[UCI]I804:24011-200000238449

2009년 8월

박사학위논문

자운영 종자 아세톤 추출물의 피부 생리활성 효과와 피부미용에 미치는 영향

조선대학교 대학원

보 건 학 과

김 란

자운영 종자 아세톤 추출물의 피부 생리활성 효과와 피부미용에 미치는 영향

Skin Bioactive Effect of Acetone Extract from Chinese Milk Vetch Seeds(*Astragalus sinicus* L.) and Its Effect on Skin Care

2009년 8월 일

조선대학교 대학원

보 건 학 과

김 란

dCollection @ chosun

자운영 종자 아세톤 추출물의 피부 생리활성 효과와 피부미용에 미치는 영향

지도교수 박 종

이 논문을 보건학 박사학위신청 논문으로 제출함

2009년 4월

조선대학교 대학원

보 건 학 과

김 란

dCollection @ chosun

김란의 박사학위논문을 인준함

위원장　조 선 대 학 교 교 수　　(인)

위　원　조 선 대 학 교 교 수　　(인)

위　원　광주여자대학교 교 수　　(인)

위　원　조 선 대 학 교 교 수　　(인)

위　원　조 선 대 학 교 교 수　　(인)

2009년 6월

조선대학교 대학원

dCollection @ chosun

목 차

표 목 차 ····· ii
그림목차 ····· iii
Abstract ····· iv

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 4
A. 연구의 과정과 개요 ····· 4
B. 피부 생리활성 실험 ····· 5
C. 자운영 종자 유액과 팩 제조 및 임상시험 ····· 10
D. 통계분석 방법 ····· 15

Ⅲ. 연구결과 ····· 16
A. 자운영 종자 아세톤 추출물의 피부 생리활성 ····· 16
B. 자운영 종자의 피부미용에 미치는 영향 ····· 26

Ⅳ. 고 찰 ····· 33

Ⅴ. 요약 및 결론 ····· 39

참고문헌 ····· 40

dCollection @ chosun

표 목 차

표 1. 유액의 처방전 ····· 10
표 2. 팩의 처방전 ····· 11
표 3. 피부자극 판정기준 ····· 12
표 4. 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량 ····· 16
표 5. 자운영 종자 유액과 팩의 피부자극 평가 ····· 29
표 6. 임상시험자의 특성 ····· 30
표 7. 임상시험자의 피부 관리 전·후의 피부상태 ····· 32

dCollection @ chosun

그 림 목 차

그림 1. 연구방법의 개요 ····· 4
그림 2. 자운영 종자 아세톤 추출물의 농도에 따른 Raw 264.7 세포생존율 ····· 17
그림 3. 자운영 종자 아세톤 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 ····· 19
그림 4. 자운영 종자 아세톤 추출물의 elastase 저해활성 ····· 21
그림 5. 자운영 종자 아세톤 추출물의 MMP-1(collagenase) 저해활성 ····· 23
그림 6. 자운영 종자 아세톤 추출물의 tyrosinase 저해활성 ····· 25
그림 7. 대조군과 시험군의 자운영 종자 유액 A와 유액 B ····· 27
그림 8. 대조군과 시험군의 자운영 종자 팩 A와 팩 B ····· 28

dCollection @ chosun

Abstract

Skin Bioactive Effect of Acetone Extract from Chinese Milk Vetch Seeds(*Astragalus sinicus* Linne) and Its Effect on Skin Care

Kim, Ran
Advisor : Prof. Park Jong M.D., Ph. D.
Department of Health Science
Graduate School of Chosun University

This study aims to identify the skin bioactive effects of acetone extract from seed of Chinese milk vetch and its effect on skin care. For the purpose, we used acetone for skin bioactive test and made fluid and pack for which 0.2% an 0.5% of acetone was added for the skin care test, targeting 36 female adults. The results were as follows:

Total content of polyphenol and flavonoid were 190.59 mg/g, and 63.03 mg/g, respectively.

To check cytotoxicity in it, conducted a MTT assay and almost 100% of cell survival rate and cell proliferation were foun, which indicates that there was little cytotoxicity.

As a result of testing DPPH radical scavenging effects, it was found that the acetone is a an anti-oxidant as it had high scavenging effects.

The inhibitory activity of the elastase was 97.36% at a concentration of 250 ㎍/㎖, that of MMP-1 was 95.24% at a concentration of 500 ㎍/㎖, and that of tyrosinase was 94.41% at a concentration of 50 ㎎/㎖, which indicates that the

dCollection @ chosun

elastase is effective for anti-aging and whitening of skin.

The fluid where 0.2% and 0.5% acetone was added was stably liquidified and absorbed over the skin, which means good for moisture of skin, and the pack which was made from the fluid was evenly absorbed to skin and well removed after skin was dried.

As a result of irritation test, fluid and pack made from seeds of milk vetch, had no irritation to skin at all. The fluid and pack were applied two experimental groups for eight weeks to measure facial conditions such as moisture, elasticity, coarseness, and pigment. skins of the two test groups showed better conditions after the use of fluid and pack ($p<0.001$), The test group who was applied 0.2% acetone showed better condition on the skin than the group who was applied 0.5% acetone.

dCollection @ chosun

Ⅰ. 서 론

피부는 자외선, 온도, 습도, 먼지, 세균 등의 물리적, 화학적, 생물학적 요인으로부터 인체를 보호해 주는 중요한 역할을 한다(김한식 등, 2009). 그러나 피부는 자외선에 의해 활성산소종(reactive oxygen species)과 자유라디칼(free radical)의 과다한 생산(Meinhard 등, 2001)과 비정상적인 대사 작용으로 인한 항산화시스템의 기능저하는 세포의 superoxide anion radical, hydroxyl radical, 과산화수소, hypochlorous acid 등의 활성산소를 생성하여 피부 구성성분의 손상과 피부노화를 촉진한다(Nordberg 등, 2001). 이러한 피부문제를 개선하기 위하여 피부 미백과 노화억제 물질인 항산화제에 대한 연구가 국내에서는 2001년 7월 기능성 화장품법(식품의약품안전청)이 발효되면서 더욱 활발해지고 있다. 현재 피부 관리를 위한 기능성 생리활성 물질은 arbutin, 비타민 C, 사탕수수 추출물의 α-hydroxy acids(AHAs), 코직산, 상백피 추출물, 닥나무 추출물 등이 주로 이용되고 있다. 피부 항산화제는 비타민 C와 비타민 E 등이 사용되고 있으며, 페놀류의 caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, catechine 등과 플라보노이드류의 quercetin 및 kaempferol 등도 항산화 활성물질로 보고되었다(Kawaguchi 등, 1996). 피부 항산화제에 관한 연구가 빠르게 시작된 일본 등에서는 1991년에 피부 및 모발을 위한 기능성 화장품의 원료로 보리, 밀, 케일 등의 녹엽성분의 항산화 활성물질을 보고하였으며, 동일 물질로 1998년에 우리나라에서도 특허출원하여 화장품의 원료로서(하기와라 요시히데, 1998) 대중화 되어 이용되고 있다.

주름개선과 미백 등의 천연물에 대한 유효성 평가는 천연물에 대하여 성분분석을 실시하고 세포독성을 파악하는 MTT (3-(4, 5 - dimethylthiazol - 2yl) - 2, 5 - diphenyl - 2H - tetrazolium bromide) assay를 실시하여 세포생존율 및 세포증식을 파악하는 과정을 거친다. 그리고 노화관련 효과를 알아보는 피부 생리활성 실험으로는 elastase, collagenase, tyrisinase 등의 저해활성 실험 결과에 의하여 피부 생리활성 유효성을 평가받을 수 있다(과학기술부, 2006; 식품의약안전청, 2004, 2007). 피부의 진피층을 구성하는 세포외 기질(extracelllar matrix)인 elastin은 elastase, collagen은 matrix metallopeptidase-1(MMP-1)에 의해서 분해되는 것으로 알려져 있다(김한식 등, 2009). 이들 효소가 활성화되면 피부의 탄력저하

dCollection @ chosun

와 주름이 생성되므로 피부 노화가 촉진되며, tyrosinase에 의하여 기미와 주근깨 등의 색소침착을 일으키게 되어 피부노화를 촉진시킨다(Imokawa 등, 1981). 최근 항산화 물질의 피부노화 및 미백효과에 관한 연구로서 복분자의 elastase 저해활성을 연구한 결과 0.52 mg/ml 농도에서 89%의 저해활성을 나타내어 노화억제 물질로 확인(곽윤진 등, 2005) 하였다. 연교(개나리 열매)는 5.7 ug/ml 농도에서 자유 라디칼의 50% 소거능을 보여주었고 농도에 따라 collagen 합성 증가효과 및 세포 증식효과를 나타내어 임상시험에서 주름개선 효과를 유의하게 나타내었다(김미진 등, 2006). 그리고 미백물질의 천연물 중 상백피는 89.7%의 tyrosinase 저해활성을, 당귀는 76.2%의 tyrosinase 저해활성을 나타내어 영양크림과 로션 등의 원료로(박동기, 2000) 현재 유용하게 사용되고 있어 천연 항산화제를 개발하는 연구는 활발하게 이루어지고 있다.

천연 약용식물인 자운영은 두과초본의 월년초로서 콩과(Leguminosae)에 속하며 우리나라 남부지방에서 주로 녹비자원으로 생육 재배하는 식물이다. 2006년 기준으로 75,400 ha의 재배면적과 10 a당 36~54 kg의 종자를 생산할 수 있다(농업진흥청작물과학원 호남농업연구소, 2007). 매년 대량으로 생육되는 자운영의 전초에는 trigonelline, canavanine가 함유되어 있으며, 종자에는 canaline, canavanine, homoserin, coumestrol 등이 함유되어 있다(Shmuel, 2004). Baoliang 등, (1992)은 자운영 종자의 soyasaponin Ⅰ,Ⅱ, Ⅲ methyl ester, soyasaponin Ⅳ 등을 분리하였다. 염승환(2004)은 flavonoid를 풍부하게 함유한 자운영 종자 화합물이 inducible nitric oxide synthase와 prostaglandin E_2 생성억제 및 라디칼 소거능이 우수하여 항산화제, 항염증제, 암예방제로 개발될 수 있는 가능성을 보고하였다.

또한 자운영의 전초는 홍화채, 종자는 자운영 종자라 하여 약용으로 쓰이며, 홍화채는 3~4월에 채취한 것으로 trigonelline, choline 및 adenine 등이 함유되어 청열과 해독의 효능이 있고, 종자에는 canaline, canavanine 및 homoserin 등의 성분이 혈액순환을 돕고 눈을 밝게 하는 효능이 있다고 알려졌다(농업진흥청작물과학원 호남농업연구소, 2007). 그러나 자운영에 대한 피부 생리활성 및 그 응용에 대한 연구가 현재 미흡하다. 저자는 매년 자연 소실되는 자운영 종자를 이용하여 항산화제와 항염증제의 효과(염승환, 2004)에 관한 선행연구를 바탕으로 자운영 종자를 아세톤과 메탄올 추출법에 의하여 추출한 결과, 메탄올 추출물은 30% 이상의 세포독성이 나타났으며, 아세톤 추출물은 다소의 세포증식 효과와 함께 세포독성이 거의 없는 것으로 나타났다.

dCollection @ chosun

따라서 본 연구에서는 자운영 종자의 아세톤 추출물을 이용하여 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드의 함량을 검량한 후 피부 생리활성 실험과 피부미용 임상시험을 시행하여 다음의 구체적인 연구 목적을 달성하고자 한다.

1) 자운영 종자 아세톤 추출물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 측정하고, MTT assay를 실시하여 세포 생존율 확인, 1,1-diphenyl-2-picrylhydr azyl (DPPH) radical 소거능을 통하여 항산화능과 elastase, collagenase, tyrosinase의 저해활성을 확인하여 피부 생리활성 효과를 파악하고자 한다.
2) 자운영 종자 아세톤 추출물을 첨가한 유액과 팩의 기능성 화장품으로서 사용 가능성을 확인한다.
3) 자운영 종자 유액과 팩을 이용하여 피부미용 임상시험을 통해 피부의 수분지수, 탄력지수, 거칠기지수, 색소지수를 측정하고 분석하여 피부상태에 미치는 효과를 파악하고자 한다.

dCollection @ chosun

Ⅱ. 재료 및 방법

A. 연구의 과정과 개요

자운영 종자를 아세톤으로 추출하여 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량을 측정하고, MTT assay를 실시한 후, 피부생리활성 실험과 피부미용 임상시험을 실시하여 피부상태에 미치는 효과를 파악하고자 하는 연구의 개요는 다음과 같다(그림 1).

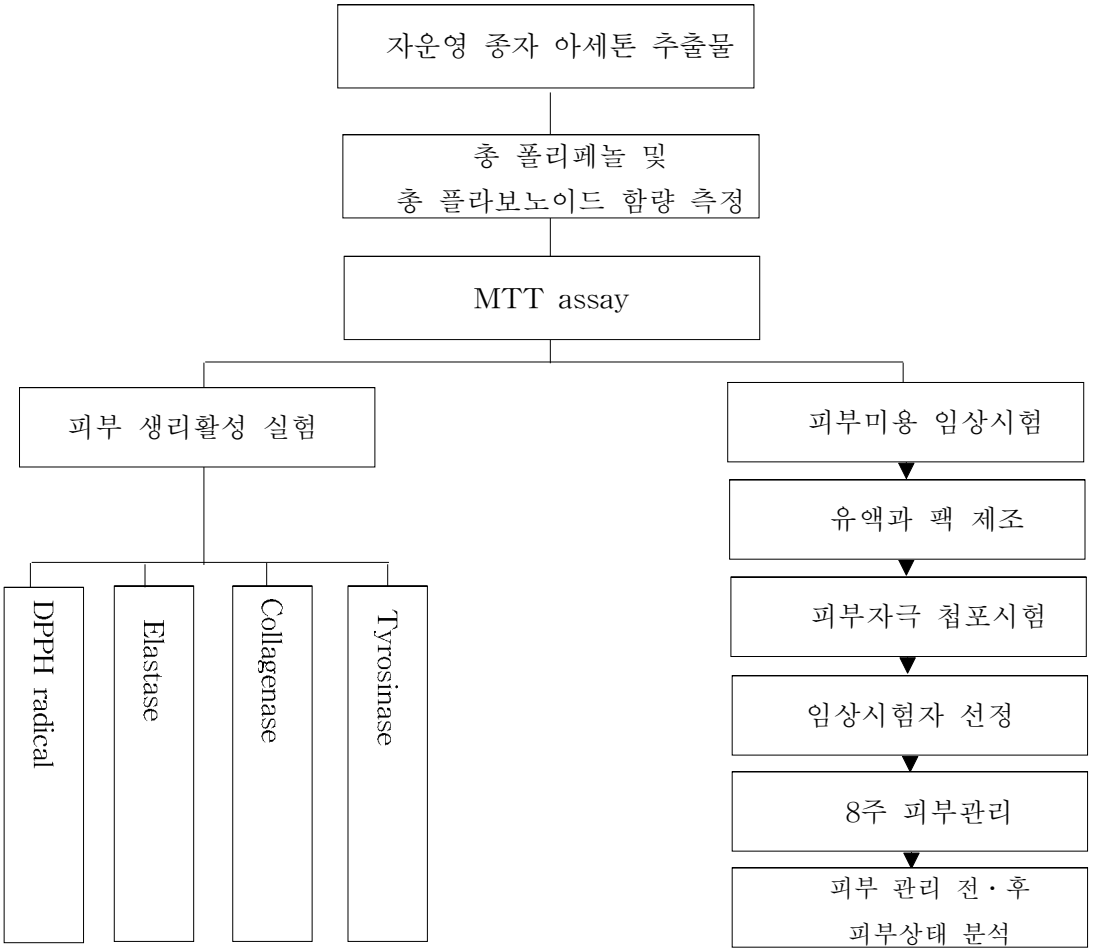


그림 1. 연구방법의 개요.

dCollection @ chosun

B. 피부 생리활성 실험

1. 재료

1) 실험재료

본 실험에 사용한 자운영 종자(*Astragalus sinicus* Linne)는 2007년 11월 초순에 나주 마한 농협에서 구입하여 이물질을 제거하고 세척한 후, 음건하여 실험재료로 사용하였다.

2) 시료추출

시료 1,100 g을 80% 아세톤으로 실온에서 3회 추출하였다. 추출액을 여과하여 감압 농축 및 동결 건조하여 냉동보관 하였다.

3) 시약, 배지, 세포주

1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), ascorbic acid, tannic acid, rutin, elastase, p-nitroanilide (N-methoxys uccinyl-Ala-Ala-Pro-Valp-nitroanilide), collagenase, collagen, L-tyrosine 및 mush-room tyrosinase는 Sigma (USA)의 제품, diethyleneglycol과 Folin-Denis reagent는 Fluka (Belgium) 제품을 사용하였다.

세포독성 시험에 사용된 MTT와 DMSO는 Sigma (USA), DMEM배지는 GIBCO (USA) 제품을 사용하였다. Raw 264.7 세포주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양받아 사용하였다.

2. 방법

1) 총 폴리페놀 함량 측정

Folin-Denis 법(Swain 등, 1959)을 이용하여 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 1 ㎎/㎖ 농도로 메탄올에 용해시킨 시료액 80 ㎕와 Folin-Denis reagent 80 ㎕를 혼합하여 3분간 반응시킨 뒤, 10% Na_2 -CO_3 80 ㎕를 혼합하여 암실에서 60분간 반응시킨 후 상등액 120 ㎕를 취하여 700 ㎚에서 흡광도(Power Wave

dCollection @ chosun

X340, BIO-TEK, USA)를 측정하였다. 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 사용하였고, 표준물질로 phenolic compound로서 항산화작용과 항변이 작용이 뛰어난 tannic acid(김정현 등, 1997)를 이용하여 검량선을 작성하고 총 폴리페놀 함량을 mg/g tannic acid를 기준으로 산출하였다.

2) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법(2000)에 의해 측정하였다. 1 ㎎/㎖ 농도로 methanol에 용해시킨 시료액 10 ㎕와 1N-NaOH 10 ㎕, diethyleneglycol 200 ㎕를 혼합하여 37 ℃에서 1시간동안 반응시킨 후 420 ㎚에서 흡광도(PowerWave X340, BIO-TEK, USA)를 측정하였다. 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 사용하였고, 표준물질로 플라보노이드계로서 생리활성물질인 rutin (박종철과 박희준, 1990)을 이용하여 검량선을 작성하고 함량을 mg/g rutin을 기준으로 산출하였다.

3) MTT assay에 의한 세포생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael 등의 방법(1987)에 의해 측정하였다. Raw 264.7 생쥐 대식 세포주를 10% FBS와 1% streptomycin이 첨가된 DMEM배지를 사용하여 5% CO_2 , 37℃조건에서 배양하였다. 세포주를 96 well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 100 ㎕씩 분주하여 24시간 동안 incubator에서 배양한 후 각 농도별 추출물을 10 ㎕씩 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. MTT 용액을 10 ㎕를 각각 가하여 다시 4시간 동안 반응 시킨 후 well 바닥에 형성된 formazan이 흩어지지 않도록 상등액을 제거하고 DMSO를 100 ㎕ 가하여 30분 방치한 뒤 540 ㎚에서 흡광도(PowerWave X340, BIO-TEK, USA)를 측정하였다. 추출물의 12.5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml의 각 농도별로 6회 반복 실험을 실시하여 평균값을 구하였으며, 추출물을 넣지 않은 대조군의 흡광도를 100%로 하여 상대적인 세포생존율을 구하였다.

dCollection @ chosun

4) DPPH radical 소거능 측정

Blois의 방법(1958)으로 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma)를 이용하여 자운영 종자 추출물의 라디칼 소거능을 측정하였다. Methanol에 농도별로 용해시킨 시료액 10 ㎕와 DPPH용액(300 μM) 190 ㎕를 혼합하여 15분간 암실에서 방치한 후, 517 ㎚에서 흡광도(PowerWave X340, BIO-TEK, USA)를 측정하였다. 대조군과 실험군의 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml의 농도별로 각각 6회 반복 실험을 실시하여 평균값을 사용하였다. 시료액 대신 10 ㎕ methanol에 혼합한 반응액의 흡광도를 기준으로 소거능을 계산하였으며, 양성대조군으로 체내 항산화 활성제인 ascorbic acid (임연일 등, 1998)를 사용하였다.

5) Elastase 저해활성 측정

Elastase 저해활성 측정은 Cannell 등의 방법(1988)에 의해 측정하였다. human leukocyte elastase를 50 mM sodium acetate buffer solution (pH 5.3)에 녹여 1 unit/ml 용액을 제조하였다. p-Nitroanilide (N-methoxysuccinyl- Ala-Ala- Pro - Valp- nitroanilide)를 DMSO에 녹여 20 mM stock solution을 만든 후 elastase 20 ㎕와 시료 20 ㎕를 48 well plate에 분주하고, 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 400 μM p-nitroanilide를 200 ㎕ 첨가하였다. 반응액을 37℃에서 20분 동안 배양하여 반응액 120 ㎕씩을 96 well plate로 옮겨 410 ㎚에서 흡광도(PowerWave X340, BIO-TEK, USA)를 측정하였다. 대조군과 실험군의 25 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml, 250 ug/ml의 농도별로 각각 5회 반복 실험을 실시하여 평균값을 사용하였으며, 항산화제로서 진피의 구성 물질 등의 변성을 억제하는 quercetin (이의열 등, 1991)을 양성대조군으로 사용하였다.

Inhibition of elastase activity (%) = {1-(S-B)/C}×100
S: 시료와 효소 포함 반응액 흡광도
B: 효소 대신 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 첨가한 반응액 흡광도
C: 시료 대신 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 첨가한 반응액 흡광도

dCollection @ chosun

6) Matrix metallopeptidase-1(MMP-1, collagenase) 저해활성 측정

MMP-1 저해활성을 Sim 등의 방법(2004)을 변형하여 측정하였다. 1,500 ㎕, PBS(pH 6.0)에 용해한 collagen 용액(0.25 ㎎/㎖) 300 ㎕, 시료 600 ㎕, collagenase 용액(0.5 unit) 600 ㎕를 첨가하였다. 암소 실온에서 20분 경과 후 형광분광광도계(fluorescence spectrophotometer, F-4500, Hitachi, Japan)를 이용하여 흡수파장 280 ㎚, 방출파장 300 ㎚에서 형광 값을 측정하였다. 대조군은 시료액 대신 PBS를 동량 첨가하여 측정하였다. 대조군과 실험군의 각 농도 50 ug/ml, 100 ug/ml, 250 ug/ml, 500 ug/ml의 농도별로 각각 3회 반복 실험하여 평균값을 사용하였으며, 항산화제로서 collagen 변성을 억제하는 quercetin (이의열 등, 1991)을 양성대조군으로 사용하였다.

Inhibition of collagenase activity (%) = {(C-S)/C}×100
S: 시료와 효소 포함 반응액 형광도
C: 시료 대신 PBS를 첨가한 반응액 형광도

7) Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성을 Mason 등의 방법(1965)을 이용하여 측정하였다. 50 ㎕ L-tyrosine solution (1.5 mM), 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5) 220 ㎕, 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5)에 녹인 시료 20 ㎕를 혼합하였다. 혼합액에 20 ㎕의 mushroom tyrosinase (1,000 unit/ml)를 분주하고 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응으로 생성된 dopachrome의 양을 490 nm에서 흡광도(Power Wave X340, BIO-TEK, USA)를 측정하여 산출하였다. 대조군과 실험군의 각 농도 6.25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml의 농도별로 각각 3회 반복 실험을 실시하여 평균값을 사용하였으며, 멜라닌 생성을 억제하고 생성된 멜라닌을 환원시키는 ascorbic acid (과학기술부, 2006)를 양성대조군으로 사용하였다.

Inhibition of tyrosinase activity (%) = {(C-S)/C}×100

dCollection @ chosun

C: 시료 대신 PBS를 사용한 반응액의 흡광도

S: 시료를 포함한 반응액의 흡광도

dCollection @ chosun

C. 자운영 종자 유액과 팩 제조 및 임상시험

자운영 종자 아세톤 추출물을 함유한 유액과 필 오프 타입의 팩을 제조하여 규칙적으로 피부에 바르게 한 후, 피부 관리에 미치는 영향을 알아보고자 임상시험을 실시하였다.

1. 자운영 종자 유액의 제조

자운영 종자 유액은 대조군과 시험군(유액 A, 유액 B)으로 각각 제조하였다. 표 1의 처방전에 의하여 대조군의 유액은 75℃에서 84 wt% 정제수에 8 wt% jojoba oil, 2 wt% vitamin E oil, 1 wt% cetyl alcohol, 5 wt% emulsifying wax를 혼합하여 충분히 용해된 유상액을 천천히 첨가하면서 호모믹서를 이용하여 3,600 rpm에서 3분 동안 유화시키고 30℃까지 냉각시켰다. 시험군의 유액 A와 유액 B 또한 동일한 방법으로 각각 제조하였으며, 대조군과 시험군의 유액 A와 유액 B를 실온에서 7일간 숙성시켜 유화상태를 관찰하였으며, 피부 관리에 이용하였다(표 1).

표 1. 유액의 처방전 (wt%)

처 방	대조군	유액 A	유액 B
Deionized water	84.0	83.8	83.5
Chinese milk vetch seeds extracts	0.0	0.2	0.5
Jojoba oil	8.0	8.0	8.0
Vitamin E oil	2.0	2.0	2.0
Cetyl alcohol	1.0	1.0	1.0
Emulsifying wax	5.0	5.0	5.0

dCollection @ chosun

2. 자운영 종자 팩의 제조

자운영 종자 팩은 실온에서 대조군과 시험군의 팩 A와 팩 B를 표 2의 처방전에 의하여 각각 제조하였다. 대조군의 팩은 실온에서 86.6 wt% 정제수, 13 wt% polyvinyl alcohol, 0.4 wt% Tween 80을 디스퍼를 이용하여 충분히 혼합하여 팩의 기질을 제조하였다. 시험군의 팩은 팩의 기질에 자운영 종자 추출물을 0.2 wt%와 0.5 wt%를 각각 첨가하여 디스퍼를 이용하여 2시간 동안 혼합하여 제조하였다. 실온에서 7일간 숙성시켜 팩의 기질을 관찰하였으며, 피부 관리에 이용하였다(표 2).

표 2. 팩의 처방전 (wt%)

처 방	대조군	Pack A	Pack B
Deionized water	86.6	86.4	86.1
Chinese milk vetch seeds extracts	0.0	0.2	0.5
Polyvinyl alcohol	13.0	13.0	13.0
Tween 80	0.4	0.4	0.4

3. 피부자극 첩포 시험

자운영 종자 추출물을 함유한 유액 A와 B, 팩 A와 B의 피부 안전성을 평가하기 위하여 평소 피부질환 및 알러지가 없는 연령이 20~40대인 10명의 피험자(남자 4명, 여자 6명)를 대상으로 상박부 내측에 첨포 시험을 실시하였다. 첩포 부위에 소독을 실시한 후, 자운영 종자 물질이 첨가된 Finn chambers를 상박부 내측 시험부위에 부착하였다. 24시간 후에 첩포를 제거하고, 피부자극 평가기준에 의하여 판독하였다(표 3).

dCollection @ chosun

표 3. 피부자극 판정기준

Symbol	Estimate standard
−	no irritation
±	generation of fine erythema
+	generation of weak erythema, wheals and papules
+ +	generation of erythema, papules and vesicles
+ + +	generation of bullae

4. 자운영 유액과 팩의 피부 임상시험

1) 연구대상 선정과 배분

광주광역시에 소재한 K대학의 여학생을 대상으로 연구자가 임상시험의 목적과 방법에 대해 설명하였고, 특정한 질병이 없이 건강상태가 양호한 동일 학년 학생으로 임상시험자를 제한한다는 조건을 설명하였다. 본 연구의 취지와 목적을 이해하고 임상시험에 참여하기로 동의한 45명의 여학생을 선정하여 자기 기입식 설문지를 작성하게 한 후 회수하였다. 응답내용이 불분명하거나 응답이 부족한 설문지 6매를 제외한 39명을 임의적으로 대조군, 시험군 A, 시험군 B의 순서대로 1매씩 놓아가며 세 그룹으로 분리하여 각 그룹 당 13명씩 임상시험자를 배정하였다. 그러나 개인 사유로 임상시험에 대한 참여를 철회한 3명을 추가로 제외하고 최종 36명을 선정하여 각각 12명씩 배정하여 임상시험을 실시하였다.

2) 설문 자료의 수집

피부 임상시험 전 조사한 설문지의 구성은 6문항으로 구성하였다. 피부 관리 임상시험을 실시함에 있어서 피부상태에 영향을 미칠 수 있는 요소 중 연령, 건강상태 인식, 하루 평균 수면시간, 규칙적인 운동의 빈도, 하루 물 섭취량, 하루식사 횟수를 알아보는 내용으로 구성하여 조사하였다. 자료 수집은 2009년 3월 9일부터 3월 13일까지 두 차례에 걸쳐 실시하였다.

dCollection @ chosun

3) 자운영 종자 유액과 팩의 도포

유액과 팩의 피부미용에 미치는 영향에 대한 효과 평가를 위해 대조군 12명, 시험군 A 12명, 시험군 B 12명으로 분류하여 제형에 따라 제조한 자운영 종자 유액과 자운영 종자 팩을 규칙적으로 얼굴에 바르도록 하였다. 자운영 종자 유액은 아침과 저녁 세안 후 마사지 하듯 충분히 바르도록 하였으며, 자운영 종자 팩은 주 2회 세안 후 자운영 종자 유액을 충분히 바르고 이어서 적당량의 자운영 종자 팩을 얼굴에 도포하여 약 15~20분경과 후 떼어낸 다음 다시 자운영 종자 유액을 충분히 바르도록 하였다. 임상시험 기간은 2009년 3월 23일부터 5월 18일까지 8주 동안 실시하였다.

4) 피부미용 효과 측정 방법

눈 꼬리와 코의 외방이 교차하는 볼 지점을 임상시험 전과 임상시험 8주후의 수분지수, 탄력지수, 거칠기지수, 색소지수를 각각 Aramo TS Diagnosis System (Aram HUVIS Co, Korea)을 이용하여 비침습적 방법으로 측정하였다.

수분지수는 피부표면의 수분 함유량을 미세전기부하 저장능력으로 개량화하여 측정하며, 피부에 직접 접촉하는 탐침자 사이의 전도 및 부하도를 계수화하여 계측한다. 피부 각질층의 수분 함유량이 많을수록 전도계기가 높게 측정되어 피부 손상에 따른 변화를 평가하며, 측정값이 1~30은 수분 매우부족, 31~40은 수분부족, 41~100은 수분양호를 나타내며 20대의 평균 표준 값은 수분지수 37 arbitrary unit (AU)이다.

탄력지수 측정의 원리는 흡입과 흡입시간의 지속에 따른 피부 변화와 복원력을 기본원리로 측정하며, 기기내부에 마이너스압력(300 mmbar)을 주어 피부를 빠르고 균일하게 흡입하여 측정 부위의 피부 변화 값을 광학측정시스템이 인지하여 수치가 변화하게 된다. 탄력지수는 0~100까지이며, 0~30까지는 낮음, 30~70까지는 보통, 70~100까지는 높은 상태이며, 20대의 표준 값은 탄력지수 68 Ur/Uf이다.

거칠기 지수는 화상분석기 (visiometer)를 통하여 evenness는 R-value가 1~100까지이며, 20대의 거칠기 표준 값은 50 R-value이다.

색소지수 melanin index (MI)는 반사율 분광 광도계의 반사되는 광선의 정도를 광

dCollection @ chosun

학적 측정기법에 의하여 색소지수를 나타내며 1~100까지의 MI로 20대의 MI 표준값은 25 MI이다.

모든 측정 부위는 오차를 최소화하기 위해 동일한 부위에 3회씩 측정하여 평균값을 사용하였으며, 피부미용 전문가인 연구자가 처음부터 마지막까지 측정에 임하였다.

dCollection @ chosun

D. 통계분석 방법

통계적 검정은 windows용 SPSS 12.0 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 피부 생리활성 실험에서 자운영 종자 추출물과 대조군의 DPPH ridical 소거능, elastase 저해활성, MMP-1(collagenase)의 저해활성, 그리고 tyrosinase의 농도에 따른 변화 정도를 ANOVA를 이용하여 검정 후 Duncan test로 농도간 유의성을 확인하였다. 각 농도별 대조군과의 효과 차이는 Mann-Whitney U test를 이용하였다. 피부미용에 미치는 임상시험 효과 검정에서 세 군간 특성의 차이는 ANOVA, Chi-Square test를 이용하였다. 시험 전과 후의 피부상태의 변화 정도는 전과 후의 차이 값을 구한 후 ANOVA를 이용하였고, 각 군별 차이를 보기 위한 사후검정은 Duncan test를 이용하였다. 통계적 유의성은 $p<0.05$로 하였다.

dCollection @ chosun

Ⅲ. 연구결과

A. 자운영 종자 아세톤 추출물의 피부 생리활성

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

자운영 종자 아세톤 추출물의 총 폴리페놀 함량을 tannic acid를 표준곡선으로 하여 측정한 결과 190.59 mg/g의 함량을 나타내었으며, 총 플라보노이드 함량은 rutin을 표준물질로 검량선을 작성하여 측정한 결과 63.03 mg/g의 함량을 나타내었다(표 4).

표 4. 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량

추출물	총 폴리페놀 (㎎/g) (Mean ± SD)	총 플라보노이드 (㎎/g) (Mean ± SD)
Chinese milk vetch seeds acetone extracts	190.59±4.06	63.03±10.80

2. Raw 264.7 세포에서 자운영 종자 아세톤 추출물의 세포 생존율에 미치는 영향

자운영 종자 추출물의 Raw 264.7 세포에 대한 독성을 MTT assay로 측정한 결과 추출물의 12.5 mg/ml에서 91.84±6.24%, 25 mg/ml에서 103.00±5.22%, 50 mg/ml에서 96.61±7.56%의 세포 생존율을 나타내었다(그림 2).

dCollection @ chosun

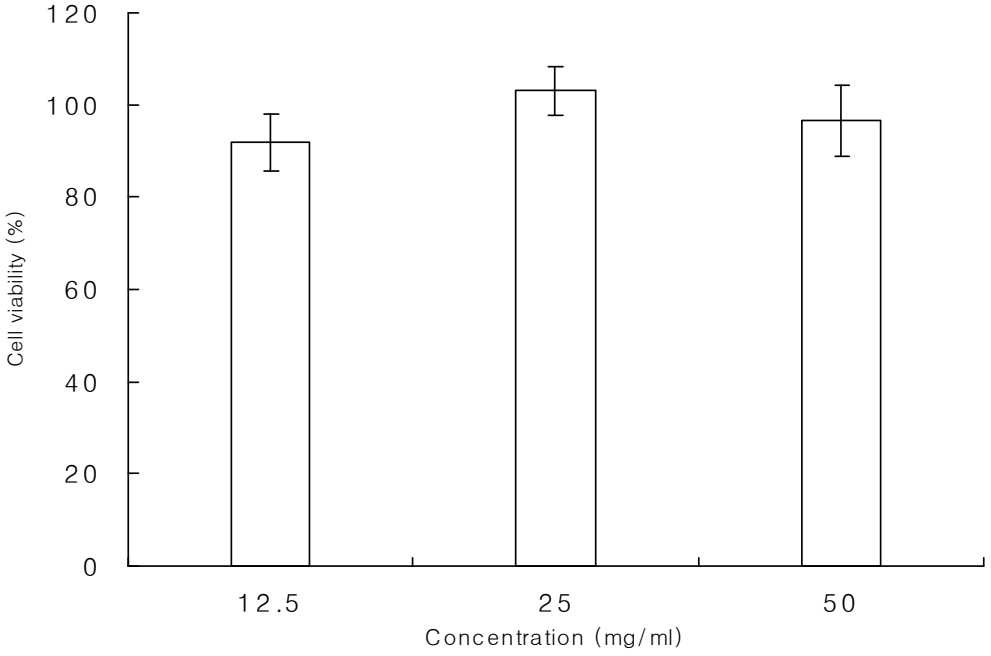


그림 2. 자운영 종자 아세톤 추출물의 농도에 따른 Raw 264.7 세포 생존율.

dCollection @ chosun

3. 자운영 종자 아세톤 추출물의 DPPH radical 소거능

자운영 종자 아세톤 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 2.5 ㎎/㎖에서 63.52±2.86%, 5.0 ㎎/㎖에서 90.71±0.65%, 10.0 ㎎/㎖에서 91.6±0.21%의 DPPH radical 소거능을 나타내었으며, 대조군인 ascorbic acid의 경우 2.5 ㎎/㎖에서 93.56±0.07%, 5.0 ㎎/㎖에서 93.72±0.04%, 10.0 ㎎/㎖에서 93.71±0.05%의 DPPH radical 소거능을 나타내어 5.0 ㎎/㎖와 10.0 ㎎/㎖에서 ascorbic acid와 유사하였다.

각 농도에서 자운영 종자 추출물의 소거능과 ascorbic acid의 소거능 간에는 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.05$)(그림 3).

dCollection @ chosun

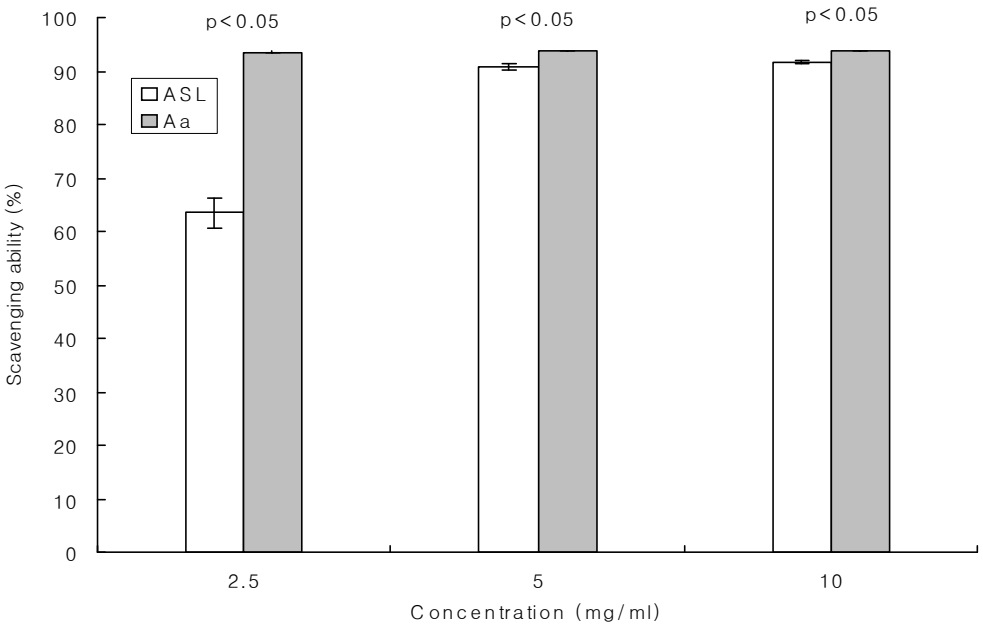


그림 3. 자운영 종자 아세톤 추출물의 DPPH 라디칼 소거능.
ASL; 자운영 종자 아세톤 추출물, Aa; ascorbic acid
Tested by ANOVA and Duncan test, Mann-Whitney U test
ASL: (2.5 - 5, 10 : $p<0.05$), Aa: (2.5, 5, 10 : $p>0.05$)

dCollection @ chosun

4. 자운영 종자 아세톤 추출물의 elastase 저해활성

자운영 종자 아세톤 추출물의 elastase 저해활성은 25 ㎍/㎖에서 73.33±1.58%, 50 ㎍/㎖에서 80.25±2.07%, 100 ㎍/㎖에서 90.82±2.46%, 250 ㎍/㎖에서 97.36±1.69%의 저해활성을 나타내었으며, 대조군의 quercetin은 25 ㎍/㎖에서 75.60±1.69%, 50 ㎍/㎖에서 79.12±1.03%, 100 ㎍/㎖에서 85.03±1.03%, 250 ㎍/㎖에서 105.28±3.63%의 저해활성을 나타내었다. 대조군인 flavonoid 계열의 elastase 활성 억제물질인 quercetin과 비교하여 100 ㎍/㎖에서는 자운영 종자 추출물의 elastase 저해활성이 대조군의 quercetin에 비해 유의하게 높았다($p<0.05$)(그림 4).

dCollection @ chosun

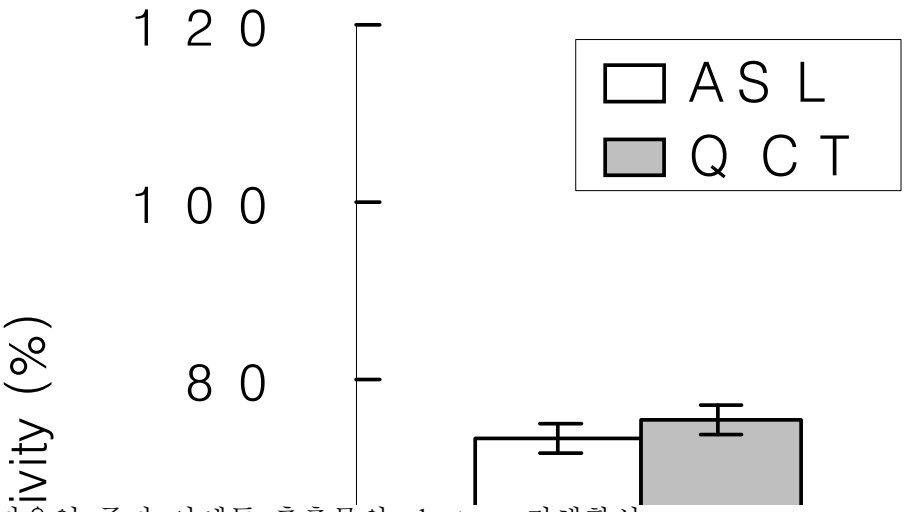


그림 4. 자운영 종자 아세톤 추출물의 elastase 저해활성.

ASL; 자운영 종자 아세톤 추출물, QCT; quercetin

Tested by ANOVA and Duncan test, Mann-Whitney U test

ASL: (25 - 50 - 100 - 250 : $p<0.05$)

QCT: (25, 50 - 100 - 250 : $p<0.05$)

dCollection @ chosun

5. 자운영 종자 아세톤 추출물의 MMP-1(collagenase)의 저해활성

자운영 종자 아세톤 추출물의 MMP-1(collagenase)의 저해활성은 자운영 종자 추출물의 50 ㎍/㎖에서 23.00±0.06%, 100 ㎍/㎖에서 43.9±0.06%, 250 ㎍/㎖에서 76.9±0.02%, 500 ㎍/㎖에서 95.24±0.03%의 저해 활성을 나타내었으며, 대조군인 quercetin은 50 ㎍/㎖에서 69.95±0.12%, 100 ㎍/㎖에서 84.2±0.09%, 250 ㎍/㎖에서 98.4±0.02%, 500 ㎍/㎖에서 99.95±0.01%의 저해활성을 나타내었다. 각 농도에서 자운영 종자 추출물의 MMP-1 (collagenase) 저해활성이 대조군인 quercetin에 비해 유의하게 낮았다($p<0.05$)(그림 5).

dCollection @ chosun

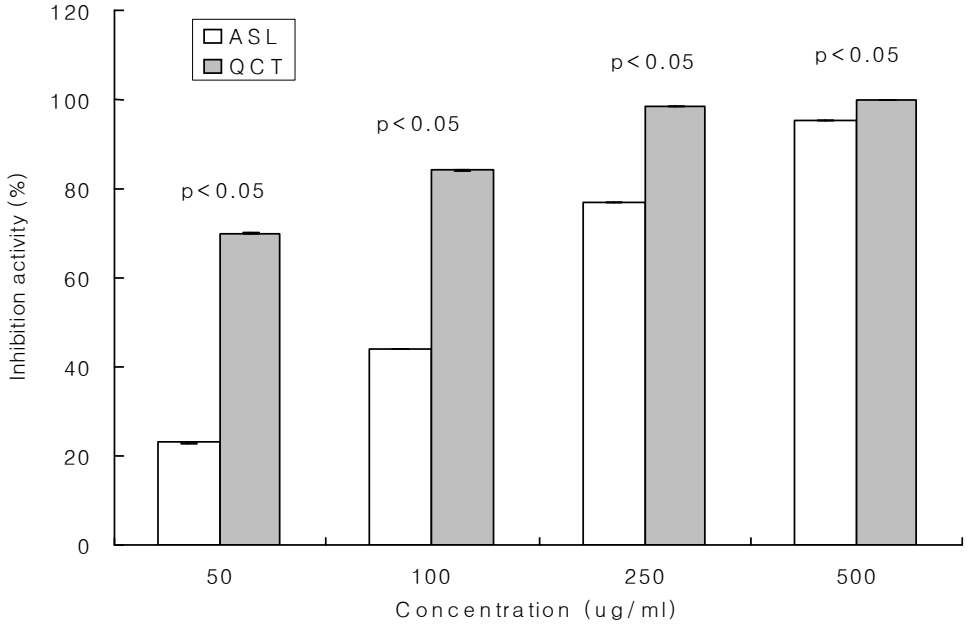


그림 5. 자운영 종자 아세톤 추출물의 MMP-1(collagenase) 저해활성.
ASL;자운영 종자 아세톤 추출물, QCT; quercetin
Tested by ANOVA and Duncan test, Mann-Whitney U test
ASL: (50 - 100 - 250 - 500 : $p<0.05$)
QCT: (50 - 100 - 250 - 500 : $p<0.05$)

dCollection @ chosun

6. 자운영 종자 아세톤 추출물의 tyrosinase의 저해활성

자운영 종자 추출물의 tyrosinase 저해활성이 농도 의존적으로 활성화를 나타내었다. 6.25 ㎎/㎖에서 61.77±2.85%, 12.5 ㎎/㎖에서 73.65±1.47%, 25 ㎎/㎖에서 89.41±5.77%, 50 ㎎/㎖에서 94.41±9.15%의 저해 활성을 나타내었으며, 대조군인 ascorbic acid는 6.25 ㎎/㎖에서 68.81±0.29%, 12.5 ㎎/㎖에서 88.75±1.58%, 25 ㎎/㎖에서 90.18±0.44%, 50 ㎎/㎖에서 89.99±0.29%의 저해활성을 나타내었다. 대표적인 미백물질인 ascorbic acid의 대조군과 비교하여 6.25 ㎎/㎖, 12.5 ㎎/㎖에서는 유의하게 낮았으나 50 ㎎/㎖에서는 유의하게 높았다($p<0.05$)(그림 6).

dCollection @ chosun

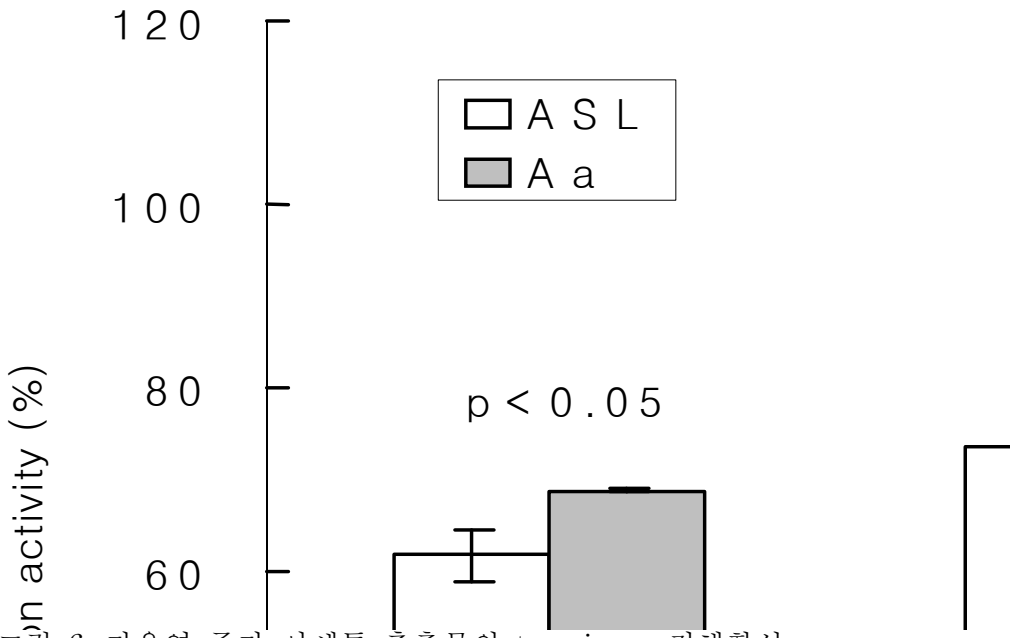


그림 6. 자운영 종자 아세톤 추출물의 tyrosinase 저해활성.

ASL; 자운영 종자 아세톤 추출물, Aa; ascorbic acid

Tested by ANOVA and Duncan test, Mann-Whitney U test

ASL: (6.25 - 12.5 - 25, 50 : $p<0.05$)

Aa: (6.25 - 12.5 - 25, 50 : $p<0.05$)

dCollection @ chosun

B. 자운영 종자의 피부미용에 미치는 영향

1. 자운영 종자 유액과 팩의 제조

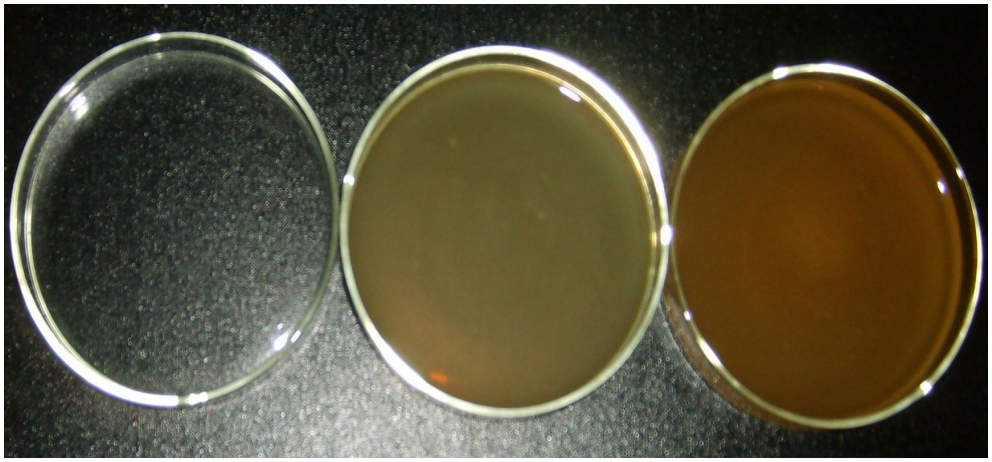
처방전에 의해 제조한 자운영 종자 유액은 외관상 엷은 갈색을 띄었으며, 수상과 유상이 분리되지 않고 처음과 같은 것으로 보아 유화상태가 안정하였고, 자운영 종자 추출물을 함유한 농도에 따라 색깔과 향의 차이를 나타내었다(그림 7). 자운영 종자 추출물을 0.2% 함유한 유액의 pH는 5.7, 0.5% 함유한 유액의 pH는 5.2를 나타내었다. 처방전에 의해 제조한 자운영 종자 팩은 진한 갈색을 띄었다. 자운영 종자 추출물을 함유한 농도에 따라 색깔이 다소 차이가 있었으며, 0.5% 함유한 팩이 0.2% 함유한 팩보다 자운영 종자의 향이 다소 더 강하게 느껴졌다. 팩의 점성은 필 오프의 특성에 알맞은 농도로 제조되었으며, 0.2% 함유한 팩의 pH는 5.2, 0.5% 함유한 팩의 pH는 4.8을 나타내었다. pH측정은 Orion Star Series Meter (Thermo Election Corporation USA)를 이용하여 측정하였으며, 실내의 실온에서 7일 동안 유액과 팩을 육안 및 냄새를 통하여 관찰한 결과 제조 시점의 유화상태 및 팩의 기질을 안전하게 유지하였다(그림 8).

dCollection @ chosun

대조군　　자운영 종자 유액 A　　자운영 종자 유액 B

그림 7. 대조군과 시험군의 자운영 종자 유액 A와 유액 B.

dCollection @ chosun



대조군　　자운영 종자 팩 A　　자운영 종자 팩 B

그림 8. 대조군과 시험군의 자운영 종자 팩 A와 팩 B.

dCollection @ chosun

2. 피부자극 평가

자운영 종자 유액과 팩의 피부 안전성을 평가하기 위하여 참여자의 상박부 내측에 24시간 동안 첩포 시험한 후, 첩포를 제거하고 1시간 경과 후에 시험 부위의 피부 반응을 관찰하여 판독하였다. 피험자 10명 모두 알레르기나 기타 피부자극이 나타나지 않았으며, 판정기준에 의하여 판독한 결과 피부 이상반응이 관찰되지 않았다(표 5).

표 5. 자운영 종자 유액과 팩의 피부자극 평가

Symbol	24 hrs				
	-	±	+	++	+++
Result (n = 10)	10	0	0	0	0

3. 임상시험자의 특성

대조군과 시험군 A, 시험군 B의 특성을 조사한 결과, 평균 연령은 각각 23.33세, 23.08세, 23.83세로 세 그룹간의 유의한 차이가 없었다. 또한 세 그룹간의 건강상태 인식, 하루 평균 수면시간, 규칙적인 운동의 빈도, 하루 물 섭취량, 하루식사 횟수 등도 유의한 차이를 보이지 않았다($p<0.05$)(표 6).

dCollection @ chosun

표 6. 임상시험자의 특성 단위: 명(%)

항 목		대조군 (n = 12)	시험군 A (n = 12)	시험군 B (n = 12)	p-value
연령 (Mean±SD)		23.33±1.43	23.08±1.89	23.83±2.44	0.626
건강상태 인식	좋음	0(0.0)	4(33.3)	1(8.3)	0.230
	보통	4(33.3	6(50.0)	8(66.7)	
	좋지 않음	8(66.7)	2(16.7)	3(25.0)	
수면시간 (1일)	5시간 미만	1(8.3)	0(0.0)	0(0.0)	0.444
	5시간 이상	5(41.7)	5(41.7)	4(33.3)	
	7시간 이상	4(33.3)	7(58.3)	5(41.7)	
	8시간 이상	2(16.7)	0(0.0)	3(25.0)	
규칙적 운동	주 2~3회	1(8.3)	1(8.3)	0(0.0)	0.723
	주 1회	1(8.3)	2(16.7)	3(25.0)	
	하지 않음	10(83.3)	9(75.0)	9(75.0)	
하루 물 섭취량	5잔 이하	10(83.3)	11(91.7)	7(58.3)	0.079
	6잔	2(16.7)	0(0.0)	5(41.7)	
	8잔	0(0.0)	1(8.3)	0(0.0)	
식사횟수 (1일)	3회	0(0.0)	3(25.0)	1(8.3)	0.064
	2회	1(8.3)	4(33.3)	1(8.3)	
	기타	11(91.7)	5(41.7)	10(83.3)	

dCollection @ chosun

4. 자운영 종자 유액과 팩의 피부 임상시험

자운영 종자 유액과 팩을 사용하기 전과 후의 대조군과 시험군 A, 시험군 B의 수분지수를 측정한 결과, 세 그룹 각각 사용 전 47.83±6.27, 45.67±4.49, 45.25±2.76의 수분지수를 나타내었으며, 사용 후 45.42±6.74, 49.25±5.70, 48.17±3.43의 수분지수를 나타내었다. 사용전과 후의 차이는 각각 -2.42±2.64, 3.58±2.64, 2.92±2.19의 차이를 나타내어 대조군은 수분지수가 감소하였으며 두 시험군에서는 유의하게 증가하였다($p<0.001$).

탄력지수를 측정한 결과에서는 사용 전 57.33±8.13, 56.08±8.40, 57.08±6.40의 탄력지수를 나타내었으며, 사용 후 54.83±8.98, 63.00±9.21, 62.00±5.86의 탄력지수를 나타내었다. 사용 전과 후의 차이는 각각 -2.50±1.83, 6.92±5.69, 4.92±3.94의 차이를 나타내어 대조군은 탄력지수 감소를 보였으며, 두 시험군에서는 유의하게 증가하였다($p<0.001$).

거칠기지수를 측정한 결과, 사용 전 세 그룹 각각 24.00±3.79, 23.92±4.69, 25.67±3.08의 거칠기 지수를 나타내었으며, 사용 후에는 각각 26.08±3.63, 19.83±3.32, 21.42±2.35의 거칠기 지수를 나타내었다. 사용전과 후의 차이는 2.08±1.50, -4.08±3.39, -4.25±2.66의 지수를 나타내어 대조군에서는 증가, 두 시험군에서는 유의하게 감소하였다($p<0.001$).

색소지수를 측정한 결과는 사용 전 각각 47.42±15.10, 44.67±11.56, 54.17±11.48을 나타내었으며, 사용 후 각각 53.75±14.64, 29.25±13.41, 39.08±13.23의 색소지수를 나타내었다. 사용전과 후의 차이는 각각 6.33±6.30, -15.42±13.27, -15.08±7.01의 차이를 나타내어 대조군에서는 증가하였으며, 두 시험군에서는 유의하게 감소하였다($p<0.001$).

각 군별 차이를 사후검정에서 수분지수, 탄력지수, 거칠기 지수, 색소지수 모두 대조군과 시험군 A, 시험군 B군 간에 유의한 차이를 보였고($p<0.05$), 시험군 간에는 유의한 차이를 보이지 않았다(표 7).

dCollection @ chosun

표 7. 임상시험자의 피부 관리 전·후의 피부상태 단위: Mean ± SD

항 목		대조군 (n = 12)	시험군 A (n = 12)	시험군 B (n = 12)	p-value*
수분지수	전	47.83±6.27	45.67±4.49	45.25±2.76	0.369
	후	45.42±6.74	49.25±5.70	48.17±3.43	0.224
	차이[1)]	-2.42±2.64	3.58±2.64	2.92±2.19	<0.001
탄력지수	전	57.33±8.13	56.08±8.40	57.08±6.40	0.915
	후	54.83±8.98	63.00±9.21	62.00±5.86	0.039
	차이[2)]	-2.50±1.83	6.92±5.69	4.92±3.94	<0.001
거칠기 지수	전	24.00±3.79	23.92±4.69	25.67±3.08	0.474
	후	26.08±3.63	19.83±3.32	21.42±2.35	<0.001
	차이[3)]	2.08±1.50	-4.08±3.39	-4.25±2.66	<0.001
색소지수	전	47.42±15.10	44.67±11.56	54.17±11.48	0.191
	후	53.75±14.64	29.25±13.41	39.08±13.23	0.002
	차이[4)]	6.33± 6.30	-15.42±13.27	-15.08± 7.01	<0.001

p-value*: 분산분석

차이[1)], 차이[2)], 차이[3)], 차이[4)]: Duncan test, 대조군 - 시험군 A, 시험군 B

dCollection @ chosun

Ⅳ. 고 찰

A. 자운영 종자 아세톤 추출물의 피부 생리활성

자운영은 약 1000년 전부터 중국의 양자강 이남에서 재배되었으며, 우리나라에서는 1909년 처음으로 시험재배 되어 따뜻한 남부지방에서 타감작용(allelopathy) 효과로 인하여 자운영을 생육재배하고 있다(유광호, 2007). 자운영 종자는 항산화제 및 항염증제 등의 효과(염승환, 2004)가 있으며, 전초는 외상출혈이나 대상포진 등의 피부 질환을 치료하는데(배기환, 2000) 쓰이는 약용식물이다. 본 연구는 이러한 천연자원의 자운영 종자를 아세톤으로 추출하여 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드의 함량을 검량하고 피부생리활성과 기능성화장품으로서의 사용 가능성 및 피부상태에 미치는 영향에 대하여 연구하고자 하였다.

자운영 종자에서 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과 190.59 mg/g을 나타내었다. 폴리페놀 화합물은 건강유지와 질병예방에 기여하는 물질로서 녹차의 카테킨(박시준, 2007), 커피의 클로로젠산(서지연, 2006), 딸기, 가지, 파프리카, 포도, 복분자 등의 붉은색이나 자색의 안토사이아닌계(박필재, 2004) 색소 등에 풍부하게 함유되어 있다. 항산화, 산화방지제 등의 효과에 관여되는 원인물질(이형범, 2007)인 폴리페놀이 자운영 종자의 추출물에도 풍부하게 함유되어 있어 피부 관리를 위한 기능성 화장품의 천연원료로서 항균, 항염, 노화예방, 미백 등에 기여할 수 있는 물질임을 확인할 수 있었다.

플라보노이드는 벤즈 감마 피론(benz - γ - pyrone)의 구조를 갖는 페놀성 화합물로서 식물에 다량 함유되어 있으며, 활성산소종을 소거하여 조직 손상을 막아주고 광노화의 원인인 단일항산소를 소거시킬 수 있다(김한식 등, 2009). 자운영 종자 아세톤 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과 63.03 mg/g을 나타내었다. 염승환(2004)은 자운영 종자를 80% 아세톤으로 추출한 후 chromatography로 8종의 화합물을 분리한 결과 플라보노이드를 풍부하게 함유하고 있음을 밝혔다. 기존의 플라보노이드 함량 분석 연구에서 산딸기 잎은 49.81 mg/g, 복분자 미숙과는 2.41 mg/g(김민영 등, 2008), 향유의 꽃 추출물은 2.75 mg/g, 잎은 3.51 mg/g(엄혜진과 김건희, 2007)을 보여 자운영 종자의 플라보노이드 함량 또한 높은 것으로 확

dCollection @ chosun

인되었다.

자운영 종자 추출물의 세포독성 여부를 알아보기 위하여 MTT assay 결과, 추출물의 25 mg/ml에서 103%의 세포 증식효과를 보였고, 50 mg/ml에서도 96.61%의 세포 생존율을 나타내었다. 뱀 딸기 열매의 세포 생존율은 50~80%(정은주, 2008), 에탄올 및 아세톤 추출물의 500 ppm에서 80% 정도의 세포 생존율을 나타낸 복숭아 꽃의 연구결과(이진영, 2007)와 비교해볼 때 자운영 종자는 세포독성에 대한 영향을 거의 미치지 않는 것으로 확인되었다.

DPPH radical의 감소는 자유 라디칼의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고, 지질과산화의 초기반응 억제정도를 예측할 수 있다(김미진 등, 2006). 자운영 종자의 추출물에서 DPPH radical 소거능은 농도 의존적으로 높은 효과를 나타내었다. 5.0 mg/ml에서 10.0 mg/ml까지 90% 이상의 높은 소거능을 보였고, 5.0 mg/ml의 낮은 농도에서도 소거능이 높은 것으로 나타났다. 대조군인 ascorbic acid mg/ml 5.0 에서 93.72%, 10.0 mg/ml에서 93.71%의 소거능과 비교하여 거의 유사한 항산화 효과를 보여 자운영 종자 화합물을 분획하여 ascorbic acid 보다 더 우수한 항산화 활성을 나타냄을 보고한 선행연구(염승환, 2003)를 뒷받침하였다. 또한 ursolic acid의 경우 500 ppm에서 16.4%, 1000 ppm에서 24.7%의 항산화 효과(김인영, 2005)를 나타내었으며, 바위취 수용성 추출물은 100 ㎍/㎖에서 55.7%의 항산화 작용을, 에탄올 추출물에서는 58.9%의 항산화 작용을 나타낸 보고(윤미연 등, 2007)와 비교하여 자운영 종자 추출물의 DPPH radical 소거능은 높은 것으로 확인되었다.

Elastase는 특이적으로 elastin을 분해하는 효소로서 1949년 Balo 등에 의해 소의 신선한 췌장에서 발견되어 그 존재가 보고되었다. 1952년 Banga에 의해 신선한 돼지 췌장으로부터 조결정이 얻어졌으며, 동시에 elastase가 단백분해능도 가지고 있음이 밝혀졌다(임윤규와 이영순, 1990). 이러한 elastase는 elastin을 분해시켜 진피의 그물망 구조결합을 절단하여 탄력감소와 주름생성의 주원인 효소로 알려져 있다(곽윤진 등, 2005). 자운영 종자 추출물의 100 ㎍/㎖에서 90.82%, 250 ㎍/㎖에서 97.36%의 높은 elastase 저해활성을 보였다. 오배자의 경우 elastase 저해활성능이 500 ㎍/㎖의 농도에서 65.79%(박진미, 2008)를 나타내었고, 애엽 메탄올 추출물의 경우 1000 ㎍/㎖의 농도에서 26.7%(박시향 등, 2008)의 결과와 비교하면 자운영 종자 추출물의 elastase 저해활성은 상대적으로 높은 것으로 사료된다. 또한 대조군인 플라보노이드 계열의 elastase 저해활성 억제물질인 quercetin (Pietta, 2000)과도 유사하게 높은 저해활성을 보여 자운영 종자 추출물은 elastase 저해활성 물질임을 확인할 수 있었다.

dCollection @ chosun

자외선은 collagenase와 같은 MMP의 발현을 유도하여 collagen의 분해가 증가되면서 함량이 줄어들게 되어 피부의 탄력감소와 주름이 나타나게 된다(이태완 등, 2004). Collagenase 저해활성 실험은 피부의 지지역할을 하는 collagen을 가수분해하는 collagenase의 저해활성을 측정하여 피부노화의 감소 정도를 측정한다(최원식 등, 2008). 자운영 종자 추출물 500 ㎍/㎖에서 나타낸 MMP-1 (collagenase)의 저해활성 결과는 대조군의 quercetin에 비해 낮았으나 피부 노화를 예방하고 주름을 개선하는 기능을 하는 것으로 볼 수 있다. 자운영 종자 추출물은 낮은 농도에서는 대조군과 비교하여 상대적으로 낮은 저해활성을 보여 자운영 종자 추출물의 MMP-1 (collagenase) 저해활성은 대체적으로 고농도에서 효과를 발휘하는 것임을 알 수 있었다. 또한 피부노화예방과 세포재생에 효과적인 coenzyme Q10의 경우 농도 1%에서 91.1%의 저해활성(최원식 등, 2008)을 보여 자운영 종자 아세톤 추출물의 500 ㎍/㎖의 95.24% 결과는 MMP-1(collagenase)의 저해활성 효과가 좋음을 알 수 있었다.

자외선에 의해 피부 노화가 진행되면 melanocyte내 tyrosinase가 활성화 되어 색소침착을 일으킨다(조수민 등, 2001). Tyrosinase는 copper를 함유한 metalloprotein으로 monophenol의 o-hydroxylation을 촉매하는 cresolase와 o-diphenol의 oxidation 반응을 촉매하는 catecholase의 두 가지 촉매 활성을 지니며, 전환되는 기질은 수산기(-OH)를 갖는 phenol류 및 catechol류로서 L-tyrosine, o,m-cresol, chlorophenol, resorcinol, l-napthol 등이다(김지연과 유영제, 1990). 본 연구에서 자운영 종자 추출물의 tyrosinase 저해활성은 농도 의존적으로 활성화된 효과를 나타내었다. 낮은 농도에서는 대조군인 ascorbic acid보다 낮은 저해활성을 나타내었으나 50 ㎎/㎖에서는 94.41%의 저해 활성을 나타내어 대조군인 ascorbic acid의 89.99%에 비해 자운영 종자 추출물이 더 효과적임을 확인할 수 있었다. 현재 ascorbic acid가 대표적인 미백물질임을 감안하면 자운영 종자 추출물의 tyrosinase 저해활성은 안전하고 높은 것임을 알 수 있다. 식용 및 약용식물의 종자를 이용한 새로운 기능성 소재 탐색 연구에서 고욤나무 종자와 대추종자 추출물을 이용한 tyrosinase 저해활성 실험 결과, 4 mg/ml의 농도에서 각각 46.7%, 44.4%의 tyrosinase 저해활성을 나타낸 결과(정진아 등, 2007)와 비교하여도 자운영 종자 추출물이 갖는 tyrosinase 저해활성이 우수함을 알 수 있었다.

dCollection @ chosun

B. 자운영 종자 아세톤 추출물의 피부미용에 미치는 영향

처방전에 의해 제조한 자운영 종자 유액을 피부에 도포 할 때 밀리거나 뭉침 현상이 없이 가볍고 부드럽게 흡수되었으며 도포 후 수 시간이 경과하여도 피부 보습효과를 유지하였다. 자운영 종자 유액의 처방전은 유화를 위한 기본 물질로만 구성하였으며, 방부제를 첨가하지 않았으므로 냉장보관하면서 사용하도록 하였다. 임상시험 8주 동안 25 ℃의 실온에서 보관하면서 관찰한 결과 색깔, 향, 농도 등의 변성이 일어나지 않았으며, 안정한 유화상태를 유지하였다. 자운영 종자 추출물을 고농도로 첨가하여 기능성 화장품으로서의 효능을 알아보고자 실험 제조하는 과정에서 자운영 종자 추출물을 1%~3%까지 첨가하여 실험 제조를 실시한 결과 유화가 이루어지지 않았으며, 반복 실험의 결과 0.5% 첨가량 이하에서 자운영 종자 유액이 정상적으로 유화됨을 확인할 수 있었다.

처방전에 의해 제조한 자운영 팩은 진한 갈색으로 자운영 종자 추출물을 함유한 농도에 따라 약간의 색의 차이가 있었으며, 0.5% 함유한 팩이 0.2% 함유한 팩보다 자운영 종자의 향이 더 높았으며 색깔도 더 진한 갈색을 띄었다. 팩의 점성은 필오프 타입의 특성을 잘 나타내었으며 피부에 도포 후 약 15~20분 경과 후에 제거하였을 때 분산되거나 조각남이 없이 자연스럽게 제거되었다. 또한 임상 8주 동안 25℃의 실온에서 보관하면서 관찰한 결과, 색깔, 향, 농도 등의 변성이 일어나지 않았으며, 분산 상태를 안전하게 유지하였다. 팩 또한 자운영 종자 추출물을 고농도로 첨가하여 기능성 화장품으로서의 효능을 알아보고자 실험 제조하는 과정에서 자운영 종자 추출물을 1%~3%까지 첨가하여 제조한 결과 농도가 묽어지는 현상을 초래하였으며, 반복 실험의 결과 0.5% 첨가량 이하에서 자운영 종자 팩이 정상적으로 제조됨을 알 수 있었다. 따라서 차후 자운영 종자 추출물을 고농도로 첨가하여 기능성 화장품을 제조하기 위한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료되었다.

사람 피부의 산도는 pH 4~6을 유지해야한다(Eckstien, 1991). 이러한 약산성 pH는 병원균으로부터 피부를 보호하므로 외부 자극으로부터 피부를 보호하기 위해서는 중성 또는 약산성 화장품을 사용하는 것이 바람직하다. 자운영 종자 추출물을 0.2% 함유한 유액의 pH는 5.7, 0.5% 함유한 유액의 pH는 5.2를 나타내었으며, 필오프 타입의 pH는 0.2% 함유한 팩은 5.2, 0.5% 함유한 팩은 4.8을 나타내어 제조일 부터 28일이 경과하는 동안 안정적으로 pH가 유지되었다. 도화추출물을 첨가한

dCollection @ chosun

W/O/W multiple emulsion pH 5.95(이진영, 2007), 오미자를 첨가한 보습팩의 pH 4.4~4.5(송미애, 2007)를 나타낸 결과와 비추어볼 때 자운영 종자 추출물을 함유한 유액과 팩의 pH도 약산성임이 확인되어 적절한 피부보호 효과가 있을 것으로 판단된다.

대조군과 시험군 A, 시험군 B의 세 그룹의 특성을 조사한 결과, 평균 연령은 23세로 세 그룹간의 연령 차이는 없었다. 또한 건강상태 인식 등도 대조군과 시험군간에 유의한 차이를 보이지 않아 이러한 특성들이 임상시험에 영향을 미치지 않을 것으로 사료되었다.

유액과 팩을 제조하여 8주 동안 얼굴에 도포하여 얼굴의 피부상태, 즉 수분지수, 탄력지수, 거칠기, 색소지수의 변화 및 효과에 대하여 관찰한 결과, 유액과 팩을 사용하기 전과 후의 세 그룹의 피부상태는 상대적으로 대조군에 비하여 두 시험군에서 피부상태 개선 효과를 나타내었다. 기본 베이스의 화장품을 사용하여 피부 관리한 대조군은 수분지수와 탄력지수가 감소하였으며, 거칠기 지수와 색소지수는 증가함을 나타내었다. 이는 임상시험 기간이 봄볕이 강한 때인 점과 기능성 물질을 함유하지 않은 유액과 팩은 피부미용에 도움을 주지 못하는 것을 보여주는 결과임을 알 수 있다. 자운영 종자 추출물을 농도별로 함유한 유액과 팩을 사용하여 피부 관리한 두 시험군에서는 수분지수와 탄력지수가 유의하게 증가하였으며, 거칠기 지수와 색소지수 또한 유의하게 감소하여 자운영 종자 추출물을 함유한 유액과 팩이 피부 관리에 효과가 있는 것으로 확인되었다. 두 시험군의 피부 관리 결과를 살펴보면, 자운영 종자 추출물을 0.5% 함유한 그룹보다 0.2% 함유한 그룹에서 다소 피부 관리 효과가 높은 것을 알 수 있어 자운영 종자 추출물은 적은 양에서도 양호한 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

본 연구의 제한점으로는 쥐나 토끼를 이용하여 자운영 종자 추출물의 동물 피부 생리활성 효과를 파악하지 못한 점과 자운영 종자 아세톤 추출물의 어떠한 특정 성분이 피부 생리활성 효과와 피부 임상시험에 효과가 있는지 화합물을 분획하지 못했다는 점이다. 차후 이러한 부분의 연구를 진행하여 자운영 종자가 피부미용에 갖는 효과를 깊이 있게 검증해야할 필요가 있다고 생각한다.

본 연구는 현재까지 화장품의 원료로 사용되지 않았던 자운영 종자 아세톤 추출물이 기능성 피부미용 물질임을 확인하여 피부 관리를 위한 새로운 원료를 개발하였다는 점과 피부 임상시험 결과, 기능성 화장품으로서 사용가능성을 확인하였다는 점에서 연구의 의의가 있다고 사료되며, 향후 자운영 종자 추출물을 첨가한 기능성

dCollection @ chosun

화장품으로서의 안전성과 유효성을 검증하는 계속적인 연구가 필요하다고 생각한다.

dCollection @ chosun

Ⅴ. 요약 및 결론

본 연구는 자운영 종자의 아세톤 추출물을 이용하여 피부 생리활성 효과와 피부미용에 미치는 영향을 규명하고자 자운영 종자 아세톤 추출물을 이용하여 피부 생리활성 실험을 시행하고 0.2%와 0.5%를 첨가한 유액과 팩을 제조한 후 36명의 성인여성을 대상으로 피부미용 임상시험을 실시한 결과는 다음과 같다.

총 폴리페놀 함량은 190.59 mg/g tannic acid, 총 플라보노이드 함량은 63.03 mg/g rutin의 함량을 나타내었다.

세포독성 여부를 확인하기 위하여 MTT assay한 결과 100%에 가까운 세포 생존율 및 세포 증식 효과를 나타내어 세포독성이 거의 없는 것으로 나타났다.

DPPH ridical 소거능의 실험 결과, 높은 소거능을 나타내어 자운영 종자 아세톤 추출물이 항산화제임을 확인하였다.

Elastase의 저해활성은 250 ㎍/㎖에서 97.36%, MMP-1의 저해활성은 500 ㎍/㎖에서 95.24%, tyrosinase 저해활성은 50 ㎎/㎖에서 94.41%의 저해 활성을 나타내어 피부 관리를 위한 노화억제 및 미백물질임을 확인하였다.

자운영 종자 아세톤 추출물 0.2% 및 0.5%를 첨가한 유액은 안정적으로 유화되어 피부에 부드럽게 흡수되어 피부보습력을 유지하였으며, 팩 또한 고르게 흡착되어 건조 후에 잘 제거되어 피부상태를 매끄럽게 개선하는 효과를 나타내었다.

피부자극 첩포 실험 결과 자운영 종자 유액과 팩은 피부 자극이 없었으며, 유액과 팩을 제조하여 8주 동안 관리한 후, 얼굴의 피부상태 즉, 수분지수, 탄력지수, 거칠기지수, 색소지수의 변화 및 효과에 대하여 측정한 결과, 유액과 팩을 사용하기 전과 후의 피부상태는 상대적으로 대조군에 비하여 두 시험군에서 우수한 피부상태 개선 효과를 나타내었으며($p<0.001$), 자운영 종자를 0.5% 함유한 시험군보다 0.2% 함유한 시험군에서 효과가 더 높은 것으로 나타났다.

결론적으로 자운영 종자 아세톤 추출물은 우수한 피부 생리활성 효과를 지니고 있는 기능성 화장품 원료로서의 가능성을 확인하여 피부미용에 활용될 가치가 높을 것으로 사료된다.

dCollection @ chosun

참 고 문 헌

과학기술부. 미백기능성 물질의 탐색, 생체효능연구 및 산업화. 2006.

과학기술부. 화장품 원료 기술 개발동향. 2006.

곽윤진, 이대형, 김나미, 이종수. 각종 약용 식물로부터 피부노화 억제 관련 elastase 저해물질의 탐색 및 추출조건. 한국약용작물학회지 2005;13(6):213-216.

김미진, 김자영, 정택규, 최상원, 윤영섭. 연교추출물의 피부 항노화 효과. 한국생물공학회지 2006;21(6):444-450.

김민영, 최무영, 남정환, 박희준. 한국산 4종 Rubus속 숙과, 미숙과 및 잎의 플라보노이드 함량 분석. 생약학회지 2008;39(2):123-126.

김인영. 나노 캡슐화한 ursolic acid의 경표피 흡수와 주름개선효과. 숭실대학교 대학원 박사학위논문. 2005.

김정현, 맹승희, 임철홍, 안령미. 자외선에 의한 염색체이상과 tannic acid의 방어효과. 한국환경성돌연변이발암원학회지 1997;17(1):17-22.

김지현, 유영제. tyrosine 전환 반응에서의 tyrosinase의 안전성 및 반응특성. 한국생화학학회지 1990;23(4):453-458.

김한식, 범희주. 피부학. 청구문화사. 서울. 2009. pp39-61.

농촌진흥청작물과학원영남농업연구소. 자운영 이용 친환경 쌀 생산기술. 2007. pp14-23.

농촌진흥청작물과학원호남농업연구소. 자운영이용 친환경 벼 재배기술. 2007. pp3-10.

박동기. 화장품에 이용하기 위한 천연물에서 추출한 추출물. 대한민국특허청 2000.

박시준. 피지선세포주(SZ95)의 지질 생성과 피부생리활성에 대한 녹차의 효과. 원광대학교 한의약전문대학원 박사학위논문, 2007.

박시향, 홍유미, 최영글, 최진호, 김병관. 자외선 조사 무모쥐 피부조직에 도포한 애엽(mugwort) 추출물의 주름 개선효과. 한국식품영향과학회지 2008;37(9):1136-1141.

박종철, 박희준. Rutin 자원식물에 관한 연구. 순천대학교 논문집 1990;9:177-182.

박진미. 오배자의 항주름 효과 및 미백효과. 원광대학교대학원 박사학위논문, 2008.

dCollection @ chosun

박필재. 복분자 딸기의 재배기술 확립, 우량계통 선발 및 생리활성 연구. 원광대학교대학원 박사학위논문, 2004.

배기환. 한국의 약용식물. 교학사. 서울. 2000. pp241.

서지연. 한국의 원두커피 시장 확대 방안에 관한 연구. 경기대학교대학원 석사학위논문, 2006.

송미애. 오미자(Schizandrn chinensos)의 화장품 약리효과 검증 및 화장품 산업의 응용에 관한 연구. 대구한의대학교대학원 석사학위논문, 2007.

식품의약안전청. 천연물을 이용한 기능성화장품에 대한 평가기술(탄닌 및 관련 페놀성 화합물을 이용한 미백 및 항산화 효능 기능성화장품에 대한 평가 기술). 2004.

식품의약안전청. 기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인(Ⅱ)(주름개선에 도움을 주는 기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인). 2005.

식품의약안전청. 기능성화장품의 기능성평가방법 연구(엘라스틴 및 관련 효소를 이용한 주름개선 효능평가방법 연구). 2007.

엄혜진, 김건희. 향유속 식물자원의 플라보노이드 성분 분석에 관한 연구. 한국식품영양학회지 2007;20(2):103-107.

염승환, 김민기, 김현정, 심재걸. 자운영 종자의 페놀성 화합물 및 항산화활성. 생약학회지 2003;4(4):344-351.

염승환. 자운영종자의 플라보노이드 및 항산화활성, No 및 PGE_2 생성억제활성. 중앙대학교대학원 석사학위논문, 2004.

유광호. 자운영의 생육시기별 allelopathy 효과에 관한 연구. 경상대학교생명환경대학원 석사학위논문, 2007.

윤미연, 임혜원, 심상수, 최태부. 바위취 에탄올 추출물의 항산화 및 항노화작용. 대한약학회지 2007;51(5):343-349.

이의열, 신용규, 이정수. Cu^{++}와 반응성 산소 대사물에 의한 collagen의 변성에 있어서 rutin과 quercetin의 보호작용. 중앙의대지 1991;16(3):227-239.

이진영. 도화(Prunus persica Flos)를 활용한 주름개선, 미백 활성물질 분리 및 기능성 화장품 응용에 관한 연구. 대구한의대학교대학원 박사학위논문, 2007.

이태완, 김상년, 지웅길, 황성주. 유백피 추출물을 함유한 하이드로겔 패치의 주름억제 효과. 약제학회지 2004;34(3):193-199.

이형범. 한방배지에서 배양한 송이버섯 균사체 미생물 발호 추출물의 추출방법에

dCollection @ chosun

따른 생리활성 연구. 원광대학교한의학대학원 박사학위논문, 2007.
임연일, 김종예, 김봉희. UVB 조사에 의한 Phenothiazine의 광독성에 미치는 ascorbic acid의 영향. 충남대학교약학논문집 1998;13(3):232-237.
임윤규, 이영순. Elastase의 최기형성시험 연구. 한국동물실험학회지 1990;6(1):7-14.
정은주. 뱀딸기 열매의 생리활성 성분과 화장품 응용에 관한 연구. 원광대학교대학원 박사학위논문, 2008.
정진아, 권수현, 김영중, 신창섭, 이철희. 종자 추출물의 항산화 활성 및 tyrosinase 저해 활성 탐색. 한국자원식물학회지 2007;20(2):177-184.
조수민, 김지헌, 이민원. 탄닌화합물의 tyrosinase 억제 활성. 생약학회지 2001;32(1):68-71.
최원식, 장도연, 남석우, 어진용, 이경주. 세포내 멜라닌 생성 및 collagenase와 elastse에 대한 coenzyme Q10 유도체들의 억제활성. 한국생명과학회지 2008;51(3):164-170.
하기와라 요시와데. 항산화 활성물질 및 그의 이용. 대한민국특허청, 1998.
Baoliang, C, Junko I, Takashi T, Junei K, Toshihiro N. Triterpene glycosdies from the seeds of Astragalus sinicus L. Chem Pharm Bull 1992;40:3330-3333.
Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 1958;26:1199-1120.
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.
Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res 1987;47(4):936-942.
Eckstein. Biokosmetik Aus Forschunf und Praxis. 1991.
Imokawa G, Mishima Y. Biochemical characterization of tyrosinase inhibitors using tyrosinase binding affinity chromatography. Br J Dermatol 1981;104(5):531-539.
Nordberg, Ellas S J, Ame R. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammallan thioredoxin system, Free Radical Biology & Medicine

dCollection @ chosun

2001;31(11):1287-1312.

Mason HS, Paterson EW, Melanoproteins I. Reaction between enzyme-generated quinones and amino acids Biochim. Biophys Acta 1965;111:134-146.

Meinhard, Wlaschek, Iliana Tantcheva-Poo, Lale Naderi. Solar UV irradiation and dermal photoaging. J Photochemistry and Photobiology B: Biology 2001:63:41-51.

Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. J Ethnopharmacol 2000;71:109-114.

Pietta PG. Flavonoid as antioxidants. Journal of natural products 2000;63:1035-1042.

Shmuel Y. Dictionary of food compounds with CD-ROM. Chapman & Hall/CRC 2004.

Sim, GS, Kim JH, Lee DH, Park SM, Lee BC, Hyeong BP. Effects of the Draconis sanguis on antioxidation and MMP-1 expression in human dermal fibroblast. J Soc Comet Scientists 2004;30:439-444.

Swain T, Hillis WE, Ortega M. Phenolic constituents of Ptunus domestica I, quantitative analysis of phenolic cinstituents. J Sci Food Agric 1959;10:83-88.

Kawaguchi. The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. Arch Dermatol Res 1996;288:39.

dCollection @ chosun

저작물 이용 허락서

학 과	보건학과	학 번	20067598	과 정	박사
성 명	한글: 김 란	한문 : 金 蘭		영문 : Kim Ran	
주 소	광주광역시 서구 상무1동 1272-6번지 4층				
연락처	E-MAIL : ran2654@hanmail.net				
논문제목	한글 : 자운영 종자 아세톤 추출물의 피부 생리활성 효과와 피부미용에 미치는 영향 영어 : Skin Bioactive Effect of Acetone Extract from Chinese Milk Vetch Seeds(*Astragalus sinicus* L.) and Its Effect on Skin Care				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대( )

2009 년 8 월 일

저작자: 김 란 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하

dCollection @ chosun