

꼬시래기 유래 아가로스와의 블루베리 열매 추출물을 이용한 화장품에멀전 개발

최문희¹, 김용운¹, 김미숙², 신현재^{1*}

Development of Cosmetic Emulsion Using Blueberry Fruit Extract and Agarose from *Gracilaria verrucosa*

Moon-Hee Choi¹, Yong-Woon Kim¹, Mi-Sook Kim², and Hyun-Jae Shin^{1*}

Received: 5 October 2016 / Revised: 5 November 2016 / Accepted: 25 November 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The need for natural cosmetic ingredients has been increasing over the world nowadays. Agarose, a natural polymer from red seaweeds, has high hydrophilic character and a function of scaffold. As skin moisturizer, agarose is adequate for percutaneous absorption. While, blueberry fruits extract possesses rich procyanidins and anthocyanins which show health benefits, anti-oxidant effect, anti-aging and anti-melanogenesis. Stability, sensory preference, skin trouble of the emulsion formula are important for cosmetic product development. In this study, we manufactured an emulsion formula for skin moisturizers using the two ingredients and tested emulsion stability and skin trouble. Total phenolic contents of the blueberry fruits extract were evaluated as well as tyrosinase inhibitory and collagenase inhibitory activities. IC₅₀ values of blueberry fruits extract for anti-tyrosinase and anti-collagenase activities were 168 and 112 µg/mL, respectively using gallic acid as a control (64.8 µg/mL). The stability (pH and viscosity) of the formula containing 2% blueberry fruits extracts and 0.1% agarose was measured at five different temperatures (room temp., 25°C, 55°C, 45°C, 55°C) under the sun

light at 2 day intervals for 12 days. There has been little pH change at the different temperatures. According to the sensory evaluation, there was no significant flavor, discoloration and physical changes of the formula at 25-65°C. These results suggest that emulsion formula containing blueberry extract and agarose could be used as a candidate for lotion and essence products.

Keywords: Blueberry fruits extract, Agarose, Emulsion formula, Tyrosinase inhibition, Collagenase inhibition, Patch test

1. INTRODUCTION

최근 화장품 산업은 소비자의 요구에 맞춰 보다 전문적이고, 고도의 기술을 필요로 하는 첨단 산업으로 변화하고 있다. 이에 따라 새로운 원료개발의 요구도 증대되고 있는 추세이며, 유효성분도 피부에 자극을 주는 화학성분보다는 상대적으로 피부에 자극이 적고 안전한 천연 화장품이 각광을 받고 있다. 또한 자연에서 유래된 화장품 원료, 또는 유기농 원료를 사용하여 만들어진 그린 코스메틱 화장품이라는 이미지도 제품 개발 측면에서는 매우 중요한 부분이다. 화장품의 원료는 동서양을 막론하고 고대로부터 현재까지 식물 추출액이 가장 많이 사용되었으며, 광우병의 발병으로 인해 동물 유래의 화장품 소재들이 대부분 식물 유래의 소재로 급격히 대체되는 추세이다. 최근에는 해양으로부터 많은 생리활성 물질을 찾아내고 이를 화장품에 응용하려는 연구가 활발해

¹조선대학교 공과대학 생명화학공분자공학과

¹Department of Biochemical and Polymer Engineering, Chosun University, Gwangju 61452, Korea
Tel: +82-62-230-7518, Fax: +82-62-230-7226
e-mail: shinhj@chosun.ac.kr

²여수한영대학 뷰티코디네이션학과

²Dept. of Coordination & Make-up, Hanyeong College, Yeosu, Korea

지고 있으며, 최근 해양에서 발견된 생리활성 물질들은 7,000여 종 이상으로, 제품 개발은 주로 스파 (Spa) 또는 해양 심층수, 캐비아 등을 활용한 제품들이 주류를 이루고 있다 [1]. 해조류 유래 하이드로 콜로이드는 갈조류의 알긴산, 홍조류의 카라기난과 한천으로 구분된다. 한천의 주성분은 아가로스 및 아가로펙틴이며, 계절 및 지역에 따라 구성 비율이 달라지나 대부분 7:3의 구성비를 갖는다 [2]. 아가로스는 아가로펙틴 보다 큰 분자량을 가지며 황산기 및 pyruvic acid 등과 같은 극성 잔기가 거의 존재하지 않고, 아가로스 및 아가로펙틴의 조성 비율에 따라 한천의 물성을 크게 달라진다고 보고되었다 [3]. 아가로스는 무독성이며, hydroxyl group을 가지고 있기 때문에 친화, 크로마토그래피, 전기영동, 약물 전달, 광센서 등 다양한 분야에 적용이 가능하고 식품 및 화장품의 안정제 등에 사용이 가능하다 [4]. 또한 블루베리의 주된 성분인 안토시아닌은 강력한 항산화능을 갖고 있는 폴리페놀의 일종으로써, 피부의 모세혈관을 복구하고 색소침착 및, 주름 등 다양한 피부질환을 개선시키며 미백효과가 있음이 증명되었다 [5]. 현재 아가로스 및 블루베리를 사용하여 진행된 화장품 제형연구는 진행된 바가 없으며, 블루베리의 최근의 연구동향으로는 항산화작용, 항암작용, 피부 미백작용에 관한 연구가 진행되었다 [6]. 따라서 본 연구에서는 피부 미백효과가 있다고 알려진 블루베리 착즙액과 피부 보습력을 극대화시킬 수 있는 꼬시래기 유래 아가로스 추출물을 사용하여 피부 미백 및 보습 효과를 증대시킬 수 있는 화장용 에멀전 제형을 개발하고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 실험재료

블루베리는 담양군 소재 블루베리 향토사업단 출하공장에서 구입하였으며, 꼬시래기는 2016년 3월에 전남 완도에서 채취하여 증류수로 3회 이상 세척하여 염분을 제거하여 60°C의 건조기에서 24시간 동안 건조하고 파쇄하여 실험에 사용하였다.

2.2. 한천의 제조

한천의 제조 실험에 사용한 꼬시래기는 전남 완도에서 양식을 하는 (주)대원식품에서 염장처리 한 물품을 구입하여 사용하였다. 실험실에서 염분을 제거하고 흐르는 물에 3회 이상 씻어서 자외선에 건조시켜서 사용하였다. 꼬시래기 15 g 과 3% NaOH 500 mL에 침지시켜 30분간 상온에서 130 rpm으로 교반시키고 autoclave에서 121°C, 1.5시간 동안 가압 추출하였다. 추출액을 여과하고 여과액을 10 N H₂SO₄를 사용하여 중화시켜 상온에서 겔화시킨다. 우무를 -20°C 냉동고에 하루간 동결시킨 후 마이크로웨이브를 이용하여 해동하여 탈수시키고 탈수된 우무를 dry oven을 이용하여 60°C에서 수분을 제거하고 분쇄하였다.

2.3. 제조된 한천으로부터 아가로스 제조

하이드로겔은 삼차원 친수성 고분자의 망상구조를 가지고 있는 물질로 다량의 수분을 함유하고 있으며, 단일중합체 또는 공중합체로 형성되고 공유결합, 수소결합, 반데르발스 결합, 물리적인 응집 등 여러 가지 요인으로 인하여 매우 안정된 상태를 형성하고 있다. 하이드로겔로 응용이 가능한 천연 고분자는 성질에 따라 음이온성, 양이온성, 중성고분자로 분류가 가능하며, 대표적인 양이온 고분자로서 콜라겐 (collagen), 젤라틴 (gelatin), 피브린 (fibrin) 등이 있고 그 외 중성고분자로서 텍스트란 (dextran), 아가로스 (agarose) 등이 있다. 본 실험에서 사용한 아가로스 제조는 Kang (2011) 등의 DMSO추출법을 이용하여 제조하였다 [7]. 꼬시래기로부터 제조한 한천 10 g을 200 mL DMSO (Daejung chemicals Co., Korea)와 함께 80°C에서 3시간 교반시킨 다음 원심분리 (15,000 rpm, 30 min)하여 상층액을 아세톤에 침전시키고, 침전된 아가로스를 회전 증발 농축기를 사용하여 40°C 이하 온도에서 감압건조하고 겔로 제조 후 건조시켜 분쇄하였다 (Fig. 1).

2.4. 블루베리 열매 추출물 제조

실험에 사용한 시료는 블루베리 건물을 믹서기로 파쇄하여 1 g을 취한 뒤 0.1% 염산을 포함한 80% ethanol 50 mL을 2번

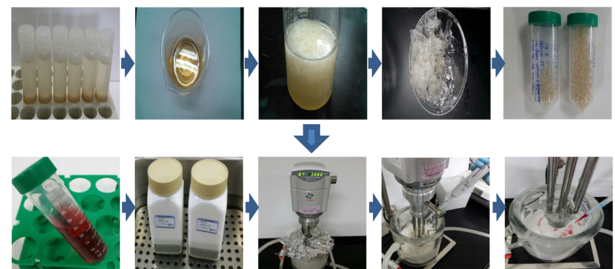
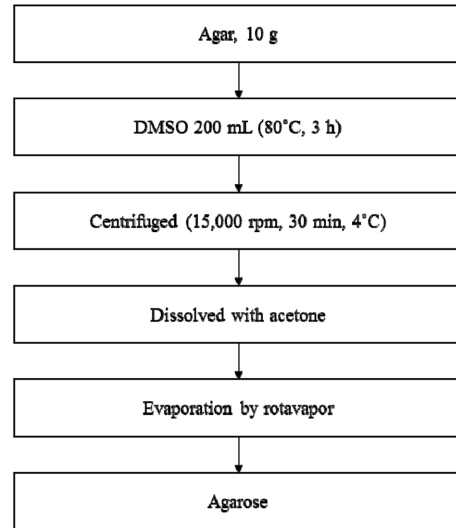


Fig. 1. Schematic diagram of cosmetic emulsion containing blueberry fruit extracts and agarose with DMSO extraction.

가하여 침지하였고, 침지된 시료에 다시 80% ethanol 50 mL 을 가하여 추출하였다. Syringe filter (0.45 μ m)를 사용하여 여과를 통하여 불순물을 제거하였고, 40°C 이하의 온도에서 감압 농축하여 ethanol을 선택적으로 증발시켰다. 증발되고 남은 물층에서 비극성화합물을 제거하기 위하여 petroleum ether 25 mL을 가하여 제거하였고 남은 물층을 농축하였다. 농축된 플라스크에 증류수와 formic acid를 사용하여 pH 2로 적정하였으며, HPLC 분석을 위해 syringe filter (0.45 μ m)로 여과한 뒤 4°C에서 보관하여 사용하였다.

2.5. 블루베리 열매 추출물의 총 폴리페놀 함량측정

본 실험은 Sluis 등 [8]의 방법을 변형하여 사용하였으며, 측정 방법은 1 M Folin-Ciocalteu phenol시약 (Sigma-Aldrich, USA)을 10배 희석하여 블루베리 열매 추출물과 2% Na₂CO₃ 수용액 (2:98, w/v)을 각각 1:1:1 비율로 교반하여 암실에서 30분 동안 반응을 시켰다. UV-spectrophotometer를 이용하여 750 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질로는 Gallic acid를 사용하여 GAE의 양으로 표시하였다.

2.6. 블루베리 열매 추출물의 Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해능은 Kwon (2015)의 방법을 변형하여 측정하였다 [9]. 실험방법은 Eppendorf tube에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) 220 μ L와 50~1000 μ g/mL 농도로 제조된 블루베리 ethanol 80% 추출액 20 μ L, L-tyrosine (Sigma, USA) 1.5 mM 40 μ L, 1500 unit 로 제조한 mushroom tyrosinase (T3824, Sigma, USA) 20 μ L 을 넣고 37°C에서 15 min 간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 tyrosinase에 의해 3, 4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로부터 형성되는 dopaquinone의 양을 490 nm에서 측정하였다. Positive control로는 gallic acid를 사용하였다. Tyrosinase의 활성 저해 정도는 2가지 시료와 증류수의 흡광도에 대한 백분율로 계산하였다.

Tyrosinase inhibition rate (%)

$$= \frac{\text{absorbance of control} - \text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

2.7. 블루베리 열매 추출물의 collagenase 저해활성 측정

블루베리의 피부 주름 억제 효과를 확인하기 위해 collagenase 저해 활성 측정을 아래와 같이 시행하였다 [10]. Collagenase 저해활성은 반응구 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazobenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-DArg (0.3 mg/mL)를 녹인 기질액 0.5 mL 및 시료 용액 0.2 mL의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/mL) 0.3 mL를 첨가하여 실온에서 20 min간 방치한 후 5% citric acid 0.5 mL을 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1 mL을 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Collagenase inhibition rate (%)

$$= \frac{\text{absorbance of control} - \text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

2.8. 꼬시래기 유래 아가로스과 블루베리 열매 추출물을 이용한 화장품의 제조

에멀전 기본 제형을 항온조에 넣고 70°C가 될 때까지 1시간 정도 가온한 후 블루베리 추출물과 아가로스 용액을 항온조에서 40°C로 가열하였다. Homogenizer (JSRC-13C, Japan)를 가동시켜 3,000 rpm까지 올리고 준비된 기본제형 1 L와 블루베리 추출물 2%, 아가로스 0.1%을 넣고 교반하여 블루베리 화장품을 제조하였다. 제조된 블루베리 화장품 제형을 vacuum oven (OV-11 Korea)을 사용하여 -0.05 mb에서 화장품 제조 시 발생한 기포를 제거하였다. 24시간 동안 실온에서 보관하면서 탈포 및 냉각과정을 진행한 후 실험에 사용하였다 (Table 1).

2.9. 꼬시래기 유래 아가로스과 블루베리 열매 추출물을 이용한 화장품의 안전성 평가

온도에 따른 안정성을 평가하기 위해 25°C, 45°C, 65°C의 온도에서 꼬시래기 유래 아가로스과 블루베리 열매 추출물을 이용한 화장품 추출물을 함유한 에멀전 제형을 인큐베이터 암실조건 (dark condition)에 보관하여 물리화학적 특성에 대한 변화를 평가하였다. 일광조사에 따른 안정성을 평가하기 위해 햇빛이 잘 드는 실험대에 방치하여 상온에서 14일 동안

Table 1. Recipe of blueberry fruit extracts-containing cosmetics

| Composition | Contents (%) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Water | to 100 |
| Butylene Glycol | 6.000 |
| Dipropylene Glycol | 5.000 |
| Hyaluronic Acid | 5.000 |
| Blueberry extracts | 2.000 |
| Glycerin | 4.000 |
| <i>Macadamia Integrifolia</i> Seed Oil | 2.000 |
| Betaine | 2.000 |
| <i>Helianthus Annuus</i> (Sunflower) Seed Oil | 1.000 |
| Olive Oil | 1.000 |
| <i>Simmondsia Chinensis</i> (Jjoba) Seed Oil | 1.000 |
| <i>Lippia Citriodora</i> Leaf Extract | 1.000 |
| Methyl Gluceth-20 | 0.500 |
| Cetearyl alcohol | 0.500 |
| <i>Butyrospermum Parkii</i> (Shea) Butter | 0.500 |
| <i>Carthamus Tinctorius</i> (Safflower) Seed Oil | 0.500 |
| Polyacrylate-13, Polyisobutene, Polysorbate 20 | 0.500 |
| Sodium Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer, Water, Isohexadecane, Polysorbate 80 | 0.400 |
| Caprylhydroxamic Acid, Caprylyl Glycol, Glycerin | 0.300 |
| Arginine | 0.300 |
| Allantoin | 0.200 |
| Rosa Canina Fruit Oil | 0.100 |
| Hydrogenated Lecithin | 0.100 |
| Tocopheryl Acetate | 0.100 |
| Agarose | 0.100 |
| Xanthan Gum | 0.100 |
| Carbomer | 0.100 |
| Phenoxyethanol | 0.100 |
| Fragrance | 0.100 |

의 물리화학적 특성 (pH, 점도, 분리, 침전형성정도)을 측정하였다. O/W에멀전의 점도측정은 Brookfield viscometer (RVDV II+, Brookfield Co., USA)를 사용하였다. O/W에멀전은 온도 25±2°C, 상대습도 60±5%에서 보관하면서 주기적으로 점도를 측정하였으며, 측정 시 조건은 spindle No. 6, 20 rpm, 2 min이었으며, 에멀전의 변취 및 변색을 육안적으로 평가하여 안정성을 평가하였다.

2.10. 블루베리 화장품 철폐시험

2.10.1. 피험자

피험자들은 광주시에 동구에 거주하고 있는 20~40대 사이의 여대학생들과 일반 사무실 근무자로, 일차로 모집된 지원자 25명 중에서 1차로 문진을 하고 본 실험에 적합하다고 판단된 20명을 대상으로 실험군을 최종 선발하였다.

2.10.2. Patch Test 평가

피험자 20명을 대상으로 patch test를 실시하였으며, 건선 (psoriasis), 습진 (eczema), 기타 피부병변 보유자나 임신, 수유부 또는 피임제, 항히스타민제 등을 복용하고 있는 사람은 시험에서 제외하였다. 블루베리 아가로즈 보습크림을 15 µL 씩 chamber에 적하시킨 뒤, 시험 부위인 상박 부위에 얹어 고정하여 철폐하고, 48시간 동안 도포하여 관찰하였다. 판정은 철폐제거 30분, 24시간, 48시간 경과 후에 국제접촉피부염연구회 (International Contact Dermatitis Research Group: ICDRG)의 판정기준에 따라 자극 정도를 분류하였다 (Table 2). 평균 피부반응도는 아래의 계산공식에 따라 산정하였으며 피부 철폐 시험결과 판정표에 따라 자극유무를 판정 하였으며, 평균 피부반응도 (Mean score) 계산공식은 아래와 같다.

Mean Score

$$= \frac{(A + B + C) \times 100}{3(\text{maximum score}) \times \text{No. of total}_{\text{jects}} \times \text{No. of evaluation}}$$

$$A = \sum_{i=1}^n \text{Score}_i \quad B = \sum_{j=1}^n \text{Score}_j \quad C = \sum_{k=1}^n \text{Score}_k$$

- i = 패치 제거 후 30분 경과 후 피험자 번호
- j = 패치 제거 후 24시간 경과 후 피험자 번호
- k = 제거 후 48시간 경과 후 피험자 번호

2.10.3. 블루베리 열매 추출물 피부 보습 평가

Apply test에서 알리지 반응이 없었던 20명을 대상으로 꼬시

Table 2. Reference basis of International Contact Dermatitis Research Group: ICDRG

| Symbol | Caveats |
|--------|------------------------------------------|
| - | Negative |
| ± | Doubtful or slight reaction and erythema |
| + | Erythema+Induration |
| ++ | Erythema+Induration+Vesicle |
| +++ | Erythema+Induration+Bullae |

<http://www.icdr.org/>

래기 유래 아가로즈와 블루베리 열매 추출물을 이용한 에멀전 형태의 보습크림 15 µL씩을 시험 부위인 얼굴 볼에 골고루 도포하고 바르기 전과 바른 후의 피부를 수분측정기 (Health and Beautiful SK-IV, China)로 촬영하였다.

2.10.4. 블루베리 열매 추출물을 첨가한 화장품의 관능평가

블루베리 열매 추출물 2% 에멀전의 사용성 검사를 위하여 20~50대 여성 20명을 대상으로 하였다. 블루베리 열매 추출물 2% 에멀전은 20일간 냉장 보관하면서 사용하도록 한 후에 향, 색상, 점성도, 발림성, 도포 후 느낌, 흡수력, 점도, 보습력의 7항목에 대하여 조사하였다. 피시험자들을 대상으로 설문 조사를 통해 진행하였으며, 5점을 만점으로 하여 진행하였다. 설문 자료는 SPSS ver. 22.0 프로그램을 사용하여 평균과 표준편차를 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 블루베리 열매 추출물의 총 폴리페놀 함량

블루베리 열매 ethanol 추출물의 폴리페놀 함량을 분석한 결과, 블루베리 ethanol 추출물 0.5 mg/mL은 gallic acid equivalent (GAE) 0.102 mg/mL에 해당되고 0.25 mg/mL은 gallic acid 0.178 mg/mL, 0.1 mg/mL은 gallic acid 0.114 mg/mL에 해당하였으며, 실험결과는 Table 3에 나타내었다. Jeong 등 [12]의 연구에서 블루베리 80% methanol 추출물의 총 페놀 함량이 tannic acid 기준으로 9.028 mg/g이라고 하였으며, Choi 등 [6]의 연구에서는 블루베리 착즙액의 0.5 mg/mL은 gallic acid 기준으로 0.098 mg/g이라 하였다. 또한 Hwang 등 [11]은 블루베리의 70% ethanol 추출물에서 총 폴리페놀 함량이 27.4 mg/g으로 나타났다. 이와 같은 결과로 보았을 때 블루베리 착즙액보다 ethanol이나, methanol 추출등 유기용매 추출법을 이용한 총 폴리페놀 함량이 더 높게 측정되는 것을 알 수 있다.

3.2. 블루베리 열매 추출물의 tyrosinase 저해활성

Tyrosinase는 멜라닌 합성에 있어서 가장 중요한 역할을 하는 효소로서 활성이 증가하면 과도한 멜라닌 형성으로 피부에 심각한 색소 침착을 유래할 수 있다. 본 실험에서 블루베리의 tyrosinase 저해결과 IC₅₀ 값은 168 µg/mL으로 측정되었으며, 양성대조군으로 사용한 gallic acid의 IC₅₀값은 84.3 µg/mL로 나타났다 (Fig. 2). 기존의 연구에서 블루베리잎의 열수추출물 실험과 ethanol 추출물을 이용한 실험결과의 tyrosinase 저

Table 3. Total polyphenol contents of blueberry fruit extracts

| Sample | Concentration (mg/ml) | Total polyphenol (GAE* mg/mL) |
|-----------|-----------------------|-------------------------------|
| Blueberry | 0.5 | 0.102±0.054 |
| | 0.25 | 0.178±0.035 |
| | 0.1 | 0.114±0.047 |
| | 0.05 | 0.097±0.052 |
| | 0.025 | 0.052±0.064 |

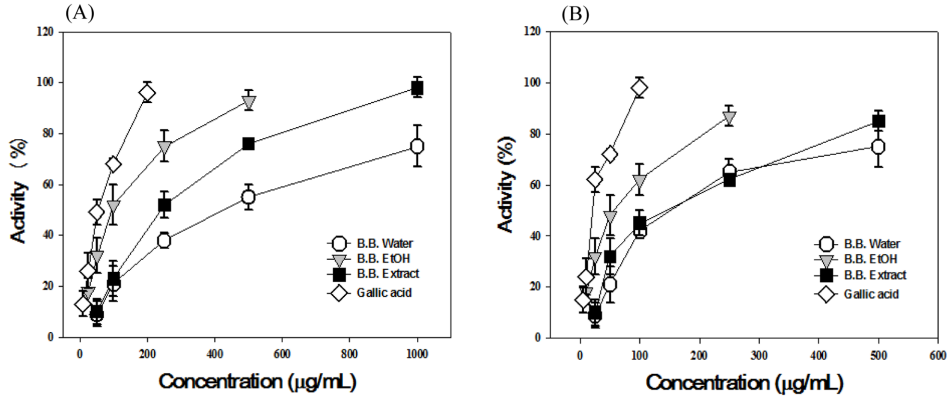


Fig. 2. (A) Tyrosinase inhibition and (B) collagenase inhibition activity of blueberry fruit extract.

해활성 농도와 비슷하다 [12]. 블루베리 열매와 잎에는 수많은 폴리페놀 화합물들이 존재하며, 식물에 존재하는 폴리페놀 성분들은 항산화 및 미백활성 및 주름개선 효과가 있음이 보고 되어있다 [13]. 일반적으로 페놀류 화합물을 다량으로 함유하는 식물체와 그 추출물은 높은 항산화능을 갖기 때문에, tyrosinase에 의한 가역적 산화반응을 억제시키는 특성을 나타낸다 [14]. 추후 세포 수준의 실험을 통해 블루베리 열매 추출물의 tyrosinase 연관 단백질과 mRNA 등의 발현량을 통해 멜라닌 생성 저해에 관한 연구가 필요하다고 판단된다.

3.3. 블루베리 열매 추출물의 collagenase 저해활성

주름개선에 관한 연구는 콜라겐을 분해하는 collagenase, 젤라틴을 분해하는 gelatinase의 작용, 탄력섬유를 분해하는 elastase의 작용을 억제하는 물질을 개발하는데 중점을 두고 있다 [15,16]. 본 실험에서 블루베리 열매 추출물의 collagenase 저해활성 실험결과와 IC₅₀ 값은 112 µg/mL로 측정되었으며, 양성대조군으로 사용한 gallic acid의 IC₅₀값은 64.8 µg/mL로 측정되어 블루베리 열매 추출물은 매우 높은 collagenase 저해 활성이 있음을 확인하였다 (Fig. 2). 기존의 연구에서 피부

노화 방지에 효과를 확인하기 위해 MSC line ST2, OB6 mature osteoblastic steocytic cell 및 MLO-Y4 cell을 이용하여 세포수준에서 블루베리 열매 추출물을 처리하였을 때 collagenase 발현양이 감소하는 것을 확인하였으며 [17], 이것은 블루베리 열매 추출물이 노화방지에 효과가 있다는 것을 의미한다. 따라서 피부 노화방지 및 주름 개선에 관한 연구 측면에서 보았을 때, 추후 피부 각질세포인 HaCAT cell 등을 이용하여 세포수준에서 주름개선 효과를 확인할 필요가 있다.

3.4. 꼬시래기 유래 아가로스 및 블루베리 열매 추출물을 이용한 화장품의 점도변화

화장품은 일사광선이나 형광등에 직, 간접적으로 노출되면 변색이 되거나 물리, 화학적으로 특성이 변하는 특성이 있으므로, 화장품 제조시 품질을 파악하기 위해서는 안정성 실험이 필요하다. 점도는 액체가 일정 방향으로 운동할 때, 그 흐름에 평행한 평면의 양측에 내부 마찰력으로서 온도 및 유체의 종류에 따라 다르며, 또한 시간 및 기포 등에 따라 점도가 달라질 수 있다 [18]. 본 연구에서는 다양한 온도 (25°C, 35°C, 45°C, 65°C)로 설정한 인큐베이터에서 보관한 시료의 점도 변

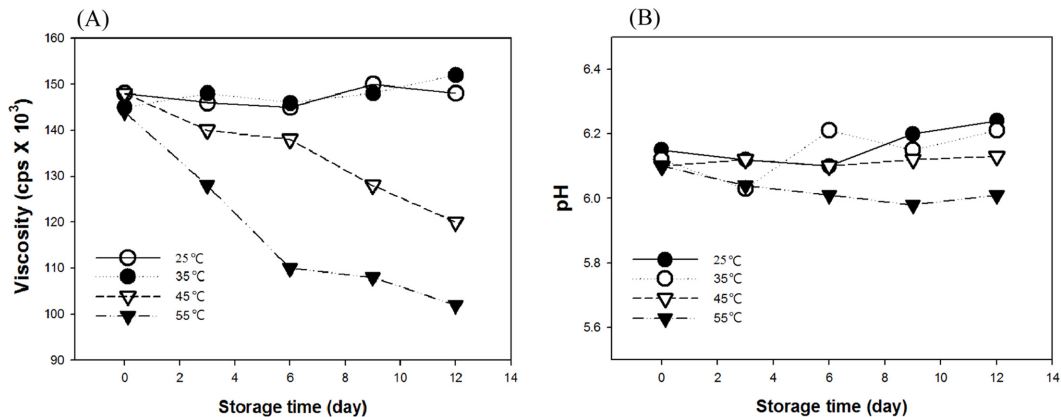


Fig. 3. Viscosity and pH changes of emulsion formula containing blueberry fruit extract and agarose with storage time.

화를 측정하였으며, 꼬시래기 유래 아가로즈와 블루베리 열매 추출물 함유 화장품의 안정성을 조사하였다 (Fig. 3). 꼬시래기 유래 아가로즈와 블루베리 열매 추출물을 이용한 화장품 초기 점도는 146,000 cPs으로 25~35°C에서 시간의 경과에 따라 점차적으로 점도가 증가하는 것을 알 수 있으며, 45~55°C에서는 3일 이후부터 점차적으로 점도가 감소하였다. 45~55°C에서 점도가 감소하는 현상은 고온으로 인해 이화학적 변성이 일어나는 것으로 판단되며, 이와 같은 결과는 Jeon 등 [19]의 연잎 화장품 제조시 65°C 고온 조건에서 점도가 감소하였던 결과와 일치한다.

3.5. 꼬시래기 유래 아가로즈와 블루베리 열매 추출물을 이용한 화장품의 pH 변화

피부의 정상적인 pH 범위는 5.5~6.5 사이로 약산성을 띠고 있으며, 피부의 pH가 알카리성이 되면 피부의 저항력 감소와 세균의 침투에 의해 여드름과 같은 피부병을 초래한다. 따라서 피부에 사용하는 화장품은 약산성이나 중성의 pH를 띠는 제품을 사용하는 것이 바람직하며, 제품 사용 중 pH가 안정하게 유지되어야 한다 [20]. 꼬시래기 유래 아가로즈와 블루베리 열매 추출물 함유 화장품을 25°C, 35°C, 45°C 및 55°C에서 인큐베이터를 사용한 암실조건과 상온의 자연광 노출 조건에서 pH의 변화를 측정하여 제품의 안정성을 검토하였다. 꼬시래기 유래 아가로즈와 블루베리 열매 추출물 함유 화장품의 초기 pH는 6.12이었고, 12일 후 25°C, 35°C, 45°C 및 55°C의 pH가 각각 6.08, 6.02 및 5.94로 매우 근소한 차이를 보였으며, pH 상에서 변화가 거의 없어 안정성은 매우 높은 것으로 판단하였다 (Fig. 3). 이와 같은 결과는 선행 연구에서 진행되었던 연잎 추출물을 함유한 화장품의 안정성 평가의 결과와 유사함을 확인하였다 [21]. 또한 기존의 연구 결과에 따르면 평균 크기 약 2 μm의 구형 입자로 합성된 pH 감응성 P (MAA-co-PEGMA) 하이드로겔은 pH 5를 전후로 급격한 팽윤비의 변화를 보이므로 pH 6.0에서는 초기부터 활성 물질의 높은 피부투과율을 보이며, 내부에 탑재된 활성물질 (알부틴)을 외부 환경으로부터 보호하여 안정성을 유지시켜주는 것으로 조사되었다 [22]. 본 실험에서는 꼬시래기 유래 아가로즈와 블루베리 열매 추출물을 이용한 화장품의 제형의 pH는 6.1~6.15 범위에서 제조하였으며, 피부 보습 실험을 통해 안전성 및 사용감을 확인하고자 하였다.

3.6. 꼬시래기 유래 아가로즈와 블루베리 열매 추출물을 이용한 화장품의 관능검사

꼬시래기 유래 아가로즈와 블루베리 열매 추출물을 이용한 화장품을 제조하여 저장 조건에 따른 안정성을 평가하기 위하여 육안으로 층분리 및 응집 여부, 이취발생 여부 등을 검토하였다. 두 제품 모두 12일 동안 관찰한 결과 크리밍, 응집과 같은 분리현상이 관찰되지 않았으며, 산화에 의한 특이취도 거의 없었다 (Table 4). 꼬시래기 유래 아가로즈와 블루베리 열매 추출물은 각각 0.1%와 2%를 사용하였으며, 저장온도에 따른 안정성을 실험한 결과 가혹 조건인 45°C 및 55°C에서는 점도가 감소하는 현상을 나타내었으나, 일반적인 상온에서는 모두 안정성을 나타내었다. 고온에서 보관할 때에는 물성의 변화가 나타날 수 있으므로, 보관시 유의할 필요가 있으며, 추후 고온에서도 제품의 정성을 향상시킬 수 있는 기술적인 보완연구가 필요하다고 생각된다.

3.7. 꼬시래기 유래 아가로즈와 블루베리 열매 추출물을 이용한 화장품의 patch test 결과

피험자 20명을 대상으로 patch test를 실시하였으며, 30분, 24시간, 48시간 경과 후 피부 상태의 변화를 국제접촉피부염연구회 (International Contact Dermatitis Research Group: ICDRG)의 판정기준에 따라 자극 정도를 분류하였다 (Table 5). 제조한 화장품을 상박의 안쪽 부위와 안면에 각각 1 mL씩 피부 첩포 실험을 시행하였으며, 총 20명의 피험자 모두 알러지 반응은 나타나지 않았다 (data not shown).

4. CONCLUSION

아가로즈는 음이온을 띠는 고분자 하이드로겔로써, 공유결

Table 5. Results of patch test about blueberry fruits extracts-containing cosmetics

| Sample | Storage time (h) | | | |
|------------------------|------------------|-----|----|----|
| | 0 | 0.5 | 24 | 48 |
| Control | - | - | - | - |
| *Blueberry. F. E. C. C | - | - | - | - |

*Means of Blueberry. F. E. C. C: Blueberry fruits extracts containing cosmetics.

Table 4. Score of usefulness by questionnaire about blueberry fruits extracts-containing cosmetics

| Questionnaire | Very good | Good | Useable | Bad | Very bad | M ± SD |
|---------------|-----------|---------|---------|-------|----------|-------------|
| Spreading | 15 (75) | 5 (25) | - | - | - | 4.75 ± 0.67 |
| Absorption | 14 (70) | 4 (20) | 2 (10) | - | - | 4.60 ± 0.49 |
| Moisturize | 13 (65) | 7 (35) | - | - | - | 4.65 ± 0.35 |
| Feel | 7 (35) | 12 (60) | 1 (5) | - | - | 4.30 ± 0.51 |
| Viscosity | 8 (40) | 10 (50) | 2 (10) | - | - | 4.30 ± 0.44 |
| Scent | 1 (5) | 7 (35) | 11 (55) | 1 (5) | - | 3.40 ± 0.82 |
| Color | - | 8 (40) | 12 (60) | - | - | 3.40 ± 0.48 |

N: Number of person, M±SD: mean±standard deviation.

‘Very bad’: 1, ‘bad’: 2, ‘Use-able’: 3, ‘good’: 4, ‘Very good’: 5.

합, 수소결합 또는 물리적 결합 등에 의해 가교된 친수성 고분자로서 수용액에서 다량의 물을 내부에 함유하여 팽윤할 수 있는 3차원 네트워크 구조를 갖는 물질이다. 아가로스는 주변의 pH 변화에 따라 네트워크의 구조적 변화를 일으켜 선별적으로 탑재된 물질의 방출을 조절할 수 있다. 본 연구에서는 블루베리 열매 추출물의 유효성분을 꼬시래기 유래 아가로스에 포집시키는 형태의 에멀전 제형을 개발하고, 외부환경에 불안정한 활성 물질을 화장품 제형 내에서는 안정하게 보존하며, 피부에 도포 시 빠른 방출로 피부에 흡수될 수 있는 제형을 개발하고자 하였다. 블루베리 열매 추출물의 효능, 효과 검증에서 tyrosinase와 collagenase의 IC₅₀ 값은 100 µg/mL 이하로 나타났다. 블루베리 열매에서 추출한 유효성분과 꼬시래기 유래 아가로를 이용한 화장품 제조와 실험에 있어서 피부에 대한 부작용은 발생되지 않았다. 꼬시래기 유래 아가로스와 블루베리 열매 추출물을 이용한 화장품 제형의 안정성 실험에서 점도 및 pH 측정 실험결과 일상적인 상온에서 제형의 안정성을 확인할 수 있었으며, 피부 첩포시험 및 수분측정에서는 전체적으로 20~40대 여성 모두 건조한 피부의 상태가 호전됨을 알 수 있었다. 결론적으로 꼬시래기 유래 아가로스와 블루베리 열매 추출물을 이용한 화장품은 피부의 수분 흡수를 도울 뿐만 아니라 증발을 방지하는 효과가 있음을 확인하였으며, 추후 리포솜과 같은 전달체 개발을 통해 피부 침투율을 극대화시키는 연구가 필요하다고 판단된다.

REFERENCES

- Lee, Y. S., D. S. Kim, B. H. Ryu, and S. H. Lee (1992) Antitumor and immunomodulating effects of seaweeds toward sarcoma-180 cell. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 21: 544-550.
- Fischer, F. G. and H. Dorfel (1955) The polyuronic acids in brown algae. Part I. *Z. Physiol. Chem.* 302: 186-203.
- Sakai, S., I. Hashimoto, and K. Kawakami (2008) Production of cell-enclosing hollow-core agarose microcapsules via jetting in water-immiscible liquid paraffin and formation of embryoid body-like spherical tissues from mouse ES cells enclosed within these microcapsules. *Biotechnol. Bioeng.* 99: 234-243.
- Kim, H. J., Y. N. Cho, S. W. Cho, Y. G. Kim, H. W. Ryu, and J. H. Jeong (2016) Tuning the hydrophobicity of agar hydrogel with substituent effect. *Abbr. Polym. Korea.* 40: 321-327.
- Sayed, A. A. R (2009) Proanthocyanidin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Phytother. Res.* 23: 1738-1741.
- Choi, M. H. and H. J. Shin (2015) Anti-oxidative and anti-melanogenesis effects of blueberry extract. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 13: 261-266.
- Kang, T. H., S. H. Lee, J. S. Baik, B. S. Kang, J. S. Lee, N. H. Lee, and Y. J. Jeon (2011) Preparation of commercial agarose from Jeju seaweed, *Gelidium amansii* using DMSO extraction and EDTA washing. *J. Kor. Fish Soc.* 44: 635-643.
- Van der Sluis, A. A., M. Dekker, A. de Jager, and W. M. F. Jongen (2001) Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3606-3613.
- Kwon, H. J., J. K. Min, and H. J. Jeon (2015) Evaluations of anti-melanogenesis activity and the moisturizing effect of *Gynura Procumbens*. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 13: 637-644.
- Wünsch, E. and H. G. Heindrich (1963) Zur quantitativen bestimmung der collagenase. *Physiol Chem.* 333: 149-151.
- Hwang, S. J., W. B. Yoon, O. H. Lee, S. J. Cha, and J. D. Kim (2014) Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food Chem.* 146: 71-77.
- Jeong, H. R., Y. N. Jo, J. H. Jeong, H. J. Kim, and H. J. Heo (2012) Nutritional composition and in vitro antioxidant activities of blueberry (*Vaccinium ashei*) leaf. *Korean J. Food Preserv.* 19: 604-610.
- Kim, M. K. and I. C. Lee (2014) Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of extracts from blueberry (*Vaccinium ashei*) leaf. *J. Kor. Soc. B&A.* 15: 109-120.
- Veberic, R., S. Slatnar, J. Bizjak, F. Stampar, and P. M. Mikulic (2015) Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT-Food Sci. Technol.* 60: 509-517.
- Kim, Y. J. and H. Uyama (2005) Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol. Life Sci.* 62: 1707-1723.
- Kanayama, H., N. Adachi, and M. Togami (1983) A new antitumor polysaccharide from the mycelia of *Poria cocos* Wolf. *Chem. Pharm. Bull.* 31: 1115-1118.
- Mauviel, A., C. Halcin, P. Vasiloudes, W. C. Parks (1994) Uncoordinated regulation of collagenase, stromelysin, and tissue inhibitor of metalloproteinase genes by prostaglandin E2: Selective enhancement of collagenase gene expression in human dermal fibroblasts in culture. *J. Cell. Biochem.* 54: 465-472.
- Thring, T. S. A., P. Hili, and D. P. Naughton (2009) Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complem. Altern. M.* 9: 27.
- Bury, M., J. Gerhards, W. Erni, and A. Stamm (1995) Application of a new method based on conductivity measurements to determine the creaming stability of o/w emulsions. *Int. J. Pharm.* 124: 183-194.
- Park, S. N., S. M. Jeon, and J. Y. Ahn (2007) A study on the stability test for the cream containing *Suaeda asparagoides* extract. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* 33: 231-238.
- Wilkinson, J. B. and R. J. Moore (1982) *Harry's Cosmeticology*. 7nd ed., pp. 749. Chemical Publishing Company, NY, USA.
- Choi, S. J., S. Y. Kim, Y. J. Jeong, C. S. Ku, B. J. Ha, and H. J. Chae (2011) Stability evaluation of the cosmetics containing louts leaf extract. *KSBB J.* 26: 83-86.
- Chung, J. Y. and H. S. Han (2014) The recent trend of percutaneous absorption used in cosmetics. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 12: 597-605.