



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0092625
(43) 공개일자 2020년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) A61K 8/60 (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A61K 8/606 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0009748
(22) 출원일자 2019년01월25일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
김중승
서울특별시 양천구 목동동로 100, 1328동 1303호
(신정동, 목동신시가지아파트13단지)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 4 항

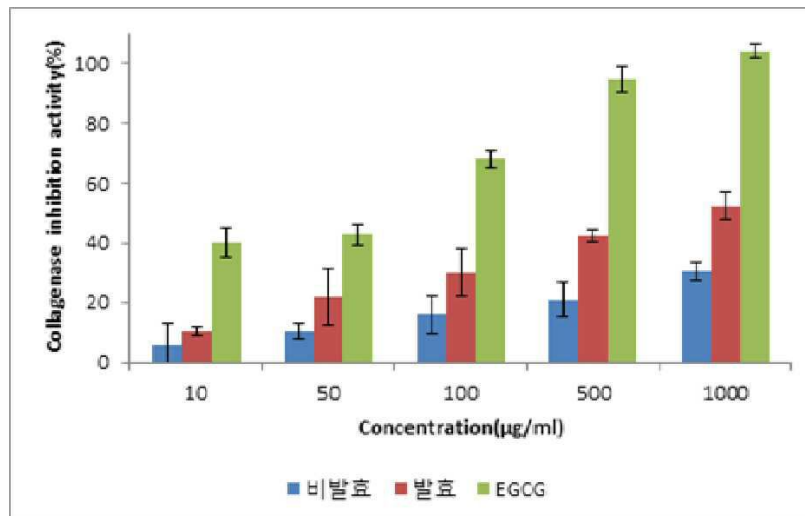
(54) 발명의 명칭 햄프시드의 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 햄프시드의 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장품 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 항산화, 주름개선, 항염증 효과를 가지는 햄프시드의 발효 추출물을 포함하는 화장품 조성물에 관한 것이다.

본 발명자들은 피부 노화 방지 및 항염 등의 기능을 가진 천연물을 연구하던 중 햄프시드를 발효시켜 얻어진 햄프시드 발효 추출물이 라디칼을 효과적으로 제거하고 콜라게나아제의 활성을 저해하며 일산화질소의 생성을 저해하는 것을 확인하였는바, 상기 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 피부 주름 개선 및 항염 용도로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A61K 8/675 (2013.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

A61K 2800/522 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1425122761

부처명 중소벤처기업부

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 2017년도 산학협력 기술개발사업 첫걸음(3차, 본선접수)

연구과제명 햄프시드 발효 추출물을 활용한 에센스 개발

기 여 율 1/1

주관기관 미라클바이오

연구기간 2017.12.01 ~ 2018.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

햄프시드 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는, 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화장품 조성물은 주름 개선용, 항산화능 개선용 및 항염증능 개선용 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 화장품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화장품 조성물은 화장수, 에센스, 파운데이션, 파우더, 로션, 크림, 팩, 젤, 연고, 패치, 분무제, 마스크 시트 및 세정제 중 어느 하나의 제형인 화장품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

진생베리 추출물, 나이아신아마이드 및 아데노신을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 햄프시드의 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장품 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 항산화, 주름개선, 항염증 효과를 가지는 햄프시드의 발효 추출물을 포함하는 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부 노화는 비가역적인 현상으로서 인간 개체의 전체적인 노화와 평행하게 진행되는 형태적, 생화학적, 생리학적 변화과정이다. 신체의 다른 장기나 기관의 노화 현상과는 다르게 피부 노화는 유전적으로 결정되어 있는 노화의 과정인 내인성 노화(Intrinsic aging) 이외에도 자외선이나 흡연 및 기타 생활 습관과 연관되는 외적 인자들에 의한 외인성 노화(Extrinsic aging) 과정을 포함한다.

[0003] 외인성 및 내인성 노화에 의한 피부 노화 현상은 일광탄력섬유증(solar elastosis)이나 색소이상증(dyschromatosis) 및 거칠기 증가, 피부 주름 형성 등의 임상 양상으로 나타난다. 피부 미용 영역의 항노화 치료는 이와 같은 피부 노화의 개별 현상들에 대한 개선에 그 초점이 맞춰져 있는데, 의학적 기술이나 수술적 치료 외에도 최근 화장품 영역에서 주로 기능성 제품들의 항노화 기전도 그 맥락을 같이 한다고 볼 수 있다.

[0004] 화장품에 의한 주름 개선 효과는 보습인자들에 의한 일시적 효과 이외에도 다양한 유효성분들에 의한 진피층 개선 효과를 그 기전으로 하며 대표적인 주름 개선 화장품의 원료들인 레티놀, 비타민C, EGF 등의 성장인자 성분들은 인간 진피 섬유아세포의 콜라겐 신생성을 증가시킴으로써 주름 개선 효능을 보이는 것으로 잘 알려져 있다.

[0005] 나아가 천연물 중 아마씨 추출물을 주성분으로 하는 화장료 조성물 제조방법에 관한 연구는 시도되었으나(한국 등록특허 제10-1687899호) 아직 햄프시드 발효 추출물 또는 상기 발효 추출물의 응용에 관한 연구는 부족한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 피부 노화 방지 및 항염 등의 기능을 가진 천연물을 연구하던 중 햄프시드를 발효시켜 유리 아미노산이 증가한, 햄프시드의 발효 추출물이 라디칼을 제거하고 콜라게나아제의 활성 저해하며 일산화탄소를 제거하는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0007] 본 발명은 햄프시드 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0009] 본 발명은 햄프시드 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는, 화장료 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 구현 예로 상기 조성물은 주름 개선용, 항산화능 개선용 및 항염증능 개선용 중 어느 하나 이상의 용도일 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 구현 예로 상기 조성물은 화장수, 에센스, 파운데이션, 파우더, 로션, 크림, 팩, 젤, 연고, 패치, 분무제, 마스크 시트 및 세정제 중 어느 하나의 제형일 수 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 구현 예로 상기 조성물은 진생베리 추출물, 나이아신아마이드 및 아데노신을 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0013] 본 발명자들은 피부 노화 방지 및 항염 등의 기능을 가진 천연물을 연구하던 중 햄프시드를 발효시켜 얻어진 햄프시드 발효 추출물이 라디칼을 효과적으로 제거하고 콜라게나아제의 활성을 저해하며 일산화질소의 생성을 저해하는 것을 확인하였는바, 상기 발효 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 피부 주름 개선 및 항염 용도로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 *Lactobacillus casei*를 접종하기 전과 후의 햄프시드 추출물에서의 유산균 수를 나타낸 것이다.

도 2는 햄프시드 발효 추출물 제조 공정을 나타낸 것이다.

도 3은 37종의 지방산 메틸 에스테르 표준물질의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 4는 유리 아미노산을 추출 분석하기 위한 조건을 나타낸 것이다.

도 5는 16종의 아미노산 표준용액의 크로마토그램을 나타내는 것이다.

도 6은 발효 전 햄프시드 추출물 중 유리 아미노산 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 7은 발효 후 햄프시드 추출물 중 유리 아미노산 크로마토그램을 나타내는 것이다.

도 8은 발효 전과 후의 햄프시드 추출물 중 유리 아미노산 크로마토그램을 나타내는 것이다.

도 9는 발효 전과 후의 햄프시드 추출물의 DPPH radical 소거능 측정 결과를 나타내는 것이다.

도 10은 발효 전과 후의 햄프시드 추출물의 ABTS radical 소거능 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 발효 전과 후의 햄프시드 추출물의 Collagenase 저해 활성을 나타낸 것이다.

도 12는 발효 전과 후의 햄프시드 추출물의 Elastase 저해 활성을 나타낸 것이다.

도 13은 발효 전과 후의 햄프시드 추출물의 Tyrosinase 저해 활성을 나타낸 것이다.

도 14는 발효 전과 후의 햄프시드 추출물의 독성실험 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 발효 전과 후의 햄프시드 추출물의 Nitric oxide(NO) 생성 저해 능력을 확인한 결과를 나타낸 것이다,

도 16은 시료를 인체에 적용하였을 때 주름 개선 지수 변화 추이를 나타낸 것이다.

도 17a 내지 17v는 시료를 인체에 적용한 피험자 임상사진을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명자들은 피부 노화 방지 및 항염 등의 기능을 가진 천연물을 연구하던 중 햄프시드를 발효시켜 유리 아미노산이 증가한, 햄프시드의 발효 추출물이 라디칼을 제거하고 콜라게나아제의 활성 저해하며 일산화탄소를 제거하는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0017] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서의 햄프시드 발효 추출물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 색소 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.

[0018] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 스프레이, 에멀전, 다중 에멀전 및 액정 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 영양 크림, 수렴 화장수, 유연 화장수, 로션, 에센스, 영양 젤 또는 마사지 크림의 제형으로 제조될 수 있다.

[0019] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트 겜, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0020] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 토스, 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.

[0021] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 가용화제 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.

[0022] 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 겜등이 이용될 수 있다.

[0023] 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.

[0024] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

실시예 1. 실험재료 및 방법

1-1. 햄프시드

[0029] 본 발명에서 사용한 원료는 성분 및 품질이 양호하고 구매가 용이한 캐나다산 햄프시드로 선택하였다. 상기 햄

프시드는 미생물 및 중금속 시험의 규격에 적합하고, 환각 물질인 THC(Tetrahydrocannabinol)가 함유된 겉껍질을 제거한 것이다.

[0031] 1-2. 일반성분분석

[0032] 햄프시드에 대한 영양성분 분석은 식품공전 실험방법에 따라 하기의 방법으로 진행하였다.

[0034] 가. 열량

[0035] 식품의 에너지는 에트워터 계수를 사용하여 검체 100 g 중의 조단백질, 조지방 및 탄수화물 또는 당질의 함량에 단백질 4, 지방 9, 당질 4의 계수를 곱하여 각각의 에너지를 킬로칼로리(Kcal) 단위로 산출하고 그 총계로 나타낸다. 단위는 킬로칼로리 또는 킬로줄(KJ)로 하고 킬로칼로리 단위에서 킬로줄 단위로의 환산은 1 Kcal를 4.184 KJ로 환산하였다(식품공전 제8. 일반시험법 2. 식품성분시험법 2.1 일반성분시험법 2.1.6 열량의 계산).

[0037] 나. 탄수화물

[0038] 탄수화물의 함량은 식품 중량에서 조단백질, 조지방, 수분 및 회분의 함량을 뺀 값으로 하였다(식품공전 제8. 일반시험법 2. 식품성분시험법 2.1 일반성분시험법 2.1.4 탄수화물).

[0040] 다. 수분

[0041] 미리 가열하여 항량으로 한 칭량접시에 검체 3~5 g을 정밀히 달아 뚜껑을 약간 열어 놓고 105℃의 건조기에 넣어 3~5시간 건조한 후 데시케이터에서 약 30분간 식히고 무게를 측정하였다. 다시 칭량접시를 1~2시간 건조하여 항량이 될 때까지 같은 조작을 반복하였다. 하기의 표 1의 식을 사용하여 수분량(%)을 계산하였다(식품공전 제 8. 일반시험법 2. 식품성분시험법 2.1 일반성분시험법 2.1.1 수분 2.1.1.1 건조감량법 가. 상압가열건조법).

표 1

[0042]
$$\text{수분}(\%) = \frac{b-c}{b-a} \times 100$$

[0043] a : 칭량접시의 무게(g)

[0044] b : 칭량접시와 검체의 무게(g)

[0045] c : 건조 후 항량이 되었을 때의 무게(g)

[0047] 라. 회분

[0048] 깨끗한 도가니를 전기로 또는 가스버너에서 600℃ 이상으로 수 시간 강하게 가열한 후 데시케이터에 옮겨 실온으로 식힌 다음 곧 화학천칭으로 칭량하였다. 다시 2시간 강하게 가열하여 건조 칭량하고 이 조작을 항량이 될 때까지 반복하였다. 시료를 넣은 용기를 그대로 회화로에 옮겨 550~600℃ 에서 수 시간 가열하여 백색~회백색의 회분이 얻어질 때까지 계속 진행하였다. 회화가 끝난 후, 가열을 중지하고 식혀 온도가 약 200℃로 되었을 때 데시케이터에 옮겨 식힌 후 칭량하였다. 회화한 다음 데시케이터에 옮겨 식히고 실온으로 되면 곧 칭량하여 검체의 회분량(%)을 하기의 표 2의 식을 사용하여 계산하였다(식품공전 제8. 일반시험법 2. 식품성분시험법 2.1 일반성분시험법 2.1.2 회분).

표 2

$$\text{회분}(\%) = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

[0049]

[0050]

W0 : 향량이 된 도가니에 무게(g)

[0051]

W1 : 회화 후의 도가니와 회분의 무게(g)

[0052]

S : 검체의 채취량(g)

[0054]

마. 조지방

[0055]

검체 약 2 g을 작은 비커에 정밀히 달아 넣고 에탄올 약 2 mL를 가하여 잘 섞었다. 그다음 염산(25→ 36) 10 mL를 가하여 잘 섞고 70~80℃의 수욕상에서 때때로 흔들면서 20~40분간 가온하였다. 다음 에탄올 10 mL를 가하고 식힌 후 내용물은 되리히 관에 옮기고 비커는 에테르 25 mL로 씻어 되리히 관에 넣고 흔든 다음 석유 에테르(Petroleum ether) 25 mL를 가하였다. 물을 가하여 약 11 mL로 하고 40℃~50℃로 가온한 후 흔들어 완전히 혼화한 후 암모니아수 1.5 mL를 가하여 다시 혼화하고 알코올 10 mL를 가하여 잘 섞었다. 다음 에테르 25 mL를 가하여 가볍게 섞고 마개를 열어 에테르 증기를 날려 보낸 후 다시 마개를 닫고 약 1분 동안 세게 흔들었다. 이를 600 rpm에서 원심분리하거나 방치하여 상층액이 완전히 투명하게 되면 상층액을 미리 향량으로 한 삼각 플라스크에 옮기고 관내의 남은 액에 에테르 및 석유 에테르 각 15 mL씩으로 가하여 위와 같은 조작을 하였다. 다시 석유 에테르 및 에테르 15 mL씩으로 3회 추출한다. 그다음 관의 마개 유출구 및 깔때기를 에테르 및 석유 에테르의 같은 양의 혼액으로 깨끗이 세척하고 여액 및 세척한 액을 삼각 플라스크에 합쳐 수욕상에서 용매를 날려 보낸 후 100±2℃의 건조기에 넣고 향량이 될 때까지 건조하고 조지방의 향량을 산출하였다(식품공전 제8. 일반 시험법 2. 식품성분시험법 2.1 일반성분시험법 2.1.5 지질 2.1.5.1 조지방 2.1.5.1.2. 산 분해법).

[0056]

바. 조단백질

[0057]

1) 검체의 조제

[0058]

① 분해과정

[0059]

a. 검체 약 1 g(3~25 %의 단백질을 함유한 식품의 경우)을 정밀하게 취하여 분해 튜브에 넣고 분해 촉진제 2알을 넣었다. 분해 촉진제는 H₂SO₄와 K₂SO₄의 비율이 1.4~2.0 : 1이 되어야 분해가 효율적으로 이루어진다.

[0060]

b. 분해 튜브에 진한 황산 12 mL를 넣었다. 검체의 지방 함량이 10 % 이상이면 진한 황산 15 mL를 넣었다.

[0061]

c. 420℃의 분해 장치에서 45~60분 동안 분해하여 분해액의 색이 투명한 연푸른색(구리 촉매제를 사용한 경우) 또는 투명한 노란색(셀레늄 촉매제를 사용한 경우)이 되면 상온으로 냉각시켰다.

[0063]

② 증류 및 적정

[0064]

자동장치인 경우 다음의 증류, 적정, 계산과정이 모두 자동으로 수행된다.

[0065]

a. 분해된 시험용액에 80 mL의 증류수를 주의하여 첨가했다.

[0066]

b. 25 mL의 혼합 지시약이 섞인 포집 용액을 삼각 플라스크에 넣은 후, 이 증류장치에 놓고 삼각 플라스크 받침대를 들어 올려주어 증류 시 증류액이 포집 용액으로 들어가도록 하였다.

[0067]

c. 40 % NaOH 50 mL(분해 시 사용한 황산의 4배에 해당하는 양)를 분해 튜브에 넣었다.

[0068]

d. 증류장치에서 3~4분 동안 증류했다. 증류장치의 삼각 플라스크에 있는 포집 용액이 증류액에 함유되어 있는 알칼리(암모니아)를 포집하면서 녹색으로 변했다.

[0069]

e. 증류액을 염산 용액(일반적으로 0.1 N 또는 0.2 N)을 이용하여 종말점이 옅은 핑크빛에 도달할 때까지 적정하였다. 적정에 사용된 산의 양을 기록했다.

[0071] ③ 계산방법

[0072] 조단백질량(%) 계산은 하기의 표 3의 식을 사용하였다(식품공전 제8. 일반시험법 2. 식품성분시험법 2.1 일반성분시험법 2.1.3 질소화합물 2.1.3.1 총 질소 및 조단백질).

표 3

$$\% \text{ 조단백질} = \frac{(\text{HCl 소비 mL} - \text{공시험 mL}) \times M \times 14.01}{\text{검체량 (mg)}} \times F \times 100$$

[0073]

[0074] 14.01 : 질소의 원자량

[0075] M : HCl의 몰농도

[0076] F : 킬달 계수(1.1.3.1 가. 5)의 질소계수 이용)

[0078] 1-3. 미생물 발육 확인 실험

[0079] 가. 미생물 접종

[0080] *Lactobacillus casei*(KCCM 12452 구매)를 Lactacilli MRS Broth에서 배양한 후 배양액 1 mL를 햄프시드 추출물 200 mL에 접종했다. 37℃ Shaking Incubator에서 18시간 동안 배양 후 Autoclave에서 121℃ 15분간 멸균한 추출물을 사용하였다. 하기 도 1에서 나타낸 바와 같이 *Lactobacillus casei*를 접종 후 18시간 배양했을 때 햄프시드 추출물에서 유산균이 자라고 있음을 확인했다.

[0082] 나. 배양 시간 별 유산균 수 및 pH 변화량

[0083] 최적의 배양 시간을 확인하기 위하여 배양시간별 유산균 수 및 pH 변화량을 측정하였다. 표 4에서 나타내는 바와 같이, 유산균 수의 경우 배양 1일 이후부터 유산균 수의 큰 변화를 나타나지 않았고, pH도 약 4.0으로 떨어진 후 큰 차이를 보이지 않았다. 그리고 배양 7일 후에 유산균 수가 감소됨을 확인할 수 있었다. 따라서 배양 시간이 1~4일까지 유산균이 급증하지 않지만 조건 내에서 발효가 되고 있음을 확인할 수 있었으며, 최종 배양 시간은 2일로 설정하여 진행하였다.

표 4

[0084]

조건	유산균수	pH
초기값(멸균전)	-	7.04
초기값 (멸균 후+배양액접종)	1.5×10^7	5.89
1일 후	1.7×10^8	4.07
2일 후	2.0×10^8	3.98
4일 후	1.8×10^8	4.03
7일 후	2.0×10^7	4.09

[0086] 1-4. 햄프시드 발효 추출물 제조

[0087] 도 2에서 나타낸 바와 같이, 햄프시드 발효 추출물 제조 공정은 다음과 같다. 햄프시드 10g을 취한 후 1차 증류수 490mL를 가하여 믹서기로 균질화하였다. 100℃에서 4시간 동안 증탕 추출을 한 후, 3000 rpm, 30분 동안 원

심분리 후 감압 여과하였다. 500 mL 삼각 플라스크에 약 200 mL 정도 여과액을 넣고, 여과액의 0.1 %가 되도록 포도당을 넣은 후 마개를 닫고, Autoclave에서 121℃ 15분 동안 멸균하였다. 멸균된 햄프시드 추출액 200 mL에 배양액(Lactobacillus casei(KCCM 12452)을 Lactobacilli MRS Broth에 배양) 1 mL를 접종하였다. 37℃ Shaking Incubator에서 48시간 동안 배양 후 Autoclave에서 121℃ 15분 동안 멸균한 추출물을 사용하였다.

[0089] 1-5. 지방산 및 유리 아미노산 분석

[0090] 가. 지방산(포화지방 및 트랜스지방)의 추출

[0091] 지방 추출에 앞서 검체를 균질화하였다. 균질화된 검체를 약 100~200 mg의 지방을 포함하는 양으로 정확히 칭량하여 마조니어관에 넣고 약 100 mg의 피로갈롤을 첨가한 후, 2 mL의 내부표준용액을 첨가하였다. 마조니어관에 끓임쪽을 넣고 2 mL 에탄올을 첨가하여 전체 검체가 잘 섞일 때까지 혼합하였다. 8.3 M 염산 용액 10 mL을 넣고 잘 섞었다. 마조니어관의 마개를 고무줄 혹은 테프론 테이프 등으로 밀봉한 후, 70~80℃의 수조에서 적당한 속도로 교반하면서 40분 동안 분해하였다. 마조니어관의 벽면에 붙어있는 입자들이 잘 혼합될 수 있도록 매 10분마다 교반기로 혼합하였다. 분해 후, 실온으로 냉각하고 에테르 추출 시 분액이 용이하도록 마조니어관의 아랫부분을 에탄올을 첨가하여 채운 후 부드럽게 섞어주었다. 마조니어관의 분해물에 25 mL 디에틸에테르를 첨가하고 마개를 한 후 5분간 진탕하여 추출하였다. 에테르 혼합 추출 용매로 마개를 씻고 25 mL의 무수 석유에테르를 추가하여 5분 동안 다시 진탕 추출하고 600 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 원심분리가 어려울 경우, 상층이 깨끗해질 때까지 적어도 1시간 이상 방치하여 분리하였다. 에테르 혼합 추출 용매로 마개를 씻고 150 mL 비커에 에테르층을 분액한 후 증발시키기 위해 질소를 사용하여 35~40℃ 수조에서 에테르를 천천히 증발시켰다.

[0093] i) 기체크로마토그래피 조건

[0094] 지방산 분석 시 C18:3(Linolenic acid, n3 cis)과 C20:1(Eicosenic acid) 및 C22:1(Docosaeonic acid), C20:3(Eicosatrienoic acid)와 C20:4 (Arachidonic acid)의 분리도는 1.0 이상이어야 한다.

[0095] a. 칼럼: SP-2560 (100 m x 0.25 mm x 0.2 μm) 또는 이와 동등한 것

[0096] b. 주입부온도 : 225℃

[0097] c. 칼럼온도 : 100℃에서 4분간 유지한 후 3℃/min의 비율로 240℃까지 온도를 상승시키고 이후 15분 이상 유지하였다.

[0098] d. 검출기온도 : 285℃

[0099] e. 유량 : 헬륨 0.75 mL/min

[0100] f. split ratio : 200 : 1

[0102] ii) 지방산 표준물질의 크로마토그램

[0103] C18:1(Elaidic acid)과 C18:2(Linolelaidic acid)의 트랜스형의 이성체의 표준물질을 포함한 37종의 지방산 메틸 에스테르 표준물질의 크로마토그램은 도 3에서 나타난 바와 같다. 통상적으로 트랜스형의 이성체는시스형보다 먼저 분리된다. C18:3(Linolenic acid, n3, cis)과 C20:1(Eicosenic acid)의 피크 순서는 칼럼의 종류 및 분석온도에 따라 상이하며 트랜스지방산의 분리조건을 최적화시키는 데에는 C20:1(Eicosenic acid)의 피크가 C18:3(Linolenic acid, n3, cis)의 바로 앞에 나오는 것이 좋다.

[0105] iii) 지방산 전환계수

[0106] GC-FID상에서의 분석은 각 지방산의 메틸 에스테르이므로 해당 지방산으로 전환해야 한다. 각 지방산별 전환계수는 8)정량시험 표를 참고한다. 트랜스형의 지방산인 경우 동일한 분자량을 갖는 시스형 지방산의 경우와 동일한 전환계수를 사용했다.

[0108] 나. 정량시험

[0109] 정성 시험법에 의해 얻은 각 지방산의 피크면적, 내부 표준 물질의 피크면적으로부터 다음과 같이 정량했다.

[0110] ① 개별 지방산 메틸 에스테르의 함량 계산

표 5

[0111]

$$W_{FAMEi} = \frac{P_{ti} \times W_{C11:0} \times 1.0067}{P_{C11:0} \times R_i}$$

[0112] W_{FAMEi} : 지방산 i의 메틸 에스테르로서의 양(mg)

[0113] P_{ti} : 시험용액 중 지방산i의 피크면적

[0114] $W_{C11:0}$: 시험용액 중 내부표준물질(C11:0 triundecanoin) 첨가량(mg)

[0115] 1.0067 : 내부 표준 물질(C11:0 triundecanoin)의 트리글리세라이드로부터 지방산 메틸 에스테르로의 전환계수

[0116] $P_{C11:0}$: 시험용액 중 내부표준물질(undecanoic acid methyl ester)의 피크면적

[0117] R_i : 지방산 i의 반응계수(response factor)

표 6

[0118]

$$\times R_i = \frac{P_{si}}{P_{Sc11:0}} \times \frac{W_{C11:0}}{W_i}$$

[0119] P_{si} : 표준용액 중 지방산 메틸 에스테르 i의 피크면적

[0120] $P_{Sc11:0}$: 표준용액 중 내부표준물질(undecanoic acid methyl ester)의 피크면적

[0121] $W_{C11:0}$: 표준용액 중 내부표준물질(undecanoic acid methyl ester)의 양(mg)

[0122] W_i : 표준용액 중 지방산 메틸 에스테르 i의 양(mg)

[0124] ② 개별 지방산 및 지방 함량 계산

[0125] 개별 지방산의 함량은 하기의 표 7의 식을 사용하여 계산하였다(식품공전 제9. 일반시험법 1. 식품성분시험법 1.1 일반성분시험법 1.1.5 지질 1.1.5.4. 지방산 나. 제2법).

표 7

[0126]

$$\text{지방산(g/100 g)} = \frac{W_{FAi} \times 100}{W_{spl}}$$

[0127] $W_{FAi} = W_{FAMEi} \times f_{FAi}$

[0128] f_{FAi} : 지방산 i(메틸 에스테르로서)의 지방산 전환계수

[0129] W_{spl} : 검체량(mg)

[0131] ③ 유리 아미노산

[0132] 균질한 검체 일정량을 정밀히 달아 약 10 배량을 물을 가해 비등 수욕 상에서 가열하여 응고시킨 다음 여과하여 물층을 취했다. 잔사는 2~3회 소량의 물로 세척하고, 세척액은 앞서의 물과 합하였다. 지방이 있는 경우에는 에테르로 추출하여 제거하였다. 물층을 감압 하에 농축 건조하여 얻은 잔사를 0.2 N 구연산나트륨 완충액(pH 2.2) 또는 0.02 N 염산으로 용해하여 일정량으로 하여 시험용액으로 하였다. 불용 물질이 있는 경우에는 멤브레인 필터를 사용하여 여과하였다. 분석조건과 분석식은 도 4에서 나타낸 바와 같다. 아미노산량은 하기의 표 8의 식을 사용하여 계산하였다(식품공전 제8. 일반시험법 2. 식품성분시험법 2.1 일반성분시험법 2.1.3 질소화합물 2.1.3.3 아미노산 나)유리 아미노산).

표 8

$$\text{아미노산 (mg/g)} = \frac{\text{시험용액의 농도 (mg/100mL)} \times \text{최종부피 (mL)} \times \text{희석배수}}{\text{시료채취량 (g)}}$$

[0133]

[0135] 실시예 2. 항산화 효과 실험

[0136] 항산화 효과를 측정하기 위해 추출물의 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능 측정법을 선정하였다.

[0138] 2-1. DPPH radical 소거능 측정

[0139] 추출물의 DPPH radical activity(Electron donating abilities, EDA)는 다음과 같이 측정하였다. 각 시료 용액 2.0 mL에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 0.5 mL를 넣고 교반한 후 30분 동안 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능 효과는 시료 용액의 첨가 구와 무첨가 구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

[0141] 2-2. ABTS radical 소거능에 미치는 영향

[0142] ABTS+ radical cation 소거작용 측정은 ABTS+ radical cation은 7 mM ABTS와 2.4 mM potassium persulfate (K2S2O8)을 1 : 1로 혼합하여 암실에서 실온으로 24시간 동안 반응하였다. 사용전에 ABTS+ 용액을 에탄올에 희석하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.706±0.001이 되게 하여 사용하였다.

[0144] 실시예 3. 주름 개선 실험

[0145] 햄프시드 발효 추출물의 주름 개선 효과를 확인하기 위해서 Collagenase와 Elastase 저해 활성 측정법을 선정하였다.

[0147] 3-1. Collagenase

[0148] Collagenase 저해 활성은 반응구 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg(0.3 mg/mL)을 녹인 기질액 0.25 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 collagenase(0.2 mg/mL) 0.15 mL를 첨가하여 실온에서 20분 동안 방치한 후 6% citric acid 0.5 mL를 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 mL를 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해 활성은 시료용액의 첨가 구와 무첨가 구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

[0150] 3-2. Elastase 저해 활성

[0151] Elastase 저해 활성은 다음과 같이 측정하였다. 0.4 M Tris-HCl buffer(pH 8.6)를 50 µL, 농도별 추출물을 50

μL , 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.6)에 0.6 U/mL가 되도록 희석한 enzyme(ex-porcine pancreas)을 50 μL 를 넣고 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 substrate(methoxysuccinyl-L-Ala-L-Val-5-nitroanilide)를 100 μL 를 넣은 후 37°C에서 30분 동안 반응 시킨 후 다시 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0153] **실시예 4. 미백효과 시험**

[0154] 햄프시드 발효 추출물의 미백효과를 확인하기 위해서 Tyrosinase 저해 활성 측정법을 선정하였다.

[0156] **4-1. Tyrosinase**

[0157] Tyrosinase 저해 활성 측정은 다음과 같이 진행하였다. 반응 구는 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료 용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110 U/mL) 0.2 mL을 첨가하여 25°C에서 2분 동안 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 시료용액의 첨가 구와 무첨가 구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

[0159] **실시예 5. 안전성 실험 : MTT assay**

[0160] 햄프시드 발효 추출물의 안전성을 확인하기 위해서 MTT assay 측정법을 선정하여 세포 생존율을 측정하였다. 세포를 96 well plate에 0.6×10^5 cells/well이 되도록 0.18 mL 분주하고, 시료를 농도별로 조제하여 0.02 mL 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 mL를 첨가하여 4시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO : Ethanol (1 : 1) 0.15 mL를 가하여 실온에서 30분 동안 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료 용액의 첨가 군과 무첨가 군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

[0162] **실시예 6. 항염 효능 측정 시험 : Nitric oxide(NO) 생성측정**

[0163] 햄프시드 발효 추출물의 항염증 효능을 확인하기 위해서 Nitric oxide(NO) 생성 측정법을 선정하였다. Raw 264.7 cell을 6 well plate에 배지 1 mL 당 1×10^5 개의 세포로 배양하여 confluence가 80 %일 때, PBS로 2번 세척한 후 무혈청 배지를 사용하여 12시간 이상 배양한 다음 LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ 를 control 군을 뺀 모든 well에 넣어서 자극시켰다. 2시간 후에 발효추출물을 농도별로 처리하고 일산화질소의 생성량은 24시간 후에 상층액을 모아 griess reagent로 10분 동안 반응시킨 후에 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0165] **실시예 7. 인체 적용시험(눈가주름 개선)**

[0166] 주름 기능성 화장품의 임상 평가법은 국내 및 국제적으로 다양한 시험법들이 알려져 있는데, 대한민국 식품의약품안전처에서는 전문가에 의한 육안 평가 이외에도 모사판 (replica)을 제작하여 주름을 측정하는 간접적인 기기 평가법, 이미지 분석 장치를 이용한 직접적인 기기 평가법 등을 권장하고 있다.

[0167] 본 시험은 4주 동안 시험 시료를 사용하면서, 이미지 분석 장치를 이용한 직접적 기기 평가법을 이용하여 시험 시료 사용으로 인한 눈가 주름 개선 효과를 평가하였다.

[0169] **7-1. 시험 시료**

[0170] 시험 시료의 성분과 기원은 하기 표 9에서 나타낸 바와 같다. 시험 시료의 물리 화학적 특성은 하기 표 10에서 나타낸 바와 같다.

표 9

시료의 명칭	제조에 사용된 주요 성분	(주)대한피부과학연구소 시료 관리 코드	비고
햄프씨드 발효 마스크팩	햄프씨드 추출물, 진생베리 추출물, 나이아신아마이드, 아데노신	2018-562-00-M	

표 10

시료의 명칭	시료의 성상	(주)대한피부과학연구소 시료 관리 코드	비고
햄프씨드 발효 마스크팩	무색의 액상	2018-562-00-M	

본 시험 시료는 고온 또는 저온의 장소 및 직사광선이 닿는 곳에 보관하지 않아야 하며, 하기와 같이 제조되었다. 가. 본 시료(들)은 화장품법에 따라 제조되었다.

나. 본 시료들이 제조에는 식품의약품안전처 고시 제2017-50호(2017.06.13.)에 의거 화장품에 사용할 수 없는 원료는 사용하지 않았으며, 사용상의 제한이 필요한 원료의 경우 규정된 사용 한도 및 그 사용 기준을 준수하여 제조되었다.

다. 본 시료들은 식품의약품안전처 고시 제2017-50호(2017.06.13.) 및 제2016-17호(2016.2.24.)에 의거 화장품 안전 기준을 준수하여 제조되었다.

라. 본 시료들은 시험 의뢰자가 본 시료의 안전성을 보장한다.

7-2. 피시험자에 관한 내용

가. 피시험자 선정기준

1) 시험책임자 또는 시험책임자의 위임을 받은 사람이 피험자에게 알려주어야 할 사항에 대하여 충분히 설명을 듣고 자발적으로 동의서를 작성하고 서명한 자

2) 피부 질환을 포함하는 급, 만성 신체 질환이 없는 건강한 자

3) 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 자

나. 피시험자 제외기준

지원자와의 면담에 의하여 다음 사항에 해당되는 사람은 피험자에서 제외시켰다.

1) 임신 또는 수유중인 여성과 임신 가능성이 있는 여성

2) 피부질환 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부 외용제를 1개월 이상 사용하는 사람

3) 동일한 시험에 참가한 뒤 6개월이 경과되지 않은 사람

4) 민감성, 과민성 피부를 가진 사람

5) 시험 부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관확장 등의 피부 이상 소견이 있는 사람

6) 연구 시작 전 3개월 내에 시험 부위에 동일 또는 유사한 효능 화장품 및 의약품 등을 사용한 사람

7) 연구 시작 전 6개월 내에 시험 부위에 시술을 받은 사람

- [0194] 8) 그 외 시험책임자의 판단으로 시험에 부적합하다고 생각되는 사람
- [0196] 다. 피시험자 중도탈락 기준
- [0197] 아래의 경우 시험책임자의 판단 하에 중지시키고, 이를 시험결과 산정에서 제외하고 최종보고서에 기록하여 보고하여야 한다.
- [0198] 1) 시험부위에 소양감이나 홍반 등의 유해사례가 발생한 경우
- [0199] 2) 피험자가 실험진행과정 중 시험 부위에 과도한 자외선 노출을 하거나 지나친 음주, 흡연 등으로 결과의 평가에 장애가 발생한 경우
- [0200] 3) 피험자가 실험 진행 과정 중 개인 사정에 의해 추적관찰이 어려운 경우
- [0202] 라. 피시험자의 숫자와 이에 대한 근거
- [0203] 식품의약품안전처 (Ministry of Food and Drug Safety, MFDS) ‘화장품 표시·광고 실증 등을 위한 시험방법 가이드라인’ 및 대한피부과학연구소 자체 규정에 근거하여, 시험결과의 통계적 유효성을 입증할 수 있도록 20명 이상의 유효데이터를 확보하였다.
- [0205] 마. 피험자 관리
- [0206] 본 연구의 의뢰자 및 시험자는 헬싱키 선언의 근본정신을 준수하고, 피험자의 권익을 보호하고자 노력하였으며 연구 수행과 결과 기록 등에 있어 인체시험관리기준 (GCP) 및 관련 국내법규를 준수하도록 노력하였다.
- [0207] 시험 전 모든 피험자들의 시험차여 동의를 받았으며, 식품의약품안전처가 발간한 [화장품인체 적용시험 및 효력 시험 가이드라인, 2015]에 따라 피험자들의 동의를 얻는데 마땅히 제공해야 할 모든 정보들을 성실히 전달하였다.
- [0209] 7-3. 시험 방법
- [0210] 가. 시험물질 적용 방법
- [0211] 실제 사용법과 동일하게 하기 위해 시험의뢰자가 제공한 사용방법을 피험자에게 교육하였다.
- [0213] 나. 사용장비
- [0214] 1) ANTERA 3DTM (Minravex, Ireland)
- [0215] ANTERA 3DTM은 다파장 LED 광원을 이용하여 표피와 진피의 상태를 측정할 수 있는 장비로서 내장 프로그램을 이용하여 이미지의 2차원 및 3차원 재구성이 가능하며 파장대별 분석을 통해 다양한 목적의 분석이 가능하다.
- [0217] 다. 시험 순서
- [0218] 1) 첫 번째 방문
- [0219] 방문일 12시간 전부터 기초 제품의 사용을 금지하였다. 피험자는 시험 방법과 일정 및 위험성과 가능한 이상반응 등의 재해 설명을 듣고 기초 정보를 작성하고 동의서를 서명하였다. 시험자가 제공하는 기준 세안제를 이용하여 세안 후 페이스 타올로 가볍게 두드려 물기를 제거한 후 30분 동안 항온 항습 조건(20~24℃, 40~60%RH)에서 안정을 취하였다. 평가 시마다 동일한 부위에서 측정이 이루어질 수 있도록 다음과 같이 측정 부위를 구획하고 기기 측정을 실시하였다. 예를 들면 좌측, 우측 눈가 주름 전체를 포함하는 양측 눈가 쪽과 같다. 피험자 주의사항과 시료 사용법을 교육한 후 시료를 배포하였다. 시험기간 동안 매일 전화 등의 방법으로 시효 사용의 순

응도를 체크하였다.

2) 두 번째 방문 (시험 2주 후)/세 번째 방문 (시험 4주 후)

첫 방문일과 동일한 방법으로 동일한 부위에서 기기 평가를 시행하였다. 피부과 전문의가 이상 반응 유무를 평가하였다. 마지막 방문일에는 시료를 수거하고, 피험자에게 피험비를 지급하였다. Antera 3D - 누각 주름 분석은 측정 오차를 줄이기 위해 모든 이미지 촬영이 완료된 마지막 방문일에 실시하였다.

라. 평가 및 분석 방법

1) Antera 3D를 이용한 눈가 주름 개선 효과 평가

시험 전, 시험 2주 후, 시험 4주 후에 눈가 주름 개선 정도를 기기적으로 측정하였다. 눈가 주름 개선 정도를 하기 표 11과 같이 % 값으로 도출하였다.

표 11

$$\text{눈가주름개선율}(\%) = \frac{\text{시험전측정치} - \text{시험후측정치}}{\text{시험전측정치}} \times 100$$

2) 피부과 전문의에 의한 안전성 평가

시험 기간 중 피험자 방문일마다 시료 사용에 의한 부작용(홍반, 부종, 인설, 가려움, 자통, 작열감, 뻣뻣함, 따끔거림 및 기타 이상증) 발생 여부를 평가하였다.

마. 통계 분석 방법

1) Minitab 18 Minitab® 18.1, Minitab Inc.) 프로그램을 이용해 유의성을 확인하였다. 결과 값은 정규성 검정(Ryan-Joiner Normality Test)을 통해 정규 분포로 추정되는 경우, 아래의 모수적은 통계법을 통해 유의성을 확인하였다.

① 동일 그룹 내 전후 결과 값 비교 : 시험 전, 후 측정한 값의 비교는 paired t-검정을 이용하며, 3회 이상 반복 측정한 경우, 반복측정분산분석(Repeated measure ANOVA)을 통해 유의수준 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 확인하였다.

② 2 이상의 상이한 그룹간 결과값 비교 : 두 그룹 간 결과 값의 비교는 Welch' s t-검정을 이용하며, 3 이상의 그룹 간 결과 값 비교는 일원분산분석(one-way ANOVA)을 통해 유의수준 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 확인하였다.

③ 반복 측정한 2 이상의 상이한 그룹의 결과 값 비교 : 반복측정분산분석(Repeated measure ANOVA)을 통해 유의수준 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 확인하며, 그룹 간 초기 측정 값이 유의하게 다른 경우 초기 측정값을 공변량으로 한 공분산분석(Analysis of Covariance)을 통해 그룹 간 결과 값의 차이를 확인하였다.

④ 정규성 검정(Ryan-Joiner Normality Test)에서 정규성이 기각되는 경우, 아래의 비모수적인 통계법을 통해 유의성을 확인하였다.

⑤ 동일 그룹 내 전후 결과 값 비교 : 시험 전, 후 측정한 값의 비교는 Wilcoxon signed rank 검정을 이용하며, 3회 이상 반복 측정한 경우, Friedman 검정을 통해 유의수준 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 확인하였다.

⑥ 2이상의 상이한 그룹 간 결과 값 비교 : 두 그룹 간 결과 값의 비교는 Mann-Whitney U 검정을 이용하며, 3이상의 그룹간 결과값 비교는 Kruskal -Wallis 검정을 통해 유의수준 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 확인하였다.

⑦ 반복 측정한 2 이상의 상이한 그룹의 결과 값 비교 : Friedman 검정을 통해 유의수준 $p < 0.05$ 수준에서 그

룹 간 결과 값의 차이를 확인하였다.

모든 자료는 연속형 변수는 평균과 표준편차로, 범주형 변수는 빈도와 백분율로 요약하였다.

실험 결과 1.

1-1. 일반성분 시험방법 및 결과

식품공전 제8.일반시험법 2.식품성분시험법 2.1. 일반시험법의 탄수화물, 질소화합물, 총 질소 및 조단백질, 지질, 조지방, 수분, 회분의 방법에 따라 분석하였다.

시험 결과는 하기의 표 12에서 나타낸 바와 같이 탄수화물 5.48 %, 조단백질 32.11 %, 조지방 49.67 %, 수분 6.45 %, 회분 6.29 %의 함량을 보였으며, 열량은 597.39 Kcal/100g으로 분석되었다.

표 12

시험항목	시 험 방 법	결 과
열량 (Kcal/100g)	식품공전 제8.일반시험법 2.식품성분시험법 2.1. 일반시험법 2.1.6 열량의 계산 6) 열량의 계산	597.39
탄수화물(%)	식품공전 8.일반시험법 2.식품성분시험법 2.1.일반시험법 2.1.4 탄수화물	5.48
조단백질(%)	식품공전 제8.일반시험법 2.식품성분시험법 2.1.일반시험법 2.1.3 질소화합물 2.1.3.1 총질소 및 조단백질	32.11
조지방(%)	식품공전 제8.일반시험법 2.식품성분시험법 2.1.일반시험법 2.1.5. 지질 2.1.5.1 조지방 2.1.5.1.2 산 분해법	49.67
수분(%)	식품공전 제8.일반시험법 2.식품성분시험법 2.1.일반시험법 2.1.1 수분	6.45
회분(%)	식품공전 제8.일반시험법 2.식품성분시험법 2.1 일반성분시험법 2.1.2 회분	6.29

1-2. 햄프시드 추출물의 발효 전과 후의 영양성분 함량 변화

발효 전 후 영양성분 함량 변화는 하기 표 13에서 나타낸 바와 같다. 햄프시드 추출물의 발효 전과 후 영양성분 함량 변화는 거의 없었다.

표 13

시험항목	발효 전 햄프시드 추출물	발효 후 햄프시드 추출물
	#3	#3
열량(Kcal/100g)	2.17	2.53
탄수화물(%)	0.09	0.16
조단백질(%)	0.25	0.27
조지방(%)	0.09	0.09
수분(%)	99.51	99.45
회분(%)	0.06	0.03
사과산(mg/g)	0.11	0.15
젖산(mg/g)	불검출	0.23
초산(mg/g)	불검출	불검출
구연산(mg/g)	불검출	불검출
호박산(mg/g)	불검출	불검출
옥살산(mg/g)	0.02	0.04
개미산(mg/g)	불검출	불검출
주석산(mg/g)	불검출	불검출

[0253] 1-3. 햄프시드 추출물의 발효 전과 후의 건조함량 및 pH

[0254] 햄프시드 추출물의 발효 전과 후의 건조함량 및 pH는 하기의 표 14에서 나타낸 바와 같다.

표 14

시험항목	발효 전 햄프시드 추출물			발효 후 햄프시드 추출물		
	#1	#2	#3	#1	#2	#3
건조함량(%)	99.54	99.50	99.65	99.45	99.44	99.54
pH	7.33	7.51	7.54	7.04	7.05	7.04

[0257] 1-4. 기능성 화장품 원료인 햄프시드 추출물 중 중금속 및 환경호르몬 함량

[0258] 햄프시드 추출물 중 중금속 및 환경호르몬 함량은 하기의 표 15에서 나타낸 바와 같다.

표 15

시험항목	발효 후 햄프시드추출물		
	#1	#2	#3
납 ($\mu\text{g/g}$)	불검출	불검출	0.36
비소 ($\mu\text{g/g}$)	불검출	불검출	불검출
카드뮴 ($\mu\text{g/g}$)	불검출	불검출	불검출
안티몬 ($\mu\text{g/g}$)	불검출	불검출	불검출
니켈 ($\mu\text{g/g}$)	0.34	0.34	0.39
수은 ($\mu\text{g/g}$)	불검출	불검출	불검출
디옥산 ($\mu\text{g/g}$)	불검출	불검출	불검출
톨루엔(%)	불검출	불검출	불검출
프탈레이트류 ($\mu\text{g/g}$)	불검출	불검출	불검출

[0261] 1-5. 발효 전과 후의 햄프시드 추출물 중 지방산 함량 변화

[0262] 발효 전과 후의 햄프시드 추출물 중 지방산 함량 변화는 하기의 표 16에서 나타낸 바와 같다.

표 16

시험항목	발효 전 햄프시드추출물			발효 후 햄프시드추출물		
	#1	#2	#3	#1	#2	#3
감마리놀렌산(g/100g)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
리놀레산(g/100g)	0.04	0.05	0.02	0.04	0.05	0.02
스테아르산(g/100g)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
아라키드산(g/100g)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
알파리놀렌산(g/100g)	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01
올레산(g/100g)	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02
팔미트산(g/100g)	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01
cis-11-에이코세노산	불검출	0.00	불검출	불검출	0.00	불검출

[0265] 1-6. 발효 전후 햄프시드 추출물 중 아미노산 함량 변화

[0266] 발효 전 햄프시드 추출물 중 아미노산 함량 변화는 하기의 표 17에서 나타낸 바와 같다. 발효 후 햄프시드 추출물 중 아미노산 함량 변화는 하기의 표 18에서 나타낸 바와 같다. 발효 전 후 햄프시드 추출물 중 아미노산 함량 변화는 하기의 표 19에서 나타낸 바와 같다. 발효 전과 후의 햄프시드 추출물 중 아미노산 함량 변화는 로이신이 670%로 유리 아미노산이 가장 많이 증가하였고, 아스파라긴산이 609%로 두 번째로 많은 증가량을 보였다.

평균적으로 유리 아미노산의 함량변화는 약 74%로 발효 후 상당량의 유리 아미노산의 증가를 나타냈다. 도 10은 아미노산 16종 표준용액 크로마토그램을 나타내며, 도 11은 발효 전 햄프시드 추출물 중 유리 아미노산 크로마토그램을 나타내고, 도 12는 발효 후 햄프시드 추출물 중 유리 아미노산 크로마토그램을 나타낸다. 도 13은 발효 전과 후의 햄프시드 추출물 중 유리 아미노산 크로마토그램을 나타내며 파란색은 발효 전, 녹색은 발효 후의 햄프시드 추출물 중 유리 아미노산을 나타낸다.

표 17

시험항목	발효 전 햄프시드추출물			
	#1 (n=3)	#2 (n=3)	#3 (n=3)	평균 (n=9)
아스파라긴산(mg/100g)	0.1077±0.0146	0.0899±0.0386	0.1016±0.0322	0.0998±0.0273
글루탐산(mg/100g)	2.4533±0.1072	2.2506±0.0334	2.4348±0.0155	2.3796±0.1124
세린(mg/100g)	0.1087±0.0016	0.0945±0.0046	0.1043±0.0033	0.1025±0.0070
히스티딘(mg/100g)	0.3570±0.0044	0.6350±0.0314	0.3437±0.0071	0.3552±0.0187
글리신(mg/100g)	0.1716±0.0048	0.1595±0.0095	0.1506±0.0018	0.1605±0.0106
트레오닌(mg/100g)	0.1082±0.0082	0.1035±0.0186	0.0972±0.0031	0.1030±0.0113
아르기닌(mg/100g)	0.6277±0.0182	0.063±0.0027	0.6096±0.0091	0.6145±0.0143
알라닌(mg/100g)	0.3432±0.0165	0.3119±0.0023	0.3173±0.0051	0.3241±0.0169
티로신(mg/100g)	0.2283±0.0180	0.2410±0.0274	0.2185±0.0170	0.2293±0.0209
발린(mg/100g)	0.2145±0.0031	0.1917±0.0016	0.2039±0.0041	0.2034±0.0103
메티오닌(mg/100g)	0.0335±0.0087	0.0234±0.0243	0.0150±0.0260	0.0240±0.0200
페닐알라닌(mg/100g)	0.2235±0.0083	0.1997±0.0100	0.1989±0.0120	0.2073±0.0150
이소로이신(mg/100g)	0.1976±0.0137	0.1784±0.0120	0.1834±0.0123	0.1864±0.0140
로이신(mg/100g)	0.1345±0.0187	0.1151±0.0203	0.1193±0.0029	0.1229±0.0164
라이신(mg/100g)	0.3014±0.0284	0.3093±0.0417	0.2873±0.0079	0.2995±0.0272
시스틴(mg/100g)	0	0	0	0
트립토판(mg/100g)	2.0631±0.0719	2.0268±0.0641	2.0481±0.0269	2.0460±0.0524
프롤린(mg/100g)	2.4696±0.1842	2.2018±0.1419	2.3434±0.0015	2.3383±0.1643
총 아미노산함량 (mg/100g)	10.1435	9.4682	9.7772	9.7963±0.3381

표 18

시험항목	발효 후 햄프시드 추출물			
	#1 (n=3)	#2 (n=3)	#3 (n=3)	평균 (n=9)
아스파라긴산(mg/100g)	0.6935±0.0404	0.6923±0.0778	0.7375±0.0231	0.7078±0.0505
글루탐산(mg/100g)	3.3535±0.0522	3.1965±0.0799	3.3912±0.0608	3.3137±0.1058
세린(mg/100g)	0.4914±0.0059	0.4952±0.0029	0.4673±0.0117	0.4846±0.0147
히스티딘(mg/100g)	0.5227±0.0587	0.5273±0.0393	0.3803±0.2434	0.4768±0.1460
글리신(mg/100g)	0.4656±0.0014	0.4733±0.0120	0.4536±0.0031	0.4642±0.0106
트레오닌(mg/100g)	0.3983±0.0015	0.4159±0.0132	0.3851±0.0062	0.3998±0.0153
아르기닌(mg/100g)	1.0455±0.0217	1.0673±0.0049	1.0666±0.0143	1.0598±0.0170
알라닌(mg/100g)	0.9011±0.0078	0.9125±0.0184	0.8897±0.0152	0.9011±0.0160
티로신(mg/100g)	0.5048±0.0198	0.5099±0.0171	0.5137±0.0037	0.5095±0.0138
발린(mg/100g)	0.7331±0.0139	0.7544±0.0103	0.7303±0.0264	0.7393±0.0195
메티오닌(mg/100g)	0.1949±0.0090	0.1678±0.0046	0.1527±0.0050	0.1566±0.0102
페닐알라닌(mg/100g)	0.6634±0.0094	0.6760±0.0142	0.6570±0.0011	0.6655±0.0120
이소로이신(mg/100g)	0.6161±0.0054	0.6442±0.0111	0.6176±0.0124	0.6260±0.0162
로이신(mg/100g)	0.9414±0.0112	0.9735±0.0318	0.9236±0.0192	0.9462±0.0293
라이신(mg/100g)	0.7511±0.0214	0.7706±0.0148	0.7374±0.0023	0.7530±0.0195
시스틴(mg/100g)	0	0	0	0
트립토판(mg/100g)	2.1933±0.0556	2.0578±0.0387	2.0098±0.1139	2.0870±0.1058
프롤린(mg/100g)	2.8545±0.0449	2.7357±0.0455	2.7165±0.0647	2.7689±0.0791

총 아미노산함량 (mg/100g)	17.2787	17.0704	16.8298	17.0597±0.2246
-----------------------	---------	---------	---------	----------------

표 19

시험항목	발효 전 햄프시드 추출물	발효 후 햄프시드 추 출물	변화량 (mg/100g)	상대비율 (%)
	평균 (n=9)	평균 (n=9)		
아스파라긴산(mg/100g)	0.0998±0.0273	0.7078±0.0505	0.608	609%
글루탐산(mg/100g)	2.3796±0.1124	3.3137±0.1058	0.9341	39%
세린(mg/100g)	0.1025±0.0070	0.4846±0.0147	0.3821	373%
히스티딘(mg/100g)	0.3552±0.0187	0.4768±0.1460	0.1216	34%
글리신(mg/100g)	0.1605±0.0106	0.4642±0.0106	0.3037	189%
트레오닌(mg/100g)	0.1030±0.0113	0.3998±0.0153	0.2968	288%
아르기닌(mg/100g)	0.6145±0.0143	1.0598±0.0170	0.4453	72%
알라닌(mg/100g)	0.3241±0.0169	0.9011±0.0160	0.577	178%
티로신(mg/100g)	0.2293±0.0209	0.5095±0.0138	0.2802	122%
발린(mg/100g)	0.2034±0.0103	0.7393±0.0195	0.5359	263%
메티오닌(mg/100g)	0.0240±0.0200	0.1566±0.0102	0.1326	553%
페닐알라닌(mg/100g)	0.2073±0.0150	0.6655±0.0120	0.4582	221%
이소로이신(mg/100g)	0.1864±0.0140	0.6260±0.0162	0.4396	236%
로이신(mg/100g)	0.1229±0.0164	0.9462±0.0293	0.8233	670%
라이신(mg/100g)	0.2995±0.0272	0.7530±0.0195	0.4535	151%
시스틴(mg/100g)	0	0	0	0%
트립토판(mg/100g)	2.0460±0.0524	2.0870±0.1058	0.041	2%
프롤린(mg/100g)	2.3383±0.1643	2.7689±0.0791	0.4306	18%
총 아미노산함량 (mg/100g)	9.7963±0.3381	17.0597±0.2246	7.2634	74%

실험 결과 2.

2-1. 항산화 효과 실험 결과

가. DPPH radical 소거능 측정결과

DPPH radical 소거능력은 항산화능을 측정하는 대표적인 방법으로 phenolic compound와 같이 수소나 전자를 제공해주는 전자공여체와 반응하면 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxyl radical을 생성하게 되어 안정한 분자로 전환하여 환원이 많이 될수록 보라색의 DPPH가 노란색으로 변화하며 환원 능력이 클수록 높은 항산화 활성을 기대할 수 있어 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다.

햄프시드의 발효 및 비발효 추출물을 이용한 결과로 항산화 효과를 확인한 결과, 도 14에서 나타낸 바와 같이 1000 µg/mL에서 60 % 이상의 라디칼 감소 효과를 확인하였으며, 용량 의존적인(dose dependent) 결과를 통해 우수한 항산화 효과를 확인하였다.

나. ABTS radical 소거능 실험 결과

ABTS는 peroxidase, H₂O₂와 반응에 의해 생성된 활성 양이온인 ABTS+가 햄프시드 추출물 발효 및 비발효 물질중의 항산화 물질에 의해 제거되어 고유의 청록색의 변화를 흡광도 값으로 나타내어 추출물의 ABTS+ 라디칼 소거 활성을 측정할 수 있다.

이와 같이 햄프시드 추출물의 발효 및 비발효물질을 이용한 ABTS 소거능을 측정한 결과, 도 15에서 나타낸 바와 같이 1000 µg/mL에서 85 %의 라디칼 감소 효과를 나타내어 소거능이 우수함을 확인하였다.

[0281] 2-2. 주름 개선 실험 결과

[0282] 햄프시드 추출물 및 발효시킨 추출물을 이용한 주름 개선 효과를 확인하였다. 햄프시드 추출물 발효물질이 collagenase 저해 효능에 높게 나타났으며 10~1000 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하여 실험한 결과, 도 16에서 나타낸 바와 같이 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 21 %의 저해 효과를 나타내었으며 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 52 %로, 햄프시드 추출물의 농도를 높일수록 저해력이 높게 나타남을 확인하였다. 이러한 결과로부터 collagenase 저해 효과가 나타남을 확인하였다.

[0284] 2-3. Elastase 저해 활성 측정 결과

[0285] 햄프시드 추출물과 발효시킨 발효 추출물을 이용한 elastase 저해로 주름 개선 효과를 확인하였다. 그 결과 도 17에서 나타낸 바와 같이 저해 효능이 나타나지 않았다. Elastase에서는 저해 효과가 미약한 것을 확인하였다.

[0287] 2-4. 미백 효과 실험 결과

[0288] 미백 효과를 확인하기 위한 Tyrosinase 저해 활성을 확인한 결과, 도 18에서 나타낸 바와 같이 효능이 떨어짐을 확인하였다. Positive control인 Ascorbic acid에 비해 햄프시드 추출물의 발효 및 비발효 물질은 효능이 미약함을 확인하였다.

[0290] 2-5. 안전성 실험 결과 : MTT assay 결과

[0291] RAW264.7 세포에 대한 햄프시드 추출물 및 햄프시드 발효 추출물에 대한 독성실험 결과, 도 19에서 나타낸 바와 같이 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 84 % 와 79 %의 안정성을 갖는 것을 확인하였다.

[0293] 2-6. 항염 효능 측정 결과 : Nitric oxide(NO) 생성측정 결과

[0294] Nitric oxide(NO)는 대표적인 염증 반응 매개물질로서 최근 염증 반응 중 생성되는 NO의 억제제개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며 다양한 염증질환의 유용한 치료방법으로 쓰이고 있다.

[0295] 본 실험은 RAW264.7 세포에 대한 햄프시드 추출물 및 햄프시드 발효 추출물에 대한 Nitric acid 생성 저해 활성을 통한 항염증 효과를 측정 한 결과 햄프시드 발효 물질은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 100 % Nitric acid 생성 제거 효율을 나타냄을 확인하였다.

[0297] 실험 결과 3. 인체 눈가 주름 개선 결과

[0298] 3-1. 피험자 기본 정보

[0299] 하기의 표 20에서는 피험자 기본 정보를 나타낸다. 하기의 표 21에서는 피험자의 기본정보를 요약한 것이다.

표 20

No.	ID	Gender	Age	No.	ID	Gender	Age
1	2927	Female	38	12	2038	Female	49
2	3013	Female	40	13	1996	Female	49
3	2069	Female	40	14	1991	Female	49
4	2742	Female	42	15	3647	Female	49
5	2992	Female	44	16	2470	Female	51
6	976	Female	45	17	3648	Female	52
7	2972	Female	45	18	3279	Female	52
8	2072	Female	46	19	3574	Female	53
9	3645	Female	46	20	2818	Female	53
10	2101	Female	48	21	2434	Female	56
11	3512	Female	48	22	3460	Female	58

[0300]

표 21

전체 피험자 수	22명	
성별	남 : 0명	여 : 22명
평균 연령	48세	
연령 분포		
30대	1명	
40대	14명	
50대	7명	

[0301]

[0302] 3-2. Antera 3D 측정 결과

[0303] 하기의 표 22는 Antera 3D 측정 결과를 나타낸다. 하기의 표 23은 눈가 주름지수 (Antera 3D, indentation index) 정규 검정결과를 나타낸다. 하기의 표 24는 눈가 주름지수 (Antera 3D, indentation index) 전 후 비교 통계 반복측정분산분석 결과를 나타낸다. 하기 표 25는 눈가 주름지수 (Antera 3D, indentation index) 전후 비교 통계 사후검정(Tukey)를 나타낸다. 하기 표 26에서 나타낸 바와 같이, 시료를 사용한 좌측 및 우측 시험 부위는 시험 2주 후부터 시험 전에 비해 통계적으로 유의한 수준($p < 0.05$)으로 눈가 주름지수가 감소하여 시험 시료가 눈가 주름 개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 판단되었다(일시적, 개인차 있음). 또한, 도 20은 주름 개선 지수 변화 추이를 나타낸 것이다(A. 눈가 주름지수 개선 정도, B. 눈자 구름 지수 개선율).

표 22

No.	좌측 시험 부위 [A.U.]			우측 시험 부위 [A.U.]		
	시험 전	시험 2주 후	시험 4주 후	시험 전	시험 2주 후	시험 4주 후
1	10.323	10.042	9.478	11.875	10.723	10.388
2	9.954	9.225	8.156	9.297	8.494	7.470
3	7.534	6.902	6.777	11.795	11.626	11.258
4	11.707	11.242	11.007	14.591	14.385	13.635
5	11.074	10.758	10.435	12.747	12.140	10.135
6	11.548	10.746	9.508	10.148	9.560	9.050
7	11.663	10.634	10.048	11.127	9.945	9.224
8	11.590	11.040	10.244	11.826	11.656	11.167
9	10.726	10.254	9.432	11.095	10.386	8.915
10	10.747	10.308	9.072	10.813	9.662	9.392
11	10.460	10.302	9.588	10.714	10.436	8.908
12	10.668	10.217	9.705	11.800	11.612	11.452
13	8.766	8.497	8.328	8.221	7.974	6.996
14	12.541	11.933	10.984	13.386	12.363	11.979
15	11.591	10.833	9.406	10.412	9.728	8.602
16	12.851	10.690	8.997	13.170	10.412	8.583
17	9.674	9.504	9.345	8.306	8.054	7.626
18	8.306	8.049	7.522	8.696	8.522	8.329
19	12.770	12.583	12.463	15.178	14.385	13.184
20	11.456	11.025	10.509	11.737	11.173	10.607
21	9.443	8.914	8.415	10.404	9.770	9.394
22	14.576	13.444	12.168	15.731	14.233	13.746

[0304]

표 23

구 분		평균 [A.U.]	표준편차	N	RJ	p-value	정규성
좌측 시험 부위	시험 전	10.91	1.607	22	0.987	>0.100	정규분포
	시험 2주 후	10.32	1.453	22	0.977	>0.100	정규분포
	시험 4주 후	9.617	1.363	22	0.987	>0.100	정규분포
우측 시험 부위	시험 전	11.50	2.054	22	0.984	>0.100	정규분포
	시험 2주 후	10.78	1.905	22	0.975	>0.100	정규분포
	시험 4주 후	10.00	1.943	22	0.978	>0.100	정규분포

[0305]

표 24

구분	요인	DF	Adj. SS	Adj. MS	F-value	p-value
좌측 시험 부위	Weeks	2	18.365	9.1827	50.64	<0.001
우측 시험 부위	Weeks	2	24.81	12.4039	49.24	<0.001

[0306]

표 25

구분	그룹화 정보*		
	시험 전	시험 2주 후	시험 4주 후
좌측 시험 부위	A	B	C
우측 시험 부위	A	B	C

* 문자를 공유하지 않는 평균들은 통계적으로 유의한($p<0.05$) 차이를 가진다.

[0307]

표 26

구분		측정 값 [A.U.]	개선율	p-value
좌측 시험 부위	시험 전	10.91	-	<0.001
	시험 2주 후	10.32***	5.34%	
	시험 4주 후	9.62***	11.83%	
우측 시험 부위	시험 전	11.50	-	<0.001
	시험 2주 후	10.78***	6.26%	
	시험 4주 후	10.00***	13.05%	

Significant probability : * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

[0308]

[0310] 3-2. 피부 이상증 발생 결과

[0311] 표 27에서 나타낸 바와 같이, 총 4주간의 시험기간 동안 22명의 피험자를 대상으로 미라클바이오 “햄프시드 발효 마스크팩” 시료의 눈가 주름 개선 효능 첨가 시험을 실시하였으며, 중도탈락자 없이 22명의 피험자가 모두 시험을 완료하였다.

표 27

구분	중반	부중	인설 생성	가려움	자통	작열감	뻣뻣함	따끔 거림	기타 이상증
경증	0	0	0	0	0	0	0	0	0
중등증	0	0	0	0	0	0	0	0	0
중증	0	0	0	0	0	0	0	0	0

시험기간 동안 특별한 이상 증상에 발생하지 않았다.

[0312]

[0314] 3-3. 제품사용 설문조사 결과

[0315] 표 28은 제품 사용 후 설문조사 결과를 나타낸 것이다.

표 28

(각 항목에 대해 1점부터 5점 사이로 점수를 매긴 후, 3점 이상으로 응답한 피험자의 인원 비율을 계산함)

No.	설 문 내 용	긍정 답변율 (%)	5 매우개선	4 개선	3 약간개선	2 자이없음	1 악화
1	제품 사용 후 눈가 주름이 개선되었다고 생각하십니까?	100%	6	9	7	0	0
2	제품 사용 후 피부가 촉촉하고 당기지 않게 되었다고 생각하십니까?	91%	8	12	0	2	0
3	제품 사용 후 제품 사용 부위가 탄력 있고 몽글몽글하다고 생각하십니까?	91%	6	14	0	2	0
4	제품 사용 후 피부톤이 맑아졌다고 생각하십니까?	95%	7	10	4	0	1
5	제품 사용 후 건조한 피부가 개선되었다고 생각하십니까?	91%	7	9	4	2	0
6	제품 사용 후 촉촉하고 윤기가 흐르는 피부가 되었다고 생각하십니까?	91%	6	11	3	2	0
7	제품 사용 후 피부가 생기 있고 컨디셔닝이 좋아졌다고 생각하십니까?	95%	5	12	4	1	0
8	제품 사용 시 끈적임 없이 빠르게 흡수가 됩니까?	100%	9	10	3	0	0
9	제품 사용 후 화장이 들뜨지 않게 되었다고 생각하십니까?	100%	9	9	4	0	0
10	제품의 향은 좋았습니까?	95%	6	7	8	0	1
No.	설 문 내 용	긍정 답변율 (%)	예		아니오		
1	제품 사용 중 피부 자극 및 가려움 등 트러블이 없었습니까?	100%	22		0		
2	제품 사용에 만족하십니까?	86%	19		3		
3	본 제품이 적당한 가격에 출시된다면 구매의사가 있습니까?	82%	18		4		
4	본 제품에 개선되어야 할 점이 있다면 어떠한 것 입니까? (자세히 기술) 밀러지 불균(2), 건조함(3), 끈적임(3), 향(1), 크기가 작음(3), 따가움(1), 흡수가 느림(2), 에센스 양 부족(1)						

[0316]

[0318] **결과 요약**

[0319] 1. 정량적 목표 달성

[0320] 원료는 환각물질(THC)을 제거한 캐나다산 햄프시드를 사용하였고, Lactobacillus casei를 균주로 선정하여 도 2와 같은 공정을 거쳐 한국기능식품연구원에서 햄프시드 추출물의 발효 전, 후 일반성분 분석 시험을 수행하였다. 그 결과는 아래와 같다.

[0321] 발효 전 후 영양성분 함량 변화는 탄수화물 5.48 %, 조단백질 32.11 %, 조지방 49.67 %, 수분 6.45 %, 회분

6.29 %의 함량을 보였으며, 열량은 597.39 Kcal/100g으로 분석되었다.

[0322] 발효 전 후 건조함량 및 pH, 햄프시드 추출물 중 중금속 및 환경호르몬 함량은 화장품 규격에 적합하였다.

[0323] 발효 전 후 햄프시드 추출물 중 아미노산 함량 변화는 로이신이 670 %로 가장 많이 유리 아미노산이 증가하였고, 아스파라긴산이 609 %로 두 번째로 가장 많은 증가량을 보였으며, 유리 아미노산의 함량 변화는 평균 약 74 %로 발효 후 상당량의 유리 아미노산의 증가를 나타내었다.

[0325] 2. 눈가 주름개선 시험 결과

[0326] 눈가 주름개선 시험은 대한피부과학연구소에서 진행하였으며, 그 결과는 아래와 같다.

[0327] 1) 주름 지수를 나타내는 Indentation index(Wrinkle: small) 측정 값은 시험 전과 비교하여 시험 2주 후, 4주 후 좌측 시험 부위에서 5.34%, 11.83 % 개선율을 나타내었고, 우측 시험 부위에서 6.26 %, 13.05 %의 개선율을 나타내어 시험 시료로 인해 눈가 주름이 개선됨을 확인하였다.

[0328] 2) 시험 기간 동안 모든 피험자로부터 피부 이상반응은 관찰되지 않았다.

[0329] 결론적으로 미라클바이오 “햄프씨드 발효 마스크팩” 시료를 사용한 모든 시험 부위는 시험 전에 비해 통계적으로 유의한 수준($p < 0.05$)으로 눈가 주름 지수가 감소하여, 시험 시료가 눈가 주름 개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 판단되었으며, 모든 피험자들에서 특별한 이상반응이 관찰 되지 않아 안전한 시료로 확인되었다.

[0331] 3. In Vitro 시험결과

[0332] DPPH, ABTS, collageage, Tyrosinase, elastase, MTT assay, Cell No 검사를 대구테크노파크에서 진행하였으며, 그 결과는 아래와 같다.

[0333] 1) 도 9(DPPH radical activity(Electron donating abilities, EDA))를 참고하여 햄프시드의 발효 및 비발효 추출물을 이용한 결과로 항산화 효과 시험인 DPPH radical 소거능 실험 결과 1000 μ g/mL에서 60 %이상의 소거 효과를 확인할 수 있었으며 dose dependent의 결과를 확인함으로써 우수한 항산화효과를 가짐을 확인하였다.

[0334] 2) 도 10(ABTS+ radical cation 소거작용)을 참고한 햄프시드 추출물의 발효 및 비발효 물질을 이용한 ABTS 소거능을 측정한 결과 1000 μ g/mL에서 85 %의 효과를 나타내어 소거능이 우수함을 확인하였다.

[0335] 3) 도 11(Collagenase 저해활성)을 참고한 발효 물질이 collagenase 저해 효능에 높게 나타났으며 10~1000 μ g/mL의 농도로 처리하여 실험한 결과, 50 μ g/mL에서 21 % 이상의 저해 효과를 나타내었으며 1000 μ g/mL에서는 52 %로 햄프시드 추출물의 농도를 높일수록 저해력이 높게 나타남을 확인할 수 있었다.

[0336] 4) 도 12(Elastase 저해활성)를 참고한 Elastase 저해 활성 측정 결과 미약한 효과가 나타남을 확인하였다.

[0337] 5) 도 13(Tyrosinase 저해활성)을 참고한 미백 효과 실험인 Tyrosinase 측정결과 효능이 떨어짐을 확인하였다. Positive control인 Ascorbic acid에 비해 햄프시드 추출물의 발효 및 비발효 물질은 효능이 미약함을 확인하였다.

[0338] 6) 도 14(MTT assay)를 참고한 RAW264.7 세포에 대한 햄프시드 추출물 및 햄프시드 발효 추출물에 대한 독성실험은 100 μ g/mL에서 84 % 와 79 %의 안정성을 갖는 것을 확인하였다.

[0339] 7) 도 15(Nitric oxide(NO) 생성측정)를 참고한 Nitric acid 생성 저해 활성을 통한 항염 효과를 측정한 결과 햄프시드 발효 물질은 100 μ g/mL 농도에서 100 % Nitric acid 생성 제거 효율을 나타냄을 확인하였다.

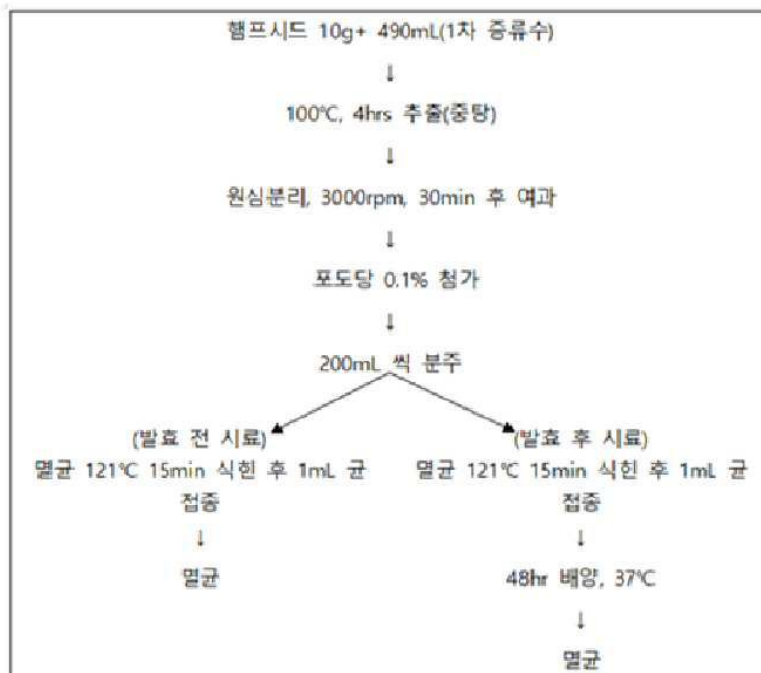
[0341] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

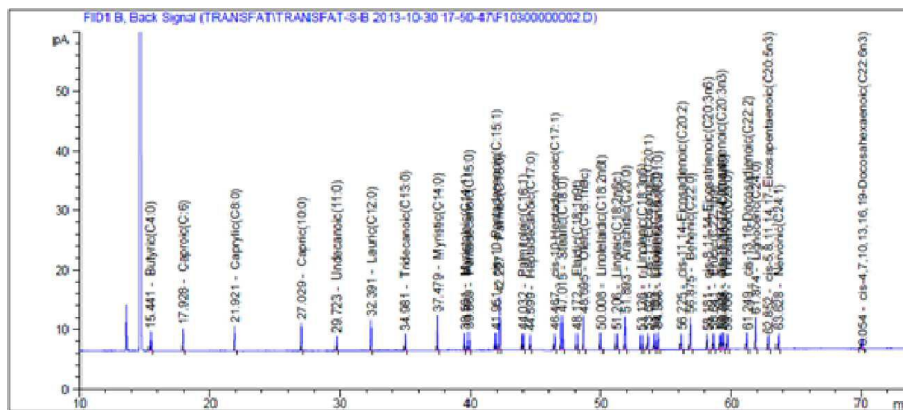
도면1

조건	사진	유산균수
멸균된 햄프시드 추출물에 유산균 배양액 1mL 접종 (초기 값, 0시간)		1.8×10^2 /mL
멸균된 햄프시드 추출물에 유산균 배양액 1mL 접종 (18시간 후)		7.7×10^4 /mL

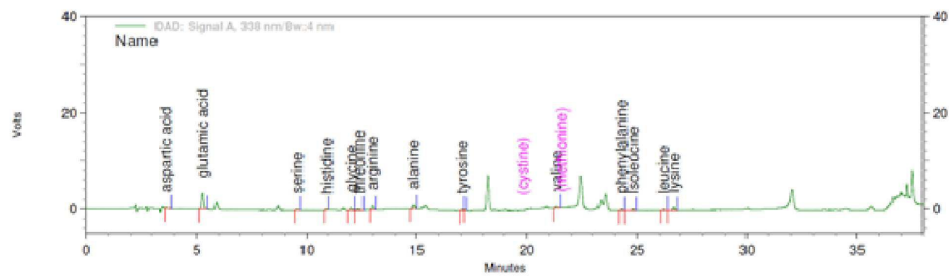
도면2



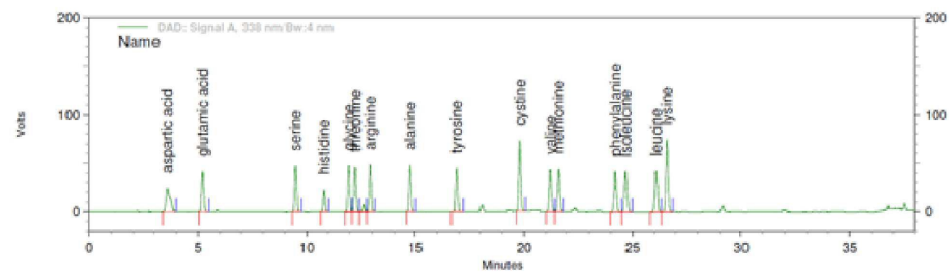
도면3



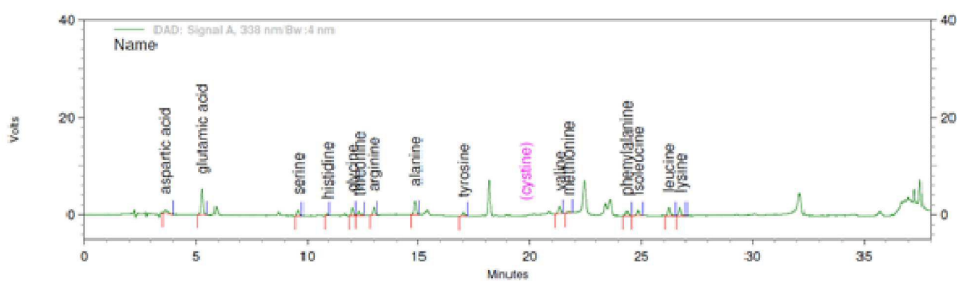
도면5



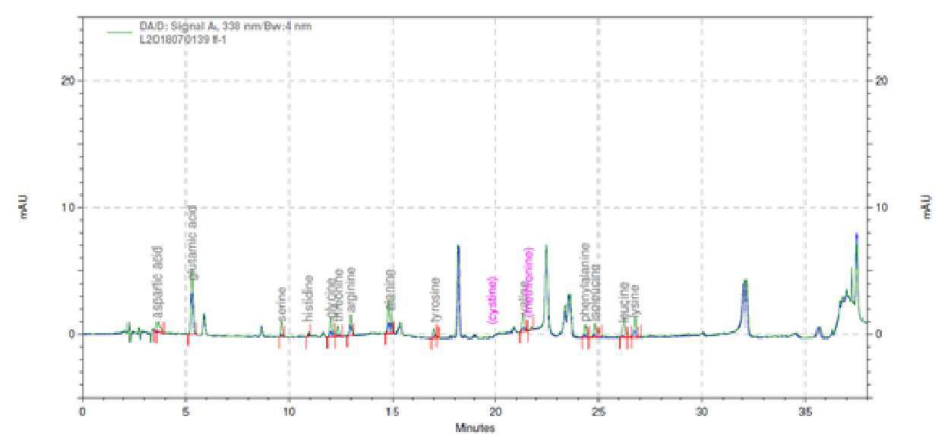
도면6



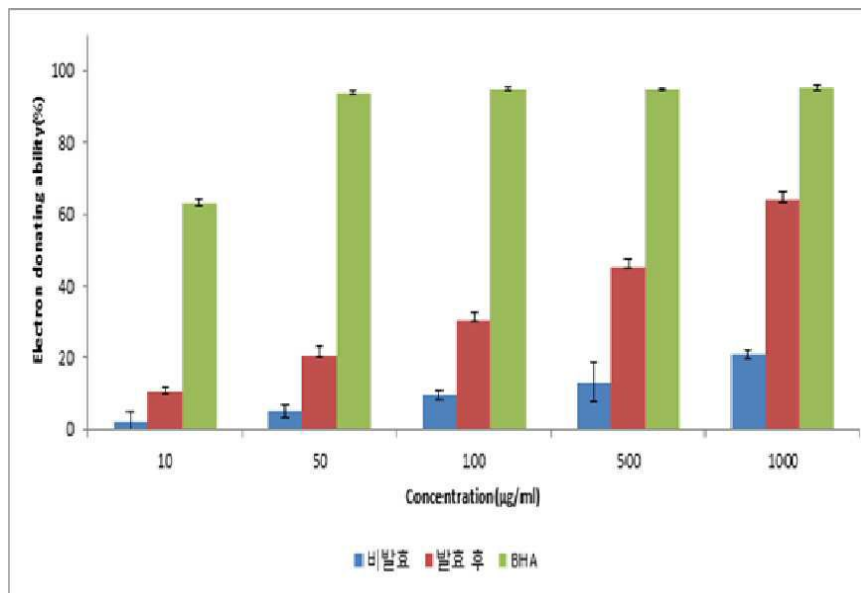
도면7



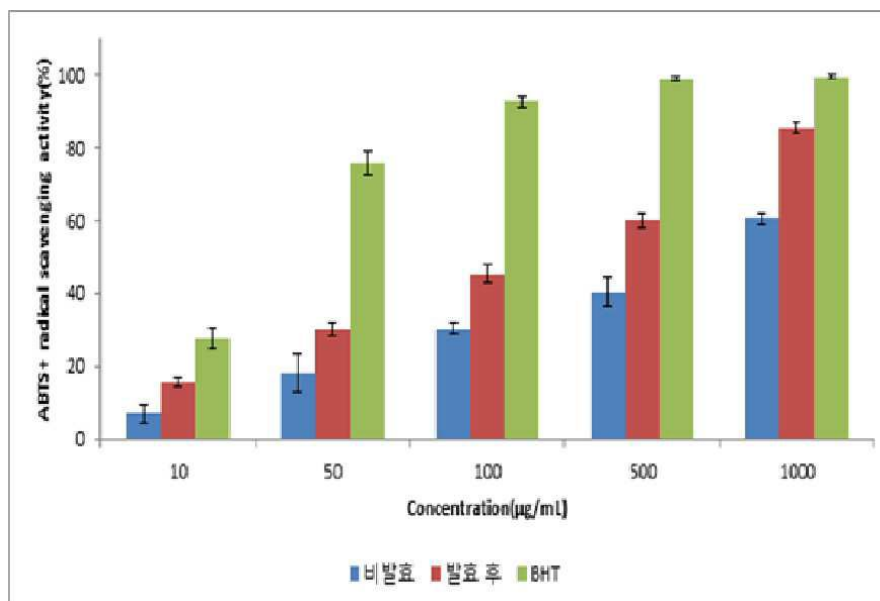
도면8



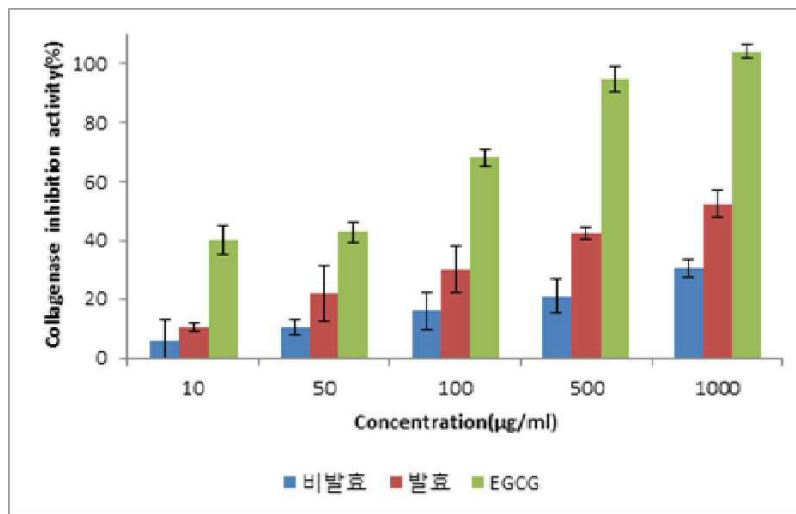
도면9



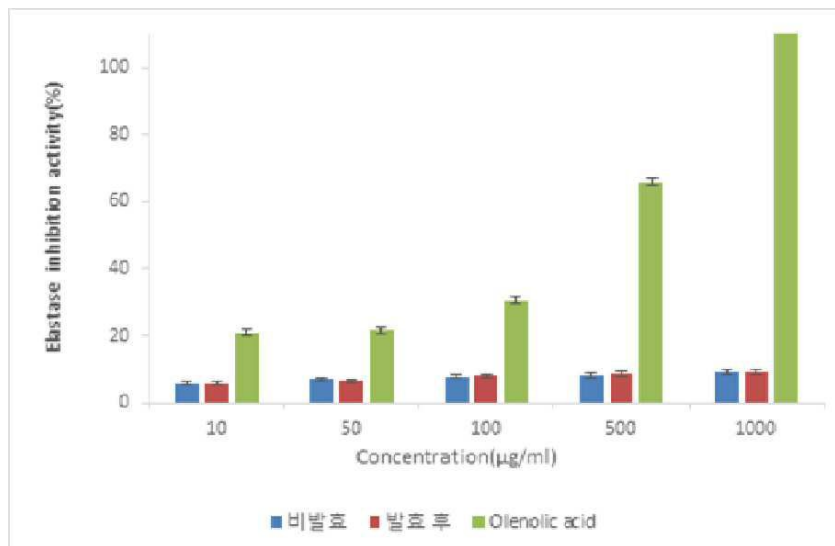
도면10



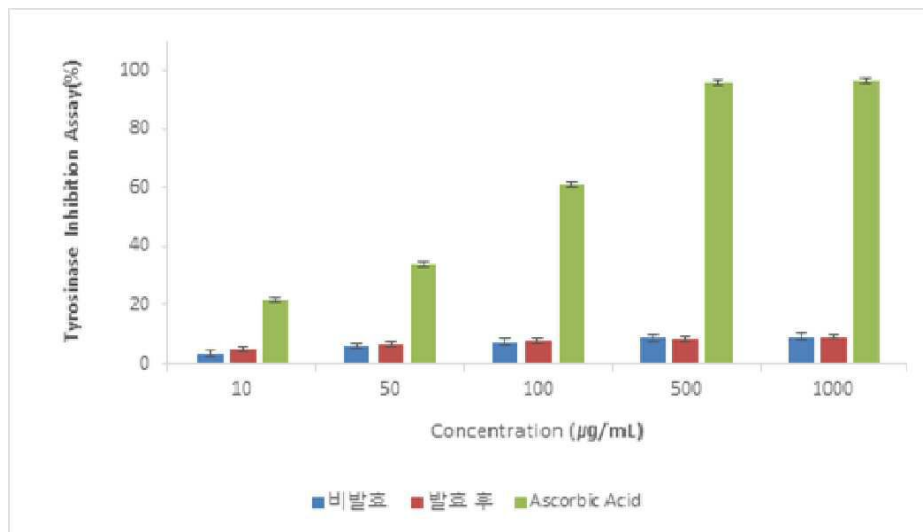
도면11



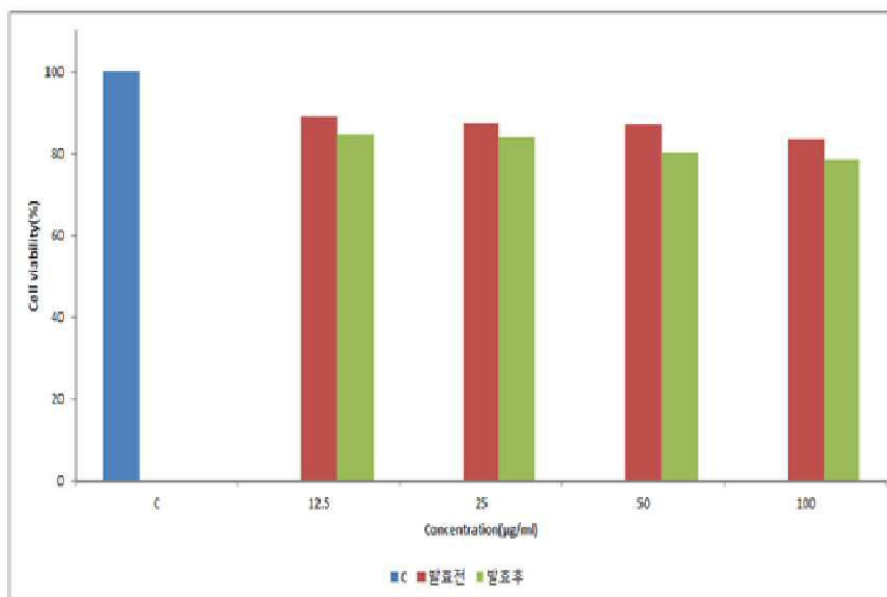
도면12



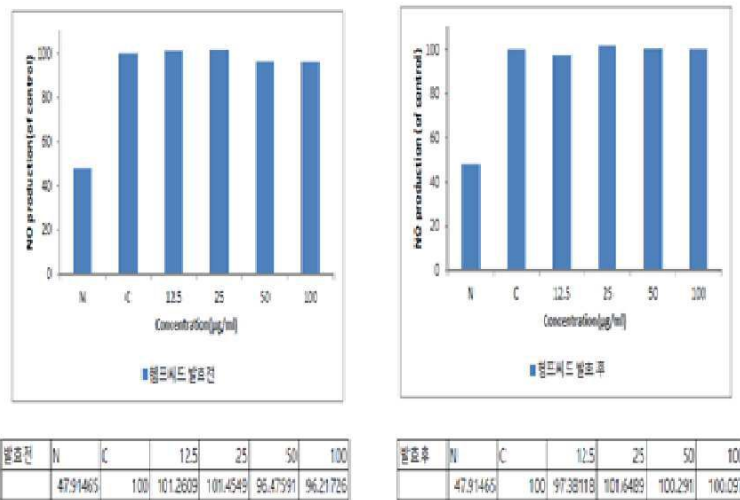
도면13



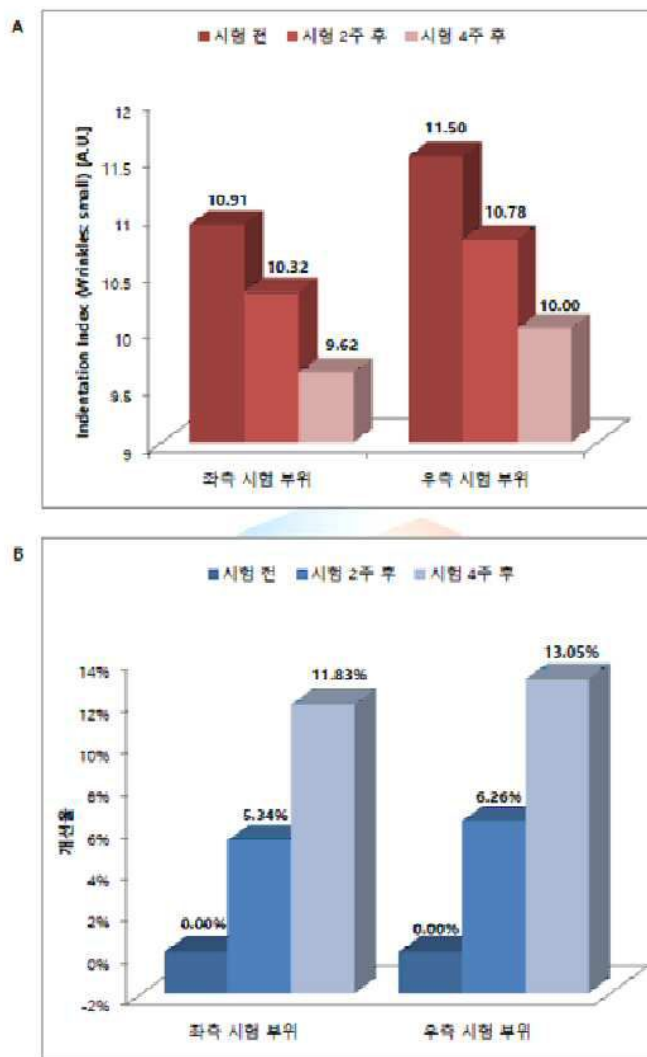
도면14



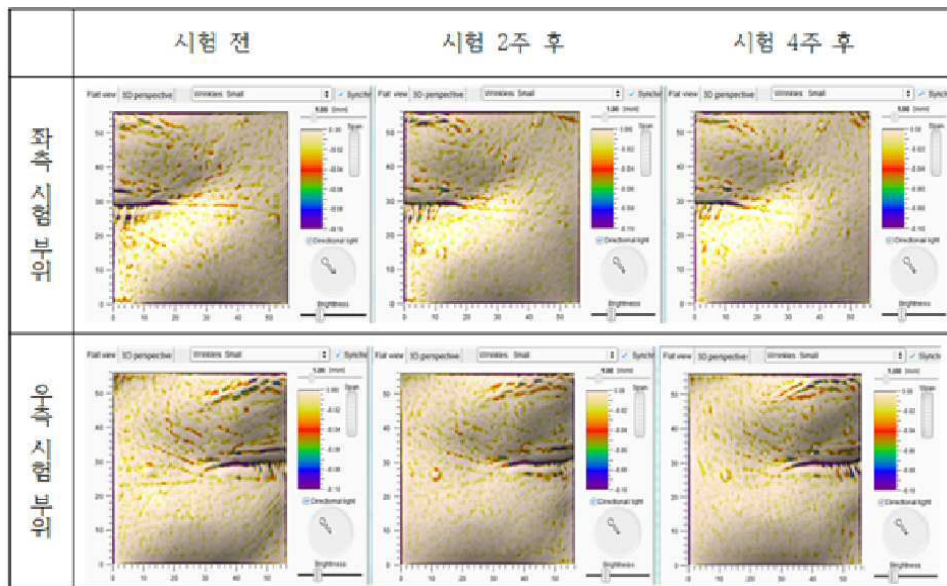
도면15



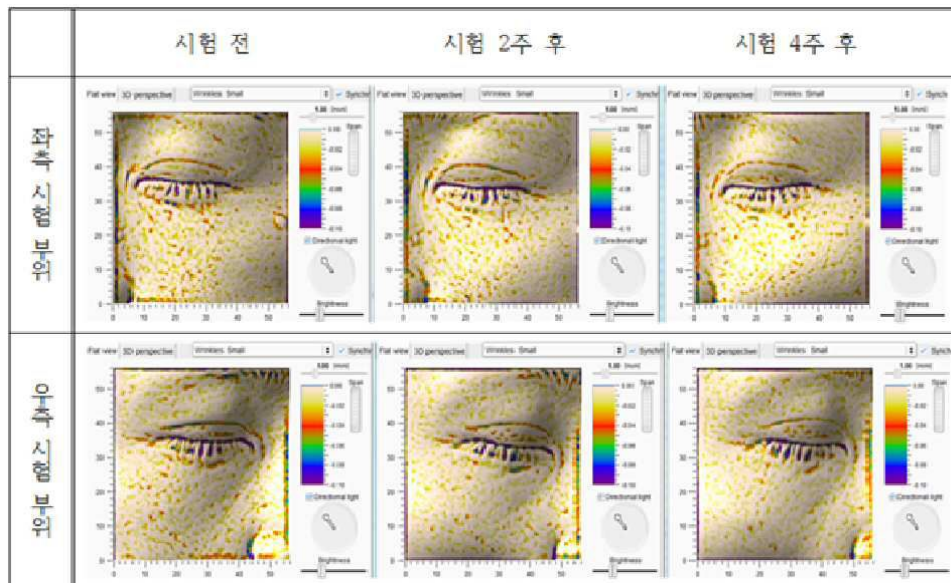
도면16



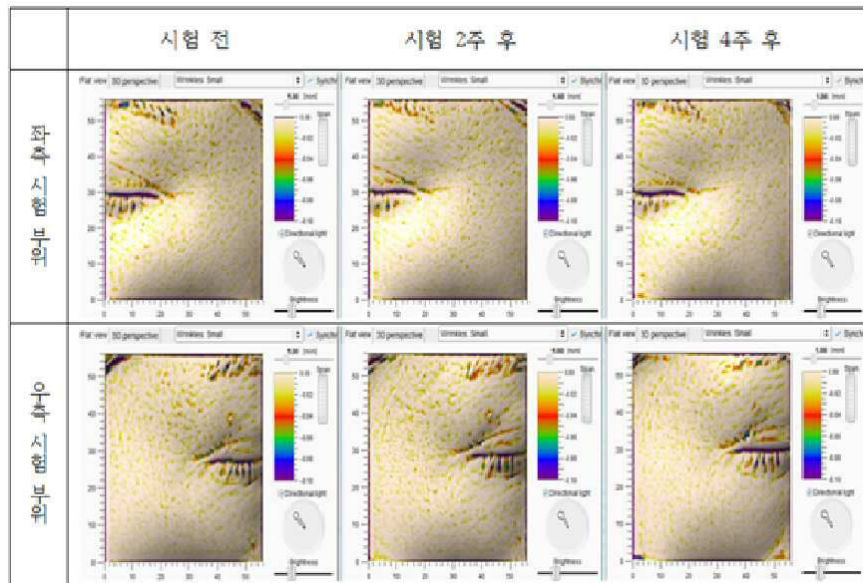
도면17a



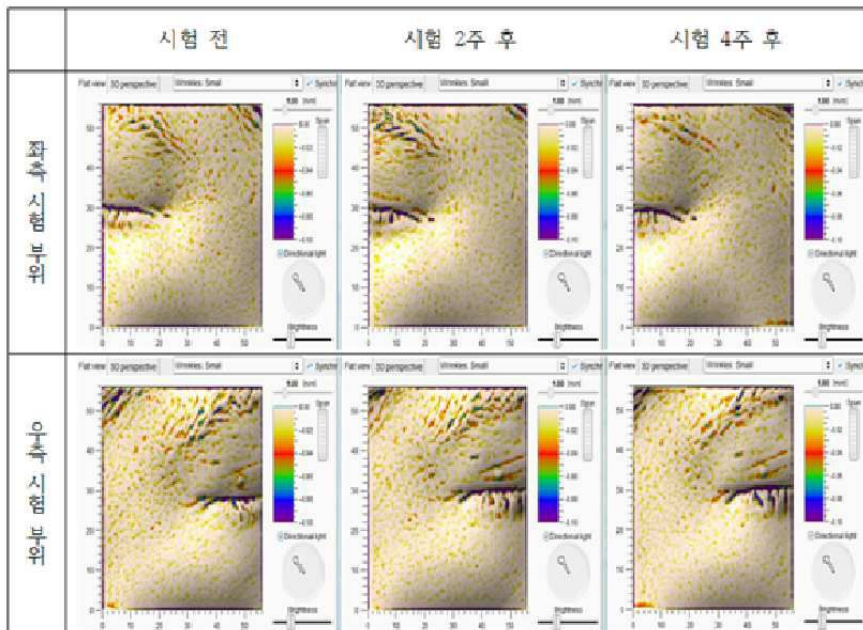
도면17b



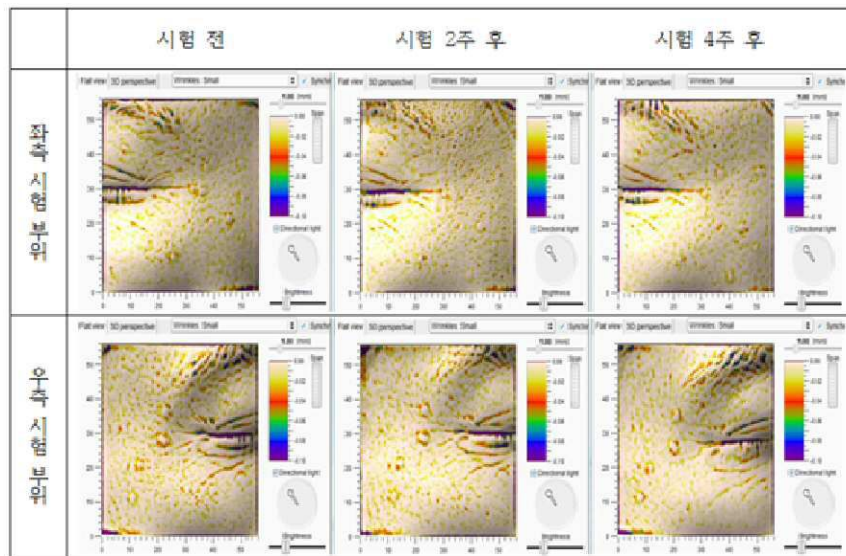
도면17c



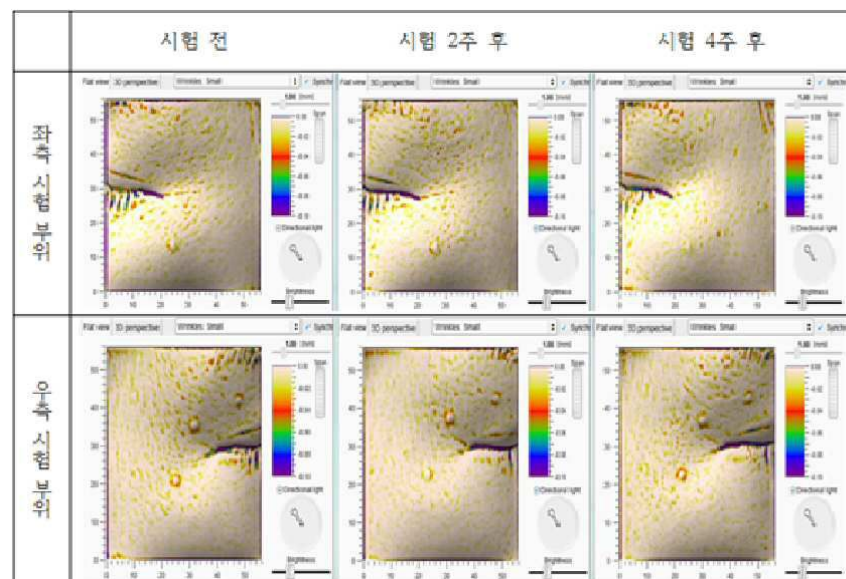
도면17d



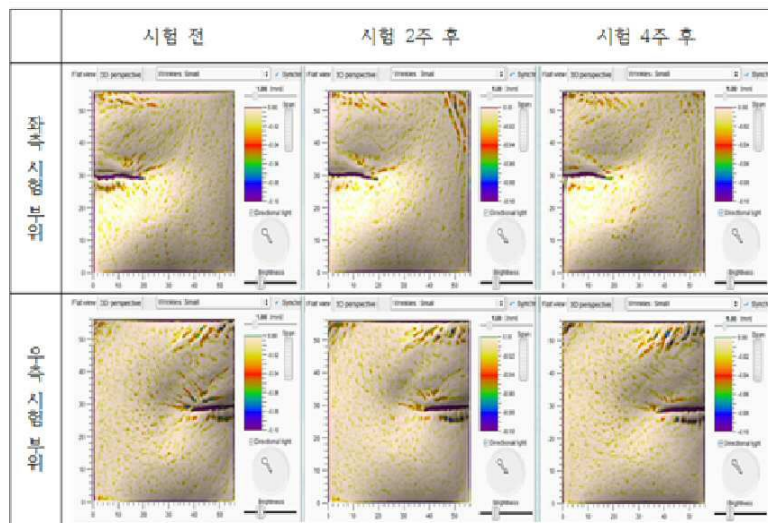
도면17e



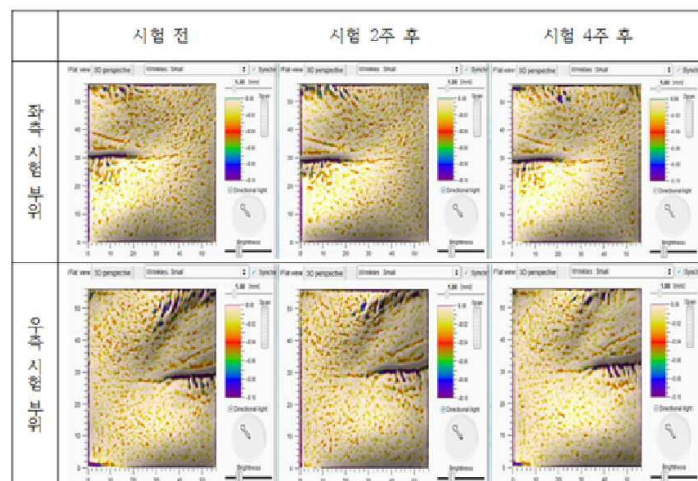
도면17f



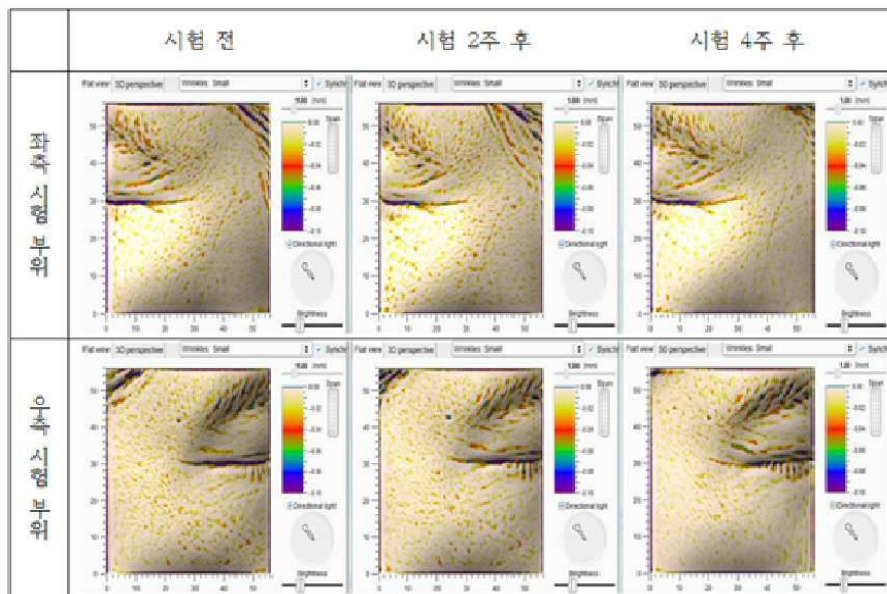
도면17g



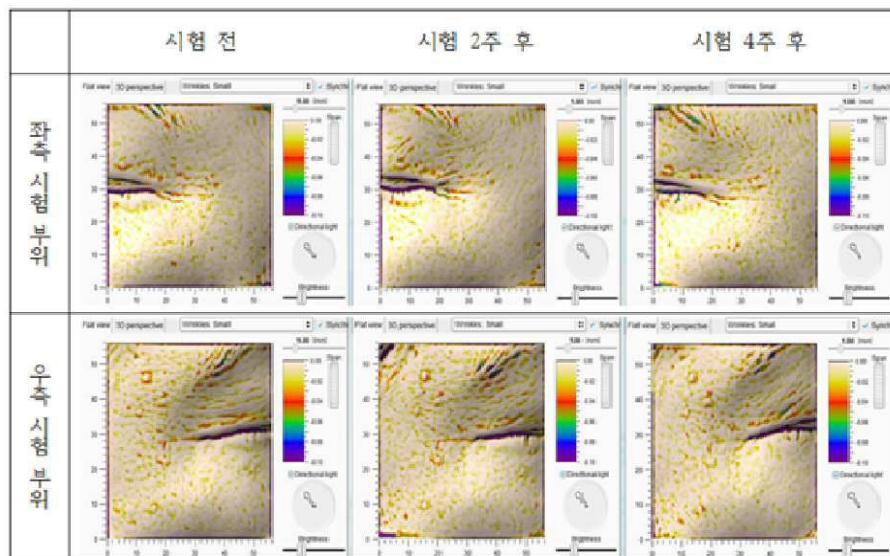
도면17h



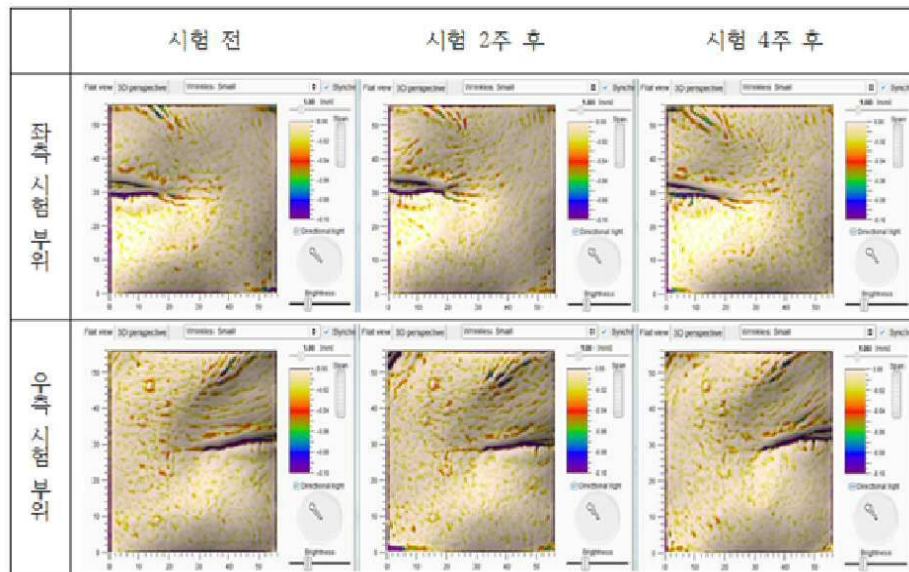
도면17i



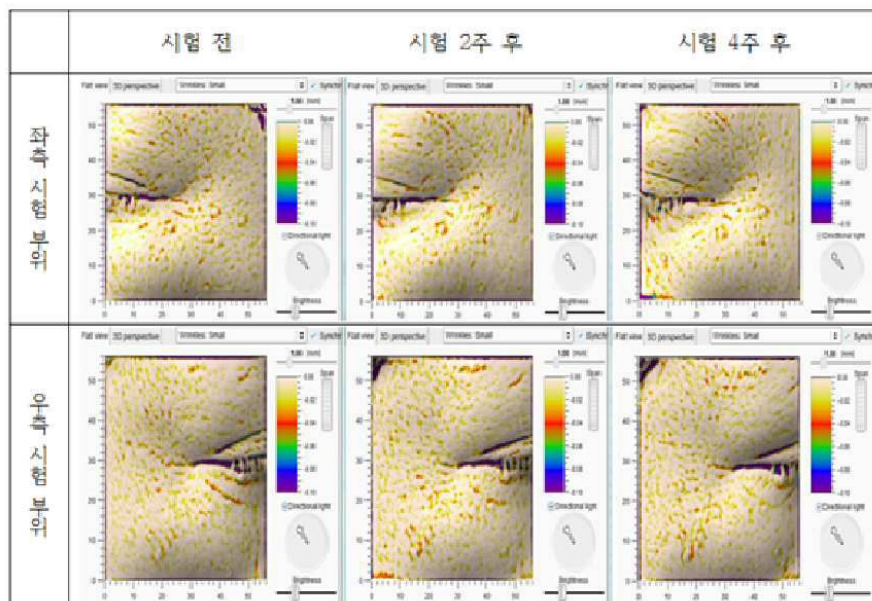
도면17j



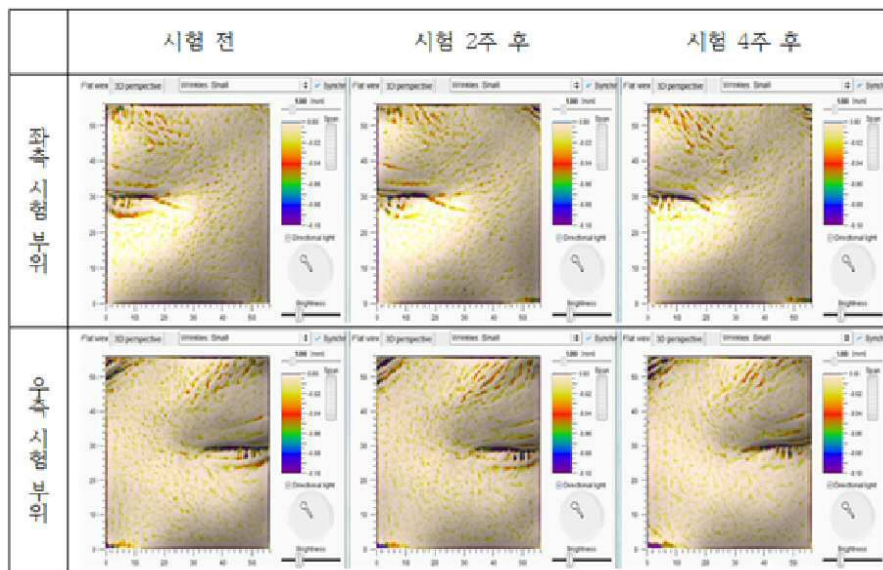
도면17k



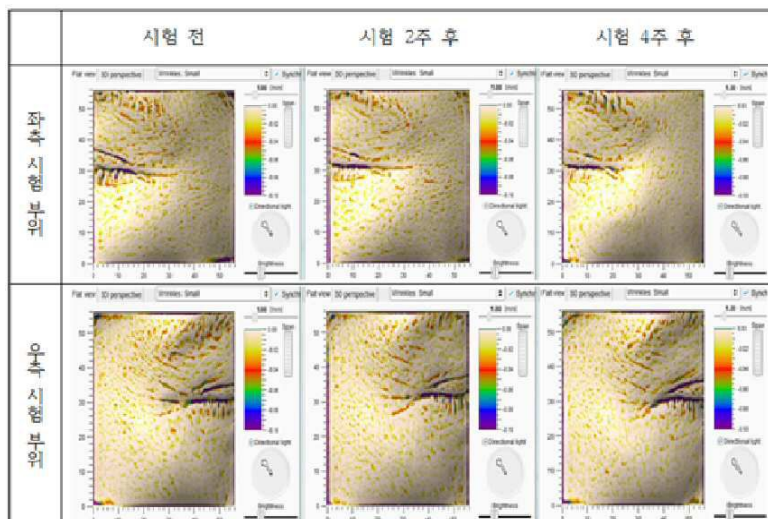
도면17l



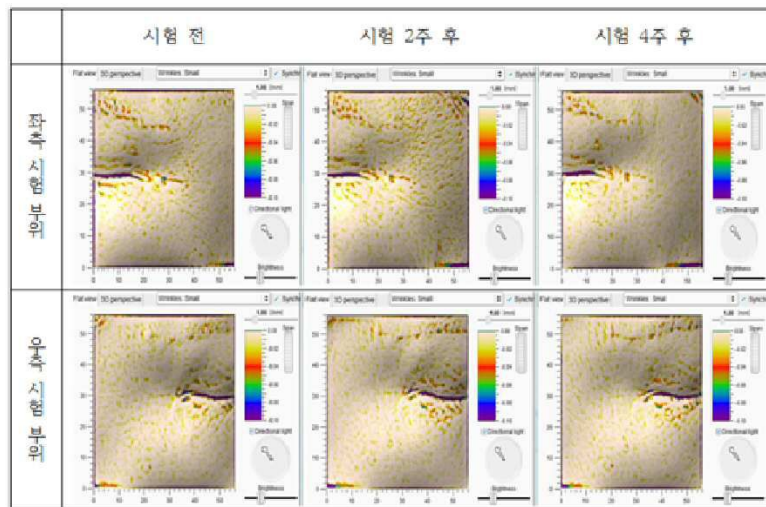
도면17m



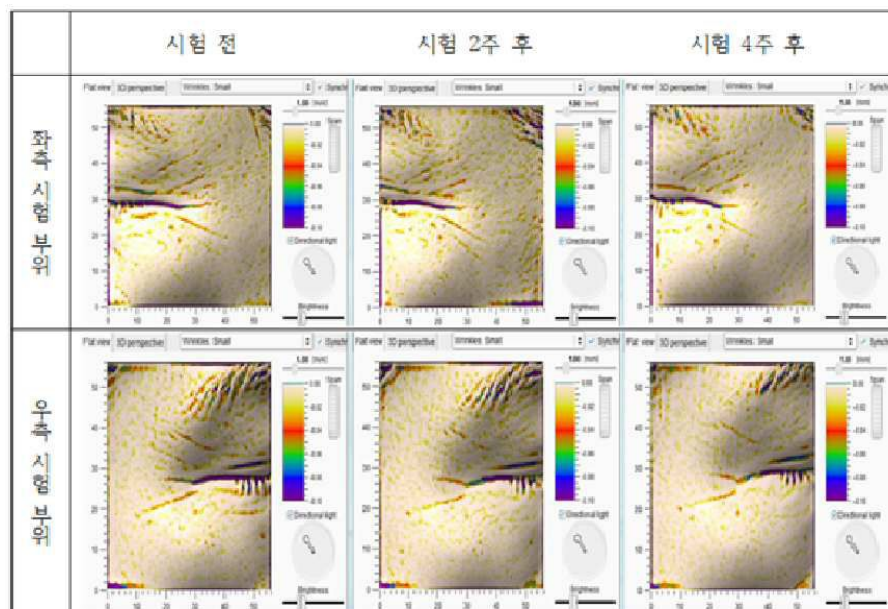
도면17n



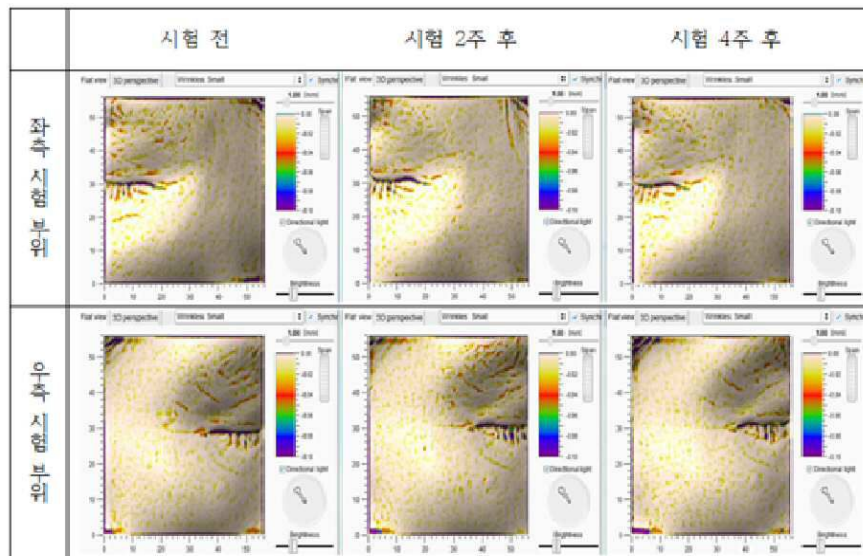
도면17o



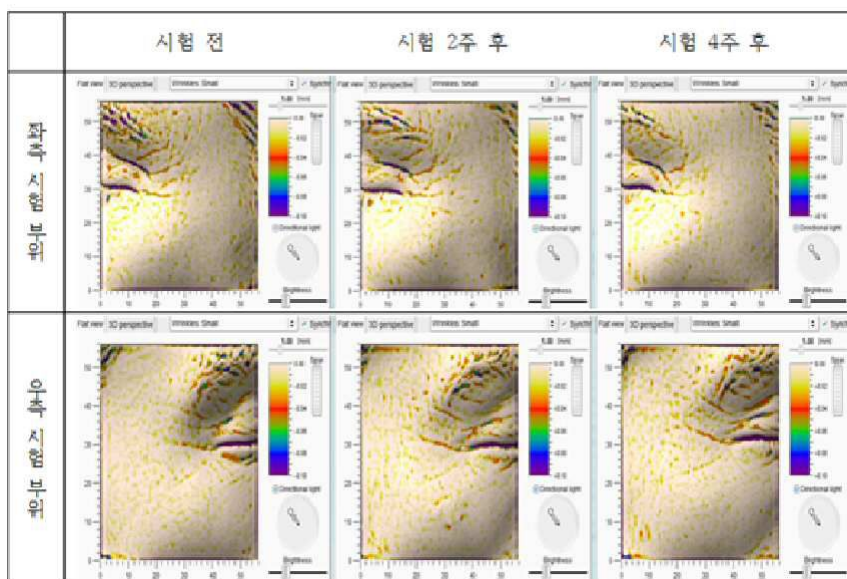
도면17p



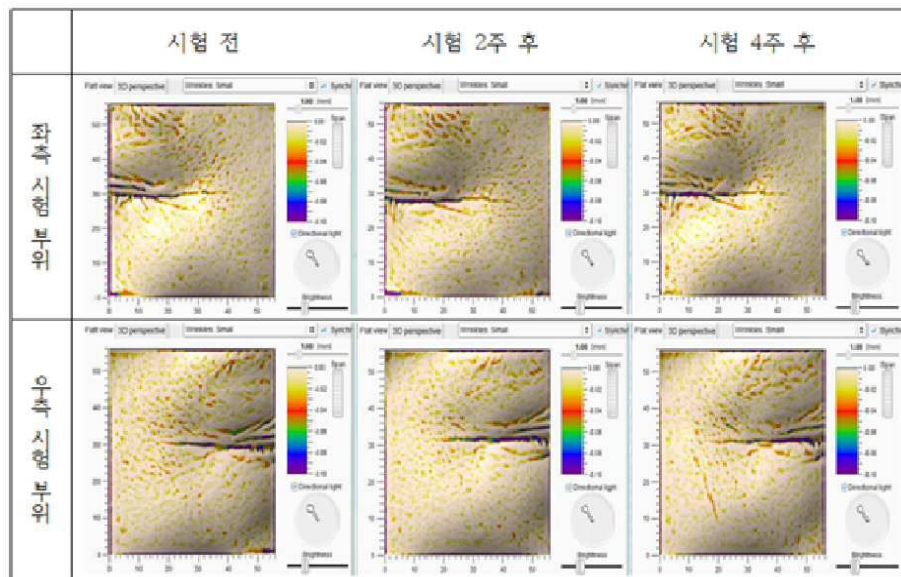
도면17q



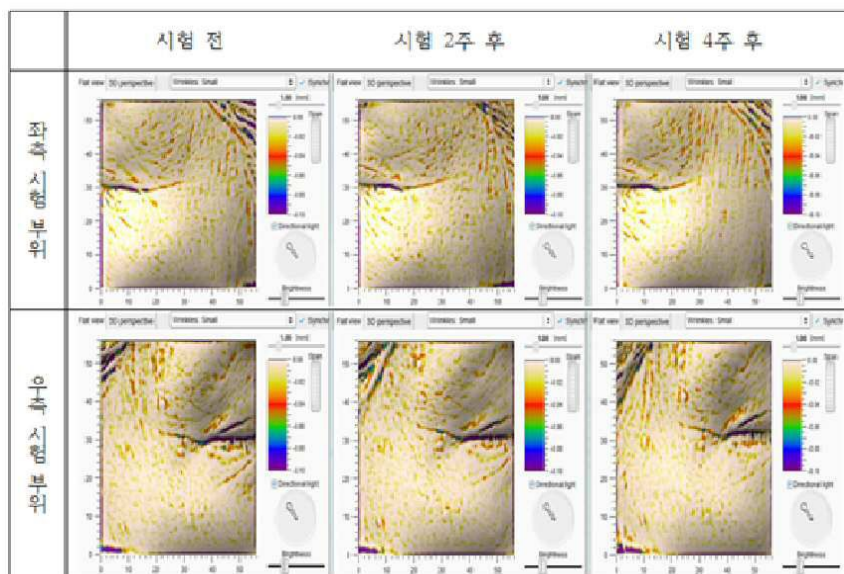
도면17r



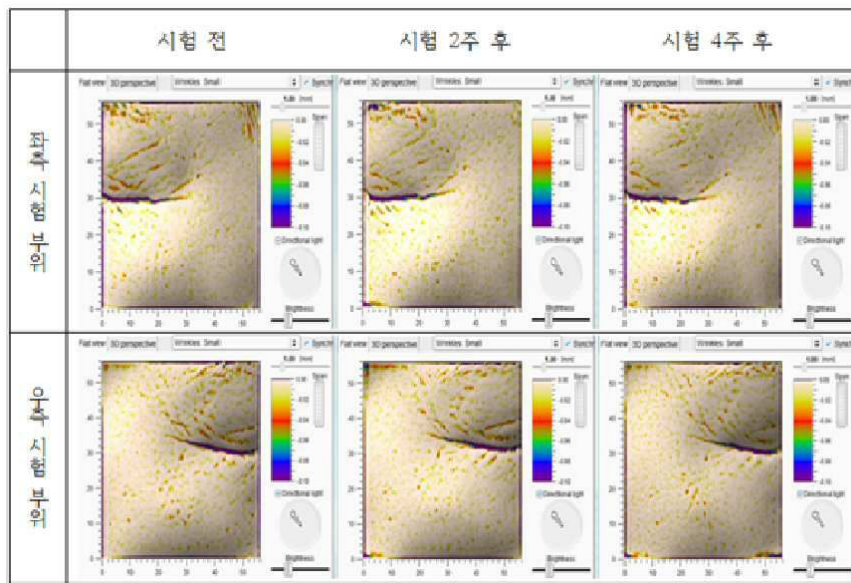
도면17s



도면17t



도면17u



도면17v

