



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월30일
(11) 등록번호 10-2094846
(24) 등록일자 2020년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) A61K 8/96 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A61K 8/965 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0143359
(22) 출원일자 2018년11월20일
심사청구일자 2018년11월20일
(56) 선행기술조사문헌
KR101463943 B1*
KR101667284 B1*
KR101710005 B1*
KR1020130052288 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
서원대학교산학협력단
충청북도 청주시 흥덕구 무심서로 377-3 (모충동, 서원대학교)
주식회사 에네스티
충청북도 충주시 충원대로 55 (단월동, (주)에네스티)
(72) 발명자
남개원
충청북도 청주시 서원구 청남로2040번길 75(수곡동)
경기열
대전광역시 유성구 엑스포로123번길 46-15 스퀘트시티주상복합아파트 501-302호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인지담

전체 청구항 수 : 총 5 항

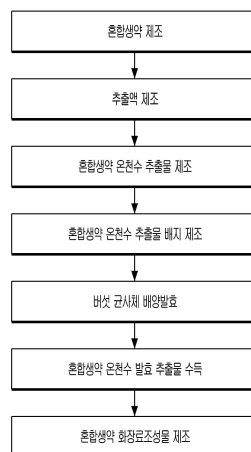
심사관 : 윤미란

(54) 발명의 명칭 **피부 개선에 효능이 있는 혼합생약 화장료 조성물의 제조방법 및 이를 통해 제조된 혼합생약 화장료 조성물**

(57) 요약

오미자, 황기, 지황 및 감초의 혼합생약 화장료 조성물의 제조방법 및 이를 통해 제조된 혼합생약 화장료 조성물을 개시한다. 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 오미자, 황기, 지황 및 감초의 혼합생약 온천수 발효 추출물은 세포 생존율 95% 이상의 우수한 안정성을 나타내고, 멜라닌 색소 합성 저해 효과가 뛰어나며, 인간 피부세포에 대한 콜라겐 합성 촉진효과가 뛰어나고, 항산화 효과가 뛰어나다. 또한, 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 오미자, 황기, 지황 및 감초의 혼합생약 온천수 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 혼합생약 화장료 조성물은 피부 자극도가 매우 낮으며, 인체 피부에 사용했을 때, 피부 미백효과 및 주름개선효과가 뛰어나고, 사용감 또한 우수하므로 피부 개선을 위한 화장품 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61Q 19/02 (2013.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

A61K 2800/522 (2013.01)

A61K 2800/59 (2013.01)

A61K 2800/85 (2013.01)

(72) 발명자

맹지혜

충청북도 청주시 흥덕구 풍산로118번길 3층

우성주

충청북도 충주시 금가면 강수로 95

지준철

충청북도 충주시 금가면 강수로 95

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 000000

부처명 충북테크노파크

연구관리전문기관 서원대학교 산학협력단

연구사업명 충북테크노파크 한·양방 융복합 연구지원사업

연구과제명 한방 제제와 온천수를 활용한 주름 개선용 진동패치 개발

기여율 1/1

주관기관 ㈜에네스티

연구기간 2016.08.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

오미자 20 내지 30 wt%, 황기 20 내지 30 wt%, 지황 20 내지 30 wt% 및 감초 20 내지 30 wt%를 분쇄하여 혼합생약을 제조하는 단계;

상기 혼합생약을 수온이 50 내지 55℃이고 pH가 8 내지 8.5이고, 라듐 및 유탄을 포함하는 것을 특징으로 하는 온천수로 추출하여 추출액을 제조하는 단계;

상기 추출액을 건조하여 혼합생약 온천수 추출물을 제조하는 단계;

상기 혼합생약 온천수 추출물을 정제수, 포도당 및 효모 추출물과 혼합하여 액체배지 조성물을 제조하는 단계;

상기 액체배지 조성물에 우장지버섯 균사체를 첨가한 후 배양하여 발효시키는 단계;

상기 액체배지 조성물의 버섯 균사체를 제거한 후 건조하여 혼합생약 온천수 발효 추출물을 수득하는 단계; 및

상기 혼합생약 온천수 발효 추출물 및 화장료 제형 혼합물을 혼합하는 단계

를 포함하는 혼합생약 화장료 조성물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 온천수는 수안보 온천수인 혼합생약 화장료 조성물의 제조방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 우장지버섯 균사체는 온천수를 포함하는 배지에 배양한 것을 특징으로 하는 혼합생약 화장료 조성물의 제조방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 혼합생약 온천수 발효 추출물의 중량비는 혼합생약 화장료 조성물 중량을 기준으로 1 내지 10 wt%인 혼합생약 화장료 조성물의 제조방법.

청구항 8

제1항의 제조방법에 따라 제조되는, 오미자, 황기, 지황 및 감초의 혼합생약 온천수 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 혼합생약 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피부 개선에 효능이 있는 혼합생약 발효 추출물을 포함하는 화장품 조성물의 제조방법 및 이를 통해 제조된 혼합생약 화장품 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 신체의 최외각에 존재하며 외부로부터 몸을 보호하는 중요한 기관이다. 모든 생명체의 모든 기관은 나이가 들어감에 따라 노화가 진행되는데 피부 또한 예외가 아니다. 일반적으로 피부노화는 내인성 노화(intrinsic aging)와 광노화(photoaging)와 같은 외인성 노화로 나뉘는데, 내인성 노화는 나이에 따라 자연적으로 노화가 일어나는 것을 의미하며 광노화는 햇빛에 의해 나타나는 노화현상을 말한다.

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

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

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

[0006] 앞서 설명한 항산화제들을 화장품에 적용함에 있어서, 상기 화합물들이 불안정하기 때문에 장기간의 유통기간을 갖는 화장품에 적용이 쉽지 않고 과량 사용 시 피부에 부작용을 일으킬 수 있는 문제점이 있다. 그러므로 주름 개선이나 미백효과가 우수한 화장품을 개발하기 위해서는 제형 내에서 안정하면서 피부 부작용이 적은 성분들을 포함하는 것이 바람직하다.

[0007] 이와 관련하여, 한국공개특허 제2012-0021766호에는 유화제를 이용한 유화기술을 적용하여 아산지역 온천수를 함유하는 액정형크림에 관한 내용이 개시되어 있다. 그러나, 상기 선행 특허문헌에서는 아산지역 온천수를 화장품 제조시에 단순 첨가하는 것으로 본 발명과 같이 온천수를 이용한 혼합생약의 추출물을 버섯균사체로 발효시킨 발효추출물에 대한 내용은 전혀 기재된 바가 없다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 피부에 안전하면서도, 피부 미백, 주름 개선 및 노화지연 효과가 우수한 화장품을 개발하기 위하여 예의 연구를 거듭한 결과, 예로부터 전통적으로 한방 약재로 사용되어온 천연물질 중에서 몇 가지 생약의 복합물이 우수한 항산화능 및 콜라겐 합성능이 있는 것을 알게 되었으며, 특별히 이들 복합물의 발효 추출물이 각각의 약재를 사용한 경우보다 그 효과가 현저히 상승하는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2012-0021766호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 전술한 문제를 해결하고자 안출된 것으로서, 본 발명의 일 실시예는 피부 개선에 효능이 있는 혼합생약 화장료 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명의 일 실시예는 혼합생약 화장료 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 한정되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 전술한 기술적 과제를 달성하기 위한 기술적 수단으로서, 본 발명의 일 측면은 오미자, 황기, 지황 및 감초를 분쇄하여 혼합생약을 제조하는 단계, 상기 혼합생약을 온천수, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 추출액을 제조하는 단계, 상기 추출액을 건조하여 혼합생약 온천수 추출물을 제조하는 단계, 상기 혼합생약 온천수 추출물을 정제수, 포도당 및 효모 추출물과 혼합하여 액체배지 조성물을 제조하는 단계, 상기 액체배지 조성물에 버섯 균사체를 첨가한 후 배양하여 발효시키는 단계, 상기 액체배지 조성물의 버섯 균사체를 제거한 후 건조하여 혼합생약 온천수 발효 추출물을 수득하는 단계 및 상기 혼합생약 온천수 발효 추출물 및 화장료 제형 혼합물을 혼합하는 단계를 포함하는 혼합생약 화장료 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0014] 여기서, 상기 온천수는 수안보 온천수일 수 있다.
- [0015] 상기 온천수는 수온이 50 내지 55℃이고, pH가 8 내지 8.5이고, 라듐 및 유황을 포함하는 것일 수 있다.
- [0016] 상기 버섯 균사체는 우장지버섯(*Antrodia Coaphorata*) 균사체일 수 있다.
- [0017] 상기 버섯 균사체는 온천수를 포함하는 배지에 배양한 것일 수 있다.
- [0018] 상기 혼합생약은 혼합생약의 총 중량을 기준으로 오미자 20 내지 30 wt%, 황기 20 내지 30 wt%, 지황 20 내지 30 wt% 및 감초 20 내지 30 wt%로 혼합되는 것일 수 있다.
- [0019] 상기 혼합생약 온천수 발효 추출물의 중량비는 혼합생약 화장료 조성물 중량을 기준으로 1 내지 10 wt%일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명의 다른 일측면은 오미자, 황기, 지황 및 감초의 혼합생약 온천수 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 혼합생약 화장료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 오미자, 황기, 지황 및 감초의 혼합생약 온천수 발효 추출물은 피부세포에 대한 독성 측정 실험에서 확인할 수 있듯이 세포 생존율 95% 이상의 우수한 안정성을 나타내고, 멜라닌 색소 합성 저해 효과가 뛰어나며, 인간 피부세포에 대한 콜라겐 합성 촉진효과가 뛰어나고, 항산화 효과가 뛰어나다. 또한, 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 오미자, 황기, 지황 및 감초의 혼합생약 온천수 발효 추출물을 유효 성분으로 함유하는 혼합생약 화장료 조성물은 피부 자극도가 매우 낮으며, 인체 피부에 사용했을 때, 피부 미백 효과 및 주름개선효과가 뛰어나고, 사용감 또한 우수하므로 피부 개선을 위한 화장품 등에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명의 일측면에 따른 혼합생약 화장료 조성물 제조방법을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에

서 설명하는 실시예에 의해 본 발명이 한정되지 않으며 본 발명은 후술할 청구범위의 의해 정의될 뿐이다.

- [0025] 덧붙여, 본 발명에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 발명의 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 '포함'한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0027] 본 발명의 일측면은 오미자, 황기, 지황 및 감초를 분쇄하여 혼합생약을 제조하는 단계, 상기 혼합생약을 온천수, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 추출액을 제조하는 단계, 상기 추출액을 건조하여 혼합생약 온천수 추출물을 제조하는 단계, 상기 혼합생약 온천수 추출물을 정제수, 포도당 및 효모 추출물과 혼합하여 액체배지 조성물을 제조하는 단계, 상기 액체배지 조성물에 버섯 균사체를 첨가한 후 배양하여 발효시키는 단계, 상기 액체배지 조성물의 버섯 균사체를 제거한 후 건조하여 혼합생약 온천수 발효 추출물을 수득하는 단계 및 상기 혼합생약 온천수 발효 추출물 및 화장료 제형 혼합물을 혼합하는 단계를 포함하는 혼합생약 화장료 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0029] 이하, 상기 혼합생약 화장료 조성물 제조방법을 각 단계별로 상세히 설명한다.
- [0030] 먼저, 상기 혼합생약 화장료 조성물 제조방법은 오미자, 황기, 지황 및 감초를 분쇄하여 혼합생약을 제조하는 단계를 포함한다.
- [0031] 이때, 상기 혼합생약은 혼합생약의 총 중량을 기준으로 오미자 10 내지 50 wt%, 황기 10 내지 50 wt%, 지황 10 내지 50 wt% 및 감초 10 내지 50 wt%로 혼합되는 것일 수 있고, 바람직하게는 오미자 20 내지 30 wt%, 황기 20 내지 30 wt%, 지황 20 내지 30 wt% 및 감초 20 내지 30 wt%로 혼합되는 것일 수 있다.
- [0032] 상기 오미자는 오미자자나무과(*Schizandra chinensis*)에 속하는 덩굴성 낙엽수의 열매로서 주로 약으로 쓰거나 술과 차의 재료로 이용되는 것을 의미한다. 오미자는 단맛, 짠맛, 쓴맛, 신맛, 매운맛의 다섯 가지의 맛을 고루 갖추고 있다고 하여 오미자라 하는데, 그 가운데에서도 신맛이 가장 강한 것을 특징으로 한다. 신맛의 성분으로서 말산·타르타르산 등이 알려지고 있으며 한방에서는 약재로 이용되고 있다.
- [0033] 상기 황기(黃/黃耆, *Astragalus membranaceus*)는 한국·중국·일본에 분포하는 여러해살이풀로 산지의 바위틈에 자라는 약초를 의미한다. 통상적으로 높이 40~70cm이며 식물 전체에 걸쳐 흰색의 부드러운 잔털이 있는 것을 특징으로 한다. 흔히 약초로서 재배하며 한방에서는 가을에 채취하여 노두(蘆頭)와 잔뿌리를 제거하고 햇빛에 말린 것을 한약재의 황기라 하며, 강장·지한(止汗)·이뇨 등의 효능이 있어 신체허약·피로권태·기혈허탈·자궁탈·내장하수·식은땀·말초신경마비·반신불수·부종·만성신장염 등에 처방한다.
- [0034] 상기 지황(地黃, 학명: *Rehmannia glutinosa*)은 열당과의 여러해살이풀을 의미하며, 중국이 원산지이다. 높이는 30cm 정도 되는데, 잎은 타원형으로 뿌리에서 나오고, 6-7월에 홍자색의 아름다운 꽃이 핀다. 뿌리는 보통 지황이라고 하여 생것을 생지황, 건조시킨 것을 건지황, 썬서 말린 것을 숙지황이라고 한다. 한방에서 보혈제·강장제·해열제로 사용한다.
- [0035] 상기 감초는 콩과의 다년생 초본으로 목질로 덩굴져 있는 땅속 줄기와 땅속 깊이 길게 뻗어 있는 뿌리를 갖고 있다. 위로 뻗어난 1m 가량의 줄기에는 9 ~ 17개의 길고 둥근 잎을 갖고 있는 잎줄기들이 많이 있다. 이용부위는 3년된 뿌리와 땅속의 줄기이며 약성은 보통이고 맛은 단 것이 특징이다. 상기 감초는 비타민 A, B를 비롯한 비타민 C가 풍부하며 여드름, 습진에 효과가 있으며, 미백효과 및 피부 진정 효과 또한 가지고 있다. 본원에서 사용되는 감초는 약용으로 사용되는 일반적인 것을 의미하며, 상세하게는 스페인 감초(*Glycyrrhiza glabra*), 만주 감초(*Glycyrrhiza uralensis*), 창과 감초(*Glycyrrhiza inflata*) 등의 동속식물 뿌리와 땅속 줄기를 그대로 또는 주피를 제거한 것을 의미한다.
- [0036] 상기 분쇄방법은 특별한 제한은 없으나 분쇄기를 사용하여 잘게 자르는 방식으로 수행하는 것이 바람직하다.
- [0038] 다음으로, 상기 혼합생약 화장료 조성물 제조방법은 상기 혼합생약을 온천수, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 추출액을 제조하는 단계를 포함한다.
- [0039] 이때, 상기 온천수는 수온이 50 내지 55℃이고, pH가 8 내지 8.5이고, 라듐 및 유탄을 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 상기 온천수는 수안보 온천수일 수 있다.
- [0040] 수안보 온천수는 수질이 단순 알칼리성으로 무미, 무취이며, 매우 매끄러운 특성이 있다. 수온은 53도, 산도 8.3 정도로 약알칼리성이며 라듐, 유탄 등을 함유하고 있어 피부병, 신경통, 부인병, 위장염 및 피로회복에 효

험이 있다. 주요 성분으로는 염소 13.0 내지 19.7 mg/L, 황산이온 26.6 내지 49.3 mg/L, 이산화규소 44.3 내지 75.1 mg/L 및 불소 5 내지 8 mg/L, 칼륨 2.03 내지 2.56 mg/L, 나트륨 63.8 내지 67.8 mg/L, 칼슘 9.5 내지 21.6 mg/L, 마그네슘 0.05 내지 0.63 mg/L, 리튬 0.16 내지 0.19 mg/L, 스트로튬 0.03 내지 0.09 mg/L, 망간 0.01 내지 0.02 mg/L 및 아연 0.01 내지 0.06 mg/L를 포함한다.

- [0041] 상기 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 부탄올 등이 사용될 수 있다.
- [0042] 상기 온천수, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매의 용량은 상기 혼합생약의 총 중량 대비 2 배 내지 10배일 수 있고, 바람직하게는 4배 내지 6배일 수 있다.
- [0043] 상기 추출은 5 내지 100℃의 온도에서 수행될 수 있고, 바람직하게는 20 내지 30℃의 온도에서 수행될 수 있고, 3시간 내지 2일 동안 수행될 수 있으며, 바람직하게는 6시간 내지 15시간 동안 수행될 수 있고, 더 바람직하게는 8시간 내지 12시간 동안 수행될 수 있다. 상기 추출 시간이 3시간 미만일 경우 추출시간이 너무 짧아 유효성분의 추출이 제대로 이루어지지 않을 수 있으며, 추출 시간이 3일을 초과하게 될 경우, 추출 성분의 변화가 미비하며 추출물이 변색될 수 있다.
- [0045] 다음으로, 상기 혼합생약 화장료 조성물 제조방법은 상기 추출액을 건조하여 혼합생약 온천수 추출물을 제조하는 단계를 포함한다.
- [0046] 이때, 상기 추출액의 건조는 추출액의 고형분을 제거하고 여액을 수거한 후 감압농축하는 방식, 동결건조, 분무 건조, 냉풍건조 또는 열풍건조 등의 방법으로 수행될 수 있고, 바람직하게는 감압농축 후 동결건조하는 방식으로 수행될 수 있다.
- [0048] 다음으로, 상기 혼합생약 화장료 조성물 제조방법은 상기 혼합생약 온천수 추출물을 정제수, 포도당 및 효모 추출물과 혼합하여 액체배지 조성물을 제조하는 단계를 포함한다.
- [0049] 이때, 상기 혼합생약 온천수 추출물은 정제수 부피를 기준으로 5 내지 15%(w/v)로 혼합할 수 있다. 또한, 상기 포도당은 정제수 부피를 기준으로 2 내지 4%(w/v)로 혼합할 수 있다. 나아가 상기 효모 추출물은 정제수 부피를 기준으로 0.5 내지 1.5%(w/v)로 혼합할 수 있다.
- [0050] 상기 액체배지 조성물은 pH가 5 내지 6일 수 있고, 바람직하게는 5.5일 수 있다.
- [0052] 다음으로, 상기 혼합생약 화장료 조성물 제조방법은 상기 액체배지 조성물에 버섯 균사체를 첨가한 후 배양하여 발효시키는 단계를 포함한다.
- [0053] 이때, 상기 버섯 균사체는 우장지버섯(*Antrodia Coaphorata*) 균사체일 수 있다. 우장지버섯(*Antrodia Coaphorata*) 균사체를 이용하는 것이 상기 온천수 추출물로부터 멜라닌합성 저해, 콜라겐 합성 촉진, 및 항산화 활성이 현저하게 우수한 온천수 발효추출물을 획득하는 데에 특히 유리하다.
- [0054] 우장지버섯은 대만이 주산지로서, 해발 1,000m 이상의 고산에서 자생하는 100년 이상 된 녹나무에 기생하는 버섯으로 장지 버섯이라고 불리우는 희귀버섯이다. 전통적으로 중국에서 고혈압, 간암, 염증, 가려움증, 복통 및 설사에 이용되어 왔다.
- [0055] 상기 우장지버섯은, 효모-맥아즙 한천배지에서 5 내지 10일간 사면 배양한 후 1 내지 2개월마다 계대배양한 것일 수 있다.
- [0056] 또한 상기 우장지버섯은 온천수를 포함하는 배지에서 배양된 것일 수 있으며, 상기 온천수는 수안보 온천수일 수 있다.
- [0057] 상기 액체배지 조성물에 버섯 균사체를 첨가하는 방법은 상기 배양된 버섯 균사체를 균질화하여 배지 조성물 부피 기준으로 1 내지 10%(v/v)로 첨가함으로써 수행할 수 있고, 상기 배양 발효는 온도 27℃ 회전수 150 rpm, 통기량 1.5 vvm의 조건에서 5 내지 10일간 배양함으로써 수행할 수 있다.
- [0059] 다음으로, 상기 혼합생약 화장료 조성물 제조방법은 상기 액체배지 조성물의 버섯 균사체를 제거한 후 건조하여 혼합생약 온천수 발효 추출물을 획득하는 단계를 포함한다.
- [0060] 상기 버섯 균사체를 제거하는 방법은 원심분리를 사용할 수 있고, 원심분리 후에 배양여액을 필터로 여과시켜 발효추출물을 얻는 단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 사용될 수 있는 필터로는 0.2 내지 0.5 마이크로미터 멤브레인(membrane) 필터 등을 사용할 수 있으며, 여액 상태의 발효추출물을 추가적으로 감압농축 및 동결건조하여 건조물 상태의 혼합 생약의 온천수 발효추출물을 얻을 수 있다.

- [0062] 마지막으로, 상기 혼합생약 화장료 조성물 제조방법은 상기 혼합생약 온천수 발효 추출물 및 화장료 제형 혼합물을 혼합하는 단계를 포함한다.
- [0063] 이때, 상기 혼합생약 온천수 발효 추출물의 중량비는 혼합생약 화장료 조성물 총 중량을 기준으로 0.01 내지 30 wt%일 수 있으며, 바람직하게는 0.1 내지 20 wt%일 수 있고, 더 바람직하게는 1 내지 10 wt%일 수 있다.
- [0064] 상기 혼합생약 온천수 발효 추출물의 중량비 0.01 wt% 미만일 경우, 만족할 만한 효능을 제공하기 어려울 수 있고, 30.0 wt% 초과일 경우, 화장료 조성물의 냄새와 색상에 영향을 미쳐서 상품성이 떨어지고 추가적인 효능을 기대하기 어려울 수 있다.
- [0065] 상기 혼합생약 화장료 조성물의 제형은 특별히 제한되지는 않으며, 목적하는 바에 따라 적절히 선택할 수 있다. 예를 들어, 상기 혼합생약 화장료 조성물의 제형은 수렴화장수, 유연화장수, 에센스, 유액, 크림, 파운데이션 또는 BB크림 등일 수 있다.
- [0066] 또한, 상기 혼합생약 화장료 조성물은, 바람직하게는, 피부 미백용, 주름 개선용, 항산화용, 피부 보습용, 또는 노화방지 용도의 제품에 적용될 수 있다.
- [0067] 상기 화장료 제형 혼합물은 화장료에 일반적으로 이용되는 성분일 수 있다. 예를 들면 유화제, 점증제, 유제, 계면활성제, 윤활제, 알코올류, 수용성 고분자제, 겔화제, 안정화제, 비타민, 무기염류, 유화제, 향료 같은 일반적인 보조 성분을 사용할 수 있다. 상기 성분들은 제형 또는 사용목적에 따라 그 첨가량을 본 발명에 따라 제조되는 혼합생약 화장료 조성물 고유의 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 선택할 수 있다. 상기 성분들의 첨가량은 예를 들어 조성물 총중량에 대하여 0.1 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 6 중량%일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0068] 상기 혼합생약 화장료 조성물의 유효성분인 오미자, 황기, 지황 및 감초의 온천수 발효 추출물은, 예로부터 약재로 사용해왔던 천연 원료로 제조되기 때문에, 상기 혼합생약 화장료 조성물은 독성이나 부작용 등을 나타내지 않아, 화장료로서 용이하게 이용될 수 있다.
- [0069] 상기 혼합생약 화장료 조성물은 매일 사용할 수 있으며 또한 정해지지 않은 기간 동안에도 사용할 수 있다. 바람직하게는 사용자의 연령, 피부상태 또는 피부타입, 발효추출물의 농도에 따라 사용량, 사용횟수 및 기간을 조절할 수 있다.
- [0071] 또한, 본 발명의 일 측면은 오미자, 황기, 지황 및 감초의 혼합생약 온천수 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 혼합생약 화장료 조성물을 제공한다.
- [0072] 이때, 상기 혼합생약 화장료 조성물에 대한 조성비, 특징, 제조 방법 등은 상술한 바와 같다.
- [0074] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0076] **실시예 1. 본 발명에 따른 혼합생약 온천수 발효 추출물의 제조**
- [0077] 단계 1: 혼합생약 온천수 추출물의 제조
- [0078] 상업적으로 시판되는 오미자, 황기, 지황 및 감초를 구입하여, 이들을 오미자 200g, 황기 200g, 지황 200g 및 감초 200g을 혼합하고, 분쇄기로 잘게 자른 다음, 4000g의 수안보 온천수를 가한 후, 23℃에서 10시간 동안 추출하여 추출액을 제조하였다. 상기 추출액의 고형분을 제거하고 여액을 수거한 후 감압농축 및 동결건조하였다. 건조 후, 혼합생약 온천수 추출물로서 건조분말 20g을 수득하였다.
- [0080] 단계 2: 혼합생약 온천수 발효 추출물의 제조
- [0081] 먼저, 혼합생약 온천수 발효 추출물 제조에 사용하기 위해 효모-맥아즙 한천배지(효모추출물 3g, 맥아즙 3g, 포도당 10g, 펩톤 5g, 한천 20g, 온천수 1L)가 든 시험관에 우장지버섯 균사체를 7일간 사면배양한 후 4℃에 보관하고 1개월마다 계대배양하였다. 상기 우장지버섯은 전라남도 산림자원연구소로부터 분양받았다.
- [0082] 상기 단계 1에서 수득한 혼합생약 온천수 추출물의 10%(w/v) 수용액 100mL, 포도당 3g 및 효모 추출물 1g을 혼합한 후, pH를 5.5로 조정하고 멸균하여 액체배지 조성물을 준비하였다. 상기 배지 조성물에, 상기 사면배지에서 자란 우장지버섯 균사체를 무균적으로 균질화하여 5%(v/v)가 되게 첨가한 후(순수균사체로 0.1g 포함됨), 온도 27℃회전수 150 rpm, 통기량 1.5 vvm의 조건에서 7일간 배양하여 혼합생약의 온천수 추출물을 발효하였다.

- [0083] 발효를 마친 후에 원심분리하여 우장지버섯 균사체를 모두 제거하고, 얻은 여액을 감압농축 및 동결건조하여, 혼합생약 온천수 발효 추출물 14g을 수득하였다.
- [0085] **실시예 2. 본 발명에 따른 혼합생약 화장료 조성물의 제조**
- [0086] 정제수 100중량부를 기준으로 실시예 1에서 수득한 혼합생약 온천수 발효 추출물(5wt%), 세토스테아릴알콜(3wt%), 글리세릴스테아레이트(2wt%), 비즈왁스(1wt%), 폴리글리세릴-3 메틸 글루코사디스테아레이트(1.5wt%), 스쿠알란(5wt%), 카르틸릭/카프릭트리글리세라이드(5wt%), 세틸에칠헥사노에이트(5wt%), 디메치콘(0.5wt%), 부틸렌글라이콜(5wt%), 글리세린(8wt%), 1,2 헥산다이올(2wt%) 및 암모니움아크롤로일디메틸 타우레이트/브이피코 폴리머(0.2wt%)를 혼합하여 수중유(W/O)형태의 크림제형인 혼합생약 화장료 조성물을 제조하였다.
- [0088] **비교예 1-1. 오미자 온천수 추출물의 제조**
- [0089] 상업적으로 시판되는 오미자를 구입하여 800g을 취하고, 분쇄기로 잘게 잘랐다. 오미자의 분쇄물에 4000g의 수안보 온천수를 가한 후, 23℃에서 12시간 동안 추출하여 추출액을 제조하였다. 상기 추출액의 고형분을 제거하고 여액을 수거한 후 감압농축 및 동결건조하였다. 건조 후, 오미자 온천수 추출물로서 건조분말 20.3g을 수득하였다.
- [0091] **비교예 1-2. 황기 온천수 추출물의 제조**
- [0092] 오미자 대신 황기를 사용한 것을 제외하고는 비교예 1-1과 동일한 방법으로 온천수 추출물을 제조하였다.
- [0094] **비교예 1-3. 지황 온천수 추출물의 제조**
- [0095] 오미자 대신 지황을 사용한 것을 제외하고는 비교예 1-1과 동일한 방법으로 온천수 추출물을 제조하였다.
- [0097] **비교예 1-4. 감초 온천수 추출물의 제조**
- [0098] 오미자 대신 감초를 사용한 것을 제외하고는 비교예 1-1과 동일한 방법으로 온천수 추출물을 제조하였다.
- [0100] **비교예 2-1. 오미자 온천수 발효 추출물의 제조**
- [0101] 단계 1: 온천수 추출물의 제조
- [0102] 상업적으로 시판되는 오미자를 구입하여 800g을 취하고, 분쇄기로 잘게 잘랐다. 오미자의 분쇄물에 4000g의 수안보 온천수를 가한 후, 23℃에서 12시간 동안 추출하여 추출액을 제조하였다. 상기 추출액의 고형분을 제거하고 여액을 수거한 후 감압농축 및 동결건조하였다. 건조 후, 오미자 온천수 추출물로서 건조분말 20.3g을 수득하였다.
- [0104] 단계 2: 온천수 발효 추출물의 제조
- [0105] 먼저, 온천수 발효 추출물 제조에 사용하기 위해 효모-맥아즙 한천배지(효모추출물 3g, 맥아즙 3g, 포도당 10g, 펩톤 5g, 한천 20g, 온천수 1L)가 든 시험관에 우장지버섯 균사체를 7일간 사면배양한 후 4℃에 보관하고 1개월마다 계대배양하였다. 상기 우장지버섯은 진라남도 산림자원연구소로부터 분양받았다.
- [0106] 상기 단계 1에서 수득한 오미자 온천수 추출물의 10%(w/v) 수용액 100mL, 포도당 3g 및 효모 추출물 1g을 혼합한 후, pH를 5.5로 조정하고 멸균하여 액체배지 조성물을 준비하였다. 상기 배지 조성물에, 상기 사면배지에서 자란 우장지버섯 균사체를 무균적으로 균질화하여 5%(v/v)가 되게 첨가한 후(순수균사체로 0.1g 포함됨), 온도 27℃ 회전수 150 rpm, 통기량 1.5 vvm의 조건에서 7일간 배양하여 오미자 온천수 추출물을 발효하였다.
- [0107] 발효를 마친 후에 원심분리하여 우장지버섯 균사체를 모두 제거하고, 얻은 여액을 감압농축 및 동결건조하여, 오미자 온천수 발효 추출물 15.6g을 수득하였다.
- [0109] **비교예 2-2. 황기 온천수 발효 추출물의 제조**
- [0110] 오미자 대신 황기를 사용한 것을 제외하고는 비교예 2-1과 동일한 방법으로 온천수 발효 추출물을 제조하였다.
- [0112] **비교예 2-3. 지황 온천수 발효 추출물의 제조**
- [0113] 오미자 대신 지황을 사용한 것을 제외하고는 비교예 2-1과 동일한 방법으로 온천수 발효 추출물을 제조하였다.
- [0115] **비교예 2-4. 감초 온천수 발효 추출물의 제조**
- [0116] 오미자 대신 감초를 사용한 것을 제외하고는 비교예 2-1과 동일한 방법으로 온천수 발효 추출물을 제조하였다.

- [0118] **비교예 3. 혼합생약 온천수 발효 추출물의 제조**
- [0119] 혼합생약 추출물을 인삼과 함께 추출한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 혼합생약 온천수 발효 추출물 14.3g을 제조하였다.
- [0121] **비교예 4. 혼합생약 온천수 추출물의 제조**
- [0122] 오미자 200g, 황기 200g, 지황 200g 및 감초 200g을 혼합하고 분쇄한 후, 4000g의 수안보 온천수를 가한 후, 23℃에서 10시간 동안 추출하였다. 추출이 완료된 후, 고형분을 제거하고 여액을 수거한 후 감압농축 및 동결건조한 건조물 상태로, 혼합 생약의 온천수 추출물 19.3g을 수득하였다.
- [0123]
- [0124] **비교예 5. 황기의 온천수 발효추출물의 제조**
- [0125] 혼합생약 대신 황기 800g을 혼합하는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 황기의 온천수 발효추출물 14.5g을 얻었다.
- [0127] **비교예 6. 화장료 조성물의 제조 1**
- [0128] 혼합생약 온천수 발효 추출물을 첨가하지 않은 화장료 조성물을 제조하였다.
- [0129] 정제수 100중량부를 기준으로 향료(적량), 세토스테아릴알콜(3wt%), 글리세릴스테아레이트(2wt%), 비즈왁스(1wt%), 폴리글리세릴-3 메틸 글루코시디스테아레이트(1.5wt%), 스쿠알란(5wt%), 카르틸릭/카프릭트리글리세라이드(5wt%), 세틸에칠헥사노에이트(5wt%), 디메치콘(0.5wt%), 부틸렌글라이콜(5wt%), 글리세린(8wt%), 1,2 헥산다이올(2wt%) 및 암모니움아크롤로일디메틸 타우레이트/브이피코 폴리머(0.2wt%)를 혼합하여 수중유(W/O)형태의 크림제형인 화장료 조성물을 제조하였다.
- [0131] **비교예 7-1. 화장료 조성물의 제조 2**
- [0132] 정제수 100중량부를 기준으로 비교예 1-1에서 수득한 오미자 온천수 추출물(5wt%), 세토스테아릴알콜(3wt%), 글리세릴스테아레이트(2wt%), 비즈왁스(1wt%), 폴리글리세릴-3 메틸 글루코시디스테아레이트(1.5wt%), 스쿠알란(5wt%), 카르틸릭/카프릭트리글리세라이드(5wt%), 세틸에칠헥사노에이트(5wt%), 디메치콘(0.5wt%), 부틸렌글라이콜(5wt%), 글리세린(8wt%), 1,2 헥산다이올(2wt%) 및 암모니움아크롤로일디메틸 타우레이트/브이피코 폴리머(0.2wt%)를 혼합하여 수중유(W/O)형태의 크림제형인 화장료 조성물을 제조하였다.
- [0134] **비교예 7-2. 화장료 조성물의 제조 3**
- [0135] 비교예 1-1에서 수득한 오미자 온천수 추출물(5wt%) 대신 비교예 1-2에서 수득한 황기 온천수 추출물(5wt%)을 사용한 것을 제외하고는 비교예 7-1과 동일한 방법으로 화장료 조성물을 제조하였다.
- [0137] **비교예 7-3. 화장료 조성물의 제조 4**
- [0138] 비교예 1-1에서 수득한 오미자 온천수 추출물(5wt%) 대신 비교예 1-3에서 수득한 지황 온천수 추출물(5wt%)을 사용한 것을 제외하고는 비교예 7-1과 동일한 방법으로 화장료 조성물을 제조하였다.
- [0140] **비교예 7-4. 화장료 조성물의 제조 5**
- [0141] 비교예 1-1에서 수득한 오미자 온천수 추출물(5wt%) 대신 비교예 1-3에서 수득한 감초 온천수 추출물(5wt%)을 사용한 것을 제외하고는 비교예 7-1과 동일한 방법으로 화장료 조성물을 제조하였다.
- [0143] **비교예 8-1. 화장료 조성물의 제조 6**
- [0144] 비교예 1-1에서 수득한 오미자 온천수 추출물(5wt%) 대신 비교예 2-1에서 수득한 오미자 온천수 발효 추출물(5wt%)을 사용한 것을 제외하고는 비교예 7-1과 동일한 방법으로 화장료 조성물을 제조하였다.
- [0146] **비교예 8-2. 화장료 조성물의 제조 7**
- [0147] 비교예 1-1에서 수득한 오미자 온천수 추출물(5wt%) 대신 비교예 2-2에서 수득한 황기 온천수 발효 추출물(5wt%)을 사용한 것을 제외하고는 비교예 7-1과 동일한 방법으로 화장료 조성물을 제조하였다.
- [0149] **비교예 8-3. 화장료 조성물의 제조 8**
- [0150] 비교예 1-1에서 수득한 오미자 온천수 추출물(5wt%) 대신 비교예 2-3에서 수득한 지황 온천수 발효 추출물

(5wt%)을 사용한 것을 제외하고는 비교예 7-1과 동일한 방법으로 화장료 조성물을 제조하였다.

[0152] **비교예 8-4. 화장료 조성물의 제조 9**

[0153] 비교예 1-1에서 수득한 오미자 온천수 추출물(5wt%) 대신 비교예 2-4에서 수득한 감초 온천수 발효 추출물(5wt%)을 사용한 것을 제외하고는 비교예 7-1과 동일한 방법으로 화장료 조성물을 제조하였다.

[0155] **비교예 9. 화장료 조성물의 제조 10**

[0156] 정제수 100중량부를 기준으로 비교예 2-1에서 수득한 오미자 온천수 발효 추출물(1.25wt%), 비교예 2-2에서 수득한 황기 온천수 발효 추출물(1.25wt%), 비교예 2-3에서 수득한 지황 온천수 발효 추출물(1.25wt%), 비교예 2-4에서 수득한 감초 온천수 발효 추출물(1.25wt%), 세토스테아릴알콜(3wt%), 글리세릴스테아레이트(2wt%), 비즈왁스(1wt%), 폴리글리세릴-3 메틸 글루코사이드스테아레이트(1.5wt%), 스쿠알란(5wt%), 카르틸릭/카프릭트리글리세라이드(5wt%), 세틸에칠헥사노에이트(5wt%), 디메치콘(0.5wt%), 부틸렌글라이콜(5wt%), 글리세린(8wt%), 1,2 헥산다이올(2wt%) 및 암모니움아크롤로일디메틸 타우레이트/브이피코 폴리머(0.2wt%)를 혼합하여 수중유(W/O)형태의 크림제형인 화장료 조성물을 제조하였다.

[0158] 하기 표 1에 실시예 1 및 비교예 1-1 내지 비교예 2-4에서 제조된 추출물의 성분 및 수득량을 정리하여 나타내었다.

표 1

분류	추출물	수득량(g)
실시예 1	혼합생약 온천수 발효 추출물	14
비교예 1-1	오미자 온천수 추출물	20.3
비교예 1-2	황기 온천수 추출물	19.9
비교예 1-3	지황 온천수 추출물	20.5
비교예 1-4	감초 온천수 추출물	19.5
비교예 2-1	오미자 온천수 발효 추출물	15.6
비교예 2-2	황기 온천수 발효 추출물	14.7
비교예 2-3	지황 온천수 발효 추출물	14.4
비교예 2-4	감초 온천수 발효 추출물	14.1

[0160] 하기 표 2에 실시예 2 및 비교예 6 내지 비교예 9에서 제조된 화장료 조성물의 성분 및 함량을 정리하여 나타내었다.

표 2

성분	함량(wt%)										
	실시예 2	비교예 6	비교예 7-1	비교예 7-2	비교예 7-3	비교예 7-4	비교예 8-1	비교예 8-2	비교예 8-3	비교예 8-4	비교예 9
세토스테아릴알코올	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
글리세릴스테아레이트	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
비즈왁스	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
폴리글리세릴-3 메틸글루코사이드스테아레이트	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
스쿠알란	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
카르틸릭/카프릭트리글리세라이드	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
세틸에칠헥사노에이트	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
디메치콘	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
정제수	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
부틸렌글라이콜	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
글리세린	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
1,2 헥산다이올	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

암모니아아크롤로 일디메틸타우레이트 /브이피코폴리머	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
항료	-	적량	-	-	-	-	-	-	-	-	-
혼합생약의 온천수 발효추출물 (실시에 1)	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
오미자 온천수 추출 물 (비교예 1-1)	-	-	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-
황기 온천수 추출물 (비교예 1-2)	-	-	-	5.0	-	-	-	-	-	-	-
지황 온천수 추출물 (비교예 1-3)	-	-	-	5.0	-	-	-	-	-	-	-
감초 온천수 추출물 (비교예 1-4)	-	-	-	-	-	5.0	-	-	-	-	-
오미자 온천수 발효 추출물 (비교예 2-1)	-	-	-	-	-	-	5.0	-	-	-	1.25
황기 온천수 발효추 출물(비교예 3)	-	-	-	-	-	-	-	5.0	-	-	1.25
지황 온천수 발효추 출물(비교예 4)	-	-	-	-	-	-	-	-	5.0	-	1.25
감초 온천수 발효 추출물(비교예 5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.0	1.25

[0163] **실험예 1. 추출물의 피부세포 독성 측정 실험**

[0164] 상기 실시예 1 및 비교예 1-1 내지 비교예 1-4에서 제조한 각 온천수 추출물 또는 온천수 발효 추출물에 대하여 피부세포 독성을 측정하는 실험을 수행하였다.

[0165] 증류수를 희석액으로 사용하여, 각각의 추출물을 100ppm, 150ppm 및 200ppm의 농도로 준비한 다음 피부세포에 처리하여 세포생존율을 측정하였다.

[0166] 실험을 위해 사용된 세포주는 인간 진피 섬유아세포(human dermal fibroblast; Lonza, Basel, Switzerland) 등 3종의 세포를 사용하였다. 상기 세포들은 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Gibco-BRL, Invitrogen; Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)에 10% 소태아혈청(FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin 100 IU/mL, streptomycin 100 µg/mL; Life Technologies)를 함유한 배지를 사용하여, 5% CO₂ 세포배양기 내에서 37°C의 온도 조건 하에서 배양하였다.

[0167] WST-1(Water-soluble tetrazolium salt) 어세이는 세포 내 미토콘드리아성 NADH-탈수소화효소(mitochondrial NADH-dehydrogenase)의 활성을 측정하여 알아보는 방법으로써 테트라졸륨염(tetrazolium salt)을 살아있는 세포에 처리하게 되면 미토콘드리아에 있는 탈수소화효소에 의하여 유색의 포마잔(formazan)이 형성되며, 형성된 포마잔을 450nm 파장의 흡광도로 확인하여 살아있는 세포의 농도를 확인하였다.

[0168] 세포를 96-well plate에 2×10³ cells/well의 세포를 분주하고 24시간 배양 후 시료를 적정농도에 맞게 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 그 후 WST-1 어세이 용액을 배지양의 10%씩 처리하여 추가적으로 0.5~1시간 37°C에서 반응 후, iMark microplate reader(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여, 450nm에서 흡광도를 측정하였으며 참조 흡광도는 650nm에서 측정하여 결과값을 보정하였다. 결과값은 세 번의 독립적 실험으로부터 평균값± 표준편차로 나타내었다. P<0.05는 Student's t-test를 통해 검증하였으며, 결과 값의 유의성을 나타낸다.

[0169] 하기 표 3에 각 실시예 및 비교예에 대한 농도 및 세포 생존율을 정리하여 나타내었다.

표 3

[0170]

시료명		농도 (ppm)	세포생존율 (%)
실시에 1	혼합생약 온천수 발효추출물	100	97.2
		150	96.8
		200	95.5
비교예 1-1	오미자 온천수 추출물	100	97.6
		150	99.7
		200	99.3
비교예 1-2	황기 온천수 추출물	100	97.4
		150	96.5
		200	95.3
비교예 1-3	지황 온천수 추출물	100	97.8
		150	97.7
		200	98.6
비교예 1-4	감초 온천수 추출물	100	95.4
		150	95.3
		200	93.5

[0171]

상기 표 3을 통해 알 수 있듯이, 본 발명에 따른 혼합생약의 온천수 발효 추출물은 피부세포에 독성을 주지 않는 안전한 성분임을 확인할 수 있다.

[0172]

실험예 2. 추출물의 멜라닌색소 합성저해 효과 측정 실험

[0173]

B16F10 세포를 60mm culture dish에 3×10^5 개로 분주 후, 실시에 1 및 비교예 1-1 내지 비교예 2-4의 시료를 배지에 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였다. 양성대조를 위해 멜라닌 합성을 촉진하는 호르몬인 $\alpha\text{-MSH}$ (Sigma-Aldrich)를 200nM의 농도로 동일세포에 처리하였다. 시료와 $\alpha\text{-MSH}$ 를 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후, 실온에서 48시간 세포를 배양시킨 뒤에 세포를 수확하여 PBS로 2회 세척 후, 각 시료별로 멜라닌합성 저해율을 측정하였다.

표 4

[0174]

시료명		멜라닌합성 저해율(%)
실시에 1	혼합생약 온천수 발효추출물	65.4
비교예 1-1	오미자 온천수 추출물	23.5
비교예 1-2	황기 온천수 추출물	20.3
비교예 1-3	지황 온천수 추출물	18.7
비교예 1-4	감초 온천수 추출물	14.7
비교예 2-1	오미자 온천수 발효추출물	28.6
비교예 2-2	황기 온천수 발효추출물	22.3
비교예 2-3	지황 온천수 발효추출물	20.5
비교예 2-4	감초 온천수 발효추출물	17.5

[0175]

상기 표 4에서 알 수 있는 바와 같이, 멜라닌합성 저해율에 있어서, 실시에 1에 해당하는 오미자, 황기, 지황 및 감초의 혼합생약 온천수 발효 추출물이 다른 비교예 1-1 내지 2-4의 온천수 추출물 또는 온천수 발효 추출물에 비해 현저히 우수함을 알 수 있다.

[0176]

실험예 3. 인간피부세포에 대한 콜라겐 합성 촉진효과 측정

[0177]

콜라겐과 콜라게네이스(collagenase) 발현은 해당 대표적 유전자의 mRNA 양 변화를 qRT-PCR(quantitative real-time PCR) 분석법을 활용하여 측정하였다. 콜라겐 양은 타입 1 콜라겐의 대표적 구성 요소인 *COL1A1* 유전자의 발현수준 분석을 통해 확인하였으며, 콜라게네이스는 타입 1 콜라겐 분해 작용을 하는 *MMP1* 유전자의 발현수준 분석을 통해 확인하였다. 인간 진피 섬유아세포(Human dermal fibroblasts, Lonza, Basel, Switzerland)를 60-mm culture dish에 5×10^5 개로 분주한 후, 24시간 배양하였다. 그 후 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 실시에 1 및 비교예 1-1 내지 비교예 2-4의 시료를 첨가하여 24시간 추가적으로 배양하였다. 배양된 세포를 수확한 후, 1ml

TRIzol reagent(Life Technology)을 첨가하여 세포 용해 및 total mRNA 추출을 수행하였다. Total mRNA의 농도 및 순도(A260/A280 and A260/A230 ratio)는 MaestroNano[®] microvolume spectrophotometer (Maestrogen, Las Vegas, NV, USA)을 이용하여 검증하였으며, 2.0 이상의 순도가 높은 total mRNA만을 선별하였다. Total mRNA는 M-MLV reverse transcriptase(Life Technologies, USA)를 이용하여 cDNA로 전환하여 qRT-PCR에 사용하였다. qRT-PCR은 HOT FIREPol EvaGreen PCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonia)를 이용하여 수행하였으며, Line-Genex K software (Bioer Technology Co. Ltd., Hangzhou, China)를 이용하여 해당 유전자의 발현을 분석하였다.

[0178] PCR반응 조건은, 94℃에서 5분간 denaturation 시킨 후 denaturation (94℃, 30초), annealing (60℃, 30초), polymerization (72℃, 30초) 과정을 40 cycle 동안 진행하였다. 유전자 발현 변화는 β-ACTIN 대조군유전자 발현양과 비교하여 측정하였다. 결과값은 세번의 독립적 실험으로부터 평균값 ± 표준편차로 나타내었다. P<0.05는 Student's t-test를 통해 검증하였으며, 결과 값의 유의성을 나타낸다.

표 5

시료명		콜라겐 생합성 증가율 (%)
실시에 1	혼합생약 온천수 발효추출물	75.1
비교예 1-1	오미자 온천수 추출물	28.3
비교예 1-2	황기 온천수 추출물	25.8
비교예 1-3	지황 온천수 추출물	23.2
비교예 1-4	감초 온천수 추출물	20.4
비교예 2-1	오미자 온천수 발효추출물	33.5
비교예 2-2	황기 온천수 발효추출물	28.1
비교예 2-3	지황 온천수 발효추출물	25.3
비교예 2-4	감초 온천수 발효추출물	22.7

[0180] 상기 표 5에서 알 수 있는 바와 같이, 실시예 1의 콜라겐 생합성 효능이 비교예 1-1 내지 2-4에 비해 현저하게 우수하였다.

[0181] **실험예 4. 추출물의 항산화효과 측정**

[0182] 상기 실시예 1 및 비교예 1-1 내지 2-4의 항산화 활성을 측정하기 위하여 DCF-DA(2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) 어세이를 실시하였다. 이는 시험물질을 처리한 다음 실리카(silica)로 자극한 세포 내에서 생성되는 활성산소의 양을 공시료액과 비교하여 활성산소 제거능을 평가하는 목적으로 사용되는 시험방법이다. 먼저, 24 시간배양한 Raw 264.7 세포를 PBS로 1회 세척 후, 세포를 수확하였다. 해당 세포를 15mL PBS로 현탁후, 15 μl of 20mM DCF-DA 용액(Sigma-Aldrich)를 첨가하고 1시간 동안 반응시켰다. 1200×g으로 2분간 원심분리한 후 PBS로 1회 세척하여 1×10⁵ cells/mL로 희석한 다음, 시료를 200 μg/ml 농도로 처리하고 10분간 반응시켰다. 그 후 20 mg/mL의 실리카를 50 μl 처리하여 1시간 동안 추가 반응시켰다. 6000×g으로 5분간 원심분리하여 얻은 세포 펠릿(pellet)을 200 μl PBS로 분산시킨 후 96-well plate에 접종하였다. 그 후 fluorescence microplate reader (Bio-Rad)를 이용하여 485nm excitation/ 535nm emission에서 형광도를 측정하여 ROS level를 결정하였다. 결과값은 세번의 독립적 실험으로부터 평균값 ± 표준편차로 나타내었다. P<0.05는 Student's t-test를 통해 검증하였으며, 결과값의 유의성을 나타낸다.

표 6

시료명		항산화효과(자유라디칼 소거율, %)
실시에 1	혼합생약 온천수 발효추출물	65.1
비교예 1-1	오미자 온천수 추출물	20.3
비교예 1-2	황기 온천수 추출물	15.6
비교예 1-3	지황 온천수 추출물	18.3
비교예 1-4	감초 온천수 추출물	15.4
비교예 2-1	오미자 온천수 발효추출물	23.5
비교예 2-2	황기 온천수 발효추출물	17.3
비교예 2-3	지황 온천수 발효추출물	20.1
비교예 2-4	감초 온천수 발효추출물	17.1

[0184] 상기 표 6에서 알 수 있는 바와 같이, 실시예 1의 항산화 활성이 비교예 1-1 내지 2-4에 비해 현저히 우수하였다.

[0185] **실험예 5. 화장료 조성물의 피부자극성 시험**

[0186] 실시예 2, 비교예 6 내지 비교예 8-4의 화장료 조성물에 대한 피부자극성 정도를 비교하기 위하여 인체에 대한 폐쇄접촉시험(closed patch test)을 실시하였다. 건강한 성인 남녀 20명을 대상으로 하박부 안쪽에 각각의 시료를 0.2g씩 첩포하고 24시간 후 핀캠버를 제거하고 4시간 경과한 다음 육안으로 피부상태를 확인하였다. 피부자극도는 하기 수학적 식 1을 이용하여 계산하였다.

[0187] [수학적 식 1]

[0188]
$$\text{피부자극도} = \frac{\{(-)\text{수} \times 1\} + \{(+)\text{수} \times 2\} + \{(++)\text{수} \times 3\}}{\text{피시험자수}}$$

표 7

[0189]

시료명	피시험자수	관정결과				자극도
		-	+ -	+	++	
실시예 2	20명	20	0	-	-	0.00
비교예 6		19	1	-	-	0.02
비교예 7-1		19	1	-	-	0.02
비교예 7-2		20	0	-	-	0.00
비교예 7-3		19	1	-	-	0.02
비교예 7-4		20	0	-	-	0.00
비교예 8-1		19	1	-	-	0.02
비교예 8-2		20	0	-	-	0.00
비교예 8-3		20	0	-	-	0.00
비교예 8-4		20	0	-	-	0.00

-: 홍반이나 특이사항 없음
 +-: 주위보다 약간 붉어짐
 +: 주위보다 현저히 붉어짐
 ++: 주위보다 심하게 붉어지고 부풀어 오름

[0190] 상기 표 7에서 알 수 있는 바와 같이, 혼합생약의 온천수 발효 추출물을 함유하는 화장료 조성물은 피부자극도가 매우 낮은 것으로 확인되었다.

[0191] **실험예 6. 화장료 조성물의 피부탄력도 측정시험**

[0192] 실시예 2, 비교예 6 및 비교예 9의 화장료 조성물에 대하여 피부탄력 개선효과를 알아보기 위하여 아침과 저녁에 하루 2회씩 사용하도록 한 후, 사용 전과 사용 8주 후의 피부탄력도 변화를 측정하였다. 피부탄력도 측정은 피부탄력측정기(Cutometer SEM 575)를 이용하였으며, 온도 25도, 습도 75% 조건에서 측정하였다. 실시예 2, 비교예 6 및 비교예 9에 대하여 30-55세의 건강한 여성 60명을 각각 20명씩 세 그룹으로 나누어 측정하였으며 그 결과를 하기의 표 8에 나타내었다.

표 8

[0193]

시료	피부탄력증가율(%)
실시예 2	23.5
비교예 6	13.6
비교예 9	15.3

[0194] 상기 표 8에서 알 수 있는 바와 같이, 혼합생약 발효 추출물을 함유하는 실시예 2의 화장료 조성물은, 비교예 6 및 비교예 9의 화장료 조성물에 비하여, 피부탄력도 증가율이 현저히 높은 것을 알 수 있다.

[0195] **실험예 7. 화장료 조성물의 인체 사용성 시험**

[0196] 실시예 2, 비교예 6 및 비교예 9의 화장료 조성물에 대하여 실제 사용 시 피부 미백효과 및 주름개선효과를 알

아보기 위하여 건강한 30~55세 성인여성 69명에 대하여 각각 실시예 2, 비교예 6 및 비교예 9의 3그룹으로 나누어 인체 사용성 시험을 실시하였다. 상기 실시예 2, 비교예 6 및 비교예 9의 조성으로 제조된 시험품 50g씩을 설문지와 함께 나눠주고 아침과 저녁에 하루 2회씩 총 8주간 사용하게 한 후 설문지를 회수하여 분석하였다.

[0197] 총 69명의 시험대상자 중 중도 포기(3명) 및 부실한 설문지(2명)를 제외한 실시예 2 그룹의 22명, 비교예 6 및 9 그룹의 각 21명, 총 64명의 설문지를 회수하여 분석한 결과를 하기의 표 9에 나타내었다.

표 9

[0198]

		응답자수				
		매우 악 화됨	약간 악 화됨	변화 없음	약간 좋아 짐	매우 좋아 짐
피부색 변화 정도	실시예 2	-	-	8	10	4
	비교예 6	-	1	17	3	-
	비교예 9	-	-	14	7	-
피부 탄력감 변화 정도	실시예 2	-	-	7	10	5
	비교예 6	-	1	16	4	-
	비교예 9	-	-	14	7	-
피부 주름 변화 정도	실시예 2	-	-	8	9	5
	비교예 6	-	-	16	5	-
	비교예 9	-	-	15	6	-

[0199] 상기 표 9에서 알 수 있는 바와 같이, 혼합생약 발효 추출물을 함유하는 실시예 2의 화장료 조성물은, 비교예 6 또는 비교예 9의 화장료 조성물에 비하여, 피부색, 피부탄력감, 피부주름개선 효능에 대한 사용자의 만족도가 높은 것을 알 수 있다.

도면

도면1

