



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0000784
(43) 공개일자 2018년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 65/08 (2009.01) A01N 59/16 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 65/08 (2013.01)
A01N 59/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0078756
(22) 출원일자 2016년06월23일
심사청구일자 2016년06월23일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
양덕춘
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1842 111동 301호 (보라동, 현대모닝사이드2차아파트)
김연주
경기도 성남시 분당구 동판교로 275 107동 801호 (삼평동, 풍성신미주아파트)
(74) 대리인
손민

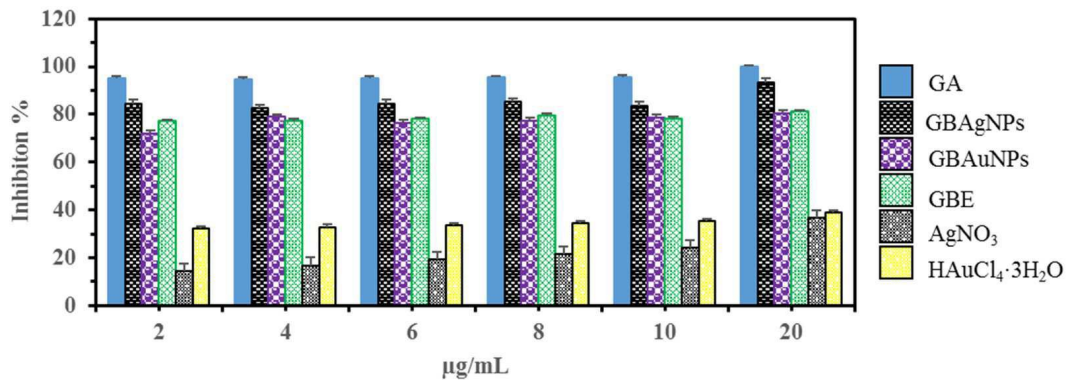
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 인삼 열매 추출물을 포함하는 금속 나노입자 제조용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인삼 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 금속 나노입자 제조용 조성물, 상기 조성물을 이용한 금속 나노입자의 제조방법, 상기 방법에 의해 제조된 금속 나노입자, 및 상기 금속 나노입자의 항균 및 항산화 용도에 관한 것이다. 본 발명의 금속 나노입자의 제조방법을 이용하면, 빠른 시간 내에 별도의 환원제 또는 안정제의 부가 없이도 크기가 균일한 금속 나노입자를 제조할 수 있고, 이처럼 제조된 금속 나노입자는 항균 활성 및 항산화 활성을 가지므로, 이를 포함하는 조성물은 산업에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도10a



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/258 (2013.01)
A61K 8/02 (2013.01)
A61K 8/97 (2013.01)
A61K 9/51 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
B82B 3/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A61K 2800/413 (2013.01)

(72) 발명자

줄리 지네네즈

경기도 용인시 기흥구 서천동 애지원 인삼 소재은행

람야 매티알라칸

경기도 용인시 기흥구 서천동 애지원 인삼 소재은행

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 313038-03-3-SB010
 부처명 농림수산식품부
 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
 연구사업명 농식품관련 유용미생물을 활용한 고부가가치 제품개발
 연구과제명 한국형 토종 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 경희대학교 산학협력단
 연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ0120342016
 부처명 농림수산식품부
 연구관리전문기관 농촌진흥청
 연구사업명 차세대바이오그린 농림수산식품부
 연구과제명 Probiotic 유래 재조합 효소를 이용한 희귀유용사포닌 대량생산 및 ginsenoside nanoconjugate 최적생산 기술 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 경희대학교 산학협력단
 연구기간 2016.01.04 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

인삼 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는, 금속 나노입자 제조용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 금속은 금(Au) 또는 은(Ag)인 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은 인삼 열매를 물, C1 내지 C4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 용매로 추출하여 수득한 것인, 조성물.

청구항 4

제1항의 조성물과 금속 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는, 금속 나노입자의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 금속은 금(Au) 또는 은(Ag)인 것인, 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 반응에 사용되는 금속 전구체의 농도는 0.01 내지 100mM인 것인, 방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 반응의 온도는 10 내지 100℃인 것인, 금속 나노입자의 제조방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 반응의 시간은 금 나노입자의 제조시에는 1분 내지 1시간이고, 은 나노입자의 제조시에는 30분 내지 5시간인 것인, 방법.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 조성물에 포함된 인삼 열매 추출물의 농도는 1 내지 10%(w/v)인 것인, 방법.

청구항 10

제4항에 있어서,

상기 방법은 반응액을 원심분리하여 금속 나노입자를 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 금속 나노입자의 제조 방법.

청구항 11

제4항 내지 제10항 중 어느 한 항의 제조방법에 의해 제조된, 금속 나노입자.

청구항 12

제11항의 금속 나노입자를 포함하는, 항균용 조성물.

청구항 13

제14항에 있어서,

상기 조성물은 스테피로코커스(*Staphylococcus*) 속 미생물 또는 에스케리치아(*Escherichia*) 속 미생물에 대해 항균 활성을 가지는 것인, 조성물.

청구항 14

제11항의 금속 나노입자를 포함하는, 항산화용 약학 조성물.

청구항 15

제11항의 금속 나노입자를 포함하는, 항산화용 식품 조성물.

청구항 16

제11항의 금속 나노입자를 포함하는, 항산화용 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인삼 열매 추출물을 포함하는 금속 나노입자 제조용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 인삼 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는 금속 나노입자 제조용 조성물, 상기 조성물을 이용한 금속 나노입자의 제조방법, 상기 방법에 의해 제조된 금속 나노입자, 및 상기 금속 나노입자의 항균 및 항

산화 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 금속 나노입자는 입자 크기의 분포가 균일하고, 표면의 개질이 쉬우며, 우수한 안정성을 나타내는 등의 구체적인 특별한 특징 덕분에 다양한 과학 분야 특히, 의생명과학 및 공학 분야에서 많은 관심을 받고 있다(Mody VV, J. Pharm. Bioall. Sci., 2010;2:282.; Moritz M, Chem. Eng. J., 2013;228:596-613.; Iravani S. ISRN., 2014;2014.). 특히, 의료 분야에서는 나노스케일의 자기를 이용한 의료영상 및 바이오센서, 유전자 타겟 및 약물 전달 등에 적용된다.
- [0003] 여러 금속 중에서, 은은 우수한 항균 특성을 나타냄에 따라 세균 감염의 치료에 주로 사용되어 왔다. 나노입자 형태로서의 은 나노입자는 그의 이온 형태보다 세포독성이 감소하고 항박테리아의 효과를 증대시킨다고 알려져 있어, 항균, 항염증 또는 감염 방지를 위해 많은 분야에 적용된다. 금 또한, 그것의 독특한 표면 플라즈몬 진동으로 약물 전달체, 포토 광열 치료(photo thermal therap), 검체에서 병원균의 면역 색층 확인(immune chromatographic identification), 바이오센서, DNA 표지 등의 다양한 분야에 활용되어 왔다. 또한, 금속 나노입자는 우수한 생체적합성을 나타내며, 입자 표면을 변형하기 쉽고, 세포 투과성이 높기 때문에 약물 담체(drug carrier)로서의 이용이 기대되고 있다(Narsireddy Amreddy et,al., International Journal of Nanomedicine 2015;10 6773-6788, Jean-Pascal Piret et,al., Nanoscale, 2012, 4, 7168-7184).
- [0004] 일반적으로 금속 나노입자의 제조에는 화학적 합성방법, 물리적 제조방법 등이 이용되고 있으며, 화학적 합성방법은 비교적 공정이 간단하나 비용이 많이 들고 시약의 독성 등이 문제시 되고 있다. 또한, 물리적 방법은 나노입자의 크기를 제어하기 어렵고, 고가의 제조 설비가 요구되는 등의 문제점 때문에 효과적인 금속 나노입자의 제조가 어렵다는 단점이 있다.
- [0005] 이러한 이유로, 최근 박테리아 또는 균주에 의한 제조방법이나, 천연 추출물을 유효성분으로 포함하는 친환경적인 금속 나노입자의 제조방법에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 그러나, 종래 박테리아 또는 균주에 의해 금속 나노입자를 합성하는 방법은 짧게는 하루에서 길게는 며칠까지 합성을 위한 긴 시간이 필요하고, 합성된 나노입자의 안정화를 위해 부가적인 환원제 또는 안정화제와 같은 캡핑제(capping agent)가 필요하다는 단점이 존재하였다. 이에, 여전히 친환경적이면서 동시에 안정하고, 화학적 또는 물리적인 합성방법과 비교할 때 제조시간의 한계를 극복한 금속 나노입자에 대한 개발은 계속 요구되고 있는 실정이다.
- [0006] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 보다 효과적으로 금속 나노입자를 제조할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 인삼 열매 추출물을 사용할 경우, 항균 및 항산화 활성을 나타내는 금속 나노입자를 제조할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 하나의 목적은 인삼 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는, 금속 나노입자 제조용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 금속 나노입자 제조용 조성물과 금속 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는, 금속 나노입자의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조방법에 의해 제조된 금속 나노입자를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 금속 나노입자를 포함하는 항균 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 금속 나노입자를 포함하는 항산화용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 금속 나노입자를 포함하는 항산화용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 금속 나노입자를 포함하는 항산화용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 인삼 열매 추출물을 유효성분으로 포함하는, 금속 나노입자 제조용 조성물을 제공한다.

- [0015] 본 발명의 금속 나노입자 제조용 조성물은 천연 추출물인 인삼 열매 추출물을 유효성분으로 포함하여, 종래보다 제조시간이 단축되고, 별도의 환원제 또는 안정제의 부가 없이도 크기가 균일한 금속 나노입자를 제조하는데 사용할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 용어, "인삼 열매 추출물"은 인삼 열매를 용매를 이용하여 통상적인 방법으로 수득한 인삼 열매에 속한 성분이나 물질을 포함하는 추출물을 의미한다.
- [0017] 상기 인삼 열매 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:
- [0018] 1) 인삼 열매에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0019] 2) 단계 1)의 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및
- [0020] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.
- [0021] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 인삼 열매는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0022] 상기 방법에 있어서, 상기 추출용매는 인삼 열매 추출물을 제조할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 에탄올, 메탄올 또는 물을 사용할 수 있고, 보다 구체적으로는 50% 에탄올 또는 물을 사용할 수 있다.
- [0023] 상기 방법에 있어서, 추출 방법으로는 여과법, 열수추출, 침지추출, 환류냉각추출 및 초음파추출 등 당업계의 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 추출용매는 건조된 인삼 열매에 0.1 내지 10배 첨가할 수 있으며, 구체적으로는 0.3 내지 5배 첨가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 추출온도는 구체적으로 20℃ 내지 150℃일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 추출시간은 구체적으로 1분 내지 3시간일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 구체적으로 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 건조는 구체적으로 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결 건조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명의 용어, "금속 나노입자"는 금속으로 이루어진, 크기가 1~100nm인 초미세 입자로, 작은 크기에 기인하는 특이하고도 다양한 성질을 보이는 입자를 의미한다. 본 발명에서 금속 나노입자는 제조방법에 따라 서로 다른 생리활성을 가질 수 있으며, 구체적으로 인삼 열매 추출물을 이용하여 제조된 본 발명의 금속 나노입자는 상기 추출물의 생리활성 물질을 포함하고 있어, 다른 방법으로 제조된 금속 나노입자보다 매우 우수한 생물학적 활성을 가질 수 있다.
- [0026] 구체적으로, 상기 "금속"은 금(Au) 또는 은(Ag)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명에서, 인삼 열매 추출물을 이용하여 제조된 금 나노입자는 '금 나노입자' 또는 'Sg-AuNP(s)'로 혼용되어 사용할 수 있고, 은 나노입자는 '은 나노입자' 또는 'Sg-AgNP(s)'로 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0028] **다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 금속 나노입자 제조용 조성물과 금속 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는, 금속 나노입자의 제조방법을 제공한다.**
- [0029] 본 발명에서 제공하는 금속 나노입자의 제조방법은 천연 추출물인 인삼 열매 추출물을 이용하기 때문에 종래의 화학적 합성방법 및 물리적 합성방법에 비해 친환경적이고, 제조시간을 현저히 단축시키며, 동시에 별도의 환원제 또는 안정제 없이 안정화를 유지할 수 있는 금속 나노입자를 제조할 수 있으므로, 다양한 산업 분야에서 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 용어, "금속 전구체"는 금속 나노입자를 제조하기 위하여 첨가하는 화합물을 의미한다. 구체적으로, 금속 전구체로는 제조하고자 하는 나노입자의 금속 종류에 따라 다양한 종류의 화합물을 선택하여 사용할 수 있다.
- [0031] 예를 들어, 금 나노입자의 제조에는 테트라클로로금(III)산(HAuCl_4), NaAuCl_3 , AuCl_3 등을 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로는, 테트라클로로금(III)산(HAuCl_4)을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 또한, 은 나노입자의 제조에는 AgBF_4 , AgCF_3SO_3 , AgClO_4 , AgNO_3 , AgPF_6 , $\text{Ag}(\text{CF}_3\text{COO})$ 등을 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로는, 질산은(AgNO_3)을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0033] 본 발명의 제조방법에서, 상기 금속 전구체의 농도는 금속 나노입자를 제조할 수 있는 한 이에 제한되지 않으나, 0.01 내지 100 mM, 구체적으로 0.01 내지 50 mM, 더욱 구체적으로 0.01 내지 10 mM일 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 제조방법에서, 반응 온도는 금속 나노입자를 제조할 수 있는 한 이에 제한되지 않으나, 10 내지 100℃, 구체적으로 금속이 금인 경우에 반응 온도는 60℃ 이상, 더욱 구체적으로 60 내지 90℃가 될 수 있고; 금속이 은인 경우에 반응 온도는 60℃ 이상, 더욱 구체적으로 60 내지 90℃가 될 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명의 제조방법에서, 반응 시간이 증가할수록 제조된 금속 나노입자의 수준이 증가하지만, 금속 나노입자에 따라 차이가 있다. 일 예로서, 금 나노입자의 경우에는 구체적으로 1분 내지 1시간, 더욱 구체적으로 15 내지 45분이 될 수 있고, 은 나노입자의 경우에는 구체적으로 30분 내지 5시간, 더욱 구체적으로 2 내지 3시간이 될 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 제조방법에서, 상기 금속 나노입자 제조용 조성물에 포함된 인삼 열매 추출물의 농도가 금속 나노입자의 제조수율에 영향을 미칠 수 있다. 일 예로서, 금 나노입자 또는 은 나노입자의 제조시, 상기 조성물에 포함된 인삼 열매 추출물의 농도는 구체적으로 1 내지 10%(w/v)가 될 수 있고, 보다 구체적으로 5 내지 8%(w/v)가 될 수 있으며, 가장 구체적으로 5%(w/v)가 될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 제조방법은 상기 반응이 종료된 후, 반응물을 원심분리하여 금속 나노입자를 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0038] **또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 금속 나노입자를 제공한다.**
- [0039] 본 발명의 금속 나노입자는 의료용, 생물학적 분석용, 연료용, 전자부품 재료의 용도로 사용될 수 있다. 이에 제한되지 않지만, 구체적으로, 금 나노입자는 고유의 빛 전도 특성으로 인해 유기태양전지, 센서프로브, 생물의 학용 약물 전달체, 전도재료 및 촉매제로 이용될 수 있고, 은 나노입자는 광학특성, 전도성 및 항균성으로 인해, 항균제, 정량검출을 위한 바이오센서, 광학분석법 등에 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 금속 나노입자는 크기나 형태, 표면의 화학적 특성 또는 응집상태를 변화시킴으로써, 입자의 광학적, 전자적 특성을 조절할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 금속 나노입자의 모양은, 일반적으로 구형의 모양을 띌 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 금속 나노입자의 유체학적 직경은 100 내지 220 nm, 구체적으로 금속이 금인 경우에 150 내지 220 nm, 더욱 구체적으로 170 내지 200nm; 금속이 은인 경우에 100 내지 150 nm, 더욱 구체적으로 110 내지 130 nm일 수 있다.
- [0042] 또한, 상기 금속 나노입자의 결정의 크기는 5 내지 20 nm, 구체적으로 금속이 금인 경우에 3 내지 13 nm, 더욱 구체적으로 5 내지 10nm; 금속이 은인 경우에 10 내지 20 nm, 더욱 구체적으로 12 내지 16 nm일 수 있다.
- [0043] **또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 금속 나노입자를 포함하는, 항균용 조성물을 제공한다.**
- [0044] 이때, "금속 나노입자"는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0045] 본 발명의 금속 나노입자는 병원성 미생물에 대해 우수한 항균 활성을 가지므로, 이를 포함하는 조성물은 다양한 산업에 매우 유용하게 활용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 항균용 조성물은 세균, 진균 또는 효모에 대해 항균활성을 가질 수 있으며, 구체적으로 비브리오(*Vibrio*) 속, 살모넬라(*Salmonella*) 속, 스테피로코커스(*Staphylococcus*) 속, 바실러스(*Bacillus*) 속, 에스케리치아(*Escherichia*) 속 및 칸디다(*Candida*) 속 미생물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상에 대해 항균 활성을 가질 수 있으며, 더욱 구체적으로, 스테피로코커스(*Staphylococcus*) 속 미생물 또는 에스케리치아(*Escherichia*) 속 미생물, 더더욱 구체적으로 포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 및 대장균(*Escherichia coli*)에 대해 항균 활성을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 또한, 본 발명의 항균용 조성물은 린코마이신 (lincomycin), 올레안도마이신 (oleandomycin), 노보비오신 (novobiocin), 반코마이신 (vancomycin), 페니실린 G (penicillin G) 및 리팜피신 (rifampicin)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 항생제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0048] 금속 나노입자와 항생제를 함께 처리할 경우, 금속 나노입자 또는 항생제 각각을 처리하는 것보다 병원성 미생물에 대해 우수한 항균 활성을 나타내는 바, 이를 포함하는 조성물은 다양한 산업에 매우 유용하게 활용될 수

있다.

[0049] 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 금속 나노입자를 포함하는, 항산화용 약학 조성물을 제공한다.

[0050] 이때, "금속 나노입자"는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0051] 본 발명의 용어, "항산화"는 유해한 프리라디칼(free radical)을 제거하는 것을 의미하며, 상기 프리라디칼에 의한 산화적 손상으로부터 세포를 보호하는 현상을 의미한다.

[0052] 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 금속 나노입자는 항산화 활성을 나타내므로, 이들을 유효성분으로 포함하는 항산화용 약학 조성물은 활성산소로 인해 발생하는 질환들을 예방, 개선 및 치료하기 위한 목적으로 사용될 수 있다.

[0053] 상기 활성산소로 인해 발생하는 질환들은 특별히 이에 제한되지는 않으나, 구체적으로 동맥경화증, 루게릭병, 파킨슨병, 알츠하이머, 근위축색경화증 및 헌팅턴병을 포함하는 퇴행성 신경질환, 심근경색, 협심증, 관상동맥 질환, 허혈성 심장질환을 포함하는 심혈관 질환, 뇌졸중을 포함하는 허혈성 뇌질환, 당뇨병, 위염 및 위암을 포함하는 소화기계 질환, 노화, 암, 백혈병, 노화, 류마티스 관절염, 간염, 아토피성 피부염 등 다양한 질환을 포함할 수 있으며, 더욱 구체적으로 활성산소에 의해 발생하는 노화일 수 있다.

[0054] 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 금속 나노입자를 포함하는, 항산화용 식품 조성물을 제공한다.

[0055] 이때, "금속 나노입자"는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0056] 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 금 나노입자는 항산화 활성을 나타내므로, 활성산소로 인해 발생하는 질환의 예방 또는 개선을 도모할 수 있는 식품의 형태로 제조되어 섭취할 수 있다.

[0057] 본 발명의 용어, "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강기능식품 및 건강식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

[0058] 상기 건강기능(성)식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나므로, 본 발명의 식품은 질병의 예방 또는 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0059] 상기 건강식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)는 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강 식품, 건강보조식품의 용어는 혼용된다.

[0060] 구체적으로, 상기 건강기능식품은 금속 나노입자를 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.

[0061] 본 발명의 식품 조성물은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 우수한 항산화 효과를 기대할 수 있어 매우 유용하다.

[0062] 상기 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.

[0063] 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인

인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0064] 또한, 상기 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨류엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아조산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.

[0065] 상기 금속 나노입자는 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 식품 조성물은 식품 또는 음료에 대하여 50 중량부 이하, 구체적으로 20 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0066] 본 발명의 식품 조성물의 일 예로 건강음료 조성물로 사용될 수 있으며, 이 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 구체적으로 약 0.02 ~ 0.03 g이 될 수 있다.

[0067] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0068] 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 금속 나노입자를 포함하는, 항산화용 화장품 조성물을 제공한다.

[0069] 이때, "금속 나노입자"는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0070] 상기 금속 나노입자를 포함하는 항산화용 화장품 조성물은 활성산소로 인하여 유발되는 피부의 노화를 예방 또는 개선시킬 수 있는 기능성 화장품의 제조에 사용될 수 있다.

[0071] 상기 용어, "기능성 화장품(cosmedical, cosmeceutical)"이란 화장품에 의약품의 전문적인 치료기능이 도입되어, 일반 화장품과 달리 생리활성적인 효능, 효과가 강조된 전문적인 기능성을 갖는 제품으로서, 피부의 미백에 도움을 주는 제품, 피부 주름개선에 도움을 주는 제품, 피부를 곱게 태우거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품 중에서 보건복지부령이 정하는 화장품을 의미한다.

[0072] 본 발명에 있어서, 상기 기능성 화장품은 다양한 기능성 화장품 중에서 항산화 활성을 나타내어 피부노화 방지에 도움을 주는 제품을 의미하고, 구체적으로 상기 금 나노입자를 유효성분으로 포함하는 피부 노화방지용 기능성 화장품이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않고, 상기 피부 노화방지용 기능성 화장품에 포함되는 상기 금 나노입자의 함량 역시 특별히 제한되지 않는다.

[0073] 본 발명의 피부 노화방지용 기능성 화장품은 상기 금 나노입자를 유효성분으로 포함하고, 통상적으로 사용되는 화장료를 추가로 함유할 수 있는데, 예를 들면 수용성 스킨제제화를 위하여 글리세롤, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 솔비톨, 폴리에틸렌글리콜, 카르복시비닐 폴리머, 잔탄검, 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 하이드록시메틸셀룰로오스, 로커스트빈검, 알란토인, 카라기난 등을 첨가할 수 있으며; 점도와 경도조절제로 밀납, 파라핀 왁스, 스테아릴알콜, 카르나우바 왁스, 칸데릴라 왁스 및 칼슘스테아레이트, 알루미늄스테아레이트, 아연스테아레이트, 위치하젤(witchhazel) 등을 사용할 수 있고; 자외선 흡수제로 부틸메톡시디벤조일메탄, 옥틸메톡시신나메이트 등을 사용할 수 있으며; 안료로는 이산화티탄, 미립자 이산화티탄, 카울린, 나이론 파우더, 탈크, 세리사이트, 마이카, 폴리메틸메타크릴레이트 등의 체질 안료와 황색산화철, 흑색산화철, 적색산화철, 울트라마린, 산화크롬, 수산화크롬 등의 착색안료를 사용할 수 있고; 보습제로 1,3-부틸렌글리콜, 농글리세린, 에틸렌글리콜 등과 키틴, 키토산, 히아론산, 하이알루론산, 젖산, 글리콜산 등의 천연보습 물질

들을 이용할 수 있으며; 방부제로 파라옥시안식향산 에스테르류, 이미다졸리디닐우레아 등을 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 상기한 성분들을 제품특성에 따라 1종 또는 2종이상 혼용 배합할 수도 있다.

- [0074] 본 발명의 기능성 화장품은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0075] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 진분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0077] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0078] 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 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0079] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

발명의 효과

- [0080] 본 발명의 금속 나노입자의 제조방법을 이용하면, 빠른 시간 내에 별도의 환원제 또는 안정제의 부가 없이도 크기가 균일한 금속 나노입자를 제조할 수 있고, 이처럼 제조된 금속 나노입자는 항균 활성 및 항산화 활성을 가지므로, 이를 포함하는 조성물은 산업에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0081] 도 1a는 합성온도에 따른 금 나노입자의 생성수준의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 1b는 합성온도에 따른 은 나노입자의 생성수준의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 2a는 인삼 열매 추출물 용액의 농도에 따른 금 나노입자의 생성수준의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 2b는 인삼 열매 추출물 용액의 농도에 따른 은 나노입자의 생성수준의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 3a는 반응시간에 따른 금 나노입자의 생성수준의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 3b는 반응시간에 따른 은 나노입자의 생성수준의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 금 나노입자 및 은 나노입자의 FE-TEM 분석결과를 나타내는 전자현미경 사진이다.
- 도 5는 금 나노입자 및 은 나노입자의 에너지 분산형 X선 분석(EDX) 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 6는 금 나노입자 및 은 나노입자의 원소 매핑 분석 결과를 나타내는 형광현미경 사진이다.
- 도 7는 금 나노입자 및 은 나노입자의 XRD 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8는 금 나노입자 및 은 나노입자의 입자크기 분석(particle size analyzer)을 수행한 결과를 나타내는 회절 분석 사진이다.

도 9는 금 나노입자 및 은 나노입자의 FTIR 분석을 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10a는 본 발명에서 제공하는 금 및 은 나노입자의 항산화 활성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10b는 대장균(E. coli)과 황색포도상구균(S. aureus)에 대한 은 나노입자의 항균활성을 분석한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

도 11a는 HDF 세포주 및 B16BL6 세포주에 다양한 농도의 금 나노입자를 처리한 결과를 나타내는 현미경 사진이다.

도 11b는 HDF 세포주 및 B16BL6 세포주에 다양한 농도의 금 나노입자 또는 금염 화합물의 처리에 따른 세포생존율의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 12a는 HDF 세포주 및 B16BL6 세포주에 다양한 농도의 은 나노입자를 처리한 결과를 나타내는 현미경 사진이다.

도 12b는 HDF 세포주 및 B16BL6 세포주에 다양한 농도의 은 나노입자 또는 은염 화합물의 처리에 따른 세포생존율의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0083] **실시예 1: 인삼 열매 추출물을 이용한 금 나노입자 또는 은 나노입자의 제조**

[0084] **실시예 1-1: 인삼 열매 추출물의 제조**

[0085] 인삼 열매를 건조시키고, 이를 마쇄하여 인삼 열매 건조분말을 수득하였다. 상기 인삼 열매 건조분말 1 g에 멸균증류수 150 mL을 가하고 100℃에서 30분 동안 추출하였다. 이어, 추출액을 여과하여 액상성분인 인삼 열매 추출물을 수득하였다.

[0086] **실시예 1-2: 금 나노입자의 제조**

[0087] 상기 실시예 1-1에서 제조된 인삼 열매 추출물 용액 100 mL에 금염 화합물($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)을 최종농도 1mM가 될 때까지 가하여 금 나노입자를 합성하였다. 반응의 진행과정은 일정 시간 간격으로 용액의 흡광도를 측정하여 모니터링하였다. 반응물에서 용액의 색변화는 금 나노입자의 형성을 나타내었다. 색 변화가 확인된 후, 반응물을 원심분리(2,000 rpm, 10분)하여 불필요한 성분을 제거하였다. 그런 다음, 합성된 나노입자를 물로 지속적으로 세척하여 정제하고, 원심분리(16,000 rpm, 15분)하여 침전물 형태의 금 나노입자를 수득하였다. 끝으로, 정제된 금 나노입자를 하룻밤동안 공기건조 시켜서, 분말형태의 금 나노입자를 제조하였다.

[0088] **실시예 1-3: 은 나노입자의 제조**

[0089] 금염 화합물 대신에 은염 화합물(AgNO_3)을 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1-2의 방법을 사용하여 분말 형태의 은 나노입자를 제조하였다.

[0090] **실시예 1-4: 나노입자의 제조에 미치는 온도의 영향 분석**

[0091] 상기 실시예 1-2 및 1-3의 나노입자 제조시에 온도의 영향을 분석하기 위하여, 상기 합성반응을 다양한 온도(23, 40, 60, 80 및 90℃)에서 수행하고, 그 결과를 분석하였다(도 1a 및 1b).

[0092] 도 1a는 합성온도에 따른 금 나노입자의 생성수준의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1a에서 보듯이, 금 나노입자의 표면 플라즈몬 파장(λ_{max})은 540 nm에서 확인되었는데, 23℃에서는 금 나노입자의 최대 흡수피크가 270분에 확인되었고, 90℃에서는 금 나노입자의 최대 흡수피크가 25분에 확인되었는 바, 합성 온도가 증가할 수록 금 나노입자의 합성시간이 단축됨을 알 수 있었다. 특히, 40℃에서 합성된 금 나노입자의 수준과 60℃에서 합성된 금 나노입자의 수준에 큰 차이를 나타내므로, 적어도 60℃ 이상의 온도에서 합성함이 바람직함을 알 수 있었다.

- [0093] 뿐만 아니라, 합성온도가 높아질 수록 합성된 금 나노입자의 크기가 감소되고, 합성온도가 낮아질 수록 합성된 금 나노입자의 크기가 증가함을 확인하였다.
- [0094] 도 1b는 합성온도에 따른 은 나노입자의 생성수준의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1b에서 보듯이, 은 나노입자의 표면 플라즈몬 파장(λ_{max})은 444 nm에서 확인되었는데, 23℃에서는 은 나노입자의 최대 흡수피크가 24시간에 확인되었고, 90℃에서는 은 나노입자의 최대 흡수피크가 3시간에 확인되었는데, 합성 온도가 증가할 수록 은 나노입자의 합성시간이 단축됨을 알 수 있었다. 특히, 40℃에서 합성된 금 나노입자의 수준과 60℃에서 합성된 금 나노입자의 수준에 큰 차이를 나타내므로, 적어도 60℃ 이상의 온도에서 합성함이 바람직함을 알 수 있었다.
- [0095] 뿐만 아니라, 합성온도가 높아질 수록 합성된 은 나노입자의 크기가 감소되고, 합성온도가 낮아질 수록 합성된 은 나노입자의 크기가 증가함을 확인하였다.
- [0096] **실시예 1-5: 나노입자의 제조에 미치는 인삼 열매 추출물 농도의 영향 분석**
- [0097] 상기 실시예 1-2 및 1-3의 나노입자 제조시에 온도의 영향을 분석하기 위하여, 상기 합성반응을 80℃에서 다양한 농도(1 내지 8%, w/v)의 인삼 열매 추출물 용액을 사용하여 수행하고, 그 결과를 분석하였다(도 2a 및 2b).
- [0098] 도 2a는 인삼 열매 추출물 용액의 농도에 따른 금 나노입자의 생성수준의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 2a에서 보듯이, 금 나노입자의 표면 플라즈몬 파장(λ_{max})은 540 nm에서 확인되었는데, 인삼 열매 추출물 용액의 농도가 5%(w/v)에 이르기까지는 인삼 열매 추출물 용액의 농도에 비례하여 금 나노입자의 합성수준이 증가되었으나, 인삼 열매 추출물 용액의 농도가 5%(w/v) 이상인 경우에는 인삼 열매 추출물 용액의 농도에 비례하여 금 나노입자의 합성수준이 서서히 감소됨을 확인하였다.
- [0099] 따라서, 금 나노입자의 합성시 사용되는 인삼 열매 추출물 용액의 최적 농도는 5%(w/v)임을 알 수 있었다.
- [0100] 도 2b는 인삼 열매 추출물 용액의 농도에 따른 은 나노입자의 생성수준의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 2b에서 보듯이, 은 나노입자의 표면 플라즈몬 파장(λ_{max})은 444 nm에서 확인되었는데, 인삼 열매 추출물 용액의 농도가 5%(w/v)에 이르기까지는 인삼 열매 추출물 용액의 농도에 비례하여 은 나노입자의 합성수준이 증가되었으나, 인삼 열매 추출물 용액의 농도가 5%(w/v) 이상인 경우에는 인삼 열매 추출물 용액의 농도에 비례하여 은 나노입자의 합성수준이 서서히 감소됨을 확인하였다.
- [0101] 따라서, 은 나노입자의 합성시 사용되는 인삼 열매 추출물 용액의 최적 농도는 5%(w/v)임을 알 수 있었다.
- [0102] **실시예 1-6: 나노입자의 제조에 미치는 반응시간의 영향 분석**
- [0103] 상기 실시예 1-2의 금 나노입자 제조시에 온도의 영향을 분석하기 위하여, 상기 합성반응을 80℃에서 다양한 시간(10, 15, 35 및 45분)동안 수행하고, 그 결과를 분석하였다(도 3a).
- [0104] 도 3a는 반응시간에 따른 금 나노입자의 생성수준의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3a에서 보듯이, 반응시간이 길어질 수록 금 나노입자의 합성수준 역시 증가됨을 확인하였는데, 특히, 10분 동안 반응시킨 것에 비하여 15분 이상의 시간동안 반응시킬 경우, 금 나노입자의 합성수준이 급격히 증가함을 확인하였다.
- [0105] 상기 실시예 1-3의 은 나노입자 제조시에 온도의 영향을 분석하기 위하여, 상기 합성반응을 80℃에서 다양한 시간(1, 2 및 3시간)동안 수행하고, 그 결과를 분석하였다(도 3b).
- [0106] 도 3b는 반응시간에 따른 은 나노입자의 생성수준의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3b에서 보듯이, 반응시간이 길어질 수록 은 나노입자의 합성수준 역시 증가됨을 확인하였는데, 특히, 1시간 동안 반응시킨 것에 비하여 2시간 이상의 시간동안 반응시킬 경우, 은 나노입자의 합성수준이 상대적으로 증가함을 확인하였다.
- [0107] **실시예 2: 금 나노입자 또는 은 나노입자의 구조적 특성 분석**
- [0108] **실시예 2-1: FE-TEM 및 DLS 분석**
- [0109] FE-TEM은 금속 나노 입자의 금속 코어 크기를 결정하는데 사용하는 반면, DLS는 나노 입자의 캐핑층을 포함하는 유체 역학적 크기(hydrodynamic size, Z-average)를 평가하는데 사용된다.
- [0110] 먼저, 금 나노입자와 은 나노입자의 FE-TEM 측정을 통해 입자 크기는 각각 5 ~ 10 nm과 10-20nm의 변동되는 크기를 가지는 구형이고, 이들 나노입자는 폴리 분산되어 있다는 것을 확인하였다(도 4).

[0111] 다음으로, DLS법으로 파이토케미컬로 코팅 된 GBAuNPs 과 GBAgNPs의 유체역학적 반경을 계산하였다. 금 나노입자에 코팅된 GBE 파이토케미컬은 GBAuNPs 과 GBAgNPs의 유체역학적 반경의 지속적인 변화를 일으킨다. DLS 측정을 통해 결정된 GBAuNPs 과 GBAgNPs의 유체역학적 직경은 각각 179에서는 PDI 0.26과 580 nm에서는 PDI 0.25를 가졌으며, GBE 파이토케미컬(진세노사이드, 산성 다당, 폴리페놀 및 환원당)의 대부분이 금과 은 나노입자로 덮혀 있다는 것을 시사한다.

[0112] **실시예 2-2: 에너지 분산형 X선 분석(EDX) 및 원소 매핑 분석**

[0113] EDX 및 원소 매핑은 200 kV에서 JEM-2100F 전자현미경을 사용하여 수행하였다. 정제된 나노입자 1 방울을 탄소 코팅 구리 그리드에 놓고, 60℃의 오븐에서 건조시켰다.

[0114] EDX으로 각각 2.2 keV 과 3.3 keV에서 금속 금과 은의 특징적 피크의 존재를 확인하였다(Fig.S1a and b).

[0115] 또한, 금 나노입자와 은 나노입자의 원소 매핑 분석을 통해 나노입자의 순도를 확인하고, 상기 EDX 결과와 원소 매핑 분석 결과를 조합하여 이들 나노입자의 분포를 확인하였다(도 6a and b).

[0116] **실시예 2-3: XRD 및 SAED 분석**

[0117] XRD 분석은 X-ray 회절계를 사용하여 수행되었는데, 상기 X-ray 회절계는 40 kV, 40 mA, 1.54 Å의 CuK α 조사, 6° /min의 스캔속도 및 0.02° 의 스텝 크기에서 작동시켰다. 시료를 20-80° 범위에서 2θ 이상 스캔하였다. 상기 금속 나노입자 결정체의 평균 크기는 Debye-Scherrer 수식에 의해 산출하였다:

[0118]
$$D = 0.9\lambda / \beta \cos \Theta, D = 0.9\lambda / \beta \cos \Theta,$$

[0119] 이때 D는 nm당 미결정의 크기이고, λ는 CuK nm당 α 조사의 파장이며, β는 라디안당 FWHM(full width at half maximum) 이고, Θ는 라디안당 Bragg angle의 중간값이다.

[0120] 또한, SAED 분석은 200 kV에서 JEM-2100F 전자현미경을 사용하여 수행하였다.

[0121] XRD 스펙트럼은 합성물질에 의해 나타나는 결정성의 동정을 위해 기록하였는데, 금 나노입자는 2 θ에서 4개의 주요 회절 피크 38.48° , 44.60° , 65.25° 및 78.21° 를 나타내었고 이는 (111), (200), (220) 및 (311) planes (도 7a)에 대응함을 확인하였다(도 7)

[0122] **실시예 2-4: 입자크기 분석(particle size analyzer)**

[0123] 증류수에 현탁된 나노입자의 입자크기 분포는 DLS(dynamic light scattering)에 의해 측정하였다. 히드로다이내믹 (Z-average) 직경과 PDI(polydispersity index)는 25℃에서 평가하였다. 1.3328의 굴절률, 0.8878의 점도 및 78.3의 유전상수를 갖는 순수 물의 분산매질을 대조군으로 사용하였다(도 8).

[0124] 합성 NPs의 평균 결정 크기는 Debye-Scherrer 방정식, $d = k\lambda / \beta \cos \Theta$, 으로 측정하였고, 이때 'd' 는 평균 결정 크기, λ는 Cu-K α 방사선의 파장, β는 가장 높은 강도의 회절 피크의 full width at half maximum (FWHM)이며, Θ는 브래그 회절각이고 k는 형상계수로 그 값은 0.9이다. Au와 Ag NPs의 평균 결정 크기는 각각 4.24 nm 와 1.69 nm이다. GBAuNPs(도 8a) 과 GBAgNPs(도 8b) 의 선택영역의 전자 회절(SAED) 패턴은 face-centered-cubic (FCC) 결정 구조를 보였다.

[0125] **실시예 2-5: FTIR(Fourier Transform-Infrared spectrometer) 분석**

[0126] 금 나노입자 및 은 나노입자의 FTIR 측정은 4000-450 cm⁻¹ 및 4 cm⁻¹의 해상도로 PerkinElmer Spectrum One FTIR spectrometer를 사용하여 수행하였다(도 9).

[0127] 인삼 열매 추출물의 관능기는 FTIR분석으로 분석하였다. GBE 및 생성된 나노입자는 유사한 특성의 피크를 나타내었고, 이는 두 경우에 있어서 관능기의 존재가 동일하게 있는 것을 나타낸 것이다. 이러한 결과는 미세 가공 추출물의 화학적 기능이 변하지 않았다는 것을 시사한다. 다당 및 O-H 신축으로 인한 페놀 화합물 구조의 수산기의 특징적 피크는 3500과 3000 cm⁻¹ 사이에서 나타난다. 3000과 2800 cm⁻¹ 사이의 C-H 신축은 메틸 또는 메틸렌기의 C-H 신축 진동 때문이다. 1600과 1400 cm⁻¹ 사이의 뚜렷한 피크는 플라보노이드의 카르보닐기 신축 진동 및 폴리페놀 화합물의 에스테르 결합을 나타낸다. 1500과 1032 cm⁻¹ 사이의 약한 피크는 태닝/탄닌산의 방향족 C-C기 및 C-O 관능기에 대응한다. 1200과 1000 cm⁻¹ 사이의 피크는 C-O-H 및 C-O-C 밴드의 위치와 관련하여 발견하였다. FTIR 스펙트럼 분석을 바탕으로 표면에 부착된 생체 분자와 실험적 작업, 다당류, 플라보노이드, 탄

닌, 페놀 배당체 및 환원당은 생합성된 나노입자의 환원 및 이후의 안정화에 관여할 것으로 분석되었다.

[0128] 실시예 2-6: 안정성 분석

[0129] 실험실 수준에서 금 나노입자 및 은 나노입자의 안정성을 평가하였다.

[0130] 구체적으로, 금 나노입자 및 은 나노입자의 안정성을 증류수, 20 mM glycine-HCl 완충액(pH 2.0), citric acid-sodium citrate 완충액(pH 5.0), sodium phosphate 완충액(pH 7.0), Tris-HCl 완충액(pH 8.0), 5% NaCl 용액, 10% NaCl 용액 및 5% BSA 용액에서 시험하였다. 금속 나노입자 용액 100 μ l에 상기 각 용액 900 μ l를 가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. UV-Vis 분광광도계를 사용하여 표면 플라즈몬에서 유의한 차이가 없으면, 금 및 은 나노입자가 안정성을 갖는 것으로 확인하였다.

[0131] 그 결과, 금 나노입자와 은 나노입자의 DW, pH2, pH7, pH8, 10% NaCl 및 5% BSA 용액에서의 표면 플라즈몬 파장은 37 $^{\circ}$ C에서 반응 1일 후 최소파장이동(0-5 nm)을 보였다. 금 나노입자의 경우에는 한달 이후에도 모든 소정의 조건에서 표면 플라즈몬 파장의 이동은 없었다. 또한, 은 나노입자의 경우에는 한달 이후에 DW 과5% BSA에서 장기적으로 안정함을 보였다. 이러한 결과는 금 나노입자와 은 나노입자가 그대로인 생리적 pH 조건에서 안정성을 나타냄을 시사하는 것으로 분석되었다.

[0132] 실시예 3: 금 나노입자 또는 은 나노입자의 기능적 특성 분석

[0133] 실시예 3-1: 금 나노입자와 은 나노입자의 항산화 활성분석

[0134] DPPH(1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl)의 자유 라디칼 제거 활성을 이용하여, 금 나노입자(GBAuNPs), 은 나노입자(GBgNPs), 인삼 열매 추출물(GBE), 금염 화합물 및 은염 화합물의 항산화 활성을 확인하였다. DPPH의 0.1 mM 메탄올 용액 160 μ l에 다양한 농도(2-20 μ g/ml)의 시료 용액 40 μ l를 추가하였다. 양성 대조군으로는 갈산(GA)을 사용하였다. 30분 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하고, 이를 하기 식에 적용하여 자유라디칼 제거활성을 산출한 후, 이를 농도별로 비교하였다(도 10a).

[0135] 자유라디칼 제거활성 = [(대조군 흡광도 - 시료 흡광도) / 대조군 흡광도] $\times$ 100

[0136] 이때, 시료 흡광도는 나노입자를 가한 DPPH 용액에서 측정하고, 대조군 흡광도는 나노입자를 가하지 않은 DPPH 용액에서 측정하였다. 50% DPPH 자유라디칼을 제거하는데 필요한 시료의 농도를 나타내는 IC50 수치는 도표로 산출하였다.

[0137] 도 10a는 본 발명에서 제공하는 금 및 은 나노입자의 항산화 활성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 10a에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 금 및 은 나노입자는 높은 수준의 항산화 활성을 나타내었는데, 은 나노입자의 항산화 활성이 가장 높은 수준(93.8%)을 나타내었고, 금 나노입자(81.5%)와 인삼 열매 추출물(81%)은 그 보다 낮은 수준의 항산화 활성을 나타냄을 확인하였다. 또한, 각 시료의 IC50 수치 역시 은 나노입자가 1.85 μ g/ml을 나타내었고, 인삼 열매 추출물은 그 보다 높은 수준인 1.90 μ g/ml을 나타내었으며, 금 나노입자는 1.96 μ g/ml을 나타내었다. 인삼 열매 추출물의 항산화 활성은 인삼 열매 추출물에 포함된 다양한 파이토케미칼에 의한 것으로 여겨지며, 은 나노입자의 높은 항산화 활성은 나노입자 자체의 항산화 활성에 인삼 열매로부터 유래된 성분이 결합되어 나타난 것으로 분석되었다.

[0138] 실시예 3-2: 은 나노입자의 항균활성 분석

[0139] 공지된 디스크 확산법을 사용하여 MHA(Mueller-Hinton agar) 플레이트에서 대장균과 황색포도상구균에 대한 은 나노입자의 항균활성을 연구하였다. 상기 분석법에 있어서, MHA 플레이트에 0.1의 밀도로 LB 배지에서 배양된 시험균주 100 μ l를 도말하고 하룻밤 동안 배양하였다. 대조군으로서, 네오마이신의 표준 항균 디스크를 사용하였다. 다음으로, 멸균 종이 디스크에 다양한 농도(15, 30 및 45 μ g/disc)로 신선한 은 나노입자 용액을 흡수시켰다. 상기 플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, 각 디스크 주위의 억제영역을 비교하였다(도 10b).

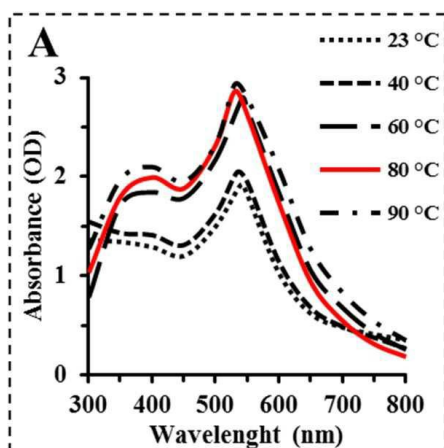
[0140] 도 10b는 대장균(E. coli)과 황색포도상구균(S. aureus)에 대한 은 나노입자의 항균활성을 분석한 결과를 나타내는 사진 및 그래프이다. 도 10b에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 은 나노입자는 그람음성균에 속하는 대장균은 물론 그람양성균에 속하는 황색포도상구균에 대하여도 항균활성을 나타내고, 이러한 항균활성은 농도 의존적으로 증가되는 양상을 나타냄을 확인하였다. 이러한 은 나노입자의 항균활성 역시 인삼 열매로부터 유래된 성분에 의하여 증가되는 양상을 나타내는 것으로 분석되었다.

[0141] 실시예 3-3: 금 나노입자와 은 나노입자의 세포독성 분석

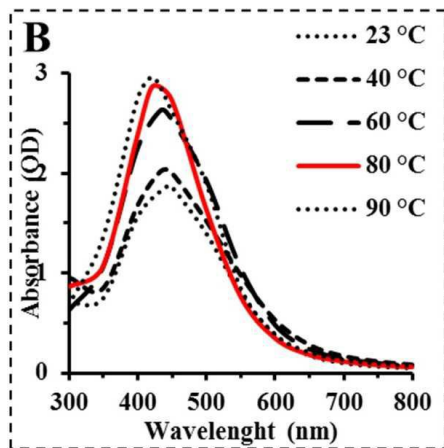
- [0142] HDF(Human dermal fibroblast) 세포주 및 흑색종인 B16BL6 세포주를 입수하였다. 상기 세포주를 공지된 방법에 따라 10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지에 접종하고, 37℃ 및 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. 세포 생존율에 미치는 금 나노입자와 은 나노입자의 세포독성 효과는 MTT 분석법으로 측정하였다. 세포를 96웰 플레이트에 접종하고 24시간 동안 배양하였다. 90%의 포화도가 되었을 때, 세포에 다양한 농도(1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 금 및 은 나노입자 또는 이들 나노입자의 합성에 사용된 금염 화합물과 은염 화합물을 72시간 동안 처리하였다. 3일이 경과된 후, 10 μl 의 MTT 용액을 각 웰에 가하고 37℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 끝으로, 100 μl 의 DMSO를 가하여 포르마잔 결정을 용해시켰다. ELISA 리더기로 570 nm에서 흡광도를 측정하여, 세포생존율을 산출하고, 이를 비교하였다(도 11a, 11b, 12a 및 12b). 이때, 대조군으로는 인삼 열매 추출물을 처리한 세포주를 사용하였다.
- [0143] 도 11a는 HDF 세포주 및 B16BL6 세포주에 다양한 농도의 금 나노입자를 처리한 결과를 나타내는 현미경 사진이다. 상기 도 11a에서 보듯이, 금 나노입자의 처리농도가 증가할 수록 흑색 클러스터(화살표)로 표시되는 사멸된 세포의 수준이 증가함을 확인하였다.
- [0144] 도 11b는 HDF 세포주 및 B16BL6 세포주에 다양한 농도의 금 나노입자 또는 금염 화합물의 처리에 따른 세포생존율의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 11b에서 보듯이, 낮은 농도(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리할 경우에는 세포독성을 나타내지 않았으나, 처리농도가 증가할 수록 세포독성이 증가하여 세포생존율이 감소되었고, 세포주에 따라 차이가 있으나, 대체로 금염 화합물 보다는 금 나노입자가 낮은 수준의 세포독성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [0145] 도 12a는 HDF 세포주 및 B16BL6 세포주에 다양한 농도의 은 나노입자를 처리한 결과를 나타내는 현미경 사진이다. 상기 도 12a에서 보듯이, 은 나노입자의 처리농도가 증가할 수록 흑색 클러스터(화살표)로 표시되는 사멸된 세포의 수준이 증가함을 확인하였다.
- [0146] 도 12b는 HDF 세포주 및 B16BL6 세포주에 다양한 농도의 은 나노입자 또는 은염 화합물의 처리에 따른 세포생존율의 변화를 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 12b에서 보듯이, 은 나노입자 및 은염 화합물은 낮은 농도(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리할 경우에도 세포독성을 나타내었고, 처리농도가 증가할 수록 세포독성이 증가하여 세포생존율이 감소되었으며, 세포주에 따라 차이가 있으나, 대체로 은염 화합물 보다는 은 나노입자가 상대적으로 낮은 수준의 세포독성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [0147] 아울러, 상기 도 11b 및 12b의 결과를 비교하면, 대체로 금 나노입자가 은 나노입자 보다는 상대적으로 낮은 수준의 세포독성을 나타냄을 알 수 있었다.

도면

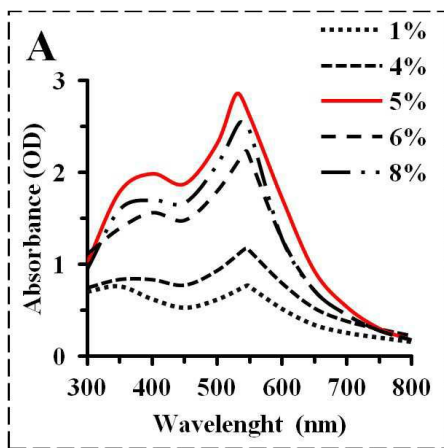
도면1a



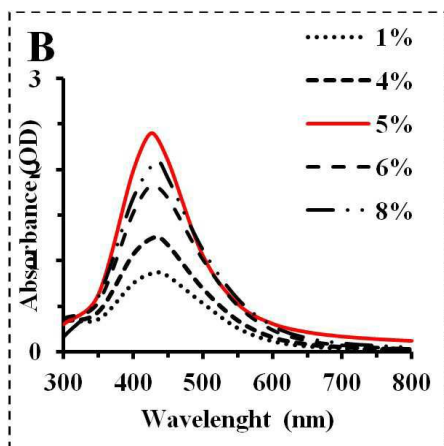
도면1b



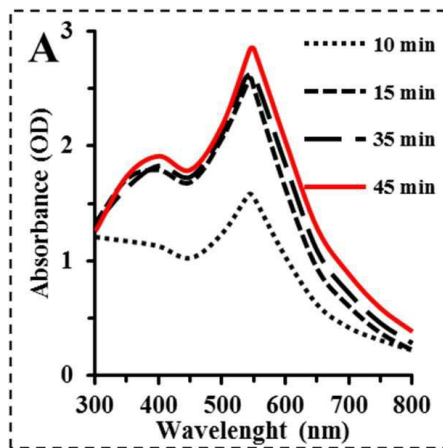
도면2a



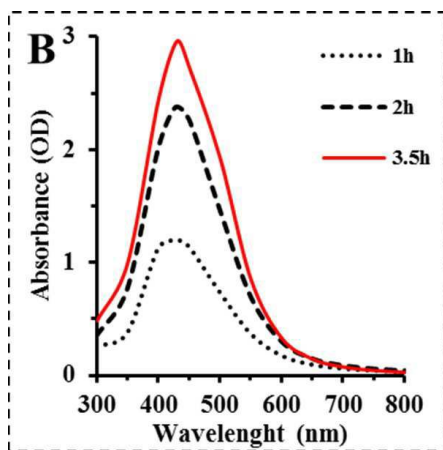
도면2b



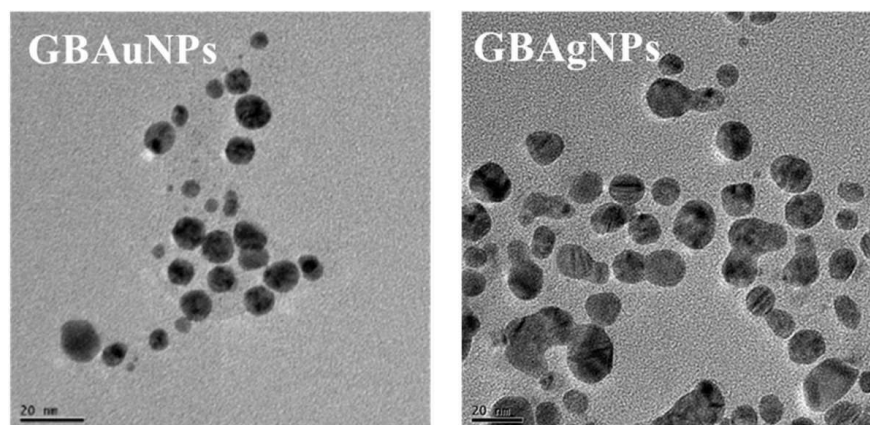
도면3a



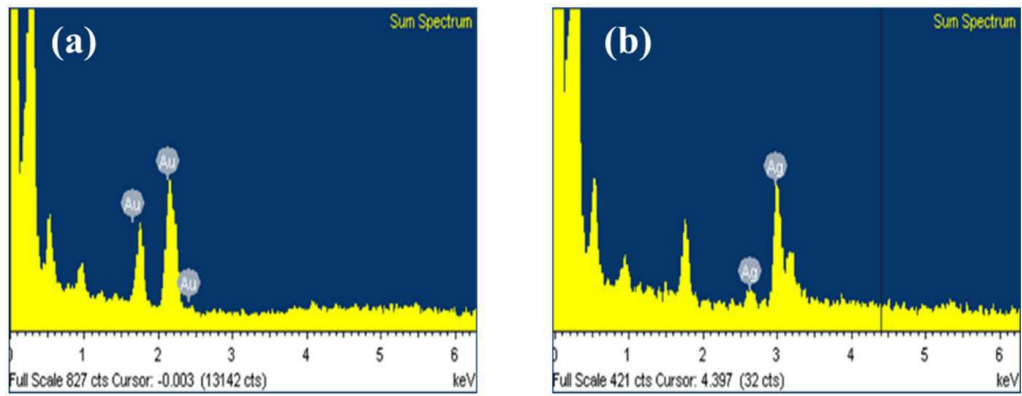
도면3b



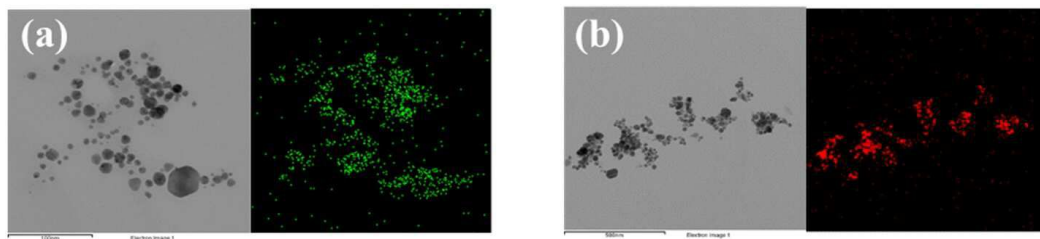
도면4



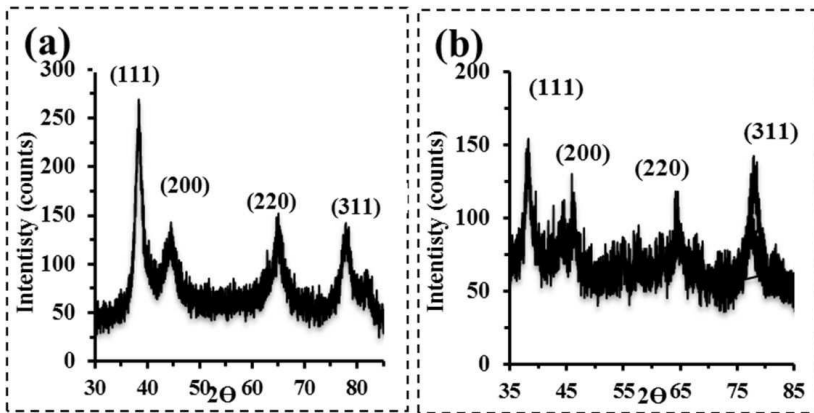
도면5



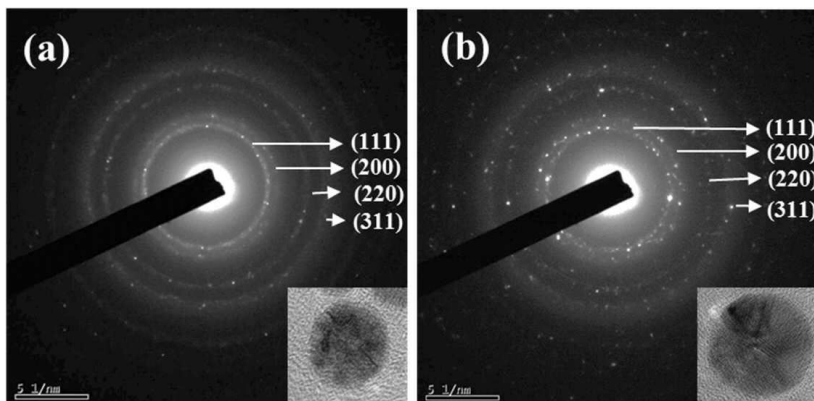
도면6



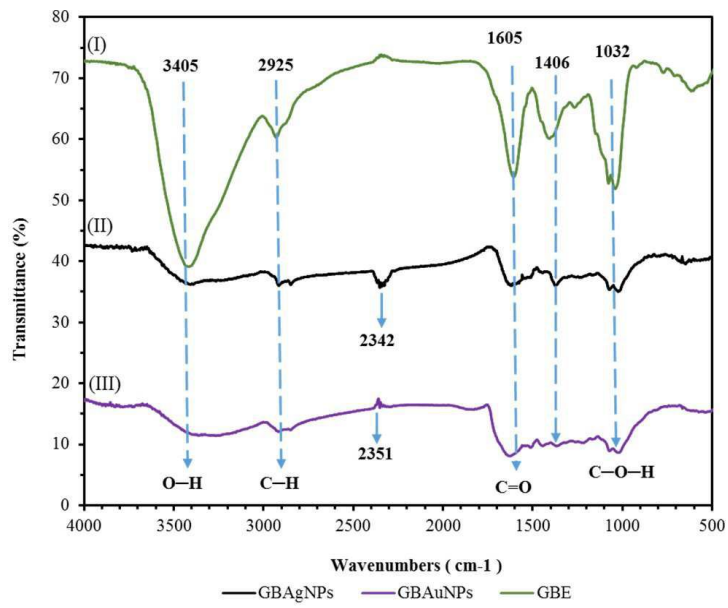
도면7



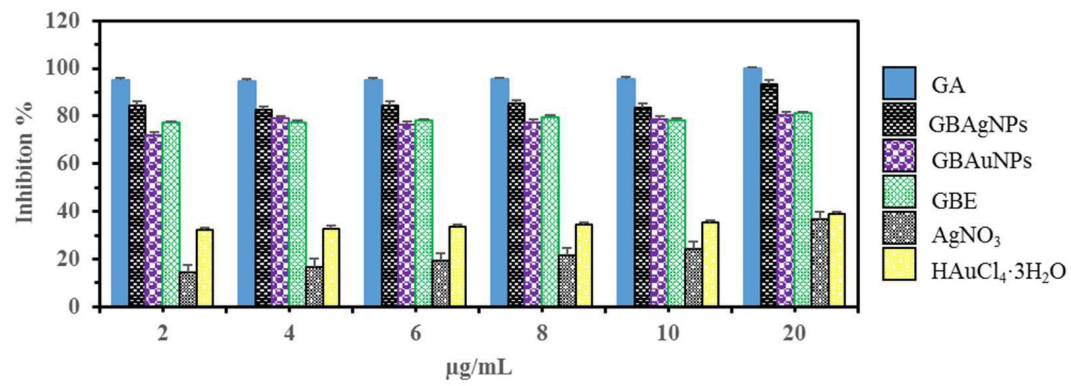
도면8



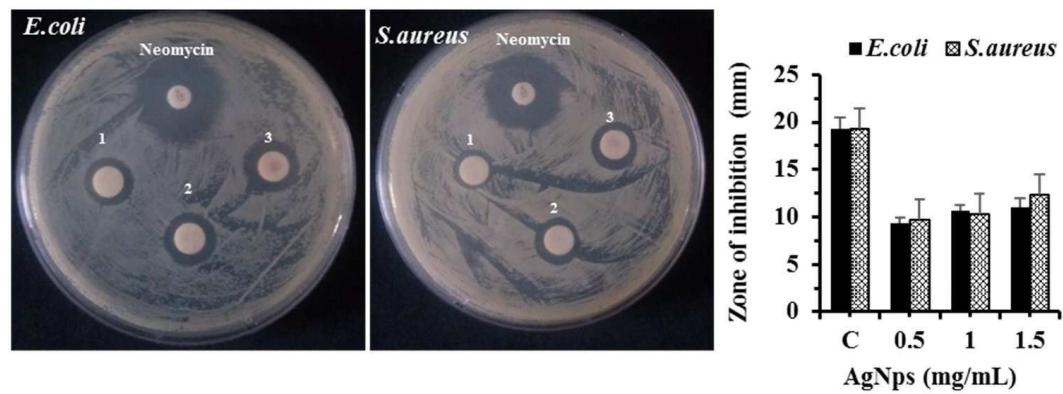
도면9



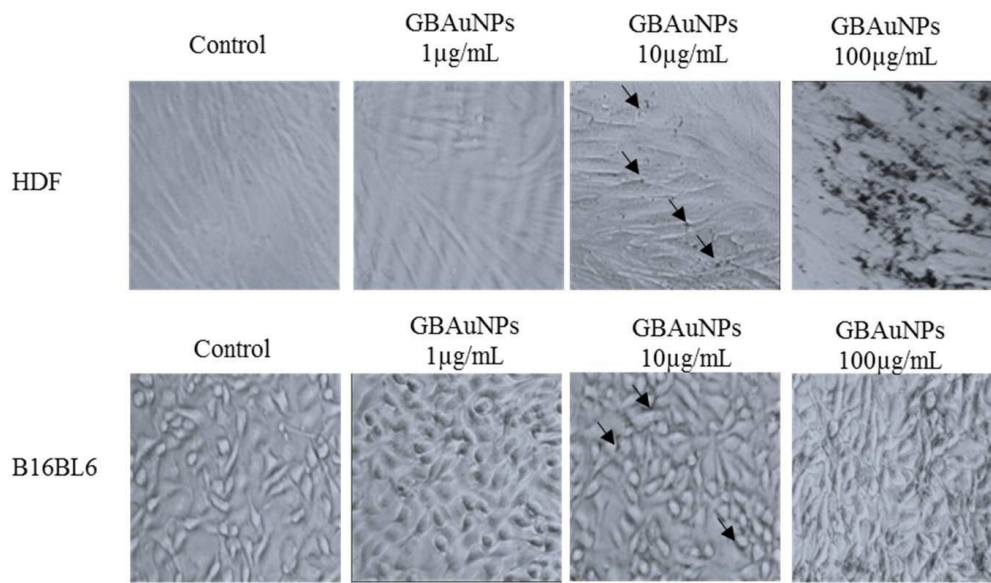
도면10a



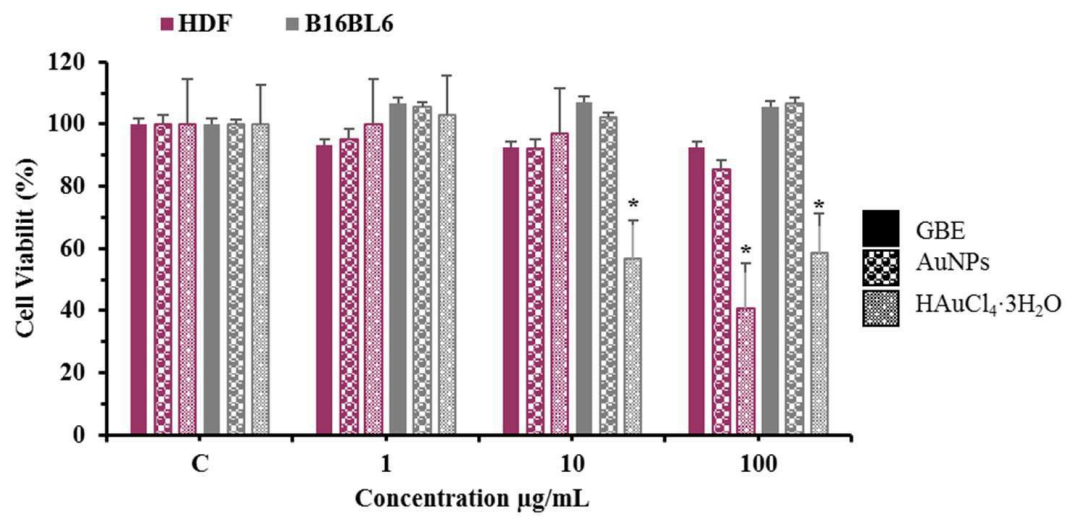
도면10b



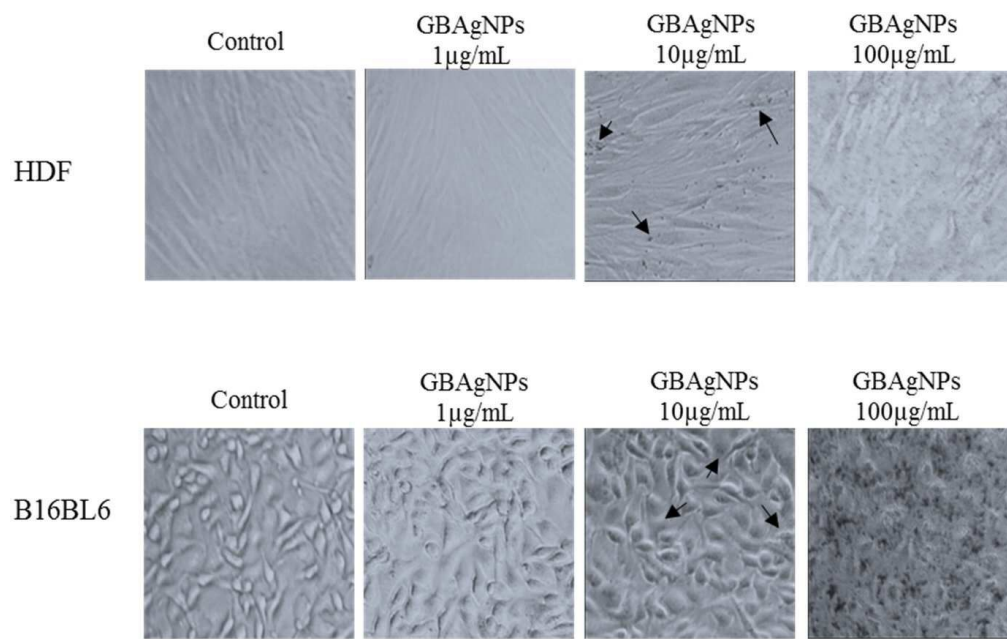
도면11a



도면11b



도면12a



도면12b

