[UCI]I804:24011-200000241383

2011年 2月

碩士學位論文

초임계 이산화탄소를 이용한 참당귀 추출물의 항산화 및 미백효과에 대한 연구

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

鄭 志 恩

초임계 이산화탄소를 이용한 참당귀 추출물의 항산화 및 미백효과에 대한 연구

Studies on Antioxidant and Whitening Efficacy of *Angelica gigas* Nakai Extracts by SFE

2011年 02月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

鄭 志 恩

초임계 이산화탄소를 이용한 참당귀 추출물의 항산화 및 미백효과에 대한 연구

指 導 敎 授　金 瑄 日

이 論文을 工學碩士學位 申請 論文으로 提出함.

2010年　10月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

鄭 志 恩

鄭志恩의 碩士學位 論文을 認准함

委員長　朝鮮大學校　教　授　申 鉉 載　印

委　員　朝鮮大學校　教　授　盧 聖 姬　印

委　員　朝鮮大學校　教　授　金 瑄 日　印

2010年　11月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

목 차

LIST OF TABLES ····· iv
LIST OF FIGURES ····· v
ABSTRACT ····· vi

I. 서 론 ····· 1

II. 이론 ····· 4
II-1. 참당귀 ····· 4
II-2. 초임계 ····· 7
II-2-1. 초임계 유체의 정의 ····· 7
II-2-2. 초임계 유체의 특성 ····· 7
II-2-3. 초임계 유체 추출 ····· 10
II-3. 미백 ····· 12
II-3-1. 피부의 색 ····· 12
II-3-2. 멜라닌의 합성 ····· 13
II-3-3. 미백제의 원료 동향 ····· 15

III. 재료 및 방법 ····· 17
III-1. 실험재료 및 기기 ····· 17
III-2. 시료의 추출 ····· 17
III-2-1. 열수 및 유기용매 추출 ····· 17

III-2-2. 초임계 추출 ····· 17
III-3. HPLC를 이용한 참당귀 추출물의 분석 ····· 18
III-4. DPPH radical 소거 효과 ····· 18
III-5. Tyrosinase 활성 억제 ····· 20
III-6. DOPA-oxidase 활성 억제 ····· 20
III-7. 초임계 추출물을 함유한 essence 및 cream 제조 ····· 21
III-7-1. Essence 및 cream의 안정성 측정 ····· 21
- pH 측정 ····· 21
- 온도에 따른 안정성 시험 ····· 21
III-7-2. 첩포시험 ····· 23

IV. 결과 및 고찰 ····· 25
IV-1. HPLC 통한 decursin과 decursinol angelate의 확인 ····· 25
IV-2. 초임계 이산화탄소를 이용한 추출 최적 조건 25
IV-3. DPPH assay를 이용한 활성산소 소거 효과 ····· 28
IV-4. Tyrosinase 활성 억제 효과 ····· 28
IV-5. DOPA-oxidase 활성 억제 효과 ····· 29
IV-6. 초임계 추출물을 함유한 essence 및 cream 제조 ····· 31
IV-6-1. Essence 및 cream의 안정성 측정 ····· 31
- pH 측정 결과 ····· 31

- 온도에 따른 안정성 확인 ····· 31
IV-6-2. 첩포 시험 ····· 35

V. 결론 ····· 37

참고문헌 ····· 38

LIST OF TABLES

Table 1. Critical Condition for Various Solvents ····· 11
Table 2. Whitening Ingredients ····· 16
Table 3. Experimental Condition for HPLC Analysis ····· 19
Table 4. Stability of the Essence and Cream Formular in Constant in Temperature Condition ····· 24
Table 5. HPLC Area of Supercritical Extraction of *Angelica gigas* Nakai 28
Table 6. DPPH Free Radical Scavenging Activity of Root Extracts of *Angellica gigas* Nakai Compared to BHT ····· 31
Table 7. Inhibition of the *In Vitro* Melanin Synthesis by Extracts from *Angelica gigas* using Tyrosinase ····· 31
Table 8. Inhibition of the *In Vitro* Melanin Synthesis by Extracts from *Angelica gigas* using DOPA ····· 31
Table 9. pH Measurement of Cosmetic Formulations ····· 34
Table 10. Results of Stability Test of Cosmetics in Constant Temperature Conditions(0°C, 25°C, 40°C) ····· 35
Table 11. Results of Patch Test ····· 37

LIST OF FIGURES

Figure 1. (A) *Angelica gigas* Nakai, (B) *Angelica acutiloba* Kitagawa and (C) An*gelica sinensis* Diels ····· 6
Figure 2. Pressure-temperature phase diagram of a pure substance ····· 8
Figure 3. Transition process to supercritical carbon dioxide ····· 9
Figure 4. Melanocyte in human skin ····· 12
Figure 5. Pathway of melamin synthesis ····· 14
Figure 6. Manufacture process of essence and cream formular ····· 22
Figure 7. HPLC chromatogram of decursin and decursinol angelate ····· 26
Figure 8. HPLC analysis of decursin and decursinol angelate in different pressure and temperature ····· 27
Figure 9. Formulation of whitening cosmetics (A. essence, B. cream) ····· 33

ABSTRACT

Studies on Antioxidant and Whitening Efficacy of *Angelica gigas* Nakai Extracts by SFE

Ji-Eun Jung
Advisor : Prof. Sun Il Kim, Ph.D.
Department of Chemical Engineering
Graduate School of Chosun University

The aim of the study was to screen the bioactive substance from *Angelicagigas* Nakai for cosmetic applications. We developed an optimized method of supercritical carbon dioxide for the extraction of decursin and decursinol angelate from *Angelica gigas* Nakai. Further, we evaluated the antioxidant activity and whitening effect of the extracts and the extracts also subjected for the stability and patch tests. According to the HPLC analysis the result revealed that the contents of decursin and decursinol angelate was 200 bar and 60°C respectively. In the case of antioxidant and whitening tests we have used water extracts, ethanol extracts and commercial products for the comparison. The results showed that the free radical scavenging activity were 95.5% for supercritical extract, 93.32% for water extract 90.71% for organic solvent extract and 92.2% for BHT(Butylated Hydroxy Toluene). The tyrosinase inhibitory activities and DOPA-oxidase inhibitory activities were found to be 58.82-52.85% for supercritical extract, 6.32-15.33% for organic solvent extracts, 35.73-30.70% for organic solvent extracts and 58.70-55.61% for arbutin

respectively. The data reported that supercritical extract had the higher inhibitory effect than other extracts. The stability was maintained for 60 days the pH was 6.3-6.9 and no changes in color and odor was observed. Therefore, the *Angelica gigas* Nakai supercritical carbon dioxide extract have remarkable antioxidant and whitening effect and thus we propose that it can be effectively used for the development of functional cosmetics.

I. 서 론

생약재의 유효성에 대한 연구는 최근 바이오산업의 급속한 성장과 함께 기능성 신물질의 탐색 연구가 주를 이루고 있으며, 산업화를 위한 효능 안정성 평가를 위한 연구가 집중되고 있다.[1-6] 국내 산업에서도 서양의 허브와 같은 한약재 등의 생약자원에 대한 이용은 민간 전통요법으로부터 비롯되었다고 할 수 있으므로 그 역사는 상당히 깊다. 또한, 오래전부터 학계를 중심으로 한약재에 대한 생리활성이 연구되어 왔다.[7,8] 오늘날에는 한약재가 지니는 생리학적 효능을 식품이나 의약품, 화장품 등의 소재로 활용하고 산업화 하려는 연구가 크게 각광을 받고 있으며, 그동안 민간에서 전해오던 한약재를 상업화하기 위한 기초연구 및 제품화 연구도 활발히 진행되고 있다.[9] 생약재를 비롯한 천연물에는 flavonoid 류, carotenoid 류, 그리고 terpenoid 류 및 동식물의 2차 대사산물 중에 다양한 생리활성 및 약리활성이 존재한다고 보고되어 있다.[10] 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 우리나라 전통 약용식물로써 미나리과 다년생 초본으로 전통 의약 고서에서도 여러 약리작용을 나타내고 있다.[11] 국내에서는 참당귀, 일당귀, 중국당귀가 모두 유통되고 있는데 종류에 따라 서로 다른 화학 성분과 약리학적인 효능 및 효과를 갖는다고 보고되어 있다.[12] 참당귀의 주성분은 pyranocoumarin 계 물질인 decursin, decursinol aangelate, nodakenetin, umbelliferon, nodakenin 등이 있으며, 특히 decursin 과 decursinol angelate 는 참당귀에서만 존재하는 것으로 알려져 있다.[13] 이 물질들은 여러 가지 약리효과가 나타난다고 여러 문헌에서 보고되고 있으며 이중 nodakenin($C_{20}H_{24}O_9$:408.40), decursin($C_{19}H_{20}O_5$:328.36), decursinol angelate($C_{19}H_{20}O_5$:328.36)의 합이 6.0% 이상을 함유하면 의약품으로 사용가능 하다고 식품의약안전청에서 발표하였다.[14-16] 특히 참당귀 주성분 중에 decursin 과 decursinol angelate 는 높은 함량과 추출과정이 간단하여 많은 연구가 진행되어 지고 있다.[17-19] 이러한 참당귀로부터 decursin 및 decursinol angelate 를 추출해내는 방법으로는 흔히 열수추출 및 유기용매 추출법이 일반적이다.

새로운 추출 방법으로서 초임계 유체를 이용한 추출기술(supercritical fluid extraction, SFE)은 기체와 액체의 물성을 갖는 특수한 유체를 사용하므로 용해력과 침투력이 커서 추출 효율이 높고 추출속도가 빠르다. 또한 용매의 회수가 용이하고 잔존하는 용매가 없기 때문에 환경 친화적일 뿐만 아니라 경제적인 측면에서

도 제품을 2차 정제 없이 이용할 수 있으므로 상업적으로도 매우 유용한 기술이다. 초임계 이산화탄소를 이용한 천연물질로부터 유용한 성분의 추출 및 정제에 관한 연구는 이미 오래전부터 이용되고 있으며 특히 이산화탄소를 이용할 경우에는 많은 장점을 가지고 있다. 이 기술이 천연생리활성물질의 분리, 정제 분야에서 적용될 시에는 기존의 공정에서 발생하는 문제점인 최종 부산물 내에 잔류하는 유기용매에 의한 인체독성, 고비용, 폐기용매에 의한 환경공해, 목적성분의 변성 및 낮은 추출 선택성 등을 상당 부분에서 해결 또는 보완될 수 있다. 초창기 초임계 유체 기술이 천연물 추출 정제에 주로 적용된 분야는 flavor, perfume, fatty acid, steroid 등과 같이 비극성, 저가의 식품이나 향료 성분에 국한 되었으나 최근 들어 이 기술에 관련된 여러 현상학적 특성 및 부가적 기술의 발전으로 극성, 소량, 고가의 천연의약품 추출 정제에 응용되기에 이르렀다.[20]

최근 미백소재 개발에 있어서의 천연물에 대한 관심과 연구는 더욱 활발해지고 있는 것으로 나타났다.[21] 몇 년 전만 하더라도 미백 관련 연구는 비타민 C 유도체, 알부틴(arbutin) 및 기타 다른 합성 미백제 등과 같은 화학합성을 기반으로 하고 있었으나 최근 들어서는 소비자의 웰빙에 대한 욕구를 적극 수용하여 천연 식물로부터 생물 공학 기술을 사용하여 미백성분을 추출, 이용하고자 하는데 초점을 두고 있다.[22] 그 이유는 안전성과 안정성을 충분히 검토하여 법적으로 고시된 기능성 원료들도 실제 사용에서 문제점들이 발견되고 있기 때문이다. 현재 가장 널리 사용되고 있는 알부틴의 경우 빛이나 효소 등에 의해서 미량의 하이드로퀴논이 생성될 수 있고 유용성 감초추출물은 안정도와 색상에서 문제가 있으며 비타민 C 유도체들은 가격이 비싸고 일부 유도체는 알려진 것과는 달리 제형에서 안정도에 취약하다. 닥나무추출물은 사용 중에 알려지지 않은 자극문제가 붉어졌으며 신규로 고시된 원료 중 나이아신아마이드는 이미 자극문제가 알려진 물질이다. 알파비사볼올은 모든 면에서 우수하나 오일이라 투명제형이나 스킨 등에 사용이 어렵다. 알부틴과 같이 수년간에 걸쳐 제품에 적용하면서 문제점이 서서히 들어난 경우도 있고, 나이아신아마이드처럼 널리 사용되기도 전에 자극문제가 알려진 경우도 있다. 따라서 고시된 여러 미백제와 비교하여 효능 및 안정성이 더 우수하고 인체에 안전한 새로운 미백 소재의 발굴이 필요하다. 현재 천연 미백원료에 대한 연구가 비교적 많이 진행되었으나 상업적으로 널리 사용되고 있는 미백원료는 극히 드물다. 그럼에도 불구하고 최근 천연원료에 대한 수요가 급속히 늘고 있기 때문에 신규 천연미백제에 대한 연구는 기초연구로서 뿐만 아니라 상업적인 응용연구로서도 매우 중

요하다.[23)]

따라서 본 연구에서는 천연 한방 소재인 참당귀로부터 미백효과에 뛰어난 유효성분을 초임계 유체추출기술에 의해 추출하여 효율을 향상시키고 기존 상용미백제와의 비교실험을 수행하여 미백 화장품 소재로써의 응용 가능성을 연구하고자 하였다.

II. 이 론

II-1.참당귀

참당귀는 한국, 일본, 중국 등지에서 약용을 목적으로 재배하여 왔으며, 그 산지에 따라 한국에서 생산되는 참당귀(*Angelica gigas* Nakai, 토당귀)와 일본에서 생산되는 일본당귀(*Angelica acutiloba* Kitagaw, 일당귀), 중국에서 생산되는 중국 당귀(*Angelica sinensis* Diels)로 구분하며 그 성분과 약리적 효과는 상이한 것으로 알려져 있다.[24] 참당귀는 산형과(미나리과)에 속하는 2~3년생 초본식물로서 굵고 짧으며, 주근으로부터 줄기 및 잔기가 남아 있다 (Figure 1). 주근의 길이는 3~7 cm, 지름은 2~5 cm, 가지뿌리 길이는 15~20 cm이다. 꽃피기 전의 뿌리를 건조하여 약용으로 쓰고 특이한 방향성 냄새가 있으며 주근 및 뿌리에 있는 피목(皮目)은 정유가 스며 나와 흑색으로 되어 있고 생약전체는 점성이 있으며 맛은 약간 쓰다. 또한 신농본초경(神農本草經)의 중품(中品)에 수재되어 있는 약재로서 한방에서 보혈강장, 조경지혈, 활혈정혈(活血精血) 및 어혈소산(瘀血消散)의 효능이 있어 빈혈치료와 혈액순환 장애로 인한 어혈증 및 혈전증 등에 처방되는 중요한 생약이다.[25]

참당귀의 약리작용으로는 중국당귀를 중심으로 혈액 및 조혈계통에 대한 작용, 자궁에 대한 작용, 심혈관 계통에 대한 작용, 면역계에 대한 작용, 진통작용(polyacetylene계), 소염작용, 향균작용, 간기능 보호작용, 항암작용 등이 보고되었으며, 일당귀에서는 중추억제작용이 보고되었고, 참당귀의 약리작용으로는 진통작용(polyacetylene계), 항염증작용(β-sitosterol-D-glucoside), 항acetylcholin작용(phth-alide계), 진경작용, 혈압강화작용, 해열작용, 수면 연장작용, 혈소판 응집 억제작용(adenosine, ligustilide, butylphthalide)이 보고되었다. 최근 참당귀의 주요성분으로는 coumarin계의 decursin, decursinol angelate와 nodakentin, umbelliferon, β-sitosterol 등의 성분이 함유됨이 알려져 있으며, 특히 당귀 뿌리의 주요 성분인 decursin 및 decursinol angelate 는 각각 봉화산 4.86% 및 3.46%, 영천산 4.75% 및 3.23% 수원산 2.33 및 1.49%로 두 성분의 구성 비율은 6:4 정도로 재배환경에 따라 당귀의 유효성분이 크게 달라지는 것으로 나타났다.[26-28] 따라서 참당귀의 주요 약효성분인 decursin과 decursinol angelate 의 수율을 향상시키기 위한 추출 및 정제 방법에 관한 연구도 많이 진행되었다.[29-30] Decursin 은 백혈병치료와 신장독성 경

감, 당뇨성 고혈압 치료 등에 효과가 있으며 새로운 기작의 항암제로 확인되고 있으며 decursin 에 관한 연구로는 참당귀로부터 decursin 의 분리 및 성분연구, decursin 의 생쥐에 대한 수면작용 변동 효과, 자발작용 억제효과 및 protein kinase C 의 활성 증진 작용 등이 보고되고 있으며, 당귀 및 산형과 식물 중 decursin 정량에 관한 연구, 재배지역에 따른 참당귀의 decursin 함량변이, 당귀를 이용한 추출물 제조 및 이화학적 특성 등에 관한 연구가 보고되고 있다.[31-38)]

(A)

(B)

(C)

Figure 1. (A) *Angelica gigas* Nakai, (B) *Angelica acutiloba* Kitagawa and (C) *Angelica sinensis* Diel.

II-2.초임계

II-2-1. 초임계 유체의 정의

초임계유체(supercritical fluid) 공정은 최근 들어 화학공정, 제약 산업 및 식료품 산업 등에 그 응용이 급속히 확대되고 있는 새로운 공정 가운데 하나이다.[39-40] 초임계 유체는 임계 온도(T_C)와 압력(P_C)이상에서 단일상으로 존재하는 유체를 의미한다 (Figure 2).

이러한 초임계 유체는 액체와 기체의 특성을 동시에 가지면서 독특한 특성을 지니고 있다. Figure 3에서와 같이 액체 이산화탄소를 반응 용기에 넣고 온도와 압력을 높이면 액체 이산화탄소가 끓고 점차 액체와 기체를 구분하는 경계가 희미해지면서 임계점을 넘어서면 초임계 상태가 된다. 일반적으로 용매의 물성은 분자의 종류와 분자간의 상호작용에 따라 결정되므로, 단일 용매로서는 큰 물성변화를 기대하기 어려우나 초임계 상태의 물질은 임계점 부근에서 온도와 압력을 변화시키면 많은 물리, 화학적 성질을 연속적으로 변화시킬 수 있다. 또한 초임계유체는 액체처럼 용해력이 크고 기체처럼 빠르고 침투력이 좋아 용매로 활용할 수 있다. 그리고 높은 용해력, 저점도, 고확산 계수 등과 같은 장점을 가지고 있기 때문에 추출 및 흡착, 건조, 세정, 결정화 등의 공정에서 매우 각광받고 있다. 이와 같이 임계점 이상에서 독특한 물성을 가지는 초임계 유체로는 초임계 수와 초임계 이산화탄소가 가장 광범위하게 사용 된다.[41]

II-2-2. 초임계 유체의 특성

일반적으로 초임계 유체에서 물질의 용해도는 밀도에 비례하며, 일정 온도에서 압력이 증가함에 따라 초임계 유체의 밀도가 증가하여 초임계 유체의 용해력이 증가한다. 한편, 낮은 압력에서는 온도가 증가함에 따라 초임계 밀도는 감소하고 밀도가 감소함에 따라 용해력이 감소한다. 그러나 높은 압력영역에서는 온도가 증가함에 따라 초임계 유체의 밀도는 감소하지만 온도 증가는 대상물질의 기화압 증가와 고체 매트릭스로부터 대상물질의 탈착을 용이하게 하여 용해력을 증가 시키며 이 같은 현상을 'crossover effect'라 한다.[42]

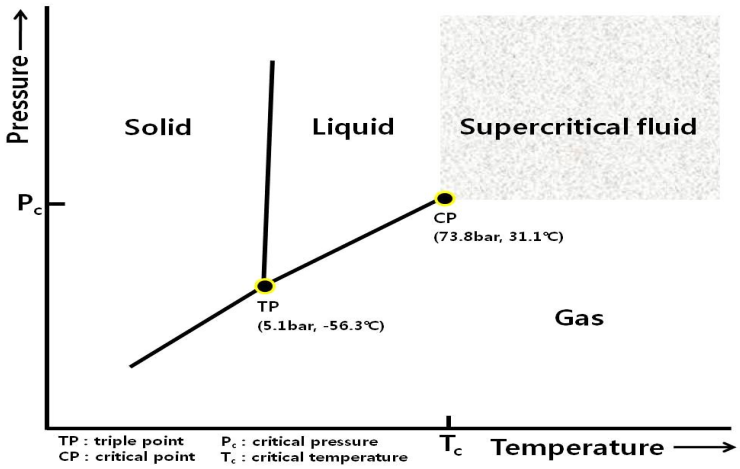

Figure 2. Pressure-temperature phase diagram of a pure substance.

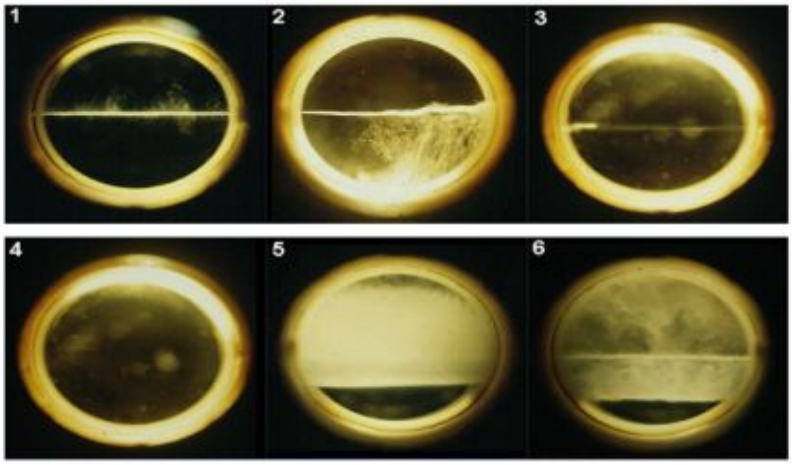

Figure 3. Transition process to supercritical carbon dioxide.

대표적인 초임계유체인 이산화탄소는 임계온도가 상온에 가깝고 임계 압력이 낮으며(T_C=31°C, P_C=73 atm), 용매염의 가능성이 없으며, 값이 싸고, 독성이 없으며, 불에 타지 않는 성질을 지녀 기존의 유기 용매를 대처할 유용한 물질로 알려져 있다. 이러한 초임계유체인 이산화탄소의 사용 시 환경 친화성 또는 에너지 절약형 공정개발이 가능하며, 특히 잔존용매가 전혀 남지 않기 때문에 천연물에서 유효성분을 추출하는 의약품, 향료, 불안정한 지질 등 열에 민감한 물질을 취급하는 공정과 특히 식품공업에 매우 유용하게 사용되고 있다.[43-44] Table 1은 초임계 유체로 사용되는 각종 물질들의 초임계 특성을 나타낸 표이다.

II-2-3. 초임계 유체 추출

초임계 유체 추출은 어떤 물질로부터 독성 잔류물질 없이 유효 성분만을 고순도로 분리, 정제하는 기술로서 전통적인 추출방법을 대체할 수 있는 환경 친화적인 추출기술로 각광받고 있다.[45] 초임계 유체 추출공정은 기본적으로 4개의 부분(solvent compressor or pump, extractor, temperature-pressure controller, separator)으로 구성되어 있으며, 추출단계와 분리단계로 이루어진다. 추출단계에서는 대상물질과 초임계 유체가 접촉하여 용해도 차이에 의해 목적성분이 초임계 유체로 추출되며, 온도나 압력 또는 기타 조작변수에 의해 분리 단계에서 목적성분과 초임계 유체는 분리된다. 추출단계는 static, dynamic, recirculating mode 의 총 3단계로 나눌 수 있다. Static mode 는 추출기에 초임계 이산화탄소를 가득 채우고, 일정 시간동안 초임계 유체와 시료가 평형을 이루게 한 후, 감압을 하며 수집되는 단계를 말한다. 마지막으로 dynamic mode 는 초임계 유체가 계속적으로 흐르면서 추출이 이루어지는 단계를 말하며, recirculating mode 는 일정 시간동안 초임계 유체가 반복적으로 시료를 통해 지나가는 단계를 말한다.[42] 한편, 분리 단계는 압력 조절법, 온도 조절법, 고정층 흡착법(fixed-bed method)의 세 가지가 있으며 사용된 초임계 유체를 추출 단계로 순환시킬 수 있다.[46]

Table 1. Critical Condition for Various Solvents

Chemical Formula	M.W.	T_b [°C]	T_c [°C]	P_c [kPa]	V_c [m^3/kg]
H_2	2.02	-252.89	-240.17	1292.81	0.03182
O_2	32.00	-182.94	-18.39	5080.93	0.00234
CH_4	16.40	-161.50	-82.50	4641.02	0.00618
CH_2=CH_2	28.05	-103.72	9.33	5117.47	0.00437
N_2O	44.02	-89.50	36.50	7225.96	0.00222
CH_3CH_3	30.07	-88.81	32.22	4894.07	0.00518
CO_2	44.01	-78.44	31.06	7377.65	0.00214
SF_6	146.05	-63.78	45.56	3761.22	0.00136
$CH_3CH_2CH_3$	44.10	-42.07	96.83	4256.97	0.00454
NH_3	17.03	-33.33	133.00	11350.00	0.00426
CH_3OH	46.07	78.40	239.45	8090.00	0.00368
C_2H_5OH	32.04	64.70	240.75	6140.00	0.00362
H_2O	18.00	100.00	374.00	22120.00	0.00311

II-3. 미 백

II-3-1. 피부의 색

지구상의 인간은 서로 다른 문화, 민족, 언어 그리고 피부색을 갖으며 성, 연령, 인종, 지역, 신체부위, 계정에 따라 피부색이 서로 다르다. 피부색은 개인의 심리적인 요인이나 건강 상태를 표시하는 하나의 지표로써도 작용하며 피부의 색은 항상 일정하지 않고 상황에 따라 변화한다. 또 피부의 색을 결정하는 데 있어 피부 고유의 색, 혈액 투시색, 피부의 색소, 피부 중의 이상색소 등이 관여하며 피부의 색을 결정하는 중요 색소로는 멜라닌을 비롯하여 혈액 내에 들어 있는 청색의 환원 헤모글로빈과 적색의 산화 헤모글로빈 그리고 음식에서 섭취하는 황색의 카로틴을 들 수 있다. 이 중 피부색을 결정하는 가장 중요한 인자는 멜라닌색소의 총량이다. 멜라닌이라는 흑색소는 피부 표피의 기저층에 위치한 멜라닌 세포에서 합성되어 점차 피부의 바깥 표면인 각질층 쪽으로 이동한다. 멜라닌 세포는 수지상의 형태를 띄며, 세포핵이나 멜라닌을 합성하는 멜라닌 세포는 표피의 기저층에 위치하며, 멜라닌세포에서 합성한 멜라닌색소는 기저층 상부로 뻗어 있는 수지상의 돌기를 통해 피부 표면으로 전달된다. 이와 같이 멜라닌 세포가 수지상의 형태를 나타내는 이유는 멜라닌색소의 이동을 쉽게 하기 위함이며 결국 광선으로부터 피부를 효과적으로 보호하기 위한 기전으로 이해된다 (Figure 4).[47]

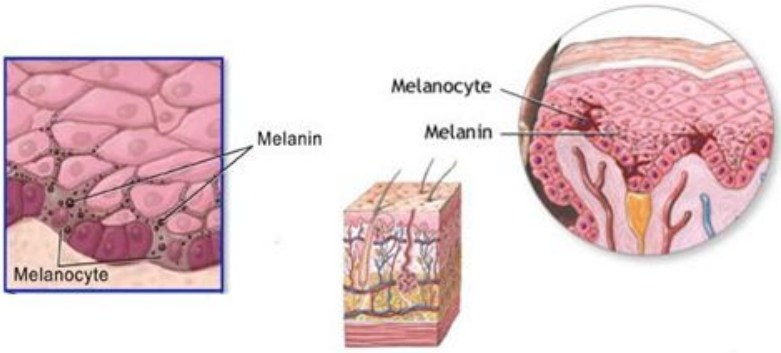

Figure 4. Melanocyte in human skin.

II-3-2. 멜라닌의 합성

멜라닌은 알칼리 용해도 및 발색 특성에 따라 유멜라닌(eumelanin)과 페오멜라닌(pheomelanin)으로 구분하거나 물리적, 화학적으로 특성이 유사한 트리코크롬(tricochrome)을 포함하여 크게 3종류로 분류하고 있다. 3가지 모두 생합생경로(biosynthesis)는 그 생성을 위해 아미노산의 일종인 tyrosine 이 필요 하다.[48]

즉, 멜라닌은 tyrosine 으로 부터 합성을 시작하고 tyrosinase 라는 효소에 의해 촉매 된다. 티로시나아제의 분자량이 66.7 KDa정도로 알려져 있으며 구리를 함유하는 효소로 색소형성에 관여하는 가장 중요한 단계 즉, 반응속도 결정단계(rate-limiting step)에 관여된 주 효소로서 첫 번째 기능은 수산화반응에 의해 페놀을 ortho-dihydroxy benzenes(DHB)으로 바꾸는 것이고 다음은 DHB를 ortho-quinones 로 산화하는 것이다. 멜라닌의 합성은 티로시나아제에 매개한 수산화반응에 의해 티로신이 도파(dopa)로 전환되는 것으로부터 개시된다. 도파는 산화에 의해 도파퀴논(dopa quinone)이 되며 이어 도파크롬(dopachrome)을 형성하기 위하여 고리화 된다. 도파크롬은 다시 5,6-dihydroxy-indole-2-carboxylic acid 와 그 유도체로 전환되며 최종적으로 멜라닌이라는 폴리머가 형성된다 (Figure 5).[49]

멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하는 중요한 기능을 갖는 반면 지나치게 많은 양의 멜라닌이 피부에 침착되는 현상 역시 과다한 색소 침착을 야기하므로 바람직하지 않다. 주요 역할은 피부에서 발생하는 활성산소나 프리라디칼을 제거하고 태양광선으로부터 들어오는 자외선으로부터 자외선을 흡수하거나 산란시켜 그 에너지가 피부내로 침투하는 것을 막아줌으로써 피부를 보호해준다.[50]

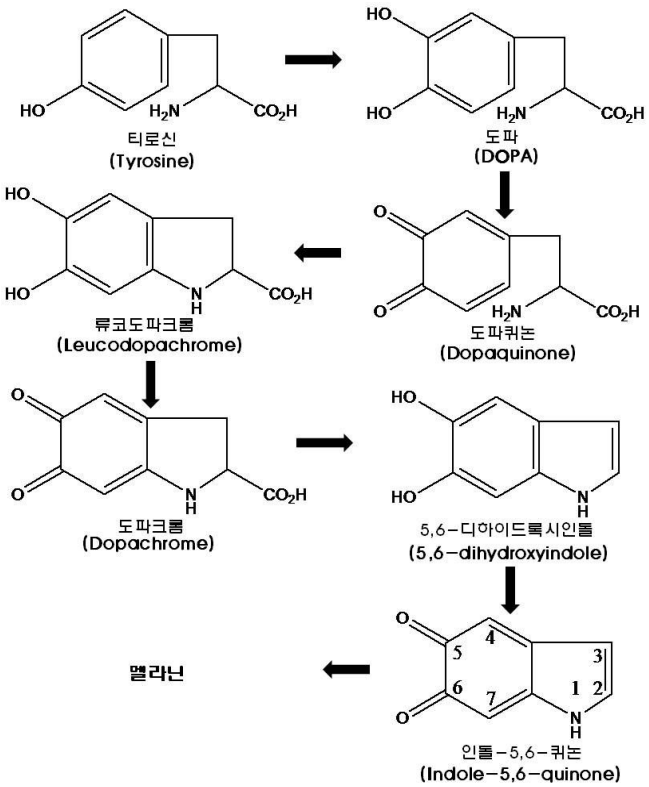

Figure 5. Pathway of melanin synthesis.

II-3-3. 미백제의 원료 동향

미백제로 함유되는 물질은 멜라닌 세포내에서 멜라닌 색소를 만드는 과정에 작용하여 멜라닌 색소의 생성을 억제하는 물질과 각질 세포를 벗겨내어 침착된 멜라닌 색소를 제거하는 물질로 나뉘게 되는데 첫 번째 물질로 대표적인 것은 arbutin, 하이드로퀴논, 비타민 C 등이 있다. 이 중 arbutin 은 현재 가장 널리 사용되고 있는 미백원료로써 물에 잘 녹고 최종제품에서 색이 없고 순도가 99% 이상으로 불순물이 적어 그 동안 거의 모든 미백제품에 광범위하게 사용되었다. 그러나 시간이 지남에 따른 제품의 변색 문제가 발생하였고 이러한 문제가 빛이나 열 또는 효소 등의 작용으로 arbutin 에서 당이 떨어져 나가면서 생성되는 하이드로퀴논에 기인한 것으로 최근 밝혀졌다.[51] 하이드로퀴논은 탈색효과가 가장 강력하여 화장품보다는 피부과 연고에 포함된다. 비타민 C가 색소 세포의 기능을 억제하여 색소생성을 억제한다는 것은 널리 알려진 사실로 여러 미백제품에 쓰이고 있으나 매우 불안정한 물질이기 때문에 단순히 피부에 바르는 것으로 피부에 흡수가 어려운 문제가 있다. 그러므로 비타민 C는 제제의 안정화를 위해 다양한 유도체가 개발되고 있다. 비타민 C 유도체류는 비타민 C의 장점을 살리고 가장 큰 단점인 안정성을 개선한 원료들로 꾸준한 인기를 갖고 있으나 모두 가격이 비싸고 일부 성분은 원료제조사의 설명과는 달리 특정 조건에서는 안정도에 문제가 있는 것으로 나타났다. 이를 대처할 미백효과가 있다고 알려진 식물추출물로는 닥나무, 상백피(뽕나무 뿌리껍질 추출물), 감초 추출물 등이 있다. 두 번째 물질로는 알파하이드록시산(alpha hydroxy acid, AHA), 베타하이드록시산(beta hydroxy acid, BHA), retinoid 등이 있다. 최근 AHA 가 가장 각광을 받고 있으나 그 함유량이 5% 이상이 되어야 피부가 약간 벗겨지는 효과가 있다. 그 외에 속수자 씨앗 추출물, 송이 추출물, 세이지 추출물, 박 추출물, 쑥 추출물 등이 미백성분으로 개발되고 있다.[52]

친환경적인 제품의 지속적인 성장을 바탕으로 R&D 분야 연구개발이 천연원료의 다기능, 고기능을 갖는 제품의 연구개발이 가속화 될 전망이다.[53] 따라서 천연 원료 개발이 활발히 진행되어 국내화장품 원료가 수입에 의존하는 실정에서 향후 기능성 원료 개발은 아주 중요하다. 효능이 우수하며 안전성과 안정성이 뛰어난 신규원료의 발굴은 기능성화장품의 발전을 위해서 반드시 필요하며 기술적, 경제적 파급효과가 있다.[54]

Table 2. Whitening Ingredients

원료명	특징/기전
닥나무 추출물 가루 (Broussontia Extract)	Broussonetia kazinoki SIEB. 및 동속식물의 추출물. 유효성분 : kazinol-F. 천연. 친수성. 타이로시네이즈 활성 억제
알부틴 (Arbutin)	Hydroquinone-beta-D-glucopyranoside 천연/합성. 친수성. 타이로시네이즈 활성 억제
유용성 감초추출물 (Glycyrrhiza Extract)	유효성분 : Gladridin 35% 이상. 천연. 친유성. 타이로시네이즈 활성 억제
에칠아스코빌에텔 (Ethyl Ascobyl Ether)	3-O-Ethylascorbic acid. 합성. 친수성. 비타민C 유도체
마그네슘 아스코빌 포스페이트 (Magnesium Ascorbyl Phosphate)	비타민C 유도체. 합성. 친수성. 타이로시네이즈 활성 억제
아스코빌글루코사이드 (Ascobyl-2-Glucoside)	비타민C 유도체. 합성. 친수성. 타이로시네이즈 활성 억제
아스코빌테트라이소팔미테이트 (Ascobyl tetraisopalmitate)	비타민C 유도체. 합성. 친유성. 항산화효과와 멜라닌형성세포 분열억제를 통한 미백효과
알파비사볼올 (Alpha-Bisabolol)	브라질산 캔데이아 나무 오일. 천연. 친유성. 멜라닌합성유전자 발현 저해
나이아신아마이드 (Niacinamide)	비타민 B3. 합성. 친수성. 멜라노솜 전달 억제

III. 재료 및 방법

III-1. 실험재료 및 기기

Tyrosinase, L-tyrosine, L-DOPA, DPPH, 시약들은 Sigma(USA)사 제품으로 사용하였다. 그 밖에 본 실험에 준하는 특급시약을 사용하였다. 실험에 사용한 기기는 초임계(SC-CO_2 extraction recycle system), evaporator(EYELA, JAPAN), 동결건조기(SFDSM 06), UV(Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer, Biochrome, USA), HPLC(10-AD SHIMADZU, JAPAN)를 사용하였다.

III-2. 시료의 추출

III-2-1. 열수 및 유기용매 추출

본 실험에 사용한 참당귀는 강원도 평창군 진부면에서 자생하는 것으로 사용하였다. 열수 추출과 유기용매 시료의 추출은 참당귀 건조 분말 200 g을 취해 10배의 증류수 및 95% 에탄올을 사용하여 각각 100 °C, 60 °C에서 4시간씩 3회 환류 추출하여 원심 분리한 상등액을 Whatman No. 1822-047 여과지로 여과하였다. 여과시료는 회전진공 농축기(Rotary evaporator N-1100S)로 농축하여 유기용매를 완전히 제거한 추출물을 얻어 동결건조 시켜 분석 시료로 사용하였다.

III-2-2. 초임계 추출

초임계 유체 추출은 초임계 유체 추출기(SC-CO_2 extraction recycle system)를 사용하여 추출온도, 추출압력이 참당귀 중 decursin 및 decursinol angelate 에 미치는 영향을 살펴보았다. 시료는 유기용매 추출시료와 동일한 참당귀 건조 분말 200 g을 취해 추출기의 원료주입조에 원료를 주입 하였다. 사용된 용매로는 서화특수상사(순도 95%이상)의 이산화탄소를 사용하였다. 추출조의 압력은 100 bar 와 300 bar로 조절하였으며, 온도는 40 °C~80 °C 범위에서 하며, CO_2의 유량은 75 ml/min으로 유지하면서 추출 하였다. 또한 이산화탄소의 감압팽창 후 추출물의 비

말 동반현상을 방지하기 위하여 2차 저장조를 두어 추출물의 손실량을 최소화 하였다. 30분 간격으로 separator 로부터 원료를 추출하고, 4회 반복하여 총 2시간 동안 추출을 한 후 종료하였다. 추출이 끝난 추출물은 동결건조 후 본 실험에 사용하였다.

III-3. HPLC를 이용한 참당귀 추출물의 분석

추출물 내에 존재하는 decursin 및 decursinol angelate 의 함량을 분석하기 위하여 표준품 decursin 및 decursinol angelate 에 대해 미리 작성한 검량선을 이용하여 계산하였다. 본 실험에서 사용된 고속액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)는 컬럼(ACE 5C 18(4.6×250 mm)), 및 검출기(SPD-20A(UV329 nm))로 구성되어 있다. 이동상은 용매 A(0.05 TFA in Water) 80%, 용매B(0.05 TFA in ACN) 20%를 사용하여, Table 3의 조건에 따라 실험하였다. 각각 참당귀 추출물을 농도 0.1 mg/ml로 제조하고 0.2 μm 여과막을 이용하여 여과한 후 20 μl를 HPLC에 주입하여 분석 하였으며, 표준시약은 식약청에서 구입하여 측정하였다.

III-4. DPPH radical 소거 효과

각 추출물에 대한 DPPH(2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma) radical 소거능은 Blois MS의 방법에 의하여 측정하였다. 즉 0.4 mM DPPH 에탄올 용액을 제조하여 여과지에 여과한 후 120 μg/ml, 240 μg/ml, 1,200 μg/ml, 2,400 μg/ml 및 4,800 μg/ml의 농도로 제조한 시료를 5초 동안 vortex mixer로 잘 혼합한 후 실온에서 30 min간 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 효능은 합성항산화제인 BHT(butylated hydroxytoluene)와 비교 실험 하였다.

DPPH Inhibition ratio(%) = 〔1 - (Exp. - Blank) / Control〕 x 100

Table 3. Experimental Condition for HPLC Analysis

Column	ACE 5C 18(4.6×250 nm)
Detector	SPD-20A(UV 329 nm)
Flow rate	1 ml/min
Solvent	A-0.05 TFA in Water(80%)
	B-0.05 TFA in ACN(20%)

III-5. Tyrosinase 활성 억제

Tyrosinase는 인체 내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도결정단계에 관여하는 효소로서 많은 미백 성분이 이 효소를 억제하는 작용기전을 가지고 있다. 이 시험은 시험관내에서 타이로시나제 효소의 활성을 저해하는 정도를 평가하는 방법이다. Tyrosinase 저해 활성 실험은 dopachrom 방법을 변형하여 실험한 후 UV/Vis spectrophotometer 로 측정하였다.[55] 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 770 ul, 각 농도별(15 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml, 75 μg/ml, 100 μg/ml)로 제조한 시험시료 70 ul, mushroom tyrosinase (1500~2000 U/ml) 70 ul, 1.5 mM L-tyrosine 140 ul를 혼합하여 37 °C에서 15 min 간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tyrosinase inhibition ratio(%) = 〔1 - (Exp. - Black) / Control〕 x 100

III-6. DOPA-oxidase 활성 억제

멜라닌의 합성과정 중 효소인 tyrosinase와 기질인 tyrosine이 반응하면 멜라닌의 전구체인 DOPA(dihydroxy phenylalanine)가 형성되는데 DOPA에서 DOPA-quinone으로 전환될 때 관여하는 효소인 tyrosinase의 DOPA 산화과정 저해를 측정하여 미백성분의 효과를 평가하는 방법이다. 0.1 mM potassium phosphte buffer (pH 7.0) 850 μl, 각 농도별(15 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml, 75 μg/ml, 100 μg/ml)로 제조한 시험시료 50 μl, mushroom tyrosinase (1500 ~ 2000 U/ml) 50 μl를 혼합하여 37 °C에서 6 min간 반응시킨 후 0.06 mM L-DOPA 50 μl를 첨가하여 37 °C에서 1 min간 반응시키고 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DOPA-oxidase inhibition ratio(%)= 〔1 - (Exp. - Blank) / Control〕 x 100

III-7. 초임계 추출물을 함유한 essence 및 cream 제조

참당귀의 초임계 추출물을 첨가한 essence 및 cream은 Figure 6과 같이 제조하였다. 최초 유상과 수상을 3,000 rpm에서 10분간 homo mixer(T.K. Homo Mixer Mark Ⅱ, Tokushu Kika Kogyo Co. Ltd. Japan)를 이용하여 1차 유화 후, 추출물을 첨가한 후 2차 유화하였다. 다음 30°C까지 냉각시켜 제조하여 본 실험에 사용하였다.

III-7-1. Essence 및 cream의 안정성 측정

- pH 측정

화장품의 산도는 pH meter(Metrohm 691, Metrohm Ltd. Herisau, Switzerland)를 이용하여 초임계 추출물을 첨가한 essence 및 cream 의 pH를 측정하였다. 측정하기 전에 유리전극은 미리 염기성 완충액이나 증류수에 수 시간 담가 두고 pH meter 는 전원에 연결한 후 10분 이상 두었다가 사용하였다. 검출부는 증류수로 잘 씻어 가볍게 닦아 낸 다음 사용하였다.

-온도에 따른 안정성 시험

온도에 따른 안정성 시험은 소정의 온도조건(0, 25, 40°C)에 보관하여 경시적 변화에 따른 상태변화를 Table 4의 조건으로 평가하였다.

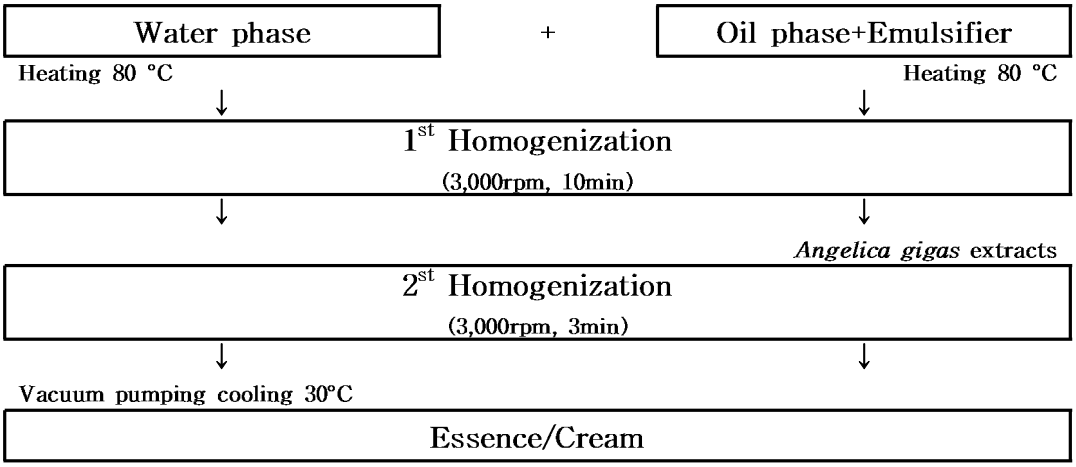

Figure 6. Manufacture process of essence and cream formular.

III-7-2. 첩포 시험

피부자극 정도를 판단하기 위해 자원자들을 대상으로 첩포시험을 실시하였다. 시험 시료는 100% glycerin(control), essence, cream 의 3종류로 하였으며 patch 위에 시료 0.5 g을 도포하였다. 첩포 시험은 20세~30세의 건강한 성인 남, 여 30명을 대상으로 하였고, 도포부위는 먼저 70% 에탄올로 소독하였고, 24시간 동안 일반 피부과용 패치(Finn Chambers on Scanpor, Finland)를 부착한 후 피부자극의 정도에 따라 육안으로 판별하여 0~4의 4등급으로 분류하였다.

Table 4. Stability of the Essence and Cream Formular in Constant in Temperature Condition (0, 25, 40°C)

Temp.	Period (day)	Check points
0 °C 25 °C 40 °C	1	Separation
	3	Precipitation
	5	Discoloration
	7	Creaming deterioration
	15	Viscosity
	30	pH

IV. 결과 및 고찰

IV-1. HPLC 통한 decursin 과 decursinol angelate의 확인

참당귀에서 추출한 decursin 및 decursinol angelate 는 이차 알콜기가 각각 3,3-dimethyl acryloyl 그룹과 angeloyl 그룹이 에스터화 되어 있으며, 이는 구조이성질체로서 물성이 거의 유사하여 HPLC 조작으로도 분리하기가 어려운 것으로 알려져 있다. Table 3의 조건으로 분석한 결과 decursin 의 피크는 11.4분, decursinol angelate 는 11.6분에 나타났으며 decursin 의 함량이 더 큰 것을 확인하였다.

IV-2. 초임계 이산화탄소를 이용한 추출 최적 조건

추출 최적 조건을 위한 실험 변수로는 온도와 압력은 40 °C, 50 °C, 60 °C, 80 °C와 100 bar, 200 bar, 300 bar 에서 실험을 하였으며 그 결과는 Figure 7에 나타내었다. 온도가 증가함에 따라 decursin 및 decursinol angelate 의 함량이 증가하지만 80°C에서 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이는 온도가 높아짐에 따라 초임계 용매의 밀도가 낮아져서 용해도에 영향을 미치는 것으로 판단 할 수 있다. 이는 Kang[20]의 초임계로부터 decursinol 을 추출한 결과와 일치하였으며, 온도보다는 이산화탄소의 밀도에 대한 의존성이 큰 것으로 판단된다. 또한 100 bar 의 조건에서 decursin 및 decursinol angelate 의 함량이 측정되지 못한 것은 낮은 CO_2의 밀도로 인한 시료의 완전 침투 불가로 판단되며 300 bar에서 추출된 함량보다 200 bar에서 추출된 성분의 함량이 더 큰 점이 발견되었다. 이는 압력이 증가함으로 인해 초임계 유체의 밀도가 높아져 용해력은 증가하지만 상대적으로 유체의 점도가 증가하게 되고 이로 인해 확산계수가 작아져서 초임계 유체의 매트릭스내로의 투과 효율이 낮아지기 때문인 것으로 판단된다. 이것으로 압력과 온도가 서로 밀접한 관계를 유지함을 알 수 있다. 따라서 전통적인 유기 용매 추출법을 대체 할 수 있는 새로운 추출법의 일종인 초임계 유체를 사용한 추출법을 적용하여 실험한 결과 Table 5에 따라 200 bar, 60°C의 조건이 가장 높은 것으로 나타나 본 실험에 사용한 시료는 이 조건에서 추출한 sample 을 사용하였다.

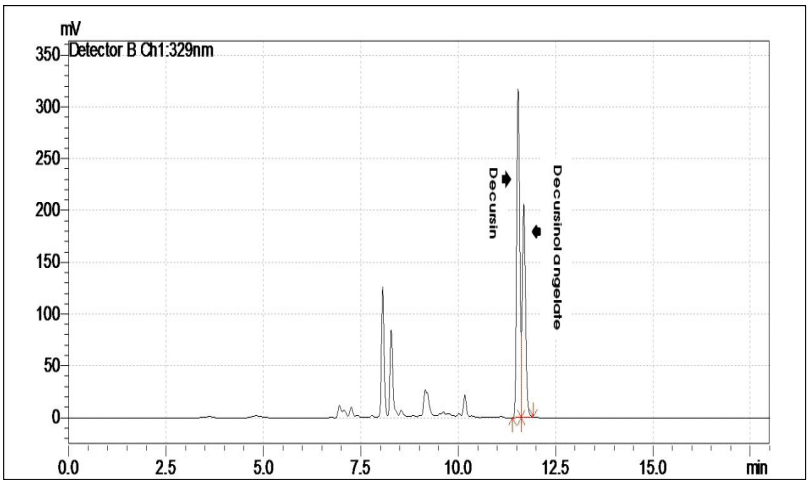

Figure 7. HPLC chromatogram of decursin and decursinol angelate.

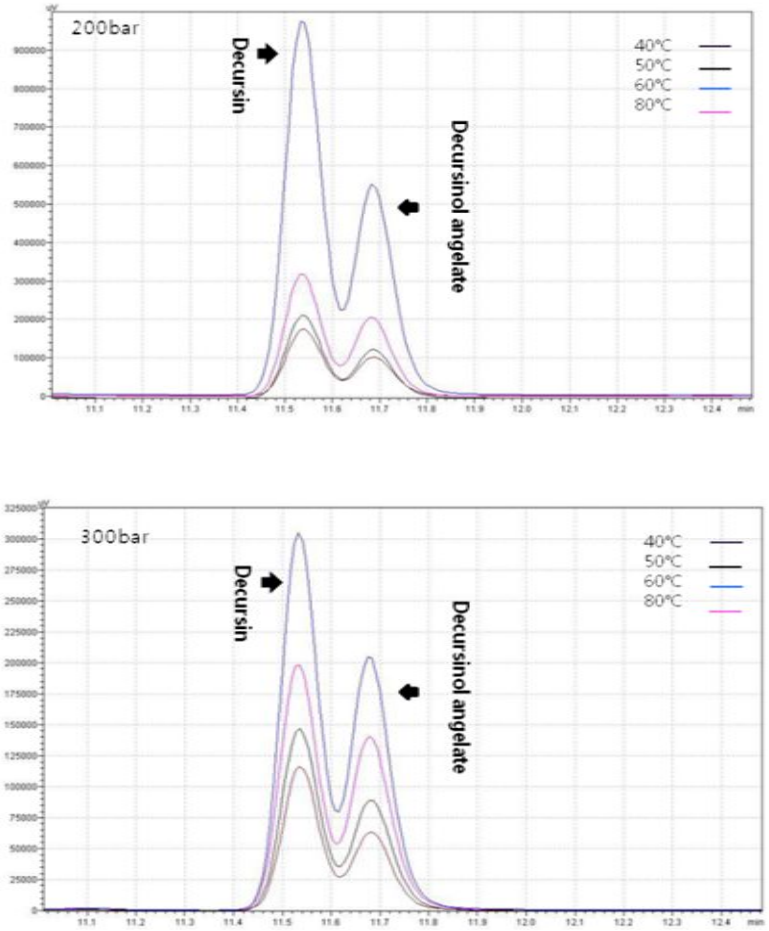

Figure 8. HPLC analysis of decursin and decursinol angelate in different pressure and temperature.

Table 5. HPLC Area of Supercritical Extraction of *Angelica gigas* Nakai

	200bar		300bar	
	decursin	decursinol angelate	decursin	decursinol angelate
40°C	1204698	733818	829224	515732
50°C	1776131	1209807	1125558	848580
60°C	5342296	3167457	1711074	1184970
80°C	976790	595579	635093	361816

IV-3. DPPH assay를 이용한 활성산소 소거 효과

멜라닌 합성과정은 일련의 산화과정이며, 이로 인해 생성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동하여 항산화제로서의 역할을 수행하게 된다. 그러므로 항산화 활성이 좋은 물질의 경우, 멜라닌 합성과정을 저해하여 미백 생리활성이 나타나게 된다. DPPH는 화학적으로 안정된 free radical 을 가지고 있는 수용성 물질로 515~520 nm 부근에서 최대 흡광도를 가지며 항산화성이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주면서 radical 이 소거되고 색깔이 보라색에서 무색으로 변한다. 유해산소라고 알려져 있는 활성산소는 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과 산화반응을 일으켜 체내에 과산화지질을 축적하여 신체 기능을 저하시키고 또한 색소 침착, 노화, 성인병 등을 유발한다고 알려져 있다.[56] 항산화 능을 실험한 결과 처리농도 120 μg/ml에서 4,800 μg/ml으로 농도가 높아질수록 decursin 및 decursinol angelate 의 활성산소를 소거하는 효과인 항산화능이 증가함을 알 수 있었다. 4,800 μg/ml 농도에서 항산화 활성은 각각 93.32%, 90.71%, 95.75%, 92.1%로서 유기용매 추출물보다 열수 추출물이 항산화활성이 높았는데, 이는 대부분 식물 추출물에서 폴리페놀 함량이 높을수록 항산화 활성이 높다는 여러 연구 결과와 일치하였다 (Table 6).[57] 반면 초임계 추출물의 항산화활성은 95.75%로 대조구로 사용된 시판 합성 항산화제인 BHT 보다 높았다. 물론 낮은 농도에서는 BHT가 훨씬 높은 수치를 보였으나 추출물의 농도를 높일수록 항산화능이 월등히 높아지는 경향이 나타났다. 참당귀의 추출물의 항산화 활성은 추출 용매의 차이에 의해 영향을 받는 것으로 나타났다.

IV-4. Tyrosinase 활성 억제 효과

자외선에 의하여 melanocyte 의 유사분열이 일어나고 이어서 melanocyte 가 활성화 된다. 활성화된 melanocyte 에서는 tyrosinase 합성이 촉진되고 melanin 의 생성이 항진되어 이를 표피 밖으로 운반 배출하게 되어 기미, 주근깨와 같은 색소 침착이 일어나게 된다. 그러므로 tyrosinase 활성 억제제는 피부 내에서의 melanin polymer 합성을 효과적으로 저해할 수 있어 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase 활성억제 실험은 유용한 평가 법으로 인정되고 있다. Tyrosinase 활성

억제 효과를 측정한 결과 처리 농도 15 μg/ml에서 100 μg/ml으로 농도가 높아질수록 decursin 및 decursinol angelate 의 tyrosinase 활성 억제 효과가 증가함을 알 수 있었다. 100 μg/ml 농도에서 tyrosinase 활성 억제 효과는 각각 6.32%, 35.73%, 58.82%, 58.7%로서 열수 추출물보다 유기용매 추출물이 억제효과가 높았는데, 이는 열수 추출물에서 tyrosinase 저해 활성이 다른 추출물보다 높은 것으로 나타난 Heo의 연구결과와 달랐다 (Table 7).[58] 이는 참당귀 추출물에 함유되어 있는 decursin 및 decursinol angelate 이라는 유효성분이 재배환경에 따라 크게 달라짐으로 인해 나타나는 결과라 사료된다. 반면 초임계 추출물의 항산화활성은 58.82%로 실험한 농도범위 내 일정농도에서 대조구로 사용된 시판 합성 미백제인 arbutin 보다 더 높은 억제 효과를 보이는 것으로 나타났다.

IV-5. DOPA-oxidase 활성 억제 효과

멜라닌 생성과정은 비교적 안정한 물질인 tyrosinase 라는 효소가 관여하여 DOPA에서 DOPA-quinone 으로 산화하게 되고 불안정한 DOPA-quinone 은 DOPA chrome 의 중간체를 거쳐 멜라닌을 생합성 하게 된다. 이에 따라 멜라닌을 합성하는데 tyrosinase는 중요한 역할을 한다. 그러므로 tyrosinase 를 저해하거나 중간체들의 산화과정을 억제함으로서 멜라닌의 생성이 감소된다.[59-60] DOPA-oxidase 활성 억제 효과를 측정한 결과 처리 농도 15 μg/ml에서 100 μg/ml으로 농도가 높아질수록 decursin 및 decursinol angelate 의 DOPA-oxidase 활성 억제 효과가 증가함을 알 수 있었다. 25 μg/ml 농도에서 활성 억제 효과는 각각 15.06%, 19.53%, 40.13%, 18.75%로서 낮은 농도에서는 초임계 추출물이 비교 실험한 arbutin 보다 더 높은 DOPA 산화 억제효과를 보여주었으나 농도가 높아짐에 따라 arbutin 에 비해 억제효과가 저조한 것으로 나타났다 (Table 8). 하지만 초임계 추출물은 농도범위 내 일정농도에서는 arbutin 보다 2배 이상 우수한 억제효과가 나타났는데 이는 tyrosinase 활성 억제 효과의 결과와 동일한 경향을 보였다. 초임계 추출물이 낮은 농도에서 활성이 크다는 것을 알 수 있었다.

Table 6. DPPH Free Radical Scavenging Activity of Extracts of *Angelica gigas* Nakai Compared to BHT

Samples	Radical scavenging activities (%)				
	120μg/ml	240μg/ml	1.200μg/ml	2.400μg/ml	4.800μg/ml
Water	27.13±12.3	38.12±1.7	66.53±3.1	90.23±4.0	93.32±2.9
Ethanol	28.10±11.8	40.91±2.3	84.36±1.7	88.23±2.6	90.71±0.8
Supercritical	40.52±10.9	65.23±0.3	92.32±0.5	95.12±4.5	95.75±1.3
BHT	91.2±0.3	91.3±0.8	92.1±0.1	91.2±0.8	92.1±0.4

Table 7. Inhibition of the *In Vitro* Melanin Synthesis by Extracts from *Angelica gigas* using Tyrosinase

Samples	Inhibition ratio(%)				
	15 μg/ml	25 μg/ml	50 μg/ml	75 μg/ml	100 μg/ml
Water	5.59±2.3	5.99±5.9	6.11±1.3	6.20±1.4	6.32±2.4
Ethanol	6.75±1.4	13.14±3.1	21.31±1.1	32.14±2.0	35.73±1.7
Supercritical	11.11±2.8	22.84±1.7	34.48±0.8	51.75±1.6	58.82±1.5
Arbutin	13.14±3.3	18.28±1.2	37.45±2.2	47.40±2.5	58.70±1.1

Table 8. Inhibition of the *In Vitro* Melanin Synthesis by Extracts from *Angelica gigas* using DOPA

Samples	Inhibition ratio(%)				
	15 μg/ml	25 μg/ml	50 μg/ml	75 μg/ml	100 μg/ml
Water	14.55±4.5	15.06±0.3	15.23±9.1	15.72±2.3	15.33±9.1
Ethanol	16.89±2.9	19.53±1.2	22.13±5.9	28.85±1.4	30.70±2.0
Supercritical	19.11±2.0	40.13±1.5	45.35±6.0	50.41±2.9	52.85±10.2
Arbutin	11.22±3.1	18.75±0.8	46.15±1.7	48.00±1.7	55.61±0.1

IV-6. 초임계 추출물을 함유한 essence 및 cream 제조

초임계 추출물을 이용하여 Figure 6의 제조 방법에 따라 Figure 9와 같이 Essence 및 Cream 을 제조하였다. 수상인 A와 유상인 B를 유화 후 초임계 추출물(C) 3%를 첨가하여 제조한 결과 30일 동안 상의 분리가 없었고, 응집과 침전 현상이 일어나지 않아 안정성을 육안으로 확인할 수 있었다.

IV-6-1. Essence 및 cream의 안정성 측정

- pH 측정 결과

화장품의 pH는 피부표면의 pH영역인 중성과 약산성에 맞추어져 있다. 그러므로 피부에는 중성 또는 약산성의 화장품을 사용하는 것이 좋다. 또한 pH의 변화가 크지 않고 안정해야 한다. 초임계 추출물을 첨가한 essence와 cream 의 pH 측정 결과, Table 9과 같이 나타났다. 1%농도에서 초임계 추출물을 첨가하지 않은 essence와 cream 의 pH는 6.7과 7.3을 나타내었으며, 초임계 추출물을 첨가한 essence와 cream 은 pH는 6.3과 6.9를 나타내어 무첨가군과 첨가군의 pH의 수치상의 변화는 크게 나타나지 않았다. 또한 60일 동안 pH 변화를 관찰한 결과 큰 변화를 나타내지 않았으며, 안정한 pH를 나타내었다.

- 온도에 따른 안정성 확인

화장품의 자발적인 경시적 열화현상과 화학적, 물리적 변화를 알아보기 위해서 온도 안정성 평가를 실시한 결과는 Table 10과 같다. 일반적 보존 시험에서 실시하는 안정성 시험법에는 온도(0°C, 25°C, 40°C)에 따른 안정성 시험법이 있다. 온도에 따른 안정성 시험법 중 고온(40°C)에서는 외관의 산패, 변색, 변취, 점도, 증발, 부유, 침전, 탁도, 분리 등을 관찰할 수 있고, 저온(0°C)에서는 응고, 침전, 탁도, 결정석출, 분리 등의 화학적, 물리적 변화를 관찰 할 수 있다. 이들 현상은 사용성에 큰 영향을 줄 뿐만 아니라, 화장품이 갖는 미적외관, 이미지 손실에도 큰 영향을 준다. 초임계 추출물을 첨가한 essence 와 cream 은 60일 동안 모든 온도 조건에서 안정성을 나타냈으며, 상의 분리와 변색, 변취 없이 안정함을 확인할 수 있었다.

(A) (B)

Figure 9. Formulation of whitening cosmetics ((A). essence, (B). cream).

(A)

No		INCI Name	Contents(%)
A	정제수	D.W	54.31
	보습제	Glycenine(99.5%)	15
		P.G(Propylene Glycol)	9.0
	킬레이트제	EDTA-2Na	0.02
	pH조정제	TEA(Triethnolamine)	0.15
	점증제	XANTHAN GUM	0.12
B	유성성분	Squalane	10
		SD Alcohol 40	8.0
	계면활성제	Nonoxynol-12	0.4
C	당귀 추출물	*Angelica gigas* extracts	3.0

(B)

No		INCI Name	Contents(%)
A	정제수	D.W	48.53
	보습제	Glycenine(99.5%)	4.0
		P.G(Propylene Glycol)	3.0
	킬레이트제	EDTA-2N	0.02
	pH조정제	TEA(Triethnolamine)	0.15
B	유성성분	Squalane	30
		Cetostearylalchol	10
	지방산	Multiwax	1.0
	계면활성제	Sorbitansesquiooleate	0.3
C	당귀 추출물	*Angelica gigas* extracts	3.0

Table 9. pH Measurement of Cosmetic Formulations

Sample	Type	Concentration(1%)	
		Before	After
Cosmetics	Essence	6.7	6.3
	Cream	7.3	6.9

Table 10. Results of Stability Test of Cosmetics in Constant Temperature Conditions (0°C, 25°C, 40°C)

Day	Essence and Cream		
	0°C	25°C	40°C
1	안정	안정	안정
3	안정	안정	안정
5	안정	안정	안정
7	안정	안정	안정
15	안정	안정	안정
30	안정	안정	안정
60	안정	안정	안정

IV-6-2. 첩포시험

첩포시험은 각종 전달 물질의 함유상태에 따라 각자의 피부에 반응하는 것이 달라질 수 있기 때문에 일반적으로 얼굴 피부와 가장 비슷한 부위인 팔꿈치 안쪽 부위나 귀의 뒷면 등에 바른 후 시간이 경과함에 따른 홍반이나 반점, 가려움 등을 보고 판단하게 된다. 초임계 추출물로 제조한 essence 와 cream 에 대한 인체 첩포 시험의 결과는 Table 11와 같이 대조군인 glycerin(100%)에서 피부자극이 전혀 나타나지 않았고, essence 를 첩포 했을 때 홍반이 없는 사람이 100%였고, cream 을 첩포 했을 때도 마찬가지로 홍반을 보이는 사람이 0%로 미세한 홍반도 보이지 않았다. 본 연구결과 초임계 추출물로 제조한 화장품은 첩포 시험에서 안전함을 보여주었다.

Table 11. Results of Patch Test

Grade	Glycerin	Essence	Cream
Minimal erythema	0%	0%	0%
Medium erythema	0%	0%	0%
Strong erythema	0%	0%	0%
Severe erythema	0%	0%	0%

V. 결론

본 연구에서는 참당귀의 생리활성 물질과 효능을 이용한 화장품 소재 개발을 위하여 초임계 이산화탄소 추출법에 의해 참당귀로부터 decrusin 과 decursinol angelate 의 추출 최적 조건을 조사하였으며, 항산화 활성 효과, tyrosinase 및 DOPA-oxidase 활성 억제 효과를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) 참당귀로부터 decrusin과 decursinol angelate 를 추출하기 위한 초임계 이산화탄소 추출법의 최적 조건은 HPLC 함량 분석 결과 200 bar, 60 °C로 나타났다.

(2) 초임계 추출물에 대한 항산화 활성 효과를 열수 추출물, 유기용매 추출물 및 상용제품과 비교한 결과, free radical scavenging 에 대한 항산화 활성은 초임계 추출물, 열수 추출물, 유기용매 추출물 및 BHT(butylated hydroxy toluene)에서 각각 95.75%, 93.32%, 90.71% 및 92.1%로 나타나 초임계 추출물이 가장 우수함을 확인하였다.

(3) Tyrosinase 활성 억제 효과는 초임계 추출물, 열수추출물, 유기용매 추출물 및 arbutin에서 각각 58.82%, 6.32%, 35.73 및 58.70%로 나타났다. 또한 DOPA-oxidase 활성 억제 효과는 초임계 추출물, 열수 추출물, 유기용매 추출물 및 arbutin에서 각각 52.85%, 15.33%, 30.70% 및 55.61%로 나타났으며, 특히 초임계 추출물은 낮은 농도에서 상용제품인 arbutin에 비해 2배 이상 높은 DOPA-oxidase 저해 활성을 보였다.

(4) 초임계 추출물을 이용한 화장품을 제조하여 안정성 실험을 수행한 결과, 60일 동안 pH는 6.3-6.9 범위로 유지되었으며, 온도 변화에 의한 상의 분리, 변색, 변취 없이 안정하였다. 또한 첩포시험 결과 피부 자극 및 홍반은 나타나지 않았다.

따라서 초임계 추출법에 의해 참당귀로부터 얻은 고농도 decrusin 과 decursinol angelate 를 함유한 추출물은 열수 추출물과 유기용매 추출물 및 상용제품인 BHT 나 arbutin 에 비하여 항산화 및 미백효과가 높게 나타나 이를 이용한 기능성 화장품 개발에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. N. S. Lee, S. H. Jeong, and B. Y. Jee, Anti-fish pathogenic efficacy of hot water extracts obtained from 5 herbs *in-vitro*, and efficacy and toxicity in flounder of the one selected herb, skullcap. *J. Fish Pathol.* 23(1): 137-143**(2010)**.
2. J. Y. Cha, H. J. Yang, J. J. Jeong, W. S. Seo, J. S. Park, M. Ok, and Y. S. Cho, Tyrosinase inhibition activity and antioxidant capacity by fermented products of some medicinal plants. *J. Life Sci.* 20(6): 940-947**(2010)**.
3. H. J. Yang, K. W. Park, H. S. Kim, S. M. Cho, and K. M. Park, Effect of anti-atopic allergic reaction in response to oriental herb extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42(1): 109-114**(2010)**.
4. S. J. Han, Antioxidant activity of colored rice and identification of new substances, oryzafuran and allantoin. *Kor. J. Crop Sci.* 50: 2-6**(2005)**.
5. H. J. Choi, Y. K. Jeong, D. O. Kang, and W. H. Joo, Inhibitory effects of four solvent fractions of *Alnus firma* on α-amylase and α-glucosidase. *J. Life Sci.* 7: 1005-1010**(2008)**.
6. J. S. Park, J. D. Park, B. C. Lee, K. J. Choi, S. W. Ra, and K. W. Jang, Effects of extracts from various parts of *Lycium chinense* Mill. on the proliferation of mouse spleen cells. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 8(4): 291-296**(2000)**.
7. H. S. Oh and J. H. Kim, Physiological functionalities of hot water extract of *codonopsis lanceolata* and some medicinal materials, and their mixtures. *Kor. J. Commumity Living Sci.* 18(3): 407-415**(2007)**.
8. K. R. Kim, Y. M. Kim, E. W. Lee, D. S. Lee, and M. S. Lee, Screening of antiviral activity from natural plants against feline calicivirus. *J. Life Sci.* 19: 928-933**(2009)**.
9. M. R. Kim, A new analytical method for volatile components and their biological activities in Korean medicinal plant, Danggui. Graduate School Chonnam National University**(2005)**.

10. S. H. Nam and M. Y. Kang, Screening of antioxidative activity of hot-water extracts from medicinal plants. *J. Kor. Soc. Agric.* 43(2): 141-147**(2000).**
11. J. B. Hwang and M. O. Yang, Comparison of chemical components of *Angelica gigas* Nakai and *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 29(6): 1113-1118**(1997).**
12. J. J. Lee, A. R. Kim, Y. N. Seo, and M. Y. Lee, Comparison of physicochemical composition of three species of genus *Angelica. Kor. J. Food Sci. Technol.* 16(1): 94-100**(2009).**
13. K. S. Ahn, W. S. Sim, H. M. Kim, S. B. Han, and L. H. Kim, Immuno stimulating polysaccharide from cell culture of *Angelica gigas* Nakai. *Biotechnology Letters* 20(1): 5-7**(1998).**
14. H. J. Chi and H. S. Kim, Studies on the components of umbelliferae plants in korea pharmacological study of decursin, decursinol and nodakenin. *Kor. J. Pharmacog.* 1(1): 25-32**(1980).**
15. H. S. Kim, J. S. Park, H. J. Park, and H, J. Chi, A study of the effects of the root components of *Angelica gigas* Nakai on voluntary activity in mice. *Kor. J. Pharmacog.* 11(1): 11-14**(1980).**
16. 식품의약품 안정청, 대한약전 9개정. 신일북스. pp. 916-917**(2008).**
17. N. S. Seong, S. W. Lee, K. S. Kim, and S. T. Lee, Environmental variation of decursin content in *Angelica gigas. Kor. J. Crop Sci.* 38(1): 60-65**(1993).**
18. K. W. Park, S. R. Choi, H. R. Hong, J. Y. Kim, M. Y. Shon, and K. I. Seo, Biological activities of methanol extract of *Angelica gigas* Nakai. *Kor. J. Food Preserv.* 14(6): 655-661**(2007).**
19. S. Y. Lee, S. R. Shin, K. S. Kim, and J. H. Kwon, Establishment of extraction conditions for effective components from *Angelica gigas* Nakai using microwave-assisted process. *Kor. J. Food Sci. Nutr.* 29(3): 442-447 **(2000).**
20. Y. S. Kang, Study on extraction of bio-active coumarin using supercritical fluid. Graduate School Sogang National University**(2002).**
21. 김은화, "천연추출물을 이용한 미백화장품 개발 동향에 관한 연구". 대한피부미용학회지. 4(2): pp. 196**(2002).**

22. Wenyuan Zhu1 and Jie Gao1, The use of botanical extracts as topical skin-l ightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. *J. Inv estigetive Dermatology Symposium Proceedings* 13: 20-24**(2008).**
23. 중소기업진흥공단, "기능성화장품의 시장 기술보고서". pp. 4-5**(2009).**
24. S. L. Lee, Phytology. Young Lim Pubishing Co., Seoul, pp. 578-580**(1994).**
25. H. Yamada, Pharmacological and clinical effects of *Angelica gigantis* Radix. Medical Publication Center. Tokyo. 13: 102-109**(1992).**
26. K. Dakaki, Whahany akmoolhak. Namsandang. Tokyo. pp. 293-297**(1982).**
27. S. Cho, M. Takahashi, S. Toita, and J. C. Cyong, Suppression of adjuvant arthritis on rat by oriental herb(I). *Shoyakagaku Zasshi* 36: 78-81**(1982).**
28. Ahn, A study on the anticancer and immu-nostimulating agents from the root of *Angelica gigas* Nakai. Ph.D. Dissertation. Dep. of Biology. Korea University**(1996).**
29. H. S. Jeong, J. G. Han, J. H. Ha, Y. Kim, S. H. Oh, S. S. Kim, M. H. Jeong. G. P. Choi, W. Y. Park, and H. Y. Lee, Enhancement of anticancer activities of *Ephedra sinica*, *Angelica gigas* by ultra high pressure extraction. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 17(2): 102-108**(2009).**
30. K. W. Park, S. R. Choi, M. E. Shon, I. Y. Jeong, K. S. Kang, S. T. Lee, K. H. Shim, and K. I. Seo, Cytotoxic effects of decursin from *Angelica gigas* Nakai in human cancer cells. *Kor. J. Food Sci. Nutr.* 36(11): 1385-1390**(2007).**
31. Y. Tropet, P. Garbuio, P. E. Ridoux, M. N. Camper, P. Vichard, La Rhizarthrose du Pouce: analyse de 27 cas traités par implants de swanson. *European J. Orthopaedic Surgery & Traumatology* 5(1): 1633-8065**(1995).**
32. S. A. Kang, J. A. Han, K. H. Jan, and R. W. Choue, DPPH racical scavenger activity and antioxidant effects of Cham-Dang-Gui (*Angelica gigas*). *Kor. J. Food Sci. Nutr.* 33(7): 1112-1118**(2004).**
33. K. S. Ryu, N. D. Hong, N. J. Kim, and Y. Y. Kong, Studies on the coumarin constituents of the root of *Angelica gigas* Nakai; Isolation of decursinol angelate and assay of decursin. *Kor. J. Phymacogn.* 21(1): 64-68 **(1990).**

34. H. J. Chi and H. S. Kim, Studies on essential oils of plants of *angelica genus* in Korea (I). Essential oils of *Angelica gigantis* Radix. *Kor. J. Pharmacogn.* 19(4): 239-247**(1988).**
35. S. U. Lee, M. H. Yoon, O. K. Choi, D. H. Yoon, and B. H. Kim, 당귀성분 중 decursin 의 HPLC 분석법 산지별 함량비교에 관한 연구. 경기도보건환경원보. pp. 5-35**(1992).**
36. W. S. Woo, K. H. Shin, and K. S. Ryu, Annual report of natural products research institute. *Seoul National Univ.* 21: 59-64**(1982).**
37. H. S. Kim, H. J. Park, and H. J. Chi, A study of effects of the root components of *Angelica roreana* Max. on voluntary actinity in mice. *Kor. J. Pharm. Sci.* 9(4): 8-12**(1979).**
38. K. S. Ahn, A study on the anticancer and imnuno stimulating agents from the root of *Angelica gigas* Nakai. Ph.D. Dissertation, Dep. of Biology, Korea University**(1996).**
39. M. A. McHugh and V. J. Krukonis, Supercritical fluid technology-theoretical and applied approached in analytical chemistry(*ACS* Symposium Series). Frank V, Bright and Mary Ellen P. Mcnally(Editor). American Chemical Society. pp. 488**(1992).**
40. G. M. Schneider, E. Stahl, and G Wilke, Extraction with supercritical gases in Germany. *J. American Oil Chemists' Society* 57(11): 834-835**(1980).**
41. L. Taylor, Supercritical fluid extraction. John Wiley and Sons. Inc. New York**(1996).**
42. Mukhopadhyay, Natural extract using supercritical carbon dioxide alk. paper. Mamata. CRC Press. Inc. FL, USA**(2000).**
43. 이윤우, "초임계유체 이용 기술(1)". News & information for chemical engineers. 19(3): 325-326**(2001).**
44. H. R. Kim, Impregnation of ibuprofen on MCM-41 using supercritical carbon dioxide. *Kor. Chem. Eng. Res.* 44: 248-253**(2006).**
45. J. D. Dean, Application of supercritical fluids in industrial analysis. Shi and John, CRC Press. Inc. FL, USA**(1993).**
46. A. R. Hwang, I. I. Jung, G. B. Lim, and J. H. Ryu, Extraction of oil from

canola seeds with supercritical carbon dioxide. *J. KSBB* 24: 367-376**(2009)**.
47. 김선미, 송인영, 양미경, 정지숙, 피부과학. 수문사. 서울**(2006)**.
48. D. S. Han, Effect of tyrosinase inhibitors on the melanogenesis of gold fish. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 28(6): 1089-1094**(1996)**.
49. Y. Mishima, S. Hatta, and Y. Ohyama, Induction of melmogenesis suppression: Cellula phamarcology end mode of differential action. *Pigment Cell Res.* 1(6): 367-374**(1988)**.
50. J. H. Park, Y. G. Shin, S. K. Baek, U. K. Lee, H. Chung, and Y. I. Park, Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs. *Kor. J. Pharm. Soc.* 41(4): 518-523**(1997)**.
51. A. Chisvert, A gas chromatography-mass spectrometic method to determine skin-whitening agemts in cosmetic products. *Talanta* 81(1): 530-536**(2010)**.
52. K. S. Kim, M. K. Shin, and H. Y. Kim, Nutritional composition and antioxidant activity of the white lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) leaf. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 18(4): 499-506**(2008)**.
53. 특허청, "2003년 천연물 화장품 신기술 동향 보고서". http://www.kipo.go.kr **(2003)**.
54. M. O. Kim, A study of skin whitening effect of oxalis trian gularis and its oil soluble active compounds. Sookmyung Women's University**(2010)**.
55. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol Methods* 65: 55-63**(1983)**.
56. *Pigment Cell Res.* 16: 101**(2003)**.
57. E. Y. Kim, I. H. Baik, J. H. Kim, S. R. Kim, and M. R. Rhu, Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 36(2): 333-338**(2004)**.
58. J. S. Heo, J. Y. Cha, H. W. Kim, H. Y. Ahn, K. E. Eom, S. J. Heo, and Y. S. Cho, Bioactive materials and biological activity in the extracts of leaf, stem mixture and root from *Angelica gigas* Nakai. *J. Life Sci.* 20(5): 750-759**(2010)**.
59. Y. Ishihara, M. Oka, M. Tsunakawa, K. Tomita, T. Hatori, H. Yamamoto,

H. Kamei, T. Miyaki, M. Konishi and T. Ok, Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor; Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *J. Antibiotics* 44(1): 25-32**(1991).**

60. K. H. Kong, S. Y. Park, M. P. Hong, and S. H. Cho, Expression and characterization of human tyrosinase from a bacterial expression system. *Comp. Biochem. Physiol.* 125(4): 563-569**(2000).**

저작물 이용 허락서

학 과	화학공학과	학 번	20097073	과 정	석 사
성 명	한 글 : 정지은 한문 : 鄭志恩 영문 : Jung Ji-Eun				
주 소	광주광역시 서구 치평동 라인대주 202동 1810호				
연락처	E-MAIL : 01054600902@hanmail.net				
논문제목	한글 : 초임계 이산화탄소를 이용한 참당귀 추출물의 항산화 및 미백효과에 대한 연구 영문 : Studies on Antioxidant and Whitening Efficacy of Extracts from *Angelica gigas* Nakai by Supercritical CO_2				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 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 편집과 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 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송・출력을 허락함.

동의여부 : 동의(●) 반대( )

2010 년 12 월 3 일

저작자: 정 지 은 (인)

조선대학교 총장 귀하