



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0032705
(43) 공개일자 2021년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A61Q 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0114061
(22) 출원일자 2019년09월17일
심사청구일자 2019년09월17일

(71) 출원인
주식회사 씨에이치하모니
경기도 안양시 동안구 별말로 126, 218~222호,
226호(관양동, 평촌오비즈타워)
(72) 발명자
최성철
경기도 안양시 동안구 별말로 126, 218~222호,
226호(관양동, 평촌오비즈타워)
최한대
경기도 안양시

(뒷면에 계속)

(74) 대리인
권혁철

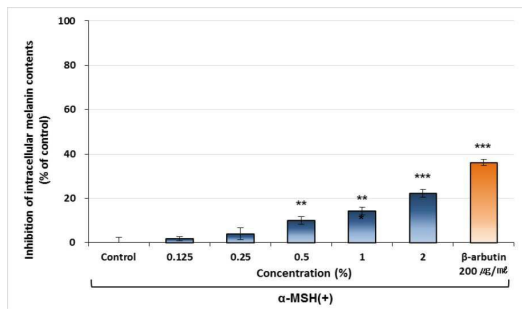
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 고온진공중류 추출법으로 제조된 인삼추출물을 함유하는 화장료 조성물

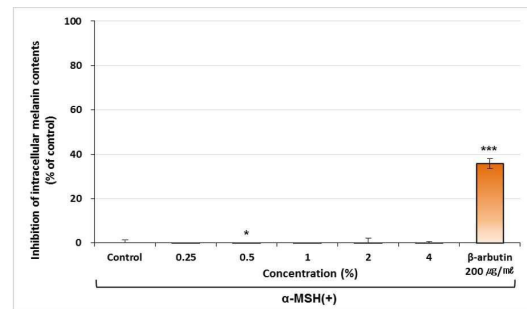
(57) 요약

본 발명은 고온진공중류 추출법으로 제조된 인삼추출물을 함유하는 화장료 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 유기농 생인삼을 고온진공중류 추출법으로 추출하여 우수한 피부미백 및 염증완화효과를 나타내는 인삼추출물을 제조하고 이를 화장료로 이용하는 기술에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 (A)진공중류추출기의 수납용기에 생인삼을 투입하는 단계; (B)200~240℃에서 23~24시간 가열하여 생인삼을 증숙하는 단계; (C)수납용기의 상부가 170~175℃가 되도록 냉각하는 단계; (D)상기 (C)단계의 온도를 유지하면서 20~22시간 가열하여 추출하는 단계; 및 (E)상기 (B), (C), (D)단계에서 포집된 추출물을 여과하는 단계를 포함하는 인삼추출물의 제조방법이 제공된다.

대표도 - 도3



실시예 1



비교예 1

(52) CPC특허분류

A61Q 19/02 (2013.01)

A61K 2800/805 (2013.01)

(72) 발명자

박영재

경기도 안양시 동안구 별말로 126, 218~222호, 22
6호(관양동, 평촌오비즈타워)

박상미

경기도 안양시 동안구 별말로 126, 218~222호, 22
6호(관양동, 평촌오비즈타워)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SA00013784

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농업기술실용화재단

연구사업명 2019 연구개발성과사업화지원

연구과제명 유기농 인삼을 활용한 유기농 화장품 5종개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 주식회사 씨에이치하모니

연구기간 2019.04.01 ~ 2019.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

- (A)진공증류추출기의 수납용기에 생인삼을 투입하는 단계;
- (B)200~240℃에서 23~24시간 가열하여 생인삼을 증숙하는 단계;
- (C)수납용기의 상부가 170~175℃가 되도록 냉각하는 단계;
- (D)상기 (C)단계의 온도를 유지하면서 20~22시간 가열하여 추출하는 단계; 및
- (E)상기 (B), (C), (D)단계에서 포집된 추출물을 여과하는 단계를 포함하는 인삼추출물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생인삼은 잎, 줄기, 뿌리 및 열매로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 것임을 특징으로 하는 인삼추출물의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 생인삼은 건조 인삼을 정제수에 22~24시간 수침한 것을 포함하는 것임을 특징으로 하는 인삼추출물의 제조방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 제조방법에 의하여 제조된 인삼추출물을 유효성분으로서 조성물 전체 중량에 대하여 0.1~20 중량% 함유하는 화장료 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 피부미백용인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 화장료 조성물은 피부염증완화용인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고온진공증류 추출법으로 제조된 인삼추출물을 함유하는 화장료 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 유기농 생인삼을 고온진공증류 추출방법으로 추출하여 우수한 피부미백 및 염증완화효과를 나타내는 인삼추출물을 제조하고 이를 화장료로 이용하는 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 한반도 및 중국 북동쪽에서 서식하는 고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 오가피(*Araliaceae*)과 인삼(*ginseng*)속의 다년생 식물이며 영문명은 'Ginseng'으로 인삼(人蔘)의 중국어 발음에서 유래되었다. 인삼은 한국, 중국 그리고 일본 등 아시아 국가에서 수 천년 동안 전통적인 약초식물로서 이용되고 있고 근래에 들어 전 세계적으로 소비되고 있다. 인삼은 매년 봄이 되면 땅속의 뿌리에서 새싹이 나오며 가을에 잎과 줄기가 말라 죽는다. 또한 인삼은 반음지성 식물로서 지상부는 직사광선에 노출되면 잎의 엽록소가 파괴되면서 고사된다. 꽃은 대부분 3월에 피기 시작하고 개화시기는 5월 중순이다. 여름철에는 인삼재배농가에서 해 가림막을 설치하여 인삼의 연약한 지상부가 직사광선에 의해 고사되는 것을 방지하며 채종은 7월 중순에서 하순까지 실시한다. 우리

나라에서 생산되는 생인삼(수삼)은 수삼용, 뿌리삼(백삼, 홍삼, 태극삼, 흑삼)용 그리고 가공인삼제품용으로 소비되고 있다. 수삼은 밭에서 수확한 생인삼으로 70~80%의 수분을 함유하고 있으며 수삼의 수분을 제거하는 방법에 따라 백삼, 홍삼, 태극삼, 홍삼으로 나뉜다. 국내 인삼재배인력 감소에 따른 인건비 증가와 좁은 재배면적에 따른 대량생산의 한계로 인해 고려인삼의 세계점유율은 감소하고 있어 차별화된 고품질의 고가인삼 개발 및 과학적인 영농방법에 필요성이 대두되고 있다.

[0003] 인삼에 관한 연구는 1845년 미국의 Garrjques가 서양삼으로부터 무정형의 배당체(glycoside) 혼합물을 분리하여 'panaquilon'이라 명명한 것에서부터 시작되었다. 그러나 본격적인 연구는 1957년 옛 소년의 약리학자 Brekhman이 인삼의 유효성분을 saponin이라고 발표한 이후 사포닌 성분을 중심으로 많은 연구들이 수행되어져 왔다. 사포닌이란 스페인어의 거품에서 유래된 말로 물, 알콜에 잘 녹고 지속적인 거품이 있으며 생리적으로는 해독작용과 적혈구 용혈작용이 있다고 알려져있다. 화학적으로는 Libermann-Buchard 반응에 적색으로 발색되고 비당부(sapogenin, aglycone)에 당류가 결합된 배당체이다. 이러한 사포닌은 1960년 Shibata 등의 연구에 의해 인삼 사포닌의 화학구조가 명확히 밝혀지면서 인삼에 대한 연구가 가속화되기 시작하였다.

[0004] 인삼의 사포닌 성분인 Ginsenoside는 인삼에 함유된 배당체란 뜻으로 지금까지 31종의 화학적 구조가 밝혀져 구조적 특성에 따라 dammarane 계열의 triterpenoid인 Protopanaxadiol(PPD)과 Protopanaxatriol(PPT)로 구분된다. 인삼의 품질을 결정하는 요인 중 사포닌의 함량이 주된 요소이며 인삼에서 발견되는 사포닌을 진세노사이드라 한다. 진세노사이드(ginsenoside)란 인삼의 주요 약리활성 물질로서 인삼에서 분리된 배당체(glycoside)라는 의미로 붙여진 이름이며 glycone과 aglycone(sapogenin)구조로 이루어져 있다. 진세노사이드는 Rx로 명명되며 'R'은 'root'의 뜻이고 'x'는 인삼추출물을 TLC상에서 분리했을 때 시료가 이동한 거리를 용매가 이동한 거리로 나눈 Rf value의 위치에 따라 o, a, b, c, d, e, f, g, h 등의 순서로 이름을 붙인 것이다. 진세노사이드 분류는 4가지의 aglycone 구조에 따라 PPD, PPT, ocotillol-type 그리고 oleanolic acid로 나눌 수 있다. Protopanaxadiol (PPD)계 사포닌에는 Ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd Rg3 등이 포함되고 Protopanaxatriol (PPT)계 사포닌에는 Ginsenoside Re, Rg1, Rg2, Rh1 등이 포함된다.

[0005] 현재까지 알려진 인삼의 약리작용 및 효능은 항당뇨 활성을 비롯하여 항암작용, 항산화작용, 동맥경화 및 항 스트레스작용, 두뇌활동 촉진작용, 항염활성, 알레르기성 질환치료, 단백질합성능력의 촉진 등이 보고되었다.

[0006] 이러한 인삼을 장기간 보관을 목적으로 증기 등으로 찌고 건조시켜 장기보관이 가능하게 한 것이 홍삼(紅蔘)이다. 홍삼은 인삼을 증숙, 건조하므로 갈색화반응이 촉진되어 외관은 담갈색 내지 적갈색을 띠며, 홍삼은 증숙과정을 거치는 동안 조직 중의 전분 입자가 호화되어 백삼보다 소화율이 높다. 또한 각종 효소들이 불활성화 되어 저장 시 백삼보다 안정하고, 제조과정 중 일부 화학적 변환이 일어나 수삼이나 백삼에는 존재하지 않는 새로운 생리활성 성분이 생성된다. 이러한 홍삼만의 특유 성분은 Ginsenoside Rg2, Rg3, Rh1, Rh2가 대표적이다. Ginsenoside Rg2는 암 독소에 대한 길항작용 및 종양혈관 신생억제 작용이 있고, Ginsenoside Rg3는 암세포가 정상세포대로 침윤과 혈관신생 전이억제 작용이 있다고 보고되고 있다. 또한 Ginsenoside Rh1은 뇌신경세포 보호 및 학습능력 개선작용이 있으며, Rh2는 암세포의 증식억제 및 형태적 기능적 정상세포로 분화유도 작용이 있다고 알려져 홍삼만의 특징점으로 주목받고 있다. 이와 같은 홍삼의 특정 성분에 대한 약리작용 및 효능이 입증되면서 최근 홍삼 관련 연구 동향은 홍삼 성분을 이용한 의약품 개발과 인삼의 주요 활성 물질인 Ginsenoside에 대한 화학적 구조규명, 물질의 분리 등 기기분석 연구와 홍삼 함량의 증대와 관련된 연구가 많이 보고되고 있다.

[0007] 최근, 기능성물질을 다량 함유하는 인삼가공제품 개발의 일환으로 개발된 흑삼은 한약의 전통적 가공방법인 수치법을 활용하여 아홉 번 찌서 아홉 번 건조(구증구폭, 九蒸九曝)한 것으로, 홍삼의 특유성분인 ginsenoside Rg2, Rg3, Rh1, Rh2를 함유하며 다른 인삼류 생약에서는 확인되지 않은 흑삼특유성분인 ginsenoside Rg5, Rk1 등을 함유하는 것이 확인되었다.

[0008] 추출은 천연물로부터 많은 생리활성성분을 얻는 필수 공정이며, 특정 유효성분을 얻기 위한 분리, 정제 공정의 첫 단계이다. 식품, 의약품, 화장품산업에서 사용하는 일반적인 추출 방법은 스티프증류법, 환류냉각추출법, 초음파추출법(UAE), 초임계유체 추출방법(SFE), 마이크로웨이브 추출방법(MAE), 가속용매 추출방법(ASE, PLE) 및 초고압추출법(HHP)등이 있다. 상기 마이크로웨이브 추출 방법은 마이크로웨이브 추출기로 파프리카의 색소 추출, 라즈베리로부터 항산화 성분 추출 및 인삼 사포닌 추출 등에 이용하는 연구가 보고되고 있으며, 상기 가속용매 추출 방법은 가속 용매 추출기를 이용해 사상자의 기능성분 추출, 오미자로부터 리그난 추출, 클로렐라로부터 카로티노이드 및 클로로필 색소 추출 등을 포함한 다양한 추출에 이용하는 연구가 보고되고 있다. 한편, 홍삼의 특정 진세노사이드(Ginsenoside) 추출물(Rb1+Rg1+Rg3 등)의 추출을 위한 가속용매 추출 방법[70%에탄올,

2000psi, 150℃]은 145.24mg/100g DW의 수율을 보여주며, 인삼과 홍삼 두 가지 모두에서 유효성분인 Ginsenoside 추출 함량은 열수추출법(95℃, 1시간)보다 초고압추출법(80MPa, 30℃, 12시간)에서 1.2~1.4배 높다는 연구가 보고된 바 있다. 초고압 장비와 효소처리를 조합하여 Ginsenoside의 추출수율을 2배 가량 증가시킨 방법 또한 보고되어 있으며, Ginsenoside의 특정 성분인 Rd의 경우, 초고압-효소처리 추출법에서 첨가하는 효소의 특정 조합(Cellulase 2U/mL + Cellobiase 4U/ml)으로 24시간 추출하였을 때, 대기압에서의 효소처리 보다 Rd 추출함량을 7배 높다는 연구도 보고된 바 있다. 한국의 산양삼 주요 생리활성성분은 진세노사이드 배당체와 산으로 가수분해 되는 배당체의 산물인 프로토파낙시디올(Protopanaxadiol) 그룹과 프로토파낙사트리올(Protopanaxatriol) 그룹, 올레아놀릭산(oleanolic acid)이 있다. 이와 같이 진세노사이드를 포함하는 인삼의 유효성분은 다양한 추출 방법에 의하여 추출할 수 있으나, 그 수율이나 활성은 추출 방법에 따라 차이가 나기 때문에 용도에 맞는 추출 방법을 선택하는 것은 매우 중요하다.

[0009] 본 발명자들은 천연, 유기농 원료로부터 화장료를 개발하기 위하여 연구하였으며, 화학적인 방부제의 첨가 없이도 세균오염에 대한 저항력이 우수한 고온진공방식의 추출방법을 개발하여 특허등록(대한민국 특허등록 제10-1965178호)을 받은바 있다. 그 후속연구 과정에서 상기 추출방법을 인삼에 응용하는 경우에 피부미백활성 및 염증완화활성이 우수한 인삼추출물이 얻어지는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) (문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2016-0019190호 (2016.02.19)
(특허문헌 0002) (문헌 0002) 대한민국 공개특허 제10-2019-0065788호 (2019.06.12)
(특허문헌 0003) (문헌 0003) 대한민국 공개특허 제10-2015-0046427호 (2015.04.30)
(특허문헌 0004) (문헌 0004) 대한민국 등록특허 제10-1630816호 (2016.06.17)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 피부미백활성 및 피부염증완화활성이 우수한 인삼추출물의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
[0012] 또한, 본 발명은 상기 인삼추출물을 유효성분으로 함유하는 항노화 화장료 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따르면, (A)진공증류추출기의 수납용기에 생인삼을 투입하는 단계; (B)200~240℃에서 23~24시간 가열하여 생인삼을 증숙하는 단계; (C)수납용기의 상부가 170~175℃가 되도록 냉각하는 단계; (D)상기 (C)단계의 온도를 유지하면서 20~22시간 가열하여 추출하는 단계; 및 (E)상기 (B), (C), (D)단계에서 포집된 추출물을 여과하는 단계를 포함하는 인삼추출물의 제조방법이 제공된다.
[0014] 이때, 상기 생인삼은 잎, 줄기, 뿌리 및 열매로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 것이다.
[0015] 또한, 상기 생인삼은 건조 인삼을 정제수에 22~24시간 수침한 것을 포함하는 것임을 특징으로 한다.
[0016] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따르면, 상기 제조방법에 의하여 제조된 인삼추출물을 유효성분으로서 조성물 전체 중량에 대하여 0.1~20 중량% 함유하는 화장료 조성물이 제공된다.
[0017] 상기 화장료 조성물은 피부미백용 또는 피부염증완화용인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 제조방법에 의하여 얻어지는 인삼추출물은 피부미백활성 및 피부염증완화활성이 우수하므로 항노화용 화장료로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 고온진공증류 추출방법을 나타내는 도면이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 인삼추출물을 처리했을 때 B16-F10 melanoma 세포의 생존율을 나타내는 그래프이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 인삼추출물의 멜라닌 생성 억제율을 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 인삼추출물의 NO 생성 억제율을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0021] 본 발명은 홍삼을 제조하는 복잡하고 번거로운 과정을 거치지 않고도, 생인삼으로부터 직접 피부개선 활성성분이 강화된 인삼추출물을 제조하고, 이를 항노화용 화장품으로 이용하는 것을 기술적 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명에 따른 인삼추출물은 다음과 같은 방법에 의하여 제조된다.
- [0023] (A)진공증류추출기의 수납용기에 생인삼을 투입하는 단계; (B)200~240℃에서 23~24시간 가열하여 생인삼을 증숙하는 단계; (C)수납용기의 상부가 170~175℃가 되도록 냉각하는 단계; (D)상기 (C)단계의 온도를 유지하면서 20~22시간 가열하여 추출하는 단계; 및 (E)상기 (B), (C), (D)단계에서 포집된 추출물을 여과하는 단계를 포함하는 방법에 의하여 제조된다.
- [0024] 본 발명의 일 구체예에 따르면 상기 추출은 도 1에 도시된 고온진공증류 추출장치를 통하여 이루어진다.
- [0025] 상기 고온진공증류 추출장치는 수납용기(210), 가열부(220), 냉각부(230), 추출물 저장부(300), 그리고 상기 가열부(220), 냉각부(230)를 제어하는 제어부(미도시)로 구성된다. 먼저, 냉각부(230)가 형성된 뚜껑을 열고, 추출원물인 생인삼(m)을 수납용기(210)에 투입한다. 상기 생인삼은 잎, 줄기, 뿌리 및 열매로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 것이며, 바람직하게는 뿌리이다. 또한, 상기 추출원물인 생인삼은 수삼이거나, 건조인삼을 증류수에 22~24시간 수침한 것이다.
- [0026] 뚜껑을 닫고 가열부(220)를 통해 승온하여 내부온도 200~240℃에서 23~24시간 가열하여 생인삼을 증숙(蒸熟)한다. 증숙과정에서 가열되어 팽창된 내부공기는 수납용기(210)와 냉각부(230) 사이에 형성된 증기 배출구(233)를 통하여 외부로 배출될 수 있다. 상기 증기 배출구(233)는 내부 공기 중 일부가 밖으로 배출되도록 하되, 내부의 압력이 낮아져도, 외부공기가 내부로 유입되지 않도록 하는 일방향 밀폐 수단을 구비하는 것이 바람직하다.
- [0027] 상기 시간이 경과하면 냉각부(230)를 가동하여 수납용기(210)의 상부온도가 170~175℃가 되도록 냉각한다. 상기 냉각부(230)에는 냉각부의 내부 상단에 냉각팬(231)이 배치되거나, 차가운 공기가 공급되도록 하는 냉각 노즐(미도시)이 추가로 구비될 수 있다.
- [0028] 추출 재료(m)가 1차 가열되는 과정에서 수납용기(210)의 내부 공기가 가열되어 팽창함으로써, 내부 공기의 압력이 상승하면, 내부 공기 중 일부가 밖으로 배출되어, 내부 공기의 압력이 낮아지게 되고, 압력이 낮아진 상태로 가열부(220)의 상단에 배치된 냉각부(230)에 의해 냉각이 이루어진다.
- [0029] 이때, 상부와 하부의 온도차에 의해, 도 1에 도시된 바와 같이 내부에서 대류 현상이 발생되어 효율적인 추출이 이루어지게 된다.
- [0030] 이와 같이 내부에 대류 현상이 발생되더라도, 증기 배출구(233)를 통해 내부 공기는 배출되고 외부 공기는 유입되지 않기 때문에, 수납용기(210)의 내부에는 진공압력이 발생한다. 상기 진공압력이 발생된 상태에서 상기 온도조건을 유지하면서 20~22시간 2차 가열하면서 증숙된 인삼을 추출한다. 수납용기(210)가 2차 가열됨에 따라 내부에 수용된 추출 재료(m)의 활성성분을 포함하는 증기가 발생되어 상승하고, 온도조건을 유지하기 위하여 냉각부(230)가 작동하면 냉각부에 도달한 증기는 냉각 응축되어 하강함으로써 추출물 저장부(300)에 포집된다. 도 1에 도시된 바와 같이 상기 증숙단계부터 증기가 발생되어 추출이 이루어질 수 있다. 상기 포집된 추출물은 상기 추출물 저장부(300)와 연결된 여과장치를 통과하여 여과된다. 이와 같은 추출공정에 있어서, 온도, 시간 등은 제어부를 통하여 조절된다.
- [0031] 상기 제조방법에 의하여 제조된 인삼추출물은 우수한 멜라닌 생성 저해 활성(시험예 2)과, NO 생성 억제 활성(시험예 3)을 나타냄을 확인하였다. 또한 상기 제조방법에 의하여 제조된 인삼추출물은 투명하거나 투명도가 높

은 액상으로 얻어지므로 다양한 제형에 적용이 가능하다는 장점을 가진다.

[0032] 그러므로 상기 인삼추출물은 피부미백용, 피부염증완화용 화장료로 다양한 제형에 유용하게 적용될 수 있다. 유효성분으로서의 상기 인삼추출물은 조성물 전체 중량에 대하여 0.1~20 중량% 함유된다.

[0033] 본 발명의 화장료 조성물은 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 그 예로는 화장수, 크림, 에센스, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 여성청결제, 팩, 바디 로션, 바디 오일, 바디 젤, 샴푸, 린스, 헤어 컨디셔너, 헤어 젤, 화운데이션, 립스틱, 마스크라, 메이크업 베이스 등을 들 수 있다.

[0034] [실시예]

[0035] 이하, 본 발명의 구체적인 내용을 실시예를 들어 상세히 설명한다.

[0036] **실시예 1: 고온진공증류추출 인삼추출물의 제조**

[0037] 유기농 생인삼의 뿌리 5 Kg을 도 1에 도시된 진공증류추출기의 수납용기에 투입하고 200℃에서 23시간 가열하여 생인삼을 증숙하였다. 증숙 후에 진공증류추출기의 상부에 설치된 냉각부를 가동시켜 수납용기의 상부가 170~175℃가 되도록 냉각하였다. 상기 온도를 유지하면서 22시간 가열하여 추출하였다. 응축되어 떨어져 포집된 추출물을 마이크로필터로 여과함으로써 침전물을 제거하여 미황색의 액상 인삼추출물을 얻었다.

[0038] **비교예 1: 저온진공추출 인삼추출물의 제조**

[0039] 유기농 생인삼의 뿌리 5 Kg을 진공증류추출기의 수납용기에 투입하고 75℃에서 3시간 증류하여 추출하였다. 93℃에서 20분간 멸균하고, 45℃까지 냉각시켰다. 마이크로필터로 여과함으로써 침전물을 제거하여 인삼추출물을 제조하였다.

[0040] **시험예 1: 세포 생존율 시험**

[0041] 상기 실시예 1의 인삼추출물을 시료로 하여 세포 생존율 시험을 하였다.

[0042] 세포 배양

[0043] B16-F10 melanoma 세포를 10% fetal bovine serum(FBS), 1% Penicillin/Streptomycin이 첨가된 DMEM 배지로 세포수가 5×10^5 cells/dish 가 되도록 배양한다. 150mm cell culture dish를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에 배양한다. Confluence에 도달한 세포는 Trypsin EDTA를 사용하여 계대 배양하여 유지한다.

[0044] 세포 생존율 실험(WST assay)

[0045] 살아있는 세포 내의 미토콘드리아에 존재하는 탈수소효소는 Tetrazolium Salt(WST)에서 formazan이라는 발색물질을 생성한다. 따라서 이를 측정하여 살아있는 세포의 수를 측정할 수 있다. 96 well cell culture plate에 2×10^3 cells/well 농도의 B16-F10 세포를 10% fetal bovine serum(FBS), 1% Penicillin/Streptomycin이 첨가된 DMEM 배양액으로 24시간 배양한다. 그 후 시료가 농도 별로 포함된 DMEM배지로 교체하여 72시간 배양한다. 배양이 끝난 세포에 EZ-CYTOX 시약을 처리하고 450nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과에도 2에 나타내었다.

[0046] $\text{Cell viability}(\%) = (\text{시료 첨가군의 흡광도} / \text{무처리군의 흡광도}) \times 100$

[0047] 도 2에서 확인되는 바와 같이, 실시예 1의 시료는 무처리군에 비교했을 때 2% 이하 농도 범위에서 B16-F10 melanoma 세포의 생존율이 90% 이상으로 나타나, B16-F10 melanoma 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

[0048] **시험예 2: 멜라닌 생성 저해활성 확인 시험**

[0049] 상기 실시예 및 비교예의 인삼추출물을 시료로 하여 다음과 같은 방법으로 멜라닌 생성 저해활성을 확인하였다.

[0050] 인간의 피부에서 멜라닌 생성 과정을 살펴보면 멜라닌은 Melanocyte의 Melanosome에서 생합성되며 자극에 의해 멜라닌 형성 관련 효소(Tyrosinase, TRP1, TRP2)가 활성화되고 멜라닌 형성 관련 효소에 의해 멜라닌이 형성되면 형성된 멜라닌이 수지상 돌기를 통하여 Keratinocyte로 이동하며 착색되는 과정을 거친다. Melanocyte 자극 인자로는 α -MSH(alpha-melanocyte-stimulating hormones)가 있다. 멜라닌 생성 억제 단계는 5가지로 볼 수 있는데, 첫 번째, melanocyte로의 자극신호를 차단하는 방법으로 대표적인 미백제로는 비타민C 화합물과 비타민E가 있고, 두 번째, Tyrosinase 형성 관련 유전자를 억제하는 방법으로 대표적인 미백제로는 레티놀이 있다. 그

리고 세 번째, Tyrosinase가 activating하기 위한 단계인 glycosylation을 억제하는 방법으로 대표적인 미백제로는 글루코사민이 있으며, 네 번째, tyrosinase를 불활성화시키는 방법으로 대표적인 미백제는 코지산, 알부틴, 비타민C 화합물이 있고, 다섯 번째, Keratinocytes로의 이동을 차단하는 방법으로 대표적인 미백제로는 니아신아미드가 있다.

- [0051] 본 시험에서는 시험 물질인 인삼추출물 시료가 α -MSH에 의해 유도되는 멜라닌형성세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 다음과 같은 방법으로 in-vitro 상에서 조사하였다.
- [0052] ①B16-F10 melanoma 세포를 6well cell culture plate 에서 8×10^4 cells/well 농도로 DMEM 배지(10% fetal bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin)를 이용해 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한다.
- [0053] ②100uM α -Melanocyte stimulating hormone(α -MSH)을 DMEM/Modified 배지 에 희석하여 100nM α -MSH를 함유하는 DMEM/Modified 배지를 제조한다.
- [0054] ③시료와 양성대조군 β -arbutin을 DMEM/Modified 배지(100nM α -MSH)를 이용하여 농도별로 희석하여 준비한다.
- [0055] ④24시간 배양한 세포의 배양액을 제거한 후 DPBS 2ml로 세포를 세척한다.
- [0056] ⑤농도별로 희석하여 준비한 시료를 3ml씩 처리한다.
- [0057] ⑥37℃, 5% CO₂ incubator에서 48~72시간 배양한다.
- [0058] ⑦배양이 완료된 후 세포와 배양액을 회수하여 원심분리한다.
- [0059] ⑧상층액을 96well plate에 100ul 씩 분주한 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 외 멜라닌 유리량을 측정한다.
- [0060] ⑨상층액 제거 후 DPBS 1 ml로 세포를 세척한 다음 40℃ 에서 건조시킨다.
- [0061] ⑩건조시킨 세포에 1N NaOH(10% DMSO) 를 120ul 첨가한 후, 60℃ water bath 에서 1시간 중탕하여 세포를 용해시킨다.
- [0062] ⑪15000 rpm, 40분간 원심분리 한다.
- [0063] ⑫상층액을 96 well plate에 100ul 씩 분주한 다음 490nm에서 흡광도를 측정하여 세포 내 멜라닌 생성량을 측정한다.
- [0064] B16-F10 melanoma 세포의 내, 외부에 생성되는 멜라닌량 측정 결과를 하기 표 1과 표 2에 나타내었으며, 멜라닌 생성 억제율은 다음 식에 의해 계산하여 도 3에 나타내었다.

$$\text{멜라닌 생성 억제율 (\%)} = 100 - \frac{\text{시료 처리군 멜라닌 생성량}}{\alpha\text{-MSH 처리 대조군 멜라닌 생성량}} \times 100$$

[0065]

표 1

[0066]

농도(%)	Total melanin content(% of control)
	실시예 1
Control - α -MSH	49.82
Control + α -MSH	100.00
0.125	98.17
0.25	95.97
0.5	89.90
1	85.72
2	77.71
β -arbutin 200 $\mu\text{g/ml}$	63.88

표 2

[0067]

농도(%)	Total melanin content(% of control)
	비교예 1

Control - α -MSH	53.02
Control + α -MSH	100.00
0.25	101.17
0.5	105.70
1	101.84
2	100.03
4	102.39
β -arbutin 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$	64.21

[0068] 상기 표 1과 도 3에서 확인되는 바와 같이 양성대조군인 β -arbutin의 경우, α -MSH 처리를 통해 생성되는 세포 내/외 총 멜라닌 생성을 36.12 % 저해하는 것으로 확인되었다. 실시예 1의 인삼추출물 시료의 경우, 0.125 내지 2 % 처리 농도 범위에서 농도 의존적으로 세포 내/외 총 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 확인되었으며, 특히 2% 처리 농도에서 세포 내/외 총 멜라닌 생성을 22.29% 저해하는 것으로 나타났다. 이에 대하여 비교예 1의 인삼추출물 시료의 경우, 0.25 내지 4 % 처리 농도 범위에서 세포 내/외 총 멜라닌 생성 저해 효과를 확인할 수 없었다(표 2, 도 3).

[0069] 상기의 결과로부터 본 발명의 고온진공증류추출법에 의하여 제조되는 상기 실시예 1의 인삼추출물은 미백 효능이 우수한 것을 확인할 수 있다.

[0070] 시험예 3: NO 생성 저해 확인 시험

[0071] 상기 실시예 및 비교예의 인삼추출물을 시료로 하여 다음과 같은 방법으로 NO 생성 저해활성을 확인하였다.

[0072] 염증반응은 인체가 항상성을 유지하기 위해 외부 자극원에 대한 인체의 방어 기작으로 미생물 유래의 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 외부자극원과 arachidonic acid와 같은 내부자극원들을 매개로 해 발생한다. LPS는 그람 음성 박테리아의 세포벽 최외곽층에 존재하는 물질로서 병원성 세균과 진핵 생물간의 상호작용에 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0073] 특히 LPS는 인체에서 외래 물질로 인식되어 세포 방어 시스템을 활성화시키고, 이로 인해 면역방어 시스템 중 하나인 염증 유발 경로가 활성화 된다. 세포가 LPS 등의 외부 자극원에 의해 자극을 받게 되면, 유도형 NO synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현이 유도되고, 이로 인해 염증반응을 매개하는 세포 내 신호 전달물질인 일산화질소(nitric oxide, NO)와 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2, PGE2)를 방출하게 된다.

[0074] 이렇게 과다 방출된 NO 및 PGE2 로 인해 인체 및 조직에 염증반응이 일어나게 된다. 일반적으로 NO는 생리적인 현상인 혈압 조절과 신경전달 매개체로 작용하는 등 정상적인 생리활성의 조절 작용을 하는 조절물질이며, 면역반응에 있어서도 중추적인 조절물질 역할을 하고 있다. 하지만 iNOS에 의해 과발현된 NO는 염증반응을 일으키고 면역체계의 이상을 유발한다. 또한 COX-2는 arachidonic acid를 prostaglandins(PGs)로 전환시키는 효소로서, COX-2가 과발현하게 되면, PGE2가 과다 생성되어 또 다른 염증 유발 경로 역할을 하게 된다.

[0075] 본 시험에 사용한 RAW 264.7 세포는 대식세포 유래의 염증 모델 세포주로서 LPS를 처리하게 되면 염증 유발 경로가 활성화 되어 iNOS 및 COX-2 발현이 유도되고, 이로 인해 염증반응을 매개하는 세포 내 신호 전달물질인 일산화 질소(nitric oxide, NO)와 프로스타글란딘 E2(prostaglandin E2, PGE2)를 과발현하게 된다.

[0076] 본 시험에서는 인삼추출물 시료를 이용하여 RAW 264.7 세포를 염증 유발 모델로 해 LPS를 처리한 후, NO생성량을 in-vitro 상에서 조사하였으며, 이를 통해 시험물질의 항염 활성화에 대해 알아보하고자 한다.

[0077] 세포 배양

[0078] 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 10% fetal bovine serum(FBS) 및 1% penicillin/streptomycin이 함유된 DMEM 배지를 이용하여 100mm cell culture dish를 사용하여 5% CO₂ 배양기에 배양한다. Confluence에 도달한 세포는 scraper를 사용하여 계대 배양하여 유지한다.

[0079] 시험 물질 처리

[0080] RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/dish density로 24 well plate에 분주하여 24시간 동안 plate에 부착시킨다. 염증반응을 유발하기 위해 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 LPS(lipopolysaccharide)와 시험물질을 함유한 새로운 배지를 처리하여 24시간 배양하였다.

[0081] Nitric Oxide(NO) 생성량 측정 실험

[0082] RAW 264.7 세포에서 생성되어 배양액에 존재하는 NO 수준을 Griess 반응을 기본으로 하는 NO detection kit(intron)를 사용하여 측정하였다. NO가 존재한다고 추정되는 배양액을 96 well plate에 100 μ l씩 분주한 후 N1 buffer(sulfanilamide) 50 μ l를 넣어 10분간 실온에서 반응 시킨다. 이어서 N2 buffer (naphthylethylenediamine) 50 μ l를 넣고 10분간 실온에서 반응 시킨 후 540nm에서 흡광도 측정하였다. 각 NO 생성량은 nitrite standard를 이용하여 얻은 표준검량곡선을 이용하여 산출 하였으며, positive control은 L-NMMA (50 μ M)을 사용하였다.

[0083] 상기 실시예 및 비교예의 인삼추출물 시료가 RAW264.7 세포의 Nitric oxide(NO) 생성에 미치는 영향을 확인한 결과를 표 3, 표 4 및 도 4에 나타내었다.

표 3

구분(%)	Nitric Oxide (μ M of control)
	실시예 1
control	-7.98
Control + LPS(μ g/mL)	28.24
0.0625	25.81
0.125	24.64
0.25	21.30
0.5	17.07
1	9.41
L-NMMA 50 μ M	9.23

표 4

구분(%)	Nitric Oxide (μ M of control)
	비교예 1
control	-7.98
Control + LPS(μ g/mL)	28.24
0.125	28.64
0.25	28.42
0.5	28.64
1	28.60
2	28.24
L-NMMA 50 μ M	9.23

[0086] 상기 표 3과 도 4에서 확인되는 바와 같이, 상기 실시예의 인삼추출물 시료를 대상으로 LPS에 의한 RAW264.7 세포의 NO 생성에 미치는 영향을 확인한 결과, 양성 대조군인 L-NMMA는 50 μ M 농도에서 RAW264.7 세포의 NO 생성을 67.32% 저해하는 것으로 확인되었으며, 상기 실시예의 인삼추출물 시료는 0.0625 내지 1% 농도 범위에서 농도 의존적으로 NO 생성을 저해하는 것으로 확인되었다. 특히, 1% 처리 농도에서 NO 생성량이 9.41 μ M로 나타났으며, 이는 무처리군 대비 NO 생성을 66.68% 억제하는 결과이다.

[0087] 이에 대하여 저온진공증류 추출방식으로 제조된 상기 비교예의 인삼추출물 시료는 0.125 내지 2% 농도 범위에서 NO 생성 저해 활성을 확인할 수 없었다.

[0088] 상기, 결과로부터 본 발명 고온진공증류 추출방식으로 제조된 인삼추출물은 대조군인 L-NMMA와 유사할 정도의 우수한 NO 생성 저해활성을 나타내므로 피부염증완화용 화장료로 유용하게 활용될 수 있음을 알 수 있다.

[0089] 제형 실시예 1: 인삼추출물을 함유하는 크림의 제조

[0090] 상기 실시예 1의 인삼추출물을 함유한 크림을 하기의 표 5의 조성 및 함량으로 통상의 방법에 따라 제조하였다.

표 5

원료	함량(중량%)
인삼추출물(실시예 1)	1.0

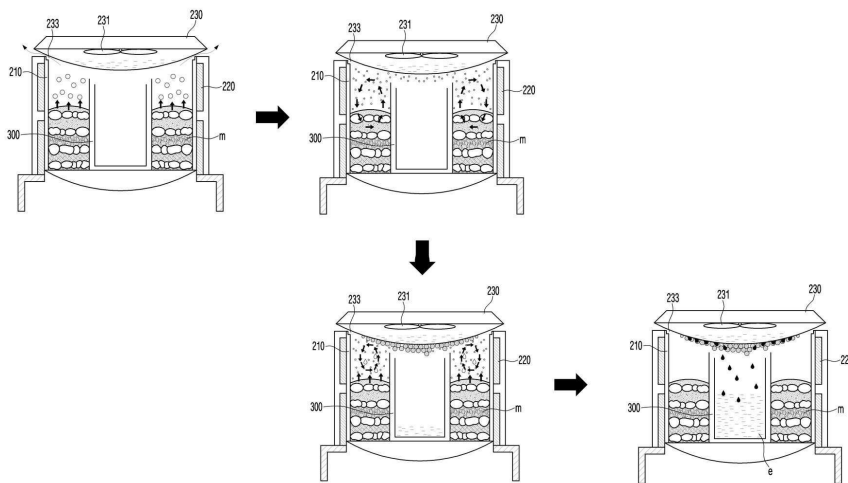
시어버터	2.0
칸데릴라 왁스	1.5
세테아릴올리베이트	0.8
해바라기씨오일	10.0
올리브오일	3.0
소르비탄 올리베이트	0.5
스쿠알란	1.0
세테아릴알코올	2.0
글리세릴스테아레이트	1.0
프로판다이올	3.0
잔탄검	0.25
달맞이꽃오일	0.25
천연방부제	적량
정제수	To 100

부호의 설명

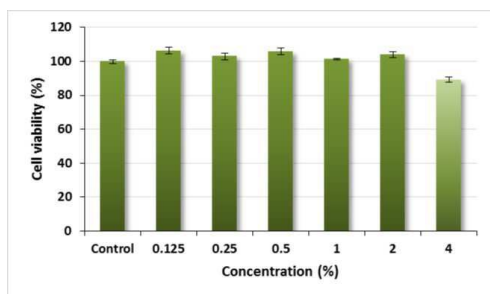
[0092] 210:수납용기 220:가열부 230:냉각부
231:냉각팬 233:증기 배출구 300:추출물 저장부

도면

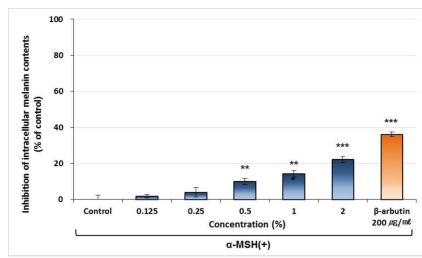
도면1



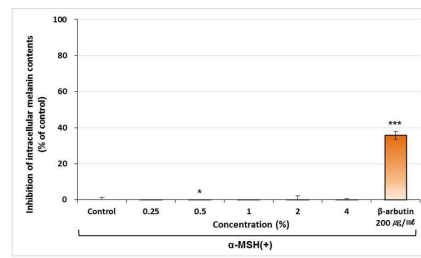
도면2



도면3

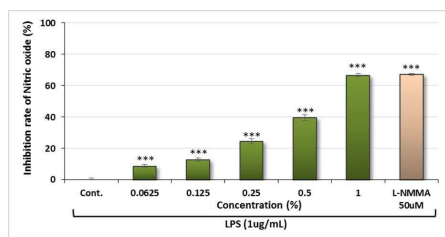


실시예 1

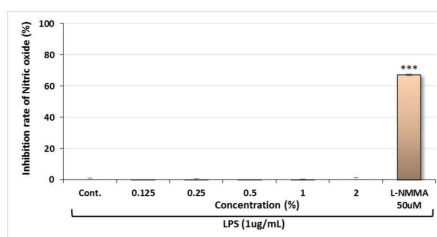


비교예 1

도면4



실시예 1



비교예 1