

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001196-01

농림식품자원인 우엉 추출물을 이용한 국내유통 및
수출용 항알러지 제품 및 원료의약소재 개발

(Development of anti-allergic pharmaceuticals and goods
for distribution via domestic and export from *Arctium lappa*
extract, agriculture food resources)

세명대학교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “농림식품자원인 우엉 추출물을 이용한 국내유통 및 수출용 항알러지 제품 및 원료의약소재 개발”의 보고서로 제출합니다.

2011년 12월 19일

주관연구기관명 : 세명대학교

주관연구책임자 : 강 세 찬

세부연구책임자 : 강 세 찬

연 구 원 : 김 현 우

연 구 원 : 정 용 준

연 구 원 : 양 윤 정

협동연구기관명 : 이수제약(주)

협동연구책임자 : 양 응 석

협동연구기관명 : 충북TP바이오센터

협동연구책임자 : 윤 승 원

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 손 은 화

요 약 문

I. 제목

농림식품자원인 우엉 추출물을 이용한 국내유통 및 수출용 항알러지 제품 및 원료의약소재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

전 세계 화장품 시장의 급속한 성장 (매년 4.1% 성장) 및 발전에 힘입어 중국과 유럽 시장에서의 한국제품의 경쟁력 확보가 이루어지고 있으며, 새로운 기능성 화장품에 대한 전반적인 인식의 변화 및 수요자의 수요 욕구가 증대되고 있는 가운데 화장품의 개념이 소비자의 욕구 증대와 화장품 관련 기술발달로 단순 미화에서 고기능·다기능 제품으로 변화하고 있다. 특히, 단순 미용개념의 화장품에서 기능성화장품 신소재 개발 요구가 증대되고 있는 상황에서 특히 국내는 풍부한 약용작물을 이용한 천연추출물 화장품 원료개발이 유리하다는 장점을 가지고 있다. 더구나 기능성 화장품 원료개발은 의약품 및 건강기능식품 개발비용에 비해 저렴하지만, 시장에 대한 과급효과 및 매출은 대등하므로 천연물 화장품 소재개발의 사회, 경제적 중요성이 크게 부각되고 있다. 미백화장품의 경우 한국, 일본, 중국 및 동아시아 시장이 증대되고 있으며, 천연 자원 활용 시 뽕나무의 멀베린과 같이 1제품 당 국내 년 2백억 원 매출이 예상되고 있고, 천연 식물을 활용한 기능성 원료개발은 의약품 개발보다 상대적 진입이 용이한 반면 시장규모도 적지 않다. 또한 기능성 화장품 원료개발 시 동시에 의약품 원료 개발 가능의 부가적 이점을 가지고 있으며, 천연원료는 특성상 다양한 생리활성 성분을 함유하고 있어서 다양성이 중시되고 있는 미래 화장품 원료개발에 적합하고 소재개발의 기간 단축 및 비용 절감의 장점을 가지고 있으므로 본 연구에서는 식품원료에 이용되고 있는 안전한 농림자원인 국내산 우엉으로부터 아토피 치료용 소재를 개발하기 위하여 유효성분 규명, 최적추출공정의 확립 및 이를 통한 천연추출물 화장품, 기능성식품 소재 및 의약품원료소재를 개발하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 국내산 우엉으로 부터 피부면역 조절 및 항알러지 및 아토피에 유용한 소재를 개발하고자 면역세포 탈과립화 억제기능을 갖는 우엉으로부터 작용기전의 규명, 유효성분의 규명, 최적추출공정 확립, 지표성분 설정 및 QC조건 확립, 최종적으로는 화장품 시제품 생산과, 원료의약품소재를 개발하고자 하였으며, 이에 대한 유효성을 확인하기 위하여 인체적용시험을

통한 최종 시제품을 제작하였다. 이를 위하여 시제품 제작 시 고품질의 우영추출물 소재개발을 위한 연구 및 생산단계별로 가능성을 확인하였으며, 유효성분을 규명하였다. 또한, 국내 저명한 알러지 관련 국제논문(SCOPUS)에 투고하였으며, 이외에 국내외 학술대회 및 학술지에 게재하였다. 본 연구의 결과를 토대로 다양한 SCI급 논문에 투고 중에 있어 국내산 우영의 우수성을 알리고 또한 특허출원을 위한 기능성 연구와 성분연구를 완료하였다. 최종적으로 의약품 원료에 대한 시험성적을 완료하였으며, 크림, 로션 등의 시제품을 생산하고 인체적용 시험을 통하여 항알러지(아토피)에 대한 유효성 시험을 완료하였다.

IV. 연구개발결과

1. 국내산 우영의 최적추출조건 확립

본 연구에서는 국내산 우영의 산지별로 추출수율과 유효성을 평가하였으며, 최종적으로 중부지방의 원료가 가장 수율이 높으며, 우영의 건조에 따라 유효성이 낮아짐을 확인하여 생우영 30% EtOH추출물이 가장 우수함을 확인하였다.

2. 우영추출물의 유효성분 규명 및 지표성분 설정

생우영 30% EtOH추출물로부터 유효성분을 규명하기 위하여 다양한 방법으로 성분을 분리한 결과, Oleamide등의 성분을 분리하여 NMR구조 분석을 통하여 유효성분을 규명하였으며, 이외에도 HPLC를 통한 원료기시법의 확인, LC-MS/MS를 통한 다양한 성분의 규명 및 GC-MS를 통한 지표성분을 확인하고, 최종적으로 유효성분 2종과 지표성분 1종을 확립하였다.

3. 우영추출물 및 성분의 작용기전 규명

우영추출물로부터 급성 항알러지 및 항염증 효과와 작용기전을 규명하였으며, 특히 RBL-2H3세포에서 β -hexosaminidase 분비억제 효과를 평가 하였다. 또한, 우영추출물로부터 생쥐의 primary splenocyte세포에 대한 mitogenic proliferation효과, IL-4 발현 및 protein expression을 확인하였으며, 염증 반응의 전사인자 NF- κ B (p65)의 핵내 translocation에 대한 우영추출물의 억제조절효과, 세포내 염증반응 신호전달 기전의 MAPKs의 활성화에 대한 억제를 규명하였다. 또한, 우영의 활성분획인 BuOH분획물에 대한 ICAM-1과 NO생성조절에 미치는 항염증효과를 규명하였으며, 2,3-di-tert-butyl-phenol과 oleamide에 대한 항원자극에 의한 β -hexosaminidase 분비억제 효과를 규명하고, IL-4 단백질 발현의 억제를 확인하여 우영의 유효성분 규명과 작용기전 규명을 완료하였다.

4. 동물시험모델 평가

최종적으로 얻어진 생우엉 30% EtOH추출물에 대한 Systemic과 Passive 쇼크반응을 통하여 동물에서 우엉추출물에 의하여 histamine분비억제를 확인하였으며, IgE의 발현억제를 확인하였다. 또한 랫드를 대상으로 하여 피부보습력을 측정한 결과 생우엉 30% EtOH추출물이 가장 우수한 보습력을 나타냄을 확인하였다.

5. 자가 품질검사

우엉추출물에 대한 잔류농약, 중금속 및 미생물검사를 완료하였으며, 원료소재에 대한 자가 품질검사 조건을 확립하였다.

6. 시제품 생산

우엉추출물이 함유된 크림, 로션타입의 제제, 제형연구를 통하여 최종적으로 우엉추출물이 함유된 크림, 로션제제를 시생산하였으며, 의약품원료소재를 확보하였다. 특히, 크림제에 대한 인체적용시험을 위한 시제품을 생산하여 인체적용 시험에 사용하였다.

7. 인체적용 시험

상기의 시험을 토대로 시제품을 생산하였으며, 20명의 피시험자를 대상으로 인체적용시험을 완료하여 우엉추출물이 함유된 화장품의 효능을 입증하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

우엉은 자체로 조림등으로 식생활에 이용되고 있으며, 따라서 안전성이 확보된 우엉추출물 자체 뿐만 아니라 식품첨가제, 기능성화장품 등 기타 식의약화장품의 첨가제로서의 가능성을 확인하였으며, 이로 인하여 제품의 다양화를 가져와 농가수입의 증대가 예상된다. 또한 본 연구를 통하여 우엉의 항염증 및 항알러지 작용기전규명과 함께 유효성분을 규명하여, 현재 국외유명저널에 게재하였으며, 국내외 학술발표 및 투고를 수행하였고, 현재도 투고 중에 있으며, 재산권 확보를 위한 특허 출원 절차 또한 진행하고 있다. 따라서, 우엉에 대한 유효성분 및 유효성에 대하여 국내외에 인정을 받을 수 있어, 국내 농산물을 이용한 제품개발이 가속화 될 것으로 판단되며, 특히, 본 연구결과를 토대로 로션, 크림 등의 화장품 시생산을 완료하여 인체적용시험시 그 우수성을 확인하였으므로, 최근 급속하게 증가되고 있는 아토피 피부염에 대한 치료효율을 높여 사회적, 문화적으로도 경제적인 효과뿐 만 아니라 그 기대효과를 높일 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 본 연구결과를 토대로 학술적인 가치 뿐 만 아니라, 산업적인 면에서 국내외 화장품 산업에의 진출이 매우 용이할 것으로 판단된다.

SUMMARY

(영문요약문)

BACKGROUND:

Atopic dermatitis is a chronic, allergic inflammatory skin disease that is accompanied by pruritic chronic eczema and markedly increased levels of inflammatory cells and by markedly increased levels of inflammatory cells, including eosinophils, mast cells, and T cells. in endothelial cells. *Arctium lappa* L. is a popular edible vegetable cultivated in Asia.

METHODS:

This study examined the effect of ALBE on the release of β -hexosaminidase in antigen-stimulated-RBL-2H3 cells. We also evaluated the ConA-induced expression of IL-4, IL-5, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and nuclear factor (NF)- κ B using RT-PCR, western blotting, and ELISA in mouse splenocytes after ALBE treatment.

This study examined the effect of butanol extracts and compounds isolated from BuOH layers of *A. lappa* (ALBE) on the expression of adhesion molecule, ICAM-1 and the production of NO-iNOS induced by TNF- α in A549 endothelial cells. We also studied the effects of ALBE on the proliferation of keratinocyte. We observed significant inhibition of NO-iNOS production in dose-dependant manners and ALBE at 100 μ g/mL suppressed the expression of ICAM-1 in TNF- α -induced A549 cells.

RESULTS:

We observed significant inhibition of β -hexosaminidase release in RBL-2H3 cells and suppressed mRNA expression and protein secretion of IL-4 and IL-5 induced by ConA-treated primary murine splenocytes after ALBE treatment. Additionally, ALBE (100 μ g/mL) suppressed not only the transcriptional activation of NF- κ B, but

also the phosphorylation of MAPKs in ConA-treated primary splenocytes.

CONCLUSIONS:

These results suggest that ALBE inhibits the expression of IL-4 and IL-5 by down-regulating MAPKs and NF- κ B activation in ConA-treated splenocytes and supports the hypothesis that ALBE may have beneficial effects in the treatment of allergic diseases, including atopic dermatitis and ALBE has an anti-inflammatory effects for the treatment of atopic dermatitis.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	1
Chapter 2. Current Status on Domestic and Foreign Technology	4
Chapter 3. Experiment and Results	17
Chapter 4. Achievements of objects and contribution	86
Chapter 5. Future plan	88
Chapter 6. Information of Foreign	94
Chapter 7. References	95

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황	4
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	17
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	86
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	88
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	94
제 7 장	참고문헌	95

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 : 연구개발의 목적

- 최종 목표 : 농림식품자원인 우엉 추출물로부터 국내 유통 및 수출용 아토피 치료제 개발
- 안전성과 함께 아토피 질환 개선의 생리활성이 있는 유효성분 규명 (원료 표준화)
 - 최적추출공정에 대한 아토피 피부염 동물 모델을 대상으로 효능 평가 (전임상 평가)
 - 화장품임상시험센터를 통한 시제품 평가 (임상평가)
 - 식품, 화장품 set 개발에 따른 차별화 : 전임상 평가시 oral, subcutaneous 효능 확인
 - 수출 : 작용기전 규명을 통한 SCI논문 발표 등 마케팅 자료 보완 / 홍보

대상제품	우엉추출물 식의약소재, 우엉추출물 함유 아토피용 화장품
용도	급성항알러지 + 항염증 + 보습 기능의 아토피 치료용 제품 및 소재
기능	<ul style="list-style-type: none"> ● DNP-BSA 항원자극에 의한 β-hexosaminidase 분비억제 ● T세포 증식능, 비장세포증식능을 통한 면역세포의 증가 ● IL-4 mRNA 및 단백질의 분비억제조절 효과 ● NF-κB (p65)의 핵내 translocation에 대한 우엉추출물 및 성분의 억제조절 효과 ● MAPKs 활성화에 대한 우엉추출물 및 성분의 억제조절효과 ● TNF-α에 의한 염증반응에서의 ICAM-1 발현의 억제조절효과 ● TNF-α에 의한 염증반응에서의 NO 분비에 대한 억제조절효과 ● 피부각질형성세포 HaCaT의 세포증식능 증가 (피부재생)
특성	<ul style="list-style-type: none"> ● 우엉의 유효성분 규명 : 2,4-di-tert-butyl-phenol 및 oleamide ● 면역세포증가, 항염증 factor의 조절확인, 피부재생력, 보습력 확인 ● 전임상 유효성 (Systemic 및 Passive anaphylaxis억제) ● 인체적용시험 결과 효과 우수
기대효과	<ul style="list-style-type: none"> ● 공해, 병원성세균 등 알러지 유발물질에 의한 질환 예방 ● 무독성, 비자극 메커니즘에 의한 유아/어린이 아토피성 질환예방 ● 국내산 우엉의 우수성 확인 : 농가소득 증대 ● 아토피 치료용 화장품, 식품, 의약외품 등의 소재 개발로 기업매출 증대 ● SCI등 발표와 추후 특허출원을 통한 해외수출의 판로확대

제2절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 연구개발의 필요성

가. 원료적 측면 : 김밥등의 식재료로 사용되고 있는 안전성이 확보된 국내 우엉자원으로부터 아토피 치료효능 평가 및 유효성분을 규명하여 농가소득의 신소득작물의 창출

(1) 기존 우엉에 대한 연구는 건조 우엉뿌리 추출물을 함유하는 수렴화장료 조성물이며, 특히 우엉의 종자인 “우방자”위주의 연구가 진행된 바 있고, 한방에서는 우방자를 포함한 처방으로 알려진 치료

(2) 천연 허브 추출 복합물 또는 우방자 추출 복합물을 이용하여 아토피 피부염 완화, 아토피 피부염 및 수렴 화장료조성물 처방 분야에 치중되어 있으나, 본 연구과제에서는 선행연구로 부위별, 건조방식별로 우엉의 효능을 평가한 결과 생우엉 뿌리 추출물에서 우수한 효과를 보였기에, 본 연구팀은 생우엉 뿌리 단독 추출물 또는 파우더를 이용한 아토피 치료용으로 먹고 바르는 화장품 및 아토피 예방 식품개발 방향으로 연구를 추진

나. 기존연구(논문분석)측면 : 기존 우엉에 대한 논문은 우엉의 일반적인 성분 비교, 향균, 미백, 물질 분리 및 분석 등과 같은 연구가 진행. 본 연구팀이 신청한 과제인 우엉 추출물로부터 아토피 피부염 즉, 우엉 추출물의 피내, 경구투여 시 Compound 48/80에 의해 유발된 히스타민 유리억제, 비만세포 탈과립화 억제, Anaphylaxis 등과 관련되는 논문은 전무

다. 제품 및 시장분석 측면 : 국내 및 국외시장 아토피 치료제를 분석한 결과 다양한 제품들이 출시되고 있지만, 원료는 대부분 수입에 의존하고 있는 실정

(1) 또한 우엉 관련 국내외 화장품을 분석한 결과 우엉의 효능인 수렴, 미백, 보습 효과에 관한 제품들이 주류였고, 특히 본 연구팀의 원료와 달리 건조 우엉 뿌리, 우방자 추출물을 이용한 제품

(2) 따라서 본 연구팀은 상기와 달리 생우엉 뿌리 추출물로부터 아토피 관련 기전 연구, 효능 평가는 세포/동물/분자생물학적 방식으로 접근하여 아토피 치료제 및 먹고 바르는 아토피 화장품을 개발

(3) 국외제품으로, 이탈리아 유아용 제1의 브랜드인 “치코”, 영국 캐논사의 “아벤트”, 프랑스의 “머스텔라”, 로레알의 “비쉬베베”와 “딕사베베”, 에스테로더에서 “바비브라운 베이비”와 “오리진 베이비”, “니베아 베이비”, 일본의 “피죤” 등이 보습제의 기능으로서 판매되고 있으며, 아토피의 작용기전 및 유효성분을 대상으로 한 제품 취약

2. 연구개발의 범위

1. 주관기관 / 제1세부 과제 [세명대학교 자연약재과학과]

- 산지별, 건조방식별 우엉 효력평가
- 유효성분/지표성분 규명 : NMR 구조 분석 및 HPLC 분석 시스템 확립
 - 1) activity-guided fraction / isolation
 - 2) NMR구조 분석 및 유효성분, 지표성분에 대한 HPLC분석 조건 확립 / QC와 연계
- 식품, 화장품 전임상 유효성 평가 : 세포 및 동물 평가
 - 1) Oral treatment 평가
 - 2) Subcutaneous 평가
 - 3) p.o, s.c 평가
- 항알러지 및 아토피 화장품 임상평가 : 세명대학교 RIC 한방바이오임상센터와 연계
 - 1) 2차년도 화장품 예비 임상평가
 - 2) 3차년도 화장품 본 임상평가
- 임상 및 전임상 자료 통합 : 특허 및 국내외 논문 발표, 보고서 작성

2. 제 1 협동기관 [이수제약(주)부설연구소]

- 산지별, 건조방식별 우엉 확보 및 추출
- 유효성분/지표성분에 따른 최적추출공정개발 (Scale up)
 - 1) 유효성분의 극대화를 위하여 비건조 생우엉 사용 및 용매분획 후 용매완전 제거
 - 2) 생산성 확대방안 : 선 유효성분 규명 후, 대량추출시 제어
- 우엉 추출물 화장품, 의약품 개발
- 제품개발용 시제품 생산 : 소재 및 시제품(화장품)
- 화장품의 경우 시생산 완료 : 제형 개선 중
- 해외 거래선 확대 및 기존 거래선과의 공동 마케팅
- 기존 제품의 보습력 중심
→ 면역세포 탈과립화억제 + 보습 + 피부장벽 보호 + 2차감염 억제

3. 제 2 협동기관 [충북전통의약산업센터]

- 시제품용 원료 생산 : 대량 추출기, 동결건조기 등 장비 지원
- QC 조건 확립 : HPLC, Prep LC 등 장비 지원 및 QC 조건 확립
- 제제/제형개발

4. 제 3 협동기관 [강원대학교 생약자원개발학과]

- 인체유래 비만세포로부터 IgE 억제 평가
- 작용기전의 차별화
 - 1) IgE의 과잉생산에 관여하는 IL-4, IL-5, TNF- α 등의 유전자 발현 연구
 - 2) IgE의 생산 억제조절이 가능한 우엉추출물의 작용 단계 규명
(RBL-2H3 mast cell과 RAW 264.7 murine macrophage cells를 이용)
 - 3) 비만세포의 IgE 결합수용체 Fc ϵ RI의 발현 조절을 규명하여 IgE의 생산조절과 무관하게 IgE-Fc ϵ R1 결합을 제어하여 활성을 제어하는 단계 규명
 - 4) Atopy와 같은 만성염증과 조직손상을 제어할 수 있는 우엉추출물의 항염증기전 규명 (IL-1, IL-6, TNF- α , iNOS, COX-2 등)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내외 기술개발현황

1. 국내의 아토피 관련 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
경기의약연구센터	일본 동북대와 공동연구, 함박꽃나무로부터 파테놀라이드를 분리하여 비만세포 탈과립화 억제 규명	특허출원
경기의약연구센터 (주)항선제약	숙지황, 산약, 산수유, 백복령, 목단피, 택사, 오미자, 사인, 진피, 황정을 배합하여 구성된 한방처방으로 한의원에서 임상에서 효과	특허출원 및 각 단일 한약재에 대한 비만세포 탈과립화 억제 비교 및 전체 처방에 대한 동물시험 효력 검증, 본과제를 통한 제품개발 예정
일본, 후지사	타크로무스의 면역조절 작용규명	국내, 동아시아 수입, 병원판매 및 20여국 수출
네오팜	유사세라마이드 피부보습 효과 규명	동화제약에서 아토피으로 약국 및 인터넷 시판
바이오스펙트럼	10여가지 생약에 대한 항균, 홍반억제	녹십자 PBM기술이전
일본, 사토사	생약과 양약의 복합처방 항히스타민제	중외제약에서 수입 판매
스위스, 노바티스	ascomycin유도체, 사이토카인 방출억제 규명	전세계 약품으로 판매되나 매우 고가 (165\$/100g)
프랑스, 라보라토이레즈	알칸올아미드를 이용한 알레르기 유발 피부병상 치료 및 예방	국내 특허출원
개인	밤나무잎 분말가루	기능성식품으로 개발 중
(주)생그린	측백나무의 정유성분, 피부트리블 완화	기능성화장품으로 개발 중
(주)바이오씨스	EC SOD단백질, ROS 제거	웹타이드의약품 개발 중
파이토테크	백선피, 적작약, 지황, 형개, 감초 추출물	아토피치료제 PCT출원
미국, HGS사	Met-Ckb7개발, 알러지 매개억제 성분	알러지 예방의약품 개발 중
일본	NF-kB 결합 인공유전자 개발	임상진입
한독약품	달맞이꽃 종자유 (수입)	알러지 질환치료의약품 판매
서울대학교	뽕나무과 꾸지나무로부터 파피리플라보놀 A분리, 항균조성물	국내 특허출원
(주)펜제노믹스	혈청 IgE감소, Th2사이토카인 감소, 비만세포 히스타민 방출억제의 다래, 취다래, 개다래 추출물	미국 에피카스사에 210만불 기술이전 계약
대한바이오링크	한약재에서 추출한 항알러지 성분	개발 중

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
셀믹스	항알러지 효과를 갖는 흑미추출물	개발 중
LG 생활건강	탱자, 고삼 성분을 함유한 아토피 개선제	개발 중
보령메디앙스	보리추출물을 첨가한 아토피성 피부개선제	개발 중
아토피아연구소	천연원료를 이용한 피부 보호막기능 회복제	개발 중
일본, KINKI	헤스페리딘 함유 미성숙 감귤류 과실에 탄을 추출물	항알레르기제 개발 중
일본, POLA CHEM	계수나무, 형개, 방풍, 국화, 개구리밥, 순비기나무, 솔뿌리혹버섯, 저령, 골풀, 슬패랭이꽃, 실고사리, 작약, 복숭아나무, 울금, 왜당귀, 야화초, 말벌, 장수말벌, 복해마 추출물	아토피 피부염 치료제 개발 중
일본, KAO사	SCF결합저해, 감초, 루이보스, 아선약, 지치, 고추, 울금, 차, 정향, 동백 추출물	아토피 피부염 치료제 개발 중

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	<i>Arctium lappa</i> , burdock, ((Ethosome+ 화장품)*아토피)*우엉추출물

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		우엉 추출물을 이용한 아토피 치료제 개발	우엉추출물의 제제, 제형 개발
Keyword		<i>Arctium lappa</i>	((Ethosome+ 화장료)*아토피)*우엉 추출물
검색건수		33	8
유효특허건수		1	1
핵심특허 및 관련성	특허명	아토피성 피부염 관련 가려움증 완화 효과를 나타내는 화장료 조성물	특정 생약추출 혼합물을 함유하는 아토피 피부용 한방화장료 조성물
	보유국	한국	한국
	등록년도	2007. 05. 07	2006. 10. 02
	관련성(%)	10%	80%
	유사점	건조 우엉 추출물 (외 4종이용), TNF- α 생성 억제 효과 측정	아토피 화장 조성물
	차이점	본 연구팀은 비만세포 탈과립화 억제, IgE 억제, 히스타민 유리 억제, 생우엉 추출물만 이용	본 특허는 우방자를 이용했지만, 본 연구팀은 생우엉 뿌리추출물을 이용하여 ethosome 형태

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr), 한국과학기술정보연구원(www.kisti.re.kr), 하버드도서관(ecommons.med.harvard.edu)
검색기간	최근 5년간
검색범위	<i>Arctium lappa</i> , burdock, 우엉, compositae

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		우엉 추출물의 아토피 효과	우엉추출물의 제제, 제형 개발
Keyword		<i>Arctium lappa</i> , Burdock, <i>Arctium lappa</i> and anti-allergic effect and atopy, Anaphylaxis	Ethosome
검색건수		81	8
유효논문건수		1	5
핵심논문 및 관련성	논문명	Anaphylaxis due to burdock	<ul style="list-style-type: none"> o Formulation and Evaluation of Ethosomes for Transdermal Delivery o In vitro Percutaneous Permeation and Skin Accumulation of Finasteride using Vesicular Ethosomal carrier o Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy o Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: in vitro percutaneous permeation through human skin and in vivo anti-inflammatory activity on human volunteers o Ethosomes and liposomes as topical vehicles for azelaic acid: a preformulation study

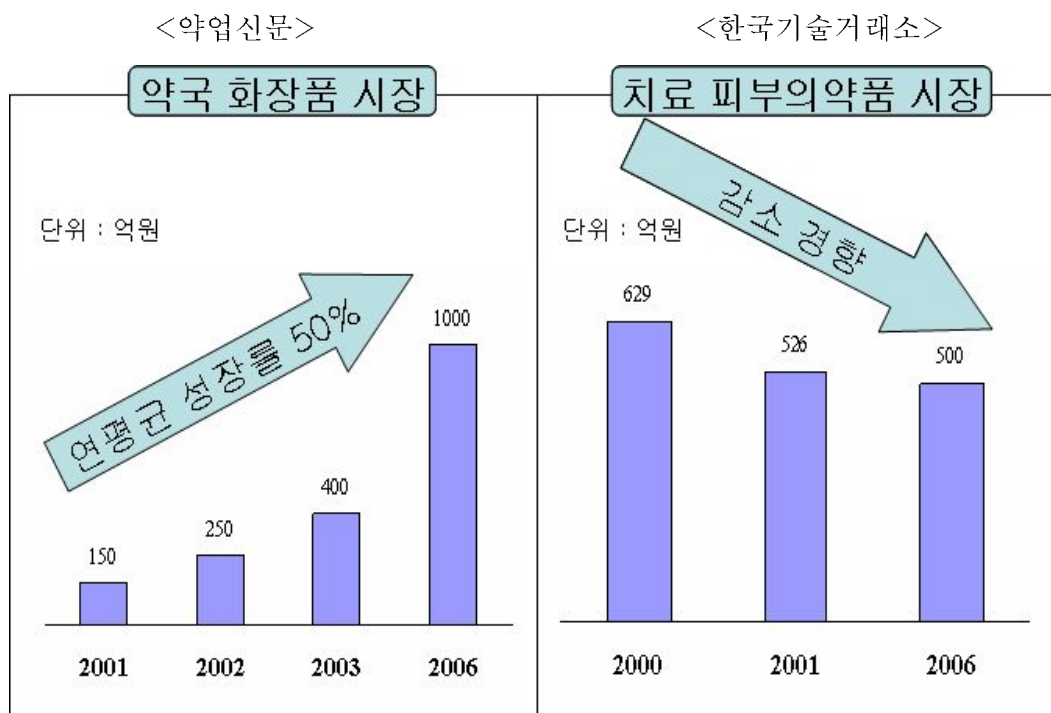
개발기술명		우엉 추출물의 아토피 효과	우엉추출물의 제제, 제형 개발
핵심논문 및 관련성	학술지명	<i>Inter. J. Derm.</i>	<i>AAPS Pharm. Sci. Tech.</i> <i>AAPS Pharm. Sci. Tech.</i> <i>Int J Pharm.</i> <i>J Control Release.</i> <i>J Cosmet Sci.</i>
	저 자	Yoshinori Sasaki, et al	Subheet Tain, et al Rao Y, et al Fang YP, et al Paolino D, et al
	게재년도	2003	2007, 2008, 2008, 2004, 2005
	관련성(%)	100%	100%
	유사점	본 연구팀은 anaphylaxis를 동물 모델에 한 결과 IgE 발현 억제 및 히스타민 분비 억제 결과와 일치하므로 우엉은 안전한 기능성 원료이다.	제제 및 제형 개발 연구
	차이점	본 논문은 boiled and raw burdock에 대한 anaphylaxis 임상시험 (skin prick test) 결과로 차후 임상시험에 중요한 데이터가 될 것으로 사료	본 논문을 참조하여 차별성을 두고자 함

4. 제품 및 시장분석

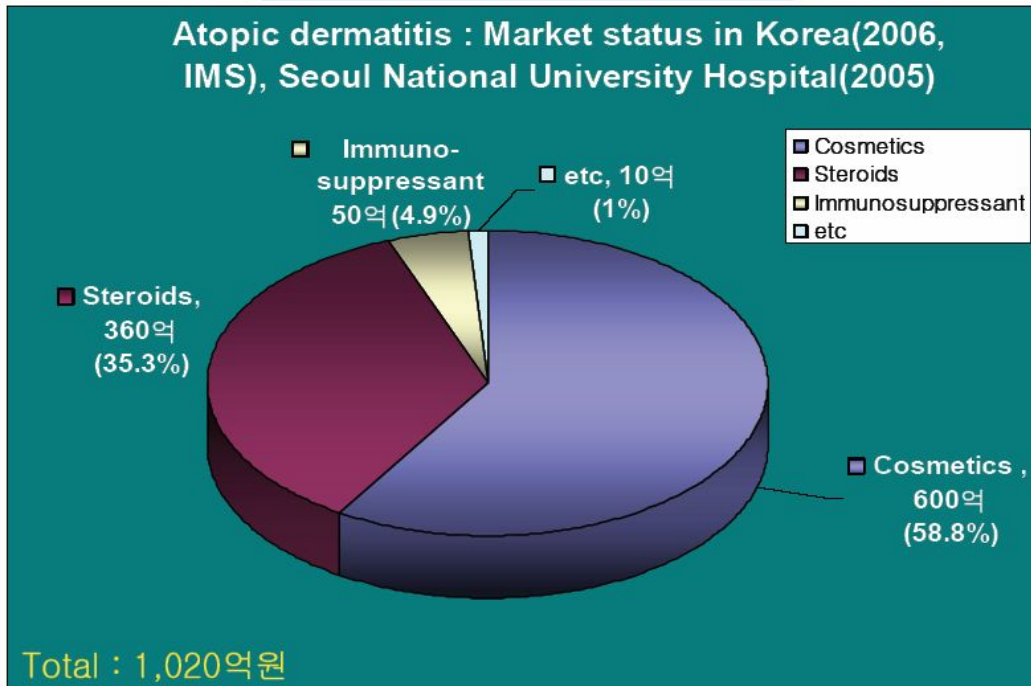
가. 국내 제품생산 및 시장현황

- (1) 최근 통계청 자료에 따르면 국내 유아 (0 ~ 4세) 6명 중 1꼴, 아토피 질환 관련 치료비는 1,700억원 (2003, 국민건강보험공단).
- (2) 우리나라에서도 인구의 10%, 소아 인구의 20%가 알레르기성 질환을 앓고 있음.
- (3) 환경오염과 주거 환경의 변화로 영유아 뿐 아니라 아토피 피부염으로 고생하는 인구 급증.
- (4) 기존 약국 유통 중심이었던 아토피 화장품이 화장품 유통의 중심이라 할 시판 전문점을 비롯해 대형 할인 라인으로까지 판매하면서 유통 라인이 점차 확대.

- (5) 지난 2000년부터 바이오벤처 기업들이 아토피용 화장품 연구개발 집중.
- (6) 국산 브랜드 뿐 아니라 고가의 수입 브랜드들까지 다양한 제품들이 최근 2 ~ 3년 사이에 출시.
- (7) 현재 국내에서 유통되고 있는 브랜드는 20여개.
- (8) 국내 아토피 시장규모는 2000년 100억원, 2004년 400억원 (약국 시장 300억원), 2010년 1,000억원 형성 (매년 15% 성장, www.biospectrum.co.kr, www.pharmstody.com)
- (9) 방문판매 경로 건강기능성식품 요구 순위로 1위 아토피 피부 개선 제품, 2위 다이어트 제품군 (태평양 설문 조사)



아토피치료제 국내시장 현황



나. 국내 제품생산 주요업체

(1) (주)네오팜

(가) 아토팜으로 2000년 12월 동화약품과 전략적 제휴 관계를 맺고 약국에 출시 이후 매년 50% 이상의 성장세를 보이며 약 30% 이상의 시장 점유, 현재는 자체 아토팜 쇼핑몰 운영 (www.atopalmb2b.co.kr, 가격대는 15,000 ~ 24,000원)

(나) 국내 뿐 아니라 영국 (약국, 홈쇼핑), 미국 (www.skinstore.com), 러시아, 중국, 호주 등지에 수출

(2) 보령제약

(가) 닥터 아토스는 국내 최초 아토피성 피부염 유아 전용 스킨케어

(나) 닥터 아토스는 약국, 유아용품 전문점, 백화점, 인터넷 쇼핑몰에서 판매

(다) 닥터 아토마일드는 대형할인마트, 슈퍼, 화장품 전문점, 인터넷 쇼핑몰에서 판매

(라) 주성분은 마치현

(3) 동성제약

(가) 아토클리어 시리즈는 치료용 의약품과 피부관리용 화장품을 동시에 출시

(나) 가격은 25,000원, 약국 유통 중심

(다) 주성분은 부작용이 적은 비스테로이드 제제인 부피사막

(라) 아토클리어 마일드 워싱젤은 누에고치의 실크 프로테인과 식물성 세라마이드, 보리 추출물 함유

(4) 바이오스펙트럼

(가) 피부의약 전문 바이오 벤처

(나) 노스테는 인공 방부제, 인공색소, 인공향 무첨가, 국제특허출원 물질인 BSASM

(다) 동백 아토 워시, 아토 리포솜, 아토 크림 3품목으로 구성 (가격은 20,000원 이하)

(라) ‘한살림’, ‘한겨레 초록마을’과 전략적 제휴를 맺고 ‘자연그대로’라는 브랜드로 이 노스테를 공급

(5) 두산바이오텍BU

(가) 성인용 아토피 브랜드 시스메틱, 유아용 아토피 브랜드 케어닉 아토타터 출시

(나) 주성분은 천연 에피더말-리피드 콤플렉스

(다) 가격은 22,000 ~ 67,000원

(라) 케어닉 아토타터 모이스춰라징 바디 워시, 더마 리페어링 로션, 더마 리페어링 크림으로 구성, 가격은 20,000 ~ 25,000원

(마) 화장품 전문점, 대형 할인마트

(6) 기타 브랜드 동향

(가) 유럽 아토피 화장품 판매 1위 제품인 아더마가 유한양행에 의해 약국에서 판매

(나) 김정문 알로에의 알로 아토피어 (www.atofree.co.kr), 남양 알로에의 아토타로에 (액티브 알로에 추출물 분말), 알로에마임의 아토타베라 (아토타베라), 애경의 아토타제닉 (세라마이드) 등이 방판 유통

(다) 한국치코화장품은 1999년 9월 초에 아토피 수퍼 센시티브 라인 출시 (바디 클렌저, 고보습 진정크림으로 구성, 가격은 18,000 ~ 22,000원)

(라) 스킨바이오가 한국백신과 공동 연구 : 아이조움 (소아과 병원에서 판매)

(마) 대표적 유아복 업체인 이에프 : 바이아토

(바) 롯데의 아토타, 바임래버러토리즈의 아토타스마일, 로레알코리아의 로슈-포제, 마인의 아토타플라야 등

(사) 씨에이팜의 아토피 질환 예방 및 개선 화장품인 아토타프라젠트라

(출처 : 더데일리코스메틱, www.dailycosmetic.com)

<주요 아토피 화장품 특징 & 유통 현황>

회사명	브랜드	제품특징	유통	비고
김정문알로에	알로 아토피어	무알콜, 무향, 무색소 처방	방판, 인터넷 쇼핑몰	
남양알로에	아토피알로에	액티브알로에 추출물분말 응용 피부트러블 개선	방판, 인터넷 쇼핑몰	
네오팜	아토피팜	KT마크 획득한 세라마이드 함유 MLE 제형	약국, 인터넷 쇼핑몰	
동성제약	아토피클리어	비스테로이드 제제인 부핵사막 주원료 로 안전하게 아토피성 피부염 증상 개선	약국	
두산바이오텍	케어닉 아토피닥터	천연 세라마이드와 스펅고리피드 고농도 함유	약국, 대형 할인마트, 화장품 전문점, 인터넷 쇼핑몰	
	시스메딕	피부 주요 구성 성분인 천연 에피더말- 리피드 콤플렉스 함유 건강 피부 실 현		
로레알코리아	라 로슈-포제	중양아프리카 토착 식물인 시어버터가 탁월한 피부 유연제 효능 발휘	병원	프랑스 수입
마이마이코리아	마이마이	식물성 스쿠알렌 등 천연원료 함유	약국, 인터넷 쇼핑몰	호주 수입
마인	아토피플라야	녹용, 홍삼추출물 등 각종 천연영양 성 분을 나노입자화해 피부 깊숙이 침투	백화점, 인터넷 쇼핑 몰	
바이오스펙트럼	틸스	23종 천연식물 원료 함유 나노리포좀 기술로 만든 저자극 고보습제품	약국, 인터넷 쇼핑몰	
	노스텍	천연방부제 네츄로틱스 적용	인터넷 쇼핑몰	
바임레버러토리즈	아토피스마일	무공화, 목피 추출물 등 27종 천연식 물 성분 함유	약국, 인터넷 쇼핑몰	
보령메디앙스	닥터 아토피스	보리추출물 등 무향료, 무색소의 저자 극성 원료 사용	약국, 백화점, 유아용 품전문매장, 인터넷 쇼핑몰	
	닥터 아토피마일드	마치현은 피부트러블에 큰 효과 해양심층수는 보습력 강화	대형 할인마트, 슈퍼, 화장품 전문점, 인터넷 쇼핑몰	
스킨바이오	아이조움	천연보습성분 강화 가려움증 신속 해소	병원, 인터넷 쇼핑몰	
아토피코코리아	아토피코	사람 피지 유사성분 다량 함유한 정제 동백유 100% 사용	약국, 유아용품전문 매장, 인터넷 쇼핑몰	일본 수입
아퓨아코리아	아퓨아	죽향과 고품질 천연성분 배합	인터넷 쇼핑몰	일본 수입
이에프이	바이아토피	한방성분과 특허신물질 함유	유아용품전문매장, 인터넷 쇼핑몰	

회사명	브랜드	제품특징	유통	비고
알로에마임	아토베라	알로에베라 성분과 16가지 천연식물 치료 성분 함유	방관	
애경	아토제닉	5가지 한방성분과 MLE 신기술 적용	방관	
유리아췌화장 품	유리아췌	필수 지방산인 감마 리놀레닉 애시드다량 함유 무향료, 무방부제 피부 자극 최소화	병원, 약국, 인터넷 쇼핑몰	프랑스 수입
유한양행	아더마	감마리놀렌산 결핍 보충 필수 지방산 과 귀리 추출물인 레알베 모트 함유	약국, 인터넷 쇼핑몰	프랑스 수입
	듀크레이(액피 양 라췌)	수분방출 롱라스팅 딜리버리 시스템에 의해 글리세린이 하루종일 촉촉한 피부 지속	약국, 유아용품전문 매장, 화장품 전문점, 인터넷 쇼핑몰	프랑스 수입
한국치코화장 품	아토피 수퍼 센시티브	무방부제, 무색, 무계면활성제 무향료 저자극 제품	약국, 유아용품전문 매장, 화장품, 백화 점, 인터넷 쇼핑몰	이탈리아 수입
롯데	아토마	천연유래 각질세포간 지질을 무계면활 성제 시스템으로 안정화한 생체 적합성 처방	약국, 인터넷 쇼핑몰	

출처 : www.skincure.co.kr

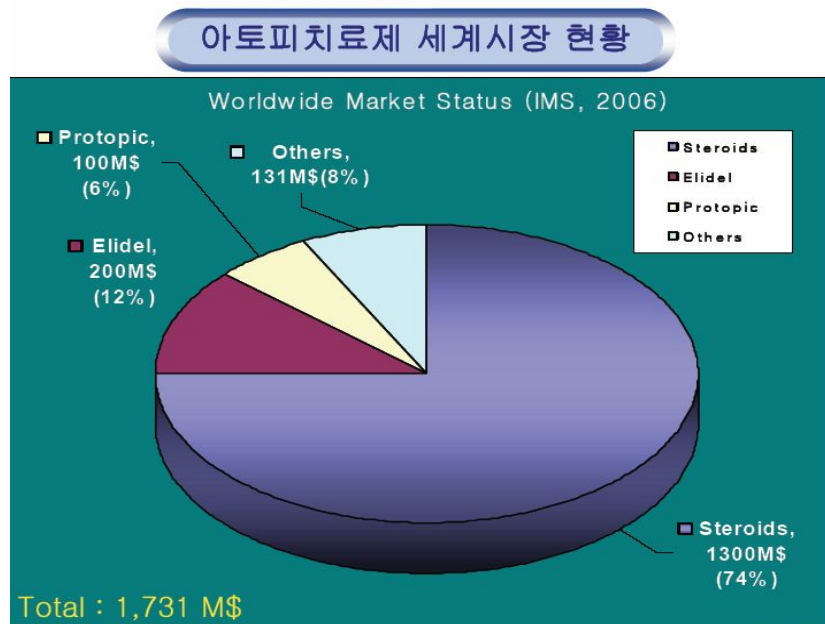
<국내외 우엉 추출물 화장품 관련 업체>

회사명	브랜드	제품특징	제품	비고
Jprima laboratories Inc	[숲에서] 네이처 앤 포레스트 크림	보습효과 수소화 야채오일, 우엉뿌리 추출물, 홍화씨 오일, 알로에 베라 추출물 등		미국 (Jprima laboratories Inc)에서 수입 www.citylife.co.kr (쇼핑전문사이트) 가격 : 38,000원 (주)숲에서 수입 국내 판매
엘보라이오	로즈마리 페이스 크림	복합성, 지성피부용 로즈마리, 우엉 추출물		이태리, 엘보라이오 가격 : 32,000원 용량 : 30mL
	우엉 스펀스 바	복합성, 지성피부용 비누 윗점오일, 우엉추출물		용량 : 100g 가격 : 12,000원
코리아나	초록색 엔시아	수렴효과, 보습 효과 오메가, 우엉추출물		파우더러 토너 (180mL) + 포어 컨트롤 에멀전 (130mL) 가격 : 32,000원
Korea Medical Nu. Ltd.	소프트치	보습효과 우엉뿌리, 레몬, 호프, 성 요한 동백나무, 실비아, 금송화, 비누풀 추출물 등		수분크림 (100mL) + 토너 (120mL) 가격 : 51,300원
LUI VILLE	바이오케어 옴프 알로에	세안용 젤 (No-Soap) 알로에잎, 파파야잎, 우엉뿌리, 아리카국화꽃 추출물 등		이태리 용량 : 200mL 가격 : 34,000원

회사명	브랜드	제품특징	제품	비고
한독화장품	달란트 내추럴 크림	피부 탄력 및 보습 주성분 : 코엔자임 Q10, NGA 보조성분 : 치마버섯추출물, 콜라겐, 우영, 박합, 산호 추출물 등		용량 : 50g 가격 : 35,000원
폐기세지	무쓰데미끼앙	폼 크렌징 우영, 붓꽃, 수레국화 추출물		프랑스 용량 : 170mL 가격 : 35,000원
(주)에스엔피 바이오메티컬	SNP 고드름팩	여드름과 피부 트러블 벤토나이트, 녹차, 화이트윌로 껍질, 우영 추출물 등		용량 : 25mL 가격 : 9,000원
나노팜	베리어블록 로션	가려움증 완화 및 보습 강화된 아토피성 피부용 로션 감마리놀렌산, 감마오리자놀, 우영추출물, 비타민 C와 E		용량 : 100mL 가격 : 35,000원 약국화장품
(주)LG생활건강	비욘드 아토티어웨이	피부보습, 아토피와 같은 민감성 피부 우방자, 지실 (탱자) 추출물		Bath & Body 케어 전문브랜드 바디샤워 : 300mL, 15,000원 바디에멀전 : 195mL, 18,000원 바디크림 : 150mL, 21,000원
(주)푸른친구들	피부와 건강	보습, 피부 자극 완화 오미자, 엉겅퀴, 신이와, 우영, 울금, 울무, 녹차, 당근, 백합, 알로에추출물 등		특허출원복합물질 (10-2004-97605)함유 가격 : 19,000원 인터넷 쇼핑물

다. 국외 제품생산 및 시장현황

- (1) 현재 전 세계 화장품시장은 약 600억불 정도, 그 중 기능성화장품 시장은 약 140 ~ 200억불 (매년 8 ~ 12% 성장)
- (2) 미국의 기능성화장품 시장은 약 50 ~ 60억불, 유럽 시장은 30 ~ 50억불, 일본의 경우 60 ~ 80억불 (출처 : Food Science and Industry, Vol 40, No. 4)
- (3) 미국의 경우 1990년대에 감소추세였다가 다시 증가 추세
- (4) 2001년 3.8% 증가하여 410.1백만불로 증대 (출처 : 보건산업기술동향, 2005)



라. 국외 주요제품

- (1) 이탈리아 유아용 제1의 브랜드인 "치코", 영국 캐논사의 "아벤트"
- (2) 프랑스의 "머스텔라", 로레알의 "비쉬베베"와 "딕사베베", 에스테로더에서 "바비브라운 베이비"와 "오리진 베이비", "니베아 베이비", 일본의 "피죤" 등

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 이론 및 실험적 접근방법

1. 이론적 배경

우엉 (*Arctium lappa L.*)은 아시아 지역을 포함한 여러 국가에서 오랫동안 식이로 사용되어 왔던 식물이다. 특히, 우엉의 뿌리부위는 식품으로 사용되어 왔으며, 종자 부위는 이뇨제 (diuretic), 해열제 (antipyretic), 해독제 (detoxifying agents)로 민간요법에서 사용되어 왔다 (Fuchigami *et al.*, 1990; Park *et al.*, 2007). 실험적 증거들에 의하면 우엉추출물에서 항염증작용 (Lin *et al.*, 1996; Kou *et al.*, 2011), 자유라디칼의 소거작용 (Chen *et al.*, 2004), 항산화작용 (Maruta *et al.*, 1995)이 보고되었고, 항돌연변이작용 (Morita *et al.*, 1985) 및 간독성보호작용 (Lin *et al.*, 2002)이 소수 보고되었다. 우엉의 주성분에 대한 연구는 우엉 과실부위에서 분리된 리그난 성분의 arctigenin과 arctiin의 효능이 보고되어 있다. Arctigenin은 동물세포에서 열충격반응 (heat shock response)의 억제 (Ishihara *et al.*, 2006), 항암효과가 보고되었고 (Jeong *et al.*, 2011), arctiin은 쥐의 사구체염에 대한 회복 효과 (Wu *et al.*, 2009)와 cyclin D1을 억제하여 암세포 증식을 저해하는 항암효과가 보고되었다 (Matsuzaki *et al.*, 2008). 이와 같이 우엉추출물과 그 주요 성분들의 효능 연구가 점차 진행되고 있지만, 항알러지 및 항아토피를 유발하는데 관련된 항염증 작용에 대한 기전 연구가 아직 충분히 보고되지 않았다.

최근 염증반응에 대한 연구는 분자수준에서 활발히 이루어졌다. 이러한 연구결과로 열 (heat), 홍반 (redness), 부종 (swelling) 등 3가지 증상으로 대표되었던 염증에 대한 정의가 염증을 일으키는 다양한 면역세포들과 이들이 분비하는 염증매개인자들 그리고 염증매개인자들에 의한 세포내 신호전달체계 등으로 더욱 구체화되었다. 염증반응은 손상된 조직으로 면역세포가 이동 (migration)하면서 유발되는데, 이러한 세포이동과정에 있어서 가장 중요한 역할을 하는 것이 세포부착분자 (cell adhesion molecule)의 발현이다. 염증반응에는 세포부착분자의 발현 외에도 화학주성을 유도하는 케모카인 (chemokine)과 다양한 염증매개요소들이 복합적으로 연관되어 있지만, 세포부착분자 발현을 조절하는 항염증치료제 개발에 대한 연구는 면역세포들의 이동을 억제함으로써 과도한 염증반응에 의한 조직손상을 막을 수 있고, 염증반응의 초기단계를 차단할 수 있어 강력한 치료제 개발의 타겟점으로 이용되고 있다. 염증 반응의 과정에서는 크게 ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular CAM-1), E-selectin의 세포부착분자가 대표적으로 연구되고 있는데, 이 중 ICAM-1은 염증 유발의 가장 강력한 단계로 인식되고 있다 (Xu and Li, 2009).

염증반응과 매우 연관성이 있는 알러지 및 아토피 질환은 최근 산업화, 도시화의 심화로 변화된 주거환경, 식생활의 변화, 유전적인 영향, 환경오염에 의해 발생하는 화학적, 생물학적 유해인자들에 대한 노출에 의해 유년기를 포함한 다양한 연령층에서의 발생이 크게 증가하고 있다 (Heo *et al.*, 2008). 이는 인체가 무해한 외부환경에 대해서도 민감한 반응을 보이며, 지속적으로 천식이나 비염과 같은 호흡기계뿐만 아니라 만성 피부염증 즉 아토피 질환 등의 피부계 증상 등으로 일상생활은 물론 정서적인 면에도 악영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Lebovidge *et al.*, 2009; Fukamizu *et al.*, 2009). 최근 2011년 본 연구팀에서는 우엉추출물이 알러지 유발에 대한 IL-4, IL-5 cytokine의 생성을 억제하며 그 기전이 NF- κ B 및 MAPKs 신호전달기전을 경유한다는 결과를 발표한 바 있다 (Sohn *et al.*, 2011). 이에 본 연구에서는 우엉추출물이 만성염증으로 알려진 아토피 질환에 적용할 수 있는 가능성을 확인하고자, 내인성 염증자극물질인 TNF- α 에 의해 유도되는 염증반응에서 면역세포와의 상호작용으로 알려진 상피세포의 ICAM-1의 발현조절과 NO-iNOS의 유도 조절능력을 연구하고 피부세포인 keratinocyte에 대한 세포증식조절을 연구함으로써 우엉추출물이 만성 염증으로 알려진 아토피 질환의 사용에 필요한 기초 자료를 제공하고 자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 세포주 및 재료

인간폐상피세포 A549 (human lung adenocarcinoma epithelial cell line) 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)에서 구입하였고 10% FBS, 2% penicillin-streptomycin (penicillin 10,000 unit/mL, streptomycin 10,000 μ g/mL)을 첨가한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (GIBCO BRL, Grand Island, NY) 성장배지에서, HaCaT (human immortalized keratinocyte) 세포는 DMEM, 10% FBS, 2% penicillin-streptomycin에 2 mM L-glutamine를 첨가한 성장배지에 부착 배양하였으며, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건을 유지하였다.

나. 우엉추출물의 제조

대한민국 충청북도에서 재배한 우엉 (*Arctium lappa L.*)의 뿌리 부위를 수확, 수세 및 정선 후 생우엉 상태의 뿌리 1 kg을 30% 에탄올로 환류추출 (10 L, 40 $^{\circ}$ C, 24 h, 2회) 후, 추출액을 40 $^{\circ}$ C에서 감압농축하여 건조분말 88.8 g을 수득하였다. 건조분말 50 g을 1 L 물로 재용해시키고, 동량 부피의 *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc 및 *n*-BuOH 용매로 분획하여 *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH, 및 H₂O층을 얻었다. 이와 같은 분획물 중에서 본

연구진의 선행연구 결과, *n*-BuOH층이 비만세포의 알러지 반응에 의한 β -hexosaminidase 분비를 가장 우수하게 억제시켰으므로 본 연구의 알러지 및 아토피에 대한 항염증 효과 또한 *n*-BuOH층을 이용하였다 (Sohn *et al.*, 2011). 본 연구에 사용된 *n*-BuOH층의 분획물은 22.0 g이 얻어졌으며, 실험에 사용된 *n*-BuOH층을 *A. lappa* butanolic extract (ALBE)라고 명명하였다.

다. ICAM-1의 mRNA의 측정

TNF- α 를 이용하여 A549 세포의 염증 환경을 만든 후, ALBE를 24시간 처리한 실험군과 ALBE를 처리하지 않은 대조군을 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA)를 이용하여 total RNA를 세포로부터 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 분리된 total RNA를 정량한 뒤, 다음과 같은 ICAM-1 (sense: 5'-CTGCTGGGAATTTTCTGGCCAC-3', antisense: 5'-CTATGGCAACGACTCCTTCTCG-3')의 primer를 이용하여 RT-PCR를 실시하였다. 먼저 1 μ g total RNA, 1 mM dNTP mix, 50 ng/ml Oligo(dT)12-18, DEPC-treated water를 10 μ L가 되도록 혼합하였으며 65°C에서 5분간 반응한 후 4°C에서 2분간 방치하였다. 여기에 2 μ L의 10X RT buffer, 4 μ L의 25 mM MgCl₂, 1 μ L의 100 mM DTT와 1 μ L의 RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor를 첨가하여 혼합한 후 42°C에서 2분간 반응시켰다. 그 다음 1 μ L (50 units)의 SuperScript™ II RT를 첨가한 후 42°C에서 50분간 추가 반응시킨 다음 70°C에서 15분간 방치하여 반응을 종료하였다. 여기에 1 μ L의 RNase H를 각 시료에 첨가하고 37°C에서 20분간 반응하여 template mRNA를 제거하였으며, 생성된 cDNA mixture의 2 μ L를 PCR 반응에 이용하였다. 이때 각각의 RT-PCR에서 동량의 RNA가 사용되었음을 확인하기 위하여 house keeping gene 인 β -actin에 대한 RT-PCR을 함께 진행하였다.

라. Nitric oxide (NO) 생성능

A549 세포(1×10^5 cell/mL)를 10% FBS, penicillin/streptomycin을 함유한 RPMI 1640에 부유한 후 세포 부유액을 96-well microplate에 100 μ L씩 부착시킨 후 ALBE를 농도별로 처리하였다. 24 시간 후에 배양 상등액 100 μ L를 취하여 96 microplate로 옮긴 후 100 μ L Griess Reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride /2.5% H₃PO₄)를 넣고 10분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader를 사용하여 흡광도 540 nm에서 측정하였다. Sodium nitrite 표준검량선으로부터 대식세포가 분비하는 nitric oxide (NO)를 계산하였다.

마. iNOS 단백질 생성 측정

TNF- α 를 이용하여 A549 세포의 염증 환경을 만든 후, ALBE를 24시간 처리한 실험군과 ALBE를 처리하지 않은 대조군을 각각 lysis하여 총단백질을 얻었다. 정량이 된 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel에 전기 영동한 후 PVDF membrane으로 Tank-type transfer unit을 이용하여 transfer 하였다. 단백질이 옮겨진 membrane은 1시간 동안 상온에서 blocking buffer (5% skim milk와 0.1% Tween20을 함유한 TBST용액)를 처리한 후 각 검증 단백질에 대한 1차 항체 (anti-iNOS)를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어 0.1% Tween20을 함유한 TBST용액으로 10분간 3회 이상 세척 후 2차 항체 (HRP-conjugated anti-IgG antibody)를 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 3회 이상 세척 후에 detection reagent (Amersham™)를 가한 후 Fuji Mmedical X-ray film (Biomax Light)에 노출시켜 각 단백질의 발현량을 확인하였다.

바. 각질형성세포주의 세포증식효과

HaCaT 각질형성세포주를 96-well plate에 1×10^5 /well이 되도록 분주하고 ALBE를 농도별로 처리한 후 각각 48 및 72시간 동안 배양한 후 MTT assay를 이용하여 세포 증식능을 측정하였다. 원하는 처리한 후에 MTT solution 2 mg/mL을 25 μ L씩 처리하고, 4시간 더 배양하여 formazan을 형성하도록 하였다. 상등액을 제거하여 살아있는 세포에서 생성된 formazan의 양을 DMSO로 녹여서 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사. 통계분석

실험 결과는 3회 반복하였으며, 가장 대표적인 실험결과를 평균 \pm 평균오차 (mean \pm S.E.M)로 나타내었고, 유의 수준은 #p<0.05, *p<0.05와 **p<0.01로 Student t'-test를 실시한 결과를 표시하였다.

제2절 연구내용 및 결과

1. 최적원료의 선별

가. 산지별, 원료별 우영추출물의 수율

(1) 산지별 우영추출물의 수율 및 항알러지 효과 분석

(가) 중국산, 충북, 충남, 전북, 전남지역의 우영을 구매하여, 음건 세절 후, 예비시험

결과 가장 우수한 활성을 나타낸 30% EtOH를 이용하여 추출

(나) 추출조건 : 30% EtOH, 상온추출, 24hr

(다) 수율비교 : 추출 후, 여과하여 감압농축 후 완전히 분말로 하여 추출수율 계산

(라) 이 중에서 Table 1과 같이 충북지역의 추출물의 수율이 가장 우수하여, 충북지역의 우영을 대상으로 연구 (충북지역외에서 충남지역의 수율도 유사하여 중부지방의 우영의 추출수율이 가장 높은 것으로 판단)

Table 1. Comparison of *Arctium lappa* extracts from 5 regions.

중국산	충북	충남	전북	전남
8.9%	15.3%	14.8%	12.5%	11.2%

나. 충북 건조우영의 에탄올 농도별 추출수율 및 항알러지 효과

(1) 에탄올 농도에 따른 수율 및 면역세포 탈과립화 억제 활성

(가) 산지별로 추출수율 및 면역세포 탈과립화 억제평가지 충북지역의 우영이 비교적 우수하였으며, EtOH를 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% 추출하였을 때 20-50%사이의 추출물이 가장 활성이 우수

Table 2. Condition of *Arctium lappa* extracts with ethanol.

구분	초기 중량 (g)	에탄올 용매 비	수득량 (g)	수율 (%)
30%	1,000	1:3	153	15.3
70%	500	1:3	52.5	10.5
95%	500	1:3	45	9.0

(2) 충북건조 우영추출물의 비만세포 탈과립화 억제도 평가 (%)

Table 3. Inhibition of degranulation in RBL-2H3 cell by the extract from *Arctium lappa*.

Sample	5 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$
95% EtOH	-7.1 \pm 2.42	10.4 \pm 2.88	15.5 \pm 1.47
70% EtOH	-3.9 \pm 3.01	2.5 \pm 1.71	7.9 \pm 2.28
30% EtOH	13.8 \pm 1.73	27.7 \pm 1.09	31.5 \pm 1.05

(가) 20-50% 추출물 중 30% 추출물이 수율이 가장 높았으며, 면역세포 억제활성 또한 비슷한 경향을 나타내어, 가장 생산성이 높은 30% EtOH추출물을 최적의 추출조건으로 설정

다. 원재료 건조에 따른 원료선별

(1) 건조우영과 생우영의 활성 및 수율 비교

(가) 건조우영과 생우영을 비교하였을 때, 생우영 추출물의 활성이 더욱 높게 나타났으며 (table 5), 생산량 또한 더욱우수하여 생산단가를 더욱 낮출 수 있을 것으로 예상

(나) 기존 연구의 내용 또한 건조우영을 대상으로 다양한 질환에 대한 연구결과를 보고한 바 있어, 생우영추출물이 생산단가 및 신규성 면에서 더욱 우수할 것으로 판단됨

Table 4. Extraction and yield of *Arctium lappa* extracts.

구분	초기 중량 (g)	EtOH 용매 비	수득량 (g)	비 고
건조우영	1,000	30%	140	고형분 80% (112g)
생우영	1,000	30%	410	고형분 40% (164g)

(다) 생우영과 건조우영을 동일한 조건에서 추출하였을 때 생우영 추출물이 건조우영 추출물에 비하여 3배 이상의 생산량이 높을 것으로 예측되었으며, 고형분 함량에서 생우영에 함유된 물을 제거하였을 때에도 건조우영 11.2%, 생우영 16.4%로 추출수율에서 매우 높은 차이가 나타남

Table 5. Inhibition of degranulation in RBL-2H3 cell by the extract from *Arctium lappa*.

Sample	5 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	125 $\mu\text{g/ml}$
건조우영	-	18.5 \pm 2.33	32.3 \pm 2.06
생우영	-	21.2 \pm 1.82	38.4 \pm 2.43

(라) 건조우영과 생우영을 대상으로 동일한 조건에서 추출한 결과 RBL-2H3세포의 탈과립화 억제도가 생우영 38.4, 건조우영 32.3으로 생우영 추출물의 효과가 더욱 우수함을 나타냄

2. 동물시험모델 평가

가. Systemic (SA) 및 Passive cutaneous anaphylaxis (PCA)

(1) 생우영 30% EtOH추출물의 SA평가

(가) 경구투여시의 histamine 분비에 의한 사망률 감소 (Table 6).

(나) 히스타민 분비 억제를 통한 항알러지, 아토피 효과 확인 (Fig. 1).

(다) 생우영 30% EtOH 추출물이 세포시험에서 가장 우수한 활성을 나타내었으므로, 생우영 추출물을 대상으로 동물시험 모델에서의 항알러지 효과 확인

(라) SA의 평가에서는 항알러지 모델 평가

(마) PCA를 통하여 IgE에 대한 억제평가를 통하여, 우영추출물이 항알러지 및 아토피의 면역 작용기전 중 현재까지 잘 알려지 IgE에 대한 억제 활성을 확인 함

Table 6. Effect of *Arctium lappa* on the compound 48/80 induced active systemic anaphylactic shock.

Dose (mg/kg)	Lethality (%)
0	100
25	100
50	88
100	63

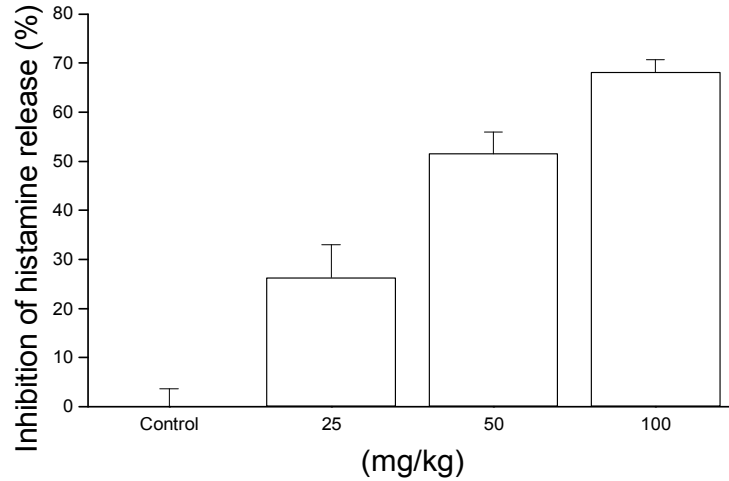


Fig. 1. Effect of *Arctium lappa* on compound 48/80-induced histamine release of mice

(2) 생우영 30% EtOH추출물의 PCA모델 평가

(가) 경구투여시의 histamine분비 억제를 SA에서 확인하였으며, 경구투여에 의한 상품화 (건강기능식품원료 및 의약소재)와 화장품 제제에 의한 상품화를 위하여 Subcutaneous에 의한 IgE의 억제활성을 확인하고 자 함

(나) 생우영 30% EtOH추출물을 대상으로 피하주사하여 화장품 개발시 100% 흡수율의 상태로한 모델에서 IgE억제 확인 (Fig. 2)

(다) 50mg/kg에서 약 50% inhibition effect를 나타내어 화장품으로서 비 제형 시 약 500 mg/kg에 해당하나, 피부용적률을 감안할 때 약 50 mg/cm²에서 효능이 있을 것으로 판단

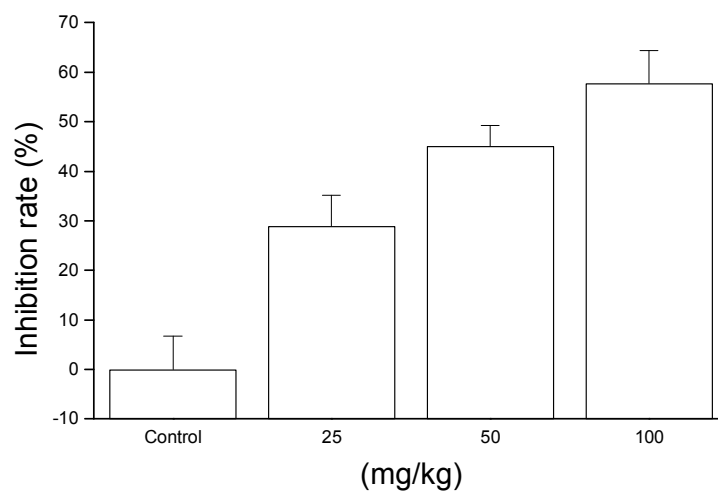


Fig. 2. Effect of *Arctium lappa* on PCA in mice

(3) 동물시험모델 : 피부보습력 평가

(가) 30% 에탄올 추출물에서 보습력이 가장 우수

(나) 토끼의 양쪽 옆구리를 clipper로 제모하고, 2% SLS이용하여 5분간 접촉 후 익일 다시 반복하여 피부 건조증을 유발

(다) 익일, 세척 후 2시간 방치(건조), Corneometer (CM 825, Germany)로 정전용량 (capacitance)를 측정, 이후 동일 부위에 시험물질 처리

(라) 1, 2, 5, 7일 째 상기방법을 반복수행하여 보습력 차이를 측정 (Table 7).

(마) 보습력 측정결과

- ① 세포시험 및 동물시험의 결과 면역세포 탈과립화 억제를 통한 항알러지 효력 및 IgE억제 활성에서 나타난 바와 같이, 30% EtOH 생우영 추출물의 경우, 가장 우수한 보습력이 나타냄
- ② 5일차까지는 30% EtOH와 70% 이상의 추출물에서 현저한 차이가 나타나나, 7일 차에는 30% EtOH와 70%EtOH간의 보습력의 차이가 크게 증가하지는 못함
- ③ 그러나, 최종적으로 30% EtOH의 추출물에서 효력이 증가하는 것으로 보아, 항아토피에서 가장 중요한 factor인 보습력과 함께 항알러지 관련 효능이 30% EtOH 추출물 (생우영)이 가장 우수할 것으로 판단되어, 추후의 연구는 모두 생우영 30% EtOH추출물에서 수행함

Table 7. Skin moisture content by extract from *Arctium lappa*.

Groups	1일	2일	5일	7일
Control	0.0 ± 10.40	-0.1 ± 8.72	0.1 ± 9.27	0.1 ± 3.16
30% EtOH	20.6 ± 8.85	20.2 ± 9.82	29.9 ± 18.41	32.1 ± 14.83
70% EtOH	4.7 ± 17.67	12.7 ± 11.42	19.2 ± 7.55	30.4 ± 10.12
95% EtOH	2.9 ± 11.28	10.4 ± 10.69	13.5 ± 11.02	17.8 ± 8.48

3. 유효성분 규명조건 확립

가. 생우영 95% EtOH 추출물에 대한 평가

초기 연구에서 라이브러리로부터 우영의 효능을 평가하여 왔으며, 사용된 라이브러리 추출물의 조건이 95% EtOH이었으므로, 초기연구단계에서 95% EtOH를 이용하여 유효

성분 규명조건을 확립함

(1) 95% EtOH에서의 활성 및 유효성분 규명 조건 검토

(가) MC 분획층에서 비만세포 탈과립화 억제율이 가장 우수 (Table 8).

(나) MC 분획물로부터 유효성분 분리/규명 중, 30% EtOH 분획물의 유효성분과 비교

Table 8. Inhibition of degranulation in RBL-2H3 cell by the solvent-fractions from *Arctium lappa* 95% EtOH extract with organic acid.

Fraction	Inhibition of degranulation (%)
Hexane	43.6 ± 3.61
MC	50.4 ± 1.77
EA	8.0 ± 3.93
BuOH	7.7 ± 1.93
Water	15.8 ± 3.61
Ketotifen	53.2 ± 6.77

(2) 30% EtOH에서의 활성 및 유효성분 규명 조건 검토

(가) 연구초반에는 95% EtOH의 활성으로 연구개시하였으나, 연구가 본격적으로 개시 됨에 따라(연구과제 수행시부터), 30% EtOH의 활성이 가장 우수하였으며, 물성 또한 95%에서는 점성이 강하였음

(나) 따라서, 30% EtOH 생우영 추출물로부터 성분연구를 수행한 결과, 95% EtOH에서는 BuOH분획이 아닌 MC층에서 효력이 가장 우수하였으나, 30% EtOH 추출물을 유기용매로 분획한 결과 BuOH층에서 가장 우수한 효능이 나타남

(다) 동결건조물 50 g을 증류수에 용해 후 유기용매를 순차적으로 분획한 결과 Hexane, MC, EtOAc 분획층에서는 추출수율이 매우 낮으며, Butanol과 물층에서 4.4 g, 33.5 g을 획득하여 비만세포 탈과립화 억제도를 조사한 결과 95% 에탄올 추출물과 달리 butanol층과 물층에서 63% 이상 비만세포 탈과립화 억제를 보였다 (Table 9).

(라) 따라서 *n*-BuOH 분획물과 물층으로부터 유효성분 분리를 위한 소분획을 실시하

였다.

Table 9. Inhibition of degranulation in RBL-2H3 cell by the solvent-fractions from *Arctium lappa* 30% EtOH extract with organic acid.

Solvent-fractions	Inhibition of degranulation (%)
BuOH	63.8 ± 0.62
Water	67.2 ± 7.55
Ketotifen	45.9 ± 22.27

(3) 생우엉 30% EtOH추출물로부터 유효성분의 분리

- (가) 생우엉으로부터 30% 에탄올에서 70 °C상에서 24시간 추출을 실시하여 여과 후 동결건조를 실시하여 본 실험 재료로 사용하였다.
- (나) 동결건조된 powder를 칭량하여 유기용매 분획을 실시하여 비만세포 탈과립화 억제율이 높은 butanol층을 대량 확보하여 HP-20 resin을 open column (H=13.5, Ø=2)에 충전 하여 10% 에탄올로 평형화 시킨 후 물질 분리에 사용하였다.
- (다) 동결건조된 우엉 추출물을 10% 에탄올에 용해하여 10%, 30%, 50%, 70%, 100% 에탄올 농도별로 130m씩 분취하여 동결건조를 실시한 결과 2.556 g, 112 mg, 78 mg, 30 mg, 20 mg씩 획득하였고, 각각의 samples에 대한 비만세포 탈과립화 억제율을 조사한 결과 10% 에탄올 분획물에서 가장 우수하였다 (Table 10).

Table 10. Separation of *Arctium lappa* extract on HP-20 open chromatography.

	Inhibition of degranulation (%)
30% EtOH	51.7 ± 1.68
HP-20-10%	53.9 ± 0.92
HP-20-30%	49.8 ± 0.74
HP-20-50%	28.4 ± 2.23
HP-20-70%	26.9 ± 3.12
HP-20-100%	4.88 ± 2.86
Ketotifen	50.0 ± 0.59

(라) HP-20에서 분리한 10% 에탄올 분획물로부터 1st silica gel open column은 10% 에탄올 분획물을 20% MeOH에 용해하여 20%, 40%, 100% MeOH 농도별로 3개의 분획물을 각기 SAI-1 (577 mg), SAI-2 (90 mg), SAI-3 (74 mg)을 획득하여 비만세포 탈과립화 억제율을 조사한 결과 SAI-2에서 가장 우수하였다 (Table 11).

Table 11. Inhibition of degranulation in RBL-2H3 cell by the separation from *Arctium lappa* with silica gel open chromatography.

	Inhibition of degranulation (%)
SAI-1	-13.4 ± 5.17
SAI-2	61.2 ± 3.65
SAI-3	50.1 ± 4.96
Ketotifen	55.9 ± 4.96

(마) 상기 결과에서 가장 우수한 SAI-2 (90 mg)를 20% MeOH에 용해하여 40% MeOH을 사용하여 2nd silica gel open column을 실시한 결과 6개의 분획물로부터 비만세포 탈과립화 억제율을 조사한 결과 SAI-2-3이 가장 우수하였다 (Table 12).

Table 12. Inhibition of degranulation in RBL-2H3 cell by the SAI-2 with silica gel open chromatography.

Inhibition of degranulation (%)	
SAI-2	54.2 ± 2.05
SAI-2-1	43.6 ± 6.08
SAI-2-2	50.4 ± 4.95
SAI-2-3	54.0 ± 1.02
SAI-2-4	49.0 ± 3.52
SAI-2-5	52.7 ± 0.21
SAI-2-6	53.8 ± 1.08
Ketotifen	50.5 ± 0.64

(바) 상기 결과에서 우수한 SAI-3 (74 mg)를 20% MeOH에 용해하여 100% MeOH을 사용하여 2nd silica gel open column을 실시한 결과 5개의 분획물로부터 비만세포 탈과립화 억제율을 조사한 결과 SAI-3-3이 가장 우수하였다 (Table 13).

Table 13. Inhibition of degranulation in RBL-2H3 cell by the subfraction from SAI-3 with silica gel open chromatography.

Inhibition of degranulation (%)	
SAI-3	54.1 ± 0.76
SAI-3-1	31.7 ± 3.70
SAI-3-2	33.9 ± 2.50
SAI-3-3	54.2 ± 2.05
SAI-3-4	43.6 ± 6.08
SAI-3-5	50.4 ± 0.64
Ketotifen	50.5 ± 0.64

4. 유효성분의 구조분석

가. 유효성분의 순수분리

(1) 상기 결과에서 비만세포 탈과립화 억제율이 가장 우수한 SAI-3-3에서 HPLC을 이용하여 4개의 물질을 분리하여 비만세포 탈과립화 억제율을 조사 한 결과 SAI-3-3-2 compound (60.2 ± 1.50)가 양성대조군인 Ketotifen (50.5 ± 0.64)보다 비만세포 탈과립화 억제율이 우수하였다. 따라서 SAI-3-3-2 compound를 확보하여 TLC plate와 HPLC을 이용하여 SAI-3-3-2가 순수한 물질임을 확인하였다 (Fig. 3-5, Table 14).

(2) SAI-3-3-2에 대한 구조분석은 NMR 분석을 이용하여 proton분석 (Fig. 6).

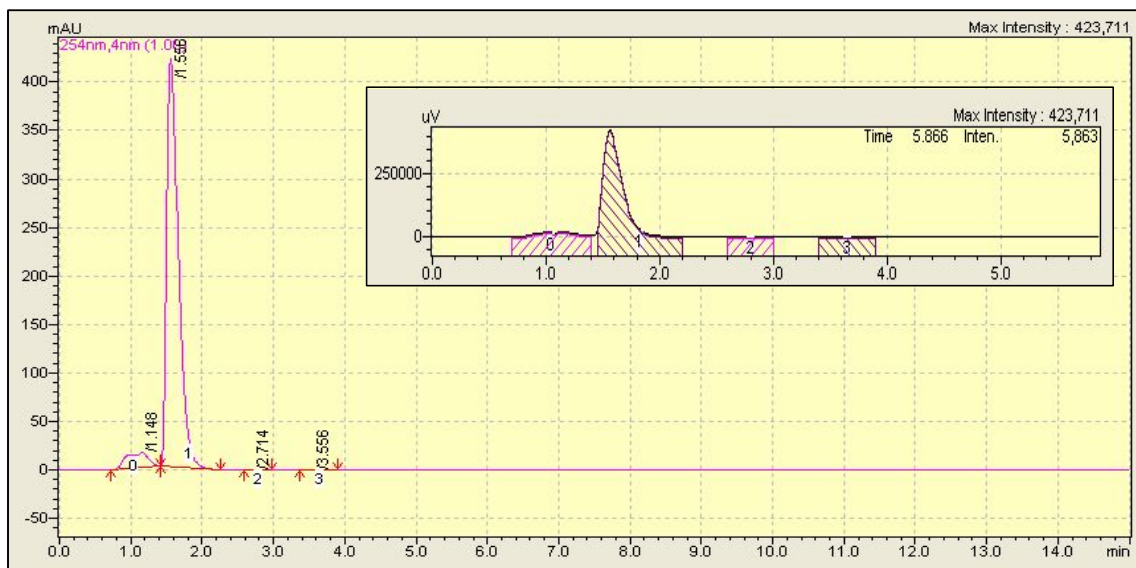


Fig. 3. The subfraction of SAI-3-3 by using HPLC.

Table 14. Inhibition of degranulation in RBL-2H3 cell by the SAI-3-3 with HPLC chromatography.

	Inhibition of degranulation (%)
SAI-3-3	54.1 ± 0.76
SAI-3-3-1	31.7 ± 3.70
SAI-3-3-2	60.2 ± 1.50
SAI-3-3-3	43.5 ± 2.05
SAI-3-3-4	43.6 ± 5.19
Ketotifen	50.5 ± 0.64

나. 유효성분의 분석 (QC조건 연계)

(1) 유효성분의 HPLC분석

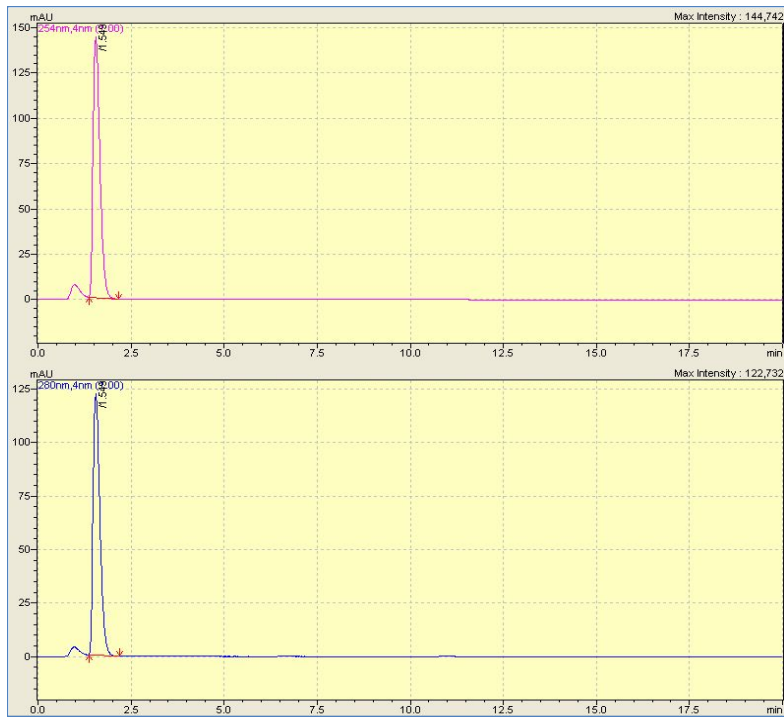


Fig. 4. The HPLC pattern of SAI-3-3-2 fraction.

(2) 원료기시범-TLC

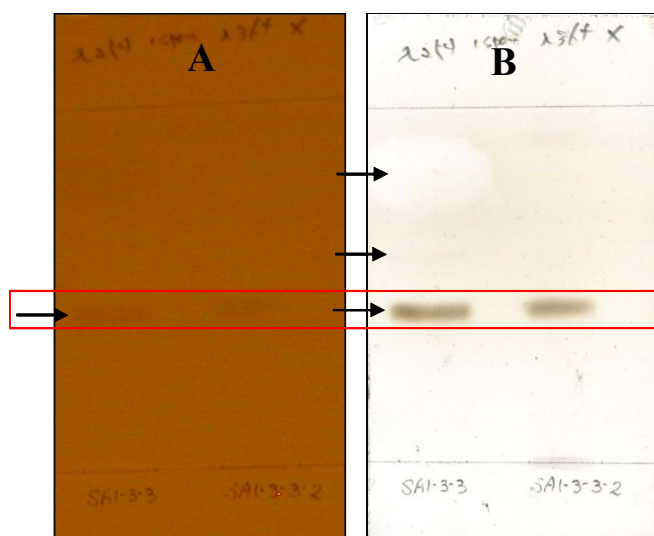


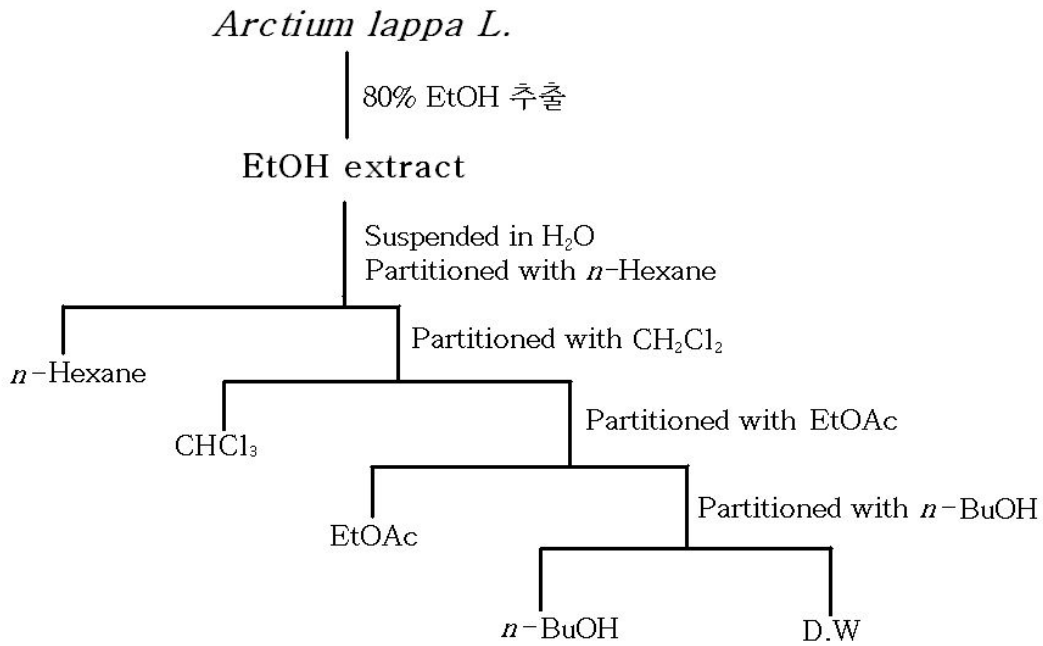
Fig. 5. The TLC pattern of SAI-3-3 and SAI-3-3-2 fraction by using RP-Silica gel 60F₂₅₄. The develop was 100% MeOH and coloring reagent 5% H₂SO₄. A : 254nm, B : 5% H₂SO₄

(가) 유효성분이 UV에서 형성되며 또한 황산에서 갈색을 나타내어 NMR 및 기존 성분연구를 비교하여, 유효성분을 확인하는데 이용하며, 또한 향후 원료 기시범에 이용

(3) 유효성분의 분리

(가) 추출 및 분획 조건

우영시료를 분쇄한 후 80% EtOH를 첨가하여 상온(실온)에서 교반기를 이용하여 24 시간 동안 교반하여 3회 반복 추출하였다. 우영 80% EtOH 추출액은 감압회전 농축기를 사용하여 용매를 제거시킨 후 얻어진 추출물을 초저온저장고에서 동결시킨 후 동결건조기를 사용하여 잔류용매를 제거 하였다. 용매를 제거한 우영추출물은 3차 증류수에 현탁 시킨 후 계통학적 방법에 따라 *n*-Hexane, CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH순으로 분획 하였다 (Scheme 1).

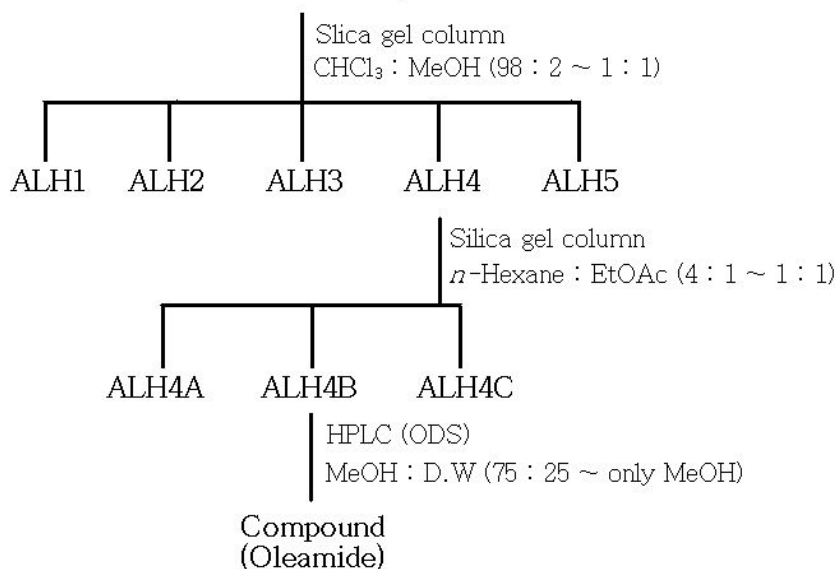


Scheme 1. Extraction and solvent partitions from *Arctium lappa L.*

(나) 유효성분의 분리 및 정제

용매분획한 우영의 *n*-Hexane layer를 open column에 silica gel을 충전 시킨다음 전개용매 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH}$ (98:2 - 1:1)를 전개하여 ALH1-5의 5개의 분획으로 나눈 뒤 이중 4번째 분획인 ALH4를 다시 silica gel이 충전된 open column에 전개용매로 *n*-Hexane : EtOAc (4:1 - 1:1)를 전개하여 ALH4A-C의 3개의 소분획으로 분획하였다. 소분획 ALH4B는 HPLC (ODS column) system에서 이동상 (75%MeOH - only MeOH)을 전개하며 RI검출기를 사용하여 Compound를 정제하였다 (Scheme 2).

Arctium lappa L.
n-Hexane layer



Scheme 2. Isolation of compound from *Arctium lappa* L.

(다) 동정 및 확인시험

각종 chromatography 기법을 이용하여 분리 정제한 compound는 TLC와 발색시약에 의한 확인 시험을 실시하였으며, NMR과 GC-MS 이용하여 그 구조를 oleamide를 동정하였다 (Fig. 1).

① GC-MS를 사용한 oleamide의 분석

HPLC를 이용하여 분리 정제 한 compound 1mg을 1 ml의 MeOH에 녹인 후 이중 20 μ l를 표준액으로 사용하였고, n-Hexane추출물 10 mg을 10 ml에 녹인 후 이중 100 μ l를 검액으로 사용한 결과 동일한 compound를 확인 할 수 있었으며, GC-MS library search 결과 oleamide임을 확인 할 수 있었다.

② TLC 및 발색시약에 의한 확인시험

표준시약과 검액을 각각 20 μ l씩 silica gel TLC에 처리한 후에 TLC수조에서 전개용매 CHCl₃ : MeOH (10 : 1)를 이용하여 전개하여 R_f=0.4에서 oleamide을 확인 할 수 있었으며, Dragendorff's reagent 발색시약 발색 시 붉은색으로 발색되었다.

③ NMR에 의한 구조동정

¹H-NMR (500MHz, CDCl₃, δ), 5.40 (H \times 2, m, H-9, 10), 2.20 (2H, t, J=7.6 Hz, H-2), 1.98 (2H \times 2, each td, J=6.1Hz, H-8, 11), 1.61 (2H, q, J=7.1Hz, H-3), 1.30~1.25 (methylene-H), 0.85 (3H, t, J=6.8Hz, terminal methyl). ¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃, δ), 175.60 (C-1), 129.99, 129.77 (C-9 or 10), 35.91, 31.88, 29.74,

29.68, 29.50, 29.30, 29.22, 29.19, 29.09, 27.19, 27.14, 25.50, 22.66 (methylene), 14.10 (terminal methyl).

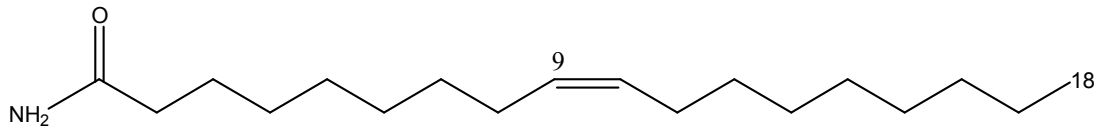


Figure 6. Structure of compound from *Arctium lappa* L.

(라) GC-MS를 통한 유효성분 확인 및 지표성분 설정

5. 유효성분의 대량확보 및 지표성분 분리·확인시험

가. MPLC 및 HPLC를 통한 분리 및 확인

(1) 생우엉으로부터 30% 에탄올에서 70 °C상에서 24시간 추출을 실시하여 여과 후 동결 건조를 실시하여 본 실험 재료로 사용하였다.

(2) 동결건조된 powder를 칭량하여 유기용매 분획을 실시하여 비만세포 탈과립화 억제율이 높은 n-Butanol층과 물층 27 g, 33.5 g를 대량 확보하여 HP-20 resin을 open column (H=13.5, Ø=2)에 충전하여 10% 에탄올로 평형화 시킨 후 물질 분리에 사용하였다.

(3) 탈과립화 활성이 우수한 분획물을 대량으로 확보하기 위하여 비만세포 탈과립화 억제도가 우수한 n-Butanol층을 이용하여 Table 10의 결과를 바탕으로 40%와 100% 에탄올 농도에서 2 L씩 broad하게 대량으로 분취하여 진공농축기를 이용하여 에탄올을 제거한 후 동결건조를 실시하여 23.4 g, 250 mg씩 각각의 동결건조물을 얻었다. 각각의 samples에 대한 비만세포 탈과립화 억제율을 조사한 결과 40% 에탄올 분획물 (HP-20-40%)에서 가장 우수하였다 (Table 15).

Table 15. Separation of *Arctium lappa* extract on HP-20 open chromatography.

	Inhibition of degranulation (%)
30% EtOH	48.3 ± 4.76
HP-20-40%	48.4 ± 5.11
HP-20-100%	33.0 ± 7.18
Ketotifen	53.2 ± 4.97

(4) 또한 탈과립화 억제도가 우수한 물층을 이용하여 상기와 같은 column 조건에서 0%, 20%, 40%, 60%와 100% 에탄올로 농도별로 1 L씩 분취하여 동결건조를 실시하여 각각의 samples에 대한 비만세포 탈과립화 억제율을 조사한 결과 40% 분획물 (WHP-20-40%)과 60% 분획물 (WHP-20-60%)에서 가장 우수하였다 (Table 16).

Table 16. Separation of *A. lappa* extract on HP-20 open chromatography.

	Inhibition of degranulation (%)
30% EtOH	48.3 ± 4.76
WHP-20-0%	34.4 ± 8.72
WHP-20-20%	27.1 ± 9.27
WHP-20-40%	53.4 ± 2.59
WHP-20-60%	54.1 ± 2.89
WHP-20-100%	47.0 ± 5.49
Ketotifen	53.2 ± 4.97

Table 17. Inhibition of degranulation in RBL-2H3 cell by the separation from *A. lappa* with silica gel open chromatography.

Inhibition of degranulation (%)	
30% EtOH	48.3 ± 4.76
SAI-1	50.4 ± 5.12
SAI-2	45.8 ± 9.27
SAI-3	48.4 ± 4.39
Ketotifen	53.2 ± 4.97

(5) *n*-Butanol층을 이용하여 HP-20에서 분리한 40% 에탄올 분획물로부터 silica gel open column을 20% MeOH로 평형화 시킨 후 유효성분 분리에 사용하였다. HP-20-40% 에탄올 분획물 3 g를 20% MeOH에 용해하여 20%, 40%, 100% MeOH 농도별로 3개의 분획물을 각기 SAI-1 (1,731 mg), SAI-2 (270 mg), SAI-3 (222 mg)을 획득하여 비만세포 탈과립화 억제율을 조사한 결과 SAI-1에서 가장 우수하였다 (Table 17).

(6) 상기 결과에서 가장 우수한 SAI-1 (1,731 mg)를 20% MeOH에 용해하여 20% MeOH을 사용하여 RP-C₁₈ open column을 실시한 결과 5개의 분획물을 분리하였고, 각각의 samples를 CAI-1, CAI-2, CAI-3, CAI-4, CAI-5로 명명하였다 ((Fig. 7 ~ 11).

(7) 5개의 분획물에 대하여 하기와 같은 조건에서 HPLC를 이용하여 분석한 결과 R.T 5 min, R.T 20 min, R.T 25 min에 main peak이 존재하였다 (Fig. 12). HPLC system을 이용하여 각 시간대에 존재하는 main peak을 순수 분리하여 HAI-1 (2 mg), HAI-2 (2 mg), HAI-3 (2 mg)으로 명명하였고, HPLC로 분석한 결과 R.T가 각각 7 min, 25 min, 그리고 40 min으로 밀린 양상을 확인 할 수 있었다 (Fig. 13).

(8) 또한 compounds에 대한 비만세포 탈과립화 억제율을 조사한 결과 3개의 compound에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다 (Table 19).

(9) 1차 년도에 분리한 single compound (SAI-3-3-2)와 비만세포 탈과립화 억제율을 비교한 결과 HAI-1, HAI-2 및 HAI-3 compound에서 우수한 활성을 보여 상기 3개의 compound에 대한 구조 분석을 실시하고 있다.

(10) 또한 물층으로부터 HP-20 open column을 이용하여 비만세포 탈과립화가 우수한 40% 에탄올 분획물 (WHP-20-40; Water layer로부터 HP-20 open column에서 40% 에탄올 분획물)로부터 MPLC system를 이용하여 3개의 fraction을 분리하여 각각 MAI-1

(5 mg), MAI-2 (2 mg), 그리고 MAI-3 (0.5 mg)로 명명하였다 (Fig. 14).

(11) MPLC는 RP-C₁₈ cartridge (RediSep[®] Rf, Teledyne, USA)을 이용하여 Table 21과 같은 조건에서 수행하였다. 소분획물에 대한 용출은 methanol gradient (0 - 100%)를 실시하여 40분 동안 분리하여 각각의 fractions에 대한 비만세포 탈과립화 억제율을 조사한 결과 MAI-1과 MAI-2에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였으며, MAI-3 경우 시료의 양이 적은 관계로 시험을 수행 하지 못했다. 따라서 상기 compounds (HAI-1, HAI-2, and HAI-3)와 비교 한 결과 HAI compounds 보다 상대적으로 낮은 비만세포 탈과립화 억제율을 보였다.

나. 유효성분, 지표성분 원료기시 및 확인시험 (HPLC 및 LC-MS/MS)

(1) 비만세포 탈과립화 억제율이 우수한 *n*-Butanol층으로부터 분리한 fraction에 대한 HPLC 분석 및 분리는 Table 18과 같은 조건에서 실시하였다.

(2) RP-C₁₈ open column을 이용하여 5개의 분획물에 대한 HPLC로 분석한 결과 CAI-3 fraction을 제외한 다른 fraction에서 유사한 pattern으로 peak들이 존재하였다.

(3) 따라서 R.T 5 - 6 min, R.T 20 - 21 min 그리고 R.T 25 - 26 min에 존재하는 peak을 순수 분리하여 동결건조를 실시한 결과 HAI-1 (3 mg), HAI-2 (2 mg), HAI-3 (2 mg)을 확보하여 GC/MS와 LC/MS/MS system을 이용하여 분석 하였다.

Table 18. The Condition of HPLC system.

Degasser	DGU-20A5 (Shimadzu, Japan)
Pump	LC-6AD (Shimadzu, Japan)
Module	CBM-20A (Shimadzu, Japan)
Auto sampler	SIL-10AF (Shimadzu, Japan)
PDA	SPD-M20A (Shimadzu, Japan)
Column	Eclipse Plus-C18 (Agilint , pore : 3.5 μ m) 3.0 \times 100 mm
Mobile phase	0-100% MeOH (gradient)
Injection volume	10 μ l
Flow rate	1 ml/min
Running time	Total 75 min (GD 60 min)

Table 19. Inhibition of degranulation in RBL-2H3 cell by the SAI-1 with HPLC system.

Samples	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Inhibition of degranulation (%)
HAI-1	100	48.2 \pm 1.43
	50	46.6 \pm 2.78
	25	42.0 \pm 1.95
	12.5	40.3 \pm 0.77
	6.25	33.0 \pm 2.94
HAI-2	100	42.6 \pm 0.63
	50	38.5 \pm 1.38
	25	37.2 \pm 1.97
	12.5	34.8 \pm 1.68
	6.25	32.3 \pm 1.47
HAI-3	100	47.5 \pm 2.02
	50	44.5 \pm 1.77
	25	43.2 \pm 1.32
	12.5	35.4 \pm 2.52
	6.25	35.4 \pm 1.36
Ketotifen	100	52.9 \pm 1.65

Table 20. Inhibition of degranulation in RBL-2H3 cell by the WHP-20-40 with MPLC system.

Samples	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Inhibition of degranulation (%)
MAI-1	100	40.0 \pm 2.69
	50	38.7 \pm 0.86
	25	34.4 \pm 2.62
	12.5	32.9 \pm 1.99
	6.25	30.7 \pm 3.56
MAI-2	100	36.7 \pm 2.18
	50	34.2 \pm 3.69
	25	33.3 \pm 1.98
	12.5	32.6 \pm 2.68
	6.25	29.7 \pm 3.35
Ketotifen	100	52.9 \pm 1.65

Table 21. The Condition of MPLC system.

Sample Name	WHP-20-40
RediSep Column	RP-C ₁₈ cartridge 80 g
Run length	40.1 min
Detection wavelength (red)	254 nm
Flow Rate	60 ml/min
Equilibration Volume	375.0 ml
Initial Waste	0.0 ml
Peaks Tube Volume	16.0 ml
Solvent	0 ~ 100% MeOH (gradient)
Peak Detection Slop-based	
Sensitivity	High
Peak Width	2 min
Threshold	0.20 AU

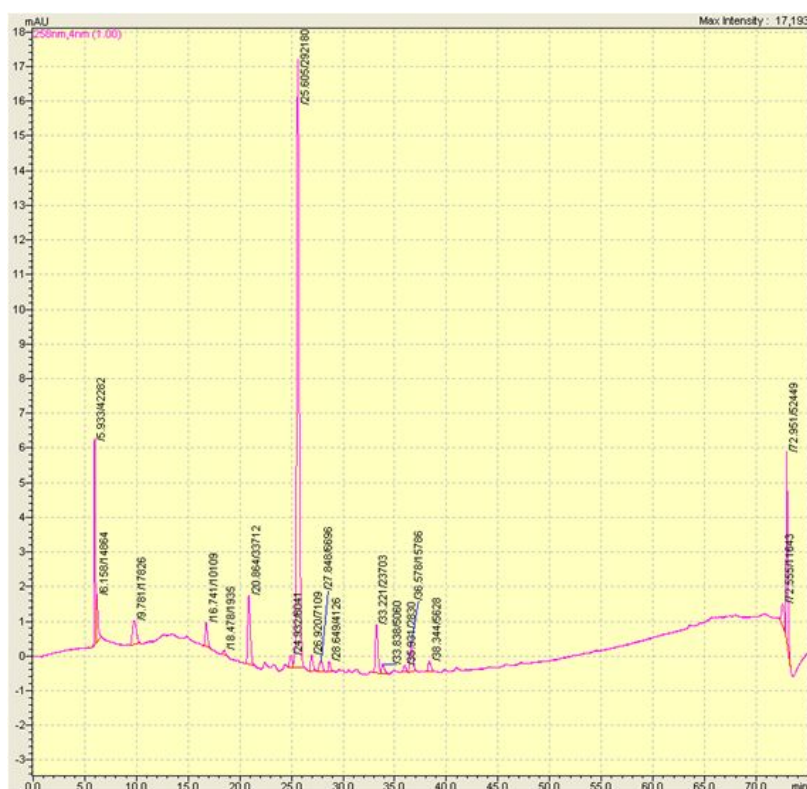


Fig. 7. The HPLC pattern of CAI-1 fraction.

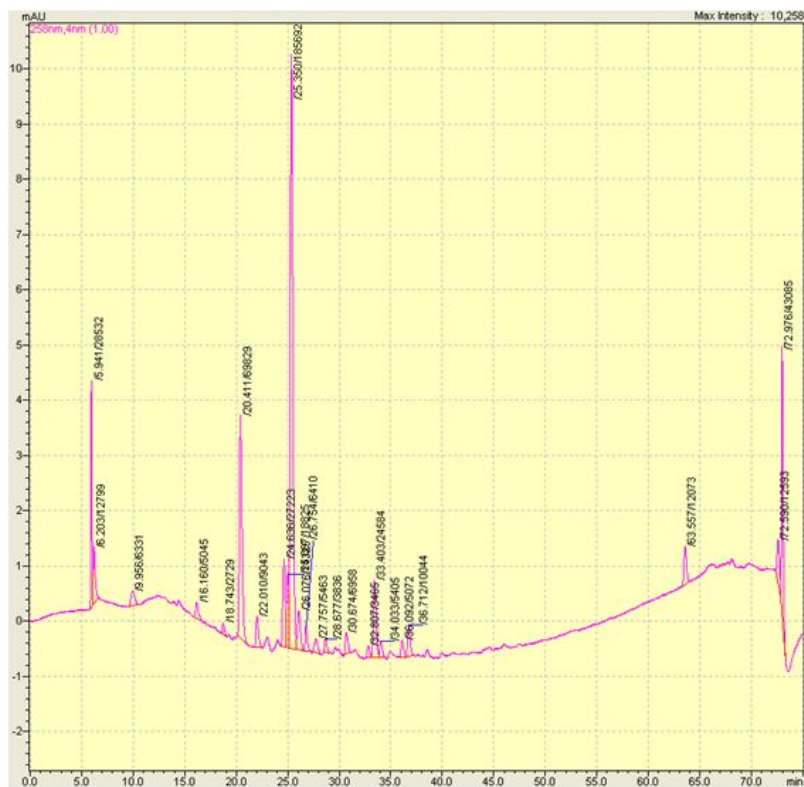


Fig. 8. The HPLC pattern of CAI-2 fraction.

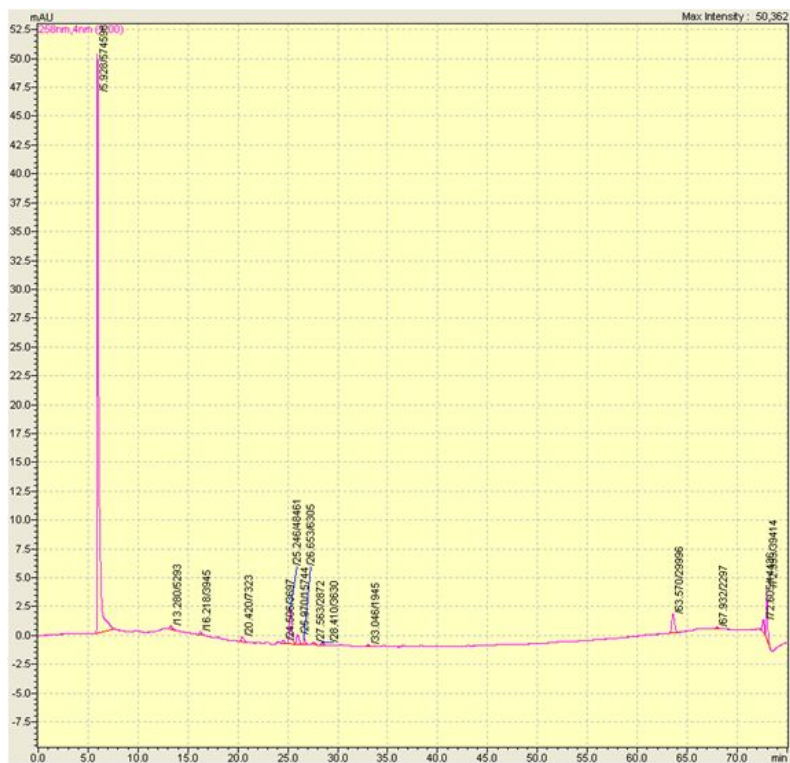


Fig. 9. The HPLC pattern of CAI-3 fraction.

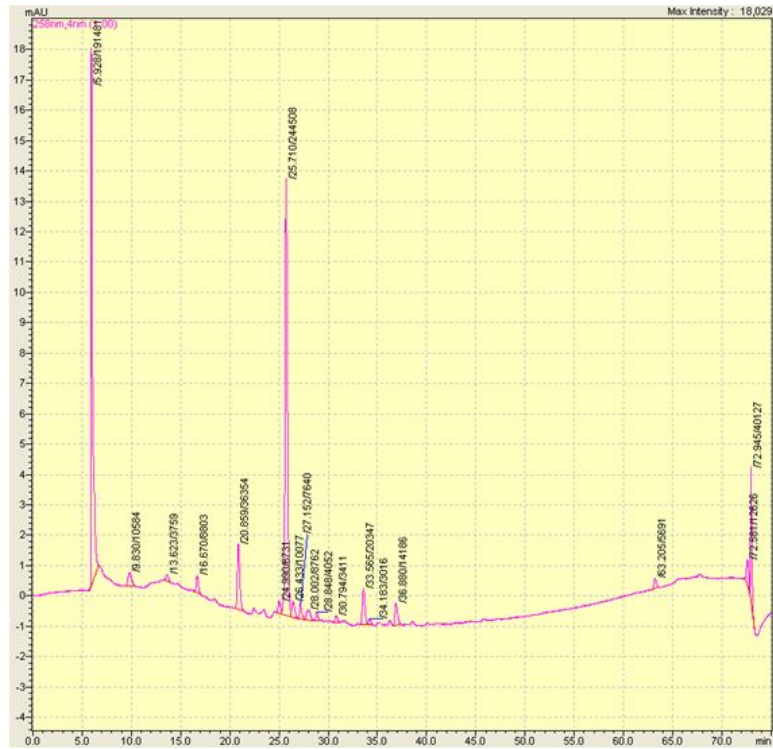


Fig. 10. The HPLC pattern of CAI-4 fraction.

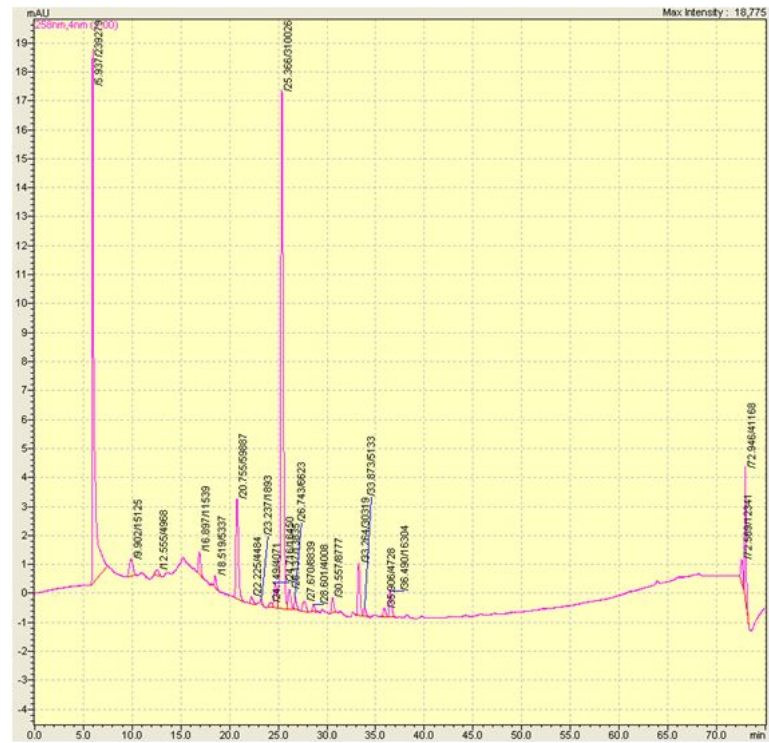


Fig. 11. The HPLC pattern of CAI-5 fraction.



Fig. 12. HPLC pattern of HAI-1, HAI-2 and HAI-3 compound.

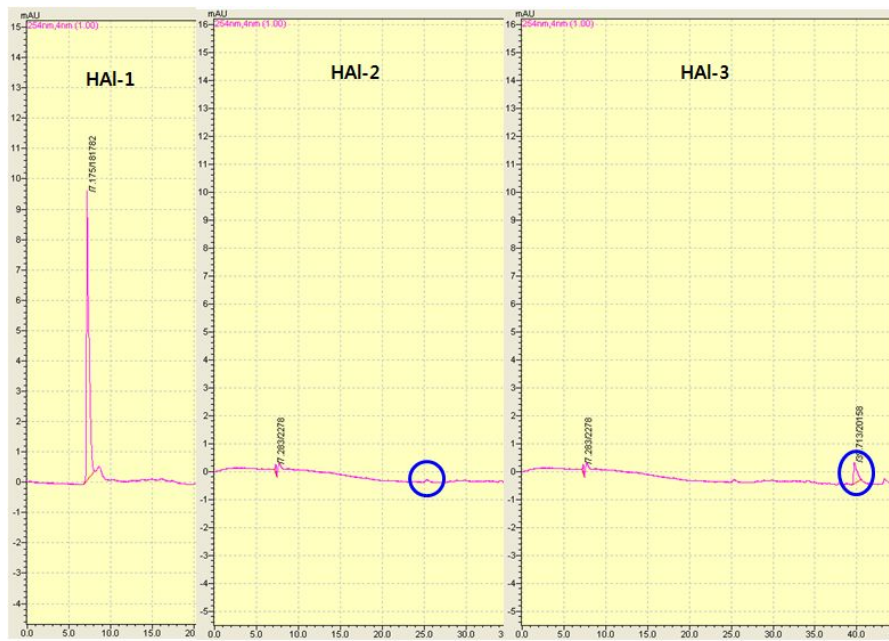


Fig. 13. HPLC pattern of Purified HAI-1, HAI-2 and HAI-3 compound.

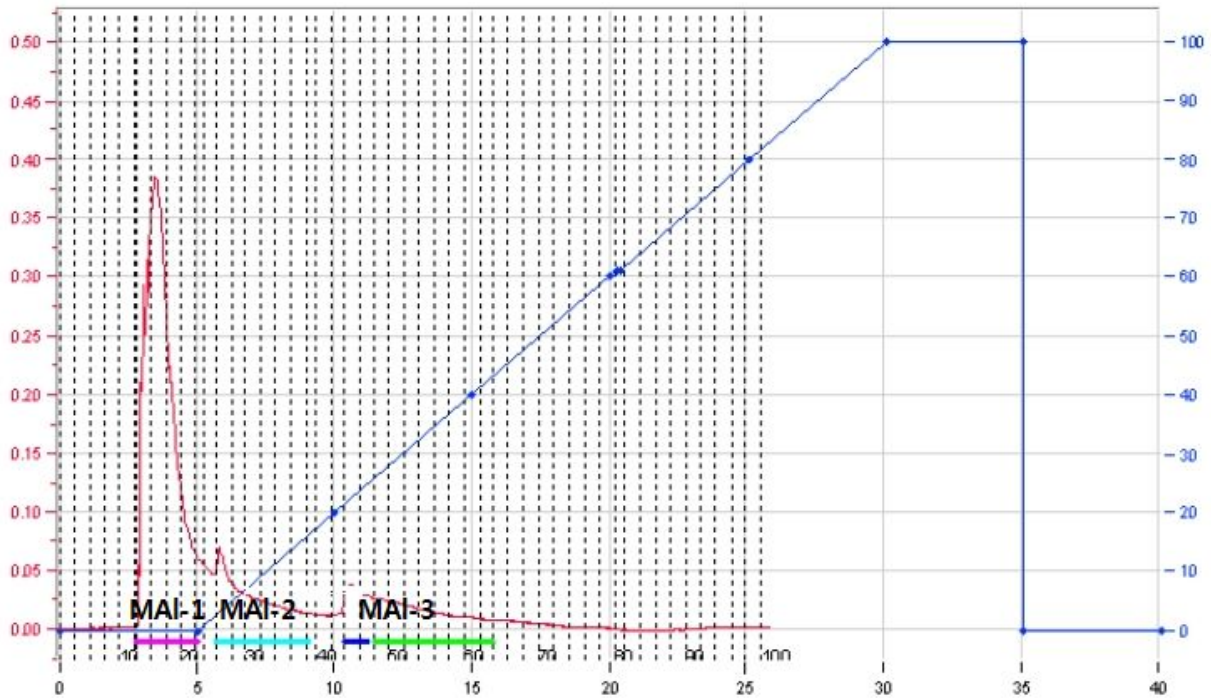


Fig. 14. MPLC pattern of MAI-1, MAI-2 and MAI-3.

(4) HA1-3의 경우, 우영씨(우방자)와 즐기, 뿌리에 공통적으로 함유되어 있는 Arctiin의 R.T와 유사하여, 3차년도에 성분비교 예정이며, SA1-3-3-2의 경우, 1차년도의 NMR자료 분석결과, pyroligneous acid로 판단되었다. NMR자료는 Loo *et al.*, 2008의 논문자료와 비교한 결과 일치하였다.

(5) ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 3.89 (s, 6H, $-\text{CH}_3$), 6.58 (d, 2H, Ar), 6.79 (dd, 1H, Ar). ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ (ppm) 56.3 ($-\text{CH}_3$), 104.9, 119.1, 147.4(Ar), 134.9 ($-\text{C}-\text{OH}$)

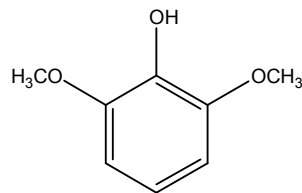


Fig. 15. Structure of pyroligneous acid.

(6) 우영으로부터 5개의 물질을 분리하였으며, 그 중 1개는 pyroligneous acid로 나타났으며, HA1-3의 HPLC 분석결과 arctiin으로 항염물질로 나타났다.

(7) 나머지 3개에 대한 성분 분석 및 지표성분에 대한 비교분석으로 최종적으로 최적추

출공정에 대한 QC조건 및 최종 원료 spec. 완성.

(8) LC/MS/MS analysis는 single compound를 혼합하여 HPLC system (0 - 100 MeOH, gradient, 75 min)으로 분석 한 결과 Fig. 4와 Fig. 13에서 확인 깨진 된 main peak외 다른 compound들이 다수 존재하는 것으로 확인되어, 보관 상 compound들이 깨진 것으로 판단된다 (Fig. 16-28).

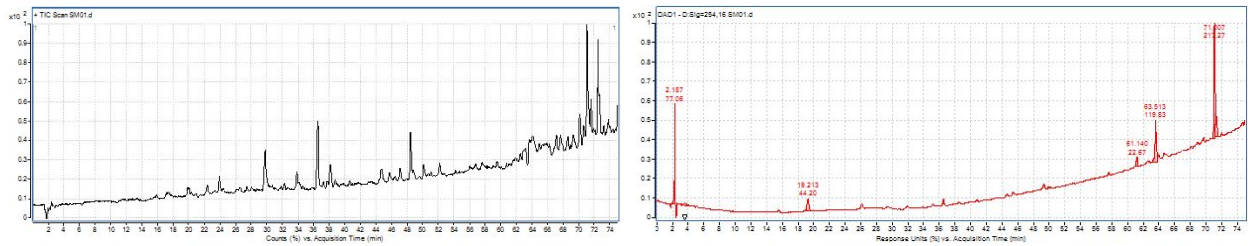


Fig. 16. LC/MS/MS pattern of 5 compounds.

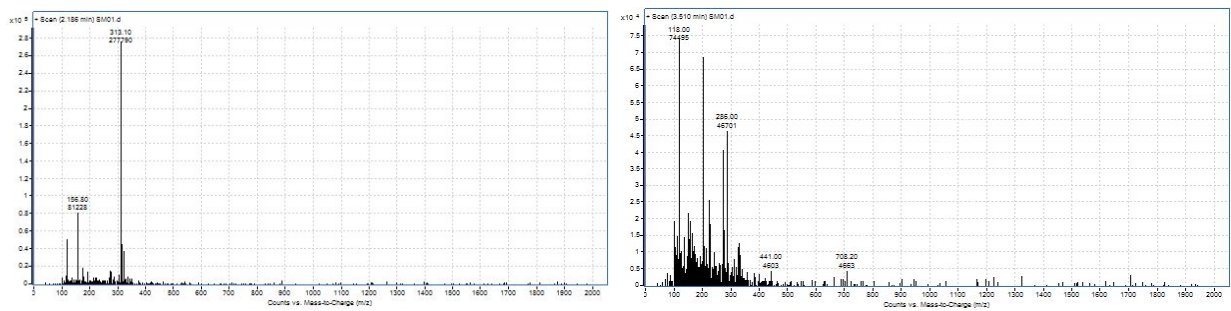


Fig. 17. LC/MS/MS analysis of R.T 2 - 3 min.

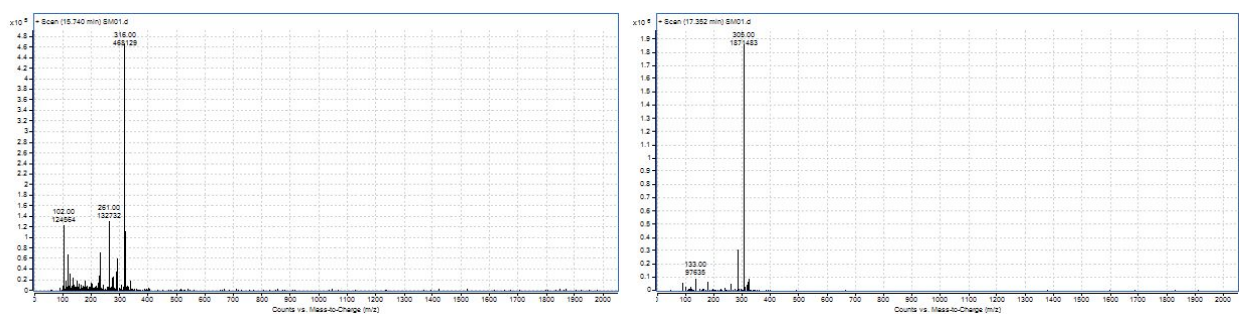


Fig. 18. LC/MS/MS analysis of R.T 15 - 17 min.

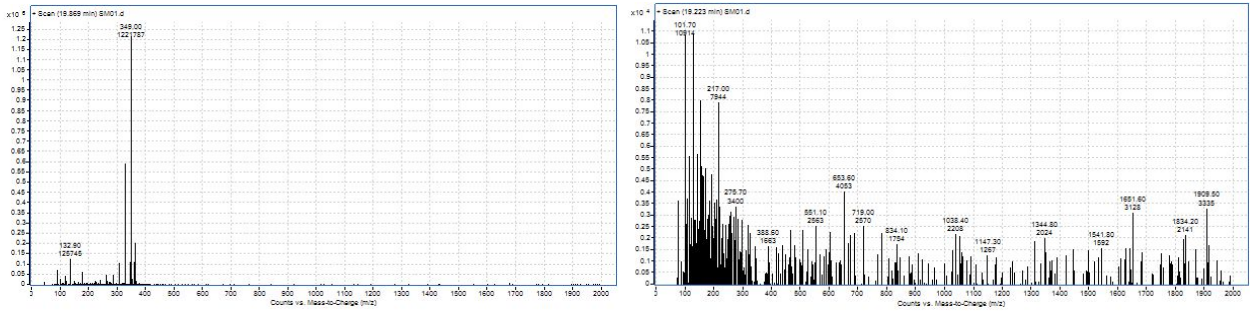


Fig. 19. LC/MS/MS analysis of R.T 19 – 20 min.

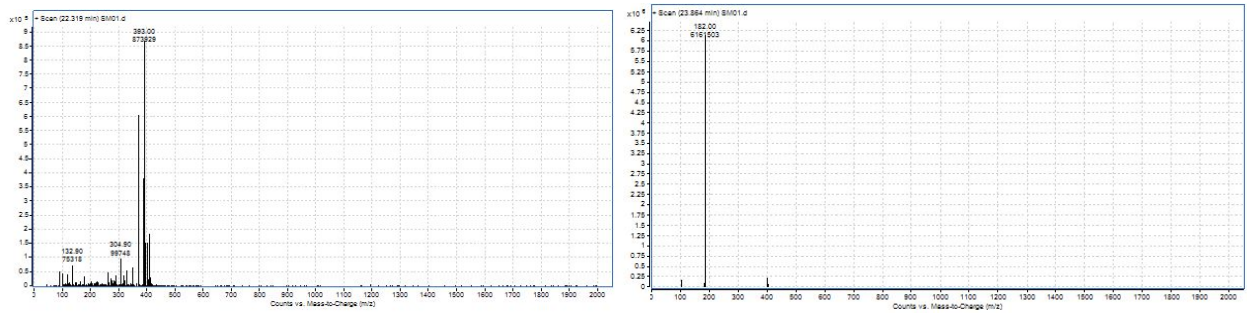


Fig. 20. LC/MS/MS analysis of R.T 22 – 23 min.

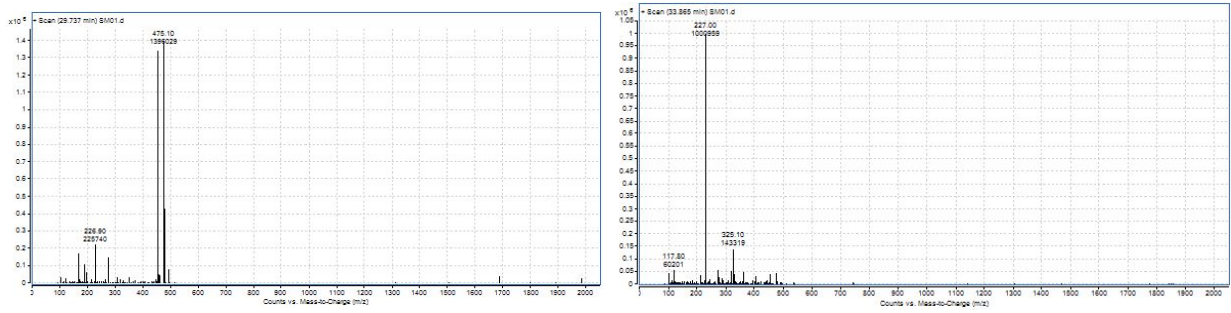


Fig. 21. LC/MS/MS analysis of R.T 29 – 34 min.

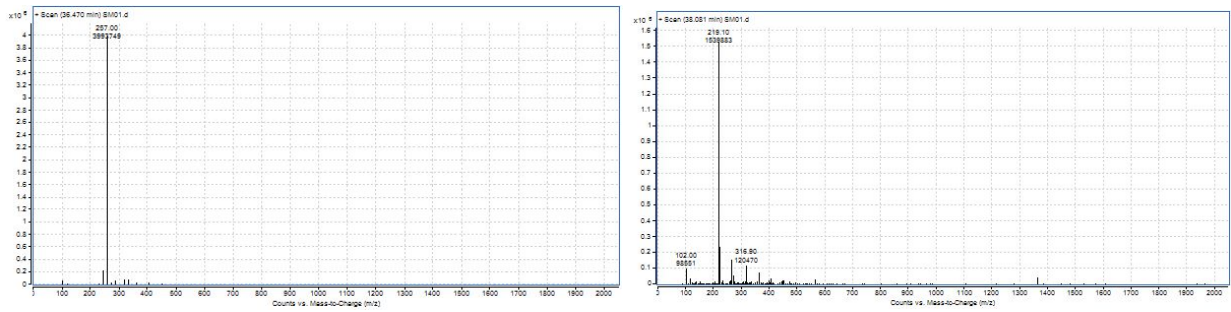


Fig. 22. LC/MS/MS analysis of R.T 36 – 38 min.

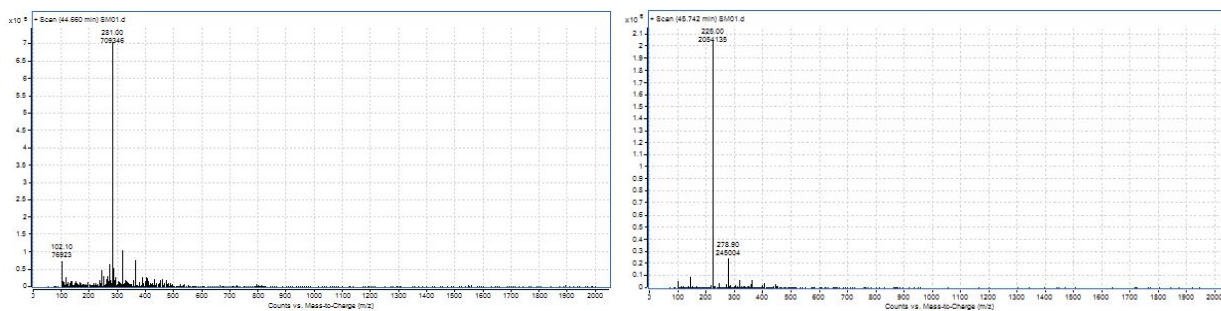


Fig. 23. LC/MS/MS analysis of R.T 44 – 45 min.

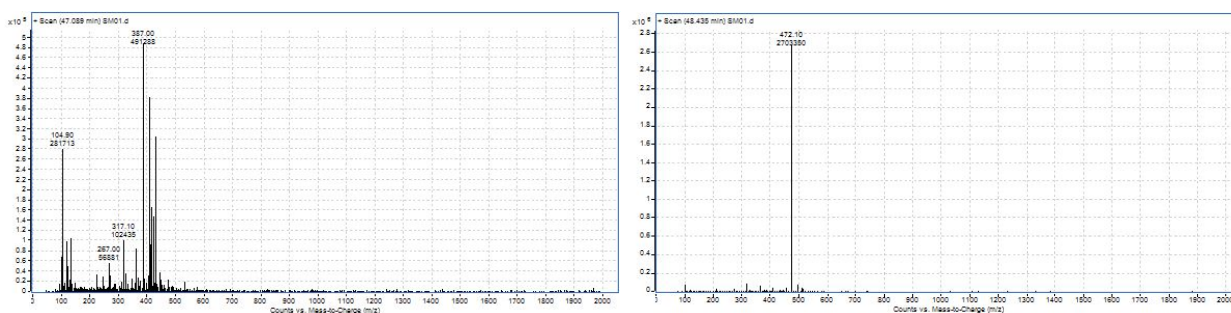


Fig. 24. LC/MS/MS analysis of R.T 47 – 48 min.

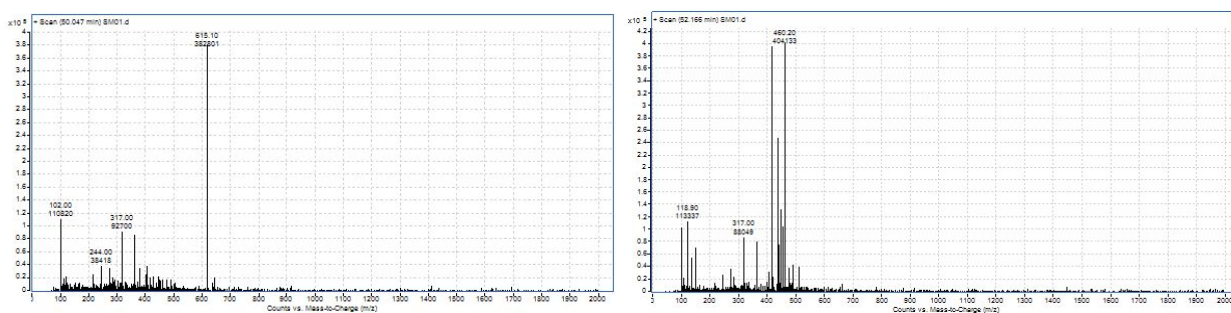


Fig. 25. LC/MS/MS analysis of R.T 50 – 52 min.

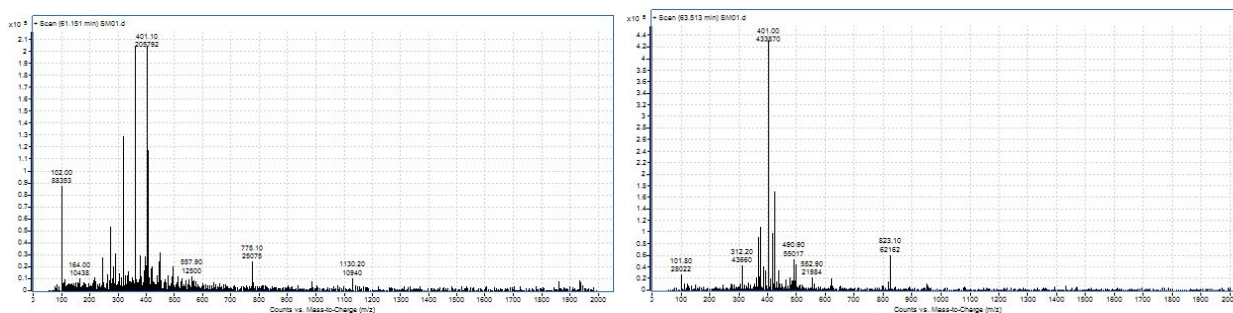


Fig. 26. LC/MS/MS analysis of R.T 61 – 63 min.

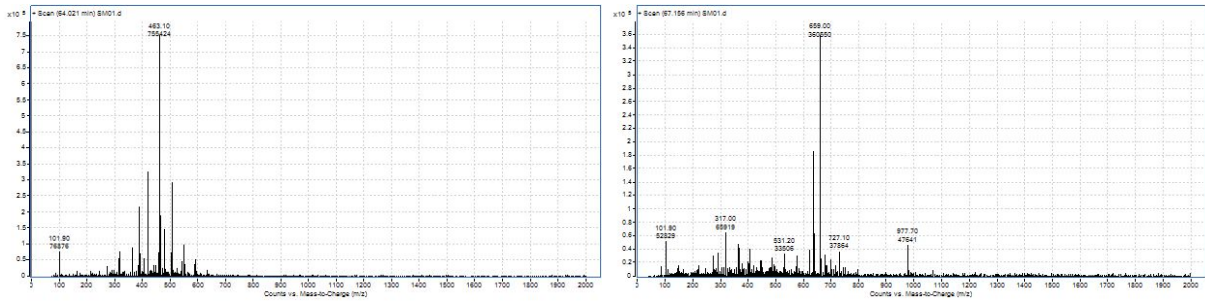


Fig. 27. LC/MS/MS analysis of R.T 64 - 67 min.

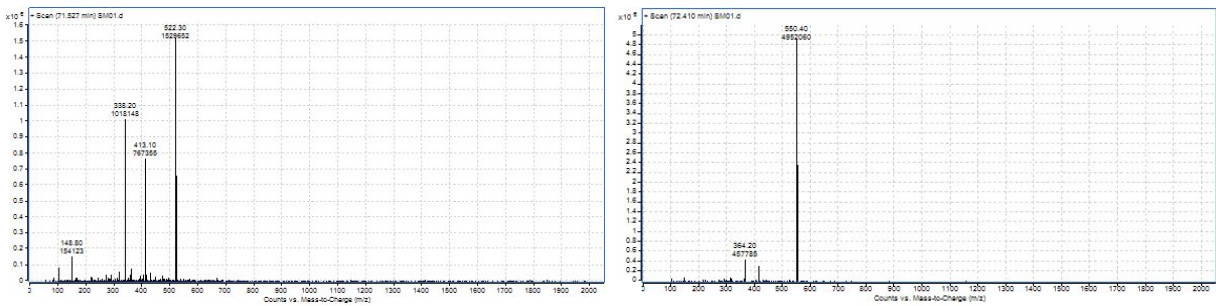


Fig. 28. LC/MS/MS analysis of R.T 71 - 72 min.

(9) 각각의 compound들을 LC/MS/MS system으로 분석하고 (Fig. 17~28), GC/MS system을 이용하여 분석 한 결과 HAI-1에는 항산화 효과가 우수한 2,4-di-tert-butylphenol과 항염증에 효과가 있는 γ -Sitosterol이 있으며, HAI-2와 HAI-3 그리고 HAI-4에는 공통적으로 2,4-di-tert-butylphenol 성분이 가장 많이 함유되어있다 (Table 22 - 25).

(10) 이 물질은 분자량이 414.71 ($C_{29}H_{50}O$, Fig. 29)로 식물성 sterol로 항당뇨, 심혈관 질환 예방 효과, 그리고 항알러지 등에 효과가 있다. 그 외 α -Copaene-8-ol (항염증 효과), δ -Cadinene (항산화 및 항염증 효과) 등을 확인 할 수 있었다.

(11) 따라서 우엉 추출물의 항알러지 및 아토피 효과에 가장 우수한 나타내는 HAI-1 compound이므로 γ -Sitosterol를 유효성분 및 지표성분으로 선정하였다.

(12) 그 외 항산화 효과가 우수한 성분인 2,4-di-tert-butylphenol과 항염증에 효과 있는 α -Copaene-8-ol 과 δ -Cadinene이 소량으로 존재하여 우엉 추출물의 항알러지 및 아토피 효과에 synergy 효과를 줄 것으로 사료된다.

(13) 또한 우엉 추출물로부터 유효성분인 γ -Sitosterol의 함량을 HPLC로 정량한 결과 0.01 - 0.02% 함유

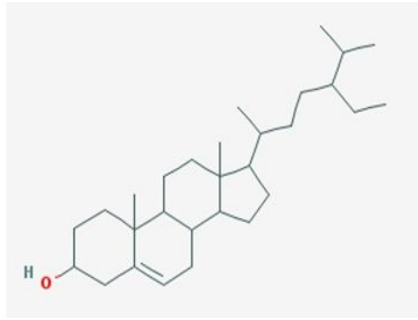


Fig. 29. Structure of γ -Sitosterol.

다. 유효성분, 지표성분 원료기시 및 확인시험 (GC-MS)

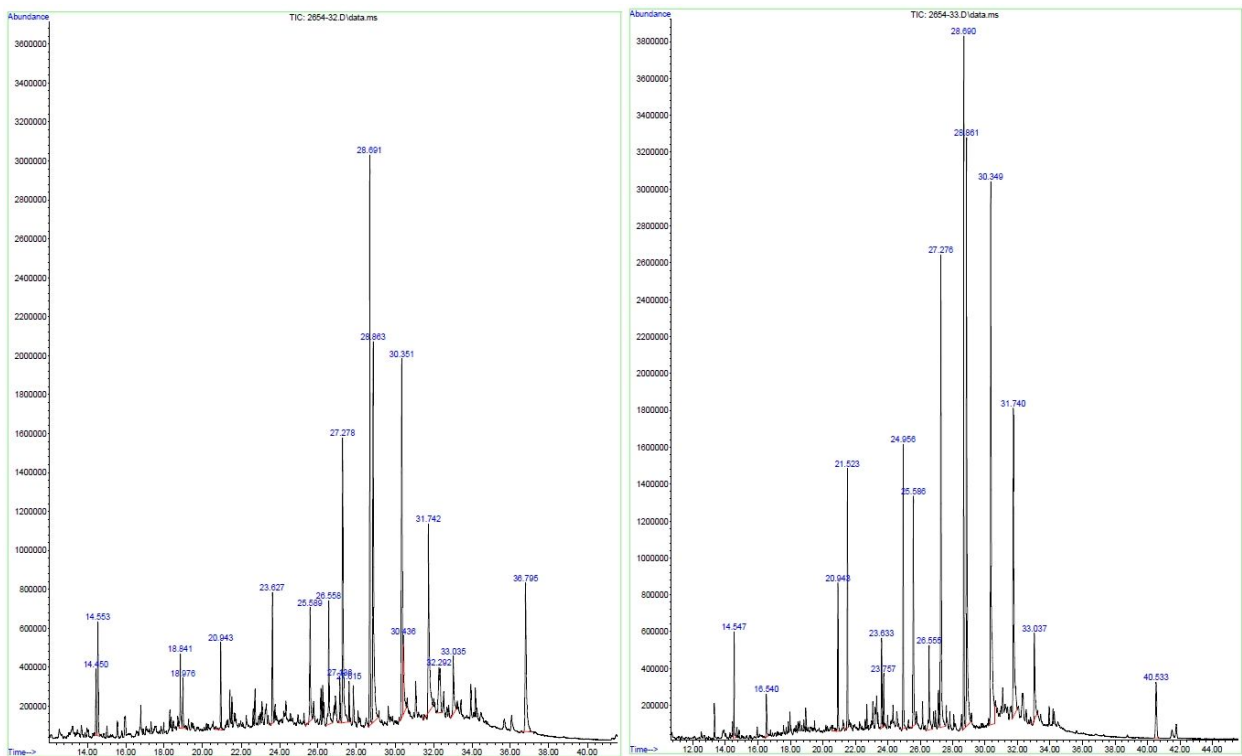


Fig. 30. GC/MS analysis of HAI-1 and HAI-2 compound.

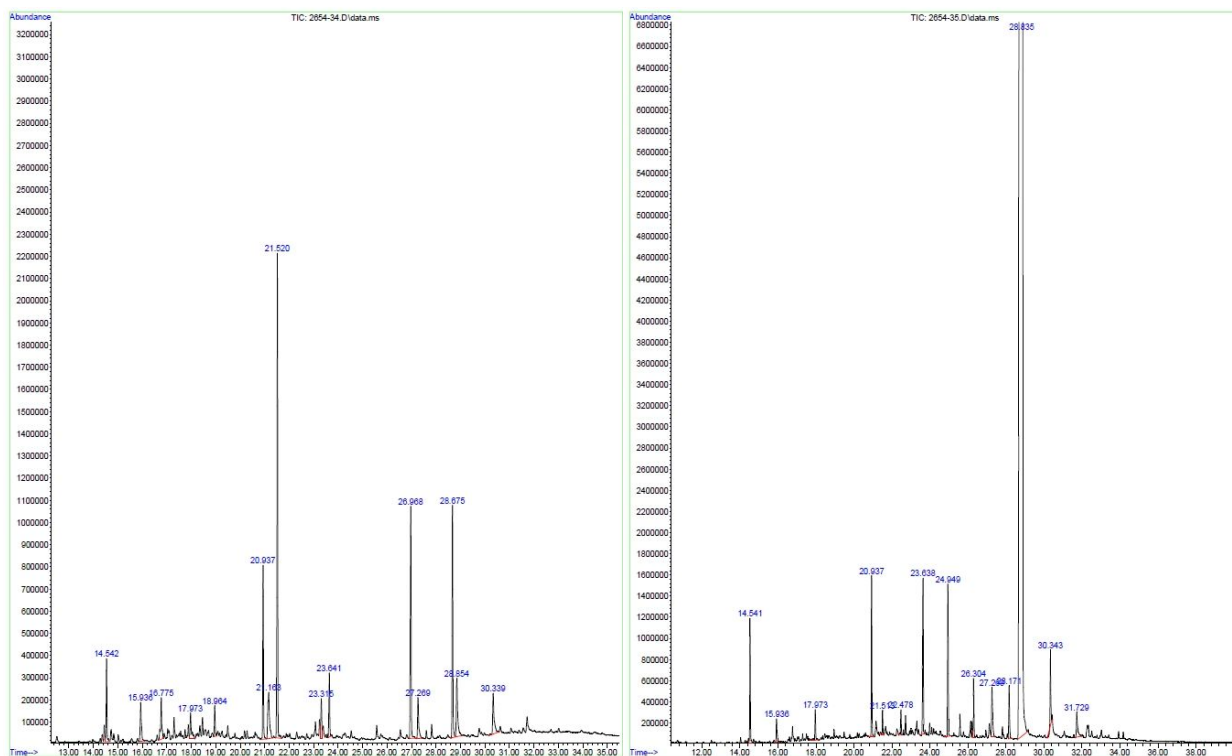


Fig. 31. GC/MS analysis of HA1-3 and HA1-4 compound.

Table 22. GC/MS analysis of HAl-1 compound.

RT	Area%	Compound Name	Molecular Formula	Quality
14.448	1.43	2,5,8,11-Tetraoxadodecane	C ₈ H ₁₈ O ₄ /178.22	86
14.553	2.60	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol/2,4-di-tert-butylphenol	C₁₄H₂₂O/206.32	97
15.981	0.79	Diethyl phthalate/1,2-benzenedicarboxylic acid	C ₁₂ H ₁₄ O ₄ /222.24	97
16.784	0.76	1-(1-Naphthyl)-3-phenyl-1,2-butadiene		81
18.291	0.37	Cubebol	C₁₅H₂₆O/222.36	95
18.838	1.74	2,5,8,11,14,17-hexaoxaoctadecane/Pentaethyleneglycol dimethyl ether	C ₁₂ H ₂₆ O ₆ /266.33	91
18.979	1.08	Cyclohexene/3-methyl-6-(1-methylethenyl)cyclohexene/(3R-trans)cyclohexene	C ₁₀ H ₁₄ O/150.21	64
20.944	1.80	Hexadecanoic acid/Methyl ester/methyl palmitate ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂ /270.45	98
21.412	0.85	n-Hexadecanoic acid/Palmitate	C ₁₆ H ₃₂ O ₂ /256.42	98
21.517	0.62	1,2-Benzenedicarboxylic acid/bis(2-methoxyethyl)ester	C ₁₄ H ₁₈ O ₆ /282.28	86
22.725	0.87	1(2H)-Naphthalenone/3,4-dihydro-2-(phenylmethylene)-1(2H)-naphthalenone/2-Benzyliden-3,4-dihydro-1(2H)-naphthalenone	C ₁₇ H ₁₄ O/234.29	41
23.087	0.81	Z-8-Hexadecene	C ₁₆ H ₃₂ /224.42	97
23.624	3.27	2,3,1',3'-Tetrahydro-[1,2']-bis(indenylidene)		98
25.766	1.13	Heneicosane/n-Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄ /296.57	96
26.154	1.01	1-Methyl-1H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-cyano-3,5-dimethyl-phenyl)-amide		50
26.242	0.82	3-Methoxy-6-oxa estra-1,3,5(10),9(11)-teten-17-one		90
26.912	1.40	Spiro[1-ethyl-3,3-dimethylindoline]-2,5'-pyrrolidin-2-one	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O/244.33	55
27.133	1.29	Bis(Dimethylthiocarbamoyl)-methane/dimethylcarbamoithioyl N,N-dimethylcarbomodithioate	C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₃ /208.36	72
27.618	1.07	Androst-2,16-diene/10,13-dimethyl-4,5-6,7,8,9,11,12,14,15-decahydro-1H-cyclopenta(a)phenanthrene	C ₁₉ H ₂₈ /256.42	94
27.838	1.07	Hexanoic acid/Hexadecyl 2-ethylhexanoate	C ₂₄ H ₄₈ O ₂ /368.63	87
28.693	12.17	Di-(2-ethylhexyl)phthalate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ /390.55	91
31.073	0.95	13-Docosamide/(Z)-13-docosenamide/Erucyl amide	C ₂₂ H ₄₃ NO/337.58	95
32.290	1.79	1-(2-pyridyl)3-(p-tolyl)-2-propen-1-one		53
32.351	1.26	6-(methylamino)phenanthren-3-ol/3-Phenanthrenol	C ₁₅ H ₁₃ NO/223.26	53
33.938	0.82	2,3,1',3'-Tetrahydro-(1,2')-bis(indenylidene)		46
34.185	0.61	(1RS, 1'RS)-1-(2',3'-dihydro-1'H-inden-1'-yl)-1H-indene		43
36.794	6.38	γ-Sitosterol/Stigmast-5-en-3-ol	C₂₉H₅₀O/414.70	99

Table 23. GC/MS analysis of HA1-2 compound.

RT	Area%	Compound Name	Molecular Formula	Quality
13.346	0.66	Dodecyl trifluoroacetate/Dodecyl 2,2,2-trifluoroacetate	C ₁₄ H ₂₅ F ₃ O ₂ /282.34	94
14.551	1.65	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol/2,4-di-tert-butylphenol	C₁₄H₂₂O/206.32	97
16.543	0.92	6-Ethyl-5,6-dihydrouracil		49
17.978	0.44	Tridecanoic acid/12-methyltridecanoic acid/Methyl isomyristate	C ₁₅ H ₃₀ O ₂ /242.39	97
18.974	0.39	6-Octenal/3,7-dimethyl 6-octenal/(R)-(+)-Citronellal	C ₈ H ₁₄ O/126.19	38
20.945	2.53	Hexadecanoic acid/Methyl palmitate	C₁₇H₃₄O₂/270.45	97
21.525	4.23	1,2-Benzenedicarboxylic acid/butyl 2-methylpropyl ester	C₁₂H₁₄O₄/222.23	95
22.729	0.43	2-(2,3-dihydro-5-methyl-1H-indol-1-yl)benzotrile		62
23.080	0.64	Z-8-Hexadecene	C ₁₆ H ₃₂ /224.42	97
23.321	0.89	cis-13-Octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂ /282.46	99
23.638	2.27	2,3,1',3'-Tetrahydro-[1,2']-bis(indenylidene)		98
24.328	0.30	n-Hexadecanamide/Palmitamide	C ₁₆ H ₃₃ NO/255.43	87
24.952	4.56	2-Butenedioic acid(E)-/Bis(2-ethylhexyl) fumarate	C₂₀H₃₆O₄/340.49	68
26.145	0.54	6,6-Dimethylhepta-2,4-diene		53
26.550	1.81	9-Octadecenamide/(Z)-9-octadecenamide/Oleylamide	C₁₈H₃₅NO/281.47	98
27.612	0.71	Androst-2,16-diene/10,13-dimethyl-4,5-6,7,8,9,11,12,14,15-decahydro-1H-cyclopenta(a)phenanthrene	C ₁₉ H ₂₈ /256.42	95
28.685	11.84	1,2-Benzenedicarboxylic acid/2-(2-ethylhexoxycarbonyl)benzoic acid	C₁₆H₂₂O₄/278.34	91
30.623	1.10	Bistrimethylsilyl N-acetyl elcosasphinga-4,11-dinine	C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₅ S ₂ Si ₂ /606.86	49
31.072	1.16	1,2-Benzenedicarboxylic acid/Phthalic acid	C₁₈H₂₆O₄/306.39	58
40.532	2.12	Mirex/Dodecachlorooctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta[cd]pentalene/Dodecachloropentacyclodecane	C ₁₀ Cl ₁₂ /545.54	58

Table 24. GC/MS analysis of HA1-3 compound.

RT	Area%	Compound Name	Molecular Formula	Quality
14.540	4.33	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol/2,4-di-tert-butylphenol	C₁₄H₂₂O/206.32	97
15.930	3.04	α-Copaene-8-ol	C₁₅H₂₄O/220.35	46
16.773	3.93	10,10-dimethyl-2,6-dimethylenebicyclo[7.2.0]undecan-5- β -ol		74
17.977	1.77	Tetradecanoic acid/Methyl myristate	C ₁₅ H ₃₀ O ₂ /242.39	97
18.963	1.78	Cyclohexene/3-methyl-6-(1-methylethenyl)cyclohexene	C ₁₀ H ₁₆ /136.23	70
20.934	9.20	Hexadecanoic acid/Methyl palmitate	C₁₇H₃₄O₂/270.45	98
21.163	5.54	1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)naphthalene/(1S-cis)-naphthalene	C₁₅H₂₄/204.35	90
21.525	25.07	1,2-Benzenedicarboxylic acid/butyl 2-methylpropyl ester	C₁₂H₁₄O₄/222.23	95
23.320	2.64	9-Octadecenoic acid/(Z)-9-octadecenoic acid/Oleic acid	C ₁₉ H ₃₆ O ₂ /296.48	99
23.638	3.39	Octadecenoic acid/Stearic acid	C ₁₉ H ₃₈ O ₂ /298.50	98
26.966	12.76	Hexanedioic acid/bis(2-ethylhexyl) ester/Adipol 2EH/Bisoflex DOA	C₂₆H₅₀O₄/426.67	91
28.674	13.60	1,2-Benzenedicarboxylic acid/3-nitro-1,2-benzenedicarboxylic acid/3-Nitrophthalic acid	C ₈ H ₅ NO ₆ /211.12	91

Table 25. GC/MS analysis of HAl-4 compound.

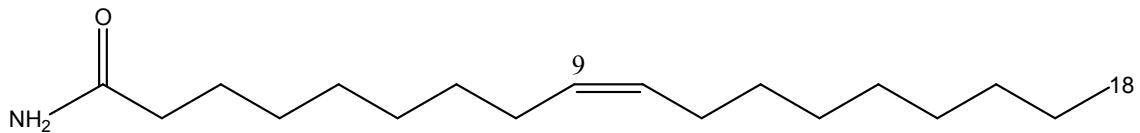
RT	Area%	Compound Name	Molecular Formula	Quality
14.539	1.08	2,4-bis(1,1-dimethylethyl)phenol/2,4-di-tert-butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O/206.32	97
15.930	0.29	α -Copaen-8-ol	C ₁₅ H ₂₄ O/220.35	46
16.773	0.22	Caryophylla-4(12), 8(13)-dien-5- β -ol	C ₁₅ H ₂₄ O/220.35	74
17.977	0.26	Tetradecanoic acid/Methyl myristate	C ₁₅ H ₃₀ O ₂ /242.39	98
20.933	1.41	Tetradecanoic acid/Methyl palmitate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂ /270.45	98
21.174	0.31	δ -Cadinene/(+)- δ -Cadinene	C ₁₅ H ₂₄ /204.35	87
21.514	0.24	Dibutyl phthalate/1,2-Benzenedicarboxylic acid	C ₁₆ H ₂₂ O ₄ /278.34	93
22.477	0.25	Phthalic acid/methyl nonyl ester/1-O-methyl 2-O-nonyl benzene-1,2-dicarboxylate	C ₁₈ H ₂₆ O ₄ /306.39	90
22.718	0.19	4-Benzhydrylimidazole/4-Benzhydryl-1H-imidazole	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ /234.29	58
23.309	0.16	11-Octadecenoic acid/Methyl 11-Octadecenoic acid	C ₁₉ H ₃₆ O ₂ /296.48	99
23.638	1.80	Octadecenoic acid/Methyl stearate	C ₁₉ H ₃₈ O ₂ /298.50	98
23.988	0.10	Diisooctyl maleate/2-Butenedioic acid (Z)-Diisooctyl ester	C ₁₀ H ₁₆ O ₄ /200.23	87
24.952	1.41	(E)-2-Butenedioic acid/Bis(2-ethylhexyl) fumarate	C ₂₀ H ₃₆ O ₄ /340.49	64
26.145	0.21	Ketone/Isopropylidenecyclopropyl methyl	C ₈ H ₁₂ O/124.18	53
26.298	0.56	Ferruginol/Abieta-9(11),8(14),12-trien-12-ol/Ferruginol (Podocarpus)	C ₂₀ H ₃₀ O/286.45	94
27.130	0.23	Tetramethyl thiurammonosulfide/bis-(dimethylthiocarbonyl) sulfide	C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₃ /208.36	59
27.820	0.16	2,5-dimethyl-1H-indole	C ₁₀ H ₁₁ N/145.20	72
28.171	0.73	1,2-Benzenedicarboxylic acid/bis(2-ethylhexyl) ester	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ /390.55	91
28.838	87.20	1,2-Benzenedicarboxylic acid/2-ethylhexyl phthalate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ /390.55	95

라. 유효성분 및 지표성분의 설정

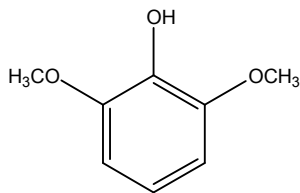
(1) Activity-guided fractionation 및 isolation / NMR구조분석 및 LC-MS/MS결과, GC-MS결과를 토대로 유효성분과 지표성분을 최종적으로 설정하였으며, 특히 유효성분의 설정은 다음 장에 기술된 유효활성결과를 토대로 선정하였음

(2) 활성연구결과, Oleamide가 가장 우수한 활성을 나타내었으며, 지표성분으로는 활성 또한 미약하나마 있으면서, 분석이 용이한 물질을 선택

(가) 유효성분

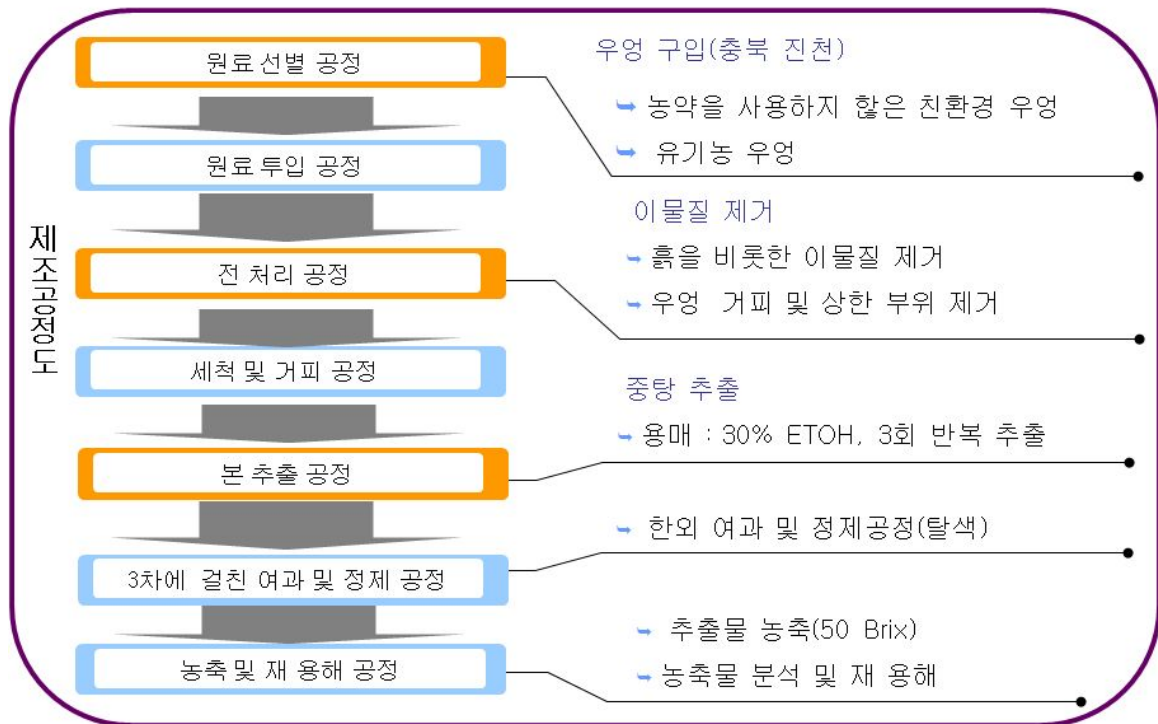


(나) 지표성분



5. 최적추출공정 확립 및 시제품 생산

가. 우엉추출물 제조공정



나. 원료소재 생산

(1) 화장품원료 : 30% EtOH 추출물 (오른쪽 사진)

(2) 의약품 원료 소재 : 30% EtOH 추출물 + Column정제 (왼쪽 사진)



다. 화장품 시생산



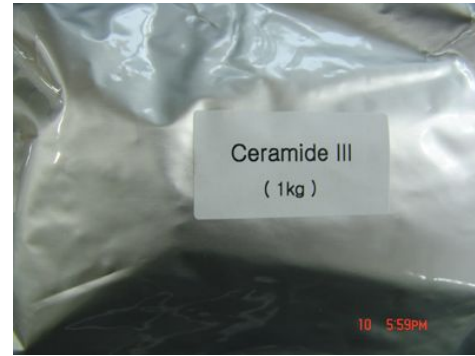
라. 제형연구 및 시생산, 안정성

<p>1,3-Butylene Glycol</p>	<p>Propylene Glycol</p>
	
<p>Lecitin</p>	<p>Supersil 200</p>
	
<p>Spigel 306</p>	<p>Hyaluronic acid</p>
	

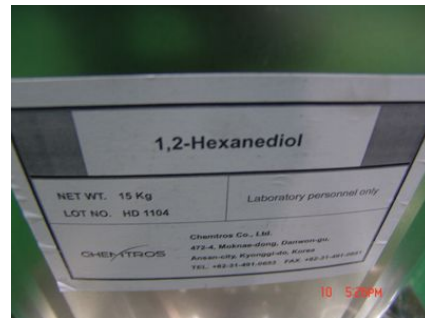
Hispagel 200



Ceramide III



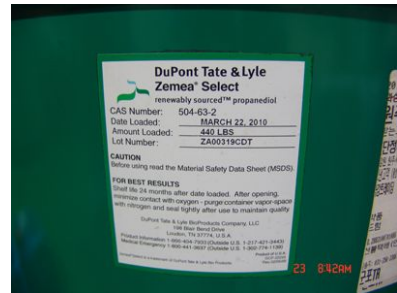
1,2 Hexanediol



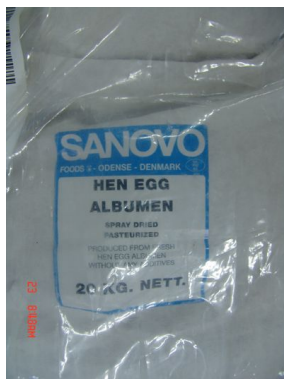
DPG



오일



알부민, 달팽이 파우더



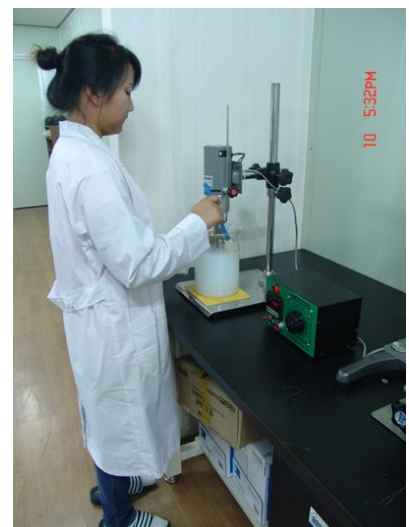
방부제



EGF 실크웬타이드 알파비사보롤



전체 원료 및 화장품 제조 실험 사진



화장품 제조 실험 품



화장품 제조 시생산품



라. 제품 제조용 크림 Base Formulation

구분	원료명	함량(%)
수상	1,2 hexaediol	0.1
	우영추출물	5.00
	Hispagel	0.15
	1,3-BG	2
	Glycerin	2
	propylen glycol	1
	DPG	0.1
	HYDRAMAX	6
	Hyaluronic acid	1
	PE	0.2
	sepigel 306	1
	정제수	55.25
유상	Cetanol	1
	Nikkolipide 81S	1
	Olivem 1000	1
	Arlacel-165	1
	Emulgin B-1	0.5
	Cutina CP	1.5
	KF-96(6CS)	2
	미강유	4
	TCG-M	2
	Vitamin E Acetate	0.5
	Lecitin	0.5
	BHT	0.05
Phenonip	0.1	
첨가상	supersill 200	10
	Perpume	0.25
	alpha bisaborol	0.1
	난백 알부민	0.1
	달팽이 점액	0.5
	EGF	0.1
계	100.00	

마. 안정성관찰

(1) 크림

(가) 제조시 및 숙성시 물성

구 분	제조시		숙성시		안정도 관찰 결과	비 고
	pH	점도 (cps)	pH	점도 (cps)		
크림 1	5.54	20,000	5.62	23,000	38, 40, 50℃, 냉온, 실온 조건 경시변화 이상 없음(60일)	원심분리 이상무
크림 2	5.49	25,000	5.60	30,000	38, 40, 50℃, 냉온, 실온 조건 경시변화 이상 없음(60일)	원심분리 이상무

(가) 기간별 점도 변화

	1일	5일	16일	29일	58일
크림 1	23,000	25,000	24,000	23,000	23,000
크림 2	30,000	32,000	35,000	33,000	31,000

바. 제형연구 및 시생산, 안정성

(1) 우영함유 스킨로션

(2) 우영추출물 함유 로션

(3) 우영추출물 함유 크림

번호	원료	함량(중량%)
1	우염 추출물	3.0
2	글리세린	3.0
3	부틸렌 글리콜	2.0
4	1% 히아루론산	2.0
5	폴리옥시에틸렌 경화피마자유	1.0
6	색소	10.0
7	향료	0.1
8	방부제	미량
9	정제수	잔량

<제조방법>

9번에 2,3,4,8번을 순서대로 투입하고 교반하여 용해시킨 후, 5번을 60℃ 정도 가열하여 용해시킨 후, 10번을 투입하여 용해한 후 11번에 투입한다. 마지막으로 1,6,7번을 투입하여 충분히 교반한 뒤 숙성시킨다.

안정성 평가

- 제조시 및 숙성시 물성

제조시		숙성시		안정도 관찰 결과	비고
pH	점도 (cps)	pH	점도 (cps)		
5.72	2,000	5.55	2,200	38, 40, 50℃, 냉운, 실온 경시변화 이상 없음(60일)	원심분리 이상 무

- 스킨의 기간별 점도 변화

1 일	7일	14 일	29일	60 일
1980	2210	2200	2180	2170

번호	원료	함량(중량%)
1	우염 추출물	3.0
2	밀납	1.0
3	폴리솔베이트 60	1.5
4	솔비탄 세스퀴올레이트	0.5
5	유동 파라핀	10.0
6	소르비탄 스테아레이트	1.0
7	천유형 모노스테아린산 글리세린	0.5
8	스테아린산	1.5
9	글리세릴스테아레이트/피이지-400 스테아레이트	1.0
10	프로필렌글리콜	3.0
11	카르복시폴리머	0.1
12	트리에탄올아민	0.2
13	방부제	미량
14	색소	미량
15	향료	미량
16	정제수	잔량

<제조방법>

10, 11, 13, 16을 혼합교반하면서 80 ~ 85℃ 사이로 가열하여 제조부에 투입한 후 유화기를 작용시키고 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12를 80 ~ 85℃ 사이로 가열 용해한 후 유화한다. 유화가 끝나면 교반기를 이용하여 교반하면서 50℃까지 냉각한 뒤 15번을 투입하고 45℃까지 냉각한 뒤 14번을 투입하고 35℃에 1번을 투입하여 25℃까지 냉각한 뒤 숙성시킨다.

안정성 평가

- 제조시 및 숙성시 물성

제조시		숙성시		안정도 관찰 결과	비고
pH	점도 (cps)	pH	점도 (cps)		
5.00	8000	5.00	18000	38, 40, 50℃, 냉운, 실온 경시변화 이상 없음(60일)	원심분리 이상 무

- 로션의 기간별 점도 변화

1 일	7일	14 일	29일	60 일
15000	15100	15300	14900	15000

번호	원료	함량(중량%)
1	우엉 추출물	3.0
2	스테아린산	2.0
3	세틸알콜	2.0
4	글리세릴모노스테아레이트	2.0
5	폴리옥시에틸렌 소르비탄모노스테아레이트	0.5
6	솔비탄세스퀴올레이트	0.5
7	글리세릴모노스테아레이트/글리세릴스테아레이트/ 폴리옥시에틸렌스테아레이트	1.0
8	왁스	1.0
9	유동파라핀	4.0
10	스쿠알란	4.0
11	카프릴릭/카프릭트리글리세라이드	4.0
12	카르복시비닐폴리머	0.3
13	부틸렌글리콜	5.0
14	글리세린	3.0
15	트리에탄올아민	0.5
16	정제수	잔량

(4) 우엉추출물 함유 에센스

번호	원료	함량(중량%)
1	우엉 추출물	3.0
2	시토 스테롤	1.7
3	폴리글리세릴 2-올레이트	1.5
4	세라미드	0.7
5	스테아레스-4	1.2
6	콜레스테롤	1.5
7	디세틸포스페이트	0.4
8	농글리세린	5.0
9	마카다미아 오일	15.0
10	카르복시비닐폴리머	0.2
11	산탄검	0.2
12	방부제	미량
13	향료	미량
14	정제수	잔량

<제조방법>

12, 13, 14, 16을 혼합교반하면서 80 ~ 85℃ 사이로 가열하여 제조부에 투입한 후 유향기를 작동시키고 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11을 80 ~ 85℃사이로 가열하여 용해한 후 15를 투입 교반하여 제조부에 투입하고 유향한다. 유향이 끝나면 교반기를 이용하여 교반하면서 35℃까지 냉각하고 1번을 투입하여 25℃까지 냉각한 뒤 숙성시킨다.

안정성 평가

- 제조시 및 숙성시 물성

제조시		숙성시		안정도 관찰 결과	비 고
pH	점도 (cps)	pH	점도 (cps)		
5.54	20000	5.62	23000	38, 40, 50℃, 냉온, 실온 경시변화 이상 없음(60일)	원심분리 이상 무

- 크림의 기간별 점도 변화

1 일	7일	14 일	29일	60 일
23000	25000	24000	23000	23000

<제조방법>

2, 3, 4, 5 및 6을 일정한 온도에서 균질화하여 비이온계 양친매성 지질이라 칭한다. 상기 비이온계 양친매성 지질과 1, 7, 8 및 14를 혼합하고 일정한 온도에서 균질화하여 마이크로플루이다이저를 통과하고 이어 9를 일정한 온도에서 서서히 첨가하여 균질화한 후 다시 마이크로플루이다이저에 재차 통과시킨다 그리고 10, 11, 12, 13을 투입하여 분산시켜 안정화하고 숙성시킨다.

안정성 평가

- 제조시 및 숙성시 물성

제조시		숙성시		안정도 관찰 결과	비 고
pH	점도 (cps)	pH	점도 (cps)		
5.63	1200	5.65	1320	38, 40, 50℃, 냉온, 실온 경시변화 이상 없음(60일)	원심분리 이상 무

- 에센스의 기간별 점도 변화

1 일	7일	14 일	29일	60 일
1250	1300	1250	1280	1200

6. 원료품질 검사

가. 품질검사 대상품

- (1) 원료 : 생우영 EtOH 30% 추출물
- (2) 화장품 : 상기원료 Formulation구성
- (3) 식품 : 주정 30%추출물로 구성
- (4) 원료의약품 : 생약추출물의 경우 EtOH 30% 및 물질분리

나. 자가품질 검사

(1) 미생물검사

(가) 원료에 대한 일반 미생물 및 곰팡이 검사

(나) 일반 미생물은 TSA agar media, 곰팡이는 PDA agar media를 이용하여 검사를 실시하였다.

(다) 우영추출물 1 g를 칭량하여 증류수와 1-3-B.G (butylene glycol)의 비율을 6 : 4로 제조한 solution에 용해하여 미생물 검사 시료로 사용하였다. TSA 및 PDA agar plate에 100 μ l씩 점적하여 도말한 다음 일반 미생물은 37 $^{\circ}$ C, 곰팡이는 30 $^{\circ}$ C에서 2일간 배양하여 plate에 생성된 미생물의 colony를 counter하여 1 g 당 미생물의 생육도 (cfu/g)을 측정하였다.

(라) 그 결과 일반 미생물, 곰팡이 및 대장균 불검출

(2) 중금속 검사

(가) 화장품 원료로 사용하기 위하여 화장품 기준에 입각한 중금속 검사를 실시하였다.

(나) 중금속 검사 항목인 납 (Pb)과 비소 (As)는 중부대학교 산학협력단에 의뢰하여 검사한 결과 적합으로 확인이 되었다.

(다) 식품 원료 기준에 입각한 중금속 항목은 비소 (As), 카드뮴 (Cd)를 실시한 결과 불검출로 확인이 되었다.

(라) 따라서 본 우영 추출물 (LSP-I-003)은 식품 및 화장품 원료로 적합

(3) 잔류농약 검사

(가) 식품공전에 서술되어 있는 우영 추출물의 잔류 농약 항목으로는 디페노코나졸 (Difenoconazol), 비터타놀 (Bitertanol), 페나리몰 (Fenarimol)이다.

(나) 잔류 농약 검사는 농협식품안전연구원에 의뢰한 결과 불검출

(다) 본 사업의 우영추출물은 식품 원료로 적합

(라) 따라서 우영 추출물의 식품, 화장품 원료에 입각하여 식품공진 방법으로 상기 항목을 검사한 결과 불검출 또는 적합으로 판명되었다.



시험 성적서

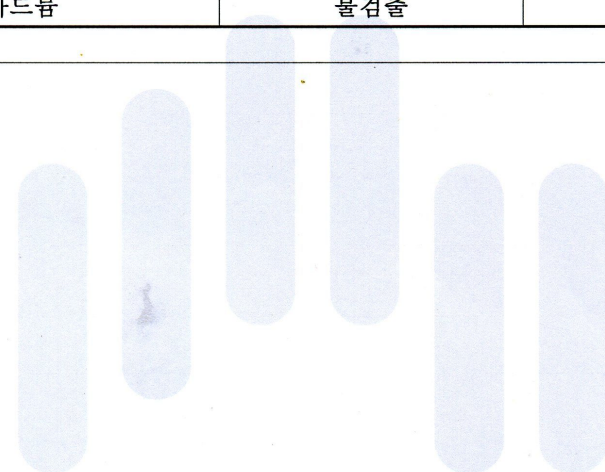

생명과학연구센터

품질 검사	책임자 실무자	송병섭 (인) 양승탁 (인)
전화번호	041) 750 - 6320	

발급번호 : 화원1009-23호		2010. 9. 30.		
접수번호	52 - 1009 - 0020	접수일자	2010년 9월 27일	
제품명	LSP-I-003	제조일자	2009년 11월 10일	
		Lot. No.	10-LSP-I-003	
제품유형	화장품원료	검사구분	품질검사용	시험항목
의뢰자 (제조업소 등 기관명)		이수제약(주)		
소재지 (연락처)		충북 제천시 왕암동 932번지 충청전통의약산업센터		
시험 결과				
검사항목	기준(규격)	결과	적부 판정	비고
납(Pb)	20ppm이하	0.00ppm	적합	
비소(As)	2ppm이하	0.00ppm	적합	
2010. 9. 30.				
중부대학교 산학협력단장 (인) <small>식품의약품안전청 화장품품질검사기관 제5호</small>				
<input type="checkbox"/> 이 성적은 제시된 검체에 한하며, 시험의뢰 목적 외의 광고, 선전 등에 이용 할 수 없음				



시 험 성 적 서

발급번호 : 생참 1009-415호		2010 . 9 . 30 .	
접수번호	12 - 1009 - 258	접수일자	2010년 9월 27일
시 료 명	LSP-I-003	제조일자 (유통기한)	-
의뢰자 (제조업소 등 기관명)	이수제약(주)	검사구분	참 고 용
소재지 (연락처)	서울시 강서구 화곡동 844-12 2층		(043-645-2466)
시 험 결 과			
검 사 항 목	결 과	비 고	
카드뮴	불검출		
			
		2010 . 9 . 30 .	
중부대학교 산학협력단장 식품의약품안전청 식품위생검사기관지정 제 28호			
<input type="checkbox"/> 이 성적은 제시된 검체에 한하며, 시험의뢰 목적 외의 광고·선전 등에 이용 할 수 없음			



7. 인체적용시험



화장품 시제품, 3개월 후

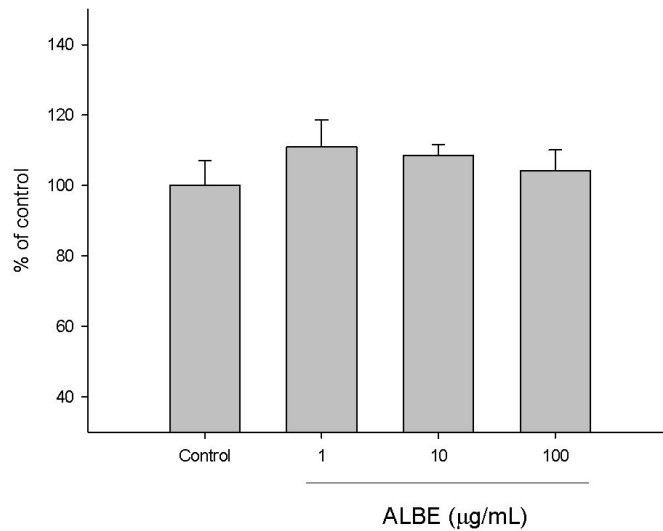


8. 작용기전 규명

가. 우영추출물의 급성 항알러지 및 항염증 효과와 작용기전 규명

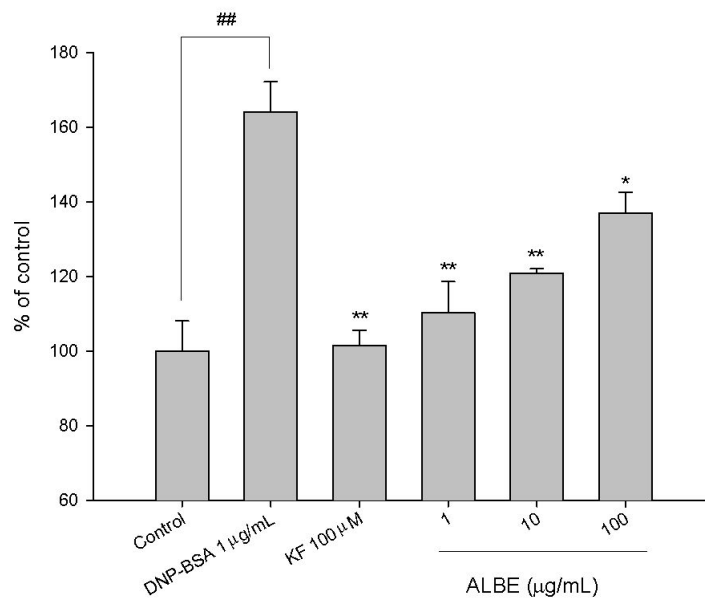
(1) 우영추출물의 RBL-2H3 (rat mast cell line) 비만세포주의 세포생존률 측정

우영추출물이 세포독성을 나타내지 않는 실험 가능한 농도를 찾음. 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 실험을 진행하게 됨.



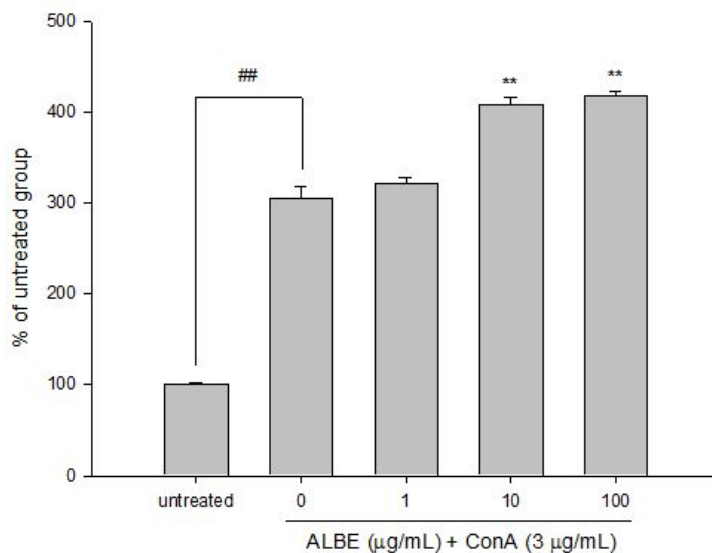
(2) 우영추출물의 β -hexosaminidase 분비억제효과

RBL-2H3 비만세포 DNP-BSA 항원자극에 대한 β -hexosaminidase 분비억제효과는 급성 항알러지 효과가 있음을 의미하는 것이며, 우영추출물 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 은 모두 β -hexosaminidase 분비억제를 나타내었고, 이는 항알러지효과가 있음을 의미함.



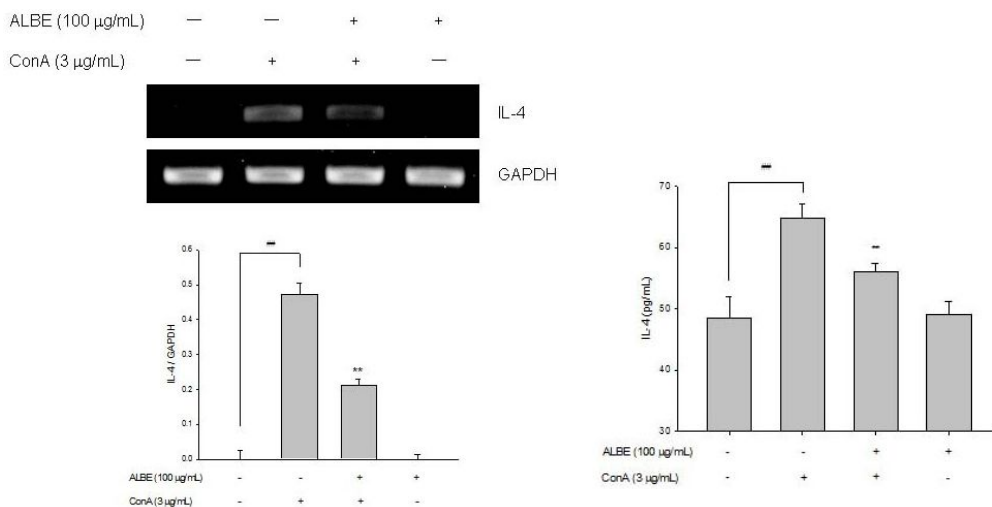
(3) 우영추출물의 primary splenocyte 세포에서의 mitogenic proliferation의 효과

ConA의 처리는 T세포의 세포증식능에 영향을 미치며 알러지를 유발하는 사이토카인을 분비하는 것으로 알려져 있음. 이러한 조건에서 우영부탄을 추출물이 비장세포의 세포증식능에 영향을 미치는지 알아봄. 우영추출물 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 은 T-cell mitogenic proliferation을 증가시킴. 면역세포의 증가를 의미함.



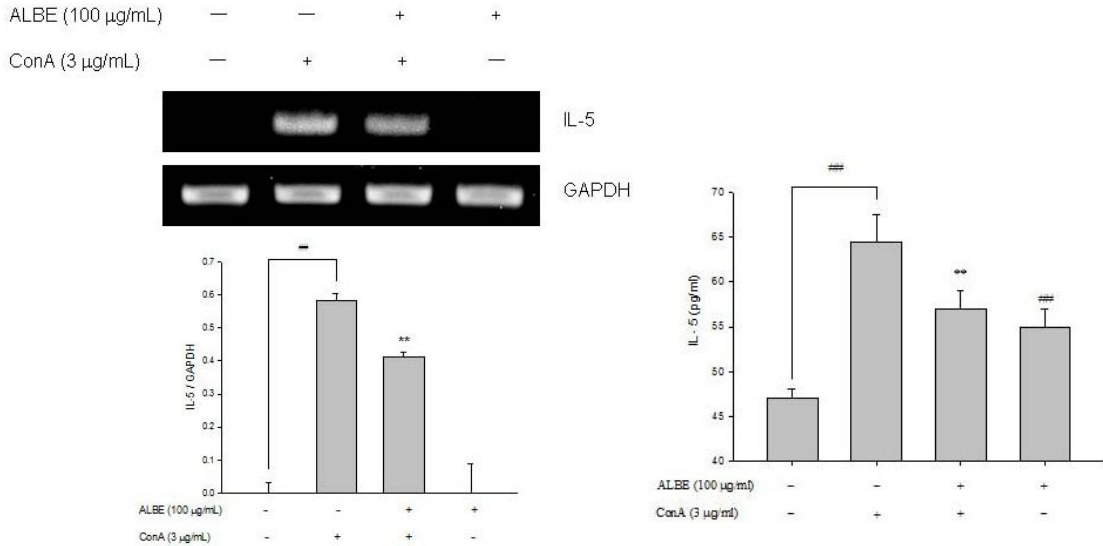
(4) IL-4 단백질과 IL-4 mRNA 발현에 대한 우영추출물의 억제조절효과

Primary splenocyte 세포에 ConA의 처리는 알러지 반응을 유발하는 IL-4 사이토카인을 분비하는 것으로 알려져 있음. 이러한 조건에서 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리가 IL-4 단백질의 분비와 IL-4 mRNA 발현을 억제함. 이는 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 항알러지 효과가 있음을 의미함.



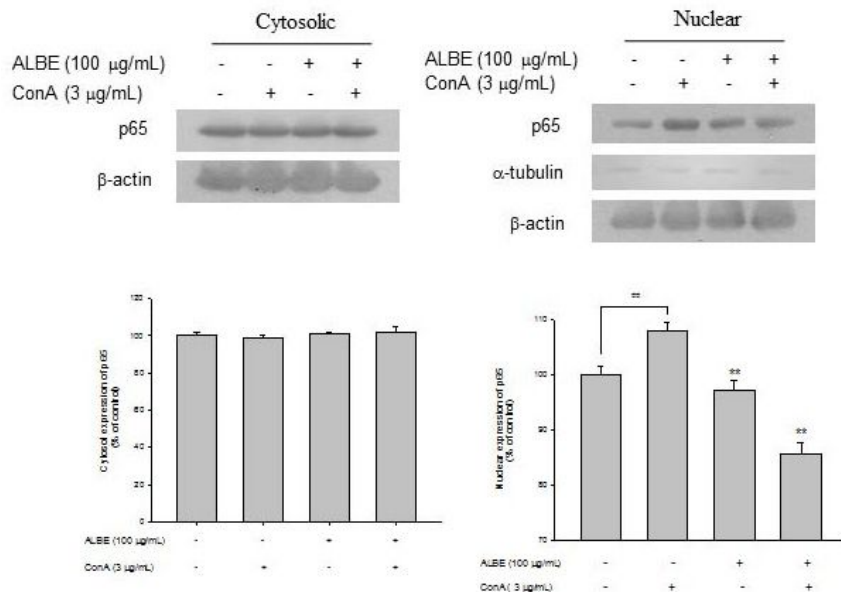
(5) IL-5 단백질과 IL-5 mRNA 발현에 대한 우영추출물의 억제조절효과

Primary splenocyte 세포에 ConA의 처리는 알려진 반응을 유발하는 IL-5 사이토카인을 분비하는 것으로 알려져 있음. 이러한 조건에서 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리가 IL-5 단백질의 분비와 IL-5 mRNA 발현을 억제함. 이는 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 항알러지 효과가 있음을 의미함.



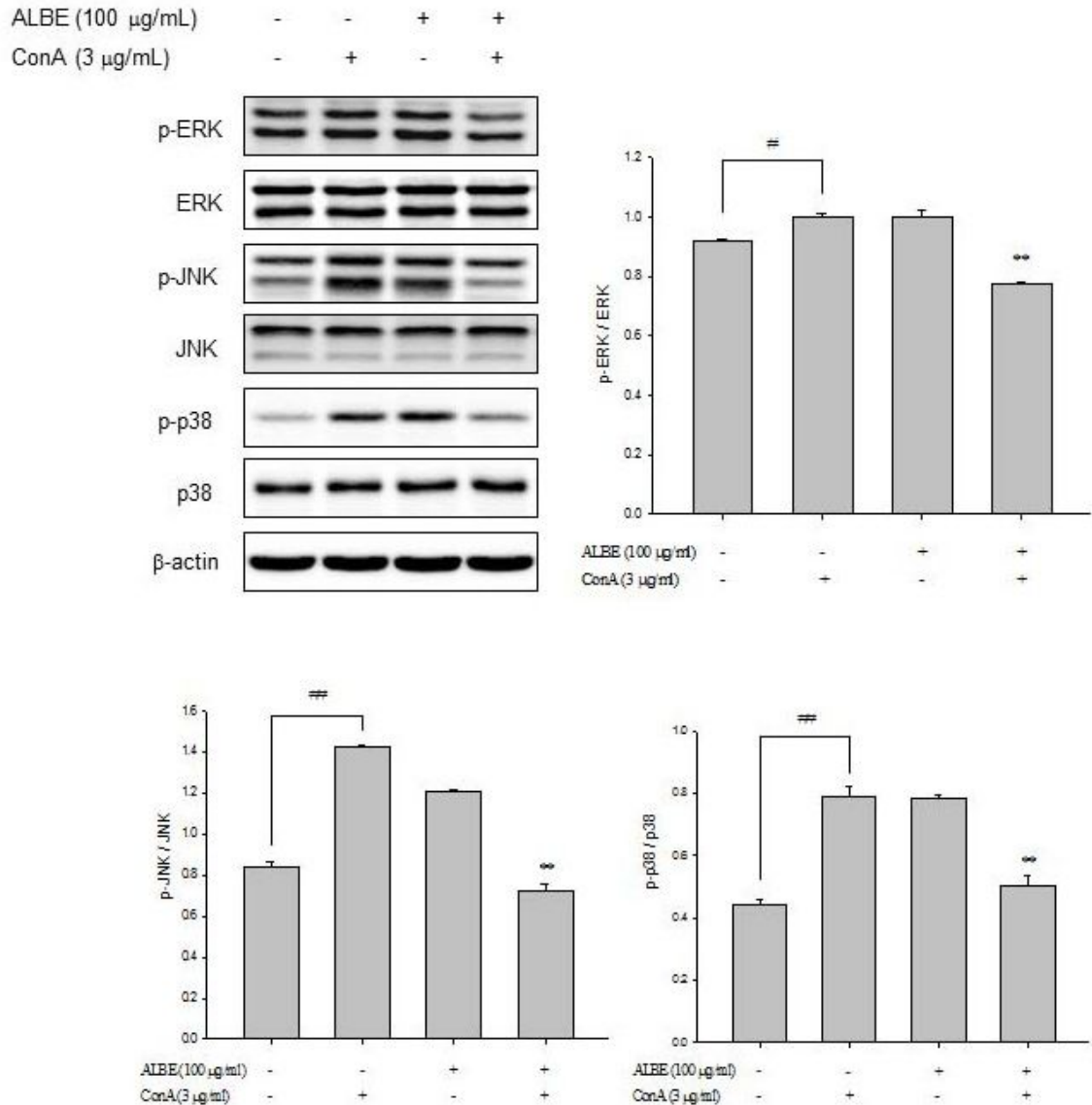
(6) 전사인자 NF- κB (p65)의 핵내 translocation에 대한 우영추출물의 억제조절효과

Primary splenocyte 세포에 ConA의 처리는 염증 반응을 유발하는 NF- κB (p65)의 핵내 translocation을 유발함. 이러한 조건에서 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리가 NF- κB (p65)의 핵내 translocation을 억제함. 이는 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 항염증 효과가 있음을 의미함.



(7) MAPKs 활성화에 대한 우영추출물의 억제조절효과

Primary splenocyte 세포에 ConA의 처리는 염증 반응을 유발하는 세포내 MAPKs 활성화가 이루어짐. 이러한 조건에서 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리가 MAPKs 활성화를 억제함. 이는 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 항염증 효과가 있음을 의미함.

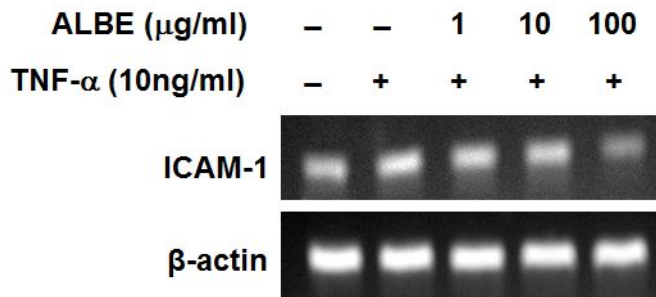


나. 우영 부탄올 추출물이 ICAM-1과 NO조절에 미치는 항염증효과

(1) TNF- α 에 의한 염증반응에서의 ICAM-1 발현 억제조절효과

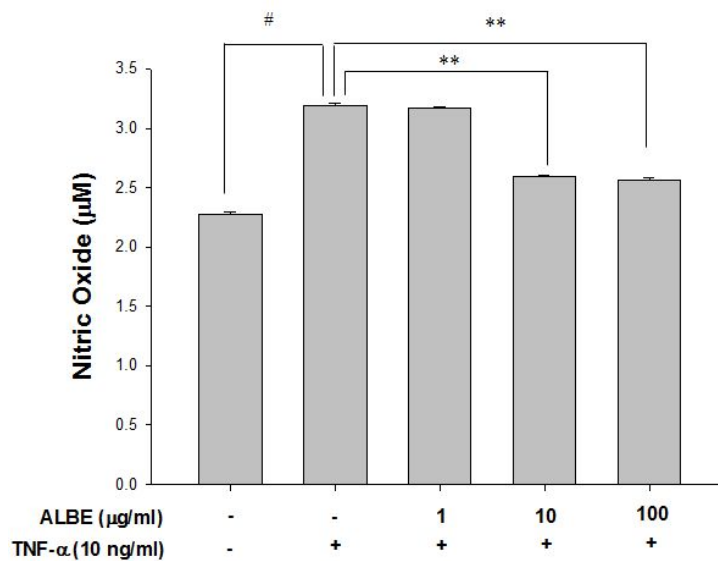
TNF- α 의 처리는 인간상피세포의 ICAM-1의 발현을 유도하여 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있음. 이러한 조건에서 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 A549 (human lung adenocarcinoma epithelial cell line) 인간상피세포의 ICAM-1 mRNA의 발현을 억제조절

하고 있음을 보여줌. 이는 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 항염증 효과가 있음을 의미함.



(2) TNF- α 에 의한 염증반응에서의 NO 분비에 대한 억제조절효과

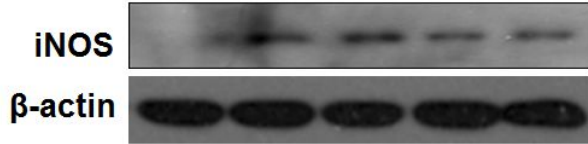
TNF- α 의 처리는 인간상피세포의 NO 분비를 증가하여 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있음. 이러한 조건에서 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 A549 인간상피세포의 NO 분비에 대한 억제조절하고 있음을 보여줌. 이는 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 항염증 효과가 있음을 의미함.



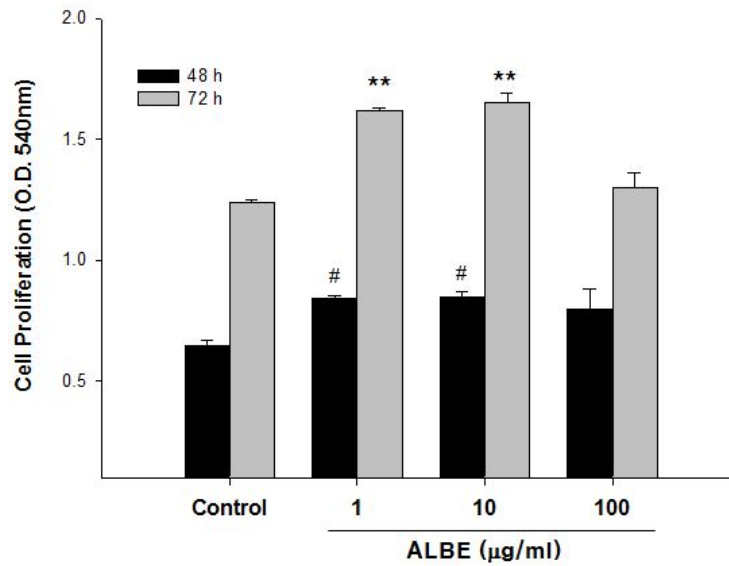
(3) TNF- α 에 의한 염증반응에서의 NO 분비에 관여하는 iNOS 발현억제조절효과

TNF- α 의 처리는 인간상피세포의 NO 분비에 관여하는 iNOS를 증가하여 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있음. 이러한 조건에서 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 A549 인간상피세포의 NO 분비에 관여하는 iNOS 발현에 대한 억제조절하고 있음을 보여줌. 이는 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 항염증 효과가 있음을 의미함.

ALBE ($\mu\text{g/ml}$)	-	-	1	10	100
TNF- α (10ng/ml)	-	+	+	+	+



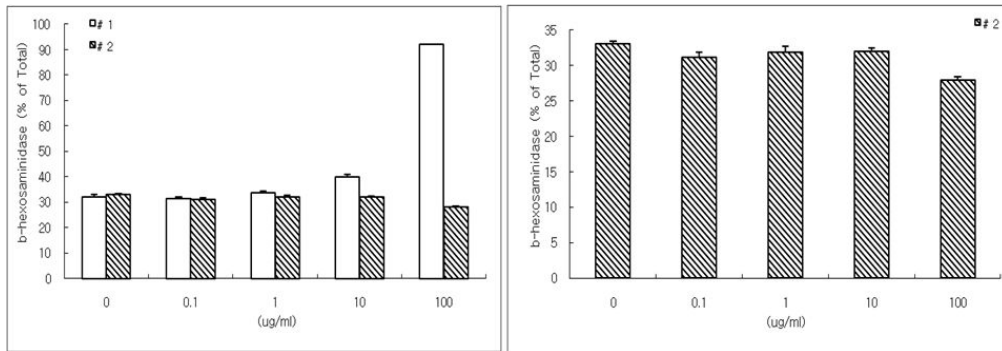
(4) 피부각질형성세포 HaCaT (human immortalized keratinocyte)의 세포증식률의 측정
우영추출물이 피부각질형성세포 HaCaT의 세포증식능을 증가시켰음. 이는 우영추출물
10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 피부재생에 효과가 있을 가능성이 있음을 의미함.



다. 우영 유효성분의 항알러지 및 항염증 효과

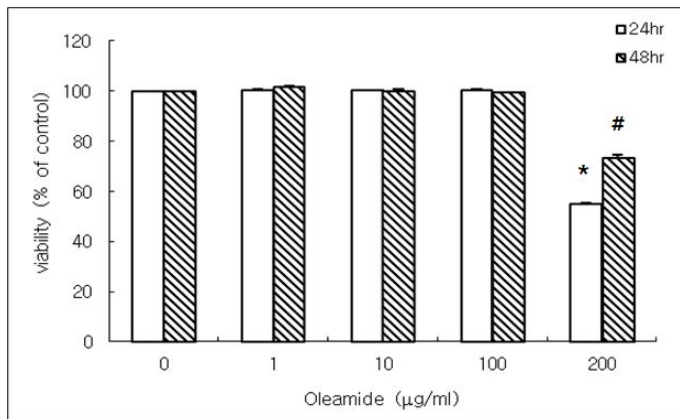
(1) 2,4-di-tert-butyl-phenol과 oleamide에 대한 항알러지 및 항염증효과를 측정

우영추출물의 항알러지효과에 대한 유효성분으로 예측되는 (#1) 2,4-di-tert-butyl-phenol과 (#2) oleamide에 대한 RBL-2H3 비만세포의 DNP-HAS 항원자극에 의한 β -hexosaminidase 분비의 억제효과를 비교 측정함. 실험결과 oleamide 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 β -hexosaminidase 분비억제효과가 나타남.



(2) Oleamide에서 RBL-2H3 (rat mast cell line) 비만세포주의 세포생존률 측정

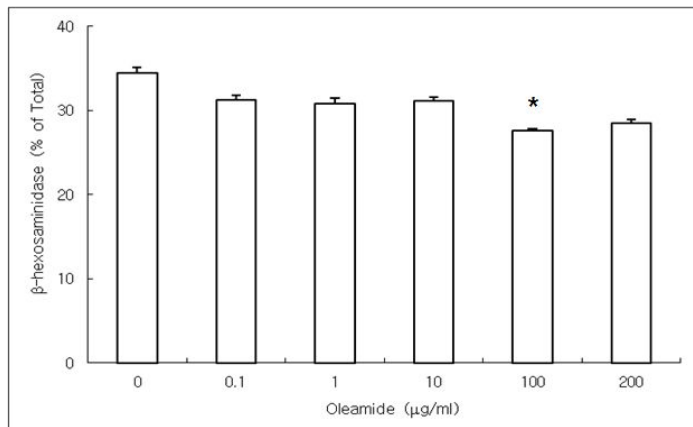
우영유효성분 oleamide가 세포독성을 나타내지 않는 실험 가능한 농도를 찾음. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 세포독성이 일어남으로 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 실험을 진행하게 됨.



P<0.001

(3) Oleamide의 β -hexosaminidase 분비억제효과 재측정

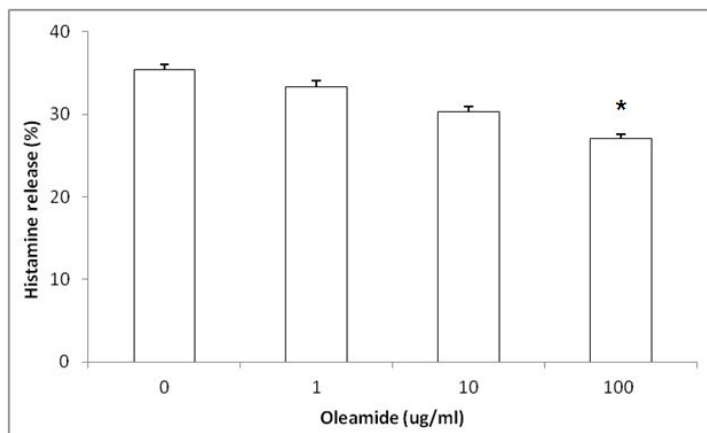
β -hexosaminidase 분비억제는 급성 항알러지 효과가 있음을 의미하는 것임. 우영유효 성분 oleamide 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 β -hexosaminidase 분비억제를 나타내었으며, 이는 항알러지효과가 있음을 의미함.



P<0.001

(4) Oleamide의 히스타민 (histamine) 분비억제효과 측정

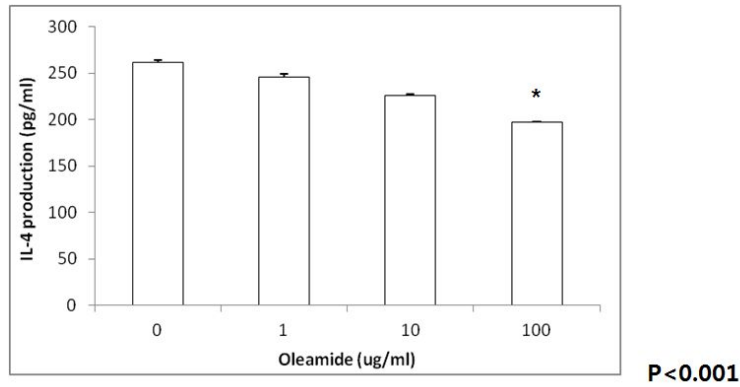
히스타민 분비억제는 급성 항알러지 효과가 있음을 의미하는 것임. 우영유효성분 oleamide 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 히스타민 분비억제효과를 나타내었으며, 이는 β -hexosaminidase 분비억제효과와 함께 항알러지 효과가 있음을 의미함.



P<0.001

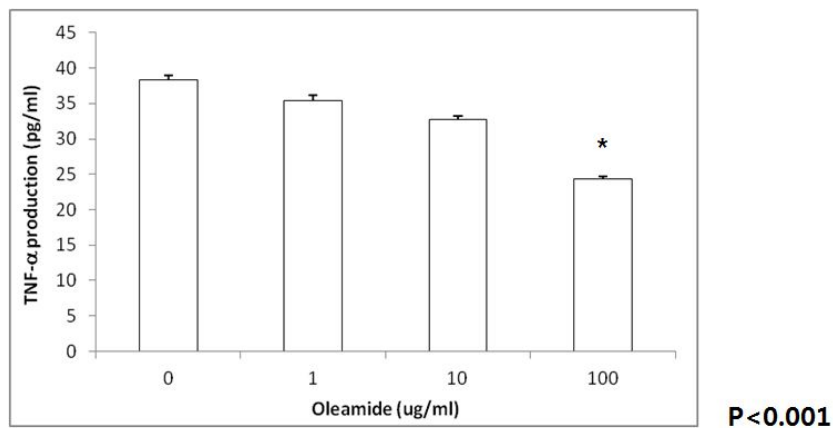
(5) Oleamide의 IL-4 단백질의 분비에 대한 억제효과 측정

DNP-HAS 항원자극에 대한 알러지 반응에서 대표적으로 IL-4 단백질이 분비되는 것으로 알려져 있음. 이러한 조건에서 우영유효성분 oleamide 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리가 IL-4 단백질의 분비를 억제함. 이는 우영유효성분 oleamide 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 항알러지 효과가 있음을 의미함.



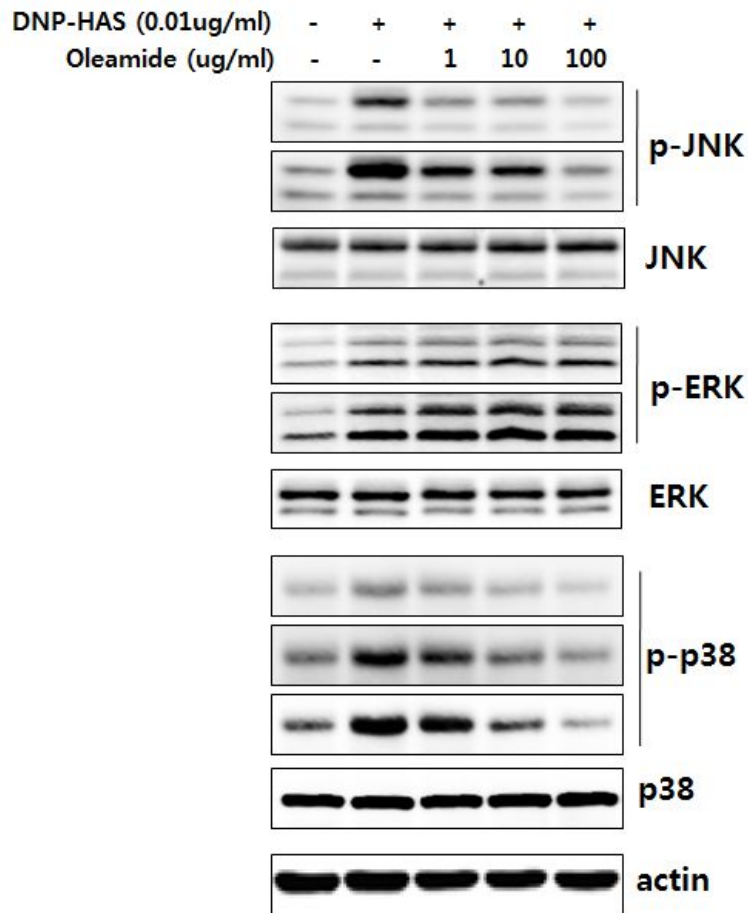
(6) Oleamide의 TNF- α 단백질의 분비에 대한 억제효과 측정

DNP-HAS 항원자극에 대한 염증 반응과 관련된 TNF- α 사이토카인이 분비되는 것으로 알려져 있음. 이러한 조건에서 우영유효성분 oleamide 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리가 TNF- α 단백질의 분비를 억제함. 이는 우영유효성분 oleamide 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 항염증 효과가 있음을 의미함.



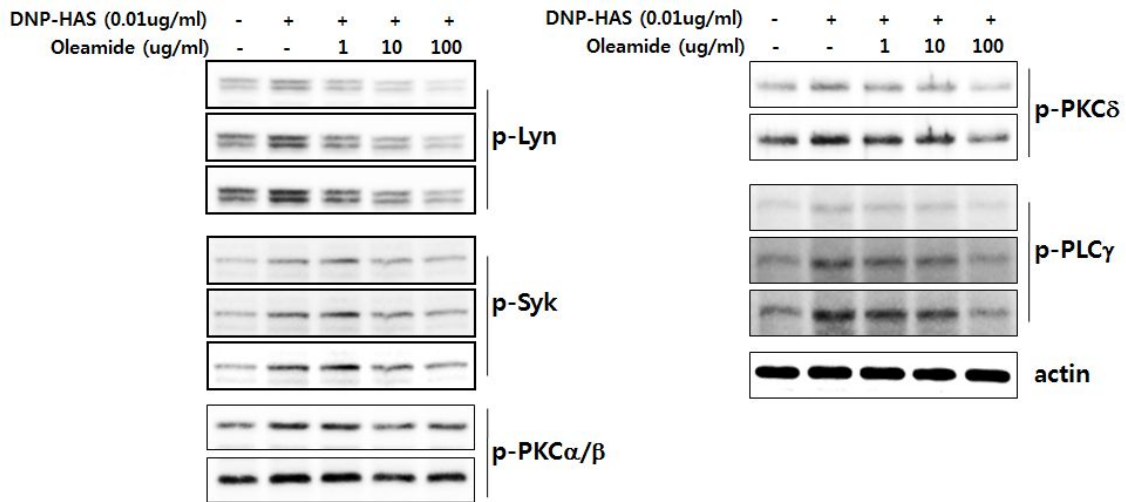
(7) Oleamide의 MAPKs 활성화에 대한 억제조절효과 측정

DNP-HAS 항원자극에 대한 염증 반응을 유발하여 세포내 MAPKs 활성화가 이루어짐. 이러한 조건에서 우영추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리가 MAPKs 활성화를 억제함. 이는 우영유효성분 oleamide 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 항염증 효과가 있음을 의미함.



(8) 항원수용체 FcεRI의 신호전달기전인 Lyn, Syk, PKC, PLC 활성화에 대한 우영유효 성분 oleamide의 억제조절효과 측정

DNP-HAS 항원자극에 대한 항원수용체 FcεRI의 신호전달기전으로 알려진 Lyn, Syk, PKC, PLC가 활성화 됨. 이러한 조건에서 우영유효성분 oleamide 100 μg/mL의 처리가 Lyn, Syk, PKC, PLC 활성화를 억제함. 이는 우영유효성분 oleamide 100 μg/mL가 항알러지 효과가 있음을 의미함.



9. 인체적용 시험

가. 연구대상 및 방법

(1) 대상

임상연구 모집 공고를 통하여 세명대학교 부속 제천한방병원 한방안이비인후피부과에 내원하여 한방안이비인후피부과 전문의 및 전문수련의의 진료 후 Hanifin과 Rajka의 기준에 의해 아토피 피부염으로 진단된 만 16세 이상 환자 중 피험자 선진기준에 합당하고 제외기준에 해당하지 않는 환자를 대상으로 2011년 4월 ~ 6월 20일까지 임상연구를 진행

(가) 또한 임상연구에 들어가지 전, 피험자에게 임상연구의 목적과 내용에 대해서 상세히 설명을 한 후, 피험자 동의서에 서명한 환자들만을 연구에 참여시켰다. 연구에 참여하게 된 37명 중에서 동의철회, 순응도 미달, 계획서 위반 등으로 중도 탈락한 4명을 제외한 33명을 대상

(나) 선정기준

- ① Hanifin과 Rajka의 진단기준에 따라 주소건중 3개 이상, 부조건 중 3개 이상의 증상이 있는 아토피 피부염 환자
- ② 치료를 받지 않을 정도로 심하지 않은 아토피 피부염을 가진 환자
- ③ 본 임상시험에 자의로 참여를 결정하고 동의서에 서명한 환자
- ④ 피험자 제외기준에 포함되지 않은 자

(다) 제외기준

- ① 심한 아토피 피부염으로 약물치료(항히스타민제, 부신피질 호르몬제, 한약 등)를 하고 있는 환자

- ② 면역계에 영향을 미치는 특별한 치료제를 사용하고 있는 환자
- ③ 본 시험에 영향을 줄 수 있다고 생각되는 건강보조식품을 복용하고 있는 환자
- ④ 아토피 피부염 치료목적으로 외용약이나 보습제를 사용하고 있는 환자
- ⑤ 임신부, 수유부 또는 적절한 피임 방법을 사용하지 않는 가임기 여성
- ⑥ 기타 위의 사항들 외에 시험책임자의 판단으로 연구 수행이 곤란하다고 판단되는 환자

(라) 임상연구에 사용되는 시험 제품과 대조 제품은 (주)이수제약의 제품을 사용함

(마) 시험 제품(실험군)

- ① 제품명 : 우엉추출물을 함유한 크림
- ② 제형 : 크림
- ③ 저장방법 : 고온이나 저온 직사광선을 피하고 일반적인 화장품 보관방법에 준함
- ④ 대상인원 : 17명(남자 10명, 여자 7명)

(바) 대조 제품(대조군)

- ① 제품명 : Atopico skin care cream(일본 (주) 大島椿本舗에서 제조하고 (주)아토피 코에서 수입 판매)
- ② 제형 : 크림
- ③ 저장방법 : 고온이나 저온 직사광선을 피하고 일반적인 화장품 보관방법에 준함
- ④ 대상인원 : 16명(남자 4명, 여자 12명)

(사) 도포기간, 도포량 및 도포방법

- ① 도포기간
 - 제품의 도포기간은 4주간

② 도포량 및 도포방법

임상연구에 참여하기로 결정되면 실험군 또는 대조군으로 무작위 배정하여 사용상 주의사항을 교육하고 시험 제품 또는 대조 제품 4주 분량(100g 튜브용기 제품 2개)을 공급

(2) 평가항목

(가) 육안적 평가

① SCORAD Index

SCORAD의 임상평가 지표를 기준으로 시험 전과 시험 종료 후 extent criteria, intensity criteria, subjective symptoms에 대한 total score를 계산하여 SCORAD

Index를 관찰

② 이미지 촬영

임상연구에 참여한 연구대상자의 병변부위를 시험 전과 시험 종료 후 (주)SOMETECH의 의료용 화상시스템인 DCS-104T를 이용하여 이미지 촬영

(나) 혈액학적 검사

- ① 혈액검사는 임상병리실에서 연구대상자의 혈액을 6cc 정도 채취하여 이원검사센터로 보내 Total IgE와 Eosinophil을 측정
- ② Total IgE는 혈청의 샘플로 CENTUAR(USA)의 면역분석장비를 이용하였고, 측정 Reagent kit는 Total IgE (SIEMENSE, USA)를 사용하여 CLIA(Chemiluminescence Immuno Assay 화학발광면역측정법) 검사방법으로 측정
- ③ Eosinophil count는 말초혈액의 샘플로 XE-2100(Sysmax, Japan)을 이용하여 자동 혈구 계산법의 원리로 측정하였으며, 측정 Reagent kit는 STROMATOLASER-4DS를 사용하였으며, 정상범위 50.00~500.00/uL 이하로 평가

(다) 총괄적 유효성 평가 (Global assesment of efficacy)

연구대상자에게 제품 도포 후 4주째 증상의 전반적인 개선 상태를 5단계로 나누어 시험에 참가한 피험자와 이를 담당할 담당자가 평가

<총괄적 유효성 평가기준>

평가기준	증상의 호전 정도
1	증상이 없어졌음
2	전반적으로 증상이 뚜렷이 좋아짐
3	전반적으로 증상이 약간 좋아짐
4	치료전과 증상의 변화가 없음
5	치료전보다 증상이 나빠짐

(3) 평가결과

<아토피 피부염 진단기준>

아토피 피부염 진단기준	
주소견 major features	
1. 소양증 2. 성인에서는 굴측부 태선화, 유소아에서는 얼굴과 신측 병변 등의 특징적 소견 3. 만성, 혹은 만성 재발성 피부염 4. 아토피 질환의 과거력 혹은 가족력	
부소견 minor features	
피부증상 1. 건조피부 2. 심상성 어린선 3. 모공각화증(닭살) 4. 잔주름이 많은 손바닥 5. 비특이적 수족부 습진 6. 유두부 습진 7. 구순염 8. 백색 비강진(마른 비집) 9. 안와하부 피부주름 10. 앞목의 피부주름 11. 오тол도톨한 모공주위 피부 12. 습진의 이른 초발연령 13. 비정상적 면역학적 소견	14. 즉시형 피부반응(두드러기) 15. 증가된 혈중의 총 IgE 수치 16. 빈발하는 피부감염증 17. 음식물에 의한 이상반응 18. 이상 혈관반응 19. 안면부 창백 또는 홍조 20. 백색 피부묘기증 21. 아세칠콜린에 대한 지연성 혈관수축 반응 안과적 소견 22. 재발성 결막염 23. 원추각막 24. 아토피성 백내장 25. 검은 눈주위 피부

(가) 아토피 피부염 진단기준

Hanifin과 Rajka의 진단기준에 근거하여 대조군과 실험군의 주소견과 부소견을 비교하였다. 아토피 피부염 진단기준의 주소견과 부소견을 가로축에 숫자로 표시

(나) 육안적 평가

제품 도포 전과 도포 4주 후의 SCORAD Index를 비교, 대조군은 도포 전 27.1±12.2점, 도포 4주 후가 19.19±11.5로 감소하였고, 실험군은 도포 전 29.2±14.6점, 도포 4주 후가 20.51±13.47로 감소. 대조군과 실험군 모두 유의성 있는 감소를 보였는데 실험군이 대조군에 비해 유의성이 높게 나타남

<Change of SCORAD Index between baseline and after 4 weeks>

SCORAD Index	Control group (N=16)	Experimental group (N=17)	Total (N=33)
	Mean±S.D	Mean±S.D	Mean±S.D
Baseline	27.1±12.2	29.2±14.6	28.2±13.3
After 4 weeks	19.19±11.5	20.51±13.47	19.87±12.37
p-value	0.021	0.014	0.016

<Change of Total IgE>

Total IgE	Control group (N=16)	Experimental group (N=17)	Total (N=33)
	Mean±S.D	Mean±S.D	Mean±S.D
Baseline	370.87±392.89	993.64±1235.1	628.26±955.48
After 4 weeks	409.15±454.71	1037.1±1217.6	723.1±958.72

<Change of Eosinophil count>

Eosinophil count	Control group (N=16)	Experimental group (N=17)	Total (N=33)
	Mean±S.D	Mean±S.D	Mean±S.D
Baseline	160.69±143.59	246.38±213.73	203.53±184.32
After 4 weeks	153.81±125.9	203.25±163.08	178.53±145.5
p-value	0.051	0.023	0.038

(다) 총괄적 유효성 평가(Global assesment of efficacy)

4주간 임상연구 후 시험에 참여한 피험자와 시험 담당자에게 총괄적 유효성 평가를 실시, 피험자와 담당자 모두 대조군에 비해 실험군의 유효성이 높게 나타남

<Global assesment of efficacy>

		average	standard deviation
Total(N=33)		2.909	0.805
피험자	실험군(N=17)	2.875	0.619
	대조군(N=16)	2.94	0.97
Total(N=33)		2.909	0.804
담당자	실험군(N=17)	2.875	0.719
	대조군(N=16)	2.94	0.9

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

가. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭 등록	품종생 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도							1	-		
2차년도	1						2	1		
3차년도		1					1	1	1(임상)	
계	1	1					4	2	1	

나. 목표달성도

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				학술발표	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭 등록	품종생 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도										
2차년도							2	1		
3차년도	1						1		1(임상)	
종료후							2	1		
계	1						3	3	2	

1. 기술적 측면

- (1) 한방제제의 evidence-based therapy에 선도적으로 개발되어 과학적 근거에 기초한 약물작용기전의 규명으로 기존의 민간요법에 사용되었던 많은 효능 후보 물질들의 과학적 발굴이 기대됨
- (2) 원인을 알 수 없는 allergy 및 만성 염증 반응에 대한 면역조절에 대한 기전 연구는 과도한 면역반응을 억제하고자 하는 이식거부반응, autoimmunity 등의 면역질환 치료에 새로운 시각을 제공할 것임
- (3) 다양한 염증 반응을 수반하는 면역학적 질환의 치료제로 활용될 수 있으며, 각 세부과제간의 상호 체계적인 공동연구의 성과가 학제간 및 산학연간의 연구에 모범이 될 수 있음

<기술적 측면의 성과 달성도>

당초목표	기술성과 달성도
<p>■ 유효성분 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Activity guided fractionation / isolation 	<ul style="list-style-type: none"> ● 2종의 유효성분 규명 (성분분리, 구조규명) ● 50여종의 지표성분 규명 (GC-MS/LC-MS) (이중에서 1종 지표성분 설정) ● 유효성분 연구 초과달성
<p>■ 최적우영추출물 및 유효성분의 작용기전 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 만성 염증과 조직손상을 제어 항염증기전 ● 추출물 및 유효성분 대한 염증 성분(IL-1, IL-6, TNF-α, iNOS, COX-2 등)생성 억제 ● 분비성 cytokine 측정(ELISA 법, cytokine 단백질 (Western blot법), 유전자 발현 (RT-PCR법) ● IL-1, IL-6, TNF-α, iNOS, COX-2 등의 항염증 작용과 그 기전 (signal pathway) 규명 	<ul style="list-style-type: none"> ● DNP-BSA 항원자극에 의한 β-hexosaminidase 분비억제 ● T세포 증식능, 비장세포증식능을 통한 면역세포의 증가 ● IL-4 mRNA 및 단백질의 분비억제조절 효과 ● NF-κB (p65)의 핵내 translocation에 대한 우영추출물 및 성분의 억제조절효과 ● MAPKs 활성화에 대한 우영추출물 및 성분의 억제조절효과 ● TNF-α에 의한 염증반응에서의 ICAM-1 발현의 억제조절효과 ● TNF-α에 의한 염증반응에서의 NO 분비에 대한 억제조절효과 ● 피부각질형성세포 HaCaT의 세포증식능 증가 (피부재생)

2. 경제·산업적 측면

- (1) 전통 한방 소재를 이용한 신약개발의 초석이 될 것으로 기대함
- (2) Chemical 의약품에서 bio 의약품의 개발로 전환되는 시점에서 본 연구의 성공적인 수행사례는 많은 바이오의약품 발굴의 촉매역할을 할 것임
- (3) 화장품 제형별 4건 개발, 1건 시제품 완료 및 임상수행

3. 사회적 측면

- (1) 환경호르몬의 영향으로 인한 새로운 allergen의 노출에 대하여 보약으로 사용되었던 전통 의약처방을 이용한 예방학적 또는 1차적 방어책을 마련할 수 있음
- (2) 연구진행절차에 의한 allergy의 기전 연구 방법과 그 결과는 새로운 allergen에 대한 세분화된 기전연구의 주요 자료로 사용 됨
- (3) 한방 및 천연물 소재의 대중화 및 과학화에 중요한 사례로 남을 것임

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 : 실용화, 산업화 및 타연구에의 활용계획

1. 한방제제에 대한 아토피 개선의 작용기전 규명은 알러지성 결막염, 알러지성 비염, 알러지성 천식, 피부알러지 및 음식알러지 등의 광범위한 적응증을 가지고 있어 그 활용범위가 크게 확대 될 것임
 2. 향후 의약품 이외에도 개별인정형 건강 기능성 제품의 유효 성분 원료로써 활용
 3. 우영 추출물을 이용한 아토피 치료 및 피부를 위한 제품의 개발을 통한 의료비의 절감 효과 및 기존의 항히스타민 제제나 부신 피질 호르몬 제제 치료 약물의 대체 가능
 4. 아토피 또는 항염증치료에 대한 다양한 형태의 건강 기능 식품 개발과 신규 천연물 의약품 개발, lead chemical의 발굴 촉진
 - (1) 연구결과를 바탕으로 ethosome화 하였을 경우, 피부흡수율이 크게 개선되어 뛰어난 효능이 기대됨
 - (2) 의약품 정도의 치료효능이 입증된 화장품의 출시를 통하여 재구매 촉진
(아토피 화장품의 문제는 재구매율이 부족함, 뚜렷한 치료 효능을 나타낼 수 있는 화장품 개발이 필요)
- 우영의 유효성분 규명 : 논문투고 국내1편, 해외 1편
 - 우영의 지표성분 설정, 최적추출공정개발 : 국내1편
 - 유효성분 및 최적추출물에 대한 작용기전 : 해외 1편, 국내1편
 - 유효성분 및 최적추출물의 전임상 안전성, 유효성 평가 : 해외 1편
 - 우영추출물 및 용매분획물, 유효성분을 함유하는 아토피 조성물 : 특허출원
 - 최적추출물의 전임상 및 임상평가 : 해외 1편, 국내1편
 - 아토피 로션, 크림, 화장품 및 파우치 식품 개발
 - 국내외 유통 및 판매전략 수립, 판매, 화장품 및 원료의약 판매/수출

우영 소재에 기반한 예상 시장 규모 및 제품화 형태

- 슬로푸드형 외식 신메뉴 제품화
- 급식 및 간편조리용 식품가공 상품화
- 메드푸드(환자식) 식품가공 상품화
- 건강기능성 제품 상용화

❖ 외식 시장 예상 매출액

- Angel-in-Us, 스타 박스 및 기타 외식 전문점
- 1,000억 예상

❖ 전문 식자재(급식) 시장 예상 매출액

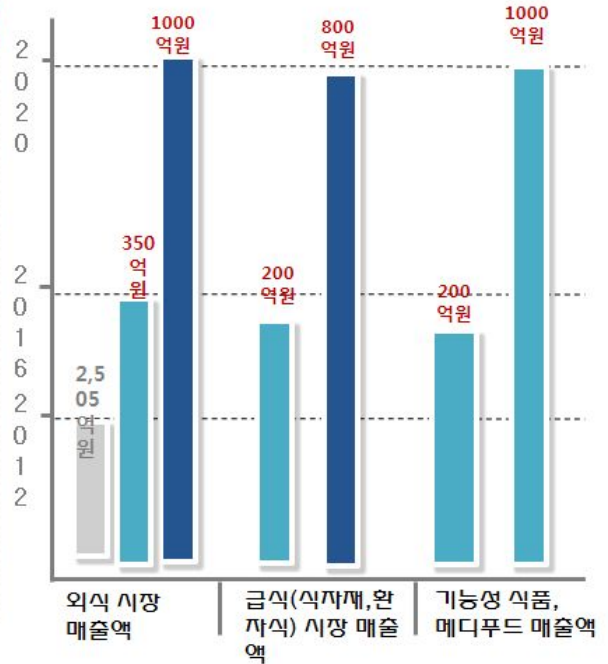
- 이랜드, 아모제과 공동 상품화
- 800억 예상

❖ 메디푸드(환자식 포함)의 예상 매출액

- 가천대학교, 경희대, 지방 병원 등의 Shop in shop
- 200억 예상

❖ 건강기능성식품의 예상 매출액

- (주)풀무원, (주)매일유업, (주)빙그레, (주)정식품과 공동 상용화
- 1,000억 예상



<국내외 판매, 마케팅 전략>

- 전문식자재 시장을 통한 유용성이 입증된 우영 시장 창출
 - 이랜드, 아워홈, 아모제과 등과의 공동상품화 추진
- 메디푸드
 - 지방병원 등의 shop in shop의 형태로 우영이 가미된 메디푸드 개발
- 건강기능식품 국내외 판매
 - 다양한 건강기능식품업체를 통하여 국내외 공동마케팅
- 참여기업의 의약외품 생산
 - 본 연구과제 수행 중, 참여기업에서 의약외품 생산라인 완공
 - 의약외품으로 크림, 로션형태의 약국유통용 아토피 치료제 개발 예정

제2절 : 특허, 논문 등 지식재산권 확보계획

1. 기투고 논문

가. Clinical and Molecular allergy (2011)

Sohn et al. *Clinical and Molecular Allergy* 2011, **9**:4
<http://www.clinicalmolecularallergy.com/content/9/1/4>



RESEARCH

Open Access

Anti-allergic and anti-inflammatory effects of butanol extract from *Arctium Lappa L*

Eun-Hwa Sohn¹, Seon-A Jang¹, Haemi Joo², Sulkyoung Park¹, Se-Chan Kang³, Chul-Hoon Lee⁴, Sun-Young Kim^{5*}

Abstract

Background: Atopic dermatitis is a chronic, allergic inflammatory skin disease that is accompanied by markedly increased levels of inflammatory cells, including eosinophils, mast cells, and T cells. *Arctium lappa L.* is a traditional medicine in Asia. This study examined whether a butanol extract of *A. lappa* (ALBE) had previously unreported anti-allergic or anti-inflammatory effects.

Methods: This study examined the effect of ALBE on the release of β -hexosaminidase in antigen-stimulated-RBL-2H3 cells. We also evaluated the ConA-induced expression of IL-4, IL-5, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and nuclear factor (NF)- κ B using RT-PCR, Western blotting, and ELISA in mouse splenocytes after ALBE treatment.

Results: We observed significant inhibition of β -hexosaminidase release in RBL-2H3 cells and suppressed mRNA expression and protein secretion of IL-4 and IL-5 induced by ConA-treated primary murine splenocytes after ALBE treatment. Additionally, ALBE (100 μ g/mL) suppressed not only the transcriptional activation of NF- κ B, but also the phosphorylation of MAPKs in ConA-treated primary splenocytes.

Conclusions: These results suggest that ALBE inhibits the expression of IL-4 and IL-5 by downregulating MAPKs and NF- κ B activation in ConA-treated splenocytes and supports the hypothesis that ALBE may have beneficial effects in the treatment of allergic diseases, including atopic dermatitis.

Background

Atopic dermatitis is a chronic, allergic inflammatory skin disorder characterized by pruritic chronic eczema, elevated serum IgE levels, and massive cellular infiltrates, including eosinophils, mast cells, and lymphocytes [1,2]. Because mast cells play essential roles in provoking the pathogenesis of allergic reactions via the degranulation process, measuring the degree of degranulation reflects the level of mast cell activation. β -Hexosaminidase released by these cells during this process has been reported to be a suitable marker for determining the degree of degranulation [3]. After an allergen triggers the allergic reactions, allergic mediators, including histamine, cytokines, and arachidonic acid derivatives, provoke acute and chronic allergic inflammation responses [4,5]. Various cells involved in the allergic reaction infiltrate the lesion. Among these, T helper 2 (Th2) cells are the most important cell type involved in atopic dermatitis

development. Th2 cells release cytokines, such as IL-4, IL-5, and IL-13, in allergic inflammation and atopic dermatitis. The cytokines released by Th2 cells lead to the proliferation and activation of both mast cells and eosinophils in atopic and allergic skin inflammation, consequently leading to pruritus and impaired skin barrier function [6]. In particular, IL-4 contributes to the expansion of the Th2 cell subset from naive T cells and the isotype switching of B cells to produce IgE against specific environmental allergens [7]. Cytokines, such as IL-4 and IL-5, are representative markers of the allergic reaction, based on their roles against allergens.

Arctium lappa L. is a popular edible vegetable cultivated in many countries. The roots are widely used in food, whereas the seeds are used in traditional medicine as diuretic, antipyretic, or detoxifying agents [8]. There are reports that *A. lappa* has anti-inflammatory [9], free radical scavenging [10], and antioxidant [11] activities, and that components [12] also have desmutagenic [13] and hepatoprotective [14] effects. Although *A. lappa* and its components have these biological activities, no reported study has evaluated the anti-allergic or anti-inflammatory

* Correspondence: nel1205@hanmail.net

⁵Department of Pediatrics, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, 133-792, Korea

Full list of author information is available at the end of the article



© 2011 Sohn et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

나. 한국자원식물학회지 (2012년 2월)

우엉뿌리추출물이 ICAM-1과 NO조절에 미치는 항염증효과

김예진, 강세찬¹, 남궁승², 정명근, 손은화*

강원대학교 생약자원개발학과, ¹세명대학교 자연약재과학과, ²강원대학교 물리치료학과

Anti-inflammatory effects by *Arctium lappa* L. root extracts through the regulation of ICAM-1 and Nitric Oxide

Ye-Jin Kim, Se-Chan Kang¹, Seung Namkoong², Myoung-Gun Choung and
Eun-Hwa Sohn *

Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok
245-907, Korea

¹Department of Natural Medicine Resources, Semyung University, Jecheon 309-711,
Korea

²Department of Physical Therapy, Kangwon National University, Samcheok 245-907,
Korea

Correspondence to: Eun-Hwa Sohn
Department of Herbal Medicine Resource
Kangwon National University
Samcheok, Gangwon-do, 245-711
Republic of Korea
Phone: +82-33-540-3322
FAX: +82-33-574-3329
E mail: ehson@kangwon.ac.kr

2. 지식재산권 (특허출원 중 - 명세서 스캔본)

【요약서】

【요약】

본 발명은 우엉 (*Arctium lappa L.*) 추출물 또는 이로부터 분리된 oleamide를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 우엉에서 분리된 oleamide 및 이를 포함하는 우엉 추출물에서 항알레르기 및 항염 효과를 확인하였으며, 이에 대하여 본 발명은 알레르기, 아토피, 염증 예방 및 치료용 조성물로 사용할 수 있는 우엉 추출물 및 이 추출물로부터 분리된 oleamide를 분리하는 방법과 이 성분들을 최적의 조건으로 포함할 수 있는 공정방법에 관한 것이다.

즉, 본 발명에 따른 우엉 추출물 및 oleamide는 비만세포를 포함하는 면역세포에서의 탈과립화 및 히스타민 방출을 억제하며, 이에 대한 분자적 지표에서도 매우 우수한 발현 및 억제 양상을 나타내어 알레르기, 아토피 및 염증 치료에 매우 유효한 약학 조성물로 사용할 수 있다.

【대표도】

도 2

【색인어】

우엉 추출물, oleamide, 아토피, 알레르기, 항염

3. 학술대회 발표

가. 2010 - 춘계약학회

(1) In vitro effects of butanol extract of *Arctium lappa* L. on anti-allergic inflammation. NS Kang, SC Kang, H Joo, DH Jung, EH Sohn

(2) 2010 대한약학회 춘계학술대회, 대구컨벤션 EXCO/ P7-75, 2010.4-15-16



P7-75 In Vitro Effects of Butanol Extract of *Arctium lappa* L. on Anti-allergic Inflammation

KANG Nam-Sung, KANG Se-Chan¹, JOO Haemi, JUNG Da Hye, SOHN Eun-Hwa^{2*}

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Korea. ¹Department of Natural Medicine Resources, Semyung University, Korea. ²Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Korea.

*Corresponding author: ehson@kangwon.ac.kr


Atopic dermatitis(AD) is characterized by a allergic and chronic inflammatory skin disease, which is accompanied by marked increases of inflammatory cells including mast cells and T cells. *Arctium lappa* L. has been used as a traditional medicine in Korea and it has known to have antioxidant, anti-diuretic, antipyretic, anti-inflammatory or detoxifying activities. In this study, we investigated the effects of *Arctium lappa* butanol extract (ALBE) on IgE-mediated allergic response in rat mast RBL-2H3 cells and expression of IL-4, IL-5 in splenocytes induced by ConA and its mechanisms. ALBE markedly inhibited β -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells and suppressed the expressions of mRNA and production of IL-4 and IL-5 induced by ConA-treated splenocytes from mice. Moreover, the ALBE (100ug/ml) has suppressive effects on NF- κ B and phosphorylation of p38 MAPK in ConA-treated splenocytes. These results strongly support that ALBE may be beneficial for the treatment of allergic diseases, including AD. This study was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Korea.

나. 2010-한국약용작물학회

**2010년도
한국약용작물학회 심포지엄 및 춘계학술발표회
(안내 및 발표요지)**

제 18 권 별책 1 호 2010년 4월 22일~23일

- 일시 : 2010. 4. 22(목)~23(금)
- 장소 : 정선군 하이원호텔
- 주최 : 한국약용작물학회
- 주관 : 강원참기특화작목산학협력단
- 후원 : 정선군, 한국연구재단, 한국과학기술단체총연합회

 **한국약용작물학회**

II-56

우영추출물의 비만세포 탈과립화 억제 효과
이수재약(주) : 양용석, 임우찬, 세명대학교 : 김현우, 정용관, 양윤정, 박대원, 우한구, 권진아, 권정은, 임수연, 김세찬*

Inhibitory effects of degranulation by *Arctium lappa* extracts on the mast cells
R&D Center of Li-Su Pharm Co. Ltd., Jecheon, 390-250, Korea
Department of Natural Medicine Resources, Semyung University, Jecheon, 309-711, Korea
Woong-Suk Yang, Woo-Chan Lim, Hyun-Woo Kim, Yong-Joon Cheong, Yun-Jung Yang, Dae-Won Park, Han-Goo Woo, Jin-A Kwon, Joung-Eun Kwon, Su-Yeon Lim, Se-Chan Kang*

실험목적 (Objectives)

Mast cell plays a crucial role in the development of allergic diseases and inflammatory processes such as asthma, mastocytosis, inflammatory arthritis and autoimmune disease. β -Hexosaminidase is stored in the secretory granules of mast cells and released when activated mast cell is degranulated. The degranulation of RBL-2H3 cell rat basophil cell line by antigen can be monitored by the release of β -hexosaminidase. Therefore, we carried out *in vitro* assay for *A. lappa* extracts and inhibition of systemic anaphylaxis and passive cutaneous anaphylaxis (PCA) *in vivo*.

재료 및 방법 (Materials and Methods)

○ 실험재료
The *A. lappa* was purchased from HMAX Co., Ltd. (Jecheon, Korea) and RBL-2H3 cell line was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, USA).
○ 실험방법
The *A. lappa* was extracted with 30%, 70% and 95% EtOH and the extract of 30% EtOH was selected because of their the most highest inhibitory degranulation activity. The *A. lappa* was extracted with 30% EtOH and fractionated by polarity in sequence of *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-butanol and water. The male ICR mice and SD rats were used for systemic anaphylaxis and PCA studies.

실험결과 (Results)

As a result, *A. lappa* extract from 30% EtOH and *n*-butanol fractions showed high degree of inhibitory degranulation. Also the extract inhibited allergic reactions in systemic anaphylaxis and PCA studies. In conclusion, this study suggest that *A. lappa* extract have an anti-allergic activities such as inhibitory of degranulation and anaphylaxis. These activities might offer a possibility of development on *A. lappa* as an anti-atopic drug.

주저자 연락처 : 강세찬 E-mail : sckang@semyung.ac.kr Tel : 010-8950-1273

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 과제와 관련된 해외 출장은 없었으나, 본 연구 수행 및 논문작성시 참고문헌에 기재된 바와 같이 해외과학기술정보를 수집하였음

제 7 장 참고문헌

- Chen, F.A., A.B. Wu and C.Y. Chen. 2004. The influence of different treatment on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active components. *Food Chem.* 86:479-484.
- Esposito, E. and S. Cuzzocrea. 2007. The role of nitric oxide synthases in lung inflammation. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 8(11):899-909.
- Fuchigami, M., Y. Kishigami and A. Sasaki. 1990. Pectic polysaccharides in edible burdock root. *Journal of Home Economics Japan* 41:947 - 962.
- Fukamizu, R., M.H. Jang and M. Miyasaka. 2009. The role of eosinophils in allergic inflammation and intestinal immunity. *Nippon Rinsho.* 67(11):2088-2093.
- Heo, Y. and H.A. Kim. 2008. Correlation between skin prick test and enzyme-linked immunoabsorbent assay using serum for identification of subjects positive to major respiratory allergens. *J. Env. Hlth. Sci.* 24(5):369-373.
- Ishihara, K., N. Yamagishi, Y. Saito, M. Takasaki, T. Konoshima and T. Hatayama. 2006. Arctigenin from *Fructus Arctii* is a novel suppressor of heat shock response in mammalian cells. *Cell Stress Chaperones* 11(2):154-161.
- Jeong, J.B., S.C. Hong, H.J. Jeong and J.S. Koo. 2011. Arctigenin induces cell cycle arrest by blocking the phosphorylation of Rb via the modulation of cell cycle regulatory proteins in human gastric cancer cells. *Int. Immunopharmacol.* (in press)
- Kou, X., S. Qi, W. Dai, L. Luo and Z. Yin. 2011. Arctigenin inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS expression in RAW264.7 cells through suppressing JAK-STAT signal pathway. *Int. Immunopharmacol.* 11(8):1095-102.
- Kwon, S., R.L. Newcomb and S.C. George. 2001. Mechanisms of synergistic cytokine-induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells. *Nitric Oxide* 5(6):534-546.
- Maruta, Y., J. Kawabata and R. Niki. 1995. Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium lappa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 43:2592 - 2595.
- Matsuzaki, Y., M. Koyama, T. Hitomi, T. Yokota, M. Kawanaka, A. Nishikawa, D. Germain and T. Sakai. 2008. Arctiin induces cell growth inhibition through the down-regulation of cyclin D1 expression. *Oncol. Rep.* 19(3):721-727.
- Morita KY, Nishijima Y, Kada T. 1985. Chemical nature of a desmutagenic factor from burdock (*Arctium lappa* Linne). *Agric. Biol. Chem.* 49:925 - 932.
- Lebovidge, J.S., H. Strauch, L.A. Kalish and L.C. Schneider. 2009. Assessment of psychological distress among children and adolescents with food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124(6):1282-1288.

- Lin, C.C., J.M. Lu, J.J. Yang, S.C. Chuang and T. Ujiie. 1996. Anti-inflammatory and radical scavenge effects of *Arctium lappa*. Am. J. Chin. Med. 24:127 - 137.
- Lin, S.C., C.H. Lin, C.C. Lin, Y.H. Lin, C.F. Chen, J.C. Chen and L.Y. Wang. 2002. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride tetrachloride. J. Biomed. Sci. 9:401 - 409.
- Park, S.Y., S.S. Hong, X. Han, J.S. Hwang, D. Lee, J.S. Ro and B.Y. Hwang. 2007. Lignans from *Arctium lappa* and their inhibition of LPS-induced nitric oxide production. Chem. Pharm. Bull. 55:150 - 152.
- Schaefer, L. and K. Kragballe. 1991. Abnormalities in epidermal lipid metabolism in patients with atopic dermatitis. J. Invest. Dermatol. 96:10-15.
- Sohn, E.H., S.A. Jang, H. Joo, S. Park, S.C. Kang, C.H. Lee and S.Y. Kim. 2011. Anti-allergic and anti-inflammatory effects of butanol extract from *Arctium Lappa* L. Clin. Mol. Allergy 9(1):4.
- Strieter, R., S. Kunkel and R. Bone. 1993. Role of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Disease States and Inflammation. Critical Care Medicine 21:S447-S463.
- Wu, J.G., J.Z. Wu, L.N. Sun, T. Han, J. Du, Q. Ye, H. Zhang and Y.G. Zhang. 2009. Ameliorative effects of arctiin from *Arctium lappa* on experimental glomerulonephritis in rats. Phytomedicine 16(11):1033-1041.
- Xu, Y. and S. Li. 2009. Blockade of ICAM-1: a novel way of vasculitis treatment. Biochem. Biophys. Res. Commun. 459-461

주 의

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