

Phellodendron amurense의 미백물질을 이용한 화장품 특성

조 영 제*

경북대학교 식품공학부, 경북대학교 식품생물산업연구소

Characteristics of Cosmetic with Whitening Compounds from *Phellodendron amurense*

Young-Je Cho*

School of Food Science & Biotechnology, Food & Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

Received January 28, 2011; Accepted May 13, 2011

The tyrosinase inhibitory activity of extracts from *Phellodendron amurense* was examined. Tyrosinase inhibitory activity of 60% ethanol extracts was determined as 25% and the inhibitory activity of 60% ethanol extracts against melanin biosynthesis in melanoma cell (B16F10) was 31.2%. The purified inhibitory compounds against tyrosinase by Sephadex LH-20, MCI-gel CHP-20 column chromatography from *P. amurense* was confirmed as obacunone by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and Fast atom bombardment (FAB)-Mass spectrum. The tyrosinase inhibitory activities of purified obacunone was respectively as 35.1%. The safety of essence with tyrosinase inhibitory compounds from *P. amurense* was also assayed by various safety profiles. First, pH and viscosity change of essence for 60 days were not detected. The essence also showed the stability against temperature and light for 60 days. All these findings suggest that extracts from *P. amurense* has a great potential as a cosmeceutical ingredient, which has a potent whitening effect.

Key words: obacunone, *Phellodendron amurense*, tyrosinase, whitening cosmetic

서 론

인간의 피부는 노화되어감에 따라 신진대사 조절호르몬의 분비가 감소하고, 면역 세포의 활성이 저하되어 피부가 얇아질 뿐만 아니라 탄력 감소에 의한 주름 생성, 멜라닌 생성에 의한 기미, 주근깨 생성 등 여러 가지 현상이 나타나게 된다[Gilchrest, 1990; Bernstein 등, 1994]. 따라서 피부 구성물질을 증가시키거나, 멜라닌 생합성을 억제하는 물질 등을 적용시킴에 따라 주름개선, 탄력복원 및 미백효과 등의 피부개선 효과를 볼 수 있는 것으로 알려져 있다[Mauviel 등, 1994; Pentland 등, 1995; Park 등, 2004]. 피부의 색조를 결정하는 주요한 인자인 melanin은 표피 기저층의 melanocyte라고 불리는 색소세포내의 melanosome에서 생합성 된다. 멜라닌 합성은 아미노산의 일종인 tyrosine이 멜라닌 세포내에서의 tyrosinase에 의해 dihydroxyphenyl-alanine (DOPA), DOPA quinone으로 산화된 후 DOPA chrome, 5,6-dihydroxyindole, indole-5,6-

quinone을 거쳐 중합에 의해 melanin을 생성하는 것으로 알려져 있다[Prota, 1980; Pavel과 Muskiet, 1983; Ko, 2000]. 또한 tyrosinase는 피부 멜라닌 생성에 있어서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase와 DOPA를 산화시켜 DOPA quinone을 만드는 DOPA oxidase로서 작용하는 중요한 효소이다[Hearing과 Jimenez, 1987].

기능성화장품의 개발에는 생리활성을 가지는 원료물질의 개발이 선결과제이며, 검토하여야할 기능성으로는 미백, 항염증, 주름개선, 항노화, 항산화 효과 등이 있고, 이러한 효과를 보유한 물질을 한약재소재 등 다양한 식물자원에서 찾으려는 연구가 시도되고 있다. 최근에 피부 흑화의 생물학적 현상에 mechanism이 상세히 규명됨에 따라 여러 자원으로부터 이러한 미백제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[Kligman, 2000; Kwak 등, 2001; Chun 등, 2002; Choi 등, 2003; Kwak 등, 2004].

황백(*Phellodendron amurense*)은 황백나무의 껍질을 말려서 약용으로 사용하는 것으로, 우리나라 전역에서 자생되고 있으며, 황백은 줄기에는 isoquiniline alkaloid, furoquiniline alkaloid, indolopyridoquinazolin alkaloid, limonoid류, flavonoid 등의 phenolic compound 등이 함유되어 있는 것으로 2006년도 biomedical compilation committee에서 보고된바 있으며, 생리

*Corresponding author
Phone: +82-53-950-7755; Fax: +82-53-950-7762
E-mail: yjcho@knu.ac.kr

작용으로는 고미진위, 정장, 위장염, 복통, 설사 등의 증상에 효과가 있는 것으로 1991년도 Medicinalphytology subcommittee에서 보고된바 있다.

따라서 본 연구에서는 피부흑화를 억제하여 미백효과를 얻을 수 있는 물질을 탐색하던 중 민간에서 한약재로 널리 사용되어 지고 있는 황백(*P. amurense*)에서 미백효과를 가지는 물질이 있음을 확인하였고, 유용성분들을 분리, 동정하였으며, 직접화장품에 적용시켜 제품의 안정성을 확인함으로써, 기능성 화장품으로의 산업화 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에 사용한 황백(*P. amurense*, 뿌리)은 영천 소재의 약업사에서 구입하여 분쇄 후 저온저장 하면서 이용하였다.

추출물의 조제. 추출물의 조제는 황백 시료 1g을 열수 및 60% 에탄올로 24시간 동안 교반 추출하였다. 각각의 추출물은 Whatman No. 1 filter paper로 여과한 후 필요에 따라 rotary vacuum evaporator (N-11, Eyela NE, Tokyo, Japan)에서 농축하여 시료로 사용하였다.

Phenol 화합물 정량. 시료 1mL에 95% ethanol 1mL와 증류수 5mL를 첨가하고 1N Folin-ciocalteu reagent 0.5mL를 넣어 잘 섞어주고, 5분간 방치한 후, Na₂CO₃ 1mL를 가한 후, 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로 양을 환산하였다[Folin과 Denis, 1912].

미백효과 (tyrosinase 활성억제력) 측정. Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[1986]에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 다음의 식에 의해 계산하였다.

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

Melanoma cell (B16F10)에서의 melanin 생합성 저해율 측정. 피부 멜라노마 세포로부터의 melanin 생합성 저해 측정은 Hosoi 등[1985]의 방법에 따라 측정하였다. DMEM 배지로 배양된 멜라노마 세포를 100 mm culture dish에 2×10⁶ cell/dish가 되게 분주하고 24시간 배양 후 시료 2 mL를 첨가하고, 48시간 후에 인산완충액(pH 7.4)으로 세척하였다. 그 다음 0.25 M trypsin-EDTA 용액으로 세포를 탈착한 후 수확한 세포를 1×10⁶ 세포 당 1 mL의 5% TCA로 처리하고, 2,500 rpm으로 2회 원심분리한 후 분리된 melanin을 인산완충액으로 세척한 뒤 ether:ethanol (1:3) 1 mL를 가하여 2회 원심분리한 후 ether 1 mL로 세척 건조시켰다. 건조된 melanin에 1 N NaOH를 1 mL 가하여 80°C에서 1시간 반응시킨 후 분광 광도계 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Melanin 생합성 저해는 시료용액의

첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{Melanin 생합성 저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}\right) \times 100$$

미백 생리활성물질의 정제. 생리활성 물질의 정제는 Sephadex LH-20 및 MCI-gel CHP 20P open column을 이용하여 정제하였다. Sephadex LH-20 column (5×95 cm)을 충전한 후 흡착성의 성질에 의해 분리하였으며, 용출용매는 normal phase type으로서 EtOH→H₂O 및 60% EtOH과 reverse phase type으로 H₂O→EtOH의 순으로 용출시켜 TLC 상에서 phenol성 물질의 유무 및 종류를 확인하였으며, 분획별로 활성 검정을 하여 미백활성 분획은 농축, 동결건조 하였다. Sephadex LH-20 column을 이용하여 분취한 미백활성 분획은 다공성 polystyren gel로서 흡착성을 이용한 MCI-gel CHP 20P column에 이용하여 정제하였으며, 용출용매는 일반적인 reverse phase type인 H₂O→EtOH로 용출하여 TLC 상에서 분리 유무를 확인하고 분획별로 활성 검정을 하였다.

정제된 화합물의 구조 동정. Melting point는 시료 1 mg을 취하여 미량용점 측정 장치를 이용하여 측정하였으며, [α]_D값은 시료 5 mg을 Me₂O 및 MeOH에 용해하여 polarimeter에 의해 측정하였다. 핵자기 공명 분광기(NMR) spectrum의 측정은 FT 방법(Pulse Fourier Transform method)을 이용하여 순수정제물 10 mg을 측정 용매 CDCl₃+DMSO-D₆+D₂O에 5~20% (w/v) 비율로 용해시키고 TMS [Tetramethylsilane:(CH₃)₄Si]를 기준 물질로 하여 PMR (300 MHz)로 측정하였다. Mass spectrum의 측정은 고체 시료 1 mg을 감압상태(10⁻⁴~10⁻⁶ mmHg)에서 negative ion Fast Atom Bombardment (FAB)-mass spectrum을 이용하여 화학적 분석법에 의해 측정하였다. 이때 측정 용매로서는 thioglycerol을 사용하였으며, 측정조건에서 emitter 전류는 22~28 eV이며, 이온원의 가속가압이 6~7 kV에서 질량분석을 하였다.

황백 추출물을 활용한 화장품의 제조. 황백 에탄올 추출물을 활용한 essence는 Table 3에서와 같이 B phase인 수상과 A phase인 유상을 나누어 80°C까지 가열하여 용해시켰다. 이때 화장품 원료는 유상에 첨가하여 녹여주며 C, D, E, F phase인 폴리머들은 mixer를 이용하여 3,000 rpm에서 폴리머가 균일하게 분산될 때 까지 완전히 풀어주고 B phase인 수상에 첨가하였다. Homo mixer (T.K. Homo Mixer Mark II, Tokushu kika kogyo Co., Ltd. Osaka, Japan)를 이용하여 3,000 rpm에서 3분간 유화 후, triethanolamine (TEA)를 넣고 다시 2분간 유화한 다음 30°C까지 냉각시킨 후 탈포하였다.

황백 추출물을 활용한 화장품의 안정성 실험. pH 측정은 Metrohm (Metrohm 691, Metrohm UK Ltd. Herisau, Switzerland)사의 pH meter를 이용하여 25±1°C에 보관한 essence를 측정하였다. 측정하기 전에 유리전극은 미리 염기성 완충액이나 증류수에 수시간 담구어 두고 pH meter는 전원에 연결하고 10분 이상 두었다가 사용하였다. 검출부는 물로 잘 씻어 가볍게 닦아 낸 다음 사용하였다.

점도측정은 Brookfield viscometer (LVDV2, Brookfield Co. Ltd)를 이용하여 스펀들(spindle) no. 4를 택하여 6 rpm에서 1분간 점도를 측정하였다.

동적 점탄성 측정(Oscillatory shear test)은 Rheometer (AR550, TA Instruments Co. Ltd., Woodland, CA)를 사용하여 측정하였다. Cone는 ϕ 60 μm 이고 기울기가 2°인 것을 이용하였으며 cone과 plate 사이의 측정거리(turcuation gap)은 60 μm 로 실험종료까지 일정하게 하였다. 온도는 $25 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며, 시료가 측정거리에 도달했을 때부터 5분간 정지 후 측정하였다. Oscillation 테스트법의 stress sweep의 응력 범위는 0.1~100 Pa까지 이고, 로그 스케일로 응력을 상승시켰으며, 측정 포인트간 interval은 두지 않았다. 농도에 따른 에센스의 특성을 동적 점탄성 측정을 통하여 검증하였으며, 실험은 3회 반복하였다. 실험 수치는 큰 차이가 없는 한 평균치를 이용하여 저장 탄성률(storage modulus, G'), 손실 탄성률(loss modulus, G''), 복소 탄성률(complex modulus, G*)과 손실각(loss angle, δ)을 계산하였으며, 동적 점탄성 측정데이터는 TA Rheometer Data Analysis Software (version 5.0, 38)에 의해 각각 계산하였다.

온도에 따른 안정성 시험법. 화장품의 온도에 따른 안정성은 0~40°C의 온도범위 조건에 보관하며, 경시적 변화에 따른 유분리, 침전, 변색 등의 상태변화를 육안으로 평가하였다.

광안정성 시험법. 인공광(Artificial sun lamp)에 의한 광안정성 시험은 투명 용기에 시료를 담아 Sun lamp (WL-610, Labtron Co. Ltd., Busan, Korea)에 넣은 후 40°C의 온도, 20.3 cm의 광원거리로 조절하여 UV조사 후 0.5~3시간 동안의 변색, 발색, 변취, 산패 등의 변화를 육안으로 관찰하였다. 자연광 노출 시험은 한여름 태양하의 조건으로 시료를 투명용기에 담아 햇빛이 비치는 실외에 보관하여 7, 15일 동안의 변색, 발색, 변취, 산패 등의 변화를 육안으로 관찰하였다.

특수가속 보존 시험. 온도순환(Cycle chamber)에 따른 안정성 시험은 시료를 투명 용기에 담아 -15~40°C의 온도 범위에서 각각 24시간 보관한 후 이를 1 cycle로 하여 10회 반복 시행하여 온도 순환에 따른 안정성을 평가하였다(Fig. 4). 냉해동순환(Freeze & Thaw cycling)에 따른 안정성 시험은 시료를 투명 용기에 담아 -10°C와 25°C에 각각 24시간 보관하여 이를 1cycle로 하여 3, 7일 동안의 안정성을 육안으로 관찰하였다.

황백을 활용한 화장품(에센스)의 소비자 품질평가. 화장품의 사용감에 대한 소비자 품질평가는 제조된 essence를 20인으로 구성된 관능검사원이 1주일간 피부에 직접 사용하여본 후 제품의 사용감, 피부자극 정도, 제품향의 느낌, 보습감, 청량감, 흡수성 및 종합적 만족도에 대하여 매우좋다(5점), 좋은 편이다(4점), 보통이다(3점), 나쁜 편이다(2점), 매우 나쁘다(1점)등의 점수를 부여하여 5단계 평점 법으로 평가하였다.

결과 및 고찰

황백추출물의 tyrosinase 억제 효과 측정. Tyrosinase는 tyrosine으로부터 DOPA와 DOPA-quinone을 거쳐 흑갈색의 melanin 색소를 생성하는 효소로써 식품의 갈변현상과 피부에 암갈색의 색소 물질을 침착 시키는 원인이다[Prota, 1980; Pavel과 Muskiet, 1983; Hearing과 Jimenez, 1987; Ko, 2000]. 본 연구에서는 황백 추출물에서 미백물질을 분리하여 기능성 화장

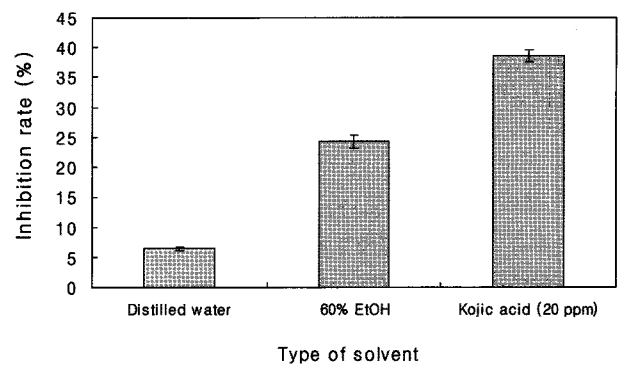


Fig. 1. Inhibitory activity against tyrosinase of extracts (142 $\mu\text{g/mL}$) from *P. amurensis*.

품 소재로서 활용키 위해 tyrosinase 억제효과를 검토한 결과 Fig. 1과 같이 물 추출물에서는 10% 이하의 낮은 tyrosinase 억제효과를 나타내었으나, 60% 에탄올 추출물(142 $\mu\text{g/mL}$)에서 25% 정도의 억제효과를 나타내어 미백물질로 알려진 순수한 kojic acid를 첨가한 대조구보다는 다소 낮았지만, 황백 추출물을 정제한다면 보다 높은 tyrosinase 억제효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단되어 에탄올 추출물을 대상으로 향후 실험을 진행하였다.

Melanoma cell (B16F10)에서의 melanin 생합성 저해율 확인. 황백 추출물을 천연 미백제로 사용하기 위하여 melanoma 세포에서의 멜라닌 생합성을 측정된 결과, 황백 에탄올 추출물은 250 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 $31.2 \pm 1.6\%$ 의 저해활성을 나타내어 멜라닌생성억제효과가 있음을 알 수 있었다. 이는 Hwang과 Choi[2006]의 건조 인삼시료 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 27.0%의 tyrosinase 저해율을 나타내었으며, Cho 등[2005]은 유기농의 멜라닌 생성 억제 효과에서 유기농 butanol 분획물의 경우 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 25.0%의 저해율을 나타내었다는 보고와 비교하여 본 시료의 멜라닌 저해 효과가 비슷함을 확인할 수 있었다.

Tyrosinase 저해 활성 물질의 분획 및 정제. Tyrosinase저해 활성 측정 결과 황백추출물에서 약 25%의 저해력을 나타내어 황백으로부터 저해활성물질을 정제하고자 용매분획 및 Sephadex LH-20 column을 이용하여 60% EtOH로 용출한 결과 Fig. 2와 같이 Fr. 1~8까지 8가지 분획물을 얻을 수 있었으며, 8가지 분획물 중 Fr. 7분획에서 tyrosinase 저해활성이 확인되어 Sephadex LH-20 column을 이용하여 EtOH을 0~100%까지 변화시키며 2차 분리를 수행한 결과 Fr. 7-1분획에서 tyrosinase 저해활성이 검출되었으나, Fr. 7-1은 TLC상에서 혼합물로 판정되어 순수물질로 분리하기 위하여, Fr. 7-1을 MCI-gel CHP-20 column을 이용하여 3차 분리하였다. 이때 용리 조건은 MeOH을 0→100%로 gradient로 용출하였다. 그 결과 Fr. 7-1-1과 Fr. 7-1-2의 단일 물질을 얻을 수 있었으며(Fig. 2), 각 정제물을 이용하여 tyrosinase저해 활성을 측정된 결과 Fr. 7-1-1 (compound A)에서 tyrosinase 저해활성을 확인할 수 있었다. 정제 결과 compound A는 황백 시료 g당 0.35 mg정도 함유된 것으로 계산되었다. 순수하게 정제된 활성물질을 동정한 결과 compound A는 미황색 무정형분말로 이었고, negative FAB-MS에서 453의

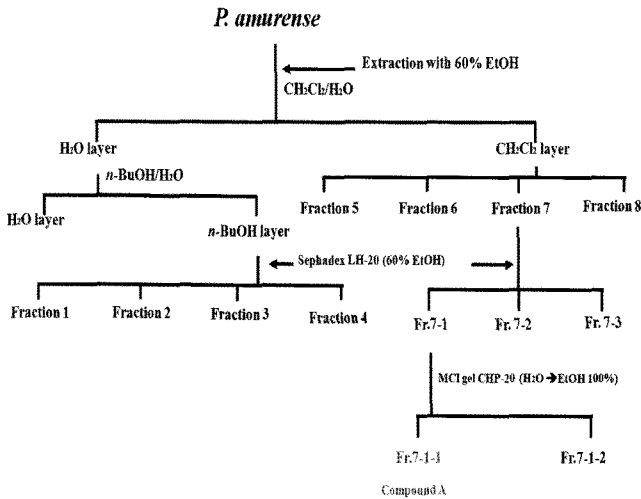


Fig. 2. Purification procedure of compound A from *P. amurense*.

분자량을 나타내었으며, ¹H-NMR spectrum은 1.14, 1.27, 1.48 및 1.53 ppm에서 singlet이 확인되어 각각 H-18, 19, 28, 29, 30의 methyl group이 확인되었고, furan ring에 해당하는 6.35, 7.38, 및 7.41 ppm의 singlet spectrum이 관찰되었으며, 6.51과 5.96에서 각 1H 분의 methine proton signal도 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 26개의 signal이 관찰되었으며, keton group에 해당하는 207.4, 166.9, 166.7 ppm 등 3개의 carbon signal과 furan ring에 해당하는 109.7, 120.0, 140.9, 143.3 ppm 등 4개의 carbon signal도 관찰되었다. 따라서 본 실험 data와 Tohru 등[1988], Hiroyuki 등[2000]의 문헌상의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum 결과와 일치하여 compound A는 obacunone으로 동정하였다.

정제물의 tyrosinase 저해활성 측정. 피부 내에서 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해할 수 있는 정제물의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과, 황백으로부터 분리한 obacunone은 20 µg/mL의 농도에서 35.1±5.2%의 저해활성을 나타내어 tyrosinase 저해활성이 Kojic acid 보다는 비교적 낮게 나타났다. Lee 등 [2001]은 제주산 식물을 이용한 tyrosinase 억제 활성을 측정한 결과 1,000 ppm의 농도에서 10.0% 미만의 효과가 나타났으며, Jung 등[1995]의 토사자, 숙지황, 오가피 추출물 1,000 ppm에서 30.0% 미만의 저해능을 나타낸 결과와 비교하여 천연자원으로서의 황백은 미백 활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

미백 기능성 화장품(에센스) 제품의 제조. 미백 기능성 에센스 제품은 Table 1의 처방에 따라 제조하였는데, 황백 추출물 0.3% 농도는 essence 제형이 유지되는 범위내의 농도이며, 0.3%에 4.3 mg정도의 활성 물질이 함유되어 있어 앞의 실험결과에서 보듯이 충분히 미백기능성을 나타낼 수 있을 것으로 판단되어 정하였다. Essence제품의 제조에는 수상으로 보습제인 glycerin, polyethylene glycol 1500과 방부제를 넣어 80°C까지 가열하여 용해시킨 후, homo mixer (T.K. Homo Mixer Mark II, Tokushu kika kogyo Co. Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 3,000 rpm에서 2분간 유회하고, 미리 분산한 lubrajel DV와 점증제인 carbopol 940을 넣고 2분간 유회하였다. Triethanolamine (TEA)를 넣고 3분간 더 유회한 후, 에탄올상인 PEG-40

Table 1. Recipe of essence with ethanol extracts from *P. amurense*

Ingredient group	Ingredient	Content (%)
A	Purified Water	37.75
	Dopotassium Glycyrrhizate	0.05
	Disodium Ethylenediaminetetraacetate	0.03
	Imidazolidinyl Urea	0.15
	Polyethylene Glycol 1500	2.00
	Betain	3.00
	Glycerin	5.00
	1,3-Butylene Glycol	2.00
B	Purified Water	10.00
	Polyglycerylmethacrylate/Propylene Glycol	2.00
C	Purified Water	15.00
	Carbomer 940	0.20
	Carbomer 941	0.06
D	Purified Water	2.00
	Hydroxyethylcellulose	0.02
E	Purified Water	1.00
	Sodium Hyaluronate	0.01
F	Purified Water	2.00
	Triethanolamine	0.26
G	Ethanol	6.00
	Methyl Paraben	0.15
	Polyoxyethylene Hydrogenated Castor Oil Fragrance	0.40 0.02
H	Aloe Vera Gel	0.30
	Fucogel 1000	0.30
I	Purified Water	10.00
	<i>P. amurense</i> 60% ethanol extracts powder	0.30

hydrogenated castor oil을 넣어 2분간 유회한 후 30°C까지 냉각하고 탈기하여 제조하였다.

미백 기능성 화장품(에센스) 제품의 소비자 품질평가. 화장품의 사용감에 대한 소비자 품질평가는 대상 인원 20명(여성)을 선발하여 제조한 미백 기능성 에센스 제품을 일주일간 사용하게 하고 각 평가항목에 대하여 5단계 평점법으로 조사한 결과, Table 2에서와 같이, 제품의 피부 자극정도는 4.8점으로 피부 자극 정도가 매우 낮은 것으로 나타났으며, 제품의 향의 느낌은 4.8점 이상의 높은 점수를 받아 기호도가 우수한 것으로 나타났다. 제품의 보습성과 바른 후의 피부 상태도 4.6점의 비교적 높은 score를 받았으며 그 중 사용 후 피부 상태와 같은 만족도에서 가장 높은 점수를 받았다. 이 결과 끈적임이 없이 가장 부드럽고, 보습감, 바름성, 바른 후의 피부상태가 가장 좋으며, 피부 자극성이 가장 낮은 제품이 개발되었으며, 종합적인 만족도는 4.8점으로 매우 우수한 평가를 받았다.

미백 화장품의 안정성. 실온에서 보관한 essence 제품을 60일간의 pH와 점도 측정 결과 Fig. 3, 4와 같이 저장 60일 동안 pH는 4.87~5.01, 점도는 25,000~25,500 cP 사이에 분포했으며, 저장기간 60일 동안 큰 변화는 없었다. 점성과 탄성을 동시에 나타내는 복소탄성률(Complex modulus, G*)은 외부에서 가해지는 면찰응력에 대한 점탄성 물질의 저항값이며, 변형에 대한 저항 부분인 G'와 흐름에 대한 저항 부분인 G''로 나누어

Table 2. Score of quality test by customer on the whitening essence

Item of sensory test	Score of quality test
Texture	4.6±0.6
Irritation	4.8±0.3
Perfume	4.8±0.3
Moisturization	4.6±0.5
Skin condition	4.8±0.8
Overall satisfaction	4.8±0.5

*This quality test by customer were tested by 20 people.

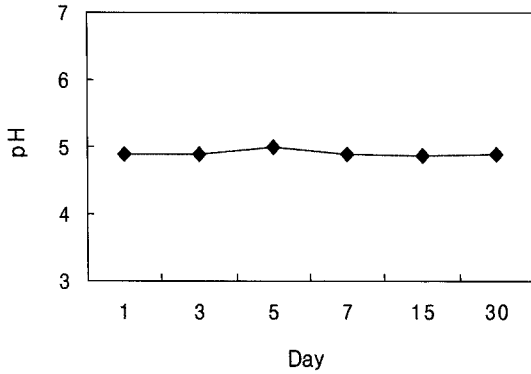


Fig. 3. pH change of essence.

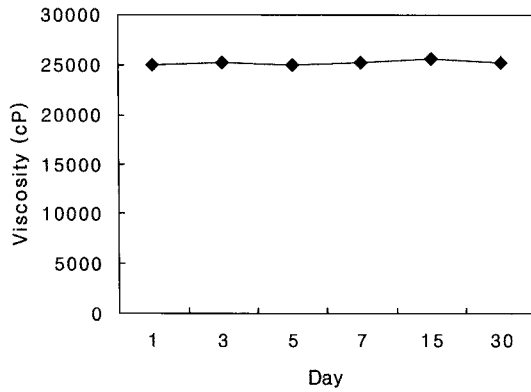


Fig. 4. Viscosity change of essence.

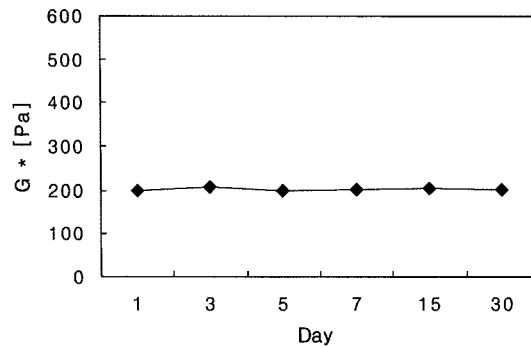


Fig. 5. Complex modulus change of essence.

지므로, 다음과 같은 식을 $|G^*| = \sqrt{G'^2 + G''^2}$ 이용해 복소탄성률을 나타낼 수 있다. essence 제품의 복소탄성률을 측정할 결과 Fig. 5와 같이, 복소탄성률이 저장기간 동안 200~215 Pa를 나타내 수치상 큰 변화가 없음을 확인 할 수 있었다.

화장품의 경우 품질의 변화가 있을 때에는 고온(40°C)에서 외관상 여러 가지 변화가 관찰되며, 저온에서는 화학적·물리적 변화가 관찰된다. 이와 같은 현상은 사용감에도 영향을 줄 뿐 아니라, 화장품이 갖는 품질열화의 원인이 되기도 하므로 품질수명을 보증하기 위한 안정성을 체크해야 한다. 화장품의 품질열화(劣化)현상과 화학적·물리적 변화를 알아보기 위해서 온도 안정성 평가를 실시한 결과, 0~40°C 범위의 온도에서 보관한 essence 제품은 60일 동안 모든 온도 조건에서 경시적 변화 없이 안정성을 나타내었다. 또한 essence제품의 인공광(artificial sun lamp) 안정성을 실시한 결과, 3시간 동안의 처리시간 동안 변색, 변취, 산패 등에 관해서는 변화없이 안정함을 나타내었으며, 햇빛아래에 보관하여 자연광 노출에 대한 안정성을 관찰한 결과, essence 제품은 15일 동안의 색조와 냄새 변화 없이 안정함을 보였다.

온도순환(Cycle chamber)에 따른 안정성 시험은 화장품의 저온 및 고온의 보관조건에 따른 물성변화를 보기 위하여 실시하며, 온도 변화에 따라 유화·가용화에 물성변화를 관찰하기 위하여 실시한다. 안전성이 떨어지는 제품은 고온에서 가수분해 현상 등이 일어나며, 저온에서는 부피팽창, 용해도차에 의한 계면막 손상, 침전 등이 일어난다. 온도순환(Cycle chamber)에 따른 안정성 시험법은 이런 현상을 짧은 기간 내에 체크할 수 있으므로, essence 제품을 -15~40°C의 범위에서 각각 24시간 보관한 후 온도 순환에 따른 안정성을 관찰한 결과, 10 cycle 모두에서 상의 분리와 변색, 변취 없이 안정함을 확인할 수 있었다. 또한 냉, 해동순환(Freeze & Thaw cycling)에 따른 안정성을 조사하기 위하여 essence 제품을 급격한 온도 조건인 고온(25°C)과 저온(-10°C)의 온도에서 각각 24시간 보관하며 3일과 7일 보관 시 안정성을 관찰한 결과, 상의 분리와 변색 및 변취는 발견되지 않아 안정함을 알 수 있었다.

초 록

황백 추출물의 tyrosinase 억제효과를 검토한 결과 60% 에탄올추출물에서 25% 정도의 억제효과를 나타내었으며, melanoma 세포(B16F10)에서의 멜라닌 생합성을 측정할 결과 31.2%의 저해활성을 나타내어 멜라닌생성억제효과가 있음을 알 수 있었다.

황백추출물에서 tyrosinase저해 활성물질들을 정제하고자 Sephadex LH-20과 MCI-gel CHP-20 open column을 이용하여 용출한 결과 순수하게 정제된 활성물질을 얻을 수 있었으며, 정제물질을 구조 동정한 결과 미백물질은 obacunone으로 동정되었다. 정제된 obacunone은 35.1%의 저해활성을 나타내어 미백활성이 비교적 우수함을 확인할 수 있었으며, 황백추출물로부터 분리한 미백물질을 이용한 미백 화장품을 제조하여 관능평가를 한 결과 우수한 평가를 받았다. 미백화장품의 안정성 검사를 위해 pH, 점도 및 복소탄성률의 변화를 측정하였으나 저장기간 60일 동안 큰 변화를 나타내지 않았다. 또한 온도변화, 인공 및 자연광에 의한 변화, 온도순환에 의한 변화 및 냉·해동순환(Freeze & Thaw cycling)에 따른 변화를 살펴본 결과 저장 60일 동안 모든 조건에서 상의 분리와 변색, 변취 등의 변화 없이 안정성을 나타내었다.

Key words: obacunone, *Phellodendron amurense*, tyrosinase, whitening cosmetic

참고문헌

- Bernstein EF, Chen YQ, Tamai K, Shepley KJ, Resnik KS, Zhang H, Tuan R, Mauviel A, and Uitto J (1994) Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J Invest Dermatol* **103**, 182-186.
- Cho YH, Lee BC, Kim JH, Kim JH, Pyo HB, Zhang YH, and Park HD (2005) Effect of *Artemisia anomala* S. Moore on antioxidant activity and melanogenesis. *Kor J Pharmacogn* **36**, 273-277.
- Choi WY, Chun HJ, Lee JH, and Baek SH (2003) Effect of methanol extract from *Cornis fructus* on melanogenesis. *Kor J Pharmacogn* **34**, 70-74.
- Chun HJ, Choi WH, Baek SH, and Woo WH (2002) Effect of Quercetin on melanogenesis in a melanocyte cells. *Kor J Pharmacogn* **33**, 245-251.
- Folin O and Denis W (1912) On phosphotungsticphosphomolybetic compounds as color reagents. *J Biol Chem* **12**, 239-249.
- Gilchrest BA (1990) Skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs* **2**, 79-82.
- Hearing VJ and Jimenez M (1987) Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int J Biochem* **19**, 1141-1146.
- Hiroyaki K, Yoshiaki T, Takuji T, Shiro H, Mikio T, Masaki M, and Keiji W (2000) Citrus limonoids abacunone and limonin inhibit azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Bio Factors* **13**, 213-218.
- Hosoi J, Abe E, Suda T, and Kuroki T (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res* **45**, 1474-1478.
- Hwang EY and Choi SY (2006) Quantitative analysis of phenolic compounds in different parts of *Panax ginseng* C. A. Meyer and its inhibitory effect on melanin biosynthesis. *Kor J Medicinal Crop Sci* **14**, 148-152.
- Jung SW, Lee NK, Kim SJ, and Han DS (1995) Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Kor J Food Sci Technol* **27**, 891-896.
- Kligman D (2000) Cosmeceuticals. *Dermatol Clin* **18**, 609-615.
- Ko JS (2000) In *Dermatology*, **73**, Soomoonsa Press, Seoul, Korea.
- Kwak JH, Kim YH, Chang HR, Choi BW, Park CW, and Han YH (2004) Inhibitory effect of gardenia fruit extracts on tyrosinase activity and melanogenesis. *Kor J Biotechnol Bioeng* **19**, 437-440.
- Kwak JH, Seo UK, and Han YH (2001) Inhibitory effect of Mugwork extracts on tyrosinase activity. *Kor J Biotechnol Bioeng* **16**, 220-223.
- Lee NH, Yang HC, Bu HJ, Jung DS, Lee SJ, and Riu KZ (2001) Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities and radical scavenging effects using plants in Cheju. *Kor J Pharmacogn* **32**, 175-180.
- Mauviel A, Halcin C, Vasiloudes P, Parks WC, Kurkinen M, and Uitto J (1994) Uncoordinate regulation of collagenase, stromelysin, and tissue inhibitor of metalloproteinases genes by prostaglandin E2: Selective enhancement of collagenase gene expression in human dermal fibroblasts in culture. *J cell Biochem* **54**, 465-472.
- Park SK, Kim SN, Lee JC, Kim HS, Kim YJ, Lee BG, and Chang IS (2004) Anti-aging effect on skin with Jaeum-Dan (JED). *Kor J Herb* **19**, 67-76.
- Pavel S and Muskiet FA (1983) Eumelanin(precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report. *Cancer Detect Prev* **6**, 311-316.
- Pentland AP, Shapiro SD, and Welgus HG (1995) Agonist-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and metalloproteinases by human macrophages is regulated by endogenous prostaglandin E2 synthesis. *J Invest Dermatol* **104**, 52-57.
- Prota G (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol* **75**, 122-127.
- Tohru S, Toshio M, Masanori K, and Akira V (1988) Limonoids and quinolone alkaloids from *Evodiarutaecarpa bentham*. *Chem Pharm Bull* **36**, 4453-4461.
- Yagi A, Kanbara T, and Morinobu N (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica* **3981**, 517-519.