



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월21일

(11) 등록번호 10-1513892

(24) 등록일자 2015년04월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/53 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0003418

(22) 출원일자 2013년01월11일

심사청구일자 2013년01월11일

(65) 공개번호 10-2014-0091311

(43) 공개일자 2014년07월21일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020070113561 A*

KR1020120139222 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

재단법인 한국한방산업진흥원

경상북도 경산시 화랑로 94 (갑제동)

(72) 발명자

김상인

대구 북구 연암로2길 55, (산격동)

손준호

대구 수성구 달구벌대로641길 31, 101동 1108호

(매호동, 매호화성파크드림)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신동인

전체 청구항 수 : 총 3 항

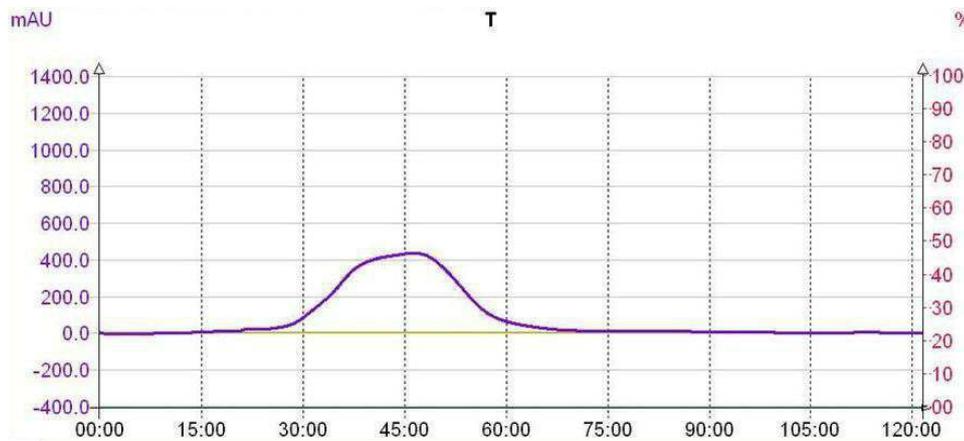
심사관 : 신창훈

(54) 발명의 명칭 단삼 추출물로부터 향산화, 미백, 주름개선에 유용한 유효 성분인 탄시논 I 및 탄시논 IIA을 다량 함유한 정제물을 생산하는 제조방법

(57) 요약

본 발명은 단삼 추출물로부터 향산화, 미백, 주름개선에 유용한 유효 성분인 탄시논 I 및 탄시논 IIA을 대량으로 분리하는 분리방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



<단일공정으로 분취한 원료소재(TanEx)의 chromatogram>

(72) 발명자

김유아

대전 대덕구 대덕대로 1555, 111동 2001호 (석봉동, 금강엑셀루타워)

김동희

경북 경산시 진량읍 황제1길 86-31, 106동 801호 (창신허제)

박상윤

대구 달서구 진천로7길 47, 101동 206호 (진천동, 세광그린타운)

조희재

경기 성남시 분당구 미금로 184, 102동 1502호 (구미동, 까치마을1단지아파트)

박태순

대구 수성구 동대구로 59, F동 3201호 (두산동, 대우트림프월드수성)

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

(1) 건조 및 분말화된 단삼시료를 시료 중량의 0.5 내지 100배(v/w)의 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 클로로포름 또는 하나 이상의 혼합용매로 10 내지 60℃ 에서 1시간 내지 6시간 동안 환류 냉각 추출법을 수행하고 이를 여과하여 조추출물을 수득하는 1 단계; (2) 상기 1단계에서 수득한 여과된 조추출물을 바로 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 클로로포름 또는 하나 이상의 혼합용매를 전개용매로 하여 건조 패킹(dry packing)하여 준비되고 실리카겔로 충전된 프레퍼러티브(preparative) HPLC 컬럼에 로딩(loading)하여 상기 전개용매로 전개하여 로딩(loading)에서부터 20 내지 60ml/min의 유속으로 30분 내지 240분 동안 전개하는 2단계 공정을 포함함을 특징으로 하는, 항산화, 미백활성 뿐만 아니라 피부노화 및 주름살에 대한 억제활성을 나타내는 유효 성분인 탄시논 I 및 탄시논 IIA을 각각 대량으로 생산하는 제조 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 2항에 있어서,

상기 제조 방법의 제 2단계에서, 상기 프레퍼러티브(preparative) HPLC는 Puriflash 430(Interchim, France), Aremen Spot prepII 시스템, 또는 Waters prep. HPLC, Agilent 1200 Series HPLC Purification Systems, Glison PLC 2020 Purification System, 또는 Hitachi HPLC Systems Prep-36을 사용함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제 2항에 있어서,

상기 제조 방법의 제 2단계에서, 상기 프레퍼러티브(preparative) HPLC의 컬럼은 Watchers 120 ODS-AP 컬럼, Waters sunfire, Waters symmetry, YMC-Triart C18, YMC-Pack ODS-A and B, Thermo Hypersil ODS, Agilent ZORBAX C-18, Phenomenex snergy C18, 또는 Phenomenex luna C18 컬럼을 충전하여 사용함을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 단삼 추출물로부터 항산화, 미백, 주름개선 등의 기능을 포함하는 탄시논 I, IIA를 고함유하는 화장 품소재를 단일공정으로 생산하는 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] [문헌 1] Claude, S., K. Manabu, M. Laura, and P. Lester. 1999. Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NKκB activation in a human keratinocyte cell line, Free radical Biol. Med. 26, 174-183.
- [0003] [문헌 2].Voegeli, R. 1996. Elastase and typtase determination on human skin surface. Cosmetic &Toiletries. 111, 51-58.
- [0004] [문헌 3].Jung, H.S., J.H. Ha., Y.K. Kim., S.H. Oh., S.S. Kim., M.H. Jeong., H.Y. Lee. 2009. Effect of Rubus coreanus extracts on ultraviolet-A irradiated cultured human skin fibroblasts. Korean J. Medicinal Crop Sci. 17(5): 321-327.
- [0005] [문헌 4] Gilchrest BA. 1989. Skin aging and photoaging. Journal of the american academy of dermatology. 21:610-613.
- [0006] [문헌 5] 정보섭 및 신민교 저, 도해향약 대사전, 영림사, pp860-862, 1998
- [0007] [문헌 6] Kim JY et al., Pharmacol. Toxicol., 92(4), pp195-200, 2003
- [0008] [문헌 7] Liu Y et al., Zhong Yao Cai., 26, pp415-417, 2003 Liu Y et al., Zhong Yao Cai., 25, pp31-33, 2002
- [0009] [문헌 8] Yuan SL et al., World J. Gastroenterol., 10(14), pp2024-2028, 2004
- [0010] [문헌 9] Ueng YF et al., Xenobiotica., 33(6), pp603-613, 2003
- [0011] [문헌 10] Tanshinones isolated from the rhizome of Salvia miltiorrhiza inhibit passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice, Hien Trung Trinh, Sun Ju Chae, Eun-Ha Joh, Kun Ho Son, Su Jin Jeon, Dong-Hyun Kim, Journal of Ethnopharmacology 132 (2010) 344348).
- [0012] [문헌 11] H.S. Kane et al., Arch. Pharm. Res., 20, 496, 1997
- [0013] [문헌 12] Bois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 1958. 26: 1199-1120
- [0014] [문헌 13] Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. Planta Medica. 1986. 39: 517-519
- [0015] [문헌 14] Cannell RJP, Kellan SJ, Owsianks AM, Walker JM. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. Planta Med. 1988. 54(1): 10-14
- [0016] [문헌 15] WE, Heindrich HG. Zur quantitativen bestimmung der collagenase. Hoppe-Seyler's. Physiol. Chem

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 본 발명은 단삼 추출물로부터 항산화, 미백, 주름개선 등의 기능을 포함하는 탄시논 I, IIA를 고함유하는 화장 품소재를 단일공정으로 생산해내는 제조 방법에 관한 것이다.

[0018] 피부의 노화는 시간의 흐름에 따라 생리적 노화 과정과 외재적 요인에 의한 노화과정으로 나누어 진다(Claude,

S., K. Manabu, M. Laura, and P. Lester. 1999. Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced $\text{NK}\kappa\text{B}$ activation in a human keratinocyte cell line, *Free radical Biol. Med.* 26, 174-183.). 이 중 외재적 요인으로 작용하는 자외선(UV=ultraviolet)은 각종 피부 트러블 유발로 기미, 주근깨, 피부 색소 침착 등의 노화 현상을 촉진하며(1.Voegeli, R. 1996. Elastase and typtase determination on human skin surface. *Cosmetic &Toiletries.* 111, 51-58.), 피부암 등 여러 가지 피부 질환의 원인이 되기도 한다(2.Jung, H.S., J.H. Ha., Y.K. Kim., S.H. Oh., S.S. Kim., M.H. Jeong., H.Y. Lee. 2009. Effect of *Rubus coreanus* extracts on ultraviolet-A irradiated cultured human skin fibroblasts. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 17(5): 321-327.). 또한 자외선은 피부 탄력 섬유인 콜라겐과 엘라스틴을 분해하여 피부 탄력을 떨어지게 하여 주름을 유발시키고 표면을 거칠게 한다(Gilchrest BA. 1989. Skin aging and photoaging. *Journal of the american academy of dermatology.* 21:610-613.).

[0019] 피부 탄력성은 진피조직의 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin), 히알루론산(hyaluronic acid) 등에 의해 유지되며, 콜라겐(collagen)을 합성하는 섬유아세포(fibroblast)는 핵심적인 역할을 한다(1). 섬유아세포 기능은 각종 성장인자(growth factor) 뿐만 아니라 케라티노사이트(keratinocyte)나 멜라노사이트(melanocyte)와 같은 피부 세포들에서 분비되는 사이토카인(cytokine)에 의해서도 조절된다(2-3). 정상적인 상태에서 유리되는 케라티노사이트의 $\text{TGF-}\beta$, $\text{T}\beta\text{RII}$, SGad3 는 피부 섬유아세포(dermal fibroblast)로 부터 프로콜라겐(procollagen), 피브리린(fibrillin-1), tropoelastin의 발현을 증가시켜 콜라겐 생성을 증가시키며, MMPs의 발현을 억제하여 콜라겐 분해를 억제하는 것으로 보고되었다.

[0020] UV에 의해 케라티노사이트가 손상되면 $\text{TGF-}\beta$ (transforming growth factor) 외에도 $\text{TNF-}\alpha$ (tumor necrosis factor), PGE_2 (prostaglandin E_2), α -MSH(melanocyte stimulating hormone), GSF(granulocyte stimulating factor), IL-1(interleukin-1), IL-6, IL-8, IL-10 등의 유리가 유발한다(6-7). IL-1, $\text{TNF-}\alpha$ (tumor necrosis factor) 등은 fibroblast에 작용하여 procollagen 발현을 억제하며, MMP-1 (martrix metalloproteinase-1), MMP-2, MMP-3, 히알루로니다아제(hyaluronidase)등의 활성을 증가시켜 콜라겐 분해를 촉진하게 된다. 또한, UV에 의해 직접적으로 섬유아세포 (fibroblast)가 상해를 받는 경우에도 콜라겐 관련 유전자는 억제되고 분해에 관련된 MMPs류 발현은 촉진되어 주름살은 증가하게 된다. 따라서, 진피 섬유아세포 (dermal fibroblast)의 증식과 콜라겐 합성을 증가시키거나, MMPs을 억제하는 것은 주름살을 생성을 억제하는 수단이 될 수 있다.

[0021] 최근 들어, 미백, 노화방지, 피부개선, 항암 및 항균 등 복합 기능성을 가진 화장품으로써 한약재는 제품 유형과 제형에 관계없이 다양하게 이용되어지고 있으며, 화장품에 천연물을 직접 이용한 것은 1973년 아모레 퍼시픽이 인삼을 주원료로 한 진생상미라는 제품을 선보인 것이 원조라 할 수 있고 이 후 산삼, 홍삼, 감초, 녹두, 흑두, 한란, 단풍잎, 대나무, 닥나무, 주목(朱木), 굴나무, 오가피, 약자수, 생강, 영지버섯, 녹차, 우영, 뽕나무 등 다양한 식물자원으로부터 효능 성분을 추출하여 화장품 개발에 적극적으로 활용하고 있으며, 소재개발로 이루어지고 있으며, 현재 세계 화장품 시장 규모 05년 약 2,500억불에서 매년 10% 성장세를 보이고 있으며, 단순미용에서 질병치료 개념으로 진화, 고기능 다기능성으로 확대, 한방화장품 시대로 변화하고 있는 상황이며, 천연 기능성 소재의 세계시장 규모는 연간 판매액 150억 달러에 달하며 최근 매년 평균 10% 이상의 성장률을 보이고 있다. 피부 천연물 소재의 개발 시 세계적으로 연간 1조 원 ~ 2조 원의 매출과 매출의 20 ~ 50%의 순이익 창출이 가능할 것으로 예상됩니다.

[0022] 특히, 주름개선 화장품의 원료개발에 있어 한방에 대한 연구는 우리 전통의학에 기반을 둔 원료개발이라는 점과 우리나라 소비자들의 화장품 선호도와 맞물려 국내 화장품 개발의 주력분야가 되고 있으며, 우리가 경쟁력을 확보할 수 있는 부분이므로 지속적인 개발이 필요하며, 기능성 화장품은 고기능성에 다기능성이 추가되는 방향으로 기술개발이 이루어지고 있으며, 이러한 기능성 소재와 관련 기술의 개발이 활발해질 것으로 예상됨. 피부재생 및 보호 효과가 우수한 한방재료를 이용한 제품화로 미용성형 및 필링 후 민감한 피부를 효과적으로 방어할 뿐만 아니라, 탁월한 피부재생 효과로 인한 기능성 화장품 또는 의약품으로서의 가치를 지니므로서 상품화의 가치가 크고 피부 신약 개발은 임상 초기에 개발의 성공 여부를 신속하게 판단할 수 있어서 임상 후기 단계의 실패에 따른 위험이 감소한다. 또한 피부질환은 신약개발에 대한 소요기간이 상대적으로 짧아서 개발 성과의 조기 가시화 및 빠른 투자 회수가 가능하므로 신약 개발의 새로운 패러다임 창출이 가능할 것이다.

[0023] 단삼 (丹蔘, *Salvia miltiorrhiza* BUNGE)은 한방에서 예로부터 널리 사용된 약재로 꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 쌍떡잎식물 통화식물목의 여러해살이풀로 원산지는 중국이다. 단삼은 수염뿌리를 제거하고 햇볕에 말린 뿌리를 약용으로 하며 11월 상순부터 다음해 3월 상순까지 채취하는데 11월 상순에 캐낸 것이 가장 좋은 것으로 알려져 있다. 단삼의 뿌리에 함유된 성분으로는 탄신논 I (tanshinone I), 탄신논 IIA (tanshinone IIA), 탄신논

II B (tanshinone II B), 디히드로탄시논 (dihydratanshinone), 메틸탄시논네이트 (methyl tanshinonate), 메틸렌 탄시퀴논 (methylene tanshinquinone), 베타-시토스테롤 (betasitosterol), 히드록시탄시논 (hydroxytanshinone), 네오탄시논 (neotanshinone) A·B·C, 살비올 (salviol), 이소탄시논 I (isotanshinone I), 이소탄시논 II (isotanshinone II), 이소크립토탄시논(isocryptotanshinone), 밀티론 (miltirone), 탄시놀 I (tanshinol I), 탄시놀 II (tanshinol II) 및 비타민 E (vitamin E) 등이 보고되고 있다 (정보섭 및 신민교 저, 도해향약 대사전, 영림사, pp860-862, 1998).

[0024] 이 중 본 발명의 정제 추출물에 함유된 탄시논 I, 탄시논 IIA 및 크립토탄시논의 활성은 하기와 같이 알려진 바 있다. 탄시논 I은 활성화된 간성상세포의 자가사멸을 유도하여 항섬유화효과를 나타내는 효능이 본 발명자들에 의해 보고된 바 있으며 (Kim JY et al., Pharmacol. Toxicol., 92(4), pp195-200, 2003), 탄시논 IIA는 사염화탄소에 의한 간손상 및 간섬유화에 대한 효능 (Liu Y et al., Zhong Yao Cai., 26, pp415-417, 2003 Liu Y et al., Zhong Yao Cai., 25, pp31-33, 2002) 및 간암세포에 대한 항암효과 (Yuan SL et al., World J. Gastroenterol., 10(14), pp2024-2028, 2004)가 보고되었으며, 크립토탄시논은 시토크롬 P4501A2 (cytochrome p4501A2; CYP1A2)의 억제효능 (Ueng YF et al., Xenobiotica., 33(6), pp603-613, 2003)이 보고되었다.

[0025] 기존의 전통적인 정제방법인 MeOH등의 추출용매로 추출한 후에 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 및 부탄올 등의 순차적인 분획 후 다시 각 분획물을 농축하고 그 중 탄시논계 화합물이 들어있는 분획을 다시 용해하여 컬럼을 실시하여 공정마다 농축단계 및 용해 단계가 포함된 다단계의 복잡한 공정으로서 지나치게 작은 수율로 탄시논계 화합물을 얻는 등의 문제점을 안고 있어 산업적으로 유용하지 못한 문제점을 안고 있다. (Tanshinones isolated from the rhizome of Salvia miltiorrhiza inhibit passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice, Hien Trung Trinh, Sun Ju Chae, Eun-Ha Joh, Kun Ho Son, Su Jin Jeon, Dong-Hyun Kim, Journal of Ethnopharmacology 132 (2010) 344348).

[0026] 그러나, 상기 문헌의 어디에도 단삼 추출물로부터 항산화, 미백, 주름개선에 유용한 유효 성분인 탄시논 I 및 탄시논 IIA을 대량으로 분리하는 분리방법에 대한 어떠한 내용도 교시되거나 개시된 바는 없다.

[0027] 이에 본 발명자들은 단삼 추출물을 대상으로 유효성분인 탄시논 I 및 탄시논 IIA을 고수율 및 고순도로 대량으로 추출할 수 있는 추출 조건을 확립하였을 뿐만 아니라 활성성분들을 분리하였으며, 이러한 시료에 대하여, 전자공여능(electron donating ability) 측정, ABTS radical 소거능 측정등의 항산화 활성 실험; Elastase 저해 활성 측정, Collagenase 저해활성 측정 등의 효소억제활성을 통한 주름개선 효능 측정 등의 광범위한 주름개선에 대한 효과 측정 실험을 통하여 상기 시료들이 강력한 항산화, 미백활성 뿐만 아니라 피부노화 및 주름살에 대한 억제활성을 나타냄을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0028] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 단삼 추출물로부터 강력한 항산화, 미백활성 뿐만 아니라 피부노화 및 주름살에 대한 억제활성을 나타내는 활성 성분인 탄시논 I 및 탄시논 IIA을 대량으로 생산하는 제조 방법을 제공한다.

[0029] 구체적으로, 본 발명의 제 1구현예로서, 본 발명은 (1) 건조 및 분말화된 단삼시료를 시료 중량의 0.5 내지 100 배(v/w), 바람직하게는 1 내지 40배 부피(v/w)의 물, 주정, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 헥산, 에칠에테르, 에틸아세테이트, 시클로헥산, 디메틸설폭사이드(DMSO), 클로로포름, 또는 메틸렌 클로라이드로부터 선택된 단독용매 또는 하나 이상의 혼합용매, 바람직하게는 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 또는 클로로포름 등의 추출용매로 0 내지 100℃, 바람직하게는 10 내지 60℃ 에서 30분 내지 24시간, 바람직하게는 1시간 내지 6시간 동안 추출법을 수행하고 이를 여과하여 조추출물을 수득하는 1 단계; (2) 상기 1단계에서 수득한 여과된 조추출물을 바로 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 클로로포름, 아세톤, 부탄올, 에탄올, 메탄올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 또는 클로로포름 등의 전개용매로 건조 패키징(dry packing)하여 준비되고 실리카겔로 충전된 프레퍼러티브(preparative) HPLC 컬럼에 로딩(loading)하여 상기 전개용매로 전개하는 크로마토그래피를 2단계 공정을 포함함을 특징으로 하는 탄시논 I 및 탄시논 IIA을 대량 함유한 단삼 정제물을 대량으로 생산하는 제조 방법을 제공한다.

- [0030] 또한 본 발명의 또 하나의 구현예로서, 본 발명은 (1) 건조 및 분말화된 단삼시료를 시료 중량의 0.5 내지 100배(v/w), 바람직하게는 1 내지 40배 부피(v/w)의 물, 주정, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 헥산, 에칠에테르, 에틸아세테이트, 시클로헥산, 디메틸설폭사이드(DMSO), 클로로포름, 또는 메틸렌 클로라이드로부터 선택된 단독용매 또는 하나 이상의 혼합용매, 바람직하게는 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 또는 클로로포름 등의 추출용매로 0 내지 100℃, 바람직하게는 10 내지 60℃ 에서 30분 내지 24시간, 바람직하게는 1시간 내지 6시간 동안 추출법을 수행하고 이를 여과하여 조추출물을 수득하는 1 단계; (2) 상기 1단계에서 수득한 여과된 조추출물을 바로 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 클로로포름, 아세톤, 부탄올, 에탄올, 메탄올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 또는 클로로포름 등의 전개용매로 건조 패킹(dry packing)하여 준비되고 실리카겔로 충전된 프레퍼러티브(preparative) HPLC 컬럼에 로딩(loading)하여 상기 전개용매로 전개하여 로딩(loading)에서부터 10 내지 100ml/min, 바람직하게는, 20 내지 60ml/min의 유속으로 20분 내지 360분, 바람직하게는 30분 내지 240분 동안 전개하는 단계를 수행하는 2단계 공정을 포함함을 특징으로 하는, 항산화, 미백활성 뿐만 아니라 피부노화 및 주름살에 대한 억제활성을 나타내는 유효 성분인 탄시논 I 및 탄시논 IIA를 각각 대량으로 생산하는 제조 방법을 제공한다.
- [0031] 구체적으로, 상기 제조방법의 제 1단계에서, 상기 추출방법은 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 속슬렛(SoXHlet) 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법, 바람직하게는 환류 냉각 추출을 사용함이 바람직하다.
- [0032] 상기 제조방법의 제 1단계에서, 상기 추출물을 여과법, 원심분리법 또는 이들의 조합, 바람직하게는 여과법을 수행하여 단삼 조추출물을 수득함이 바람직하다.
- [0033] 상기 제조방법의 제 2단계에서, 상기 프레퍼러티브(preparative) HPLC는 Puriflash 430(Interchim, France), Aremen Spot prepII 시스템, 또는 Waters prep. HPLC, Agilent 1200 Series HPLC Purification Systems, Glison PLC 2020 Purification System, Hitachi HPLC Systems Prep-36 등 유사 사양의 Prep HPLC에 Watchers 120 ODS-AP 컬럼 또는 Waters sunfire, Waters symmetry, YMC-Triart C18, YMC-Pack ODS-A and B, Thermo Hypersil ODS, Agilent ZORBAX C-18, Phenomenex snergy C18, Phenomenex luna C18 등의 컬럼을 충전하여 사용함을 특징으로 한다.
- [0034] 본 발명의 상기 정제 및 제조공정을 통하여, 기존의 전통적인 정제방법인 MeOH등의 추출용매로 추출한 후에 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트 및 부탄올 등의 순차적인 분획 후 다시 각 분획물을 농축하고 그 중 탄시논계 화합물이 들어있는 분획을 다시 용해하여 컬럼을 실시하여 공정마다 농축단계 및 용해 단계가 포함된 다단계의 복잡한 공정으로 구성된 탄시논계 화합물 분리 방법, 예를 들어, 문헌(Tanshinones isolated from the rhizome of *Salvia miltiorrhiza* inhibit passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice, Hien Trung Trinh, Sun Ju Chae, Eun-Ha Joh, Kun Ho Son, Su Jin Jeon, Dong-Hyun Kim, Journal of Ethnopharmacology 132 (2010) 344348)에 기재된 방법을 살펴 보면, 단삼을 추출→농축→용해→분획→농축→용해→실리카겔 크로마토그래피→농축→재결정→건조 과정 등의 다수 단계 공정을 거쳐 탄시논 I, 0.005% 및 탄시논 IIA, 0.0068%의 매우 작은 수율로만 수득가능)에 기재된 종래 제조방법은 다단계 공정으로 인하여 발생하는 문제점, 즉, 시간과 비용이 많이 소모되고 수율 또한 매우 낮은 점 등의 문제점을 해결할 수 있다.
- [0035] 본원 발명은 추출과정 후 농축없이 바로 컬럼에 로딩하고 단 한번에 탄시논계 화합물을 높은 함량범위, 예를 들어, 20.0% 내지 28.0% 범위의 탄시논 I 및 48.0% 내지 55.0% 범위의 탄시논 IIA에 달하는 고품량 및 고순도의 탄시논계 화합물을 함유한 정제물을 얻을 수 있었다. 또한 상기 제조공정에서 얻은 고품량의 정제물은 강력한 항산화, 미백활성 뿐만 아니라 피부노화 및 주름살에 대한 억제활성을 나타내므로 탄시논 I 및 탄시논 IIA를 대량 함유한 단삼 정제물을 유효성분으로 하는 화장료 제조에 유용함을 확인하였다.
- [0036] 따라서, 본 발명은 상기 생산방법으로 제조된 탄시논 I 및 탄시논 IIA를 대량 함유한 단삼 추출 정제물을 유효 성분으로 함유하는 피부노화, 미백 또는 주름살의 예방 및 개선을 위한 화장료 조성물을 제공한다.
- [0037] 상기 제조 방법으로 제조된 탄시논 I 및 탄시논 IIA를 대량 함유한 단삼 추출 정제물을 대상으로 전자공여능(electron donating ability) 측정, ABTS radical 소거능 측정등의 항산화 활성 실험; Elastase 저해활성 측정, Collagenase 저해활성 측정 등의 효소억제활성을 통한 주름개선 효능 측정 등의 광범위한 주름개선에 대한 효과 측정 실험을 통하여 상기 시료들이 강력한 미백활성 및 피부노화 및 주름살에 대한 억제활성을 나타냄을 확인하였다.
- [0038] 또한, 상기 화장료 조성물은 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 마사지 크림, 에센스, 팩의 제형을 포함

한다.

- [0039] 또한, 본 발명의 추출물 또는 화합물은 피부주름살 개선 효과를 갖는 화장품 및 세안제 등에 다양하게 이용될 수 있다.
- [0040] 본 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 화장수, 스킨, 로션, 영양로션, 영양크림, 맛사지크림, 에센스, 팩 등과 같은 화장품류와 샴푸, 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 미용액 등이 있다.
- [0041] 본 발명의 화장료는 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스펅고 지질 및 해초 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 조성물을 포함한다.
- [0042] 수용성 비타민으로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B6, 피리독신, 엽산피리독신, 비타민 B12, 판토텐산, 니코틴산, 니코틴산아미드, 엽산, 비타민 C, 비타민 H 등을 들 수 있으며, 그들의 염 (티아민엽산염, 아스코르빈산나트륨염 등)이나 유도체 (아스코르빈산-2-인산나트륨염, 아스코르빈산-2-인산마그네슘염 등)도 본 발명에서 사용할 수 있는 수용성 비타민에 포함된다. 수용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 취득할 수 있다.
- [0043] 유용성 비타민으로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 비타민 A, 카로틴, 비타민 D2, 비타민 D3, 비타민 E (d1-알과 토코페롤, d-알과 토코페롤, d-알과 토코페롤) 등을 들 수 있으며, 그들의 유도체 (팔미틴산아스코르빈, 스테아르산아스코르빈, 디팔미틴산아스코르빈, 아세트산 d1-알과 토코페롤, 니코틴산 d1-알과 토코페롤비타민 E, d1-판토텐일알코올, D-판토텐일알코올, 판토텐일에틸에테르 등) 등도 본 발명에서 사용되는 유용성 비타민에 포함된다. 유용성 비타민은 미생물 변환법, 미생물의 배양물로부터의 정제법, 효소 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 취득할 수 있다.
- [0044] 고분자 펩티드로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 콜라겐, 가수 분해 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴, 가수 분해 엘라스틴, 케라틴 등을 들 수 있다. 고분자 펩티드는 미생물의 배양액으로부터의 정제법, 효소법 또는 화학 합성법 등의 통상의 방법에 의해 정제 취득할 수 있으며, 또는 통상 돼지나 소 등의 진피, 누에의 견섬유 등의 천연물로부터 정제하여 사용할 수 있다.
- [0045] 고분자 다당으로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 히드록시에틸셀룰로오스, 크산탄검, 히알루론산나트륨, 콘드로이틴 황산 또는 그 염 (나트륨염 등) 등을 들 수 있다. 예를 들어, 콘드로이틴 황산 또는 그 염 등은 통상 포유동물이나 어류로부터 정제하여 사용할 수 있다.
- [0046] 스펅고 지질로서는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 세라미드, 피토스핑고신, 스펅고당지질 등을 들 수 있다. 스펅고 지질은 통상 포유류, 어류, 패류, 효모 또는 식물 등으로부터 통상의 방법에 의해 정제하거나 화학 합성법에 의해 취득할 수 있다.
- [0047] 해초 엑기스로는 화장품에 배합 가능한 것이라면 어떠한 것이라도 되지만, 바람직하게는 갈조 엑기스, 홍조 엑기스, 녹조 엑기스 등을 들 수 있으며, 또, 이들의 해초 엑기스로부터 정제된 칼라기난, 아르긴산, 아르긴산나트륨, 아르긴산칼륨 등도 본 발명에서 사용되는 해초 엑기스에 포함된다. 해초 엑기스는 해초로부터 통상의 방법에 의해 정제하여 취득할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 화장료에는 상기 필수 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분을 배합해도 된다.
- [0049] 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다.
- [0050] 유지 성분으로서는 에스테르계 유지, 탄화수소계 유지, 실리콘계 유지, 불소계 유지, 동물 유지, 식물 유지 등을 들 수 있다.
- [0051] 에스테르계 유지로서는 트리2-에틸헥산산글리세릴, 2-에틸헥산산세틸, 미리스틴산이소프로필, 미리스틴산부틸, 팔미틴산이소프로필, 스테아르산에틸, 팔미틴산옥틸, 이소스테아르산이소세틸, 스테아르산부틸, 리놀레산에틸, 리놀레산이소프로필, 올레인산에틸, 미리스틴산이소세틸, 미리스틴산이소스테아릴, 팔미틴산이소스테아릴, 미리스틴산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 세바신산디에틸, 아디핀산디이소프로필, 네오펜탄산이소알킬, 트리(카프릴, 카프린산)글리세릴, 트리2-에틸헥산산트리메틸올프로판, 트리아소스테아르산트리메틸올프로판, 테트라

2-에틸헥산산펜타엘리글리콜, 카프릴산세틸, 라우린산데실, 라우린산헥실, 미리스틴산데실, 미리스틴산미리틸, 미리스틴산세틸, 스테아르산스테아릴, 올레인산데실, 리시노올레인산세틸, 라우린산이소스테아릴, 미리스틴산이소트리데실, 팔미틴산이소세틸, 스테아르산옥틸, 스테아르산이소세틸, 올레인산이소데실, 올레인산옥틸도데실, 리놀레산옥틸도데실, 이소스테아르산이소프로필, 2-에틸헥산산세토스테아릴, 2-에틸헥산산스테아릴, 이소스테아르산헥실, 디옥탄산에틸렌글리콜, 디올레인산에틸렌글리콜, 디카프린산프로필렌글리콜, 디(카프릴, 카프린산)프로필렌글리콜, 디카프릴산프로필렌글리콜, 디카프린산네오펜틸글리콜, 디옥탄산네오펜틸글리콜, 트리카프릴산글리세릴, 트리운데실산글리세릴, 트라이소팔미틴산글리세릴, 트라이소스테아르산글리세릴, 네오펜탄산옥틸도데실, 옥탄산이소스테아릴, 이소노난산옥틸, 네오데칸산헥실데실, 네오데칸산옥틸도데실, 이소스테아르산이소세틸, 이소스테아르산이소스테아릴, 이소스테아르산옥틸데실, 폴리글리세린올레인산에스테르, 폴리글리세린이소스테아르산에스테르, 시트르산트라이소세틸, 시트르산트라이소알킬, 시트르산트라이소옥틸, 락트산라우릴, 락트산미리틸, 락트산세틸, 락트산옥틸데실, 시트르산트리에틸, 시트르산아세틸트리에틸, 시트르산아세틸트리부틸, 시트르산트리옥틸, 말산다이소스테아릴, 히드록시스테아르산 2-에틸헥실, 숙신산디2-에틸헥실, 아디판산다이소부틸, 세바신산다이소프로필, 세바신산디옥틸, 스테아르산콜레스테릴, 이소스테아르산콜레스테릴, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 올레인산콜레스테릴, 올레인산디히드로콜레스테릴, 이소스테아르산피트스테릴, 올레인산피트스테릴, 12-스테알로일히드록시스테아르산이소세틸, 12-스테알로일히드록시스테아르산스테아릴, 12-스테알로일히드록시스테아르산이소스테아릴 등의 에스테르계 등을 들 수 있다.

[0052] 탄화 수소계 유지로서는 스쿠알렌, 유동 파라핀, 알파-올레핀올리고머, 이소파라핀, 세레신, 파라핀, 유동 이소파라핀, 폴리부텐, 마이크로크리스탈린왁스, 왁셀린 등의 탄화 수소계 유지 등을 들 수 있다.

[0053] 실리콘계 유지로서는 폴리메틸실리콘, 메틸페닐실리콘, 메틸시클로폴리실록산, 옥타메틸폴리실록산, 데카메틸폴리실록산, 도데카메틸시클로실록산, 디메틸실록산·메틸세틸옥시실록산 공중합체, 디메틸실록산·메틸스테알록시실록산 공중합체, 알킬 변성 실리кон유, 아미노 변성 실리кон유 등을 들 수 있다.

[0054] 불소계 유지로서는 퍼플루오로폴리에테르 등을 들 수 있다.

[0055] 동물 또는 식물 유지로서는 아보카도유, 아르몬드유, 올리브유, 참깨유, 쌀겨유, 새플라워유, 대두유, 옥수수유, 유채유, 행인(杏仁)유, 팜핵유, 팜유, 피마자유, 해바라기유, 포도종자유, 면실유, 야자유, 쿠쿠이너트유, 소맥배아유, 쌀 배아유, 시아버터, 월견조유, 마커데미미아너트유, 메도흙유, 난황유, 우지(牛脂), 마유, 밍크유, 오렌지라피유, 호호바유, 캔데리리왁스, 카르나바왁스, 액상 라놀린, 경화피마자유 등의 동물 또는 식물 유지를 들 수 있다.

[0056] 보습제로서는 수용성 저분자 보습제, 지용성 분자 보습제, 수용성 고분자, 지용성 고분자 등을 들 수 있다.

[0057] 수용성 저분자 보습제로서는 세린, 글루타민, 솔비톨, 만니톨, 피롤리돈-카르복실산나트륨, 글리세린, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜B(중합도 n = 2 이상), 폴리프로필렌글리콜(중합도 n = 2 이상), 폴리글리세린B(중합도 n = 2 이상), 락트산, 락트산염 등을 들 수 있다.

[0058] 지용성 저분자 보습제로서는 콜레스테롤, 콜레스테롤에스테르 등을 들 수 있다.

[0059] 수용성 고분자로서는 카르복시비닐폴리머, 폴리아스파라긴산염, 트라가칸트, 크산탄검, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 수용성 키틴, 키토산, 텍스트린 등을 들 수 있다.

[0060] 지용성 고분자로서는 폴리비닐피롤리돈·에이코센 공중합체, 폴리비닐피롤리돈·헥사데센 공중합체, 니트로셀룰로오스, 텍스트린지방산에스테르, 고분자 실리콘 등을 들 수 있다.

[0061] 에몰리엔트제로서는 장쇄아실글루타민산콜레스테릴에스테르, 히드록시스테아르산콜레스테릴, 12-히드록시스테아르산, 스테아르산, 로진산, 라놀린지방산콜레스테릴에스테르 등을 들 수 있다.

[0062] 계면 활성제로서는 비이온성 계면 활성제, 음이온성 계면 활성제, 양이온성 계면 활성제, 양성 계면 활성제 등을 들 수 있다.

[0063] 비이온성 계면 활성제로서는 자기 유화형 모노스테아르산글리세린, 프로필렌글리콜지방산에스테르, 글리세린지방산에스테르, 폴리글리세린지방산에스테르, 솔비탄지방산에스테르, POE (폴리옥시에틸렌)솔비탄지방산에스테르, POE 솔비트지방산에스테르, POE 글리세린지방산에스테르, POE 알킬에테르, POE 지방산에스테르, POE 경화피마자유, POE 피마자유, POE·POP (폴리옥시에틸렌·폴리옥시프로필렌) 공중합체, POE·POP 알킬에테르, 폴리에테르변성실리콘, 라우린산알카놀아미드, 알킬아민옥시드, 수소첨가대두인지

질 등을 들 수 있다.

- [0064] 음이온성 계면 활성제로서는 지방산비누, 알파-아실술폰산염, 알킬술폰산염, 알킬알릴술폰산염, 알킬나프탈렌술폰산염, 알킬황산염, POE 알킬에테르황산염, 알킬아미드황산염, 알킬인산염, POE 알킬인삼염, 알킬아미드인산염, 알킬로일알킬타우린염, N-아실아미노산염, POE 알킬에테르카르복실산염, 알킬술폰숙신산염, 알킬술폰아세트산나트륨, 아실화 가수분해 콜라겐펩티드염, 퍼플루오로알킬인산에스테르 등을 들 수 있다.
- [0065] 양이온성 계면 활성제로서는 염화알킬트리메틸암모늄, 염화스테아릴트리메틸암모늄, 브롬화스테아릴트리메틸암모늄, 염화세토스테아릴트리메틸암모늄, 염화디스테아릴디메틸암모늄, 염화스테아릴디메틸벤질암모늄, 브롬화베헤닐트리메틸암모늄, 염화벤잘코늄, 스테아르산디에틸아미노에틸아미드, 스테아르산디메틸아미노프로필아미드, 라놀린 유도체 제 4급 암모늄염 등을 들 수 있다.
- [0066] 양성 계면 활성제로서는 카르복시베타인형, 아미드베타인형, 술포베타인형, 히드록시술포베타인형, 아미드술포베타인형, 포스포베타인형, 아미노카르복실산염형, 이미다졸린 유도체형, 아미드아민형 등의 양성 계면 활성제 등을 들 수 있다.
- [0067] 유기 및 무기 안료로서는 규산, 무수규산, 규산마그네슘, 텔크, 세리사이트, 마이카, 카올린, 벵갈라, 클레이, 벤토나이트, 티탄피막운모, 옥시염화비스무트, 산화지르코늄, 산화마그네슘, 산화아연, 산화티탄, 산화알루미늄, 황산칼슘, 황산바륨, 황산마그네슘, 탄산칼슘, 탄산마그네슘, 산화철, 군청, 산화크롬, 수산화크롬, 칼라민 및 이들의 복합체등의 무기 안료 ; 폴리아미드, 폴리에스테르, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리우레탄, 비닐수지, 요소수지, 페놀수지, 불소수지, 규소수지, 아크릴수지, 멜라민수지, 에폭시수지, 폴리카보네이트수지, 디비닐벤젠·스티렌 공중합체, 실크파우더, 셀룰로오스, CI 피그먼트옐로우, CI 피그먼트옐로우 등의 유기 안료 및 이들의 무기 안료와 유기 안료의 복합 안료 등을 들 수 있다.
- [0068] 유기 분체로서는 스테아르산칼슘 등의 금속비누; 세틸린산아연나트륨, 라우릴린산아연, 라우릴린산칼슘 등의 알킬인산금속염; N-라우로일-베타-알라닌칼슘, N-라우로일-베타-알라닌아연, N-라우로일글리신칼슘 등의 아실아미노산 다가금속염; N-라우로일-타우린칼슘, N-팔미토일-타우린칼슘 등의 아미드술폰산 다가금속염; N-엡실론-라우로일-L-리진, N-엡실론-팔미토일리진, N-알파-과리토일올니틴, N-알파-라우로일아르기닌, N-알파-경화우지지방산아실아르기닌 등의 N-아실염기성아미노산; N-라우로일글리실글리신 등의 N-아실폴리펩티드; 알파-아미노카프릴산, 알파-아미노라우린산 등의 알파-아미노지방산; 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 나일론, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리스티렌, 디비닐벤젠·스티렌 공중합체, 사불화에틸렌 등을 들 수 있다.
- [0069] 자외선 흡수제로서는 파라아미노벤조산, 파라아미노벤조산에틸, 파라아미노벤조산아밀, 파라아미노벤조산옥틸, 살리실산에틸렌글리콜, 살리신산페닐, 살리신산옥틸, 살리신산벤질, 살리신산부틸페닐, 살리신산호모멘틸, 계피산벤질, 파라메톡시계피산-2-에톡시에틸, 파라메톡시계피산옥틸, 디파라메톡시계피산모노-2-에틸헥산글리세릴, 파라메톡시계피산이소프로필, 디이소프로필·디이소프로필계피산에스테르 혼합물, 우로카닌산, 우로카닌산에틸, 히드록시메톡시벤조페논, 히드록시메톡시벤조페논술폰산 및 그 염, 디히드록시메톡시벤조페논, 디히드록시메톡시벤조페논디술폰산나트륨, 디히드록시벤조페논, 테트라히드록시벤조페논, 4-tert-부틸-4'-메톡시디벤조일메탄, 2,4,6-트리아닐리노-p-(카르보-2'-에틸헥실-1'-옥시)-1,3,5-트리아진, 2-(2-히드록시-5-메틸페닐)벤조트리아졸 등을 들 수 있다.
- [0070] 살균제로서는 히노키티올, 트리클로산, 트리클로로히드록시디페닐에테르, 크로르헥시딘글루콘산염, 페녹시에탄올, 레조르신, 이소프로필메틸페놀, 아줄렌, 살리칠산, 진크필리티온, 염화벤잘코늄, 감광소 301호, 모노니트로과이어콜나트륨, 운데시렌산 등을 들 수 있다.
- [0071] 산화 방지제로서는 부틸히드록시아니솔, 갈릭산프로필, 엘리스오르빈산 등을 들 수 있다.
- [0072] pH 조정제로서는 시트르산, 시트르산나트륨, 말산, 말산나트륨, 프말산, 프말산나트륨, 숙신산, 숙신산나트륨, 수산화나트륨, 인산일수소나트륨 등을 들 수 있다.
- [0073] 알코올로서는 세틸알코올 등의 고급 알코올을 들 수 있다.
- [0074] 또한, 이외에 첨가해도 되는 배합 성분은 이에 한정되는 것은 아니며, 또, 상기 어느 성분도 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 배합 가능하지만, 총중량에 대하여 바람직하게는 0.01-5 %중량, 보다 바람직하게는 0.01-3 %중량로 배합된다.
- [0075] 본 발명의 화장료는 용액, 유화물, 점성형 혼합물 등의 형상을 취할 수 있다.

- [0076] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 우방자 추출물 및 diarctigenin 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함한다.
- [0077] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 유액, 크림, 화장수, 팩, 파운데이션, 로션, 미용액, 모발화장료 등을 들 수 있다.
- [0078] 구체적으로, 본 발명의 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바다로션 및 바다클린저의 제형을 포함한다.
- [0079] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0080] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0081] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 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.
- [0082] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록사이드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0083] 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 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0084] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구체적인 구성에 대하여 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 권리범위는 이들 실시예의 기재에만 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0085] 상기한 바와 같은 본 발명의 상기 정제 및 제조공정을 통하여, 선행기술에 알려진 추출 및 분리 방법보다 유효 성분인 탄시논 I 및 탄시논 IIA을 고수율 및 고순도로 대량으로 추출할 수 있는 추출조건을 확립하였을 뿐만 아니라 이러한 시료들에 대하여, 전자공여능(electron donating ability) 측정, ABTS radical 소거능 측정등의 항노화 활성 실험; Elastase 저해활성 측정, Collagenase 저해활성 측정 등의 효소억제활성을 통한 주름개선 효능 측정 등의 광범위한 주름개선에 대한 효과 측정 실험을 통하여 상기 시료들이 강력한 피부노화 및 주름살에 대한 억제활성을 나타냄을 확인하여 단삼 추출물로부터 유효성분의 효율적이고 대량생산이 가능한 산업적 분리 방법 및 화장료 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0086] 도 1은 단삼으로부터 탄시논 I 및 탄시논 IIA를 대량 함유한 원료소재(TanEx)를 추출 및 분리하는 공정을 나타낸 도이며;
- 도 2은 단일공정으로 분취한 원료소재(TanEx)의 크로마토그램을 나타낸 도이며;
- 도 3는 원료소재(TanEX)의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 도이며;

도 4는 분리된 탄시논 I 및 탄시논 IIA 순도를 측정된 HPLC 크로마토그램 결과를 나타낸 도이며;
 도 5는 Compound 1(탄시논 I)과 Compound 2(탄시논 IIA)의 분취 크로마토그램을 나타낸 도이며;
 도 6는 compound 1(탄시논 I)의 ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) 및 ¹³C-NMR 스펙트럼(CDCl₃, 125 MHz)을 나타낸 도이며;
 도 7는 compound 2(탄시논 IIA)의 ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) 및 ¹³C-NMR 스펙트럼(CDCl₃, 125 MHz)을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0087] 이하, 본 발명을 하기 실시 예 및 실험 예에 의해 상세히 설명한다.
 [0088] 단, 하기 실시 예 및 실험 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시 예, 참고 예 및 실험 예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0089] **참조예 1. 실험 준비**

[0090] 1-1. 시약 및 시료

[0091] 항산화능과 항염증 측정 실험에 사용된 시약인 1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH), xanthine, xanthine oxidase, pyrogallol, hyaluronidase, hyaluronic acid, p-dimethylaminobenzaldehyde, sodium nitrite 및 griess reagent 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

[0092] 1-2. 미백 및 주름억제 효과 측정 시약

[0093] 미백 및 주름억제 효과 측정에 사용된 시약인 mushroom tyrosinase, L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine(L-DOPA), porcine pancreas elastase(PPE), N-succinyl-(L-Ala)³-p-nitroanilide, collagenase 및 4-phenylazobenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 콜라겐 생합성 측정에 사용된 시약은 procollagen type IC-peptide EIA kit(Takara-Bio Inc. Japan)을 구입하여 사용하였다.

[0094] 1-3. 실험에 사용된 기기

[0095] 분취용 (preparative) Aremen Spot prepII 시스템(France)을 사용하였다. 상기 Aremen Spot prepII 시스템은 1 to 50 mL/min의 유속 및 300 bar(50 mL/min)압력에서 이용하였다. 또한 Detector로 UV-Vis dual WL spectrophotometer 200-600 nm를 이용하였다. 시료는 Shimadzu LC-20A system(일본)을 이용하여 HPLC로 분석하였으며, 구성기기로는 펌프 LC-20At 자동시료입기에는 Si1-9A, Shimadzu, 검출기로서 SPD-M20A(PDA)와 ELSD-LTII(ELSD)로 되었으며, 사용 컬럼으로 YMC Triart C18 column(4.6× 250 mm, 5μm, YMC, Japan)을 장착하였다. 항산화, 미백 주름억제 효과를 측정하기 위하여 사용한 ELISA reader는 Bio Rad(Japan)사의 제품을 이용하였다.

[0096] **실시예 1. 단삼 추출물로부터 탄시논 I 및 IIA의 추출분리**

[0097] 1-1. 단삼 추출물 시료의 제조 (도 1 참조)

[0098] 사용한 단삼 시료는 휴먼허브(<http://www.humanherb.co.kr>)로부터 구입하여 사용하였다. 아세토니트릴, 에탄올 및 메탄올은 Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA)에서 구입하였고 3차 증류수(Sartorius arium 611VF, Germany)를 이용하여 제조한 후 분석과 추출에 사용하였다. 추출 및 분획에 사용한 용매는 모두 특급을 사용하였다.

[0099] 1단계로 단삼 500g을 메틸렌클로라이드용매 2L의 용매로 추출조에서 40℃에서 3 시간 동안 환류 추출법을 수행하고 여과지 (NO.2. Whatman)로 여과한 후 바로 여과 추출액을 컬럼 로딩(loading)에 이용하였다.

[0100] 2단계로 MPLC는 Puriflash 43 0(Interchim, France)으로 구성하고 전개용매로 메틸렌클로라이드 용액을 사용하였다. 분리용 컬럼으로 실리카겔 (Merck 9385)로 충전된 컬럼(50×500 mm)을 메틸렌클로라이드로 건조 패킹(dry packing)하여 준비하였다. 이 후에 추출 후 여과액을 직접 로딩(loading)에 사용하고 로딩(loadinf)이 완료되면 다시 메틸렌클로라이드로 전개하여 로딩(loading)에서부터 유속은 40 ml/min으로 120분간 전개하였다.

[0101] 상기 실험 결과, 도 2와 같은 크로마토그램을 나타내었으며, 획득한 단일피크를 원료소재(TanEx)로 하였다. 이때 얻어진 원료소재의 건조 중량은 총 564 mg이었다. 한약재 단삼으로부터 약 0.11%의 수율을 나타냈다.

[0102] 1-2. 원료소재(TanEx)의 성분 양상(profile)

[0103] 원료소재(TanEx) 성분을 HPLC로 분석한 결과를 도 3에 나타내었다. UV 검출기 254nm 파장에서 피크1, 2, 3 및 4의 피크가 검출되었으며 Area%가 24.0, 19.3, 51.1 및 5.6의 비율로 구성되어 있으며 또한 총 Area%가 100인 것을 볼 때 원료소재(TanEx)가 4개의 피크 외 다른 물질은 없는 것으로 판단하였다.

표 1

분석을 위한 HPLC 조건 확립

[0104]

Pump	Shimadzu LC-20AT		
Detector	Shimadzu SPD-M20A(PDA) 254nm		
Column	YMC Triart C-18 (4.6×250 mm, 5 μm)		
Flow rate	1 ml/min		
Mobile phase	Time (min)	Solvent A (%) H2O+1% HOAc	Solvent B (%) ACN+1% HOAc
	0	95	5
	5	95	5
	45	0	100
	50	0	100
	55	95	5

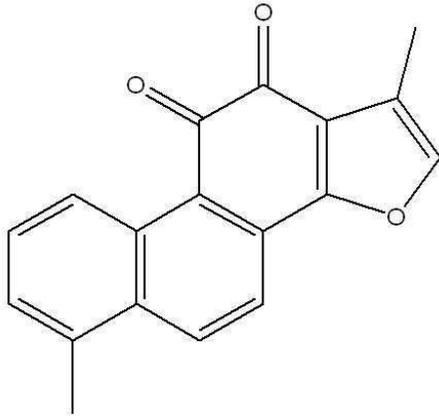
[0105] 1-3. 원료소재(TanEx)의 성분규명

[0106] 원료소재(TanEx)의 성분조사를 위하여 Aremen Spot prepII 분취 HPLC 시스템에서 YMC-DispoPack AT (ODS, 40 g, 50 μm)의 cartridge column을 이용하여 70% 메탄올로 20 ml/min의 유속으로 전개하여 순수분리를 시도하였다.

[0107] 상기 실험결과, 도 5에 나타난 바와 같이, UV 254 nm detector에서 3개의 피크를 얻었으며, 각 피크를 분취하여 compound 1, 2를 단일 화합물로 획득하였다. JEOL ECA-500 spectrometer (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 ¹H, ¹³C NMR 스펙트럼을 측정된 결과 (도 6 내지 도 7), 전형적인 탄시논계 피크가 관측되었으며, 기존 문헌과 비교하여 compound 1은 하기 구조식 1의 탄시논 I으로 compound 2는 하기 구조식 2의 탄시논 IIA로 각각 동정되었으며, (H.S. Kane et al., Arch. Pharm. Res., 20, 496, 1997),

[0108] 또한 본원 제조방법으로 제조된 원료소재(TanEx)중 탄시논 I의 함량은 24.0%(w/w), 탄시논 IIA가 51.1%(w/w)로 함유됨을 확인하여 종래의 알려진 단삼추출 제조방법으로 제조시의 탄시논 화합물의 함량 (약 1 내지 10%)보다 고함량 및 고순도의 탄시논 화합물 함유 정제물을 제조할 수 있음을 확인하였다.

화학식 1

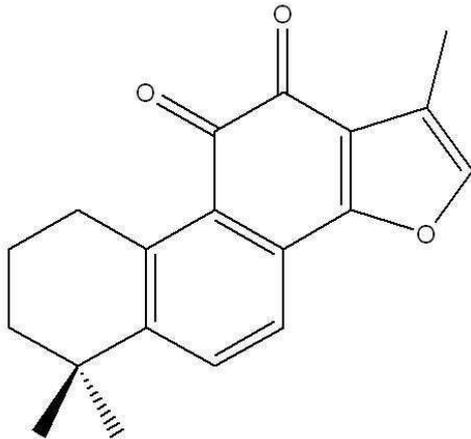


[0109]

[0110]

Tanshinone I

화학식 2



[0111]

[0112]

Tanshinon IIA

표 2

[0113]

탄시논 I, IIA의 순수분리를 위한 prep. HPLC 조건

Prep system	Armen Spot prep II
Detector	UV 254 nm
Column	YMC-DispoPack AT (ODS, 40 g, 50 μm)
Flow rate	20 ml/min
Mobile phase	70% MeOH

표 3

[0114]

순도측정을 위한 HPLC 조건

Pump	Shimadzu LC-20AT		
Detector	Shimadzu SPD-M20A(PDA), 254nm		
Column	YMC Triart C-18 (4.6×250 mm, 5 μm)		
Flow rate	1 ml/min		
Mobile phase	Time (min)	Solvent A (%) H2O+1% HOAc	Solvent B (%) ACN+1% HOAc
	0	95	5
	5	95	5
	45	0	100
	50	0	100
	55	95	5

[0115]

실험예 1. 전자공여능 활성

[0116]

상기 실시예에서 얻은 시료의 전자공여능(EDA: electron donating ability)에 대한 활성을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 Blois의 방법을 변형하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Bois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 1958. 26: 1199-1120)

[0117]

각 시료용액 2mL에 0.2mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) 1mL 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 하기 수학적 1과 같이, 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

수학적 1

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

[0118]

[0119]

상기 실험 결과, 본원 발명의 원료소재(TanEX)를 10, 100, 1000 μg/ml의 농도로 처리하여 free radical을 517nm에서 측정하였다. 그 결과, 라디칼 소거능이 10 μg/ml에서는 10%였으며, 100, 1000 μg/ml에서는 각각 72, 94%로 dose response하게 나타나 원료소재(TanEx)에 의한 활성임을 확인할 수 있었다. 또한 대조구로 사용된 EGCG와 비슷한 효과를 나타내는 것으로 보아 천연 항산화제로서의 이용 가능성을 확인할 수 있었다.

[0120]

실험예 2. 미백 활성 측정

[0121]

상기 실시예에서 얻은 시료의 티로시나제(Tyrosinase)에 대한 억제 활성을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 Yagi의 방법을 변형하여 하기와 같이 실험을 수행하였다(Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. Planta Medica. 1986. 39: 517-519).

[0122]

반응구는 0.175M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5mL에 10mM L-DOPA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)를 녹인 기질액 0.2mL 및 시료용액 0.1mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)를 110U/mL의 농도로 0.2mL을 첨가하여 25℃에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475nm에서 측정하였다. 티로시나제 저해활성은 하기 수학적 2과 같이, 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

수학식 2

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

[0123]

[0124]

상기 실험 결과, 본원 발명의 원료소재(TanEx) 농도를 10, 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였으며, 그 결과, 각각 5, 15, 53%의 tyrosinase 저해활성이 나타났으며, dose response가 확인되었다. 이러한 활성은 대조구로 사용된 비타민 C의 활성인 78, 96, 99%의 저해활성보다 낮은 활성이나, Jung 등55)의 토사자, 숙지황, 오가피 추출물 1.000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 30.0% 미만의 저해활성을 나타낸 결과와, An 등56)의 진달래꽃 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 열수 및 에탄올 추출물 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 24.0, 48.0%의 저해를 나타낸 결과와 비교하여 다른 추출물 형태의 원료보다 단삼분획 원료소재(TanEx)의 활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

[0125]

실험예 3. 엘라스타제 억제 활성 측정

[0126]

상기 실시예에서 얻은 시료의 엘라스타제(Elastase)에 대한 억제 활성을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 Cannell 등의 방법을 변형하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Cannell RJP, Kellan SJ, Owsianks AM, Walker JM. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. Planta Med. 1988. 54(1): 10-14)

[0127]

기질로서 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)를 사용하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 445nm에서 측정하였다. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.5mL씩 시험관에 취하고, 50mM tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) 2.5U/mL의 농도로 0.5mL을 가한 후 기질로 50mM tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) 0.5mg/mL로 첨가하여 20분간 반응시켜 측정하였다. Elastase 저해활성은 하기 수학식 3과 같이, 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

수학식 3

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

[0128]

[0129]

상기 실험 결과, 본원 발명의 원료소재(TanEx)의 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 측정하였으며, 그 결과 각각 12, 49, 90%로 dose response가 확인되었으며, 각종 약용 식물로부터 elastase 저해활성을 측정한 결과, 대부분이 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 30.0% 미만의 저해활성을 나타내었으며, 홍화씨 추출물과 식물성 유사 호르몬으로 알려진 ursolic acid, genistein, oleanolic acid에 대한 elastase 저해활성 측정 결과 ursolic acid의 경우 IC_{50} 이 50.8 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났고, 홍화씨 추출물은 265 $\mu\text{g/ml}$ 으로 나타났으며, genistein는 각각 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 31.7%, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 40.7%의 저해율을 나타내어 원료소재(TanEx)가 상대적으로 우수한 Elastase 효과를 가짐을 알 수 있었다.

[0130]

실험예 4. 콜라게나제 억제 활성 측정

[0131]

상기 실시예에서 얻은 시료의 콜라게나제(Collagenase)에 대한 억제 활성을 확인하기 위하여 문헌에 기재된 W등의 방법을 변형하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (WE, Heindrich HG. Zur quantitativen bestimmung der collagenase. Hoppe-Seyler's. Physiol. Chem)

[0132] 반응구는 0.1M tris-HCl buffer(pH 7.5)에 4mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)을 0.3mg/mL농도의 기질을 0.25mL와 시료용액 0.1mL의 혼합액에 collagenase(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)을 0.2mg/mL 농도로 0.15mL를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5mL을 넣어 반응을 정지 시킨 후, 에틸아세테이트(ethyl acetate) 1.5mL를 첨가하여 320nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 하기 수화식 4과 같이, 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

수화식 4

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

[0133]

[0134] 상기 실험 결과, 본원 발명의 원료소재(TanEx)의 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml 농도에서 측정하였으며, 그 결과 각각 30, 46, 90%로 dose response가 확인되었으며, 대조구로 사용된 EGCG의 31, 65, 91% 결과와 유사한 결과로 우수한 효과를 나타내었다.

[0135] 이하, 본 발명의 제형으로서 크림, 마사지크림, 로션, 스킨로션, 에센스, 팩, 클렌징폼의 제형을 예시하고 있으나, 본 발명의 화장품 조성물을 포함하는 제형은 이에 한정되는 것은 아니다.

[0136] 제형에 1. 크림조성물

[0137] 유상과 수상을 각각 75 °C로 가열 혼합한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	1.0
2	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	1.0
3	친유형 모노스테아린산 글리세린	2.5
4	마이크로 스택린 납	2.0
5	파라옥시안식향산메틸	0.2
6	파라옥시안식향산프로필	0.1
7	밀납	2.0
8	모노스테아린산 폴리에틸렌글리콜	2.0
9	모노스테아린산 소르비탄	1.0
10	트리 (카프릴, 카프린산) 글리세린	5.0
11	액상 리놀린	5.0
12	미리스틴산 옥틸도데실	8.0
13	스쿠알란	8.0
14	농글리세린	5.0
15	1,3-부틸렌글리콜	5.0
16	알란토인	0.1
17	추출물 TanEx	10.0
18	향료	미량
19	황색4호	미량
20	정제수	잔량

[0138]

[0139] 제형에 2. 마사지크림 조성물

[0140] 유상과 수상을 각각 75 ℃로 가열 용해 혼합한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	2.0
2	친유형 모노스테아린산 글리세린	2.5
3	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	1.5
4	파라옥시안식향산메틸	0.2
5	파라옥시안식향산프로필	0.1
6	바셀린	3.5
7	모노스테아린산 폴리에틸렌글리콜	3.5
8	세스퀴올레인산 소르비탄	1.8
9	유동 파라핀	35.0
10	트리 (카프릴, 카프린산) 글리세린	3.0
11	옥틸도데칸올	5.0
12	스쿠알렌	2.0
13	농글리세린	5.0
14	추출물 TanEx	5.0
15	히아루로닉애씨드추출물	1.0
16	향료	미량
17	정제수	잔량

[0141]

[0142] 제형예 3. 로션 조성물

[0143] 유상과 수상을 각각 75 ℃로 가열 혼합 용해한 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	세토스테아릴 알코올	2.0
2	스테아린산	1.0
3	친유형 모노스테아린산 글리세린	1.0
4	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	2.0
5	바셀린	1.0
6	모노스테아린산 폴리에틸렌글리콜	1.5
7	세스퀴올레인산 소르비탄	1.0
8	유동 파라핀	5.0
9	스쿠알렌	5.0
10	파라옥시안식향산프로필	0.2
11	파라옥시안식향산메틸	0.2
12	농글리세린	5.0
13	추출물 TanEx	15.0
14	트리에탄올아민	0.5
15	카르복시비닐폴리머	0.2
16	향료	미량
17	정제수	잔량

[0144]

[0145] 제형예 4. 스킨로션 조성물

[0146] 수상과 에탄올상을 각각 제조 혼합한 후 여과한다.

번호	원료명	중량 %
1	글리세린	2.0
2	1,3-부틸렌글리콜	2.0
3	구연산	0.01
4	에탄올	15.0
5	폴리옥시에틸렌경화피마자유	1.0
6	추출물 TanEx	25.0
7	향료	미량
8	위치하젤추출물	1.0
9	정제수	잔량

[0147]

[0148] 제형예 5. 에센스 조성물

[0149] 수상과 에탄올상을 각각 제조 혼합한 후 여과한다.

번호	원료명	중량 %
1	농글리세린	15.0
2	1,3-부틸렌글리콜	5.0
3	알란토인	0.1
4	에탄올	7.0
5	파라옥시안식향산메틸	0.15
6	트리에탄올아민	0.15
7	폴리옥시에틸렌경화피마자유	1.0
8	초산토코페롤	0.5
9	카르복시비닐폴리머	0.15
10	추출물 TanEx	30.0
11	향료	미량
12	정제수	잔량

[0150]

[0151] 제형예 6. 팩 조성물

[0152] 수상과 에탄올상을 각각 분산 용해하여 혼합시킨 후 실온으로 냉각한다.

번호	원료명	중량 %
1	폴리비닐알코올	15.0
2	카르복시메틸셀룰로이스나트륨	0.3
3	농글리세린	3.0
4	알란토인	0.1
5	에틸렌디아민테트라초산디나트륨	0.01
6	폴리에틸렌글리콜	1.0
7	에탄올	6.0
8	파라옥시안식향산메틸	0.15
9	타라옥시안식향산프로필	0.05
10	디엘판테놀	0.1
11	폴리옥시에틸렌 (12) 노닐페닐에테르	0.5
12	추출물 TanEx	45.0
13	향료	미량
14	정제수	잔량

[0153]

[0154] 제형예 7. 클렌징폼 조성물

[0155] 수상과 오일상을 각각 분산 용해하여 혼합 검화한 후 실온으로 냉각한다.

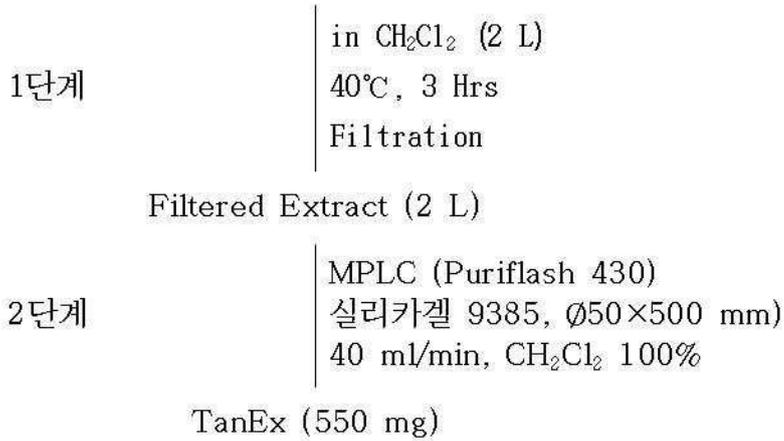
번호	원료명	중량 %
1	스테아린산	6.5
2	미리스틴산	28.0
3	자기유화형 모노스테아린산 글리세린	3.0
4	프로필렌 글리콜	5.0
5	농글리세린	10.0
6	수산화나트륨	7.0
7	에틸렌디아민테트라초산나트륨	0.1
8	태반 추출물	0.5
9	추출물 TanEx	15.0
10	향료	미량
11	정제수	잔량

[0156]

도면

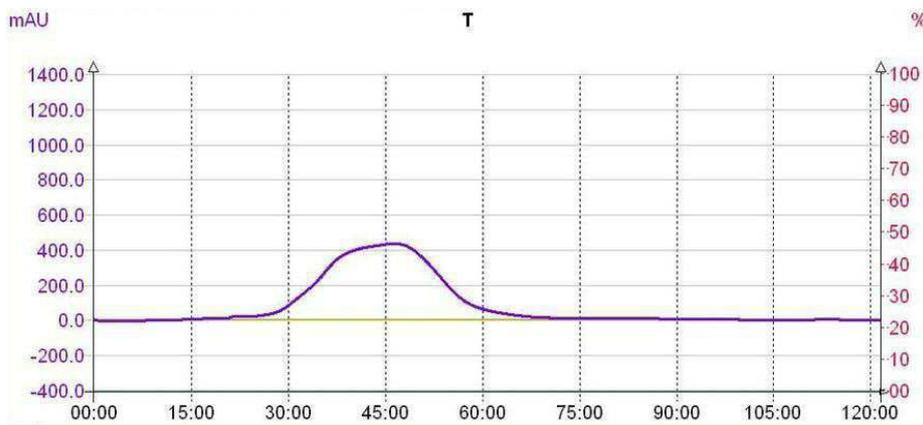
도면1

단삼 (*Salvia miltiorrhiza* BUNGE, 500g)



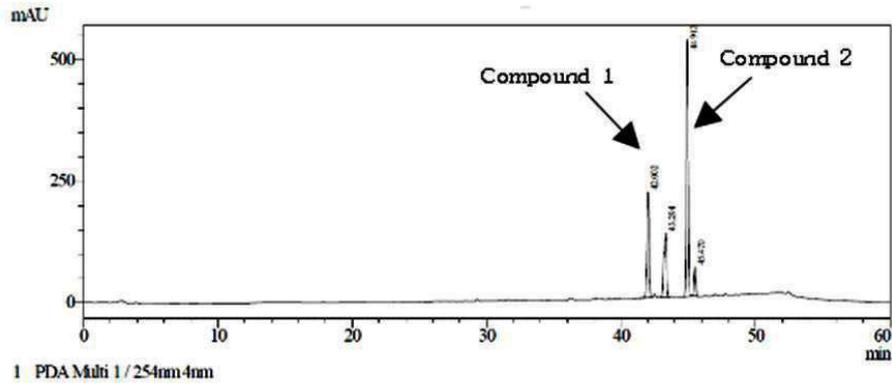
<원료소재 (TanEx) 조제를 위한 공정도>

도면2



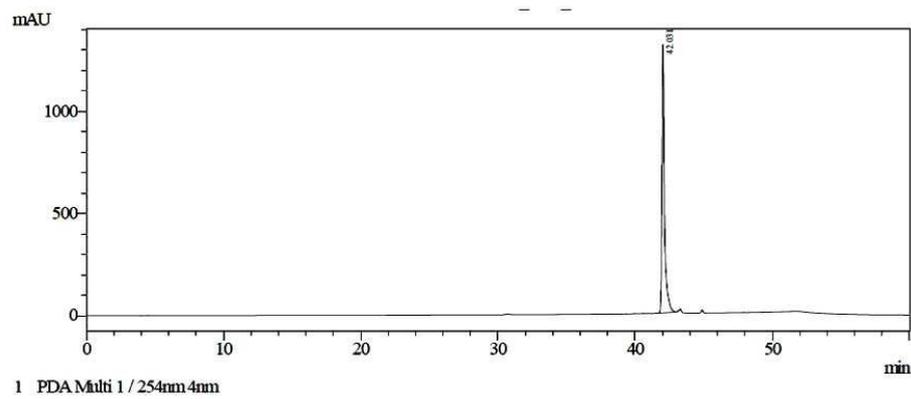
<단일공정으로 분취한 원료소재(TanEx)의 chromatogram>

도면3

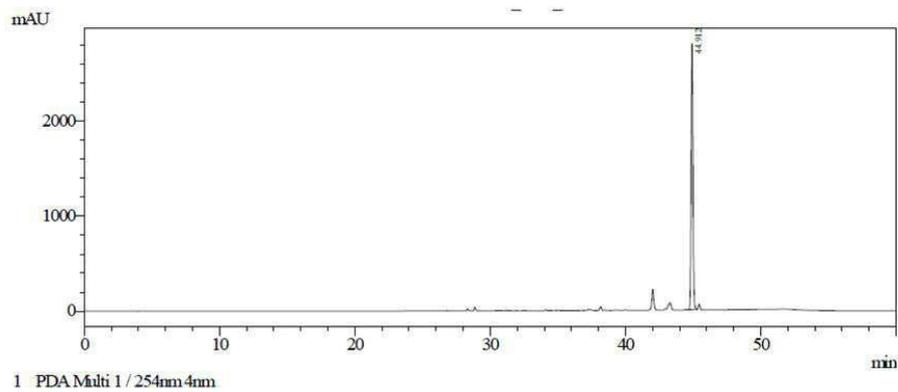


<원료소재(TanEX)의 HPLC chromatogram>

도면4

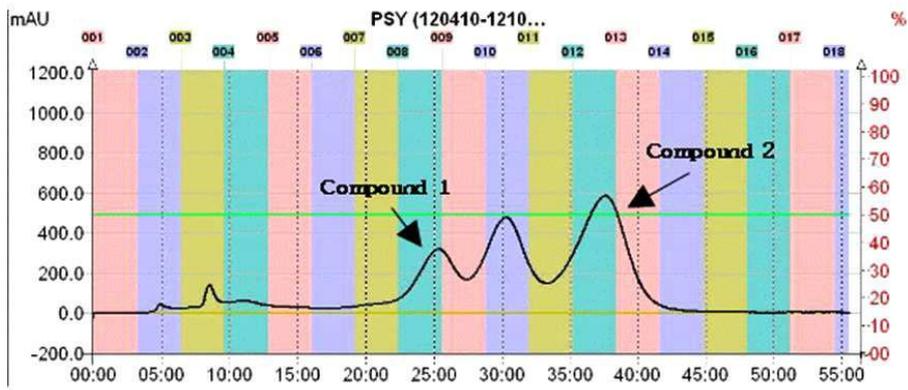


<Compound 1의 HPLC chromatogram>



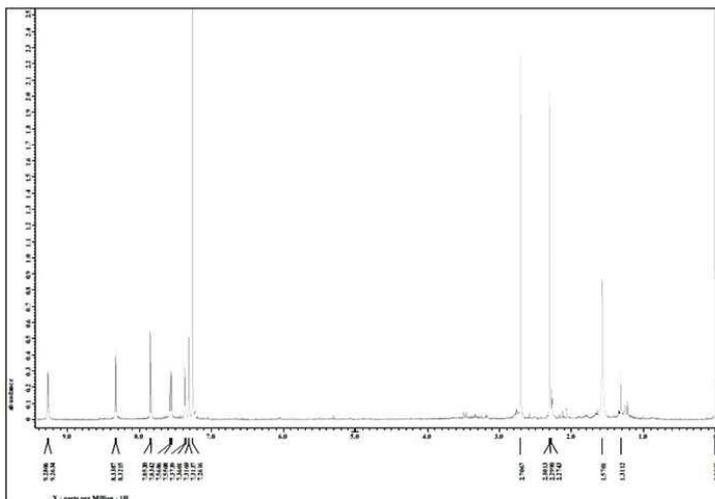
<Compound 2의 HPLC chromatogram>

도면5

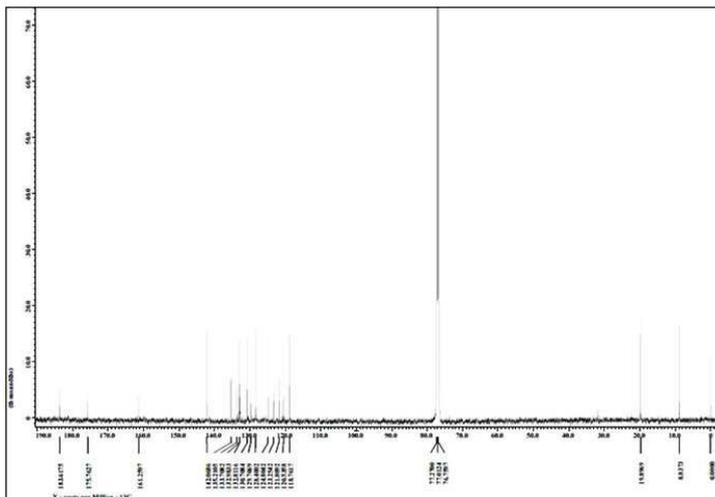


<Compound 1과 Compound 2의 분취 chromatogram>

도면6



<compound 1의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CDCl_3 , 500 MHz)>



<compound 1의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (CDCl_3 , 125 MHz)>

