(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0128888
(43) 공개일자 2013년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/62 (2006.01) *A61K 8/64* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0053032
(22) 출원일자 2012년05월18일
심사청구일자 2012년05월18일

(71) 출원인
(주)모아캠
서울특별시 강남구 학동로24길 11, 4층 (논현동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
이근하
인천광역시 연수구 먼우금로 126 대림2차아파트 207동 206호
박청
대전광역시 유성구 가정로 65 대림두레아파트 101동 405호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 5 항

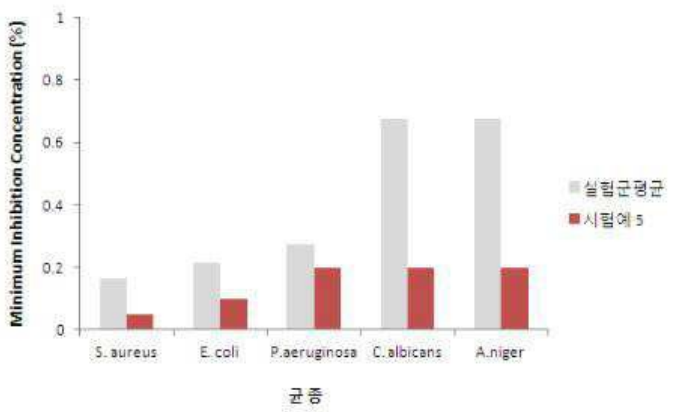
(54) 발명의 명칭 **연잎, 연꽃, 연씨 및 연근 추출물을 함유하는 천연 복합 방부제 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 연잎 추출물, 연꽃 추출물, 연씨 추출물 및 연근 추출물을 함유하는 천연 복합 방부제 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 천연 복합 방부제 조성물은 인체에 독성이 없으며 뛰어난 방부효과 및 항균 효과를 가지고 있어, 합성 방부제 대신 화장품, 식품 및 의약품의 천연 방부제로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

공혜진

경상북도 경산시 삼풍로2길 18 태양빌 302호

권순상

경기도 용인시 수지구 상현동 성원 상떼빌3차아파트 228동 1204호

주철규

서울특별시 강동구 구천면로42길 28-33

조영롱

서울특별시 구로구 공원로 35 새솔금호아파트 A동 2001호

주일우

서울특별시 서초구 신반포로 270 반포자이아파트 125동 403호

정용철

서울특별시 노원구 동일로207길 184 학여울청구아파트 107동 1301호

황재성

서울특별시 송파구 동남로 169 미륭아파트 101동 206호

신동하

경기도 용인시 처인구 역북동 태공빌라 나동 301호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A103017
부처명	보건복지부
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	글로벌코스메틱연구개발사업단
기 여 율	1/1
주관기관	(재) 대한화장품산업연구원
연구기간	2011.11.01 ~ 2015.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

연잎 추출물, 연꽃 추출물, 연씨 추출물 및 연근 추출물을 함유하는 천연 복합 방부제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 연잎 추출물, 연꽃 추출물, 연씨 추출물 및 연근 추출물의 함량은 각각 0.01 내지 2.0 중량%인 것을 특징으로 하는 천연 복합 방부제 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 천연 복합 방부제 조성물을 방부성분으로 함유하는 화장품.

청구항 4

제3항에 있어서, 천연 복합 방부제 조성물의 함량은 0.001 내지 10 중량%인 것을 특징으로 하는 화장품.

청구항 5

제1항 또는 제2항의 천연 복합 방부제 조성물을 방부성분으로 함유하는 식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 연잎 추출물, 연꽃 추출물, 연씨 추출물 및 연근 추출물을 함유하는 천연 복합 방부제 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 방부제는 화장품, 의약품, 생활용품, 식품 등 다양한 제품군의 품질을 장기간 유지하기 위해 필수적이며, 특히 유통기간이 비교적 길고 기름이나 물이 주성분으로 구성되어 있으며 미생물의 탄소원이 되는 글리세린이나 솔비톨 등과 질소원이 되는 아미노산 유도체 및 단백질 등으로 조성된 화장품의 경우는 더욱 필수적이다.

[0003] 화장품은 일반적으로 상온 1년~ 3년간의 유통기간을 가지고 있으며, 개봉 후 지속적으로 손과의 접촉으로 인하여 미생물에 매우 취약하다. 따라서 이러한 미생물로부터의 오염을 차단하며 제품의 안전과 품질을 보장하기 위하여 방부력이 높은 방부제를 사용해야 한다.

[0004] 하지만 기존의 화장품용 방부제는 화학적 방법에 의해서 제조된 화학방부제가 대부분이다. 이러한 화학방부제는 인체 피부에 장기적으로 사용되는 경우 피부 노화 촉진, 피부 자극, 발암 및 내분비계의 교란시킬 수 있는 문제점과 생분해성 결여 등의 문제점이 있어 인체에 안정하며, 환경친화적인 천연물 유래의 방부제의 개발이 필요하다.

[0005] 또한, 대표적인 방부제인 파라벤(paraben, p-hydroxybenzoic acid ester), 포름알데하이드 도너(formaldehyde-donor) 및 이소티아졸리논(isothiazolinone) 등은 피부 알러지, 환경 호르몬으로서의 작용 가능성(Andera Countti *et al., Contact Dermatitis,* 37:35, 1997; Edwin *et al.,Toxicology and Applied*

Pharmacology, 153:12, 1998) 및 지속적인 체내 축척으로 인한 급, 만성 독성 및 돌연변이 유발 등의 유해성이 널리 인식되고 있기 때문에 일부 생산기업들은 소비자의 요구에 대응하여 대체 방부제 개발에 노력을 하고 있다.

[0006] 이러한 문제점들로 인하여 제품의 안전성과 경제성이 우수한 천연방부제에 대한 연구가 지속되고 있으며 그 결과로 향신료, 정유, 한약재 등 동·식물기원의 추출물(한국등록특허 제10-09862490호, 제10-07876340호, 제10-07825990호, 제10-09814070호, 제10-07298310호, 제10-0822416호, 제10-09428300호, 한국공개특허 제2009-0025654호, 제2007-0080707호 및 제 2009-0075282호)과 박테리오신 같은 미생물 기원의 천연 항균성 물질이 보고되고 있다.

[0007] 그러나, 많은 업체들은 천연 소재의 비싼 가격과 천연 소재에 대한 가공 기술력의 미비 등으로 인하여 천연 소재를 방부제로 사용하지 못하고 있다. 또한, 천연활성 물질들의 경우, 대부분 색취, 안정성 저하, 좁은 항균스펙트럼, 제형상의 문제점, 재연성 등으로 인하여 상용화되지 못하고 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 여러 천연물 추출물 중 방부 효능을 가지는 천연물 추출물을 개발하고자 예의 노력한 결과, 연잎 추출물, 연꽃 추출물, 연씨 추출물 및 연근 추출물추출물을 혼합하여 사용하는 경우 각각의 천연 추출물에 비하여 미생물 생장 억제효과가 증가하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 천연 방부 및 항균 효과가 뛰어난 연잎 추출물, 연꽃 추출물, 연씨 추출물 및 연근 추출물을 함유하는 천연 복합 방부제 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 연잎 추출물, 연꽃 추출물, 연씨 추출물 및 연근 추출물을 함유하는 천연 복합 방부제 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 상기의 천연 복합 방부제 조성물을 방부성분으로 함유하는 화장품을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한. 상기의 천연 복합 방부제 조성물을 방부성분으로 함유하는 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 천연 복합 방부제 조성물은 인체에 독성이 없으며 뛰어난 방부효과 및 항균 효과를 가지고 있어, 합성 방부제 대신 화장품, 식품 및 의약품의 천연 방부제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 각각의 균주에 대한 미생물 생장 최소억제농도 평균값과 천연 복합 방부제 조성물의 미생물 생장 최소억제농도를 비교평가한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0016] 본 발명의 일 관점에서, 본 발명은 본 발명은 연잎 추출물, 연꽃 추출물, 연씨 추출물 및 연근 추출물을 함유하는 천연 복합 방부제 조성물에 관한 것이다.

[0017] 본 발명에 있어서, 연잎 추출물, 연꽃 추출물, 연씨 추출물 및 연근 추출물의 함량은 각각 0.01 내지 2.0 중량%인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0018] 상기의 천연 복합 방부제 조성물은 바람직하게는 연잎 추출물 0.2 중량%, 연꽃 추출물 0.2 중량%, 연씨 추출물 0.05 중량% 및 연근 추출물 0.05 중량%으로 구성될 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에서 건조된 연잎 100 g을 분쇄한 후 70%(v/v)에탄올 수용액으로 12시간 가온 환류추출하고 냉침 시키고, 1.2㎛ 투과 사이즈를 갖는 여과지로 여과하여 여과액을 수득하였다. 수득된 여과액을 감압 농축 및 감압 건조로 농축하여 7.54 g의 연잎 추출물을 얻었다.

[0020] 본 발명의 다른 실시예에서 건조된 연꽃 100 g을 분쇄한 후 70%(v/v)에탄올 수용액으로 12시간 가온 환류추출하고 냉침 시키고, 1.2㎛ 투과 사이즈를 갖는 여과지로 여과하여 여과액을 수득하였다. 수득된 여과액을 50℃ 이하에서 감압 농축 및 감압 건조로 농축하여 11.12 g의 연꽃 추출물을 얻었다.

[0021] 본 발명의 다른 실시예에서 건조된 연씨 100 g을 분쇄한 후 70%(v/v)에탄올 수용액으로 12시간 가온 환류추출하고 냉침 시키고, 1.2㎛ 투과 사이즈를 갖는 여과지로 여과하여 여과액을 수득하였다. 수득된 여과액을 50℃ 이하에서 감압 농축 및 감압 건조로 농축하여 6.32 g의 연씨 추출물을 얻었다.

[0022] 본 발명의 다른 실시예에서 건조된 연근 100 g을 분쇄한 후 70%(v/v)에탄올 수용액으로 12시간 가온 환류추출하고 냉침 시키고, 1.2㎛ 투과 사이즈를 갖는 여과지로 여과하여 여과액을 수득하였다. 수득된 여과액을 50℃ 이하에서 감압 농축 및 감압 건조로 농축하여 4.5 g의 연근 추출물을 얻었다.

[0023] 상기 연잎 추출물, 연꽃 추출물, 연씨 추출물 및 연근 추출물의 항균력을 측정하기 위해 고체 배양 희석법을 이용하여 최소저해 농도를 측정한 결과, 연잎 추출물의 경우, 그람 양성균인 황색포도상구균과 대장균에 대해 0.05 중량%의 농도에서 우수한 항균활성을 나타냈으나, 그람 양성균인 녹농균과 캔디다효모의 경우, 0.2 중량%의 농도에서 우수한 항균활성을 나타내었으며, 흑국균에 대해서는 상대적으로 약한 항균활성을 나타내었다. 또한, 연꽃 추출물의 경우, 그람 음성균인 대장균과 그람양성세균인 황색포도상 구균에 대해서는 0.1 중량%의 농도에서도 우수한 항균활성을 나타냈으며, 녹농균과 흑국균에 대해서는 0.2 중량%의 농도에서 항균활성을 보였으나, 캔디다균에 대해서는 상대적으로 낮은 0.5 중량%에서 항균활성을 나타냈다. 연씨 추출물의 경우, 그람양성세균인 포도상구균에서 0.01 중량%에서 항균활성을 나타내었으며 대장균과 녹농균은 0.2 중량%에서 항균 활성을 보였으나, 캔디다와 흑국균에 대해서는 1.0 중량%의 농도에서까지 항균활성이 나타나지 않았다. 연근 추출물의 경우 황색포도상구균과 대장균, 녹농균에 대해서 0.5 중량% 농도에서 항균활성을 보였으나, 캔디다와 흑국균에 대해서는 1.0 중량%의 농도에서까지 항균활성이 나타나지않았다 (표 1).

[0024] 본 발명의 다른 실시예에서 상기 추출물들을 다양한 비율로 혼합하여 천연 복합 방부제 조성물을 제조하였으며 (표 2), 제조된 천연 복합 방부제의 방부력을 확인하기 위해 원형여과지법(paper disc method) 및 미생물 생장 최소억제 농도 평가를 수행한 결과, 천연 복합 방부제는 여러 조합에서 방부 활성을 나타냈으며, 연잎 추출물 0.2 중량%, 연꽃 추출물 0.2 중량%, 연씨 추출물 0.05 중량% 및 연근 추출물 0.05 중량%로 혼합된 천연 복합 방부제 조성물이 우수한 조합임을 확인할 수 있었다 (표 3 및 표 4).

[0025] 상기의 천연 복합 방부제 조성물에 함유된 연잎 추출물, 연꽃 추출물, 연씨 추출물 및 연근 추출물은 항균 및 방부효능은 이미 보고가 되어있으나, 본 발명의 일부 실시예와 같이 각각의 추출물들은 그람양성균, 그람음성균, 진균류 모두에서 뛰어난 항균활성을 보이지 못하므로 사용범위에 제한성이 있다. 하지만 본 발명의 천연 복합 방부제 조성물은 그람양성균, 그람음성균 및 진균류 모두에서 뛰어난 항균활성으로 보이며 각각의 균주에 대한 미생물 생장 최소억제농도 평균값과 시험예 5를 비교한 결과, 시험예 5의 비율로 혼합하여 사용한 경우 각각의 평균값보다 50~70% 감소된 미생물 생장 최소억제 농도 값을 보여 뛰어난 미생물 생장 억제 효과를 확인할 수 있었다 (표 5 및 도 1). 즉, 각각의 추출물을 따로 사용하였을 때보다 본 발명에서와 같이 연잎 추출물, 연꽃 추출물, 연씨 추출물 및 연근 추출물을 일정한 비율로 혼합하여 사용하였을 때 상승적인 미생물 생장 억제 효과(synergy effect)를 보이는 것을 확인하였다.

[0026] 본 발명의 천연 복합 방부제 조성물의 독성을 확인하기 위해 상기 조합의 복합 천연 방부제 조성물을 이용하여 세포 독성을 확인한 결과, 5 중량%의 천연 복합 방부제 조성물을 처리하였을 때, HaCaT 세포 및 HDF-N 세포에서 각각 90.2% 및 92.1%의 생존율을 보이는 것을 확인하였으며, 천연 복합 방부제 조성물의 방부 활성이 1 중량% 내외에서 효과적으로 나타나므로 화장용 조성물, 식품 및 의약품 제형에 안전하게 사용할 수 있음을 확인하였다 (표 6 및 표 7).

[0027] 본 발명의 다른 관점에서, 본 발명은 상기의 천연 복합 방부제 조성물을 방부성분으로 함유하는 화장품에 관한 것이다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 화장품의 천연 복합 방부제 조성물의 함량은 0.001~10 중량%인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0029] 본 발명의 다른 실시예에서 상기의 다양한 비율로 혼합된 천연 복합 방부제 조성물을 이용하여 크림 제형을 제조하였으며(표 8), 천연 복합 방부제를 포함한 제형의 방부력을 확인한 결과,연잎 추출물 0.2 중량%, 연꽃 추출물 0.2 중량%, 연씨 추출물 0.05 중량% 및 연근 추출물 0.05 중량%로 혼합된 천연 복합 방부제 조성물을 이용한 제형에서 우수한 방부 효능을 가지는 것을 확인할 수 있었다 (표 9).

[0030] 본 발명의 천연 복합 방부제를 포함한 제형의 피부자극 정도를 확인하기 위해 상기 조합의 천연 복합 방부제를 포함한 제형을 이용하여 건강한 성인 남녀 20명을 대상으로 피부자극 실험을 진행한 결과, 대부분 자극이 없거나 경미한 정도였으며, 화학성분의 방부제가 포함된 크림보다 평균 자극지수가 낮은 것을 확인할 수 있었다 (표 10 및 표 11).

[0031] 또한, 다양한 비율로 혼합된 천연 복합 방부제 조성물을 이용하여 제조된 크림 제형의 안정성을 확인한 결과, 로션이 분리되는 과정인 크리밍, 응집과 같은 현상은 관찰되지 않았으며, 로션 성분의 산화에 의한 특이취도 나타나지 않는 것을 확인하였다 (표 12).

[0032] 본 발명의 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기의 천연 복합 방부제 조성물을 방부성분으로 함유하는 식품에 관한 것이다.

[0033] 상기의 천연 복합 방부제 조성물은 식품 및 의약품에 보존제로 사용될 수 있다.

[0034] 상기 천연 복합 방부제 조성물은 연잎 추출물, 연꽃 추출물, 연씨 추출물 및 연근 추출물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0035] 본 발명의 천연 복합 방부제 조성물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물로 제조되는 화장품은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조할 수 있으며, 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다.

[0036] 본 발명의 천연 복합 방부제 조성물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물의 제형으로는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형으로 제조될 수 있고, 통상적인 화장료 제조법에 적용시킬 수 있다. 구제척으로 액상, 크림상, 페이스트상 및 고체상등 다양한 성상으로 적용이 가능하며, 이들 각 제형에 적합하고 당업계에 주지된 각종의 통상적인 보조제와 담체를 포함할 수 있다.

[0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0038] **실시예 1. 연잎 추출물의 제조**

[0039] 건조 중량 100 g의 분쇄한 연잎을 70% (V/V) 에탄올 수용액으로 12시간 가온 환류추출하고 냉침한 후, 1.2㎛ 투과사이즈를 갖는 여과지로 여과하였다. 이 여과된 추출액을 50℃이하에서 감압농축한 후 감압건조기를 이용해 완전히 건조시켜 연잎 추출물 7.54 g을 수득하였다.

[0040] **실시예 2. 연씨 추출물의 제조**

[0041] 건조 중량 100 g의 분쇄한 연꽃을 70% (V/V) 에탄올 수용액으로 12시간 가온 환류추출하고 냉침한 후, 1.2㎛ 투과사이즈를 갖는 여과지로 여과하였다. 이 여과된 추출액을 50℃이하에서 감압농축한 후 감압건조기를 이용해 완전히 건조시켜 연꽃 추출물 11.12 g을 수득하였다.

[0042] **실시예 3. 연씨 추출물의 제조**

[0043] 건조 중량 100g의 분쇄한 연씨를 70% (V/V) 에탄올 수용액으로 12시간 가온 환류추출하고 냉침한 후, 1.2㎛ 투과사이즈를 갖는 여과지로 여과하였다. 이 여과된 추출액을 50℃이하에서 감압농축한 후 감압건조기를 이용해 완전히 건조시켜 연씨 추출물 6.32g을 수득하였다.

[0044] **실시예 4 연근 추출물의 제조**

[0045] 건조 중량 100g의 분쇄한 연근을 70% (V/V) 에탄올 수용액으로 12시간 가온 환류추출하고 냉침한 후, 1.2㎛ 투과사이즈를 갖는 여과지로 여과하였다. 이 여과된 추출액을 50℃이하에서 감압농축한 후 감압건조기를 이용해 완전히 건조시켜 연근 추출물 4.5g을 수득하였다.

[0046] **실험예 1. 미생물 생장 최소 억제 농도 측정**

[0047] 상기 추출물들의 항균 효과를 측정하기 위하여 최소 저해농도(Minimum Inhibition Concentration, MIC)를 측정하여 항균활성을 조사하였다. 항균 효과를 측정하기 위하여 사용한 균주로는 그람양성균으로 포도상구균(*Staphylococcusaureus* ATCC 6538P), 그람음성균으로 대장균(*Escherichia coli* ATCC 8739), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), 효모로는 캔디다 효모(*Candida albicans* ATCC 10231), 사상균으로 흑국균(*Aspergillus niger* ATCC22343)을 한국생명공학연구원 생물자원센타(KCTC, Korea)로부터 분양받아 사용하였다.

[0048] 각각의 균주는 영양배지(Nutrient Broth) 용액을 제조하여 121℃에서 15분간 멸균한 후 각각의 배양된 균주 1백금이를 영양배지 용액 (10mℓ)에 접종하고, 진탕배양기(shaking incubator)에서 24시간 배양하여 항균실험을 위한 균주를 준비하였다.

[0049] 미생물 균주의 성장을 억제하는 항생물질의 최소억제농도를 측정하기 위해, 멸균된 배지에 배양된 균주를 세균은 1 X 10^6 cfu/mℓ, 진균은 1 X 10^5 cfu/mℓ이 되도록 각각을 접종하여 세균의 경우 35℃에서 2일간 배양하고, 진균류의 경우 25℃에서 5일간 배양하여 이를 대조군으로 하여 관찰하였다.

[0050] 한편, 각각의 추출물은 0.01 내지 1 중량%가 되도록 배지에 첨가하여 제조한 후 제균하여 대조군과 마찬가지로 세균은 1 X 10^6 cfu/mℓ, 진균은 1 X 10^5 cfu/mℓ이 되게 각각 접종하여 세균의 경우 35℃에서 2일간 배양하고, 진균류의 경우 25℃에서 5일간 배양하여 이를 실험군으로 하여 관찰하였다.

[0051] 배양이 끝난 대조군과 실험군의 배지 용액에 대해서 각 균주의 증식 유무를 확인하기 위하여 무균공간에서 시료를 약 300㎕씩 취하여 멸균된 96웰 마이크로플레이트에 분주하고 분광 광도계(spectrophotometer)를 이용하여 650nm에서 흡광도를 측정하여 미생물의 증식을 확인하였고 대조군과 비교하여 각각의 균주에 대하여 낮은 증식도를 보인 최소 농도를 측정하여 이를 최소저해농도(Minimum inhibitory concentration,MIC)로 하였다.

표 1

[0052] 추출물의 미생물 생장 최소 억제 농도 측정

구분	최소저해농도 (중량%)				
	S.aureus	E. coli	P. aeruginosa	C. albicans	A.niger
연잎 추출물	0.05	0.05	0.2	0.2	0.5
연꽃 추출물	0.1	0.1	0.2	0.5	0.2
연씨 추출물	0.01	0.2	0.2	>1.0	>1.0
연근 추출물	0.5	0.5	0.5	>1.0	>1.0

[0053] 연잎 추출물의 경우, 그람 양성균인 황색포도상구균과 대장균에 대해 0.05 중량%의 농도에서 우수한 항균활성을 나타냈으나, 그람 양성균인 녹농균과 캔디다효모의 경우, 0.2 중량%의 농도에서 우수한 항균활성을 나타내었으

며, 흑국균에 대해서는 상대적으로 약한 항균활성을 나타내었다.

[0054] 연꽃 추출물의 경우, 그람 음성균인 대장균과 그람양성세균인 황색포도상 구균에 대해서는 0.1 중량%의 농도에서도 우수한 항균활성을 나타냈으며, 녹농균과 흑국균에 대해서는 0.2 중량%의 농도에서 항균활성을 보였으나, 캔디다균에 대해서는 상대적으로 낮은 0.5 중량%에서 항균활성을 나타냈다.

[0055] 연씨 추출물의 경우, 그람양성세균인 포도상구균에서 0.01 중량% 에서 항균활성을 나타내었으며 대장균과 녹농균은 0.2 중량%에서 항균 활성을 보였으나, 캔디다와 흑국균에 대해서는 1.0 중량%의 농도에서까지 항균활성이 나타나지 않았다.

[0056] 연근 추출물의 경우 황색포도상구균과 대장균, 녹농균에 대해서 0.5 중량% 농도에서 항균활성을 보였으나, 캔디다와 흑국균에 대해서는 1.0 중량%의 농도에서까지 항균활성이 나타나지 않아 연씨 추출물 및 연근 추출물은 효모 및 곰팡이 계열에는 항균효과가 약한 것을 알 수 있었다 (표 1).

[0057] **실시예 5. 천연 복합 방부제의 제조**

[0058] 본 발명의 천연 복합 방부제 조성물의 방부 효과를 확인하기 위해 다양한 비율로 혼합된 천연 복합 방부제 조성물을 시험예 1~6와 같이 제조하였다 (표 2).

표 2

[0059] 다양한 비율로 혼합된 천연 복합 방부제 조성물

번호	성분	시험예 1	시험예 2	시험예 3	시험예 4	시험예 5	시험예 6
1	연잎 추출물	0.05	0.05	0.05	0.2	0.2	0.2
2	연꽃 추출물	0.05	0.2	0.2	0.05	0.2	0.05
3	연씨 추출물	0.2	0.05	0.2	0.2	0.05	0.05
4	연근 추출물	0.2	0.2	0.05	0.05	0.05	0.2

[0060] **실험예 2. 다양한 비율로 혼합된 천연 복합 방부제 조성물의 방부활성 측정**

[0061] 상기 실시예 5에서 제조한 시험예 1~6의 천연 복합 방부제 조성물의 방부활성을 측정하기 위해 천연 복합 방부제의 최종 농도는 0.01%가 되게 하여 실험을 수행하였다. 시험 방법으로 원형여과지법(paper disc method)을 이용하였으며, 사용한 균주로는 그람양성균으로 포도상구균(*Staphylococcusaureus,* ATCC 6538P), 그람음성균으로 대장균(*Escherichia coli,* ATCC 8739), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa,* ATCC 9027), 효모로는 캔디다 효모(*Candida albicans,* ATCC 10231), 사상균으로 흑국균(*Aspergillus niger,* ATCC22343)을 사용하였다.

[0062] 배양한 각각의 균주를 응고된 평판 배지 위에 약 100㎕를 가하여 평판배지에 분주하고 스프레더(spreader)를 이용하여 균일하게 도말 하였다. 측정하고자 하는 각 추출물을 지름이 10㎜인 페이퍼디스크(paper disk)에 약 60㎕를 흡수시킨 후 용매를 건조시키고 균주가 도말된 배지 표면상에 밀착시켜 25℃ ~ 35 ℃조건의 배양기에서 48시간 이상 배양 후 페이퍼디스크 주변에 형성된 투명환 (clear zone)의 크기를 측정하여 항균효과를 확인하였다. 그 결과, 천연 복합 방부제는 여러 조합에서 방부 활성을 나타냈으며, 시험예 5의 천연 복합 방부제 조성물이 우수한 조합임을 확인할 수 있었다 (표 3).

표 3

[0063] 다양한 비율로 혼합된 천연 복합 방부제 조성물의 방부활성 측정

미생물균주	S.aureus		E. coli		P. aeruginosa		C. albicans		A.niger		평균 직경
농도(%)	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	
시험예 1	11	13	10	14	14	16	9	12	10	13	12.2
시험예 2	13	15	12	16	14	15	13	17	11	19	14.5
시험예 3	09	15	11	16	13	15	10	14	12	13	12.8
시험예 4	13	16	12	16	11	16	11	12	12	15	13.4
시험예 5	19	21	18	22	17	19	16	20	14	17	18.3
시험예 6	11	13	10	13	12	15	10	13	11	14	12.2

[0064] **실험예 3. 천연 복합 방부제의 미생물 생장 최소억제농도 평가**

[0065] 천연 복합 방부제의 미생물 생장 최소억제 농도 평가(minimum Inhibition Concentration: MIC)를 측정하기 위해 실험예 1에서와 같은 방법으로 실험을 진행하였다. 그 결과, 시험예 1~6에서 전반적으로 우수한 항균활성을 나타내는 것을 확인하였으며, 시험예 5의 경우 그람 양성균인 황색 포도상 구균에서 0.05 중량%의 농도에서 우수한 항균활성을 나타내었으며, 특히 그람 음성균인 대장균과 녹농균에서 0.1 중량% 농도와 0.2 중량%농도에서 우수한 항균활성을 나타내었다. 또한 캔디다균과 흑국균에서도 0.2 중량% 농도에서 우수한 항균활성을 나타내었다 (표 4).

[0066] 또한, 각각의 균주에 대한 미생물 생장 최소억제농도 평균값과 시험예 5를 비교한 결과, 시험예 5의 비율로 혼합하여 사용한 경우 각각의 평균값보다 70~80% 감소된 미생물 생장 최소억제 농도 값을 보여 뛰어난 미생물 생장 억제 효과를 확인할 수 있었다 (표 5 및 도 1). 즉, 각각의 추출물을 따로 사용하였을 때보다 본 발명에서와 같이 연잎 추출물, 연꽃 추출물, 연씨 추출물 및 연근 추출물을 일정한 비율로 혼합하여 사용하였을 때 상승적인 미생물 생장 억제 효과(synergy effect)를 보이는 것을 확인하였다.

표 4

[0067] 천연 복합 방부제의 미생물 생장 최소억제농도 평가

구분	최소저해농도 (중량%)				
	S.aureus	E. coli	P. aeruginosa	C. albicans	A.niger
시험예 1	0.1	0.2	0.5	1.0	1.0
시험예 2	0.2	0.2	0.2	0.5	0.2
시험예 3	0.05	0.1	0.2	0.5	0.5
시험예 4	0.05	0.1	0.2	0.5	0.5
시험예 5	0.05	0.1	0.2	0.2	0.2
시험예 6	0.2	0.1	0.5	0.5	0.5

표 5

[0068] 각 추출물과 시험예 5의 미생물 생장 최소억제농도 비교 평가

구분	최소저해농도 (중량%)				
	S.aureus	E. coli	P. aeruginosa	C. albicans	A.niger
추출물 평균	0.165	0.213	0.275	0.675	0.675
시험예 5	0.05	0.1	0.2	0.2	0.2

[0069] **실험예 5. 천연 복합 방부제의 세포독성 평가**

[0070] 천연 복합 방부제의의 독성을 확인하기 위해, 상기 실험예에서 가장 방부활성이 높은 시험예 5을 이용하여 HaCaT cell과 HDF-N cell에서의 세포독성을 측정하였다. HaCaT cell은 96 well plate에 well 당 5×10^4 cell의 농도로, HDF-N cell은 96 well plate에 well 당 6×10^3 cell의 농도로 분주한 다음 세포 배양조건에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 DPBS로 세척한 뒤, 12시간의 기아상태를 유지시킨 후 검액 및 새로운 배지(media supplement 제외)를 넣고, 24시간 배양하였다. 또 검액 및 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 세포의 생존율을 측정하기 위해 WST-1 반응액을 supplement가 제외된 배지에 1/10로 희석하고 이를 각 웰당 100 ㎕씩 처리하여 1시간 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0071] 그 결과, HaCaT 세포 및 HDF-N 세포에서 각각 90.2% 및 92.1%의 생존율을 보이는 것을 확인하였으며, 천연 복합 방부제 조성물의 방부 활성이 1 중량% 내외에서 효과적으로 나타나므로 화장용 조성물, 식품 및 의약품 제형에 안전하게 사용할 수 있음을 확인하였다 (표 6 및 표 7).

표 6

[0072] 천연 복합 방부제 조성물의 HaCaT cell에 대한 세포독성 평가

시료	대조군	실험군 [HaCaT cell에 대한 세포독성]					
농도	0	0.01	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0
% Control	100.0	102.2	100.5	99.1	96.5	92.1	90.2

표 7

[0073] 천연 복합 방부제 조성물의 HDF-N cell에 대한 세포독성 평가

시료	대조군	실험군 [HDF-N cell에 대한 세포독성]					
농도	0	0.01	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0
% Control	100.0	101.3	98.3	96.4	93.2	92.4	92.1

[0074] **실시예 6. 다양한 비율로 혼합된 천연 복합 방부제를 함유하는 크림 제형 제조**

[0075] 본 발명의 천연 복합 방부제 조성물을 함유하는 화장료의 방부력 시험을 행하기 위해 다양한 비율로 혼합된 천연 복합 방부제 조성물이 함유된 크림 제형을 비교예 1 및 시험예 1~6와 같이 제조하였다 (표 8).

표 8

[0076] 다양한 비율로 혼합된 천연 복합 방부제를 함유하는 크림 제형 제조

성분	비교예 1	시험예 1	시험예 2	시험예 3	시험예 4	시험예 5	시험예 6
정제수	잔량	잔량	잔량	잔량	잔량	잔량	잔량
글리세린	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
부틸렌글라이콜	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
카보머	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
잔탄검	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
세테아릴알코올	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
글리세릴스테아레이트	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
베헤닐알코올	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
수첨레시틴	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
프로필파라벤	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
미네랄 오일	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
식물성 스쿠알란	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
세틸에칠헥사노에이트	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
알지닌	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
연잎 추출물	-	0.05	0.05	0.05	0.2	0.2	0.2
연꽃 추출물	-	0.05	0.2	0.2	0.05	0.2	0.05
연씨 추출물	-	0.2	0.05	0.2	0.2	0.05	0.05
연근 추출물	-	0.2	0.2	0.5	0.05	0.05	0.2
메틸파라벤	0.2	-	-	-	-	-	-

[0077] **실험예 5. 천연 복합 방부제를 함유한 제형의 방부 효과 확인**

[0078] 비교예 1과 시험예 1~6에 대한 방부 효과를 미국화장품공업협회(The Cosmetic, Toility and Fragrance Association, Inc., 이하 CTFA)의 미생물 가이드라인(microbiology Guidelines)의 시험법을 사용하여 행하였다. 사용한 균주로는 그람양성균으로 포도상구균(*Staphylococcusaureus*, ATCC 6538P), 그람음성균으로 대장균(*Escherichia coli*, ATCC 8739), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 9027), 효모로는 캔디다 효모(*Candida albicans*, ATCC 10231), 사상균으로 흑국균(*Aspergillus niger*, ATCC22343)을 사용하였다. 비교예와

시험예들이 10ｇ씩 담겨져 있는 병에 세균 3종(*E.coli, P. aeruginosa, S. aureus*)과 진균 2종(*C. albicans, A. niger*)을 혼합한 현탁액을 각각 1×10^{6}cfu/ｇ, 1×10^{5}cfu/ｇ이 되도록 접종한 다음, 25℃에서 보관 후 4시간, 1일, 2일, 3일, 7일 간격으로 무균 조작 하에서 1g의 샘플을 채취하여 희석액으로 적절히 희석하고 세균은 뉴트리언트 아가(Nutrient agar, Difco), 진균은 포테이토 덱스트로스 아가(potato dextrose agar, Difoc) 배지에 깔아 각각 35℃, 25℃에서 24 ~ 72시간 동안 배양 후 계수하였다. 그 결과, 시험예 5의 복합 천연 방부제를 함유한 크림의 방부 효과는 종래의 합성 방부제로 사용되는 비교예와 비슷하거나 뛰어난 효과를 보이므로(표 9), 본 발명의 천연 복합 방부제 조성물을 매우 우수한 방부 효과를 가지는 것을 확인하였다.

표 9

[0079] 천연 복합 방부제를 함유한 제형의 방부 효과 확인

	균종	D-value (hr)
비교예 1	세균사멸	4.2
	진균사멸	6.5
시험예 1	세균사멸	6.2
	진균사멸	9.6
시험예 2	세균사멸	6.5
	진균사멸	7.5
시험예 3	세균사멸	5.0
	진균사멸	8.2
시험예 4	세균사멸	4.6
	진균사멸	8.0
시험예 5	세균사멸	4.2
	진균사멸	5.1
시험예 6	세균사멸	5.6
	진균사멸	7.1

[0080] **실험예 6. 천연 복합 방부제의 피부자극 실험**

[0081] 천연 복합 방부제의 피부자극 실험을 위해 상기 실시예 6에서 시행한 크림 제형의 시험예 5의 천연방부제 조성으로 피부자극 실험을 진행하였다.

[0082] 건강한 성인 남녀 20명을 대상으로 CTFA 가이드라인 (The Cosmetic, Toility and Fragrance Association, Inc. Washington D.C., 20036, 1991)에 따라 실시하였다. 핀 챔버(finn chamber)에 시료 및 용액 15㎎/15㎕를 적하시킨 후, 이것을 시험 부위인 인체의 팔에 얹어 테이프로 고정시켰다. 이어서 24시간 동안 첩포 한 후, 첩포를 제거하고 다시 2시간 경과 한 다음 시험 부위의 피부 반응을 다음 기준에 따라 판정한 결과, 대부분 자극이 없거나 경미한 정도였으며, 화학성분의 방부제가 포함된 크림보다 평균 자극지수가 낮은 것을 확인할 수 있었다(표 10 및 표 11).

표 10

[0083] 피부결과에 따른 판정기준

구분	점수	판정기준
자극없음	0	무반응
경미한 자극	0.5	희미하거나 가벼운홍반
	1	명확한 홍반이나 약한 홍반
강한 자극	2	구진 및 부종을 동반한 뚜렷한 홍반
	3	심한 홍반이며 수포가 형성

표 11

[0084] 천연 복합 방부제의 피부자극 실험

구분	자극발생인원			평균자극지수
	자극없음	경미한 자극	강한자극	
시험예 5 (0.5% 방부처방크림)	19	1	0	0.025
1% 방부처방 크림	18	2	0	0.05
대조군 (무방부크림처방)	20	0	0	0

[0085] **실험예 7. 제형의 안정성 실험**

[0086] 천연 복합 방부제 조성물을 함유하는 실시예 6의 시험예 1~6의 크림과 천연 복합 방부제조성물을 함유하지 않은 크림(대조군)을 12주 동안 온도(0, 25, 37, 45, 일광)를 다르게 하여 저장한 후 크림의 육안관찰 및 냄새들의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 대조군과 시험예 1~6을 함유한 크림 모두 12주 동안 로션의 분리가 되는 과정인 크리밍 및 응집과 같은 현상은 관찰되지 않았으며, 로션 성분의 산화에 의한 특이취도 나타나지 않았다 (표 12).

표 12

[0087] 온도 조건에 따른 제형의 안정성 실험

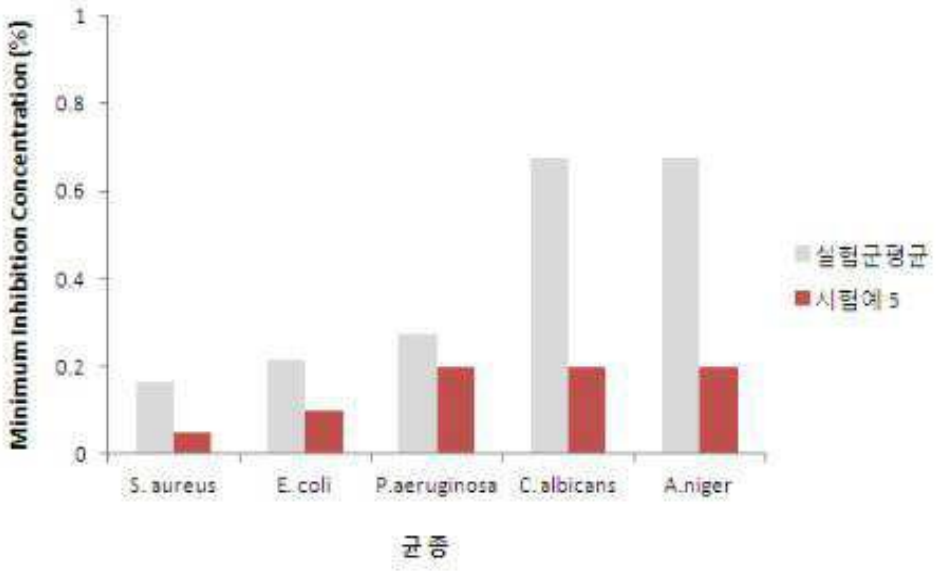
구 분	온도 조건에 따른 제형의 안정성				
	0℃	25℃	37℃	45℃	일광
비교예 1	0	0	0	0	0
시험예 1	0	0	0	0	0
시험예 2	0	0	0	0	0
시험예 3	0	0	0	0	0
시험예 4	0	0	0	0	0
시험예 5	0	0	0	0	0
시험에 5	0	0	0	0	0

[0088] 0: 변화없음, 2: 조금 변화, 4: 심하게 변화(변취,변색,분리)

[0089] 이상으로, 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1


Minimum Inhibition Concentration (%)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
S. aureus
E. coli
P.aeruginosa
C.albicans
A.niger
균종
실험군평균
시험예 5