

황금추출물이 함유된 Cosmeceuticals의 제조: 유화안정성 및 항균특성 최적화

홍세흠 · 최용우* · 쉬원지아* · 이승범*,†

단국대학교 고분자시스템공학부, *단국대학교 화학공학과
(2024년 6월 12일 접수, 2024년 6월 24일 수정, 2024년 6월 26일 채택)

Preparation of Cosmeceuticals Containing *Scutellaria baicalensis* Extracts: Optimization of Emulsion Stability and Antibacterial Property

Seheum Hong, Young Woo Choi*, Wenjia Xu* and Seung Bum Lee*,†

Department of Polymer Science and Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea

*Department of Chemical Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea

(Received June 12, 2024; Revised June 24, 2024; Accepted July 26, 2024)

초 록

천연물인 황금추출물과 천연유화제인 올리브 유화왁스를 사용하여 제조된 cosmeceuticals의 유화안정성 및 대장균에 대한 항균능력을 최적화하였다. 독립변수로는 황금추출물 첨가량과 올리브 유화왁스의 첨가량으로 설정하였으며, 반응치로는 제조한 cosmeceuticals의 유화안정도지수(ESI)와 대장균 억제직경을 설정하였다. CCD-RSM을 통하여 95% 신뢰구간 내에서 통계학적으로 합리적이며 신뢰성이 우수한 회귀방정식을 얻었다. 다중반응의 최적화를 통하여 유화안정도지수와 대장균 억제직경을 동시에 만족하는 최적 유화조건으로 황금추출물 첨가량은 3.7 wt%, 올리브 유화왁스의 첨가량은 2.7 wt%이었으며, 산출된 유화안정도지수와 대장균 억제직경의 예측값은 각각 97.9%와 9.7 mm로 나타났다. 최적 조건에서 실제 실험을 진행한 결과 유화안정도지수 및 대장균 억제직경은 각각 95.0%와 9.4 mm로 측정되어 다중반응에 의한 예측값과의 평균오차율은 $3.2 \pm 0.4\%$ 로 나타났다.

Abstract

To optimize the emulsion stability and antibacterial activity against *Escherichia coli* (*E. coli*) of cosmeceuticals using *Scutellaria baicalensis* extracts and olive wax as natural emulsifiers, we conducted a study. The independent variables were the amounts of *Scutellaria baicalensis* extracts and olive wax added. The response variables included the emulsion stability index (ESI) of the cosmeceuticals product and the inhibition diameter against *E. coli*. Through central composite design-response surface methodology (CCD-RSM), we obtained a statistically significant and reliable regression equation within a 95% confidence interval. By optimizing multiple responses, we determined that the optimal emulsification conditions that satisfied both ESI and *E. coli* inhibition diameter were 3.7 wt% of *Scutellaria baicalensis* extracts and 2.7 wt% of olive wax. The predicted ESI and *E. coli* inhibition diameter were 97.9% and 9.7 mm, respectively. When actual experiments were conducted under the optimal conditions, the measured ESI and *E. coli* inhibition diameter were 95.0% and 9.4 mm, respectively, with an average error rate of $3.2 \pm 0.4\%$.

Keywords: *Scutellaria baicalensis*, Cosmeceuticals, *Escherichia coli*, Inhibition diameter, CCD-RSM

1. 서 론

화장품을 구성하는 여러 성분은 미생물이 성장할 수 있는 요인으로 작용한다. 이러한 미생물의 성장은 화장품의 품질을 저하시키며 피부에 문제점을 일으키기도 한다. 화장품을 제조하고 사용하는 과정에서 미생물에 의한 오염 및 문제점을 완벽하게 차단할 수 없기 때문에 미

생물에 의한 제품의 오염을 최대한으로 억제하기 위하여 미생물을 억제 및 사멸시키는 방법으로 항균작용을 보이는 방부제를 반드시 사용해야 한다. 화장품에 많이 사용되는 합성보존제에는 phenoxyethanol, paraben, imidazolidinyurea, quarerium-15, sorbic acid, benzoic acid 등이 있으며, 합성보존제는 아니지만 항균능이 있어 1,2-hexanediol, ethylhexyl glycerin, caprylyl glycol, 1,3-propanediol 등이 최근에는 주로 사용된다. 이들 합성방부제의 경우, 적정 농도 이하에서는 제품의 안정성과 피부의 안전성에 효과가 있는 것으로 사용되고 있지만 여러 미생물에 대한 내성 효과로 인하여 여러 문제점이 나타나고 있다 [1-2]. 따라서 화장품의 안정성과 피부에 관한 안전성 및 환경보호 차원에서 합성방부제를 대체하기 위해서 자연에서 추출한 천연방부제

† Corresponding Author: Dankook University
Department of Chemical Engineering, Gyeonggi 16890, Korea
Tel: +82-31-8005-3559 e-mail: leesb@dankook.ac.kr

를 사용하려는 관심과 연구가 높아지고 있다[3].

황금(*Scutellaria baicalensis*)은 다년생 초본식물인 골무꽃 속에 속하는 천연물이다. 시베리아, 몽골, 중국과 한국이 주 원산지로서 전통 의학에서 많이 쓰이는 처방약 중 하나로 황금의 뿌리는 항균성, 항염, 항산화, 면역 조절, 항암 등에 우수한 약리작용이 있는 것으로 알려져 있다[4]. 선행 연구를 통하여 황금추출물의 항균능이 우수한 것으로 확인되었기 때문에 본 연구에서는 합성방부제를 대체할 목적으로 황금추출물을 사용하여 제조한 cosmeceuticals의 유효안정성과 항균성을 평가하였다. 일반적으로 oil-in-water (O/W) 유화액의 안정성은 유화액의 입자 주위에 흡착하는 유화제의 조밀성이 높을수록, 유화액의 입자 크기는 작을수록, 외상의 점도는 높을수록 증가한다. 즉, 유화액 입자 주위의 유화제의 조밀성은 강한 계면막을 형성하여 입자 간 충돌에 의한 합입을 방지하며, 작은 입자는 입자들 간의 분산력을 증가시킨다[5-6].

따라서 본 연구에서는 반응표면분석법 중 중심합성설계모델(central composite design model-response surface methodology, CCD-RSM)을 이용하여 황금추출물과 피부친화성이 우수한 천연유화제인 올리브 유화왁스를 사용한 cosmeceuticals의 제조공정을 최적화하고자 하였다. CCD-RSM을 수행하기 위한 독립변수로는 황금추출물 첨가량과 유화제 첨가량으로 설정하였으며, 이에 대한 반응치로는 유효안정도 지수(emulsion stability index, ESI)와 대장균 억제직경(*Escherichia coli* inhibition diameter)을 설정하였다.

2. 실험방법

2.1. Cosmeceuticals의 제조

황금추출물이 함유된 cosmeceuticals을 제조하기 위해 유상성분으로는 천연물인 땅콩유(peanut oil)를 사용하였으며, 유화제는 천연 올리브 유화왁스를 사용하였다. 총 질량 100 g에 대하여 유상과 수상의 비를 2:8로 설정하였으며, 황금추출물과 유화제를 각 조건별로 질량비에 맞춰 계량한 후 수상과 유상에 첨가하였다. 유화온도는 water bath (SL-WB6D, Sunil Science Co., Ltd)에서 각각 75 ± 0.5 °C로 예열한 다음 수상에 유상을 혼합시켜 호모게나이저(Homomixer Mark II, T.K. Primix)에서 5000 rpm으로 15분간 교반하여 제조하였다. 제조한 cosmeceuticals은 냉각한 후 항온조(25 ± 0.5 °C)에 안정화시킨 후 물성을 측정하였다.

2.2. 유효안정성 평가

유효안정성 평가를 위해 제조한 cosmeceuticals을 25 °C에서 7일간 방치한 후 식(1)과 같이 ESI를 계산하였다.

$$ESI (\%) = \left(1 - \frac{H_S}{H_E}\right) \times 100 \quad (1)$$

H_E 는 유화액의 전체의 높이(mm)이며, H_S 는 층분리된 유화액의 serum layer의 높이이며, ESI는 5회 반복 측정된 평균값을 사용하였다.

2.3. 항균성 평가

Cosmeceuticals의 항균성은 디스크 확산법(disk diffusion method)으로 측정하였다[7]. 항균시험에 사용한 균주는 KCTC (Korean collection for type cultures)에서 분양받은 대장균(*Escherichia coli*, *E. coli*)을 사용하였으며, 항균활성에 사용된 배지는 LB 배지(lysogeny broth

Table 1. CCD-RSM Variance Analysis of Regression Coefficients of the Various Response Values

Source	ESI (%)		<i>E.Coli</i> Inhibition Diameter (mm)	
	F-value	P-value	F-value	P-value
Module	17.13	0.001	67.33	< 0.0001
y_1	3.25	0.114	232.39	< 0.0001
y_2	54.25	< 0.0001	3.35	0.110
y_1^2	6.57	0.037	58.47	< 0.0001
y_2^2	22.44	0.002	52.99	< 0.0001
y_1y_2	1.86	0.215	2.14	0.187
Lack of fit	5.49	0.067	1.37	0.373
R^2	92.44		97.96	

medium)와 MHA 배지(Mueller-hinton agar)를 사용하였다. 대장균 균액의 농도는 0.5 McFarland standard를 이용하여 균액의 탁도를 조절하였다[8]. 배지에 대장균 50 μ L를 도말하여 균질화시킨 후 멸균된 직경이 6 mm인 paper disk를 배지 위에 놓은 후, 제조한 cosmeceuticals 25 μ L를 paper disk에 흡수시킨 후 37 °C의 incubator (HQ-DI84, SCIENTIFIC CO., LTD)에서 24시간 동안 배양하였다. 대조균은 증류수를 흡수시킨 paper disk로 하였다. 24시간 후에 paper disk 주위에 항균 활성에 의하여 형성된 대장균 억제직경(inhibition diameter)을 3회 측정된 평균값으로 항균성을 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. CCD-RSM 이용한 Cosmeceuticals 제조공정 최적화

천연항균제인 황금추출물을 함유한 cosmeceuticals 제조공정의 최적화 설계를 위해 CCD-RSM을 이용하였다. CCD-RSM 최적화 과정의 독립변수로는 황금추출물 첨가량과 유화제 첨가량으로 설정하였으며, 반응치로는 제조한 cosmeceuticals의 ESI와 대장균 억제직경을 설정하였다. 기초실험을 통하여 각 독립변수의 합리적인 범위를 결정하고 얻어진 실험 결과로부터 통계학적 수단으로 도출된 회귀방정식으로부터 독립변수와 반응치 간의 상관관계를 분석함으로써 cosmeceuticals 제조공정의 최적화 및 정확성을 판단하였다[9]. CCD-RSM을 이용한 최적화 과정에서 독립변수 범위는 황금추출물 첨가량(3~4 wt%)과 유화제 첨가량(2~3 wt%)을 설정하였다. 13개의 실험과정을 설계한 후 얻어진 결과를 CCD-RSM으로 회귀분석을 수행하여 얻은 결과를 Table 1에 나타내었다.

3.2. O/W 유화액의 유효안정성 및 항균성 최적화

Cosmeceuticals의 ESI를 최대화하는 최적조건을 찾기 위하여 CCD-RSM을 사용하여 다음의 회귀방정식을 얻었다.

$$ESI = -18.2 + 30.4y_1 + 47.02y_2 - 3.61y_1^2 - 6.67y_2^2 - 2.53y_1y_2 \quad (2)$$

여기서 독립변수 y_1 과 y_2 는 각각 황금추출물 첨가량(wt%), 유화제 첨가량(wt%)이다. Table 1의 각 독립변수들의 통계학적 분석결과 ESI에 대한 F-value는 $y_1 = 3.25$, $y_2 = 54.25$, $y_1y_2 = 1.86$ 이며 P-value는 $y_1 = 0.114$, $y_2 < 0.0001$, $y_1y_2 = 0.215$ 로 나타났다. 여기서 F-value와

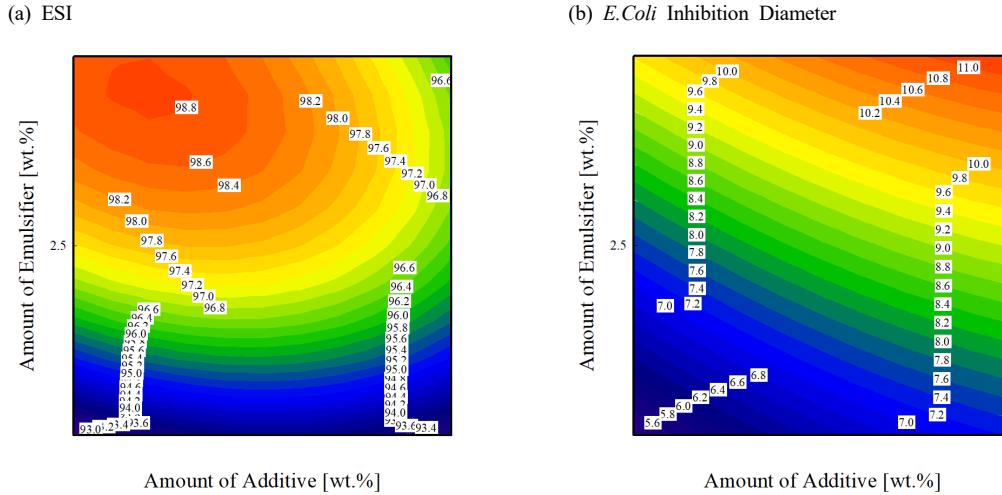


Figure 1. Contour graph of ESI and *E.coli* Inhibition diameter according to independent variables.

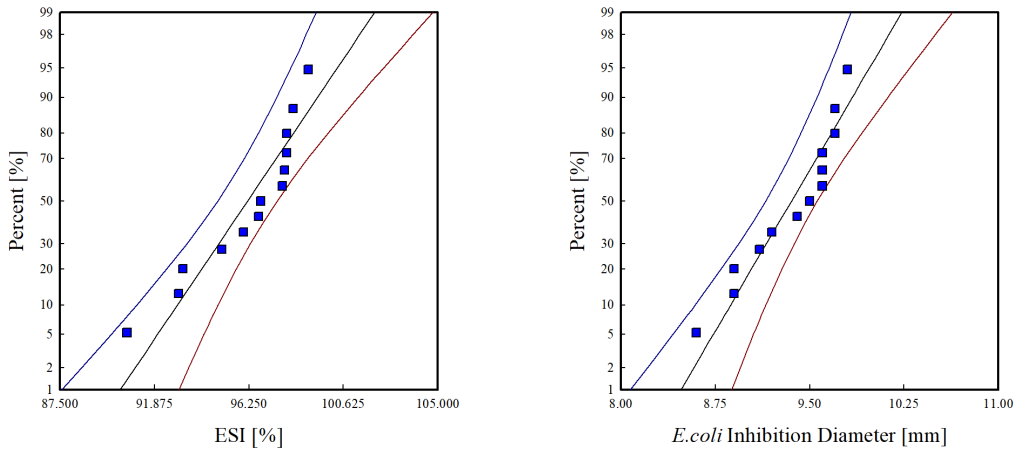


Figure 2. Scatter plot of in 95% confidence interval of ESI and *E.coli* Inhibition diameter.

P-value는 독립변수의 유의성을 나타내는 값으로서 F-value는 클수록, P-value는 작을수록 반응치에 끼치는 독립변수의 유의성이 높은 것으로 판정한다. R^2 은 결정계수로서 회귀방정식의 최적화를 나타내는 것으로서 이 값이 100에 가까울수록 적용한 회귀방정식의 신뢰성은 우수한 것으로 판정한다[10-11]. 따라서 ESI에 영향을 미치는 독립변수는 유화제 첨가량 > 황금추출물 첨가량 > (황금추출물 첨가량 × 유화제 첨가량) 순으로 크게 나타나 주효과도가 크게 작용한다고 볼 수 있다. 또한 결정계수 R^2 의 값은 92.44%으로 크게 나타났다. 위의 분석 결과를 확인하기 등고선도를 작성하여 Figure 1에 나타내었다. 그림에서 확인할 수 있듯이 위에서 설명한 통계학적 분석결과와 일치함을 알 수 있다. ESI는 황금추출물 및 유화제 첨가량 범위 내에서 93.0% 이상의 높은 안정성을 나타냄을 알 수 있다. 따라서 CCD-RSM에 의해 반응치인 ESI만을 고려한 최적 조건은 황금추출물 첨가량(3.9 wt%), 유화제 첨가량(2.3 wt%)이며, 이 조건에서 예측된 ESI의 최대 값은 98.9%으로 나타났다.

제조된 cosmeceuticals의 항균성은 대장균 억제직경으로 평가하였으며, 대장균 억제직경이 클수록 항균성은 우수한 것으로 판정하였다. CCD-RSM으로부터 산출된 항균성에 대한 회귀방정식은 다음과 같다.

$$D = -9.87 + 7.126y_1 + 4.605y_2 - 0.832y_1^2 - 0.792y_2^2 - 0.210y_1y_2 \quad (3)$$

여기서 D 는 대장균 억제직경(mm)이다. Table 1의 대장균 억제직경에 대한 F-value는 $y_1 = 232.39$, $y_2 = 3.35$, $y_1y_2 = 2.14$ 이며 P-value는 $y_1 < 0.0001$, $y_2 = 0.110$, $y_1y_2 = 0.187$ 로서 독립변수 중 주효과도(황금추출물 첨가량, 유화제 첨가량)가 이들의 교호효과보다 크게 나타났고, 주효과도 중에서는 황금추출물 첨가량이 유화제 첨가량보다 크게 나타났음을 알 수 있다. 따라서 대장균 억제직경에 영향을 미치는 독립변수는 황금추출물 첨가량 > 유화제 첨가량 > (황금추출물 첨가량 × 유화제 첨가량) 순으로 크게 나타났으며, 주효과도가 교호효과도보다 크게 작용한다고 볼 수 있다. 또한 결정계수 R^2 의 값은 98.0%로 크게 나타났다. CCD-RSM 최적화 과정을 통해 대장균 억제직경만을 고려한 최적조건은 황금추출물 첨가량(3.5 wt%), 유화제 첨가량(2.9 wt%)으로 산출되었으며, 이 조건에서 예측된 대장균 억제직경의 최대값은 9.8 mm이다.

Figure 2는 제조된 cosmeceuticals의 ESI와 대장균 억제직경에 대한 데이터의 신뢰성을 확인하기 위하여 95% 신뢰구간 내의 데이터의 분포상황을 나타내었다. CCD-RSM에 의한 실험설계로부터 얻은 ESI와 대장균 억제직경에 대한 95% 신뢰구간 내에서의 분포상황을 통계학

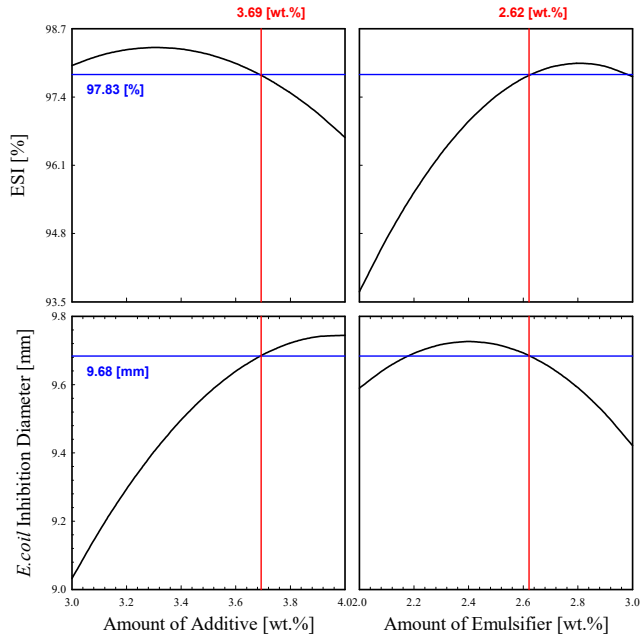


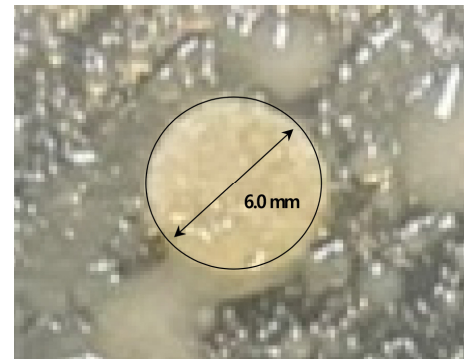
Figure 3. Multiple optimization graph of response surface for ESI and *E.coli* Inhibition diameter.

적 분포이론에 근거하여 평균값, 표준편차, AD (Anderson darling)값, 데이터의 전체 수(N), P-value 등을 고려하여 데이터의 신뢰성을 분석하였다. 표준편차는 데이터들의 분산 상태를 표시하는 척도로서 이 값이 작을수록 데이터들 간의 분산분포도는 작아지는 것으로 판단한다. AD값은 데이터의 예상분포구간 내에서의 분포균일성을 나타내는 것으로 이 값이 작을수록 해당분포구간 내에서 데이터들의 분포가 균일함을 뜻한다. P-value는 데이터가 목표분포구간 내에서 만족하는가를 나타내는 척도로서 관련된 회귀방정식이 정규분포에 만족하는지를 95% 신뢰구간 내에서 0.05를 기준으로 판단한다. 즉, P-value > 0.05인 경우, 데이터들이 목표분포에 만족하며 P-value < 0.05인 경우에는 데이터들이 목표분포에 만족하지 못하는 것으로서 관련된 회귀방정식의 통계학적 합리성을 판단한다[12]. 제조된 cosmeceuticals의 ESI의 경우 평균값은 96.1%, 표준편차는 2.578, AD값은 0.686, P-value는 0.055으로 합리적인 수치범위에 해당됨으로 산출된 데이터들이 정규분포를 따른다고 할 수 있다. 또한 결정계수 R^2 의 값도 92.44%으로 크게 나타났다. 또한 대장균 억제직경의 경우 평균값은 9.34 mm, 표준편차는 0.38, AD값은 0.679, P-value는 0.058로 합리적인 수치범위에 해당됨으로 산출된 데이터들이 정규분포를 따른다고 할 수 있다. 또한 결정계수 R^2 의 값도 97.96으로 크게 나타나 산출된 ESI와 대장균 억제직경에 대한 회귀방정식 모두 높은 신뢰성을 보이며 합리적이라고 판단할 수 있다.

3.3. 종합만족도 평가

위에서 고찰한 바와 같이 천연물인 황금추출물과 유화제 첨가량을 독립변수로 설정하여 본 연구에서 제조한 cosmeceuticals의 ESI와 대장균 억제직경에 관한 회귀방정식의 합리성 및 최적화가 확인되어 ESI와 대장균 억제직경을 모두 만족하는 다중반응의 최적화를 수행하여 Figure 3에 나타내었다. 다중반응의 최적화를 통하여 ESI와 대장균 억제직경을 모두 만족하는 최적 조건은 황금추출물 첨가량(3.7 wt%), 유화제 첨가량(2.7 wt%)으로 산출되었으며, 이 조건에서 예측된 ESI

(a) Control group



(b) Cosmeceuticals

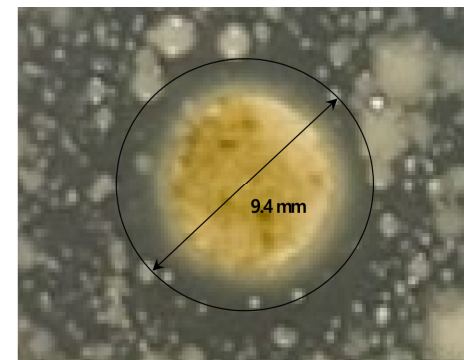


Figure 4. *E.coli* Inhibition diameter of cosmeceuticals containing *Scutellaria baicalensis*.

은 97.9%이고, 대장균 억제직경은 9.7 mm로 나타났다. 최적 조건에서 실제 실험을 진행한 결과 ESI 및 대장균 억제직경은 각각 95.0%와 9.4 mm로 측정되어 다중반응에 의한 예측값과의 평균오차율은 $3.2 \pm 0.4\%$ 로 나타났다.

Figure 4는 다중반응 최적조건에서 제조된 cosmeceuticals의 대장균 억제직경을 나타낸 그림이다. 그림에서 볼 수 있듯이 증류수를 사용한 대조군 디스크의 억제직경은 6.0 mm으로 변화가 없지만 황금추출물 함유된 cosmeceuticals의 경우 대장균 억제직경은 9.4 mm으로 나타났다. 이는 황금추출물 중 대장균에 대해 항균특성이 있는 baicalin의 영향으로 사료된다[13].

4. 결 론

CCD-RSM을 이용하여 대장균에 대한 항균능력이 있는 황금추출물이 첨가된 cosmeceuticals 제조 공정을 최적화한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 유화액의 ESI에 영향을 미치는 독립변수는 유화제 첨가량 > 황금추출물 첨가량 > (황금추출물 첨가량 × 유화제 첨가량) 순으로 크게 나타났다. 유화액의 ESI만을 고려한 최적조건은 황금추출물 첨가량(3.9 wt%), 유화제 첨가량(2.3 wt%)이었으며, 이 조건에서 예측된 ESI는 98.9%이다.

2. 대장균 억제직경에 영향을 미치는 독립변수는 황금추출물 첨가량 > 유화제 첨가량 > (황금추출물 첨가량 × 유화제 첨가량) 순으로 크게 나타났다. 대장균 억제직경만을 고려한 최적조건은 황금추출물 양(3.5 wt%), 유화제 첨가량(2.9 wt%)이었으며, 이 조건에서 예측된

대장균 억제직경은 9.8 mm이다.

3. 다중반응의 최적화를 통하여 예측된 유화액의 ESI와 대장균 억제직경을 동시에 만족하는 최적 유화조건은 황금추출물 첨가량(3.7 wt%), 유화제 첨가량(2.7 wt%)이었으며, 이 조건에 산출된 유화액의 ESI는 97.9%, 대장균 억제직경은 9.7 mm이었다. 최적 조건에서 실제 실험을 진행한 결과 유화액의 ESI 및 대장균 억제직경은 각각 95.0%와 9.4 mm로 측정되어 평균오차율은 $3.2 \pm 0.4\%$ 이었다.

References

1. M. Hendrix and J. Luo, Association between exposure to parabens and total mortality in US adults, *Environ. Res.*, **205**, 112415, (2022).
2. P. W. Harvey, Parabens, oestrogenicity, underarm cosmetics and breast cancer: A perspective on a hypothesis, *J. Appl. Toxicol.*, **23**, 285-288 (2003).
3. G. Iscan, Antibacterial and anticandidal activities of common essential oil constituents, *Rec. Nat. Prod.*, **11**, 374-388 (2017).
4. T. Zhao, H. Tang, L. Xie, Y. Zheng, Z. Ma, Q. Sun, and X. Li, *Scutellaria baicalensis* Georgi. (Lamiaceae): A review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology, *J. Pharm. Pharmacol.*, **71**, 1353-1369 (2019).
5. K. Nowak, E. Jabłońska, and W. Ratajczak-Wrona, Controversy around parabens: Alternative strategies for preservative use in cosmetics and personal care products, *Environ. Res.*, **198**, 110488, (2021).
6. F. Calvo, J. M. Gómez, L. Ricardez-Sandoval, and O. Alvarez, Integrated design of emulsified cosmetic products: A review, *Chem. Eng. Res. Des.*, **161**, 279-303 (2020).
7. H. L. Mobey, M. J. Cortesia, L. E. Roseuthal, and B. D. Jones, Characterization of urease from *Campylobacter pylori*, *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 831-836 (1988).
8. M. K. Lee and M. D. Kim, Evaluation of disk diffusion test with

glucose- and methylene blue-enriched mueller-hinton agar for susceptibility testing of fluconazole against candida isolates, *Korean J. Lab. Med.*, **25**, 247-251 (2005).

9. B. H. Yoo, C. Zuo, and S. B. Lee, Preparation of cosmeceuticals containing flos sophorae immaturus extracts: Optimizing using Box-Benken design model, *Appl. Chem. Eng.*, **31**, 404-410 (2020).
10. M. Yolmeh, M. B. H. Najafi, and R. Farhoosh, Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology(RSM), *Food Chem.*, **155**, 319-324 (2014).
11. M. O. Saeed, K. Azizli, M. Isa, and J. K. Bashir, Application of CCD in RSM to obtain optimization treatment of POME using Fenton oxidation processes, *J. Water Process Eng.*, **8**, 6-7 (2015).
12. Y. W. Choi and S. B. Lee, Antibacterial properties of extracts from *Abies holophylla* and *Pinus koraiensis* needles against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Appl. Chem. Eng.*, **35**, 248-254 (2024).
13. Y. Q. Wen, Y. Z. Wang, C. X. Zhao, B. Y. Zhao, and J. G. Wang, The pharmacological efficacy of baicalin in inflammatory diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 9317 (2023).

Authors

Seheum Hong; Ph.D., Professor, Department of Polymer Science and Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea; hong@dankook.ac.kr

Young Woo Choi; B.Sc., Master Course, Department of Chemical Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea; 7221166666@dankook.ac.kr

Wenjia Xu; M.Sc., Researcher, Department of Chemical Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea; m17835332975@163.com

Seung Bum Lee; Ph.D., Professor, Department of Chemical Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea; leesb@dankook.ac.kr