

## 초임계 복령피 추출물의 생리활성 및 경피투과 펩티드를 이용한 경피 약물전달의 응용

김민기\* · 박수인 · 안규민 · 허수현 · 신문삼†

을지대학교 대학원 시니어헬스케어학과 화장품약리학 전공  
(2019년 8월 16일 접수: 2019년 9월 16일 수정: 2019년 9월 17일 채택)

### Physiological Activity of Supercritical *Poria cocos* back Extract and Its Skin Delivery Application using Epidermal Penetrating Peptide

Min Gi Kim · Su In Park · Gyu Min An · Soo Hyeon Heo · Moon Sam Shin†

Department of Senior Healthcare, majored in Cosmetic Pharmacology, Eulji University,  
Seongnam, Gyeonggi 13135, Korea  
(Received August 16, 2019; Revised September 16, 2019; Accepted September 17, 2019)

**요약** : 본 연구에서는 초임계 공정에 의해 복령피를 추출하였고, 에탄올 복령피 추출물과 비교하여 항염, 미백, 항산화효과를 측정하였다. 또한 선정된 추출물의 제형과 약물전달 펩티드를 활용하여 효율적인 경피투과 방법을 제시하였다. 복령피의 항염, 항염성분으로 알려진 Pachymic acid를 지표성분으로 HPLC 분석 결과 에탄올 복령피 추출물 보다 초임계 복령피 추출물이 2배 이상 높게 추출되는 것으로 나타났다. 복령피의 항산화효과를 확인하기 위하여 DPPH 소거능과 ABTS 소거능은 복령피 에탄올 추출물이 초임계 복령피 추출물보다 더 낮은 농도에서  $IC_{50}$ 을 나타내었다. 하지만 RAW 264.7 세포 내 NO(Nitric oxide) 생성량을 측정한 결과에서는, 에탄올 복령피 추출물보다 초임계 복령피 추출물이 동일 농도에서 더 낮은 NO 생성량을 나타냈다. 또한 B16 melanoma 세포에 복령피 추출물을 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도를 72시간 처리 후 세포 내외 멜라닌 합성을 확인한 결과에서는, 에탄올 복령피 추출물과 초임계 복령피 추출물 모두 효과가 있었으며 초임계 추출물이 더 낮은 멜라닌 함량을 보였다. NO 생성량 실험에서 활용된 RAW 264.7 세포에서는 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서도 독성이 나타나지 않았다. 하지만 B16 melanoma 세포에서는 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 에탄올 추출물과 초임계 추출물 모두 60 % 미만의 생존율을 나타냈다. 초임계 복령피 추출물을 대상으로 리포솜 제형과 약물전달 펩티드를 활용하여 Franz diffusion cell 실험 결과에서는, 리포솜 제형과 약물 전달 펩티드가 초임계 복령피 추출물을 경피 투과를 증진시켜 주는 것으로 나타났다. 초임계 복령피 추출물이 다양한 효능의 화장품 소재로서 개발될 가능성이 있다고 판단된다.

**주제어** : 복령피, 초임계 추출, 항염, 미백, 항산화

†Corresponding author  
(E-mail: msshin@eulji.ac.kr)

**Abstract :** In this study, *Poria cocos* bark were extracted by supercritical process, and anti-inflammatory, whitening, and antioxidant effects were measured in comparison with ethanol extract. Also, An effective percutaneous permeation method using a selected formulation of the extract and a drug delivery peptide was proposed. Pachymic acid, known as the anti-cancer and anti-inflammatory compound of the ventricle, is an indicator component and the HPLC analysis shows that the supercritical extract of the pericardium is more than twice that of the *Poria cocos* bark extract. In order to confirm antioxidative effect of Bombyx mori, DPPH scavenging ability and ABTS scavenging ability test showed that the ethanol extract of *Poria cocos* Back had lower concentration than the supercritical extract of *Poria cocos* back. However, RAW 264.7 Measurements of Nitric oxide (NO) production in cells showed lower NO production at the same concentration than the *Poria cocos* back ethanol extract. In addition, after 72 hours of processing of 20  $\mu\text{g} / \text{ml}$  of the *Poria cocos* back extract in B16 melanoma cells, both the intracellular and extracellular melanin extract were effective and the supercritical extract was lower melanin content. No toxicity was observed at the concentration of 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in RAW 264.7 cells used in NO production experiments. However, in B16 melanoma cells, even at 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , both *Poria cocos* back ethanol extract and supercritical extract showed a survival rate of less than 60%. The liposome formulation and drug delivery peptides were shown to be useful for percutaneous permeation of Supercritical Extract of *Poria cocos* back using a liposome formulation and a drug delivery peptide. it is expected that there will be great potential for development as a variety of cosmetic materials for *Poria cocos* back.

**Keywords :** *Poria cocos* back, Supercritical Extraction, Anti-inflammatory, whitening, Antioxidant

## 1. 서론

현대사회는 도시화와 산업화가 시작되면서 인간은 풍요로운 삶을 살게 되었고 인간의 수명은 증가하였다. 하지만 산업화는 인간에게 이로운 점만 준 것은 아니다. 산업화의 부작용으로 환경호르몬과 미세먼지 등의 다양한 외부적 요인으로 인간의 건강은 악화 되어왔다. 신체의 가장 최외각에서 인간을 보호하는 피부는 외부 유해요소로부터 가장 큰 영향을 받는 부분이다. 외부적 요인은 피부 장벽을 파괴하고 다양한 질병을 야기한다. 최근 선진국 질병으로 알려진 아토피 피부염이 대표적인 질병이다. 또한 피부는 외부적 요인만으로 악화되는 것은 아니다[1,2]. 나이가 증가함에 따라 피부를 구성하는 섬유아세포의 기능과 수가 줄어 엘라스틴과 콜라겐 등의 합성양이 감소하여 각질층의 구조가 변화된다. 피부 노화를 일으키는 산화적 스트레스 이를 해결하기 위하여 천연물을 이용한 연구가 여러 분야에서 진행되고 있다[3,4].

복령(*Poria cocos*)은 한방에서 예로부터 사용되

어온 생약 중 하나로 동의보감에 이뇨작용 및 진정작용이 있다고 알려져 있다. 또한 복령의 항종양연구가 보고된 바 있으며 항구토, 항암, 항염증 등의 연구가 진행되어왔다[5-7]. 복령피(*Poria cocos* bark)는 구멍장이버섯과 복령(*poria cocos*) 균핵의 바깥 껍질로, 수분을 배출시키는 작용하여 부종을 가라앉히는 효능이 있는 약재로 알려져 있다. 복령피는 사전 연구에 따르면 미백효능이 확인되었으며 항알러지 효과 또한 탁월한 것으로 알려져 있다[8]. 복령피는 복령에 비해 활용도가 낮고 현재 많은 양이 버려지고 저렴한 가격에 판매되고 있으며 그 가치가 저평가 되어왔다. 본 연구에서는 에탄올 및 초임계 추출법을 이용하여 추출된 복령피의 유효성분을 HPLC를 활용한 분석을 통하여 보다 효율적인 추출법을 제시하고 복령피 추출물의 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 한다.

최근 유효성분의 난용성 문제와 경피 약물전달 연구가 활발하게 진행되고 있다. 피부는 인체에서 매우 뛰어난 장벽 역할을 한다. 피부는 표피, 진피, 피하지방으로 구성되어 있으며 표피는 각질

층, 과립층, 유극층, 기저층으로 나뉘어 있으며 진피는 유두층과 망상층으로 되어있다. 그 중 경피 흡수에서 가장 중요한 부분은 표피의 각질층이다. 각질층은 외부의 여러 가지 자극요인으로부터 피부를 보호하는 장벽 역할을 한다. 하지만 장벽 역할이 경피 흡수의 관점에서는 방해요인으로 작용한다[9,10]. 우리는 경피 흡수를 촉진하기 위하여 제형적 접근, 물리적 접근, 생물학적 접근 등을 여러 가지 측면으로 연구가 진행되고 있다 [10].

제형적 접근으로는 리포솜 제형법[10]이 있다. 리포솜이란 유효성분을 효과적으로 피부에 흡수시킬 수 있는 전달체로 세포막 또는 각질층의 지질과 유사한 구조와 성분을 가지고 있어 세포막과 융합하거나 리포솜내의 활성 성분을 전달하기에 용이하다. 최근 리포솜을 활용한 활성 성분의 약물전달 연구가 많이 진행되고 있다. 본 연구에서는 복령피의 유효성분을 표피의 각질층을 투과시켜 피부에서 유효한 효능을 내고자 한다 [11,12]. 복령피의 유효성분으로 알려진 pachymic acid는 난용성 성분으로 알려져 있다. Pachymic acid가 포함된 복령피 추출물 또한 난용성이다. 복령피 추출물의 난용성 문제를 해결하고자 리포솜 제형 방법을 이용해서 유효추출물을 리포솜과 혼합하여 난용성 문제를 해결하고자 한다[13].

생물학적 접근으로는 경피 약물전달 펩티드가 있다. 유전자재조합 기술과 펩티드 합성기술이 발전함에 따라서 수많은 단백질과 펩티드가 개발되어왔다. 약물전달 펩티드 중 Tat-peptide에 대한 연구가 가장 활발하게 진행되어왔다. Tat-peptide는 HIV 바이러스가 세포막을 투과할 때 분비하는 펩티드로 몸집이 큰 바이러스가 급속도로 세포를 투과하는 방법으로 알려져 있다. Tat-peptide는 86개의 아미노산 서열로 이루어져 있으며 47~57(Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg)이 약물전달의 핵심 아미노산 서열로 알려져 있다[10]. 하지만 Tat-peptide 자체를 합성하는 것은 어렵고 비용적인 문제로 현실적으로 실용화하기 어려워 Tat-peptide의 핵심 아미노산 서열의 6개의 Arg을 가진 hexa-D-arginine, R6를 경피 약물전달 peptide로 사용하여 약물전달의 효능 및 실현 가능성을 확인하였다[14,15].

## 2. 실험

### 2.1. 재료

본 연구에 사용된 복령피는 충청남도 부여군에서 재배된 것을 건화약품(주)에서 구매하여 실험을 진행하였다. 건조된 복령피를 분쇄하여 -23℃에 보관하여 사용하였다.

### 2.2. 시약 및 기기

항산화 효과 측정에 사용한 시약은 L(+)-ascorbic acid 99.5%는 삼진화학(Korea)에서 구매하였고, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), SOD Assay Kit, ABTS, potassium persulfate는 Sigma aldrich(USA)에서 구입하였으며, 미백 실험에서 사용된 시약은 potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic는 대정(Korea)에서 구매하였고, mushroom tyrosinase, kojic acid는 Sigma aldrich(USA)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS), trypsin and penicillin-streptomycin (Capricorn Scientific, Germany)이며, 항염 실험에서 사용된 시약은 phosphoric acid, sulfanilamide, naphthylethylenediamine, sodium nitrite, LPS, indomethacin는 Sigma aldrich(USA)에서 구매하였다. 실험에 사용한 기기는 동결건조기(FD8508, Ilshin, Korea), microplate reader (Infinite M200PRO, Switzerland), rotary vacuum evaporator (NE-1001, EYELA, JAPAN), 원심분리기(Supra-25K, Hanil Scientific Inc., Korea), 향온기 (Changshin, Korea), 초임계 추출장치(Ari instrument, Korea), 경피 약물 전달 실험 장치는 Franz diffusion cells and systems (PermeGear, USA)이며 인공피부는 Neoderm-E (Tegoscience, Korea)이며, R6 (hexa-D-arginine)는 Dermafirm Co.(Korea)에서 구입하였다.

### 2.3. 시료 제조

본 연구에서는 에탄올 추출과 초임계 추출에 의해 복령피 추출물을 얻었다. 먼저, 복령피 분쇄물에 대하여 100 % 에탄올 추출을 실시하였다. 100 % 에탄올과 추출 대상물을 20배율로 혼합하여 상온에서 3일간 침지시켜 추출한 것을 필터 (ADVANTEC filter paper 100 circles)를 통해 여과한 후 Rotary vacuum evaporator로 50 °C

에서 감압농축 하였다. 이러한 과정을 통해 얻어진 에탄올 추출 농축액을 밀봉하여 냉동보관하면서 일정 농도로 희석하여 항산화, 주름개선, 항염 효과 등의 화장품원료로서의 효능실험을 측정하기 위한 시료로 사용하였다.

또한 복령피 초임계 추출물을 얻기 위하여 추출조의 조건은 온도 40°C, 압력 350bar, 분리조 조건 온도 25°C, 압력 30bar CO<sub>2</sub> 분당 60mL, EtOH 분당 5mL의 조건에서 2시간 30분 동안 추출을 진행하였다. 회수한 추출물은 필터를 통해 여과한 후 Rotary vacuum evaporator로 50°C에서 감압농축 후 -21°C에서 보관하여 사용하였다.

#### 2.4. HPLC를 활용한 유효성분 분석

복령피의 항염 지표 성분인 pachymic acid의 함량을 초임계 추출법과 에탄올 추출법을 비교 분석하기 위해 HPLC 분석조건을 응용하였다. 시료와 methanol을 섞어 10 mg/mL의 농도로 sample을 제조하고 pachymic acid를 농도별로 methanol에 용해하여 제조하였다. Pachymic acid도 methanol에 용해시켜 표준곡선을 얻기 위하여 농도별로 희석하여 사용하였다. HPLC장비는 Agilent사의 LC-P-10 Pump를 사용하였으며 Detector는 LC-UV-100UV/VIS를 이용하여 210 nm, 40°C에서 측정하였다. Column의 Shiseido사의 C<sub>18</sub>(5 μm Particle size, 25cm×3.2mm)를 사용하였다. 이동상은 methanol과 HPLC water을 88 : 12비율로 혼합 후 초음파배스에서 30분 동안 방치 후 유속 1 mL/min 조건에서 실험을 진행하였다. 한 개의 sample 당 25분씩 분석을 진행하였다[16].

#### 2.5. DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능을 확인하기 위해 DPPH를 이용하여 각 시료의 프리라디칼 소거능 실험은 Blois의 방법을 참고하여 실행하였다. 에탄올에 DPPH를 희석하여 0.2mM DPPH 용액을 제조하였다. 시료는 에탄올 용매에 녹인 후 일정 농도로 희석하여 사용하였다. 각 시료를 0.2mM DPPH Solution과 1 : 1비율로 혼합하여 암실에서 30분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용해 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타냈다[17].

$$\text{DPPH 라디칼 소거능 (\%)} \\ = (1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{시료 무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

#### 2.6. ABTS 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거능을 이용한 항산화 실험은 Van den berg의 방법을 활용하여 측정하였다 [18]. 7 mM 2,2-azinobis (3-ethylbenzothianoline-6-sulfonic acid)와 2.4 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 18 - 24시간 반응시킨 후 ABTS가 형성된 반응물에 phosphate buffered saline에 희석하여 사용하였다. 96-well에 sample 20 μL와 ABTS solution 180 μL을 혼합 후 7분 동안 암실에서 반응시켜 ELISA reader를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 ascorbic acid와 비교하여 계산하였다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능(\%)} \\ = (1 - \text{시료 첨가구 흡광도} / \text{무첨가구 흡광도}) \times 100$$

#### 2.7.

##### 2.7.1 NO(Nitric oxide) 생성량 측정

96-well에 RAW 264.7 세포를 2.4X10<sup>4</sup> cell/well씩 분주한 후, 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 Cell incubator에서 배양하였다. 배지를 제거 후 PBS를 이용해 농도 처리를 위해 세척하였다. 일정 농도로 시료와 1 μL/mL LPS를 세포에 처리 후, 24h 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 Cell incubator에서 배양하였다. Sodium nitrite를 Griess reagent와 동량으로 혼합 후 상온에서 10분간 반응 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[19]. NO의 양은 sodium nitrite로부터 얻은 표준곡선을 이용하여 결정하였으며, 최종 NO의 양은 일정 단백질 당 NO 양으로 환산하여 음성대조군과 비교하였으며 NO 생성 억제능은 LPS 자극 NO량 - 추출물 NO 양으로 계산하였다.

##### 2.7.2 단백질 정량

단백질 정량은 세포 내에 포함된 단백질의 양을 측정하는 것으로, 배지를 회수하고 PBS (phosphate-buffered saline)로 세척 후 1 N NaOH를 처리하여 용해시켜주었다. 단백질 정량법 중 하나인 Lowry assay를 하였으며 Thermo의 Pierce BCA Protein Assay kit 제품

을 사용하였다. Reagent A과 Reagent S의 용액을 50 : 1의 비율로 반응시켜준 후, Reagent B를 처리하여 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 10분간 반응시켜주었다. ELISA reader로 562 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 양을 확인하였다. 단백질의 양은 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin)으로부터 얻은 표준곡선을 이용하여 결정하였다.

## 2.8.

### 2.8.1 멜라닌 생성 억제 효과 측정

48well plate에 15 x 10<sup>4</sup> cells/well씩 분주한 후, 4시간 동안 세포가 Plate에 잘 붙도록 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 세포 배양기에 배양하였다. Plate에 잘 붙은 세포에 media를 제거해 주고  $\alpha$ -MSH (Melanocyte-stimulating hormone)과 FBS가 처리된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)을 혼합하여 Well에 Sample을 농도별로 처리하여 72시간 동안 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 세포 배양기에 배양하였다. 양성대조군으로는 kojic acid를 사용하였다. 배양 후 곧바로 extra cell Melanin을 측정하기 위해 상층액을 96 well에 넣은 후 ELISA Reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 Melanin의 양을 측정하였다. Intra cell Melanin을 측정하기 위해 Media를 제거한 후 1 N NaOH를 처리하고 60°C에서 30분간 방치 후 세포를 용해시켜 ELISA Reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 Melanin의 양을 측정하였다[8].

### 2.8.2 세포 생존율 측정

96-well에 B16 세포를 1 x 10<sup>4</sup> cells/well씩 분주한 후, 24시간 동안 세포가 plate에 잘 붙도록 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 세포 배양기에 배양하였다. 일정 농도의 시료를 처리하여 세포를 24 h 동안 배양하였다. 96well에 Media를 제거 한 후 CCK-8(10 %)혼합한 Media를 plate에 처리 후 2 - 4 h 동안 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 세포 배양기에 배양 후 ELISA Reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.[8,19]

세포 생존율(%)

Cell viability (%)= (시료처리군/대조군)×100

## 2.9.

### 2.9.1 복령피 추출물을 함유한 리포솜 제조

난용성 복령피 초임계 추출물을 함유한 리포솜의 사용된 레시틴은 Soya SPL 75H제품을 사용하였으며 glycerin 60 %, 레시틴 5 %, 1,2-hexandiol 2 % 을 가열하여 녹인 후 80 °C에서 용해한 증류수 8 %를 포함하는 수상(water phase)을 넣고 혼합하였다. 여기에 DC 200 25 %을 70 °C 가열 후 넣고 호모믹서를 이용하여 3,000 rpm의 속도로 5 min 간 유회시켜 리포솜을 제조하였다. 제조된 리포솜을 1200 bar에서 3회에 걸쳐 Micro-fluidizer를 냉각 장치를 사용하지 않고 반복 통과하여 리포솜을 제조하였다. 제조에는 EDTA-2Na (0.02 %)를 추가로 첨가되었다. 이러한 공정으로 제조된 리포솜과 1,3 BG에 용해시킨 복령피 초임계 추출물을 1 : 9 비율로 혼합하여 복령피 추출물의 농도를 0.5 %로 제조 후 실험에 사용하였다.

### 2.9.2 In vitro 경피 투과 실험

복령피 초임계 추출물을 포함한 리포솜과 R6의 경피 투과 증진을 확인하기 위하여 Franz diffusion cell을 이용하여 경피 투과 실험을 진행하였다. 복령피 초임계 추출물은 난용성이라 수용액에 용해되지 않기 때문에 1,3 BG(Butylene Glycol)에 녹인 후 실험을 진행하였다. 실험에 사용된 Sample은 총 3 가지로 A : 복령피 초임계 추출물 + 1,3 BG, B: 복령피 초임계 추출물 + 1,3 BG + 리포솜 C:복령피 초임계 추출물 + 1,3 BG + 리포솜 + R6을 제조하여 실험을 진행하였다. 먼저 Receptor Chamber에 인공피부의 각질층이 위로 되도록 Donor와 Receptor Phase 사이에 고정시켜 실험을 진행하였다. 실험이 진행되는 동안 항온수조의 온도가 사람의 체온과 비슷한 37°C가 되도록 유지시켰다. sample을 피부 위에 0.2 mL씩 도포 후 시간에 따라 Receptor Phase를 채취 후 동량을 보충해주었다. 채취한 시료속의 Pachymic acid를 지표성분으로 HPLC을 이용하여 포함된 양을 분석하였다[12,13].

## 2.10. 통계 처리

모든 실험의 결과는 3회 반복하여 시행한 것을 평균 ± 표준편차로 표기하였으며, SPSS 18.0 프로그램을 이용하여 독립표본 t-test와 one-way ANOVA 분석으로 p값이 0.05미만 일 때 통계적

으로 유의하다고 판단하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. HPLC를 활용한 유효성분 분석

Pachymic acid를 표준물질로 표준곡선을 구하여 시료의 10 mg/mL 농도에서의 pachymic acid량을 측정하였다. HPLC를 활용한 복령피 추출물의 활성성분인 pachymic acid의 분석결과는 Table 1 나타내었다. 복령피 에탄올 추출물은  $9,529.66 \pm 3.17 \mu\text{g/mL}$ , 복령피 초임계 추출물은  $20,322.63 \pm 5.77 \mu\text{g/mL}$ 의 pachymic acid를 함유하고 있었으며, 이는 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Table 1). HPLC 분석 결과로 보여 질 때 복령피에 포함된 pachymic acid를 효율적으로 추출하기 위해서는 에탄올 추출법 보다 CO<sub>2</sub> 초임계를 활용한 추출방법이 더 효율적인 추출법이라고 할 수 있다. 그 이유는 pachymic acid는 강한 비극성 물질로 에탄올 추출법 보다 CO<sub>2</sub> 초임계를 활용한 추출방법이 더 약물을 용해시켜 추출하는 것이 더 효율적인 추출방법이라고 사료된다.

Table 1. Total pachymic acid contents of ethanolic extracts from *Poria cocos* bark and supercritical extracts from *Poria cocos* bark.

Extracts	Pachymic acid ( $\mu\text{g/mL}$ )
PEE	$9,533.33 \pm 3.17$
PCE	$20,322.63 \pm 5.77$

(PEE: *Poria cocos* bark ethanolic extracts, PCE: *Poria cocos* bark supercritical extracts)

Table 2. DPPH radical scavenging activity rate of ethanolic extracts from *Poria cocos* bark and supercritical extracts from *Poria cocos* bark (단위 %)

Extracts ( $\mu\text{g/mL}$ )	Extracts	
	PCE	PEE
5,000	$87.78 \pm 0.75$ ***	$68.81 \pm 1.44$ ***
2,500	$86.61 \pm 0.30$ ***	$45.23 \pm 0.56$ ***
1,250	$85.36 \pm 0.34$ ***	$17.13 \pm 1.65$ ***

(PEE: *Poria cocos* bark ethanolic extracts, PCE: *Poria cocos* bark supercritical extracts.

\*  $p < 0.05$  versus control, \*\*  $p < 0.01$  versus control, \*\*\*  $p < 0.001$  versus control)

#### 3.2. DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능을 측정하기 위하여 복령피 에탄올 추출물, 복령피 초임계 추출물을 각각 5,000  $\mu\text{g/mL}$ , 2500  $\mu\text{g/mL}$ , 1250  $\mu\text{g/mL}$ , 625  $\mu\text{g/mL}$ , 312.5  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석하여 실험하였다. 복령피 에탄올 추출물은 1250  $\mu\text{g/mL}$ 에서 85.36%, 625  $\mu\text{g/mL}$ 에서 58.32%, 312.5  $\mu\text{g/mL}$ 에서 27.08%의 소거능을 보였으며, 복령피 초임계 추출물은 5000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 68.8%, 2500  $\mu\text{g/mL}$ 에서 45.23%, 1250  $\mu\text{g/mL}$ 에서 17.12%의 소거능을 보였으며 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능이 증가하였다(Table 2).

복령피 에탄올 추출물이 복령피 초임계 추출물보다 더 낮은 농도에서 더 높은 DPPH radical 소거능을 보였다. 그 결과는 5000  $\mu\text{g/mL}$ , 2500  $\mu\text{g/mL}$ , 1250  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 대조군인 ascorbic acid와 비교해보면 ascorbic acid는 25  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 95.07%의 DPPH radical 소거능을 나타내었고, 복령피 에탄올 추출물은 1250  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 85.36%의 소거능을 나타냈다. 복령피 에탄올 추출물은 ascorbic acid보다는 DPPH 라디칼 소거능력이 우수하지 않지만, Ascorbic acid가 강력한 항산화 물질임으로 복령피 에탄올 추출물 또한 항산화 능력을 갖는 것으로 판단된다. 이를 통해 복령피에 항산화 물질이 함유되어 있는 것을 확인하였고, 항산화 화장품 소재로서의 개발 가능성을 확인하였다.

#### 3.3. ABTS 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거능을 측정하기 위하여 복령피 에탄올 추출물, 복령피 초임계 추출물을 각각 450  $\mu\text{g/mL}$ , 225  $\mu\text{g/mL}$ , 112.5  $\mu\text{g/mL}$ 의 농

도로 희석하여 실험하였다. 복령피 에탄올 추출물 450  $\mu\text{g/mL}$ 에서 90%, 225  $\mu\text{g/mL}$ 에서 75.8 %, 112.5  $\mu\text{g/mL}$ 에서 23.81 %의 소거능을 보였으며, 복령피 초임계 추출물 450  $\mu\text{g/mL}$ 에서 82.59 %, 225  $\mu\text{g/mL}$ 에서 37.63 %, 112.5  $\mu\text{g/mL}$ 에서 5.06 %의 소거능을 보였으며 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능이 증가하였다 (Table 3).

복령피 에탄올 추출물이 복령피 초임계 추출물보다 더 낮은 농도에서 더 높은 ABTS 라디칼 소거능을 보였다. ABTS 라디칼 소거능 실험 결과 통계적으로 유의하게 나타났다. 대조군인 ascorbic acid와 비교해보면 ascorbic acid는 20  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 75.46 %의 ABTS 라디칼 소거능을 나타내었고, 복령피 에탄올 추출물은 450  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 90%의 ABTS 라디칼 소거능을 나타냈다. 복령피 에탄올 추출물은 ascorbic acid보다는 ABTS 라디칼 소거능력이 우수하지 않다. 하지만 복령피 에탄올 추출물 또한 항산화 능력을 갖는 것으로 사료된다. 본 실험을 통하여 복령피에 함유된 항산화 성분을 추출하기 위해서는 초임계 추출방법 보다는 에탄올 추출방법이 더 효율적인 추출방법이라고 판단된다.

### 3.4.

#### 3.4.1 NO(Nitric oxide) 생성량 측정

NO(Nitric oxide) 생성량 측정을 위하여 복령피 에탄올 추출물, 복령피 초임계 추출물을 각각 800  $\mu\text{g/mL}$ , 400  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석하여 실험하였다. 복령피 에탄올 추출물은 800  $\mu\text{g/mL}$ 에서 89.71  $\mu\text{g/mL}$ ,

400  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 163.08  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 203.75  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 218.77  $\mu\text{g/mL}$ 의 NO 생성량을 보였다. 복령피 초임계 추출물은 800  $\mu\text{g/mL}$ 에서 27.89  $\mu\text{g/mL}$ , 400  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 141.41  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 179.76  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 217.36  $\mu\text{g/mL}$ 의 NO 생성량을 보였다. 복령피 초임계 추출물과 복령피 에탄올 추출물 둘다 농도 의존적으로 NO 생성량이 감소하는 것으로 나타났다 (Table 4).

복령피 초임계 추출물과 복령피 에탄올 추출물을 동일 농도에서 비교하였을 때 복령피 초임계 추출물이 더 낮은 NO 생성량을 나타냈다. 대조군인 indomethacin와 비교해봤을 때 복령피 초임계 추출물 800  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 일 때 비슷한 NO 생성량을 보였다. 그 결과 복령피 초임계 추출물이 복령피 에탄올 추출물보다 더 낮은 NO 생성량을 나타냄으로 복령피 초임계 추출물이 복령피 에탄올 추출물 보다 항염 화장품 소재로서의 가치가 클 것으로 보인다. 하지만 복령피 에탄올 추출물 800  $\mu\text{g/mL}$  NO 생성량을 저해시키기 때문에 복령피 에탄올 추출물 또한 항염 화장품 소재로서 활용 가능할 것으로 보인다. 복령피 초임계 추출물이 복령피 에탄올 추출물에 비해 NO 생성량이 낮은 이유는 추출방법 별 pachymic acid와 같은 항염효과를 나타내는 성분이 용해되는 양이 다르기 때문에 차이를 보이는 것으로 판단된다.

Table 3. ABTS radical scavenging activity rate of ethanolic extracts from *Poria cocos* back, supercritical extracts from *Poria cocos* back (단위 %)

Extracts ( $\mu\text{g/mL}$ )	PCE	PEE
450	90.00 $\pm$ 1.65 **	82.59 $\pm$ 0.50 **
225	575.80 $\pm$ 0.29 ***	37.64 $\pm$ 0.36 ***
112.5	23.82 $\pm$ 1.08 ***	5.07 $\pm$ 0.86 ***

(PEE: *Poria cocos* back ethanolic extracts, PCE: *Poria cocos* back supercritical extracts.

\* $p < 0.05$  versus control, \*\* $p < 0.01$  versus control, \*\*\* $p < 0.001$  versus control)

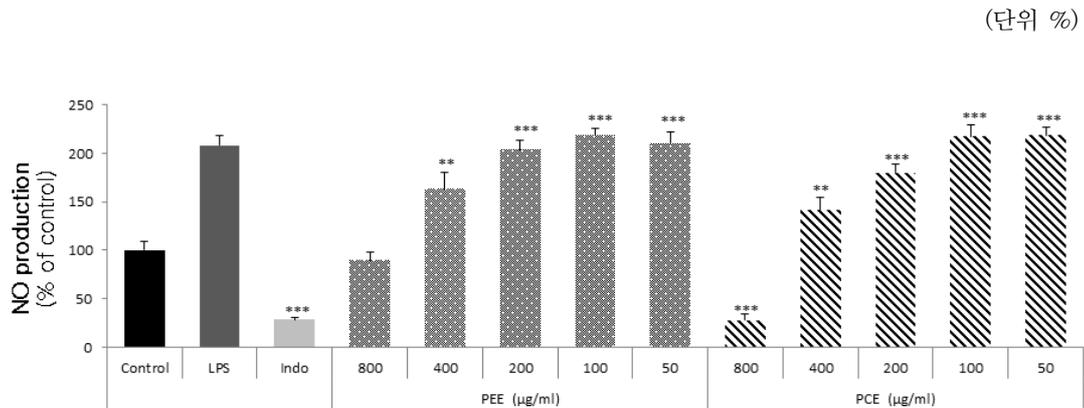


Fig. 1. Nitric oxide levels(of control) of LPS-stimulated RAW 264.7 cell on each concentration of ethanolic extracts from *Poria cocos* back, supercritical extracts from *Poria cocos* back. (PEE: *Poria cocos* back ethanolic extracts, PCE: *Poria cocos* back supercritical extracts, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .)

Table 4. Nitric oxide levels(of control) of LPS-stimulated RAW 264.7 cell on each concentration of ethanolic extracts from *Poria cocos* back, supercritical extracts from *Poria cocos* back (단위 %)

Extracts (µg/mL)	PEE	PCE
800	89.71 ± 8.39	27.89 ± 6.65
400	163.08 ± 17.47	141.41 ± 12.7
200	203.75 ± 9.96	179.76 ± 8.93
100	218.77 ± 7.09	217.36 ± 12.17

(PEE: *Poria cocos* back ethanolic extracts, PCE: *Poria cocos* back supercritical extracts)

### 3.5.

#### 3.5.1 B16 세포 생존율 측정

복령피 에탄올 추출물, 복령피 초임계 추출물의 세포독성과 더불어 미백실험에서의 사용될 농도를 측정하기 위하여 CCK-8 assay를 시행하였다. B16 cell에대한 복령피 에탄올 추출물, 복령피 초임계 추출물의 세포독성을 평가한 결과 20 µg/mL이하에서의 세포 생존율이 85%이상을 나타냈다. 복령피 에탄올 추출물이 복령피 초임계 추출물보다 동일 농도에서 더 높은 세포 생존율을 보였다. 하지만 두 가지 추출물 모두에서 50

µg/mL 이상의 농도에서는 급격하게 생존율이 감소하는 것으로 나타났다.그 이유는 B16 cell이 쥐에서 자라는 악성 흑색종 세포이기 때문에 복령피의 항암효과로 인해서 50 µg/mL 이상의 농도 일 때 생존율이 급격하게 감소하는 것으로 사료된다. 따라서 50 µg/mL의 농도 일 때 B16 cell에 대한 항암효과가 있을 것으로 사료된다. 독성평가 결과를 바탕으로 B16 cell에 대한 복령피 에탄올 추출물, 복령피 초임계 추출물의 미백 실험 농도는 20 µg/mL 이하에서 실험하였다.

(단위 %)

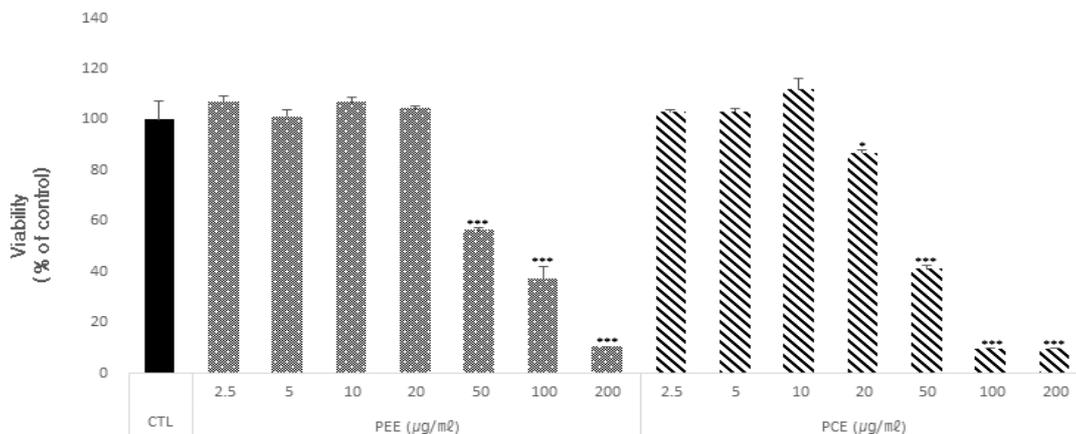


Fig. 2. Viability level of  $\alpha$ -MSH B16 cell on each concentration of ethanolic extracts from *Poria cocos* back, supercritical extracts from *Poria cocos* back. (PEE: *Poria cocos* back ethanolic extracts, PCE: *Poria cocos* back supercritical extracts \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .)

Table 5. Viability (% of control) level of  $\alpha$ -MSH B16 cell on each concentration of ethanolic extracts from *Poria cocos* back, supercritical extracts from *Poria cocos* back

(단위 %)

( $\mu$ g/mL)	Extracts	PCE	PEE
10		106.97 $\pm$ 1.79	111.83 $\pm$ 4.47
20		104.65 $\pm$ 0.74	87.03 $\pm$ 0.96
50		56.58 $\pm$ 0.75	41.19 $\pm$ 1.34
100		37.52 $\pm$ 4.35	9.94 $\pm$ 0.13
200		10.58 $\pm$ 0.13	9.94 $\pm$ 0.1

(PEE: *Poria cocos* back ethanolic extracts, PCE: *Poria cocos* back supercritical extracts)

### 3.5.2 멜라닌 생성 억제 효과 측정

복령피 에탄올 추출물과 복령피 초임계 추출물의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16 cell을 이용하여 실험을 진행하였다.  $\alpha$ -MSH를 100 nM 처리한 B16 cell에 복령피 에탄올 추출물과 복령피 초임계 추출물을 5, 10, 20  $\mu$ g/mL의 농도별로 처리 후 72시간 동안 37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub> 세포 배양기에 배양된 세포를 채취하여 멜라닌 함량을 Extra와 Intra를 측정한다.

과, 두 가지 추출방법 모두 농도 의존적으로 멜라닌 생성량이 감소됨을 확인하였다. 대조군인 Kojic acid 100  $\mu$ g/mL와 비교하였을 때에도 더 낮은 농도에서 미백효과를 나타냈다. 실험 결과 복령피 에탄올 추출물의 경우 복령피 초임계 추출물보다 5  $\mu$ g/mL농도에서 더 낮은 멜라닌 생성량을 보였다. 하지만 10, 20  $\mu$ g/mL농도에서는 복령피 초임계 추출물이 복령피 에탄올 추출물보다 더 낮은 멜라닌 생성량을 나타냈다. 실험

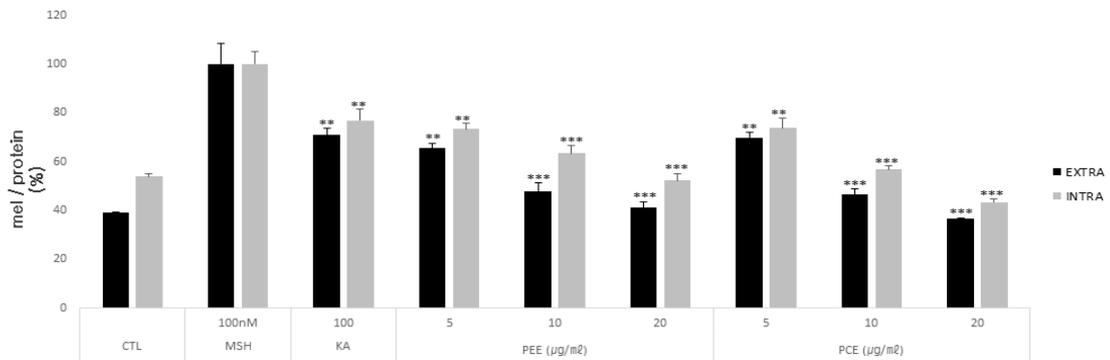


Fig. 3. Melanin level of α-MSH B16 cell on each concentration of ethanolic extracts from *Poria cocos* bark, supercritical extracts from *Poria cocos* bark. (PEE: *Poria cocos* bark ethanolic extracts, PCE: *Poria cocos* bark supercritical extracts, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.)

Table 6. Melanin level of α-MSH B16 cell on each concentration of ethanolic extracts from *Poria cocos* bark, supercritical extracts from *Poria cocos* bark (단위 %)

Extract	μg/mL	Extra (mel / protein)	Intra (mel / protein)
PEE	5	65.57 ± 1.66	73.37 ± 2.41
	10	47.72 ± 3.52	63.35 ± 3.44
	20	41.11 ± 2.28	52.24 ± 2.63
PCE	5	69.86 ± 2.31	73.72 ± 4
	10	46.45 ± 2.43	56.85 ± 1.43
	20	36.58 ± 0.41	43.42 ± 1.32

(PEE: *Poria cocos* bark ethanolic extracts, PCE: *Poria cocos* bark supercritical extracts)

결과 에탄올 추출법보다는 초임계 추출방법이 복령피 미백화장품 소재개발에 조금 더 적합한 것으로 사료된다. 하지만 두 가지 추출법 모두 멜라닌 생성량을 감소시키는 효과가 대조군에 비해 뛰어난 것으로 나타내고 있으며 두 가지 추출방법에 멜라닌 생성억제 효과가 큰 차이를 보이지 않음으로 두 가지 추출법 모두 미백화장품 소재 개발에 적합하다고 할 수 있다.

### 3.6. In vitro 경피 투과 실험

Franz diffusion cell 실험은 선행된 실험에 결과 중 항염효과와 미백효능에 뛰어난 복령피 초임계 추출물을 선정하였다. 총 3가지 Sample로 실험을 진행하였으며 세 가지 샘플 모두 경피 투과를 하는 것으로 나타났으며 시간대별 경피 투과량이

증가하는 것을 나타냈다. A의 경우 4 h에서 16.57 μg/cm<sup>2</sup> 투과하였으며 8 h에서 26.38 μg/cm<sup>2</sup>, 12 h에서 32.55 μg/cm<sup>2</sup>, 16 h에서 34.15 μg/cm<sup>2</sup>, 20 h에서 34.15 μg/cm<sup>2</sup>, 24 h에서 37.03 μg/cm<sup>2</sup> 투과하였다. B는 4 h에서 26.34 μg/cm<sup>2</sup> 투과하였으며 8 h에서 39.51 μg/cm<sup>2</sup>, 12 h에서 46.37 μg/cm<sup>2</sup>, 16 h에서 54.45 μg/cm<sup>2</sup>, 20 h에서 58.27 μg/cm<sup>2</sup>, 24 h에서 60.48 μg/cm<sup>2</sup> 투과하였으며 C는 4 h에서 35.44 μg/cm<sup>2</sup> 투과하였으며 8 h에서 45.18 μg/cm<sup>2</sup>, 12 h에서 56.20 μg/cm<sup>2</sup>, 16 h에서 60.61 μg/cm<sup>2</sup>, 20 h에서 63.98 μg/cm<sup>2</sup>, 24 h에서 66.40 μg/cm<sup>2</sup> 투과하였다. A와 B 그리고 C의 경피 투과 실험 결과 리포솜과 R6 (0.1 %)를 섞은 C가 가장 높은 경피 투과율을 보였으며 단순 복령피 초임계 추출물을 1,3 BG에 용해시

킨 것 보다 리포솜과 혼합한 것이 더 높은 투과율을 보였다. 실험 결과 이는 리포솜 제형이 경피 투과에 도움을 주며 또한 R6 경피 투과 펩티드가 복령피 초임계 추출물의 경피 투과를 증진시켜 준다.

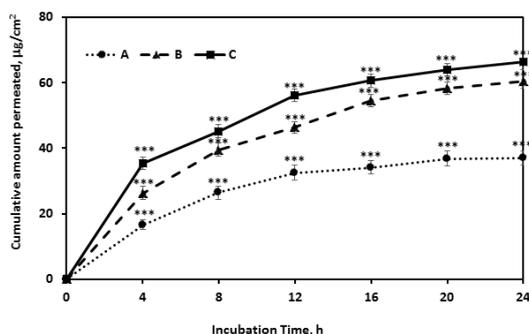


Fig. 4. *In vitro* skin permeation profiles of *Poria cocos bark* in 1,3 BG and mixed liposome and mixed liposome with R6 peptide. (A: *Poria cocos bark* supercritical extract in 1,3BG, B: *Poria cocos bark* supercritical extract in liposome C: *Poria cocos bark* supercritical extract in liposome + R6, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .)

#### 4. 결론

본 연구에서는 복령피 속에 내포되어 있는 항염, 미백, 항산화 성분들을 확인하고 에탄올, 초임계 추출법에 따른 효능 차이를 확인하고자 하였다. 또한 복령피에 포함된 Pachymic acid를 효율적으로 추출하기 위한 추출공정을 선정하여 제시하고자 한다.

1. HPLC를 이용한 복령피 추출물의 지표성분으로 pachymic acid를 분석한 결과 초임계 추출법이 에탄올 추출법보다 2배 가량 높은 pachymic acid를 추출하였다. 그 결과 pachymic acid를 효율적으로 추출하기 위해서는 초임계 추출법이 적합한 추출법이며, 초임계 이산화탄소가 비극성 성분을 추출하는데 능력이 뛰어나기 때문에 단순 에탄올 추출보다 더 많은 양이 추출된다고 판단된다.
2. DPPH 라디칼 소거능 복령피 에탄올 추출물이 복령피 초임계 추출물 보다 좋은 결과가 나타났다. 또한 ABTS 라디칼 소거능 실험에서도 동일한 결과를 나타냈다. 두 가지 항산화 실험의 결과를 바탕으로 복령피를 항산화 화장품소재로서 개발하기 위해서는 초임계 추출법보다 에탄올 추출법이 더 적합한 추출법이다. 에탄올 추출의 경우, 침지 시간이 초임계 추출시간 보다 오래 추출하

Table 7. *In vitro* skin permeation profiles of *Poria cocos bark* in 1,3 BG and mixed liposome and mixed liposome with R6 peptide

Time	Extracts	A ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	B ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	C ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
H4		16.57 ± 1.48	26.34 ± 1.97	35.44 ± 1.86
H8		26.38 ± 2.04	39.51 ± 2.05	45.18 ± 2.02
H12		32.55 ± 2.20	46.37 ± 1.73	56.20 ± 1.92
H16		34.15 ± 1.98	54.45 ± 1.85	60.61 ± 1.96
H20		34.15 ± 2.35	58.27 ± 1.85	63.98 ± 1.84
H24		37.03 ± 2.19	60.48 ± 2.12	66.40 ± 2.56

(A: *Poria cocos bark* supercritical extract in 1,3BG, B: *Poria cocos bark* supercritical extract in liposome C: *Poria cocos bark* supercritical extract in liposome + R6)

였으며 에탄올이 초임계추출법 보다 항산화 성분을 추출하는데 용이하다고 생각된다.

3. NO(Nitric oxide) 생성량 측정 실험에서는 복령피 에탄올 추출물과 복령피 초임계 추출물 모두 같은 농도에서 NO 생성량을 저하시켰다. 하지만 같은 농도에서 비교 하였을 때 복령피 초임계 추출물이 복령피 에탄올 추출물 보다 더 낮은 NO 생성량을 보였다. 따라서 복령피를 항염 화장품 소재로서 개발하기 위해서는 에탄올 추출법보다 초임계 추출법이 더 적합한 추출법이라고 판단되는데 그 이유는 초임계추출물이 에탄올추출물보다 추출되는 pachymic acid의 양이 더 많이 추출되었기 때문이다.
4. B16 cell에대한 세포생존율은 복령피 에탄올 추출물과 초임계 추출물 모두 낮은 농도에서 독성을 보였다. 하지만 RAW 264.7 cell의 경우는 높은 농도에서도 독성이 발견되지 않았다. RAW 264.7에서는 독성이 발견되지 않고 B16 cell에서만 독성이 발견된 이유는 B16 cell가 흑색종 세포이기 때문 복령피의 항암효과로 낮은 농도에서도 독성을 보이는 것으로 생각된다.
5.  $\alpha$ -MSH 멜라닌 생성 억제 실험에서는 복령피 에탄올 추출물과 초임계 추출물 모두 같은 농도에서 미백효과를 보였다. 하지만 초임계 추출물이 10, 20  $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 Extra cell과 Intra cell 모두 더 낮은 농도의 멜라닌 함량을 보였다. 결과적으로 복령피를 미백화장품 소재로서 활용을 한다면 초임계 추출법을 이용하는 것이 더 효율적이라 판단된다.
6. Franz cell을 이용한 경피 투과 실험은 효능 평가 실험을 바탕으로 초임계 추출물을 선정하였다. 선정된 복령피 초임계 추출물은 강한 난용성 추출물이기 때문에 단순 수용성용매에는 용해되지 않아 가용화 시키기 위해서 1,3 BG와 리포솜을 활용하였다. 또한 복령피의 유효성분을 더욱 효과적으로 피부에 전달하기 위하여 약물전달 펩티드 R6를 혼합하여 실험을 진행하였다. 결과적으로 단순 1,3 BG에 용해시킨 Sample에 비해 리포솜과 혼합한 Sample 그리고 R6를 혼합한 Sample 역순으로 효과가 좋았다. 실험

결과를 바탕으로 리포솜 제형은 복령피 추출물을 경피에 전달하는 효과가 있으며 약물전달 펩티드 R6 또한 경피 약물 전달 효과가 있는 것으로 나타났다. 난용성 복령피 초임계 추출물을 피부에 침투시키기 위해서는 리포솜 제형과 약물전달 펩티드가 효과적인 방법이라고 판단된다.

따라서 항알러지, 항암 등 다양한 효과를 가지고 있는 복령피를 대상으로 항염, 미백, 항산화 화장품 소재로서의 가능성을 제시하며 추출방법에 따른 복령피에 포함된 유효성분의 효능을 비교하여 추출조건을 제시하였다. 그리고 본 연구결과는 복령피가 다양한 효능의 화장품 소재로서 적용하는데 유용한 정보를 제공 할 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 2017년도 과기정통부의 재원으로 한국연구재단 바이오·의료기기개발사업의 지원을 받아 수행되었음(No. 2017M3A9D8048416).

## References

1. J. U. Kim, "Prevention of atopic dermatitis through strengthening skin barrier", *The Journal of Skin Barrier Research*, Vol. 18, No.1 pp. 86-87 (2016).
2. S. K. Jeong, H. J. Kim, B. D. Park, S. H. Lee, "Skin barrier and lipids", *The Journal of Skin Barrier Research*, Vol. 11, No.1 pp. 13-27 (2009).
3. I. D. Kim, R. H. Kwon, Y. Y. Heo, H. J. Jung, H. Y. Kang, B. J. Ha, "Supercritical extraction of oriental Herb: anti-aging and anti-wrinkles effects", *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, Vol. 23, No.6 pp. 529-534 (2008).
4. Y. J. Kim, "Effects of *Centella asiatica* extracts on anti-oxidant and collagen synthesis according to extraction conditions", *Journal of The Korean Society of cosmetology*, Vol. 16, No.2 pp.

- 834-839 (2010).
5. D. G. Kim, D. H. Son, U. K. Choi, Y. S. Cho, S. M. Kim, "The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of *Poria cocos*", *The Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 31, No.6 pp. 1097-1101 (2002).
  6. G. Chihara, J. Hamura, Y. Maeda, Y. Arai, F. Fukumoto, "Antitumor polysaccharide derived chemically from natural *Glucan(pachyman)*", *Nature*, Vol. 225, pp. 943-944 (1970).
  7. S. D. Rhee, S. M. Jeong, J. S. H. Park, S. B. Han, Y. J. Jeon, H. M. Kim, G. P. Kim, "Chemical composition and biological activities of immunostimulants purified from alkali extract of *Poria cocos* Sclerotium", *Korean journal of society of Mycology*, Vol. 271, No.4 pp. 293-298 (1999).
  8. E. J. Lee, S. Y. Bae, R. H. Son, Y. H. Lee, "The inhibitory effects of *Poria cocos* Bark extract on melanogenesis", *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol. 35, No.3 pp. 243-250 (2009).
  9. N. R. Im, H. S. Kim, J. W. Lim, K. J. Kim, G. Y. Noh, S. N. Park, "Characterization and transdermal delivery of ethosomes loaded with liqiritigenin and liquiritin", *The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry*, Vol. 26, No.5 pp. 563-568 (2015).
  10. J. Y. Chung, H. S. Han, "The recent trend of percutaneous absorption used in cosmetics", *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, vol.12, No. 5 pp. 597-605 (2014).
  11. Y. K. Cha, H. D. Cho, W. G. Cho, S. Y. Byun, "Studies on Skin Whitening Efficacy and Skin Permeation Using O/W Nanoemulsion Sytem with Resorcinol Dipentyl Ether", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.34, No.2 pp. 225-235, (2017).
  12. K. Y. Chae, S. S. Kwon, S. N. Park, "A study on nano-emulsion for enhanced transdermal delivery of *Hippophae rhamnoides* leaf extract", *The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry*, Vol. 24, No.3 pp 260-265 (2013).
  13. S. N. Park, M. S. Lim, M. A. Park, S. S. Kown, S. B. Han, "Transdermal delivery of quercetin using elastic liposomes: preparation, characterization and *in vitro* skin permeation study", *The Polymer Society of Korea*, Vol. 36, No. 6 pp. 705-711 (2012).
  14. P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, J. B. Rothbard, "The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , vol. 97, No. 24 pp. 13003-13008 (2000).
  15. S. Y. Shin, "Cell-penetrating peptides as drug delivery carriers", *The Medical Journal of Chosun University*. Vol. 34, No. 1 pp. 1-10 (2009).
  16. L. Y. Zhong, Q. Duan, Q. F. Gong, "Determination of pachymic acid in poria by RP-HPLC", *Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine* (2005).
  17. M. S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical", *Nature*, No. 181, pp. 1199-1200 (1958).
  18. R. V. D. Berg, R. M. M. G. Haenen, H. D. Berg, A. Bast, "Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures", *Food Chemistry*, Vol. 66, No. 4 pp. 511-517 (1999).
  19. Y. J. Kang, A. R. Han, H. Y. Min, J. Y. Hong, E. K. Seo, S. K. Lee, "Inhibitory effects of morachalcone A on lipopolysaccharide - induced nitric oxide production in raw 264.7 cells", *Cancer prevention research*, Vol. 14, pp. 118-23 (2009).