

최 종
연구보고서

소나무 폐수피의 환경친화적 처리에 의한
고기능성 성분의 생산과 이들의 기능성
화장품 원료로서의 이용기술 개발

Production of High Functional Compounds from Pine Bark
Waste by Environmentally Friendly Treatment and Their
Application as Functional Cosmetic Material

연구기관
전북대학교

농림자료실



0013405

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “소나무 폐수피의 환경 친화적 처리에 의한 고기능성 성분의 생산과 이들의 기능성 화장품 원료로서의 이용 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 24일

주관연구기관명 : 전북대학교

총괄연구책임자 : 문 성 필

세부연구책임자 : 문 성 필

연 구 원 : 구 창 섭

연 구 원 : 장 정 필

요 약 문

I. 제 목

소나무 폐수피의 환경 친화적 처리에 의한 고기능성 성분의 생산과 이들의 기능성 화장품 원료로서의 이용 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내 목재공업 및 관련산업에서 발생하는 소나무 폐수피는 연간 수십만톤에 이르며(조남석, 1998), 이들 중 일부만이 토양개량제 또는 토양 멀칭재료로 이용되고 있다. 나머지 대부분의 폐수피는 소각되거나 매립되어 환경오염을 가중시키고 있다(Hassan & Mun, 2002). 특히 소각에 따른 이산화탄소의 배출은 선진국을 중심으로 국제적인 규제가 시작되어 우리나라의 경우에도 앞으로 이들 온실가스배출 규제를 받게 되어있다. 따라서 이들 수피의 소각이나 폐기는 점점 더 어렵게 되어 이들 수피의 유효이용 및 그 이용기술 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

한편, 일부 특정 소나무재 수피의 열수추출물(hot water extract, HWE)은 최근에 항산화제, 혈당강하제, 항염증제, 성장촉진제, 탈모방지제 등으로써 많은 주목을 받고 있으며, HWE의 이러한 항산화 효과는 flavan-3-ol 단위체가 C4-C8 결합된 형태의 페놀성 화합물인 proanthocyanidin(PA)에 의한 것으로 알려져 있다(Ku & Mun, 2004). 따라서 소나무 폐수피를 이용한 PA의 추출 및 그 추출물의 이용은 상당히 고부가가치 산업이 될 수 있을 것으로 전망된다.

현재 국내의 경우 매년 소비되는 목재의 90%이상을 수입에 의존하고 있다(황병호 등, 1998). 특히 소나무재는 건축용재로서, 펄프, 제지공업에서 또한 보드재료로서 엄청난 양이 사용되고 있으며, 그 수피 발생량 또한 수십만 톤에 이른다. 특히 라디아타 소나무재는 국내 수입 원목 중 약 50%를 차지하고 있으며 원목의 10-15%에 해당하는 수피부는 박피공정 중에 배출된다(심중섭 등, 1987).

본 연구는 국내산 소나무재를 비롯하여 수입산 소나무재에서 과생되는 다양한 종류의 소나무재의 수피로부터 가장 경제성이 있고 생리활성이 뛰어난 수피를 선별하여 그 성분을 특성화하고 기능성 화장품 원료로서 적용하기 위한 제반 실

험을 실시하여 폐수피 자원을 고부 가치적으로 이용하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 소나무 폐수피를 이용한 고기능성 성분의 생산과 이들의 기능성 화장품 원료로서의 이용기술 개발을 하고자 수행하였으며 그 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

1. 유효 수피추출물의 최적 제조조건의 확립과 추출성분의 특성화

- 1) 다양한 수피의 열수 추출물 제조 및 항산화 활성 비교
- 2) 최적 수피의 선발과 추출 조건 확립
- 3) 최적 수피 추출물의 특성화

2. 수피 추출물의 다양한 생리활성 평가

- 1) 수피 추출물의 분자량에 따른 분획
- 2) 친환경 용매에 의한 고순도 수피 추출물의 제조
- 3) 다양한 라디칼을 이용한 항산화 활성 평가
- 4) 콜라겐, 엘라스틴과 같은 진피 성분에 대한 안정화 효과
- 5) 미백 효과 (tyrosinase저해 활성 및 melanoma cell과의 상호작용)
- 6) 섬유아세포에 대한 세포독성 혹은 증식 효과
- 7) 수피 추출물의 분획물의 UV A/B 흡수 잠재 효과 검토 (UV 스펙트럼 측정)

3. 수피 추출물로부터 기능성 화장품의 개발

- 1) 수피 추출물을 주성분으로 이용한 기능성 화장품 제조
- 2) 수피 추출물을 이용한 기능성 화장품의 피부 적용 실험
- 3) 피부 적용 실험을 근거로 한 기능성 평가

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

소나무 폐수피의 환경 친화적 처리에 의한 고기능성 성분의 생산과 이들의 기능성 화장품 원료로서의 이용 기술 개발에 관한 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었으며 이에 근거하여 활용에 대한 건의를 하였다.

- 1) 적송, 리기다 소나무 및 라디아타 소나무 수피의 HWE가 강력한 항산화 효과를 나타내었다.
- 2) 소나무 수피의 강력한 항산화 효과는 수피 중의 PA에 의한다는 것을 입증하였다.
- 3) 라디아타 소나무 수피가 그 추출물 이용에 있어서 가장 경제성 있는 것으로 판명되었다.
- 4) PA는 알카리영역에서 환의 개열 및 급속한 산화가 일어나므로 중성 용매계에 의한 추출이 바람직하며, 열수추출과 같은 친환경적인 방법으로 추출물을 대량으로 얻을 수 있었다.
- 5) PA를 수피로부터 대량으로 얻기 위해서는 시료의 입자는 20-80 mesh, 추출 온도 80-100℃, 추출 시간 1시간, 액비 10정도의 조건이 최적으로 생각되었다.
- 6) 활성 성분인 PA는 Sephadex LH 20 겔에 흡착시켜 50% 아세톤으로 용리하여 용이하게 분리 정제할 수 있었다.
- 7) 분리 정제한 라디아타 소나무 수피 PA는 다음과 같은 특성을 가지고 있었다.
 - ① 라디아타 소나무 수피 PA는 수피 열수 추출물의 약 57%를 차지하는 주성분이었다.
 - ② PA는 procyanidin골격이 C4-C8결합한 형태이며, 주로 *trans*형을 이루고 있었다.
 - ③ ¹³C NMR연구에 의하여 수피 PA는 procyanidin골격이 94%, prodelphinidin골격이 6%정도로 주로 B환이 카테콜 골격을 하고있는 구조를 이루고 있었다.
 - ④ PA의 중량평균 분자량, 3,800, 수평균 분자량 1,200, 다분산도 3.2, 중합도 (DP) 13을 나타내었다.
 - ⑤ MALDI-TOF MS에 의하여 PA 전체 분자량을 해석하기는 어려웠지만, 본 화합물이 주로 procyanidin골격구조를 가지는 것과 prodelphinidin이 혼재해 있는 것을 확인할 수 있었다.
 - ⑥ 분리 정제된 PA는 시판 비타민 C와 비교할 수 있는 강력한 항산화 활성을 가지고 있었다.
- 8) 열수 추출물 중 PA의 분리 후 저분자 화합물을 검토한 결과는 다음과 같다.

- ① HWE의 주된 페놀류는 *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, protocatechuic acid, *cis*-ferulic acid, *p*-coumaric acid, *trans*-ferulic acid, *trans*-caffeic acid의 저분자 페놀산류였으며, 그 주성분은 protocatechuic acid였다.
- ② 플라보노이드류로서는 *trans*형의 taxifolin이 주성분을 이루고 있었다. 다음으로 많은 성분으로는 quercetin이었다. 소량의 페놀성 성분은 GC, GC-MS등에 의하여 (+)-catechin, (-)-epicatechin, *cis*-taxifolin, (+)-gallocatechin, (-)-epigallocatechin, *trans*- 및 *cis*-leucodelphinidin, astrigenin, astrigenin glycoside 등과 같은 화합물이 검출되었다.
- 9) 라디아타 소나무 수피로부터 proanthocyanidin(PA) 함량이 90%이상인 수용성 및 에탄올 가용성 추출물을 제조하였다.
- 10) DPPH, ABTS⁺, superoxide 음이온 라디칼, 과산화수소, 지질 산화 억제, 환원력, ferrous 이온과의 킬레이트 형성을 평가하여 소나무 수피 추출물이 강력한 항산화 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다.
- 11) PA를 90%이상 함유한 소나무 추출물은 멜라닌을 형성하는 효소인 tyrosinase를 비경쟁적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.
- 12) 수피 추출물이 melanocyte의 수상돌기(dendrite) 발달을 억제하는 것을 현미경상에서 확인할 수 있었으며 이로부터 수피 추출물은 각질층으로의 melanosome의 전이를 막아주는 미백용 화장품 원료로 활용될 수 있을 것으로 판단하였다.
- 13) 수피 추출물이 NIH/3T3 섬유아세포에 대해 1,250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 150-250%의 높은 세포 증식효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.
- 14) 수피 추출물의 주성분인 PA는 콜라겐에 대해 217 mg/g의 높은 흡착량을 나타내었으며 그 흡착 거동이 가역적이나 흡착력은 매우 강한 것을 알 수 있었다.
- 15) 수피 추출물은 콜라겐에 흡착된 후 콜라겐나제와 유해 라디칼로부터 콜라겐을 안정화하는 것을 확인할 수 있었다.
- 16) 수피 추출물은 엘라스틴을 엘라스타제로부터 안정화하는 것으로 나타났으며 이때 사용된 수피 추출물의 분자량이 클수록 높은 안정화 효과를 나타내었다.
- 17) 수피 추출물 중 저분자 구분인 MPP는 UV B에 대해 280 E[%]cm로 다소 높은

자외선 차단 효과를 나타내었다.

- 18) DPPH 자유 라디칼 소거능으로 평가한 수피 추출물의 항산화 활성의 안정성 결과로부터 482시간 동안 90%이상의 활성을 유지하는 것을 알 수 있었다.
- 19) 소나무 수피 추출물을 화장품 원료로 사용하기 위하여 극성 유기용매의 조합이 필요하였다.
- 20) 다양한 용매 등과의 상용성을 검토하여 스킨 앰펜스, 크림 및 세럼(serum) 제조를 위한 기본 제형을 완성하였다.
- 21) 화장품의 기능성 증대 및 시너지 효과를 위하여 기존 및 신규 기능성 원료를 배합할 수 있는 조건을 완성하였다.
- 22) 다양한 조건의 검토 결과 완성된 시제 화장품을 20명의 피험자에게 시험한 결과 뛰어난 미백효과 및 주름 개선 효과가 관찰되었다.
- 23) 설문 조사결과 대부분 시제품에 대하여 높은 만족도를 나타내었으며, 특히 수피 추출물에 의한 화장품의 색상은 전혀 문제가 되지 않았다.

본 연구의 결과로부터 소나무 수피 추출물을 기능성 화장품 원료로 적용 가능하다는 결론을 얻을 수 있었으며 특히 melanocyte와 수피 추출물 간의 상호 작용을 통한 멜라닌의 피부 착색을 예방할 수 있다는 연구는 기존에 알려진 미백용 화장품과 학계에서의 이론적인 접근 방식과 달리 새로운 메커니즘에 대한 제시를 한 것으로 앞으로 이 부분에 대한 보다 구체적인 연구를 진행하게 된다면 산업적인 브랜드화와 학술적인 발전에도 크게 기여할 수 있을 것이라 판단된다. 또한, 수피 추출물이 extracellular matrix(ECM) 즉, 콜라겐과 엘라스틴의 흡착기작을 통해 이들을 분해 효소로부터 안정화 시킬 수 있으므로 앞으로 의학적 산업 부문에서 이들 ECM에 의해 유발되는 질병을 치료할 수 있는 제약 개발이 가능하리라 판단된다. 더욱이 2년차 생리 활성 연구와 3년차의 피부 임상 실험 결과가 서로 잘 일치하는 것으로부터 이러한 제안이 가능하리라 사료된다. 수피 추출물이 다양한 라디칼에 대해 매우 강력한 항산화 활성을 나타냄으로 이 추출물을 건강식품 혹은 식품 첨가제로 개발하게 된다면 그 용도를 보다 다양화할 수 있을 것으로 보인다. 이처럼 본 연구를 통해 소나무 수피 추출물은 기능성 화장품 원료뿐만 아니라 식품·의약품으로 개발할 수 있는 충분한 여지를 두고 있다는 것을 알 수 있으며 이부분에 대한 보다 진보적인 연구가 앞으로 이루어진다면 다양한 분야에 응용가능하리라 사료되었다.

SUMMARY

This study focused on estimating pine bark extracts as a useful material for skin biology and searching a higher value-added application of pine bark, a great deal of by-product in wood industry.

The outer barks prepared from the 11 *Pinus* species, which are being used in wood industry or/and autogenous or experimentally planted in Korea, were estimated to search extractable and polyphenol-rich pine bark. *Pinus radiata* bark was the most suitable for extraction of biologically active material due to high polyphenol content and potent antioxidant activity. Temperature was considered as a significant factor to prepare water extract (WE) from *Pinus radiata* bark, and quality of the WE was estimated by polyphenol content, molecular weight distribution and antioxidant activity. These determinants for quality of the WE were calibrated by a sigmoidal (Boltzman equation) mode at $R^2 = 0.99$. Proanthocyanidin (PA) content in the WE at each temperature reached to extraction saturation at 80°C. The extraction at above 100°C caused a polymerization reaction in the bark slurry during extraction process, confining molecular weight (Mw) of extractable PA and leading relatively to increasing extraction of monomeric polyphenols. The WE obtained at 80°C showed the highest antioxidant activity. Extraction temperature suitable for preparation of WE from pine bark was considered as 100°C due to significance of Mw of PA in biological activity. PA, a major component of *Pinus radiata* bark, was characterized using various instruments. PA in hot water extract (HWE) from *Pinus radiata* bark comprised procyanidin (PC, 94%) and prodelphinidin (PD, 6%) and the higher *trans* configuration rather than the *cis* configuration of C2-C3. The average molecular weight (Mw, Mn), polydispersity (Mw/Mn) and degree of polymerization (DP) of the PA were 3,800 (Mw), 1,200 (Mn), 3.2 and 13, respectively. Low molecular weight polyphenols in the HWE were mainly composed of procatechuic acid, *trans*-taxifolin and quercetin. Small amounts of the polyphenols identified

were *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, *cis*- and *trans*-ferulic acids, *p*-coumaric acid, *trans*-caffeic acid, (-)-epicatechin, (+)-catechin and (+)-gallocatechin. The presence of astringenin, astringenin glycoside, *trans*- and *cis*-leucodelphinidin was strongly assumed from characteristic mass fragment ions due to their conjugated structures induced from retro Diels-Alder reaction. Polyphenolic fractions in the HWE could be fractionated into monomeric polyphenol (MPP), oligomeric proanthocyanidin (OPA) and polymeric proanthocyanidin (PPA) by their characteristic elution pattern via Sephadex LH 20 column. MPP was composed of 3 phenolic acids and 6 flavonoids. Taxifolin (456 $\mu\text{g}/\text{mg}$), catechins (240 $\mu\text{g}/\text{mg}$) and protocatechuic acid (46 $\mu\text{g}/\text{mg}$) were major compounds of MPP. OPA ranged from dimer to hexamer. Structural characterization of PPA was already mentioned above. All the polyphenolic fractions showed potent antioxidant activity against different radical species (DPPH, ABTS $^{\cdot+}$, O $_2^{\cdot-}$ and H $_2$ O $_2$), strong reducing power and inhibitory activity of lipid peroxidation. OPA significantly ($p < 0.05$) scavenged hydrogen peroxide and PPA delayed the lipid peroxidation in oil-in-water emulsion via a quenching pathway of reactive oxygen radicals to participate in the formation of peroxides. Adsorption capacity of PA onto collagen (major component of skin dermal layer) was determined by employing Lagergren, Pseudo-second order and Langmuir models. The maximum adsorption capacity of PA on collagen was found to be 217 mg/g. Comparison among these fractions (MPP, OPA and PPA) clearly exhibited Mw-dependent tendency in stabilizing collagen against collagenase and, particularly, PPA played a key role in stabilizing the extracellular matrix (ECM, collagen and elastin) in dose-dependent manner. Adsorption of PPA onto the ECM is a significant mechanism for its protection against enzymatic degradation and reactive oxygen species. All the fractions stimulated cell proliferation of NIH/3T3 fibroblast. The cell proliferation may be due to potent hydrogen peroxide scavenging capacity and structural self-stabilization (transformation of B-type to A-type PA) in relation to low level of prooxidant state. Noticeable retraction of melanoma cell dendrite was found, leading to

morphological transformation. In this study, this finding was first recognized as a novel mechanism that PA-rich extracts can exert whitening effect in skin by retracting the melanoma cell dendrite. In particular, OPA significantly adhered on surface of the melanoma cell. The inhibition kinetics of PPA analyzed by a Lineweaver-Burk plot indicated that PPA is a non-competitive inhibitor for L-DOPA oxidation by mushroom tyrosinase.

Formulation containing pine bark extract for use in cosmetic fields was optimized, and it was applicable for skin essence, cream and serum. Synergic effect and functional improvement of the formulation could be expected by mixing it with other additional components. The formulation was used for skin test of twenty volunteers. Superior whitening and anti-wrinkle effects were observed for most of the volunteers. In particular, it was noticeable that a few volunteers having a hyperpigmented skin showed an improved effect of melasma. These effects may be associated with *in vitro* biological activities of pine bark extract.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction-----	16
Section 1. Objective and significance of the study-----	16
1. Technical viewpoint-----	16
2. Commercial viewpoint-----	17
3. Social and cultural viewpoint-----	18
Section 2. Scope of research and development-----	19
Chapter 2. Present condition of technique-----	20
Section 1. Present condition and problem of the related technique-----	20
Section 2. Prospect in future-----	21
Chapter 3. Research contents and results-----	22
Section 1. Optimization of pine bark extraction and characterization of the extract-----	22
1. Introduction-----	22
2. Materials and methods-----	23
2.1 Materials-----	23
2.2 Chemical composition of pine bark-----	24
2.3 Optimal extraction condition of <i>Pinus radiata</i> bark and structural analysis of the extracts-----	25
2.4 Large-scale preparation of HWE under the optimal extraction condition and characterization of the extract-----	27
3. Results and discussion-----	33
3.1 Chemical composition of various pine bark-----	33
3.2 Yield, total phenolic and PA contents, and antioxidant activity of HWE from various pine bark-----	35
3.3 Extraction optimization of <i>Pinus radiata</i> bark-----	39
3.4 Analysis of HWE from <i>Pinus radiata</i> bark-----	45

3.5 Sugar and inorganic contents-----	61
4. Subconclusions-----	66
Section 2. Various biological activities of pine bark extract-----	68
1. Introduction-----	68
2. Materials and methods-----	68
2.1 Preparation of PA-rich pine bark extract-----	68
2.2 Antioxidant activity-----	69
2.3 Whitening effect-----	73
2.4 Anti-wrinkle effect-----	76
2.5 Additional experiment for preparation of a functional cosmetic----	81
2.6 Stability of pine bark extract in polar solvents-----	81
3. Results and discussion-----	81
3.1 Preparation of PA-rich pine bark extract-----	81
3.2 Fractionation of HWE to polyphenolic fractions with different molecular weight distributions and their structural characterization-----	82
3.3 Antioxidant activity-----	84
3.4 Whitening effect-----	95
3.5 Anti-wrinkle effect-----	103
3.6 Adsorption of UV A/B-----	132
3.7 Stability of pine bark extracts in polar solvents-----	133
4. Subconclusions-----	134
Section 3. Development of functional cosmetic containing pine bark extract-----	135
1. Introduction-----	135
2. Materials and methods-----	135
2.1 Materials-----	135
2.2 Solubility of pine bark extract-----	136
2.3 Optimal content and color stability of pine bark extract-----	136
2.4 Compatibility test of pine bark extract with other components---	136
2.5 Formulation search-----	137

2.6 Skin test of formulation-----	138
2.7 Enquetes-----	143
3. Results and discussion-----	143
3.1 Solubility and stability of pine bark extract-----	143
3.2 Optimal content of pine bark extract-----	148
3.3 Compatibility of pine bark extract with other components-----	149
3.4 Search of optimal formulation-----	153
3.5 Skin test-----	166
3.6 Enquetes-----	177
4. Subconclusion-----	192
Chapter 4. Achievements and contributions-----	199
Chapter 5. Applications-----	201
Chapter 6. International trend and scientific information-----	203
Chapter 7. References-----	213

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요-----	16
제 1 절 연구개발의 필요성-----	16
1. 기술적 측면-----	16
2. 경제·산업적 측면-----	17
3. 사회·문화적 측면-----	18
제 2 절 연차별 연구 개발 목표와 내용-----	19
제 2 장 국내외 기술개발 현황-----	20
제 1 절 국내·외 관련 기술의 현황과 문제점-----	20
제 2 절 앞으로의 전망-----	21
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과-----	22
제 1 절 유효 수피추출물의 최적 제조 조건의 확립과 추출 성분의 특성-----	22
1. 서론-----	22
2. 재료 및 방법-----	23
가. 공시 재료-----	23
나. 수피의 화학 조성-----	24
다. 라디아타 소나무 수피의 최적 추출 조건과 추출물의 구성 성분 분석-----	25
라. 최적 추출 조건에서의 HWE의 대량 제조와 그 특성-----	27
3. 결과 및 고찰-----	33
가. 다양한 소나무 수피의 화학 조성-----	33
나. 다양한 소나무 수피의 HWE 수율, 총 페놀성 화합물 함량, PA 함량 및 항산화 활성-----	35
다. 라디아타 소나무 수피의 추출 조건-----	39
라. 라디아타 소나무 수피 HWE의 분석-----	45
마. 당과 무기물 함량-----	61
4. 소괄-----	66
제 2 절 수피 추출물의 다양한 생리 활성 평가-----	68

1. 서론-----	68
2. 재료 및 방법-----	68
가. 소나무 수피로부터 고농도 PA의 제조-----	68
나. 항산화 활성-----	69
다. 미백 효과-----	73
라. 주름 개선 효과-----	76
마. 기능성 화장품 제조와 관련된 제반 실험-----	81
바. 극성 용매 중 수피 추출물의 안정성 평가-----	81
3. 결과 및 고찰-----	81
가. 소나무 수피로부터 고농도 PA 추출물의 제조-----	81
나. HWE의 분자량에 따른 분획과 그 구조의 특성화-----	82
다. 항산화 활성-----	84
라. 미백 효과-----	95
마. 주름 개선 효과-----	103
바. UV A/B 흡수 잠재 효과-----	132
사. 극성 용매 중 수피 추출물의 안정성 평가-----	133
4. 소괄-----	134
제 3 절 소나무 수피 추출물로부터 기능성 화장품의 개발-----	135
1. 서론-----	135
2. 재료 및 방법-----	135
가. 공시재료의 제조-----	135
나. 수피 추출물의 용해도-----	136
다. 수피 추출물의 적정 농도 및 색상 안정성-----	136
라. 수피 추출물과 타 화장품 원료 혼합 실험-----	136
마. 제형연구실험-----	137
바. 시제 화장품의 효과 검증-----	138
사. 시제 화장품의 사용 설문 조사-----	143
3. 결과 및 고찰-----	143
가. 소나무 수피 추출물의 용해도 및 안정성-----	143
나. 수피 추출물의 적정 농도-----	148
다. 수피 추출물과 타 화장품 원료 혼합에 따른 특성-----	149

라. 제형 연구 실험-----	153
마. 시제 화장품의 피부 적용시험-----	166
바. 시제 화장품 사용 후 설문지 조사 결과-----	177
4. 소괄-----	192
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	199
제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	201
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	203
제 7 장 참고문헌-----	213

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

우리나라 산림면적은 6,456천ha로써 전 국토 면적 9,931천ha의 약 65%를 점유하고 있다. 소유별로 살펴보면 국가 소유인 국유림이 1,386천ha로 21%이고, 군이나 지방자치단체 소유인 공유림은 492천ha로 8%, 그리고 개인들이 소유하고 있는 사유림이 4,578천ha로 전체의 71%를 점유하고 있다. 한편, 임상별로는 침엽수림이 2,883천ha로 46%를 점유하고 있으며, 혼효림은 1,714천ha(27%), 활엽수림은 1,669천ha(27%), 죽림 8천ha로 구성되어있다. 산림축적은 296백만m³로서 침엽수림이 134백만m³, 활엽수림이 83백만m³, 혼효림이 79백만m³을 차지하고 있으며, 소유별 산림축적을 보면 사유림이 180백만m³로 전체의 60%를, 국유림이 97백만m³으로 33%를, 공유림이 21백 만m³로 7%를 차지하고 있다.

우리나라의 원목사용량은 65년도에 1,259천m³에 불과했던 것이 '92년말에는 8,883천m³으로 무려 7배나 증가되었으며 이는 주로 합판용재 및 펄프용재의 급격한 수요신장에 기인한다. 그러나 이와 같은 원목사용 총량 중 국내에서 생산되어 공급된 량은 65년도에 503천m³로 자급율 40%에 이르렀으나 94년도 말에는 자급율이 오히려 13%에 불과한 실정이며 나머지는 외국에서 수입하여 쓰고 있는 실정이다. 앞으로 2030년대의 원목사용량은 23,500천m³에 이를 것으로 추정되고 있으며 내재공급량도 10,852천m³까지 확충하여 자급율을 높혀 나갈 계획이다. 그러나 21세기 산림비전에 의하면 총 목재사용량에 대한 국내 자급율은 2007년까지 10%이하를 유지하고 점차 자급율을 제고하여 2030년 22.4%, 2050년 30%로 국산재 공급을 늘여 나갈 계획이라고 한다. 따라서 국내 목재 자급률은 2030년까지도 60%미만을 유지할 것으로 판단된다.

그러나 국내 목재 수요량의 약 87%를 수입에 의존하고 있는 현 실정에서 세계원목 시장의 변화에 따른 목재 수입지역의 다변화, 해외의 자원 개발 및 국산재 활용증대 등이 검토되어 왔다. 최근 열대림보호와 관련하여 남양재의 별채규제, 가격안정 등으로 인하여 국내로 반입되는 활엽수 원목이 대폭적으로 감소되면서 주로 침엽수로 구성된 북양재의 수입과 함께 뉴질랜드산 라디아타 소나무

원목의 수입이 연간 300만 m³이 넘어서고 있으며, 앞으로는 계속하여 늘어갈 전망이다. 현재 라디아타 소나무는 수입 원목의 약 50%를 차지하고 있으며 이들은 주로 건축, 가설, 토목, 포장, 중밀도섬유판 및 펄프생산에 이용된다. 비록 라디아타 소나무가 수입 원목일지라도 국내로 반입된 이후에는 결국 비싼 외화를 투자해서 구입한 우리의 자원이라는 측면에서 이들에 대한 보다 효율적인 이용이 절실히 요구된다.

원목 사용량의 추이

단위: 천 m³

구분	1965	1970	1980	1994	2030
총수요량	1,259	4,000	7,750	8,883	23,500
내재	503	845	1,008	1,173	10,852
외재	756	3,155	6,742	7,710	12,648
자급율	40	21	13	13	46

근래 국내 원주에 100 m³의 대규모 소나무 칩 공장이 설립되었으며, 이 공장에서부터 발생하는 수피는 일일 35 m³, 월 1,000 m³에 달하고 있는 실정이며, 전국에 분포하는 펄프제지 공업 및 목재관련산업에서 대량으로 파생되는 소나무 수피량을 감안한다면 그 양은 수십만 톤에 이를 것으로 예상된다. 소나무의 박피 후 얻어지는 이들 폐수피들 중 일부는 토양개량제 또는 토양멸칭재료로 이용되지만, 나머지는 소각 및 매립되어 환경오염을 가중시키고 있는 실정이다. 따라서 현재 이들 폐수피에 대한 새로운 용도 개발이 절실히 요구되고 있다. 또한 국내에서 소비되고 있는 소나무의 많은 부분은 라디아타 소나무에 해당하므로 이들 라디아타 소나무 폐수피의 유효이용 및 이들 관련 제품의 생산을 통한 부가가치 창출은 앞으로 매우 필요하리라 생각된다.

2. 경제·산업적 측면

현재 국내 펄프제지 공업 및 목재관련 산업에서 대량으로 파생되는 폐수피는 국제적인 이산화탄소 총량 규제에 따라 앞으로 에너지원으로서의 대량 소각은 어려울 것으로 예상된다. 따라서 이들의 유효 이용을 위한 다양한 연구개발이 필연적이라고 생각된다.

소나무 폐수피가 경제·산업적으로 많은 흥미를 끄는 이유로는 1) 폐기물이면

서도 인체에 유해한 성분이 거의 없으며 2) 대량으로 수집가능하며, 3) 수피 추출물 중 많은 성분들은 다양한 생리활성을 가지므로 화장품 원료로서 충분히 이용 가능하다고 하는 점이다. 따라서 이들 수피 추출물의 환경 친화적인 추출방법의 개발과 이들의 추출물의 용도 개발이 가능하다면 경제적 및 산업적으로도 큰 도움이 될 것이다. 본 연구 과제에서는 1) 라디아타 소나무 수피로부터 유효 추출성분의 환경친화적인 분리 정제 방법의 개발, 2) 수피 추출물과 기타 첨가제를 혼합하여 보다 기능성이 우수한 화장품을 개발하였으며 이를 통하여 국내에서 발생하는 라디아타 소나무 폐수피의 고부가가치 창출에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

소득 수준의 향상과 삶의 질이 개선됨에 따라 소비자들은 천연물을 이용한 제품에 대해 높은 선호도를 보이고 있으며 국내 업체들 또한 소비자들의 욕구에 상응하는 제품을 생산하고자 방안을 강구하고 있는 실정이다. 이러한 면에서 본 연구 과제에서 수행하고자하는 미백용 화장품의 개발은 국내외 업체의 주목을 받을 것으로 판단되며 앞으로 본 연구에서 얻어진 데이터베이스를 관련 산업계의 기술 지원에 활용하게 된다면 대량의 폐수피 자원을 재활용하는 방안을 마련하는 한편 국민 건강의 질을 보다 향상시키는데 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

3. 사회·문화적 측면

임업분야는 천연물의 재활용 분야에 있어 충분한 자원을 확보하고 있음에도 불구하고 이에 대한 연구가 활발하지 못한 실정이다. 그 주원인으로는 1) 전문 연구 인력의 부족, 2) 막대한 연구비용, 3) 목재 분야의 연구 지원 업체의 영세한 자본 등을 들 수 있다. 그러나 본 연구를 통해 폐수피 자원의 추출물이 다양한 친환경 제품으로 전환될 수 있다고 하는 새로운 인식을 일반인들에게 심어줄 수 있을 것을 생각된다. 앞으로 목재의 9-15%의 매우 큰 비중을 차지하는 수피를 폐자원으로 생각하던 많은 사람들에게 수피에 대한 새로운 인식을 심어 줌으로서 낙후된 임업 분야에 대한 투자를 늘릴 수 있는 기회를 제공할 수 있을 것을 생각된다. 또한 폐수피를 이용한 다양한 연구가 진행되어 이 부분에 대한 인지도가 높아진다면 차후 임업 분야의 활성화 및 전문인력 양성에 크게 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 더 나아가 수피를 다루는 학문이 체계적으로 자리 잡을 수 있는 기회를 제공할 수 있을 것으로 본다.

제 2 절 연차별 연구 개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2004)	유효 수피추출물의 최적 제조조건 확립과 추출성분의 특성화	① 수피 추출물 제조 분쇄: 여과 및 높은 수율 조건에 부합할 수 있는 시료 입자 크기 선별 추출: 물과 에탄올 (친환경 용매) 농축: 용매 제거 건조: 동결건조를 통한 시료의 안정성 확보 ② 수피 추출물의 화학 조성 분획: 시료 성분의 세분화 정제: 유효 성분의 구분을 통한 고부가가치화 분석: 수피 추출물 중 화학 성분의 특성화
2차년도 (2005)	수피 추출물의 다양한 생리활성 평가	① 다양한 라디칼을 이용한 항산화 활성 평가 ② 콜라겐, 엘라스틴과 같은 진피 성분에 대한 안정화 효과 ③ 미백 효과 (tyrosinase저해 활성 및 melanoma cell과의 상호작용) ④ 섬유아세포에 대한 세포독성 ⑤ 수피 추출물의 분획물의 UV A/B 흡수 잠재 효과 검토 (UV 스펙트럼 측정)
3차년도 (2006)	수피 추출물로부터 기능성 화장품의 개발	① 수피 추출물을 주성분으로 이용한 기능성 화장품 제조 ② 수피 추출물을 이용한 기능성 화장품의 피부 적용 실험 ③ 피부 적용 실험을 근거로 한 기능성 평가

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

대부분의 수피는 전술한 바와 같이 유용한 자원으로서 보다는 불필요한 폐기물로 생각되어 왔으며, 연료 및 소량의 유기질 비료 이외에는 폐기처리가 오히려 심각한 문제로 대두되었다. 그러나 최근 들어 환경 문제에 대한 관심이 모아지면서 수피 폐자원을 이용하려는 연구가 국내외적으로 진행되어 소나무 수피의 주 성분인 탄닌은 자가 축합형 페놀수지 접착제의 원료로서 주로 브라질, 남아메리카, 오스트레일리아, 남아프리카 등지의 국외에서 상업적으로 개발되었다(Bisanda et al., 2003). 한편, 목질부와는 달리 수피는 고온에서 열분해할 경우 다량의 타르 성분(페놀성 화합물)을 얻을 수 있으므로 목재 접착제(주로 레졸수지) 제조 시 사용되는 페놀을 일부 대체할 수 있다. 또한, 소나무 수피의 액화를 통해 얻어지는 액화물은 상당량의 페놀성 화합물을 포함하고 있기 때문에 접착제, 폴리우레탄 등의 원료로 사용할 수 있으며 현재 국내에서는 문 등에 의해서 이 부분에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는 실정이다(Mun et al., 2001, 2002a, 2002b; Mun & Hassan, 2002). 수피 액화 연구에서는 액화물을 접착제나 고분자 수지에 적용할 경우 경화속도를 최적화해야 하는 과제를 안고 있다. 최근에는 소나무 수피 추출물에 대한 보다 진보적인 연구가 진행되어 기능성 식품인 항산화제 생산에 소나무 수피를 이용한 제품이 유럽 등지에서 출시되어 현재 전세계에 판매되고 있다(Liu et al., 2004). 현재 수피에 관한 연구 현황은 국내외적으로 접착제 및 고분자 수지 개발에 관한 내용이 주가 되고 있으며 일부 국외에서는 고부가가치의 수익을 올릴 수 있는 항산화제를 개발하는 방향으로 연구가 추진되고 있다. 그러나 국내외적으로 현재까지 라디아타 소나무 수피를 이용하여 기능성 화장품을 개발한 예가 없는 실정이다.

라디아타 소나무 수피의 경우 상당량의 proanthocynidin을 포함하고 있으며 이들은 항산화효과, 미백효과 등 다양한 잠재 가능성을 포함하고 있기 때문에 본 연구에서는 기능성 화장품 원료로 개발하여 관련 업계의 산업화에 기여하고자 하였다. 또한 라디아타 수피는 폐자원이라고 하는 장점 때문에 원료 구입비가 저렴함으로 현재 화장품 원료로 수입되고 있으며, 화장품 첨가제로 사용되고 있는 포도씨앗, 녹차 추출물의 상당 부분을 대체할 수 있을 것으로 사료

된다.

제 2 절 앞으로의 전망

국민 소득의 향상과 더불어 현재 환경문제에 대한 관심이 커지고 있는 것이 사실이다. 이러한 관점에서 앞으로 환경 문제에 대한 규제 및 해결 방안을 마련하는데 많은 힘을 쏟아야 할 것으로 전망된다. 상기에 언급한 본 연구 과제는 현재 국내외적으로 크게 관심을 끌고 있는 부분일 뿐만 아니라 이 문제들을 해결하고자하는 노력이 진행 중이다. 따라서 본 연구는 앞으로 환경 문제를 비롯한 국민 복지 개선에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 라디아타 소나무로부터 대량으로 발생되는 수피는 국내에서는 폐자원으로 간주되고 있지만 본 연구에서는 이들 폐수피를 새로운 고부가가치 기능성 원료로 개발하여 국내 자급 및 수입품 대체뿐만 아니라 국외로 기술이전 혹은 재수출하여 앞으로 국가의 외화창출을 증대시킬 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 유효 수피추출물의 최적 제조조건의 확립과 추출 성분의 특성

1. 서론

국내 목재공업 및 관련산업에서 발생하는 소나무 폐수피는 연간 수십만톤에 이르며(조남석, 1998), 이들 중 일부만이 토양개량제 또는 토양 멀칭재료로 이용되고 있다. 나머지 대부분의 폐수피는 소각되거나 매립되어 환경오염을 가중시키고 있다(Hassan & Mun, 2002). 특히 소각에 따른 이산화탄소의 배출은 금년부터 선진국을 중심으로 국제적인 규제가 시작되어 우리나라의 경우에도 앞으로 이들 온실가스배출 규제를 받게되어있다. 따라서 이들 수피의 소각이나 폐기는 점점 더 어렵게되어 이들 수피의 유효이용 및 그 이용기술 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

한편, 일부 특정 소나무재 수피의 열수추출물(HWE: Hot Water Extract)은 최근에 항산화제로써 많은 주목을 받고 있으며, HWE의 이러한 항산화 효과는 flavan-3-ol 단위들이 C4-C8 결합된 형태의 페놀성 화합물인 proanthocyanidin(PA)에 의한 것으로 알려져 있다(Ku & Mun, 2004). 따라서 소나무 폐수피를 이용한 PA의 추출 및 그 추출물의 이용은 상당히 고부가가치 산업이 될 수 있을 것으로 사료된다.

현재 국내의 경우 매년 국내에서 소비되는 목재의 90%이상을 수입에 의존하고 있다(황병호 등, 1998). 특히 소나무재는 건축용재로서, 펄프, 제지공업에서 또한 보드재료로서 엄청난 양이 사용되고 있으며, 그 수피 발생량 또한 수십만톤에 이른다. 특히 라디아타 소나무재는 국내 수입 원목 중 약 50%를 차지하고 있으며 원목의 10-15%에 해당하는 수피부는 박피과정 중에 배출된다(심중섭 등, 1987).

본 연구는 1) 국내산 소나무재를 비롯하여 수입산 소나무재에서 파생되는 다양한 종류의 소나무재의 수피를 분석하고, 2) 가장 경제성있는 수피의 선발, 3) 환경친화적인 용매를 사용하여 최적 추출조건을 확립, 4) 최적 조건에서 제조한 수피 추출물은 세분화하고 항산화 활성이 뛰어난 PA의 분리, 정제 및 특성화를 수행, 5) 저분자 페놀류의 검토, 6) 기타 성분의 분석을 실시하였고 기능성 화장품료

제조시의 자료로 사용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시재료

국외에서 수입되고 있는 소나무 수종, 국내 고유 소나무 수종, 국내 시험 식재 되어있는 소나무 수종 등 총 11 수종의 소나무로부터 그 수피를 채취하였으며 이들을 엽수에 따라 분류하고 채집 장소 및 연령을 Table 1에 나타내었다. 수피 연구에 사용한 소나무는 적송(*Pinus densiflora*), 해송(*Pinus thunbergii*), 방크스(*Pinus banksiana*), 콘돌라(*Pinus contorta*), 리기다(*Pinus rigida*), 테다(*Pinus taeda*), 리기테다(*Pinus rigida*×*taeda*), 세로리나(*Pinus serotina*), 라디아타(*Pinus radiata*), 잣나무(*Pinus koraiensis*), 섬잣나무(*Pinus parviflora*)로 총 11 수종이었다.

수집된 수피는 수일 동안 자연건조 한 후, 60±1℃ 송풍건조기에서 48시간 동안 건조시켰다. 건조된 수피는 분쇄한 후 표준망체를 사용하여 다양한 mesh의 수피 분말을 제조하였다. 수피 분말은 지퍼 팩에 담아 보관하였으며 이를 공시 재료로 사용하였다. 본 연구에 사용된 에탄올과 벤젠(대정화학주식회사, 한국), 가성소다(Yakuri pure chemicals Co., LTD., Japan) 그리고 황산(동양제철주식회사, 한국) 등의 시약류들은 모두 시약 1급을 사용하였으며, 별도의 정제 없이 그대로 실험에 사용하였다.

Table 1. Locality, age and collection date of pine bark used in this study

Leaf No.	<i>Pinus</i> species	Locality	Age	Date
2	<i>P. densiflora</i>	전북 전주시 팔복동 소재 Pan Asia Paper Korea	25-30	2004/3
	<i>P. thunbergii</i>	전북 김제시 죽산면 홍산리	20	2004/3
	<i>P. banksiana</i>	전북 임실군 임실읍 두곡리 산림환경연구소 시험립	12	2004/4
	<i>P. contorta</i>	전북 임실군 임실읍 두곡리 산림환경연구소 시험립	6	2004/4
3	<i>P. rigida</i>	전북 전주시 덕진구 전북대학교 연습립	10	2004/4
	<i>P. taeda</i>	전북 환경연구소 소양 시험립	28	2004/3
	<i>P. rigida</i> × <i>taeda</i>	전북 환경연구소 소양 시험립	41	2004/3
	<i>P. serotina</i>	전북 임실군 임실읍 두곡리 산림환경연구소 시험립	20	2004/4
5	<i>P. radiata</i>	전북 군산시 서수면 축동리 소재 (주)한영목재	25-30	2004/12
	<i>P. radiata</i>	New Zealand, Christchurch소재 Stoneyhurst Sawmilling Co. Ltd.	25-30	2002/5
5	<i>P. koraiensis</i>	전북 완주군 고산면 양아리	20	2004/3
	<i>P. parviflora</i>	전북 전주시 덕진구 전북대학교 농업생명과학대학	25	2004/3

나. 수피의 화학 조성

1) 열수추출

수피(20-80 mesh) 약 2 g과 이온교환수 100 ml를 300 ml 삼각플라스크에 넣고 1 m길이의 유리관을 부착한 후 비등수욕상에서 3시간 추출하였다. 추출액은 1G3 글라스필터에 여과하였으며 잔사는 열수 300 ml로 충분히 세정하였다. 수세한 잔사는 105±1℃ 송풍건조기에서 하룻밤 동안 건조시킨 후 원 수피로부터의 중량 감소로부터 열수추출물의 함량은 계산하였다.

2) 냉수추출

수피(20-80 mesh) 약 2 g과 이온교환수 300 ml를 500 ml 삼각플라스크에 넣고 시판되는 랩을 사용하여 플라스크 입구를 밀봉하였다. 추출은 추출용 삼각플라스크를 25℃의 항온실에 48시간 방치하여 실시하였다. 그 후 추출액은 1G3 글라스필터에 여과하였으며 잔사는 25℃ 이온교환수 300 ml로 충분히 세정하였다. 수세한 잔사는 105±1℃ 송풍건조기에서 하룻밤 동안 건조시킨 후 원 수피로부터의 중량 감소로부터 냉수추출물의 함량은 계산하였다.

3) 알코올-벤젠 추출

수피(20-80 mesh) 약 6 g을 원통여과지에 넣고 탈지면으로 입구를 봉하여 soxhlet 추출기에 넣었다. Soxhlet 추출기의 상부에 냉각관을 부착하고, 하부에는 알코올(95% 에탄올)과 벤젠 혼합액(1:2, v/v) 200 ml가 들어있는 플라스크를 연결하였다. 추출은 soxhlet 추출관 하부의 플라스크를 85±2℃ 항온수조에 설치하여 6시간 동안 행하였다. 그 후 플라스크 내의 알코올-벤젠은 감압 농축기를 사용하여 제거하였다. 플라스크는 105±1℃ 항온 건조기에서 하룻밤 동안 건조시킨 후 그 중량을 측정하여 알코올-벤젠 추출물 함량을 계산하였다.

4) 1% NaOH 추출

수피(20-80 mesh) 약 2 g과 1% NaOH 수용액 100 ml를 300 ml 삼각플라스크에 넣고 1 m 유리관을 부착한 후 비등수욕상에서 1시간 동안 추출하였다. 추출액은 1G3 글라스필터에 여과하였으며 잔사는 열수 300 ml로 충분히 세정하였다. 수세한 잔사는 105±1℃ 송풍건조기에서 하룻밤 동안 건조시킨 후 원 수피로부터의 중량 감소로부터 열수추출물의 함량은 계산하였다.

5) 회분

수피 약 2 g을 도가니에 넣고 600±1℃ 회화로에서 4시간 동안 회화시켰다. 그 후 도가니를 데시케이터 중에서 냉각시킨 후 그 잔사 중량으로부터 회분 함량을 계산하였다.

6) 클라손 리그닌

알코올-벤젠, 1% NaOH 추출 후의 잔사를 클라손 리그닌 함량 측정용 시료로 사용하였다. 잔사 약 0.5 g을 30 ml청량병에 넣고 72% 황산 7.5 ml를 추가한 후 30분마다 유리막대로 잘 저어주면서 4시간 동안 실온에 방치하였다. 그 후 반응물은 증류이온교환수 283 ml를 사용하여 500 ml 삼각플라스크에 옮겨 3% 황산 농도가 되도록 하였다. 희석액은 autoclave에 넣고 120℃에서 1시간 동안 가수분해하였다. 가수분해물은 1G4 글라스필터에 여과하였고 열수 300 ml로 충분히 세정하였다. 여과 후 잔사는 105±1℃ 송풍건조기에서 하룻밤 동안 건조하였고 그 중량 측정하여 클라손 리그닌 함량을 계산하였다.

7) 산 가용성 리그닌

산가용성 리그닌은 클라손 리그닌 측정 후 여과액을 500 ml로 희석하여 UV흡광법(204 nm, 흡광계수 105 l/g·cm)으로 정량하였다.

$$\text{산가용성리그닌(\%)} = DV(As - Ab)/aW \times 100$$

D: 희석배율, V: 정량 여과액의 용량(l), As, Ab: 각각의 시료액과 Blank의 흡광도, a: 리그닌의 흡광계수(l/g·cm), W: 시료의 전건중량(g)

다. 라디아타 소나무 수피의 최적 추출 조건과 추출물의 구성 성분 분석

1) 열수 추출 조건

라디아타 소나무 수피의 최적 추출 조건을 검토하기 위하여 다양한 조건에서 추출을 시도하였다. 추출 조건은 수피의 입자 크기, 액비, 추출 시간 및 추출온도 등으로 나누어 검토하였다. 각 조건에서 사용한 수피분말의 양은 2 g으로 하였다. 열수 추출은 수피 분말 2 g을 삼각플라스크에 넣고 환류냉각관을 부착하여 각각의 조건에서 실시하였다. 추출후의 잔사는 1G3 글라스필터로 여과한 후

105±1℃에서 하룻밤 건조하고 그 중량으로부터 추출물 함량을 구하였다. 추출조건의 상세는 다음과 같다.

- 수피 입자 크기에 따른 영향(용매: 물, 온도: 100℃, 액비: 10, 시간: 60분)
20 mesh 이하, 20-40 mesh, 40-80 mesh, 80-200 mesh
- 추출 온도(용매: 물, 입자크기: 20-80 mesh(2 g), 액비: 10, 시간: 60분)
25, 40, 60, 80, 100, 120℃(120℃의 경우에는 autoclave 사용)
- 추출 액비(용매: 물, 입자크기: 20-80 mesh(2 g), 온도: 100℃, 시간: 60분)
5, 10, 20, 30, 40, 50
- 추출 시간(용매: 물, 입자크기: 20-80 mesh(2 g), 온도: 100℃, 액비: 10)
30, 60, 120, 180, 240분

2) 열수추출물(HWE)의 분석

상기 각 조건에서 얻어진 HWE는 약 65℃에서 감압, 농축한 후 동결건조하였다. 이후 건조된 수피 HWE는 하룻밤 동안 진공건조하여 수분을 완전히 제거한 후 실험에 사용하였다.

가) 총 페놀성 화합물의 함량

Folin-Ciocalteu법에 준하여(Takahata et al., 2001) 소나무 수피 HWE 중 총 페놀성 화합물에 대한 함량을 구하였다. 즉, 0.8 mg/100 ml농도로 희석한 시료 용액 1 ml를 PTFE screw capped 바이알에 넣고 10% Folin 시약 1 ml를 첨가하였다. 이 용액을 잘 혼합한 후 3분 동안 실온에 방치하였다. 여기에 10% Na₂CO₃ 2 ml를 첨가하고 이 혼합액을 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 750 nm에서 흡광도를 측정하였으며 총 페놀성 화합물의 함량은 (+)-catechin에 대한 동일 양으로 계산하였다. Blank는 동일 시약에 열수추출물 용액 대신 물을 첨가한 것을 사용하였다.

나) Proanthocyanidin(PA)의 함량(Sun et al., 1998)

(1) 표준용액의 제조

(+)-Catechin 4, 2, 1 및 0.5 mg을 취하여 HPLC급 메탄올 10 ml에 용해시켜 HWE 중의 PA정량 시, 검량선 작성용 표준용액으로 사용하였다.

(2) PA의 정량

HWE용액 (3 mg/10 ml methanol) 또는 상기 1)에서 제조한 표준용액 1 ml를 10 ml 바이알에 넣고 여기에 1% vanillin 용액(0.5 g vanillin/50 ml methanol) 2.5 ml와 25% (v/v) H₂SO₄ 용액(250 ml 95% H₂SO₄/250 ml methanol) 2.5 ml를 첨가하였다. 그 후 바이알은 25℃로 설정된 shaking water bath(JEIO TECH SWB-10 Shacking Water Bath, Korea)에 장착하여 15분 동안 반응시켰다. 반응물은 UV/Vis diode array spectrophotometer(HP 8452A, USA)를 사용하여 500 nm에서의 흡광도를 구하였으며, 이로부터 각 HWE 중의 PA를 정량하였다.

(3) 항산화활성(Erasto et al., 2004)

상기의 건조 HWE 20 mg을 취하여 메탄올에 녹이고 50 ml로 정용하였다. 이 용액을 일부 취하여 각각 25와 12.5 µg/ml의 농도가 되도록 희석하였다. 이 희석 용액을 각각 1 ml 취한 후 시험관에 넣고 0.1 mM DPPH 2 ml를 각각의 시험관에 첨가하였다. 이후 25℃ 수욕 상에서 30분 동안 진탕하고 518 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정을 위해 UV/Vis diode array spectrophotometer를 사용하였다. Blank는 메탄올로 하였으며 control은 메탄올 1 ml와 0.1 mM DPPH 2 ml의 혼합액으로 하였다. 또한 control은 시료와 동일한 조건에서 처리하였다.

DPPH 자유라디칼 소거능(%) =

$$((\text{Control 흡광도} - \text{시료 흡광도})/\text{Control 흡광도}) \times 100$$

라. 최적 추출 조건에서 HWE의 대량 제조와 그 특성

1) 수피 HWE의 대량제조

라디아타 소나무 수피를 분쇄하여 얻은 20-80 mesh 통과분 약 600 g(o.d)을 6 l 이온교환수가 담긴 스테인리스 용기에 넣고 1시간 동안 가열하였다. 이 추출물을 여과한 후 그 잔사는 16 l의 이온교환수로 세정하였다. 추출물과 세정액을 모두 합하여 HWE로 하였으며 이 추출물은 3 µm 필터로 진처리한 후 대형 농축기(EYELA, N-12, Japan)를 사용하여 65℃에서 감압 농축하였다. 농축액은 동결 건조하고 진공건조 후 갈색병에 보관하였으며 이때 132 g의 HWE 건조 분말을 얻을 수 있었다(수율: 22%).

2) HWE구성 성분의 분리, 정제 및 분석

가) Proanthocyanidin(PA)의 분리 및 정제

소나무 수피 HWE로 부터 PA를 분리하는 과정은 Fig. 1과 같다. HWE 5 g을 70% 아세톤에 녹인 후 불용부분은 0.45 μm 필터로 여과하였다. 여과액은 아세톤을 제거하기 위해 40°C에서 감압·농축하였으며 이후 분액 깔데기로 옮기고 지질성분을 제거하기 위해 *n*-헥산 100 ml로 2회 추출하였다. 수층에 남아있는 플라보노이드 단량체 및 flavan-3-ol 단량체를 제거하기 위해 에틸아세테이트로 5회 반복 추출하였다. 에틸아세테이트 층은 50°C에서 감압 농축 후 진공 건조하였다 (753 mg). 수층은 65°C에서 감압농축한 후 동결 건조하여 4.06 g의 갈색분말을 얻을 수 있었다. 수층으로부터 얻은 갈색 분말 중 2.51 g을 50% 메탄올에 녹인 후 Sephadex LH 20칼럼의 상단부에 도입하였다. 이후 50% 메탄올 1 l로 용리시켜 당류, 플라보노이드 배당체, 저분자 flavan-3-ol 화합물을 제거하였으며 Sephadex LH 20 겔 상에 흡착되어있는 PA를 분리하기 위해 50% 아세톤 2.1 l로 용출시켰다. PA를 분리한 후 칼럼에 강하게 흡착된 부분을 제거하기 위해 70% 아세톤으로 겔을 세척해 주었다. 50% 아세톤에 용출된 정제 PA분획은 65°C에서 감압 농축한 후 동결건조하고 진공·건조하여 1.76 g 갈색분말의 PA를 얻을 수 있었다. 분리한 PA를 특성화하기 위해 Bate-Smith법에 의한 알코올 분해반응, FT-IR, ¹³C NMR, MALDI-TOF MS, 분자량 분포도를 측정하였다.

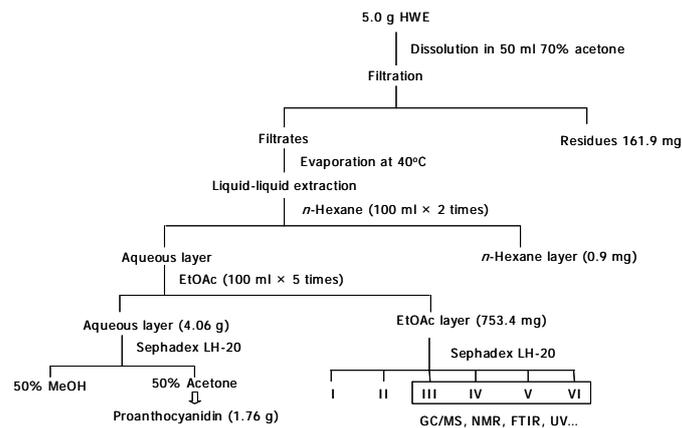


Fig. 1. Schematic flow diagram for purification and fractionation of HWE from *Pinus radiata* bark.

나) PA의 특성화

(1) Bate-Smith 알코올 분해반응

Bate-Smith법은 ferric염 존재 하에서 염산-부탄올에 의한 PA의 분해반응으로 이때 형성되는 색소 성분이 나타내는 가시광선 영역에서의 최대 흡광도에 따라 PA의 확장 단위에 대한 분자구조 추정이 가능한 방법이다(Hagerman, 2002). 1 mg의 HWE를 PTFE screw capped 바이알에 첨가하고 1 ml 50% 메탄올로 녹였다. 여기에 6 ml 염산-부탄올 시약(농염산 50 ml + *n*-부탄올 950 ml)과 0.2 ml 철염 시약(0.5 g $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 을 2N 염산 25 ml에 녹인 용액)을 첨가한 후 heating block에서 95-100°C, 1시간 동안 가열하였다. 반응 종료 후 바이알은 얼음 용액 중에서 냉각시켰으며 PA의 반응 분해물인 anthocyanidin 색소의 가시광선 스펙트럼은 400-800 nm 영역에서 스캔하여 얻었다. 이때 550 nm부근의 최대 흡광도에 따라 PA의 확장구조를 추정할 수 있다. Blank는 50% 메탄올, 염산-부탄올 및 철염시약의 혼합액으로 하였다.

(2) 기기분석

UV스펙트럼은 UV/Vis diode array spectrophotometer를 측정하였으며, FT-IR 분석은 Shimadzu FTIR-8201PC(Japan)를 이용하여 KBr pellet법으로 측정하였으며, 4,000-400 cm^{-1} 의 범위에서 스캔하였다. ^{13}C NMR 스펙트럼은 단리한 PA를 acetone- d_6 /D₂O 용매로 녹인 후 JEOL JNM-EX 400 spectrometer(Japan)로 측정하였다. PA는 GPC컬럼에 강하게 흡착됨으로 전처리 과정으로 아세틸화하는 것이 일반적이다(Kennedy & Taylor, 2003). 아세틸화는 PA 100 mg을 피리딘 3 ml로 녹이고 여기에 3 ml 무수초산을 첨가한 후 데시케이터 안에서 2일 동안 반응시켜 실시하였다. 아세틸화한 PA 1 mg을 THF 1 ml에 녹인 후 0.45 μm 필터로 여과하고, Spectra-Physics사의 SP8800 HPLC(USA)를 이용하여 분자량 분포를 측정하였다. 컬럼은 AM GEL GPC 컬럼(15 μm , linear, American Polymer Standards)과 Shodex GPC KB-802.5 컬럼(8 × 300 mm)을 연결하여 장착하였다. 용리제는 THF, 유속 1.0 ml/min, 검출 Spectra 100 UV detector(280 nm(시료), 254 nm(polystyrene 표준분자량 시료)의 조건에서 분자량 분포를 측정하였다. 표준 분자량 시료는 polystyrene series(Mw 1,028,500, 158,180, 28,720, 3,275), phenol(Mw 94)을 사용하였으며 254 nm에서 검출하였다. 아세틸화한 PA의 아세틸기는 분자량 환산 시에 배제되었으며 중합도는 procyanidin 기본 단위체를 기

준으로 하였다. MALDI-TOF MS분석을 위해 아세틸화한 PA는 THF, DHB(2,5-dihydroxy benzoic acid) 매트릭스와 NaCl은 70% 아세톤에 각각 녹이고 매트릭스:시료:NaCl을 10:1:1(v/v/v)로 혼합하여 분석 시료를 조제하였다. 이 시료 용액 중 1-2 μ l를 취해 MALDI 타겟에 떨어뜨리고 기건하여 pulsed N₂-laser (337 nm)가 장착된 Applied Biosystems사의 Voyager-DE-STR MALDI-TOF MS로 분석하였다. MALDI-TOF 조건은 laser 강도 2178, 가속 전압 20 kV, grid 전압 68%, 매트릭스 DHB, 작동 모드 reflector, 추출 연기 시간 350 ns, 극성 positive, 가이드 전선 0% (가속 전압 기준), 분자량 범위 100-7,000 Da.

3) 저분자 폴리페놀류의 분리 및 동정

가) 용매 분획 및 칼럼에 의한 분리(Fig. 1 참고)

HWE 5 g을 70% 아세톤에 녹인 후 불용부분은 0.45 μ m 필터로 여과하였다. 여과액은 아세톤을 제거하기 위해 40°C에서 감압농축하였으며 이후 분액 깔데기로 옮기고 지질성분을 제거하기 위해 *n*-헥산 100 ml로 2회 추출하였다. 수층에 남아있는 플라보노이드 단량체 및 flavan-3-ol 단량체를 제거하기 위해 에틸아세테이트로 5회 반복 추출하였다. 에틸아세테이트 층은 50°C에서 감압 농축 후 진공건조하였다(753 mg). 600 mg의 에틸아세테이트 가용부를 취하여 소량의 에탄올에 녹인 후 Sephadex LH 20컬럼의 상단부에 도입하였다. 이후 에탄올 2.6 l, 아세톤:에탄올(15:85, v/v) 820 ml, 아세톤:에탄올(40:60, v/v) 640 ml로 에틸아세테이트 가용부를 용리시켰으며 각각의 분획은 fraction collector(EYELA, DC-1200, Japan)으로 10 ml씩 수집하였다. 주요 폴리페놀 성분은 에탄올에 의해 용리되었으며 UV 검출기로부터 각각의 분획을 서로 확인(254 nm) 할 수 있었다. 에탄올 분획 I-VI을 얻을 수 있었으며 이들에 대해 UV/Vis diode array spectrophotometer로 각각의 스펙트럼을 확인하였다.

나) 화합물 1-3의 동정

화합물 1(protocatechuic acid)

¹H-NMR(400 MHz, methanol-*d*₄) δ : 6.79(1H, d, *J*=7.8 Hz, H-5), 7.41(1H, dd, *J*=1.9 & 7.7 Hz, H-6), 7.43(1H, d, *J*=1.9 Hz, H-2). ¹³C-NMR(100 MHz, methanol-*d*₄) δ : 115.7(C-5), 117.7(C-2), 123.1(C-6), 123.8(C-1), 146.0(C-3),

151.4(C-4), 170.1(C-7). GC-MS(TMS-derivative), m/z: 73, 193(base peak), 311, 355, 370(M⁺).

화합물 2(*trans*-taxifolin)

UV: $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 290, 326 nm(sh); (+2N NaOH) 290→326 nm; (+AlCl₃) 310, 376 nm (sh); (+NaOAc) 290→326 nm IR(KBr. cm⁻¹) ν_{\max} 3437, 3186, 1616, 1477, 1086. ¹H-NMR(400 MHz, methanol-*d*₄) δ : 4.49(1H, d, *J*=11.5 Hz, H-2), 4.90(1H, d, *J*=11.9 Hz, H-3), 5.87(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6), 5.91(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.79(1H, d, *J*=7.9 Hz, H-5), 6.83(1H, dd, *J*=1.9 & 9.8 Hz, H-6), 6.85(1H, d, *J*=1.4 Hz, H-2). ¹³C-NMR(100 MHz, methanol-*d*₄) δ : 73.7(C-3), 85.1(C-2), 96.2(C-8), 97.3(C-6), 101.8(C-10), 115.8(C-2), 116.0(C-5), 120.8(C-6), 129.8(C-1), 146.2(C-4), 147.0(C-3), 164.4(C-5), 165.2(C-9), 168.6(C-7), 198.2(C-4). GC-MS(TMS-derivative), m/z: 75, 147, 179, 267, 368(base peak), 665(M⁺).

화합물 3(quercetin)

UV: $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 258, 374 nm. IR(KBr. cm⁻¹) ν_{\max} 3412, 1665, 1612, 1524, 1450, 1016. ¹H-NMR(400 MHz, methanol-*d*₄) δ : 6.18(1H, d, *J*=1.9 Hz, H-6), 6.38(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.88(1H, d, *J*=8.1 Hz, H-5), 7.63(1H, dd, *J*=2.0 & 8.4 Hz, H-6), 7.73(1H, d, *J*=1.9 Hz, H-2). ¹³C-NMR(100 MHz, methanol-*d*₄) δ : 94.4(C-8), 99.2(C-6), 104.5(C-10), 115.9(C-2), 116.2(C-5), 121.6(C-6), 124.1(C-1), 137.2(C-3), 146.1(C-3), 147.9(C-2), 148.7(C-4), 158.1(C-9), 162.4(C-5), 165.5(C-7), 177.2(C-4). GC-MS (TMS-derivative), m/z: 207, 559, 575, 647(base peak), 661(M⁺).

다) 기타 폴리페놀류의 분석

분획 I-VI 및 표준 플라보노이드류 ((-)-epicatechin, (+)-catechin, (+)-gallocatechin, (-)-epigallocatechin, *trans*-taxifolin 및 quercetin)를 acetonitrile 혹은 피리딘 함유 acetonitrile에 녹인 후 TMS화제인 BSTFA를 첨가하고 70°C에서 15분간 반응시켰다. 반응 생성물은 GC-MS와 GC분석에 사용되었다.

1 μl 시료용액을 FID가 부착된 Shimadzu GC 17A(Japan)에 주입하였다. 피크 동정은 Shimadzu GC-MS QP5050(Japan)을 사용하였으며 성분은 SPB 5(30 m \times 0.25 mm, i.d, 0.25 μm film thickness)로 분리하였다. 오븐 온도는 200-300 $^{\circ}\text{C}$ 까지 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 으로 승온하였으며 이후 300 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 유지하였다. 운반기체는 헬륨을 사용하였으며 유속은 1.0 ml/min, split ratio 10, MS는 EI 모드로 가속전압 70 eV에서 화합물들을 파편화시켰다. 인터페이스 온도는 230 $^{\circ}\text{C}$ 로 설정하였다. 화합물의 동정은 표준품, Wiley 139 library와 문헌(Owen et al., 2003; Zhang & Zuo, 2004)을 참고하였다.

단리한 폴리페놀류의 UV스펙트럼은 UV/Vis diode array spectrophotometer를 이용하여 200-400 nm범위에서 스캔하여 측정하였다. 다양한 shift 시약(NaOH, AlCl_3 , NaOAc)을 사용하여 폴리페놀류의 심색이동(bathochromic shift)을 유도하였다. FT-IR분석은 Shimadzu FTIR-8201PC를 이용하여 KBr pellet법으로 측정하였으며 4,000-400 cm^{-1} 의 범위에서 스캔하였다. ^{13}C NMR 스펙트럼은 단리한 폴리페놀류를 methanol- d_4 로 녹인 후 JEOL JNM-EX 400 spectrometer로 측정하였다.

4) 당 및 회분조성

50 mg의 HWE와 3% 황산(전 당량 분석시) 4 ml 혹은 이온교환수(유리당 분석시) 4 ml를 각각 시험관에 첨가하고 120 $^{\circ}\text{C}$ autoclave에서 1시간 동안 가압처리한 후 제조한 당액을 3% 황산-imidazole법(Sun et al., 1998)으로 alditol-acetate 유도체화한 후 이를 GC로 분석하여 전 당량, 유리당 및 결합당량을 측정하였다.

GC분석 조건은 Shimadzu GC 17A, SP-2380 silica fused capillary column(30 m \times 0.32 mm, film thickness 0.20 μm), 오븐 온도는 180-250 $^{\circ}\text{C}$ 까지 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 으로 승온하고 250 $^{\circ}\text{C}$ 에서 8분간 유지, 주입구 온도 240 $^{\circ}\text{C}$, FID 검출기 온도 260 $^{\circ}\text{C}$, 운반기체 헬륨, 유속 2.6 ml/min, split ratio 10, 시료 주입량 1 μl 로 하였다.

HWE의 회분조성은 상법에 준하여 HWE로부터 회분을 제조하고, 이를 SEM-EDS(Scanning Electron Microscopy(JSM-6400, Jeol, Japan)-Energy Dispersive X-ray Spectrometer(link ISIS 3.0, Oxford))로 3개소 분석한 후 얻어진 값의 평균치를 회분중의 원소 조성 값으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 다양한 소나무 수피의 화학 조성

국내 자생 혹은 시험림에 식재 되어있는 소나무, 수입되고 있는 소나무 11수종의 수피를 수집하고 이들 수피의 화학적 조성을 검토하여 Table 2에 나타내었다. 이들 수피는 사용하기 전에 에탄올-벤젠 (1:2, v/v)을 포함하는 Soxhlet 추출기로 탈지시켰다. 대체적으로 수피 중 추출물 함량이 일반 목재보다 높게 나타났으며 특히, 1% NaOH 추출물은 약 35-65%로 많은 양의 페놀성 화합물이 수피 중에 함유되어 있었다. 수피 중의 전리그닌(클라손 리그닌 + 산 가용성 리그닌)함량은 50-70%로 매우 많은 양이 측정되었는데 이는 수피 중의 폴리페놀이 클라손 리그닌 정량 시에 황산에 의해 축합되어 과다 정량되었기 때문인 것으로 생각되었다. 사실상 화학 조성 검토 시 리그닌과 폴리페놀간의 상호 영향은 목재 시험법을 직접적으로 수피에 적용할 수 없는 원인이 된다. 따라서 수피 중의 보정 리그닌(compensated lignin)과 폴리페놀(polyphenol)의 측정은 다음과 같이 행하였다. 즉, 알코올-벤젠 추출 잔사를 1% NaOH 추출하여 페놀성 화합물을 제거한 후 리그닌을 정량하였으며 그 결과 값은 실험에 도입된 수피량으로 환산하여 나타내었다. 이렇게 계산된 리그닌을 보정 리그닌으로 하였다. 또한 폴리페놀은 수피를 알코올-벤젠 추출한 후 이들 잔사에 대하여 측정한 전리그닌 값을 원래의 수피량으로 환산하여 보정 리그닌 함량을 감(減)한 값으로 하였다.

소나무 수피 중 폴리페놀은 항산화 활성의 정량적인 평가와 직접적인 연관성을 가지므로 매우 중요한 성분이다. 실험에 사용된 다양한 소나무 수피로부터 결정된 폴리페놀 함량은 22.8-55.0%로 비교적 넓은 범위의 값을 나타내었다. 라디아타 소나무 수피의 경우 폴리페놀이 55.0%, 45.3%로 타 수종에 비하여 그 함량이 월등히 높게 나타났다. 또한, 본 수피의 경우 1% NaOH 추출물뿐만 아니라 열수 및 냉수 추출물이 각각 23.4%와 10.6%로 높게 나타나 본 수피 중에 함유된 많은 성분들은 타 소나무 수피의 그것에 비하여 물에 용이하게 용해되는 것으로 생각되었다. 또한, Tables 2의 TAPPI법을 적용한 액비 1:50일 경우의 열수 추출물 함량과 Table 3의 공정상 필요최소한의 물을 사용한 액비 1:10에서의 열수 추출물 함량이 서로 유사한 것으로부터 상기의 결과를 보충 설명할 수 있었다. 결과적으로, 라디아타 소나무 수피로부터 열수 추출물을 제조하고자 할 경우 일반 유기용매를 사용하지 않고 물과 같은 친환경 용매를 액비 1:10으로 추출하더라도 경제적인 추출물 수율을 얻을 수 있을 것으로 생각되었다.

Table 2. Contents of phenolic components and water extracts of various pine bark varieties

Leaf No.	Species	HWE ^a (%)	1% NaOH (%)	CWE (%)	ABE (%)	Ash (%)	ABE-R (%) ^b		NaOH-R (%) ^c		CTL ^d (%)	PP ^e (%)
							KL	ASL	KL	ASL		
	<i>P. densiflora</i>	8.2	41.9	2.1	5.0	1.5	61.5	1.3	51.2	0.5	30.0	29.6
2	<i>P. thunbergii</i>	3.7	35.7	0.5	4.7	3.1	56.0	0.9	48.2	0.6	31.4	22.8
	<i>P. banksiana</i>	7.0	56.8	1.7	18.9	2.1	60.1	1.1	46.5	0.7	20.4	29.2
	<i>P. contorta</i>	10.2	64.7	2.3	11.2	1.4	58.5	1.9	39.7	0.5	14.2	39.4
	<i>P. rigida</i>	15.1	56.1	5.4	4.4	1.8	67.5	2.3	52.8	0.4	23.4	43.4
	<i>P. taeda</i>	4.3	45.8	0.3	4.0	1.4	64.6	0.7	54.5	0.4	29.8	32.9
3	<i>P. rigida</i> × <i>taeda</i>	4.8	45.3	0.9	3.9	1.0	60.9	0.6	48.7	0.4	26.9	32.2
	<i>P. serotina</i>	5.6	59.8	0.1	2.5	1.1	69.6	1.5	52.8	0.4	21.4	47.9
	<i>P. radiata</i> ^f	23.4	64.8	10.6	10.5	0.4	70.4	9.6	46.5	0.6	16.6	55.0
	<i>P. radiata</i> ^g	31.7	65.3	21.3	13.5	1.08	67.5	2.01	42.7	0.1	14.8	54.7
5	<i>P. koraiensis</i>	7.7	47.3	0.6	6.7	1.4	50.5	1.2	40.8	0.5	21.8	26.5
	<i>P. parviflora</i>	9.4	62.6	2.7	21.1	4.6	47.6	1.4	39.5	0.5	15.0	23.7

HWE, hot water extract; CWE, cold water extract; ABE, alcohol-benzene extract; ABE-R, residue after alcohol-benzene extraction; NaOH-R, residue after 1% NaOH extraction; KL, Klason lignin; ASL, acid soluble lignin; CTL, compensated total lignin; PP, polyphenol

^a HWE was experimented at a liquor ratio of 1:50

^b Lignin content calculated from the residue after ethanol-benzene (1:2, v/v) extraction

^c Lignin content calculated from the residue after 1% NaOH extraction

^d Values are compensated total lignin content (Klason lignin + acid-soluble lignin) of the residues after 1% NaOH extraction based on amount of bark

^e Values are calculated by the following equation: polyphenol (%) = [total lignin (g) in the residues after ethanol-benzene extraction - compensated total lignin (g)]/bark (g) × 100

^f Bark obtained from Stoneyhurst Sawmilling Co. Ltd., Christchurch, New Zealand

^g Bark obtained from HanYoung Sawmilling Co. Ltd., Gunsan, Korea

나. 다양한 소나무 수피의 HWE 수율, 총 페놀성 화합물 함량 (total phenolic, TP), PA함량 및 항산화 활성

Table 3은 20-80 mesh 시료 분말, 액비 1:10, 100℃, 1시간의 조건에서 11종의 소나무 수피를 열수추출하고 그 추출물의 수율과 이들 추출물 중의 총 페놀성 화합물의 함량, PA함량 및 DPPH 자유라디칼 소거능 즉, 항산화 활성을 검토한 결과를 나타내었다. 11종의 소나무 수피에 있어서 HWE 수율은 2.4-23.2%을 나타내어 동일한 분류 중에 속하는 수피로부터 얻은 추출물이라 하더라도 큰 수율 차이를 보이는 것을 알 수 있었다. 이들 수피 중 라디아타 소나무 수피가 23.2%로 가장 높게 나타났으며 리기다 소나무 수피는 14.4%로 두 번째로 높은 수율을 나타내었다. 이 두 수종을 제외한 소나무 수피의 HWE 수율은 2.4-6.9%로 낮았다. 실상 소나무 수피 추출물의 수율 차이는 용매에 의해 추출 가능한 폴리 페놀류 즉, 방향족 고리에 의한 π - π stacking interaction에 의해 회합되어 있는 형태를 갖는 폴리페놀류와 용매 추출에 대한 저항성이 높은 폴리페놀류 즉, 고분자 탄수화물(주로 cellulose)에 직접 화학결합을 하고 있는 폴리페놀류의 비율에 상당히 의존적이다(Fig. 2).

폴리페놀류와 HWE 중의 총 페놀성 화합물 함량은 5엽송의 잣나무 수피(862 mg (+)-catechin/g HWE)에서 가장 높았으며, 그 다음으로 라디아타 소나무 수피였다. 그러나 항염증, 항알레르기, 항궤양 등의 다양한 생리활성이 있는 것으로 잘 알려진 PA함량의 경우 잣나무 수피 중에는 극소량 존재하였으며 총 페놀성 화합물 함량과 PA 함량간의 비율(PA/TP)은 0.09로서 매우 낮았다. 즉, 잣나무 수피 중에는 PA류가 아닌 일반적인 페놀류가 다량 존재할 가능성이 높을 것으로 추정할 수 있었다. 이에 반해서 적송 및 리기다 소나무재의 수피는 PA/TP가 0.93, 0.88로 페놀류의 대부분은 PA에 유래하는 것을 알 수 있었다.

Figure 3은 Folin-Ciocalteu assay에 의해 결정된 총 페놀성 화합물의 함량과 항산화 활성 간에 얻어진 random plots을 보여준다. 비록 Folin-Ciocalteu assay가 일반적으로 식물 자원으로부터 유래하는 조(粗)추출물의 총 페놀성 화합물 함량을 결정하기 위해 사용되어져 왔을 지라도 이 assay는 소나무 수피 HWE에 대해서는 특정(specific) 결과를 나타내지 않았다. Zhang & Hamauzu (2004)의 연구결과에서도 총 페놀성 화합물 함량과 항산화 활성간의 상관성은 낮게 보고되었다. 이러한 낮은 상관성은 문헌(Burns et al., 2000; Mozetič et al., 2006)에 언급된 바와 일치하는 이유로 수피 HWE 중에 존재하는 개개의 항산화 성분과

산화될 수 있는 비페놀성 혹은 환원성 극성 불순물(산류 및 당류)의 영향에 의한 것으로 판단되었다. 이러한 예상은 monophenol류가 폴리 페놀류보다 낮은 항산화력을 나타내는 화학 구조적인 특성(Qian & Nihorimbere, 2004)과 비페놀성 물질들이 Folin-Ciocalteu 페놀 시약과 양성 반응을 함으로써 molybdenum이 환원되어 측정 과정에서 흡광도가 증가되기 때문에 가능하다. 또 다른 가능성은 일반적으로 소나무 수피가 왁스류, 지질 성분 및 중성당류를 높은 농도로 포함하고 있기 때문에 열수 추출 조건하에서 수피로부터 용출될 수 있는 중성당류와 불포화 이중결합을 포함하는 지질 성분들이 총 페놀성 화합물 함량과 항산화 활성간의 상관관계에 영향을 미쳤을 것으로 판단할 수 있었다. 부가적으로 항산화제가 DPPH 자유 라디칼과 반응하는 것과 총 페놀성 화합물 함량에 사용되는 Folin-Ciocalteu 시약과의 반응하는 정도에 차이를 나타냄으로 이러한 낮은 상관성의 원인을 제공할 수 있다. 즉, Folin-Ciocalteu 시약은 쉽게 산화될 수 있는 광범위한 기질들에 민감하게 작용하는 반면 DPPH 자유 라디칼은 항산화제의 구조에 기인하는 반응 속도에 의존함으로써 이들 간의 다른 반응성을 나타내는 특성이 있다. 그러므로 Folin-Ciocalteu 시약과 강하게 반응하는 페놀성 화합물이라도 DPPH 자유 라디칼과 반응하지 않을 수 있다.

Figure 4는 vanillin-H₂SO₄ assay에 의해 결정된 다양한 소나무 수피 HWE 중의 PA 함량과 항산화 활성과의 관계를 나타내며 이들의 평가는 직선 상관에 의해 검토되었다. 높은 직선 상관성으로부터 HWE 중에 포함된 PA 함량이 높은 소나무 수피일수록 강력한 항산화 활성을 보이는 것을 알 수 있었다. 즉, 소나무 수피 HWE의 항산화 활성은 PA 함량에 중대하게 의존한다는 것을 시사하였다. 이러한 결과는 소나무 수피 추출물이 taxifolin, quercetin, protocatechuic acid, ferulic acid, caffeic acid 등과 같은 단량체 폴리페놀을 함유하고 있지만 대부분이 단량체에서 장쇄 고분자로 광범위한 분자량 분포를 보이는 PA(주로 procyanidin)로 대부분 이루어져 있다는 일반적인 사실에 근거해서 설명될 수 있었다(Packer et al., 1999; Karonen et al., 2004). 라디아타 소나무, 리기다 소나무 및 육송으로부터 제조한 HWE는 높은 PA 함량에 기인하여 25.0 µg/ml의 낮은 농도에서도 90%이상의 높은 항산화 활성을 나타내었다. Vanillin-H₂SO₄ assay를 이용해 결정된 PA의 정량은 소나무 수피 추출물의 항산화 특성을 평가하는데 유용하며 본 결과에 준하여 PA가 소나무 수피 추출물의 항산화 활성에 있어 중요한 역할을 한다는 사실과 높은 HWE 수율 및 PA 함량을 나타낸 라디아타 소

나무 수피를 활용하여 기능성 화장품을 제조하는 것이 바람직하다고 판단되었다. 특히 이 수종은 국내 수입되는 목재의 약 50%를 차지하고 있으며 사용 시에 수피를 박피함으로 대량 입수가 용이하다. 따라서 상기의 소나무 수피 탐색 결과로부터 본 연구의 최적 시료로 라디아타 소나무 수피를 선정하였으며 이에 대해 다양한 추출 조건을 검토하였다.

한편, 적송과 같은 국산 소나무 및 연료림으로 대량 조립된 리기다 소나무재의 경우 그 수피 HWE의 수율은 라디아타 소나무 보다 낮지만 HWE를 구성하는 페놀류의 대부분은 PA에 유래하므로 앞으로 고순도의 PA류 제조를 위하여 좋은 원료가 될 수 있을 가능성을 시사하였다. 이들 수종에 대해서는 앞으로 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

Table 3. Yield, total phenolic content, proanthocyanidin content and antioxidant activity of HWEs from various pine bark varieties

Leaf No.	Species	HWE (%)	TP (mg/g)	PA (mg/g)	PA/TP	DPPH scavenging activity (%)	
						25.0 $\mu\text{g/ml}$	12.5 $\mu\text{g/ml}$
2	<i>P. densiflora</i>	5.1 ^a	411 ^b	384 ^c	0.93	91.5	54.8
	<i>P. thunbergii</i>	2.5	541	103	0.19	44.5	20.6
	<i>P. banksiana</i>	4.1	501	27	0.05	25.2	12.4
	<i>P. contorta</i>	6.9	403	102	0.25	36.8	17.8
3	<i>P. rigida</i>	14.4	558	489	0.88	93.1	64.6
	<i>P. taeda</i>	2.4	338	51	0.15	26.0	13.9
	<i>P. rigida</i> \times <i>taeda</i>	2.7	111	41	0.37	29.7	15.3
	<i>P. serotina</i>	2.9	184	37	0.20	30.0	16.7
	<i>P. radiata</i> ^d	23.2	629	404	0.64	92.5	67.9
5	<i>P. koraiensis</i>	3.8	862	49	0.06	19.3	12.1
	<i>P. parviflora</i>	4.5	226	21	0.09	3.8	4.8

TP, total phenolic; PA, proanthocyanidin; DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

^a Values determined at a liquor ratio of 1:10.

^b Values determined by Folin-Ciocalteu assay, in units of milligrams (+)-catechin equivalent per gram HWE.

^c Values determined by vanillin-H₂SO₄ assay, in units of milligrams (+)-catechin per gram HWE.

^d Bark obtained from HanYoung Sawmilling Co. Ltd., Gunsan, Korea.

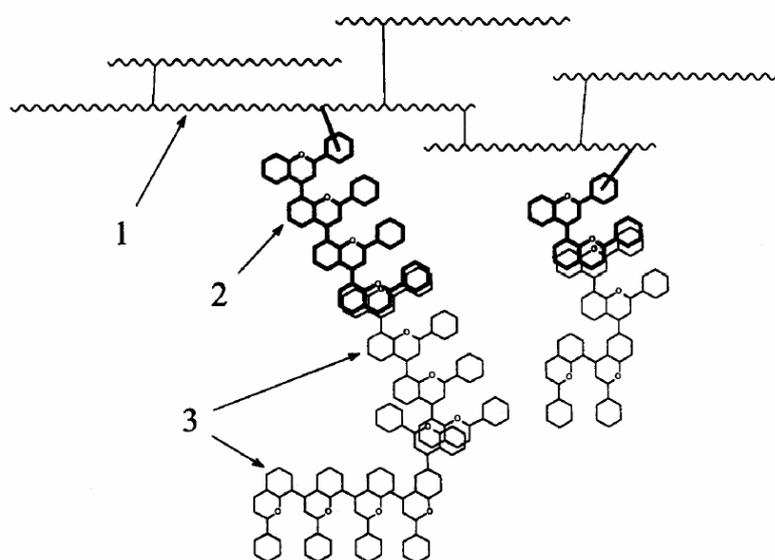


Fig. 2. Extractable and non-extractable PA in pine bark complex. (1) cell wall matrix; (2) non-extractable and (3) extractable PAs (Matthews et al., 1997).

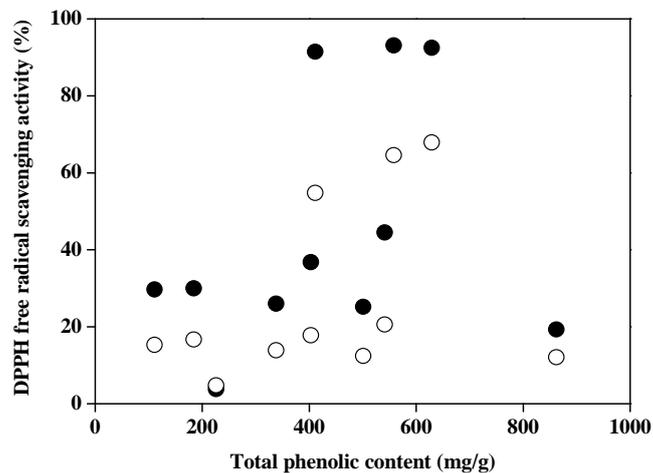


Fig. 3. Correlation between total phenolic content and antioxidant activity.
 Filled circles, 25 µg/ml; open circles, 12.5 µg/ml

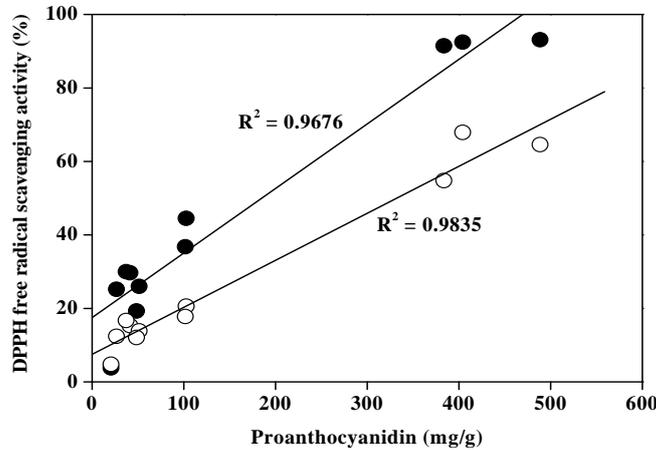


Fig. 4. Correlation between PA content and antioxidant activity
 Filled circles, 25 µg/ml; open circles, 12.5 µg/ml

다. 라디아타 소나무 수피의 추출 조건

상술한 각 소나무 수피의 화학적 조성분석, HWE의 수율 및 항산화활성 검토 결과와 원료의 수급 등을 감안하여 라디아타 소나무 수피가 본 연구를 위해 가장 적합한 원료로 생각되었다. 따라서 라디아타 소나무 수피를 공시재료로 이용하여 유기용매를 사용하지 않고 물과 같은 친환경 용매를 사용하여 유효 활성 성분인 PA를 다량 추출하기 위한 조건을 검토하였다. 즉, 수피 분말의 mesh, 액비, 추출 시간 및 온도에 따른 HWE의 수율과 PA함량을 검토하고 최적 조건을 도출하고자 하였으며, 그 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 수피 분말의 mesh별 HWE의 수율은 Fig. 5에 나타낸 것처럼 분말의 입자 크기가 작을수록 HWE의 수율은 높아졌다. 본 결과로부터 수피 HWE를 대량으로 제조할 경우 20 mesh 미통과분은 HWE 수율이 낮고 80-200 mesh는 HWE의 수율은 높으나 입자가 미세하여 여과하기가 곤란함으로 대량생산 및 경제성을 고려하여 20-80 mesh의 시료를 HWE제조에 이용하는 것이 좋을 것으로 생각되었다. 20-80 mesh의 수피 분말을 액비 5, 10, 20, 30, 50로 변화시켜 HWE의 수율을 검토하였다. 액비 5에서 HWE의 수율이 액비 10보다 그 수율이 수% 낮았으나, 이후 액비 10이상 50

까지 높이더라도 거의 일정 수율을 나타내어, HWE제조를 위한 최적 액비는 10으로 생각되었다. 추출 시간의 경우 Fig. 5에 나타낸 것처럼 HWE의 수율은 60분 이상에서 일정하였으므로 추출 최적 시간은 60분이 적합할 것으로 생각되었다. 추출 온도는 25, 40, 60, 80, 100, 120℃에서 실시하였으며 추출 온도가 증가함에 따라 HWE수율도 증가하는 경향을 나타내었다. 추출 온도 100℃에서 거의 최대 수율을 나타내었다. 따라서 라디아타 소나무로부터 HWE를 제조하는 최적 추출조건은 입자크기 20-80 mesh, 액비 10, 추출 시간 60분, 추출 온도 100℃로 생각되었다.

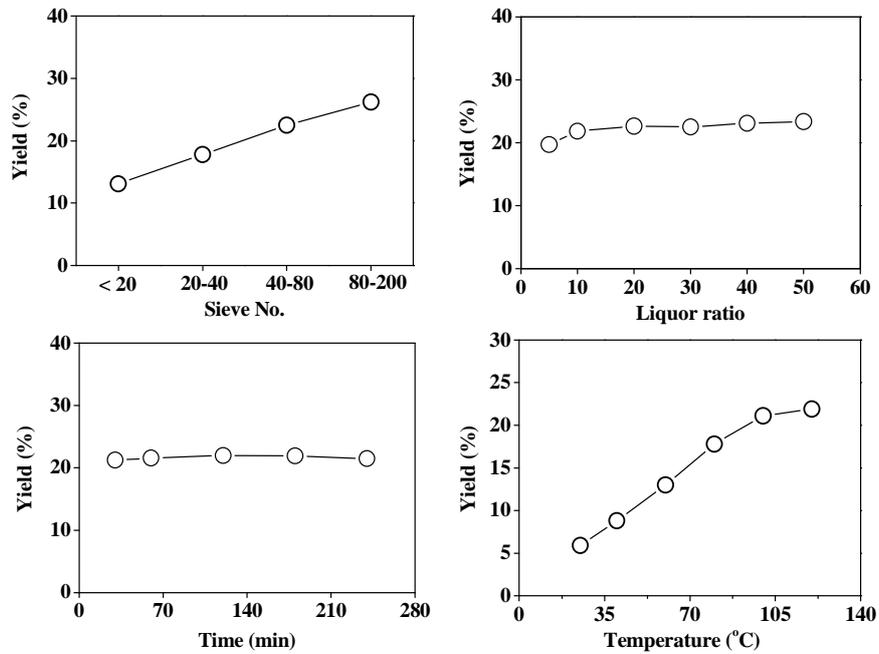


Fig. 5. Effect of particle size, liquor ratio, extraction time and temperature on water extraction of *Pinus radiata* bark.

라디아타 소나무 수피 추출에 영향을 미치는 다양한 인자(variables)에 대해 검토한 결과, 다른 인자와 비교하여 추출 온도는 추출물 수율에 중대하게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 추출 온도가 라디아타 소나무 수피 추출에 미치는 영향과 추출물의 질적인 면을 구체적으로 검토하였다. Figures 5와 6은 라디아타 소나무 수피의 열수 추출 온도에 따른 PA의 함량 변화를 나타낸다. 상술한 것처럼 열수추출 온도를 높이면, HWE의 수율은 급격하게 높아졌지만, PA 함량은 서서히 감소하였다. 즉, 추출 온도의 상승은 수피 중의 PA이외의 다른 화합물도 용출된다는 것을 알 수 있었다. Figure 7에 이러한 결과를 뒷받침 할 수 있는 결과를 나타내었다. 즉, 추출 온도의 상승과 함께 Fig. 7에 나타낸 것처럼 HWE의 280 nm에서의 흡광도 증가가 현저하였다. 본 결과로부터 추출온도의 증가는 수피 성분의 가수분해가 촉진되면서 현저한 양의 페놀산류 및 단순 페놀류 등이 생성되는 것으로 생각되었다. 그러나 소나무 수피를 기준으로 하여 계산하면, 저온 추출의 경우 PA의 함량은 높지만, HWE의 수율이 낮으므로 전체적으로 수피에서 용출되는 PA의 수율은 낮다. Figure 8에서 나타낸 것처럼 수피에 대한 PA의 함량을 plot한 결과 100°C에서 가장 높게 나타났으며, 이들 함량은 전건 수피의 약 12%를 나타내었다.

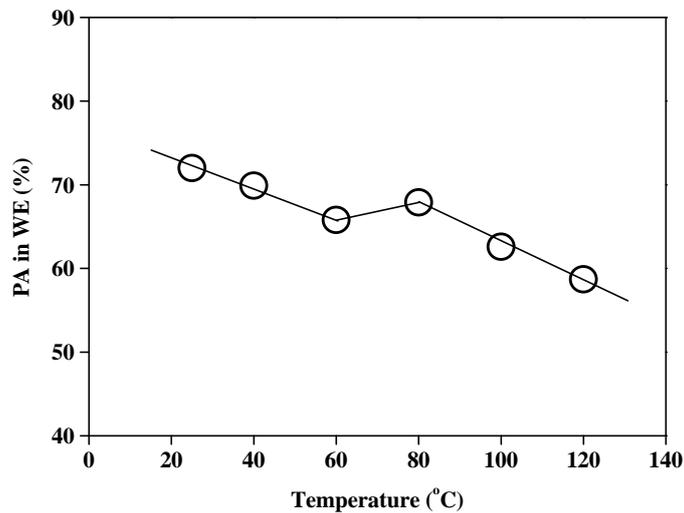


Fig. 6. Temperature effect on PA content in WE from *Pinus radiata* bark.

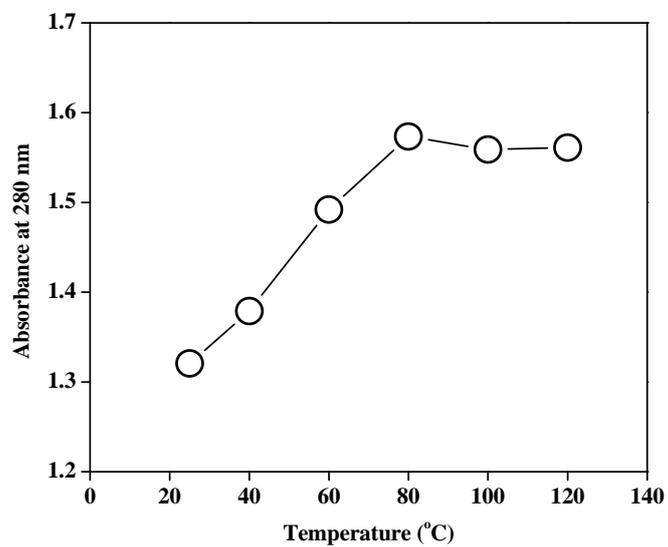


Fig. 7. Temperature effect on proximate total phenolic content in WE from *Pinus radiata* bark; 1 mg HWE/10 ml 50% (v/v) aqueous methanol.

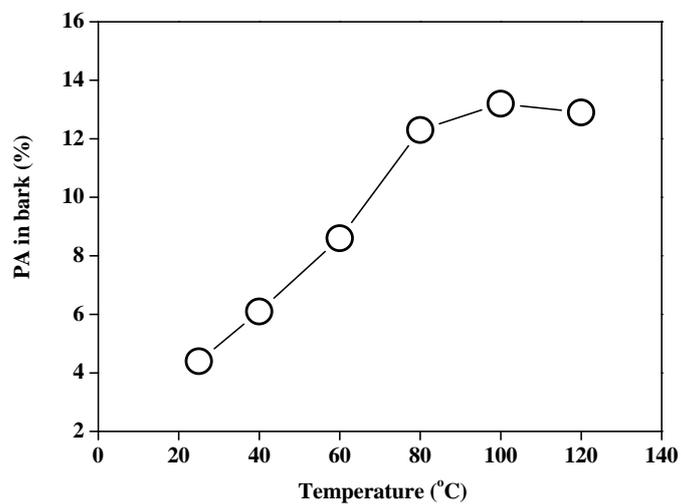


Fig. 8. Temperature effect on PA content in *Pinus radiata* bark.

추출 온도가 수피 추출물의 질적인 면에 미치는 영향을 평가하기 위해 분자량 분포와 항산화 활성을 측정하였다. Figure 9는 추출 온도에 따른 분자량 분포를 나타낸 결과이며 Fig. 10은 Fig. 9의 분자량 분포 곡선을 선분할법으로 계산하여 얻은 평균 분자량과 중합도를 그래프로 나타낸 것이다. Figure 9로부터 20.5분에 검출된 피크는 monomeric polyphenol임을 알 수 있었으며 또한 이들 성분이 온도가 증가함에 따라 추출량이 증가한다는 사실을 확인할 수 있었다. 이로부터 추출 온도가 증가함에 따라 소나무 수피 추출물에서 흔히 발견될 수 있는 caffeic acid와 quercetin과 같이 냉수에 대한 용해는 낮지만 열수에 의해 용해도가 증가하는 성분들이 용출되었을 가능성이 높다고 판단되었다. 이량체 이상의 PA 성분들을 포함하는 넓게 분포한 피크의 최대 용출 시간은 80°C까지 빠른 시간대로 이동하였으며 100°C 추출 보다 높은 온도에서는 용출 시간대가 뒤로 이동하였다. 이러한 결과로부터 80°C이하에서 온도가 증가함에 따라 분자량이 높은 PA 성분이 용출되며 100°C이상의 높은 온도 조건에서는 PA 성분이 수피 분말 내에 산화 축합됨으로 추출에서 배제되었다고 판단할 수 있었다. Figure 10으로부터 80°C에서 얻은 추출물이 Mw 3,700 정도로 가장 높은 분자량을 나타내는 것을 알 수 있으며 100°C이상의 높은 온도에서는 Mw 3,200 정도로 분자량이 80°C보다 500정도 감소한 것을 알 수 있었다. 사실상 분자량이 높으면 높을수록 기능성 화장품으로 사용하는 데는 어려운 점이 있으며 이것은 formulation 제조 시에 난용성이 되고 안정성 문제를 야기할 수 있기 때문이다. 반면에 기능성 저분자 폴리페놀이 많이 용출될수록 유효 성분의 피부 침투률이 증가하게 됨으로 이들 성분의 다량 추출은 기능성 화장품을 제조하는 데 있어 잇 점으로 작용할 것으로 사료되었다. 상기의 추출 결과를 감안해 볼 때 이러한 추출물의 질을 만족할 수 있는 라디아타 소나무 수피의 추출 온도는 100°C로 판단되었다.

Figure 11은 추출 온도에 따른 추출물의 항산화 활성을 검토한 결과이며 80°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 25°C에서 얻은 추출물의 항산화 활성이 낮게 나타난 것은 물에 대한 용해도는 높지만 활성이 낮은 중성당류와 배당체들이 상당 부분 용출되었기 때문인 것으로 판단되었다. 80-120°C 사이에서 얻은 열수 추출물은 온도가 증가함에 따라 항산화 활성이 감소하는 것을 알 수 있었으며 80°C에서 높은 항산화 활성이 나타난 것은 저분자 폴리페놀에 의한 상승효과에 기인하는 것으로 판단되었다. 100°C이상의 비교적 고온에서는 저분자 폴리페놀이 쉽게 산화되는 경향이 있어 이로부터 형성된 고분자 폴리페놀은 반응 속도 차이

에 의해 DPPH assay에서 다소 활성이 과소평가됨으로 이 고분자 산화물과 주요 성분인 PA가 혼재되어 있는 추출물의 경우 항산화 활성이 감소하는 것으로 판단되었다.

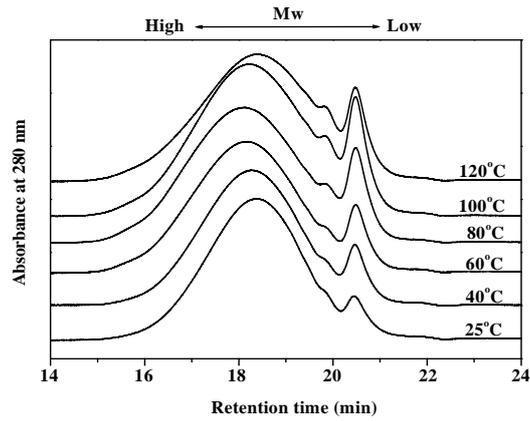


Fig. 9. Mw distribution of WE from *Pinus radiata* bark at increasing temperature.

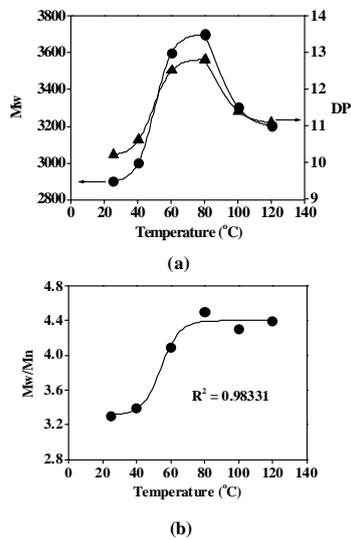


Fig. 10. Temperature effect on Mw, DP, and Mw/Mn of PA-rich WE from *Pinus radiata* bark.

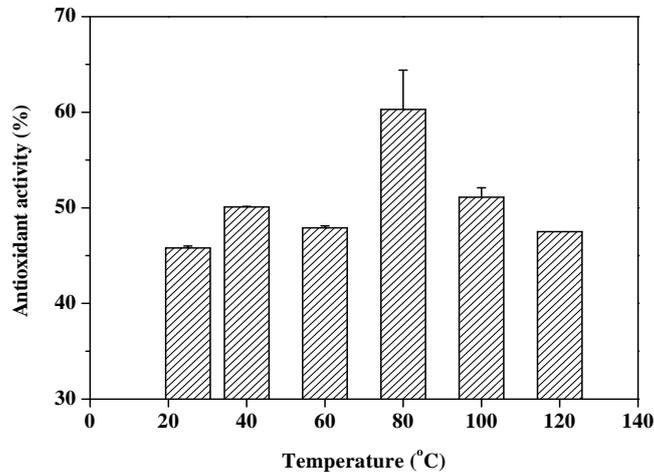


Fig. 11. Temperature effect on antioxidant activity of WE from *Pinus radiata* bark.

라. 라디아타 소나무 수피 HWE의 분석

1) HWE의 대량제조

소나무 수피 중 유효 추출 성분인 PA를 대량으로 추출할 수 있는 최적조건 즉, 입자 크기 20-80 mesh, 액비 10, 추출시간 60분, 추출온도 100°C을 적용하여 라디아타 소나무 수피 의 HWE를 대량 제조하였으며 이때 HWE 수율은 22%였다. 라디아타 소나무 수피 중의 열수 가용성 추출물은 상술한 Fig. 2의 수피를 이루고 있는 폴리페놀 매트릭스에서 추출 가능한 PA가 타 소나무 수피에 비하여 많이 존재하는 것으로 생각되었다. 이하 본 수피 HWE를 이용하여 활성 성분의 분리, 저분자 화합물의 분리 및 동정 그리고 당류 및 무기화합물 분석을 수행하였다.

2) HWE 중의 PA분리 정제와 그 구조 분석

최적 추출 조건에서 대량으로 제조한 라디아타 소나무 수피 HWE의 일부를 Fig. 1의 용매 추출과정을 거친 후 그 수층을 Sephadex LH 20 칼럼으로 분획하였다. 그 결과 저분자 및 고분자 PA를 제외하고 약 58%의 PA를 단리할 수 있었다. 본 PA함량은 이전 HWE의 vanillin-H₂SO₄ assay에 의한 비색법으로 측정

한 PA 40.4%보다 높게 나타났다. 단리한 PA의 화학 구조를 특성화하는 것은 기능성 화장품의 원료로 수피 추출물을 활용하는 데 있어 상당히 중요한 역할을 함으로 UV 심색이동, Bate-Smith alcoholysis, FT-IR, ^{13}C NMR, MALDI-TOF MS, 분자량 분포도를 측정하여 상세히 검토하였다.

가) PA의 UV 심색이동

라디아타 소나무 수피로부터 단리한 PA의 UV 스펙트럼과 알칼리에 의한 심색이동(bathochromic shift) 효과를 Fig. 12에 나타내었다. PA의 UV 스펙트럼은 280 nm에서 최대 흡광도를 나타내었으며 이는 전형적인 PA의 B ring에 해당하는 흡수 band에 기인한 것이다. PA의 B ring의 수산기는 알칼리에 의한 심색이동이나 착염형성, 유해 산소종에 대한 proton-donor로서의 환원 역할을 한다. Cren-Olivé et al. (2002)의 보고에 준하여 이러한 현상은 catechin의 페놀성 수산기의 pKa 값으로부터 예상 가능할 것으로 판단되며 B ring의 3'-OH와 4'-OH가 각각 9.02와 9.12로 A ring의 5-OH(9.43)와 7-OH(9.58)보다 낮아 B ring이 알칼리, 착염 및 proton-donor로써 작용하는 주요 부위를 제공한다고 볼 수 있었다. PA에 알칼리를 처리한 경우 12 nm 간격으로 이동한 것을 확인할 수 있었으며 이로부터 페놀성 화합물임을 확인할 수 있었다(Harbone, 1998).

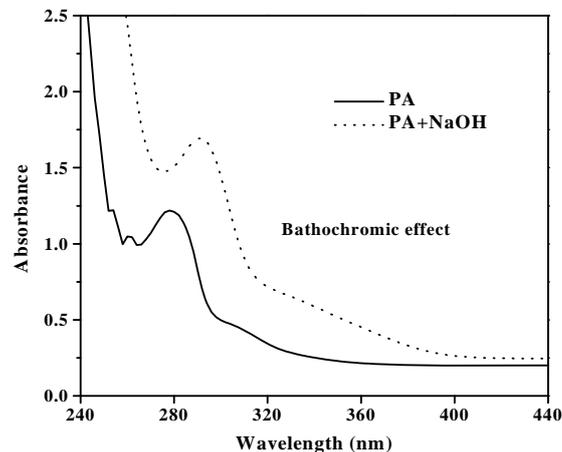


Fig. 12. UV spectra of PAs from *Pinus radiata* bark and their bathochromic effect.

나) Bate-Smith법에 의한 PA구성 단위체 검토

Bate-Smith법은 철염 존재 하에서 butanol-HCl에 의해 PA의 C4-C8 탄소 결합이 깨어짐에 의해 붉은색 색소 성분인 cyanidin과 delphinidin을 형성하게 됨으로 이들에 기인하는 최대 흡수 band에 해당하는 파장으로부터 PA의 구성 단위체를 확인하는 것을 가능하도록 한다(Hagerman et al., 1997; Dalzell & Kerven, 1998; Porter et al., 1986). 이 방법에서 전이 금속 이온은 붉은색 영역의 흡광도를 증가시키는 역할을 하며 Porter et al. (1986)은 Fe^{3+} 가 butanol-HCl 반응에 있어 붉은 색상을 형성하는데 가장 효율적이라고 보고하였다. 그러므로 본 연구에서는 Fe^{3+} 를 포함하는 butanol-HCl을 단리한 PA의 구조를 대략적으로 평가하는데 사용하였다. 이 반응으로부터 형성된 cyanidin은 본 연구에서 적용한 조건에서 546 nm에서 최대 흡광도를 나타내고 delphinidin은 558 nm에서 최대 흡광도를 나타냄으로(Samejima & Yoshimoto, 1981) 이들 간의 차이에 의해 상대적인 존재비를 대략적으로 추정할 수 있다(Hussein et al., 1990). PA의 화학 구조는 A 및 B ring의 페놀성 수산기의 개수가 형성된 안토시아닌 생성물의 λ_{max} 와 흡광계수(extinction coefficient)에 영향을 미친다는 사실에 근거하여 추정할 수 있다. 특히, PA는 butanol-HCl 반응에 의해 (epi)catechin-based 및 gallo(epi)catechin-based PA으로부터 각각 cyanidin과 delphinidin의 안토시아닌을 형성한다(Samejima & Yoshimoto, 1981). Hussein et al. (1990)은 butanol-HCl 반응에 있어서 540-550 nm사이에서의 흡수 최대의 변화는 안토시아닌(delphinidin to cyanidin ratio)의 상대적인 양에 기인한다고 제안하였다.

Figure 13은 라디아타 소나무 수피 PA를 Bate-Smith법으로 처리한 후 반응 생성물의 가시광선 스펙트럼을 조사한 결과이다. Butanol-HCl 반응 후 546 nm에서 최대 흡광도를 나타내어 라디아타 소나무 수피로부터 단리한 PA는 대부분 delphinidin 보다는 오히려 cyanidin 골격으로 이루어져 있다는 것을 알 수 있었다.

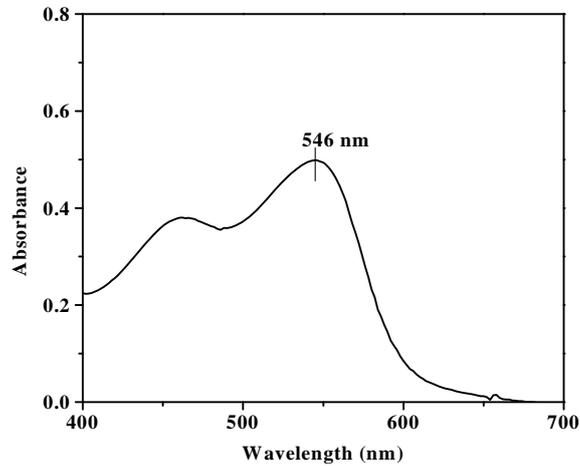


Fig. 13. Visible spectrum of PAs from *Pinus radiata* bark after alcoholysis under an acidic condition.

다) PA의 FT-IR 분광 분석

Figure 14는 라디아타 소나무 수피 PA의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 것이다. 3384.8, 1612.4, 1066.6 cm^{-1} 의 강한 흡수대는 전형적인 고분자 polyflavonoid의 특정 관능기를 나타내었다(Yazaki & Hillis, 1977; Kim et al., 1996). Foo (1981)에 따르면 1534, 1520, 732 cm^{-1} 의 흡수대는 prodelphinidin(PD)의 존재에 기인하는 반면 procyanidin(PC)에 상응하는 흡수대는 1524, 782 cm^{-1} 에서 나타난다. 이로부터 Figure 14에서 알 수 있는 바와 같이 라디아타 소나무 수피 PA는 주로 상술한 것처럼 procyanidin 골격을 하고 있음을 추정할 수 있었다.

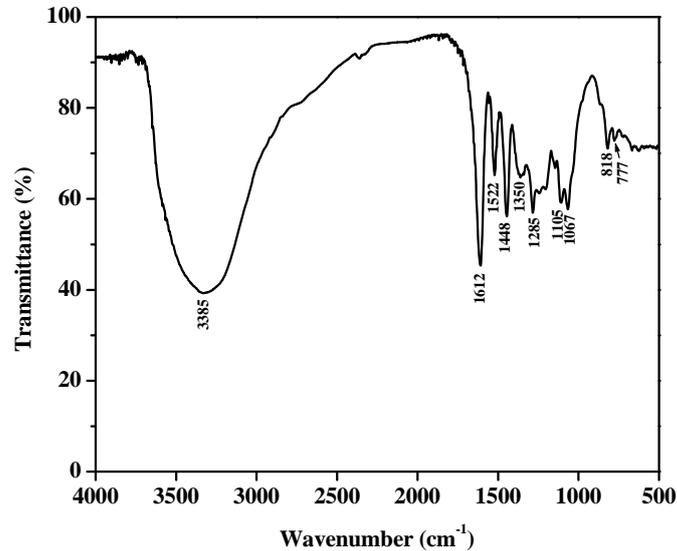


Fig. 14. FT-IR spectrum of PAs from *Pinus radiata* bark.

라) PA의 ^{13}C NMR 분석

^{13}C NMR 스펙트럼은 PA의 기본 구조, 입체 배위, PC:PD의 존재비 등을 귀속 하는데 유용한 수단으로 사용되어져 왔다(Czohcanska et al., 1980; Newman et al., 1987; Foo et al., 2003; Ayres et al., 1997; Hemingway, 1989). Figure 15는 라디아타 소나무 수피 PA의 ^{13}C NMR 스펙트럼을 나타낸 것이며 PC와 PD 구조를 포함하는 전형적인 PA의 signal을 보여주고 있음을 알 수 있었다. 문헌(Czohcanska et al., 1980; Newman et al., 1987; Ayres et al., 1997)을 참고하여 각각의 signal들을 귀속하였다. 115.6(C2', C5'), 120.2(C6'), 144.8 ppm(C3', C4')에서 보여주는 signal들은 PC 단위체, 즉 (+)-catechin과 (-)-epicatechin의 존재에 기인하며 145.5 ppm의 작은 signal은 PD 단위체, 즉 (+)-gallocatechin과 (-)-epigallocatechin의 존재에 의한 것이다. 유사한 환경에 있는 144.8 ppm(PC구조의 C3', C4')과 145.5 ppm(PD구조의 C3', C5') signal들의 피크 면적으로부터 PC:PD의 존재비를 알 수 있다. 그러나 PC 단위체가 PD 단위체보다 상당히 많이 존재하는 경우 PD의 signal이 PC의 signal에 의해 가리어짐으로 존재비를 추정

하는 것이 곤란하다. 이러한 문제점을 보완하기 위해 Kraus 등(2003)은 PC:PD 존재비를 구하는데 116/107 ppm의 피크 높이를 이용하였다. 이들 연구자는 116/107 ppm의 피크 비율이 3.3이상인 경우 PC 단위체가 100%라고 보고하였다. 또한, 이들이 제시한 116/107 ppm의 피크비율과 PC:PD 존재비에 대한 자료를 근거로하여 라디아타 소나무 수피 PA는 PC와 PD 단위체가 각각 94:6 비율로 존재함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Czochanska 등(1979)의 ^{13}C NMR 적분 결과에서 나타난 PC:PD 90:10과 거의 일치하였다. 또한 Bate-Smith alcoholysis 반응 및 FT-IR 결과와도 유사하게 나타났다.

30-90 ppm영역에서 나타난 signal들은 flavan-3-ol의 C2, C3 및 C4에 기인하며 76.3과 82.6 ppm의 두 signal은 2,3-*trans*와 2,3-*cis* 배위로 귀속하였다. 이로부터 라디아타 소나무 수피 PA는 *trans* 및 *cis* 이성질체가 공존하며 *trans* 배위가 *cis* 구조에 비해 상대적으로 많이 존재한다는 것을 알 수 있었다. 67.7과 72.3 ppm의 signal은 말단 및 확장 구조 단위체의 C3으로 각각 귀속하였다.

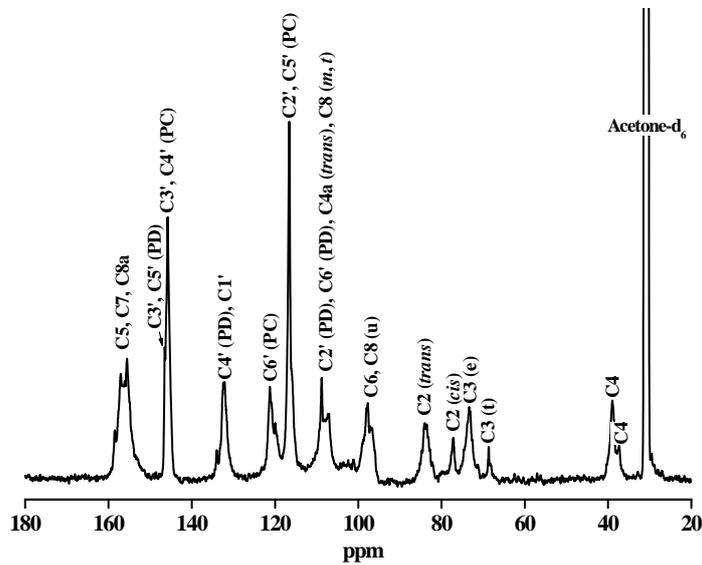


Fig. 15. ^{13}C FT NMR (100 MHz) spectrum of PAs from *Pinus radiata* bark in acetone- d_6 /D $_2$ O; *t*, terminal unit; *m*, middle unit; *u*, upper unit; PC, procyanidin; PD, prodelphinidin.

마) PA의 MALDI-TOF MS분석

MALDI-TOF MS는 고분자 구조의 반복 단위, 수 평균분자량(Mn), 화학적인 균질성에 관한 정보를 제공한다(Pasch & Schrepp, 2003). 그러므로 단리한 PA의 화학 구조의 보다 상세한 정보를 얻기 위해 MALDI-TOF MS 분석을 실시하였다. Flamini (2003)과 Behrens et al. (2003)은 DHB 매트릭스를 사용하여 TOF MS의 reflectron mode를 적용했을 경우 PA를 검출하는데 최소의 background noise와 가장 넓은 범위의 분자량을 얻을 수 있다고 보고하였다. 산소 혹은 질소와 같은 electronegative 원소를 분자 구조 내에 포함하는 고분자는 Li^+ 혹은 Na^+ 에 의해 가장 잘 양이온화되며 π 전자를 갖는 비극성 고분자는 Ag^+ 혹은 Cu^+ 과 같이 극성화할 수 있는 양이온과 친화성을 갖는다. 본 연구에서는 아세틸화한 PA의 MALDI-TOF MS 분석을 위해 적합한 양이온을 스크린하기 위해 다양한 금속 이온을 사용하였으나 Na^+ 만이 MS 스펙트럼 상의 signal의 강도에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 그러나 단리한 PA 자체는 DHB 매트릭스와 Na^+ 이 존재하는 조건에서 분석을 하더라도 signal을 검출할 수 없었다. 이 결과는 DHB 매트릭스의 proton-donating 거동과 pulsed N_2 -laser(337 nm)의 방사에 대한 PA의 불안정한 구조에 기인하는 결과라고 생각되었다. 또한 이러한 원인을 규명하기 위해 PA를 pyridine-acetic anhydride와 diazomethane 시약으로 각각 아세틸화 및 메틸화하여 MALDI-TOF MS 분석을 실시하였으나 단지 아세틸화한 PA만이 signal을 검출할 수 있었다. 따라서 PA의 페놀성 수산기를 아세틸화하는 것은 본 연구에서 적용한 MALDI-TOF MS 분석 조건하에서 성공적인 flight를 위해 중요한 인자로 작용한 것으로 사료되었다.

Figure 16은 라디아타 소나무 수피 PA를 아세틸화한 후 얻은 시료, DHB 매트릭스 및 NaCl을 혼합하여 측정된 MALDI-TOF MS 스펙트럼을 나타낸 것이다. Table 4는 TOF MS 스펙트럼 상의 결과를 체계적으로 명시한 결과이다. TOF MS 스펙트럼에서 알 수 있는 바와 같이 498 Da간격으로 분자량이 증가하고 있는 것을 확인 할 수 있었다. 여기에서 498 Da은 아세틸화한 catechin/epicatechin 단량체의 질량에 해당하는 것으로(Nonier et al., 2004) 라디아타 소나무 수피 PA는 PC 단위체가 대부분을 차지하고 있음을 알 수 있었으며 각각의 DP에 해당하는 질량 피크에 있어서 58 Da 즉, -OAc관능기에 해당하는 질량이 증가하는 것으로부터 B ring에 수산기가 1개 더 결합한 PD 단위체가 부분적으로 소량 존재함을 알 수 있었다. TOF MS에 의한 아세틸화한 PA의 DP는 팔량체(octamer)로

한정되었다. 이러한 결과는 고분자량에 해당하는 PA가 매트릭스로부터 혹은 검출기로 유도되는 과정에서 분자의 과편화가 일어나거나(Perret et al., 2003) 저분자 PA가 검출기를 포화시킴에 의해 고분자량 PA가 검출되는 것을 방해하기 때문인 것으로(Krueger et al., 2000) 판단되었다.

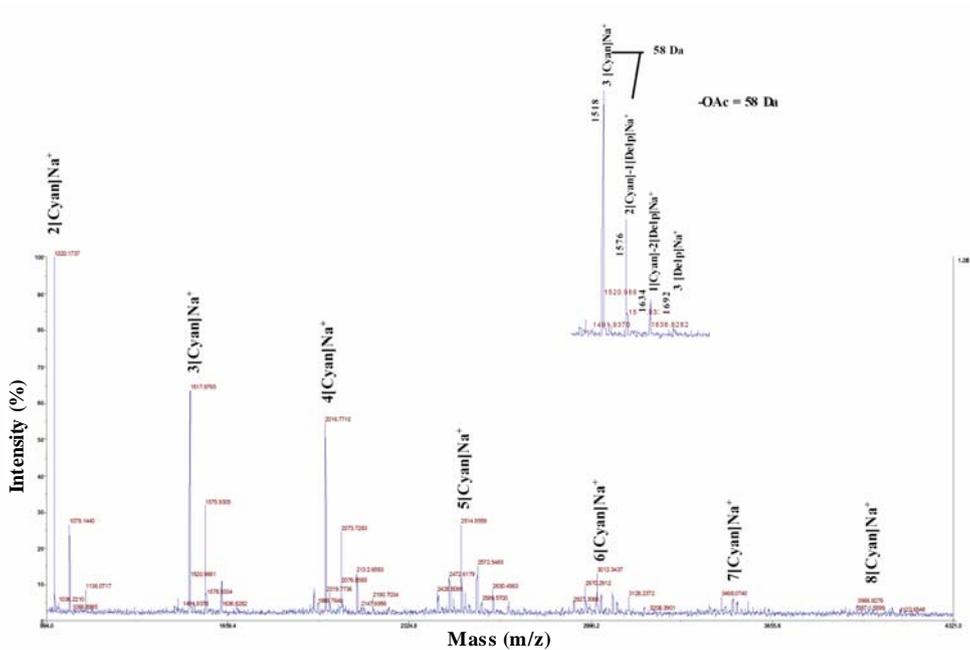


Fig. 16. MALDI-TOF MS of PAs (acetylated form) from *Pinus radiata* bark in the presence of sodium ion.

바) PA의 분자량 분포

PA는 많은 수산기를 포함하므로 겔여과 시 강한 흡착현상이 발생하게 된다. 이러한 강한 흡착을 방지하기 위해 아세틸화를 하는 것이 일반적이며(Kennedy & Taylor, 2003) 수 평균분자량 및 중량 평균분자량을 선분할법에 의해 계산한 후 아세틸기에 해당하는 만큼 분자량을 배제해주었다. Figure 17은 아세틸화한 라디아타 소나무 수피 PA의 분자량 분포를 나타낸 것이며 Table 5는 표준 분자량의 polystyrene과 페놀을 표준으로하여 선분할법으로 계산한 각각의 분자량 및 중합도 결과를 정리한 것이다. 이들 결과로부터 라디아타 소나무 수피 PA는 중

량 평균분자량(Mw) 3,800, 수 평균분자량(Mn) 1,200, 다분산성(Mw/Mn) 3.2, 평균 중합도(DP: degree of polymerization) 13을 가진다는 것을 알 수 있었으며 겔 여과 크로마토그램의 최대 피크점에 해당하는 중합도는 7정도였다.

Table 4. Masses and unit type of PAs (acetylated form) from *Pinus radiata* bark by MALDI-TOF MS

Polymer	M+Na ⁺ (positive reflectron)	Unit type	
		Cyanidin (<i>n</i>)	Delphinidin (<i>n'</i>)
Dimer	1020.3	2	0
	1078.3	1	1
	1136.3	0	2
Trimer	1518.3	3	0
	1576.2	2	1
	1635.2	1	2
Tetramer	2017.1	4	0
	2075.1	3	1
	2133.1	2	2
	2190.1	1	3
Pentamer	2515.0	5	0
	2573.0	4	1
	2630.9	3	2
	2688.8	2	3
Hexamer	3012.9	6	0
	3070.8	5	1
	3128.7	4	2
	3186.8	3	3
Heptamer	3511.7	7	0
	3569.6	6	1
	3627.5	5	2
	3685.4	4	3
Octamer	4009.4	8	0
	4067.3	7	1

Note: Calculated $M+Na^+=M'+(n+n'-1)(M'-2H)+58n'+23$: M', 500 Da; H, 1 Da; Na⁺ adduct, 23 Da; -OAc group, 58 Da.

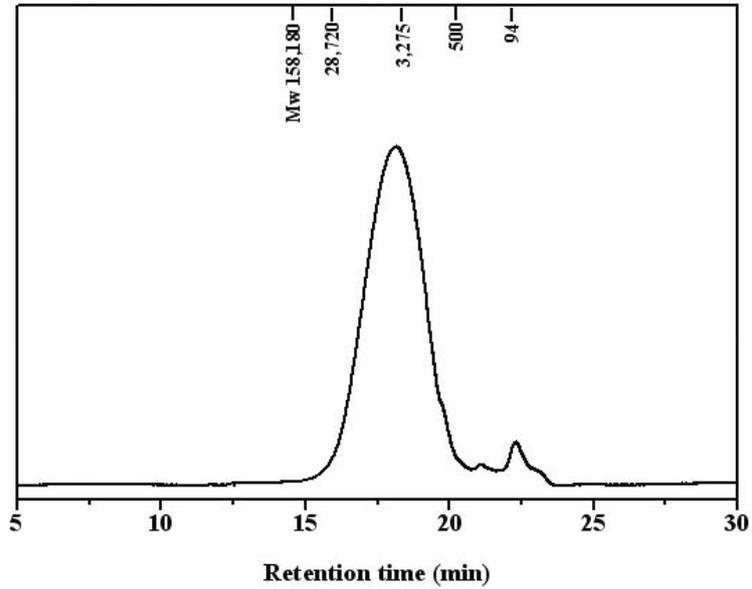


Fig. 17. Molar mass distribution of PAs (acetylated form) from *Pinus radiata* bark.

Table 5. DP and Mw of PA isolated from *Pinus radiata* bark

Mn	Mw	Mw/Mn	DP
1,200	3,800	3.2	13

Acetylated PA is used for determination of molecular weight (Mw) distribution and the molar mass of the substituted acetyl group based on procyanidin(PC) units is excluded in this calculation.

사) PA의 항산화 활성

Table 6은 라디아타 소나무 수피 HWE, HWE로부터 분리 정제한 PA 및 시판 수용성 항산화제인 비타민 C의 항산화 활성을 상호 비교하였다. 수피 HWE의 경우 항산화 활성은 비타민 C보다 약간 낮았으나, HWE의 주성분인 PA는 비타민 C와 거의 유사하거나 높았다. 즉, 라디아타 소나무 수피의 강력한 항산화 활

성은 이러한 열수 가용의 PA에 유래하는 것이며, 앞으로 기능성 화장품 제조에 있어서 좋은 원료가 될 가능성이 충분히 시사되었다.

Table 6. Antioxidant activity of HWE and PA from *Pinus radiata* bark

Antioxidant	DPPH free radical scavenging activity, IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
HWE	12.3
PA	9.0
Vitamin C	9.3

HWE: Hot Water Extract, PA: Proanthocyanidin.

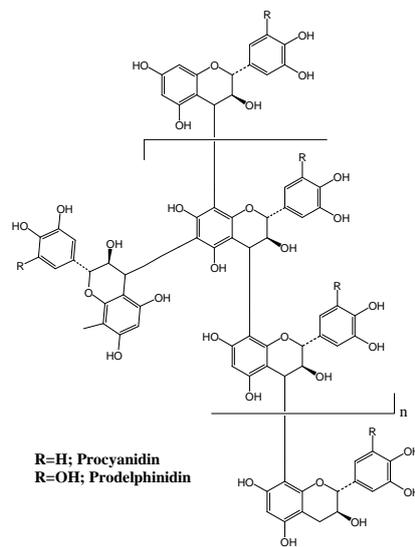


Fig. 18. Chemical structure of PA isolated from *Pinus radiata* bark.

PC:PD=94:6, PC: procyanidin, PD: prodelphinidin.

3) 저분자 폴리페놀류의 분리 및 그 구조 분석

라디아타 소나무 수피 HWE 중 에틸아세테이트 가용부를 Sephadex LH 20칼럼 상에서 에탄올로 용출시켰으며 용출 성분은 UV 검출기와 최적화한 용매조건에서 TLC 전개를 통해서 분획 I-VI을 얻을 수 있었다(Fig. 19). 이들 분획의 수

율은 Table 7에 나타내었다. 이들 분획은 주로 페놀산류와 flavonoid aglycone에
 상응하며 HWE 중에 약 5.18%를 차지하였다. 분획 I과 II는 지방족 화합물, 단
 순 페놀류 및 중성당류가 대부분을 차지함으로 분획 III-VI에 대해 UV, GC,
 GC-MS를 포함한 다양한 기기분석을 실시하였다.

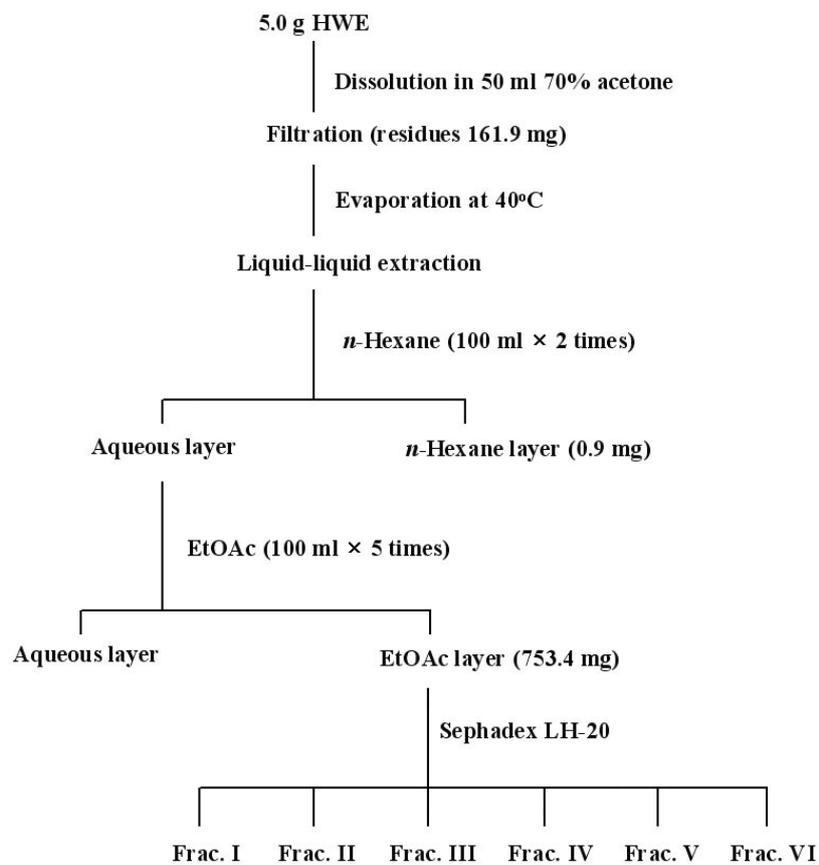


Fig. 19. Schematic flow diagram for fractionation of monomeric polyphenols of HWE from radiata pine bark.

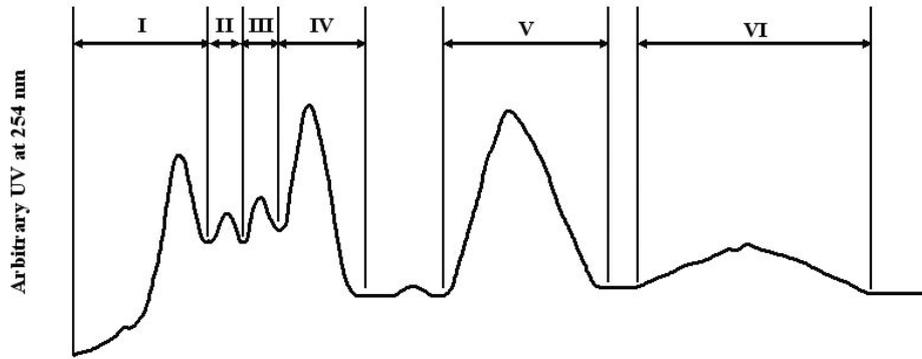


Fig. 20. Elution chromatogram of monomeric polyphenols of ethyl acetate soluble fraction on a Sephadex LH 20 column using ethanol as an eluent.

Table 7. Yields of ethyl acetate-soluble fractions (600 mg) in HWE from *Pinus radiata* bark

Fraction	Yield (mg)
I	13
II	5
III	10
IV	9
V	158
VI	29

Figure 20은 라디아타 소나무 수피 HWE 중 에틸아세테이트 가용부의 에탄올 용출 칼럼 크로마토그램을 나타낸 것이며 각각의 분획에 대해 UV 스펙트럼을 측정하여 분획물의 구성 성분을 대략적으로 추정할 수 있었다(Fig. 21). 또한 분획 III-VI의 구성 성분에 대한 상세한 분석은 GC 및 GC-MS를 통해 이루어졌으며 그 결과를 Figure 22와 Table 8에 나타내었다. 분획 III(10 mg)은 *p*-hydroxybenzoic acid(1), vanillic acid(2), protocatechuic acid(3), *cis*-ferulic acid(4), *p*-coumaric acid(5) 및 *trans*-ferulic acid(6)의 다양한 페놀산류로 구성되어 있었다. 이들 페놀산류는 표준 페놀산과 문헌(Owen et al., 2003; Zhang & Zuo, 2004)을 참고하여 동정하였다. *p*-Hydroxybenzoic acid의 경우 식물체에 혼

히 존재하는 페놀산이지만 본 연구에서 라디아타 소나무 수피 추출물 중 처음으로 검출되었다. Ferulic acid의 구조 이성질체는 GC의 보유시간에 따른 차이로부터 명백히 구분할 수 있었다. 분획 IV(9 mg)의 UV 스펙트럼은 문헌(Dueñas et al., 2004)에서 보고된 protocatechuic acid의 스펙트럼과 거의 유사하였으며 262와 292 nm의 두 흡수 band는 *para* position과 *ortho* 혹은 *meta* position중 하나의 관능기가 존재함을 나타내었다. 분획 IV는 GC 및 GC-MS분석 결과 RT 4.43분에 90%이상을 차지하는 주요 피크를 나타내었으며 MS 결과 M^+ 가 370 m/z를 나타내었다(Fig. 24). 화합물 1은 분획 IV의 주요성분이므로 재결정 없이 ^1H 과 ^{13}C NMR 분석을 실시하였다. ^1H NMR 스펙트럼은 ABX 시스템의 방향족 signal을 6.79(d, $J=7.8$ Hz), 7.41(dd, $J=1.9$ & 7.7 Hz), 7.43(d, $J=1.9$ Hz) ppm에서 보여주었으며 각각 H-5, H-6, H-2로 귀속하였다. 또한 ^{13}C NMR 스펙트럼은 151.4와 146.0 ppm에서 두개의 oxygen-bearing 방향족 고리에 상응하는 signal을 보여주었으며 170.1 ppm에서 케톤기에 해당하는 signal을 나타내었다. 이들 결과를 종합하여 화합물 1은 protocatechuic acid로 동정하였다. Figure 22에서 분획 IV의 RT 8.05분에 검출된 피크는 396(M^+)와 73(base peak) m/z의 특징적인 질량피크를 가지는 화합물로 질량 파편화 패턴으로부터 *trans*-caffeic acid로 동정할 수 있었다.

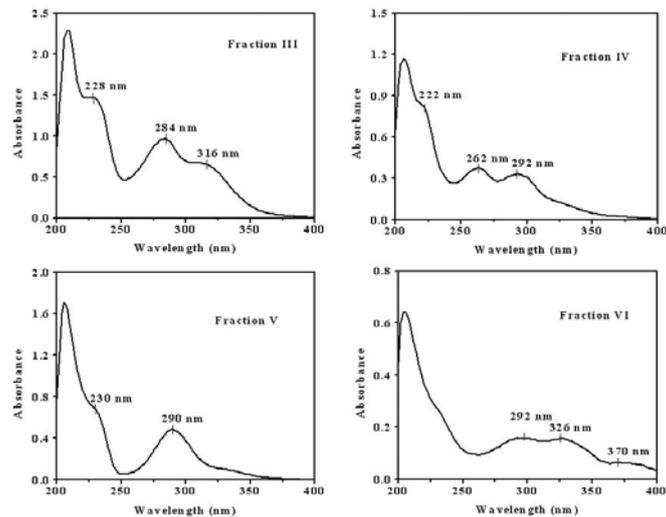


Fig. 21. UV spectra of fractions III-VI obtained from ethyl acetate soluble fraction of HWE from radiata pine bark.

분획 V(158 mg)의 UV 스펙트럼은 290 nm에서 전형적인 flavanone과 dihydroflavonol에 해당하는 특징적인 흡수 band를 나타내었다. 백색의 결정이 분획 V에서 침전으로 발생하였으며 초순수로 재결정하여 화합물 2을 단리하였다. 화합물 2(14 mg)의 화학 구조는 스펙트럼 연구에 의해 확인할 수 있었다. 화합물 2의 UV 흡수 band는 290과 326(sh) nm에서 관찰되었으며 dihydroflavonol인 taxifolin의 UV 흡수 band와 일치하였다(Le Nest et al., 2004; Dellus et al., 1997; Mabry et al., 1970). AlCl_3 를 첨가하였을 때 band I과 band II가 각각 50과 20 nm 심색이동하였으므로 5-hydroxy-4-ketogi의 존재를 확인할 수 있다(Mabry et al., 1970; Harborne & Mabry, 1982; Bergeron et al., 1998). 또한 NaOAc를 첨가하였을 때 36 nm 심색이동하였으므로 C-7에 수산기가 존재하지 않는 것을 알 수 있었다(Mabry et al., 1970; Li et al., 1997). 화합물 2의 ^{13}C NMR 스펙트럼(Fig. 25)에서 나타난 85.1(C-2), 73.7(C-3), 198.2(non-conjugated keto기, C-4) ppm으로부터 dihydroflavonol골격임을 확인할 수 있었다. ^1H NMR 스펙트럼에서 보여준 4.49와 4.90 ppm의 signal은 H-2과 H-3의 methylene proton에 각각 상응하였다. 높은 H-2/H-3 coupling constant($J=11.5$ Hz)는 C ring이 입체적으로 *trans* 배위를 하고 있음을 나타내었다. 5.87과 5.91 ppm에서 관찰된 두 개의 doublet signal은 A ring의 낮은 coupling constant($J=2$ Hz)로부터 *meta*-coupled aromatic proton으로 귀속하였다. 6.79(d, $J=7.9$ Hz), 6.83(dd, $J=1.9$ & 9.8 Hz) 및 6.85(d, $J=1.4$ Hz) ppm은 1, 2, 4-trisubstituted benzene ring에 기인하는 signal이었다. 상기의 모든 분석 결과로부터 화합물 2는 *trans*-taxifolin으로 동정하였다.

화합물 2를 단리한 후 잔사는 TMS화한 후 GC 및 GC-MS로 분석하였다(그림 16). RT 19.33분과 19.85분에 검출된 두 화합물은 650(M^+)와 368(base peak) m/z 의 주요 질량 피크를 나타내어 서로 이성질체 관계에 있음을 확인할 수 있었다. 이들 화합물은 표준품과의 RT 및 질량 파편화 패턴으로부터 각각 (-)-epicatechin(9)과 (+)-catechin(11)으로 동정하였다. RT 20.13분과 21.13분에 검출된 두 화합물 또한 서로 이성질체 관계에 있는 화합물임을 확인할 수 있었으며 주요 질량 피크는 665(M^+)와 368(base peak) m/z 에 해당하였다. 이 두 화합물은 상기에서 동정한 *trans*-taxifolin을 표준품으로 사용하여 비교한 결과 각각 *cis*-taxifolin(12)과 *trans*-taxifolin(14)임을 확인할 수 있었다. Catechin류와 taxifolin 이성질체간의 base peak(368 m/z)가 서로 일치하는 결과로부터 이들

플라보노이드류는 retro Diels-Alder fission(Fig. 23)에 따른 질량 파편화가 이루어짐을 알 수 있었다.

분획 VI(29 mg)은 370 nm에서 flavonol의 특징적인 UV 흡수 band를 나타내었다. 분획 VI로부터 노란연두색의 결정이 침전으로 발생하였으며 에탄올로 재결정하여 화합물 3을 얻을 수 있었다. 화합물 3(3 mg)의 IR 스펙트럼은 3412 cm^{-1} 에서 수산기에 해당하는 강한 흡수대를 보여주었으며 1665, 1612, 1016 cm^{-1} 에서 conjugated carbonyl기와 방향족 이중결합 및 aryl ether에 상응하는 흡수대를 나타내었다. 화합물 3의 374 nm에서 나타난 band I은 flavonol의 B ring에 있어 3', 4'-dihydroxyl기에 기인하는 최대 흡광도를 보여주었으며 문헌(Li et al., 1997; Lewis et al., 1998; Peng et al., 2003)과 비교하여 quercetin과 유사함을 확인할 수 있었다. 661(M^+)과 647(base peak) m/z에서 나타난 특징적인 질량 피크는 보고된 quercetin의 것과 동일하였다(Owen et al., 2003; Zhang & Zuo, 2004; Stevens et al., 1996). ^{13}C NMR 스펙트럼(Fig. 26)은 147.9(C-2), 137.2(C-3) 및 177.2(conjugated keto기, C-4) ppm에서 flavonol골격에 해당하는 특징적인 탄소 signal을 나타내었다. ^1H NMR 스펙트럼으로부터 6.18과 6.38 ppm에서 관찰된 signal은 낮은 coupling constant를 나타내어 *meta*-coupled aromatic proton에 기인하는 것으로 판단하였다. 또한 6.88(d, $J=8.1$ Hz), 7.63(dd, $J=2.0$ & 8.4 Hz) 및 7.73(d, $J=1.4$ Hz) ppm에서 나타난 signal은 1,2,4-trisubstituted benzene ring으로 귀속하였다. 상기의 결과로부터 화합물 3은 quercetin으로 동정할 수 있었다. 화합물 3을 단리한 후 얻어진 잔사는 TMS화한 후 GC 및 GC-MS로 분석하였다(Fig. 22). GC-MS결과로부터 분획 VI는 (+)-catechin(11), *cis*-taxifolin(12), (+)-gallocatechin(13), *trans*-taxifolin(14) 및 quercetin(17)을 포함하는 것을 알 수 있었다. 또한 conjugated 이중결합과 retro Diels-Alder 반응, 소나무 수피의 생합성 경로, 질량 파편화 패턴으로부터 astringenin(8), astringenin glycoside(10), *trans*- 및 *cis*-leucodelphinidin(15, 16)의 존재를 추정할 수 있었다.

Figure 27은 동정한 폴리 페놀류와 이들의 Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC)을 나타낸다. 폴리 페놀류의 구조-항산화제 활성 관계(structure-antioxidant activity relationship)는 문헌들(Rice-Evans et al., 1996; Luximon-Ramma et al., 2005; van den Berg et al., 1999; Re et al., 1999)에서 광범위하게 보고 되어 왔다. Trolox equivalent로 표준화한 TEAC assay는 잘

알려져 있는 폴리페놀류 간의 잠재적인 항산화 활성을 비교하기 위해 사용되어 왔다. 그러므로 이전에 보고 된 폴리 페놀의 TEAC assay 값으로부터 본 연구에서 동정한 폴리 페놀류의 항산화 활성을 명시할 수 있었다. 이 폴리페놀에 관한 항산화 활성 보고 내용으로부터 소나무 수피 추출물이 ROS에 의해 유도된 장애에 의해 야기될 수 있는 피부 및 건강 문제에 잠재적인 효과가 있을 것이라는 것을 예상할 수 있었다. 또한, 소나무 수피 HWE로부터 검출된 폴리페놀 단량체들은 다양한 식물 추출물에서도 발견되어왔으며 이들 성분은 항산화활성을 비롯하여 항암효과, 유전자발현의 변화, 심혈관질환의 보호 기능 등의 여러 생리활성이 있는 것으로 보고 되어왔다. 게다가 동정된 페놀 산류들은 음식물의 변질을 일으키는 지질과산화물을 저해하는 효과가 있으며 전임상과 임상 실험 결과에 따르면 이들 페놀산류는 면역과 염증 반응을 조절할 뿐만 아니라 자외선을 동물 모델들의 피부에 방사시켜 유도한 피부암을 예방하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 라디아타 소나무 수피 HWE에 포함되어 있는 저분자량 폴리 페놀류의 특성화 결과와 보고 되어있는 여러 연구 결과를 토대로 HWE의 저분자량 분획물도 기능성 화장품을 제조하는데 있어 중요한 피부 생리활성에 기여할 수 있으리라 미뤄 예측할 수 있었다.

마. 당과 무기물 함량

라디아타 소나무 수피 HWE 중에 존재하는 유리당 및 폴리페놀 배당체에 대한 당 함량을 계산하기 위해 3% 황산-imidazole법을 적용하였다. HWE 중 유리당은 6.4%, 결합당은 7.8% 존재하였으며 전당량은 14.2%였다. 유리당의 경우 glucose가 5.3%로 대부분을 차지하였고 결합당은 arabinose가 6.1%로 가장 많았다. HWE 중 무기성분은 0.77% 포함되어 있었으며 Ca(0.26%), Al(0.16%), Si(0.14%)가 대부분을 차지하였다.

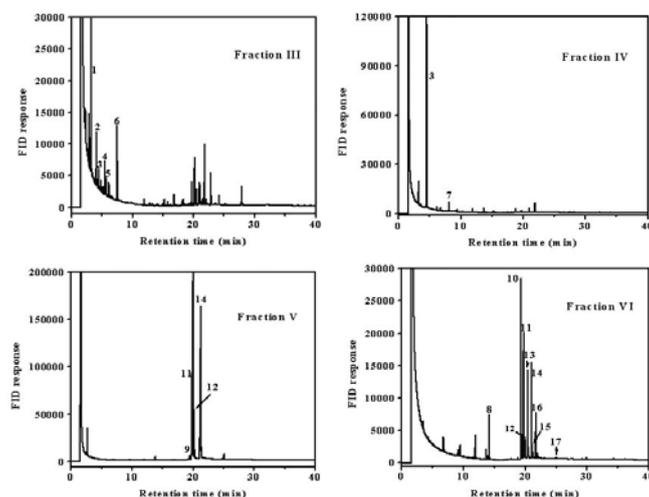


Fig. 22. GC chromatogram of fractions III–VI obtained from ethyl acetate soluble fraction of HWE from radiata pine bark.

Table 8. GC–MS result for monomeric polyphenols in HWE from *Pinus radiata* bark

RT (min)	Compound	M ⁺ , Base peak, <i>m/z</i>	Main fragment ions, <i>m/z</i>	Fraction
3.24	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid, 1	282 73	282, 267, 193, 73	III
4.13	Vanillic acid, 2	312 297	312, 297, 282, 267, 253, 223, 126, 73	III
4.62	Protocatechuic acid, 3	370 193	370, 355, 311, 193, 73	III, IV
5.63	<i>cis</i> -Ferulic acid, 4	338 338	338, 323, 308, 293, 249, 219, 73	III
5.83	<i>p</i> -Coumaric acid, 5	308 73	308, 293, 249, 219, 179, 73	III
7.68	<i>trans</i> -Ferulic acid, 6	338 338	338, 323, 308, 293, 249, 219, 73	III
8.05	<i>trans</i> -Caffeic acid, 7	396 73	396, 381, 219, 73	III, IV
14.31	Astringenin (?), 8	532 532	532	VI
19.33	(-)-Epicatechin, 9	650 368	650, 368, 355	V
19.43	Astringenin glycoside(?), 10	? 532	532	VI
19.85	(+)-Catechin, 11	650 368	650, 368, 355	V, VI
20.13	<i>cis</i> -Taxifolin, 12	665 368	665, 368, 267, 179, 147, 75	V, VI
20.53	(+)-Gallocatechin, 13	738 456	738, 648, 456, 355, 281, 267	VI
21.13	<i>trans</i> -Taxifolin, 14	665 368	665, 368, 267, 179, 147, 75	V, VI
21.28	<i>cis</i> -Leucodelphinidin(?), 15	826(?) 456	753, 739, 456, 369, 267	VI
21.79	<i>trans</i> -Leucodelphinidin(?), 16	826(?) 456	752, 737, 456, 369, 267	VI
25.12	Quercetin, 17	661 647	661, 647, 575, 559, 207	VI

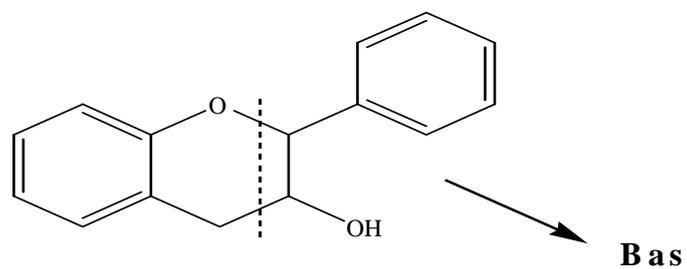


Fig. 23. Retro Diels–Alder fission of flavonoid structure.

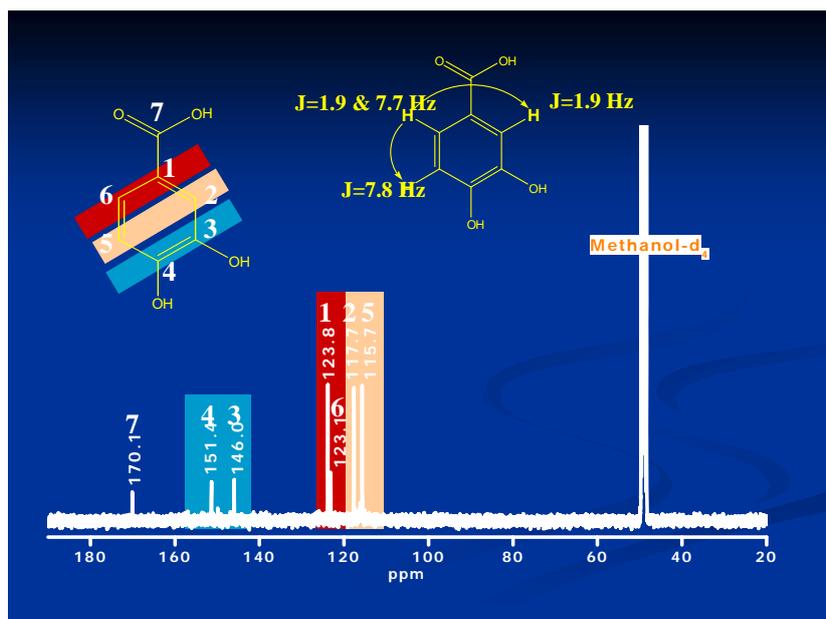


Fig. 24. ^{13}C NMR spectrum, coupling constant, and structural assignment of protocatechuic acid.

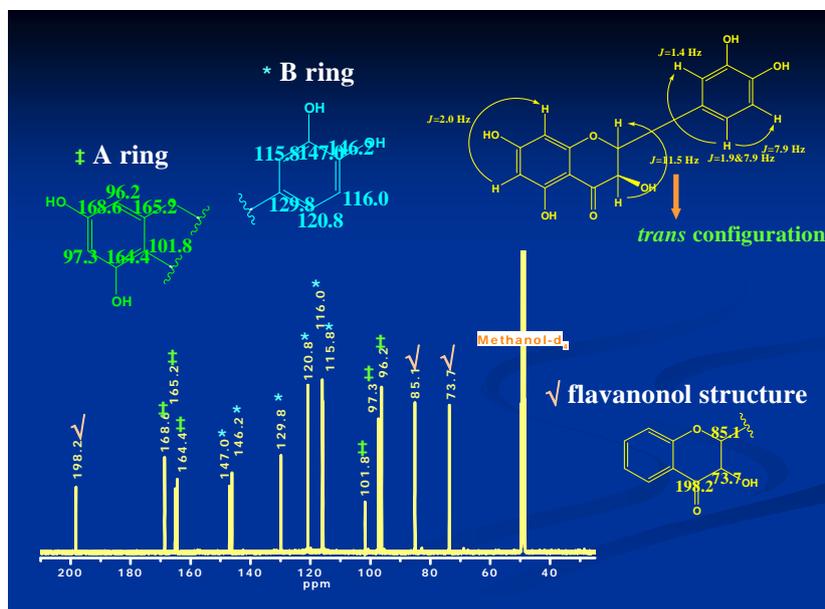


Fig. 25. ^{13}C NMR spectrum, coupling constant, and structural assignment of *trans*-taxifolin

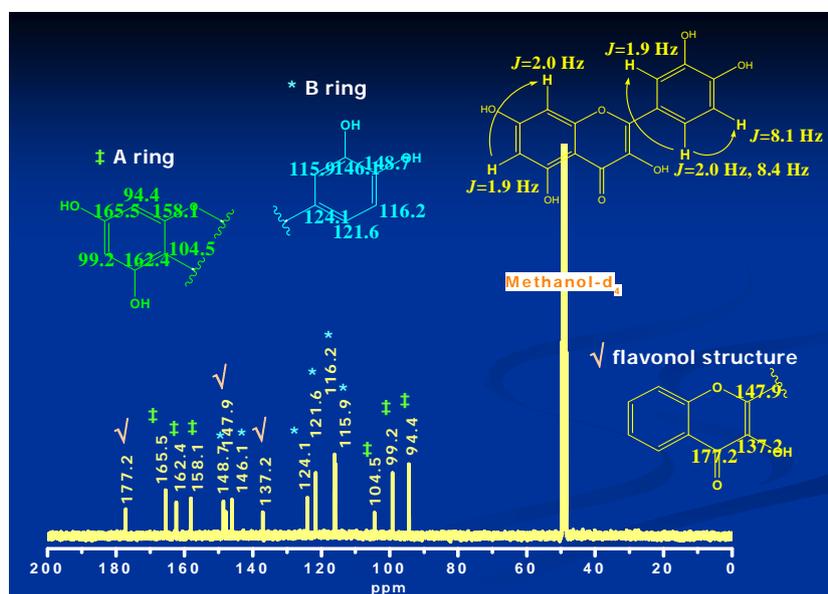


Fig. 26. ^{13}C NMR spectrum, coupling constant, and structural assignment of quercetin.

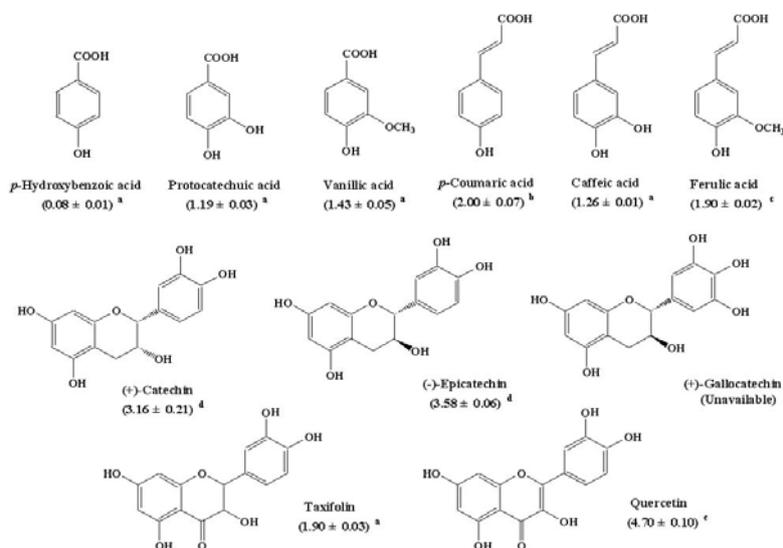


Fig. 27. TEAC (mM) of monomeric polyphenols in HWE from radiata pine bark. a Rice–Evans et al. (1996), b Luximon–Ramma et al. (2005), c van den Berg et al. (1999), d Re et al. (1999).

Table 9. Sugar composition of HWE from *Pinus radiata* bark

Sugars (%)	Free sugars (%)	Combined sugars(%)	Total sugars(%)
Glucose	5.3	1.2	6.5
Arabinose	1.1	6.1	7.2
Galactose	–	–	–
Mannose	–	0.1	0.1
Xylose	0.1	0.3	0.4
Total	6.4	7.8	14.2

Combined sugars (%) = Total sugars (%) – Free sugars (%)

Table 10. Inorganic elements of HWE from *Pinus radiata* bark

Elements	Mg	Al	Si	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Total
% in HWE	0.07	0.16	0.14	0.03	0.04	0.26	0.01	0.03	0.02	0.02	0.77

4. 소괄

다양한 종류의 소나무 수피를 스크린하고 최적 수피 열수 추출물을 다음과 같이 특성화 하였다.

- ① 적송, 리기다 소나무 및 라디아타 소나무 수피의 HWE가 강력한 항산화 효과를 나타내었다.
- ② 소나무 수피의 강력한 항산화 효과는 수피 중의 PA에 의한다는 것을 입증하였다.
- ③ 라디아타 소나무 수피가 그 추출물 이용에 있어서 가장 경제성 있는 것으로 판명되었다.
- ④ PA는 알칼리 영역에서 환의 개열 및 급속한 산화가 일어나므로 중성 용매계에 의한 추출이 바람직하며, 열수추출과 같은 친환경적인 방법으로 추출물을 대량으로 얻을 수 있었다.
- ⑤ PA를 수피로부터 대량으로 얻기 위해서는 시료의 입자는 20-80 mesh, 추출 온도 100℃, 추출 시간 1시간, 액비 10정도의 조건이 최적으로 생각되었다.
- ⑥ 활성 성분인 PA는 Sephadex LH 20 겔에 흡착시켜 50% 아세톤으로 용리하여 용이하게 분리 정제할 수 있었다.
- ⑦ 분리 정제한 라디아타 소나무 수피 PA는 다음과 같은 특성을 가지고 있었다.
 - 라디아타 소나무 수피 PA는 수피 열수 추출물의 약 58%를 차지하는 주성분이었다.
 - PA는 procyanidin골격이 C4-C8결합한 형태이며, 주로 *trans*형을 이루고 있었다.
 - ¹³C NMR연구에 의하여 수피 PA는 procyanidin골격이 94%, prodelphinidin골격이 6%정도로 주로 B환이 카테콜 골격을 하고있는 구조를 이루고 있었다.
 - PA의 중량평균 분자량, 3,800, 수평균 분자량 1,200, 다분산도 3.2, 중합도 (DP) 13을 나타내었다.
 - MALDI-TOF MS에 의하여 PA 전체 분자량을 해석하기는 어려웠지만, 분화합물이 주로 procyanidin골격구조를 가지는 것과 prodelphinidin이 일부 혼재해 있는 것을 확인할 수 있었다.
 - 분리 정제된 PA는 시판 비타민 C와 비교할 수 있는 강력한 항산화 활성을

가지고 있었다.

⑧ 열수 추출물 중 PA의 분리 후 저분자 화합물을 검토한 결과는 다음과 같았다.

- HWE의 주된 페놀류는 *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, protocatechuic acid, *cis*-ferulic acid, *p*-coumaric acid, *trans*-ferulic acid, *trans*-caffeic acid의 저분자 페놀산류였으며, 그 주성분은 protocatechuic acid였다.
- 플라보노이드류로서는 *trans*형의 taxifolin이 주성분을 이루고 있었다. 다음으로 많은 성분으로는 quercetin이었다. 소량의 페놀성 성분은 GC, GC-MS 등에 의하여 (+)-catechin, (-)-epicatechin, *cis*-taxifolin, (+)-gallocatechin, (-)-epigallocatechin, *trans*- 및 *cis*-leucodelphinidin, astrigenin, astrigenin glycoside 등과 같은 화합물이 검출되었다.

제 2 절 수피 추출물의 다양한 생리활성 평가

1. 서론

국내에서 발생하는 폐소나무 수피를 보다 고부가가치 있는 용도로 이용하고자 본 연구과제에서는 고기능성 화장품 원료 개발에 그 목표를 두고 1) 국내산 소나무재를 비롯하여 수입산 소나무재에서 파생되는 다양한 종류의 소나무재의 수피를 분석하고, 2) 가장 경제성 있는 수피의 선별, 3) 환경친화적인 용매를 사용하여 최적 추출조건을 확립, 4) 최적 조건에서 제조한 수피 추출물은 세분화하고 항산화 활성이 뛰어난 PA의 분리, 정제 및 특성화를 수행, 5) 저분자 페놀류의 검토, 6) 기타 성분의 분석을 실시하여 기능성 화장료 개발을 위한 성분 조성에 대한 연구에 대한 기반을 확립하였다. 본 연구는 라디아타 소나무 수피 추출물로부터 기능성 성분인 PA를 다량 함유하는 원료를 개발하고 현재 기능성 화장품 산업에서 중시되는 항산화효과, 미백효과, 잔주름 예방 등의 피부 생리활성에 대한 수피 추출물의 작용에 대한 연구를 실시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 소나무 수피로부터 고농도 PA의 제조

대용량 추출조(600 ℓ)에 라디아타 소나무 수피 분말과 액비 10에 해당하는 물을 넣었다. 이후 1시간동안 비등 조건에서 열수 추출하였다. 열수추출물을 고진공의 농축기(600 ℓ)로 옮긴 후 물을 증발시켰다. 이 농축물은 필터로 여과하여 물가용부(WS, water soluble)를 제조하였다. 또한 상기와 동일한 과정을 통해 열수추출물을 농축한 후 에탄올 가용부를 추출하였다. 에탄올 가용부(ES, ethanol soluble)는 5 μm 필터 카트리지로 여과하고 진공 건조시켰다. WS와 ES가 고농도의 PA를 함유하는 지를 평가하기 위해 순수 정제한 PA를 표준 시료로 하여 butanol-HCl법으로 PA를 정량하였다.

PA 약 10 mg을 메탄올을 사용하여 50 ml로 정용한 후 60~140 μg/ml로 희석하여 표준용액을 제조하였다. 시료 용액은 시료 약 10 mg을 메탄올로 100 ml 정용하여 제조하였다. PA함량은 butanol-HCl법에 준하여 측정하였으며 다음과 같이 실시하였다. 10 ml 바이알에 표준용액 또는 시료용액 1 ml를 넣고 여기에

butanol-HCl 용액(butanol 95 ml + 농 HCl 5 ml) 6 ml와 2% ferric ammonium sulfate 용액 0.2 ml를 첨가한 후 100°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액은 UV/Vis diode array spectrophotometer(HP 8452A, USA)를 사용하여 측정하였다.

나. 항산화 활성

1) DPPH 라디칼 소거능

0.1mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액을 제조하기 위해 냉동 보관 중이던 DPPH(C₁₈H₁₂N₅O₆, FW 394.3) 4.20 mg을 소형 코니칼 비이커에 넣고 소량의 메탄올로 녹였다. 이후 DPPH의 빛에 대한 영향을 배제하기 위해 100 ml 갈색 용량플라스크에 넣어 정용하였다. 시료는 각각 5 mg을 취하여 10 ml 용량플라스크에 넣고 메탄올로 정용하였으며, 이를 stock solution으로 사용하였다. 시료 용액은 30배(16.7 µg/ml)와 100배 희석(5 µg/ml)하였다. DPPH 소거능을 검토하기 위해 시료 희석액 1 ml와 0.1mM DPPH용액 2 ml를 넣고 25°C 수욕조에서 30분간 반응시킨 후 518 nm에서 흡광도를 측정하였다(As). Control로는 시료 용액 대신 메탄올을 사용한 것으로 하였다(Ac). UV blank는 메탄올로 하였다.

$$\text{DPPH 자유라디칼 소거능 (\%)} = ((Ac - As)/Ac) \times 100$$

2) ABTS⁺ 소거능

1% ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) 용액은 100 mM 칼륨 인산염 완충용액(pH 4.5)로 제조하였으며 0.5% 과산화수소는 28% 원액을 희석하여 240 nm에서 흡광도 0.40이 되도록 하였다. Horseradish peroxidase(HRP, 1,280 units/mg) 80 µg을 100 ml 100 mM 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 녹여 효소 용액을 제조하였다. ABTS⁺ 양이온 라디칼을 발생시키기 위해 1% ABTS(700 µl), HRP(1.4 ml), 100 mM 인산염 완충용액(pH 7.0, 39.2 ml) 및 0.5% 과산화수소(700 µl)를 혼합하고 12시간동안 어두운 곳에 방치하였다. 제조한 ABTS⁺ 용액은 사용 전에 희석하여 734 nm에서 흡광도가 0.5가 되도록 100 mM 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 희석하였다. 시료 stock solution은 5 mg시료를 100 mM 인산염 완충용액(pH 7.0) 5 ml로 녹여 제조하였으며 동일 완충용액으로 다시 희석하여 50과 100 µg/ml의 농도가 되도록 하였다. ABTS⁺ 소거능을 검토

하기 위해 시료 50 μl 와 ABTS⁺ 용액 2 ml를 control은 시료 대신 100 mM 인산염 완충용액(pH 7.0) 50 μl 와 ABTS⁺ 용액 2 ml를 각각 혼합하였다. 이들 용액은 25°C 수욕조에서 50분 동안 반응시켰으며 734 nm에서 남아있는 ABTS⁺의 흡광도를 측정하여 아래와 같이 ABTS⁺ 양이온 라디칼 소거능을 계산하였다.

$$\text{ABTS}^+ \text{ 소거능(\%)} = ((A_c - A_s)/A_c) \times 100$$

Ac: 100 mM 인산염 완충용액(pH 7.0, 50 μl) + ABTS⁺ 용액 (2 ml)

As: 시료 용액(50 μl) + ABTS⁺ 용액 (2 ml)

3) Superoxide anion 소거능

시료는 각각 10.0 mg씩 취하고 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여 10 ml로 정용하여 0.1% 용액을 제조하였다. 이후 0.1% 시료용액을 10배 희석하여 0.01% 시료용액을 제조하였다. 시료 용액 또는 DMSO 500 μl , 10 mM L-methionine 500 μl 및 440 μM NBT 1 ml를 순차적으로 시험관에 넣었다. 여기에 200 μM riboflavin 200 μl 를 넣어 혼합한 후 시료 고정판에 접촉시켰다. 이후 ultra-violet/condensation weathering device인 UCON(ATLAS사)에 넣고 UV 램프(UVA(320-400 nm) 영역인 356 nm, 40W)에 5분간 조사하였다. 그 후 UV 200~800 nm 범위에서 스캔한 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Control은 시료 용액 대신 DMSO를 첨가한 것으로 하였으며, 시료자체의 흡광도 영향을 배제하기 위한 blank는 L-methionine 대신 buffer를 넣어 상기와 동일하게 처리한 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Superoxide anion 라디칼 소거능(\%)} = [(A_c - (A_s - A_b))/A_c] \times 100$$

Ac: DMSO + L-methionine + NBT + riboflavin

As: Sample + L-methionine + NBT + riboflavin

Ab: Sample + buffer + NBT + riboflavin

4) 과산화수소 소거능

각각의 시료는 10 mg을 취하여 10 ml의 용량플라스크에 넣고 100 mM 인산염

완충용액(pH 7.0)으로 정용하여 0.1% 용액을 제조하였다. 이를 다시 10배 희석하여 0.01%의 시료 용액을 제조하였다. 시료에 대한 과산화수소 소거능 측정을 위해 100 mM 인산염 완충용액 (2.7 ml, pH 7.0), 시료(100 μ l)와 과산화수소(50 μ l, 0.5% w/w)를 혼합한 용액을 25°C 수욕조에서 10분간 반응시킨 후 여기에 다시 guaiacol(50 μ l)과 HRP (100 μ l, 1 unit/ml)를 넣고 상기의 반응조건에서 30분간 반응시켰다. Control은 시료 대신 buffer를 넣었으며, 시료 blank에는 guaiacol 대신 이온교환수를 첨가하여 반응을 시킨 후 436 nm에서 흡광도를 측정하여 과산화수소 소거능을 계산하였다.

$$\text{과산화수소 소거능(\%)} = [(Ac - (As - Ab))/Ac] \times 100$$

Ac: 100 mM 인산염 완충용액(pH 7.0, 2.8 ml) + 과산화수소(50 μ l) + HRP(100 μ l) + guaiacol(50 μ l)

As: 100 mM 인산염 완충용액(pH 7.0, 2.7 ml) + 시료(100 μ l) + 과산화수소(50 μ l) + HRP(100 μ l) + guaiacol (50 μ l)

Ab: 100 mM 인산염 완충용액(pH 7.0, 2.7 ml) + 시료(100 μ l) + 과산화수소(50 μ l) + HRP(100 μ l) + 이온교환수(50 μ l)

5) Linoleic acid의 과산화 방지

Linoleic acid의 과산화 방지 실험에 사용된 시료는 다음과 같이 희석하여 시료를 제조하였다.

WS (25.0 mg/25 ml 90% ethanol + 10% water),

ES (24.9 mg/25 ml 90% ethanol + 10% water),

Vitamin E (24.91 mg/25 ml 99.5% ethanol),

BHT (Butylated Hydroxy Toluene, 25.1 mg/25 ml 99.5% ethanol),

HWE (10.2 mg/10 ml 99.5% ethanol),

MPP (10.0 mg/10 ml 99.5% ethanol),

OPA (10.1 mg/10 ml 99.5% ethanol),

PA (10.1 mg/10 ml 99.5% ethanol)

이외에 linoleic acid 자체의 산화를 측정하기 위한 control로서는 시료대신 ethanol을 사용하였다. 시료 용액 또는 ethanol 10 ml, linoleic acid(2.5% v/v in

99.5% ethanol) 10 ml, 50 mM 인산염 완충용액 (pH 7.0) 20 ml, 이온교환수 10 ml를 50 ml용량의 바이알에 혼합한 후 40°C 수욕조에서 진탕시켰다.

가) 2-Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay

일정 시간이 경과한 후 상기의 반응용액 2 ml를 꺼내어 20% trichloroacetic acid(TCA)/0.75% thiobarbituric acid(TBA)용액 2 ml를 넣고 100°C 끓는 물 내에서 30분간 반응시켰다. 그 후 실온으로 식히고 *n*-부탄올 4 ml를 첨가하고 vortex mixer를 이용하여 추출한 후 5,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리하였다. 추출된 *n*-부탄올층은 532 nm, 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편, 시료자체의 영향을 배제시키기 위한 blank로써 시료반응용액 2 ml와 20% TCA 2 ml를 100°C에서 위와 동일하게 반응시키고 *n*-부탄올로 추출하여 그 흡광도를 측정하였다.

Linoleic acid 산화 저해 활성(%)

$$= \frac{\text{Control}(A_{532 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}) - [\text{Sample}(A_{532 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}) - \text{Sample blank}(A_{532 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}})]}{\text{Control}(A_{532 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}})} \times 100$$

나) Ferric thiocyanate method

상기 2.2.5에서 제조한 시료 용액과 동일한 혼합액을 제조한 후 190시간 동안 40°C 수욕조에서 진탕시켰다. 이후 반응용액 500 μl를 7.5% 에탄올(3 ml), 30% ammonium thiocyanate(500 μl)과 혼합하였다. 이 혼합액은 3분 동안 실온에서 방치한 후 3.5% 염산용액으로 녹인 ferrous sulfate(100 μl)를 첨가하여 붉은색의 ferric thiocyanate를 유도하였다. 이 반응은 5시간동안 실시하였으며 474와 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Linoleic acid 산화 저해 활성(%)

$$= \frac{\text{Control}(A_{474 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) - [\text{Sample}(A_{474 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) - \text{Sample blank}(A_{474 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})]}{\text{Control}(A_{474 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})} \times 100$$

6) 환원력

시료는 이온교환수로 녹여 100 μg/ml 농도가 되도록 하였다. 시료 용액 1 ml를

200 mM 인산염 완충용액(pH 6.6, 2.5 ml) 및 1% potassium ferricyanide(2.5 ml)와 혼합하였다. 제조한 혼합액을 50°C 수욕조에서 20분 동안 반응시켰으며 이후 10% trichloroacetic acid(2.5 ml)를 그 혼합액에 첨가하였다. 이 용액에 2 ml 이온교환수와 0.1% ferric chloride(0.5 ml)를 혼합하였으며 그 흡광도를 700 nm에서 측정하였다.

7) Ferrous 이온에 대한 킬레이트 활성

시료 용액(30 $\mu\text{g/ml}$ 50 mM 인산염 완충용액, pH 7.0)과 80 μM FeSO_4 를 1:1 (v/v)비율로 혼합한 후 220-400 nm범위에서 UV스펙트럼을 측정하였다.

다. 미백효과

1) Mushroom tyrosinase저해 활성

시료 농도에 따른 tyrosinase 저해 활성관계를 검토하기 위하여 10 mg의 시료를 취해 각각의 50 ml 용량 플라스크에 넣은 후 DMSO 10 ml로 녹이고 이후 이온교환수를 이용하여 50 ml로 정용하였다. 제조한 용액을 stock solution(200 $\mu\text{g/ml}$)으로 하여 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 다양한 농도의 시료용액을 제조하였다. 이들 농도에서 tyrosinase 저해 활성을 정도를 검토한 후 대략적으로 50% 저해율을 보일 것으로 추정되는 농도를 결정하였으며 이로부터 수피 추출물의 상당량을 차지하는 PA의 순수 정제물과 arbutin을 비교 시료로 사용하였다. 각각의 시료 약 25 mg을 취하여 50 ml 용량플라스크에 넣고 DMSO 10 ml로 녹인 후 이온교환수를 이용하여 50 ml로 정용하였으며 이때 시료 농도는 500 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. Mushroom tyrosinase 저해활성을 측정하기 위해 0.5 mM L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine)용액 1 ml, 1/15 M 인산염 완충용액(pH 6.8) 0.5 ml와 시료용액 1 ml를 시험관에 넣고 잘 혼합한 후 여기에 114 units/ml mushroom tyrosinase용액을 1 ml 첨가하였다. 이후 25°C 수욕조에 넣고 10분간 반응하여 tyrosinase에 의해 기질 L-DOPA가 dopachrome으로 변형되는 것을 476 nm에서 흡광도로 측정하였다. Control은 시료용액 대신 이온교환수를 첨가한 것으로 하였으며 blank는 1/15 M 인산염 완충용액(pH 6.8)과 tyrosinase 용액의 혼합액으로 하였다. 또한, 시료가 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 476 nm의 흡광도 나타냄으로 이를 배제하기 위해 시료와 L-DOPA 및 1/15 M 인산염 완충용액(pH 6.8)을 넣고 tyrosinase대신 이온교환수를 첨가하여 시료자체의 흡광도를 측정하였다.

(+)-Catechin과 arbutin의 경우 DOPA 대신 이온교환수를 사용하였으며 여기에 tyrosinase와 1/15 M 인산염 완충용액(pH 6.8)을 넣고 상기와 동일하게 처리하여 (+)-catechin과 arbutin의 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Tyrosinase 저해율(\%)} = [(Ac - (As - Ab))/Ac] \times 100$$

Ac: L-DOPA 1 ml + 1/15M 인산염 완충용액 0.5 ml + water 1 ml + tyrosinase 1 ml

As: L-DOPA 1 ml + 1/15M 인산염 완충용액 0.5 ml + 시료 1 ml + tyrosinase 1 ml

Ab: L-DOPA 1 ml + 1/15M 인산염 완충용액 0.5 ml + 시료 1 ml + tyrosinase 1 ml(WE와 ES의 경우)

1/15M 인산염 완충용액 1.5ml + 시료 1ml + tyrosinase 1ml(catechin, gallic acid, arbutin의 경우)

2) Tyrosinase저해 kinetic검토

상기 “가”에서 제조한 114 units/ml tyrosinase를 2배 희석하여 57 units/ml의 농도로 조절하여 사용하였다. Control의 경우 저해제 대신 이온교환수 1 ml를 0.5 mM L-DOPA 용액 1 ml, 1/15M 인산염 완충용액(pH 6.8) 0.5 ml 및 57 units/ml tyrosinase용액 1 ml를 잘 혼합한 후 30초 간격으로 10분 동안 476 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. Tyrosinase 저해제를 첨가한 경우에는 0.5 mM L-DOPA 용액 1 ml, 1/15M 인산염 완충용액(pH 6.8) 0.5 ml, 시료(500 µg/ml), tyrosinase 용액(57 units/ml) 1 ml를 잘 혼합하였으며 dopachrome의 생성 정도를 30초 간격으로 10분 동안 476 nm에서 측정하였다. Kinetic검토 시 실내온도는 20°C로 고정하였다.

3) Lineweaver-Burk plot에 의한 tyrosinase저해 기작

L-DOPA 157.76 mg을 취하여 1/15 M 인산염 완충용액(pH 6.8)에 녹여 4.0 mM L-DOPA 용액 200 ml를 제조하였다. 이로부터 2.0, 1.0, 0.5 mM L-DOPA 용액을 제조하였다. 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mM L-DOPA 용액을 각 시험관에 1 ml씩 넣고 1/15 M 인산염 완충용액(pH 6.8) 0.5 ml, 이온교환수 1 ml 혹은 200, 500,

1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 시료 1 ml를 각각의 시험관에 넣었다. 이후 57 units/ml tyrosinase를 첨가하고 25°C에서 10분간 반응 후 476 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 구리이온과의 킬레이트 효과

$\text{CuSO}_4(\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}, \text{Mw } 249.69)$ 을 5 g 취하여 이온교환수로 5% CuSO_4 용액 100 ml를 제조하였다. 수피 추출물의 대표 활성성분인 PA를 10.0 mg 취하여 10 ml 정용 플라스크에 넣은 후 이온교환수로 정용하였다. 0.1%의 정제된 PA 또는 이온교환수 2 ml와 5% CuSO_4 2 ml를 넣고 잘 혼합한 후 어두운 곳에 보관하면서 UV 흡광도 변화를 측정하였다.

$$\text{킬레이트된 } \text{Cu}^{2+} \text{ 이온}(\%) = [((\text{Ac}_{810}-\text{Ac}_{520})-(\text{As}_{810}-\text{As}_{590})) / (\text{Ac}_{810}-\text{Ac}_{520})] \times 100$$

Ac: 이온교환수(2 ml) + 5% CuSO_4 (2 ml)

As: 0.1% 정제 proanthocyanidin(2 ml) + 5% CuSO_4 (2 ml)

UV blank: 이온교환수

5) PA와 B16 melanoma 세포 간의 상호작용

각각의 시료를 50% (v/v) 함수 butylene glycol에 녹여 2% stock solution을 제조하였다. Stock solution을 50% (v/v) 함수 butylene glycol로 2배 희석하여 1%로 한 후 1% 시료 희석액 100 μl 와 50% (v/v) 함수 butylene glycol 900 μl 를 혼합하여 다시 희석하였다. B16 melanoma 세포는 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, 89%), fetal bovine serum(FBS)와 penicillin-streptomycin 1%를 혼합한 배지로 5% CO_2 , 37°C 하에서 배양하였다. 섬유아세포의 수는 hemocytometer로 측정하였으며 6 well plate에 1×10^5 세포/well를 분주하고 하룻밤 동안 5% CO_2 , 37°C에서 배양하여 세포가 well에 부착되도록 하였다. 이후 well에 남아있는 배지를 제거하고 다시 각각의 well에 배지 2,625 μl 와 희석한 시료 375 μl 를 첨가하고 3일 동안 배양하였다. 시료와 배지를 털어낸 후 다시 PBS 완충 용액 2 ml로 2회 세정해 주었다. 이후 세포의 형태변화를 역상 현미경으로 관찰하였다.

라. 주름 개선효과

1) NIH/3T3 섬유아세포의 세포 독성

각각의 시료를 50% (v/v) 함유 butylene glycol에 녹여 2% stock solution을 제조하였다. Stock solution 50 μ l를 96 well plate로 옮긴 후 50% (v/v) 함유 butylene glycol로 희석하여 0.001, 0.01, 0.1, 1%로 농도를 조절하였다. 세포 독성 실험 시 희석액 중 25 μ l를 취하여 동일 시료 당 3반복 처리하여 그 평균값으로부터 세포독성을 평가하였다.

NIH3T3 섬유아세포는 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, 89%), fetal bovine serum(FBS)와 penicillin-streptomycin 1%를 혼합한 배지로 5% CO₂, 37°C 하에서 배양하였다. 섬유아세포의 수는 hemocytometer로 측정하였으며 well 당 1×10^4 세포를 분주하고 하룻밤 동안 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 세포가 well에 부착되도록 하였다. 이후 well에 남아있는 배지를 제거하고 다시 각각의 well에 배지 175 μ l를 채운 후 희석한 시료와 대조구로 50% (v/v) 함유 butylene glycol을 25 μ l씩 각각의 well에 넣고 잘 섞어주었다. 시료를 처리한 96 well plate는 5% CO₂, 37°C 하에서 하룻밤 동안 배양한 후 배지를 제거하고 DMEM 배지만을 100 μ l취하여 각각의 well에 넣고 10 μ l MTT용액을 첨가한 후 4시간 반응시켰다. Well의 배양액을 제거한 후 DMSO 100 μ l를 넣어 미토콘드리아 환원효소에 의해 형성된 formazan을 5분 동안 잘 흔들어서 녹였다. 생성된 formazan의 흡광도를 570 nm에서 측정하여 섬유아세포에 대한 세포 독성을 계산하였다.

2) PA의 콜라겐 흡착 실험

가) pH

다양한 pH 범위(2.0-10.0)에서 PA의 농도를 100 mg/l로 조절하였으며 최종 부피는 50 ml로 고정하였다. PA 용액에 40 mg 콜라겐을 넣고 37°C 수욕조에서 5시간 동안 흡착시켰다. 흡착 후 남은 PA 용액 1.5 ml를 취하여 마이크로 튜브로 옮기고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상정액 1 ml를 시험관에 넣고 50% (v/v) 함유 butylene glycol로 희석하였다. 이후 희석액의 흡광도를 280 nm에서 측정하여 초기 농도 PA 100 mg/l일 때 흡광도와 차이 값으로부터 흡착된 PA양을 계산하였다.

나) 흡착시간

PA 용액(100, 200, 300, 400 mg/ℓ)을 50 mM 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 제조하였으며 이때 최종 부피는 50 ml로 고정하였다. 다양한 농도의 PA 용액에 40 mg 콜라겐을 넣고 37℃ 수욕조에서 5시간 동안 흡착시켰다. 콜라겐에 흡착하지 않고 남아있는 PA의 농도를 시간 경과에 따라 측정하기 위해 15분 간격으로 취해 마이크로 튜브로 옮기고 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상정액 1 ml를 시험관에 넣고 50% (v/v) 함수 butylene glycol로 희석하였다. 이후 희석액의 흡광도를 280 nm에서 측정하여 초기 농도 PA 100 mg/ℓ일 때 흡광도와 차이 값으로부터 흡착된 PA양을 계산하였다.

다) 흡착제

PA 용액(100 mg/ℓ)에 다양한 양의 흡착제(콜라겐과 polyvinyl polypyrrolidone (PVPP); 5, 10, 25, 50, 100 mg)를 첨가한 후 37℃ 수욕조에서 5시간 동안 흡착시켰다. 5시간 후 남아 있는 PA 용액 1.2 ml를 취하여 마이크로 튜브에 옮기고 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상정액 1 ml를 취하여 50% (v/v) 함수 butylene glycol로 희석하였다. 이후 희석액의 흡광도를 280 nm에서 측정하여 초기 농도 PA 100 mg/ℓ일 때 흡광도와 차이 값으로부터 흡착된 PA양을 계산하였다.

라) 흡착온도

흡착온도가 PA의 콜라겐 흡착에 미치는 영향을 평가하기 위해 상기 1)과 동일한 방법으로 PA의 흡광도 변화를 측정하였다. 단, pH는 7.0으로 고정하였으며 흡착온도는 25, 37, 50, 60℃에서 측정하였다.

마) 콜라겐에 흡착된 PA(PA-콜라겐)의 용해도

콜라겐의 PA 흡착능력을 상기 2)의 결과에 준하여 Langmuir 흡착 등온식으로부터 계산한 결과 흡착량(Q_0)이 217 mg/g이었다. 이 Q_0 값을 근거로 하여 PA 50 mg을 50 mM 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 녹이고 여기에 200 mg의 콜라겐을 첨가하였다. 이후 이 혼합액을 37℃ 수욕조에서 5시간 동안 반응시켰으며 반응 종료 후 PA-콜라겐을 회수하기 위해 Nylon 66 membrane(0.45 μ m)으로 여과하였다. 여과 후 잔사는 200 ml 이온교환수로 세정하고 오산화인 존재 하에서 2일 동안

진공 건조하였다. 이렇게 제조한 PA-콜라겐을 콜라겐에 흡착되어있는 PA의 흡착강도를 측정하기 위해 사용하였으며 이를 위해 절대 에탄올, 50% (v/v) 합수 에탄올, 70% (v/v) 합수 아세톤, 이온교환수, 2N 황산, 2N 수산화나트륨, 5% 탄산수소나트륨을 사용하였다. PA-콜라겐 10 mg(156 μ g PA/mg 콜라겐)을 각각의 용매 10 ml에 넣고 37°C에서 24시간동안 반응시켰다. 이후 용매 추출물 1 ml를 취하여 시험관에 넣고 50% (v/v) 합수 butylene glycol 1 ml와 혼합하였다(A₁). 용매에 대한 PA의 용해도를 측정하기 위해 콜라겐 10 mg에 흡착된 PA양인 1.56 mg을 50% (v/v) 합수 butylene glycol 10 ml로 녹인 후 이 PA용액 중 1 ml를 각각의 용매 1 ml와 혼합하였다(A₀). 70% (v/v) 합수 아세톤을 용매로 사용한 경우 아세톤의 UV 흡수대가 280 nm에 영향을 줌으로 이 용매에 추출된 PA를 얻기 위해 65°C에서 감압·건고 시켰다. 이후 절대 에탄올을 넣고 녹인 후 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 콜라겐에 흡착된 PA의 용해도 즉, 흡착 강도를 간접적으로 측정한 결과는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{콜라겐에 흡착된 PA의 용해도(\%)} = ((A_0 - A_1)/A_0) \times 100$$

바) FT-IR 분광분석

FT-IR스펙트럼은 transmission mode에서 Shimadzu 8201PC FT-IR (Japan) 분광기로 측정하였으며 시료는 KBr 펠렛을 제조하여 4,000-400 cm^{-1} 범위에서 4 cm^{-1} 분해능으로 스캔하였다.

3) 콜라겐에 흡착된 PA의 항산화 효과

가) PA-콜라겐의 DPPH 자유 라디칼 소거능

PA-콜라겐(0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 25 mg)을 0.1 mM DPPH 5 ml와 혼합한 후 25°C 수욕조에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 잔존하는 DPPH 자유 라디칼의 흡광도를 570 nm에서 측정하였다(A_s). Control은 0.1 mM DPPH (5 ml)이었으며(A_c) UV blank는 메탄올로 하였다. PA-콜라겐의 DPPH 자유 라디칼 소거능은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH 자유 라디칼 소거능(\%)} = ((A_c - A_s)/A_c) \times 100$$

나) PA-콜라겐의 ABTS⁺ 소거능

ABTS⁺은 상기 “2-나”와 동일한 방법으로 과산화수소와 HRP 존재 하에서 ABTS를 산화시킴으로써 유도되었다. ABTS⁺ 용액을 100 mM 인산염 완충용액 (pH 7.0)으로 희석하여 734 nm에서 흡광도를 0.86으로 조절하였다. PA-콜라겐 (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg)을 ABTS⁺ 용액 3 ml와 혼합한 후 25°C 수욕조에서 50 분 동안 반응시켰다. 이때 잔존하는 ABTS⁺의 흡광도를 734 nm에서 측정하였다 (As). Control(Ac)은 ABTS⁺ 용액(3 ml)이었으며 UV blank는 100 mM 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 하였다.

$$\text{ABTS}^+ \text{ 소거능(\%)} = ((\text{Ac} - \text{As})/\text{Ac}) \times 100$$

4) 콜라겐 안정화 효과

콜라겐 안정화 효과를 검토하기 위해 콜라겐(20-80 mesh) 15 mg과 0.36 mM 염화칼슘을 포함하는 50 mM TES 완충용액(1.5 ml, pH 7.0), 시료 (500 µg/ml DMSO:TES 완충용액(pH 7.0), 20:80 (v/v)) 및 콜라겐나제(100 µl, clostridiopeptidase A from *Chlostridium histolyticum* Type IV, 효소 농도: 100 µg/ml TES 완충용액(pH 7.0))를 혼합한 후 37°C에서 5시간 동안 반응시켰다. 콜라겐나제 효소에 의해 분해된 콜라겐 양을 측정하기 위해 혼합액 1 ml를 취해 1.5 ml 마이크로 튜브로 옮기고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상정액 200 µl를 취하여 마이크로 튜브에 옮기고 ninhydrin-citrate용액 1 ml를 넣었다. 이후 혼합액을 끓는 물에 5분 동안 반응시키고 찬물에 넣어 반응을 종료하였다. 생성물은 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 그 상정액(700 µl)을 50% 함수 propanol 700 µl와 혼합하였다. 이 용액을 취하여 96-well plate에 옮기고 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 콜라겐나제에 대한 시료의 콜라겐 안정화 효과는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{콜라겐 안정화 효과(\%)} = [(\text{Ac} - (\text{As} - \text{Ab}))/\text{Ac}] \times 100$$

Ac: 콜라겐(15 mg) + 50 mM TES 완충용액(pH 7.0, 1.5 ml) + DMSO-TES 완충용액(1 ml) + 콜라겐나제(100 µl)

As: 콜라겐(15 mg) + 50 mM TES 완충용액(pH 7.0, 1.5 ml) + 시료용액(1 ml) +

콜라겐나제(100 μ l)

Ab: 50 mM TES 완충용액(pH 7.0, 1.5 ml) + 시료용액(1 ml) + 콜라겐나제(100 μ l)

5) 엘라스틴 안정화 효과

엘라스틴 안정화 효과를 검토하기 위해 엘라스틴-오르세인(elastin-orcein, 2 mg), 200 mM Tris-HCl(200 μ l, pH 8.8), 시료 용액(40 μ l, 농도: 250 μ g/ml 이온교환수), 엘라스타제(80 μ l, 0.6 units/ml, Type IV elastase from *Porcine pancreas*, 6.0 units/mg)을 1.5 ml 마이크로 튜브에 넣고 혼합하였다. 이 반응은 엘라스타제를 첨가함으로써 개시되었으며 반응은 37°C 수욕조에서 17시간 동안 실시하였다. 반응을 종료한 후 이 혼합액은 12,000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하였으며 그 상정액 200 μ l를 취해 96-well plate에 옮긴 후 570 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

$$\text{엘라스틴 안정화 효과(\%)} = [(Ac - (As - Ab))/Ac] \times 100$$

Ac: 엘라스틴-오르세인(2 mg) + 200 mM Tris 완충용액(pH 8.8, 200 μ l) + 이온교환수(40 μ l) + 엘라스타제(80 μ l)

As: 엘라스틴-오르세인(2 mg) + 200 mM Tris 완충용액(pH 8.8, 200 μ l) + 시료용액(40 μ l) + 엘라스타제(80 μ l)

Ab: 엘라스틴-오르세인(2 mg) + 200 mM Tris 완충용액(pH 8.8, 280 μ l) + 시료용액(40 μ l)

엘라스타제에 의해 분해되지 않고 남아있는 엘라스틴-오르세인의 양을 측정하기 위해 이온교환수로 12,000 rpm에서 5분 동안 3회 반복 세정하였다. 이후 상정액을 제거하고 침전물은 오산화인 존재 하에서 24시간 동안 진공 건조하였다. 잔존한 엘라스틴-오르세인의 양으로부터 엘라스틴 안정화 효과를 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{엘라스틴 안정화 효과(\%, w/w)} = ((W0 - W1)/W0) \times 100$$

W0: 반응 전 엘라스틴-오르세인의 양, W1: 반응 후 잔존하는 엘라스틴-오르세인의 양.

마. 기능성 화장품 제조와 관련된 제반실험

시료를 50% (v/v) 함수 butylene glycol로 녹여 250-0.97 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위까지 희석하였다. 비교 실험을 위해 PASOL-MCX (UV B차단제)와 PASOL-1789 (UV A 차단제)를 사용하였다. 잘 희석된 시료용액의 UV B(280-320 nm)와 UV A(320-400 nm)차단력을 각각 300과 360 nm에서 측정하였다. 자외선 차단력($E\%$ cm)은 시료 1% 농도에서 직경 1 cm UV cell을 통과할 때의 이론적인 흡광도로 계산하였다.

바. 극성 용매 중 수피 추출물의 안정성 평가

시료를 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 메탄올로 희석하여 10 ml로 정용하였으며 이후 실리콘 마개가 달린 바이알에 넣어 실온에 방치하였다. 시료의 항산화 안정성을 검토하기 위해 경과 시간에 따라 시료 1 ml를 취하여 0.1 mM DPPH 2 ml와 혼합한 후 25°C 수욕조에서 30분간 반응 시킨 후 518 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 소나무 수피로부터 고농도 PA 추출물의 제조

라디아타 소나무 수피의 경우 열수 추출만으로도 매우 높은 순도의 PA를 얻을 수 있지만, 이들 열수추출물은 중에는 당과 불용성 침전부가 존재하여 생리활성이 높은 PA를 다량으로 함유한 추출물을 제조하는데 어려움이 있다. 따라서 열수추출물 중 불용성 잔사부분과 당을 최대한 제거하는 것이 고순도 PA를 제조하는데 중요하므로 본 연구에서는 물에 불용인 구분을 정밀 여과하여 제거한 WS와 당 함량을 낮춘 에탄올 가용부 ES를 제조하였다. 실질적으로 WS와 ES 중에 고농도 PA가 함유되어 있는지를 검토하기 위해 PA 정량법인 butanol-HCl 법을 이용하여 각각의 함량을 구하였다. 그 결과 WS의 경우 92.3%, ES는 94.9%를 나타내어 소나무 추출물의 경우 용매 침전법을 이용하여 고농도 PA 추출물을 제조하는 것이 용이하다는 것을 알 수 있었다.

나. HWE의 분자량에 따른 분획과 그 구조의 특성화

라디아타 소나무 수피 HWE 중에 포함되어 있는 폴리페놀류에 대해 Fig. 28에 나타내었다. 제 1절의 결과로부터 이들 성분 중 PA가 주성분이며 기타 저분자 플라보노이드류로 taxifolin이 다량 함유되어 있었으며 페놀산류 중에는 protocatechuic acid가 주성분이었다. 이들 성분들의 이용가치를 보다 향상시키기 위한 목적으로 분자량에 따른 활성부를 저분자, 올리고머 및 고분자로 구분하여 실험하였다. Figure 28에 나타낸 것처럼 저분자 구분은 다양한 페놀산류와 플라보노이드류로 구성되며, 올리고머(DP 2-5)와 고분자 구분은 PA의 중합도(degree of polymerization, DP)에 따라 분리하여 실험에 사용하였다.

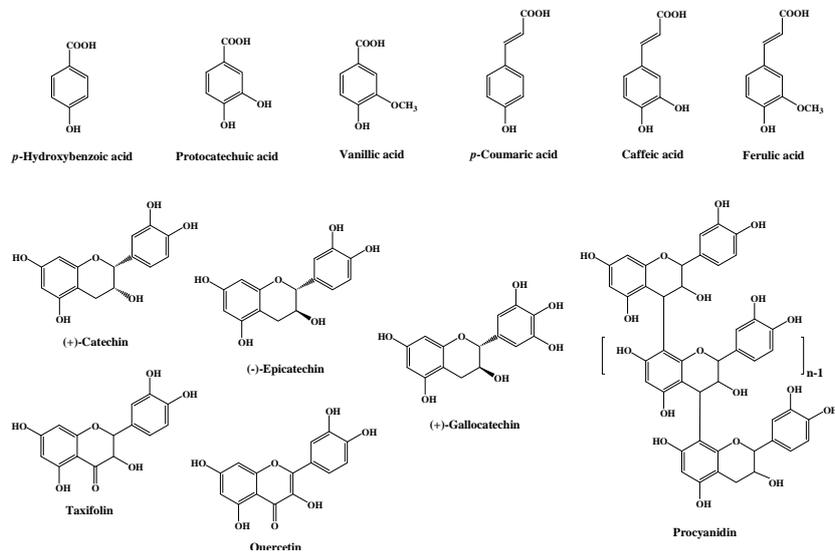


Fig. 28. Main components of hot water extracts from *Pinus radiata* bark.

라디아타 소나무 수피로부터 제조한 HWE로부터 얻은 저분자 분획물을 TMS 유도체화 한 후 GC 분석을 실시하여 다양한 폴리페놀을 정량할 수 있었다. 이 결과에 대해서는 Table 11에 나타내었으며 taxifolin은 동정한 폴리 페놀의 약 60%를 차지하는 주요 성분이었으며 (-)-epicatechin, (+)-catechin, (+)-gallocatechin을 포함하는 catechin류는 약 31%를 차지하였다. 기타 성분으로는 대부분이 페놀산류에 해당하며 동정한 폴리 페놀의 약 7%를 차지하였다. 특히, 페놀산류 중에서는 protocatechuic acid가 약 85%로 대부분을 차지한다는 사실을 알

수 있었다. 이와 같은 저분자 폴리 페놀류는 자연계에서 얻은 추출물로부터 쉽게 발견할 수 있는 성분들로 다양한 식물물을 통해 혹은 기능성 식품으로부터 일반적으로 많이 섭취되고 있으므로 이 추출물의 생체 적용 시 안정성이 우수할 것이라는 것을 미뤄 짐작할 수 있었다.

에틸아세테이트 추출물로부터 얻은 올리고머 PA를 저분자 폴리 페놀과 분리하기 위해 Sephadex LH20을 사용하여 에탄올로 용리시켰다. Sephadex LH20에 흡착되어 있는 올리고머 PA를 에탄올로 용리시켜 얻은 분획에 대해 실질적으로 PA연구에서 올리고머로 인정되는 중합도(degree of polymerization, DP) 범위 2-6에 해당하는 지를 확인하기 위해 아세틸화 후 MALDI-TOF MS분석을 실시하였다. 이 MS 분석 결과를 Fig. 29에 나타내었으며 cyanidin 골격을 주요 단위체로 하고 DP 2-6에 해당하는 PA로 구성되어 있다는 사실을 알 수 있었다. 그러므로 본 연구에서 사용한 추출 과정으로부터 선택적인 올리고머 PA의 제조가 가능하다는 것을 알 수 있었으며 Sephadex LH20에 흡착되어 있는 올리고머 PA 분획이 대부분 흡착되지 않고 회수될 수 있다는 것을 육안과 UV monitoring을 통해 확인하였기 때문에 올리고머 PA를 대량으로 제조하는 공정에 본 연구에서 확립한 scheme을 적용할 수 있을 것으로 판단되었다.

Table 11. Concentration of phenolic acids and flavonoids in MPP from *Pinus radiata* bark expressed in $\mu\text{g}/\text{mg}$ MPP

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Protocatechuic acid	46.2 \pm 1.1
<i>trans</i> -Ferulic acid	5.9 \pm 0.1
<i>trans</i> -Caffeic acid	2.6 \pm 0.1
(-)-Epicatechin	21.6 \pm 1.7
(+)-Catechin	198.5 \pm 6.4
<i>cis</i> -Taxifolin	73.6 \pm 2.7
(+)-Gallocatechin	20.1 \pm 1.3
<i>trans</i> -taxifolin	382.5 \pm 12.1
Quercetin	15.2 \pm 1.0
Total	766.3 \pm 22.6

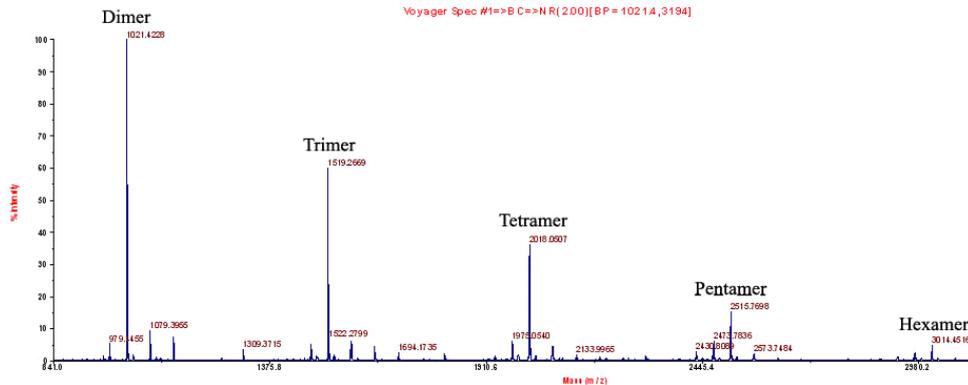


Fig. 29. MALDI-TOF mass spectrum of OPA (acetylated form) in HWE from *Pinus radiata* bark in the presence of sodium ion.

여기에서 고분자 PA(polymeric proanthocyanidin, PPA)는 제 1 절에서 단리된 PA와 동일한 성분으로 PA와 PPA를 혼용해 사용하더라도 이후에 이들 용어의 의미는 동일하다고 본다.

다. 항산화활성

생체 내에서 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)은 자외선, 방사선, 화학반응, 대사 과정을 통해 생성되어 DNA 부절, 지질 과산화, 단백질의 불활성화 등을 야기하며 이로 인해 암, 당뇨병, 뇌졸중, 동맥 경화, 심-혈관 질환, 신부전, 빈혈 등 광범위한 질병의 병태 생리적인 원인을 제공하고 노화를 촉진시키는 것으로 잘 알려져 있다. 이러한 활성 산소종을 제거할 수 있는 항산화제를 개발하기 위한 연구가 꾸준히 진행되고 있는 실정이다. 특히 자외선에 의한 피부 자극으로 인한 ROS의 발생은 피부에 손상을 주는 근본적인 원인이 됨으로 수피 추출물을 기능성 화장품 원료 활용하기 위해 다양한 라디칼을 유도하여 항산화 활성을 검토하고자 하였다.

1) DPPH 라디칼 소거능

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 자유라디칼 소거 또는 hydrogen donor 역할을 하는 화합물의 활성을 측정하는데 사용되는 라디칼로 어떤 특정 항산화제에 대해서만 선택적이지 않으며 천연물의 전반적인 항산화능력을 측정하는데 적용될 수 있다. 홀전자를 가지고 있는 DPPH는 518 nm에서 최대의 흡광

도를 가지며 보라색을 나타낸다. 그러나 항산화제에 의해 DPPH가 환원되어 DPPH-H가 되면 노란색을 띄게 되며 518 nm의 흡광도는 감소하게 된다. 천연물의 항산화 활성은 이러한 DPPH 방법에 의해 빠르고, 정확하게 측정할 수 있다.

Figure 30에 라디아타 소나무 수피의 추출물에 대한 DPPH 자유 라디칼 소거능을 나타내었다. 시료 농도가 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때 사용한 모든 시료에서 89-92%의 높은 DPPH 자유라디칼 소거능을 나타내었다. 한편, 시료농도를 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석한 경우 OPA(48.7%)와 (+)-catechin(47.7%)이 가장 높은 DPPH 자유라디칼 소거능을 나타내었으며, 비타민 C의 경우는 33.3%로 가장 낮은 수치를 나타냈다. 비타민 C는 구조상 catechol 골격을 하고 있는 수피 추출물 보다 높은 항산화 활성을 보이는 것이 일반적이지만 본 연구에서 낮은 활성을 나타낸 것은 비타민 C 자체 산화가 실험 과정에서 빠르게 진행되었기 때문인 것으로 생각되었다. 그 외 시료들은 약 36-39% 범위로 모두 유사한 DPPH 자유라디칼 소거능을 나타내었다.

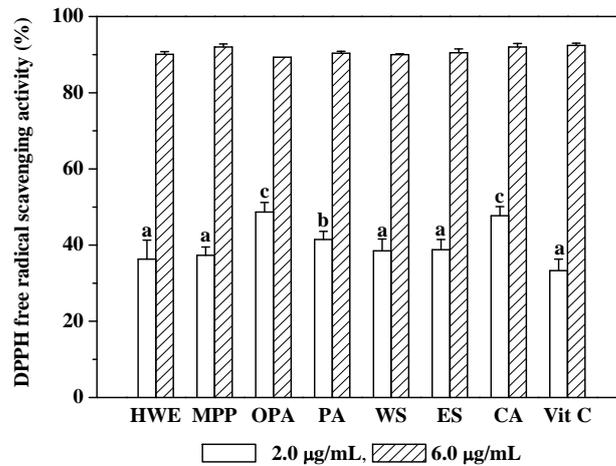


Fig. 30. DPPH free radical scavenging activity of the polyphenolic fractions in HWE from *Pinus radiata* bark; MPP, monomeric polyphenol; OPA, oligomeric proanthocyanidin; PA, proanthocyanidin; WS, water soluble; ES, ethanol soluble; CA, (+)-catechin; Vit C, vitamin C. Empty bars, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; slashed bars, 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Each value is expressed as mean \pm SD ($n = 3$). Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$.

2) ABTS⁺ 소거능

Horseradish peroxidase(HRP)는 ABTS, guaiacol, pyrogallol, scopoletin, ascorbate와 같은 다양한 기질을 산화시켜 색깔을 띠는 화합물을 생성한다. 특히 안정한 ABTS⁺은 HRP와 과산화수소 존재 하에서 ABTS를 산화시킴으로 인해 발생될 수 있다(Fig. 31). 이처럼 효소를 이용해 유도한 ABTS⁺은 산화제를 이용하는 경우와 유사한 소거능을 얻을 수 있다. 항산화제에 의한 ABTS⁺ 양이온 라디칼의 탈색은 수소 혹은 전자를 공여할 수 있는 능력을 반영한다. Figure 32는 다양한 수피 추출물에 의해 ABTS⁺이 얼마나 소거되었는지를 나타낸 것이다. 수피 추출물 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 MPP와 OPA의 경우 고분자 PA를 다량 함유하는 HWE, PA, WE, ES와 비교하여 약 20% 높은 ABTS⁺ 소거능을 나타내었으며 CA 및 GA와 거의 상응할 만큼 높은 라디칼 소거능을 보여주었다. 이러한 결과는 ABTS⁺과 고분자 PA간의 반응에 있어서 입체적인 장애에 의한 것으로 판단되었다. 즉, 상기의 DPPH 자유라디칼 소거능과 비교하여 고분자 PA의 경우 메탄올에서 분자 구조가 어느 정도 직쇄상을 하고 있지만 물에 녹인 경우 random coil한 형태를 취함으로써 인해 ABTS⁺과 고분자 PA B ring의 수산기 간의 반응에 입체적인 장애가 일어난 것으로 추정할 수 있었다. 그러므로 고분자 PA를 포함하는 천연물의 경우 ABTS⁺ 소거능 측정 시 용매 선정이 중요한 요인으로 작용할 것으로 생각되었다.

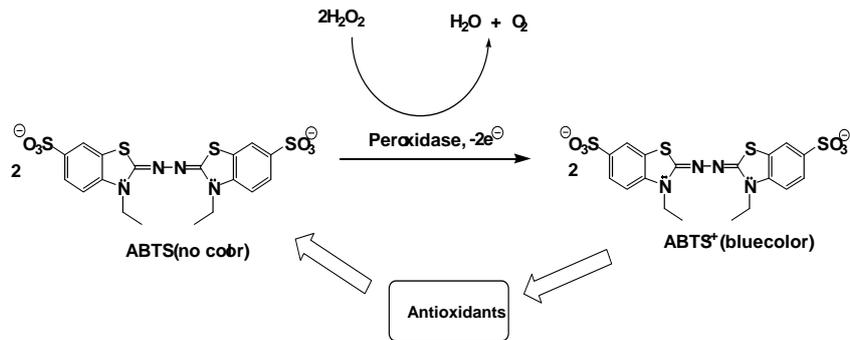


Fig. 31. Induction of ABTS cation radical in the presence of hydrogen peroxide and HRP.

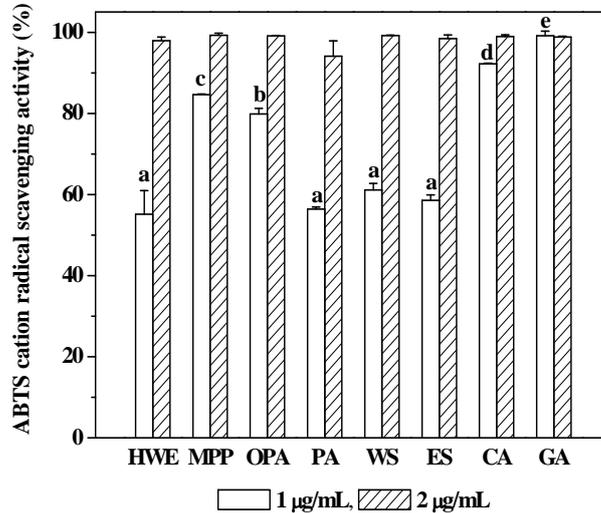


Fig. 32. 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) cation radical scavenging activity of the polyphenolic fractions in HWE from *Pinus radiata* bark; MPP, monomeric polyphenol; OPA, oligomeric proanthocyanidin; PA, proanthocyanidin; WS, water soluble; ES, ethanol soluble; CA, (+)-catechin; GA, gallic acid. Empty bars, 1.0 µg/ml; slashed bars, 2.0 µg/ml. Each value is expressed as mean ± SD (n = 3). Different letters indicate significant differences at p < 0.05.

3) Superoxide 음이온 라디칼 소거능

유해산소로 알려져 있는 활성산소는 가장 안정한 형태인 삼중항산소(3O_2)가 환원되면서 일차적으로 superoxide 음이온 라디칼을 발생시키게 되며 superoxide dismutase(SOD)와 같은 효소에 의해 과산화수소가 된다. Superoxide 음이온 라디칼은 피부 세포 내에서 산소분자를 이용하려는 초기 산화과정에서 발생하는 라디칼로서 이들에 대한 소거능을 측정하기 위해 빛에 민감하게 감응하는 riboflavin을 이용하였다. 즉, riboflavin은 산소와 전자 공여화합물인 methionine 존재하에서 자외선을 조사하게 되면 superoxide anion($O_2^{\cdot-}$)이 생성되며 이 라디칼은 다시 nitroblue tetrazolium(NBT)을 환원시켜 청색의 formazan(560 nm)을 형성함으로써 formazan의 농도를 측정하여 superoxide 음이온 라디칼 소거능을 검

토할 수 있다. 이러한 과정을 통해 superoxide 음이온 라디칼 소거능을 검토한 결과를 Fig. 33에 나타내었다.

수피 추출물 농도 227 $\mu\text{g/ml}$ 에서 모든 시료로부터 강력한 superoxide 음이온 라디칼 소거능을 관찰할 수 있었다. 수피 추출물 농도 23 $\mu\text{g/ml}$ 에서 OPA가 다소 높은 superoxide 음이온 라디칼 소거능을 보여주었으나 GA와 비교하여 약 20% 낮은 활성을 나타내었다. 그러나 GA와 같이 pyrogallol 골격을 한 화합물은 뛰어난 ROS 소거능을 보이지만 기능성 화장품 원료로 사용할 경우 그 만큼 장기간 안정하게 보관하는 것이 어렵다. 또한 피부에 대한 염증반응을 유발할 가능성이 크다고 판단된다.

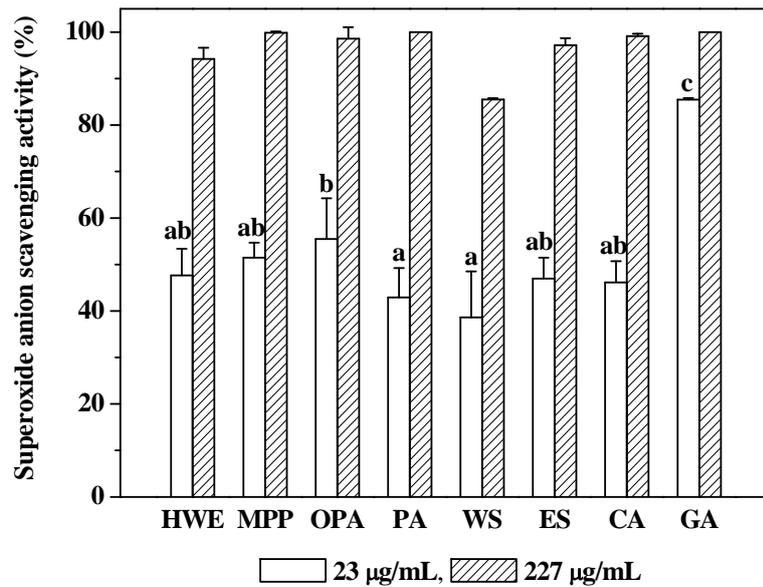


Fig. 33. Superoxide anion scavenging activity of the polyphenolic fractions in HWE from *Pinus radiata* bark; MPP, monomeric polyphenol; OPA, oligomeric proanthocyanidin; PA, proanthocyanidin; WS, water soluble; ES, ethanol soluble; CA, (+)-catechin; GA, gallic acid. Each value is expressed as mean SD ($n = 3$). Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$.

4) 과산화수소 소거능

과산화수소는 온화한 형태의 ROS에 해당하지만 Fe^{2+} 이온 존재하에서 상당히 유해한 것으로 알려져 있는 $HO \cdot$ 라디칼을 형성시킴으로 인해 DNA, 단백질, 지질에 손상을 주게 된다. 수피 추출물이 근본적으로 $HO \cdot$ 라디칼 형성을 억제하기 위한 작용을 할 수 있는지 여부를 판단하기 위해 과산화수소 소거능을 검토하였다.

HRP는 과산화수소를 이용해 guaiacol을 산화시켜 3,3'-dimethoxy-4,4'-dihydroxybiphenyl을 형성하며 더욱 산화가 진행되게 되면 산화 축합형 고분자로 변화하게 된다(Fig. 34). HRP에 의해 산화된 형태의 화합물들은 436 nm에서 흡광도를 나타냄으로 과산화수소 소거능을 측정할 수 있다.

HRP와 과산화수소 존재하에서 기질로서 guaiacol을 이용한 수피 추출물의 과산화수소 소거능은 시료 농도 3.3, 8.3, 16.7과 33.3 $\mu g/ml$ 에서 측정하였으며 그 결과를 Figs. 35과 36에 나타내었다. 이때 비교를 위해 자연계에 가장 풍부하게 존재하는 PA의 이성질체 골격 즉 procyanidin(PC) 및 prodelphinidin(PD)과 B ring이 유사구조를 하고 있는 갈릭산(gallic acid, GA)와 카테킨(catechin, CA)을 사용하였다. 전반적으로 이들 수피 추출물은 16.7 $\mu g/ml$ 이상의 농도에서 약 90% 이상의 높은 과산화수소 소거능을 나타내었으며 특히, OPA와 GA는 8.3 $\mu g/ml$ 의 저농도에서도 약 90% 이상의 강력한 과산화수소 소거능을 보여주었다. 이러한 결과로부터 차후 라디아타 소나무 수피 추출물은 세포 내 과산화수소로 인해 발생하는 세포활성 저하 및 세포 손상과 연관된 상처치유 혹은 피부 질환에 대해 강력한 활성을 나타낼 것으로 판단되었다.

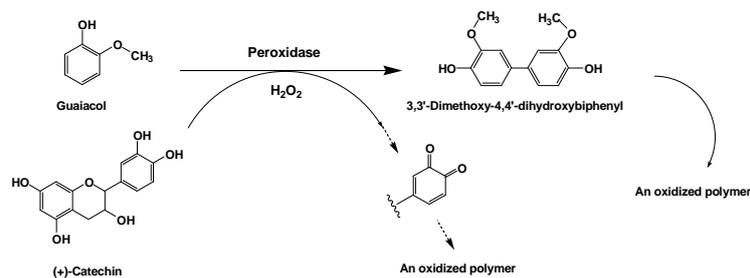


Fig. 34. Hydrogen peroxide scavenging mechanism of (+)-catechin in the presence of guaiacol and HRP.

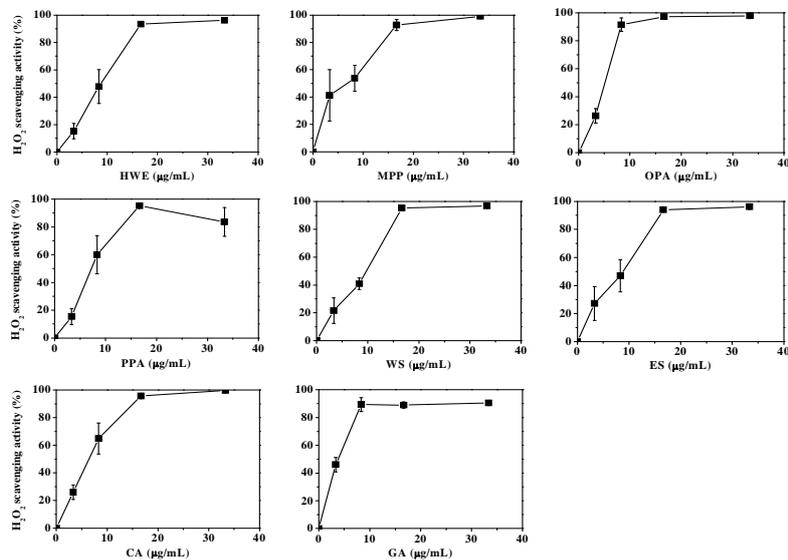


Fig. 35. Hydrogen peroxide scavenging activity of extracts from *Pinus radiata* bark. Each value is expressed as mean \pm standard deviation ($n = 3$).

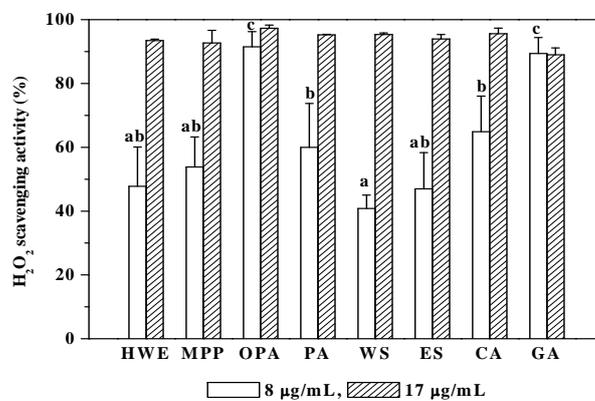


Fig. 36. Hydrogen peroxide scavenging activity of the polyphenolic fractions in HWE from *Pinus radiata* bark; MPP, monomeric polyphenol; OPA, oligomeric proanthocyanidin; PA, proanthocyanidin; WS, water soluble; ES, ethanol soluble; CA, (+)-catechin; GA, gallic acid. Each value is expressed as mean \pm SD ($n = 3$). Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$.

5) Linoleic acid의 과산화저해

불포화 linoleic acid의 과산화반응으로부터 malondialdehyde가 부산물로 생성된다. Thiobarbituric acid와 malondialdehyde가 반응하게 되면 532 nm에서 흡광도를 갖는 붉은색 색소 화합물을 형성하게 된다. 그러므로 linoleic acid의 산화가 진행될수록 532 nm에서 흡광도가 증가하게 된다. 만일 linoleic acid와 항산화효과가 있는 시료를 같이 첨가하였을 때 Fig. 37과 같이 진행되는 linoleic acid의 산화속도가 지연되었다면 시료가 지질에 대한 항산화 효과가 있는지 알 수 있다. 또한, Fe^{2+} 이온은 linoleic acid의 이중결합이 산소 라디칼의 첨가반응에 의해 과산화 형태를 취하게 되면 linoleic acid-OOH와 반응하여 Fe^{3+} 형태로 산화되며 Fe^{3+} 는 thiocyanate 이온(SCN^-)과 반응하여 $Fe(SCN)^{2+}$ 형태의 brick-red complex를 형성한다. 이로부터 지질의 과산화물에 대한 산화진행 정도를 판단할 수 있으므로 linoleic acid의 과산화 저해 활성을 평가하기 위해 2-thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) assay와 ferric thiocyanate(FTC) method를 병행하였다.

다양한 수피 추출물과 지질 과산화 저해 활성을 비교하기 위해 비타민 E와 시판 페놀계 합성 항산화제인 BHT를 사용하였으며 그 결과를 Fig. 38에 나타내었다. Fig. 38에 나타낸 바와 같이 사용한 모든 시료는 linoleic acid 자체 산화가 진행되고 있는 control에 비해 낮은 산화율을 나타내어 지질에 대한 항산화 효과가 있음을 알 수 있었다. Fig. 39를 보면 BHT는 95.6%로 높은 지질 안정화 효과를 보여주었으며 WS와 ES의 경우도 약 90%로 BHT에 상응하는 높은 linoleic acid 과산화 저해 활성을 가진다는 사실을 확인할 수 있었다. 비타민 E의 경우 78%로 다소 낮은 지질 안정화 효과를 나타내었다. 40°C 조건에서 190시간동안 linoleic acid를 산화시킨 후 TBARS와 FTC 방법을 이용하여 지질 안정화 효과를 검토한 결과를 Fig. 39에 나타내었다. Figure 39에서 알 수 있는 바와 같이 두 방법으로부터 양호한 결과를 얻을 수 있었으며 수피 추출물의 지질 안정화 효과는 BHT에 상응할 만큼 강력하다는 것을 확인할 수 있었다.

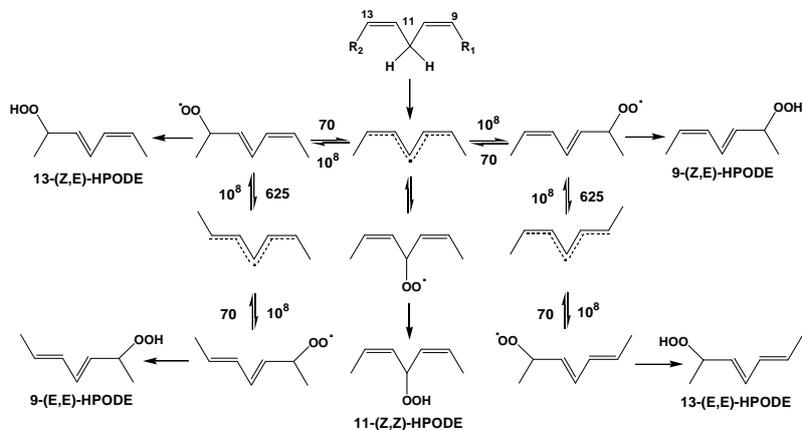


Fig. 37. Reaction pathways of the peroxidation of linoleate; HOPDE, hydroperoxy octadecadienoate.

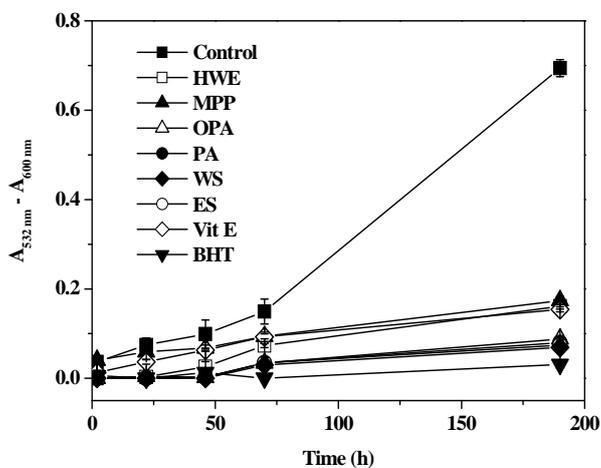


Fig. 38. Inhibitory activity of time-dependent lipid peroxidation of extracts from *Pinus radiata* bark; MPP, monomeric polyphenol; OPA, oligomeric proanthocyanidin; PA, proanthocyanidin; WS, water soluble; ES, ethanol soluble; Vit E, vitamin E; BHT, butylated hydroxytoluene. Each value is expressed as mean \pm standard deviation ($n=3$).

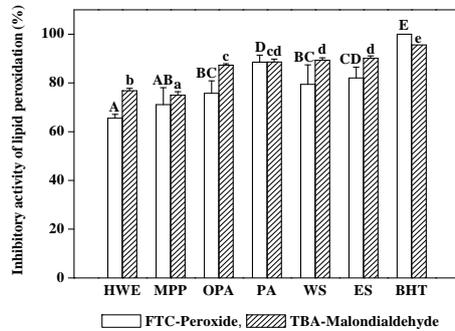


Fig. 39. Inhibitory activity of linoleic acid oxidation of extracts (1 mg/ml) from *Pinus radiata* bark determined by ferric thiocyanate (FTC) and 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assays. Each value is expressed as mean \pm standard deviation ($n=3$).

6) 환원력

수피 추출물의 ferric 이온에 대한 환원력을 측정된 결과를 Fig. 40에 나타내었다. GA는 가장 높은 ferric 이온에 대한 환원력을 나타내었으며 수피 추출물은 CA와 비타민 C에 상응할 만큼 높은 환원력을 보여주었다. 상기 결과와 연관하여 수피 추출물은 강력한 수소 및 전자 공여를 할 수 있는 천연 항산화제로 활용할 수 있을 것으로 판단되었다.

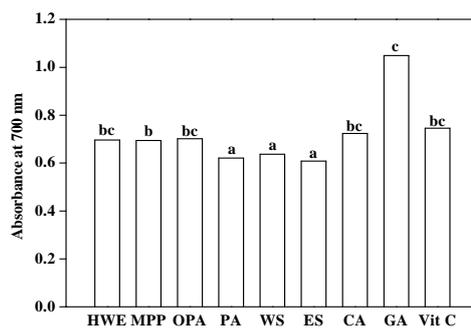


Fig. 40. Reducing power of extracts (100 $\mu\text{g/ml}$) from *Pinus radiata* bark. Each value is expressed as mean \pm standard deviation ($n=3$).

7) Ferrous이온에 대한 킬레이트 효과

상기에서 언급한 바와 같이 과산화수소는 온화한 형태의 ROS에 해당하지만 Fe^{2+} (ferrous) 이온 존재하에서 상당히 유해한 것으로 알려져 있는 $HO\cdot$ 라디칼을 형성시킴으로 인해 DNA, 단백질, 지질에 손상을 주게 된다. 그러므로 수피 추출물이 ferrous이온을 킬레이트하는 효과를 가진다면 과산화수소 소거능에 의한 $HO\cdot$ 라디칼의 생성 억제뿐만 아니라 ferrous이온을 제거해 줌으로써 DNA, 단백질, 지질을 보호할 수 있다고 판단되었다.

Figure 41에서 알 수 있는 바와 같이 WS와 ES는 ferrous이온을 킬레이트하여 이들 추출물의 특정 흡수파장인 280 nm에서 284 nm로 이동한 것을 알 수 있다. 따라서 유해 ROS인 $HO\cdot$ 라디칼을 발생시키는 주요 인자인 ferrous 이온에 대한 킬레이트 형성이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

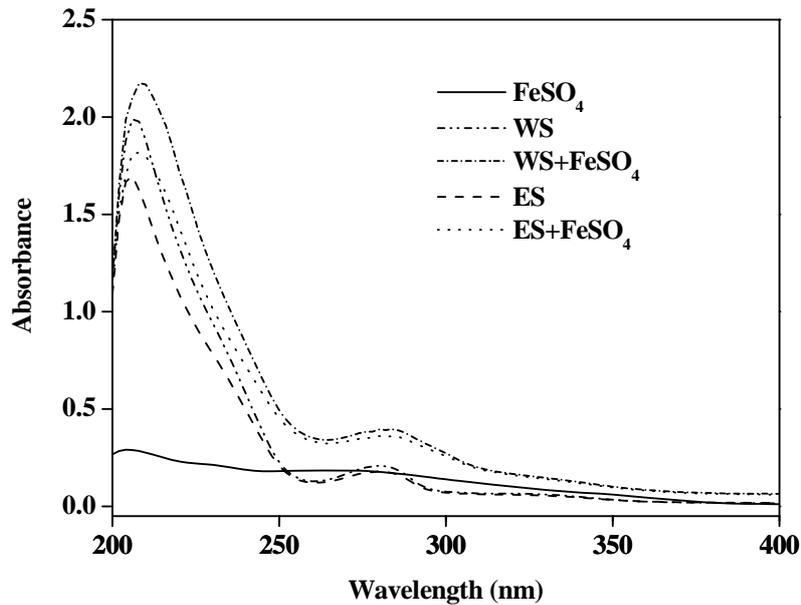


Fig. 41. Chelating effect of WS and ES from *Pinus radiata* bark on ferrous ion adsorption.

라. 미백 효과

Tyrosinase는 tyrosine을 quinone과 indolequinone화합물들의 여러 중간체를 거쳐 멜라닌을 합성하는 효소이다. Tyrosinase는 포유동물뿐만 아니라 하등동물, 식물 혹은 곰팡이 등에서도 존재하는 것으로 알려져 있다. 특히, 피부 멜라닌 세포 내의 tyrosinase로부터 생성되는 멜라닌은 결국 각질층으로 전이되어 피부를 암화시켜 기미, 주근깨와 같은 색소침착을 야기함으로써 tyrosinase 활성 억제제와 melanocyte로부터 합성된 멜라닌이 각질층으로 전이되는 것을 억제할 수 있는 물질에 대해 기능성 화장품에 있어 피부 미백과 관련됨으로 화장품 산업에서 중요하게 여겨지고 있다. 그러므로 라디아타 소나무 수피로부터 제조한 다양한 추출물에 대해 tyrosinase 저해 활성 및 그 메커니즘, melanocyte의 각질층 전이 억제에 관한 기작을 구명하고자 하였다.

1) Mushroom tyrosinase 저해 활성

Figure 42는 tyrosinase의 농도에 따른 ES의 저해 활성을 나타낸 것이다. ES 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 저해 활성은 이차 곡선을 보여주었으며 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 저농도에서도 15 unit/ml의 tyrosinase를 약 90% 이상 저해하는 것을 알 수 있었다. Figure 43은 tyrosinase 효소농도를 30 unit/ml로 고정된 후 수피 추출물 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 tyrosinase 저해 활성을 측정된 결과이다. MPP가 약 75%로 가장 높은 tyrosinase 저해 활성을 나타내었으며 HWE, OPA, PA, WS 및 ES는 약 30-40%로 유사한 수준의 tyrosinase 저해 활성을 보여주었다. 반면에 현재 시판 미백제로 사용되고 있는 AR과 AS는 본 실험에서 낮은 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 이들 미백제가 포함하고 있는 glucose의해 AR과 AS가 tyrosinase의 산화 기질로 작용하는 것을 방해했기 때문인 것으로 판단되었다.

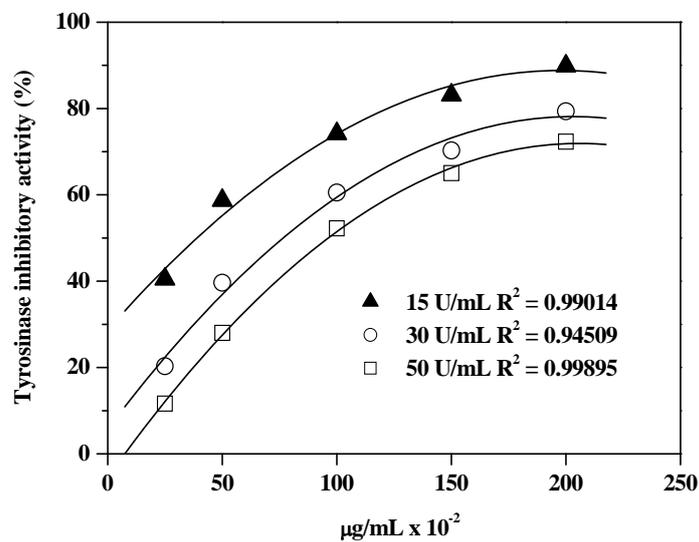


Fig. 42. Inhibitory activity of tyrosinase by ES from *Pinus radiata* bark.

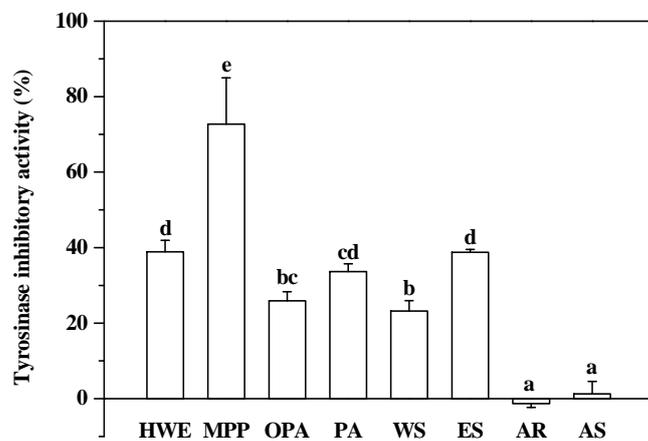


Fig. 43. Inhibitory activity of tyrosinase by extracts from *Pinus radiata* bark. Each value is expressed as mean \pm standard deviation ($n=3$). AR: arbutin, AS: ascorbic acid-3-glucoside.

2) Tyrosinase저해 kinetic

Figure 44는 시간 경과에 따른 ES와 PA의 tyrosinase 저해 활성의 변화를 나타낸 것이다. 저해제를 첨가하지 않은 control의 경우 초기에 빠른 속도로 L-DOPA가 산화되는 것을 관찰할 수 있었으며 10분경과 시 476 nm에서 약 4배 정도 높은 흡광도를 나타내었다.

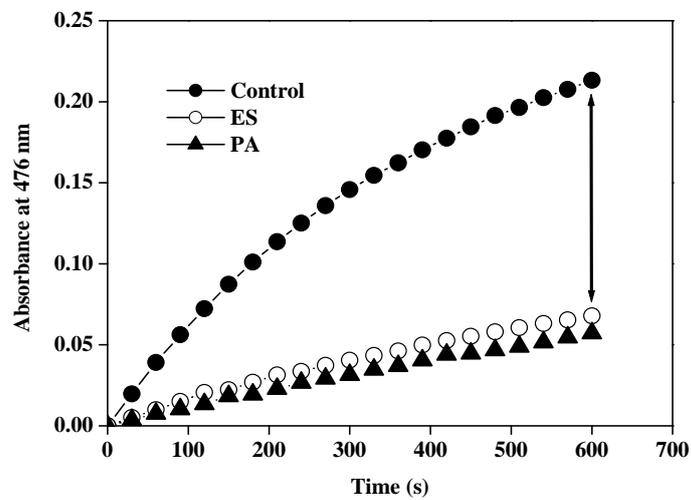


Fig. 44. Inhibitory kinetics of tyrosinase by extracts from *Pinus radiata* bark.

3) Lineweaver-Burk plot에 의한 tyrosinase저해 기작

Lineweaver-Burk plot은 어떤 물질(저해제)이 tyrosinase와 같은 효소를 경쟁적 또는 비경쟁적으로 저해 하는지 여부를 판단하기 위해 보편적으로 이용되며 이로부터 효소와 기질 혹은 저해제 간의 작용기작을 추측할 수 있다.

Figure 45의 상위 그래프로부터 L-DOPA와 tyrosinase 혼합액에 ES 저해제를 첨가한 경우에 ES와 L-DOPA의 농도 증가에 따른 직선의 기울기가 control보다 증가하며 ES농도에 따른 직선의 기울기가 변화하더라도 1/V축의 한점을 통과하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 ES가 비경쟁적인 저해제라고 하는 것을 의미하며 L-DOPA 기질과 활성부위가 다르며 tyrosinase의 다른 부위와 상호작용을 통해 간접적으로 효소 활성을 저해하는 것으로 생각되었다. Figure 45의 아

래 그래프는 L-DOPA와 tyrosinase 혼합액에 저해제로 PA를 사용한 경우이며 ES와 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 이것은 tyrosinase 저해 활성이 ES에 다량 포함되어있는 PA에 주로 의존한다는 것을 보여주는 결과라 판단되었다.

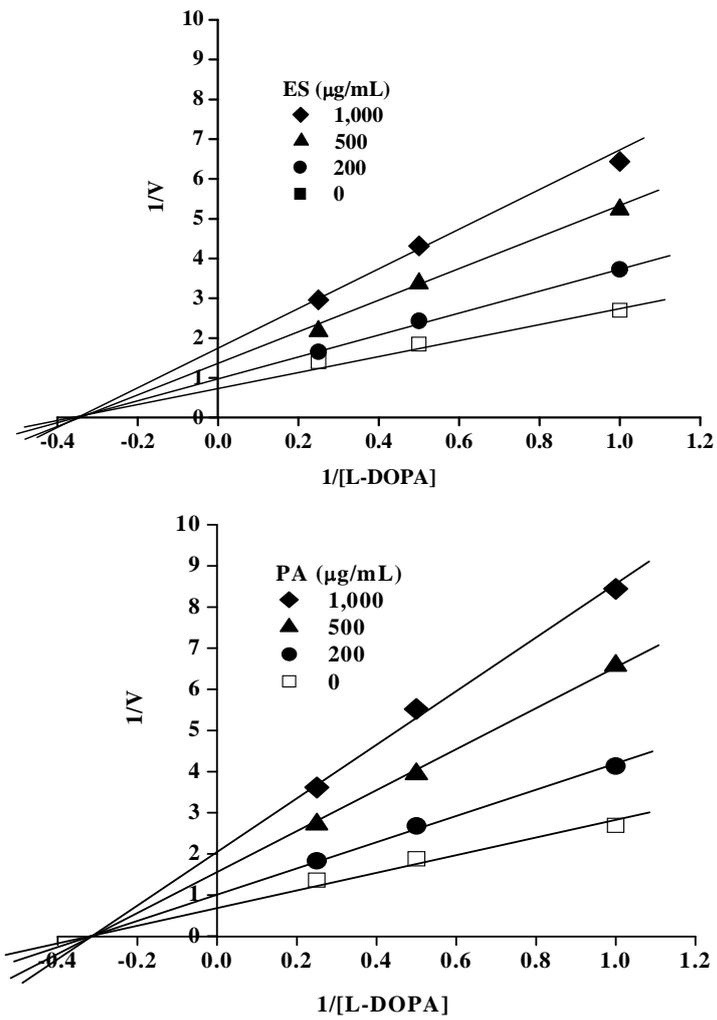


Fig. 45. Lineweaver-Burk plot between L-DOPA and either ES or PA at 5 units/ml of tyrosinase concentration.

4) 구리이온과의 킬레이트 효과

산소를 포함하고 있는 활성형 tyrosinase[copper sites: $-[CuA-2O-CuB]-$]는 피부 melanoma 세포 내에서 기질인 tyrosine의 산화를 통해 멜라닌을 생합성하고 자신은 1가 Cu 이온만 포함한 비활성형으로 바뀌게 된다. Tyrosinase의 활성 부위에는 구리 이온이 포함되어있으므로 구리이온과의 킬레이트 능력을 갖는 경우 tyrosinase를 비활성화할 수 있는 능력이 있다고 볼 수 있다. 따라서 수피 추출물의 주요 성분인 PA를 이용하여 구리 이온에 대한 킬레이트 효과를 시간에 대한 파라미터로 검토하여 Fig. 46에 나타내었다. PA의 구리이온 킬레이트 효과는 안정한 흡수대인 810 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 계산하였다. PA 첨가 시 초기에 약 9% 까지 구리이온이 빠르게 흡착되며, 340분경과 시 최대 26%까지 구리이온을 흡착하지만 그 후 흡착된 구리이온을 서서히 방출되게 된다. Figure 47의 FT-IR 결과는 구리이온의 킬레이트 능력이 저하된 원인은 PA의 방향족 고리가 변성됨으로 인해 발생되었음을 보여주었다.

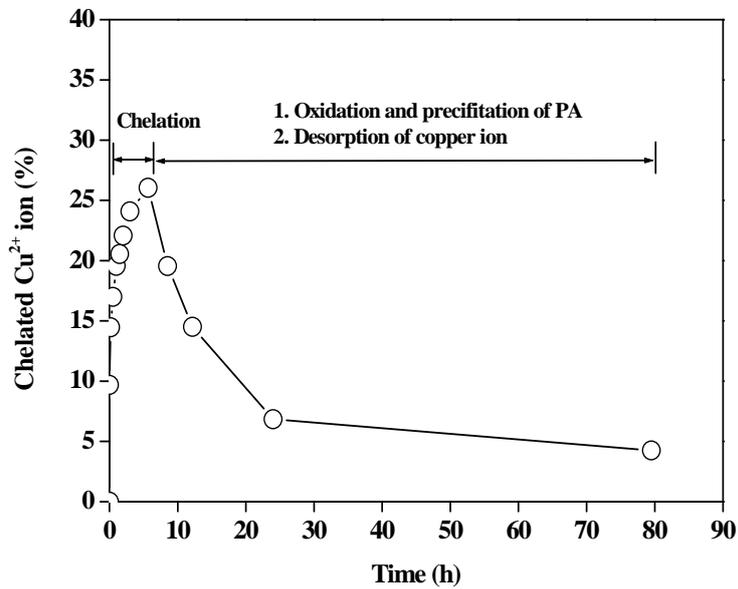


Fig. 46. Chelation of copper ion by PA according to time.

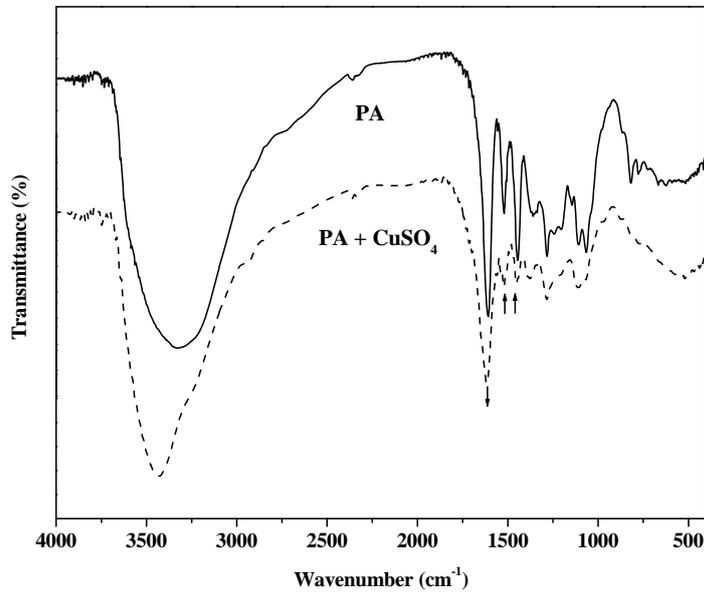


Fig. 47. FT-IR spectra of PA and PA after chelation time.

5) PA와 B16 melanoma 세포간의 상호 작용

피부의 기저층에 존재하는 melanocyte는 자외선의 자극을 받으면 tyrosine으로부터 멜라닌을 합성하여 피부를 보호한다. 그러나 지나친 멜라닌의 생성은 미적으로나 피부 건강상 문제를 야기할 수 있으므로 최근에는 멜라닌에 의한 피부 착색을 회피하거나 완화시키는 기능성 화장품들이 개발되고 있다. 그러므로 라디아타 소나무 수피로부터 제조한 다양한 추출물과 melanocyte의 각질층 전이 억제에 관한 기작을 구명하고자 하였다. 수피 추출물은 천연 색소로서 멜라닌의 가시광선 흡수대와 겹치게 되기 때문에 멜라닌 합성 억제에 대한 실험은 사실상 곤란하였다(Fig. 48). 구체적으로 Fig. 48에서 600 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도로 처리한 경우 control과 비교하여 490 nm에서 높은 흡광도를 나타내었다. 정상적으로는 490 nm에서의 흡광도 증가는 melanogenesis를 촉진한 결과로 해석되어야 하지만 이 경우 melanocyte에 처리 시료가 흡착되어 일어난 것으로 보인다. 이러한 예상에 기

인하여 melanocyte를 현미경으로 관찰하여 이들의 형태학적인 변형이 있다는 것을 확인하였으며 그 사진으로부터 수피 추출물이 melanocyte의 수상돌기(dendrite) 성장을 저해하는 것으로 확신할 수 있었다. 보다 특징적인 사실은 저분자 물질을 다량 포함하는 MPP의 경우 melanocyte 수상돌기의 변형을 야기하지 않았다는 것이다. 그러므로 수피 추출물의 주요 성분인 PA는 melanocyte의 표면에서 상호 작용을 통해 수상돌기 발달을 저해함으로써 차후 기능성 화장품 원료로 사용할 경우 melanocyte 수상돌기로부터 각질층으로의 melanosome의 전이를 억제할 수 있을 것으로 판단되었다. 과도하게 피부의 암색화가 일어나는 부위에 수피 추출물을 함유한 고농축형 화장품을 집중적으로 바르게 되면 미백효과를 볼 수 있을 것으로 예상할 수 있었다. 이들 수피 추출물이 피부 미백 효과에 기여할 수 있는 메커니즘에 대해 상기의 결과를 종합하여 Fig. 50에 나타내었다.

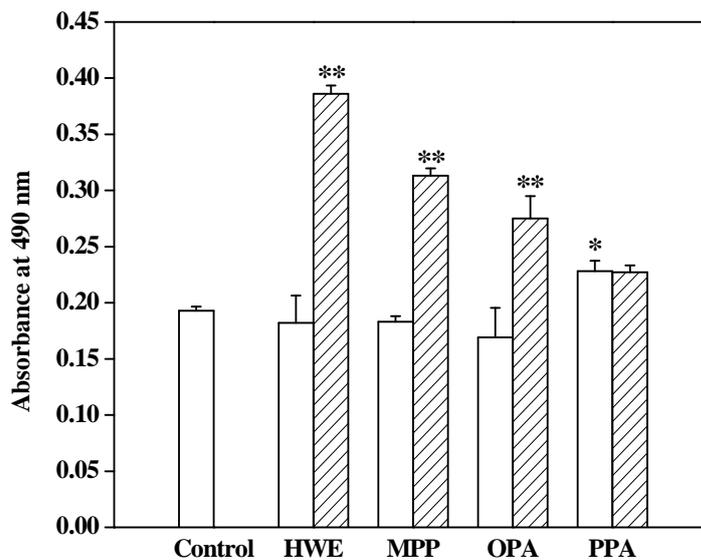


Fig. 48. Absorbance at 490 nm of melanin in B16 melanoma cells after treatment of the polyphenolic fractions from *Pinus radiata* bark at 125 and 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations. Each value is expressed as mean standard deviation ($n = 3$): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared with the control.

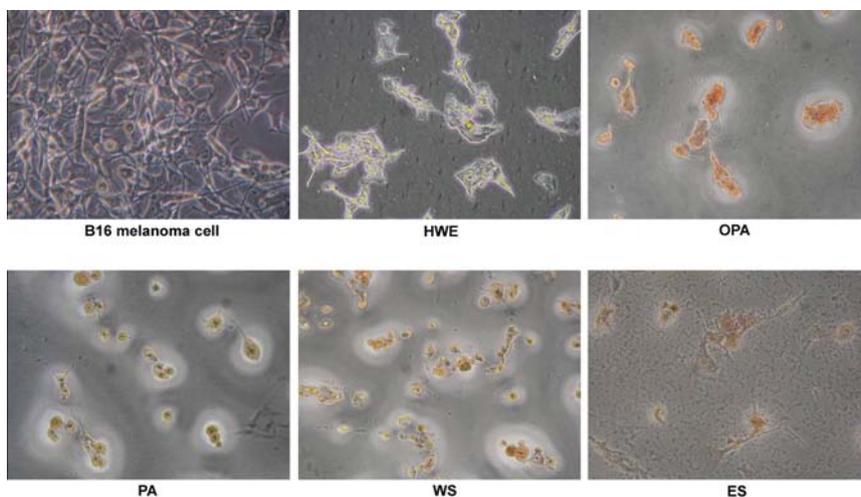


Fig. 49. Photograph of B16 melanoma cells cultured with polyphenolic fractions from *Pinus radiata* bark. The cells cultured with 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of HWE, OPA, PPA, WS, and ES, respectively. Magnification 400 \times .

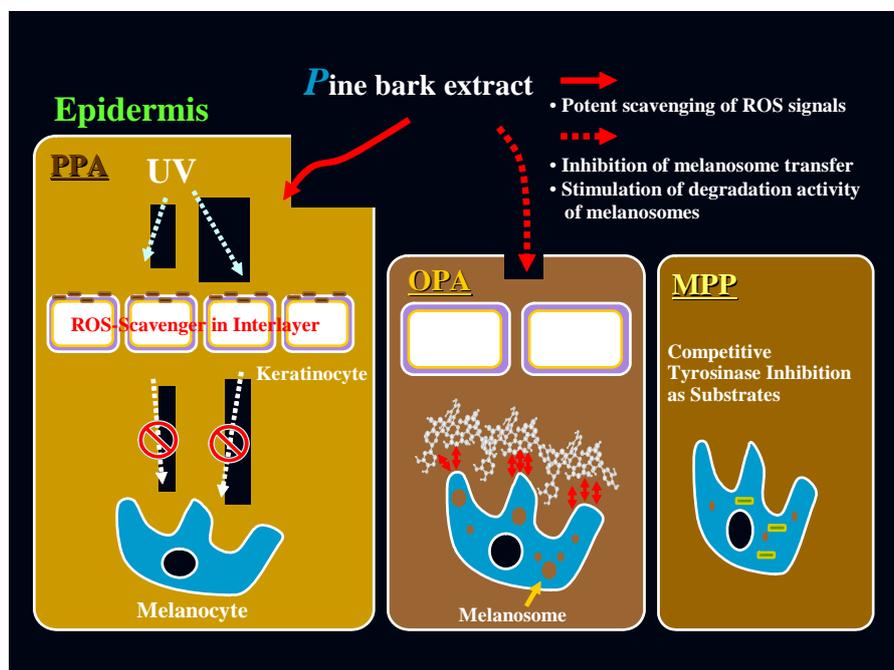


Fig. 50. Proposed mechanism of pine bark extracts on skin-whitening effect.

마. 주름개선효과

1) NIH/3T3 섬유아세포의 세포 증식 효과

NIH/3T3 섬유아세포에 대한 세포 독성을 MTT법으로 평가하여 Fig. 51에 나타내었다. 전체 수피 추출물에서 섬유아세포의 증식효과가 있는 것으로 나타났으며 1,250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 150-250%의 세포 증식효과가 있는 것을 알 수 있었다. 또한 125 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았으며 이 결과로부터 수피 추출물이 충분한 항산화 활성을 보이는 농도로 피부에 적용하더라도 세포 독성은 극히 낮을 것으로 판단되었다. 고농도 처리 시에 나타난 세포 증식효과는 수피 추출물이 섬유아세포를 자극함에 의해 나타난 것으로 생각되었다.

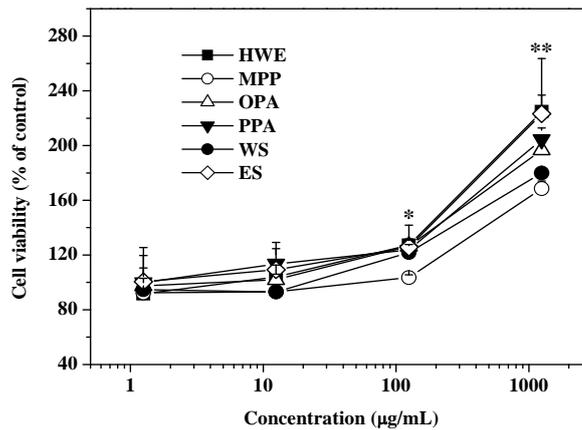


Fig. 51. Cell growth of the polyphenolic fractions from *Pinus radiata* bark on NIH/3T3 fibroblast at different doses. Each value is expressed as mean standard deviation ($n = 3$): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared with the control.

2) PA의 콜라겐 흡착

콜라겐은 고등동물의 가장 풍부한 단백질이며 몸체를 구성하는 단백질의 약 20~25% 함유하고 있는 세포외 매트릭스이다. 힘줄, 피부, 혈관, 뼈와 같은 결합조직은 주로 type I 콜라겐(~95%)으로 구성되며 부분적으로 ~5% type III 콜라겐을 포함한다. 콜라겐은 Fig. 52와 같이 두 개의 $\alpha 1(1)$ 과 한 개의 $\alpha 2(1)$ 사슬이

coiled coil구조를 하고 있으며 길이가 약 3,000 Å, 직경이 15 Å 정도의 삼중 나선형이다. 또한, 콜라겐은 인공 보철, 치아 보호, 인공 조직, 약물 전달체, 화장품, 화상용 붕대, 상처 치유 등 임상 분야에 다용도로 사용되고 있는 실정이다. UV에 의한 피부 자극은 콜라겐나제와 엘라스타제와 같은 단백질 분해효소의 생성을 촉진시켜 진피 내의 콜라겐과 엘라스틴의 분해를 초래하게 된다. 이러한 일련의 과정이 반복됨으로 인해 결국 피부의 노화가 진행되어 주름을 생성시키는 원인이 된다. 콜라겐과 엘라스틴의 분해를 각각의 발현 효소로부터 보호할 수 있는 기능을 가진 천연물이 있다면 기능성化妆품을 개발하기 위한 목적뿐만 아니라 건강식품, 의료용 임상 분야로 광범위한 응용이 가능하리라 판단하였다. 따라서 다양한 수피 추출물이 단백질 분해 효소 및 자유 라디칼에 의해 콜라겐 혹은 엘라스틴이 손상되는 것을 안정화시킬 수 있는지에 대해 상세히 검토하고자 하였다. 연구 과정에서 PA는 콜라겐나제, 엘라스타제와 같은 단백질 분해효소를 직접적으로 저해하는 것이 아니라 콜라겐과 엘라스틴에 대한 흡착에 의해 상대적으로 이들 분해 효소로부터 콜라겐과 엘라스틴을 보호하는 것으로 추정되었다. 그러므로 수피 추출물의 대표 성분인 PA를 이용하여 콜라겐에 흡착될 수 있는 양이 어느 정도 되는지를 알아보하고자 하였으며 PA가 콜라겐에 흡착한 이후 콜라겐나제와 라디칼에 대해 콜라겐을 안정화시킬 수 있는지의 여부를 검토하였다.

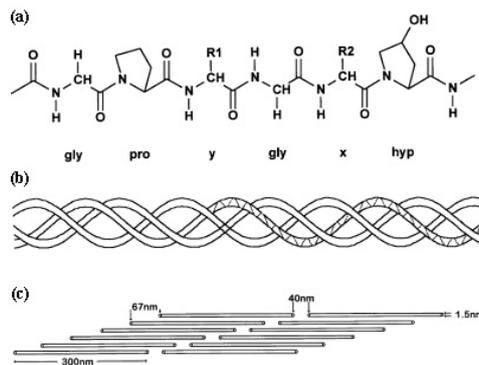


Fig. 52. Chemical structure of collagen type I. (a) Primary amino acid sequence, (b) secondary left handed helix and tertiary right handed triple-helix structure and (c) staggered quaternary structure (Gly, glycine; Pro, proline; Hyp, hydroxyproline).

가) pH에 의한 영향

PA의 콜라겐 흡착에 있어 pH가 미치는 영향을 검토하여 Fig. 53에 나타내었다. pH 2.0-3.0에서 현저한 부풀림 현상을 관찰할 수 있었으며 이로 인해 PA의 흡착량이 감소한 것으로 판단되었다(Fig. 54). 콜라겐은 조직의 부가적인 기계적·물리적 안정성을 유지하기 위해 본질적으로 가교결합을 형성하고 있으며 이들 결합 중 대표적인 콜라겐의 aldimine-type의 내부 가교 결합은 강산성 조건하에서 해리됨으로 인해 겔과 같은 부풀림 현상이 발생한 것으로 판단되었다. 또한 Fig. 55에 나타낸 바와 같이 낮은 pH 범위에서 콜라겐의 삼중 나선상이 positive 전하를 띠므로 인해 척력이 작용하여 보다 부풀림 현상이 두드러지게 된 것으로 사료되었다(Friess, 1998). 보다 구체적으로 PA의 낮은 콜라겐 흡착은 부풀림 현상으로 인해 콜라겐과 PA사이에 성립될 수 있는 수소 결합(hydrogen bond)과 소수성 상호 작용(hydrophobic interaction)이 입체적으로 제한을 받는 것으로 해석될 수 있다.

콜라겐에 흡착된 PA는 pH 4.0-7.0에서 약 90%이상의 최대 흡착량을 나타내었으며 이러한 높은 흡착량은 콜라겐의 표면 전하가 양쪽성을 띠므로 인해 즉, 등전점에 해당하는 부근에서 PA와의 적절한 상호 작용이 성립된 것으로 판단되었다. 또한 이 최적의 pH 범위에서 콜라겐의 겔과 유사한 구조를 보이는 것은 피부 내의 콜라겐 본래의 환경에서도 관찰될 수 있으며 이것은 콜라겐이 물을 흡수할 수 있는 친수성 관능기가 표면에 노출되어 있기 때문인 것으로 판단되었다. 실질적으로 콜라겐은 피부 내에서 70-80 wt%의 수분을 함유할 수 있다(Reichert et al., 2004). 콜라겐 기질 상에 PA의 높은 흡착량을 보인 최적 pH 범위 중 pH 7.0을 선택하여 차후 실험을 실시하였다.

Figure 54에서 알 수 있는 바와 같이 알칼리 범위에서 PA는 어두운 갈색을 나타내었다. 이러한 현상은 PA B ring의 catechol 구조가 알칼리 및 산소 존재 하에서 산화되어 quinone을 유도함으로 인해 Fig. 55와 같은 반응이 진행되어 콜라겐과 conjugated 공유결합을 형성함으로 인해 발생한 것으로 생각되었다. 일반적으로 알칼리 산화와 같은 비효소계 산화 반응은 폴리페놀의 산화 구조인 quinone과 단백질간의 반응에 의해 어두운 색상의 최종 산물을 형성한다(Xu & Diosady, 2000). 또한 알칼리 조건에서 콜라겐의 표면 전하는 negative이며 산화된 PA의 경우도 negative 전하를 나타냄으로 이로 인해 전기적으로 척력이 작용하여 흡착량을 저하시킨 것으로 판단되었다. 그러나 공유 결합을 형성한 PA의

경우 상당히 해리하기가 어려운 비가역적인 형태를 취할 것으로 추정할 수 있었다. 콜라겐은 알칼리 환경 하에서 비교적 양호한 가수분해 반응을 겪기 때문에 장시간의 흡착 반응 시에는 PA의 흡착·침전 보다는 오히려 해리·분해반응으로의 기작이 더 강하게 일어날 것으로 예상할 수 있었다.

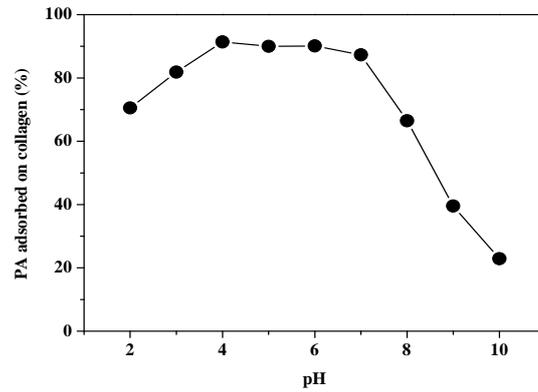


Fig. 53. Effect of pH in adsorption of PA onto collagen: Adsorbent dose 40 mg /50 ml; PA concentration 100 mg/ℓ; Agitation time 5 h.

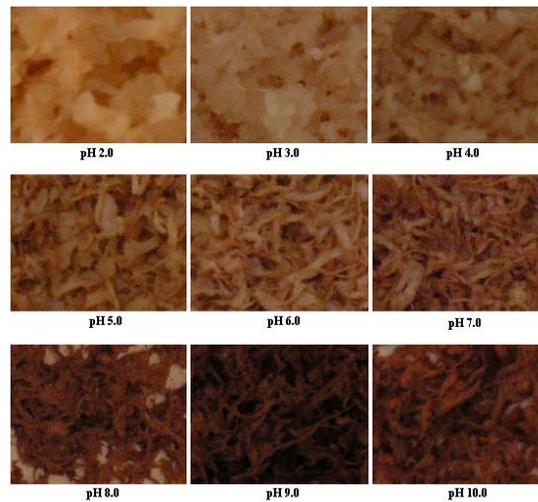


Fig. 54. Photographs of PA-collagen associated at various pH levels (pH 2.0-10.0, 40).

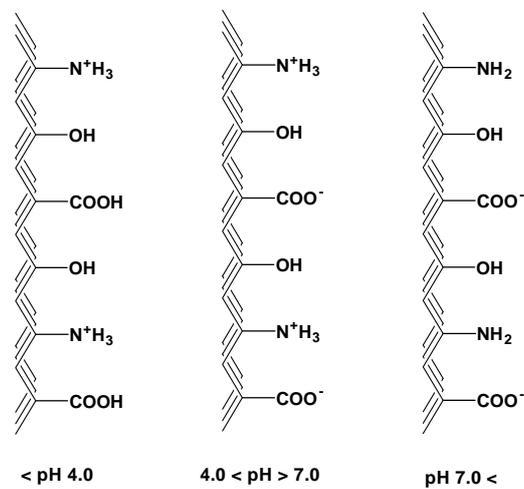


Fig. 55. Proposed dissociation states for the carboxylic acid and amine groups of the side-chain amino acid residues in the collagen macromolecule.

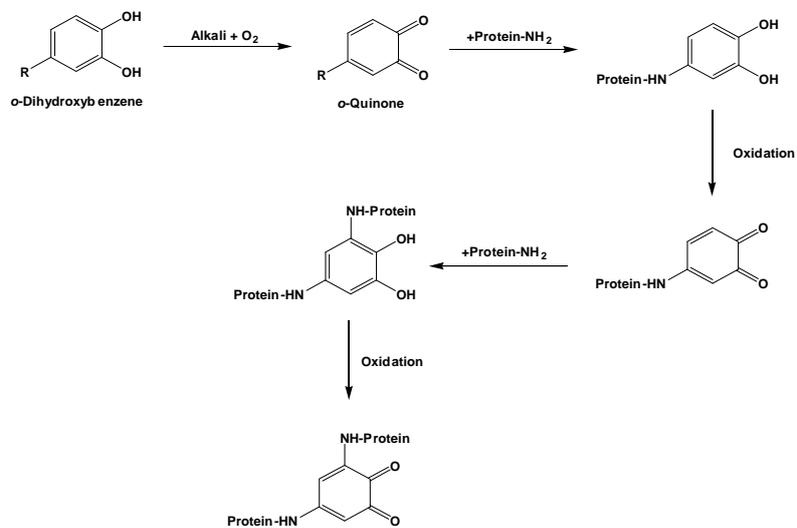


Fig. 56. Interaction reaction between side chain of protein and quinone form of *o*-dihydroxybenzene leading to polymerization, complex formation (Rawel et al., 2001).

나) 접촉시간과 초기 농도의 효과

Figure 57은 접촉시간과 초기 PA농도가 PA의 콜라겐에 대한 흡착 효과에 미치는 영향을 검토한 결과이다. 접촉시간이 경과함에 따라 PA 흡착량도 증가하였다. PA의 흡착은 초기 접촉시간에 빠르게 진행되었으며 점차적으로 평형에 도달하는 것을 알 수 있었다. 여기에서 평형시간은 콜라겐 표면에 흡착된 PA의 양이 최대가 될 때까지 걸린 시간을 의미한다. PA 농도 100, 200, 300, 400 mg/l 에서 평형에 도달하는 시간은 285 min이었으며 PA 농도 범위에서 콜라겐의 PA uptake는 41-89%를 나타내었다. 초기의 빠른 흡착은 초기 단계에서 흡착할 수 있는 콜라겐 사이트(site)의 수에 기인한다. PA흡착 곡선은 콜라겐에 흡착된 PA의 형태가 단층(monolayer)을 하고 있음을 보여주었다.

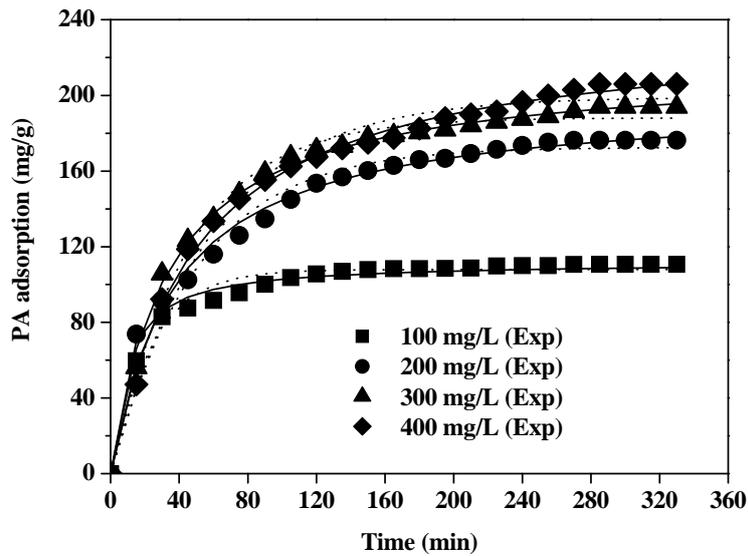


Fig. 57. Effect of contact time on adsorption of PA onto collagen; adsorbent dosage 40 mg/50 ml; pH 7.0; temperature 37°C. Curves predicted by the first order rate expression (dotted line) and the pseudo-second order expression (straight line).

다) 흡착 속도 상수

흡착 속도 상수는 다음과 같은 일차 속도 방정식으로부터 결정할 수 있다. 여기에서 q 와 q_e 는 각각 시간 t (분)와 평형상태에서 흡착된 피흡착제의 양을 의미하며 K_{ad} 는 흡착 속도 상수이다.

$$\text{Log}(q_e - q) = \log q_e - K_{ad}/2.303 \times t$$

$\text{Log}(q_e - q)$ 와 t 사이의 직선 그래프는 상기의 방정식을 적용할 수 있다는 것을 의미한다. K_{ad} 값은 Fig. 58의 직선 그래프의 기울기로부터 계산하였으며 PA 농도가 증가함에 따라 약간의 K_{ad} 값이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Table 12). 이 결과로부터 피흡착제 즉, PA의 농도는 속도 상수에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다.

흡착 속도 데이터는 상기와 같이 직선 형태로 분석할 수 있으며 또한 아래의 곡선 일차 속도식으로 표현할 수 있다(Lagergren & Svenka, 1898; Ho & McKay, 1998).

$$q = q_e(1 - \exp(-k_1 t))$$

Table 12에서 알 수 있는 바와 같이 k_1 값은 PA의 농도가 증가함에 따라 감소하였다. 모든 측정 농도에서 속도 상수와 평형 흡착량 예측치를 계산하여 Table 12에 나타내었다. q_e 의 계산치는 q_e 실험치 보다 낮게 나타났으며 이로부터 검토한 초기 농도에 대해 일차 속도론을 적용하는 것은 불충분하다고 판단되었다. 이러한 이론치와 실험치 간의 차이에는 흡착 초기 단계에서 경계부 혹은 외부 저항에 대한 조절에 기인할지 모르는 시간 연장 때문일 것으로 판단되었다(McKay et al., 1999). 문헌에서 언급한 대부분의 경우에 Lagergren 즉, 일차 속도론은 흡착시간이 전범위에 걸쳐서 데이터를 잘 fit하지 못하며 일반적으로 q_e 값을 실험치보다 평가저하는 경향이 있다(Reddad et al., 2002; Vijayaraghavan et al., 2006). Lagergren fit에 대한 상관계수는 0.96-0.99범위였다.

Pseudo 이차 속도론(Ho & McKay, 1999)을 아래의 직선(수식1) 및 곡선 형태(수식2)의 fit로 적용하였다.

$$t/q_t = k_2 q_e^2 + t/q_e \quad \text{수식 1)}$$

$$q = q_e (1 - 1/(1 + q_e k_2 t)) \quad \text{수식 2)}$$

Figure 58은 PA와 콜라겐 간의 흡착 데이터에 pseudo 이차 속도론의 직선 fit (수식 1)를 적용한 것이다. Pseudo 이차 속도론은 고체상위에서의 흡착능력에 근거를 둔다. 이 이차 속도론은 다른 잘 평가된 이론들과 반대로 흡착 연구의 전범위에 걸친 거동을 예측할 수 있으며 속도 조절 단계가 존재하는 화학 흡착과 잘 일치한다(McKay et al., 1999; Senthilkumar et al., 2006). Table 12는 pseudo 이차 속도론으로 계산한 평형 시간에서의 흡착량과 속도 상수를 나타낸 것이다. 상관계수는 항상 0.99보다 높은 값을 나타내었으며 이 경우에 가장 낮은 상관계수도 일차 속도론에서 얻어진 상관계수 보다 높게 나타났다. 이 결과로부터 얻은 이론적인 평형 흡착량은 실제 평형 uptake 값과 상당히 잘 일치하였다. PA와 콜라겐 흡착 속도를 예측하기 위한 이론으로 곡선 형태의 pseudo 이차 속도론(상기 수식2)을 적용하였다. Figure 56은 pseudo 이차 속도 곡선과 실제 plot 데이터 간의 fit를 나타낸 것이다. 본 연구 결과에서는 평형 흡착량에 대한 예측치가 실험치와 양호한 관계를 보이는 것을 알 수 있었으며 고농도의 PA를 사용하였을 때 약간의 평가 상향되는 경향이 있는 것으로 나타났다. 그러나 직선 형태의 이차 속도 모델을 적용한 경우와 마찬가지로 곡선 모델의 경우에도 0.99이상의 높은 상관관계를 나타내어 단층 표면 흡착에 근거를 둔 Lagergren 일차 속도론 보다는 화학 흡착과 같은 속도 조절 단계를 갖는 pseudo 이차 속도론을 적용하는 것이 바람직하다고 판단되었다.

라) 흡착 등온선

Langmuir(1918) 흡착 등온선은 피흡착체의 농도 범위에 대한 흡착 데이터를 설명하기 위해 사용되어왔다. 이 흡착 등온선은 bulk fluid phase에 있어 피흡착체의 평형 농도(C_e , mg/l)와 흡착 밀도 q_e (흡착체의 단위 중량 당 피흡착체의 uptake, mg/g)간의 관계를 나타내며 아래와 같은 방정식으로 표현된다. Q_0 는 흡착 용량과 관련된 Langmuir 상수이며 b 는 흡착에너지를 의미한다.

$$C_e/q_e = 1/Q_0 b + C_e/Q_0$$

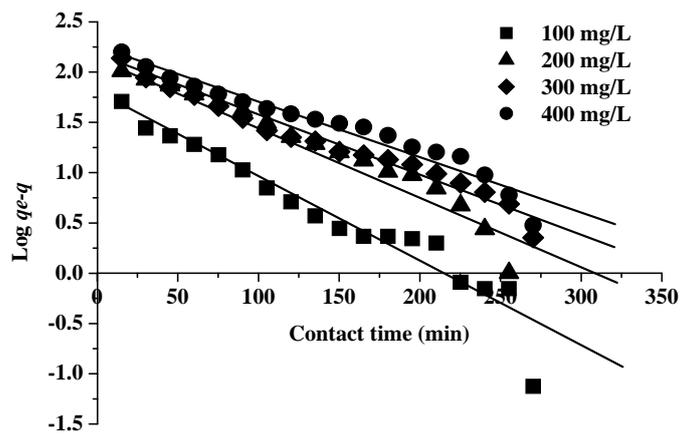


Fig. 58. Lagergren plots for adsorption of PA onto collagen.

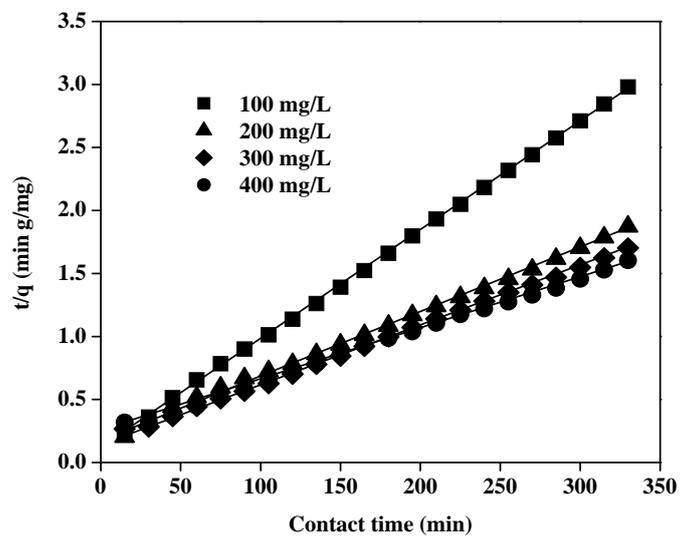


Fig. 59. Pseudo-second order plots for adsorption of PA onto collagen.

Table 12. Kinetic constants for PA adsorption

PA concentration (mg/ℓ)	First order kinetic model			Second order kinetic model	
	q_e (exp) (mg/g)	K_1 (ℓ/min)×10 ⁻²	q_e (cal) (mg/g)	k_2 (g · mg/min)×10 ⁻²	q_e (cal) (mg/g)
100	111	1.3	108	0.10	112
200	176	2.5	173	0.01	198
300	194	2.2	188	0.01	216
400	206	1.7	199	0.01	236

Langmuir 등온선은 용해되어 있는 리간드 복합체와 유사한 표면 사이트를 다룬다. 또한 이 등온선은 흡착 평형 상수와 흡착 사이트의 전체 수 상에 질량 균형을 조합함으로써 유도할 수 있다. Langmuir 등온선은 동일한 사이트의 한정된 수를 포함하는 표면상으로 이루어지는 단층 흡착에 대해 유효하다. 그러므로 이 모델은 표면 흡착이 균일한 에너지를 가지고 이루어지며 흡착 표면에 존재하는 피흡착제의 이동(transmigration)이 없다는 가정을 전제로 한다.

Figures 60에 나타낸 바와 같이 C_e/q_e 과 C_e 간의 직선 상관성과 곡선 관계에서 양호한 fit가 성립된 것을 확인할 수 있었으며 이것은 PA와 콜라겐 간의 흡착이 Langmuir 등온선 모델을 따른다는 것을 잘 보여주었다. Langmuir 상수, Q_0 와 b 는 직선의 기울기와 절편으로부터 결정할 수 있었으며 이때 Q_0 값은 217 mg/g, b 는 0.79 ℓ/mg이었다. 이 결과로부터 PA가 bovine Achilles tendon collagen과 강한 결합력을 갖는다는 것을 알 수 있었다.

Langmuir 등온선의 본질적인 특징은 아래와 같이 평형 파라미터, R_L 로 표현할 수 있다. 여기에서 C_0 는 초기 PA농도(mg/ℓ)이며 b 는 Langmuir 상수(ℓ/mg)이다. 또한 R_L 은 Langmuir 등온선의 형태를 나타낸다.

$$R_L = 1/1 + bC_0$$

R_L	등온선의 형태
$R_L > 1$	Unfavourable
$R_L = 1$	Linear
$0 < R_L < 1$	Favourable
$R_L = 0$	Irreversible

다른 PA농도에서 콜라겐의 R_L 값은 0과 1사이로 favourable 흡착이 이루어 질 것이라는 것을 추정할 수 있었다.

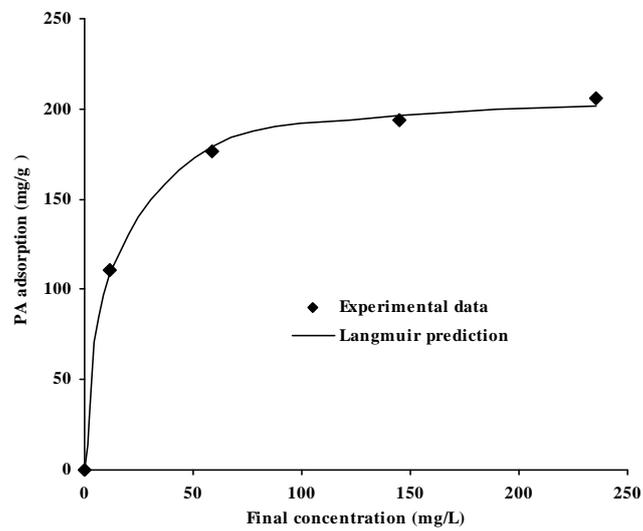
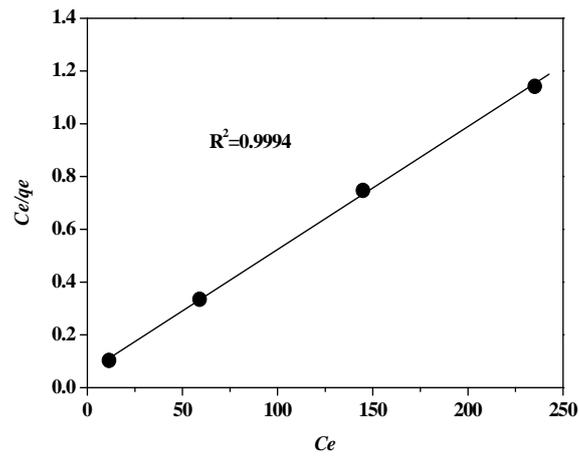


Fig. 60. Langmuir plot for adsorption of PA onto collagen.

Table 13. Equilibrium parameter, R_L for PA removal

PA concentration (mg/ℓ)	R_L
100	0.1129
200	0.0598
300	0.0407
400	0.0308

마) PVPP 흡착제와의 비교

콜라겐의 PA 흡착능력을 비교하기 위해 콜라겐과 유사한 구조를 하고 있는 합성 PVPP를 사용하였으며 그 결과를 Fig. 62에 나타내었다. 물에 대해 불용성인 PVPP는 PA와 수소결합을 형성할 수 있는 proline 골격으로 이루어진 흡착제이다(Fig. 61). Figure 62에서 알 수 있는 바와 같이 콜라겐은 5-100 mg/50 ml의 흡착제 범위에서 약 20%만큼 PVPP보다 높은 흡착량을 보여주었다. 콜라겐과 같이 proline이 높은 비율을 차지하는 단백질 혹은 펩타이드(peptide)와 PA간의 강한 친화력은 proline의 존재량에 기인한다. PA의 방향족 골격과 콜라겐의 proline 잔기의 pyrrolidone간의 소수성 π - π stacking은 이들 사이의 회합에 관여하는 주요 모드이다(Lu & Bennick, 1998). 또한, 이 proline 구조는 proline 잔기의 이차아민에 인접한 탄소에 존재하는 카르보닐기의 산소원자와 강한 수소결합을 형성할 수 있기 때문에 중요한 역할을 한다(Bennick, 200).

콜라겐과 비교하여 상대적으로 PVPP의 낮은 PA 흡착력을 나타낸 것은 입체적으로 결합할 수 있는 부위의 적합성이 부족했다는 점을 언급할 수 있었다. 즉, 삼중 나선(triple helix) 구조를 갖는 콜라겐이 상대적으로 그 구조면에 있어서 proline의 가교 결합 구조를 한 PVPP가 PA와 비가역적인 복합체(complex)를 형성할 수 있는 능력이 있음에도 불구하고(Silanikove et al., 2001) 이 보다 더 높은 결합 사이트를 가지고 있다고 볼 수 있었다. PVPP와 콜라겐 간의 PA 흡착량의 차이가 약 20%로 일정하게 나타난 것을 확인 할 수 있었으며 이러한 결과는 이들 두 흡착제간의 흡착 기작이 유사하기 때문인 것으로 추정할 수 있었다.

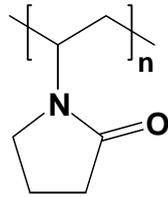


Fig. 61. Chemical structure of PVPP.

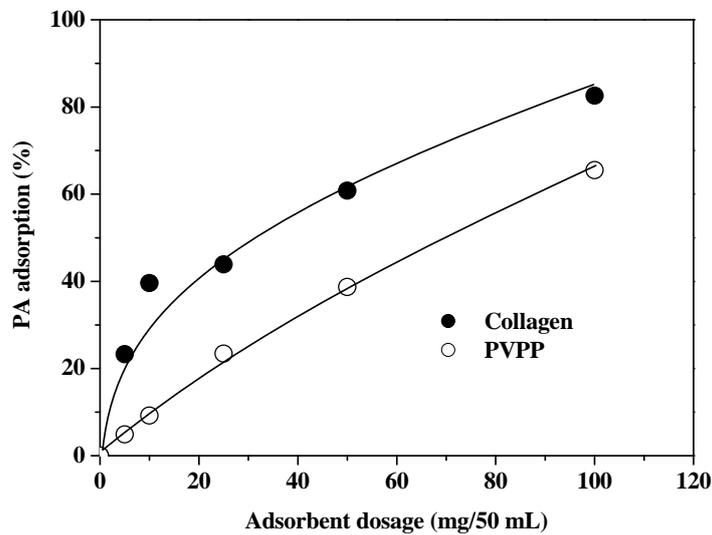


Fig. 62. Comparison of adsorptivity between collagen and PVPP according to increasing adsorbent dosage: PA concentration 100 mg/ℓ pH 7.0; Temperature 37°C.

바) 흡착온도

흡착온도에 따른 콜라겐의 PA 흡착량을 Fig. 63에 나타내었다. 콜라겐의 PA 흡착은 37-50°C에서 최적의 흡착량을 나타내었다. 25°C에서 PA의 콜라겐 흡착이 낮게 나타난 것은 분자운동을 위해 요구되는 에너지가 열역학적으로 낮았기 때문인 것으로 판단되었다. 50°C이상의 온도에서 흡착량이 감소하는 경향을 나타내었으며 이러한 결과는 콜라겐의 거대 분자구조가 삼중 나선형에서 random coil

구조로 변형(deformation)되어 일어난 것으로 판단되었다(Nishiyama et al., 2003). 콜라겐의 구조적인 변형은 콜라겐의 열적 안정성과 깊은 관련이 있는 hydroxyproline 잔기에 기인하는 수소결합이 해체됨으로 인해 나타날 수 있다. 이것은 prolyhydroxylase에 의해 중재되어 proline의 hydroxylation과정으로부터 형성되는 hydroxyproline이 본래 열적으로 안정한 콜라겐 구조에 있어 본질적으로 중요한 역할을 하기 때문이다.

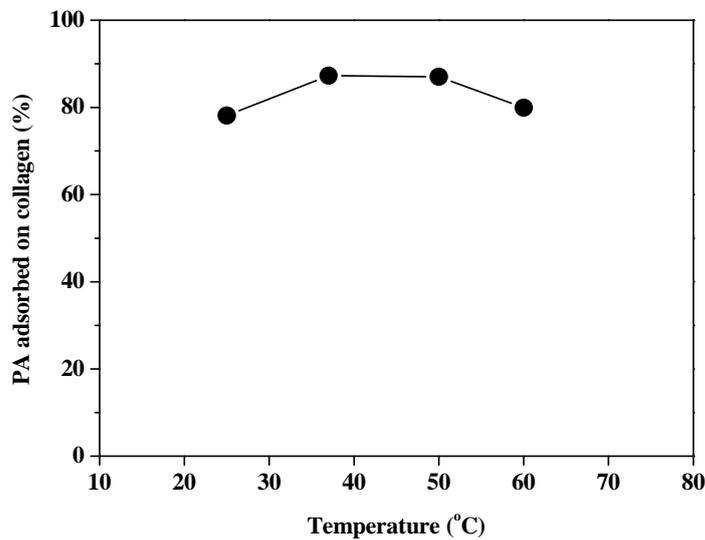


Fig. 63. Effect of temperature for adsorption of PA onto collagen: PA concentration 100 mg/ℓ, adsorbent dosage 40 mg/50 ml, pH 7.0.

사) 콜라겐에 흡착된 PA의 용해도

콜라겐에 흡착된 PA의 흡착 강도를 간접적으로 측정하기 위해 PA에 대해 좋은 선택성이 있는 것으로 잘 알려져 있는 용매 및 산, 알칼리 용액을 선정하여 그 용해도를 검토하였다(Table 14). Table 14에서 알 수 있는 바와 같이 2N NaOH에서 완전한 콜라겐 해리현상이 관찰되었으나 콜라겐에 흡착된 PA는 대부분의 용매에 대해 강한 저항성을 나타내었다. 제 1 절의 라디아타 소나무 수피 HWE에 대한 특성화 결과로부터 PA가 대부분 catechin을 기본 단위체로 있다는

사실을 알 수 있었으며 Cren-Olivé et al. (2002)의 연구에서 catechin의 수산기는 9.02-9.58 범위의 pKa 값을 갖고 있다고 보고하였기 때문에 이 내용에 근거하여 PA가 알칼리 처리에 의해 용이하게 탈수소화(deprotonation)될 것이라는 것을 알 수 있었다. 또한, 페놀성 수산기는 알칼리 처리에 의해 극단적으로 친수성을 띠는 phenolate를 형성할 수 있다. 그러므로 2N NaOH 용액 중에서 phenolate 형태로 존재하는 PA는 콜라겐으로 흡착되기 보다는 오히려 쉽게 용해된다. 함수용매와 5% NaHCO₃에 대한 PA의 용해도는 약 30%로 유사하였다. 절대 알코올, 물, 2N H₂SO₄의 경우 PA의 용해도는 약 7%이하로 상당히 낮았다. 이처럼 강한 용매 저항성은 방향족 고리간의 상호작용과 수소 결합에 기인하는 PA와 콜라겐 사이의 강한 친화력을 암시하였으나 상기의 Langmuir 등온선 결과에서 언급한 바와 같이 비록 강한 PA-콜라겐이 형성되었을 지라도 이들 사이의 complex는 가역적인 흡착력을 가진다는 것을 미루어 짐작할 수 있었다. 또한 궁극적으로 이러한 결과는 수피 추출물로 제조한 기능성 화장품을 피부에 적용했을 경우 콜라겐과 가역적인 흡착이 일어나며 콜라겐나제와 유해 산소에 대해 PA가 콜라겐을 보호하는 작용을 장기간 할 수 있을 것으로 생각되었다.

Table 14. Solubility of PA adsorbed onto collagen in various solvents

Solvent	Solubility (%)
50% (v/v) aqueous ethanol	33.4
Absolute ethanol	3.3
70% (v/v) aqueous acetone	30.7
Water	6.6
2N H ₂ SO ₄	7.1
2N NaOH	100.0 ^a
5% NaHCO ₃	30.1

^a Complete collagen dissociation.

PA-collagen: 10 mg (containing 1.56 mg of PA), solvent: 10 ml, agitation: 3 7°C, 24 h.

아) FT-IR

PA, 콜라겐, PA-콜라겐의 FT-IR 스펙트럼을 Fig. 64에 나타내었다. PA의 1612와 1067 cm⁻¹부근의 강한 흡수대는 PA의 특징적인 관능기를 나타내며 1521 cm⁻¹의 흡수대는 방향족 고리의 breathing mode에 기인한다. 콜라겐의 1651과

1543 cm^{-1} 은 아미드 I과 II의 특징적인 흡수대이며 아미드 I 흡수대는 단백질 아미드 C=O stretching 진동으로부터 두드러지게 일어나지만 아미드 II 흡수대는 아미드 N-H 굽힘(bending) 진동(60%)와 C-N stretching 진동(40%)에 기인한다 (Sionkowska et al., 2004). 콜라겐 단백질은 삼중 나선 구조로서 특성화될 수 있다. 즉, 콜라겐의 거대 분자 구조가 삼중 나선 구조를 할 경우 아미드 I과 II의 흡수대는 1640과 1550 cm^{-1} 에서 나타나지만 random coil구조를 할 경우 1655와 1540 cm^{-1} 에서 이 두 흡수대가 나타남으로(Tsuboi et al., 2001) 본 연구에 사용한 bovine Achilles tendon collagen type I은 일반적으로 random coil구조를 하고 있다는 것을 알 수 있었다. PA-콜라겐의 경우 1543과 1456 cm^{-1} 부근의 흡수대는 콜라겐과 유사하지만 아미드 I에 기인하는 흡수대의 경우 1651 cm^{-1} 에서 1641 cm^{-1} 로 이동하였다. 이러한 현상은 이들 특정 흡수대가 고진동 영역으로 이동한 것으로 볼 수 있으므로 PA와 콜라겐 간의 수소결합에 의한 상호작용에 기인한 것으로 생각되었다.

FT-IR 분광법은 분자 내의 원자 그룹 혹은 원자의 진동 혹은 회전 에너지의 증가를 야기하는 흡수 에너지(absorption energy)를 측정할 수 있기 때문에 본 연구에서는 생물학적인 거대분자들의 분자 구조(콜라겐)와 conformation에 대한 정보를 얻는데 사용 되었다(Takata et al., 2004). 또한, FT-IR 분광법은 혼합물의 상대량에 관한 정보를 제공한다. 콜라겐 polypeptide에 기인하는 특정 흡수대의 기울기 변화를 살펴보면 피흡착제 즉, PA가 존재한다는 것을 쉽게 이해할 수 있다(Fig. 64). 구체적으로 PA-콜라겐 complex의 FT-IR 결과에 나타난 기울기로부터 1641 cm^{-1} 에서의 강도가 증가한 것을 보면 PA와 콜라겐 사이에 흡착이 일어났다는 것을 알 수 있다.

1745 cm^{-1} 에서 나타난 흡수대는 콜라겐을 채취한 힘줄 조직 중에 존재하는 지방산의 카르보닐기에 기인하는 것으로 생각되었다(Tsuboi et al., 2001).

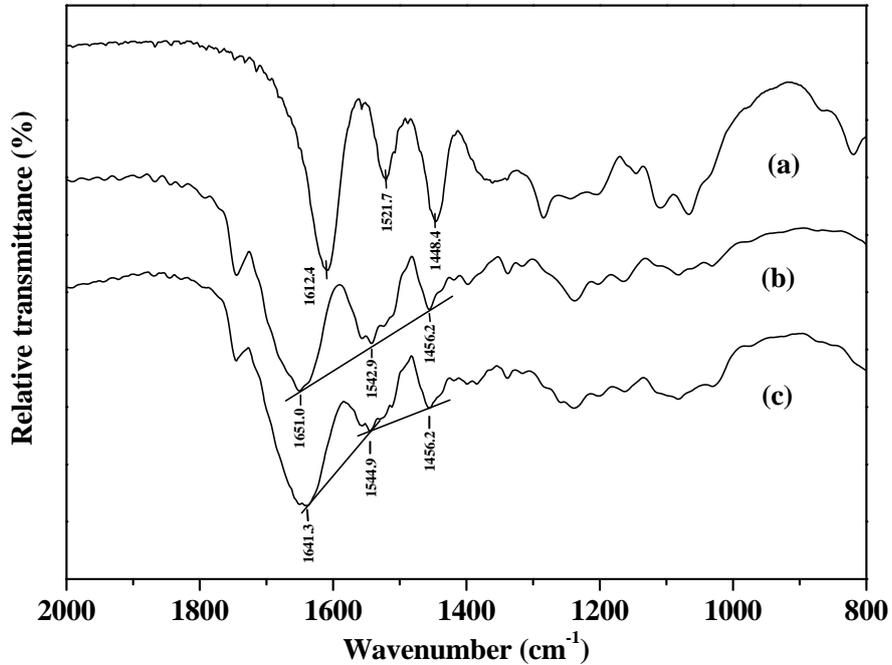


Fig. 64. FT-IR spectra of (a) PA, (b) collagen and (c) PA-collagen (PA concentration, 200 mg/ℓ)

3) 콜라겐에 흡착된 PA의 항산화 효과

ROS는 단백질 콜라겐 손상에 원인이 되는 인자 중의 하나로 판단되어 PA가 피부 속으로 침투한 후 콜라겐에 흡착되면 ROS에 대한 소거능을 발휘해 콜라겐을 보호할 수 있겠는가에 관한 검토를 하였다. DPPH는 생물계의 산화에 직접적인 영향을 미치는 superoxide(O_2^-)와 hydroxyl 라디칼($HO \cdot$)에 대한 활성 비교를 위해 사용할 수 있는 안정한 라디칼이며 또한 자유라디칼 소거제나 환원제로써 역할을 할 수 있는 화합물의 활성을 검토하기 위해 사용될 수 있다. DPPH 라디칼의 구조에 존재하는 홀전자(odd electron)가 자유라디칼 소거능을 갖는 항산화제로부터 수소를 pair하게 되어 DPPH-H 형태를 취하게 되면 자주색에서 노란색으로 색깔이 변화한다. DPPH 자유 라디칼 자체의 자주색은 518 nm에서 흡수 최대를 나타냄으로 이러한 색깔 변화로부터 다양한 천연물의 항산화 활성을

정확하고 빠르게 평가할 수 있다. 한편, ABTS는 과산화수소 존재 하에서 HRP 효소에 의해 ABTS 라디칼 양이온을 형성하게 되며 특정 파장인 734 nm에서의 색깔 감소로부터 항산화 활성을 평가하는 데 사용된다.

Figure 65는 PA-콜라겐 complex가 DPPH 자유 라디칼과 ABTS 라디칼 양이온에 대해 갖는 소거 활성을 나타낸 것이다. 콜라겐에 흡착한 PA의 양을 계산하여 PA-콜라겐을 DPPH와 ABTS 라디칼 양이온 용액에 첨가하였으며 흡착 PA의 농도가 증가할수록 이들 라디칼에 대한 소거능이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 65). PA와 콜라겐 complex간에 많은 관능기(방향족 고리와 수산기)의 상호 작용에도 불구하고 이 PA-콜라겐 complex의 항산화 활성 결과로부터 PA의 B ring 즉, catechol이 입체적으로 표면에 노출되어있다는 것을 간접적으로 추정할 수 있었다. 이 catechol 구조는 라디칼 소거능을 강화시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되어 왔다(Rice-Evans, 1996).

피부 상피(epidermal) 내에 존재하는 UVA를 흡수할 수 있는 발색단(*trans*-urocanic acid)은 광자 방사(photon radiation)에 의해 에너지 준위가 여기되어 산소와 반응함으로 인해 superoxide anion과 singlet oxygen을 포함하는 ROS를 발생시킨다(Scharffetter-Kochanek, 2000). ROS는 간극콜라겐(interstitial collagen)을 직접적으로 파괴하고 ECM(extracellular matrix)을 분해하는 metalloprotease의 합성과 활성화와 연관되는 콜라겐 대사에 있어 중요한 역할을 한다. 그러므로 콜라겐에 흡착된 PA의 항산화 활성은 ROS의 소거를 경유하는 콜라겐의 효율적인 안정화에 기여할 수 있을 것으로 판단되며 결과적으로 효소에 의한 콜라겐 분해를 목적으로 하는 유전자 발현 경로(gene expression pathway)를 차단할 것으로 예상되었다.

4) 콜라겐 안정화 효과

피부에서 발생하는 ROS는 콜라겐나제의 발현의 원인이 되며 이로 인해 콜라겐의 분해가 진행되게 된다. 콜라겐의 분해는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 상처 치유에 있어서 중요한 역할을 담당하며, 손상된 상피에서 콜라겐의 합성을 촉진시켜 상처를 신속하게 흉터 없이 회복시킬 수 있다. 그러므로 콜라겐의 안정화는 피부의 주름 형성뿐만 아니라 자외선에 의해 일어나고 있는 피부 염증 반응 등에 대한 예방 혹은 치유 효과를 도모하게 된다.

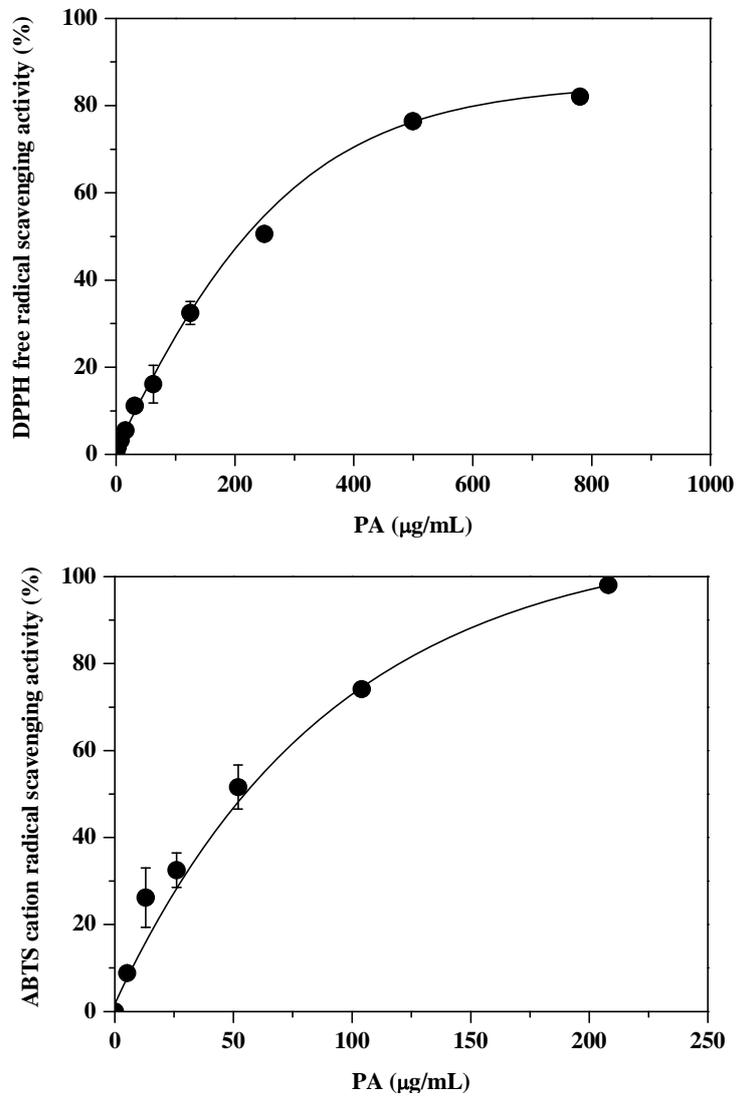
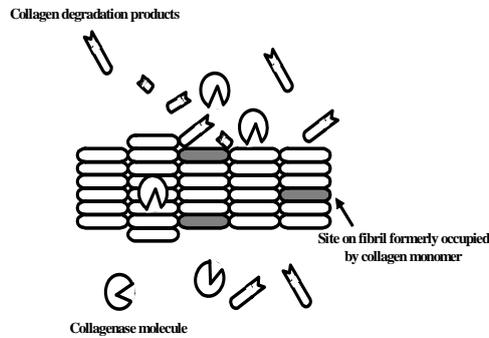
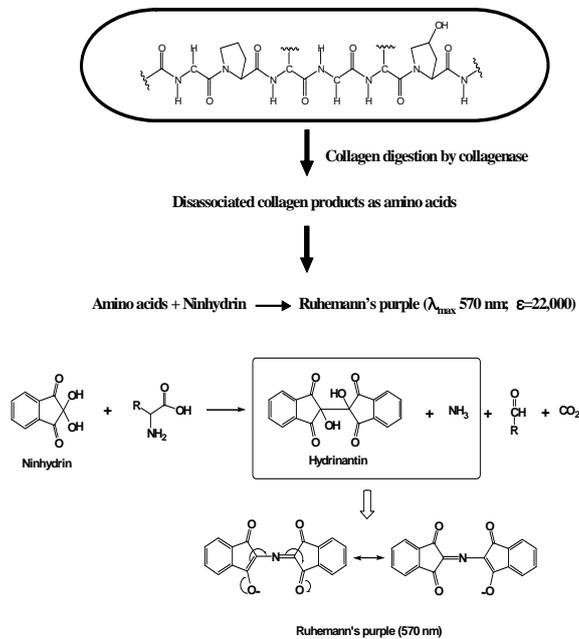


Fig. 65. Antioxidant activity of PA adsorbed on collagen.

콜라겐난제에 의한 콜라겐의 분해 기작과 그 분해정도를 측정하는 방법에 대한 내용을 Fig. 66에 나타내었다. 즉, 콜라겐으로부터 분해된 아미노산과 ninhydrin을 반응시켜 Ruhemann's purple을 형성하게 하여 수피 추출물을 첨가하지 않은 경우와 비교함으로써 콜라겐에 대한 안정화 효과를 검토하였다.



1. Schematic illustration of proposed mechanism of action of collagenase on collagen fibrils.



2. Mechanism of reaction of amino acids with ninhydrin to form Ruhemann's purple.

Fig. 66. Collagen digestion by collagenase and colorimetric determination of the degraded amino acid.

콜라겐 기질농도 15 mg에서 각 시료의 콜라겐나제에 대한 콜라겐 안정화 효과를 측정 한 결과 Fig. 67에 나타낸 바와 같이 모든 수피 추출물은 60-80% 정도의 양호한 정도로 콜라겐을 보호하는 것을 알 수 있었다. MPP의 경우 저분자

분획물로 PA를 다량 함유하고 있는 추출물과 비교하여 낮은 콜라겐 안정화 효과를 보여주었다. 또한 분자량에 따른 콜라겐 안정화 효과를 MPP, OPA, PPA 분획으로부터 평가할 수 있었다. 이들 분획의 콜라겐 흡착 현상을 안정화 실험 동안에 육안으로 관찰할 수 있었으며 이러한 흡착 현상은 폴리 페놀 화합물과 콜라겐 간의 수소 결합과 소수성 상호작용에 기인한다고 판단되었다. 특히 PA는 콜라겐과 같이 proline 구조를 많이 포함하고 있는 단백질을 용이하게 침전시킬 수 있는 것으로 잘 알려져 있으며 이러한 단백질과 PPA의 상호 작용은 종종 음식물과 음료를 섭취할 때 떼은맛을 일으킨다. 콜라겐과 PPA간의 상호 작용은 콜라겐을 안정시킬 수 있는 주요 메커니즘과 연관이 있을 것으로 판단되었다. HWE, MPP, OPA 및 PPA는 시료 농도 192 $\mu\text{g/ml}$ 에서 86%, 64%, 76%, 88%의 콜라겐을 안정화시킬 수 있는 것으로 나타났다. 즉, 분자량이 증가할수록 콜라겐에 대한 흡착력이 증가하여 콜라겐나제를 보호하는 기능이 향상된다는 것을 확인할 수 있었다. HWE, WE와 ES는 조추출물로 다양한 폴리페놀을 포함하고 있지만 정제한 PPA와 비교하여 높은 콜라겐 안정화 효과를 발휘한다는 것을 알 수 있었다. 또한 이러한 결과는 단순 시너지 효과에 기인한 다기 보다는 오히려 라디아타 소나무 수피 추출물에 함유되어 있는 유효 성분의 대부분이 PPA 분획물로 구성되어 있기 때문에 나타난 것으로 미뤄 짐작할 수 있었다. 분자량 분포에 따른 콜라겐 안정화 효과의 차이는 결국 라디아타 소나무 수피 추출물 중의 PPA 분획물에 기인하는 중대한 영향에 의한 것이므로 순수 이들 분획에 대한 피부 관련 혹은 인체 조직 관련 biomaterial에 응용할 수 있을 것으로 판단되었다. PPA의 중요한 콜라겐 안정화 역할에 근거하여 이들에 대한 구체적인 연구를 수행하기 위해 PPA의 농도에 따른 콜라겐 안정화와 흡착량을 비롯한 PPA-콜라겐 complex 형성 후 콜라겐나제에 의한 분해반응을 억제할 수 있는지를 검토하고자 하였다. Figure 68은 PPA 농도에 관한 콜라겐 안정화 효과를 나타낸 그래프이다. 이 결과들은 sigmoidal 모드에 의해 높은 상관성을 갖는 곡선을 얻을 수 있었으며 이에 근거하여 콜라겐 안정화 효과는 PPA의 농도에 의존적이며 시료 농도 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 약 90% 이상의 콜라겐(15 mg)을 안정화시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다. 콜라겐 기질을 15 mg으로 하고 PA농도의 증가에 따른 콜라겐나제에 대한 콜라겐 안정화 효과를 Fig. 68에 나타내었다. PA농도 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 약 80%의 콜라겐 안정화 효과를 보여주었다. 또한 Fig. 71에서 알 수 있는 바와 같이 PA 10 mg/ml농도에서 콜라겐을 최대 50 mg 사용하더라도 약 95%이상의 높

은 콜라겐 안정화 효과를 보여주었으나 PA 2.5 mg/ml 농도에서는 콜라겐 양이 증가함에 따라 콜라겐의 분해가 점차적으로 진행된다는 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로 PA 2.5 mg/ml 농도에서 콜라겐을 90% 이상과 50% 안정화시킬 수 있는 콜라겐 양은 각각 18과 44 mg이었다.

Figure 72는 PA 농도에 따른 콜라겐에 흡착된 PA 양의 변화를 나타낸다. 이 결과 plot을 sigmoidal 모드로 fit하였으며 콜라겐에 흡착된 PA의 최대량을 이 fit로부터 이론치로 계산한 결과 217 mg/g(PA/콜라겐)이었다. 콜라겐에 대한 PA의 최대 흡착량은 Langmuir의 흡착 이론에 의해 211 mg/g(PA/콜라겐)으로 결정되었다. 이 결과에 대해서는 상기 PA의 콜라겐과의 흡착 능력을 평가한 chapter로부터 알 수 있다. 그러나 이론치에 준해 콜라겐과 PA를 혼합하여 제조한 콜라겐-PA complex는 실질적으로 187 mg/g(PA/콜라겐)을 포함하고 있었으며 이러한 결과는 PA의 콜라겐에 대한 흡착 선택성은 높지만 콜라겐의 불균일한 표면에 기인하여 흡착량이 다소 낮게 나타난 것으로 판단되었다. PA-콜라겐(187 mg/g)은 PA가 complex 형성한 후 콜라겐을 보호할 수 있는지를 평가할 수 있는 콜라겐나제에 대한 콜라겐 안정화 효과를 조사하기 위해 사용되었다. 또한 이 complex의 분해에 대한 저항력 즉, 콜라겐 안정화는 42과 70 mg/g(PA/콜라겐)에서 각각 50과 90%였으며 이러한 결과로부터 비록 흡착된 PA의 농도가 콜라겐 섬유에 대한 PA의 흡착력(217 mg/g)보다 3-fold 낮았을 지라도 콜라겐에 대한 높은 안정성을 나타냈다는 것을 알 수 있었다. 콜라겐에 흡착한 PPA의 콜라겐나제에 대한 콜라겐 안정화 효과를 검토하여 Fig. 73에 나타내었다. PA/콜라겐 농도 78 mg/g 이상에서 콜라겐나제에 대한 콜라겐 분해 저해 효과는 90% 이상으로 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 이들 결과는 PA가 흡착 메커니즘을 경유하여 PA는 피부 진피 세포로부터 유도된 matrix metalloproteinase(콜라겐나제)에 의한 콜라겐 분해로부터 야기되는 질병의 예방에 기여할 수 있다는 것을 확신시켰다. 사실상 콜라겐은 전신 단백질의 20-25%를 구성하고 있으며(Kjaer et al., 2005) 힘줄(tendon), 피부(skin), 혈관(blood vessel), 뼈(bone) 등과 같은 대부분의 결합조직은 주요 요소로 콜라겐 type I(~95%)을 비롯하여 type III(~5%)으로 이루어져 있다(Olsen et al., 2003). 이처럼 콜라겐은 신체 내에서 배제할 수 없는 중요한 요소이며 다양한 질병과도 연관성을 보인다. 즉, 콜라겐에 의한 질병은 류머티즘 열(rheumatic fever), 류머티즘성 관절염(rheumatoid arthritis), 전신 홍반성 루프스(systemic lupus erythematosus), polyarteritis nodosa, dermato-

myositis(polymyositis)과 전신 피부 경화증(systemic scleroderma)이 있으며 이들 질병은 mesenchymal 조직에서 일어나는 콜라겐 섬유의 광범위한 섬유소 모양의 변질(widespread fibrinoid degeneration)에 근거를 둔다. 최근에 콜라겐 질병은 40 여개의 질병을 포함하는 전신 자기면역 장애(systemic autoimmune disorder)의 복잡한 배열(complex array)로서 받아들여지고 있다. PA는 이들 콜라겐 질병과 연관되는 치유에 사용될 수 있을 것으로 판단되며 이와 같은 연구를 추진하게 된다면 목재 응용 분야에서의 고부가가치 창출이 가능하리라 사료되었다.

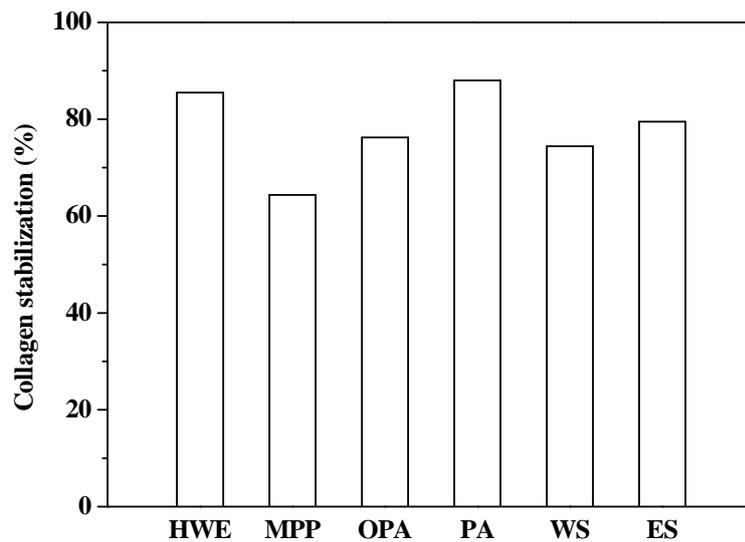


Fig. 67. Collagen stabilization of *Pinus radiata* bark extracts with different Mw distribution (collagen 15 mg, sample 192 $\mu\text{g}/\text{ml}$). HWE, hot water extract; MPP, monomeric polyphenol; OPA, oligomeric proanthocyanidin; PPA, polymeric proanthocyanidin.

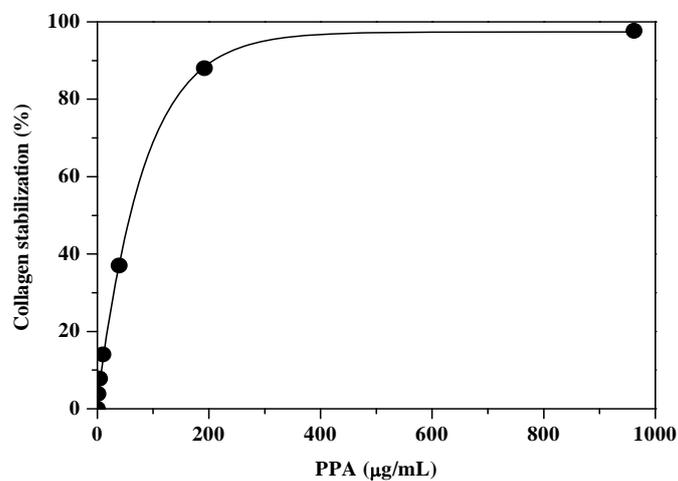


Fig. 68. Collagen stabilization of PPA in HWE from *Pinus radiata* bark as a function of dose (collagen 15 mg). HWE, hot water extract; PPA, polymeric proanthocyanidin. Values were calibrated according to sigmoidal mode ($R^2 = 0.999$).

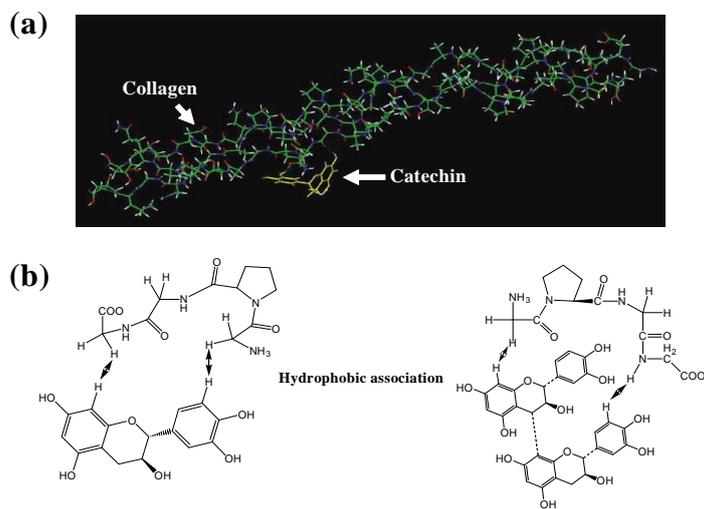


Fig. 69. Intermolecular interaction between polyphenols and proline-rich proteins.

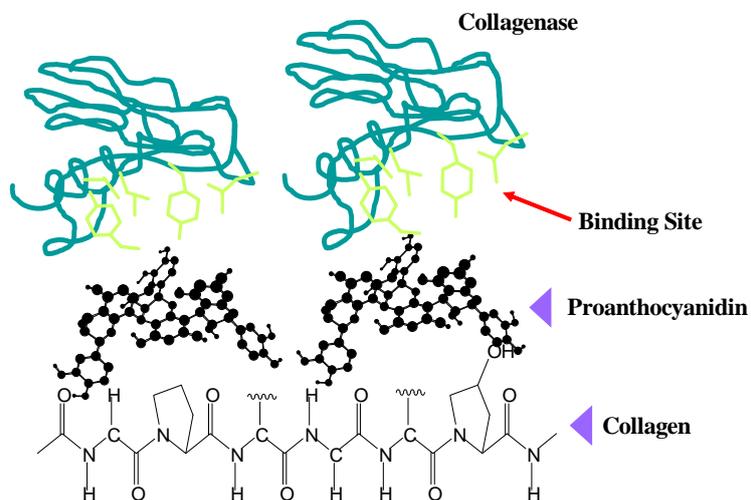


Fig. 70. Collagen-stabilizing mechanism of PA via formation of PA-collagen complex.

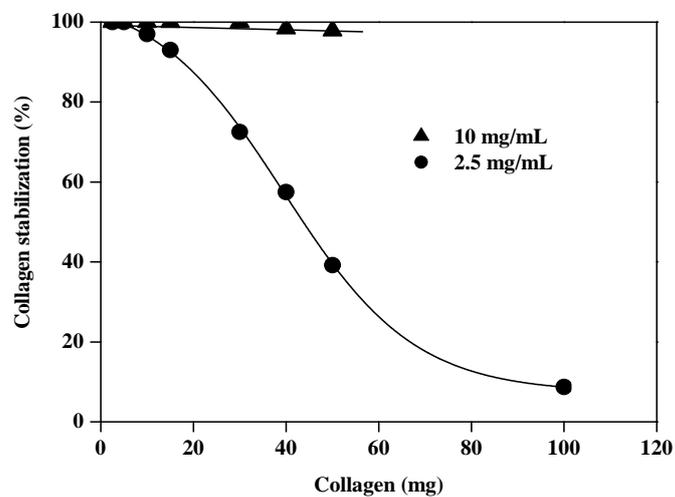


Fig. 71. Collagen stabilization of PA against collagenase according to increasing amount of collagen.

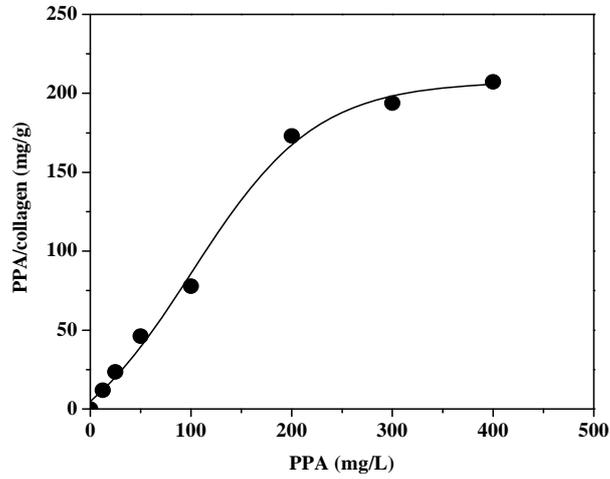


Fig. 72. Absorption capacity of PPA onto collagen (collagen 15 mg). PPA, polymeric proanthocyanidin. Values were calibrated according to sigmoidal mode ($R^2 = 0.996$).

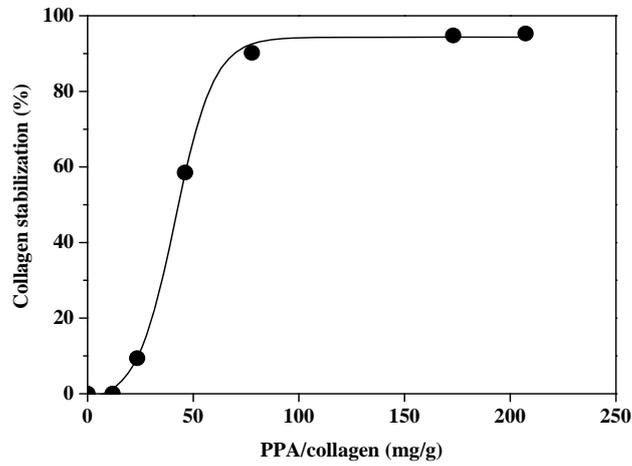


Fig. 73. Collagen stabilization of PPA-collagen complex as a function of dose. PPA, polymeric proanthocyanidin. Values were calibrated according to sigmoidal mode ($R^2 = 0.999$).

5) 엘라스틴 안정화 효과

현재 기능성 화장품의 특성으로 크게 대두되는 것 중의 하나는 피부의 탄력이다. 피부 탄력에 영향을 미치는 콜라겐과 엘라스틴은 주요 피부 구성 단백질이며, 피부 탄력을 유지하는 역할을 하는 물질이다. 이중 엘라스틴은 피부 속 콜라겐을 연결시켜 주는 기능을 수행함으로써 피부 탄력 유지에 중요한 역할을 한다. 한편, 자연적으로 발생하는 자외선에 의한 노화나 스트레스 등은 피부 내 엘라스타제 분비를 촉진시켜 피부 조직을 파괴하며 결국 피부의 탄력 상실 및 주름 발생의 원인이 된다. 이러한 문제를 경향해서 현재 시판되고 있는 민감성 피부나 화학적 자극에 대해 기능성이 매우 높은 제품을 개발하는데 있어 엘라스타제 저해 활성을 고려하는 추세이다. 그러므로 수피 추출물이 어떠한 기작으로 엘라스타제로부터 엘라스틴의 분해를 저해할 수 있겠는지를 검토하고자하였다.

상술한 바와 같이 수피 추출물이 피부 단백질을 보호하는 기능을 발휘하는데 있어 흡착능력은 중요한 영향인자이다. 그러므로 엘라스틴 안정 효과를 보다 용이하게 측정하기 위해 엘라스틴-오르세인을 사용하였다. 즉, 엘라스타제에 의해 엘라스틴이 분해되면 오르세인 염색제가 용출됨으로 오르세인의 특정 파장인 570 nm에서 흡광도를 측정하여 엘라스틴 안정화 효과를 검토할 수 있다. 또한 남아 있는 엘라스틴-오르세인의 무게를 측정함으로써 상호 보완적으로 엘라스틴 안정화 효과를 평가할 수 있었다(Fig. 74). Figure 74에 나타난 바와 같이 PA가 가장 높은 엘라스틴 안정화 효과를 나타내었으며 HWE와 ES도 양호하였다. 수피 추출물이 엘라스타제 효소에 대해 엘라스틴을 안정화시키는데 있어 중요한 인자는 추출물의 분자량이라고 하는 것을 확인할 수 있었다. 저분자 분획물인 MPP의 경우 엘라스틴 안정화 효과가 거의 미비한 것으로 나타났다. 다양한 수피 추출물 중 엘라스틴 안정화 효과가 뛰어난 PA에 대해 농도에 따른 변화를 검토하고자 용출된 오르세인 농도와 잔존하는 엘라스틴-오르세인의 중량을 측정하였다. Sigmoidal fit에 의한 이론치로부터 PA농도 524 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 엘라스틴 안정화 효과는 약 81%의 평형 상태에 도달했다는 것을 알 수 있었다. Figure 75는 엘라스틴의 안정화가 PA와 엘라스틴 간의 흡착에 직접 관련이 있다는 것을 보여준다. 즉, 약 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 PA와 엘라스틴간의 흡착이 두드러지며 이 농도 보다 낮은 영역에서는 급격하게 엘라스틴이 분해 되는 것을 오르세인의 용출 정도와 잔존하는 엘라스틴 침전물의 양으로부터 용이하게 육안 판단할 수 있었다.

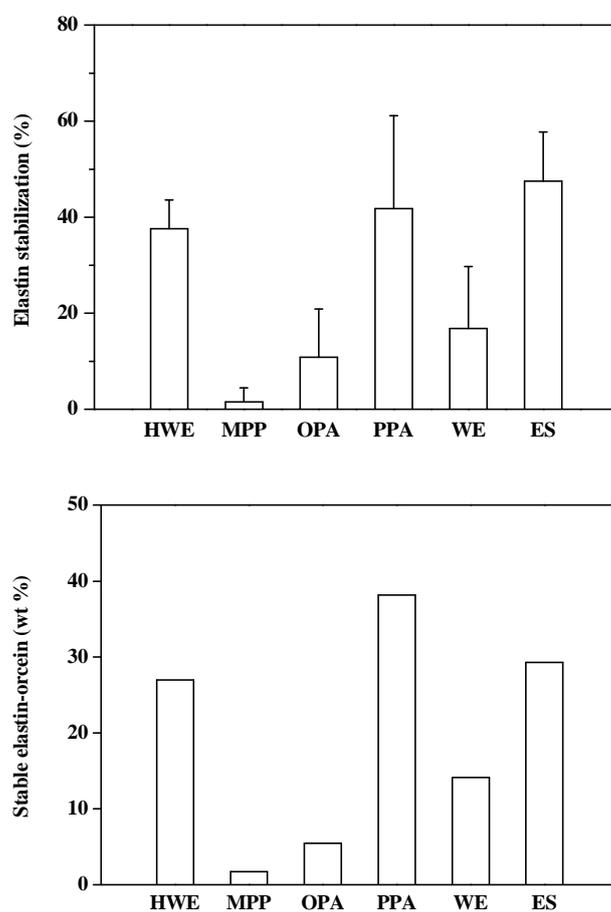


Fig. 74. Effect on elastin-orcein stabilization of various extracts from *Pinus radiata* bark against elastase (elastin orcein 2 mg, sample 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Each value is expressed as mean \pm standard deviation ($n=3$).

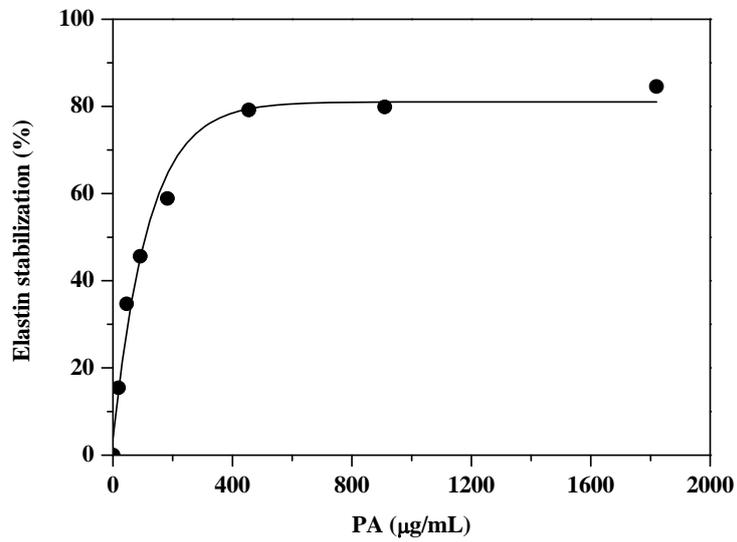


Fig. 75. Stabilization of elastin by PA against elastase.

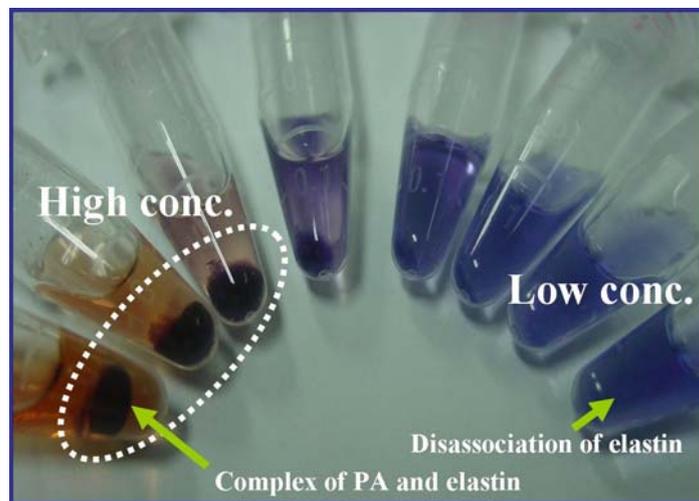


Fig. 76. Photograph of stability and disassociation of elastin-orcein against elastase relative to PPA concentration.

바. UV A/B 흡수 잠재효과

피부에 도달하는 태양광 스펙트럼은 UV B(280-320 nm), UV A(320-400 nm), 가시광선 및 적외선으로 이루어진 복사선이다. UV B의 작용은 주로 표피에 제한되어 있지만 UV A보다 더 깊이 침투하여 단구 및 다형핵 세포의 침윤을 야기할 뿐만 아니라 진피의 미세혈관에서 내피 세포 손상도 일으킨다. 자외선 파장과 세기는 활성산소 발생과 긴밀한 관계가 있다. 그러므로 다양한 수피 추출물을 이용하여 UV A/B에 대한 광보호 효과를 검토하고자 하였으며 이때 자외선 차단 효과는 $E\%cm$ 로 계산하였다.

Figure 77은 수피 추출물 중 MPP, WS, ES의 자외선 차단 효과를 시료 농도에 따른 흡광도 관계로 나타낸 것이다. 전반적으로 MPP를 제외한 수피 추출물의 경우 40-60%로 UV A에 대한 자외선 차단력이 유사하였다. 반면 MPP는 UV A에 대해 다른 추출물과 비교하여 약 6배 높은 차단 효과를 보여주었다. 비교를 위해 사용한 시판 UV A/B 차단제의 경우 MPP보다 UV A와 UV B에서 약 4배 높은 자외선 차단 효과를 나타내었다.

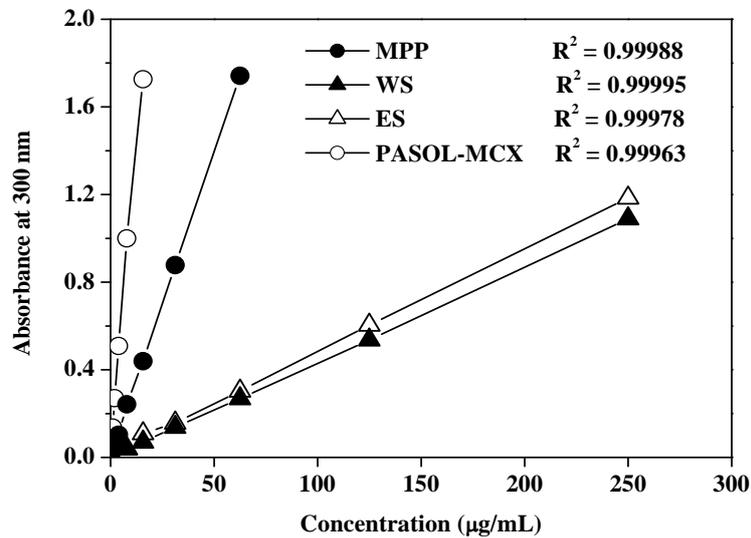


Fig. 77. Concentration-dependent UV B absorption properties of MPP, WS, ES and PASOL-MCX.

Table 15. UV A/B absorption properties of various extracts from *Pinus radiata* bark

Sample	E [%] cm	
	300 nm	360 nm
HWE	58.9	12.5
MPP	279.6	35.3
OPA	49.1	13.4
PA	44.4	11.7
WS	43.5	9.9
ES	47.7	11.3
PASOL-MCX (UV B)	1290.3	-
PASOL-1789 (UV A)	-	1243.4

The coefficient of extinction, E[%]cm, is the theoretical absorbance of a 1% solution over an optic path of 1 cm.

사. 극성 용매 중 수피 추출물의 안정성 평가

90%이상의 PA를 함유한 ES와 비교로서 비타민 C를 사용하여 각각의 산화 안정성을 DPPH 자유 라디칼 소거능으로 평가하여 Fig. 78에 나타내었다. ES의 경우 482 시간이 경과하더라도 90%이상의 높은 항산화 활성을 보인 반면 비타민 C는 72시간 경과 시 항산화 능력의 약 70%를 소실하였으며 194 시간 이후 항산화 능력을 잃어버렸다. 이처럼 ES의 경우 극성 용매 중에서도 장시간 산화 안정성을 지니므로 앞으로 기능성 화장품으로 개발할 경우 제품의 효력을 보장받을 수 있을 것으로 판단되었다.

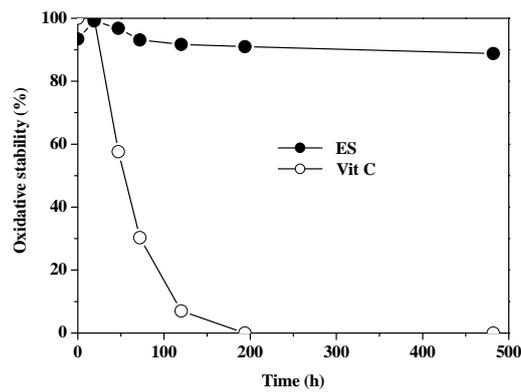


Fig. 78. Oxidative stability of ES and vitamin C according to time.

4. 소괄

라디아타 소나무 수피 추출물을 이용하여 다양한 생리활성을 평가한 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- ① 라디아타 소나무 수피로부터 proanthocyanidin(PA) 함량이 90%이상인 수용성 및 에탄올 가용성 추출물을 제조하였다.
- ② DPPH, ABTS⁺, superoxide 음이온 라디칼, 과산화수소, 지질 산화 억제, 환원력, ferrous 이온과의 킬레이트 형성을 평가하여 소나무 수피 추출물이 강력한 항산화 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다.
- ③ PA를 90%이상 함유한 소나무 수피 추출물은 멜라닌을 합성하는 효소인 tyrosinase를 비경쟁적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.
- ④ 수피 추출물이 melanocyte의 수상돌기(dendrite) 발달을 억제하는 것을 현미경상에서 확인할 수 있었으며 이로부터 수피 추출물은 각질층으로의 melanosome의 전이를 막아주는 미백용 화장품 원료로 활용될 수 있을 것으로 판단하였다.
- ⑤ 수피 추출물이 NIH/3T3 섬유아세포에 대해 1,250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 150-250%의 높은 세포 증식효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.
- ⑥ 수피 추출물의 주성분인 PA는 콜라겐에 대해 217 mg/g의 높은 흡착량을 나타내었으며 그 흡착 거동이 가역적이나 흡착력은 매우 강한 것을 알 수 있었다.
- ⑦ 수피 추출물은 콜라겐에 흡착된 후 콜라겐나제와 유해 라디칼로부터 콜라겐 안정화하는 것을 확인할 수 있었다.
- ⑧ 수피 추출물은 엘라스틴을 엘라스타제로부터 안정화하는 것으로 나타났으며 이때 사용된 수피 추출물의 분자량이 클수록 높은 안정화 효과를 나타내었다.
- ⑨ 수피 추출물 중 저분자 구분인 MPP는 UV B에 대해 280 E[%]cm로 다소 높은 자외선 차단 효과를 나타내었다.
- ⑩ DPPH 자유 라디칼 소거능을 평가한 소나무 수피 추출물의 항산화 활성의 안정성 결과로부터 482 시간 동안 90%이상의 활성을 유지하는 것을 알 수 있었다.

제 3 절 소나무 수피 추출물로부터 기능성 화장품의 개발

1. 서론

3차년도의 경우 다양한 생리활성을 가지는 proanthocyanidin(PA)을 주성분으로 하는 라디아타 소나무 수피 추출물을 기능성 화장품 제조를 위하여 1) 소재로서의 특성 검토, 2) 용해도 특성, 3) 타 화장품 원료와의 혼합에 따른 특성을 검토하고자 하였다. 여기서 얻어진 결과를 토대로 시제 화장품 3종류 즉, 세럼, 스킨 에센스 및 크림을 제조하고 이를 30대 후반에서 60대 이전의 여성을 대상으로 가능성 등을 검토한 후 최적이라고 생각되는 조건을 선발하여 화장품을 대량 제조하였다. 이들 화장품을 20명의 중년 여성을 대상으로 처음 실시기간 포함 8주간의 시험을 거쳐 그 기능성 유무 및 특성 등을 상세히 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시재료의 제조

2차 년도에서 뛰어난 생리 활성을 나타낸 라디아타 소나무 추출물을 대량으로 제조하기 위하여 30 kg(a.d)의 라디아타 소나무 수피 분말을 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 재료는 다음과 같이 2종류를 제조하였다. 즉, 라디아타 소나무 수피 분말을 액비 10의 조건에서 100℃, 1 시간 추출하였다. 추출물은 200 mesh 필터로 여과하고 50℃이하에서 감압농축 하였다. 농축 시 생성되는 침전을 10 μm 봉상 카트리지로 여과 제거하였다. 여과물은 분무 건조하여 분말화 하였다. 분무 건조는 토출부 온도 170℃, 사이클론 온도 90℃, 20,000 rpm의 조건으로 실시하였다. 제조된 시료는 실온에서 오산화인 존재 하에서 24시간 진공건조시켜 수분을 제거한 후 밀봉하여 보관하였다. 그리고 이렇게 제조된 시료를 WS로 약칭하였다. 추출물중의 중성당 함량 등을 낮추고 기능성 성분인 PA의 함량을 높이기 위하여 상기 여과한 열수 추출물의 일부는 다시 농축하고 중성당류 등의 제거를 위하여 무수알코올을 처리하였다. 생성된 침전은 10 μm 봉상 카트리지로 여과하였으며, 50℃에서 감압농축 후 열수 순환식 진공건조기를 이용하여 60℃에서 진공건조 시켰다. 진공 건조 후 시료는 고속 분쇄기를 이용하여 파쇄하고 이를 시료로 사용하였다. 이렇게 제조된 시료를 ES로 명하였다.

WS 및 ES의 PA 함량은 butanol-HCl법으로 측정하였으며, 각각의 함량은 92.7% 및 94.9%였다. 이들 시료를 화장품 제조시의 기본 시료로 사용하여 다양

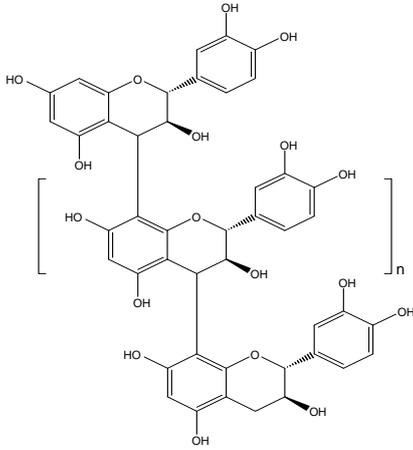


그림 78. 라디아타 소나무 수피 추출물의 주성분인 PA.

함께 검토하였다.

다. 수피 추출물의 적정 농도 및 색상 안정성

소나무 수피 추출물의 화장품 원료로서 액상으로 출하하기 위한 적정 농도를 설정하기 위하여 표 16에 나타낸 것처럼 정제수 및 BG에 대하여 0.1 - 3%로 설정하였다. 본 시료 농도에서 다양한 화장품 제형을 설정하고 또한 소나무 수피 추출물의 효능 효과가 발현 될 수 있는 배합 비에서의 색상을 근거로 적정 농도를 판단하였다.

각 추출물의 색상 안정성은 정제수, BG, 수피 추출물의 비율을 49 : 50 : 1(이후 본 조성을 WS-1로 약칭 함)로 한 후 실내, 실온에서 6개월간 방치하고 육안으로 변색의 정도를 관찰하였다.

라. 수피 추출물과 타 화장품 원료 혼합 실험

소나무 수피 추출물을 타 화장품 원료와의 혼합에 의한 특성 실험을 상용성 및 생리활성을 극대화 하기위한 실험으로 나누어 실시하였다. 이들 실험을 위하여 시료는 상술한 WS-1을 사용하였다

1) 원료의 상용성 실험

원료의 상용성 실험에는 (1) 수계(水界) 시스템 (2) oil/water(O/W) 유화 시스

한 테스트를 실시하였다.

나. 수피 추출물의 용해도

화장품 처방 실험에 앞서 소나무 수피 추출물을 화장품 원료로서 적용하기 위하여 화장품 제조 시 사용되는 다양한 용매에 대한 용해도 특성을 검토하였다. 용매로는 정제수, 에탄올, 글리세린, butylene glycol(BG), propylene glycol(PG) 등을 이용하였다. 이들 용매에 각 시료를 다양한 농도로 녹이고 그 용해특성을 관찰하였다. 또한 정제수에 대한 유기용매의 혼합비에 따른 용해도 특성 등도

템, (3) water/oil(W/O) 유화 시스템 및 (4) 기타 처방으로 나누어 그 상용성을 검토하였다.

상용화에 사용된 용매로는 에탄올, 글리세린, BG, PG, ethylene glycol(EG), PEG-100, 400, 1000, 1500 등으로 하였으며, 계면활성제는 HLB가 약 15이상의 것을 사용하였다. 예를 들면 다음과 같다.

Tween 류: Tween 20, 40, 60, 80 등

Brij 류: Brij 721, 98, 78 등

Myrj 류: 49, 52, 59 등

레시틴류: 수용성 난황 레시틴, 콩 레시틴 등

계면활성제 이외에 첨가제로 히아루론산나트륨, 콜라겐, 베타글루칸 등 폴리사카라이드계 원료나 아미노산, 펩타이드 및 프로테인류 등과의 상용성도 검토하였다. 이들 재료를 이용하여 다양한 온도 조건에서 유화 또는 혼합하여 그 상용화 특성을 검토하였다.

2) 생리활성의 극대화를 위한 실험

생리활성을 극대화하기 위하여 스킨, 옛센스, 젤리 크림, O/W 크림, W/O 크림, W/S 크림 등의 처방을 비교 검토하였다. WS-1의 첨가량은 각 제형에 대하여 5%로 일정하게 첨가하였다. 안정도의 경우 실온방치 1일 후, 45°C에서 1개월 방치 후 침전, 오일분리 등의 현상을 육안으로 관찰하고 이를 1에서 5등급으로 분류하였다. 각 등급의 성적은 1: 나쁨, 2: 약간 나쁨, 3: 보통, 4: 좋은 편, 5: 매우양호 의 형태로 부여하였다. 생리활성도는 인공 피부에 10회 도포한 후 5분 및 2시간 방치 한 다음 물에 용해시켜 DPPH법으로 측정하여 상대 비교하였다. 이 경우에도 상술한 등급을 그대로 적용하였다.

마. 제형연구실험

WS-1과 기존에 잘 알려진 다양한 기능성 원료와의 조합을 통하여 스킨 옛센스, 크림, 세럼의 3종류의 제형을 설정하고 이에 대한 최적 제형 조건을 검토하였다. 그리고 이들 3종류의 제형은 미백, 항노화 및 주름개선 효과가 있도록 천연 및 합성 기능성 원료를 적절히 혼합하여 그 효능효과가 잘 발현될 수 있도록 하였다. 대표적인 기능성 원료로는 나노-코엔자임 Q10(註 1참고) arbutin(註 2

참고), 비타민 E, 베타글루칸류, 한방 복합추출물 등이다. 실험에 대한 상세는 결과 및 고찰 부분에서 상세하게 기술하기로 한다.

마. 시제 화장품의 효과 검증

수피 추출물을 이용한 3종류의 화장품 즉, 스킨 앰펜스, 크림 및 세럼을 대량으로 제조하고 이들에 대한 실제 효과에 대한 검증을 30 - 60대 여성을 대상으로 2007년 3월 5일 - 2007년 4월 28일의 8주간 식품의약품안전청의 기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인(II)을 참고로 하였으며, 필요 따라 본 연구의 목적에 맞게 수정하여 실시하였다. 피험자 선정, 유, 수분 및 색소측정 그리고 피부 탄성 측정과 피부 주름 개선 효과에 대한 상세는 다음 실험부에 상세하게 기술하였다. 피부의 pH는 세정제 사용 전 후 잔존하는 계면활성제 등의 검토를 위한 수단이므로 본 실험에서는 생략하였다.

본 실험에서 상기 3종류의 화장품에 대한 기능성 평가는 비침습적 연구기기의 세계적인 표준으로 사용되고 있는 Multiprobe Adapter System(Cutometer MP A580, Courage+Khazaka사, Germany)을 이용하였다. 피부 측정은 본 장비에 연결된 개별 측정센서 probe로 실시하였으며, 사용된 probe는 다음과 같다. 피부 보습도 측정에는 Corneometer(CM825), 피부표면 유분량을 측정에는 Sebumeter (Sm815), 피부 홍반과 멜라닌 색소의 측정에는 Mexameter (MX18), 피부 탄력도를 측정에는 Cutometer(MPA 580)을 이용하였다(사진 1 참조). 그리고 피부주름 및 피부표면 영상분석에는 동일회사의 Skin-Visiometer(SV600) 및 Visioscan을 이용하였다(사진 2 참조). 각 기기 이용에 대한 상세는 각 실험 항에서 설명하기로 한다.

1) 피험자 선정

육안평가 및 과거력 조사를 통하여 피부에 주름이나 과색소 침착 등의 문제를 안고 있어서 시험에 부합된다고 선정된 30세 이상의 여성 중 연구에 대한 목적과 시험방법, 시험기간을 설명하고 이에 자발적으로 동의한 자를 피험자의 대상으로 선정하였다. 다음에 피험자 선정에 대한 구체적인 선정기준 및 탈락기준에 대하여 분류하고 그 내용을 상세하게 기술하였다.

- 피험자 선정기준

- 만 30 - 60세 사이의 여성으로 추적 관찰이 가능한 자
- 실험의 목적, 내용 등을 이해하고 자의적으로 참여한 자
- 육안 평가상 주름 및 색소 침착 등의 문제성 피부를 가진 자
- 실험 부위에 피부 질환 포함한 급, 만성 신체 질환이 없는 자
- 알레르기성 특이 체질이나 과민성 피부를 가지고 있지 않은 자
- 피부 질환 치료를 위해 스테로이드가 함유된 피부 외형제를 1개월 이상 사용한 경험이 없는 자
- 최근 6개월 이내에 피부박피술이나 주름제거술 등을 받지 아니한 자
- 실험부위에 점, 여드름, 홍반, 모세혈관 확장 등의 피부 이상 소견이 없는 자

- 피험자 탈락기준

- 실험 진행 중 피부질환이 발생한 자
- 제품 사용 후 심각한 이상 반응이 발생한 자
- 실험의 수칙을 여러 차례 어기거나 피험자의 개인 사정에 의해 추적 관찰이 어려운 경우
- 실험 진행과정 중 과도한 자외선 노출을 하거나 지나친 음주, 흡연 등으로 결과의 평가에 문제가 된다고 판단되는 경우에는 대상에서 제외된다.

2) 피험자 피부 측정 전 준비

- 실험은 상기 피험자 기준에 부합한 피험자 20명을 대상으로 8주간 진행하였다. 각각의 피험자는 4그룹으로 나누어 매주 정해진 요일과 시간에 실험실을 방문 하도록 하였다.
- 실험에 앞서 피험자에게 연구의 목적과 실험방법 및 진행사항을 설명하였고 평가 실험에 따른 유의사항을 인쇄물로 나눠주었으며(별지 1) 피험자의 성별, 연령, 연락처 및 과거력 같은 기초정보와 자신의 피부와 생활습관에 대한 설문을 조사하여 각 피험자의 프로필을 작성하였다(개인 신상 보호를 위하여 본 보고서에서는 첨부하지 않음).
- 실험이 진행되는 기간 중에는 각각의 시제 화장품을 일주일 분량으로 지급하였으며, 지급한 제품 이외에 실험결과에 영향을 미칠 수 있는 어떠한 다른 기초제품의 사용이나 기타 맛사지 등의 피부 관리도 금지하였다
- 시작하는 첫 주와 마지막 주인 8주에는 각 피험자의 피부에 대한 육안평가

를 위하여 8 mm 렌즈 장착 비디오 카메라(CAMESCOPE, 알파시스템, 한국) 테스트 부위 및 얼굴 옆면을 촬영하였다.

- 실험 12시간 이전에는 화장을 하지 않는 것을 원칙으로 하였다.
- 화장품 테스트를 위한 실험실은 기능성 화장품 테스트에서 요구하는 온도 및 습도 범위(온도:20 - 24℃, 습도: 40 - 45%)를 유지 하였다.
- 테스트 당일에는 동 실험실에서 온수로 세안하고 상기 온습도 조건에서 30분 머무른 후 피부 테스트를 실시하였다.
- 실험 최종 주에는 설문지(별지 2)를 통하여 제품에 대한 느낌과 사용감 및 개선점 등의 전반적인 내용을 조사하였다.



① Cutometer, 탄성측정용 probe, ② Coneometer, 보습도 측정용 probe, ③ Mexameter, 멜라닌/홍반 측정용 probe, ④ Sebumeter, 유분측정용 카세트.

사진 1. 피부 측정용 장치, probe 및 Sebumeter 카세트.

3) 피부 보습도 측정

피부 보습도 측정에는 Coneometer(CM 825)를 사용하였다. 피험자의 측정부위를 정확하게 확인한 후 probe를 측정하고자 하는 피부표면에 약1초간 직접 눌러 준다. Probe자체 내부에 스프링이 내재되어 있기 때문에 너무 세게 누르지 않도록 주의한다. 이 실험에서는 이 방법으로 3회 반복하여 평균값을 구하였다.

4) 유분측정

Sebumeter는 특수한 반투명 지질흡수 테이프를 피부에 부착한 후 묻어나오는 피지량을 광학적 반사 원리로 측정하는 기기이다. MPA 프로그램을 실행시킨 후

sebumeter 측정 창을 띄운다. 유분측정 카세트(Sebumeter cassette)를 MPA본체 우측에 있는 검은색 홀에 삽입하여 “뵙” 소리가 나도록 1초 정도 가볍게 눌러준다. 프로그램 화면에 30초가 countdown되어지면 카세트를 꺼내어 측정부위에 대고 15초 이상 눌러준 후 다시 MPA본체 검은색 홀에 1초 정도 가볍게 눌러주면 측정값이 화면에 display된다. 본 조작을 1개 부위에 1회 측정하였다.

5) 멜라닌/홍반 지수 측정

실험에 사용된 Mexameter(MX18)는 피부색조 분석에 가장 적합한 멜라닌과 혈색소에 대응하는 서로 다른 3종의 파장대를 갖는 광원(다이오드) 16개가 원형으로 배치된 센서 probe를 특징으로 하는 측정기법을 사용한다.

MPA프로그램을 실행시킨 후 우측 상단에 ‘Mexameter’ 측정 창을 띄운다. 햇빛을 차단하기 위해서 제공된 light protection ring을 probe에 끼운다. probe를 측정하고자 하는 피부표면에 약1초간 직접 눌러주면 측정과 동시에 Melanin & Erythema의 결과 값이 동시에 display된다. 본 조작을 3회 반복하여 그 평균값을 취하였다.

6) 피부 탄성 측정

측정원리는 흡입방법을 토대로 하고 있는데 장비내부에서 음압이 발생되어지고 피부는 probe의 작은 구경 안으로 빨려 들어간다. 음압에 의해 빨려 들어간 피부는 저항력과 원래의 형태로 돌아가려고 하는 성질로 인해 각 측정의 끝 단계에 커브형태로 display 되어진다.

Cutometer MPA580프로그램을 실행시킨 후 기계의 음압이 450 mbar까지 올라가는 것을 확인한다. 측정하려는 피부표면에 수직이 되도록 probe를 살짝 갖다 대고 측정을 시작한다. 본 실험은 4회 반복하여 그 평균값을 사용하였다.

7) 주름측정

Skin Visiometer(SV600, 사진 2))는 특별한 광원이 통과되도록 제작된 표준 카트리지에 푸른색의 실리콘 replica로 얻은 피부주름 형틀을 끼우고 프로그램을 구동시킨 후 화면사의 측정부위를 선택하여 주름의 깊이와 형태를 객관적으로 평가할 수 있도록 되어 있는 장비로 이 실험에서는 이를 이용하여 분석하였다.

항온 항습의 조건하에서 지정된 측정부위에 실리콘 재질을 이용하여 replica(사

진 2 하)를 제작하였다. 본 실험을 위하여 replica 제작 부위 주름의 수축 이완이 일어나지 않도록 피험자를 편안하게 고개를 돌려 눕히고 실리콘 용액이 흐르지 않도록 한다. Replica 제작을 위한 실리콘 용액(기체)와 C(촉매제)를 혼합 용기에 각각 같은 양으로 떨어트린 후 미세기포가 생기지 않도록 감압 조건 하에서 10 - 15초 정도 두 용액을 잘 섞어 혼합한다. 조제된 액상의 실리콘을 replica제작 부위에 1방울 정도 떨어트린 후 측정 하려는 주름이 있는 눈 꼬리에서 수평으로 1.0 cm되는 부위에 고정시킨다. 3분정도 경과 후 탁본을 떼어내어 준비된 프레임에 맞도록 붙인다. 이 과정은 실리콘이 굳는 것을 막기 위하여 20초 정도의 빠른 시간 안에 진행한다.

주름의 평가는 Visiometer의 software를 이용하여 분석하였다.

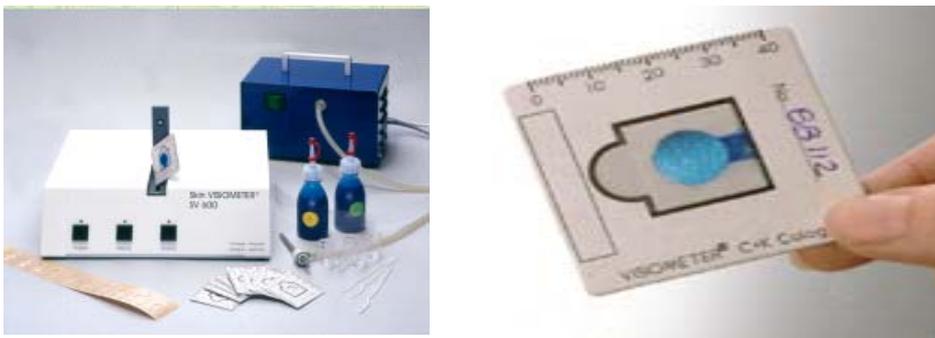


사진 2. Skin Visiometer(좌) 및 제작된 replica(우).

Skin Visiometer (SV600)의 측정원리는 인공 광원에서 방출된 빛이 상기 제작한 푸른색의 실리콘 replica를 투과하면서 생기는 빛의 강도를 반대편에 설치된 비디오 센서 CCD 카메라로 받고, 화면상의 특정부위를 선택하여 주름의 깊이와 형태를 Lambert & Beer's 법칙으로 계산하고 이를 피부주름 정도로 한다(그림 79). Visiometer의 분석결과는 R1 - R5값으로 얻어지는데 본 값은 낮아질수록 피부주름의 깊이가 낮아짐을 의미하며, 단위는 임의의 단위가 된다. Visiometer의 측정값은 다음과 같다.

- R1: 피부 거칠기(Skin roughness, 최고주름의 포인트와 최저주름 포인트와의 거리)
- R2: 최대 거칠기(Maximum roughness주름을 자동적으로 5개로 분할하여 각각 R1을 구한 후 분할된 주름 중에서 가장 높은 R1값)

- R3: 평균 거칠기(Average roughness, 5개로 분할하여 얻은 R1값의 평균)
- R4: 평활 깊이(Smoothness depth)
- R5: 산술적 평균 거칠기(Arithmetic average roughness)

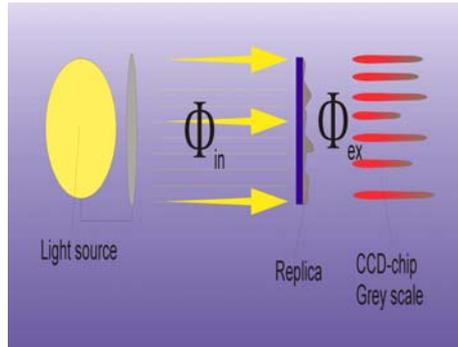


그림 79. Skin Visiometer (SV 600)의 측정원리.

Viscometer에 의한 분석 지표로는 circle, horizontal, vertical, mean line 의 4종류가 있는데 본 시험에서는 mean line을 이용하여 R1 - R5값을 계산하였다

사. 시제 화장품의 사용 설문조사

피험자의 인체실험이 종료와 동시에 기 작성된 일반적인 화장품 효능 효과 평가 설문지를 배포하고 설문지에 대한 답을 작성하게 하였다. 즉, 8주간 인체시험 결과 피험자의 일반적 평가(사용감), 효능 평가, 화장품의 적합성평가, 안정성 평가, 피부 이상반응 및 제품에 대한 호감도 등을 작성하게 하였다. 각 설문항목에 대한 통계분석은 SAS version 9.0 software를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 소나무 수피 추출물의 용해도 및 안정성

1) 정제수 단독사용에 따른 용해 특성

일반적으로 화장품의 경우 물이 주성분이므로 물에 대한 용해도는 매우 중요하다. 표 16에 정제수에 대한 각 소나무 수피 추출물의 용해도 등의 검토를 위하여 정제수에 대하여 소나무 수피 추출물을 0.1 - 10%(w/v) 첨가하여 용액을 제조하였다. 이렇게 만든 용액은 가열 등을 통한 용해 특성, 실온에 장시간 방치 등을 통한 침전 형성 여부 및 부패 정도를 육안으로 검토하였다.

표 16. 정제수 용해도 실험을 위한 소나무 수피 추출물의 비율

처방 No.	1	2	3	4	5	6	7	8
정제수	99.9	99.5	99.3	99.0	98.0	97.0	95.0	90.0
WS	0.1	0.5	0.7	1.0	2.0	3.0	5.0	10.0
ES	-	-	-	-	-	-	-	-
합계	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

	9	10	11	12	13	14	15	16
정제수	99.9	99.5	99.3	99.0	98.0	97.0	95.0	90.0
WS	-	-	-	-	-	-	-	-
WE	0.1	0.5	0.7	1.0	2.0	3.0	5.0	10.0
합계	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

각 소나무 수피 추출물의 경우 기본적으로 열수에 의하여 추출된 것이므로 물에 대한 친화력은 높아야 할 것이지만, 이들 추출물을 일단 농축하여 분말화 공정을 거치면 정제수에 대한 용해도가 매우 낮았다. 즉, 열수 추출물인 WS의 경우, 실온에서 정제수에 어느 정도 용해되고 분산되지만, 불투명하였으며, 시간이 지나면 침전을 형성하였다. 온도를 올리면 잘 용해되었지만, 식으면 다시 혼탁해졌으며, 침전이 관찰되었다. 이러한 현상은 본 추출물의 주성분으로 구성되어있는 PA 중 분자량이 큰 부분들이 소수성이 강하여 시간이 지나면서 서로 회합하기 때문으로 생각되었다. ES의 경우는 정제수에 일부 녹았으나, 많은 부분이 녹지 않았다. 이것은 열수 추출물을 다시 무수알코올로 추출하였기 때문에 염류 및 당의 부분적인 제거로 인하여 PA의 순도가 높아져 이들 PA의 회합이 더욱 용이하게 일어나기 때문으로 사료되었다. 이러한 정제수에 대한 수피 추출물의 불량한 용해도 특성으로부터 화장품 원료로의 이용을 위하여 극성 유기용매의 혼합사용이 필요하다는 것을 알 수 있었다. 또한 장기간 실온에 방치하는 동안 세균류가 증식하여 변질될 수 있음을 알 수 있었다. 화장품은 장기간 사용하므로 장기 안정성은 매우 중요하다. 따라서 이를 막기 위해서도 피부에 자극성이 적으면서도 용해도 및 변질을 막을 수 있는 용매의 혼합사용이 필요하였다.

이하 화장품 제조 시 사용되는 다양한 종류의 극성 유기용매와의 혼합에 따른 용해 특성 및 안정성에 대하여 검토하였다.

2) 정제수 및 에탄올 혼합 용매계

표 17에 화장품 제조 시 살균 및 청량감을 부여하기 위하여 흔히 사용되는 에탄올을 비를 10 - 99로 바꾸어 가면서 소나무 수피 추출물의 용해도, 색상 및 안정성 등을 검토하였다. 이때 소나무 수피 추출물의 비율은 1%가 되도록 하였다. 수피 추출물의 경우 2년차 연구에서 밝힌 것처럼 극미량에서도 강력한 항산화 효과를 나타내므로 화장품 제형화 시 이를 다시 회석하여 추출물의 전체 농도가 0.1%가 된다고 해도 항산화 효과는 충분히 발휘될 수 있다.

알코올 비율이 낮은 WS 17 - 19의 경우 온도를 약간 올리면 모두 용해되었으나 식으면 침전이 발생하였다. 알코올 비율이 30 - 70%인 20 - 21에서는 침전이 발생하지 않았으나, 90 - 99% 비율에서는 오히려 용해도가 떨어졌다. WS의 경우 알코올 30 - 70%혼합이 용해도 및 안정성이 뛰어났다.

ES의 경우 알코올 농도가 낮은 10 - 30%인 24 - 26의 경우 실온에서 녹았으나 5℃에서 1주일 방치 시 침전이 발생하였다. 본 추출물은 알코올로 역 추출하였음에도 불구하고 알코올 비율이 90%, 99%로 고농도가 역시 용해도가 떨어졌다. 이러한 사실은 역 추출시 전체 알코올 농도가 이들 농도보다 낮기 때문으로 사료된다. 본 ES의 경우에 있어서도 50%, 70% 알코올 비율이 가장 양호한 용해도 및 안정성을 나타내었다. 그러나 알코올 50%의 경우 장시간 방치 시 세균에 의한 변질이 관찰 되었다. 따라서 50% 알코올 사용의 경우 방부제 사용이 필요할 것으로 생각되었다. 그리고 에탄올과 같은 알코올의 경우 특유한 알코올취가

표 17. 정제수 및 에탄올 혼합 용매계 비율

처방 No.	17	18	19	20	21	22	23
정제수	89.0	79.0	69.0	49.0	29.0	9.0	-
Ethanol	10.0	20.0	30.0	50.0	70.0	90.0	99.0
WS	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ES	-	-	-	-	-	-	-
합계	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

처방 No.	24	25	26	27	28	29	30
정제수	89.0	79.0	69.0	49.0	29.0	9.0	-
Ethanol	10.0	20.0	30.0	50.0	70.0	90.0	99.0
WS	-	-	-	-	-	-	-
ES	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
합계	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

있으며, 이를 싫어하는 여성들이 많다. 또한 알코올에 민감성 피부도 있으며, 스킨이나 에센스류를 제조할 때 알코올의 농도가 낮아져 원료성분이 재 석출 현상이 일어날 수도 있다. 따라서 특수한 경우를 제외하고 다량의 알코올 사용은 피해야 할 것으로 생각되어 다음에는 에탄올의 문제점을 부분적으로 해결 할 수 있는 글리세린과 같은 다가 알코올을 사용하여 동일한 비율로 용해도, 안정성 및 사용감 등을 검토하였다.

3) 정제수 및 글리세린 혼합 용매계

표 18에 그 혼합 비율을 나타내었다. WS의 경우 글리세린 비율이 10%, 20%(31 - 32)일 때 용해는 되지만, 5℃의 낮은 온도에서는 단 1일 후 침전이 발생하였다. 글리세린 30% 이상인 33 - 37에서는 침전현상이 일어나지 않고 안정하였으나, 보습력이 너무 강하여 사용감이 좋지 않았다.

ES의 경우(38 - 39)는 온도를 80℃로 올리면 모두 녹았으나 5℃에서 1주일 방치하면 침전이 발생하였다. 글리세린 비율이 30 - 90%인 40 - 43의 경우 양호한 용해도 및 안정성을 나타내었다. 그러나 글리세린 70% 이하의 경우 역시 방부제를 사용해야 할 필요가 있었다. 그리고 글리세린계의 경우 보습력이 높아 자체 사용감이 너무 무거운 단점이 있었다. 따라서 다음에는 글리세린보다 분자 내 수산기가 1개 적은 butylene glycol(BG)를 사용하여 동일한 실험을 실시하였다.

표 18. 정제수 및 글리세린 혼합 용매계 비율

처방 No.	31	32	33	34	35	36	37
정제수	89.0	79.0	69.0	49.0	29.0	9.0	-
Glycerine	10.0	20.0	30.0	50.0	70.0	90.0	99.0
WS	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ES	-	-	-	-	-	-	-
합계	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

처방 No.	38	39	40	41	42	43	44
정제수	89.0	79.0	69.0	49.0	29.0	9.0	-
Glycerine	10.0	20.0	30.0	50.0	70.0	90.0	99.0
WS	-	-	-	-	-	-	-
ES	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
합계	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

4) 정제수 및 BG 혼합 용매계

표 19에 정제수와 BG의 혼합 비율을 나타내었다. WS의 경우, 30%이하의 BG 비율(45 - 47)에서 모두 용해되었지만, 상술한 글리세린 및 알코올과 같이 온도가 낮아지면 침전이 발생하였다. BG 비율이 50% 이상인 48 - 51에서는 낮은 온도에 방치해도 침전이 발생하지 않았다. 흥미로운 사실은 에탄올의 경우 90%이상의 높은 농도에서는 시료의 용해도가 불량하였으나, BG의 경우에는 이러한 현상이 나타나지 않았다. ES의 경우 BG의 비율이 20%이하(52 - 53)에서 잘 녹았으나 5°C에서 1주일 방치한 결과 침전이 발생하였다. 전체적으로 BG 비율 30 - 70%인 54 - 56이 가장 좋은 용해도를 나타내었다.

한편 방부력 테스트 결과 BG 30%이상에서는 미생물의 성장을 확인 할 수 없었다. 따라서 사용감 등을 고려하여 BG 비율 50%인 48, 55번 처방이 가장 양호한 것으로 판단되었다.

유사한 실험을 propylene glycol(PG)에도 적용하였다. 그 결과 PG의 경우 상술한 BG의 결과 유사하였으나 샴푸나 클렌징 등 wash-off 제품 등에는 사용하기 좋으나 스킨케어에 사용 시 누적 자극 등의 부작용이 있으므로 이후의 실험에서는 사용하지 않았다.

이상의 실험결과로부터 방부제를 사용하지 않고도 안정성을 유지 할 수 있는 가장 적절한 용제는 글리세린과 BG로 그 사용 농도는 40 - 90%가 좋으며 최적의 농도는 50%가 가장 적합할 것으로 판단되었다.

표 19. 정제수 및 BG 혼합 용매계 비율

처방 No.	45	46	47	48	49	50	51
정제수	89.0	79.0	69.0	49.0	29.0	9.0	-
BG	10.0	20.0	30.0	50.0	70.0	90.0	99.0
WS	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ES	-	-	-	-	-	-	-
합계	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

처방 No.	52	53	54	55	56	57	58
정제수	89.0	79.0	69.0	49.0	29.0	9.0	-
BG	10.0	20.0	30.0	50.0	70.0	90.0	99.0
WS	-	-	-	-	-	-	-
ES	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
합계	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

나. 수피 추출물의 적정 농도

원료의 유통 및 보관 등을 위하여 분말상의 제품이 바람직 하지만, 즉시 혼합 사용하기에는 어려움이 있다. 따라서 많은 화장품 원료 및 첨가제 등은 일정농도의 액상으로 공급 및 유통된다. 수피 추출물의 경우 상술한 것처럼 정제수 49, BG 50의 비율에서 잘 용해되고 안정성 또한 뛰어나 이러한 상태로 공급 및 유통되는 것이 바람직 할 것으로 생각되었다. 이러한 혼합 용매계에서 소나무 수피 추출물 농도를 고농도로 하는 것이 효능 효과 및 취급 면에서 유리하겠지만, 소나무 수피 추출물의 효능 및 효과는 0.01%에서도 충분히 발현되므로 무리하게 고농도의 시료를 조절할 필요는 없다. 따라서 표 20에 나타낸 것처럼 WS 및 ES를 각각 0.1 - 3%로 조절 한 후 화장품 제형에 대하여 1 - 10% 배합하여 최종 제품의 색상으로 적정 소나무 수피 추출물 농도를 결정하였다.

본 실험에 사용된 소나무 수피 추출물을 정제수 및 BG혼합 용매에 용해시키면, 짙은 적갈색으로 일반적으로 화장품 제조 시 기피하는 색상이 된다. 천연물을 원료로 하여化妆품을 제조할 경우 이러한 색상문제는 언제나 제기되므로 이들을 제형화 하였을 때 그 색상이 사용자가 거부감이 들지 않도록 조절해야 할 필요가 있다. 동시에 수피 추출물의 효능 효과가 발현될 수 있어야 하므로 이러한 강한 유색 시료의 경우 그 조색에 어려움이 많다.

표 20. 수피 추출물의 적정농도 설정을 위한 혼합비

처방 No.	59	60	61	62	63	64	65	66
정제수	49.9	49.5	49.0	47.0	49.9	49.5	49.0	47.0
BG	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
WS	0.1	0.5	1.0	3.0	-	-	-	
ES					0.1	0.5	1.0	3.0
합 계	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

3% 이상의 시료 농도의 경우 유효 성분의 농도가 높아 효능 효과 면에서 좋지만, 제형화 시 압갈색이 강하여 거부감이 심하였다. 0.5%이하의 경우 제형화 시켰을 때 옅은 핑크 빛으로 색상은 좋았지만, 추출물의 효능 효과를 충분히 발휘하게 하기 위하여 다량을 사용해야 할 필요가 있었다. 1%의 경우 화장품 제형에 10%까지 배합하여도 옅은 브라운 칼라로 시판 유명 식물소재 천연화장품과

큰 차이가 없었으며, 큰 거부감 또한 없었다. 따라서 이후 화장품 제형화 시험 시 본 처방 61 및 65의 수피 추출물 농도 1%(WS-1)를 기본 원료로 사용하였다.

본 처방을 기본으로 하여 추출물의 색상 안정성을 6개월간 관찰한 결과, 색상은 서서히 더욱 짙은 암갈색으로 변화하였다. 색차계를 이용하면 보다 정확한 색상의 변화를 읽을 수 있겠으나, PA를 주성분으로 하는 페놀성 화합물은 빛에 의하여 중합되거나 분해가 일어나며, 따라서 서서히 농색 및 퇴색화 하므로 색상의 변화는 천연물 이용 시 피할 수 없는 현실이다. 공기 중에서도 상당히 오랜 기간 항산화 활성을 유지하는 PA의 경우에도 예외는 아니어서 금후 화장품 제조 시에는 이러한 빛에 의한 변색을 고려하여 빛과 공기가 가능한 접촉하지 않도록 화장품 용기를 설정해야 할 것으로 사료되었다.

다. 수피 추출물과 타 화장품 원료 혼합에 따른 특성

1) 원료의 상용화 특성

가) 수계(水界) 시스템에서의 상용성

상기 수피추출물 농도 1%, 처방번호 61을 WS-1로 하고 이것을 기본 시료로 하여 원료의 상용화 특성을 검토하였다.

WS-1은 친수성 및 소수성 성분을 가지고 있어 물 100% 존재 하에 희석하면 희석 비율에 따라 안정도가 달라짐을 알 수 있었다. 즉, WS-1을 물에 대하여 소량 첨가 할 경우 육안으로 침전 및 혼탁 등은 잘 확인 할 수 없었으나 5% 이상 첨가하면 시간이 지남에 따라 소수성 화합물의 침전이 관찰되었다. 따라서 WS-1을 화장품 원료로 사용할 경우 대부분이 물로 이루어진 화장품 제조 시에는 필연적으로 소량의 극성 유기용매(글리세린, 알코올류, 다가 알코올류, PEG류)를 사용하거나 계면활성제를 사용해야 할 것으로 생각되었다. 계면활성제로는 실험부에 나타낸 HLB 15이상의 것이 유효하였다. 한편, 계면활성제 이외의 근래 고급 화장품의 기능성 첨가제로 많이 사용되는 히아루론산나트륨, 콜라겐, 베타글루칸 등 폴리사카라이드계 원료나 아미노산, 펩타이드 및 프로테인류 등과의 WS-1과의 혼합을 실시한 결과 상용성에 큰 문제가 없었다. 따라서 앞으로 WS-1을 기본으로 한 기능성 화장품 제조 시 이들 기존의 기능성 재료와의 자유로운 배합이 가능하여 좋은 기능성 화장품 제조가 가능할 것으로 생각되었다.

나) O/W 및 W/O 유화 시스템에서의 상용성

O/W 유화 시스템에서는 80℃에서 유화 후 냉각 과정 중 WS-1을 45 - 50℃에서 첨가하는 것이 가장 바람직하였다. 그러나 처방에 따라 미리 유화 전 수상에 첨가 한 후 유화시켜도 큰 문제가 없는 것으로 판단되었다. 단, 함께 첨가 시 높은 온도에서 강한 반응을 일으킬 수 있는 물질, 예를 들면 양이온성 계면활성제나 그 유도체 등은 조심해야 할 필요가 있었다. 그 이유는 본 원료 WS-1은 양이온성 계면활성제와 일부 응집현상을 나타내었기 때문에 WS-1고유의 효능효과가 떨어질 수 있는 것으로 나타났다. O/W유화 시 WS-1은 사용되는 유화제에 의하여 쉽게 안정화 되므로 별다른 용매를 필요로 하지 않았다.

한편, O/W 유화와는 달리 W/O 유화의 경우 수상(水相)이 내부로 들어가고 유상(油相)이 바깥으로 배열하기 때문에 우수한 보습력을 주기는 하나 수용성 활성 물질이 빨리 외부로 나오는 것이 어렵다. 그러나 시간이 지날 수록 서서히 방출할 수 있다는 장점을 갖고 있다. WS-1은 W/O 제형 특성상 유화 직전에 수상에 첨가하면 쉽게 제형화 할 수 있다. 유화 시 이미 W/O 유화제가 사용되기 때문에 별다른 유화제나 안정화제를 필요로 하지 않는다.

다) 기타 처방 상용성

WS-1을 범용 샴푸, 바디 클렌저, 클렌징 폼 등의 세정용 제품 제조에 적용한 결과 이들 제형에서도 안정하였으므로 이 후 이들 제품군의 제조에서도 광범위하게 적용 가능할 것으로 생각되었다.

2) 다양한 제형에 대한 적용 특성

표 21에 나타낸 것처럼 다양한 제형에 대하여 WS-1을 5% 처리하고 5℃ 및 45℃에서 1개월간 안정성을 검토하였다. 그 결과 5℃에서는 대부분 안정하였으나 45℃의 경우 스킨류나 O/W크림은 안정성이 떨어졌다. 이러한 이유는 스킨류 및 O/W크림의 경우 활성 성분인 소나무 수피 PA가 직접 공기와 접촉하므로 산화가 일어나기 때문으로 사료되었다. 이를 뒷받침 할 수 있는 것이 이들 두 제형의 경우 공기 중에 방치하면 타 제형보다 빠른 시간에 암색화 하는 것으로부터 예상할 수 있다. 자외선을 조사하면 이러한 제형의 암색화는 더욱 빠르게 나타났다.

DPPH법으로 측정한 생리 활성도 또한 안정성과 유사한 경향으로 스킨류 및

수상이 바깥으로 배열되는 O/W 크림에 사용 하였을 때 매우 낮았다. 이러한 이유 역시 공기 중의 활성 산소와 반응하여 급속히 그 생리활성이 낮아지는 것으로 사료되었다. 따라서 방치 중의 변색을 억제하고 항산화력을 높이기 위해서는 다른 항산화제와 혼용이 필요할 것으로 생각되었다.

여러 가지의 항산화제를 실험한 결과, 미토콘드리아 내에 존재하는 생리활성물질인 코엔자임Q10(Coenzyme Q10, 註 1 참조)과 일반적으로 시품 및 화장품 첨가제로 많이 알려진 항산화제인 비타민 E(Tocopherol)이 SW-1의 변색을 지연시키고 항산화력을 증진시킨다는 사실을 발견하고 화장품 처방에 응용할 경우 시너지 효과를 기대할 수 있으리라 예측되었다. 따라서 WS-1과의 혼합 사용 시너지 효과를 기대하여 제형화 연구, 기능성 화장품 테스트 그리고 시제품 제조 시 이러한 항산화제를 조합하고자 하였다.

표 21. 스킨, 옛센스 및 다양한 형태의 크림류에 WS-1의 첨가시 안정도 및 생리활성도

		스킨	옛센스	젤리크림	O/W크림	W/O크림	W/S크림
WS-1, 5% 처리		5	5	5	5	5	5
안정도	실온, 1일	5	5	5	5	5	5
	45℃, 1개월	3	4	4	3	5	5
	5℃, 1개월	4	5	5	5	5	5
생리 활성도	실온, 5 분	5	5	4	3	1	2
	실온, 2 시간	1	3	2	1	3	3

WS-1: 수피추출물 1, 정제수 49, BG 50으로 되어있는 처방 61을 약술한 것임.
수치정의, 1: 나쁨, 2: 약간나쁨, 3: 보통, 4: 좋은 편, 5: 매우양호

註 1: 코엔자임 Q10(Coenzyme Q10)

코엔자임 Q10은 생체 에너지이자 천연 항산화제의 대명사가 되고 있다. 자연 상태에서 존재하는 지용성 물질로 비타민 또는 비타민 유사체로 분류되고 있는 조효소인 코엔자임 Q10은 체내에 있는 거의 모든 세포에 있다. 특히 심장, 신장 등의 장기에 많이 함유되어 있으며 피부에는 표피에 다량으로 존재한다.

1957년 미국 위스콘신의 Frederick Crane 박사에 의해 최초로 발견된 이래, ‘어디에나 있는’이라는 의미의 ‘유비퀴논(ubiquinone)’이라 명명되었다. 1970년경에는 일본에서 이를 입상에 사용할 수 있는 정도의 대량 생산에 성공하였고 잇따라 1972년 인간의 심장 질환에서 코엔자임 Q10이 결핍되어 있다는 사실이 규명됨으로써, 실제 인체에 사용할 수 있는 가능성을 입증하기에 이르렀다.

1978년경, 항산화 및 프리 라디칼(활성산소) 소거 물질로 그 효능이 확대됨에 따라 코엔자임 Q10의 중요성이 부각되었다. 1980년 초에는 일본 제약회사들의 코엔자임 Q10의 대량생산능력 및 정량법을 개발하여 임상예의 가능성이 더욱 확대되었다. 코엔자임 Q10은 노화와 함께 각종 장기와 심장 등에서 급격히 감소하는 성분으로 알려져 있다. 따라서 노화에 의한 활력 감퇴나 피로 등을 코엔자임 Q10의 농도 저하에 대한 시각으로 보고 이를 보충해 주기 위해 코엔자임 Q10을 활용한 각종 건강식품 및 의약품 등이 개발되고 있는 추세다.

코엔자임 Q10은 세포내 미토콘드리아에서 에너지를 생성할 때 관여하는 중요한 보호소인데 뇌기능향상에 도움이 되면서 독소를 제거해주는 역할을 한다. Co Q10은 우리 인체 내의 모든 세포에서 발견되는 필수 영양분으로 심장질환과 노화방지(장수)에 매우 중요한 역할을 하는데 이러한 Co Q10은 구조적으로 비타민E와 유사하며 인체내 병을 일으키는 자유 라디칼의 활동을 방해하는 강력한 항산화제로써 기적의 비타민이라 불리어지고 있다.

연구에 의하면 심장병, 심장마비, 면역력약화 그리고 활력감소 등을 포함한 소위 노인질환들은 우리 인체 내에서 코엔자임 Q10의 감소로 발생된다고 밝혀졌다. 1981년 루퍼스 연구소의 Emile Bliznakov 박사에 의하면 쥐의 실험에서 코엔자임 Q10을 사용한 쥐 중에서 30 - 40%의 쥐는 그렇지 않은 쥐에 비하여 인간수명으로 치면 평균130 - 150살까지 사는 것을 밝히고 장수에 아주 중요한 물질로 규명한바 있다.

● 코엔자임 Q10효능

- 1) 항산화제로서 강력한 노화방지 효과
- 2) 심장질환에 탁월한 효과
- 3) 혈액순환을 촉진
- 4) 치매예방과 뇌기능향상
- 5) 고혈압과 뇌졸중에도 효과

● 피부와 코엔자임 Q10

피부에서는 코엔자임 Q10이 20대를 정점으로 감소하기 시작하여 40대 무렵에는 20대의 약 70%까지 감소하는 것으로 보고되고 있다. 코엔자임 Q10은 자외선에 의해 발생하여 피부 노화의 원인이 되는 프리 라디칼을 소거하는 역할을 하는 반면, 자외선에 의해 가장 먼저 손상을 입는 생체 성분으로도 알려져 있다.

따라서 화장품에서는 이러한 광(光)노화를 유발하는 인자들을 제거할 목적으로 항산화 및 항노화 제품의 주 효능 성분으로 사용되고 있다. 최근에는 외용제의 성분으로서 탄력, 주름 개선 작용 뿐 아니라 생체 내 산화-환원 작용과 밀접한 관련이 있는 멜라닌 생성 과정을 억제하는 효능도 밝혀져 미백 화장품에도 적용되는 사례가 증가하고 있는 추세이다. 또한 각종 생체 내 항산화제의 재생을 도와 항산화력을 증강시키는 역할로도 알려져 있어 비타민제에 함께 사용되기도 한다.

그러나 두 원료성분 모두 친유성 이므로 스킨, 스킨 토너, 에센스, 아스트린젠트 등 수계제형에서는 사용하기 어려운 난제가 있다. 근래 참여회사인 (주)씨엔텍은 독자 기술로 나노 에멀전 시스템을 이용하여 코엔자임 Q10과 비타민 E를 수용액처럼 투명한 형태의 평균입자 31 nm로 수용화, 안정화하는데 성공하여 이를 WS-1과 함께 화장품에 응용하여 제품화하기로 하였다.

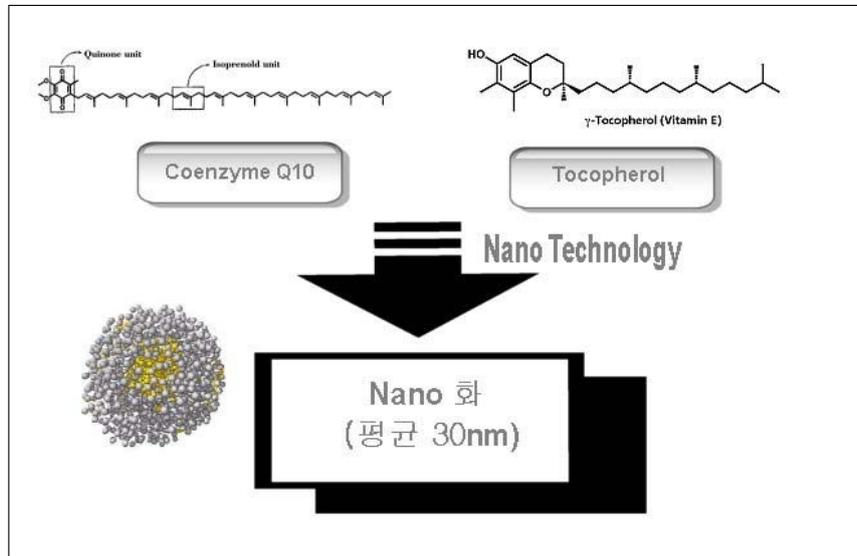


그림 80. Nano화 Coenzyme Q10.

라. 제형연구실험

1) 스킨 에센스

스킨 에센스는 스킨의 기능과 에센스의 기능을 복합화 하기 위해 만든 처방이다. 따라서 끈적이지 않고 후레쉬한 스킨의 기능과 촉촉한 에센스의 기능을 복합화 하고자 하였다.

우선 적정 보습제량을 검토하였다. 그 조건은 표 22에 나타내었다. 처방 SE-1, SE-4는 첫 사용감은 좋으나 후감이 너무 건조한 느낌이 들었다. 4계절용으로 검토 시 처방 SE-3, SE-7쪽이 우수한 보습력을 나타내었다. 그러나 여기서 사용한 점증제인 Carbomer가 첫 터치감이 퍼지는 듯하고 미끄러운 감이 들며 피부 흡수 시 끈적임이 많아 점증제 종류 및 조성의 조정 실험을 실시하였다. 본 실험을 위한 조건을 표 23에 나타내었다.

점증제 실험결과, Carbopol의 함량을 5%로 낮추고 sodium hyaluronate, xyloglucan을 첨가하여 조정 실험하였으나 그다지 사용감이 좋지 못하였다. CM-cellulose를 첨가한 것은 매끈거리는 감은 좋으나 흡수력이 나빴다. Xanthan gum을 함유한 SE-11, SE-12가 우수하였으나 퍼짐성이 좀 나쁘고 후감에서 너무 리치한 느낌이 들었다.

표 22. 보습제 조정실험

원 료 명		처 방						
		SE-1	SE-2	SE-3	SE-4	SE-5	SE-6	SE-7
1	Water	81.0	76.0	71.0	76.0	71.0	71.0	66.0
	Glycerine	-	5.0	10.0	-	-	5.0	5.0
	Butylene Glycol	-	-	-	5.0	10.0	5.0	10.0
	Nano-coenzyme Q10	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Polysorbate 80	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	WS-1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2	1% Carbopol 941	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
3	4% Sodium hydroxide	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
4	Preservatives	q.s						

표 23. 점증제 조정실험

원 료 명		처 방						
		SE-8	SE-9	SE-10	SE-11	SE-12	SE-13	SE-14
1	Water	66.0	61.0	61.0	56.0	46.0	51.0	41.0
	Glycerine	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	BG	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	5.0	10.0
	Nano-coenzyme Q10	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Polysorbate 80	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	WS-1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2	1% Carbopol 941	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	-	-
	1% CM-cellulose	-	5.0	-	-	-	-	-
	1% Xanthan gum	-	-	5.0	10.0	20.0	20.0	30.0
	1% Sodium hyaluronate	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	1% Xyloglucan	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
3	4% Sodium hydroxide	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	-	-
4	Preservatives	q.s	q.s	q.s	q.s	q.s	q.s	q.s

따라서 Carbopol을 처방에서 제외하고 Xanthan gum을 주제로 실험한 결과 처방 SE-13, 14의 1% Xanthan gum 함량이 30% 정도가 적당한 것으로 생각되었다. Carbopol을 제외한 결과 부수적으로 중화제로 수산화나트륨을 사용하지 않아도 되는 장점이 있었다.

WS-1 사용량을 1%에서 2%로 늘리고 미백효과를 높이기 위한 시너지 효과를 기대하여 원료로 arbutin(註 2)을 선정하고 그 함량 조정실험을 검토하였다.

WS-1의 경우 사용량을 2%보다 더 높이 증가시키면 효능 효과는 좋아지겠지만, 제품의 색상이 너무 어두워져 제품으로서의 선호도가 떨어질 수 있다. 따라

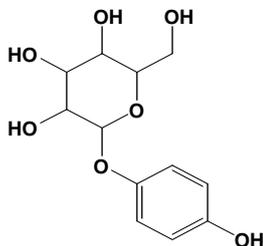
서 제품의 색상에 크게 거부감을 주지 않을 정도의 2%가 스킨 에센스에서의 적당하다고 판단되었다.

Arbutin은 1989년 일본의 시세이도에서 사용되어지기 시작하여 전 세계에 사용되고 있으며 한국에서도 현재 미백화장품 고시 원료로서 그 효능 효과가 입증되어져 많은 기능성 화장품에 사용되어지고 있다. 본 미백원료는 비타민C처럼 이미 생성되어버린 멜라닌 색소를 환원시키는 작용을 하는 것이 아니라 tyrosinase에 직접 작용하여 멜라닌 색소의 생성을 억제하는 물질이다.

표 24. Arbutin 및 Rose water 첨가 조정 실험

원 료 명		처 방						
		SE-15	SE-16	SE-17	SE-18	SE-19	SE-20	SE-21
1	Water	48.5	48.0	47.5	47.0	44.0	39.0	34.0
	Glycerine	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	BG	10.0	10.0	10.0	10.0	8.0	8.0	8.0
	Nano-coenzyme Q10	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Polysorbate 80	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	WS-1	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
	Arbutin	0.5	1.0	1.5	2.0	2.0	2.0	2.0
2	1% Xanthan gum	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
	1% Sodium hyaluronate	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	1% Xyloglucan	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
3	Rose water	-	-	-	-	5.0	10.0	15.0
4	Preservatives	q.s						

註 2: Arbutin: 베어베리 추출물에 존재하는 물질로 피부의 멜라닌 생성을 억제해주어 기미, 주근깨 등의 생성을 막아 피부 미백효과를 증진시키는 물질.



- Arbutin의 효능
- 1) 피부 칙칙함 방지
- 2) 피부 흑화 제거
- 3) 기미, 주근깨 예방

실험결과, WS-1의 사용량을 2%, arbutin 1%가 시너지 효과를 주는 것으로 나타났다. 2% 사용 시 좀 후감이 텁텁하고 뻣뻣한 느낌이 들었으나, 기능성 미백제품을 위해 2%를 사용하고 다른 원료인 BG를 조정하였다. 또한 천연 향인 rose water를 처방에 넣어 자체 베이스 냄새도 없애고 은은한 rose water향이 있어 사용 시 상쾌함을 주기도 하므로 각 조성 조정 실험결과 처방 SE-20인 10%가 가장 적당한 것으로 생각되었다. 일반 합성향료를 사용할 경우, 천연향보다는 자극성이 조금 더 있고 또 반드시 계면활성제를 사용하여야 하므로 이때 일어날 수 있는 피부 자극도도 줄이고 제조의 편리성을 위하여 rose water를 사용하기로 하였다.

지금까지 경피 흡수제로 글리세린 과 BG만 사용하였는데 좀더 흡수력을 높이기 위해 에탄올 첨가 실험을 실시하였다(표 25). 실험 결과, 에탄올 사용량의 경우 5%는 조금 모자랐으며, 10%는 알코올 취가 약간 강하여 8% 정도가 가장 후레쉬 하면서도 경피 흡수력이 좋은 것으로 나타났다. 또한 여기에 사용된 계면활성제인 Polysorbate 80의 함량을 줄이는 실험을 하였다. 결과적으로 에탄올 첨가로 인하여 Polysorbate 80을 첨가하지 않은 처방 SE-27번의 것이 피부 자극을 줄일 수 있었으며 사용감도 훨씬 좋게 나타났다. 이에 따라 본 에센스 처방은 SE-27 처방을 주 베이스로 개발하였으며 품평결과는 표 26에 나타내었다.

2) 크림 제형

영양 크림 제형은 일반적으로 유상성분이 약 30% 전후로 많이 함유되어 있는 편이다. 따라서 우리나라의 경우 사계절이 뚜렷하고 한 여름에는 습도가 높고 무더위 땀이 많이 나므로 크림을 사용하면 피지 분비가 많아 오일리하게 느껴지고 한 겨울에는 건조하고 낮은 온도로 피부에 충분한 수분을 공급해 주어도 곧 당기는 느낌을 준다. 이러한 난제를 극복하고 여름에는 사용감이 가벼우면서도 끈적이지 않고 겨울에는 충분한 보습력을 부여해 주어 이 크림으로 사계절 모두 사용할 수 있는 처방을 개발하기로 하였다. 여러 가지 유형의 크림 유헤시스템을 이용하여 다음 표(① - ⑤)에 나타낸 5가지 유형의 처방으로 실험을 실시하였다.

각 제형별로 서로 다른 특성이 있었다. CM-1의 경우는 여름처방에는 적합하였으나 겨울에는 보습력이 떨어질 것으로 판단되었고, CM-2의 경우는 보습력은 매우 우수하나 습도가 높은 한 여름처방으로는 적합하지 못한 것으로 판단되었다. CM-3의 경우는 CM-2보다 더 우수한 보습력을 지녔으나 결정적으로 사용감

표 25. 경피흡수 및 사용감 조정실험

원 료 명		처 방					
		SE-22	SE-23	SE-24	SE-25	SE-26	SE-27
1	Water	37.0					
	Ethanol	1.0	5.0	10.0	8.0	8.0	8.0
	Glycerine	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	BG	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
	Nano-coenzyme Q10	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Polysorbate 80	1.0	1.0	1.0	0.7	0.5	-
	WS-1	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
	Arbutin	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
2	1% Xanthan gum	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
	1% Sodium hyaluronate	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	1% Xyloglucan	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
3	Rose water	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
4	Preservatives	q.s	q.s	q.s	q.s	q.s	q.s

표 26. 품평결과

실험처방		SE-14	SE-18	SE-20	SE-27	평가구분
안 정 도	5℃	◎	◎	◎	◎	매우 양호: ◎ 양호: ○ 보통: △ 나쁘다: ×
	20℃	◎	◎	◎	◎	
	45℃	◎	△	◎	◎	
	Cycling	◎	○	◎	◎	
색상, 향취		△	△	◎	◎	
첫 덧취감		○	△	○	◎	
끈적임		×	△	○	◎	
촉촉함		○	○	○	◎	
비 고		호감도: SE-27>SE-20>SE-14>SE-18				

이 좋지 못하였다. CM-4의 경우는 보습력, 사용감에서 모두 우수한 처방이나 제조 시 품질의 균일성에서 어려움이 예상되었고 시간이 지남에 따라 후감에서 약간 답답한 느낌을 주었다. CM-5의 경우는 기존의 W/O나 W/S가 가지지 못한 특성을 가지고 있다. 즉, 피부에 적용 시 W/S가 빠르게 수분이 방출되어 시원하

면서 끈적임 없이 산뜻한 느낌을 주면서도 가벼운 느낌을 주면서 적당한 보습력도 있어 처방 조정실험을 거치면 가장 적합한 제형이 될 것으로 판단되었다. 생리활성도는 즉효성은 O/W 타입이 우수하였으나 장기 지속성에서는 떨어졌다(표 27). W/O타입의 경우는 즉효성이 떨어졌으나 장기 지속성에서 우수하였다. 그러나 CM-5의 경우 비교적 즉효성과 장기 지속성이 우수한 것으로 나타났다. 이상의 분석결과로 CM-5번을 기준으로 선택하여 개선 실험을 실시하였다.

		CM-1	②		CM-2
1	Steareth-2	3.0	1	Cyclomethicone	4.0
	Steareth-21	2.0		PPG-15 Stearyl Ether	5.0
	PPG-15 Stearyl Ether	3.0		Stearic Acid	2.0
	Isohexadecan	4.0		Sunflower oil	15.0
	Cetostearyl Alcohol	2.0		2	Water
	Stearic Acid	2.0	Sorbitan Stearate		2.0
	Dimethicone	1.0	Stearyl Cocoate	2.0	
2	Water	to 100	Butylene Glycol	4.0	
	Butylene Glycol	4.0	3	Pinux WS-1%	10.0
	Glycerine	2.0		Preservatives	q.s.
Perfume	q.s.	Perfume		q.s.	

		CM-3	④		CM-4
1	Polyglyceryl-2 isostearate	3.0	1	Steareth-21	2.0
	Polyglyceryl-2 diisostearate	2.0		Steareth-2	3.0
	Cetostearyl alcohol	1.0		PEG-30 dihydroxy stearate	0.5
	Isopropyl isostearate	6.0		PPG-15 stearyl ether	5.0
	Triethyl hexanoin	5.0		Isohexadecan	4.0
	Isopropyl myristate	6.0		Vitamin E	1.0
	Cyclomethicone	5.0		Cetostearyl alcohol	1.0
	Magnesium stearate	0.5		Stearic acid	1.5
2	Water	to 100		Dimethicone	1.0
	BGl	4.0	2	Water	to 100
	Glycerine	2.0		BG	4.0
3	WS-1%	10.0		Glycerine	2.0
	Preservatives	q.s.	3	WS-1%	10.0
	Perfume	q.s.		Preservatives	q.s.
				Perfume	q.s.

⑤		CM-5
1	Cyclomethicone	4.0
	PPG-15 stearyl ether	2.0
	PEG-10 Dimethicone	1.0
	Dimethicone/Vinyl dimethicone crosspolymer(주4)	2.0
	Dimethicone	4.0
	Vitamin E	1.0
2	Water	to 100
	BG	4.0
	WS-1%	10.0
	Preservatives	q.s.

표 27. 제형별 오일함량 및 생리활성도 실험 결과

		CM-1	CM-2	CM-3	CM-4	CM-5
제형구분		O/W	O/W	W/O	W/O/W	W/S
타입		라이트 타입	리취 타입	리취 타입	멀티플 에멀전	라이트 타입
오일함량		17%	26%	28.5%	19.0%	15.0%
생리 활성도	5분 후	◎	◎	△	○	○
	2시간 후	△	△	◎	○	◎

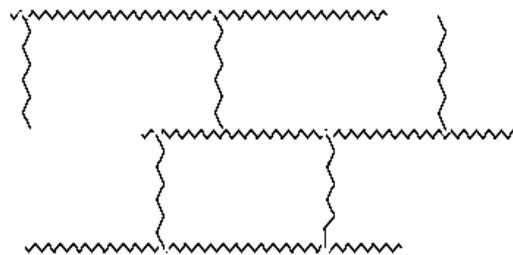
표 28. 안정도 조정 실험

		CM-6	CM-7	CM-8	CM-9	CM-10	CM-11	CM-12	CM-13	CM-14
1	Cyclomethicone	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	PPG-15 stearyl Ether	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
	PEG-10 dimethicone	1.0	1.0	0.5	0.5	3.0	-	0.5	0.5	0.5
	Dimethicone/Vinyl dimethicone crosspolymer	2.0	3.0	2.0	3.0	-	3.0	10.0	5.0	1.0
	Dimethicone	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	Nano-coenzyme Q10	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2	Water	to 100								
	BG	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	WS-1%	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
	Preservatives	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

본 처방에서 PEG-10 dimethicone과 dimethicone/vinyl dimethicone cross-polymer의 배합 비율에 의해 안정도, 사용감에 지대한 영향을 미치고 있다. 두 배합 비율의 합이 6에서부터 2까지 배합 비율을 조정하여 실험을 실시 한 결과

(표 28) PEG-10 dimethicone이 0.5%가 가장 적당한 것으로 나타났다. 배합 비율의 함이 크면 안정도는 좋아지나 사용감에서 첫 터치감이 무겁고 water leaking 시간이 길었으며 배합비율의 함이 적으면 유화력이 낮아 안정도가 떨어지는 경향을 보였다. 단독으로 사용한 CM-10은 유화 안정도가 매우 좋았으나 사용 시 유화가 깨짐이 늦고 피부 흡수력도 늦었으며 점도가 낮았다. CM-11의 경우는 유화가 되지 않고 분리되었다. 따라서 PEG-10 dimethicone과 dimethicone/vinyl dimethicone crosspolymer의 배합 비율이 1:4 - 1:6의 비율이 좋았으며 CM-8, CM-9의 처방이 가장 좋은 것으로 나타났다. 다음에 dimethicone/vinyl dimethicone crosspolymer(註 3)의 변화 실험한 결과, 함량이 많을수록 안정하며 점도도 높으나 후감이 약간 뻣뻣해 지는 경향이 있어 CM-12 보다는 CM-13번 처방이 가장 안정하면서도 사용감이 좋은 것으로 나타났다. 그러나 본 처방은 재현성에 문제가 있었는데 즉, 제조 시 온도와 교반기의 속도 및 시간에 따라 마지막 유화 입자가 매우 달라지는 단점을 갖고 있다. 따라서 본 연구에서는 PEG-10 dimethicone과 dimethicone/vinyl dimethicone crosspolymer를 비율로 사용하지 않고 자기 유화성이 있는 dimethicone/vinyl dimethicone crosspolymer에 polyether를 추가시킨 물질로 실험하기로 하였다.

註 3: Dimethicone/vinyl dimethicone crosspolymer



Silicone crosspolymer

Dimethicone/vinyl dimethicone crosspolymer은 백금 촉매 하에서 dimethicone과 vinyl dimethicone을 가교 결합시킨 것이다. 여기에 dimethicone을 첨가하여 분산시킨 제품으로 일부 물을 붙잡을 수 있으며 자체가 겔 상태로 되어있으며 독특한 사용감을 부여한다.

이 물질은 보다 쉽게 그리고 안정하게 제형화 하는 것이 가능한 것으로 예측되어 다음과 같이 실험을 진행하였다. 본 물질의 제조 방법은 다음과 같다. Dimethicone/vinyl dimethicone crosspolymer에 polyether를 백금 촉매 하에 반응시켜 생성된 물질을 cyclomethicone에 분산시켰다. 제형의 특성상 다른 유화제의 첨가 없이도 polyether기가 있어 물을 붙잡는 것이 가능하였다(그림 83 참조). 새로운 가교물질을 첨가한 실험결과, Dimethicone/ vinyl dimethicone (and) Polyether crosspolymer가 7 - 10% 첨가된 CM-18, CM-19의 처방이 가장 우수하였으며 전에 두 가지 원료를 병용하여 사용하였던 처방보다도 water leaking 현상이 훨씬 우수하였다. 7%이하는 제조 후 45°C에서 불안정한 경향을 나타내었다. CM-20 - 23처방은 WS-1%의 사용량의 변화를 테스트한 것이다. 외관상으로는 3 - 5%가 적당하다고 느껴졌으나 본 개발 제품은 미백 기능성으로 개발하는 것이므로 색상보다는 효능효과에 중점을 두고 있으므로 충분한 미백효과와 충분한 항산화효과를 부여하기 위하여 기 검토한 세포 독성실험(WS-1의 고형분 농도 0.1%이하에서 독성이 거의 없음)을 바탕으로 피부자극에 문제가 없으면서도 가장 높은 농도의 양인 10%(본 사용량이 고형분 농도 0.1%가 됨)를 그대로 유지하기로 하였다.

한편 본 제품에 미백, 항산화 및 노화방지 뿐만 아니라 상처치유 및 회복효과와 같은 기능성을 부여하기 위하여 귀리에서 추출한 베타글루칸인 Immunocan OBG를 첨가하였다.

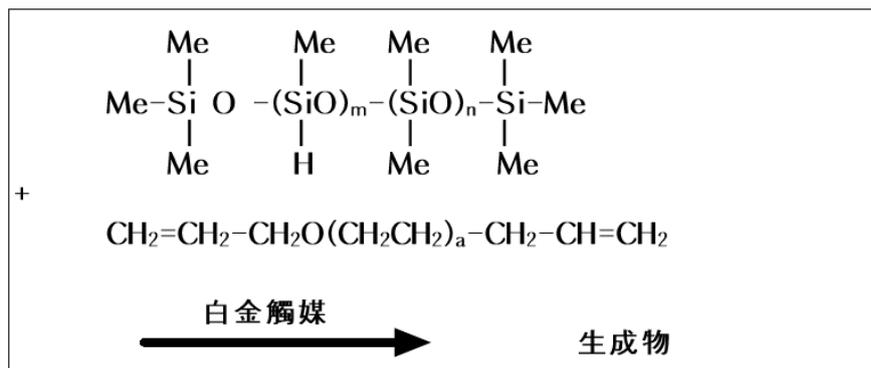


그림 81. silicone crosspolymer 합성.

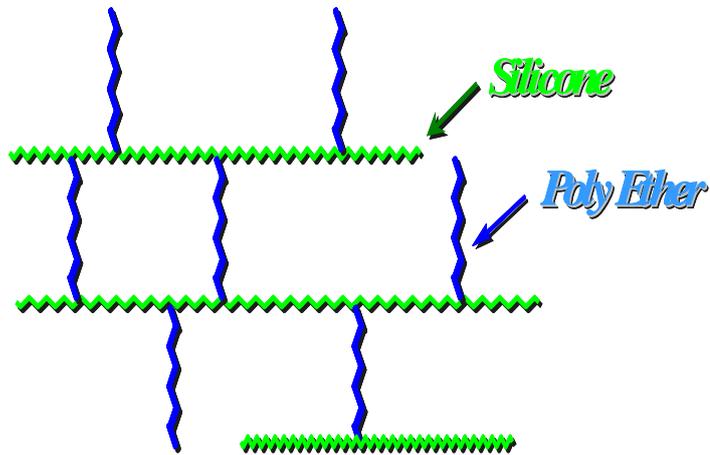


그림 82. Silicone crosspolymer의 개념도.

표 29. 2차 안정도 조정실험

		CM-15	CM-1 6	CM-1 7	CM-1 8	CM- 19	CM- 20	CM-2 1	CM- 22	CM- 23
1	Cyclomethicone	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	PPG-15 stearyl Ether	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
	Dimethicone/vinyl dimethicone (and) Polyether Crosspolymer	1.0	3.0	5.0	7.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
	Dimethicone	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	Nano-coenzyme Q10	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2	Water	to 100								
	BG	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	WS-1%	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	1.0	3.0	5.0	7.0
	Preservatives	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

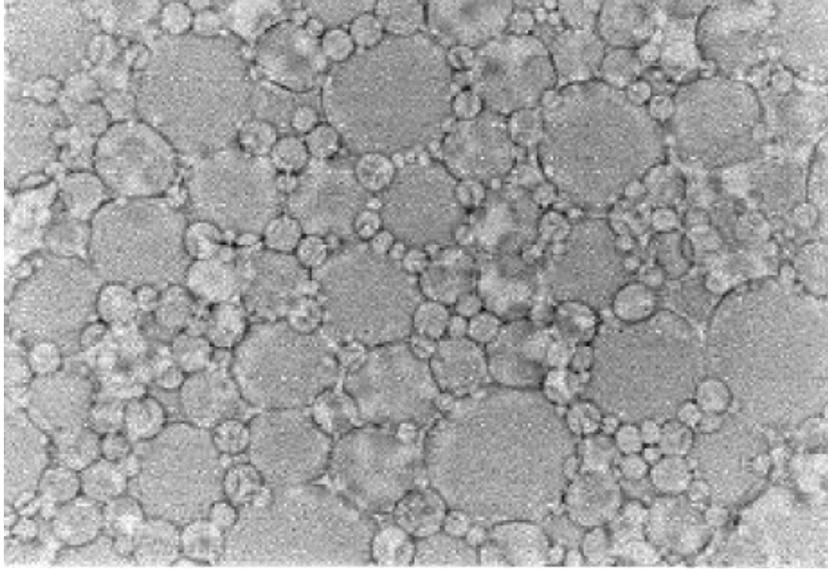
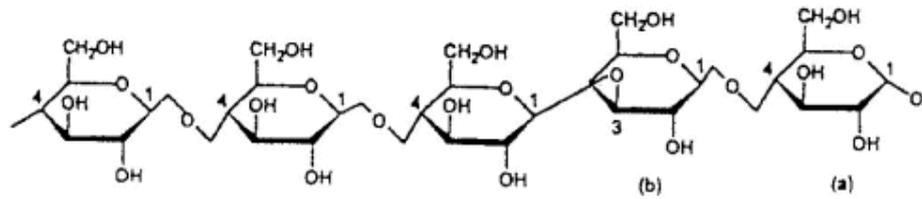


그림 83. 물 입자가 불잡혀 있는 상태.



M.W.: 10,000 ~ 30,000

그림 84. 귀리에서 추출한 베타글루칸 Immunocan OBG.

3) 세럼(serum)

일반 화장품 보다 효능효과 위주로 더욱 강력한 제품인 스킨 세럼의 개발이 필요하다 고 여겨져 다음과 같은 실험을 하였다. 주 원료는 순수 비타민 C와 WS-1 을 복합 처방하여 개발할 경우, 기존의 비타민 C 제형의 문제점인 즉시 변질되어 버리는 단점을 보완하고 즉효성과 지속성이 있으며 상호 보완작용으로 미백효

과가 더욱 뛰어난 제품을 개발 할 수 있으리라 여겨져 실험을 실시하게 되었다. 이 처방에 사용되어진 주요 원료들은 다음과 같다. Ascorbic acid, azelaic acid, salicylic acid, WS-1 한방복합추출물(OM Cocktail CW), BG, Hydrogenated castor oil, 에탄올, D-EDTA.

본 원료들을 상호 조합하여 비타민C를 안정화하고 WS-1과의 적절한 균형을 이루어 기존의 순수 비타민 C의 단점인 안정성을 보완하여 제품화 하였다.

표 30에 기본 제형을 나타내었다. SS-1부터 SS-5까지의 처방을 테스트 한 결과, ascorbic acid 의 함량 10%는 자극성도 강하고 전체적으로 안정도가 좋지 않았다. Ascorbic acid와 WS-1 두 물질의 미백 상승효과를 최대화하기 위하여 테스트 한 결과, ascorbic acid의 함량은 8%, WS-1은 20%에서 Tyrosinase 활성억제 및 미백효과가 가장 적합할 것으로 예상되었다.

표 30. 스킨 세럼 제조를 위한 기본 제형

		SS-1	SS-2	SS-3	SS-4	SS-5	SS-6	SS-7	SS-8	SS-9
1	Water	to 100								
	Ascorbic acid	1.0	3.0	5.0	7.0	10.0	8.0	8.0	8.0	8.0
	WS-1	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
	한방복합추출물	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	Butylene Glycol	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	pH 조정제	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	-	0.5	1.0	1.5
2	Ethanol	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	Azelaic acid	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Salicylic acid	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Hydrogenated castor oil	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Perfume	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

표 31. pH 조정시험

	SS-6	SS-7	SS-8	SS-9
pH	2.8	4.2	5.0	6.0

pH와 피부 자극도를 체크한 결과 pH 조정제를 사용하지 않은 모든 제품에서 자극도를 나타내었다. 이는 ascorbic acid 자체가 매우 강한 산이어서 자극을 주는 것으로 pH 조정제를 사용하지 않으면 안 되었다. Ascorbic acid 8.0% 함유할 때 pH 조정실험을 표 31과 같이 조정하여 실시하였다.

피부 자극도를 테스트한 결과 SS-6의 경우 심한 피부 자극도가 나타났으며 SS-7의 경우에도 피부 자극도가 꽤 높았다. 그러나 SS-8과 SS-9의 경우 자극도가 거의 없었다.

표 32의 SS-10에서 SS-14의 처방에서 에탄올 함량 조정 실험한 결과 자체 안정도는 함량이 높은 20% 정도가 가장 좋았으나 피부자극이 있어 선호하지 않았다. 5%의 경우는 안정도와 상쾌한 감촉이 떨어져 그다지 선호되지 않았다. 따라서 가장 적합한 에탄올 사용량은 8.0%로 생각되었다.

SS-15에서 SS-18의 실험에서는 azelaic acid와 salicylic acid의 함량 조정실험을 실시한 것이다. 두 원료 모두 안정도에 영향을 미쳤다. 즉 두 성분 모두 알코올 용해도가 높아 시간이 지날수록 침전이 생겨 양을 줄일 필요가 있었다. 그 결과 각 0.5%에서, hydrogenated castor oil의 함량을 늘여야 안정한 제품을 얻을 수 있다는 것을 알 수 있었다. 그러나 여전히 장기 안정성에서는 문제가 있는 것으로 생각되었다.

표 32. 기타 첨가제 조정시험

		SS-10	SS-11	SS-12	SS-13	SS-14	SS-15	SS-16	SS-17	SS-18	
1	Water	to 100									
	Ascorbic acid	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	
	WS-1	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	
	한방복합추출물	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	
	BG	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	
	D-EDTA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1
	pH 조정제	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
2	Ethanol	5.0	8.0	10.0	15.0	20.0	8.0	8.0	8.0	8.0	
	Azelaic acid	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	1.0	0.5	0.5	
	Salicylic acid	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.5	0.5	0.5	
	Hydrogenated castor oil	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
	Perfume	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	

제품의 고농도화로 인하여 저온에서 비타민 C와 WS-1 간에 침전 현상이 일어나 안정도를 유지시키기가 매우 어려웠다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 금속이온 봉쇄제인 D-EDTA를 첨가한 결과, 두 물질간의 반응에 의한 상호 침전 현상을 개선시킬 수 있었다.

이와 같이 처방하여 테스트 한 결과, ascorbic acid와 WS-1 두 원료의 복합 상승효과에 의한 미백효과 뿐만 아니라 고농도의 순수 비타민 C(처방에 8% 함유) 배합에 의한 우수한 콜라겐 생성 촉진효과로 강력한 보습효과가 확인되었으며 azelaic acid와 salicylic acid에 의한 항 여드름 효과도 우수하였다.

이상과 같이 다양한 세럼 조성물에 pH 조정제를 이용하면 비타민 C를 안정화시켜 그 효과를 극대화시킬 수 있을 뿐만 아니라 복합 상승 미백효과와 보습효과를 동시에 기대할 수 있는 제품의 개발에 성공하였다.

마. 시제 화장품의 피부 적용시험

상술한 것처럼 다양한 실험을 통하여 스킨 앳센스, 크림 및 세럼의 3종류를 개발하고 이를 40 - 60(주로 40대 여성을 대상)대 여성을 대상으로 이들 화장품의 효과를 검토하고 자 하였다. 피험자는 전북대학교 직원, 전주시 거주자를 20명을 대상으로 실시하였다. 시험은 피부 유수분, 탄성, 멜라닌/홍반, 주름 및 화상관찰을 실시하여 이들을 종합 평가하고자 하였다.

1) 피부 유수분

피지선 혹은 각질층으로부터 유래하는 피부의 지질막은 피부생리를 유지하는데 필수적이거나 지나치게 많이 생성되는 유분은 여드름 및 지루 피부염 등과 관련된다. 따라서 이러한 유분의 정확한 측정의 피부상태를 파악하는데 큰 도움이 된다. Sebumeter는 특수한 반투명 지질 흡수데이프를 피부에 부착한 후 묻어나오는 피지량을 광학적 반사원리로 측정하는 기기이다. 이를 이용하여 20명의 피험자들을 세안 시키고 30분간 항온항습실에 있게 한 후 유분량을 측정한 결과를 표 33에 나타내었다. 본 실험에는 유분 측정을 위하여 관자놀이 또는 눈 아래쪽 부분을 측정하였다. 피험자 대부분의 유분은 10이하로 매우 낮고 이는 뺨이나 관자놀이 등의 정상 수치인(여기서는 나타내지 않았음) 40 - 90의 1/10정도에 불과하였다. 이러한 이유는 피험자들이 본 유분 측정 전 세안을 한 것과 세안 후 30분 정도밖에 시간이 흐르지 않아 충분한 유분이 공급되지 않았기 때문으로 사료

된다. 따라서 본 유분량으로 어떤 결론을 도출하기는 어려우나, 7주 후 유분의 변화는 매우 미미하여 본 화장품으로 인한 피부기능개선 효과를 판단하기는 어렵다는 것을 알 수 있었다. 본 실험 중 세안 후 30분경과 시 피부의 기능이 개선되어 충분한 유분이 유지될 것으로 생각되었으나, 대부분의 피험자들이 40이상의 중년 여성으로 자연회복능력이 매우 낮은 것도 한 가지 원인으로 생각되었다. 그림 1은 실험기간 중 유분 변화의 평균값을 그래프로 나타내었다. 본 그림에서 7주간의 실험기간 동안 피험자 20명의 유분 평균 값이 미미하게 증가하는 경향이 있으나, 유의성은 없는 것으로 판단되며, 효과를 판단하기 위해서는 별도의 실험이 필요할 것으로 판단되었다. 본 연구에서는 만들어진 화장품의 미백, 주름 감소 등의 기능성을 주로 검토하고 있으므로 더 이상의 실험 및 고찰은 생략하기로 한다.

표 33. Sebumeter로 측정된 각 피험자의 유분

피험자	유 분							
	0	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주
1. JS	2	1	2	2	2	1	2	2
2. JE	4	8	1	10	7	6	11	12
3. YZ	4	2	2	1	1	2	2	1
4. NS	2	1	3	1	1	1	1	2
5. KS	1	1	1	1	5	1	1	1
6. MR	5	1	3	2	4	2	8	9
7. KR	1	1	2	3	2	1	1	4
8. MS	3	1	1	2	1	1	1	1
9. YS	1	2	1	1	2	3	1	2
10. JR	4	2	2	1	6	21	11	2
11. HS	6	2	3	13	6	9	4	4
12. YH	3	2	3	1	5	22	2	1
13. HA	1	7	2	5	2	4	1	6
14. SJ	11	27	6	10	8	6	22	21
15. YR	6	3	7	6	10	1	5	9
16. OS	2	6	5	3	4	5	3	10
17. HS	5	5	3	3	2	3	2	18
18. SN	2	1	1	1	16	2	1	1
19. JH	4	2	5	5	6	6	3	8
20. YM	5	8	16	9	21	7	27	9
평 균	4	4	3	4	6	5	5	6

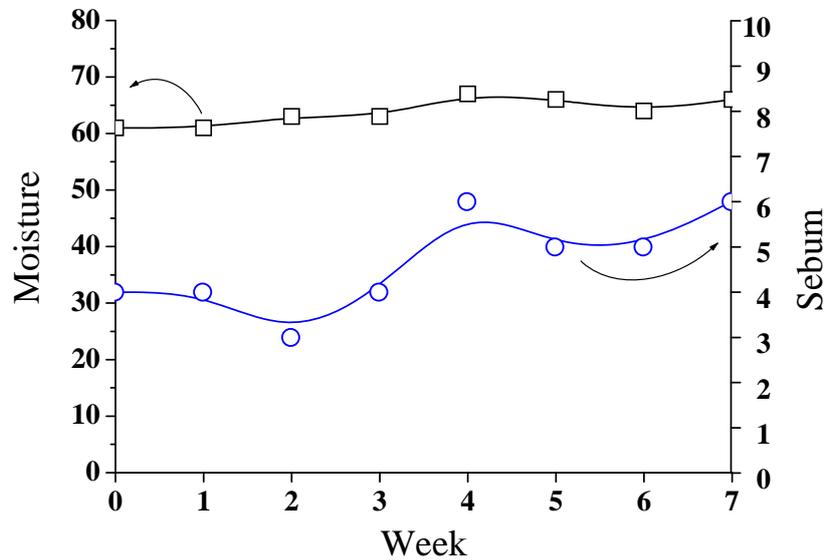


그림 85. 피부 유수분 함량의 경시변화.

표 34는 Corneometer로 측정한 각 피험자들의 보습정도를 나타내었다. 피부 보습도는 피부 표면에 접촉하는 probe를 통하여 전달되는 미미한 전류의 정전부하용량 계측을 통하여 이루어진다. 피부의 보습정도가 높으면, 본 수치가 높아지므로 피부의 습윤 상태를 용이하고 빠르게 파악 할 수 있다. 피험자 대부분의 보습도는 50 - 70 정도였으며, 본 수치는 표 35에 나타난 참고 자료로부터 판단해보면 적절한 피부 습윤 상태라는 것을 알 수 있다. 일부 피험자의 경우 매우 높은 보습도를 가지고 있기도 하였지만, 대부분 세안 후 30분이면 상기 유분과는 달리 적절한 습윤 상태로 돌아오는 것을 알 수 있었다. 실험 7주간 보습도는 약간 증가하는 경향이었으나, 유의성은 거의 없는 것으로 판단되었다. 즉, 본 화장품의 경우 피부의 자연회복력에는 큰 지장을 주지는 않는 것으로 판단되었다.

표 34. Corneometer에 의한 피부의 보습도

피험자	보 습 도							
	0	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주
1. JS	55	61	64	63	65	61	60	67
2. JE	59	62	75	69	71	65	72	68
3. YZ	60	57	57	55	52	63	62	59
4. NS	65	65	63	57	56	61	64	66
5. KS	57	59	65	62	60	61	62	62
6. MR	56	52	60	60	63	62	60	57
7. MS	74	57	62	60	66	66	70	61
8. KR	70	68	72	71	73	70	63	84
9. YS	60	58	59	59	68	70	52	63
10. JR	55	60	56	58	69	73	73	62
11. HS	52	57	46	63	68	46	51	59
12. YH	58	54	47	53	67	70	67	54
13. HA	49	62	58	54	55	57	48	60
14. SJ	55	47	58	61	66	69	62	61
15. YR	73	69	67	71	68	72	76	83
16. OS	51	64	71	64	73	66	63	65
17. HS	71	73	66	68	82	73	76	86
18. SN	64	63	66	64	70	68	67	64
19. JH	65	60	62	62	63	65	63	71
20. YM	74	79	80	76	81	80	78	75
평 균	61	61	63	63	67	66	64	66

표 35. Corneometer 측정 결과 해석을 위한 참고 자료

측정 부위 타입	이마, T존, 머리피부, 뺨, 눈꺼풀, 관자놀이, 입 가장자리, 상반신, 등, 목 부위	팔, 손, 다리, 팔꿈치
매우 건조	< 30	< 15
건조	30-49	15-29
보습	50-59	30-39
충분히 보습	> 60	> 40

표 36. Cutometer에 피부 탄성 측정 결과

피험자	피부 탄성							
	0	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주
1. JS	0.56	0.53	0.68	0.62	0.65	0.60	0.61	0.61
2. JE	0.49	0.48	0.55	0.62	0.52	0.572	0.62	0.76
3. YZ	0.60	0.61	0.52	0.48	0.64	0.45	0.54	0.57
4. NS	0.43	0.52	0.64	0.53	0.57	0.52	0.55	0.62
5. KS	0.57	0.55	0.54	0.56	0.53	0.55	0.56	0.52
6. MR	0.53	0.38	0.42	0.45	0.49	0.51	0.50	0.49
7. KR	0.65	0.67	0.57	0.66	0.58	0.65	0.62	0.61
8. MS	0.63	0.52	0.61	0.54	0.45	0.55	0.58	0.58
9. YS	0.55	0.57	0.65	0.58	0.59	0.55	0.58	0.63
10. JR	0.63	0.63	0.53	0.59	0.48	0.62	0.63	0.46
11. HS	0.55	0.41	0.60	0.60	0.56	0.53	0.52	0.66
12. YH	0.65	0.54	0.50	0.58	0.63	0.58	0.48	0.55
13. HA	0.76	0.71	0.64	0.66	0.65	0.65	0.66	0.65
14. SJ	0.57	0.58	0.53	0.48	0.48	0.57	0.61	0.57
15. YR	0.59	0.52	0.60	0.54	0.60	0.57	0.54	0.64
16. OS	0.46	0.51	0.57	0.48	0.51	0.48	0.62	0.50
17. HS	0.54	0.55	0.46	0.51	0.46	0.58	0.62	0.59
18. SN	0.56	0.52	0.41	0.45	0.54	0.52	0.53	0.57
19. JH	0.58	0.35	0.48	0.50	0.49	0.38	0.42	0.53
20. YM	0.62	0.57	0.65	0.66	0.58	0.62	0.73	0.62
평균	0.58	0.54	0.56	0.55	0.55	0.55	0.58	0.59

2) 피부 탄성

Cutometer의 장비내부에 음압이 발생되고 피부는 probe안의 작은 구경으로 빨려들어간다. 이때 피부는 원래의 형태로 되돌아가려고 하는 성질이 있으므로 그림 86의 측정 예처럼 끝부분이 커브형태로 디스플레이 된다. 탄성 값은 표 36의 수치가 1에 근접하면 가장 이상적이며, 피부가 젊어 진피층을 구성하는 콜라겐 및 엘라스틴의 네트워크가 잘 이루어진 상태로 볼 수 있다. 피부의 탄성이 좋아진다고 하는 것은 간접적으로 피부를 구성하는 요소 즉, 콜라겐 및 엘라스틴과 같은 피부 요소가 증식하거나 더 이상 콜라게나제, 반응 활성 산소종 등으로부터 저항한다는 사실을 간접적으로 예상할 수 있다. 처음 측정일부터 8주간 실험이 결코 긴 시간이 아니기 때문에 피부의 탄성을 충분히 관찰하기에는 부족한 면이 있었으나, 실험기간 중 탄성에 있어서 큰 차이를 나타내지 않은 것은 본 화장품이 피부 탄력을 좌우하는 구성요소에 해가 되지는 않았음을 간접적으로 의미한

다. 그림 87은 Cutometer로 측정된 피험자 20인의 피부탄성의 평균치에 대한 경시변화를 나타내었다.

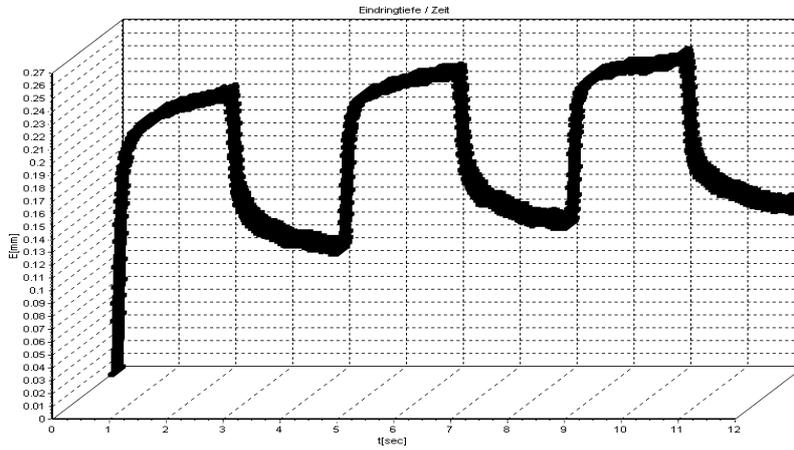


그림 86. Cutometer로 피부 탄성 측정시의 파형.

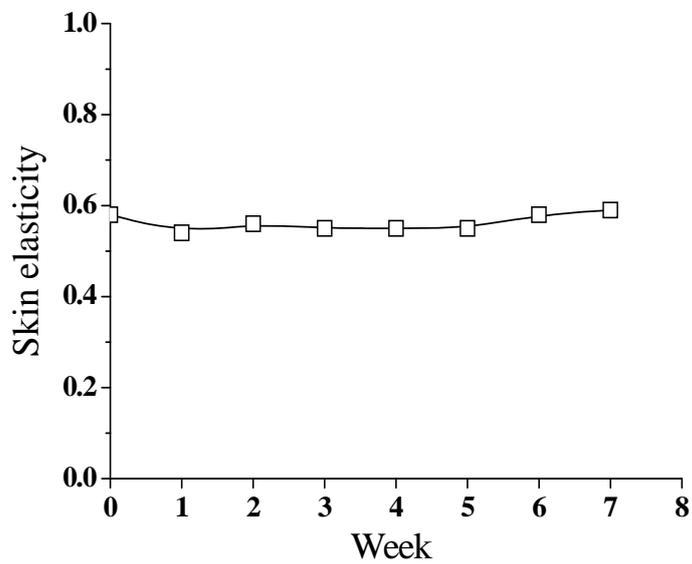


그림 87. Cutometer로 측정된 피부 탄성 경시변화.

3) 멜라닌/홍반

피부 색조는 멜라닌과 혈색소의 함량과 분포에 의하여 결정된다. Mexameter는 피부색조 분석에서 가장 적합한 멜라닌과 혈색소에 대응하는 서로 다른 3종의 파장대를 갖는 다이오드가 16개 배치된 센서 probe를 가지고 있어 화장품의 미백효과, 색소병변의 레이저 치료에 따른 효과판정에 매우 유리하다. 본 연구에서도 화장품의 미백효과를 판정하기 위하여 본 probe를 사용하였다. 측정된 결과는 표 37에 나타내었다. 동양인의 경우 분류표(표 38)에 나타낸 것처럼 아시안 인디안 형으로 대부분의 피험자들의 멜라닌 수치는 유럽혼합형 및 지중해 형으로 아시안/인디안 형보다는 매우 낮았다. 일부 7, 9, 10, 11, 13, 20의 경우는 심한 색소 침착부위가 있어 특이하게 높은 수치를 나타낸 것으로 이들에게 본 시제화장품의 미백효과를 확인하고자 특히 주의를 기울여 조사하였다.

표 37. Mexameter로 측정한 멜라닌/홍반 분석 결과

피험자	멜라닌/홍반							
	0	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주
1. JS	103	100	111	101	101	99	110	107
2. JE	121	138	114	90	91	115	118	110
3. YZ	119	151	121	116	81	110	122	117
4. NS	128	147	116	141	97	119	121	104
5. KS	147	184	158	159	153	159	132	143
6. MR	160	164	162	156	135	140	154	137
7. KR	251	167	137	137	125	123	144	141
8. MS	113	95	93	106	102	99	92	94
9. YS	269	340	268	267	252	251	242	241
10. JR	202	202	176	162	165	165	158	184
11. HS	232	200	207	235	180	166	199	185
12. YH	182	167	165	100	90	74	94	99
13. HA	212	179	138	122	129	136	131	120
14. SJ	199	128	91	74	57	72	77	73
15. YR	153	139	123	126	123	137	131	114
16. OS	187	188	184	186	176	174	169	159
17. HS	154	132	104	103	130	128	114	100
18. SN	173	182	162	165	178	144	164	161
19. JH	198	274	212	201	193	152	160	153
20. YM	256	240	227	235	229	219	218	198
평균	178	176	153	149	139	139	142	137

표 38. Mexameter에 의한 피부색조 측정 결과 해석을 위한 인종 분류 참고 자료

타입	분류	평균 멜라닌 함량
I	Celtic형	0-49
II	Caucasian형	50-99
III	유럽 혼합형	100-149
IV	지중해형	150-199
V	아시안/인디안형	200-299
VI	흑색피부형	300-999

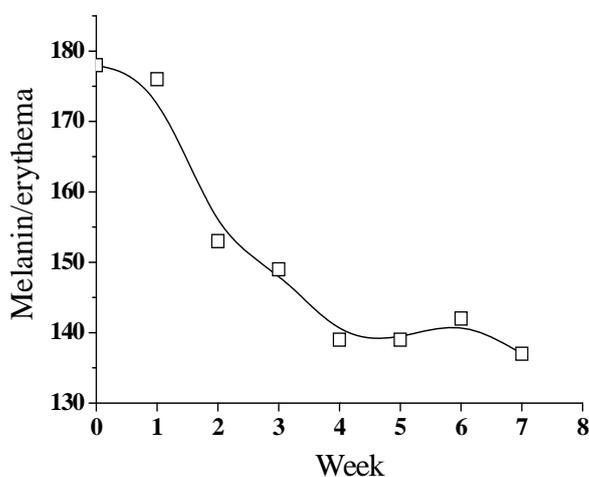


그림 88. 멜라민/홍반의 경시변화.

멜라민/홍반 수치는 은 그림 88에 나타난 것처럼 약 4주까지 급격히 떨어졌으며, 이후에는 큰 변화가 없었다. 이것은 피부 장벽이 약 4주에 거의 완전히 교체되므로 미백효과도 4주간의 시험에서 가장 높이 나타난 것으로 생각되었다.

색소 침착이 심한 피험자를 대상으로 화장품 시험 전 및 8주 후의 화상 결과를 나타내었다(사진 3). 본 사진에 나타난 것처럼 동일 부위의 색소 침착부위가 많이 사라졌으며, 전체적으로 많이 밝아진 것을 확인 할 수 있다. 즉, 본 시제 화장품은 뛰어난 미백효과가 있는 것이 확인 되었다. 이것은 arbutin의 효과도 생각되었지만, 소나무 수피 PA의 경우 melanoma 셀의 축수를 위축시켜 멜라닌 전이를 막기 때문에 그 효과가 증가한 것으로 사료되었다. 앞으로 본 사실을 증명하기 위해서는 앞으로 arbutin 무첨가구를 실험해야 할 것으로 사료되었다.



(시험 전)

(시험 8주 후)

사진 3. 시험 전 후 피부의 색소 침착상태.

4) 주름개선 효과

피부표면 영상분석 측정기법은 피부의 변화를 직접 관찰하는 데에 필수 불가결한 연구방법이나 과거부터 일반적인 광학영상 확대 관찰 장치가 사용되고 있다. 통상의 halogen 광원을 이용하여 확대영상으로만 관찰되는 피부의 변화는 실제 측정조건과 차이가 많을 뿐 아니라 피부주름의 정확한 측정에는 한계가 있어 실제 시험조건에서는 replica를 사용한 profilometry가 유용한 방법이나 laser profilometry 조차도 한 개의 샘플을 처리하는데 많은 시간이 소요된다. 따라서 짧은 시간에 많은 replica 샘플을 처리할 수 있는 측정기법인 Skin Visiometer를 본 연구에 사용하였다. 본 기기는 특징은 특별한 광원이 통과되도록 제작된 표준 카트리지에 푸른색의 실리콘 replica로 얻은 피부주름 형틀을 끼우고 프로그램을 구동시킨 후 화면상의 특정부위를 선택하여 주름의 깊이와 형태를 객관적으로 평가할 수 있다(그림 89).

본 연구에서는 본 기기의 다양한 측정 모드 중 피부 거칠기 측정 모드를 선택하여 R1에서 R5값을 구하여 피부결의 상태를 검토하였다. 즉, 실험 방법에서도 언급한 것처럼 R1은 피부 거칠기를 나타내며, 선택된 이미지 안에서 최고 봉우리의 값과 가장 낮은 골 값과의 차이를 나타내는 값이다. R2는 평균 거칠기로 동일한 길이로 5등분한 이미지 조각들의 R1 값 중 가장 높은 값이다. R3는 최대 거칠기를 나타내며, 동일한 길이로 5등분된 각 이미지 조각들의 R1 값에 대한 평균값이다. R4는 평활 깊이로 최고 봉우리까지 선을 그었을 때 중앙라인을 형

성하여 최고 봉우리 값과 중앙선과의 차이 값이다. 마지막으로 R5는 산술적인 평균거칠기로 R4에 대한 reference profile의 중앙 표준편차이다. 측정되는 parameter들은 전체적인 피부결의 상태를 energy, variance, contrast 지수와 함께 통합적으로 평가할 수 있다(그림 90).

표 39에 6명의 피험자에 대한 R1 - R5값에 대한 7주간의 결과를 나타내었다. Replica의 제작 미숙 및 분석을 의뢰한 관계로 20명의 피험자 중 14명에 대한 초기 결과를 얻지 못하였다. 분석 가능한 6명에 대한 처음 출발 시 및 7주 후의 결과에 대한 평균값을 구해보면 각각의 대응하는 R1 - R5값은 모두 감소하였다. 즉, 본 시제 화장품의 경우 7주간의 처리에 의하여 확실한 주름 개선이 있는 것으로 생각되었다. 그러나 20명중 6명에 대한 평균이므로 본 결과로 주름 효과를 충분히 설명하기 어렵다고 판단하여 실험 2주 및 7주간 실험에 성공한 5명의 결과를 표 40에 나타내었다. 처음 결과는 없지만, 2주 및 7주 후의 R1 - R5 값을 비교해보면 본 결과 역시 2주보다 7주 후의 각 값이 매우 낮아 처음 출발 값이 없더라도 본 화장품의 주름 개선 효과를 충분히 파악할 수 있었다.

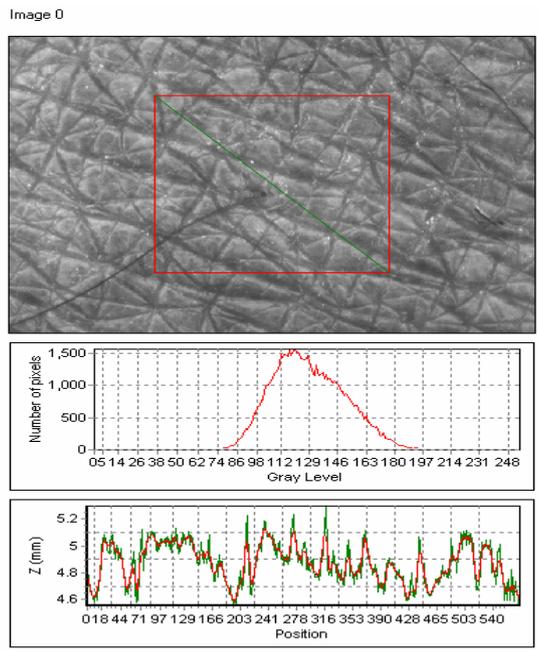


그림 89. Skin Visiometer 측정예.

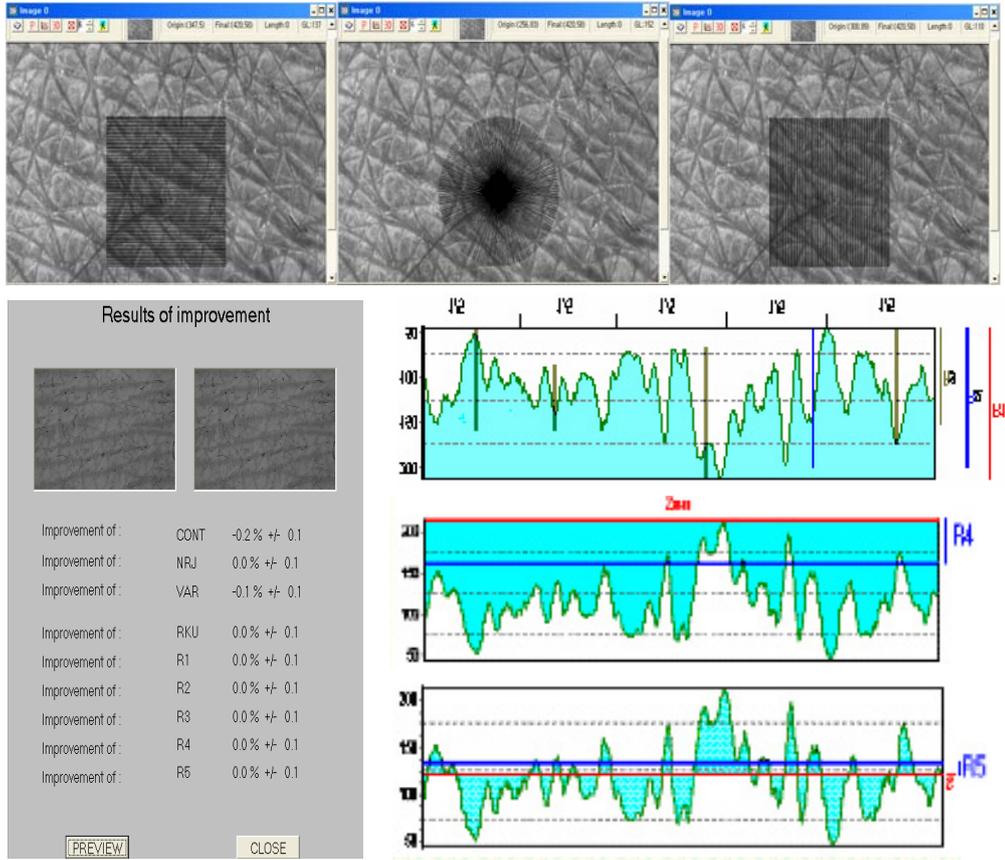


그림 90. Skin Visiometer로 피부 거칠기 측정 예.

표 39. Skin Visometer로 측정한 0 및 7주 후의 피부 거칠기

피험자	주 름									
	0					7주				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
1. YS	74.4	64.02	37.7	22.3	8.9	77.9	59.6	38.7	23.9	10.1
2. KR	79.0	57.4	39.1	30.7	13.3	70.4	61.8	36.0	18.4	6.2
3. YH	98.4	85.1	56.4	27.1	13.8	65.2	51.3	34.1	23.0	9.7
4. JE	86.2	58.5	36.6	37.5	13.4	62.0	50.2	33.6	20.4	8.4
5. HA	69.2	55.6	33.9	21.3	9.6	73.6	61.2	39.0	22.8	9.2
6. NS	69.1	46.1	28.8	27.5	12.9	61.8	48.8	28.2	19.6	9.1
평 균	68.0	53.8	38.8	23.8	10.7	68.5	47.7	30.7	18.8	8.1

표 40. Skin Visometer로 측정한 2주 및 7주 후의 피부 거칠기

피험자	주 름									
	2주					7주				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
7. MS	93.6	60.9	40.2	39.9	16.8	74.2	64.6	42.7	24.3	8.9
8. OS	69.0	46.9	33.3	32.2	12.3	64.9	54.3	29.8	21.8	7.6
9. HS	66.0	57.0	35.2	16.7	7.7	56.2	47.6	31.9	17.4	7.4
10.SN	99.9	84.2	60.7	41.3	15.1	70.0	59.4	40.2	24.7	10.0
11.YM	85.6	71.7	46.5	30.2	10.8	57.6	47.9	31.4	19.4	7.8
평 균	65.9	50.2	34.5	32.1	11.4	53.3	45.6	29.5	18.4	7.8

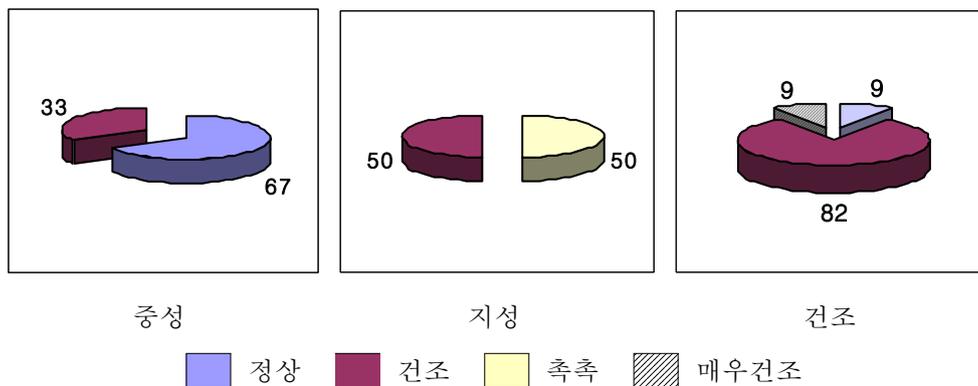
바. 시제 화장품 사용 후 설문지조사 결과

시제품의 적용시험 개시일로부터 8주째 피험자 20명에게 별지 2의 설문지를 나누어주고 회수한 설문지를 통계 프로그램을 가동하여 분석하였다.

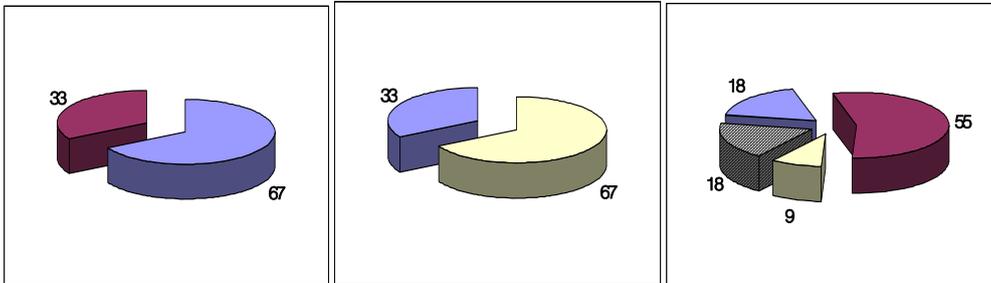
1) 피험자특징

피험자 20명에 대하여 피부 타입을 조사한 결과 중성, 건성 및 지성으로 나눌 수 있었다. 따라서 피험자의 특성분에서의 조사는 3가지 피부 타입을 기준으로 분석하였다. 대부분의 피험자들의 특징은 다음에 나타낸 일련의 파이 그래프처럼 본인의 피부 수분, 유분, 탄력성, 피부 두께, 민감성, 피부 표면 상태 등에 대하여 보통 또는 정상에 가깝다고 판단하였다. 이들 20명의 피험자들에 대하여 시제 화장품 사용 후의 사용감에 대하여 조사한 결과를 다음에 나타내었다.

피부수분(%)



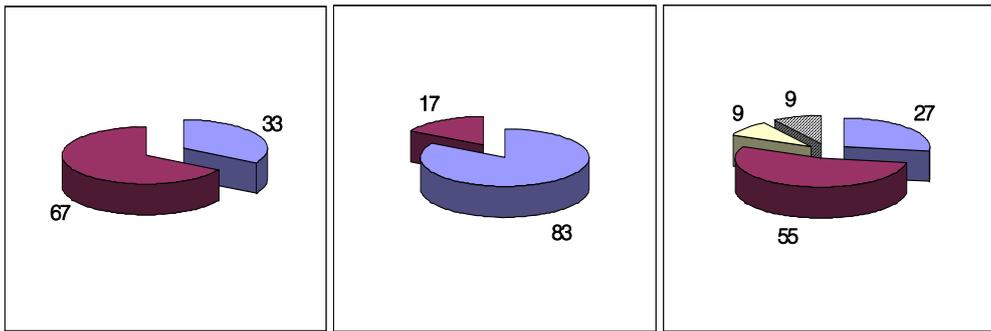
피부유분



중성 지성 건조

■ 정상
 ■ 약간부족
 ■ 많음
 매우부족

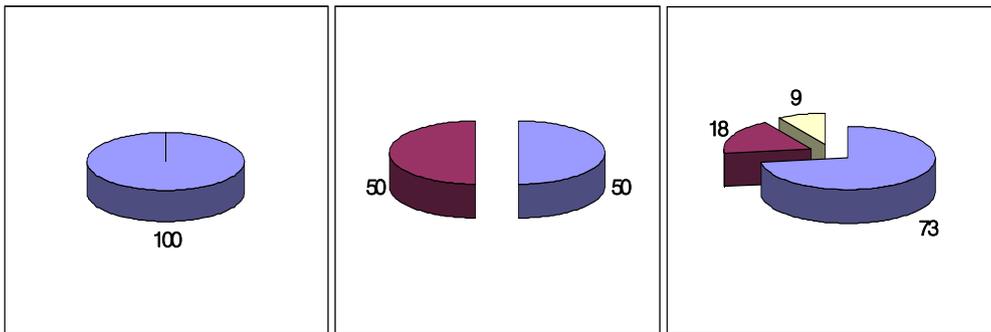
피부탄력성



중성 지성 건조

■ 보통
 ■ 약간부족
 ■ 매우부족
 매우탄력적

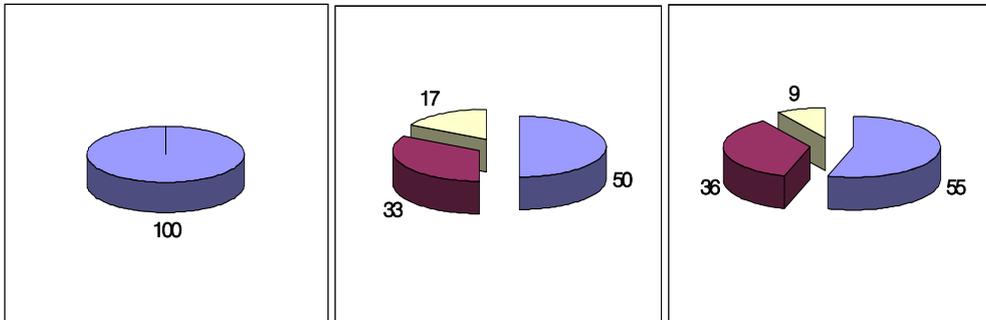
피부표면상태



중성 지성 건조

■ 보통
 ■ 매우부드러움
 ■ 약간 거침

피부두께



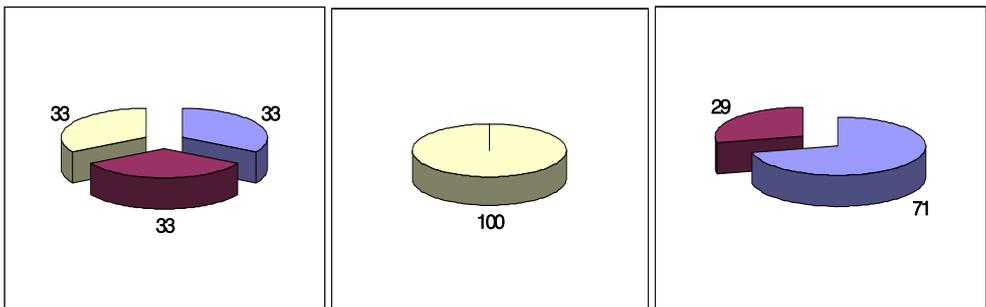
중성

지성

건조

보통 얇음 두꺼움

음주유무



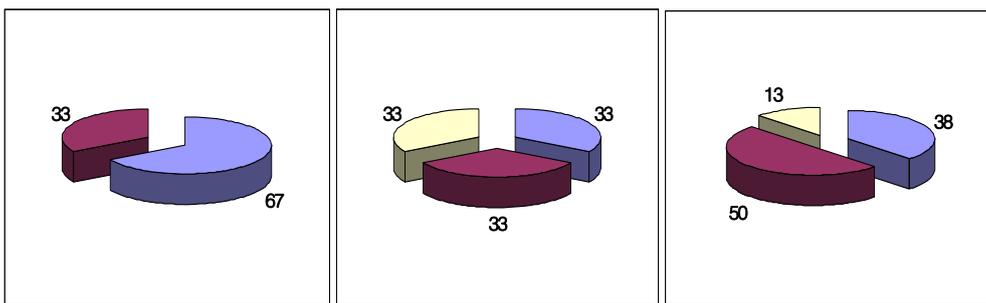
중성

지성

건조

금주 소주 반병 소주 한병

수분섭취량



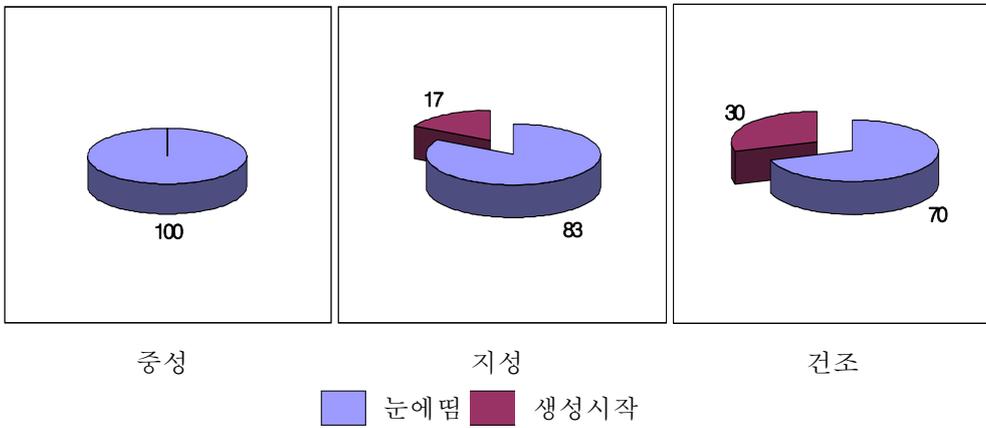
중성

지성

건조

0.5 L 1 L 1.5 L

피부주름생성정도



민감성여부

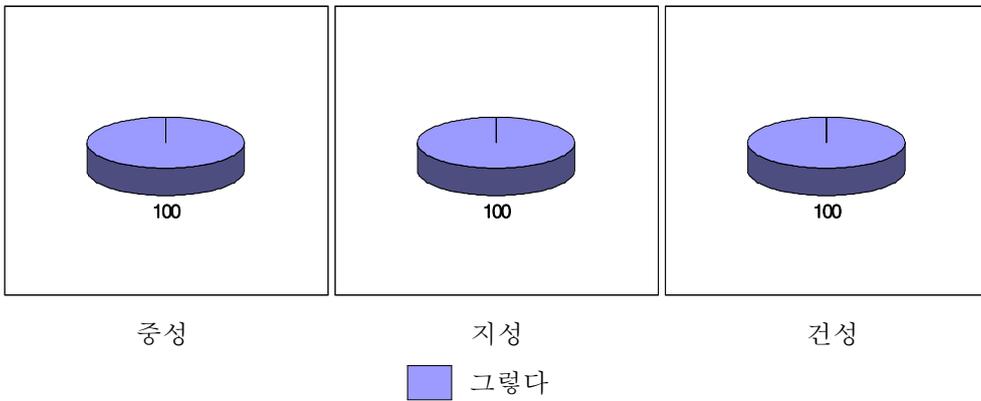


2) 사용감에 대한 설문평가

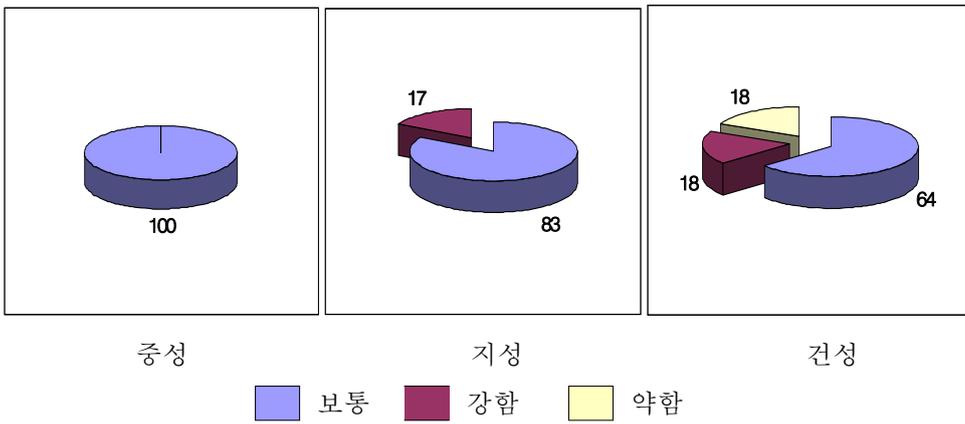
20명의 피험자들은 피부의 타입에 의하지 않고 7주 간 사용 후 본 시제화장품에 대하여 100% 만족하였다. 또한 제품의 향, 질감 등에 대해서도 대부분 매우 높은 만족도를 나타내었다. 특히 우려하였던 제품의 색상에 대해서도 높은 만족도를 나타내어 소나무 PA의 색상으로 인한 옅은 갈색 계통의 화장품의 출시는 큰 어려움이 없는 것으로 판단되었다. 이러한 이유는 본 시험에 참여한 피험자들의 시험 전 화장품에 대한 선호도 조사(여기서는 나타내지 않았음, 미공개 자료)

에서 좋은 피부 유지를 위하여 효과만 확실하다면 거의 맹목적으로 화장품을 구입하려는 성향과 화장품 색상에 거의 상관하지 않는다고 하는 사실로부터 증명될 수 있다. 따라서 앞으로 이러한 중노년층 여성들을 상대로 식물 유래의 고기능성 화장품의 진출은 화장품 색조와 관계없이 많은 수요가 있을 것으로 생각되며 그 전망 또한 밝다고 할 수 있겠다.

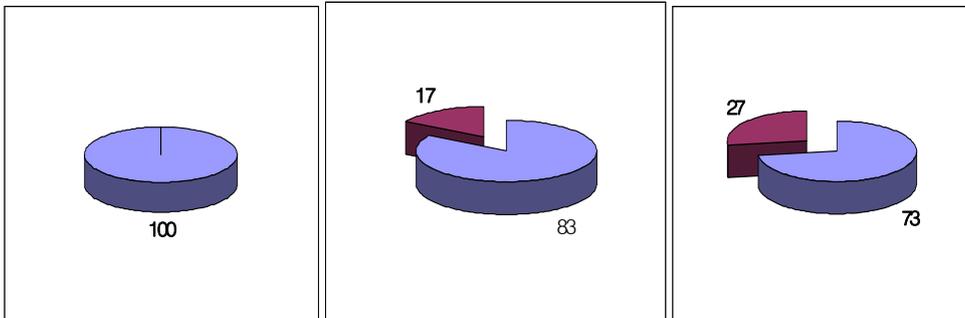
1. 제품에 대해 대체적으로 만족하십니까?



2. 제품의 향은 어떠하십니까?



3. 제품에 내용물의 질감은 마음에 드십니까?



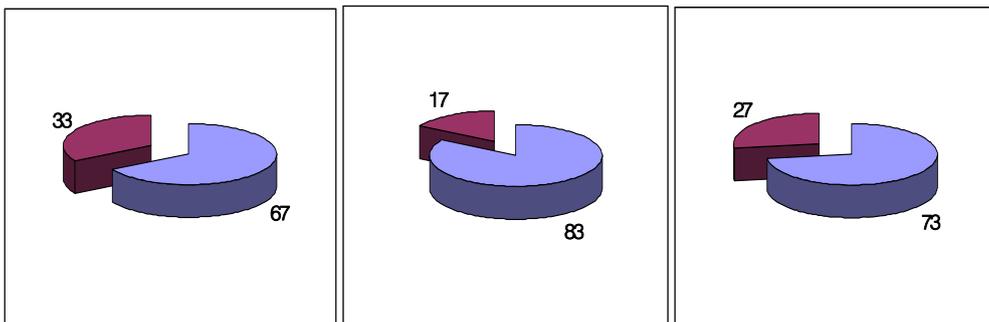
중성

지성

건성

예 아니오

4. 제품 내용물의 점도는 어떠하십니까?



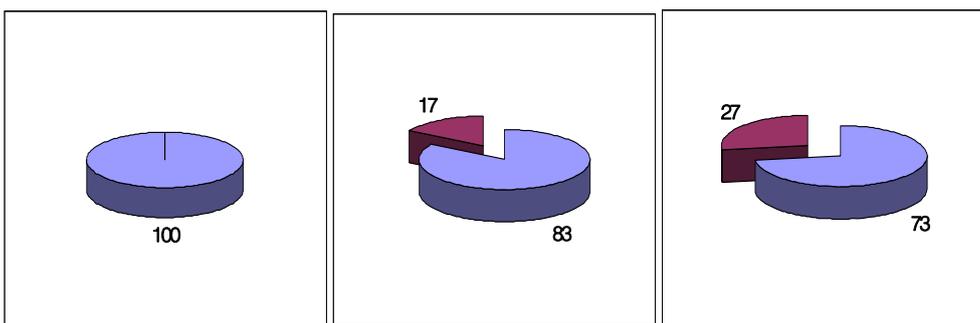
중성

지성

건성

적당하다 너무 묽다

5. 제품의 색은 마음에 드십니까?

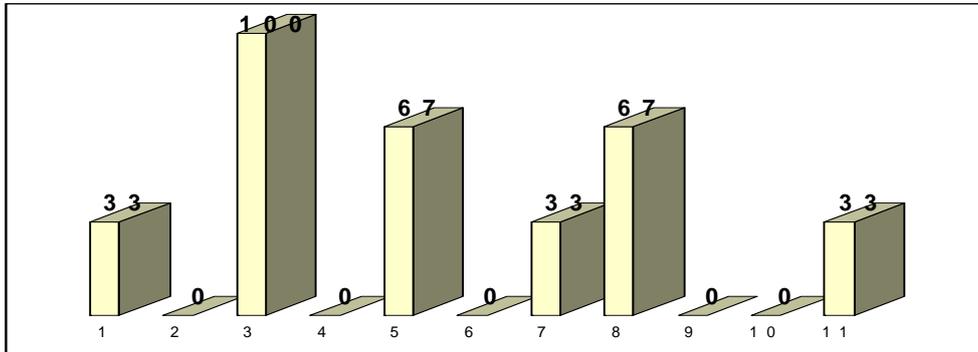


중성

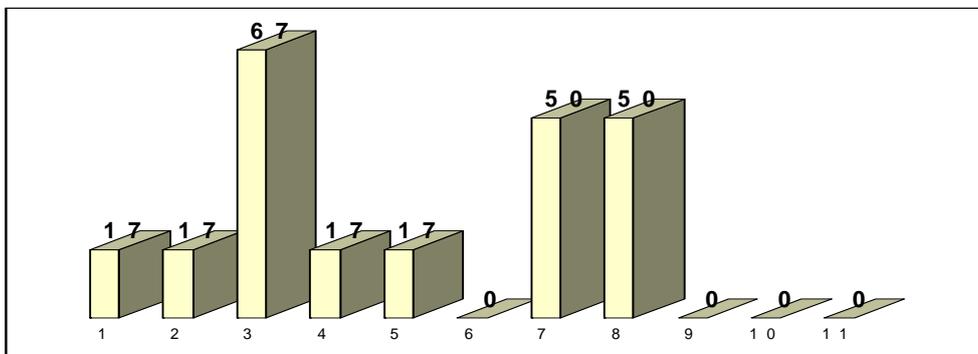
지성

건성

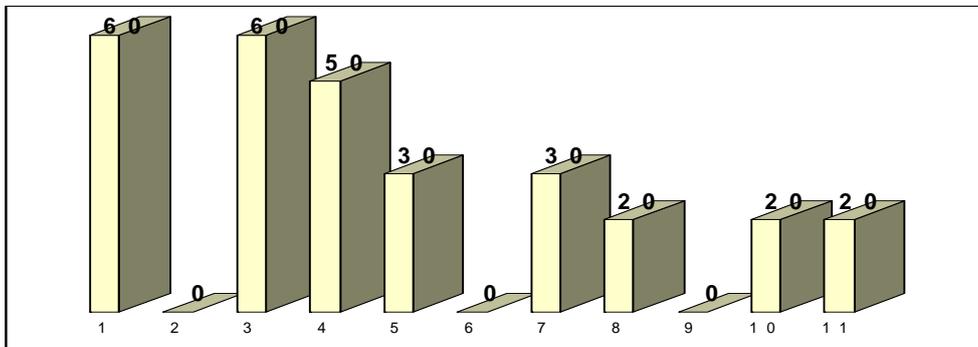
그렇다 그렇지 않다



중성



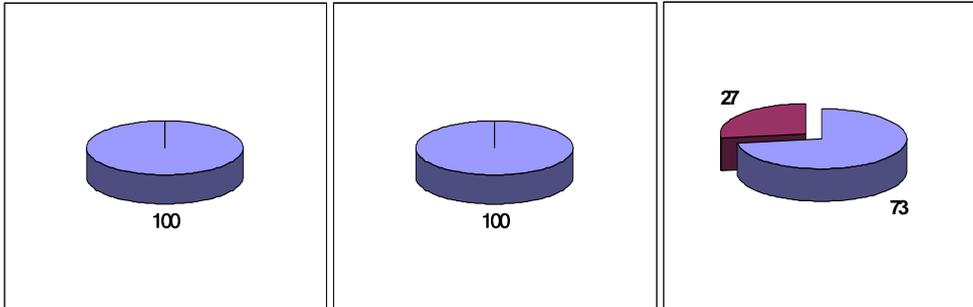
지성



건성

1. 끈적이다, 2. 무겁다, 3. 촉촉하다, 4. 미끈거린다, 5. 가볍다, 6. 뻑뻑하다, 7. 부드럽다, 8. 매끄럽다, 9. 매트하다, 10. 오일같다, 11. 왁스같다

7. 사용 시 제품이 썩 발라지는 정도는 어떻습니까?



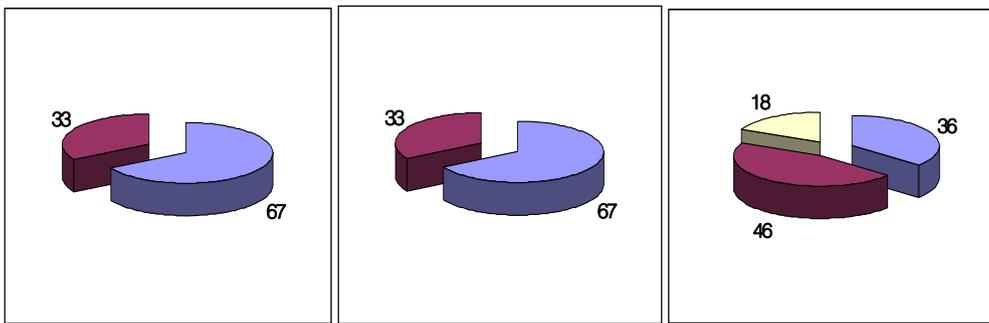
중성

지성

건성

알맞다 미끈거린다

8. 사용 시 제품이 피부에 빨리 흡수됩니까?



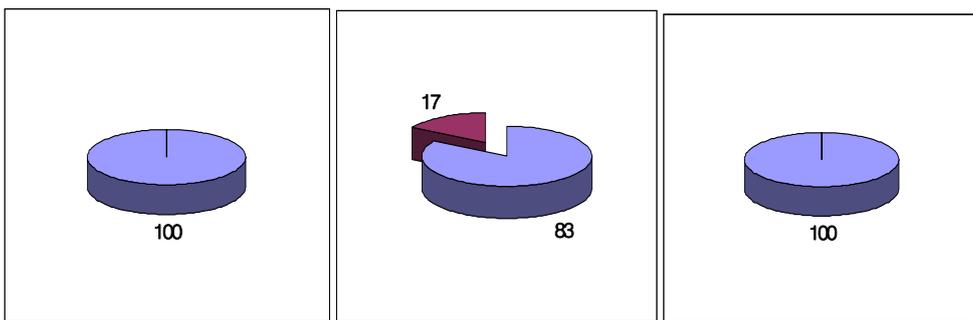
중성

지성

건성

알맞다 미끈거린다 별도 그렇지 않다

9. 사용 직 후 피부는 편안하십니까?



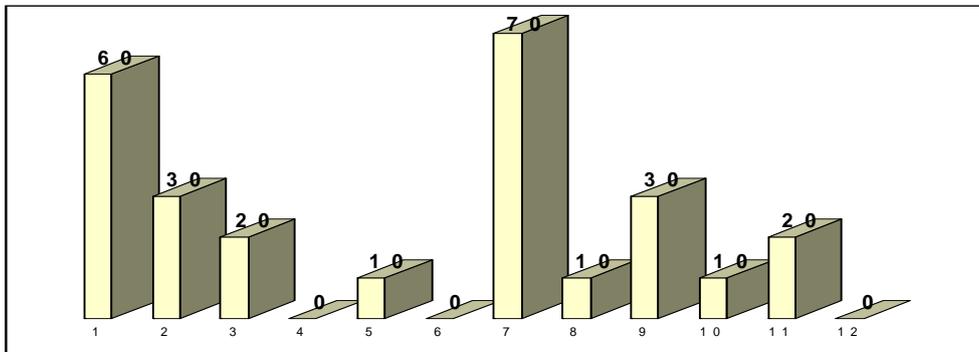
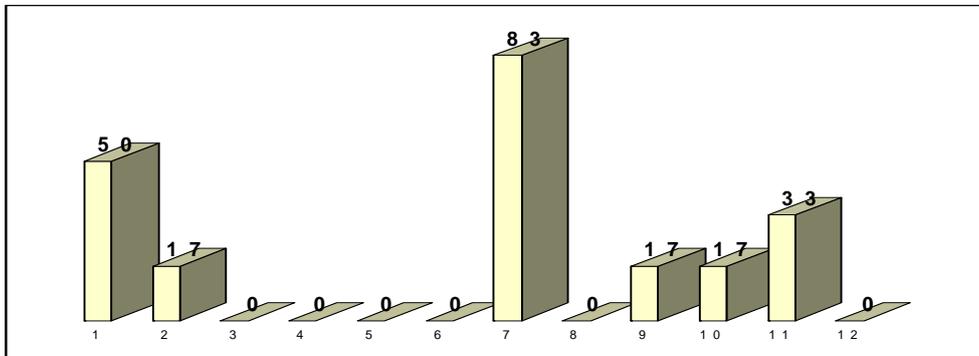
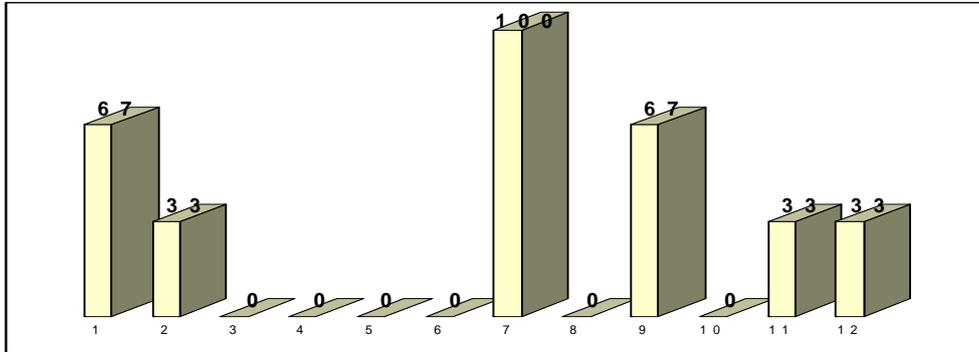
중성

지성

건성

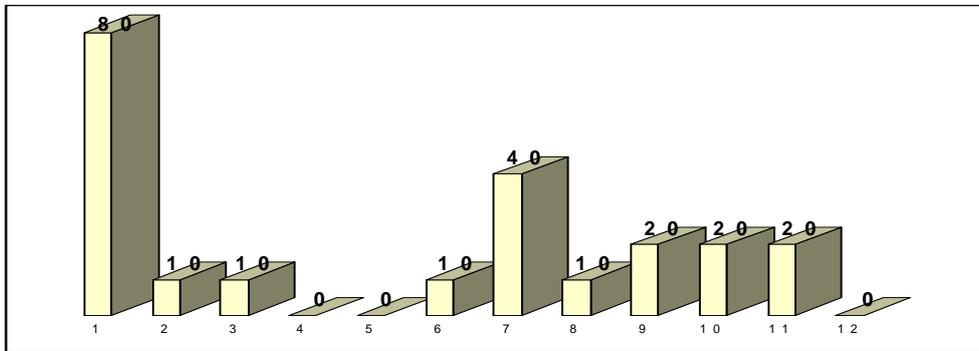
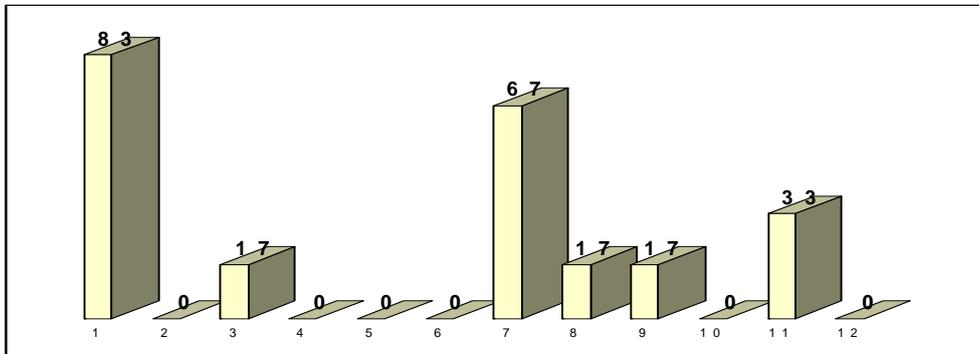
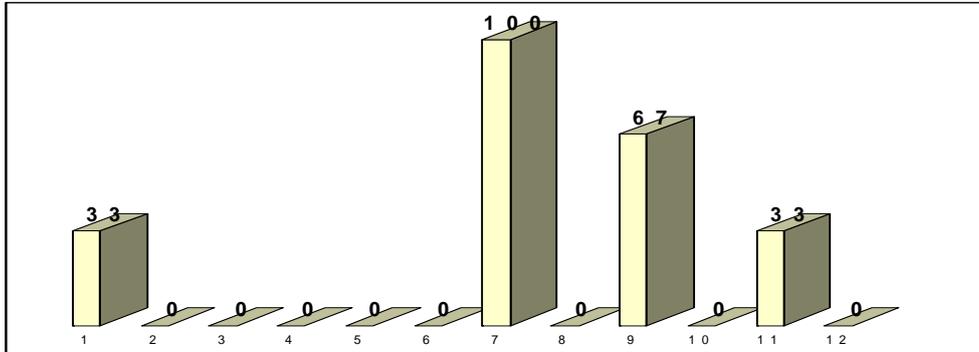
그렇다 그렇지 않다

10. 제품 사용 직후 피부의 느낌은 어떻습니까?



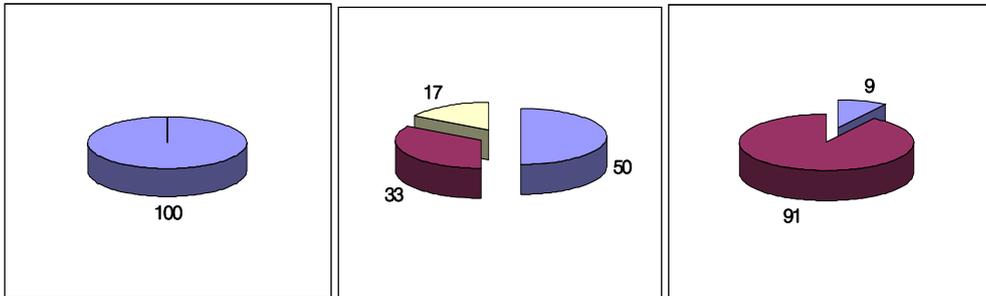
1. 매끄럽다, 2. 끈적이다, 3. 번들거린다, 4. 당긴다, 5. 답답하다 6. 뻣뻣하다, 7. 촉촉하다, 8. 무겁다, 9. 가볍다, 10. 건조하다, 11. 윤기가 난다, 12. 매트하다.

11. 제품 사용 다음 날 피부의 느낌은 어떻습니까?



1. 매끄럽다, 2. 끈적이다, 3. 번들거린다, 4. 당긴다, 5. 답답하다 6. 뻣뻣하다, 7. 촉촉하다, 8. 무겁다, 9. 가볍다, 10. 건조하다, 11. 윤기가 난다, 12. 매트하다.

12. 제품사용 후 피부가 부드러워졌습니까?



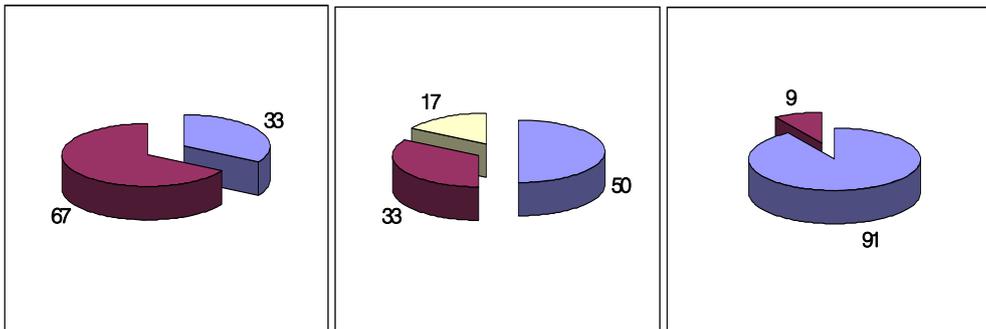
중성

지성

건성

■ 그렇다 ■ 그런 편이다 ■ 별로 그렇지 않다

13. 제품 사용 후 피부 결이 매끄러워졌습니까?



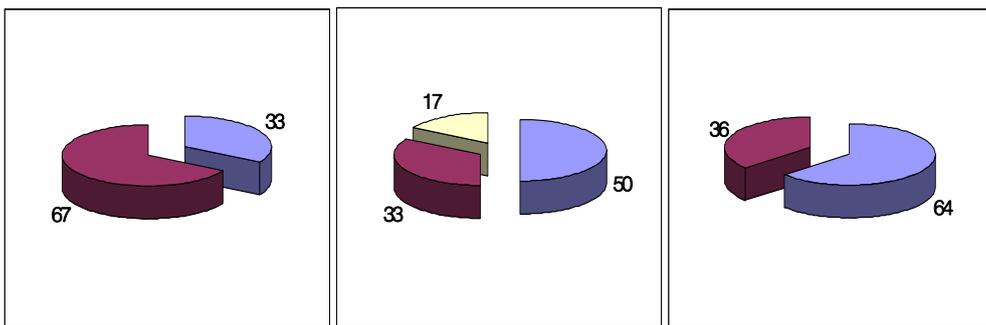
중성

지성

건성

■ 그렇다 ■ 그런 편이다 ■ 별로 그렇지 않다

14. 제품 사용 후 피부 윤기가 증가하였습니까?



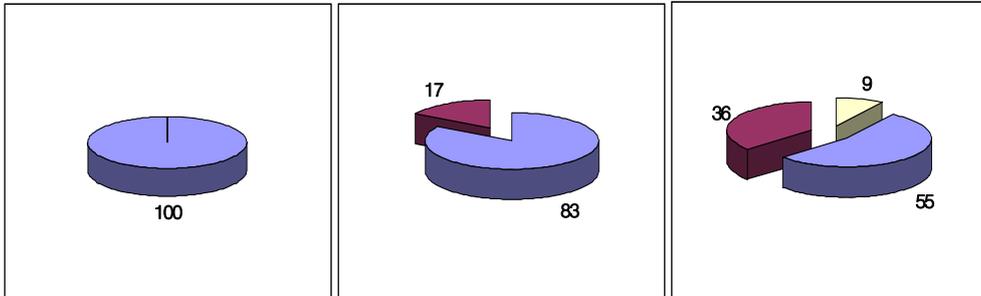
중성

지성

건성

■ 그렇다 ■ 그런 편이다 ■ 별로 그렇지 않다

15. 제품이 얼굴을 밝고 생기 있게 해줍니까?



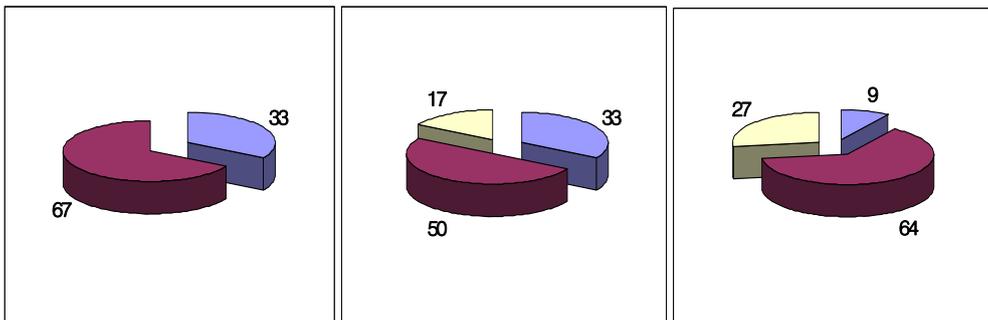
중성

지성

건성

■ 그런편이다 ■ 별로 그렇지 않다 ■ 그렇다

16. 제품 사용 후 피부가 촉촉해 지셨습니까?



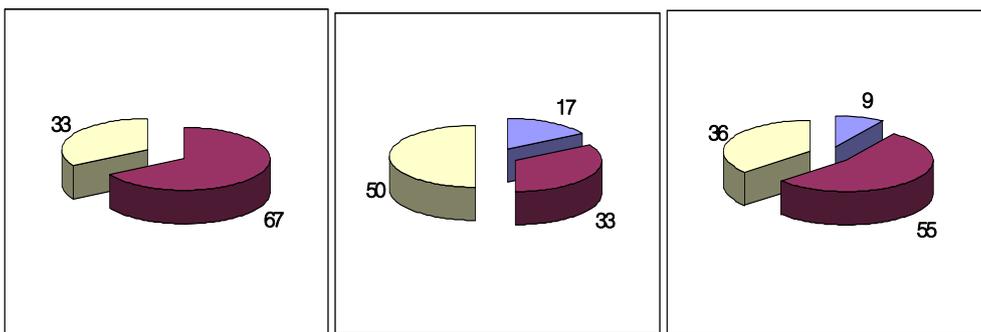
중성

지성

건성

■ 그렇다 ■ 그런 편이다 ■ 별로 그렇지 않다

17. 제품 사용 후 피부탄력감에 대한 변화를 느끼셨습니까?



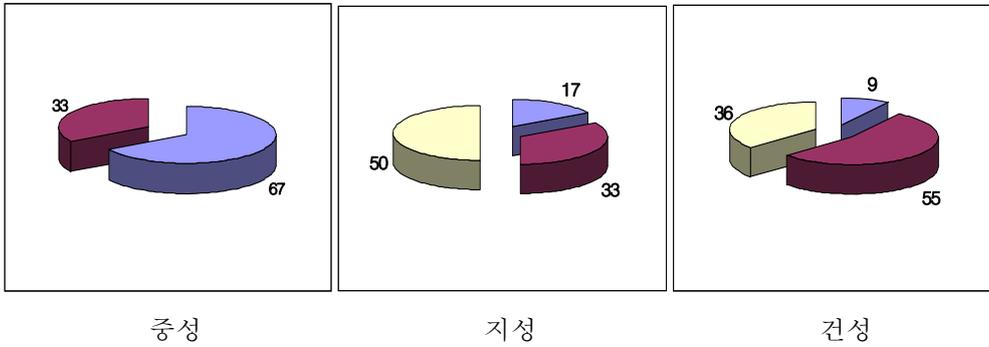
중성

지성

건성

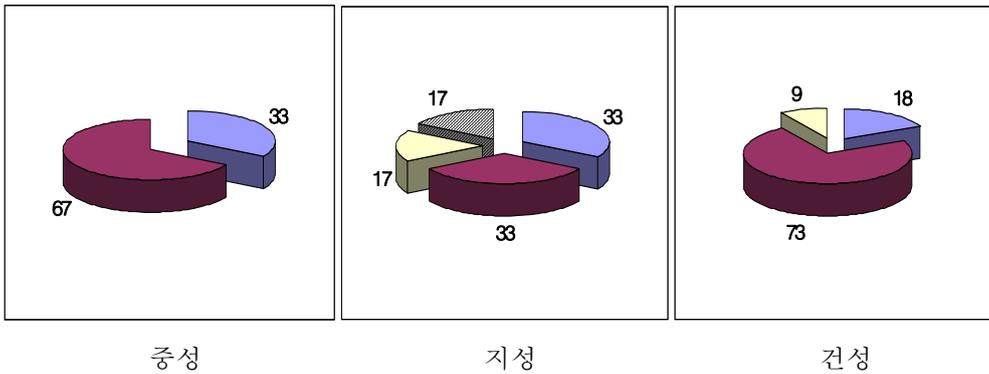
■ 그렇다 ■ 그런편이다 ■ 별로 그렇지 않다

18. 제품사용 후 피부표면에 대하여 변화를 느끼셨습니까?



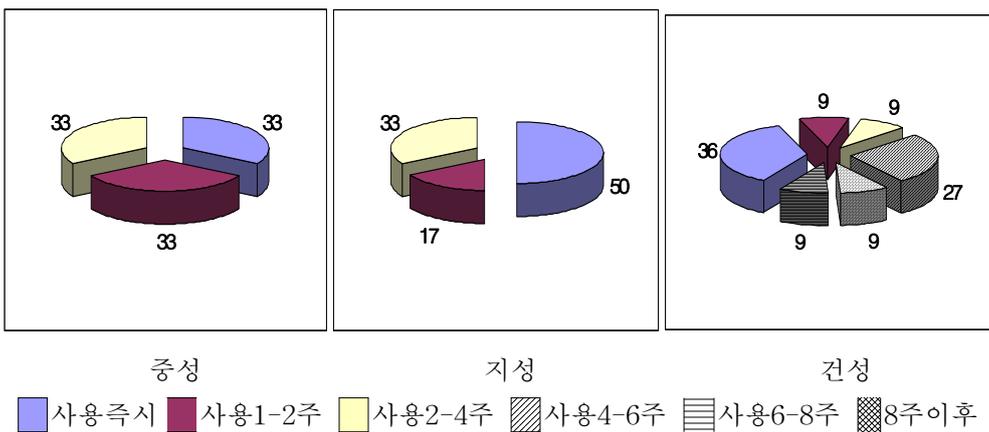
■ 그렇다 ■ 그런편이다 ■ 별로 그렇지 않다

19. 피부주름에 대한 효과를 느끼셨습니까?



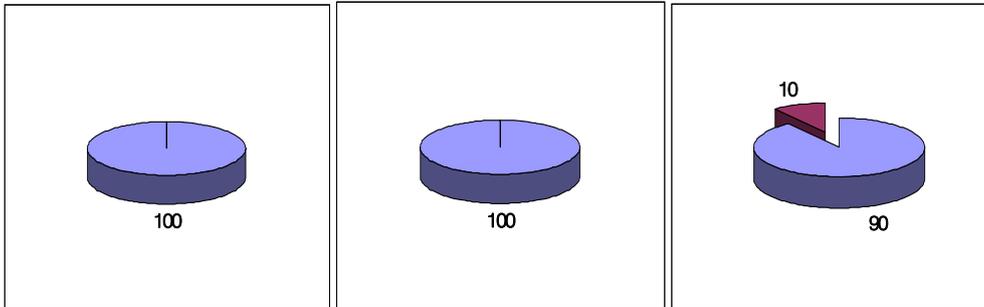
■ 변화 없음 ■ 경미 ■ 양호 ■ 현저

20. 피부 주름에 대한 효과를 처음 느낀 시기는?



■ 사용즉시 ■ 사용1-2주 ■ 사용2-4주 ■ 사용4-6주 ■ 사용6-8주 ■ 8주이후

21. 이 제품이 평상 시 사용하는 제품에 비하여 효과적입니까?



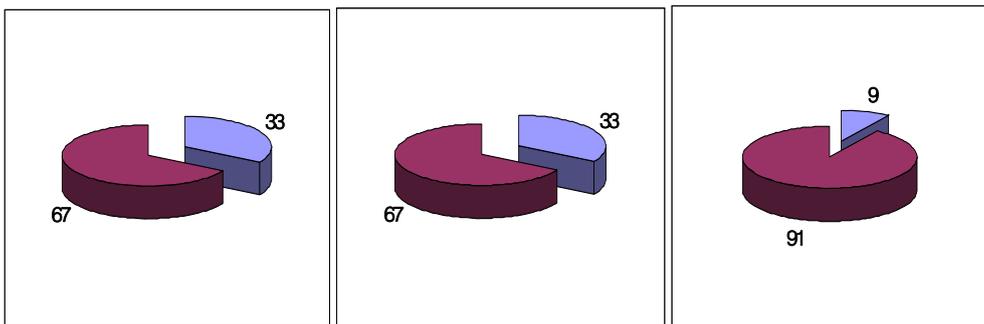
중성

지성

건성

■ 시험제품이 더 효과적 ■ 두 제품모두 효과적

22. 제품을 사용하는데 있어 어떠한 부작용을 경험하십니까?



중성

지성

건성

■ 그렇다 ■ 그렇지 않다

한편, 본 제품을 사용한 모든 피험자는 제품에 대한 높은 만족도를 나타내었을 뿐만 아니라 평상시 사용하던 제품보다 더 효과적이라고 응답하였다. 이들 피험자들의 대부분은 외국계 고급 화장품을 많이 사용하고 있는 사람들로 앞으로 본 제품이 출시된다면 대부분 기존에 화장품 사용은 중지하고 본 제품을 구입하겠다고 하였다.

극소수의 피험자들의 경우 피부타입에 상관없이 약간의 가려움, 화끈거림, 눈이 따끔거림 등의 현상이 나타났다. 이러한 원인은 청량감을 부여하기 위하여 첨가한 에탄올에 의한 것으로 생각되었다. 이러한 알코올 알러지에 의한 부작용은

경미한 것이었으며, 제품 사용 초기 발생하였다가 대부분 사라졌으므로 제형의 수정은 하지 않아도 될 것으로 생각되었다.

3) 시제 화장품 제조 및 주의점

상기 제품 테스트를 통하여 사진 4에 나타난 것처럼 3종류의 시제품을 만들었다. 본 제품의 경우 많은 천연물이 존재하므로 공기산화를 가능한 피해야한다. 이번 시제품 용기의 경우 시판품을 구입한 것으로 어쩔 수 없는 선택이었지만, 본 기술을 이전 받을 회사가 이러한 종류의 제품을 생산할 경우 1) 내용물의 빛에 의한 변질을 막기 위하여 불투명 재질의 용기 선택, 2) 내용물의 산화를 막고 장기간 사용 가능하게 하기위하여 화장품 내용물에 직접 공기가 들어가지 않고 간접적으로 밀어 올리는 펌프 방식의 신규 용기가 필요할 것으로 생각되었다. 이러한 종류의 용기는 이미 일부 유명 화장품사의 특정 화장품에서 적용하고 있으므로 앞으로 대량 생산 시 고려되어야 할 것으로 생각되었다.



사진 4. 완성된 시제 화장품
(좌: 스킨 옛센스, 중앙: 크림, 우: 세럼)

4. 소괄

- ① 소나무 수피 추출물을 화장품 원료로 사용하기 위하여 극성 유기용매의 조합이 필요하였다.
- ② 다양한 용매 등과의 상용성을 검토하여 스킨 앳센스, 크림 및 세럼(serum) 제조를 위한 기본 제형을 완성하였다.
- ③ 화장품의 기능성 증대 및 시너지 효과를 위하여 기존 및 신규 기능성 원료를 배합할 수 있는 조건을 완성하였다.
- ④ 다양한 조건의 검토 결과 완성된 시제化妆품을 20명의 피험자에게 시험한 결과 뛰어난 미백효과 및 주름 개선 효과가 관찰되었다.
- ⑤ 설문 조사결과 대부분 시제품에 대하여 높은 만족도를 나타내었으며, 특히 수피 추출물에 의한 화장품의 색상은 전혀 문제가 되지 않았다.

별지 1: 피험자 주의 사항

기능성 화장품(미백, 주름개선 및 항노화) 유효성 평가 실험에 따른 주의사항

피부 노화는 얼굴 근육의 분포, 근육의 움직임, 유전인자, 자외선, 흡연, 음주, 약품, 음식과 수면, 열, 산화적 손상, 호르몬의 변화 등 여러 원인이 복합적으로 작용합니다. 여성에게 있어서 노화는 참으로 스트레스가 아닐 수 없습니다. 이에 본 연구는 이러한 여성들의 고민을 해결 하고자 하는 접근 시도에 있습니다. 다음 사항을 잘 숙지하시고 지켜 주시기 바랍니다.

- ★ 피부 질환 치료를 위하여 스테로이드 함유 피부 외형제를 1개월 이상 사용한 경험이 없어야 합니다.
- ★ 연구시작 6개월 전 피부박피시술, 주름제거시술 등을 받지 않은 자야 합니다.
- ★ 실험진행 과정 중 시험 부위에 과도한 자외선 노출 및 지나친 음주, 흡연은 결과에 큰 영향을 미치므로 삼가 해야 합니다.
- ★ 시험 부위에 소양감, 홍반 등의 이상반응이나 불쾌감이 있을 경우에는 화장품의 사용을 중지하시고 보고해 주셔야 합니다.
- ★ 실험은 매주 1회, 총 8주간 진행되며 추적 관찰에 협조하여 주셔야 합니다.
- ★ 매주 지정된 시간에 오셔서 실험에 임하셔야 합니다.
- ★ 실험 12시간 이전엔 화장을 하지 않는 것을 원칙으로 합니다.
- ★ 실험이 있는 날은 세안 후 30분 - 1시간 이상을 충분히 기다리신 후 검사가 진행됩니다.
- ★ 실험 기간 동안은 연구실에서 제공한 화장품만을 사용하셔야 하며 다른 기초제품과 섞어 사용하시면 안 됩니다. 단 본 화장품을 바르시고 난 후 선 크림 또는 색조 화장품 사용은 가능합니다.

협조해 주셔서 감사드리며, 여러분들의 피부가 실험전보다 훨씬 개선되기를 진심으로 바라는 바 입니다.

2007년 3월 6일
전북대학교 농업생명과학대학 산림과학부
교수 문 성 필

의문사항이 있으시면 다음 연락처로 연락주시기 바랍니다.
연락처: 010-8641-0210, 270-2624

별지2: 설문지

피험자 특징 (피험자 작성)

* 연령: (만) _____

* 직업: (구체적) _____

* 피부 타입

중성 건성 약건성 지성

* 피부 수분

매우 촉촉 정상 건조 매우 건조

* 피부 유분

매우 번들거린다 정상 약간 부족 매우 부족

* 피부 탄력성

매우 탄력적 보통 약간 부족 매우 부족

* 피부 표면상태

매우 부드러운 편 보통 약간 거친 편 매우 거친 편

* 피부 두께

얇은 편 보통 두꺼운 편

* 흡연 유무(1일 기준)

안 핀다 10개피 미만 10개피 이상 한 갑 이상

* 음주 유무(1주일 기준, 스스로 본인의 음주량을 개략적으로 작성바람)

* 수분섭취량(본인이 섭취하는 하루 수분량을 개략적으로 작성바람)

6. 제품의 사용감을 어떻게 표현할 수 있습니까?

(해당하는 것 모두 표시해 주십시오)

- ① 끈적이다 ② 무겁다 ③ 촉촉하다 ④ 미끈거린다 ⑤ 가볍다
⑥ 뻣뻣하다 ⑦ 부드럽다 ⑧ 매끄럽다 ⑨ 매트하다 ⑩ 오일같다
⑪ 왁스같다

7. 사용시 제품이 펄 발라지는 정도는 어떻습니까?

- ① 쉽게 발라진다 ② 너무 뻣뻣하다 ③ 너무 미끈거린다

8. 사용시 제품이 피부에 빨리 흡수됩니까?

- ① 그렇다 ② 그런 편이다 ③ 별로 그렇지 않다 ④ 그렇지 않다

9. 사용 직후 피부는 편안하십니까?

- ① 그렇다 ② 그렇지 않다

10. 제품 사용 직후 피부의 느낌은 어떻습니까?

(해당하는 것 모두 표시해 주십시오)

- ① 매끄럽다 ② 끈적이다 ③ 번들거린다 ④ 당긴다 ⑤ 답답하다
⑥ 뻣뻣하다 ⑦ 촉촉하다 ⑧ 무겁다 ⑨ 가볍다 ⑩ 건조하다
⑪ 윤기가 난다 ⑫ 매트하다

11. 제품 사용 다음날 피부의 느낌은 어떻습니까?

(해당하는 것 모두 표시해 주십시오)

- ① 매끄럽다 ② 끈적이다 ③ 번들거린다 ④ 당긴다 ⑤ 답답하다
⑥ 뻣뻣하다 ⑦ 촉촉하다 ⑧ 무겁다 ⑨ 가볍다 ⑩ 건조하다
⑪ 윤기가 난다 ⑫ 매트하다

12. 제품 사용 후 피부가 부드러워 졌습니까?

- ① 그렇다 ② 그런 편이다
③ 별로 그렇지 않다 ④ 그렇지 않다

13. 제품 사용 후 피부결이 매끄러워 졌습니까?

21. 이 제품이 평상시 사용하는 제품에 비해 효과적입니까?

- ① 시험 제품이 더욱 효과적이다
- ② 평상시에 사용하는 제품이 더욱 효과적이다
- ③ 두 제품 모두 효과적이다
- ④ 두 제품 모두 효과적이지 않다

22. 제품을 사용하는데 있어 어떠한 불편함이나 부작용을 경험하셨습니까?

- ① 그렇다 ② 그렇지 않다.
- (만약 그렇다면 자세히 설명해 주십시오)

23. 제품 사용 중 다음에서 어떤 것을 경험하하셨습니까?

(해당하는 것을 모두 골라주십시오)

- ① 가려움 ② 따가움 ③ 화끈거림 ④ 붉어짐 ⑤ 통증
- ⑥ 부어오름 ⑦ 각질이 벗어짐 ⑧ 뽀루지 등이 생김 ⑨ 좁쌀 같은 것이남
- ⑩ 눈물이 남 ⑪ 눈이 따끔거림 ⑫ 기타

24. 위와 같은 부작용이 얼마동안 지속되셨습니까?

예) 바를 때만 있었고, 수분 지나면 사라졌다 (가려움)

25. 전반적으로 귀하는 이 제품의 어떤 점이 마음에 들거나 들지 않으셨습니까?

- 설문에 응해주셔서 감사합니다. -

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연도	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	달성도 (%)
1차 연도	2004	수피 추출물의 제조 공정이 단순한가?	원료 제조 공정의 단순화	100
		라디아타 소나무 수피 추출물의 제조 조건이 친환경적인가?	친환경적인 제조 공정	“
		라디아타 소나무 폐수피 추출물을 원료로 사용할 때 경제성이 있겠는가?	원료 생산에 대한 경제성 확보	“
		수피 추출물의 화학 조성에 대한 검토가 잘 이루어졌는가?	원료의 특성화	“
2차 연도	2005	수피 추출물의 생리활성 테스트가 적합한 방법으로 이루어졌는가?	연구 방법의 타당성	“
		생리활성 검토 방법이 수피의 품질을 평가하는데 적용될 수 있겠는가?	품질 평가 시험 방법 마련	“
		수피 추출물이 가지는 생리활성이 기능성 화장품으로서 적용 가능한가?	연구 개발의 실제성 평가	“
3차 연도	2006	수피 추출물로부터 기능성 화장품을 개발하였는가?	제품 개발	“
		시제품을 제조하였는가?	시제품 제조 유무	“
		수피 추출물로부터 제조한 기능성 화장품의 산업화가 가능하겠는가?	산업화 가능성 평가	“

상술한 표에 나타낸바와 같이 3년간의 연구를 통하여 각 연도별 세부목표를 100% 달성 하였다. 부수적으로 본 연구 수행 중 소나무 수피 추출물의 주성분인 proanthocyanidin의 추출 및 이용에 관련된 많은 자료들을 수집분류하여 제6장에 연구개발과정에서 수집한 해외기술정보 부분에 데이터 베이스화 하여 정리하였다. 결론적으로 소나무 수피 연구를 통하여 국내에서는 아직 시작되지 않은 새로운 산업으로서의 가능성을 열었으며, 소나무 수피 유효이용에 관련된 많은 새로

운 기술을 축적할 수 있게 되었다. 개발된 기술 중의 일부는 현재 국내 중소기업 및 농업인 단체로 기술 이전을 위한 기술료 감면 승인 신청 중에 있으며, 금년 내 산업화되어 새로운 천연물 산업으로서의 발전이 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

2004년도 농림기술과제를 수행하고 다음 표 나타낸 것처럼 3가지의 주요 기술을 확보하였다.

구분	핵심 기술 명
1	소나무 수피로부터 proanthocyanidin의 분리 기술
2	소나무 수피로부터 분리한 proanthocyanidin의 멜라닌 전이 억제 기작
3	소나무 수피 추출물 및 proanthocyanidin을 주원료로 하는 기능성 화장품의 제조기술

핵심 기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
기술 1	본 기술은 특허 출원중이며, 현재 블리스이앤이(주)에서 8년간 기술 전용실시를 위한 기술료 감면 신청 중에 있다. 식물 기원의 proanthocyanidin의 경우 현재 건강식품으로 그 용도가 알려져 있으므로 기능성 화장품 제조 원료는 물론 1조원이 넘는 기능성 식품 시장에도 진출이 가능하다.
기술 2	Proanthocyanidin에 대한 다양한 생리활성 효과는 많이 알려져 있지만, 본 연구에서 소나무 수피 proanthocyanidin이 멜라닌 생성 및 전이를 일으키는 멜라노머 셀의 수상돌기를 위축시킨다는 사실은 처음으로 밝혀진 것이다. 따라서 본 내용은 특허 출원이 가능하며, 새로운 미백 기능성 화장품 원료로서 등록이 가능하다. 특허 출원 후 이를 이용하고자 하는 화장품 회사에 특허 사용 실시계약 체결 예정이며, 이를 통하여 미백 기능성 화장품 원료 등록시켜 국내외 판매가 가능하도록 할 예정이다.
기술 3	소나무 수피 proanthocyanidin을 이용한 기능성 화장품은 거의 찾아볼 수 없다. 특히 기능성이 실험을 통하여 알려진 예는 찾아볼 수 없다. 따라서 기능성 화장품 제조에 대한 1년간 통상 실시권 및 기술 지도를 전북 임실생약조합(영농법인)에 실시할 예정이다.

핵심기술 1) 및 3)의 경우 기술료 감면 허가를 받는 즉시 계약을 체결하여 기술 활용이 가능 하도록 할 것이다.

2)의 기술은 아직 국내외 이러한 기작을 발표한 예가 없어 학술적인 가치가 매우 클 뿐만 아니라 의 용도에 대한 원천 기술로써 대단히 중요하다. 따라서 특허 출

원 후 화장품 관련 대기업과 접촉하여 본 기술에 대한 기술 이전 실시계약 등을 체결할 예정이다.

또한 본 연구를 통하여 소나무 수피 proanthocyanidin의 새로운 가능성을 발견하였다. 즉, 새로운 기능성 식품은 물론 의약품 및 의약품 기초 원료로서의 이용가능성이다. 본 연구 수행 중 본 대학교 의과대학과의 예비연구를 통하여 수피 proanthocyanidin의 항염증 및 항알러지 효과 등을 확인하였으며, 피부질환 치료 부분에서도 큰 가능성이 있다는 결과를 얻었다. 따라서 본 연구는 앞으로 화장품 시장보다 더 큰 식품 및 의약품 시장에의 진출이 기대되었다. 따라서 본 연구 종료 후 학제 간 공동연구를 통하여 미국과 FTA체결로 인하여 고통 받고 있는 국내 의약품 및 그 관련 분야 산업체와 협력하여 proanthocyanidin 베이스 신약개발 및 관련 기술개발을 실시할 예정이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

국내에서 독자적으로 소나무 수피 추출물을 이용한 기술 개발에 관한 특허 출원 사례는 전무한 것으로 조사되었으며 단지 국외 특허가 국내에 등록된 사례가 일부 있었다. 그러므로 국외 특허와 SCI 등재 국외 학회지에 게재되어 있는 소나무 수피 추출물 혹은 국제적으로 상용화되어 있는 관련 제품인 Pycnogenol[®]에 관한 내용을 중심으로 조사하였으며 일부 식물 추출 성분 중 그 기작이 proanthocyanidin에 의존한다고 명시한 자료에 대해 부가적으로 데이터베이스화하였다. 국외 특허에 관한 평가는 본 연구과제 수행에 적합하도록 proanthocyanidin-rich 분획물을 다량으로 회수할 수 있는 정제 기술과 이들 분획물 혹은 추출물을 기능성 화장품 혹은 의약품 제형에 사용한 경우에 한하여 검토한 내용을 나타내었다. 국제 학회지에 게재된 관련 내용은 주로 proanthocyanidin을 주요 성분으로 하는 추출물의 생리활성에 초점을 두었으며 본 연구 과제의 주요 골자인 기능성 화장품 원료 개발과 관련된 활성을 비롯하여 여러 흥미로운 결과를 살펴볼 수 있었다. 본 연구에서 특허와 논문을 정리한 데이터베이스는 앞으로 임업계의 대표적인 폐자원인 소나무 수피를 이용한 보다 부가가치가 높은 연구 방향을 모색하는데 도움이 되고자 미흡하지만 1995-2007년 현재까지 국외 SCI급 논문에 게재되어 있는 거의 대부분을 간략하게 데이터베이스화하였다.

특허의 요약 내용을 살펴보면 쉽게 이해할 수 있듯이 광범위한 분자량 분포를 갖는 proanthocyanidin이 다량 함유된 조추출물 보다는 산업적으로는 proanthocyanidin 올리고머를 더욱 필요로 하며 이들의 생리활성이 고분자 분획보다 우수하다는 예측이 가능하다. 그러나 현재까지 공고된 특허에 언급되어 있는 proanthocyanidin 올리고머 정제방법은 복잡한 공정 단계를 필요로 하며 원료 제조업에서 고가의 비용 손실을 야기하는 유기 용매와 흡착제를 사용함으로써 이들 공정법에 따라 회수한 추출물은 시장에서 고가로 판매될 수밖에 없는 한계성을 갖는다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방안으로 proanthocyanidin을 다량으로 함유하고 있는 식물재료를 선별하는 것도 중요하지만 올리고머 중합도에 해당하는 proanthocyanidin을 쉽게 얻을 수 있는 추출 식물 원료를 선별하는 작업이 우선시 되어야 한다. 또한, proanthocyanidin이 식물체 내에서 생장 기간 동안 어느

정도 고분자화 되는 지에 대한 식물체의 특유 과정을 조사하여 환경 변이 조건으로 proanthocyanidin의 고분자화를 예방하는 방법과 같은 새로운 식물 원료의 생물학적 제어를 고려할 필요성이 있다고 판단된다. 결론적으로 추출 단계의 복잡성과 올리고머 정제 단계에서 요구하는 고가의 용매와 흡착제의 사용을 줄이기 위해서는 원료에 대한 보다 광범위한 선별과정이 선행되어야 하며 식물체의 단계별 생리적인 변이에 대해서도 사전에 면밀히 고려되어야 만 이러한 문제를 해결할 수 있을 것으로 판단된다.

소나무 수피 추출물은 주로 항산화 활성, 항염증, 심·혈관 질환, 항암, 항당뇨에 주요 효과가 있으며 효소 및 단백질과의 상호 작용에 의한 세포 반응(cellular response)에 영향을 미치는 것과 관련한 다양한 생리 활성을 갖는다. 후자의 단편적인 원리를 이용해 앞으로 질병, 위생, 의학, 식품 등과 관계하는 다양한 세포 혹은 효소에 소나무 수피 추출물이 미치는 영향을 평가함으로써 보다 진보한 연구 및 용도 개발이 가능하리라 판단된다. 또한, proanthocyanidin-rich 추출물이 고혈압 환자의 혈관내기능 개선, 지방생성저해, 피부 홍반 감소, 상처 형성 감소, 임신통증 감소, 치은출혈과 치태(齒苔) 감소, 비만세포의 히스타민 분비 저해, 용혈성 상처 예방, 주의력 결핍 과잉 행동 장애(Attention Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD)증후 경감, 피부 과색소 침착 치유, 혈관 망막병증 치유, 편두통 치유 등과 같은 다양한 활성을 갖는다는 사실을 알 수 있다. 이들 생리활성을 비롯하여 특허에 언급된 내용을 더하면 관절병 치유, 비뇨 생식기 감염 예방, 항부착 활성, 말초혈관병증 치유, 반흔성수축과정 개선, 아토피성 피부염과 혈중 치료, 비음과 인두 점막 보호, 주름개선 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

○ Proanthocyanidin-rich 추출물의 정제방법과 응용에 관한 국외특허

특허 번호	발명자	발명 제목	발명 내용
JP 2000083647	Takahashi T, Kobayashi A	Composition and method for stabilising proanthocyanidin	Proanthocyanidin의 산화에 의한 고분자화를 방지하기 위해 아미노산을 이용하는 방법에 관한 내용에 대해 기술하였다. 이렇게 안정화한 proanthocyanidin은 음료수, 식품, 화장품, 의약품에 응용할 수 있다. 발명자에 따르면 proanthocyanidin을 안정화 시킬 수 있는 다른 기술로 potassium pyrosulfite, ascorbic acid를 안정화제로 사용하거나 화장품 제조 시에는 sodium hydrogen sulfite, 1-hydroxyethane-1,1-disulfonic acid, diethylenetriaminepentaacetic acid 또는 phytic acid를 혼합물로 사용할 수 있다. 또한 폴리페놀을 안정화하기 위한 기술로는 porphyrin-zinc 착염과 환원제를 혼합해 폴리페놀의 탈색을 방지할 수 있으며 (JP-B-8-2819) 화장품의 안정화 제형으로 폴리 페놀과 sucrose-higher fatty acid ester(JP-A-5-112441)을 혹은 alkyl glucoside를 혼합하여 사용하는 방법 (JP-A-5-163131)이 있다. JP 2744572에 명시된 방법은 3개 이상의 페놀성 수산기를 갖는 폴리 페놀과 polyhydric alcohol 혹은 saccharidefb를 혼합하여 탈색을 방지하는 것이다.
US 5814494	Ariga T, Hosoyama H, Yuasa K	Process for improving the property of proanthocyanidins and for preparing an improved proanthocyanidin product	Tannase의 활성화 조건에서 추출 공정 중에 이 효소를 사용하여 proanthocyanidin의 수율과 그 특성 개선에 관한 방법을 기술하였다.
EP 1669338 A1	Takagaki K Yamaguchi G	Process for producing product containing proanthocyanidin in high proportion	Proanthocyanidin 올리고머를 다량으로 함유하는 분획물을 재료, 공극 반경, 표면적이 다른 적어도 두 종류의 흡착제를 사용하여 제조하는 방법을 명시하였다. 발명자에 따르면 다른 기술로서 메탄올, 에탄올, 아세톤, 헥산, 에틸 아세테이트와 같은 용매를 물과 혼합하여 사용하는 방법이 있을 수 있으나 회수할 수 있는 proanthocyanidin 양이 적고 결과물의 순도가 낮다는 단점이 있으며 또한 농축과 정제와 같은 부가적인 공정이 요구되어 비용과 시간을 증가시킨다(JP 1180148). 키틴(chitin)을 폴리페놀 흡착제로 사용한 경우와 ascorbic acid와 알칼리 금속 혹은 염을 식물 추출물 액체에 첨가하여 pH를 6-11로 조절하여 폴리 페놀을 침전시키고 금속염을 회수한 후 이온교환을 통해 폴리페놀에 흡착된 염을 탈염시켜 회수하는 방법이 기술되었다.

특허 번호	발명자	발명 제목	발명 내용
US 20030059488A1	Daniels E	Bioflavanoid-rich potent extract and process for the extraction from white oak bark and pine bark	식물로부터 탄닌산과 갈릭산의 추출과 단리를 위한 방법에 관한 내용으로 주요 추출 원료는 졸참나무(oak)와 소나무(pine)를 사용하며 75-95℃에서 열수 추출하는 것을 주요 과정으로 한다.
US 6426080B1	Golz-Berner K, Zastrow L	Cosmetic preparation of active substances with high protection factor against free radicals	본 발명의 화장품 조성물은 Quebraco blanco 수피 추출물(90% 이상의 proanthocyanidin 올리고머 함유), 누에 추출물(peptide cecropin, amino acid, 복합 비타민, 비이온성, 양이온성, 음이온성 hydrogel, 인지질, 물 포함)을 비롯하여 기타 활성 성분으로 비타민 유도체, 식물 추출물(acerola, 해초, citrus, bitter orange, cherry, papaya, tea, coffee beans, Mimosa tenuiflora, angelica)로 구성된다. 이 조성물은 자유 라디칼에 대해 10,000 정도의 보호 요인(protection factor)을 가지며 이들 조성물을 함유한 화장품은 제조 비율에 따라 40-200정도의 보호 요인을 가진다.
US 6210681B1	Walker EB, Mickelsen RA, Mickelsen JN	Plant proanthocyanidin extracts	식물 proanthocyanidin 추출물의 제조는 Vaccinium 속의 식물을 대상으로 하며 이 추출물은 박테리아 세포의 표면 부착을 예방하는 생물학적인 활성을 갖는다. 즉, 항부착 활성(anti-adhesion activity)을 갖는다. 구체적인 성분 조성은 pro-cyanidin(특정 성분), leukocyanin, leucodelphinidin, flavonol glucoside류 (myricetin-3-pyranoside과 proanthocyanidin 추출물)로 이루어져 있다. 이들 proanthocyanidin 추출물은 P-type E. coli의 접합 반응을 저해하는 능력이 있으며 이 추출물은 적어도 한 개의 A-type interflavanoid 결합을 포함한다. Proanthocyanidin 조성물을 경구 투입함으로써 포유동물에 있어 비뇨 생식기의 감염을 예방하거나 혹은 치료하는 방법을 기술하였다. 추출물의 항부착 활성은 다양한 분야에 유용하며 그 예시로는 산업용 발효 장치, 의학 및 치의 도구, 의학용 드레싱, 실험실 배양 용기 등을 위한 세척제를 포함하여 외과용 임플란트, 이빨 표면, 경구 세포, 동물 혹은 사람의 요로(urinary tract) 세포에 박테리아의 부착을 예방하기 위한 용도로 사용될 수 있다.

특허 번호	발명자	발명 제목	발명 내용
US 6207842B1	Romanczyk L, Kozikowski AP, Tueckmantel W	Process for preparing procyanidin (4-6 or 4-8) oligomers and their derivatives	이 발명은 합성 폴리 페놀 올리고머의 제조와 응용하는 방법을 다룬다.
US 5665365	Bombardelli E, Cristoni A, Morazzoni P	Formulations containing coumarins and the use thereof in the pharmaceutical and cosmetic fields	Esculoside, esculetin과 같은 소수계 coumarin류와 proanthocyanidin 이량체 혹은 올리고머를 혼합하여 말초혈관병증(peripheral vasculopathies)의 치유 및 반흔성수축(cicatrization)과정을 개선하기 위해 사용될 수 있는 제형과 관련된 발명 내용을 기술하였다. 이들 coumarin류 단독 혹은 proanthocyanidin과 조합하여 제조한 제형은 아토피성 피부염(atopical dermatitis)과 혈종(haematomas)의 치료에 유용하다.
US 6627232	Hammerstone JF, Chimel MJ	Method for extracting cocoa procyanidins	Procyanidin 단량체와 올리고머를 다량으로 포함하는 코코아 추출물은 탈지, 볶지 않은, 미발효된 코코아 콩을 유기용매로 추출하여 제조한다. 그 수율은 사용된 용매, 추출온도, pH에 따라 변화하며 추출 최적화를 위해 바람직한 방법은 역류 추출(counter-current extraction) 방법이다.
US 6558689B2	Ross MA	Proanthocyanidins and ascorbic acid composition for topical application to human respiratory and oral mucosa	이 발명의 내용은 유독한 바이러스, 박테리아와 균 그리고 과도한 건조, 항공기 객실과 같이 위험 수위가 높은 상황으로부터 점막(mucosa)을 보호하기 위해 코와 입에 분무할 수 있는 비음(nasal) 및 인두(pharyngeal) 용 분무 용액을 proanthocyanidin과 ascorbic acid의 염수 용액으로 제조하는 방법을 기술한다. 여기에서 ascorbic acid는 proanthocyanidin의 효과를 지속시키기 위한 항산화제일 뿐만 아니라 면역 반응을 자극하는 성분으로 사용되었다. 그러므로 비음과 인두의 점막을 보호하는 역할은 proanthocyanidin에 의한 것임을 알 수 있다.
US 6936726B2	Torres Simón JL	Flavanol and cysteamine conjugates	이 발명은 thiol 기를 포함하는 분자와 flavanol류의 컨쥬게이션에 의해 발생하는 새로운 생성물에 관한 내용을 명시한다. 이 생성물은 procyanidin과 prodelphinidin의 올리고머와 폴리머가 다량 함유되어 있는 식물 추출물로부터 제조할 수 있으며 암, 심장질환, 조기노화와 같은 장애로부터 생체를 보호하는 제제로 응용할 수 있다.

특허 번호	발명자	발명 제목	발명 내용
US 6800433B1	Honda et al.	Process for purification of proanthocyanidin oligomer	이 발명은 methyl acetate를 이용한 고체-액체 추출로부터 proanthocyanidin 올리고머를 포함하는 원료 혹은 미정제품으로부터 proanthocyanidin 올리고머를 추출하여 이량체에서 오량체 proanthocyanidin을 정제하는 과정을 명시한다. 이 추출 과정은 원료 혹은 미정제품을 가수분해하기 위해 효소에 의한 전처리를 수행할 수 있으며 균일한 중합도를 갖는 proanthocyanidin 이량체에서 오량체를 추출·분리하기 위해 순상 실리카겔 크로마토그래피를 적용할 수 있다.
US 6716451B1	Udell RG, Hari SP, Rich M	Formulation and delivery method to enhance antioxidant potency of vitamin E	이 발명은 비타민 E의 항산화력, 생체이용도, 용해 및 효율을 개선시키기 위한 제형을 명시하였으며 이 제형은 세포막의 산화, 심장병, 암, 눈과 피부질환에 사용될 수 있다. 비타민 E를 주요 기작 성분으로 한 이 제형은 coenzyme Q10, rosemary oil, green tea, α-lipoic acid, lycopene, grape seed extract, pine bark extract, vitamin C, natural beta-carotene, γ-oryzanol, selenium, lutein으로 구성된다.
US 6544581B1	Shrikhande AJ, Race EJ, Wightman JD, Sambueso RD	Process for extraction, purification and enrichment of polyphenolic substances from whole grapes, grape seeds and grape pomace	이 발명은 포도, 포도 씨앗, 포도 찌꺼기로부터 폴리 페놀의 추출, 정제, 농축을 막여과 없이 수행할 수 있는 novel 과정에 관해 명시한다. 이 과정은 열수 추출, 열수 추출물의 pH처리, 폴리 페놀의 농축과 정제를 최대화하기 위해 흡착 수지로 trimethylolpropane trimethacrylate(XAD-7HP [®])을 사용한다.
US 4698360	Masquelier J	Plant extract with a proanthocyanidins content as therapeutic agent having radical scavenger effect and use thereof	이 발명은 라디칼 소거능을 갖는 proanthocyanidin을 포함하는 식물 추출물을 운혈동물과 사람의 생체 내에서 일어나는 자유 라디칼의 해로운 생물학적 효과를 예방하는 방법에 관해 기술한다. 이 방법은 고분자 proanthocyanidin의 추출을 배제시키기 위해 염화나트륨 추출과 침전 과정을 실시하며 에틸아세테이트의 반복 추출을 필요로 한다. 에틸아세테이트의 증발시키는 동안 용매의 손실을 동반하게 되며 proanthocyanidin 올리고머를 침전시키기 위해 클로로포름을 사용함으로써 상업적인 관점에서 실질성과 안정성이 낮다고 평가된다.
US 5484594	Frangi E, Bertani M, Mustich G, Tuccini G	Process for preparing grapeseed extracts enriched in procyanidol oligomers	한외여과법을 사용하여 600-3,000을 cut-off시켜 혹은 에테르류, 에스테르류, 혹은 에틸 아세테이트와 방향족 탄화수소의 혼합용매를 사용하여 조식물추출물(예, <i>Vitis vinifera</i>)로부터 단량체를 제외시킨 procyanidol 올리고머가 다량 함유된 추출물을 제조한다.

특허 번호	발명자	발명 제목	발명 내용
US 5912363	Nafisi-Movaghar K, Svanoe TT, Seroy WA	Method for extraction of proanthocyanidins from plant material	식물 재료의 수용성 혼합물을 가압과 산소 부재하에서 가열하여 proanthocyanidin을 추출하는 방법이 며 다양한 분리, 여과 및 흡착 단계와 극성 용매를 사용한 흡착된 proanthocyanidin의 용리 과정을 포함한다. 선택적으로, 극성 용매는 재생 사용됨으로 용매 감소를 최소화할 수 있다. 이 방법은 제한적인 실용성과 proanthocyanidin 추출물의 낮은 순도를 동반하며 높은 온도의 사용은 막여과의 사용을 필요로 할 뿐만 아니라 이 방법의 실질적인 이용을 제한하는 단점이 있다.
US 6333304B1	Bath TK, Lynch N	Therapeutic compositions containing glucosamine, collagen and a bioflavanol for repair and maintenance of connective tissue	이 발명은 외인성 glucosamine, 가수분해형 콜라겐과 bioflavanol을 포함하는 동물 관절병(arthrose) 치료를 위한 조성물에 관한 내용을 명시한다. Bioflavanol은 포도 씨앗, 소나무 수피 혹은 강황 뿌리로부터 추출한 것을 사용한다. 이 조성물은 tablet과 캡슐로 제조하여 사용한다.
US 5968517	Duncan KW, Gilmour IA	Process for extraction of proanthocyanidins from botanical material	이 발명은 생물학적인 재료로부터 proanthocyanidin을 추출 및 분리하는 방법을 명시한다. 탈산소화한 물을 사용하여 분쇄한 후의 재료를 열수 추출하는 단계, 추출 용액으로부터 잔사를 분리하는 단계, 농축 단계(한외여과), 분말화 단계를 포함한다. 열수는 재생하여 사용하며 잔사는 부산물로 이용가능하다. 가장 바람직한 생물학적인 재료는 15년생인 라디아타 소나무 수피이다.
US 5928646	Nkiliza J	Process for extracting catechin polyphenols from potentillas, extract obtained and its use	이 발명은 potentilla 식물로부터 올리고머 catechin 폴리페놀을 추출하는 방법을 명시한다. 추출 방법은 이 식물을 최소의 극성 유기 용매로 처리하여 1차 추출물을 얻고 60°C보다 낮은 온도에서 용매를 증발시켜 추출물을 건조는 단계, 농축 잔사에 물을 첨가하여 수용액을 제조하는 단계, 올리고머 catechin 폴리페놀을 용해시킬 수 있고 물에 섞이지 않는 용매로 추출하는 단계, 올리고머 catechin 폴리페놀을 포함하는 추출물을 얻기 위해 60°C보다 낮은 온도에서 건조 시까지 유기 용액을 농축하여 2차 추출물을 제조하는 단계를 포함한다. 2차 추출물은 최종 산물로써 항산화제로 사용한다.

특허 번호	발명자	발명 제목	발명 내용
US 5470874	Lerner S	Ascorbic acid and proanthocyanidin composition for topical application to human skin	사람 피부 보호에 응용하기 위해 ascorbic acid와 proanthocyanidin을 투여하는 방법과 조성을 기술한다. 이 조성물은 ascorbic acid(10-25%)와 고비율의 계면활성제와 조합한 proanthocyanidin을 적어도 0.5-5%포함한다. 증접제, 보존제 및 캐리어는 피부막에 serum 조성의 침투력을 증진시킨다. 또한 이 조성물은 선 스크린 특성과 우수한 콜라겐 치료 효과를 갖는다.
US 4668516	Duraffourd A, Duraffourd JM	Composition for regenerating the collagen of connective skin tissue and a process for its preparation	피부 결합 조직인 콜라겐을 재생시키기 위한 조성은 pH 7.0으로 조절한 수용성 침엽수재 수피 추출물, 수용성 flavonol류와 비타민 C를 포함한다. 특히, 이 조성물은 주름을 치료하는데 유용하다.
US 6579543B1	McClung JH	Composition for topical application to skin	이 발명은 의학적인 컨디션 혹은 물리적인 상처에 의해 야기되는 다양한 증후를 경감시키기 위한 조성물을 명시한다. 이 조성물에서 포도 씨앗 proanthocyanidin은 항염증제, 항산화제, 혈액순환 개선제로 첨가될 수 있는 것으로 기술되어 있다.

○ Biological activities of Pycnogenol® and pine bark extract

Activity	Reference
Effective decrease of systolic blood pressure in mildly hypertensive patients	Hosseini et al. (2001)
Antioxidant activity	Jerez et al. (2007), Packer et al. (1999), Grimm et al. (2004), Guri et al. (2006), Weber et al. (2007), Janisch et al. (2002), Bors et al. (2000), Guo et al. (1999), Berryman et al. (2004), Vuorela et al. (2005), Cui et al. (2005), Tourino et al. (2005), Virgili et al. (1998), Devaraj et al. (2002)
α -Glucosidase inhibition	Kim et al. (2004), Kim et al. (2005), Schäfer & Högger (2007)
Action as modulators of the immune response	Park et al. (2000)
Antidiabetic effect	Liu et al. (2004)
Antimicrobial activity	Torras et al. (2005)
Participation to the antioxidant network	Packer et al. (1999)
Action as a protective factor against ultraviolet(UV)-radiation-induced injury	Packer et al. (1999)
Metal chelating activity	Packer et al. (1999)
Specific binding to proteins and enzyme inhibition	Packer et al. (1999)
Modulation of enzyme activity involved in cellular response	Packer et al. (1999)
Cardiovascular effect	Packer et al. (1999)
Vasorelaxation and vasoconstriction	Packer et al. (1999)
Inhibition of platelet aggregation	Packer et al. (1999), Schäfer et al. (2005), Pütter et al. (1999), Kim et al. (2005), Araghi-Niknam et al. (1999)
Inhibition of angiotensin converting enzyme	Packer et al. (1999)
Enhancement of microcirculation and capillary resistance	Packer et al. (1999)
Inhibition of elastase enzyme activity	Packer et al. (1999)
Anti-inflammatory activity	Packer et al. (1999), Cho et al. (2000), Schäfer et al. (2005), Vuorela et al. (2005), Stefanescu et al. (2001)
Modulation of macrophage activity	Packer et al. (1999)
Inhibition of matrix metalloproteinases	Grimm et al. (2004)
Inhibition of the activity of phosphorylase kinase, protein kinase C and protein kinase A	Nardini et al. (2000)
Cancer chemopreventive effect	Kyriazi et al. (2006)
Treatment of chronic venous insufficiency	Koch R (2002)
Protective effect on cardiotoxicity of doxorubicin and inhibition of thymus DNA synthesis induced by cyclophosphamide in mice	Feng et al. (2002)

Activity	References
Prevention of protein oxidation and DNA damage	Senthilmohan et al. (2003)
Alternation of intracellular antioxidant defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetic rats	Maritim et al. (2003)
Inhibition of protein tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor	Fridrich et al. (2007)
Improvement of endothelial function of hypertensive patients	Liu et al. (2004)
Inhibition of lipogenesis	Hasegawa (2000)
Inhibitory effect on lipid peroxidation	Nakanishi-Ueda et al. (2006)
Reduction of erythema in human skin	Saliou et al. (2001)
Induction of reversed catabolic effects of nicotine	Figuro et al. (2006)
Inhibitory effect on oxidative DNA damage in healthy smokers	Ohno et al. (2007)
Beneficial changes in clinical study (anthropometric, vascular and plasma rheological indices)	Shand et al. (2003)
Therapeutic potential in patients with inflammatory skin disorders	Bito et al. (2000)
Downregulation of both calgranulin A and B genes to be upregulated in psoriasis and various dermatoses	Rihn et al. (2001)
Anticancer activity	Cui et al. (2005), Huang et al. (2005)
Preventive effect on ischemia/reperfusion-induced acute renal injury	Ohkita et al. (2005)
Antiproliferative effect in melanoma cells	Tourino et al. (2005)
Protection of endothelium from oxidative stress induced by reactive nitrogen speceis through enhancement of α -tocopherol level	Virgili et al. (1998)
Protection of ethanol-insulted cerebellar granule cells	Siler-Marsiglio et al. (2004)
Inhibition of xanthine oxidase through binding to the enzyme	Moini et al. (2000)
Inotropic effects in chick embryonic cardiomyocytes via stimulation of β -receptor mediated activity	Hasegawa et al. (2007)
Wound healing: Reduction of scar formation	Blazsó et al. (2004)
Reduction of pain associated with pregnancy	Kohama & Inoue (2006)
Minimization of gingival bleeding and plaque accumulation	Kimbrough et al. (2002)
Inhibitory effect on mast cell histamine release	Sharma et al. (2003)
Prevention of haemolytic injury	Sharma et al. (2003)
Protection from ionizing radiation damage by X-rays	Ramos et al. (2006)
Reduction of talc-induced neoplastic transformation: A potent chemopreventative agent against ovarian carcinogenesis	Buz'Zard et al. (in press)
Prevention of fluoride-induced release of <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosaminidase isozymes from renal lysosomes	Arhima et al. (2004)
Relief of attention deficit/hyperactivity disorder symptoms of children	Muchová et al. (2006)
Treatment of melasma, a common disorder of cutaneous hyperpigmentation	Ni et al. (2002)
Treatment of vascular retinopathies	Spadea & Balestrazzi (2001)
Treatment of migraine: Reduction of headache frequency and severity	Chayasirisobhon (2006)

제 7 장 참고문헌

- Araghi-Niknam M, Hosseini S, Larson D, Rohdewald P, Watson RR (1999) Pine bark extract reduces platelet aggregation. *Integrative Med.* 2:73-77.
- Arhima MH, Gulati OP, Sharma SC (2004) The effect of Pycnogenol on fluoride induced rat kidney lysosomal damage *in vitro*. *Phytother. Res.* 18:244-246.
- Ayres MP, Clausen TP, MacLean SF, Redman AM Jr, Reichardt PB (1997) Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology* 78:1696-1712.
- Bayeta E, Benjamin HS, Lau MD (2000) Pycnogenol inhibits generation of inflammatory mediators in macrophages. *Nutr. Res.* 20:249-259.
- Behrens A, Maie N, Knicker H, Kögel-Knabner I (2003) MALDI-TOF mass spectrometry and PSD fragmentation as means for the analysis of condensed tannins in plant leaves and needles. *Phytochem.* 62:1159-1170.
- Bennick A (2002) Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* 13:184-196.
- Bergeron C, Marston A, Antus S, Gauthier R, Hostettmann K (1998) Flavonoids from *Pyrola elliptica*, *Phytochemistry* 49:233-236.
- Berryman AM, Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB (2004) Influence of treatment of diabetic rats with combinations of Pycnogenol, β -carotene and α -lipoic acid on parameters of oxidative stress. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 18:345-352.
- Bisanda ETN, Ogola WO, Tesha JV (2003) Characterization of tannin resin blends for particle board applications. *Cement & Concrete Composites* 25:593-598.
- Bito T, Roy S, Sen CK, Packer L (2000) Pine bark extract Pycnogenol downregulates IFN- γ -induced adhesion of T cells to human keratinocytes by inhibiting inducible ICAM-1 expression. *Free Rad. Biol. Med.* 28:219-227.
- Blazsó G, Gábor M, Schönlaui F, Rohdewald P (2004) Pycnogenol[®] accelerates wound healing and reduces scar formation. *Phytother. Res.* 18:579-581.
- Bors W, Michel C, Sterrmaier K (2000) Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. *Arch.*

- Biochem. Biophys. 374:347-355.
- Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB, Lister C, Matthews D, MacLean MR, Lean MEJ, Duthie GG, Crozier A (2000) Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *J. Agric. Food Chem.* 48:220-230.
- Buz'Zard AR, Lau BHS, Pycnogenol® reduces talc-induced neoplastic transformation in human ovarian cell cultures. *Phytother. Res.* in press.
- Chayasirisobhon S (2006) Use of a pine bark extract and antioxidant vitamin combination product as therapy for migraine in patients refractory to pharmacologic medication. *Headache* 46:788-793.
- Cho KJ, Yun CH, Yoon DY, Cho YS, Rimbach G, Packer L, Chung AS (2000) Effect of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritima* on proinflammatory cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168:64-71.
- Cren-Olivé C, Wieruszkeski JM, Maes E, Rolando C (2002) Catechin and epicatechin deprotonation followed by ¹³C NMR. *Tetrahedron Lett.* 43:4545-4549.
- Cui Y, Xie H, Wang J (2005) Potential biomedical properties of *Pinus massoniana* bark extract. *Phytother. Res.* 19:34-38.
- Czochanska Z, Foo LY, Newman RH, Porter LJ, Thomas WA (1979) Direct proof of a homogeneous polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidins. *JCS Chem. Commun.* 375:375-377.
- Czohcanska Z, Foo LY, Newman RH, Porter LJ (1980) Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units and molecular weight, *Journal of the Chemical Society Perkin Transaction* 1:2278-2286.
- Dalzell SA, Kerven GL (1998) A rapid method for the measurement of *Leucaena spp* proanthocyanidins by the proanthocyanidin (butanol/HCl) assay. *J. Sci. Food Agric.* 78:405-416.
- Dellus V, Mila I, Scalbert A, Menard C, Michon V, Herve du Penhoat CLM (1997) Douglas-fir polyphenols and heartwood formation. *Phytochem.* 45:1573-1578.
- Devaraj S, Vega-López S, Kaul N, Schönlau F, Rohdewald P, Jialal I (2002) Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases

- plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids* 37:931-934.
- Dueñas M, Estrella I, Hernández T (2004) Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.), *Eur. Food Res. Technol.* 219:116-123.
- Erasto P, Bojase-Moleta G, Majinda RRT (2004) Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the root wood of *Bolusanthus speciosus*, *Phytochemistry* 65:875-880.
- Feng WH, Wei HL, Liu GT (2002) Effect of Pycnogenol[®] on the toxicity of heart, bone marrow and immune organs as induced by antitumor drugs. *Phytomed.* 9:414-418.
- Figuro E, Soory M, Cerero R, Bascones A (2006) Oxidant/antioxidant interactions of nicotine, Coenzyme Q10, Pycnogenol and phytoestrogens in oral periosteal fibroblasts and MG63 osteoblasts. *Steroids* 71:1062-1072.
- Flamini R (2003) Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: polyphenols. *Mass Spectrom. Rev.* 22:218-250.
- Foo LY (1981) Proanthocyanidins: gross chemical structures by infrared spectra. *Phytochem.* 20:1397-1402.
- Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N (2003) The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochem.* 62:1159-1170.
- Fridrich D, Kern M, Fritz J, Pahlke G, Köhler N (2007) The epidermal growth factor receptor and human topoisomerases represent potential cellular targets of oligomeric procyanidins. *Mol. Nutr. Food Res.* 51:195-200.
- Friess W (1998) Collagen: biomaterial for drug delivery. *Euro. J. Pharm. Biopharm.* 45:113-136.
- Grimm T, Schäfer A, Högger P (2004) Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (Pycnogenol). *Free Rad. Biol. Med.* 36:811-822.
- Guo Q, Zhao B, Packer L (1999) Electron spin resonance study of free radicals formed from a procyanidin-rich pine (*Pinus maritima*) bark

- extracts, Pycnogenol. *Free Rad. Biol. Med.* 27:1308-1312.
- Guri A, Kefalas P, Roussis V (2006) Antioxidant potential of six pine species. *Phytother. Res.* 20:263-266.
- Hagerman AE, Zhao Y, Johnson S, Methods for determination of condensed and hydrolysable tannins. In F. Shahidi (Ed.), *Antinutrients and phytochemicals in foods* pp. 209-222 (1997). ACS Symposium Series 662. Washington, DC. American Chemical Society.
- Hagerman AE (2002) Tannin chemistry. www.users.muohio.edu/hagermae
- Hasegawa N (2000) Inhibition of lipogenesis by Pycnogenol. *Phytother. Res.* 14:472-473.
- Harborne JB, *Phytochemical methods*. Chapman and Hall, New York.
- Harborne JB, Mabry TJ (1982) *The flavonoids: advances in research*, Chapman and Hall, New York.
- Hasegawa N, Kinoshita H, Mochizuki M (2007) Pycnogenol increases the probability of the contraction state in chick embryonic cardiomyocytes, indicating inotropic effects. *Phytother. Res.* 21:181-182.
- Hassan EBM, Mun SP (2002) Liquefaction of pine bark using phenol and lower alcohols with methanesulfonic acid catalyst. *J. Ind. Eng. Chem.* 8: 359-364.
- Hemingway RW, in: R.W. Hemingway, J.J. Karchesy (Eds), *Chemistry and significance of condensed tannins*, Plenum, New York, p. 83 (1989).
- Ho YS, McKay G (1998) Sorption of dye from aqueous solution by peat. *Chem. Eng. J.* 70:115-124.
- Ho YS, McKay G (1999) Pseudo-second order model for sorption processes. *Process. Biochem.* 34:451-465.
- Hosseini S, Lee JM, Sepulveda RT, Rohdewald P, Watson RR (2001) A randomized, double-blind, placebo-controlled, prospective, 16 week crossover study to determine the role of Pycnogenol in modifying blood pressure in mildly hypertensive patients. *Nutr. Res.* 21:1251-1260.
- Huang WW, Yang JS, Lin CF, Ho WJ, Lee MR (2005) Pycnogenol induces differentiation and apoptosis in human promyeloid leukemia HL-60 cells.

- Leukemia Res. 29:685-692.
- Hussein L, Fattah MA, Salem E (1990) Characterization of pure proanthocyanidins isolated from the hulls of faba beans. J. Agric. Food Chem. 38:95-98.
- Janisch K, Hippeli S, Dornisch K, Kern S, Elstner EF (2002) Determination of the antioxidative potential of human plasma after supplementation with pycnogenol and whey. Food Res. Intern. 35:257-266.
- Jerez M, Selga A, Sineiro J, Torres JL, Núñez MJ (2007) A comparison between bark extracts from *Pinus pinaster* and *Pinus radiata*: Antioxidant activity and procyanidin composition. Food Chem. 100:439-444.
- Luximon-Ramma A, Bahorun T, Crozier A, Zbarsky V, Datla KP, Dexter DT, Aruoma OI (2005) Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. Food Res. Int. 38:357-367.
- Karonen M, Loponen J, Ossipov V, Pihlaja K (2004) Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 522:105-112.
- Kennedy JA, Taylor AW (2003) Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. J. Chrom. A 995:99-107.
- Kim S, Sarathchandra D, Mainwaring DE (1996) Effect of urea on molecular and colloidal aggregation of proanthocyanidin polymers from *Pinus radiata*, J. Appl. Poly. Sci. 59:1979-1986.
- Kim YM, Wang MH, Rhee HI (2004) A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. Carbohydrate Res. 339:715-717.
- Kim YM, Jeong YK, Wang MH, Lee WY, Rhee HI (2005) Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. Nutr. 21:756-761.
- Kimbrough C, Chun M, dela Roca G, Lau BHS (2002) Pycnogenol[®] chewing gum minimizes gingival bleeding and plaque formation. Phytomed. 9:410-413.
- Kjaer M, Langberg H, Miller BF, Boushel R, Cramer R, Koskinen S,

- Heinemeier K, Olesen JL, Døssing S, Hansen M, Pedersen SG, Rennie MJ, Magnusson P (2005) Metabolic activity and collagen turnover in human tandom in response to physical activity. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* 5:41-52.
- Koch R (2002) Comparative study of Venostasin[®] and Pycnogenol[®] in chronic venous insufficiency. *Phytother. Res.* 16:S1-S5.
- Kohama T, Inoue M (2006) Pycnogenol[®] alleviates pain associated with pregnancy. *Phytother. Res.* 20:232-234.
- Kraus TEC, Yu Z, Preston CM, Dahlgren RA, Zasoski RJ (2003) Linking chemical reactivity and protein precipitation to structural characteristics of foliar tannins. *J. Chem. Ecol.* 29:703-730.
- Krueger CG, Dopke NC, Treichel PM, Folts J, Reed JD (2000) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of polygalloyl polyflavan-3-ols in grape seed extract. *J. Agric. Food Chem.* 48:1663-1667.
- Ku CS, Jang JP, Mun SP (2007) Exploitation of polyphenol-rich pine barks from potent antioxidant activity. *J. Wood Sci.* in press.
- Kyriazi M, Yova D, Rallis M, Lima A (2006) Cancer chemopreventive effects of *Pinus maritima* bark extract on ultraviolet radiation and ultraviolet radiation-7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced skin carcinogenesis of hairless mice. *Cancer Lett.* 237:234-241.
- Lagergren B, Svenka VP (1898) as cited by Trivedy et al. Adsorption of cellulose triacetate on calcium silicate. *Environ. Poly.* 9, 525 (1973).
- Langmuir I (1918) The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* 40:1361-1403.
- Le Nest G, Caille O, Woudstra M, Roche S, Guerlesquin F, Lexa D (2004) Zn-polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: I optical and NMR studies. *Inorgan. Chim. Acta* 357:775-784.
- Lewis CE, Walker JRL, Lancaster JE, Sutton KH (1998) Determination of anthocyanidins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: coloured

- cultivars of *Solanum tuberosum* L.. *J. Sci. Food Agric.* 77:45-57.
- Li TM, Li WK, Yu JG (1997) Flavonoids from *Artabotrys hexapetalus*. *Phytochem.* 45:831-833.
- Liu X, Wei J, Tan F, Zhou S, Würthwein, Rohdewald P (2004) Pycnogenol[®], French maritime pine bark extract, improves endothelial function of hypertensive patients. *Life Sci.* 74:855-862.
- Liu X, Wei J, Tan F, Zhou S, Würthwein G, Rohdewald P (2004) Antidiabetic effect of Pycnogenol[®] French maritime pine bark extract in patients with diabetes type II. *Life Sci.* 75:2505-2513.
- Lu Y, Bennick A (1998) Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Arch. Oral Biol.* 43:717-728.
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB (1970) The systematic identification of flavonoids, Springer, New York.
- Maritim A, Dene BA, Sanders RA, Watkins III JB (2003) Effects of Pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17:193-199.
- McKay G, Ho YS, Ng JCY (1999) Biosorption of copper from wastewaters: a review. *Sep. Purif. Meth.* 28:87-125.
- Moini H, Guo Q, Packer L (2000) Enzyme inhibition and protein-binding action of the procyanidin-rich French maritime pine bark extract, Pycnogenol: Effect on xanthine oxidase. *J. Agri. Food Chem.* 48:5630-5639.
- Mozetič B, Tomažič I, Škvarč A, Trebše P (2006) Determination of polyphenols in white grape berries cv. *Rebula*. *Acta Chim. Slov.* 53:58-64.
- Nakanishi-Ueda T, Kamegawa M, Ishigaki S, Tsukahara M, Yano S, Wada K, Yasuhara H (2006) Inhibitory effect of lutein and Pycnogenol on lipid peroxidation in porcine retinal homogenate. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 38:204-210.
- Nardini M, Scaccini C, Packer L, Virgili F (2000) In vitro inhibition of the activity of phosphorylase kinase, protein kinase C and protein kinase A by caffeic acid and a procyanidin-rich pine bark (*Pinus maritima*) extract. *Biochim. Biophys. Acta* 1474:219-225.
- Newman RH, Porter LJ, Foo L, Yeap L, Johns SR, Willing RI (1987) High resolution ¹³C NMR studies of proanthocyanidin polymers (condensed

- tannins). *Magn. Reson. Chem.* 25:118-124.
- Ni Z, Mu Y, Gulati O (2002) Treatment of melasma with Pycnogenol®. *Phytother. Res.* 16:567-571.
- Nishiyama N, Suzuki K, Nagatsuka A, Yokota I, Nemoto K (2003) Dissociation states of collagen functional groups and their effects on the priming efficacy of HEMA bonded to collagen. *Biomater. Bioeng.* 82:257-261.
- Nonier MF, Absalon C, Vivas N, Vias de Gaulejac N (2004) Application of off-line size-exclusion chromatographic fractionation-matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for proanthocyanidin characterization. *J. Chrom. A* 1033:291-297.
- Ohkita M, Nakajima A, Ueda K, Takaoka M, Kiso Y, Matsumura Y (2005) Preventive effect of flavan-3-ols on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 28:1655-1657.
- Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Kawagoe N (2007) Pilot study of antioxidant mixture (vitamin E, Pycnogenol® and squalene) in healthy smokers: Inhibitory effect on oxidative DNA damage. *日本補完代替医療學會誌* 4:33-36.
- Olsen D, Yang C, Bodo M, Chang R, Leigh S, Baez J, Carmichael D, Perälä M, Hämäläinen ER, Jarvinen M, Polarek J (2003) Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:1547-1567.
- Owen RW, Haubner R, Hull WE, Erben G, Spiegelhalder B, Bartsch H, Haber B (2003) Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food Chem. Toxicol.* 41:1727-1738.
- Packer L, Rimbach G, Virgili G (1999) Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, Pycnogenol. *Free Rad. Biol. Med.* 27:704-724.
- Park YC, Rimbach G, Saliou C, Valacchi G, Packer L (2000) Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF- α secretion, and NF- κ B-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Lett.* 465:93-97.
- Pasch H, Schrepp W (2003) MALDI-TOF mass spectrometry of synthetic polymers, Springer, New York.
- Peng ZF, Strack D, Baumert A, Subramaniam R, Goh NK, Chia TF, Tan SN, Chia LS (2003) Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum*

- hydropiper* L., *Phytochem.* 62:219-228.
- Perret C, Pezet R, Tabachi R (2003) Fractionation of grape tannins and analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Phytochem. anal.* 14:202-208.
- Porter LJ, Hrstich LN, Chan BG (1986) The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochem.* 25:223-230.
- Pütter M, Grotemeyer KHM, Würthwein G, Araghi-Niknam M, Watson RR, Hosseini S, Rohdewald P (1999) Inhibition of smoking-induced platelet aggregation by aspirin and Pycnogenol. *Thrombosis Res.* 95:155-161.
- Qian H, Nihorimbere V (2004) Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 5:676-683.
- Ramos FMDM, Schönlaue F, Novaes PD, Manzi FR, Bóscolo FN, Almeida SMD (2006) Pycnogenol[®] protects against ionizing radiation as shown in the intestinal mucosa of rats exposed to X-rays. *Phytother. Res.* 20:676-679.
- Rawel HM, Kroll J, Rohn S (2001) Reactions of phenolic substances with lysozyme: physicochemical characterization and proteolytic digestion of the derivatives. *Food Chem.* 72:59-71.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free rad. Bio. Med.* 26:1231-1237.
- Reichert D, Pascui O, de Azevedo ER, Bonagamba TJ, Arnold K, Huster D (2004) A solid-state NMR study of the fast and slow dynamics of collagen fibrils at varying hydration levels. *Magn. Reson. Chem.* 42:276-284.
- Reddad Z, Gerente C, Andres Y, Cloirec PL (2002) Adsorption of several metal ions onto a low-cost biosorbent: Kinetic and equilibrium studies. *Environ. Sci. Technol.* 36:2067-2073.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganaga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Bio. Med.* 20:933-956.
- Rihn B, Saliou C, Bottin MC, Keith G, Packer L (2001) From ancient remedies to modern therapeutics: Pine bark uses in skin disorders revisited.

- Phytother. Res. 15:76-78.
- Samejima M, Yoshimoto T (1981) General aspects of phenolic extractives from coniferous barks. *Mokuzai Gakkaishi* 27:491-497.
- Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, Meewes C, Wlaschek M (2000) Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp. Gerontol.* 35:307-316.
- Schäfer A, Chovanová Z, Muchová J, Sumegová K, Liptáková A, Ďuračková Z, Högger P (2005) Inhibition of COX-1 and COX-2 activity by plasma of human volunteers after ingestion of French maritime pine bark extract (Pycnogenol). *Biomed. Pharmacother.* 60:5-9.
- Schäfer A, Högger P (2007) Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol®) effectively inhibit α -glucosidase. *Diabetes Res. Clin. Practice* 77:41-46.
- Senthilkumar R, Vijayaraghavan K, Thilakavathi M, Iyer PVR, Velan M (2006) Seaweeds for the remediation of wastewaters contaminated with zinc(II) ions. *J. Hazard. Mater.* 136:791-799.
- Senthilmohan ST, Zhang J, Stanley RA (2003) Effects of flavonoid extract Enzogenol® with vitamin C on protein oxidation and DNA damage in older human subjects. *Nutr. Res.* 23:1199-1210.
- Shand B, Strey C, Scott R, Morrison Z, Giese S (2003) Pilot study on the clinical effect of dietary supplementation with Enzogenol®, A flavonoid extract of pine bark and vitamin C. *Phytother. Res.* 17:490-494.
- Sharma SC, Sharma S, Gulati OP (2003) Pycnogenol® inhibits the release of histamine from mast cells. *Phytother. Res.* 17:66-69.
- Sharma SC, Sharma S, Gulati OP (2003) Pycnogenol® prevents haemolytic injury in G6PD deficient human erythrocytes. *Phytother. Res.* 17:671-674.
- Silanikove N, Perevolotsky A, Provenza FD (2001) Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Ani. Feed Sci. Technol.* 91:69-81.
- Siler-Marsiglio KI, Paiva M, Madorsky I, Serrano Y, Neeley A, Heaton MB (2004) Protective mechanisms of Pycnogenol® in ethanol-insulted cerebellar granule cells. *Wiley Periodicals, Inc.* p. 267-276.
- Sionkowska A, Wisniewski M, Skopinska J, Kennedy CJ, Wess TJ (2004) Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*

25:795-801.

- Saliou C, Rimbach G, Moini H, McLaughlin L, Hosseini S, Lee JM, Watson RR, Packer L (2001) Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor- κ B-dependent gene expression in keratinocytes are modulated by a French maritime pine bark extract. *Free Rad. Biol. Med.* 30:154-160.
- Spadea L, Balestrazzi (2001) Treatment of vascular retinopathies with Pycnogenol[®]. *Phytother. Res.* 15:219-223.
- Stefanescu M, Matache C, Onu A, Tanaseanu S, Dragomir C, Constantinescu I, Schönla F, Rohdewald P, Szegli G (2001) Pycnogenol[®] efficacy in the treatment of systemic lupus erythematosus patients. *Phytother. Res.* 15:698-704.
- Stevens JF, H't Hart ET, Elema A (1996) Bolck, Flavonoid variation in Eurasian Sedum and Sempervivum. *Phytochem.* 41:503-512.
- Sun B, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46:4267-4274.
- Takahata Y, Ohnishi-Kameyama M, Furuta S, Takahashi M, Suda I (2001) Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity. *J. Agric. Food Chem.* 49:5843-5847.
- Takata S, Shibata A, Yonezu H, Yamada T, Takahashi M, Abbaspour A, Yasui N (2004) Biophysic evaluation of bone quality: application of Fourier transform infrared spectroscopy and phosphorus-31 solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Med. Invest.* 51:133-138.
- Torras MAC, Faura CA, Schönla F, Rohdewald P (2005) Antimicrobial activity of Pycnogenol[®]. *Phytother. Res.* 19:647-648.
- Trebatická J, Kopasová S, Hradečná Z, Činovský K, Škodáček I, Šuba J, Muchová J, Žitňanová I, Waczulíková I, Rohdewald P, Ďuračková Z (2006) Treatment of ADHD with French maritime pine bark extract, Pycnogenol[®]. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 15:329-335.
- Tsuboi Y, Kimoto N, Kabeshita M, Itaya A (2001) Pulsed laser deposition of

- collagen and keratin. J. Photochem. Photobiol. A 145:209-214.
- Yazaki Y, Hillis WE (1977) Polyphenolic extractives of *Pinus radiata* bark. Holzforschung 31:20-25.
- Tourino S, Selga A, Jinénez A, Juliá L, Lozano C, Lizárraga D, Cascante M, Torres JL (2005) Procyanidin fractions from pine (*Pinus pinaster*) bark: Radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells. J. Agri. Food Chem. 53:4728-4735.
- van den Berg R, Haenen GRMM, van den Berg H, Bast A (1999) Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chem. 66:511-517.
- Vijayaraghavan K, Palanivelu K, Velan M (2006) Biosorption of copper(II) and cobalt(II) from aqueous solutions by crab shell particles. Biores. Technol. 97:1411-1419.
- Virgili F, Kim D, Packer L (1998) Procyanidins extracted from pine bark protect α -tocopherol in ECV 304 endothelial cells challenged by activated RAW 264.7 macrophages: Role of nitric oxide and peroxynitrite. FEBS Lett. 431:315-318.
- Vigili F, Kobuchi H, Packer L (1998) Procyanidins extracted from *Pinus maritima* (Pycnogenol[®]): Scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism in activated murine RAW 264.7 macrophages. Free Rad. Biol. Med. 24:1120-1129.
- Vuorela S, Kreander K, Karonen M, Nieminen R, Hämäläinen M, Galkin A, Laitinen L, Salminen JP, Moilanen E, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P, Heinonen M (2005) Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry and pine bark phenolics for health related effects. J. Agri. Food Chem. 53:5922-5931.
- Weber HA, Hodges AE, Guthrie JR, O'Brien BM, Robaugh D, Clark AP, Harris RK, Algaier JW, Smith CS (2007) Comparison of proanthocyanidins in commercial antioxidants: Grape seed and pine bark extracts. J. Agric. Food Chem. 55:148-156.
- Xu L, Diosady LL (2000) Interactions between canola proteins and phenolic

- compounds in aqueous media. Food Res. Intern. 33:752-731.
- Zhang D, Hamazu Y (2004) Phenolic compounds and their antioxidant properties in different tissues of carrots (*Daucus carota* L.). Food Agric. Environ. 2:95-100.
- Zhang K, Zuo Y (2004) GC-MS determination of flavonoids and phenolic and benzoic acids in human plasma after consumption of cranberry juice. J. Agric. Food Chem. 52:222-227.
- 심중섭 외 5인, 임산화학, 향문사, p. 423 (1987).
- 조남석, 소나무수피 알칼리추출물의 한외여과 및 집착제 제조 특성, 목재공학회 26(1), 29-37 (1998).
- 황병호 외 11인, 목질바이오매스, 선진문화사, p. 19 (1998).