



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년10월16일
 (11) 등록번호 10-1908342
 (24) 등록일자 2018년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 8/9789 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)
 A61Q 19/02 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
 A61K 8/9789 (2017.08)
 A61Q 19/00 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2017-0168077
 (22) 출원일자 2017년12월08일
 심사청구일자 2017년12월08일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020080036302 A*
 KR1020150059551 A*
 KR1020150019577 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 재단법인 전남생물산업진흥원
 전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
 (72) 발명자
 정용기
 전라남도 장흥군 장흥읍 동교3길 5, 403호 (정하
 e시티주상복합)
 김건우
 전라남도 순천시 이수1길 54-1(덕암동)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 김정현

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 김현태

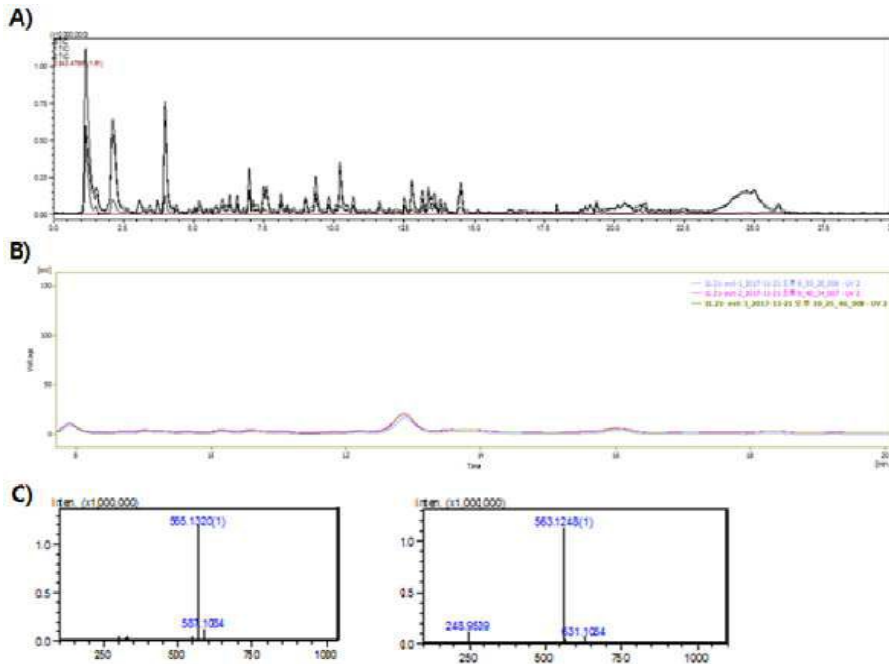
(54) 발명의 명칭 **새싹인삼과 차폴 복합추출물을 유효성분으로 하는 피부상태 개선용 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 새싹인삼과 차폴 복합추출물을 유효성분으로 하는 피부상태 개선용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 새싹인삼과 차폴 복합추출물은 피부상태개선효과 및 알츠하이머 치료효과가 입증되었으나 외국산 식물
 (뒷면에 계속)

대표도 - 도7



또는 희귀종 식물의 추출물에서만 확인되어 산업적 이용 시 국제적인 특허분쟁을 야기할 수 있으며 생산비용이 증가하여 가격경쟁력이 저하되므로 전적으로 수입에 의존하는 샤프토사이드를 지표물질로서 포함하고 있어 우수한 향산화 효과 및 미백효과가 있다.

특히, 새싹인삼과 차풀은 한국을 원산지로 하므로 국제적인 특허분쟁의 소지가 없으며 낮은 비용으로 대량생산이 가능하여 산업적 이용 가능성이 높은 장점이 있다.

또한 제조방법에 있어서도 새싹인삼과 차풀을 특정 비율로 혼합한 후 물을 비롯한 30%이내의 주정만을 이용한 열수추출을 수행하여 상기 샤프토사이드를 지표물질로 하는 새싹인삼과 차풀의 복합추출물을 제조하므로 유기용매에 의한 세포독성이 없으며 제조단가가 저렴한 장점이 있다.

(52) CPC특허분류

A61Q 19/02 (2013.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

A61K 2800/59 (2013.01)

(72) 발명자

최윤희

광주광역시 서구 상무공원로 114, 101동 1103호(치평동, 해광한신아파트)

김병록

전라남도 목포시 포미로 22, 210동 305호(용해동, 포미타운주공2단지)

김영욱

전라남도 장흥군 장흥읍 동교3길 53

성락선

전라남도 장흥군 장흥읍 북부로 39, 203호(수창아트빌아파트)

문은정

전라남도 장흥군 장흥읍 동교1길 10-10

신영순

전라남도 장흥군 장흥읍 행원1길 51

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0453822

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 산학연협력기술개발사업

연구과제명 새싹인삼과 차풀을 이용한 기능성 원료 표준화 및 이를 이용한 화장품 개발

기여율 1/1

주관기관 주식회사 하연 (공동개발기관 : 재단법인 전남생물산업진흥원)

연구기간 2016.12.01 ~ 2017.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

새싹인삼과 차풀의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 향산화 및 미백 개선 화장품 조성물로서;

상기 복합추출물은 새싹인삼과 차풀을 1:9의 질량비로 혼합한 후 열수추출하여 제조한 것이고;

상기 복합추출물은 200ppm의 샤프토사이드(schaftoside)를 포함하고;

상기 열수추출은 30% 알코올(alcohol)을 이용하여 80℃의 온도에서 8시간동안 수행되며;

상기 알코올은 C1 내지 C4의 저급 알코올, 다가 알코올, 및 탄화수소계 용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물이며;

상기 피부 향산화 방지는 상기 복합추출물의 향산화작용에 의해 수행되며;

상기 피부 미백 개선은 상기 복합추출물의 타이로시네이즈(tyrosinase) 활성 저해 또는 멜라닌 세포 활성저해에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

전초 상태의 새싹인삼 및 차풀을 세척 및 건조하는 제 1 단계;

상기 전초상태의 새싹인삼과 차풀을 1:9의 중량비로 혼합하고 상기 새싹인삼과 차풀의 혼합물의 100 중량부에 대하여 30% 알코올(alcohol) 20 중량부를 첨가하여 새싹인삼-차풀 혼합액을 제조하는 제 2 단계;

상기 새싹인삼-차풀 혼합액을 80℃의 온도 에서 8시간동안 가열하여 새싹인삼-차풀 복합추출액을 제조하는 제 3 단계; 및

상기 새싹인삼-차풀 복합추출액을 동결건조하여 새싹인삼-차풀 복합분말을 제조하는 제 4 단계;

를 포함하는 새싹인삼과 차풀의 복합추출물의 제조방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 새싹인삼과 차풀 복합추출물을 유효성분으로 하는 피부상태 개선용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 천연화장품 시장은 전 세계적으로 꾸준한 성장 추세를 이어가고 있으며, 소비자의 윤리의식 향상과 환경에 대한 경각심 심화 등으로 인해 앞으로의 전망이 밝을 것으로 기대된다. 이에 따라 전 세계 천연화장품 시장규모는 2013년 약 107억 달러로 추정되며, 2015년에는 약 127억 달러에 달할 것으로 예상된다. 천연화장품의 소재는 다양한 종류의 식물이 원료로서 사용된다. 천연재료의 기능적인 측면에 따라 상기 천연화장품의 소재를 분류하면 피부주름방지 및 세포부활작용 화장품의 주요 원료로서 아이리스, 알로에, 해조, 토마토, 인삼, 마로니에, 라벤더 등이 있으며, 자외선 방지 및 미백 효과 화장품의 주요 원료로서 미강유, 계피, 대황, 마로니에, 월굴나무, 콩과식품, 감초 함유 성분이 있다. 또한 보습효과 화장품의 주요 원료로서 히알루론산, 키틴 유도체, 알로에 추출물, 식물성 다당류, 사포닌류 등이 있으며, 육모효과가 있는 화장품의 주요 원료로서 검정콩, 다시마, 솔방울 추출물, 고추나물, 인삼, 감초, 산사자, 목단피 등이 있으며, 피부 진정 및 피부개선효과가 있는 화장품의 주요 원료로서 서양 허브류, 쑥, 금은화 등이 있다.

[0004] 2010년 일본 나고야에서 열린 제10차 생물다양성협약(나고야의정서)에 따르면, 동식물 및 미생물 포함하는 생물 유전자원을 이용하는 나라는 유전자원 제공 국가에 미리 통보해 승인을 받아야 하며, 해당 유전자원을 이용해서 얻은 금전 또는 비금전적 이익을 포함하는 모든 이익을 상호 합의된 계약조건에 따라 유전자원 제공 국가에 배분해야 한다. 특히, 유전자원과 관련된 전통지식도 보호대상에 포함되며, 각 국가의 전통지식을 이용해 특정 외국 기업이 신약을 개발했을 경우 그 이익을 그 지역민과 공유해야 한다. 한국은 2011년 9월 20일 상기 생물다양성협약에 서명하였으며 2012년 2월 1일 '생물다양성 보전 및 이용에 관한 법률'이 제정(2013년 2월 2일 시행)되어 시행중이다. 일부에서는 상기 나고야의정서가 식물, 동물, 곤충, 천연물, 바이러스, 미생물 등의 생물자원에 대한 국가적 재산권을 발생시켜 해외 생물자원을 활용하는 의약품, 건강기능식품, 화장품 등의 산업 분야에서 특히 장벽으로 작용될 수 있다는 우려의 목소리가 있다.

[0005] 최근 천연화장품 조성물의 유효성분으로서 샤프토사이드(schaftoside)가 주목받고 있다. 한국출원특허 10-2015-0019577호에는 상기 샤프토사이드가 저농도에서 월등히 우수한 콜라겐 합성 촉진 효과, 항산화 효과, 항염증 효과 및 미백 효과를 나타내므로 피부 재생, 주름 개선, 항산화, 항염증 및 피부 미백을 위한 의약품, 화장료, 건강식품 등의 유효성분으로 사용할 수 있다는 결과가 기재되어 있으며, 출원특허 WO 2016167385 A1에는 이소샤프토사이드(iso-schaftoside)가 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물로서 사용될 수 있다는 결과가 기재되어 있다. 상기 샤프토사이드 또는 이소샤프토사이드는 시계초(passionflower) 또는 석송강(Lycopodiella cernua)에서 추출된 추출물에서 확인되는 유효성분이다. 상기 시계초는 미국 동부를 원산지로서 하는 쌍떡잎식물강의 시계초과 식물로서 허브의 일종으로 아메리카 원주민에 의해 염증 완화용 약제로 사용되기도 하였다. 상기 석송강은 석송과에 딸린 양치식물로서 대부분 열대지방에 분포하며 미국 최남부 및 하와이에 자생하는 것으로 알려져 있다. 한국의 전라남도 완도에서도 자생하는 것이 확인되었으나 수십년 만에 발견될 만큼 귀한 식물로 알려져 있다.

[0006] 따라서 상기 식물로부터 추출된 샤프토사이드 또는 이소-샤프토사이드를 산업적으로 이용하게 되면 상기 나고야의정서에 따라 식물의 원산지 국가와 이익을 공유해야 하는 문제가 발생하거나 식물을 구하기가 어려워 생산비용이 상승하는 문제점이 있다.

[0007] 새싹인삼과 차풀은 한국을 원산지로하며 피부 주름방지 및 세포부활작용 화장품의 주요 원료 천연물로서 사용된다. 상기 새싹인삼은 2008년 농촌진흥청에서 인삼을 먹기 좋게 세계 최초로 개발한 것으로 2년 미만의 인삼을 2~4개월 동안 수경 재배하여 생산한다. 상기 새싹인삼을 천연 화장품의 원료로 사용한 예로서 하기의 선행문헌이 있다. 한국출원특허 10-2013-0143284호에는 인삼의 어린 새싹부위를 30% 부틸렌글리콜로 열 또는 냉침 추출 후 얻은 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 하는 주름개선, 미백, 항산화, 및 피부 항염 개선용 조성물이 개시되어 있다.

[0008] 상기 차풀은 한국 및 중국 등지에 분포하는 콩과의 한해살이 식물로 높이 30 내지 60cm이며 잎은 어긋나기하고 줄 모양 타원형인 특징이 있다. 상기 차풀은 식물의 전체부위(전초)가 식용 가능한 원료로서 별도의 화장품 원료 등록 절차 없이도 바로 활용이 가능한 천연 소재이다. 상기 차풀은 안전한 식품으로 분류될 수 있고 항산화 효과가 알려져 있어 안전한 천연화장품 원료로서 다양한 연구가 이루어지고 있다. 그 예로서 한국출원특허 10-

2006-0102755호에는 차풀의 지상부를 80%메탄올로 추출하고, 그 중 항산화 활성을 갖는 에칠아세테이트 분획물에서 루테오린 화합물을 획득하여 항산화, 주름개선용 조성물을 제조한 것이 개시되어 있으며 한국출원특허 10-2011-0135360호에는 차풀의 전초 분말을 열수 추출 후 획득한 농축물로부터 제형을 제작하여 피부 보습 효과가 있는 조성물을 제조한 것이 기재되어 있다.

[0009] 상기 새싹인삼과 차풀은 한국을 원산지로 하며 대량생산이 가능하여 경제적인 이점이 있다. 그러나 상기 새싹인삼 추출물, 차풀 추출물 또는 새싹인삼과 차풀의 복합추출물에서 상기의 샤프토사이드 또는 이소-샤프토사이드가 확인되었다는 결과는 아직 없다.

[0011] 본 명세서에서 언급된 특허문헌 및 참고문헌은 각각의 문헌이 참조에 의해 개별적이고 명확하게 특정된 것과 동일한 정도로 본 명세서에 참조로 삽입된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) 한국출원특허 10-2015-0019577호
- (특허문헌 0002) 한국출원특허 10-2013-0143284호
- (특허문헌 0003) 한국출원특허 10-2006-0102755호
- (특허문헌 0004) 한국출원특허 10-2011-0135360호
- (특허문헌 0005) WO 2016167385 A1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 한국을 원산지로 하는 새싹인삼 및 차풀을 이용하여 열수 추출한 결과, 상기 열수추출을 통해 수득한 새싹인삼-차풀 복합추출물이 우수한 항산화 효과 및 미백 효과를 가지고 있으며 외국산 식물이나 희귀종 식물의 추출물에서만 확인되는 샤프토사이드(schaftoside)를 지표물질로서 포함하고 있다는 것이 실험적으로 확인되었다. 따라서 이를 이용하면 피부상태 개선효과 및 알츠하이머 치료효과가 있는 샤프토사이드를 수입에 의존하지 않으며 국제적인 특허분쟁에 대한 우려 없이 산업적으로 이용할 수 있는 장점이 있다.

[0015] 본 발명에 목적은 새싹인삼과 차풀의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 탄력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 피부 노화 방지 또는 개선, 피부 미백 개선용 화장품 조성물로서 상기 복합추출물은 새싹인삼과 차풀을 1:8 내지 1:10의 질량비로 혼합한 후 열수추출하여 제조한 것을 특징으로 하는 피부 탄력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 피부 노화 방지 또는 개선, 및 피부 미백 개선용 화장품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 상기 새싹인삼과 차풀의 복합추출물의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0018] 본 발명의 다른 목적 및 기술적 특징은 이하의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 구체적으로 제시된다.

과제의 해결 수단

[0020] 본 발명은 150 내지 300ppm의 샤프토사이드(schaftoside)를 포함하는 새싹인삼과 차풀의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 탄력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 피부 노화 방지 또는 개선, 피부 미백 개선용 화장품 조성물로서 상기 복합추출물은 새싹인삼과 차풀을 1:8 내지 1:10의 질량비로 혼합한 후 열수추출하여 제조한 것을 특징으로 하는 피부 탄력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 피부 노화 방지 또는 개선, 및 피부 미백 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 열수추출은 25 내지 35% 알코올(alcohol)을 이용하여 70 내지 90℃의 온도에서 7 내지 9시간동안 수행하며 상기 알코올은 C1 내지 C4의 저급 알코올, 다가 알코올, 및 탄화수소계 용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물이다.

[0022] 상기 피부 탄력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 및 피부 노화 방지 또는 개선은 상기 새싹인삼과 차풀의 복합 추출물의 항산화작용에 의해 수행되며 상기 피부 미백 개선은 상기 새싹인삼과 차풀의 복합추출물의 타이로시네이즈(tyrosinase) 활성 저해에 의해 수행된다.

[0023] 본 발명은 전초 상태의 새싹인삼 및 차풀을 세척 및 건조하는 제 1 단계; 상기 전초상태의 새싹인삼과 차풀을 1:8 내지 1:10의 중량비로 혼합하고 상기 새싹인삼과 차풀의 혼합물의 100 중량부에 대하여 25 내지 35% 알코올(alcohol) 15 내지 25 중량부를 첨가하여 새싹인삼-차풀 혼합액을 제조하는 제 2 단계; 상기 새싹인삼-차풀 복합추출 혼합액을 70 내지 90℃의 온도 범위에서 7 내지 9시간동안 가열하여 새싹인삼-차풀 복합추출액을 제조하는 제 3 단계; 및 상기 새싹인삼-차풀 복합추출액을 동결건조하여 새싹인삼-차풀 복합분말을 제조하는 제 4 단계;를 포함하는 새싹인삼과 차풀의 복합추출물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명은 새싹인삼과 차풀 복합추출물을 유효성분으로 하는 피부상태 개선용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0026] 본 발명의 새싹인삼과 차풀 복합추출물은 피부상태개선효과 및 알츠하이머 치료효과가 입증되었으나 외국산 식물 또는 희귀종 식물의 추출물에서만 확인되어 산업적 이용 시 국제적인 특허분쟁을 야기할 수 있으며 생산비용이 증가하여 가격경쟁력이 저하되므로 전적으로 수입에 의존하는 샤프토사이드를 지표물질로서 포함하고 있어 우수한 항산화 효과 및 미백효과가 있다.

[0027] 특히, 새싹인삼과 차풀은 한국을 원산지로 하므로 국제적인 특허분쟁의 소지가 없으며 낮은 비용으로 대량생산이 가능하여 산업적 이용 가능성이 높은 장점이 있다.

[0028] 또한 제조방법에 있어서도 새싹인삼과 차풀을 특정 비율로 혼합한 후 물을 비롯한 30%이내의 주정만을 이용한 열수추출을 수행하여 상기 샤프토사이드를 지표물질로 하는 새싹인삼과 차풀의 복합추출물을 제조하므로 유기용매에 의한 세포독성이 없으며 제조단가가 저렴한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 새싹인삼과 차풀의 혼합비에 따른 새싹인삼-차풀 복합추출물의 항산화 효과의 차이를 보여준다. 패널 D)에는 새싹인삼과 차풀의 혼합비(1:9)에서 추출한 복합추출물이 다른 조건의 복합추출물에 대비하여 우수한 항산화효과를 보인다는 것을 보여준다.

도 2는 새싹인삼과 차풀의 혼합비에 따른 새싹인삼-차풀 복합추출물의 미백효과(티로시나아제 활성억제효과)의 차이를 보여준다. 패널 D)에는 새싹인삼과 차풀의 혼합비(1:9)에서 추출한 복합추출물이 다른 조건의 복합추출물에 대비하여 우수한 항산화효과를 보인다는 것을 보여준다.

도 3은 열수추출 용매의 종류에 따른 새싹인삼과 차풀 복합추출물의 항산화 효과(패널 A)) 및 미백효과(패널 B))의 차이를 보여준다.

도 4는 열수추출 온도에 따른 새싹인삼과 차풀 복합추출물의 항산화 효과(패널 A)) 및 미백효과(패널 B))의 차이를 보여준다.

도 5는 열수추출 시간에 따른 새싹인삼과 차풀 복합추출물의 항산화 효과(패널 A)) 및 미백효과(패널 B))의 차이를 보여준다.

도 6은 새싹인삼과 차풀을 1:9로 혼합하고 30% 주정을 이용하여 80℃에서 8시간동안 대용량으로 추출한 새싹인삼과 차풀 복합추출물의 항산화 효과(패널 A)) 및 미백효과(패널 B))확인 결과를 보여준다.

도 7은 새싹인삼과 차풀 복합추출물의 지표물질에 대한 분석결과를 보여준다. 패널 A) 및 B)는 새싹인삼과 차풀 복합추출물을 이용한 HPLC실험(C18 컬럼) 분석결과를 보여주며 패널 C)는 상기 HPLC로부터 확인된 지표물질에 대하여 MALDI-TOF 분석을 수행하여 분자량을 확인한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 새싹인삼과 차풀의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 탄력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 피부 노화 방지 또는 개선, 피부 미백 개선용 화장료 조성물로서 상기 복합추출물은 새싹인삼과 차풀을 1:8 내지 1:10의 질량비로 혼합한 후 열수추출하여 제조한 것을 특징으로 하는 피부 탄

력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 피부 노화 방지 또는 개선, 및 피부 미백 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

- [0032] 상시 새싹인삼은 2년 생 인삼을 수경재배하여 생산한 인삼이며 상기 차풀은 물가에 서식하는 한해살이풀로서 한국의 전국각지에 널리 분포한다. 따라서 상기 새싹인삼과 차풀은 한국을 원산지로 한다.
- [0033] 상기 새싹인삼은 인삼의 종류에 제한되지 않으며, 재배한 것을 사용하거나, 시중에서 구입한 것을 사용하는 등 그 출처에 제한 없이 모든 2년 생 인삼을 수경재배한 것이라면 사용 가능하다. 상기 차풀 역시 동일한 종이라면 재배방법에 상관없이 사용할 수 있다.
- [0034] 상기 새싹인삼과 차풀의 복합추출물은 상기 새싹인삼과 차풀 혼합물의 열수추출처리에 의하여 얻어지는 열수추출화합물(熱水抽出化合物)을 포함하는 추출액을 의미하며 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다. 상기 열수추출화합물은 뜨거운 물 또는 주정과 같은 용매에 의해 용출되는 수용성의 화합물을 의미한다. 상기 열수추출을 수행하면 열수추출과정에서 일반적인 혼합물외에 열과 물에 의한 화학작용으로 화합물이 생성될 수 있고 상기 화합물이 수용성이라면 추출과정에서 열수추출화합물로서 용출될 수 있다. 본 발명은 새싹인삼과 차풀을 혼합하여 열수추출을 수행하며 상기 열수추출을 통해서 용출된 열수추출물에 대하여 지표성분 분석을 수행한 결과 샤프토사이드(schaftoside)가 확인되었다.
- [0035] 상기 샤프토사이드는 종래의 새싹인삼 추출물 및 차풀 추출물에서 확인된 적이 없는 새로운 열수추출물이다. 따라서 상기 샤프토사이드는 새싹인삼과 차풀의 열수추출과정에서 새로이 형성된 열수추출화합물로 판단되나 상기 샤프토사이드가 어떠한 메커니즘에 의해 새싹인삼과 차풀의 열수추출물로서 용출되는지는 연구가 더 필요한 실정이다.
- [0036] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 새 싹· 7인삼-차풀 복합추출물은 새싹인삼과 차풀을 1:8 내지 1:10의 질량비로 혼합한 후 열수추출하여 제조한다. 바람직하게는 상기 새싹인삼과 차풀을 1:9의 질량비로 혼합한 후 열수추출하여 제조한다.
- [0037] 상기 새싹인삼과 차풀을 1:8 미만의 질량비로 혼합하고 열수추출을 수행하면 항산화 효과 및 미백효과가 상기 범위의 혼합비에 대비하여 저하되며 상기 새싹인삼과 차풀을 1:10을 초과하는 질량비로 혼합하고 열수추출을 수행하더라도 항산화 효과 및 미백효과의 상승정도는 미미하다.
- [0038] 본 발명은 새싹인삼과 차풀의 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 탄력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 피부 노화 방지 또는 개선, 피부 미백 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0039] 상기 개선은 상태의 완화 또는 치료와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를
- [0040] 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미하며 상기 방지는 상태 완화 또는 치료와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 현 상태로 유지하는 모든 행위를 의미한다.
- [0041] 상기 피부 탄력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 및 피부 노화 방지 또는 개선은 상기 새싹인삼과 차풀의 복합추출물의 항산화작용에 의해 수행된다.
- [0042] 상기 피부 탄력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 및 피부 노화 방지 또는 개선은 활성산소에 의하여 피부 탄력 감소, 피부 주름 형성, 피부 노화의 증상이 감소시키거나 현상태를 유지하는 것을 의미한다.
- [0043] 상기 피부 미백 개선은 상기 새싹인삼과 차풀의 복합추출물의 타이로시네이즈(tyrosinase) 활성 저해 또는 멜라닌 세포 활성저해에 의해 수행된다.
- [0044] 상기 피부미백은 멜라닌의 합성을 저해하여 멜라닌 색소의 피부 침착을 억제하거나 방지하는 모든 작용을 의미하며 상기 색소 피부침착은 멜라닌의 합성 증가로 인해 피부의 색깔이 어두워지는 모든 작용 또는 그 상태를 의미한다.
- [0045] 따라서 멜라닌 색소를 합성하는 멜라닌 세포 자체의 활성을 저해하면 멜라닌 세포의 수가 줄어들어 피부미백효과가 있으며 멜라닌 세포의 멜라닌 합성과정에서 중요한 역할을 하는 타이로시네이즈의 활성을 저해하면 멜라닌 세포가 멜라닌 색소를 합성하지 못하므로 피부미백효과가 있다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 상기 피부 탄력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 및 피부 노화 방지 또는 개선, 피부 미백효과는 본 발명의 지표성분인 샤프토사이드 때문인 것으로 판단된다.

- [0047] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 새싹인삼과 차풀의 복합추출물은 150 내지 300ppm의 샤프토사이드(schaftoside)를 포함하는 피부 탄력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 피부 노화 방지 또는 개선, 및 피부 미백 개선용 화장품 조성물을 제공한다. 상기 샤프토사이드는 저농도에서 월등히 우수한 콜라겐 합성 촉진 효과, 항산화 효과, 항염증 효과 및 미백 효과를 가진 것으로 알려져 있다. 상기 샤프토사이드의 함량이 150ppm미만이며 항산화 효과 및 미백효과가 미미하여 피부 탄력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 피부 노화 방지 또는 개선, 및 피부 미백 개선의 효과가 없고 상기 샤프토사이드의 함량이 300ppm을 초과하더라도 상기 피부 탄력 개선, 피부 주름 방지 또는 개선, 피부 노화 방지 또는 개선, 및 피부 미백 개선의 효과는 유사하다. 바람직하게는 상기 샤프토사이드의 함량은 200ppm이다.
- [0048] 상기 화장품 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 팩취 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명의 상기 화장품 조성물은 일반 피부 화장품에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장품 조성물의 제형에 따라 다양하다. 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연등으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리암이드 파우더 등이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로하이드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 수 있으며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는, 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속 염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 새싹인삼과 차풀의 복합추출물의 제조방법을 제공한다.
- [0057] 제1단계: 전초 상태의 새싹인삼 및 차풀을 세척 및 건조하는 단계;
- [0058] 제2단계: 상기 전초상태의 새싹인삼과 차풀을 1:8 내지 1:10의 중량비로 혼합하고 상기 새싹인삼과 차풀의 혼합물의 100 중량부에 대하여 25 내지 35% 알코올(alcohol) 15 내지 25 중량부를 첨가하여 새싹인삼-차풀 혼합액을 제조하는 단계;
- [0059] 제3단계: 상기 새싹인삼-차풀 복합추출 혼합액을 70 내지 90℃의 온도 범위에서 7 내지 9시간동안 가열하여 새

씩인삼-차폴 복합추출액을 제조하는 단계; 및

[0060] 제4단계: 상기 새씩인삼-차폴 복합추출액을 동결건조하여 새씩인삼-차폴 복합분말을 제조하는 단계.

[0062] **제1단계: 새씩인삼 및 차폴의 준비**

[0063] 새씩인삼과 차폴은 전초상태로서 준비한다. 보통 종래 발명에서는 새씩인삼의 뿌리부분만을 사용하는 경우가 많았으나 본 발명에서는 뿌리, 줄기 및 잎을 포함하는 새씩인삼의 전부위를 원료로서 사용한다. 상기 차폴 또한 뿌리를 제거하지 않은 전체식물의 상채로 세척한 후 물기를 건조하여 준비한다.

[0065] **제2단계: 새씩인삼-차폴 혼합액의 제조**

[0066] 상기 준비한 새씩인삼 및 차폴의 전초를 1:8 내지 1:10의 질량비로 혼합한다. 바람직하게는 1:9의 비율로 혼합한다.

[0067] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 새씩인삼과 차폴을 1:9로 혼합한 경우에서 열수추출물의 항산화 효과 및 티로시나아제 또는 멜라닌세포의 활성 저해효과가 가장 우수하였다.

[0068] 상기 새씩인삼-차폴의 전초혼합물에 대하여 열수추출을 위한 용매를 첨가한다.

[0069] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 용매는 C1 내지 C4의 저급 알코올, 다가 알코올, 및 탄화수소계 용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물로 구성된 알코올이며 상기 알코올을 25 내지 35%로 희석하여 사용한다. 상기 알코올의 농도가 25%미만이면 지표물질의 용출이 적어 항산화 효과 및 미백효과가 감소되며 상기 알코올의 농도가 35%를 초과하면 최종 복합추출물에 세포독성이 있어 추가적인 정제과정이 필요하다. 바람직하게는 상기 알코올은 30% 알코올이다. 상기 용매는 상기 새씩인삼-차폴 혼합물의 열수추출이 충분히 잠길 수 있는 수준으로 첨가하되 새씩인삼과 차폴의 혼합물의 100 중량부에 대하여 15 내지 25 중량부를 첨가하여 새씩인삼-차폴 혼합액을 제조한다. 바람직하게는 새씩인삼과 차폴의 혼합물의 100 중량부에 대하여 20 중량부를 첨가하여 새씩인삼-차폴 혼합액을 제조한다.

[0071] **제3-4단계: 새씩인삼-차폴 혼합액의 열수추출 및 새씩인삼-차폴 복합추출물의 수득**

[0072] 상기 제조한 새씩인삼-차폴혼합액에 대하여 열을 가하여 열수추출을 수행한다.

[0073] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 열수추출은 70 내지 90℃의 온도에서 7 내지 9시간동안 수행한다. 상기 열수추출온도 및 추출시간이 70℃ 미만이거나 7시간 미만이면 지표물질의 용출량이 적어 항산화 효과 및 미백효과가 감소하며 상기 열수추출온도 및 추출시간이 90℃를 초과하거나 9시간을 초과하더라도 복합추출물의 항산화 효과 및 미백효과의 향상은 미미하다. 바람직하게는 상기 새씩인삼-차폴혼합액의 열수추출은 80℃의 온도에서 8시간 동안 수행한다.

[0074] 상기 추출한 새씩인삼-차폴 복합추출물은 고체입자를 제거하기 위해 나일론 등을 이용해 입자를 걸러내거나 냉동여과법 등을 이용해 여과한 후, 그대로 사용하거나 이를 동결건조, 열풍건조, 분무건조 등을 이용해 건조시켜 사용할 수 있다.

[0075] 상기 새씩인삼-차폴 복합추출물은 추가적인 추출과정을 통해 특정 분획물의 상태로 이용될 수 있다. 상기 분획물은 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다. 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 분획 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 분획 방법은 본 발명의 새씩인삼-차폴 복합추출물에 소정의 용매를 처리하여 상기 추출물로부터 분획물을 얻는 방법을 의미하며 물, 증류수, 알코올 등의 극성 용매; 헥산(Hexane), 에틸 아세테이트(Ethyl acetate), 클로로포름(Chloroform), 디클로로메탄(Dichloromethane) 등의 비극성 용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물일 수 있다. 상기 분획 용매 중 알코올을 사용하는 경우에는 바람직하게는 물 또는 C1 내지 C4의 알코올을 사용하는데 특히 물을 사용하는 경우 분획물의 용매로 인한 세포독성으로부터 안전한 장점이 있으나 분획물에 포함된 지표물질(샤프토사이드)의 함유량이 저하될 수 있으므로 상기 알코올을 적절하게 혼합하여 사용하는 것이 바람직하다.

[0076] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 30% 주정을 사용하면 용매로 인한 세포독성이 없으며 지표물질의 함량이 높아 우수한 항산화 효과 및 미백효과를 보이는 것이 확인되었다.

[0077] 하기에서 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다.

- [0079] 실시예
- [0081] 실시예: 새싹인삼-차풀 복합추출물의 제조
- [0082] 새싹인삼과 차풀의 복합추출물을 제조하기 위하여 2년 미만의 인삼을 2-4개월간 수경재배한 새싹인삼 및 차풀 준비하였다. 상기 새싹인삼 및 차풀은 모두 건조의 상태이며 이를 세척하고 건조하였다.
- [0083] 항산화 효과 및 미백효과가 우수한 새싹인삼-차풀 복합추출물을 제조하기 위하여 새싹인삼과 차풀의 배합비율(중량비)을 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 및 1:9로 하여 열수추출을 수행하였다. 상기 열수추출은 물, 10% 에틸알코올, 20% 에틸알코올 또는 30% 에틸알코올을 상기 배합된 새싹인삼 및 차풀 혼합물에 첨가하고 20℃, 40℃, 60℃, 80℃ 또는 100℃에서 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간 또는 24시간 동안 수행하였다.
- [0084] 상기 열수추출을 통해 제조한 새싹인삼-차풀 복합추출물은 동결건조 한 후 항산화 효과 및 미백효과(타이로시네이즈 저해효과 및 멜라닌 세포활성 저해)를 측정하여 최적의 열수추출 조건을 확인하였다.
- [0086] 1) 새싹인삼 및 차풀의 최적 배합비율
- [0087] 항산화 효과와 미백효과가 가장 우수한 새싹인삼과 차풀의 최적 배합비율을 찾기 위하여 새싹인삼과 차풀의 배합비율(중량비)을 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 및 1:9로 하여 열수추출을 수행하였다. 상기 열수추출은 80℃에서 8시간동안 수행하는 조건으로 고정하여 수행하고 상기 추출된 새싹인삼-차풀 복합추출물에 대하여 동결건조를 수행한 후 항산화 효과 및 미백효과를 측정하였다(도 1 및 2 참조).
- [0088] 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) assay법을 통한 항산화 효능을 측정한 결과, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 및 1:9의 배합비율 모두에서 농도가 증가할수록 항산화 효과가 향상되는 것이 확인되었다. 이는 상기 배합비율에 의해 추출된 추출물 모두 항산화 효과를 가지고 있다는 것을 의미한다.
- [0089] 상기 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 및 1:9의 배합비율에서 추출된 새싹인삼-차풀 복합추출물의 항산화 효과를 각각 비교하여 항산화가 가장 우수한 새싹인삼-차풀의 배합비율을 확인하였다(도 1 참조).
- [0090] 새싹인삼-차풀의 배합비율(중량비)이 3:1, 2:1, 1:1인 복합추출물의 항산화 효과를 비교한 결과, 새싹인삼-차풀의 배합비율이 3:1 및 2:1인 복합추출물의 항산화 효과는 유사한 반면 새싹인삼-차풀의 배합비율이 1:1인 복합추출물의 경우 상기 새싹인삼-차풀의 배합비율이 3:1 및 2:1인 복합추출물에 대비하여 항산화 효과가 향상된 것이 확인되었다. 상기 결과는 차풀의 함량은 고정시킨 상태에서 새싹인삼의 함량을 변화시킨 결과로서 상대적인 새싹인삼의 양이 증가하면 오히려 항산화 효과가 저하된다는 결과를 보여준다(도 1의 패널 A) 참조).
- [0091] 새싹인삼-차풀의 배합비율이 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 및 1:9인 복합추출물의 항산화 효과를 비교한 결과, 상기 배합비율이 1:2, 1:3, 1:4로 증가함에 따라 항산화 효과가 향상되는 것이 확인되었으며 상기 배합비율이 1:5인 복합추출물에서 어떠한 이유로 항산화 효과가 반감되었다가 배합비율이 1:6, 1:7, 1:8 및 1:9로 증가함에 따라 항산화 효과가 다시 향상되는 것이 확인되었다(도 1의 패널 A) 참조). 상기 배합비율이 1:5인 복합추출물에서 항산화 효과가 급격히 감소되는 것은 추출물의 농도가 1000ppm(ug/ml)을 초과하는 복합추출물에서는 확인되지 않는 것으로 보아 측정방법의 감도로 인한 현상인 것으로 판단된다.
- [0092] 정리하면 새싹인삼-차풀 복합추출물은 차풀의 함량이 증가함에 따라 항산화 효과가 향상되는 것으로 판단된다.
- [0093] 항산화 효과가 가장 우수한 새싹인삼-차풀의 배합비율을 확인하기 위하여 새싹인삼-차풀의 배합비율이 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8 및 1:9인 복합추출물의 항산화 효과를 비교하였다. 비교결과, 새싹인삼-차풀의 배합비율이 1:6, 1:7, 1:8 및 1:9인 복합추출물의 항산화 효과가 가장 우수한 것이 확인되었다. 상기 배합비율에서는 1:8 및 1:9 복합추출물의 항산화 효과가 가장 우수한 것으로 확인되었다. 이는 1:1, 1:5, 1:9 복합추출물의 농도에 따른 항산화효과 그래프를 살펴보면 더 정확히 알 수 있다(도 1의 패널 D) 참조). 1:1 및 1:5 복합추출물의 경우 100ppm의 농도에서 항산화 활성이 1:9 복합추출물의 항산화활성의 50% 수준에 머무르는 것이 확인된다.
- [0094] 따라서 최고의 항산화 효과를 가지는 새싹인삼-차풀 복합추출물은 새싹인삼-차풀의 배합비율은 1:6, 1:7, 1:8, 또는 1:9인 것으로 판단된다.
- [0095] 상기와 동일한 방법으로 다양한 배합비율의 새싹인삼-차풀 복합추출물을 제조하고 타이로시네이즈 저해활성(미

백효과)을 측정하였다(도 2 참조).

[0096] 실험결과, 상기 항산화 활성의 측정 결과와 유사하게, 차풀의 비율이 증가할수록 항산화 효과가 향상되는 것이 확인되었다(도 2의 패널 A) 내지 D) 참조). 또한 새싹인삼의 배합비율이 증가하는 오히려 미백효과를 저하시키는 것이 확인되었으며 새싹인삼과 차풀의 배합비율이 1:9인 경우에서 가장 우수한 미백효과를 보이는 것이 확인되었다.

[0098] **2) 새싹인삼-차풀 복합추출물의 최적 추출용매 및 용매비율**

[0099] 상기 결정한 최적 배합비율 중 가장 우수한 항산화 효과를 보이는 1:9의 배합비율을 선택하고 물, 10% 주정(에틸알코올), 20% 주정, 및 30% 주정을 사용하여 새싹인삼-차풀 복합추출물을 열수추출 하였다. 상기 열수추출은 80℃에서 8시간동안 수행하는 조건으로 고정하여 수행하고 상기 추출된 새싹인삼-차풀 복합추출물에 대하여 동결건조를 수행한 후 항산화 효과 및 미백효과를 측정하였다(도 3 참조).

[0100] 상기 용매의 주정비율은 주정을 30%를 초과하여 사용하는 경우 최종 새싹인삼-차풀 복합추출물이 세포독성을 가질 수 있다는 선행연구결과에 따라 정해졌다.

[0101] 추출용매가 물인 복합추출물과 추출용매가 10%, 20% 및 30% 주정인 복합추출물의 항산화 효과를 비교분석한 결과, 20% 및 30% 주정을 사용하여 추출한 새싹인삼-차풀 복합추출물의 항산화 효과가 가장 우수한 것이 확인되었다(도 2의 패널 A) 참조). 또한 추출용매가 물인 복합추출물과 추출용매가 10%, 20% 및 30% 주정인 복합추출물의 미백 효과를 비교분석한 결과, 항산화 효과의 측정 결과와 동일하게 20% 및 30% 주정을 사용하여 추출한 새싹인삼-차풀 복합추출물의 미백 효과가 가장 우수한 것이 확인되었다(도 3의 패널 B) 참조). 또한 상기 20% 주정과 30% 주정 중 30% 주정을 이용한 복합추출물의 항산화 효과 및 미백효과를 비교한 결과 주정 30%를 사용한 복합추출물에서 미세하게 항산화 및 미백효과가 더 우수한 것으로 확인되었다.

[0102] 따라서 새싹인삼-차풀의 배합비율이 1:9인 경우 최적의 항산화 효과 및 미백효과를 가지는 추출용매는 30% 주정인 것으로 판단된다.

[0104] **3) 새싹인삼-차풀 복합추출물의 최적 추출온도**

[0105] 상기 실험을 통해 새싹인삼-차풀 복합추출물은 새싹인삼과 차풀의 배합비율이 1:9이며 추출용매가 30% 주정인 경우 항산화 및 미백 효과가 가장 높은 것으로 확인되었다(도 4 참조).

[0106] 상기 조건을 바탕으로 새싹인삼-차풀 복합추출물의 최적 추출온도를 찾기 위하여 새싹인삼과 차풀의 배합비율을 1:9로 고정하고 추출용매를 30% 주정으로 한 후 추출온도를 20℃, 40℃, 60℃, 80℃ 및 100℃로 하고 8시간동안 열수추출을 수행하였다. 상기 추출된 새싹인삼-차풀 복합추출물에 대하여 동결건조를 수행한 후 항산화 및 미백 효과를 측정하였다.

[0107] 실험결과 추출온도가 20℃, 40℃, 60℃, 80℃로 증가함에 따라 복합추출물의 항산화 효과가 향상되는 것이 확인되었으며 추출온도가 80℃에서 100℃로 향상되면 복합추출물의 항산화 효과가 오히려 감소하는 것이 확인되었다(도 4의 패널 A) 참조). 미백 효과 역시 상기 항산화 효과의 측정 결과와 같이 추출온도가 80℃에서 100℃로 향상되면 복합추출물의 미백 효과가 오히려 감소하는 것이 확인되었다(도 4의 패널 B) 참조).

[0108] 따라서 새싹인삼-차풀의 배합비율이 1:9이고 추출용매가 30% 주정인 경우 최적의 항산화 효과 및 미백효과를 가지는 추출온도는 80℃인 것으로 판단된다.

[0110] **4) 새싹인삼-차풀 복합추출물의 최적 추출시간**

[0111] 상기 실험을 통해 새싹인삼-차풀 복합추출물은 새싹인삼과 차풀의 배합비율이 1:9이며 추출용매가 30% 주정이며 추출온도가 80℃인 경우 항산화 및 미백 효과가 가장 높은 것으로 확인되었다(도 5 참조).

[0112] 상기 조건을 바탕으로 새싹인삼-차풀 복합추출물의 최적 추출시간을 찾기 위하여 새싹인삼과 차풀의 배합비율을 1:9로 고정하며 추출용매를 30% 주정으로 하고 추출온도를 80℃로 고정 한 후 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간 및 24시간 동안 열수추출을 수행하였다. 상기 추출된 새싹인삼-차풀 복합추출물에 대하여 동결건조를 수행한 후 항산화 및 미백 효과를 측정하였다.

[0113] 실험결과 복합추출물의 항산화 효과는 추출시간에 상관없이 유사한 것으로 확인되었으나 6시간 추출한 경우에서 미세하게 항산화 활성이 높게 확인되는 것으로 확인되었다(도 5의 패널 A) 참조). 그러나 미백효과와 경우 6시간 추출한 복합추출물과 8시간 추출한 복합추출물이 2시간, 4시간, 10시간, 12시간 및 24시간 추출한 복합추출

물에 대비하여 우수한 미백효과를 보이는 것이 확인되었다. 복합추출물을 1000ppm으로 사용한 측정하는 경우 6시간 추출한 복합추출물이 가장 우수한 미백효과를 보이며 복합추출물을 2000ppm으로 사용한 측정하는 경우 8시간 추출한 복합추출물이 가장 우수한 미백효과를 보이는 차이점이 있었다(도 5의 패널 B) 참조). 그러나 복합추출물을 2000ppm으로 사용한 측정하는 경우에서 6시간 추출한 복합추출물에 대비하여 8시간 추출한 복합추출물의 미백효과가 더 크게 차이나는 것으로 보아 8시간 추출하는 것이 더 향상된 미백효과를 보이는 것으로 판단된다.

[0114] 따라서 새싹인삼-차폴의 배합비율이 1:9이고 추출용매가 30% 주정이며 추출온도는 80℃로 추출하는 경우 최적의 항산화 효과 및 미백효과를 가지는 추출시간은 6시간 또는 8시간인 것으로 판단된다. 바람직하게는 새싹인삼-차폴의 배합비율이 1:9이고 추출용매가 30% 주정이며 추출온도는 80℃로 추출하는 경우 최적의 항산화 효과 및 미백효과를 가지는 추출시간은 8시간인 것으로 판단된다.

[0116] **5) 새싹인삼-차폴 복합추출물의 대용량 제조**

[0117] 상기 실험을 통하여 실험실 수준에서 샤프트사이드를 포함하여 항산화 효과 및 미백효과가 우수한 새싹인삼-차폴 복합추출물을 제조하는 방법을 확인하였다. 상기 결과를 바탕으로 상기 새싹인삼-차폴 복합추출물의 대량 추출방법을 확인하여 상기 복합추출물의 산업적 이용 가능성을 확인하였다.

[0118] 이를 위하여 상기 새싹인삼 전초 100g과 차폴 전초 900g을 준비하고 이를 혼합하였다. 상기 새싹인삼과 차폴의 혼합물에 대하여 20L의 30% 주정(에틸알코올 6L + 물 14L)을 첨가하고 80℃에서 6시간동안 열수추출하였다. 상기 열수추출을 통해 수득한 새싹인삼-차폴 복합추출물에 대하여 동결건조를 수행한 결과 최종적으로 190g의 새싹인삼-차폴 복합추출물 분말을 수득하였다.

[0119] 상기 대용량으로 수득한 새싹인삼-차폴 복합추출물의 항산화 효과와 미백효과를 측정하여 피부상태 개선용 화장품의 재료 등으로 사용이 가능한지 확인하였다. 상기 항산화 효과는 1,1-diphenyl-2picrylhydrazyl(DPPH) assay법을 사용하여 확인하였으며 상기 미백효과는 멜라닌 세포인 B16F10 세포주의 생존율을 측정하는 방법으로 확인하였다(도 6 참조).

[0120] 상기 항산화 활성 실험결과, 새싹인삼과 차폴의 복합추출물의 항산화 효과가 확인되었으며 50ppm($\mu\text{g/ml}$)을 사용한 경우 80%의 DPPH 제거활성이 있는 것이 확인되었으며 100ppm이상 사용한 경우 대부분의 DPPH가 제거되는 것이 확인되었다(도 6의 패널 A) 참조).

[0121] 상기 타이로시네이즈(tyrosinase) 저해 활성 확인을 통한 미백 활성 실험결과, 새싹인삼과 차폴의 복합추출물의 미백 효과가 확인되었으며 200ppm을 사용한 경우 세포활성이 급격히 감소하는 것이 확인되었으며 500ppm을 사용하는 경우 세포활성이 50%미만인 것이 확인되었다(도 6의 패널B) 참조).

[0122] 또한 상기 멜라닌 세포로서 세포활성 저해를 통한 미백 활성 실험결과, 상기 새싹인삼-차폴 복합추출물의 농도에 따라 멜라닌 세포인 B16F10 세포주의 생존율이 감소하는 것이 확인되었다. 상기 새싹인삼-차폴 복합추출물을 200ppm으로 사용한 경우 B16F10 세포주의 생존율이 억제되는 것이 확인되었으며 상기 새싹인삼-차폴 복합추출물을 500ppm으로 사용하면 B16F10 세포주의 생존율이 50% 이상 감소하는 것이 확인되었다(도 6의 패널B) 참조).

[0124] **6) 새싹인삼-차폴 복합추출물의 지표성분**

[0125] 본 발명은 상기 실험을 통해 항산화 효과 및 미백효과 있는 것이 확인되었다. 특히, 새싹인삼과 차폴의 배합비율이 1:9이고 추출용매가 30% 주정이며 추출온도는 80℃로 추출하는 경우 최적의 항산화 효과 및 미백효과를 보이는 것이 확인되었다.

[0126] 상기 새싹인삼은 2년생 인삼을 수경재배한 것으로 기본적으로 인삼의 영양성분을 포함하고 있어 주름개선, 미백, 항산화, 및 피부 항염 개선용 조성물의 제조에 사용된다는 선행기술(한국출원특허 10-2015-0019577호)이 있으며 차폴 또한 항산화 활성이 있어 항산화, 주름개선용 조성물을 제조에 사용하는 선행기술(한국출원특허 10-2006-0102755호)이 있다.

[0127] 그러나 본 발명의 실시예에 따르면, 새싹인삼과 차폴의 배합비율이 1:9에 가장 우수한 항산화 및 미백효과를 보이며 차폴의 혼합비율이 증가함에 따라 항산화 효과 및 미백효과가 향상된다는 것이 확인되었다. 상기와 같이 차폴의 항산화 효과에 대하여는 선행기술을 통해 실험적으로 확인된 바 있으나 차폴의 미백효과에 대하여는 알려진 바가 없다.

[0128] 이에 본 발명에서는 상기 새싹인삼-차폴 복합추출물에 대하여 HPLC 분석 및 MALDI-TOF실험을 수행하여 상기 복합추출물의 항산화 효과 및 미백효과를 나타내는 지표물질을 확인하였다(도 7 참조).

- [0129] 이를 위하여 새싹인삼과 차풀의 배합비율이 1:9이고 추출용매가 30% 주정이며 80℃의 추출온도 8시간동안 추출한 새싹인삼-차풀 복합추출물을 C18 컬럼을 이용하여 분리하고 수득된 후보 지표물질에 대하여 MALDI-TOF 질량분석기(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometer, MALDI-TOF MS)를 이용한 질량분석을 수행하고 이를 데이터베이스에 비교하여 상기 지표물질의 종류를 확인하였다.
- [0130] 확인결과 본 발명의 지표물질은 샤프토사이드(schaftoside)인 것이 확인되었으며 상기 샤프토사이드가 지표물질로서 새싹인삼-차풀 복합추출물의 항산화 효과 및 미백효과에 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 특히 새싹인삼과 차풀의 혼합비율(중량%)이 1:9에서 가장 우수한 것으로 보아 상기 샤프토사이드에 관련된 항산화 효과 및 미백효과는 차풀의 혼합비율이 상승함에 따라 향상된 것으로 판단된다.
- [0131] 상기 샤프토사이드는 최근 천연화장품 조성물의 유효성분으로서 주목받고 있다. 한국출원특허 10-2015-0019577호에는 상기 샤프토사이드가 저농도에서 월등히 우수한 콜라겐 합성 촉진 효과, 항산화 효과, 항염증 효과 및 미백 효과를 나타내므로 피부 재생, 주름 개선, 항산화, 항염증 및 피부 미백을 위한 의약품, 화장품, 건강식품 등의 유효성분으로 사용할 수 있다는 결과가 기재되어 있으며, 출원특허 WO 2016167385 A1에는 이소샤프토사이드(iso-schaftoside)가 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물로서 사용될 수 있다는 결과가 기재되어 있다.
- [0132] 상기 샤프토사이드 또는 이소샤프토사이드는 시계초(*passionflower*) 또는 석송강(*Lycopodiella cernua*)에서 추출된 추출물에서 확인되는 유효성분이다. 상기 시계초는 미국 동부를 원산지로 하며 상기 석송강은 석송과에 딸린 양치식물로서 대부분 열대지방에 분포하며 미국 최남부 및 하와이에 자생한다. 상기 석송강은 한국의 전라남도 완도에서도 자생하는 것이 확인되었으나 수십년 만에 발견될 만큼 귀한 식물이다.
- [0133] 따라서 상기 샤프토사이드를 추출하여 사용하게 되면 상기 시계초 또는 석송강만을 사용하여야 했기 때문에 나고야 의정서에 따라 국제적인 특허분쟁이 발생할 우려가 있거나 상기 식물을 구하기가 어려워 생산비용이 상승하는 문제점이 있었다. 본 발명에서는 상기 문제점을 야기하는 시계초(*passionflower*) 또는 석송강(*Lycopodiella cernua*)가 아닌 새싹인삼과 차풀의 혼합물에 대하여 열수추출을 수행하면 샤프토사이드를 지표물질로 하는 복합추출물을 수득할 수 있으며 상기 복합추출물이 항산화 효과 및 미백효과가 있다는 것을 최초로 밝혔다.
- [0134] 본 발명의 새싹인삼 및 차풀은 모두 한국을 원산지로 하고 있으며 모두 대량생산이 가능하여 매우 경제적인 장점이 있다. 따라서 유용한 천연화장품원료로 주목받고 있는 샤프토사이드를 포함하는 복합추출물을 상기 새싹인삼 및 차풀로부터 수득하여 이를 산업적으로 이용한다면 상기 국제적인 특허분쟁이나 고비용으로 인한 산업적 이용의 제한으로부터 자유로울 수 있다.
- [0136] **실험예 1: 항산화 효과 및 미백효과 확인**
- [0137] 상기 제조한 새싹인삼과 복합추출물에 대한 항산화 활성과 미백활성을 확인하였다. 상기 항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) assay법을 이용하였다. 시험재료는 DPPH, L-ascorbic acid, 메탄올, 96 well plate을 사용하였으며 각 농도별 희석 샘플 20 μ l와 0.15mM DPPH 200 μ l와 혼합 후 30분 암실 반응하여 517nm에서 흡광도를 측정하는 방법으로 항산화 활성을 확인하였다.
- [0138] 상기 미백효과 확인은 타이로시네이즈의 저해 활성 및 멜라닌세포의 활성 저해효과를 측정하여 확인하였다.
- [0139] 상기 타이로시네이즈(tyrosinase) 저해 활성은 시험재료로서 0.1M Sodium phosphate(pH 6.5) buffer, tyrosinase, 1.5mM tyrosine, 및 arbutin을 사용하였으며 상기 새싹인삼과 복합추출물을 다양한 농도로 희석하여 수행하였다. 0.1 M Sodium phosphate(pH 6.5) buffer 220 μ L, 시료액 20 μ L, tyrosinase(1500 U/ml~2000 U/ml) 20 μ L, 1.5mM tyrosine 40 μ L를 순서대로 혼합하고 상기 혼합액을 37 $^{\circ}$ C에서 10~15분 동안 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0140] 상기 멜라닌세포의 활성 저해효과 측정은 B16F10 세포주를 이용하였다. B16F10 세포주는 멜라닌 세포로서 세포활성이 억제되면 피부색소의 생선이 억제되어 미백활성이 있는 것으로 판단할 수 있으므로 화장품 등의 미백활성을 측정하는 방법으로 많이 사용된다. 상기 B16F10 세포주를 96 well plate에 1x10⁶ cells/well 농도로 분주한 후 상기 제조한 새싹인삼과 차풀의 복합추출물을 농도별(100~1,000ug/ml)로 처리한 후 24시간 배양하였다. 상기 배양세포에 대하여 MTT 시약을 처리하고 3시간동안 암실에서 반응시켰다. 상기 반응 후 490nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다.

[0142] 실험예 3: 지표성분 확인

[0143] 상기 새싹인삼과 차폴의 배합비율이 1:9이고 추출용매가 30% 주정이며 80℃의 추출온도 8시간동안 추출한 새싹인삼-차폴 복합추출물에 대하여 Triart C18 PLUS 컬럼(250 x 4.6 mm, D.S-5um.)을 이용하여 HPLC분석을 수행하였다. 샘플의 Injection volume은 10 μ l이었으며 Flow rate는 1ml/min이었으며, Temperature는 37℃였다.

[0144] 상기 HPLC의 solvent는 0.01% Formic acid을 포함하는 물과 acetonitrile(ACN)이었으며 물과 ACN의 비율을 조절하여 분석하였다. 상기 solvent 및 실험조건은 하기 표 1과 같다.

표 1

Time	water(0.01% Formic acid)	Acetonitrile(0.01% Formic acid)
0	84%	16%
20	84%	16%
25	0%	100%
32	0%	100%
37	84%	16%
45	84%	16%

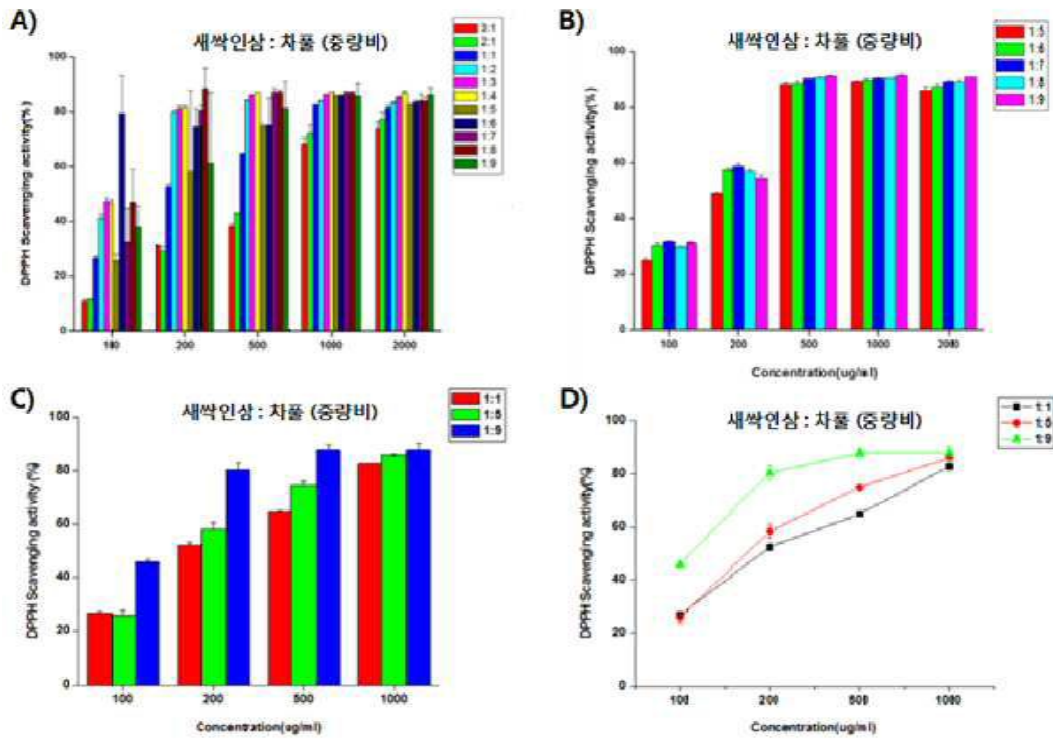
[0147] 상기 HPLC를 통해 수득한 지표물질에 대하여 MALDI-TOF 질량 분석기(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometer, MALDI-TOF MS)를 이용한 질량분석을 수행하고 이를 데이터베이스에 비교하여 상기 지표물질의 종류를 확인하였다.

[0148] 상기 실험결과 12분대에서 확인된 지표물질은 샤프토사이드(schaftoside)인 것으로 확인되었다. 이에 샤프토사이드(CAS 51938-32-0)를 구입하여 상기와 동일한 조건에서 HPLC 실험을 수행하여 본 발명의 지표물질이 샤프토사이드와 동일한 물질인지 확인하였다.

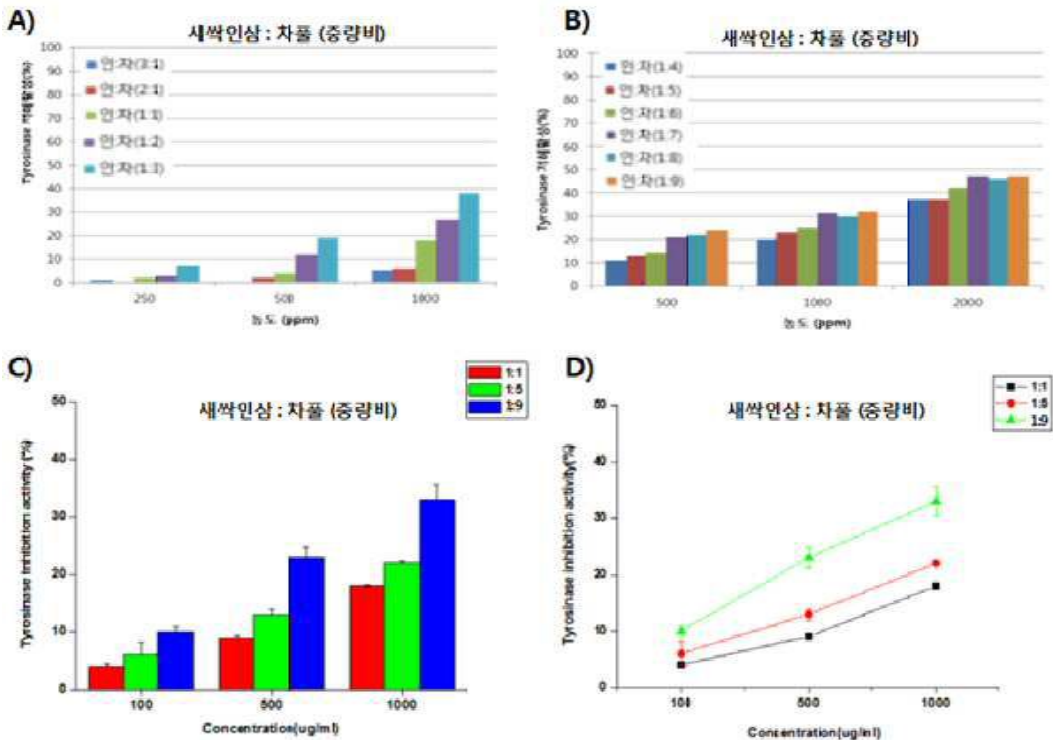
[0150] 본 명세서에서 설명된 구체적인 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예 또는 예시를 대표하는 의미이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되지는 않는다. 본 발명의 변형과 다른 용도가 본 명세서 특허청구범위에 기재된 발명의 범위로부터 벗어나지 않는다는 것은 당업자에게 명백하다.

도면

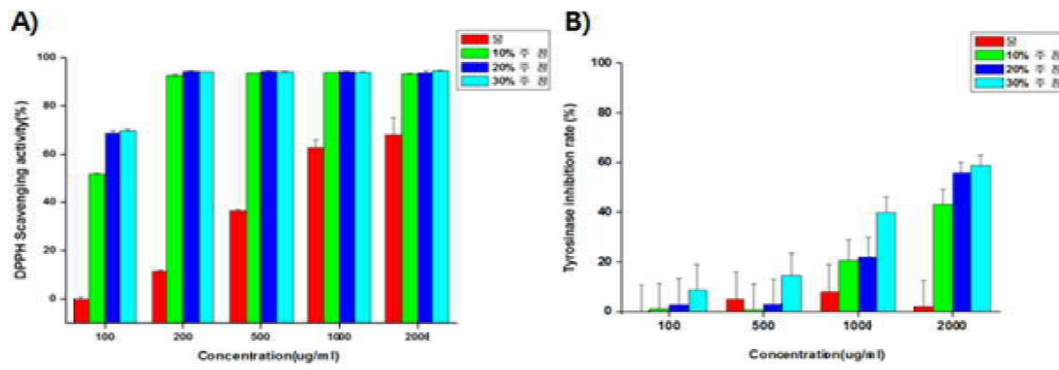
도면1



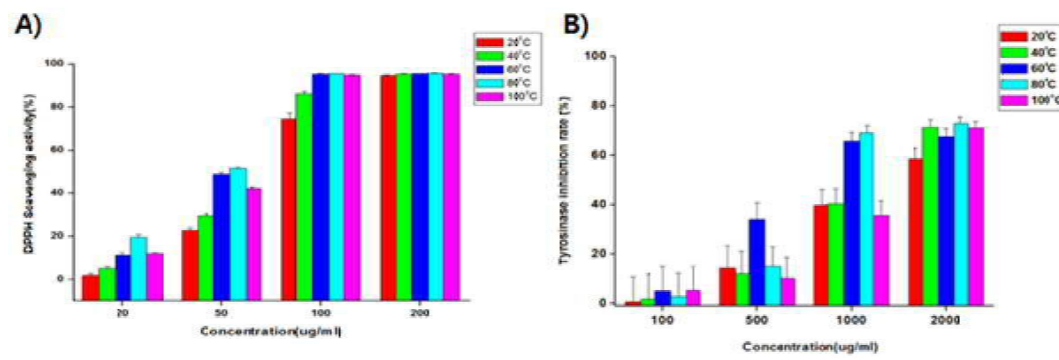
도면2



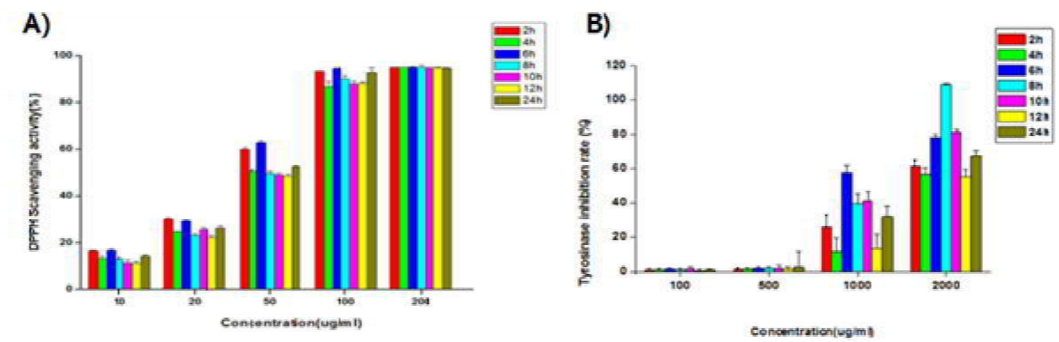
도면3



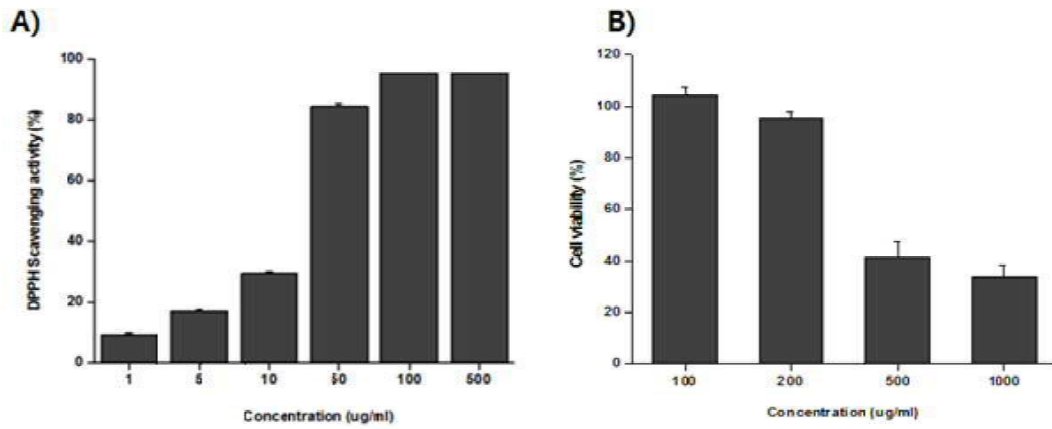
도면4



도면5



도면6



도면7

