

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2008-0017963 (43) 공개일자 2008년02월27일
(51) Int. Cl. <i>A61K 8/97</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2006-0079905 (22) 출원일자 2006년08월23일 심사청구일자 없음	(71) 출원인 코스맥스 주식회사 경기 화성군 향남면 상신리 902-4 (72) 발명자 변상요 서울특별시 강남구 도곡동 467-10 우성리빙텔 1703호 유병삼 서울특별시 송파구 송파1동 한양1차아파트 2동 108호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 이병현	

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 초임계 이산화탄소를 이용한 돌외추출물의 제조방법 및 이를 함유하는 피부 노화 방지용 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 초임계 이산화탄소를 이용하여 돌외추출물을 제조하는 방법 및 초임계 추출방법으로 추출한 돌외추출물을 포함하는 피부 노화방지용 화장품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 초임계 돌외추출방법은 40 내지 90℃ 및 300 내지 700bar의 조건에서 초임계 이산화탄소를 가하여 유효성분인 카로테노이드의 함량이 높은 돌외추출물을 얻는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 돌외 초임계 추출물은 인체 피부세포의 콜라겐 생성과 인테그린 발현을 촉진하여 피부 노화로 인한 주름 개선에 효과가 있다.

(72) 발명자

문지영

제주도 제주시 노형동 1292-1 연동아파트 나동 21
2호

함영민

제주도 제주시 연동 251-35 쌍둥이주택 나동 301호

정동진

대전광역시 서구 정림동 640 우성아파트 121동
1502호

송영근

경기도 양평군 강하면 동오리 166-9

김형배

대구광역시 수성구 황금동 843-1 14/3 코아시스
105동 601호

특허청구의 범위

청구항 1

건조된 돌외를 추출조에 넣고 40 내지 90℃ 및 300 내지 700bar의 조건에서 초임계 이산화탄소를 적용하여 돌외를 추출하는 단계:

상기 돌외추출물과 초임계 이산화탄소의 혼합물로부터 이산화탄소를 기체상으로 분리하여 수거하는 단계를 포함하는, 초임계 이산화탄소를 이용하여 항산화성분의 함량이 높은 돌외추출물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 항산화성분은 카로테노이드 화합물인 것을 특징으로 하는 돌외추출물의 제조방법.

청구항 3

제1항에 따라 제조된, 카로테노이드 화합물의 함량이 0.1 중량% 이상인 돌외추출물.

청구항 4

제3항에 따른 돌외추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화방지용 화장료조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <1> 본 발명은 초임계 이산화탄소를 이용하여 돌외추출물을 제조하는 방법 및 초임계 추출방법으로 추출한 돌외추출물을 포함하는 피부 노화방지용 화장료 조성물에 관한 것이다.
- <2> 좀더 구체적으로 설명하면, 본 발명의 초임계 돌외추출방법은 40 내지 90℃ 및 300 내지 700bar의 조건에서 초임계 이산화탄소를 가하여 유효성분인 카로테노이드의 함량이 높은 돌외추출물을 얻는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 돌외 초임계 추출물은 인체 피부세포의 콜라겐 생성과 인테그린 발현을 촉진하여 피부 노화로 인한 주름 개선에 효과가 있다.
- <3> 돌외 (*Gynostemma pentaphyllum*)는 박목 박과의 쌍떡잎식물로, 여러해살이 덩굴식물이다. 한국에서는 주로 제주도 및 울릉도의 산이나 들의 숲속에서 자란다. 예로부터 강장강정, 이뇨, 소염 및 건위 효과가 있는 약용식물로 알려져 있다가 1979년 봄, 일본 약학회에서 인삼보다 많은 사포닌성분이 함유되어있다고 발표된 후, 돌외 바람이 불기도하였다. 이후 많은 연구가 진행되어 돌외가 항암, 고혈압, 간세포재생 등에 효과가 있다는 주장도 제기되기도 하였다.
- <4> 현재까지 발표된 연구 자료들은 모두 돌외를 알코올과 같은 유기용매나 물을 이용하여 추출하여 활용하고 있다. 하지만 이 방법들은 돌외의 적극적인 활용측면에서 매우 바람직하지 못한 단점을 내포하고 있다. 즉, 유기용매나 물로 추출한 돌외추출물은 항산화물질의 함량이 높지 못하다는 것인데, 이 경우 항산화물질의 함량을 높이려면 별도의 정제 과정을 필요로 할 수 밖에 없게 된다. 최근 돌외에 카로테노이드(carotenoid) 성분들이 많이 존재한다는 사실이 밝혀지고 있는데, 이들 성분은 강한 항산화활성을 가져 노화방지에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 하지만 이들 카로테노이드 성분들은 유기용매나 물로 추출하는 경우 추출되지 않거나, 추출물 중 항산화물질의 함량이 높지 못하다는 문제를 내포하고 있었다.
- <5> 따라서, 돌외로부터 카로테노이드 등과 같은 항산화 유용물질을 효율적으로 추출하는 효과적인 방법을 개발하여야 할 필요성이 계속 대두되었고, 동시에 이들 성분이 함유된 돌외추출물의 노화방지 효과를 확인하여 화장품에 적용하고자 하는 요구도 지속적으로 있었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <6> 이에, 본 발명자들은 초임계 이산화탄소를 이용하여, 돌외로부터 항산화성분 함량이 높은 효과적인 추출 방법을

개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 카로테노이드 성분의 함량이 높은 초임계추출물을 얻을 수가 있었고, 상기 방법으로 추출한 돌외추출물의 효능 효과 연구를 통하여 피부 노화방지에 탁월한 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

<7> 따라서, 본 발명의 첫째목적은 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출함으로써 돌외추출물의 카로테노이드와 같은 항산화성분의 함량을 높여서 항산화성분이 많이 함유된 추출물을 제공하는 것이다.

<8> 본 발명의 두번째 목적은 상기 방법에 의하여 수득한 돌외추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 방지용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<9> 본 발명의 초임계 이산화탄소를 이용한 돌외 추출방법은 돌외에 40 내지 90℃ 및 300 내지 700bar의 조건에서 초임계 이산화탄소를 가하여 유효성분인 카로테노이드의 함량이 높은 돌외추출물을 얻는 것을 특징으로 한다.

<10> 초임계 이산화탄소를 사용하여 항산화물질의 함량이 높은 돌외추출물을 추출하기 위해서는, 유럽특허 제925,724 호에 개시된 바와같이 추출조, 열교환기, 펌프, 이산화탄소 저장조, 칠러(냉각응축기), 감압 분리기 및 감압밸브로 구성된 추출장치를 사용한다. 상기 추출장치에 있어서, 추출조는 돌외 원료를 투입하여 추출되도록 하는 역할을 수행하고, 펌프는 초임계 이산화탄소에 압력을 가하는 역할을 수행하며, 열교환기는 초임계 이산화탄소를 가열하는 역할을 수행하고, 감압밸브는 추출기에서 방출된 초임계 이산화탄소를 감압시키는 역할을 수행하며, 감압분리기는 초임계 이산화탄소를 완전히 감압시켜서, 기체상의 이산화탄소를 분리하는 역할을 수행하고, 칠러는 감압된 이산화탄소를 초임계 이산화탄소로 전환시키는 역할을 수행하며, 이산화탄소 저장조는 초임계 이산화탄소를 저장하는 역할을 수행한다.

<11> 상기 추출장치를 사용하여 돌외로부터 특정성분을 추출하기 위해서는, 먼저 추출조에 원료를 투입하고, 펌프 및 열교환기를 통과한 초임계 이산화탄소를 추출조의 하단에 투입한 다음, 원료에서 추출된 성분과 이산화탄소의 혼합물을 추출조의 상단으로 배출하고, 배출된 혼합물을 감압밸브를 통하여 감압시킨 후, 감압분리기에서 이산화탄소를 기체상으로 분리하여 수거하고, 추출된 성분을 수거하는 단계를 수행하게 된다. 이때, 분리된 이산화탄소는 칠러를 통하여 액체 이산화탄소로 전환되고, 이산화탄소 저장조에 보관되었다가, 다시 펌프 및 열교환기를 이용하여 추출기에 공급하는, 순환 방식으로 특정성분을 추출하게 된다.

<12> 본 발명의 피부 노화 방지에 효과가 있는 초임계 유체 돌외추출물의 대표적인 유효성분으로 카로테노이드 화합물이 포함된다. 상기 초임계 이산화탄소를 이용하는 추출방법에 의하여 돌외로부터 수득한 추출물에 포함되어 있는 카로테노이드 화합물로는 루테인(lutein), 네오크롬(neochrome), 네오잔틴(neoxanthin), 알파 및 베타 카로틴(carotene), 오로잔틴(auroxanthin), 비올라잔틴(violaxanthin) 및 루테오잔틴(luteoxanthin) 등이 있다. 상기 돌외 초임계유체 추출물의 카로테노이드화합물은 피부세포의 구조형성 및 기능에 필요한 단백질의 합성을 촉진하여 피부노화를 방지하며, 콜라겐 및 인테그린의 발현을 증진시키는 효과가 있다.

<13> 피부 노화에 따른 주름 생성은 진피층 내부의 extra-cellular 매트릭스 구조를 형성하고 있는 콜라겐 단백질의 생성 및 전환이 제대로 이루어지지 않을 때 나타날 수 있다. 주름생성 및 피부 탄력 저하에 영향을 미치는 또 다른 단백질로 인테그린을 들 수 있다. 인테그린은 피부 세포에 존재하는 막 단백질로서, 피부 세포 간 접촉 및 세포와 단백질 간의 상호작용을 촉진하는 역할을 하며, 피부 탄력에 크게 영향을 미친다. 인테그린의 발현 정도가 피부의 탄력과 밀접하게 연관되어 있다. 본 발명자는 카로테노이드를 유효성분으로하는 돌외 초임계 추출물이 사람 피부세포의 콜라겐 생성을 촉진하고, 인테그린의 발현을 증가시켜, 피부 노화에 의한 주름 개선에 효과가 있음을 확인하였다.

<14> 본 발명의 돌외 초임계 추출물은 화장품, 식품 등의 원료로 활용될 수 있으며, 피부노화 방지를 목적으로 하는 화장품 조성물을 제공한다.

<15> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<16> 실시예 1: 돌외추출물의 제조 및 카로테노이드성분의 확인

<17> 본 발명의 돌외추출물에서 카로테노이드는 다음과 같은 방법으로 분리 및 확인되었다.

<18> 건조된 돌외 10 g을 추출조에 넣고, 초임계 이산화탄소의 유량은 10 ml/min, 추출조의 온도는 60℃, 초임계 이

산화탄소의 압력은 400 bar로 유지하며 추출하였다. 추출물의 카로테노이드 성분은 HPLC 를 이용하여 분석하였다. 루테인(lutein) 과 카로틴(carotene)의 표준품은 시그마사로부터 구입 사용하였고, 네오크롬(neochrome), 네오잔틴(neoxanthin), 오로잔틴(auroxanthin) 및 비올라잔틴(violaxanthin)은 순수분리한 후 NMR을 이용하여 구조를 동정 확인하고 표준품으로 사용하였다. 분석칼럼으로 C30 역상칼럼을 이용하였고, 이동상은 gradient 조성을 적용하였는데, 메탄올-이소프로판올 혼합액(99:1, v/v)과 메틸렌클로라이드를 100:0에서 70:30 (v/v) 으로 50분에 걸쳐 변화시켰다. 검출기로는 성분검증을 위하여 photodiode-array UV 검출기를 이용하였다.

<19> 상기 HPLC 분석에 의하여 본 발명의 돌외 추출물의 카로테노이드 조성을 분석한 결과, 루테인(lutein) 62%, 네오크롬(neochrome) 12%, 네오잔틴(neoxanthin) 8%, 알파 카로틴(carotene) 4%, 베타 카로틴 1%, 오로잔틴(auroxanthin) 7% 및 비올라잔틴(violaxanthin) 6% 로 구성됨을 알 수 있었다.

<20> 실시예 2: 돌외추출물의 카로테노이드 함량을 높이기 위한 초임계 이산화탄소 조건

<21> 돌외추출물의 카로테노이드 함량을 높이기 위한 초임계 이산화탄소의 조건을 결정하고자 다음과 같이 조건을 변화시켜 실험하였다.

<22> 추출조의 온도는 40 - 90℃ 범위로 변화시키며, 초임계 이산화탄소의 압력을 각각 200, 300, 400, 500, 600 또는 700bar로 변화시켜 1시간 동안 추출한 후, 돌외추출물에서 카로테노이드의 함량을 측정하여 추출 효율을 결정하였다. 표 1, 2는 초임계 추출 조건에 따른 추출물의 카로테노이드 함량 변화를 나타낸다. 카로테노이드 함량은 돌외 시료 단위 중량당 추출된 총 카로테노이드 중량으로 나타내는데, 실시예 1의 HPLC 분석법으로 측정하였다. 이때, 추출 효율 비교를 위하여 다음과 같이 유기용매 메탄올을 이용한 추출물에서의 카로테노이드 함량을 대조군으로 적용하였다. 대조군으로는 건조 돌외 시료를 메탄올로 상온에서 24시간 3회 교반 추출한 뒤, 여과하여 수득한 액을 40℃에서 감압 건조하여 얻은 추출물을 사용하였다.

표 1

<23> 추출압력에 따른 돌외추출물의 카로테노이드 함량(mg/g 건조시료) 변화 (추출온도: 60℃ 고정)

함량 / 추출조건	초임계 이산화탄소 압력조건 (bar)						대조군
	200	300	400	500	600	700	
carotenoids (mg/g 시료)	0.6	1.0	1.2	1.4	1.6	1.7	0.4

표 2

<24> 추출온도에 따른 돌외추출물의 카로테노이드 함량(mg/g 건조시료) 변화

함량 / 추출조건	초임계 이산화탄소 온도조건 (℃)						대조군
	40	50	60	70	80	90	
carotenoids (mg/g 시료)	1.1	1.2	1.2	1.3	1.4	1.2	0.4

<25> 상기 표 1에서 보듯이, 압력이 300bar 이상인 경우에 추출되는 총 카로테노이드 함량이 급격히 증가되는 양상을 나타내었으며, 압력이 500bar 이상인 경우에는 추출되는 함량 증가가 완만해짐을 알 수 있었다. 따라서 카로테노이드 추출에는 초임계 이산화탄소의 압력이 300 bar 이상이 적합함을 알 수 있었다. 온도의 영향은 표 2 에서 보듯이, 40℃ 이상에서 추출 효율에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 오히려 90℃ 이상에선 추출 효율이 감소하는데, 이는 온도상승에 따라 여러 성분의 안정성이 감소하였을 수도 있었음을 알 수 있었다.

<26> 실험예 1: 돌외 추출물의 주름 개선 효과

<27> 피부 노화에 따른 주름 생성은 진피층 내부의 extra-cellular 매트릭스 구조를 형성하고 있는 콜라겐 단백질의 생성 및 전환이 제대로 이루어지지 않을 때 나타날 수 있다. 따라서 돌외 초임계 추출물의 피부노화에 따른 주름 억제 효과를 측정하기 위하여, 초임계 추출물을 사람 피부세포에 투여하여 콜라겐 생성 증진 효과를 측정하였다. 인체 피부 섬유아세포 (CCD986-SK, 한국세포주 은행)를 마이크로 웰 플레이트에 5×10^5 세포가 되도록 접종하고, 37℃ CO₂ 인큐베이터에서 DMEM 배지에서 36 시간 배양하였다. 이어 DMEM 배지를 교체하는데 각각 돌외

카로테노이드 농도를 0, 10, 20, 50, 100, 200 ppm 농도로 포함하는 DMEM 배지를 적용하였다. 배지 교환 후 24 시간 추가 배양한 후 각 웰에서 세포를 제외한 용액만 모아 PICP collagen assay kit를 이용하여 콜라겐 농도를 분석하였다. 이때 콜라겐 농도는 배양중 합성된 프로타입 콜라겐 type 1의 c-peptide (PICP) 양을 측정하는데, 농도로 $\mu\text{g/ml}$ 단위로 표 3에 나타내었다.

표 3

돌외 초임계 추출물의 콜라겐 생성 증진 효과

효과 / 조건	돌외 카로테노이드 투여 농도 (ppm)					
	0	10	20	50	100	200
콜라겐 생성량 ($\mu\text{g/ml}$ 배지)	0.18	0.45	0.62	0.60	0.61	0.23

상기 표 3에서 보듯이, 본 발명의 돌외 초임계 추출물을 투여한 인체 피부세포에서 콜라겐 생성량이 증가함으로써 콜라겐 생성 촉진 효과를 확인할 수 있었다. 200 ppm 이상의 농도에서는 증진효과가 나타나지 않았는데, 이는 세포 독소효과 (cytotoxicity)로 여겨진다.

주름생성 및 피부 탄력 저하에 영향을 미치는 또 다른 단백질로 인테그린을 들 수 있다. 인테그린은 피부 세포에 존재하는 막 단백질로서, 피부 세포 간 접착 및 세포와 단백질 간의 상호작용을 촉진하는 역할을 하며, 피부 탄력에 크게 영향을 미친다. 인테그린의 발현 정도가 피부의 탄력과 밀접하게 연관되어 있다고 알려져 있다. 따라서, 돌외 초임계 추출물의 피부탄력 증진 효과를 측정하기 위하여, 초임계 추출물을 사람 피부세포에 투여하여 인테그린 발현 증진 효과를 측정하였다.

상기 인간 피부 섬유아세포 배양법과 동일하게 실험하되, 각 웰에서 배양된 세포만 원심분리를 통하여 회수하고 파쇄한 후, 세포추출액에 존재하는 인테그린 베타1의 농도를 측정하였다. 인테그린 베타1의 농도는 효소면역분석법에 의한 ELISA 분석법을 이용하는데, 인테그린 ELISA kit(TAKARA, Japan)을 이용하여 측정하고 인테그린 농도는 OD₅₃₀ 흡광도 값을 대조군의 흡광도와 상대적인 비(ratio) 값으로 표 4에 나타내었다.

표 4

돌외 초임계 추출물의 인테그린 발현 증진 효과

효과 / 조건	돌외 카로테노이드 투여 농도 (ppm)					
	0	10	20	50	100	200
흡광도 비 (ratio)	1	1.1	1.2	1.4	1.5	0.9

상기 표 4에서 보듯이, 본 발명의 돌외 초임계 추출물을 투여한 인체 피부세포에서 인테그린 베타1 발현 증진 효과를 확인할 수 있었고, 전기 콜라겐 실험과 마찬가지로 200 ppm 이상의 투여 농도에서는 증진효과가 나타나지 않았는데 마찬가지로 세포 독소효과 (cytotoxicity)로 여겨진다.

발명의 효과

본 발명은 초임계 이산화탄소를 이용하여 돌외로부터 카로테노이드의 함량이 높은 추출물을 제조하는 방법 및 상기 방법에 의하여 제조된 높은 카로테노이드 함량을 가지는 돌외추출물을 제공한다. 본 발명에 의한 카로테노이드 함량이 높은 돌외추출물은 피부노화에 따른 주름 억제 효과가 우수하고 각종 유용성분을 포함하므로 기능성 화장품이나 식품 등의 원료로 널리 활용될 수 있을 것이다.