



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월18일
(11) 등록번호 10-1667284
(24) 등록일자 2016년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/97 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0066330
(22) 출원일자 2015년05월12일
심사청구일자 2015년05월12일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020090034241 A*
KR1020020044266 A*
KR1020140081138 A*
KR1020060104804 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
송규용
대전광역시 유성구 대학로 99, 약학과 (궁동, 충남대학교)
(74) 대리인
특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 5 항

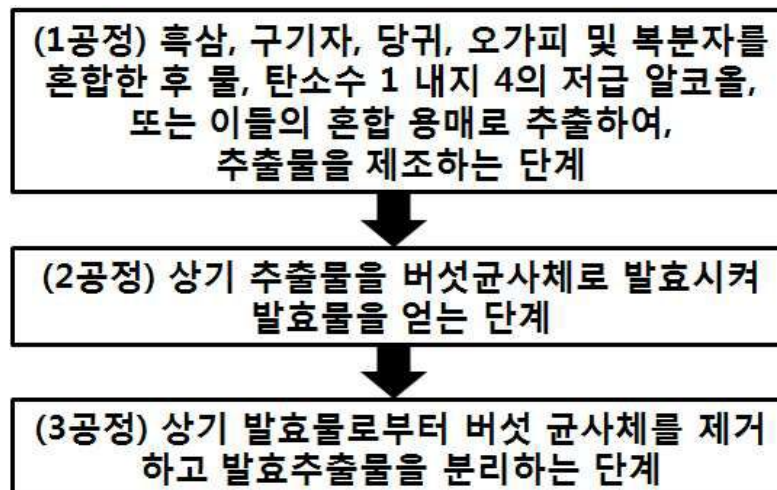
심사관 : 최수형

(54) 발명의 명칭 **흑삼 및 혼합 생약의 발효 추출물을 함유하는 화장료 조성물**

(57) 요약

본 발명은 흑삼 및 혼합 생약의 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물에 관한 것으로서, 피부에 안전하면서도, 우수한 멜라닌생성 억제, 콜라겐 합성 증진, 및 항산화 활성을 가져, 피부 미백, 주름 개선과 탄력 증진, 및 노화 지연 효과가 뛰어나다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2800/85 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093815

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소사업

연구과제명 심혈관계 질환 치료제 개발 기반연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 및 복분자의 발효 추출물을 유효성분으로 함유하며,

상기 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 및 복분자의 발효 추출물은, 흑삼 100중량부를 기준으로, 구기자 30~300중량부, 당귀 30~300중량부, 오가피 30~300중량부 및 복분자 30~300중량부를 혼합한 후 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 추출물을, 버섯 균사체로 발효시킨 것을 특징으로 하는 화장료조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 버섯 균사체는 우장지버섯(*Antrodia Coaphorata*) 균사체인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항 또는 제3항에 있어서,

상기 조성물은 피부 미백, 주름개선, 또는 항산화용 화장료 조성물인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제3항에 있어서,

상기 화장료 조성물은, 화장수, 유액, 크림, 에센스, 팩, 마스크, 파운데이션, 자외선차단제품, BB크림, 또는 피부세정제 제형인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 7

(1공정) 흑삼 100중량부를 기준으로, 구기자 30~300중량부, 당귀 30~300중량부, 오가피 30~300중량부 및 복분자 30~300중량부를 혼합한 후 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여, 추출물을 제조하는 단계;

(2공정) 상기 추출물을 버섯균사체로 발효시켜 발효물을 얻는 단계; 및

(3공정) 상기 발효물로부터 버섯 균사체를 제거하고 발효추출물을 분리하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 흑삼 및 혼합 생약의 발효 추출물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 흑삼 및 혼합 생약의 발효 추출물을 함유하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 신체의 최외각에 존재하며 외부로부터 몸을 보호하는 중요한 기관이다. 모든 생명체의 모든 기관은 나이가 들어감에 따라 노화가 진행되는데 피부 또한 예외가 아니다. 일반적으로 피부노화는 내인성 노화

(intrinsic aging)와 광노화(photoaging)와 같은 외인성 노화로 나뉘는데, 내인성 노화는 나이에 따라 자연적으로 노화가 일어나는 것을 의미하며 광노화는 햇빛에 의해 나타나는 노화현상을 말한다.

[0003] 피부가 노화되면서 나타나는 대표적인 현상은 주름과 기미/검버섯 등 잡티이다. 피부 주름의 경우 여러 원인에 의해 피부 진피층에 존재하는 탄력섬유인 콜라겐의 분해 또는 합성 저하에 의해 탄력이 떨어지면서 나타나는 현상이다. 기미나 검버섯 같은 잡티 역시 호르몬 이상이나 자외선에 의해 멜라닌 색소가 과다하게 생성되면서 나타나는 현상이다.

[0004] 내인성 노화든 외인성 노화든 간에 이들은 활성산소가 깊이 관여하는 것으로 알려져 있는데, 내인성 노화는 생체 세포내에서의 대사과정에서 발생하는 활성산소가 주로 작용하고 외인성 노화의 경우에는 자외선에 의한 활성산소의 발생이 주된 원인이다. 그러므로 피부노화를 완전히 막을 수는 없지만 항산화제 또는 콜라겐 합성물질이 들어 있는 화장품 같은 외용제의 사용이나 자외선에 대한 노출을 피하는 등의 노력으로 어느 정도 노화를 지연시킬 수 있다는 것이 일반적으로 알려진 사실이다.

[0005] 그러므로 피부노화 지연용 화장품을 만들기 위해서는 콜라겐 합성 촉진 또는 세포재생 기능을 부여하거나 활성산소를 제거할 수 있는 항산화제의 사용이 필요하다. 대표적인 항산화제로서는 수퍼옥사이드디스뮤타제(SOD)라는 효소와 비타민 C, 비타민 E(토코페롤), 플라보노이드 등이 있다. 또한 콜라겐 합성 촉진물질로는 비타민 C, 비타민 A(retinoic acid), 피부성장인자(EGF) 등이 있다.

[0006] 앞서 설명한 항산화제들을 화장품에 적용함에 있어서의 문제점은 이들이 불안정하기 때문에 장기간의 유통기간을 갖는 화장품에 적용이 쉽지 않고 과량 사용 시 피부에 부작용을 일으킬 수 있는 문제점이 있다. 그러므로 주름개선이나 미백효과가 우수한 화장품을 개발하기 위해서는 제형 내에서 안정하면서 피부 부작용이 적은 성분들이 많이 개발되어 화장품에 이용되고 있다.

[0007] 본 발명자들은 피부에 안전하면서도, 피부 미백, 주름 개선 및 노화지연 효과가 우수한 화장품을 개발하기 위하여 예의 연구를 거듭한 결과, 예로부터 전통적으로 한방 약재로 사용되어온 천연물질 중에서 흑삼과 몇 가지 생약의 복합물이 우수한 항산화능 및 콜라겐 합성능이 있는 것을 알게 되었으며, 특별히 이들 복합물의 발효추출물이 각각의 약재를 사용한 경우보다 그 효과가 현저히 상승하는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 한편, 본 발명과 관련한 선행 특허문헌으로서, 한국특허 제1180354호에는 흑삼추출물을 함유하는 화장료 조성물 개시되어 있고, 한국특허 제910040호에는 감초, 당귀, 인삼, 황금, 및 백봉령으로 이루어지는 군으로부터 1종 이상 선택되는 약재의 버섯균 발효물을 효모 등으로 발효시켜 추출한 발효추출물을 포함하는 항산화 활성을 갖는 화장료 조성물이 개시되어 있으며, 한국특허 제2013-004778호에는 천연물을 약용 꽃으로 싸거나 덮어서 발효시켜 제조된 싹 발효 추출물을 함유하는 피부 외용제 조성물에 대해 개시되어 있다. 또한, 한국공개특허 제2014-0081138호에는 우장지버섯 균사체의 추출물 또는 그 배양액을 함유하는 피부 외용제 조성물에 대해 개시되어 있다.

[0009] 그러나, 이들 선행 특허문헌에, 본 발명과 같은 조성의 흑삼 및 혼합 생약의 추출물을 버섯균사체로 발효시킨 발효추출물에 대해서는 전혀 기재된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1180354호(흑삼(黑蔘) 추출물을 함유하는 화장료 조성물, 2012.08.31. 등록)
- (특허문헌 0002) 한국등록특허 제910040호(항산화 활성을 갖는 화장료 조성물, 2009.07.23. 등록)
- (특허문헌 0003) 한국공개특허 제2013-004778호(약용 꽃을 활용한 싹 발효법 및 이를 활용한 피부 외용제 조성물, 2013.05.09. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 피부 미백, 주름 개선, 또는 항산화 활성에 기한 노화방지 효과가 우수한 화장료 조성물을 제

공하는 데에 있다.

[0012] 본 발명의 목적은, 흑삼 및 혼합 생약의 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은, 일 양태에 따르면, 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 및 복분자의 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성에 관한 것이다.

[0014] 본 발명에 있어서, 흑삼 이외의 구기자, 당귀, 오가피 및 복분자를 "혼합 생약"으로 지칭하기도 한다.

[0015] 상기 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 및 복분자의 발효 추출물은, 흑삼 100중량부를 기준으로, 구기자 30~300중량부, 당귀 30~300중량부, 오가피 30~300중량부 및 복분자 30~300중량부를 혼합한 후 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 추출물을 버섯 균사체로 발효시킨 것일 수 있다.

[0016] 상기 버섯 균사체는 우장지버섯(*Antrodia Coaphorata*) 균사체일 수 있다.

[0017] 본 발명의 화장료 조성물은 노화 방지용 화장료 조성물로 사용될 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 피부 미백, 주름개선, 또는 항산화용 화장료 조성물로 사용될 수 있다.

[0019] 상기 화장료 조성물은, 화장수, 유액, 크림, 에센스, 팩, 마스크, 파운데이션, 자외선차단제품, BB크림, 또는 피부세정제로 제형화 될 수 있다.

[0020] 본 발명은, 다른 양태에 따르면, 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 및 복분자의 발효 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제조방법에 관한 것으로서,

[0021] (1공정) 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피 및 복분자를 혼합한 후 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여, 추출물을 제조하는 단계;

[0022] (2공정) 상기 추출물을 버섯 균사체로 발효시켜 발효물을 얻는 단계; 및

[0023] (3공정) 상기 발효물로부터 버섯 균사체를 제거하고 발효추출물을 분리하는 단계;를 포함한다.

[0024] 이하, 본 발명에 대해 자세하게 설명한다.

[0025] 본 발명은, 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 및 복분자의 발효 추출물을 유효성분으로 함유한다.

[0026] 상기 흑삼은 홍삼과 더불어 인삼을 가공한 것으로 인삼의 활성성분인 진세노사이드의 함량을 더욱 높이기 위해서 한약재의 가공방법 중 물과 불을 함께 사용하는 가장 대표적인 방법인 구증구포의 원리를 이용하여 제조된다. 본 발명에 있어서 사용되는 흑삼은 일반적인 구증구포의 원리로 제조되거나, 또는 구증구포의 원리에 비해서 시간 및 제조시간을 획기적으로 단축시킬 수 있는 방법(한국등록특허 제754253호 "신규한 흑삼의 제조방법 및 이를 함유하는 조성물")을 이용하여 제조될 수 있다.

[0027] 상기 구기자는 구기자나무(*Lycium chinense Miller*) 또는 기타 동속식물의 열매를 사용한다. 어지럽고 허리와 무릎에 힘이 없으며 남자가 유정(遺精)하고, 임신을 못 시킬 때 사용한다. 음혈이 허약해져 얼굴이 누렇고 머리털이 희어지며 잠을 못 이룰 때나 소갈증에 효과가 있다. 폐기 허약으로 인한 오랜 해수에도 사용한다. 약리작용으로 비특이성 면역증강 작용, 조혈작용, 콜레스테롤강화작용, 항지방간작용, 혈압강하, 혈당강하, 생장촉진, 항암작용 등이 보고되었다. 구기자는 한 쪽이 뾰족한 방추상이며 열매껍질은 적색 또는 어두운 적색이다. 바깥면은 주글주글하고 속에는 황색을 띤 흰색의 씨가 들어 있다. 씨는 납작한 타원형이다.

[0028] 상기 당귀의 효능은 피가 부족할 때 피를 생성해 주는 보혈작용(補血作用)이다. 중국당귀나 왜당귀의 뿌리로 만든 당귀는 보혈작용이 뛰어나다. 하지만 참당귀의 뿌리로 만든 당귀는 보혈작용 보다는 피를 원활히 순환하게 해주는 활혈작용(活血作用)이 더 뛰어나며, 항암효과 및 혈압강하작용이 강하다고 알려져 있으며, 약리학적으로 당귀는 관상동맥의 혈류량을 촉진시키고, 적혈구 생성을 왕성하게 한다.

[0029] 상기 오가피는 두릅나무과의 오갈피나무(*Acanthopanax sessiliflorum Seeman*) 또는 동속 식물의 뿌리, 줄기 및 가지의 껍질을 말한다. 오가피는 간과 신장의 기운을 보하여 힘줄과 뼈를 튼튼하게 하므로 사지마비, 구련, 허리와 무릎의 연약증상, 하지무력감, 골절상, 타박상, 부종 등에 쓰인다. 약리작용은 면역증강, 항산화, 항피로, 항고온, 항자극작용, 내분비기능조절, 혈압조절, 항방사능, 해독작용이 보고되었다.

- [0030] 상기 복분자는 장미과의 복분자딸기(*Rubus coreanus*)의 채 익지 않은 열매로 만든 약재이며, 신(腎)기능을 북돋아 유정(遺精), 몽정(夢精), 유뇨(遺尿) 등에 사용하며 시력약화를 방지하고, 몸을 가볍게 하며 머리를 검게 한다. 또한 살결을 부드럽고 아름답게 하기도 한다. 약리작용으로 항염작용, 항산화 작용, 항헬리코박터파이로리 작용이 보고되었다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피 및 복분자의 총 5종의 약재를 혼합하고, 추출 및 발효하는 것에 의해, 펠라닌생성 억제, 콜라겐 합성 촉진, 및 항산화 활성이 모두 우수한 화장료 조성물을 얻을 수 있는 효과가 있다.
- [0032] 본 발명의 화장료 조성물을 제조하는 방법은, (1공정) 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피 및 복분자를 혼합한 후 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여, 추출물을 제조하는 단계; (2공정) 상기 추출물을 버섯 균사체로 발효시켜 발효물을 얻는 단계; 및 (3공정) 상기 발효물로부터 버섯 균사체를 제거하여, 발효추출물을 분리하는 단계;를 포함한다.
- [0033] 상기 1공정에 있어서, 바람직하게는, 흑삼 100중량부를 기준으로 구기자 30~300중량부, 당귀 30~300중량부, 오가피 30~300중량부 및 복분자 30~300중량부를 혼합하며, 보다 바람직하게는, 흑삼 100중량부를 기준으로 구기자 50~200중량부, 당귀 30~100중량부, 오가피 30~100중량부, 및 복분자 50~200중량부를 혼합한다.
- [0034] 위와 같이 약재를 혼합하고 분쇄한 후 분쇄물의 총중량 대비 3배~10배, 보다 바람직하게는 4배~6배의 추출용매를 가하여, 5~100℃의 온도에서, 1시간~2일, 보다 바람직하게는 1시간~12시간, 가장 바람직하게는 3시간~9시간 동안 추출한다. 상기 추출 시간이 1시간 미만이면 원하는 성분의 추출이 미흡하며, 추출 시간이 2일을 초과하면 추출 성분의 변화가 없고 추출물이 변색되는 문제가 있다.
- [0035] 추출이 완료된 추출액에서 고형분을 제거하고 여액을 수거한 후 감압농축한 형태, 또는, 동결건조, 분무건조, 냉풍건조, 열풍건조 등의 방법으로 건조하여 건조물 형태로 추출물을 제조할 수 있다.
- [0036] 다음으로, 상기 흑삼 및 혼합 생약의 추출물을 버섯 균사체로 발효시켜 발효물을 얻는 단계(2공정)를 거친다. 여기서, 버섯 균사체로는, 우장지버섯(*Antrodia Coaphorata*) 균사체를 이용하는 것이, 상기 추출물로부터 펠라닌합성 저해, 콜라겐 합성 촉진, 및 항산화 활성이 현저하게 우수한 발효추출물을 수득하는 데에 특히 유리하다.
- [0037] 우장지버섯은 대만이 주산지로서, 해발 1,000m 이상의 고산에서 자생하는 100년 이상 된 녹나무에 기생하는 버섯으로 장지 버섯이라고 불리우는 희귀버섯이다. 전통적으로 중국에서 고혈압, 간암, 염증, 가려움증, 복통 및 설사에 이용되어 왔다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 우장지버섯은, 효모-맥아즙 한천배지에서 5~10일간 사면 배양한 후 1~2개월마다 계대배양해서 이용하였다.
- [0039] 또한, 상기 흑삼 및 혼합 생약의 추출물의 5~15%(w/v) 수용액, 포도당 2~4%(w/v) 및 효모추출물 0.5~1.5%(w/v)을 혼합한 후, pH를 5.5로 조정하고 멸균하여 액체배지 조성물을 준비한 후, 상기 배양된 우장지버섯 균사체를 균질화하여 1~10%(v/v)가 되게 첨가한 후, 온도 27℃, 회전수 150 rpm, 통기량 1.5 vvm의 조건에서 5~10일간 배양하여, 흑삼 및 혼합 생약의 추출물을 발효한다.
- [0040] 이후, 균사체를 원심분리를 통해 제거한 후 배양여액을 필터로 여과시켜 발효추출물을 얻는 단계(3공정)를 거치며, 이때, 필터로는 0.2 내지 0.5 마이크로미터 멤브레인(membrane) 필터 등을 사용할 수 있으며, 여액 상태의 발효추출물을 추가적으로 감압농축 및 동결건조하여, 건조물 상태의 흑삼 및 혼합 생약의 발효추출물을 얻을 수도 있다.
- [0041] 여기서, 상기 1공정 내지 3공정을 통해 얻어진, 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 및 복분자의 발효추출물을 이른바, 슬로우에이징 콤플렉스(Slow Aging Complex)라고도 한다.
- [0042] 상기와 같이 수득한 발효추출물을 본 발명의 화장료 조성물 총 중량의 0.01 내지 30.0중량%로 첨가될 수 있으며, 바람직하게는 0.1~30중량%, 보다 바람직하게는 1~20중량%로 첨가될 수 있다. 이 때 화장료 조성물 총 중량의 0.01중량% 미만에서는 만족할 만한 효능을 제공하기 어렵고, 30.0중량% 이상에서는 조성물의 냄새와 색상에 영향을 미쳐서 상품성이 떨어지고 추가적인 효능을 기대하기도 어렵다.
- [0043] 본 발명의 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 및 복분자의 발효 추출물을 포함하는 화장료 조성물로부터 제조되는 제형은 특별히 제한되지는 않으며, 목적하는 바에 따라 적절히 선택할 수 있다. 예를 들면 본 발명의 화장료 조성

물은 수렴화장수, 유연화장수, 에센스, 유액, 크림, 파운데이션, BB크림 등이 있으며 이들 중 선택된 제형으로 제조될 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은, 바람직하게는, 피부 미백용, 주름 개선용, 항산화용, 피부 보습용, 또는 노화방지 용도의 제품에 적용될 수 있다.

[0045] 상기 화장료 조성물은, 유효성분인 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 및 복분자의 발효 추출물 이외에, 화장료에 일반적으로 이용되는 성분을 포함할 수 있다. 예를 들면 유화제, 점증제, 유제, 계면활성제, 윤활제, 알코올류, 수용성 고분자제, 겔화제, 안정화제, 비타민, 무기염류, 유화제, 향료 같은 일반적인 보조 성분을 포함할 수 있다. 상기 성분들은 제형 또는 사용목적에 따라 그 첨가량을 본 발명의 화장료 고유의 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 선택할 수 있다. 상기 성분들의 첨가량은 예를 들어 조성물 총중량에 대하여 0.1~10중량%, 바람직하게는 0.1~6중량%일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 유효성분인 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 및 복분자의 발효 추출물 은, 예로부터 약재로 사용해왔던 천연 원료로 제조되기 때문에, 본 발명의 화장료 조성물은 독성이나 부작용 등을 나타내지 않아, 화장료로서 용이하게 이용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 화장료 조성물은 매일 사용할 수 있으며 또한 정해지지 않은 기간 동안에도 사용할 수 있다. 바람직하게는 사용자의 연령, 피부상태 또는 피부타입, 발효추출물의 농도에 따라 사용량, 사용횟수 및 기간을 조절할 수 있다.

발명의 효과

[0048] 본 발명은 흑삼 및 혼합 생약의 발효추출물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물을 제공한다. 상기 화장료 조성물은 피부에 안전하면서도, 우수한 멜라닌생성 억제, 콜라겐 합성 증진, 및 항산화 활성을 가져, 피부 미백, 주름 개선과 탄력 증진, 및 노화 지연 효과가 뛰어나다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 본 발명의 흑삼 및 혼합 생약의 발효추출물을 함유하는 화장료 조성물을 제조하는 단계를 나타내는 순서도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하 본 발명을 실시예, 비교예 및 시험예를 통하여 구체적으로 설명한다. 그러나, 여기서 설명되는 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 예일 뿐 본 발명의 권리범위를 한정하는 것은 아니다.

[실시예 및 비교예]

[실시예 1. 흑삼 및 혼합 생약의 발효추출물의 제조]

[0053] (1) 흑삼 및 혼합 생약의 추출물의 제조

[0054] 상업적으로 시판되는 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 및 복분자를 구입하여, 이들을 흑삼 200g, 구기자 200g, 당귀 100g, 오가피 100g 및 복분자 200g을 혼합하고, 분쇄기로 잘게 자른 다음, 4000g의 물을 가한 후, 23℃에서 7시간 동안 추출하였다. 추출이 완료된 후, 고형분을 제거하고 여액을 수거한 후 감압농축 및 동결건조하였다. 흑삼 및 혼합 생약의 추출물로서 건조분말 17g을 얻었다.

[0055] (2) 흑삼 및 혼합 생약의 발효추출물(슬로우에이징 콤플렉스)의 제조

[0056] 본 발효추출물 제조단계에서 사용된 우장지버섯은 전라남도 산림자원연구소로부터 분양받았다. 우장지버섯 균사체를 효모-맥아즙 한천배지(효모추출물 3g, 맥아즙 3g, 포도당 10g, 펩톤 5g, 한천 20g, 증류수 1L)가 든 시험관에 7일간 사면배양한 후 4℃에 보관하고 1개월마다 계대배양하여 사용하였다.

[0057] 실시예 1-(1)의 흑삼 및 혼합 생약 추출물의 10%(w/v) 수용액 100mL, 포도당 3g, 및 효모 추출물 1g을 혼합한 후, pH를 5.5로 조정하고 멸균하여 액체배지 조성물을 준비하였다. 상기 배지 조성물에, 상기 사면배지에서 자란 우장지버섯 균사체를 무균적으로 균질화하여 5%(v/v)가 되게 첨가한 후(순수균사체로 0.1g 포함됨), 온도 27℃, 회전수 150 rpm, 통기량 1.5 vvm의 조건에서 7일간 배양하여, 흑삼 및 혼합 생약의 추출물을 발효하였다.

[0058] 발효를 마친 후에는 원심분리하여 우장지버섯 균사체를 모두 제거하고, 얻은 여액을 감압농축 및 동결건조하여,

흑삼 및 혼합 생약의 발효추출물(슬로우에이징 콤플렉스) 12g을 얻었다.

비교예 1 및 2. 단독 생약의 추출물 또는 발효추출물의 제조

(1) 상업적으로 시판되는 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 및 복분자를 구입하여, 이들을 800g씩 취하고, 각각 분쇄기로 잘게 자른다. 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피 및 복분자의 각 분쇄물에 각각 4000g의 물을 가한 후, 23℃에서 7시간 동안 추출하였다. 추출이 완료된 후, 고형분을 제거하고 여액을 수거한 후 감압농축 및 동결건조하여, 비교예 1-1 내지 1-5의 추출물을 표 1과 같이 건조물 상태로 얻었다.

(2) 위 비교예 1-1 내지 1-5의 추출물을, 각각, 실시예 1-(2)의 방법으로 발효해서 비교예 2-1 내지 2-5의 발효추출물을 표 1과 같이 건조물 상태로 얻었다.

표 1

비교예	추출물	건조물 중량
비교예 1-1	흑삼 추출물	18.2g
비교예 1-2	구기자 추출물	15.4g
비교예 1-3	당귀 추출물	16.1g
비교예 1-4	오가피 추출물	14.4g
비교예 1-5	복분자 추출물	19.1g
비교예 2-1	흑삼 발효추출물	12.8g
비교예 2-2	구기자 발효추출물	13.7g
비교예 2-3	당귀 발효추출물	13.5g
비교예 2-4	오가피 발효추출물	12.7g
비교예 2-5	복분자 발효추출물	13.3g

비교예 3. 인삼과 혼합 생약의 발효추출물의 제조

실시예 1-(1)의 방법을 수행하되, 흑삼을 대신해서 인삼을 사용하였다. 즉, 인삼 200g, 구기자 200g, 당귀 100g, 오가피 100g 및 복분자 200g의 5종을 혼합해서, 실시예 1-(1)의 방법으로, 인삼 및 혼합 생약의 추출물 17.5g을 제조한 후, 이 추출물을 실시예 1-(2)의 방법으로 발효해서 발효추출물 12.4g을 제조하였다.

비교예 4. 흑삼 및 혼합 생약의 추출물의 제조

실시예 1-(1)의 방법과 마찬가지로, 흑삼 200g, 구기자 200g, 당귀 100g, 오가피 100g 및 복분자 200g을 혼합하고 분쇄한 후, 4000g의 물을 가한 후, 23℃에서 7시간 동안 추출하였다. 추출이 완료된 후, 고형분을 제거하고 여액을 수거한 후 감압농축 및 동결건조한 건조물 상태로, 흑삼 및 혼합 생약의 추출물 16.8g을 얻었다.

비교예 5. 흑삼 및 당귀의 발효추출물의 제조

흑삼 533g 및 당귀 267g을 혼합하는 것만을 달리하여, 실시예 1-(1) 및 실시예 1-(2)의 방법을 진행하여, 흑삼 및 당귀의 발효추출물 12.7g을 얻었다.

실시예 2 및 비교예 6~11. 크림 제조

다음 표 2의 조성으로, 실시예 1 및 비교예 1~5의 시료를 첨가하여, 수중유형 유화(O/W emulsion) 타입의 크림 제형(실시예 2, 및 비교예 7~11)을 제조하였다. 또한, 비교예 6으로서, 실시예 및 비교예의 추출물 또는 발효추출물과 같은 시료를 첨가하지 않고, 크림 제형을 제조하였다.

표 2

조성 성분	함량(중량부)										
	실시예 2	비교예 6	비교예 7-1	비교예 7-2	비교예 7-3	비교예 7-4	비교예 7-5	비교예 8	비교예 9	비교예 10	비교예 11
세토스테아릴알코올	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
글리세릴스테아레이트	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
비즈왁스	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
폴리글리세릴-3 메틸글루코스디스테아레이트	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

스쿠알란	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
카프릴릭/카프릭트리글리세라이드	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
디메치콘	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
정제수	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100	To 100
디프로필렌글리콜	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
글리세린	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
헥산디올	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
암모니움아크롤로일디메틸타우레이트/브이피코폴리머	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
향료	-	적량	-	-	-	-	-	-	-	-	-
슬로우에이징 콤플렉스 (실시예 1)	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
흑삼추출물 (비교예 1-1)	-	-	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-
구기자추출물 (비교예 1-2)	-	-	-	5.0	-	-	-	-	-	-	-
당귀추출물 (비교예 1-3)	-	-	-	-	5.0	-	-	-	-	-	-
오가피추출물 (비교예 1-4)	-	-	-	-	-	5.0	-	-	-	-	-
복분자추출물 (비교예 1-5)	-	-	-	-	-	-	5.0	-	-	-	-
흑삼발효추출물 (비교예 2-1)	-	-	-	-	-	-	-	5.0	-	-	-
인삼 및 혼합생약의 발효추출물(비교예 3)	-	-	-	-	-	-	-	-	5.0	-	-
흑삼 및 혼합생약의 추출물(비교예 4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.0	-
흑삼 및 당귀의 발효추출물(비교예 5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.0

[0072] [시험예 1] 실시예 1, 및 비교예 1의 피부세포에 대한 독성 측정

[0073] 상기 실시예 및 비교예를 통하여 제조한 각 추출물 또는 발효추출물에 대하여, 증류수를 희석액으로 사용하여, 하기 표 3과 같은 농도의 조성물로 각각 준비한 다음 처리하고 피부세포에 대한 독성을 측정하였다.

[0074] 본 시험을 위해 사용된 세포주는 인간 진피 섬유아세포(human dermal fibroblast; Lonza, Basel, Switzerland) 등 3종의 세포를 사용하였다. 상기의 세포들은 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Gibco-BRL, Invitrogen; Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)에 10% 소태아혈청(FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin 100 IU/mL, streptomycin 100 µg/mL; Life Technologies)를 함유한 배지를 사용하여, 5% CO₂ 세포배양기 내에서 37℃의 온도 조건 하에서 배양하였다.

[0075] WST-1(Water-soluble tetrazolium salt) 어세이는 세포 내 미토콘드리아성 NADH-탈수소화효소(mitochondrial NADH-dehydrogenase)의 활성을 측정하여 알아보는 방법으로써 테트라졸륨염(tetrazolium salt)을 살아있는 세포에 처리하게 되면 미토콘드리아에 있는 탈수소화효소에 의하여 유색의 포마잔(formazan)이 형성되게 된다. 형성된 포마잔을 450nm 파장의 흡광도로 확인하면 살아있는 세포의 농도를 확인할 수 있다. 세포를 96-well plate에 2×10^3 cells/well의 세포를 분주하고 24시간 배양 후 시료를 적정농도에 맞게 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 그 후 WST-1 어세이 용액을 배지양의 10%씩 처리하여 추가적으로 0.5~1시간 37℃에서 반응 후, iMark microplate reader(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여, 450nm에서 흡광도를 측정하였으며 참조 흡광도는 650nm에서 측정하여 결과값을 보정하였다. 결과값은 세 번의 독립적 실험으로부터 평균값 ± 표준편차로 나타냈다. P<0.05는 Student's t-test를 통해 검증하였으며, 결과 값의 유의성을 나타낸다.

표 3

시료명		농도 (ppm)	세포생존율 (%)
실시예 1	슬로우에이징 콤플렉스	100	95.81
		150	95.83
		200	94.47
비교예 1-1	흑삼추출물	100	95.68
		150	93.62
		200	91.07
비교예 1-2	구기자추출물	100	98.59
		150	102.67
		200	115.75
비교예 1-3	당귀추출물	10	102.42
		50	100.00
		100	88.96
비교예 1-4	오가피추출물	10	99.81
		50	98.78
		100	97.83
비교예 1-5	복분자추출물	100	97.14
		150	94.14
		200	91.09

상기 표 1의 결과를 통하여, 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 복분자의 각 추출물, 및 슬로우에이징 콤플렉스를 함유하는 조성물은 피부세포에 독성을 주지 않는 안전한 성분임을 알 수 있다.

[시험예 2] 실시예 1 및 비교예 1~5의 멜라닌색소 합성 저해 효과 측정

B16F10 세포를 60mm culture dish에 3×10^5 개로 분주 후, 실시예 1 및 비교예 1~5의 시료를 배지에 200 μ g/ml 농도로 처리하였다. 양성대조를 위해 멜라닌 합성을 촉진하는 호르몬인 α -MSH(Sigma-Aldrich)를 200nM의 농도로 동일세포에 처리하였다. 시료와 α -MSH를 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후, 실온에서 48시간 세포를 배양시킨 뒤에 세포를 수확하여 PBS로 2회 세척 후, 각 시료별로 멜라닌합성 저해율을 측정하였다.

표 4

시료명		멜라닌합성 저해율(%)
실시예 1	슬로우에이징 콤플렉스	47.3
비교예 1-1	흑삼 추출물	17.5
비교예 1-2	구기자 추출물	13.4
비교예 1-3	당귀 추출물	21.9
비교예 1-4	오가피 추출물	10.7
비교예 1-5	복분자 추출물	18.3
비교예 2-1	흑삼 발효추출물	28.2
비교예 2-2	구기자 발효추출물	18.9
비교예 2-3	당귀 발효추출물	28.9
비교예 2-4	오가피 발효추출물	14.1
비교예 2-5	복분자 발효추출물	19.3
비교예 3	인삼 및 혼합 생약의 발효추출물	31.7
비교예 4	흑삼 및 혼합 생약의 추출물	21.3
비교예 5	흑삼 및 당귀의 발효추출물	30.5

상기 표 4에서 알 수 있는 바와 같이, 멜라닌합성 저해율에 있어서, 실시예 1에 해당하는 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 및 복분자의 발효추출물(슬로우에이징 콤플렉스)이 다른 비교예 1 내지 5의 추출물 또는 발효추출물에 비해 훨씬 우수함을 알 수 있다.

[시험예 3] 실시예, 및 비교예 1 내지 5의 인간피부세포에 대한 콜라겐 합성 촉진효과 측정

콜라겐과 콜라게네이스(collagenase) 발현은 해당 대표적 유전자의 mRNA 양 변화를 qRT-PCR(quantitative

real-time PCR) 분석법을 활용하여 측정하였다. 콜라겐 양은 타입 1 콜라겐의 대표적 구성 요소인 *COL1A1* 유전자의 발현수준 분석을 통해 확인하였으며, 콜라게네이즈는 타입 1 콜라겐 분해 작용을 하는 *MMP1* 유전자의 발현수준 분석을 통해 확인하였다. 인간 진피 섬유아세포(Human dermal fibroblasts, Lonza, Basel, Switzerland)를 60-mm culture dish에 5×10^5 개로 분주한 후, 24시간 배양하였다. 그 후 200 μ g/ml 농도로 실시예 1 및 비교예 1 내지 3의 시료를 첨가하여 24시간 추가적으로 배양하였다. 배양된 세포를 수확한 후, 1ml TRIzol reagent(Life Technology)을 첨가하여 세포 용해 및 total mRNA 추출을 수행하였다. Total mRNA의 농도 및 순도(A260/A280 and A260/A230 ratio)는 MaestroNano[®] microvolume spectrophotometer (MaestroGen, Las Vegas, NV, USA)을 이용하여 검증하였으며, 2.0 이상의 순도가 높은 total mRNA만을 선별하였다. Total mRNA는 M-MLV reverse transcriptase(Life Technologies, USA)를 이용하여 cDNA로 전환하여 qRT-PCR에 사용하였다. qRT-PCR은 HOT FIREPol EvaGreen PCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonia)를 이용하여 수행하였으며, Line-Gene K software (Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, China)를 이용하여 해당 유전자의 발현을 분석하였다.

[0084] PCR반응 조건은, 94℃에서 5분간 denaturation 시킨 후 denaturation (94℃, 30초), annealing (60℃, 30초), polymerization (72℃, 30초) 과정을 40 cycle 동안 진행하였다. 유전자 발현 변화는 β -ACTIN 대조군유전자 발현양과 비교하여 측정하였다. 결과값은 세번의 독립적 실험으로부터 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. $P < 0.05$ 는 Student's t-test를 통해 검증하였으며, 결과 값의 유의성을 나타낸다.

표 5

[0085]

시료명	콜라겐 생합성 증가율 (%)
실시예 1	슬로우에이징 콤플렉스
비교예 1-1	흑삼추출물
비교예 1-2	구기자추출물
비교예 1-3	당귀추출물
비교예 1-4	오가피추출물
비교예 1-5	복분자추출물
비교예 2-1	흑삼 발효추출물
비교예 2-2	구기자 발효추출물
비교예 2-3	당귀 발효추출물
비교예 2-4	오가피 발효추출물
비교예 2-5	복분자 발효추출물
비교예 3	인삼 및 혼합 생약의 발효추출물
비교예 4	흑삼 및 혼합 생약의 추출물
비교예 5	흑삼 및 당귀의 발효추출물

[0086] 상기 표 5에서 알 수 있는 바와 같이, 실시예 1의 콜라겐 생합성 효능이 비교예 1 내지 3에 비해 현저하게 우수하였다.

[0087] [시험예 4] 실시예 1, 및 비교예 1 내지 5의 항산화효과 측정

[0088] 상기 실시예 1, 및 비교예 1 내지 5의 항산화 활성을 측정하기 위하여 DCF-DA(2'7'-Dichlorofluorescein diacetate) 어세이를 실시하였다. 이는 시험물질을 처리한 다음 실리카(silica)로 자극한 세포 내에서 생성되는 활성산소의 양을 공시료액과 비교하여 활성산소 제거능을 평가하는 목적으로 사용되는 시험방법이다. 먼저 24시간 배양한 Raw 264.7 세포를 PBS로 1회 세척 후, 세포를 수확하였다. 해당 세포를 15mL PBS로 현탁후, 20mM DCF-DA 용액(Sigma-Aldrich) 15 μ l를 첨가하고 1시간 동안 반응시켰다. 1200 $\times$ g으로 2분간 원심분리한 후 PBS로 1회 세척하여 1×10^5 cells/mL로 희석한 다음, 시료를 200 μ g/ml 농도로 처리하고 10분간 반응시켰다. 그 후 20mg/mL의 실리카를 50 μ l 처리하여 1시간 동안 추가 반응시켰다. 6000 $\times$ g으로 5분간 원심분리하여 얻은 세포 펠렛(pellet)을 200 μ l PBS로 분산시킨 후 96-well plate에 접종하였다. 그 후 fluorescence microplate reader (Bio-Rad)를 이용하여 485nm excitation/ 535nm emission에서 형광도를 측정하여 ROS level를 결정하였다. 결과값은 세번의 독립적 실험으로부터 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. $P < 0.05$ 는 Student's t-test를 통해 검증하였으며, 결과값의 유의성을 나타낸다.

표 6

[0089]	시료명		항산화효과(자유라디칼 소거율, %)
	실시예 1	슬로우에이징 콤플렉스	
	비교예 1-1	흑삼추출물	26.9
	비교예 1-2	구기자추출물	11.1
	비교예 1-3	당귀추출물	6.1
	비교예 1-4	오가피추출물	27.4
	비교예 1-5	복분자추출물	19.0
	비교예 2-1	흑삼 발효추출물	36.8
	비교예 2-2	구기자 발효추출물	17.2
	비교예 2-3	당귀 발효추출물	13.3
	비교예 2-4	오가피 발효추출물	37.0
	비교예 2-5	복분자 발효추출물	27.8
	비교예 3	인삼 및 혼합 생약의 발효추출물	35.4
	비교예 4	흑삼 및 혼합 생약의 추출물	28.2
	비교예 5	흑삼 및 당귀의 발효추출물	32.7

[0090] 상기 표 5에서 알 수 있는 바와 같이, 실시예 1의 항산화 활성이 비교예 1 내지 3에 비해 매우 우수하였다.

[0091] [시험예 5] 실시예 2, 비교예 6 및 7의 크림의 피부자극성 시험

[0092] 실시예 2, 비교예 6 및 비교예 7의 크림에 대한 피부자극성 정도를 비교하기 위하여 인체에 대한 폐쇄접포시험(closed patch test)을 실시하였다. 건강한 성인 남녀 20명을 대상으로 하박부 안쪽에 각각의 시료를 0.2g씩 접포하고 24시간 후 핀챗버를 제거하고 4시간 경과한 다음 육안으로 피부상태를 확인하였다. 피부자극도는 하기 수확식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{피부자극도} = \frac{\{(-)수 \times 1\} + \{(+)수 \times 2\} \{(+ +)수 \times 3\}}{\text{피시험자수}}$$

[0093]

표 7

[0094]

시료명	피시험자수	판정결과				자극도
		-	+-	+	++	
실시예 2	20명	19	1	-	-	0.02
비교예 6		19	1	-	-	0.02
비교예 7-1		19	1	-	-	0.02
비교예 7-2		18	2	-	-	0.04
비교예 7-3		18	2	-	-	0.04
비교예 7-4		18	2	-	-	0.04
비교예 7-5		19	1	-	-	0.02
-: 홍반이나 특이사항 없음 +-: 주위보다 약간 붉어짐 +: 주위보다 현저히 붉어짐 ++: 주위보다 심하게 붉어지고 부풀어 오름						

[0095] 상기 표 7에서 알 수 있는 바와 같이, 흑삼, 구기자, 당귀, 오가피, 및 복분자의 각 추출물이나, 슬로우에이징 콤플렉스를 함유하는 조성물은 피부자극도가 매우 낮은 것으로 확인되었다.

[0096] [시험예 6] 실시예 2, 비교예 6 및 11의 크림의 피부탄력도 측정시험

[0097] 상기 표 2의 실시예 2, 비교예 6 및 비교예 11의 크림에 대하여 피부탄력 개선효과를 알아보기 위하여 아침과 저녁에 하루 2회씩 사용하도록 한 후, 사용 전과 사용 8주 후의 피부탄력도 변화를 측정하였다. 피부탄력도 측정은 피부탄력측정기(Cutometer SEM 575)를 이용하였으며, 온도 25℃, 습도 75% 조건에서 측정하였다. 실시예 2, 비교예 6 및 비교예 11에 대하여 30-55세의 건강한 여성 60명을 각각 20명씩 세 그룹으로 나누어 측정하였으

며 그 결과를 하기의 표 8에 나타내었다.

표 8

시료	피부탄력증가율(%)
실시예 2	25
비교예 6	12
비교예 11	16

상기 표 8에서 알 수 있는 바와 같이, 슬로우에이징 콤플렉스를 함유하는 실시예 2의 크림은, 비교예 6 및 비교예 11의 크림에 비하여, 피부탄력도 증가율이 높은 것을 알 수 있다.

[시험예 7] 실시예 2, 비교예 6 및 11의 크림의 인체 사용성 시험

상기 실시예 2, 비교예 6 및 11에 대하여 실제 사용 시 피부 미백효과 및 주름개선효과를 알아보기 위하여 건강한 30~55세 성인여성 60명에 대하여 각각 실시예 2, 비교예 6 및 비교예 11의 3그룹으로 나누어 인체 사용성 시험을 실시하였다. 상기 실시예 2, 비교예 6 및 비교예 11의 조성으로 제조된 시험품 50그램씩을 설문지와 함께 나눠주고 아침과 저녁에 하루 2회씩 총 8주간 사용하게 한 후 설문지를 회수하여 분석하였다.

총 60명의 시험대상자 중 중도 포기(2명) 및 부실한 설문지(2명)를 제외한 실시예 2 그룹의 18명, 비교예 6 및 11 그룹의 각 19명, 총 56명의 설문지를 회수하여 분석한 결과를 하기의 표 9에 나타내었다.

표 9

		응답자수				
		매우 악화됨	약간 악화됨	변화 없음	약간 좋아짐	매우 좋아짐
피부색 변화 정도	실시예 2	-	-	6	9	3
	비교예 6	-	1	16	2	-
	비교예 11	-	-	13	6	-
피부 탄력감 변화 정도	실시예 2	-	-	6	8	4
	비교예 6	-	-	15	4	-
	비교예 11	-	-	12	7	-
피부 주름 변화 정도	실시예 2	-	-	7	8	3
	비교예 6	-	-	15	4	-
	비교예 11	-	-	13	6	-

상기 표 9에서 알 수 있는 바와 같이, 슬로우에이징 콤플렉스를 함유하는 실시예 2의 크림은, 비교예 6 또는 비교예 11의 크림에 비하여, 피부색, 피부탄력감, 피부주름개선 효능에 대한 사용자의 만족도가 높은 것을 알 수 있다.

도면

도면1

