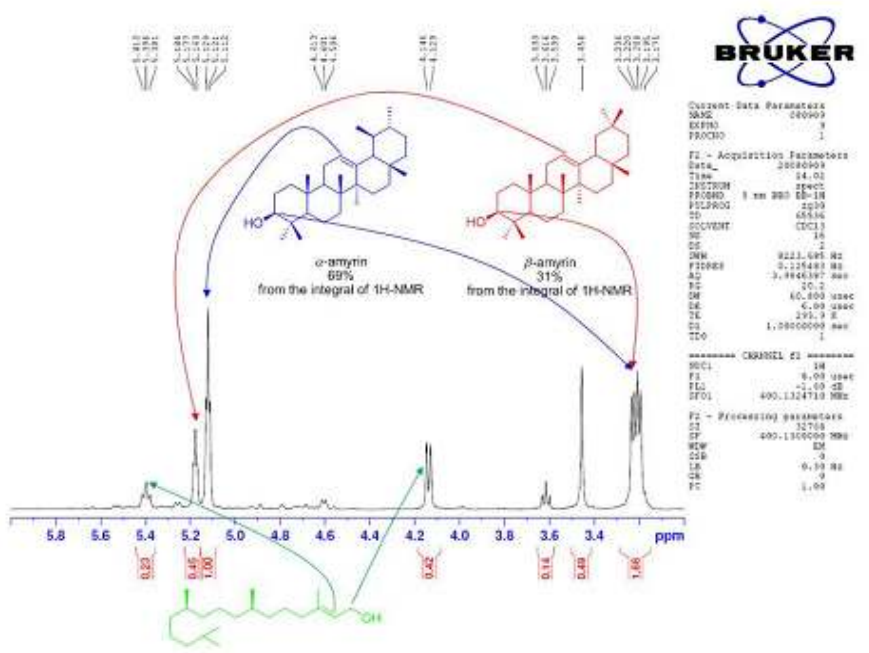
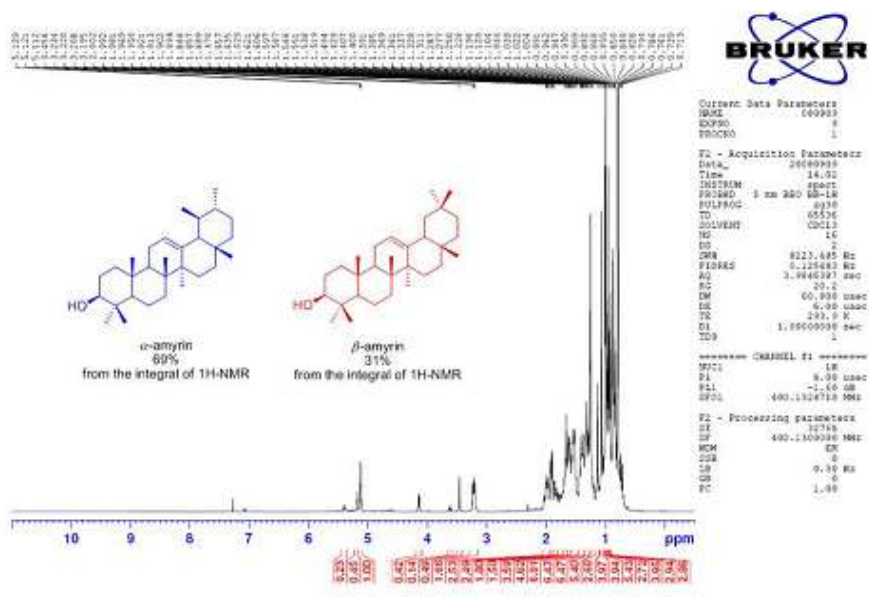


Fig. 3-15 . The NMR spectrum of α -amyirin (ursane skeleton) and β -amyirin (oleanane skeleton) from the n-hexane fraction of mud Chrysanthemum morifolium.

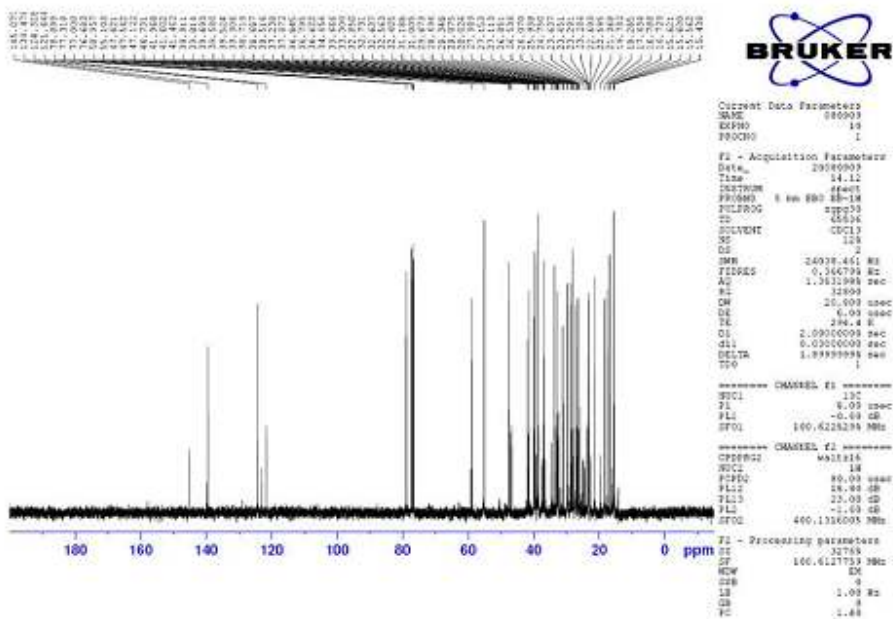
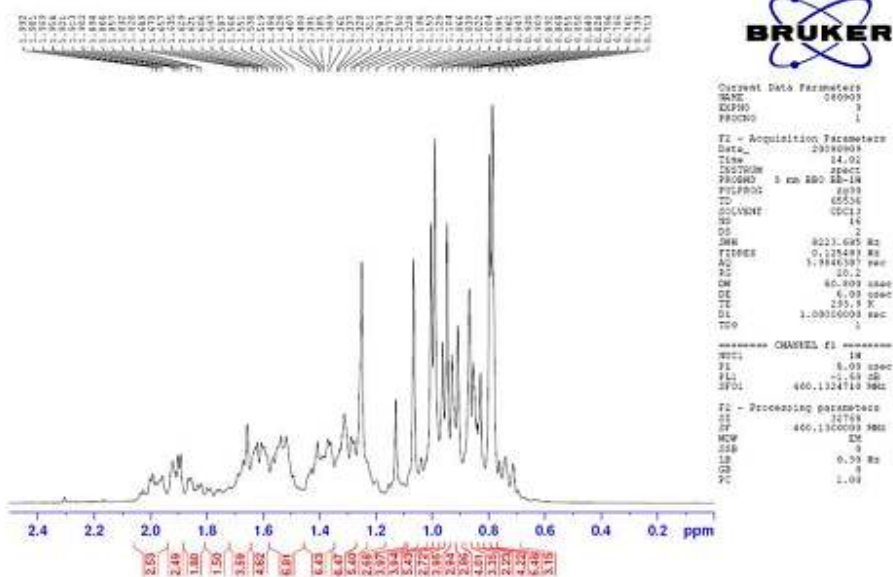


Fig. 3-16 . The NMR spectrum of α -amyrin (ursane skeleton) and β -amyrin (oleanane skeleton) from the n-hexane fraction of mud *Chrysanthemum morifolium*.

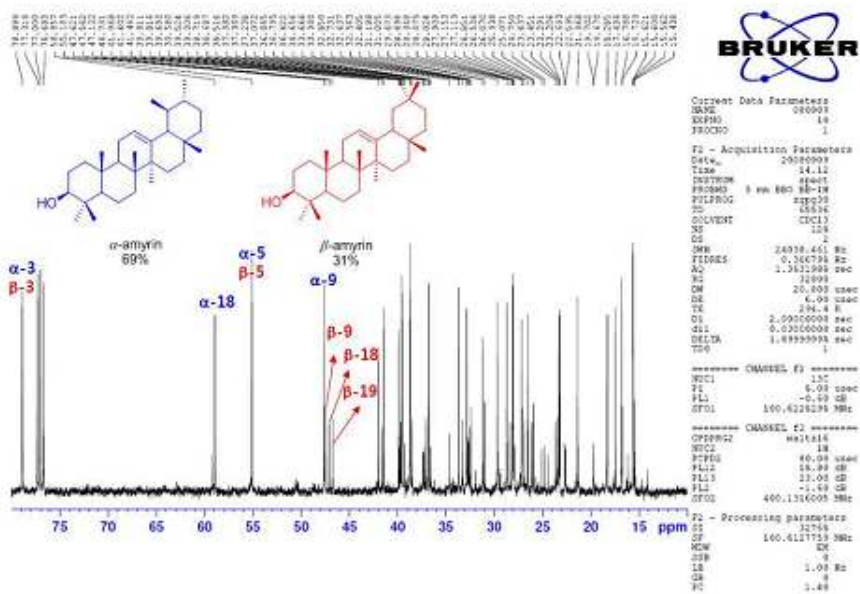
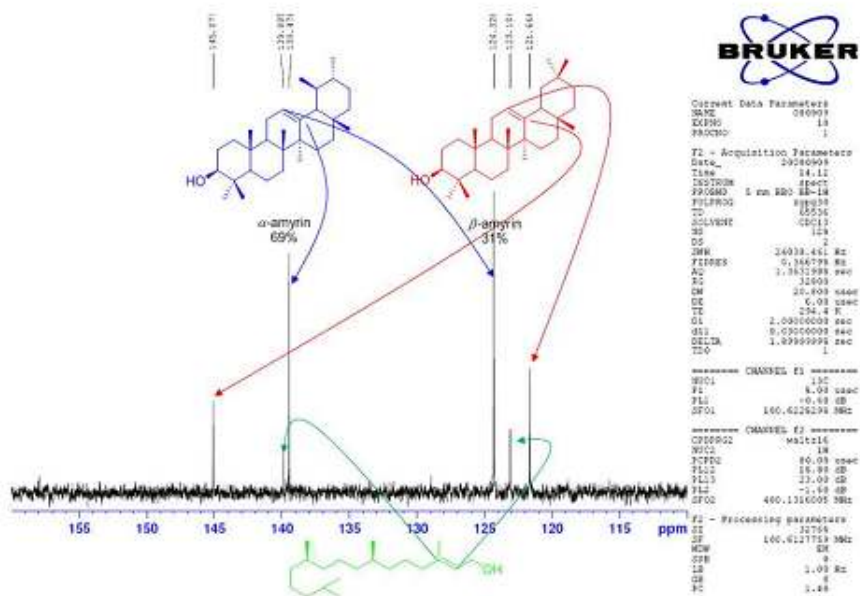


Fig. 3-17 . The NMR spectrum of α -amyryn (ursane skeleton) and β -amyryn (oleanane skeleton) from the n-hexane fraction of mud Chrysanthemum morifolium.

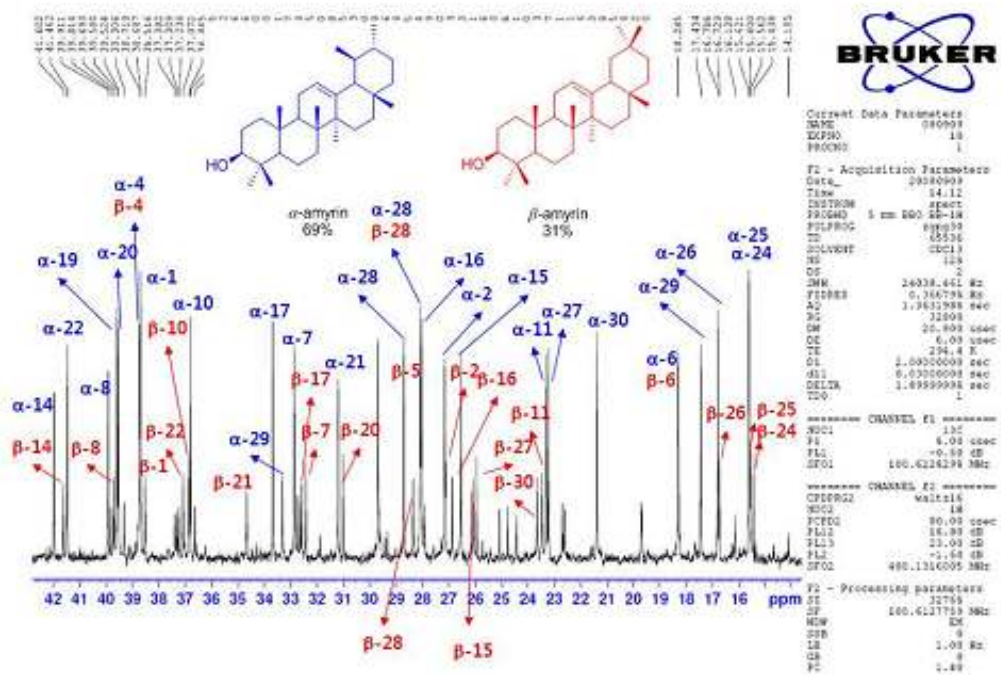


Fig. 3-18 . The NMR spectrum of α-amyrin (ursane skeleton) and β-amyrin (oleanane skeleton) from the n-hexane fraction of mud Chrysanthemum morifolium.

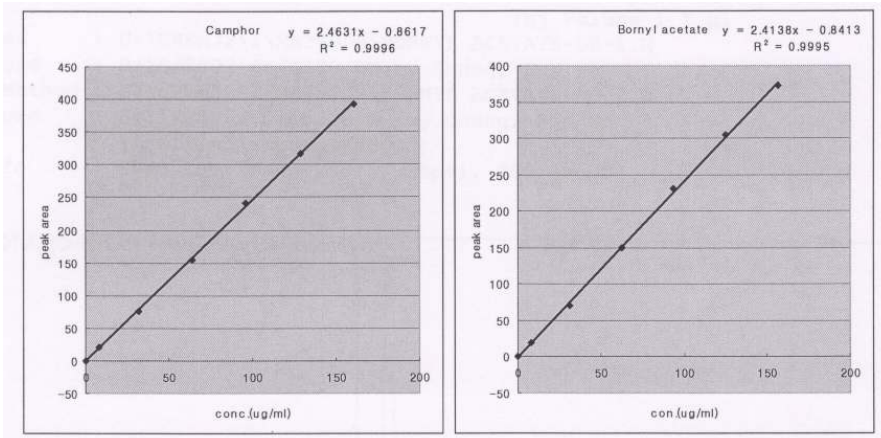
3. 국화 정제오일의 지표성분 연구

문헌조사를 통하여 아래의 두성분을 지표성분으로 하여 함량을 분석하였다.

Camphor(99.8%), Bornyl acetate(96.9%)

국화추출물중 정제오일 샘플은 두가지 정유 지표성분을 사용하여 분석하였고 Camphor 6.25%, Bornyl acetate 0.5%가 분석되었다.

HPLC condition	
System	Shiseido nanospace SI-2
Detector	DAD
Column	C18 (4.6*250), ACE 5um
Mobile phase	ACN : 10mM H3PO4 = 35:65
Flow rate	0.7mL/min
Column temp	37°C



Sample	Camphor peak area	Bornyl acetate peak area	Camphor 함량(%)	Bornyl acetate 함량(%)
oil	309.77509	24.02539	6.20	0.51
	314.31754	23..27312	6.29	0.49
	평균값		6.25	0.50
ext	ND	ND		

제 4절 황토국화 추출물의 생산공정 표준화 및 제제화 연구

1. 국화 정제오일 추출공정 연구

고창지역에서 수급한 황토국화 100kg을 처리하여 제품개발용 시생산을 실시하였다. 황토국화 100kg을 증류수 스팀을 사용하여 2시간 증류를 실시한다. 유수를 분리하여 Essential oil 50mL과, 오일함유 증류수 200kg을 얻었다. 30% 1,3 butylene glycol을 투입하여 95℃에서 2시간을 추출하여 추출액 250을 얻고 잔사를 제거하였다. 3일간 냉장처리하여 침전시키고 1.0um, 0.8um 필터를 사용하여 여과공정을 실시한다. 이때 고형분 함량을 체크하였을때 1.0%임을 확인하였고 이후 방부제로 phenoxy ethanol을 처리하여 제균여과하고 최종 추출물로 220kg을 얻었다.

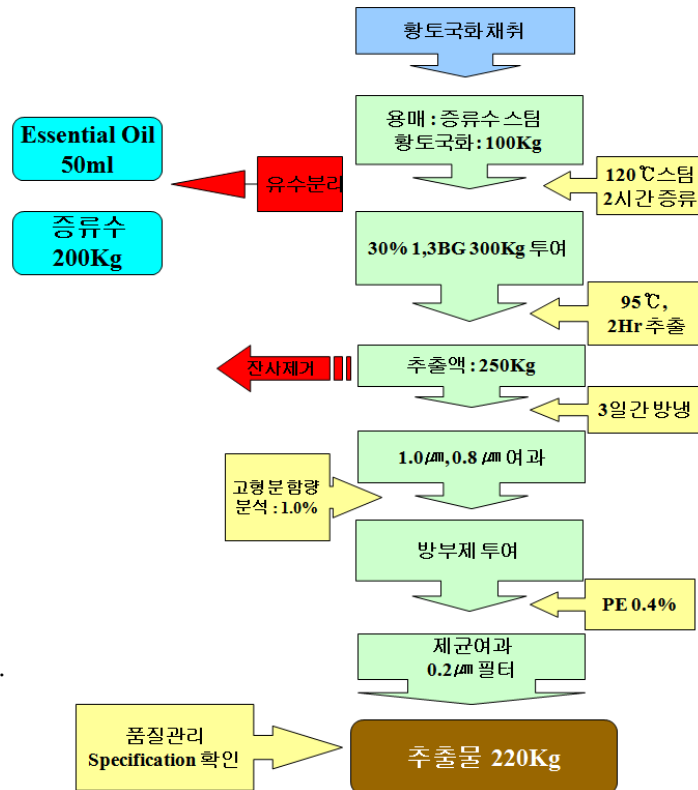


그림 3-19. 국화추출물 Pilot 추출공정

Essential oil의 경우 carrier oil을 사용하여 최종 200mL의 오일을 수득하였으며 오일함유 증류수의 경우 방부제로 phenoxy ethanol 을 처리하였고 섞여있는 오일상을 가용화되도록 가용화제로 Poly oxy ethylene을 처리하여 최종 오일함유 증류수를 만들어 내었다.

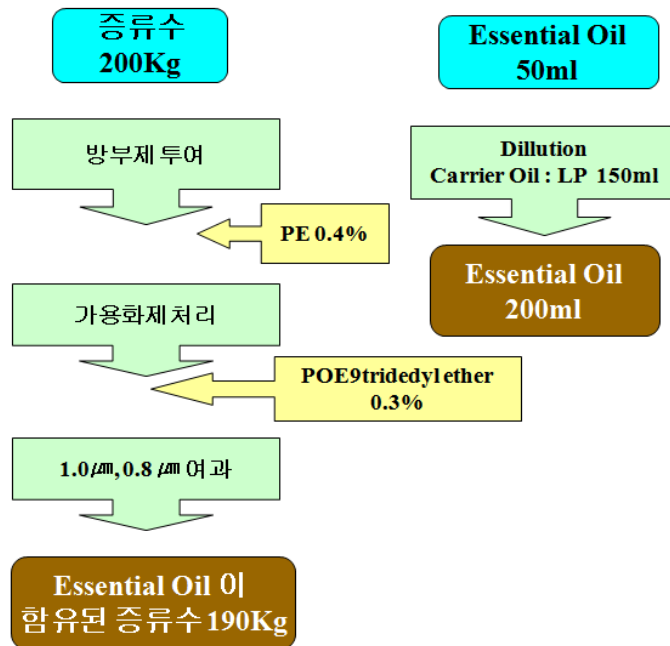


그림 3-20. 오일함유 증류수 및 에센셜 오일 제조과정



그림 3-21. 최종 추출산물



그림 3-22 황토국화 추출시설



그림 3-23. 황토국화 에센셜오일 및 추출물 추출 작업



그림 3-24. 추출공정에 따른 시제품

SPECIFICATION

Product

황토국화 증류수

Analytical Tests	Specifications
INCI Name	Chrysanthellum indicum Ext.
Description	Transparent Liquid
Odour	Typical
pH	4.5 ~6.5
Refractive index(20℃)	1.320 ~1.360
Specific Gravity(d20/20)	0.980 ~ 1.020
Identification -1) Saccharides	적자색
Heavy Metals	≤ 10 ppm
Arsenic	≤ 2 ppm
Microbes	≤ 100 cfu/ml

Approved by : J.W. Yoon

5-6 Bangea-ri, Munmak-eup, Wonju-si, Gangwon-do, South Korea Tel. +82 33 732 7561~2 Fax. +82 33 732 7563
<http://www.dermalab.co.kr> info@dermalab.co.kr

그림 3-25. 황토국화 증류수의 Specification

SPECIFICATION

Product 황토국화 Essential Oil

Analytical Tests	Specifications
INCI Name	Chrysanthellum indicum Ext.
Description	Light Yellow ~ Yellow liquid
Odour	Typical
Refractive index(20℃)	1.430 ~ 1.470
Specific Gravity(d20/20)	0.930 ~ 0.970
Heavy Metals	≤ 10 ppm
Arsenic	≤ 2 ppm
Microbes	≤ 100 cfu/ml

Approved by : J.W. Yoon

.....

5-6 Bangye-ri, Munmak-eup, Wonju-si, Gangwon-do, South Korea Tel. +82 33 732 7561~2 Fax. +82 33 732 7563
<http://www.dermalab.co.kr> info@dermalab.co.kr

그림 3-26. 황토국화 에센셜 오일의 Specification

SPECIFICATION

Product 황토국화 Extract

Analytical Tests	Specifications
INCI Name	Chrysanthellum indicum Ext.
Description	Brown ~ Dark Brown Liquid
Odor	Typical
pH	5.0 ~ 7.0
Refractive index(20℃)	1.355 ~ 1.395
Specific Gravity(d20/20)	1.000 ~ 1.040
Identification	
-1) Saccharides	적자색
-2) Triterpenoids	적갈색
-3) Saponins	적갈색
-4) Tannins	암녹색/침전
-5) Amino acids	자색
Heavy Metals	≤ 10 ppm
Arsenic	≤ 2 ppm
Microbes	≤ 100 cfu/ml

Approved by : **J.W. Yoon**

.....

2. 황토국화 오일, 증류액, 추출물 수율 및 생산에 따른 문제점 및 해결방안

가. 추출 수율

- 1) 오일 및 증류액 : 황토국화 100Kg을 증류할 때 오일이 약 50mL를 생산되며, 또한 증류액이 약 200Kg 포집됨.
- 2) 추출물 : 황토국화를 수증기 증류 후에 잔사를 화장품 사용가능 용매를 이용하여 추출할 경우 추출물이 용매를 포함하여 약 220Kg 얻어짐..

나. 문제점

- 1) 오일의 추출 수율이 매우 저조함으로 생산 비용이 많이 들며 또한 생산하여도 오일 판매 금액이 상당히 비싸게 형성됨으로써 시장 확보에 문제가 있음.
- 2) 오일의 수율을 높이기 위하여 초임계 추출을 할 경우에는 황토국화 잎 및 가지에 존재하는 엽록체가 함께 추출되어 후처리 공정이 필요하게 되며, 또한 대량을 초임계로 추출하기 어려움이 있음.
- 3) 오일을 증류하기 위해서는 생초를 사용해야 함으로 생산 시기의 한계 및 설비의 대량화 등의 여러 문제점 등이 도출되었음.

다. 해결 방안

- 1) 오일은 추출 수율이 떨어지므로 오일 생산보다는 증류에 의한 오일이 함유된 증류액이 생산 비용 절감, 판매 단가 저렴, 화장품 제조시 사용 용이 등의 장점이 있으므로 수증기증류법에 의한 증류액의 생산이 바람직할 것으로 예상됩니다.

- 2) 이 경우에는 화장품에 제조시 물이 약 70% 사용되는 것을 감안한다면 대량 생산, 대량 유통으로 인하여 생산원가 절감, 화장품 효능 극대화 등의 효과를 얻을 것으로 예상됩니다.
- 3) 수증기 증류법에 의한 경우에는 황토국화의 생초가 아닌 건조도 가능함으로 황토국화를 전시 및 축제가 완료된 이 후에 채취하여 건조 후 생산에 사용함으로써 생초 운반 및 추출 시기에 따르는 문제점이 없습니다.
- 4) 따라서 황토국화를 화장품 원료로 사용하기 위하여 수증기 증류법에 의하여 생산한다면 황토국화의 상품화에 있어서 야기될 수 있는 문제점을 해결할 수 있습니다.

3. 황토국화 증류액의 안정성 시험 결과

가. 시료 : 수증기 증류(2007년에 Scale up하여 생산한 추출물)에 의한 증류액은 다량의 오일을 함유하고 있으므로 이 증류액에 폴리옥시에틸렌9트리데실 에테르(가용화제) 0.3%와 1,3-부틸렌글리콜 5%, 방부제 0.4%를 첨가한다.

나. 기간 : 2007년 10월 ~ 2007년 12월(2개월)

(주) 더마랩의 공장 및 연구소를 인천 남동공단에서 강원도 원주시 문막 공단으로 확장 이전함으로써 2개월 안정성만 실시하였음. 2008년 5월부터 다시 추출하여 추출물의 안정성 실험을 실시하고 있음.

다. 안정성 시험 항목

안정성 시험의 기준은 추출물 연구를 진행하면서 얻은 결과를 근거로 하였으며, 일반적인 추출물의 화장품 원료 기준항목에 따라 설정된 것이다. 또한 확인시험은 추출물에서 Saccharides등의 정성분석을 의미함.

라. 결 과

황토국화 증류액의 실온 안정성						
	pH	굴절	비중	확인시험	미생물	침전유무
Specification	5.5	1.340	1.000	전체 확인	무	무
1주	5.41	1.346	1.000	전체 확인	무	무
2주	5.38	1.346	1.000	전체 확인	무	무
4주	5.50	1.346	1.000	전체 확인	무	무
8주	5.45	1.346	1.000	전체 확인	무	무

황토국화 증류액의 4℃ 안정성						
	pH	굴절	비중	확인시험	미생물	침전유무
Specification	5.5	1.340	1.000	전체 확인	무	무
1주	5.55	1.346	1.000	전체 확인	무	무
2주	5.57	1.346	1.000	전체 확인	무	무
4주	5.48	1.346	1.000	전체 확인	무	무
8주	5.59	1.346	1.000	전체 확인	무	무

황토국화 증류액의 일광 안정성						
	pH	굴절	비중	확인시험	미생물	침전유무
Specification	5.5	1.340	1.000	전체 확인	무	무
1주	5.60	1.344	1.000	전체 확인	무	무
2주	5.65	1.344	1.000	전체 확인	무	무
4주	5.57	1.344	1.000	전체 확인	무	무
8주	5.55	1.344	1.000	전체 확인	무	무

황토국화 증류액의 40℃ 안정성						
	pH	굴절	비중	확인시험	미생물	침전유무
Specification	5.5	1.340	1.000	전체 확인	무	무
1주	5.38	1.346	1.000	전체 확인	무	무
2주	5.45	1.346	1.000	전체 확인	무	무
4주	5.41	1.346	1.000	전체 확인	무	무
8주	5.42	1.346	1.000	전체 확인	무	무

마. 고찰

황토국화 증류액을 2개월간 pH, 굴절, 비중, 확인시험, 미생물, 침전유무 등을 확인한 결과 안정성에는 별다른 문제가 없음을 확인하였다. 2008년 5월 추가로 황토국화를 제공받아 증류공정에 따른 증류액을 생산하여 6개월간의 안정성 실험을 진행한 결과 이상이 없었음.

4. 황토국화 추출물의 안정성 시험 결과

가. 시료 : 황토국화 1,3-Butylene Glycol 추출물(2007년에 Scale up하여 생산한 추출물)

나. 기간 : 2007년 10월 ~ 2007년 12월(2개월)

(주)더마랩의 공장 및 연구소를 인천 남동공단에서 강원도 원주시 문막 공단으로 확장 이전함으로써 2개월 안정성만 실시하였음. 2008년 5월부터 다시 추출하여 추출물의 안정성 실험을 실시하고 있음.

다. 안정성 시험 항목

안정성 시험의 기준은 추출물 연구를 진행하면서 얻은 결과를 근거로 하였으며, 일반적인 추출물의 화장품 원료 기준항목에 따라 설정된 것이다. 또한 확인시험은 추출물에서 Amino acid, Terpenoids, tannins, saponins, Saccharides등의 정성분석을 의미하는 것이다.

라. 결 과

황토국화 추출물의 실온 안정성						
	pH	굴절	비중	확인시험	미생물	침전유무
Specification	6.0	1.075	1.020	전체 확인	무	무
1주	6.08	1.072	1.020	전체 확인	무	무
2주	6.04	1.073	1.020	전체 확인	무	무
4주	6.10	1.073	1.020	전체 확인	무	무
8주	6.02	1.073	1.020	전체 확인	무	무

황토국화 추출물의 4℃ 안정성						
	pH	굴절	비중	확인시험	미생물	침전유무
Specification	6.0	1.075	1.020	전체 확인	무	무
1주	6.02	1.073	1.020	전체 확인	무	무
2주	6.00	1.073	1.020	전체 확인	무	무
4주	6.05	1.074	1.020	전체 확인	무	무
8주	6.03	1.073	1.020	전체 확인	무	무

황토국화 추출물의 일광 안정성						
	pH	굴절	비중	확인시험	미생물	침전유무
Specification	6.0	1.075	1.020	전체 확인	무	무
1주	6.07	1.075	1.020	전체 확인	무	무
2주	6.13	1.074	1.020	전체 확인	무	무
4주	6.11	1.074	1.020	전체 확인	무	무
8주	6.15	1.075	1.020	전체 확인	무	무

황토국화 추출물의 40℃ 안정성						
	pH	굴절	비중	확인시험	미생물	침전유무
Specification	6.0	1.075	1.020	전체 확인	무	무
1주	6.05	1.074	1.020	전체 확인	무	무
2주	6.03	1.074	1.020	전체 확인	무	무
4주	6.07	1.074	1.020	전체 확인	무	무
8주	6.03	1.074	1.020	전체 확인	무	무

4. 고 찰

황토국화 추출물을 2개월간 pH, 굴절, 비중, 확인시험, 미생물, 침전유무 등을 확인한 결과 아무런 문제를 발생시키지 않음을 확인하였음. 2008년 5월 추가로 황토국화를 제공받아 추출공정에 따른 추출물을 생산하여 6개월간의 안정성 실험을 진행한 결과 이상이 없었음.

5. 제제화 연구

황토국화 추출물 및 황토국화로부터 추출한 에센셜오일을 이용한 화장품개발 및 아토피 효능에 대한 사전시험을 위하여 기존 base에 대하여 황토국화 오일함유 증류수와 황토국화추출물에 대하여 물성에 맞는 formulation을 적용하여 아래의 내용과 같이 제제적용을 실시하였음. 또한 이를 이용하여 전임상 및 간이임상 실험을 실시하였음.

수상 성분	용도	함량
황토국화 증류수	유효성분	to 100
Disodium EDTA	금속이온봉쇄제	0.02
Glycerine	폴리올	5.00
Sodium hyaluronate	첨가제	0.01
Butylene Glycol	폴리올	3.00
Polyquaternium-51	사용감 개선제	0.10
Polyacrylate 13 & Polyisobutene & Polysorbate 20	증점제	0.50

유상 성분	용도	함량
Arachidyl Alcohol & Behenyl Alcohol & Arachidyl Glucoside	유화제	2.00
Glyceryl Stearate & PEG-100 Stearate	유화제	0.50
Pentaerythrityl Distearate	유화제	0.50
Cetearyl Alcohol	유화안정제	2.00
Shea Butter	첨가제	0.10
Butyrospermum Parkii	오일	1.00
TCG-M	오일	9.00
Isohexadecane	오일	2.00
Cyclomethicone	오일	3.00
Dimethicone	오일	0.30
Tocopheryl Acetate	항산화제	0.20
Phenoxy ethanol	보존제	0.30

유효 성분	용도	함량
황토국화 추출물	유효성분	5.00

유효 성분	용도	함량
황토국화 에센셜 오일	유효성분	2.00

< 제조 방법 >

1. 수상을 계량하여 호모믹서에 투입하여 온도를 70~80℃로 가온한다.
2. 호모믹서를 가동시켜서 호모믹서의 RPM을 4000RPM으로 하여 30분간 교반하여 준다.
3. 유상을 계량하여 유상부 Bath에 투입하고 온도를 70~80℃로 가온한다.
4. 수상부 Bath에서 교반되고 있는 수상에 가온한 유상을 투입한다.
5. 유상을 투입하고 호모믹서의 RPM을 6000RPM으로 하여 30분간 혼합시키며, 온도는 60~70℃가 되게 유지하여 유화를 시킨다.
6. 유화가 종료되면 35℃까지 냉각시켜 황토국화 추출물을 투입하고 천천히 교반한다.
7. 이후 30℃까지 냉각시켜 황토국화 오일을 투입하고 천천히 교반한다.
8. 제품의 제조가 완료되면 이를 2일간 숙성을 시켜 상의 안정성을 확보한다.
9. 숙성이 완료된 제품을 품질관리 기준에 따라 품질관리한다.

표 3-9. 안정도 관찰 결과

제조 직후		숙성 후		안정도 관찰 결과
pH	점도(cps)	pH	점도(cps)	
5.61	9,800	5.59	14,800	35, 50℃, 냉온, 실온 조건 60일간의 경시변화 없음

표 3-10. 기간별 점도 변화

제조시	1주일 후	2주 후	4주 후	8주 후
13,200	13,100	13,200	13,200	13,200

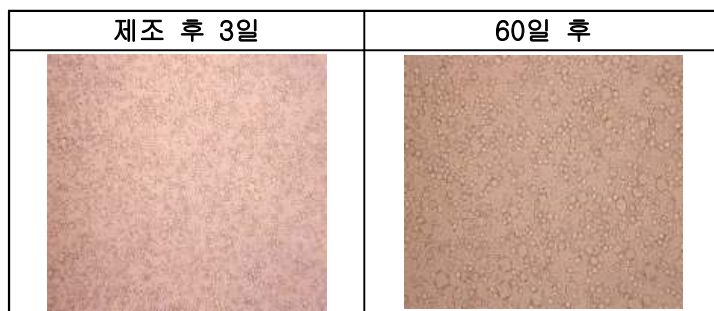


그림 3-28. 유화입자 사진

제 5 절 황토국화 추출물 및 시제품의 독성 전임상

1. 황토국화추출물의 피부자극성 시험

○ 시험방법

피부반응의 평가는 식품의약품안전청고시 제1999-61호 “의약품등의독성시험기준”에 표시된 피부반응의 평가기준에 따라 실시하였다. 또한 결과에 대한 자극성의 정도판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize의 일차자극지수 (PII, primary irritation index)의 산출방법에 따랐다.

일차자극지수	자 극 구 분
< 2	Mild irritant
2~5	Moderate irritant
> 5	Severe irritant

○ 시험결과 요약

황토국화추출물에 대한 피부자극성을 조사하기 위하여 6마리의 New Zealand White계 수컷토끼에 시험물질 0.5 ml을 찰과 및 비찰과부위에 각각 24시간동안 적용하였다. 72시간의 관찰기간 동안 사망률, 일반증상, 체중변화 및 국소자극성을 평가하였다.

이와 같이 시험한 결과는 다음과 같다.

- 1) 시험기간 중 시험물질의 적용에 기인된 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 2) 일반증상 관찰시 시험물질의 적용에 기인된 이상소견은 인정되지 않았다.
- 3) 체중측정 결과, 시험물질의 적용에 기인된 체중변화는 관찰되지 않았다.
- 4) 시험물질 도포종료 후 찰과 및 비찰과부위의 국소자극성을 관찰한 결과, 시험물질의 적용에 의한 어떠한 이상소견도 인정되지 않았다. 따라서 본 시험물질의 1차 자극지수(primary irritation index)는 "0"으로서 무자극성 물질로 평가되었다.

이상의 결과로 보아 New Zealand White계 토끼에 있어서 황토국화추출물의 피부적용은 찰과 및 비찰과부위에 어떠한 자극성도 유발하지 않는 것으로 나타났으며, 따라서 본 시험물질은 무자극성 물질인 것으로 판단된다.

○ 시험결과

표 3-11. 치사량 및 임상소견

SUMMARY OF MORTALITY AND CLINICAL SIGNS		
Material : C-BuOH		SEX : MALE
No. of rabbits	Mortality	Clinical signs
6	0/6 ^{a)}	No gross finding

^{a)} No. of dead animals/No. of tested animals

표 3-12. 피부자극성 시험결과

RESULTS OF SKIN REACTION									
Material : C-BuOH					SEX : MALE				
Sites	Control site				Test site				
Change	Erythema & Eschar		Edema		Erythema & Eschar		Edema		
	Intact 24 72	Abraded 24 72	Intact 24 72	Abraded 24 72	Intact 24 72	Abraded 24 72	Intact 24 72	Abraded 24 72	Intact 24 72
Phases (hours) ^{a)}									
Animal No.									
1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
2	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
3	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
4	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
5	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
6	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Mean Score	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
ΣMean Score	0		0		0		0		
Total	0				0				
PII ^{b)}	0				0				

^{a)} Time after topical application

^{b)} PII (primary irritation index)

2. 황토국화 추출물의 급성 경구 독성 시험

- 감국의 안전성을 확인하기 위하여 급성 독성시험을 진행하였고 특별한 독성에 관한 소견이 없었다.

Table 1-1. Mortality of Males.

DOSE (mg/kg)	No. Dead/No. Animal	MORTALITY/SUMMARY/REPORT LIMIT TEST MALE NUMBER OF DEATHS/DAYS AFTER DOSING														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1024	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1280	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1600	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2000	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 1-2. Mortality of Females.

DOSE (mg/kg)	No. Dead/No. Animal	MORTALITY/SUMMARY/REPORT LIMIT TEST MALE NUMBER OF DEATHS/DAYS AFTER DOSING														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1024	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1280	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1600	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2000	0/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2-1. Clinical signs of male ICR Mice with Acute Toxicity.

Variable	\ Sex	Male				
	\ Group	C	T1	T2	T3	T4
	\ Dose (mg/kg)	0	1024	1280	1600	2000
	\ No. of animal	5	5	5	5	5
normal		5	5	5	5	5
abnormal		0	0	0	0	0

C: Control group, T1: Extraction of mud Chrysanthemum 1024mg/kg(day) medication group, T2: Extraction of mud Chrysanthemum 1280mg/kg(day) medication group, T3: Extraction of mud Chrysanthemum 1600mg/kg(day) medication group, T4: Extraction of mud Chrysanthemum 2000mg/kg(day) medication group.

Table 2-2. Clinical signs of female ICR Mice with Acute Toxicity.

Variable	\ Sex	Female				
	\ Group	C	T1	T2	T3	T4
	\ Dose (mg/kg)	0	1024	1280	1600	2000
	\ No. of animal	5	5	5	5	5
normal		5	5	5	5	5
abnormal		0	0	0	0	0

C: Control group, T1: Extraction of mud Chrysanthemum 1024mg/kg(day) medication group, T2: Extraction of mud Chrysanthemum 1280mg/kg(day) medication group, T3: Extraction of mud Chrysanthemum 1600mg/kg(day) medication group, T4: Extraction of mud Chrysanthemum 2000mg/kg(day) medication group.

Mud Chrysanthemum Treated Group (Male)

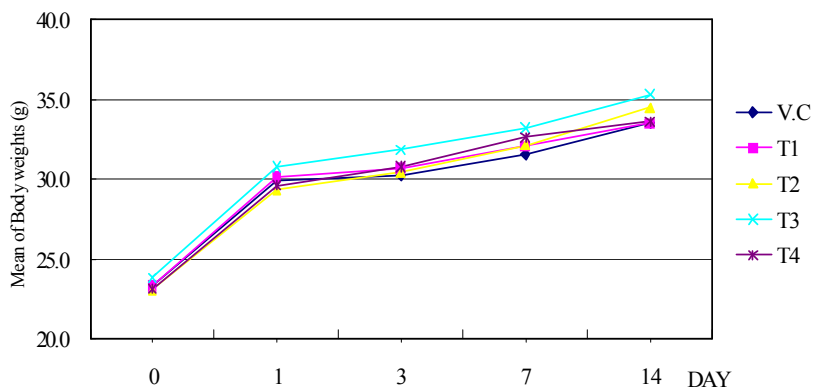


fig3-29. Mean of body weight changes of ICR mouse(male) orally treated with SsangHwaTang in Acute Toxicity(*p<0.05)C; Vehicle control group, T1; 1024mg/kg(day) administered group, T2; 1280mg/kg(day) administered group, T3; 1600mg/kg(day) administered group, T4; 2000mg/kg(day) administered group

Mud Chrysanthemum Treated Group (Female)

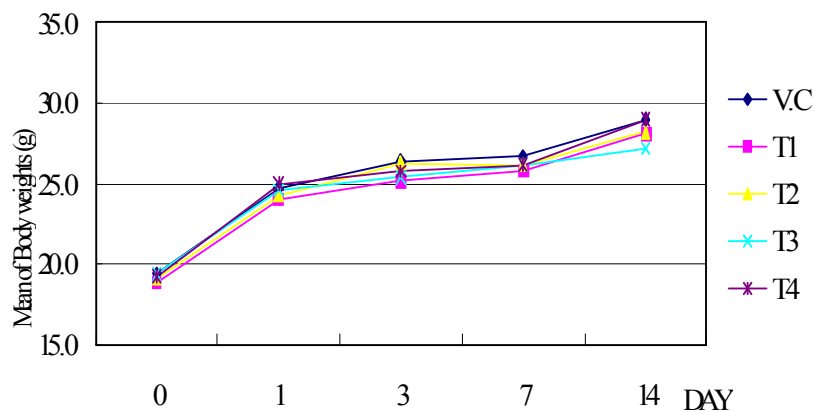


fig.3-30 Mean of body weight changes of ICR mouse(female) orally treated with SsangHwaTang in Acute Toxicity(*p<0.05)C; Vehicle control group, T1; 1024mg/kg(day) administered group, T2; 1280mg/kg(day) administered group, T3; 1600mg/kg(day) administered group, T4; 2000mg/kg(day) administered group

3. 황토국화 추출물 경피 독성 시험

- 피부에 대한 안전성을 확인하기 위하여 토끼를 이용한 경피독성시험을 실시하였으나 독성에 대한 특별한 소견이 없었다.

Table 1. Mortality and clinical signs in male rabbits

MORTALITY AND CLINICAL SIGNS		
STUDY: 07-BL-076N		SEX: MALE
No. of animals	Mortality (%)	Clinical signs
3	0	No clinical signs

Table 2. Body weight changes in male rabbits

BODY WEIGHT CHANGES (kg)				
STUDY: 07-BL-076N	Days after treatment	SEX: MALE		
	DAY 0	DAY 1	DAY 2	DAY 3
MEAN	2.234	2.119	2.202	2.231
S. D.	0.045	0.019	0.045	0.039
N	3	3	3	3

Table 3. Redness & crust formation in male rabbits

REDNESS & CRUST FORMATION											
STUDY: 07-BL-076N		SEX: MALE									
		Normal skin					Abrasion				
Grade ^{a)}		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Application site	24 hrs	0*	0	3	0	0	0	0	0	1	2
	48 hrs	0	1	2	0	0	0	0	1	1	1
	72 hrs	0	2	1	0	0	0	0	1	2 ^{b)}	0
Control site	24 hrs	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0
	48 hrs	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0
	72 hrs	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0

* No. of animals

a) Grades are follows: 0: No redness, 1: Slight Redness, 2: Mild Redness, 3: Severe Redness, 4: Very Severe Redness, crust formation

b) Observed crust formation

Table 4. Edema in male rabbits

EDEMA											
STUDY: 07-BL-076N		SEX: MALE									
		Normal skin					Abrasion				
Grade ^{a)}		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Application site	24 hrs	1*	2	0	0	0	0	1	2	0	0
	48 hrs	1	2	0	0	0	1	0	2	0	0
	72 hrs	2	1	0	0	0	2	0	1	0	0
Control site	24 hrs	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0
	48 hrs	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0
	72 hrs	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0

* No. of animals

b) Grades are follows: 0: No Edema, 1: Very Slight Edema, 2: Slight Edema, 3: Mild Edema (=1mm), 4: Severe Edema (>1mm)



Fig 3-31. An example of skin reaction at 24 hours after treatment with test article (left; abrasion, right; normal)



Fig 3-32. An example of skin reaction at 48 hours after treatment with test article(left; abrasion, right; normal)



Fig 3-33. An example of skin reaction at 72 hours after treatment with test article(left; abrasion, right; normal)

4. 황토국화 시제품의 단회투여 독성시험

시험물질 황토국화 추출물의 독성을 조사하기 위하여 공비를 2로 하여 0, 500, 1000 및 2000 mg/kg의 용량으로 ICR 계통 암수 마우스에 각 군당 5마리씩 단회 경구투여하였다.

시험기간 중 시험물질의 투여에 기인한 사망동물은 관찰되지 않았고, 특이할 만한 임상증상도 관찰되지 않았으며 체중변화의 경우 모든 생존개체 투여용량군에서 유의성 있는 체중 증감은 관찰되지 않았다. 육안적 부검소견의 경우 사망개체나 생존개체 모두에서 특이할 만한 부검소견이 관찰되지 않았다. 이상의 결과에서 마우스에 있어서 황토국화 추출물의 LD₅₀값은 2000 mg/kg 이상일 것으로 예상된다.

□ 실험재료 및 방법

○ 시험물질

시험물질은 (주)더마랩에서 공급받은 황토국화 추출물을 사용하였다.

○ 실험동물 및 사육조건

실험동물은 SPF(특정병원체 부재) ICR계 마우스를 중앙실험동물(주)로부터 분양하여 약 1주일간 본 사육장의 조건에 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 배기 10-12회, 형광등 명암 12hr cycle, 조도 150-160 Lux로 전 시험기간동안 폴리카보네이트 사육상자(260W×420L×180H mm)에 5마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였고, 멸균된 물과 사료는 자유로이 공급하였다.

○ 시험군의 구성 및 용량설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였으며 각 군의 평균체중에 대한 군간 차이는 ANOVA 검정으로 통계학적 검증을 실시하여 확인하였다. 동물의 개체식별은 피모색소표시법 및 사육상자별 tag 표

시법을 이용하였다. 단회투여시험에서 각 군은 암수 각 5마리씩 10마리로 구성하였으며, 투여용량의 설정은 예비시험결과 및 시험물질의 용해도 등을 고려하여 3단계의 등비용량(공비 2)으로 고용량군(2000 mg/kg), 중용량군(1000 mg/kg) 및 저용량군(500 mg/kg)으로 설정하였으며, 대조군은 용매처치군으로 하여 1회 경구투여하였고, 2주간 관찰하였다.

○ 투여약액의 조제 및 투여방법

(주)더마랩에서 제공받은 시험물질인 황토국화 추출물을 투여용량별로 투여 직전 제조하여 사용하였으며, 투여직전에 측정된 체중에 따라 시험물질의 투여량을 산출하여 마우스에 경구투여하였다.

○ 관찰 및 검사항목

· 일반증상관찰

모든 실험동물에 대한 임상증상은 투여당일에는 투여 후 1시간에서 6시간까지는 매시간, 투여 1일부터 7일까지는 1일 1회 이상씩 일정시간에 관찰하여 14일동안 일반상태의 변화, 중독증상발현, 사망동물의 유무 및 시험물질 투여 후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대해 주의하여 관찰하였다.

· 체중측정

시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여당일 (0일), 7일, 부검시에 측정하여 기록하였다.

· 부검

시험종료 후 생존례는 부검전에 체중을 측정하고 ether 마취하에 방혈치사시킨 다음 외관 및 내부장기 이상유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다.

· 통계학적 분석

시험물질에 대한 LD₅₀는 Litchfield & Wilcoxon법으로 산출하며, 그 외 본 실험에서 얻어진 체중 등의 자료에 대한 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 이용하여 대조군과의 군간 유의성을 검정하였다.

□ 결 과

· 사망동물 및 임상증상의 관찰

전 투여군에서 사망 개체가 관찰되지 않았으며(Table 3-14), 특이할 만한 임상증상도 관찰되지 않았다(Table 3-15).

· 체중변화

모든 생존개체 투여용량군에서 유의성 있는 체중 증감은 관찰되지 않았다(Table 3-16).

· 육안적 부검소견

전 투여군 모두에서 특이할 만한 부검소견이 관찰되지 않았다(Table 3-17).

□ 고찰 및 결론

황토국화는 고창 황토와 변산반도의 해풍으로 재배하여 그 이름이 명명되었으며 면역보호 작용과 항스트레스 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이 제제는 현재 음료로 생산, 시판되고 있으나 이번에 아토피치료 기능성 화장품으로 개발하고자 하는 것으로써 본 연구에서는 기능성 화장품으로서의 황토국화 추출물의 독성유무를 규명하기 위하여 식품의약품 안전청 고시(2005. 10. 21.)의 의약품 등의 독성시험기준 제 2005-60호에 준하여 마우스에 경구로 단회 투여하여 단회투여 독성을 관찰하였다.

단회투여 독성시험에서 최고용량군(2000 mg/kg), 중간농도군(1000 mg/kg), 저농도군(500 mg/kg) 및 용매처치 대조군을 두어 14일간 관찰한 결과, 시험물질 투여후 전 농도군에서 대조군에 비해 유의성 있는 변화나 폐사가 관찰되지 않았다. 이상의 결과에서 마우스에 있어서 황토국화 추출물의 LD₅₀값은 2000 mg/kg 이상일 것으로 생각된다.

Table 3-14. Mortality of the mice orally treated with loess chrysanthemum once

Sex	Dose (mg/kg)	No. of mice	Hours after administration						Days after administration						Final mortality	
			1	2	3	4	5	6	3	6	10	11	12	13		14
Male	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Female	Control	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Table 3-15. Clinical signs of the mice orally treated with loess chrysanthemum once

Sex	Dose (mg/kg)	Clinical signs	Days after administration								
			0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	Control	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	500	NAD	5	5	5	5	5	5	5	4	5
	1000	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2000	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	Control	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	500	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1000	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2000	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5

NAD : Not abnormalities detected

Table 3-16. Body weights of the mice orally treated with loess chrysanthemum once

Sex	Dose (mg/kg)	Number of mice	Days after administration				
			0	7	14		
Male	Control	5	Mean	33.8	36.1	38.5	
			S.D.	2.82	2.18	2.33	
	500	5	Mean	33.8	36.9	41.0	
			S.D.	1.82	2.19	1.88	
	1000	5	Mean	31.0	38.3	41.4	
			S.D.	0.65	2.84	2.94	
	2000	5	Mean	33.5	36.6	40.2	
			S.D.	1.96	1.05	0.85	
	Female	Control	5	Mean	32.0	36.2	37.1
				S.D.	1.66	1.93	1.54
		500	5	Mean	32.5	35.0	37.4
				S.D.	1.82	2.95	1.63
1000		5	Mean	33.6	35.9	38.8	
			S.D.	2.42	2.29	1.42	
2000		5	Mean	33.6	37.2	38.9	
			S.D.	2.44	2.31	1.88	

S.D. : Standard deviation

Table 3-17. Gross findings of the mice orally treated with loess chrysanthemum once

Incidence of gross findings									
Male					Female				
Dose(mg/kg)	Control	500	1000	2000	Control	500	1000	2000	
No. of mice	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Items									
Adrenal gland									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Brain									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Heart									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Liver									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Kidney									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Spleen									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Testis									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)					
Ovary									
NGF					5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Thymus									
NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)

NGF : No gross finding, () : Percent of no gross finding

5. 황토국화 시제품의 피부자극시험

시험물질 황토국화 추출물의 피부자극성을 조사하기 위하여 50% 농도 시험물질을 6마리의 New Zealand White계 수컷 토끼의 건강한 피부 및 찰과 피부에 적용한 후 시험물질을 적용하지 않은 건강한 피부 및 찰과 피부와 반응을 비교 평가하였다.

시험기간 중 시험물질의 처치에 기인한 것으로 생각되는 일반 증상 및 사망 동물은 관찰되지 않았으며 시험물질의 처치에 기인된 체중 증감은 관찰되지 않았다. 시험물질 처치 후 찰과부에서의 피부반응에 있어서는 처치 24시간째 분명한 홍반이 관찰되었으며, 처치 48시간째는 아주 가벼운 홍반이, 처치 72시간째는 시간의 경과와 더불어 피부반응이 약간씩 소실되는 경향을 보여주었다. 비찰과부에서는 처치 24시간째 아주 가벼운 홍반이 관찰되었으나 처치 72시간째는 모두 회복되어 홍반 및 부종은 관찰되지 않았다.

피부자극성의 평가에서 본 시험물질은 일차자극지수(P.I.I., Primary Irritation Index)가 0.5로 비자극성에 해당되었다.

□ 실험재료 및 방법

○ 시험물질

시험물질은 (주)더마랩에서 공급받은 황토국화 추출물을 사용하였다.

○ 실험동물 및 사육조건

실험동물은 New Zealand White계 토끼를 (주)오리엔트 바이오로부터 분양하여 21일간 본 사육장의 조건에 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 선택하여 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 배기 10-12회, 형광등 명암 12hr cycle, 조도 150-160 Lux로 전 시험기간동안 스테인레스제 사육상자 (380W×500L×330H mm)에 1마리씩 넣어 시험하였다. 시험기간동안 사용한 깔짚은 고압증기 멸균기로 121°C 에서 15분간 멸균하여 사용하였고, 멸균된 사료는 자유섭취시켰고 음수는 정수과정을 거친 상수도수를 자동급수시켰다.

○ 시험군의 구성 및 용량설정

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 개체를 선택하였다. 동물의 개체식별은 순화기간 중에는 좌측 귓바퀴 내부, 시험기간 중에는 우측 귓바퀴 내부에 유성 매직으로 동물번호를 표시하고 개체 식별 카드 및 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 시험군은 6마리로 구성하였으며, 투여용량의 설정은 일반적인 피부자극시험에 많이 사용되는 용량인 0.5 ml씩 건강 피부와 찰과 피부에 적용하여 시험물질을 처치하지 않은 건강 피부 및 찰과 피부와 비교하였다. 예비시험결과 및 시험물질의 용해도 등을 고려하여 50% 농도를 처치 농도로 설정하였다.

○ 투여약액의 조제 및 투여방법

(주)더마랩에서 제공받은 시험물질인 황토국화 추출물을 투여직전 제조하여 사용하였으며, 처치경로는 경피 적용하였다. 시험물질 처치 24시간 전에 전기 제모기를 이용하여 토끼의 피부에 상처가 생기지 않도록 가로 세로 약 10 cm씩의 제모된 건강한 피부를 만들었다. 제모된 피부는 좌우로 나누어 좌를 처치구획, 우를 대조구획으로 하고 처치구획과 대조구획의 건강피부 또는 찰과 피부가 서로 대각선으로 분포하도록 구분하여 2.5 cm x 2.5 cm의 건강 (비찰과) 피부 2개소와 찰과 피부 2개소를 유성펜으로 표시하였다. 찰과 피부는 주사침 끝을 이용하여 표피는 손상되나 진피는 손상되지 않게 출혈이 생기지 않도록 찰과상을 입혀서 만들었다. 처치방법으로는 가로 세로 2.5 cm의 처치구획 피부 부위에 0.5 ml의 시험물질을 적용한 거즈를 덮어 시험물질과 피부가 잘 접촉할 수 있도록 하였다. 거즈의 위에는 시험물질의 증발을 막기 위하여 침투성이 없고 자극성이 낮은 호일로 덮은 다음 종이테이프로 고정하였으며 처치 횟수는 처치 당일 1회 적용하였다.

○ 관찰 및 검사항목

· 일반증상 및 사망동물의 관찰

시험 기간 중 모든 실험동물에 대하여 매일 1회 이상 일반상태의 변화, 사망동물의 유무 및 시험물질 처치 후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대해 주의하여 관찰하였다.

· 체중측정

시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 처치 전과 처치 후 24 시간 및 72 시간 후에 체중을 측정하여 기록하였다.

· 처치부위의 육안적 관찰

처치부위의 육안적 변화는 처치 후 24 시간 및 72 시간에 관찰하였다.

· 자극성의 평가

시험물질은 적용 24시간 경과 후 제거하고, 피검 시험물질이 잔류하지 않도록 생리식염수로 가볍게 씻어내었다. 시험물질 처치 후 24시간 및 72시간 췌에 도포 국소 부위의 홍반, 부종, 출혈, 가피 형성 등의 변화를 육안적으로 관찰하였다. 홍반과 가피형성 및 부종의 출현은 염증 반응을 근거하여 판정하는 것으로 홍반은 육안적으로, 부종은 가벼운 촉진을 병행하여 판정하였다. 피부 반응의 정도는 처치 후 24시간 및 72시간에 피부반응 기준에 따라 채점하여 기록하였다.

※ 피부 반응 평가 기준

① 홍반과 가피형성

반응	점수
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
분명한 홍반	2
약간 심한 홍반	3
심한 홍반(홍당무 색의 발적)과 가벼운 정도의 가피	4
총 가능한 홍반 점수	4

② 부종형성

반응	점수
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종(뚜렷하게 부어올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)	2
보통의 부종(약 1 mm정도 부어올랐을 경우)	3
심한 부종(1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태)	4
총 가능한 부종 점수	4

③ 피부반응 성적의 평가

피부 반응을 채점한 것을 이용하여 시험물질 처치 후 24시간과 72시간 때의 홍반 평점과 부종 평점을 더해서 평균치를 산출하고, 이 수치로 피부자극성을 평가하였다. 이때 시험물질의 자극성은 일차자극지수외에도 시험기간 중 관찰된 일반증상 등을 고려하여 평가하였다.

※ 피부 일차 자극표

일차자극지수(P.I.I.)*	구분
0.0 ~ 0.5	비자극성
0.6 ~ 2.0	약한 자극성
2.1 ~ 5.0	중등도 자극성
5.1 ~ 8.0	강한 자극성

*P.I.I.(Primary Irritation Index : 일차자극지수) = 평균의 합계/4

□ 결 과

○ 일반증상관찰 및 사망률

시험 전기간 동안의 일반증상 및 사망동물을 관찰한 결과 모든 동물에 있어서 시험물질의 처치에 의한 변화로 인정되어지는 일반증상은 관찰되지 않았다. 사망동물도 관찰되지 않았다 (Table 3-18).

○ 체중변화

시험기간 동안 체중변화는 정상적인 성장을 보여 주었다 (Table 3-19).

○ 처치부위의 육안적 관찰

시험물질 처치 후 24시간 및 72시간째의 처치 부위를 육안적으로 관찰한 결과 처치 24시간째의 경우, 시험물질을 처치한 찰과부에서는 분명한 홍반이 1례, 아주 가벼운 홍반이 5례 관찰되었고, 비찰과부에서는 아주 가벼운 홍반이 3례 관찰되었으며 시험물질을 처리하지 않은 대조 찰과부에서는 분명한 홍반이 3례, 아주 가벼운 홍반이 3례 관찰되었고, 비찰과부에서는 홍반이 관찰되지 않았다. 부종은 시험물질의 적용부와 비적용부 모두 관찰 되지 않았다. 처치 72시간째, 시험물질을 처리한 찰과부에서는 아주 가벼운 홍반이 1례, 비찰과부에서는 홍반이 관찰되지 않았으며, 시험물질을 처리하지 않은 대조 찰과부에서는 아주 가벼운 홍반만이 1례 관찰되었다. 비찰과부에서는 시험물질의 적용부와 비적용부 모두 아무런 변화를 보이지 않았다 (Table 3-20, 3-21).

○ 자극성의 평가

시험물질 처치 후 24시간째와 72시간째의 홍반 평점과 부종 평점을 더한 평균치의 합계는 1.9로, 일차자극지수 P.I.I.(Primary Irritation Index)는 0.5로 비자극성에 해당되었다. 시험물질을 처리하지 않은 대조부에서도 평균치의 합계가 1.7로, 일차자극지수는 0.4로 비자극성에 해당되었다 (Table 3-22).

□ 고찰 및 결론

시험물질 황토국화 추출물은 아토피 치료용 기능성 화장품의 원료로 사용될 가능성을 알아보고 그에 대한 기초적 자료를 산출하기 위하여 본 시험을 수행하였다. 피부처치에 의한 자극성을 조사하기 위하여 50% 농도의 시험물질을 New Zealand White계 수컷 토끼의 건강한 피부와 찰과 피부에 24시간 적용한 후 사망률, 일반증상, 체중변화 및 피부반응을 평가하였다. 시험결과, 본 시험물질 처치에 기인된 일반증상, 사망동물 및 체중증가의 이상은 관찰되지 않았다. 시험물질 처치 부위의 육안적 관찰 결과에서 피부반응에 있어서는 처치 24시간째 분명한 홍반이 관찰 되었으나 처치 72시간째는 호전된 아주 가벼운 홍반만이 관찰되어 본 시험물질 처치 후 제거시 시간의 경과와 더불어 피부자극반응은 약간씩 완화되는 것으로 관찰 되었다. 시험물질 처치 후 24시간째와 72시간째의 자극성의 평가 결과 일차자극지수 P.I.I.(Primary Irritation Index)로 볼 때 본 시험물질은 0.5로 비자극성에 해당 되었다.

이상의 결과에서 본 시험조건에 의한 황토국화 추출물의 피부자극시험은 일반증상, 사망률 및 체중에 영향은 주지 않는 것으로 생각되었다. 또한 황토국화 추출물의 피부에서의 자극성은 50%농도 이하로 사용 할 경우는 자극성이 없을 것으로 생각된다.

Table3-18. Mortality and clinical findings

No. of animals	Mortality (%)	Clinical findings
6	0	No clinical finding

Table 3-19. Body weight changes

	(Unit; Kg)		
	Day after treatment		
	0	1	2
Mean	2.65	2.70	2.64
S.D.	0.308	0.209	0.187
N.	6	6	6

Table 3-20. Redness & Crust formation of the Application site

Grade		Intact					Abraded				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Test site	24 hrs	3*	3	0	0	0	0	5	1	0	0
	72 hrs	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0
Control site	24 hrs	6	0	0	0	0	0	3	3	0	0
	72 hrs	6	0	0	0	0	5	1	0	0	0

*No. of animals

※ Grades are follows :

Reaction	Grading
No redness	0
Slight Redness	1
Mild Redness	2
Severe Redness	3
Very Severe Redness	4

Table 3-21. Edema of the Application site

Grade		Intact					Abraded				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Test site	24 hrs	6*	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	72 hrs	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
Control site	24 hrs	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0
	72 hrs	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0

*No. of animals

※ Grades are follows :

Reaction	Grading
No Edema	0
Very Slight Edema	1
Slight Edema	2
Mild Edema(= 1 mm)	3
Severe Edema(> 1 mm)	4

Table 3-22. Primary Irritation Index

	Test site								Control site							
Response	Redness, Crust formation				Edema				Redness, Crust formation				Edema			
Application site	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded	Intact	Abraded		
Time (hours)	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72
Total	3	0	7	1	0	0	0	0	0	0	9	1	0	0	0	0
Mean	0.5	0.0	1.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
Sum	1.9								1.7							
P.I.I.*	0.5								0.4							

P.I.I.* = Sum/4

제 6 절 황토국화 추출물 적용제품의 효력(간이임상)

1. 국화 국화 추출물 함유 크림의 아토피 치료 Case Study

- 본 연구를 통해 얻어진 황토국화 오일, 오일이 함유된 증류수 및 추출물을 이용하여 간이임상시험을 진행하였다. 간이임상시험을 위하여 황토국화 추출물 제제에 적합한 처방을 설정하여 제제를 제조하였으며 피부에 대한 안전성을 확인하기 위하여 총 5명의 아동을 대상으로 간이임상을 진행하였다. 실험군 중 4명의 아동이 현저히 아토피 질환이 완화됨을 확인하였고 향후 제제 검토와 추출물에 대해서도 임상시험을 진행하고자 한다.

가. Case study 간이임상

- (1) 아토피 피부염은 주로 영유아기에 시작하는 가려움을 동반하는 만성 재발성 습진질환 (Hanifin, 1991)
- (2) 대개 5세 이전에 증상이 나타나서 성장함에 따라 증상이 완화되거나 사라지는 것이 일반적, 약 10%는 성인이 되어서도 지속됨 (권 등, 2003)
- (3) 본 연구의 국화추출물 80% EtOH는 면역세포의 탈과립화를 억제한다 있음 (1,2차년도 보고서)
- (4) 따라서, 80% EtOH로부터 용매분획을 실시한 결과 *n*-hexane layer에서 면역세포 탈과립화 억제가 나타남
- (5) *n*-hexane layer가 함유된 아토피 크림을 제작하여, 간이임상 실시



그림 3-34. 대표사진

나. 시험방법

- (1) 대상 : 지원자를 대상으로 연구의 목적과 내용을 상세히 설명한 후, 설문조사 및 간이임상 실시
- (2) 시험에 사용된 시험제품과 대조제품은 (주)더마랩에서 동일한 튜브용기에 100g씩 담아 제조 공급하였으며, 명칭은 대조제품으로 HGC, 국화함유 제품으로 HGA로 명명하였다.

다. 제품구성

황토국화 추출물 및 황토국화로부터 추출한 에센셜오일을 이용한 화장품개발 및 아토피 효능에 대한 사전시험을 위하여 기존 base에 대하여 황토국화 오일함유 증류수와 황토국화추출물에 대하여 물성에 맞는 formulation을 적용하여 아래의 내용과 같이 제제적용을 실시하였음. 또한 이를 이용하여 전임상 및 간이임상 실험을 실시하였음.

수상 성분	용도	함량
황토국화 증류수	유효성분	to 100
Disodium EDTA	금속이온봉쇄제	0.02
Glycerine	폴리올	5.00
Sodium hyaluronate	첨가제	0.01
Butylene Glycol	폴리올	3.00
Polyquaternium-51	사용감 개선제	0.10
Polyacrylate 13 & Polyisobutene & Polysorbate 20	증점제	0.50

유상 성분	용도	함량
Arachidyl Alcohol & Behenyl Alcohol & Arachidyl Glucoside	유화제	2.00
Glyceryl Stearate & PEG-100 Stearate	유화제	0.50
Pentaerythrityl Distearate	유화제	0.50
Cetearyl Alcohol	유화안정제	2.00
Shea Butter	첨가제	0.10
Butyrospermum Parkii	오일	1.00
TCG-M	오일	9.00
Isohexadecane	오일	2.00
Cyclomethicone	오일	3.00
Dimethicone	오일	0.30
Tocopheryl Acetate	항산화제	0.20
Phenoxy ethanol	보존제	0.30

유효 성분	용도	함량
황토국화 추출물	유효성분	5.00

유효 성분	용도	함량
황토국화 에센셜 오일	유효성분	2.00

< 제조 방법 >

1. 수상을 계량하여 호모믹서에 투입하여 온도를 70~80℃로 가온한다.
2. 호모믹서를 가동시켜서 호모믹서의 RPM을 4000RPM으로 하여 30분간 교반하여 준다.
3. 유상을 계량하여 유상부 Bath에 투입하고 온도를 70~80℃로 가온한다.
4. 수상부 Bath에서 교반되고 있는 수상에 가온한 유상을 투입한다.
5. 유상을 투입하고 호모믹서의 RPM을 6000RPM으로 하여 30분간 혼합시키며, 온도는 60~70℃가 되게 유지하여 유화를 시킨다.
6. 유화가 종료되면 35℃까지 냉각시켜 황토국화 추출물을 투입하고 천천히 교반한다.
7. 이후 30℃까지 냉각시켜 황토국화 오일을 투입하고 천천히 교반한다.
8. 제품의 제조가 완료되면 이를 2일간 숙성을 시켜 상의 안정성을 확보한다.
9. 숙성이 완료된 제품을 품질관리 기준에 따라 품질관리한다.



그림 3-35. 황토국화 추출물을 적용한 아토피 임상 치료용 시제품

라. 평가항목

(1) 육안적평가 (SCORAD Index)

SCORAD Index는 “Consensus report of the European task force on atopic dermatitis. Severity scoring of atopic dermatitis. The SCORAD index. Dermatoloy, 1993;186:23-31.”에 의거하여 실시하였다.

(2) 이미지 촬영

병변부위를 시험전과 시험종료 후 (주)SOMETECH의 의료용화상시스템인 DCS-104T 및 니콘디지털 카메라 D-80을 사용하였다.

(3) 기타 임상시험

간이임상시험으로 임상승인위원회에 저촉이되는 혈액학적검사, 피부장비를 통한 기기적평가는 실시하지 않았다.

마. 시험결과

제품도포전과 도포 4주 후의 SCORAD Index를 비교하였다.

Table. 3-23 Change of SCORAD Index between baseline and after 4 weeks

SCORAD Index	Control group (N=13)	Experimental group (N=15)	Total (N=28)
	Mean±S.D	Mean±S.D	Mean±S.D
After 4 weeks	23.08±4.80	20.00±5.35	21.43±5.25
Baseline	26.15±5.06	27.33±4.58	26.79±4.76

대조군은 도포전 26.15±5.06점, 도포 4주후 23.08±4.80으로 감소하였고, 실험군인 HGA (국화추출물 함유)의 경우 도포전 27.33±4.58, 도포 4주후 20.00±5.35으로 감소하였다. 대조군과 실험군 모두 유의성 있는 감소를 나타냈으나, 실험군이 대조군에 비해 매우 유의성 있게 나타났다.

(1) SCORAD기초자료

(가) 판정(주관적 평가로 보호자가 평가)

(나) 7일 간격으로 평가

(다) 현재 아토피 수준 : 매우심함 100점, 중간정도 50점으로 하여 10점 단위로 평가 및 사진촬영

(라) 평가항목별 Score (매우좋아졌다 4, 다소좋아졌다 3, 보통이다 2, 미약하게 좋아졌다 1, 효과가 없다 0)

- 가려움완화, 홍반정도, 피부건조정도, 사용감, 피부개선정도

시험례 1.

피험자 : 주민등록번호 앞자리 : 990506-XXXXXX 성명: 유○○

1. 판정 (주관적 평가가로 보호자가 평가) : 2008년 12월 11일

1) 7일 간격으로 평가 (1달 ~ 2달)

2) 현재 아토피 수준 : 매우심함 100점, 중간정도 50점으로 하여 10점 단위로
평가: (50 점): 현재 아토피 부위 사진촬영 및 7일
간격으로 사진촬영 바랍니다.

3) 다음항목에 대하여 7일 간격으로 평가 바랍니다. 모든 평가항목은 매우
좋아졌다 4점, 다소 좋아졌다 3점, 보통이다 2점, 미약하게 좋아졌다
1점, 효과가 없다 0점

-가려움 완화 : 7일째: (2 점), 14일째: (1 점), 21일째: (0 점), 28일째: (점)

-홍반 정도 : 7일째: (2 점), 14일째: (1 점), 21일째: (0 점), 28일째: (점)

-피부건조 정도 : 7일째: (2 점), 14일째: (1 점), 21일째: (0 점), 28일째: (점)

-사용감 : 7일째: (2 점), 14일째: (1 점), 21일째: (0 점), 28일째: (점)

-피부 개선 정도 : 7일째: (2 점), 14일째: (1 점), 21일째: (0 점), 28일째: (점)

바. 이미지 결과

990506-xxxxxx (유○○)



그림 3-35. 팔의 아토피 임상 소견

971110-xxxxxx (김○○)



그림 3-36. 다리의 아토피 임상 소견

다리부분



그림 3-37. 다리의 아토피 임상 소견

팔



그림 3-38. 팔의 아토피 임상 소견

2. 황토국화 추출액+용매를 이용한 기니픽의 피부보습효과 시험(위탁연구)

- 시험제목 황토국화 추출액+용매를 이용한 기니픽의 피부보습효과 시험
- 시험목적 본 시험은 기니픽을 이용하여 황토국화 추출액+용매의 피부보습효과를 알아보기위해 수행하였다.
- 시험기관 명 칭: 한국한의학 연구원
 소 재 지: 대전광역시 유성구 전민동 461-24
 의뢰책임자: 마 진 열
 연 락 처: 042-868-9466 (TEL), 042-868-9466 (FAX)
- 시험일정 2009 년 01 월 08 일: 시험계획서 승인(시험개시)
 2009 년 01 월 09 일: 동물입수(실험개시)
 2009 년 01 월 14 일: 피부건조증 유발개시
 2009 년 01 월 19 일: 시험물질 도포 및 피부보습 측정 개시
 2009 년 01 월 24 일: 피부보습 측정 종료(실험종료)
 2009 년 02 월 10 일: 최종보고서(안) 제출
- 기록과 본 시험의 시험계획서(및 변경기록), 최종보고서, 시험기초자료,
 재료의 보관 검체, 보관용 시험물질 및 각종 증거자료는 시험물질의 실험 종
 료 후 5 년간 한국한의학연구원에 보관한다.

가. 요약

본 시험은 기니픽을 이용하여 제모한 피부에 피부건조증을 유발한 후 황토국화 추출액+용매에 의한 피부보습상태의 개선 효능을 검증하기 위하여 실시하였다. 피부보습상태의 개선은 제모 및 피부건조증을 유발한 후 시험물질을 도포한 부위와 대조물질을 처치한 대조군의 보습도를 비교하여 평가하였다. 시험물질과 대조물질은 250 mg/head를 도포하였고 각 군당 6마리의 동물을 사용하였다. 시험물질은 1 일 1 회 5 일간 도포하고, 보습도는 1, 2, 3 및 6 일 총 4 회 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1.	실험기간 중 시험물질에 의한 일반증상 변화는 관찰되지 않았다.
2.	시험물질에 의한 체중 변화는 관찰되지 않았다.
3.	실험기간 동안 대조물질과 비교한 보습도의 차이에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 본 시험 조건에서 황토국화 추출액+용매의 5 회 피부 도포는 피부 보습도에 영향이 없는 것으로 판단된다.

나. 시험물질 및 대조물질

(1) 시험물질

- (1) 명칭: 황토국화 추출액+용매
- (2) 기관내코드번호: C-0129
- (3) 제조(로트)번호: 의뢰자측에서 제공하지 않음
- (4) 입수일: 2008 년 11 월 20 일
- (5) 입수량: 59.64 g (용기포함)
- (6) 외관 및 성상: 백색의 연고제
- (7) 순도: 의뢰자측에서 제공하지 않음
- (8) 유효기간: 의뢰자측에서 제공하지 않음
- (9) 보관조건: 실온보관
- (10) 공급원: 더마랩

(2) 대조물질

- (1) 명칭: 용매
- (2) 제조(로트)번호: 의뢰자측에서 제공하지 않음
- (3) 입수일: 2008 년 11 월 20 일
- (4) 입수량: 66.98 g (용기포함)
- (5) 외관 및 성상: 백색의 연고제
- (6) 순도: 의뢰자측에서 제공하지 않음
- (7) 유효기간: 의뢰자측에서 제공하지 않음
- (8) 보관조건: 실온보관
- (9) 공급원: 더마랩

다. 재료 및 방법

(1) 시험계

(가) 종 및 계통: 기니픽-Hartley계(Albino guinea pigs)

(나) 공급원: (주)샘타코바이오코리아(경기도 오산시 서량동 77-1)

(다) 시험계의 선택이유

본 시험에 사용된 기니픽은 피부시험과 관련하여 일반적으로 사용되는 동물계통으로 풍부한 시험 기초 자료를 가지고 있어 본 시험에 사용하였다.

(라) 주령 및 체중범위

입수시 주령: 수컷 5 주령

입수시 동물수: 수컷 14 마리

입수시 체중: 303.87 ~ 309.13 g

투여개시시 주령: 수컷 8.5 주령

투여개시시 동물수: 수컷 12 마리

투여개시시 체중: 399.89 g~363.71 g

(마) 검역 및 순화

동물 입수시 공급처에서 제공한 시험계의 병원체 검사 성적서를 참고로 하여 입수동물의 검수검역을 실시하였으며, 동물 입수 후 10일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시켰다. 동물공급업체에서 제공한 시험계의 건강 및 병원체검사 성적서를 검토한 결과 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었으며, 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다.

(2) 사육환경

(가) 환경조건

본 시험은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10~20 회/hr, 조명시간 12 시간(오전 8 시 점등~오후 8 시 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정한 (주)캠온의 전임상연구센터 제1동물사육구역 8 호실에서 수행하였으며, 시험자들은 모두 고압증기멸균(121 °C, 20 분)한 작업복과 보호장구를 착용하고 작업을 실시하였다.

(나) 사육환경 모니터링

시험기간 중 동물실의 온습도는 컴퓨터 시스템을 이용한 자동 온습도 측정기로 매시간마다, 환기횟수 및 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정하였다. 환경측정 결과 실험기간 동안 온습도, 환기횟수, 조도 등에서 설정범위를 벗어나 시험의 결과에 나쁜 영향을 끼칠만한 이상은 관찰되지 않았다.

(다) 사육상자 및 사육밀도

스테인레스제 망 사육상자(W 215 x L 355 x H 200 mm)에서 검역, 순화 기간에는 3 마리/사육상자 이하로 사육하였고, 시험물질 도포 및 관찰기간 중에는 1 마리/사육상자 이하로 사육하였다.

(라) 사료 및 물

실험에 공급된 사료는 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고품사료 (Harlan Co. Ltd., USA.TEKLADCERTIFIEDGLOBAL 18% PROTEINRODENTDIET, 2918C)를 폴라스인터내셔널로부터 공급받아 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 사료의 성분분석성적서를 검토한 결과, 사료조성 및 오염물질에서 시험에 악영향을 줄만한 요인은 없었다. 물은 지하수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후, 물병을 이용하여 자유롭게 섭취하도록 하였다. 시험에 앞서 공인기관 ((주)위트랩생활환경연구원, 경기도 수원시 권선구 서둔동 14-3)에 의뢰하여 수질검사를 실시한 결과 '적합' 판정을 받았다.

(마) 동물실험윤리규정의 준수

본 시험은 (주)캠온의 동물실험윤리규정을 준수하여 실시하였다.

(3) 시험군 구성 및 투여량 설정

(가) 시험군의 구성

군	성 별	동물수(마리)	동 물 번 호	투여량(mg/kg/day)
G1	M	6	1-6	250
G2	M	6	7-12	250

G1: 대조물질 투여군
G2: 시험물질 투여군

(나) 투여량 설정

의뢰자와 협의하여 도포부위에 충분히 도포되는 양을 설정하였다.

(다) 군분리 및 잔여동물의 처리

동물의 군분리는 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 동물들을 12 마리 선택하였다. 선택한 동물들은 순위화한 체중에 따라 각군의 평균체중이 최대한 균일하게 분포하도록 무작위법으로 분배하여 '시험군의 구성'표에 지정된 수가 되도록 하였다. 군분리 후 잔여동물은 Ether 마취 후 안락사 처리하였다.

(라) 식별

개체식별은 포화 피크린산을 이용한 피모 색소표식법을 사용하였다. 사육상자에는 용량별로 다른 색상의 개체식별카드를 부착하였다.

사육실 입구에는 시험번호, 동물실 사용기간, 시험책임자명, 시험담당자명, 비상연락처 등을 기재한 동물실 사용기록지를 부착하였다.

(4) 시험물질의 조제

시험물질은 순도에 대한 보정 없이 중량 그대로를 사용하였다

(5) 투여

(가) 투여경로 및 선택이유: 사람에게 대한 임상 예정 경로로서 피부도포를 선택하였다.

(나) 도포부위 및 도포법

등배부를 제모한 후 면도를 하고 오른쪽에만 도포하였다.

(다) 도포량: 250 mg/head로 도포하였다.

(라) 도포횟수 및 기간

1 회/일, 5 일/주, 5 회 투여하였으며, 도포는 16:00 이전에 완료하였다.

(6) 시험방법

(가) 시험물질의 적용 전 제모 및 피부건조 유발법

① 제모

시험물질 처치 전에 기니픽의 양쪽 옆구리(flank)를 clipper로 1 차 제모하고, 면도기를 이용하여 2 차 제모를 하였다(제모면적은 3.0 cm x 3.0 cm으로 함). 이 때 좌측은 유발물질 및 시험물질을 도포하지 않은 대조부위, 우측은 도포부위로 정하였다.

② 피부건조증 유발

제모 후 2 % SLS (Sodium Lauryl Sulfate)를 적신 면패드를 우측 도포부위에 1 일 1 회 5 분간씩 3 일간 접촉하여 피부건조증을 유발하였다.

③ 3 회차 SLS를 적용이 끝난 후 2 일 동안 방치하였다.

(나) 시험물질의 처치 및 보습도 측정

- ① 1 일째(2 % SLS 3 회차 적용 2 일 후, 1 차 보습도 측정)
면도기로 양쪽 flank 부분을 면도한 후 흐르는 물로 세척을 하였다. 세척 후 제모한 동물이 들어 있던 사육상자 내에서 2 시간 방치하였다. 피부보습 측정기(Corneometer, CM 825, Germany)로 대조부위 및 도포부위의 정전용량(capacitance)을 10 회 측정하고 그 평균을 보습도를 수치로 나타내었다(1 차 측정). 보습도를 측정한 후 도포부위에 시험물질을 도포하였다.
- ② 2 일째(2 차 보습도 측정)
면도기로 제모하고 1 시간 30 분 후에(세척은 생략) 전술한 피부보습 측정기로 보습도를 측정한 후 도포부위에 시험물질을 도포하였다.
- ③ 3 일째(3 차 보습도 측정)
면도기로 제모하고 1 시간 30 분 후에(세척은 생략) 전술한 피부보습 측정기로 보습도를 측정한 후 도포부위에 시험물질을 도포하였다.
- ④ 4 일째: 위의 1 일째와 같은 방법으로 시험물질을 도포하였다.
- ⑤ 5 일째: 위의 1 일째와 같은 방법으로 시험물질을 도포하였다.
- ⑥ 6 일째 (4 차 보습도 측정)
3 일째와 같이 제모하고 보습도를 측정하고 실험을 종료하였다.

(7) 관찰 및 검사항목

(가) 일반증상관찰

투여 및 관찰기간 동안 사망여부, 일반증상의 종류, 발현 일 및 증상의 정도를 1 일 1 회 관찰하여 개체 별로 일반증상관찰기록지에 기록하였다.

(나) 체중측정

모든 동물에 대하여 투여 개시일, 투여 3 일째 및 마지막 부검일에 측정하였다.

(다) 보습도의 평가

각 군에서 ‘보습도 차이’(좌측 대조부위 보습도 측정 수치 - 피부 건조증을 유발한 우측 도포부위의 측정 수치)를 산출하였다.

(8) 통계학적 방법

시험물질투여군과 대조물질투여군간의 비교에는 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 Student's *t*-test를 적용하였다. 기타의 통계학적 방법을 사용한 경우에는 최종보고서에 상세히 기술하며, 모든 통계학적인 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 10.1을 이용하였다.

라. 결 과

(1) 일반증상

시험기간 중 모든 시험군에서 일반증상 변화는 관찰되지 않았다.

(2) 체중

시험기간 동안 대조물질과 비교하여 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 체중 변화는 관찰되지 않았다.

(3) 피부 보습도의 변화(Figure 3-39, Tabel 3-24 and Appendix 1-4)

시험기간 동안 대조물질과 비교한 보습도의 차이는 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

마. 고찰 및 결론

본 시험은 기니픽에서 제모한 피부에 피부건조증을 유발한 후 시험물질에 의한 피부보습상태의 개선 효능을 검증하기 위하여 실시하였다. 피부보습상태의 개선은 제모한 좌측 옆구리를 대조부위로 하고, 제모 및 피부건조증을 유발한 후 시험물질을 피부 도포한 우측을 도포부위로 하여, 대조부위 및 도포부위의 보습도 차이를 비교하여 평가하였다.

대조물질 도포부위의 보습도는 시간의 경과에 따른 자연회복으로 서서히 증가하였다. 시험물질 처치군 도포부위의 보습도의 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 본 시험 조건에서 황토국화 추출액+용매의 5 회 피부 도포는 피부 보습도에 영향이 없는 것으로 판단된다.

Table 3-24. Differences between the Corneometer data (arbitrary units) of the treated and untreated sides of the guinea pigs

	Skin moisturization			
Group	Day 1 (1st)	Day 2 (2 nd)	Day 3 (3 rd)	Day 6 (4 th)
G1	9.63 ± 4.98 ^{a)}	14.38 ± 3.44	7.95 ± 2.40	6.95 ± 7.06
G1	12.38 ± 2.34	13.78 ± 6.40	11.92 ± 5.40	13.77 ± 3.87

a) Corneometer data of left side-right side. Each value represents Mean±SD.

G1: Comparison article (용매, n=6)

G2: Test article (황토국화 추출액+용매, n=6)

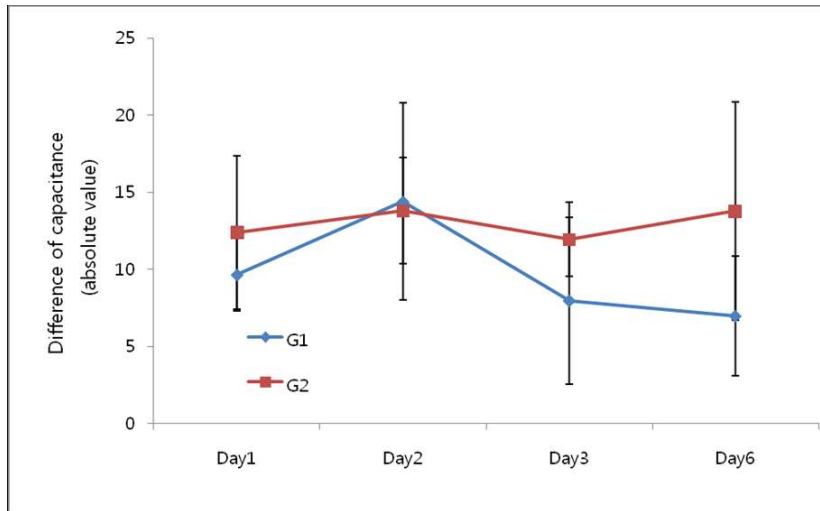


Figure 3-40. Differences between the Corneometer data (absolute value) of the treated and untreated sides of the guinea pigs. Each value represents Mean±SD.

G1: Comparison article (용매, n=6)

G2: Test article (황토국화 추출액+용매, n=6)

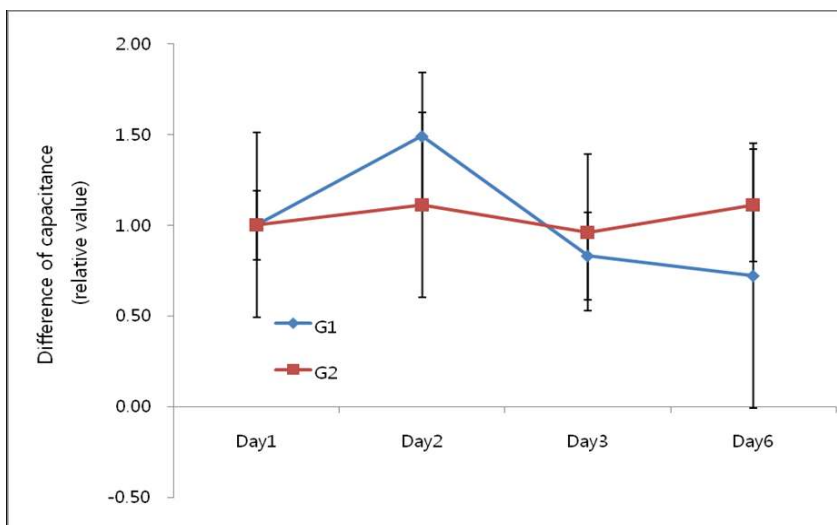


Figure 3-41. Differences between the Corneometer data (relative value) of the treated and untreated sides of the guinea pigs. Each value represents Mean±SD.

G1: Comparison article (용매, n=6)

G2: Test article (황토국화 추출액+용매, n=6)

Appendix 1. Individual Corneometer data (day 1)

INDIVIDUAL MOISTURE VALUE																		
STUDY: 08-GE-542N												SEX: MALE						
GROUP : G1																		
Comparison article																		
Animal No.	1			2			3			4			5			6		
	R		L-	R		L-	R		L-	R		L-	R		L-	R		L-
1 st	2	11	9	3	10	7	1	7	6	2	8	6	3	8	5	3	22	19
2 nd	2	12	10	6	8	2	2	8	6	2	11	9	4	13	9	3	23	20
3 rd	3	10	7	3	8	5	1	8	7	2	10	8	6	13	7	3	25	22
4 th	3	11	8	4	10	6	2	5	3	2	12	10	5	12	7	4	24	20
5 th	2	11	9	4	11	7	2	7	5	2	10	8	5	10	5	3	22	19
6 th	2	12	10	3	9	6	2	7	5	2	12	10	5	14	9	3	21	18
7 th	3	11	8	3	15	12	2	6	4	2	16	14	7	13	6	4	26	22
8 th	3	11	8	4	12	8	2	7	5	2	16	14	7	14	7	4	16	12
9 th	3	10	7	5	13	8	2	8	6	3	14	11	3	13	10	3	22	19
10 th	4	11	7	4	16	12	2	8	6	3	14	11	3	13	10	4	26	22
MEAN	8.3			7.3			5.3			10.1			7.5			19.3		
S.D.	1.2			3.0			1.2			2.6			1.9			2.9		
GRAND TOTAL: 9.63 ± 4.98																		

INDIVIDUAL MOISTURE VALUE																		
STUDY: 08-GE-542N												SEX: MALE						
GROUP : G2																		
Comparison article																		
Animal No.	7			8			9			10			11			12		
	R		L-	R		L-	R		L-	R		L-	R		L-	R		L-
1 st	5	18	13	5	12	7	1	12	11	2	12	10	3	11	8	3	23	20
2 nd	4	19	15	5	14	9	1	11	10	3	13	10	4	14	10	2	16	14
3 rd	5	19	14	5	14	9	1	11	10	2	15	13	4	14	10	3	17	14
4 th	5	20	15	6	11	5	1	14	13	2	15	13	4	14	10	4	18	14
5 th	5	22	17	7	17	10	1	12	11	3	12	9	4	14	10	4	19	15
6 th	5	18	13	6	15	9	1	14	13	3	17	14	3	16	13	5	19	14
7 th	4	17	13	8	16	8	2	15	13	2	19	17	4	17	13	5	17	12
8 th	7	19	12	7	17	10	1	13	12	3	23	20	4	18	14	5	18	13
9 th	9	23	14	4	15	11	2	11	9	3	22	19	5	18	13	5	19	14
10 th	3	21	18	5	15	10	2	12	10	3	19	16	5	16	11	3	19	16
MEAN	14.4			8.8			11.2			14.1			11.2			14.6		
S.D.	1.9			1.8			1.5			3.8			1.9			2.2		
GRAND TOTAL: 12.38 ± 2.34																		

R: Right, L: Left

(Continued)

Appendix 2. Individual Corneometer data (day 2)

INDIVIDUAL MOISTURE VALUE																		
STUDY: 08-GE-542N												SEX: MALE						
GROUP : G1																		
Comparison article																		
Animal No.	1			2			3			4			5			6		
Measurement	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R
1 st	1	14	13	2	12	10	2	11	9	2	11	9	4	11	7	3	14	11
2 nd	1	16	15	3	18	15	4	17	13	2	12	10	3	15	12	2	13	11
3 rd	1	24	23	3	18	15	3	13	10	2	14	12	3	17	14	3	19	16
4 th	2	26	24	3	18	15	4	16	12	2	12	10	4	15	11	3	19	16
5 th	1	18	17	3	20	17	3	16	13	1	14	13	4	16	12	3	23	20
6 th	2	17	15	4	20	16	3	14	11	1	14	13	3	17	14	3	22	19
7 th	2	21	19	5	19	14	4	13	9	2	16	14	3	18	15	3	25	22
8 th	3	23	20	2	22	20	6	14	8	2	15	13	3	18	15	3	23	20
9 th	2	26	24	3	18	15	5	13	8	2	13	11	4	17	13	3	24	21
10 th	3	20	17	3	19	16	5	15	10	2	11	9	4	19	15	3	25	22
MEAN	18.7			15.3			10.3			11.4			12.8			17.8		
S.D.	4.0			2.5			1.9			1.8			2.5			4.2		
GRAND TOTAL: 14.38 ± 3.44																		

INDIVIDUAL MOISTURE VALUE																		
STUDY: 08-GE-542N												SEX: MALE						
GROUP : G2																		
Comparison article																		
Animal No.	7			8			9			10			11			12		
Measurement	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R
1 st	2	22	20	6	15	9	1	14	13	1	14	13	6	15	9	3	18	15
2 nd	1	20	19	8	16	8	1	18	17	1	11	10	6	10	4	2	21	19
3 rd	2	21	19	7	15	8	1	17	16	1	11	10	6	13	7	2	20	18
4 th	1	21	20	6	12	6	1	17	16	1	10	9	6	12	6	2	24	22
5 th	1	24	23	7	16	9	1	17	16	1	10	9	7	15	8	1	25	24
6 th	1	21	20	7	17	10	1	20	19	1	10	9	7	11	4	2	23	21
7 th	2	22	20	8	12	4	2	14	12	1	10	9	6	16	10	2	28	26
8 th	2	23	21	7	12	5	1	17	16	1	10	9	7	14	7	2	29	27
9 th	2	21	19	9	15	6	1	21	20	1	13	12	7	15	8	2	24	22
10 th	2	22	20	7	16	9	1	21	20	1	11	10	7	16	9	2	23	21
MEAN	20.1			7.4			16.5			10			7.2			21.5		
S.D.	1.2			2.0			2.7			1.4			2.0			3.6		
GRAND TOTAL: 13.78 ± 6.40																		

R: Right, L: Left

(Continued)

Appendix 3. Individual Corneometer data (day 3)

INDIVIDUAL MOISTURE VALUE																		
STUDY: 08-GE-542N												SEX: MALE						
GROUP : G1																		
Comparison article																		
Animal No.	1			2			3			4			5			6		
Measurement	R		L-	R		L-	R		L-	R		L-	R		L-	R		L-
	1 st	1	10	9	1	12	11	6	12	6	3	7	4	2	10	8	1	9
2 nd	1	11	10	1	14	13	5	11	6	3	8	5	4	11	7	1	8	7
3 rd	1	11	10	2	10	8	7	13	6	4	7	3	5	11	6	1	11	10
4 th	2	16	14	2	10	8	3	10	7	4	7	3	6	11	5	1	11	10
5 th	2	10	8	2	15	13	5	11	6	2	8	6	5	10	5	1	11	10
6 th	1	10	9	3	16	13	5	11	6	3	9	6	4	11	7	1	11	10
7 th	1	11	10	1	11	10	5	13	8	4	7	3	4	10	6	2	9	7
8 th	1	11	10	1	10	9	4	11	7	3	8	5	5	13	8	1	9	8
9 th	1	12	11	2	12	10	4	12	8	2	7	5	5	12	7	1	12	11
10 th	1	13	12	2	13	11	5	14	9	3	7	4	4	11	7	1	9	8
MEAN	10.3			10.6			6.9			4.4			6.6			8.9		
S.D.	1.7			2.0			1.1			1.2			1.1			1.4		
GRAND TOTAL: 7.95 ± 2.40																		

INDIVIDUAL MOISTURE VALUE																		
STUDY: 08-GE-542N												SEX: MALE						
GROUP : G2																		
Comparison article																		
Animal No.	7			8			9			10			11			12		
Measurement	R		L-	R		L-	F		L-	F		L-	F		L-	R		L-
	1 st	1	19	18	3	15	12	1	13	12	1	8	7	1	8	7	1	11
2 nd	2	21	19	2	16	14	1	10	9	1	9	8	1	7	6	1	12	11
3 rd	2	19	17	2	11	9	1	10	9	2	7	5	1	8	7	1	13	12
4 th	2	23	21	2	13	11	1	11	10	1	9	8	1	7	6	1	12	11
5 th	2	24	22	2	17	15	1	15	14	1	9	8	1	7	6	1	18	17
6 th	1	26	25	3	10	7	1	12	11	1	9	8	1	8	7	1	20	19
7 th	2	25	23	2	17	15	1	13	12	1	7	6	1	7	6	1	21	20
8 th	2	24	22	2	12	10	1	11	10	1	7	6	1	7	6	1	17	16
9 th	2	28	26	2	14	12	1	10	9	1	8	7	1	8	7	1	16	15
10 th	2	19	17	2	13	11	1	11	10	1	8	7	1	8	7	1	18	17
MEAN	21			11.6			10.6			7			6.5			14.8		
S.D.	3.2			2.6			1.6			1.1			0.5			3.6		
GRAND TOTAL: 11.92 ± 5.40																		

R: Right, L: Left

(Continued)

Appendix 4. Individual Corneometer data (day 6)

INDIVIDUAL MOISTURE VALUE																		
STUDY: 08-GE-542N															SEX: MALE			
GROUP : G1																		
Comparison article																		
Animal No.	1			2			3			4			5			6		
Measurement	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R
1 st	8	20	12	7	14	7	8	11	3	3	7	4	13	11	-2	7	24	17
2 nd	10	16	6	10	14	4	6	10	4	2	10	8	16	7	-9	10	25	15
3 rd	6	16	10	7	11	4	7	11	4	3	6	3	15	9	-6	10	28	18
4 th	9	16	7	8	19	11	7	10	3	4	10	6	11	12	1	7	27	20
5 th	8	12	4	11	24	13	6	17	11	4	7	3	9	14	5	8	29	21
6 th	12	13	1	9	11	2	9	15	6	5	6	1	8	15	7	7	30	23
7 th	5	17	12	7	19	12	8	11	3	4	7	3	13	7	-6	8	31	23
8 th	4	15	11	9	10	1	8	8	0	5	10	5	19	16	-3	9	23	14
9 th	8	15	7	13	23	10	9	14	5	5	7	2	10	10	0	7	24	17
10 th	6	18	12	7	26	19	10	10	0	6	7	1	10	7	-3	6	31	25
Mean	8.2			8.3			3.9			3.6			-1.6			19.3		
S.D.	3.8			5.7			3.1			2.2			5.0			3.7		
GRAND TOTAL: 6.95 ± 7.06																		

INDIVIDUAL MOISTURE VALUE																		
STUDY: 08-GE-542N															SEX: MALE			
GROUP : G2																		
Comparison article																		
Animal No.	7			8			9			10			11			12		
Measurement	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R	R	L	L-R
1 st	7	28	21	2	19	17	5	16	11	2	10	8	2	14	12	6	16	10
2 nd	6	26	20	3	17	14	2	26	24	2	23	21	3	19	16	5	12	7
3 rd	5	27	22	3	17	14	3	19	16	2	16	14	3	19	16	5	13	8
4 th	4	21	17	2	20	18	4	15	11	2	10	8	4	20	16	4	11	7
5 th	5	26	21	2	13	11	4	20	16	3	17	14	2	25	23	5	13	8
6 th	3	19	16	3	14	11	3	28	25	2	14	12	5	19	14	5	9	4
7 th	5	22	17	3	13	10	3	17	14	4	22	18	3	13	10	5	9	4
8 th	6	23	17	6	15	9	3	18	15	5	10	5	4	16	12	6	12	6
9 th	10	23	13	4	18	14	2	20	18	4	23	19	4	21	17	6	12	6
10 th	6	24	18	5	19	14	3	14	11	5	21	16	6	18	12	4	12	8
MEAN	18.2			13.2			16.1			13.5			14.8			6.8		
S.D.	2.8			2.9			5.0			5.3			3.7			1.9		
GRAND TOTAL: 13.77 ± 3.87																		

R: Right, L: Left

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

년도	연구개발 수행내용	달성도 (%)	대외기여도
1차 연도	황토국화 원물표준화 연구 표준 재배원료 국화 염기서열 분석을 통한 중분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - 황토국화의 원물 표준화 및 국화 품종 동정법 개발 - 황토국화추출물의 아토피 효능 확인으로 인한 추출물의 아토피 평가 screening system 확립 - 천연물에서 지용성 성분의 유효성 시험법 정립
	유효 및 지표성분연구	100	
	아토피성피부염 치료용 원료 검증 황토국화추출물의 전초, 부위별, 분획별 탈과립화 억제 효과 아토피 유발물질 억제효과 과민반응 억제 간이 임상 효능 시험	100	
	황토국화추출물의 피부자극성 시험 황토국화 추출물의 독성연구 급성 경구 독성 시험(<i>in vivo</i>) 경피 독성 시험(<i>in vivo</i>)	100	
	추출공정 및 표준분석법 연구	100	
2차 연도	Subfraction과 항알러지 효능 검증 항산화 효능 평가 황토국화 추출물의 anaphylaxis 시험 시제품의 피부 보습효과 측정	100	<ul style="list-style-type: none"> - 황토국화의 화장품으로서의 가치 평가 및 황토국화에 대한 소비자의 안전성에 대한 인식 증대 제고 - 황토국화 추출 생산 공정화를 통한 에센셜오일, 증류수, 추출물을 동시에 추출할 수 있는 공정설정 - 화장품 분야에서의 천연 추출물에 대한 피부자극 및 독성 연구 system 설정
	표준분석법 연구 Hexane 층의 성분 분석 EA 층의 성분 분석	100	
	황토국화 시제품의 안전성 시험 단회투여 독성시험(<i>in vivo</i>) 황토국화의 피부자극시험(<i>in vivo</i>)	100	
	시제품 생산용 추출물 생산 에센셜오일 에센셜오일이 함유된 증류수 추출물 시제품에 대한 안정성 평가	100	
3차 연도	시제품 생산	100	<ul style="list-style-type: none"> - 박사학위 논문자료 이용, 학회 논문 투고, 특허 출원 등으로 황토국화 대한 대외 신인도 증대, 황토국화 개발 자료를 통하여 화장품회사에 대한 자료 설명, 화장품 개발의 다양성 제공
	특허 출원	100	
	황토국화 적용 제품의 간이임상 시험	100	
	화장품 제형 연구	100	
	황토국화 적용 제품 출시	100	

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 개발 결과 추진전략

가. **활용분야** : 황토국화의 에센셜오일, 에센셜오일 함유 증류수 및 추출물을 아토피 전용 화장품, 기능성 화장품, 민감성 화장품, 식품첨가제, **아로마 therapy**, 입욕제 기타 식의약화장품 첨가제로의 적용분야 확대 추진. 또한 **황토국화를 대체 작물화하여 수매를 통한 농가의 소득향상에 활용**

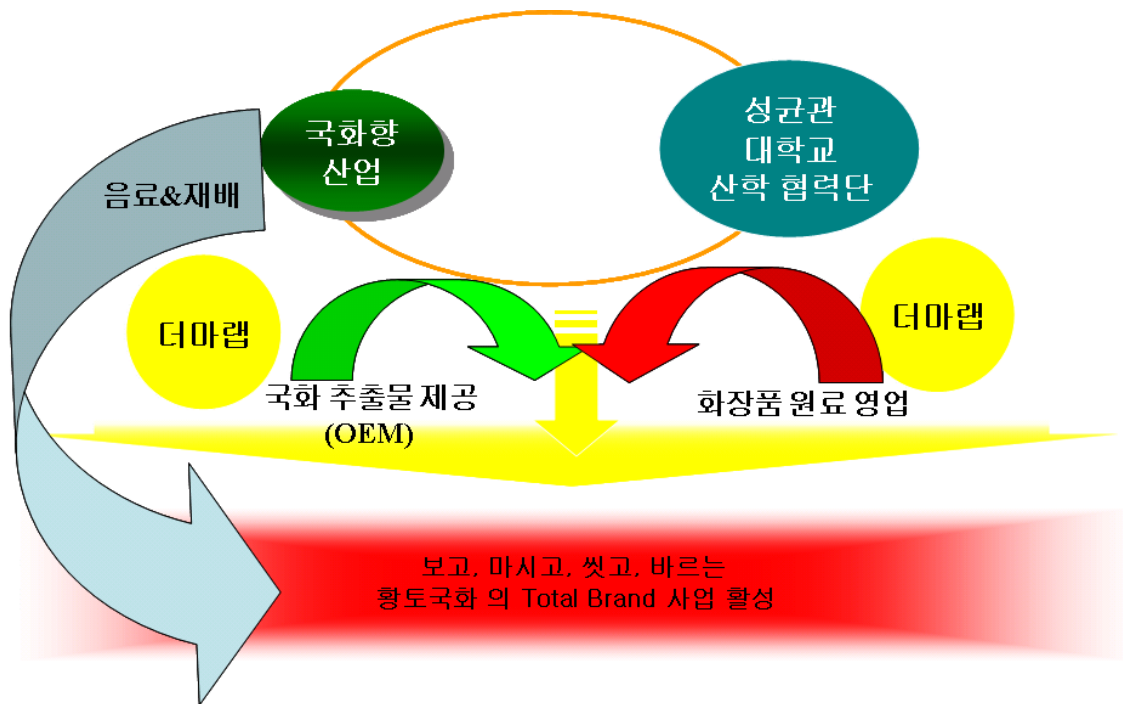
나. **주활용분야** : 아토피 전용 황토국화의 에센셜오일, 증류수 및 추출물 기존의 천연 화장품 추출 소재에서는 주로 단일의 소재 및 효능을 중심으로 하여 마케팅에 이용하고 있으며, 본 과제의 경우와 같은 아토피 치료 및 예방에 우수한 효과를 가지는 아토피 전용 에센셜오일, 증류수 및 추출물 등의 차별화된 천연 소재는 개발된 바 없다. 따라서, 본 과제에서는 아토피 전용 황토국화의 에센셜오일, 증류수 및 추출물을 이용한 보고, 씻고, 마시고, 바르는 부위별, 사용별, 적용분야별 차별화된 아토피 개선 화장품 및 파생상품을 개발함으로써 차별화된 **천연 아토피 전용 제품라인을 구성하고자 한다**. 또한 에센셜오일 개발을 통한 부가가치가 높은 **아로마테라피 및 천연 향료 개발에 적용할 것**이며, 이에 따르는 원물의 대량 소비가 예상됨으로써 농가 재배지의 확대와 GAP 사업과 연계하여 농가의 대체 우수 작물화를 진행하여 **농가의 소득향상에 이바지 하고자한다**.

다. 활용유형 : GLP 임상기관을 통한 아토피 임상 확보 및 협동기업을 통한 생산, 화장품 제조회사에 대한 원료판매((주)더마랩), 에센스 오일 완제품에 대한 공동 마케팅. GAP 사업과 연계하여 황토국화의 우수 작물화 추진

라. 추가기술 개발

- (1) 고품질 오일생산을 위한 추가 공정/시설 확충
- (2) 황토국화와 유사한 방향성오일 함유 및 항산화, 항알러지 물질이 함유된 천연 소재의 발굴 및 생산 확대
- (3) 농산물, 임산물에 대한 적용 확대
- (4) 기능성 다양화를 위한 연구 확대 : 적용 품목에 대한 다양한 제품력 구성

마. 사업화 계획



* 참여기업인 (주)더마랩에서 국내의 450여개의 화장품 제조업체에 황토국화 에센셜 오일, 황토국화 에센셜오일 함유 증류수, 황토국화 추출물을 영업하여 황토국화가 화장품 시장에서 중요한 원료로서의 평가받을 수 있도록 영업을 진행.

* 황토국화의 화장품, 식품 등의 소재로 확대됨으로써 재배 지역 확대, 재배지의 관광 상품화, 재배지역의 지역 특산물화를 추진하여 농가의 소득향상 및 지역 경제 발전에 이바지 할 수 있도록 진행.

* 본 연구결과를 토대로 황토국화의 다양한 제품 적용 및 개발로 황토국화의 부가가치가 향상되도록 진행하여 기업, 농가, 지자체 등이 실질적인 소득향상을 꾀함.

2. 연구개발 결과 활용현황 및 계획

일정	추진내용	세부추진사항	비고
2008	국화화장수 개발		첨부자료1
2008. 9	특허출원	- 황토국화 추출물 특허출원	첨부자료2
2008. 9	기술이전계약 체결	- 성균관대학교-국화향산업(주) 간 기술이전계약 체결	첨부서류3
2009. 3	국화비누 및 클렌저 출시	- 디자인, CI, BI 개발 - 한일물산 생산	첨부서류4 첨부서류5
2009. 5	국화추출물 함유 화장품 출시	(주)콜마 생산	첨부서류6
이후계획	기능성 화장품(보습)	- 보습기능성화장품 획득 - 대기업과 연계 원료 및 제품 출시	

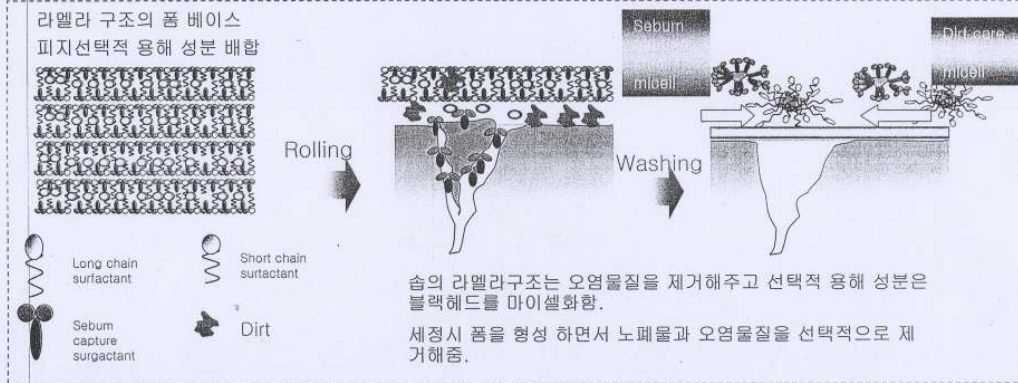
MGC-국화 폼클렌저

기술적 특징 1

블랙헤드 제거

QUICK PENANTRATION MICELL

침투가 빠른 침투형 블랙헤드 용출 성분이 선택적으로 블랙헤드를 용해 시켜 마이셀화하여 제거해주는 기술을 사용하여 세안하는 동안 간단히 블랙헤드를 제거해 주는 데 도움을 줌.



특성 원료

- ❖ 황도국화수 1.0%
- ❖ 황도국화추출물 0.1%

【첨부자료 2】 국화추출물 특허출원 서류-1

HANOL LAW OFFICES
LEGAL GROUP
TEL: 82-2-6004-2500
FAX: 82-2-6203-2500

한얼국제특허사무소

서울시 강남구 삼성동 159-9
도심공방타워 19층 (우) 135-973

HANOL LAW OFFICES
IP GROUP
TEL: 82-2-2016-7900
FAX: 82-2-2016-7905

2008. 9. 24.

수 신 : 국화향산업
참 조 : 이 영 빈 대표님
발 신 : 한얼국제특허사무소
제 목 : 특허출원완료보고

당소관리번호 : PA080426/KR

당소에 의뢰하신 하기 특허출원을 완료하고 그 내역을 아래와 같이 알려드립니다.

권 리	특 허	출 원 일	2008년 09월 22 일		
출 원 번 호	10-2008-0092515				
출 원 인	성균관대학교산학협력단				
명 칭	국화추출물을 포함하는 향산화 또는 항염증 조성물 및 이의 제조 방법				
발 명 자	지옥표/박종혁/이종욱/김일환/정의수/윤제용/마진열/이재훈				
심 사 청 구	무	조기공개	무	우선권주장	무
우선권출원기한	2009년 09월 22 일		해의출원기한	2009년 09월 22 일	

위의 출원과 관련하여 특허청에 제출한 출원서류 사본을 동봉합니다. 추후 진행상황은 발생하는 대로 알려드리겠습니다. 감사합니다.

한얼국제특허사무소



MS/SJJ/zrsp

- 첨부서류 : 1. 특허출원서 사본 1부.
2. 출원번호통지서 1부.

Note : 출원인의 주소 또는 명칭(성명)이 변경되는 경우, 당소로 연락을 주셔야 향후 변경 등의 경우에 서류송달 불능으로 인한 불이익을 방지할 수 있습니다.

【첨부자료 2】 국화추출물 특허출원 서류-2

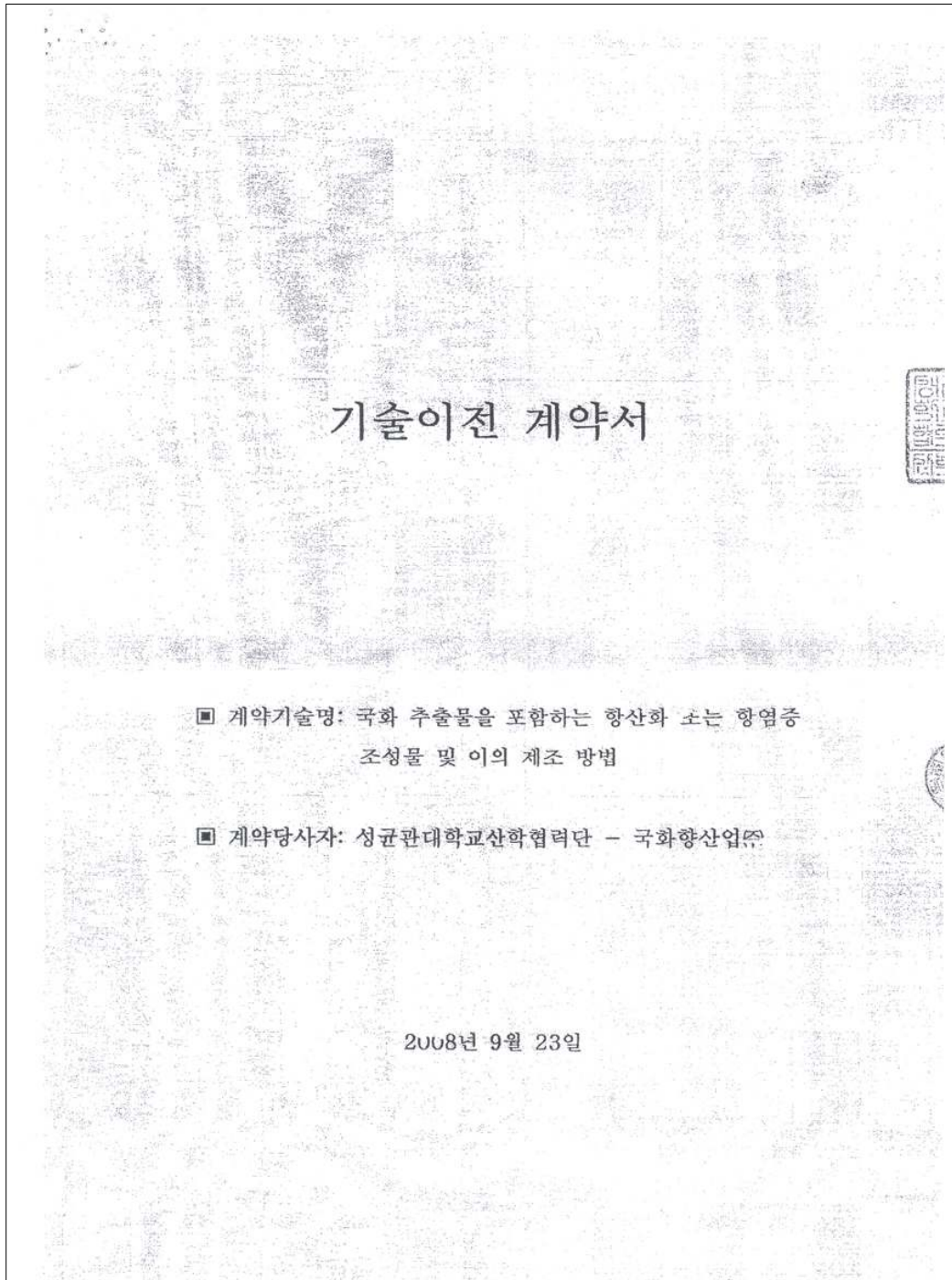
출원번호통지서

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2008.09.22
특기사항 심사청구(우) 공개신청(우)
출원번호 10-2008-0092515 (접수번호 1-1-2008-0662510-02)
출원인명칭 성균관대학교산학협력단(2-2005-001360-4)
대리인성명 손민(9-1999-000420-6)
발명자성명 지용표 박종혁 이종욱 김일환 정의수 윤재웅 마진열 이재훈

특 허 청 장

- 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
- 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 6개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr> 이하 "홈페이지"라 함)내 "특허로(문라인전자출원)" 사이트 "나의출원등록조회"에서 1차 심사처리 1개월 전에 1차 심사결과통지 예정시기를 확인할 수 있으며, 동 사이트 코너인 "통지서비스신청"에서 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.(단 홈페이지 회원에 한하여 통지서비스 신청 가능)
2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 류별 1차 심사결과통지 예정시기를 매월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
2-라. 1차 심사결과통지시(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
- 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
- 우선심사 특허출원 또는 디자인등록출원에 대해 초기에 심사받기를 원하시면 우선심사제도를 이용하실 수 있습니다.
- 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
- 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
- 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
- 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
- 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454



【첨부자료 3】 기술이전 및 사용계약 서류 -2

“교육개혁으로 21세기를 선도하는 민족정통대학”



성균관대학교

수신자 국화향산업(주) 대표이사

(경유)

제 목 연구성과 반영제품 광고 문구 중 대학 명칭 사용 승인

1. 귀사의 번창을 기원합니다.

2. 귀사의 대학명칭 사용 요청에 대하여 다음과 같이 승인함을 알려드립니다.

가. 명칭 사용 범위 : “성균관대학교 약학부 지옥표 교수 연구팀”으로 하여 연구책임자의 소속을 밝히는 것으로 한정하며, “성균관대학교”, “성균관대학교 산학협력단” 등 기관 명칭을 단독으로 사용하는 것은 불허

나. 제품군 및 홍보매체

- (1)제품군 : 비누, 팩, 폼클렌징, 기초화장품, 생활용품 등
- (2)홍보매체 : 제품포장, 인터넷, 카탈로그, 홈쇼핑 등
- (3)홍보문구

- 본 제품은 2007 농림부 기술개발과제인 ‘황토국화를 이용한 아토피 치료용 화장품 개발’을 수행하고 있는 성균관대학교 약학부 지옥표 교수팀의 연구 성과와 농림부 기술개발사업의 지원으로 만들었습니다.
- 본 제품은 ‘황토국화를 이용한 아토피 치료용 화장품 개발’을 위한 2007농림부 기술개발사업지원과 성균관대학교 약학부 지옥표 교수팀의 연구성과로 만든 제품입니다.
- 본 제품은 ‘황토국화를 이용한 아토피 치료용 화장품 개발’을 위한 국가기술과제로 성균관대학교 약학부 지옥표 교수팀과 농림부 기술개발 사업의 지원으로 만들었습니다.

다. 명칭사용 승인 기간 : 연구과제 종료 후 1년(2010년 4월 24일)으로 하며, 생산·판매자, 제품군, 홍보매체 등 주요사항에 변경이 있는 경우 반드시 사전 협의하여 승인을 득해야 함. 끝.

성균관대학교 산학협력단장



★과장 채혁철

팀장 (전력) 최원영

협조자

시행 산학사업팀- 264 (2008. 5. 8) 접수 ()

우 440-746 주소: 경기도 수원시 정안구 천천동 300 성균관대학교 / http://www.skku.edu/
전화 031) 290-5081 /전송 031) 290-5089 / bluerain@skku.edu / 공개

【첨부자료 4】 국화비누 디자인, CI, BI 개발 서류

‘국화향산업’ 디자인용역계약서

경기도 수원시 장안구 천천동 성균관대학교 제 2 공학관 27501 호(이하 ‘갑’이라 함.)과 안양시 동안구 호계동 968-3 번지 우양빌딩 6 층에 소재하는 주식회사 코비컴 (이하 ‘을’이라함)은 신의성실 원칙에 준거하여 디자인용역계약을 다음과 같이 체결한다.

제 1 조 (계약의 목적)

본 계약은 ‘갑’이 ‘국화향산업’ 브랜드로 영업하고자 하는 ‘국화차’ 및 ‘비누 외 기초화장품 3 종’의 비즈니스에 관한 B.I. Design 및 Package Design 을 개발,지원하는 디자인용역제공을 목적으로 한다.

제 2 조 (용역의 내용 및 범위)

본 용역의 주요내용 및 범위는 아래와 같다.

1. 용역의 주요내용 및 용역의 범위
 - (1) ‘갑’의 ‘국화향산업’ Brand 에 의한 Brand Identity Design
 - a. Basic System (Mark & Logo-type, Signature, Color Scheme)
 - b. 기본편 그래픽매뉴얼 (Eps.file, jpg.file)
단, 확정 Brand Name 은 디자인개발 전 ‘갑’이 ‘을’에게 제공하여야 한다.
 - (2) 前 (1)항의 부문별 디자인 범위
 - A. 비누 및 기초화장품(Form Cleansing, Body Cleanser, Pack 등 3 종) 단위포장디자인.
A-1 前 A 항의 선물세트포장디자인 1 종 (지기구조디자인 포함)
 - B. ‘국화차’ 포장디자인 (Eps.file, jpg.file)
B-1. Tea Bag Carton Package 1 종
B-2. Paper Composite Can 1 종
B-3. 선물세트 Carton Package Design 1 종
 - C. 비즈니스를 위한 Business Proposal (Report) 2 종 (jpg.file)
: A4 규격 x 10 P 기준(표지포함) / 3D Image Sketch 6 종 기준.
단, Proposal 에 관한 일체의 관련정보는 개발 전 ‘을’에게 doc.file 로 제출되어야 한다.

제 3 조 (용역의 수행기간)

본 용역계약의 수행기간은 2008 년 11 월 26 일 부터 2009 년 1 월 30 일까지 66 일간으로 한다. 단, 쌍방의 서면에 의한 합의가 있을 경우에 한하여 계약기간의 연장이 가능하나 계약기간 종료일 전일까지 서면으로 의사를 표시하여야 한다.

제 4 조 (용역 결과의 제출 및 협조)

- 을’은 본 용역을 수행함에 있어서 ‘갑’에게 다음과 같이 용역의 결과물을 제출한다.
1. 갑의 실제 비즈니스를 위해 요구하는 前 2 조, 1 항 (1),(2) 에 해당되는 디자인의 시안. (2 회 이내 / PT Board 제출)
 2. 포장 디자인의 경우 이미지자료(jpg.file 출력물 또는 PT Board) 협의에 의해 결정된 최종안에 관한 입체 시안제작물 상품별 각 1 종.
 3. 前 2 조, 1 항 - C ‘Business Proposal’ 2 종. (jpg.file) 출력물 각 1 부.
 4. 前 1 항의 제반 결과물은 디자인승인 시점에서 ‘갑’에게 이전하는 것을 원칙으로 하며, 단, 발생된 결과물의 특성에 의해 즉시 이전이 곤란 할 경우는 ‘갑’과 성실하고 충분한 협의를 통해 ‘갑’의 승인을 득하도록 한다.

I. 발명특허로 차별화된 만족과 깊은 신뢰를 드립니다.



본 제품은 2007 농림수산식품부 기술과제인 '국화를 이용한 아토피 치료용 화장품의 개발' 을 수행하고 있는 성균관대학교 약학부 자육표 교수팀의 연구 성과와 농림수산식품부기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

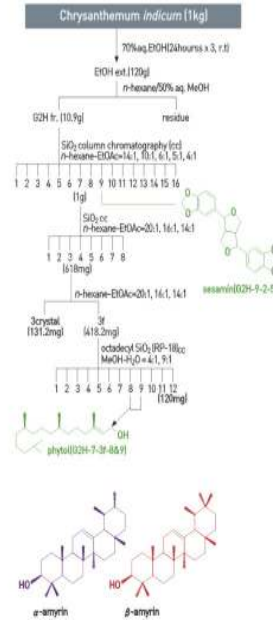
This Research and development was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry for Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea

- 본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어졌습니다.
- 과제명 : 황토국화를 이용한 아토피 치료용 화장품의 개발

특허출원번호 : 10-2008-0092515
특허출원명 : 국화추출물을 포함하는 항산화 또는 항염증 조성물 및 그의 제조방법

특허요약 : 본 발명에 따른 국화추출물을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 아나필락틱 쇼크(Anaphylactic Shock, 과민성 쇼크)를 억제하거나 아토피 피부를 개선시키는데 유용하게 사용될 수 있으며, 본 발명에 따른 초음파 추출 기법을 이용하여 제조된 화정료는 종래의 화정료에 비하여 항산화,면역세포 탈과립화(알레르기 반응) 억제 활성이 우수하여 아토피 피부 개선에 효과적이다.

국화제품은 특허출원중인 항염, 항산화 효과로 알려진 Sesamin, Phytol, Amyrin 등의 성분등이 함유된 국화추출물을 적용하여 과민성 피부에 효과적 입니다.





**II. 국화비누는 순식물성 천연, 한방원료의 이상적인 배합으로
우리 피부를 만족시켜드립니다.**

Pure Vegetable Ingredients

국화비누는 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원과 성균관대학교 약학부 지옥표 교수
팀의 연구성과를 활용하여 특허출원중인 Sesamin, Phytol, Amyrin 등의 성분이 함
유된 국화추출물을 주성, 항염, 항산화 효과로 인하여 **이토피 및 과민성 피부에 효과적**입니다.

국화비누에 함유된 대황추출물의 각종 병원성 세균에 대한 항균력 평가는 '세명대학교 특성화
사업단' 지원으로 '세명대학교 자연의재과학과 Herbs'에서 평가하였으며, **특히 여드름 및
피부공황이균류에 효과적**입니다.

국화비누는 ●특히등락된 Anthraquinones 유도체 성분이 함유된 대황추출물을 사용하여
뛰어난 **항균효과로 인한 각종 피부 트러블에 효과적**입니다.

국화비누는 ●천연 한방추출액 16종 (백령, 백급, 석창포, 백편두, 행인, 의이인, 애엽, 고삼,
백강징, 은행, 만년청, 유근피, 박하, 녹두, 죽엽, 찬궁)이 함유되어 **피부의 보습 및 영양공급에
효과적**입니다.

국화비누는 ●100% 천연식물성 Soap Base (Coconut 원료)를 주원료로 하여 천연지방산
Lauric acid (Cream Type 거품형성)가 풍부하게 함유되어 **보습력**이 뛰어 납니다.

국화비누는 ●알로에베라추출물, 호호바오일, 스쿠알렌, 그레이브씨드오일, 키모마일, 알록
시글리세롤, 토코페롤의 추출물 성분을 함유하고 있어 피부 **미용 및 노화방지에 효과적**입니다.

성균관대학교 약학부 지옥표 교수팀의 연구 성과로 등록된 천연식물추출물(특허)을 사용하였으며, 그로 인하여

제품상담 : 02-6000-4242 홈페이지 : www.kuknhwa.com | www.kukhwa.co.kr



【첨부자료 5】 국화비누 제품사진 (한일물산 생산)



【첨부자료 6】 논문발표

1. Dermal Irritation Study of *Mud Chrysanthemum* Extract in Rabbits.,
hoong Je ma, Hyun Kyoo Shin, Young Beob Yu, Hwa Yong Park, Jin Yeul
Ma, Molecular & Cellular Toxicology, Vol. 3(4). 2007, P125

2. Screening and Evaluation of Cosmeceuticals from Medicinal Plants,
정의수, 성균관대학교 박사학위 논문, 2008.2.25

3. Acute toxicity study on *mud chrysanthemum morifolium* in mice.,
Choong J Ma, Young Beob Yu, Jae Hoon Lee, Hwa Yong Park, Han
Choi1, Ok Pyo Zee, Jin Yeul Ma, 대한본초학회지 투고 중(학진), 2008. 02월

제 6 장 참고문헌

- 1) Assaf Eliiezer Sagiv et al. A novel in vivo model in guinea pigs for dry skin syndrome. *Skin Research and Technology*. 2000, 6:37-42.
- 2) Assaf Eliiezer Sagiv et al. The efficiency of humectants as skin moisturizers in the presence of oil. *Skin Research and Technology*. 2001, 7:32-35.
- 3) Arnao, M.B., Cano, A., and Acosta, M. (1999) Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free radical research* 31 Suppl, S89-96.
- 4) Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., and Cisneros-Zevallos, L. (2003) Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 6657-6662.
- 5) Baumann, L.S. (2003) Cosmeceutical critique: allantoin. *Skin & Allergy News* 34, 10.
- 6) Beaven, M.A., and Metzger, H. (1993) Signal transduction by Fc receptors: the Fc epsilon RI case. *Immunology today* 14, 222-226.
- 7) Benhamou, M., Ryba, N.J., Kihara, H., Nishikata, H., and Siraganian, R.P. (1993) Protein-tyrosine kinase p72syk in high affinity IgE receptor signaling. Identification as a component of pp72 and association with the receptor gamma chain after receptor aggregation. *The Journal of biological chemistry* 268, 23318-23324
- 8) Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200.
- 9) Bondet, V., Brand-Williams, W., and Berset, C. (1997) Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 30, 609-615.
- 10) Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. -wiss. Technol* 28, 25-30.
- 11) Burits, M., and Bucar, F. (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res* 14, 323-328.
- 12) Byun, M.W., Jo, C., Lee, J.W., Jo, S.K., and Kim, K.S. (2004) Application of radiation technology to develop green tea leaf as a natural resource for the cosmetic industry. *Radiation Physics and Chemistry* 71,

487–489.

13) Cao, G., Alessio, H.M., and Cutler, R.G. (1993) Oxygen–radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free radical biology & medicine* 14, 303–311.

14) Cao, G., Sofic, E., and Prior, R.L.(1996) Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3426–3431.

15) Draelos, Z.D. (1997) New developments in cosmetics and skin care products. *Adv Dermatol* 12, 3–17.

16) Draelos, Z.D. (2005) The cosmeceutical conundrum. *Journal of cosmetic dermatology* 4, 149–150.

17) Dureja, H., Kaushik, D., Gupta, M., Kumar, V., and Lather, V. (2005) Cosmeceuticals: An emerging concept. *Indian J Pharmacol* 37, 155–159.

18) Dvorak, A.M. (1997) New aspects of mast cell biology. *International archives of allergy and immunology* 114, 1–9.

19) Fischer, M.J., Paulussen, J.J., Horbach, D.A., Roelofsen, E.P., van Miltenburg, J.C., de Mol, N.J., and Janssen, L.H. (1995) Inhibition of mediator release in RBL–2H3 cells by some H1–antagonist derived anti–allergic drugs: relation to lipophilicity and membrane effects. *Inflamm Res* 44, 92–97.

20) Assaf Eliiezer Sagiv et al. (2003) The connection between in vitro water uptake and in vivo skin moisturization. *Skin Research and Technology.*, 9:306–311.

21) Fitzpatrick, R.E. (2005) Endogenous growth factors as cosmeceuticals. *Dermatol Surg* 31, 827–831; discussion 831.

22) Funaba, M., Ikeda, T., and Abe, M. (2003) Degranulation in RBL–2H3 cells: regulation by calmodulin pathway. *Cell biology international* 27, 879–885.

23) Glaser, D.A. (2003) Anti–aging products and cosmeceuticals. *Facial plastic surgery clinics of North America* 11, 219–227.

24) Gushchin, I.S., Prozorovsky, N.S., Ignatyeva, E.M., Chitaeva, V.G., and Leskov, V.P. (1994) Histamine releasing activity of blood mononuclear cells is acquired by means of activation of mast cells. *Agents and actions* 41 Spec No, C16–18.

25) Hahn, H.G., Oh, H.S., Cheon, S.H., Oak, M.H., Kim, Y.R., and Kim, K.M. (2004) Excavation of lead compounds that inhibit mast cell degranulation by combinatorial chemistry and activity–guided. *Archives of*

pharmacol research 27, 518–523.

26) Halliwell, B. (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews* 52, 253–265.

27) Halliwell, B. (1995) Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical pharmacology* 49, 1341–1348.

28) Halliwell, B. (1995) Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical pharmacology* 49, 1341–1348.

29) Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., and Aruoma, O.I. (1995) The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 33, 601–617.

30) Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1988) Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Human toxicology* 7, 7–13.

31) Huang, D., Ou, B., Hampsch–Woodill, M., Flanagan, J.A., and Prior, R.L. (2002) High–throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96–well format. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4437–4444.

32) Hyun, S.H., Jung, S.K., Jwa, M.K., Song, C.K., Kim, J.H., and Lim, S.B. (2007) Screening of antioxidants and cosmeceuticals from natural plant resources in jeju island. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39, 200–208.

33) Ikawati, Z., Wahyuono, S., and Maeyama, K. (2001) Screening of several Indonesian medicinal plants for their inhibitory effect on histamine release from RBL–2H3 cells. *Journal of ethnopharmacology* 75, 249–256.

34) Jacobi, H.H., Skov, P.S., Kampen, G.T., Poulsen, L.K., Reimert, C.M., Bindslev–Jensen, C., Praetorius, C., Malling, H.J., and Mygind, N. (1998) Histamine and tryptase in nasal lavage fluid following challenge with methacholine and allergen. *Clin Exp Allergy* 28, 83–91.

35) Jeannin, P., Didierlaurent, A., Gras–Masse, H., Ellass, A.A., Delneste, Y., Cardot, E., Joseph, M., Tartar, A., Vergoten, G., and Pestel, J. (1992) Specific histamine release capacity of peptides selected from the modelized Der p I protein, a major allergen of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Molecular immunology* 29, 739–749.

36) Jimbow, K., Fitzpatrick, T.B., and Wick, M. (1991) *Physiology and molecular biology of the skin*, ed. by Goldsmith, L.A. Oxford Univ. Press, New York, pp, 873–909.

37) Joe, W.A., An, B.J., Lee, C.E., Jang, M.J., Cheon, S.J., Sung, J.Y., Choi, E.Y., Kang, B.Y., Jeung, Y.S., Kim, Y.S., and Lee, J.T. (2006)

38) Cosmeceutical activities of *Persicae semen*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 49, 135–139.

- 39) Juhlin, L. (1978) [Methods for the detection of drug allergies]. *Zeitschrift fur Hautkrankheiten* 53, 335–340.
- 40) Kim, H.J. and Lee, Y.S. (2005) Identification of new dicaffeolyquinic acids from *Chrysanthemum morifolium* and their antioxidant activities. *Planta Med.* 71, 871–876.
- 41) Liu, T., Bai, Z.T., Pang, X.Y., Chai, Z.F., Jiang, F., and Ji, Y.H. (2007) Degranulation of mast cells and histamine release involved in rat pain-related behaviors and edema induced by scorpion *Buthus martensi* Karch venom. *European journal of pharmacology* 575, 46–56.
- 42) Maegawa, Y., Sugino, K., and Sakurai, H. (2007) Identification of free radical species derived from caffeic acid and related polyphenols. *Free radical research* 41, 110–119.
- 43) Miyazawa, M., and Hisama, M. (2003) Antimutagenic activity of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 67, 2091–2099.
- 44) Moneret-Vautrin, D.A., Kanny, G., and Halpern, G. (1993) Detection of antifeed IgE by in vitro tests and diagnosis of food allergy. *Allergie et immunologie* 25, 198–204.
- 45) Mosher, D.B., Pathak, M.A., and Fitzpatrick, T.B. (1983) Update: *Dermatology in general medicine*, ed. by Fitzpatrick, T.B., Eisen, A.Z., Wolff, K., Freedberg, I.M., Austen, K.F., McGraw-Hill. New York, pp, 205–225.
- 46) Most, S.P. (2007) Prospective examination of the efficacy of 2 topical over-the-counter cosmeceutical creams for rapid treatment of facial rhytids. *Arch Facial Plast Surg* 9, 340–343.
- 47) Nadler, M.J., Matthews, S.A., Turner, H., and Kinet, J.P. (2000) Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function. *Advances in immunology* 76, 325–355.
- 48) Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., and Deemer, E.K. (2002) Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3122–3128.
- 49) Posner, R.G., Geng, D., Haymore, S., Bogert, J., Pecht, I., Licht, A., and Savage, P.B. (2007) Trivalent antigens for degranulation of mast cells. *Organic letters* 9, 3551–3554.
- 50) Prichard, A.J.N. (2004) The use of essential oils to treat snoring. *Phytother. Res.* 18, 696–699.
- 51) Prior, R.L., Cao, G., Prior, R.L., and Cao, G. (2000) Analysis of

botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. *Journal of AOAC International* 83, 950–956.

52) Rawlings, A.V. (2003) Trends in stratum corneum research and the management of dry skin conditions. *International Journal of Cosmetic Science* 25, 63.

53) Ring, J., Sedlmeier, F., Dorsch, W., and Hermann, K. (1991) In vitro IgE elution and histamine releasability from peripheral leukocytes of atopics and normals. *Journal of dermatological science* 2, 413–421.

54) Subramoniam, A., Evans, D.A., Valsaraj, R., Rajasekharan, S., and Pushpangadan, P. (1999) Inhibition of antigen-induced degranulation of sensitized mast cells by *Trichopus zeylanicus* in mice and rats. *Journal of ethnopharmacology* 68, 137–143.

55) Sun, W.S., Roh, J.S., Oh, S.U., Lee, J.I., Oh, W.T., and Kim, J.H. (1999) Screening of antioxidants from Indonesian medicinal plants. *Food Sci. Biotechnol.* 8, 93–96.

56) Yoo, K.M., Kim, D.O., and Lee, C.Y. (2007) Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Sci. Biotechnol.* 16, 177–182.

57) Zheng, W., and Wang, S.Y. (2001) Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5165–5170.

58) Zheng, Y., Wang, X.S., and Fang, J. (2006) Two acidic polysaccharides from the flowers of *Chrysanthemum morifolium*. *Journal of Asian natural products research* 8, 217–222.

59) Assaf Eliiezer Sagiv et al. (2000) A novel in vivo model in guinea pigs for dry skin syndrome. *Skin Research and Technology.*, 6:37–42.

60) Assaf Eliiezer Sagiv et al. (2001) The efficiency of humectants as skin moisturizers in the presence of oil. *Skin Research and Technology.*, 7:32–35.

61) Lupo, M.P. (2005) Cosmeceutical peptides. *Dermatol Surg* 31, 832–836; discussion 836.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.