

발간등록번호

11-1541000-000500-01

최 종 보 고 서

옥수수겨로부터 피부 미백 기능성 소재 개발 및 제품화 (Development of Skin Whitening Materials and Cosmetics Derived from Corn Bran)

1. 소재평가 및 화장품개발

(Evaluation of Materials and Development of Cosmetics)

2. 소재개발 및 특성분석

(Development of Materials and Analysis of Physical Properties)

3. 피부안전성 및 유효성평가

(Evaluation of Skin Safety and Efficacy)

(주)사임당화장품

농림수산식품자료실



0005459

농림수산식품부

1.7
390
010-80

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “옥수수겨로부터 피부 미백 기능성 소재 개발 및 제품화” 과제
(세부과제 1 : 소재평가 및 화장품개발
협동과제 1 : 소재개발 및 특성분석
협동과제 2 : 피부안전성 및 유효성평가)
의 보고서로 제출합니다.

2010 년 6 월 16 일

주관연구기관명 : (주)사임당화장품

주관연구책임자 : 윤 경 섭

세부연구책임자 : 윤 경 섭

연 구 원 : 김 자 영

연 구 원 : 홍 인 기

연 구 원 : 정 택 규

연 구 원 : 김 미 진

연 구 원 : 임 경 란

협동연구기관명 : 대구가톨릭대학교

협동연구책임자 : 최 상 원

협동연구기관명 : 더마프로

협동연구책임자 : 고 재 숙

요 약 문

I. 제 목

옥수수겨로부터 피부 미백 기능성 소재 개발 및 제품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구개발의 목적은 옥수수 전분 제조과정에서 부산물로 대량 생산되는 옥수수겨로부터 피부 항노화성 hydrocinnamic acid derivatives (HCAD, 하이드로신나믹유도체)의 분리 및 정제, 항산화 및 항노화활성 평가, 미백 및 자외선차단 유효성 평가, 미백기전 평가, 안전성 및 독성평가 및 임상평가를 통한 신규 기능성 미백성분 개발과 고부가가치의 피부항노화 기능성 미백화장품을 개발함으로써 농산 자연자원 활용과 신규 소재 개발에 의한 농림산업과 화장품 산업에 기여하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

화장품분야는 신기술이 융합될 수 있는 대표적인 분야로, 피부보호라는 수동적 개념의 제품에서 천연소재의 활용과 미세 유효물질 전달시스템을 이용한 효능의 극대화 등 적극적 개념의 제품으로 패러다임이 변화하고 있는 추세이다. 21세기 화장품 업계의 화두는 기능성화장품이라고 할 정도로 기능성화장품에 대한 관심과 소비가 증가하고 있으므로, 미래의 화장품개발은 안정성만을 강조한 일반화장품이 아닌, 주름개선, 미백 및 자외선차단 등의 적극적인 개념의 도입이 강화된, 효능·효과를 강조한 기능성화장품에 초점을 맞추어 수행하는 것이 매우 중요하다.

옥수수의 전분제조 과정(dry milling)에서 부산물로 대량 얻어지는 옥수수겨(corn bran)는 비소화성 다당류와 회분을 많이 함유하고 있어 현재 거의 대부분 사료로 사용되고 있어 고부가가치 산업에 활용되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 미활용 옥수수겨로부터 유용 생리활성물질을 추출하여 기능성 신소재로서 개발할 필요가 있다.

현재 기능성화장품으로 분류되어 있는 화장품은 주름개선제품, 미백제품, 자외선차단 제품군이 있다. 현재 고시되어 있는 기능성성분의 대부분은 매우 불안정한 원료들이기 때문에 다양한 형태의 화장품에 사용되지 못하고 있다. 이에 기존의 기능성 성분보다 피부에의 유효성과 안전성이 높으며 제형에서의 안정성이 확보되는 천연에서 유래된 성분이 그 해답이 될 수 있다

옥수수겨로부터 기능성 미백화장품의 신소재 개발은 현재 거의 대부분 수입에 의존하고 있는 옥수수를 국내 주요 재배작물로써 다시 일으키는 계기를 마련해 줄 수 있기에 국가 정책적인 차원에서도 옥수수의 산업 활성화를 위해 본 연구의 수행은 꼭 필요한 실정이다. 또한 옥수

수겨에 유일하게 다량 함유된 HCAD (0.5~1.0%, 건조 옥수수겨)는 선행 연구에서 피부 항노화작용 이외에도 항당뇨, 항균 및 항산화활성을 지니고 있는 생리활성물질로써 밝혀지고 있기 때문에 향후 옥수수의 폴리아민유도체는 화장품산업뿐만 아니라 기능성식품 및 의약품 산업에도 크게 기여할 것으로 예상된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 옥수수겨로부터 피부항노화 소재 개발 및 생산

- 옥수수겨로부터 HCAD의 분리, 정제, 동정 및 화학적 특성 분석
- 옥수수겨로부터 분리된 HCAD의 물리·화학적 안정성 조사
- 옥수수겨로부터 분리된 HCAD의 항산화활성 측정
- 옥수수 품종별, 가공방법(볶음, 찜, fry 및 microwave 처리), 및 제분방법(dry milling 및 wet milling)에 따른 HCAD의 함량 변화 분석
- 효소처리 및 산 또는 알칼리 처리에 따른 HCAD의 함량 변화 분석
- 여러 칼럼크로마토그래피에 의한 옥수수겨로부터 HCAD의 대량 분리기술 개발
- 효소처리, 용매분획 및 흡착이온수지크로마토그래피에 의한 polyamine conjugates (PCs, 폴리아민유도체)의 대량분리 및 생산
- 산 또는 알칼리처리, 용매분획 및 흡착이온수지크로마토그래피에 의한 ferulate oligomers (diferulate 및 triferulate)의 대량분리 및 생산
- 최종 생산된 HCAD 함유 정제분말의 순도, 함량, 및 화학적 특성에 관한 spec 작성

2. 유효성평가, 나노소재 개발과 적용 미백화장품 개발

- 소재의 미백활성 평가(기존 미백제와 비교)
- 소재의 미백활성 기전 연구
- 소재에 대한 멜라닌생성 세포의 세포독성 평가
- 소재의 자외선차단 평가(기존 자외선차단제와 비교)
- 피부에 효과적인 전달을 위한 나노캡슐(나노입자) 소재 개발 및 물성 평가
- 안정성 및 역가 안정성 평가
- 표준화, 기준 및 시험방법 확립
- ICID (국제화장품원료집) 등재
- 미백화장품 제형 점검 및 제품에 대한 안정성 및 역가 안정성 평가
- 자외선차단 화장품 제형 점검 및 제품에 대한 안정성 및 역가 안정성 평가
- 미백화장품 및 자외선차단 화장품에 대한 사용성 임상평가
- 미백화장품에 대한 KFDA (한국식품의약품안전청) 미백화장품 인증
- 차별화된 유일의 기능성 비교시 미백 소재를 활용하여 미백화장품 3종 개발을 위한 처방 및 생산공정 확립

- 시제품 개발 및 제조

3. HCAD의 안전성, 적용 미백화장품의 유효성 임상평가

- 소재의 미백활성 유효성 평가(*in vitro* 시험)
- 소재의 안전성 및 독성 평가(동물시험)
- 소재의 인체피부 안전성 평가(인체접포시험)
- 미백화장품의 인체피부 안전성 평가
- 미백화장품의 인체피부 효능 평가

IV. 연구개발 결과

1. 옥수수겨로부터 피부항노화 소재 개발 및 생산

옥수수겨를 이용한 피부노화 예방용 기능성화장품을 개발하기 위한 연구의 일환으로 옥수수겨로부터 HCAD의 분리 및 동정 그리고 항산화 및 피부항노화활성을 측정하였다. 또한, 옥수수겨의 품종별, 제분방법 및 가공처리에 따른 HCAD의 함량 변화 및 효소처리 및 산 또는 알칼리 처리에 따른 HCAD의 함량 변화를 측정함으로써 고품질의 옥수수겨추출물의 제조방법을 개발하였으며, 아울러 HPLC에 의한 HCAD 함유 옥수수겨추출물의 정량분석 방법 개발 및 안정성 조사 그리고 순도, 함량 및 물리·화학적 특성에 관한 spec을 작성한 결과는 다음과 같다.

가. 옥수수겨로부터 HCAD의 추출, 분리, 정제 및 동정

먼저, 옥수수겨의 80% 에탄올추출물을 노르말-헥산으로 분획하여 탈지하고 얻어진 하층을 부분 감압농축한 후 CH_2Cl_2 를 가하여 분획한 후 CH_2Cl_2 추출물을 silica gel, ODS-A, 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 순차적으로 실시하여 3가지 polyamine conjugates (PCs), 즉, *N*-dicoumaroylputrescine (DCP, 13.6 mg, 수율: 0.68 mg%), *N*-*p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine (CFP, 28.8 mg, 수율: 1.44 mg%) 및 *N*-diferuloylputrescine (DFP, 156.3 mg, 수율: 7.82 mg%)를 각각 순수하게 분리 및 정제하였고, 각 화합물의 UV, NMR 및 FAB-MS spectra를 통해 옥수수겨로부터 분리된 3개의 PCs의 화학구조를 동정하였다.

나. 옥수수겨로부터 분리한 HCAD의 화학적 특성 및 물리·화학적 안정성

분리된 3가지 PCs 화합물은 305~320 nm 부근에서 최대 흡수파장을 나타내었으며, 4.28~4.60 흡광물계수 및 130~230 녹는점을 갖고 있었다. 3가지 PCs는 온도, pH에는 대체로 안정하였으나 자연광, 자외선 및 효소에는 불안정하였으며, 특히 360 nm 자외선 부근에서 크게 불안정하였다.

다. 옥수수겨로부터 분리한 HCAD의 항산화활성 평가

다음, 옥수수겨로부터 분리된 3가지 PCs와 그들의 모핵인 ferulic (FA) 및 *p*-coumaric (CA) acids의 DPPH, superoxide 및 hydroxyl radical scavenging activity를 측정된 결과, 5가지 페놀화합물의 DPPH radical scavenging activity는 DFP ($IC_{50} = 38.46 \mu M$)가 가장 높았으며, 그 다음으로 FA ($IC_{50} = 45.27 \mu M$) 및 CFP ($IC_{50} = 70.37 \mu M$) 순이었으며, CA 및 DCP는 매우 낮은 활성을 나타내었다. 또한, superoxide radical scavenging activity는 DFP ($IC_{50} = 291.62 \mu M$)가 가장 높았으며, 그 다음으로 CFP ($IC_{50} = 488.04 \mu M$) 및 FA ($IC_{50} = 5,312.30 \mu M$) 순이었으며, CA 및 DCP는 매우 낮은 활성을 나타내었다. 한편, 5가지 페놀화합물 중 DCP ($IC_{50} = 164.84 \mu M$)는 α -tocopherol ($IC_{50} = 155.67 \mu M$)과 유사하게 가장 강한 hydroxyl radical scavenging activity를 나타내었으며, 그 다음으로 CFP ($IC_{50} = 192.45 \mu M$) > CA ($IC_{50} = 256.31 \mu M$) > DFP ($IC_{50} = 351.87 \mu M$) > FA ($IC_{50} = 502.11 \mu M$) 순으로 나타났다.

라. 옥수수 품종별, 가공방법, 가공부산물 및 추출방법에 따른 HCAD 함량 비교

옥수수 품종별 HCAD 함량을 비교한 결과, 옥수수 품종별 HCAD 함량은 다소 차이가 있었지만 대체적으로 사료용 옥수수 품종의 3 가지 PCs 함량이 가장 높았으며, 그 다음으로 감미 옥수수 및 찰옥수수 순으로 함량이 높았으며, 두 가지 cinnamic acids (*p*-coumaric 및 ferulic acids) 함량은 몇 품종을 제외하고 거의 미량으로 존재하였다. 여러 옥수수 품종 중 미국 옥수수 품종인 “P3394”가 옥수수 중 가장 높은 PCs 함량을 나타내었다. 한편, 습식법(wet-milling) 및 건식법(dry-milling)에 의해 제조된 옥수수 전분가공부산물 중의 HCAD 함량은 건식법 처리 시 가공부산물로 얻어지는 옥수수겨가 모든 가공부산물 중 가장 높은 HCAD 함량을 나타내었으며, 특히 3가지 PCs 함량이 가장 높은 반면, 두 가지 cinnamic acids 함량은 습식법 처리 시 가공부산물로 얻어지는 옥피가 가장 높았다. 옥수수 가공처리(볶음, 찜, 마이크로웨이브, 팽화 및 압출성형)에 따른 HCAD 함량 변화는 각 처리에 따라 증감 변화가 크게 나타났으나 두 가지 free cinnamic acid 함량은 모든 처리구에서 다소 증가하였으며, 특히 찜처리 시 대조군보다 가장 높은 증가를 보였다. 옥수수겨 추출방법에 따른 HCAD 함량 변화는 초음파추출(대조군)에 비해 초고압추출, 압출성형처리 후 초음파추출, 압출성형처리 후 초고압추출 시 대조군보다 각각 약 1.2배, 1.3배, 1.4배 높아 모든 추출방법에서 압출성형처리 후 초고압추출이 가장 높은 추출효과를 나타내었다. 한편, 효소처리 및 산 또는 알칼리처리에 의해 제조된 HCAD 함유 옥수수겨추출물의 5가지 HCAD 함량을 측정된 결과, 두 가지 free cinnamic acid 함량은 약간 증가한 반면, 3가지 PCs 함량은 크게 감소하였으며, 특히 1 N HCl 및 NaOH 처리 시 거의 소실되었다. 다음, 옥수수겨 80% 에탄올 초음파추출에 이은 CH_2Cl_2 분획 및 Diaion HP-20 흡착수지 크로마토그래피를 순차적으로 실시하여 고품질의 부분정제 옥수수겨 추출물(partially purified corn bran extract, Corn BE, 수율: 0.32%, DFP 함량 25%)을 제조하였으며, Corn BE는 pH, 온도에 강한 안정성을 나타내었으나, 효소 및 자연광 또는 자외선 하에서 매우 불안정하였다.

마. Corn BE의 spec 작성

마지막으로 피부노화 예방용 미백화장품의 원료로 사용하기 위해 제조된 고품질의 Corn BE의 순도, 함량 및 물리·화학적 특성에 관해 작성한 spec은 성상은 연한 노란색 분말로 약간의 특이취가 있으며, 수분함량 $6.71 \pm 0.40\%$, 최대흡수파장 317.3 ± 0.5 nm, pH 5.15 ± 0.07 , 납 및 비소 함량 10 ppm 및 2 ppm 이하, 총 생균수 50 ± 5.54 CFU (colony forming unit)/g, DFP의 함량은 $26.2 \pm 1.2\%$ 이었다.

이상의 결과로부터 옥수수 전분 제조과정에서 가공부산물로 대량 얻어지는 옥수수겨에 함유된 항산화 및 피부 항노화성 HCAD를 대량분리 및 정제하는 기술 개발과 더불어 HCAD 함유 고품질의 옥수수겨추출물(corn bran extract, Corn BE)의 제조 및 정량분석방법 개발과 그들의 물리·화학적인 특성과 안정성 조사, 그리고 이를 포함하는 품질특성에 관한 spec 작성을 통해 Corn BE의 표준화 및 규격화를 달성함으로써 향후 Corn BE가 기능성 미백화장품의 신소재로 널리 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

2. 옥수수겨추출물의 유효성평가, 나노소재 개발과 적용 미백화장품 개발

가. 옥수수겨추출물의 자외선차단, 항산화활성, 미백활성 탐색 및 독성 평가

옥수수겨추출물인 CFP, DFP, CH_2Cl_2 분획물 및 EtOAc 분획물에 대해 UV 흡광도를 평가한 바, 모두 두 군데에서 최대 흡수파장을 보였으며, 같은 농도에서 흡광도 순서는 $\text{CA} > \text{FA} > \text{EHMC}$ (ethylhexyl methoxycinnamate) $> \text{DFP} > \text{CFP} > \text{CH}_2\text{Cl}_2$ 분획물 $> \text{EtOAc}$ 분획물이며, 옥수수겨추출물 중 DFP는 기존 합성 자외선차단제인 EHMC와 가장 유사한 정도를 보였다.

옥수수겨추출물의 항산화활성 평가 결과는 대부분의 시료가 합성 산화방지제인 BHT보다 양호하였다.

옥수수겨추출물의 세포독성을 평가한 결과는 멜라닌생성세포(B16F1 Cell)에 대한 세포독성은 대부분 $500 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 독성을 보였으며, DFP는 $200 \mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 독성이 나타났으나, 사람섬유아세포(Human Dermal Fibroblast Cell)에 대한 세포독성은 $1000 \mu\text{g/mL}$ 농도에서 90% 이상의 세포생존율을 보였다.

옥수수겨추출물의 *in vitro* 미백활성 평가는 tyrosinase inhibition assay에서 전반적으로 L-ascorbic acid에 버금가는 미백효과를 보였으며, DOPA oxidation inhibition assay에서는 CH_2Cl_2 분획물과 EtOAc 분획물의 미백활성이 비교적 양호하였으며, melanogenesis inhibition assay에서 CH_2Cl_2 분획물 $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 알부틴과 동등한 정도이며, DFP의 함량을 65%까지 증가시킨 시료는 알부틴보다 양호하였다.

나. 옥수수겨추출물의 선정

다양한 조성의 옥수수겨추출물에 대한 미백활성을 평가한 결과, CH_2Cl_2 분획물 시료가 비교적 활성이 양호한 것으로 평가되었고, DFP 함량이 65% 수준인 시료의 경우 melanogenesis inhibition assay에서 알부틴보다 양호하였다.

CA, FA 및 CFP의 경우 tyrosinase inhibition assay 및 melanogenesis inhibition assay에

서 비교적 양호한 결과를 보여, DFP 함량 조절과 CA, FA 및 CFP가 함유된 시료의 준비가 요구되었으며, 이에 DFP 함량이 25% 수준, CFP 3~6% 수준이며, 다른 HCAD가 함유된 옥수수겨 정제분말을 외부 평가시료로 선정하였고, SID Corn BE로 명명하였다.

다. 옥수수겨추출물의 미백활성 평가

Melanogenesis inhibition assay에서 SID Corn BE는 50 µg/mL 농도에서 16.3%의 멜라닌생성 저해효과를 보였으며, 세포 내 tyrosinase 활성 저해효과 평가에서 SID Corn BE는 알부틴과 유사한 정도의 저해효과를 보였다.

멜라닌 생합성 경로에서 초기에 관여하는 microphthalmia-associated transcription factor (MITF), cAMP-response-element-binding-protein (CREB), extracellular signal-regulated kinase (ERK) 등의 초기인자에 대한 실험에서 **CFP와 DFP에서 MITF의 발현량이 두드러지게 감소함을 확인**할 수 있었다. DFP의 경우, MITF 발현량의 현저한 감소에 비해 tyrosinase 양의 감소가 적은 것으로 보아 tyrosinase 활성 저해 외에 다른 요인으로 인해 미백활성이 나타나는 것으로 보였으며, 옥수수겨추출물 중 CFP와 DFP는 미백 기능성화장품 소재로서의 활용 가능성이 높을 것으로 사료되었다.

라. 피부에 효과적인 전달을 위한 나노캡슐(나노입자) 소재 제조 및 평가 방법

SID Corn BE를 함유하는 나노에멀전(nanoemulsion), G-리포솜(liposome), 니오솜(niosome) 및 듀얼-리포솜(dual-liposome)의 다양한 나노제형을 제조하여 입도분석기와 TEM을 통해 입자를 분석한 바, 100~200 nm 수준으로 평가되었다.

나노입자 제형에 대한 30일, 50°C 보관 후 입도를 분석한 바, 니오솜 제형과 듀얼-리포솜 제형이 다소 유리하였으며, 캡슐화 시킨 SID Corn BE의 농도가 증가하면 입자 안정성이 감소하였다.

각 나노제형에 대해 보관 조건에 따라 90일간 SID Corn BE 내의 DFP를 정량한 바, 저온에서는 나노에멀전과 니오솜이 유리하였고, 고온에서는 나노에멀전과 G-리포솜이 유리하여, 40°C 보관 조건에서 90일 경과 시 88~90% 역가를 보존한 것으로 측정되었다. 각각의 나노제형을 함유한 로션에 대해서는 니오솜 제형을 함유한 로션에서 가장 양호하였으며, 40°C 보관 조건에서 90일 경과 시 82% 역가를 보존한 것으로 측정되었다

또한 각 나노제형과 나노제형을 함유한 로션에 대해 7개월 동안 40°C 보관한 경우와 6시간 동안 UV 조사 한 경우, 색차계에 의한 b 값이 증가하여 yellow 톤이 증가하였으나 비교적 온도와 광에 안정한 것으로 평가되었다.

Micro pig를 이용한 나노제형의 경피투과 평가에서 니오솜 제형(6시간 경과 후 총 경피흡수율은 8.52%)은 대조군(일반 스킨 제형, 6시간 경과 후 총 경피흡수율은 5.65%)보다 피부투과량이 많았으나 월등하지는 않았다.

마. 표준화, 기준 및 시험방법 확립, ICID 등재

SID Corn BE에 대한 원료의 제법, 성장, 확인시험, 순도시험, pH, 건조감량, 강열잔분, 미생물

한도, 지표성분의 정량법을 통해 기준 및 시험방법을 확립하고 표준화하였다.

옥수수겨추출물 4종[SID Corn BE (*Zea Mays* (Corn) Bran Extract), SID Corn CFP (Coumaramido Ferulamidobutane), SID Corn DCP (Bis-Coumaramidobutane), SID Corn DFP (Bis-Ferulamidobutane)]에 대해 국제화장품원료집인 ICID에 등재하여 화장품 원료로 사용할 수 있도록 하였다.

바. 옥수수겨추출물 적용 미백화장품 및 자외선차단 화장품의 안정성 및 역가 평가

SID Corn BE 0.1% 함유한 미백화장품 4종(화장수, 에센스, 유액, 크림)을 제조하고 냉온(4°C) 및 항온(40°C)에서 90일까지 보관하고 DFP 함량으로 역가변화를 측정할 때, 화장수 제형에서는 90% 수준, 나머지 제품에서는 80% 정도의 역가를 유지하였다. 또한 주성분 변경에 따른 사용성 품평을 진행하였다.

SID Corn BE 0.1% 함유한 자외선차단 화장품 2종(O/W, W/S 타입)을 제조하고 냉온(4°C) 및 항온(40°C)에서 90일까지 보관하고 DFP 함량으로 역가변화를 측정할 때, 80% 정도의 역가를 유지하였다.

SID Corn BE는 기존 UV-B 자외선차단제인 EHMC보다 SPF (자외선차단능력)은 낮지만 UV-A/UV-B ratio가 커서 좀 더 넓은 영역의 자외선을 차단하는 것으로 평가되었다.

사. 미백화장품에 대한 KFDA 인증 및 미백화장품 3종 시제품 제조

현재 SID Corn BE를 주성분으로 한 미백크림(사임당 디에프피 크림)을 KFDA에 비교시 미백 기능성화장품으로 허가신청 중에 있으며, 3종(미백화장수, 미백유액, 미백크림)에 대한 시제품을 제조하였다.

3. 옥수수겨추출물의 안전성, 적용 미백화장품의 유효성 임상평가

가. 미백활성 유효성 평가(*in vitro* 시험)

SID Corn BE (DFP 25%)는 cell viability assay에서, 0.1 mg/mL 농도에서 80% 이상의 세포생존율을 보였으며, tyrosinase activity inhibition과 DOPA oxidase activity inhibition assay에서는 arbutin과 유사하였다.

Melanogenesis inhibition assay에서는 알부틴보다 강하게 멜라닌 생성을 저해하였다.

나. 안전성 및 독성 평가(*in vivo* 시험)

SID Corn BE (DFP 25%)에 대해 광감작성시험, 광독성시험, 단회투여독성시험, 안점막시험, 피부감작성시험 및 피부자극시험을 실시한 바, 피부자극시험에서 일차피부자극지수가 0.71로 mild irritant (약한 자극성) 외에 자극이 나타나지 않았다.

다. 인체피부 안전성 평가(인체척포시험)

SID Corn BE (DFP 25%) 2% 및 5% 함유 시료와 0.1% 함유된 크림 제형에 대해 인체척포 시험을 실시한 바, 인체 피부 일차자극 측면에서 저자극 범주의 물질로 판단되었다.

라. 인체피부 효능 평가

SID Corn BE (DFP 25%) 0.1% 함유 크림(시험군) 및 미함유 크림(대조군)에 대하여 8주 동안 임상시험을 실시한 바, 육안평가, 기기평가 및 설문평가 모두에서 시험군 사용 시 대조군 사용 시보다 유의한 미백 개선 효과를 보였다.

피부 안전성 평가 결과, 본 시험기간 동안 총 21명의 피험자에게서 피부 이상반응은 관찰되지 않았다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 과제를 통해 미백소재로 SID Corn BE를 포함하여 ICID에 등재시킨 총 4종의 원료를 개발하였으며, SID Corn BE를 적용한 미백 화장수, 유액 및 크림의 미백제품 3종을 개발하였다.

본 과제를 통해 SCI 급 3편과 비SCI 급 2편의 학술논문 성과를 올렸으며, 2010년 2편의 추가 논문을 준비 중에 있다. 발명특허는 1건이 등록되었으며, 5건이 출원 중에 있다.

2010년에는 본 과제를 통해 개발된 미백소재를 미백 보조성분으로 적용한 3품목(에센스, 유액, 크림)의 사업화, 2010년에는 미백 주성분으로 적용한 3품목(에센스, 유액, 크림)을 사업화할 예정이다. 또한 2012년에는 미백 보조성분으로 적용하여 주름개선 및 자외선차단 화장품을 사업화할 예정이다.

SUMMARY

I. Title

Development of Skin Whitening Materials and Cosmetics Derived from Corn Bran

II. Objective and Necessity

1. Objective

Recently, much attention has been focused on development of plant-derived biologically active compounds which played important physiological roles in prevention of several pathological disorders, such as cancer, atherosclerosis, diabetes, inflammation, and aging. Particularly, corn bran as obtained by-product in the dry-milling process of corn has recently received renewed interest as a functional phytochemical source due to its high levels of hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD), such as *p*-coumaric and ferulic acids and their polyamine conjugates (PCs), such as *N,N'*-diferuloylputrescine (DFP) and *N-p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine (CFP), and *N,N'*-dicoumaroylputrescine (DCP) with anti-diabetic, antimicrobial, antioxidant and anti-melanogenic activities. Thus, this fact prompted us to search for skin anti-aging agents from corn bran and further develop functional cosmetics.

The major objective of this study is to develop skin-whitening ingredients from corn bran and their application to functional cosmetics. At first, five different HCAD were isolated and identified from corn bran, and further evaluated their antioxidant, anti-aging, skin-whitening and UV-protective effects by using several *in vitro* and *in vivo* assays. Finally, further research on application of skin-whitening ingredients derived from corn bran to functional cosmetics was also performed through elucidating their skin-whitening mechanism and evaluating safety and toxicity, and clinical trial on human skin. Development of value-added skin-whitening ingredients using unutilized corn bran and their used skin-whitening functional cosmetics made a great contribution to increase of farmer income, corn processing and cosmetic industry.

2. Necessity

As cosmetic industry is one of new representative fusion-technology industry, new paradigm shift has recently been occurred in cosmetic industry from passive concept products of skin protection to active concept products of maximization of efficacy using

transport system of nano-efficient resource and utilization of natural resources. The most-talked-about-categories of the 21 century's cosmetic industry is called as functional cosmetic market which has greatly increased and received much attention. It is very important that the development of cosmetics in the future is focused on functional cosmetic which emphasized efficacy and effect through introducing active concept products with anti-wrinkle, skin-whitening, and UV protecting effects in place of typical cosmetics emphasized safety.

At present, corn bran obtained as by-product in the dry-milling process of corn starch has been widely used as feed for livestock but not used as promising sources of valuable phytochemicals because it contained large amounts of non-digestible polysaccharides and ash. Therefore, study on isolation and identification of valuable phytochemicals in unutilized corn bran is required to develop a new functional resource.

There are three types of cosmetics, including anti-wrinkle, skin-whitening and UV protective products, in the category of functional cosmetics. Since most of approved functional constituents in cosmetics were unstable, they could not be used in a variety of cosmetics. Recently, development of new plant-derived functional components with higher efficiency and safety toward human skin, and with more stable in formulation are required to replace conventional functional constituents.

Development of new functional resources used in skin-whitening cosmetics from corn bran could be provided new opportunity with farmer in domestic who mostly depended on foreign imports. Therefore, this study is needed to perform for activating corn industry in domestic in the aspect of national politicals. In addition, HCAD (0.5~1.0%, dry base) in corn bran have recently been reported to have anti-diabetic, anti-microbial, antioxidant, and anti-melanogenic activity. In the future, HCAD are expecting to contribute in the cosmetic industry and functional foods, as well as medicines as promising sources of anti-aging therapeutic.

III. Contents and Scope of the Study

1. Development and production of skin anti-aging ingredients from corn bran

- Isolation, purification, identification of HCAD from corn bran, and analysis of their chemical properties
- Investigation of stability of HCAD isolated from corn bran against several physiochemical factors
- Evaluation of antioxidant activity of HCAD isolated from corn bran
- Quantitative changes of HCAD in corn according to cultivars, heat pretreatments and milling processes

- Quantitative changes of HCAD in corn bran extract by enzymes and acid or alkali treatments
- Development of large scale isolation and purification procedure of HCAD from corn bran by solvent fractionation and adsorption resin column chromatography
- Preparation of partially purified corn bran extract (Corn BE) containing HCAD by large scale ultrasonic extraction, solvent fractionation and Diaion HP-20 column chromatography
- Reporting on specification of Corn BE including purity and level of HCAD, and chemical properties

2. Efficacy evaluation, development of nano-materials and application to skin-whitening cosmetics

- Evaluation of skin-whitening effect, as compared to conventional skin-whitening agents
- Elucidation of action mechanism of skin-whitening effect
- Evaluation of cell toxicity against B16 melanoma cell
- Evaluation of UV protective capacity, as compared to conventional UV protective agents
- Development of nano-particle for efficient transport to skin, and rheology evaluation
- Evaluation of safety and stability
- Establishment of standardization, criteria and analysis methods
- ICID (International Cosmetics Ingredient Dictionary) registration
- Investigation of skin-whitening cosmetics formulation and evaluation of safety and stability of products
- Investigation of UV protective cosmetics formulation and evaluation of safety and stability of products
- Clinical evaluation of utilization against skin-whitening and UV protective cosmetics
- Approval of KFDA skin-whitening cosmetics against skin-whitening cosmetics
- Establishment of formulation and production procedure for development of three kinds of whitening cosmetic using differentiated unique skin-whitening source
- Development and preparation of pilot-products

3. Evaluation of safety and efficient clinical test of applied skin-whitening cosmetics

- Evaluation of skin-whitening efficacy (*in vitro*)
- Evaluation of safety and toxicity (*in vivo*)
- Safety evaluation against human skin (human patch test)
- Safety evaluation of skin-whitening cosmetics against human skin
- Efficacy evaluation of skin-whitening cosmetics against human skin

IV. Results

1. Development and production of skin anti-aging resources from corn bran

This study was conducted to develop functional skin-whitening cosmetics using antioxidant and anti-melanogenic HCAD in corn bran. At first, three polyamine conjugates, DCP, CFP and DFP were isolated from corn bran via a combination procedure of solvent fractionation, silica gel, ODS-A and Sephadex LH-20 column chromatography. Their chemical structures were identified by UV, NMR and FABMS spectrometry, and their antioxidant and anti-aging activity was also evaluated. In addition, Quantitative changes of HCAD in corn and corn bran extracts was determined by HPLC according to cultivar, milling processes and heat pretreatments, as well as enzyme and acid or alkali treatments. A partially purified corn bran extract (Corn BE) was successfully prepared by a series of extraction and purification procedures using ultrasonicator, solvent fractionation and Diaion HP-20 column chromatography. A simple and efficient analysis method for quantification of HCAD in Corn BE was developed, and the stability of Corn BE against several physiochemical factors was also determined. Finally, the results of specification of Corn BE on purity, level and physiochemical properties are as follows.

A. Extraction, isolation, purification and identification of HCAD from corn bran

Corn bran powder was extracted with 80% EtOH under large scale ultrasonicator, filtered and evaporated to EtOH extract. The EtOH extract was defatted with *n*-hexane and fractionated with CH₂Cl₂ and successively silica gel, ODS-A and Sephadex LH-20 column chromatography to isolate three PCs [(DCP, 13.6 mg, recovery: 0.68 mg%), (CFP, 28.8 mg, recovery: 1.44 mg%) & (DFP, 156.3 mg, recovery: 7.82 mg%). The chemical structures of three PCs were identified by UV, NMR and FABMS spectrometry,

B. The stability of HCAD isolated from corn bran against several physiochemical factors

Three PCs exhibited UV maximum absorption at 305~320 nm with molar extinction coefficient of 4.28~4.60, and melting point of 130~230. Five HCAD showed high stability against pH and heat, but exhibited unstable toward sunlight, UV and enzyme, especially at long wavelength of 360 nm.

C. Evaluation of antioxidant activity of HCAD isolated from corn bran

Five HCAD, including three PCs and their parent moiety, *p*-coumaric acid (CA) and

ferulic acid (FA), significantly scavenged DPPH, superoxide and hydroxyl radicals in a dose-dependent manner. Particularly, DFP showed potent DPPH ($IC_{50} = 38.46 \mu\text{M}$) and superoxide ($IC_{50} = 291.62 \mu\text{M}$) radical scavenging activities, while DCP ($IC_{50} = 164.84 \mu\text{M}$) exhibited the strongest hydroxyl radical scavenging activity, comparable to that of α -tocopherol ($IC_{50} = 155.67 \mu\text{M}$). CFP also exerted moderate DPPH, superoxide and hydroxyl radical scavenging activities.

D. Quantitative changes of HCAD of corn according to cultivar, milling process, extraction methods, and heat and enzyme pretreatments

Five HCAD in corn were quantified by HPLC according to cultivar, milling (dry- and wet-milling) and thermal pretreatments including roasting, steaming, microwave, puffing, and extruding. "P3394" and "Kwangpyeongok" dent corns had greater five HCAD content, while "Daehak" and "Mibaek", waxy corns had lesser amounts. "Gammichal" and "Gammiok" sweet corns had intermediate levels of three PCs. Corn hull and corn bran obtained as byproducts in the wet- and dry-milling process of corn had the highest levels of two cinnamic acids and three PCs, respectively. Meanwhile, levels of CA and FA in waxy corn considerably increased by five thermal pretreatments except the extruding process, and especially the steaming and puffing processes significantly increased the levels of CA and FA. However, levels of three PCs in waxy corn varied by thermal treatments. Among four extraction methods examined, the ultrahigh-pressure extraction, ultrasonic and ultrahigh-pressure extraction after extruding showed 1.2, 1.3 and 1.4 times higher extraction efficiency than control. Among five different carbohydratase treated, the ethanol extract of corn bran hydrolyzed by viscozyme L had the largest amount five HCAD. Acid and alkali treatment for preparation of corn bran extracts exert no appreciable effects on levels of five HCAD except below pH 2.0. **A partially purified corn bran extract (Corn BE)**, recovery 0.32%, 25% of DFP was prepared by 80% EtOH extraction under large scale sonicator, followed by solvent fractionation and Diaion-HP column chromatography. Corn BE showed considerable stability against temperature and pH, but unstable toward enzyme and sunlight or ultraviolet radiation.

F. Preparation of quality specification of Corn BE

Corn BE showed considerable high stability against pH, heat, but low stability toward sunlight and UV radiation. Specifications of finally produced Corn BE for use of whitening agent in cosmetics were as follows; $UV_{\lambda_{\text{max}}}$ ($317.3 \pm 0.5 \text{ nm}$), pH (5.15 ± 0.07), heavy metal ($< 10 \text{ ppm}$), Sn ($< 2 \text{ ppm}$), moisture ($6.71 \pm 0.40\%$), total microbe number ($50.0 \pm 5.54 \text{ CFU/g}$), DFP content ($26.2 \pm 1.2\%$). These results suggest that the Corn BE powder containing 25% of DFP could be useful as a promising agent for improving skin aging.

2. Efficacy evaluation, development of nano-materials and application to skin-whitening cosmetics

A. UV protective, antioxidant and skin-whitening activity, and evaluation of toxicity

From the results of determining optical density of HCAD and active fractions (CH₂Cl₂ fr. & EtOAc fr.), most of all fractions showed the maximum absorption spectra at two wavelength, and the order of OD was the highest at CA, followed by FA > EHMC (ethylhexyl methoxycinnamate) > DFP > CFP > CH₂Cl₂ fr. > EtOAc fr., in that descending order. UV protective capacity of DFP was comparable to that of well-known UV protective agents, EHMC. Antioxidant activity of HCAD was higher than that of BHT, an well-known synthetic antioxidant.

Meanwhile, cell viability of Corn BE was determined by using B16F1 melanoma cell. Most of sample showed a slight toxicity at 500 µg/mL, especially DFP exhibited some toxicity at above 200 µg/mL. Meanwhile, DFP showed above 90% of cell viability at 1,000 µg/mL against human dermal fibroblast cell.

The inhibitory effects of Corn BE in tyrosinase assay system was comparable to that of L-ascorbic acid, while in Dopa oxidase assay system, CH₂Cl₂ and EtOAc frs. exhibited somewhat inhibitory activity. In the melanoma cell system, CH₂Cl₂ fr. showed considerable inhibitory activity as much as arbutin at 100 µg/mL, especially the CH₂Cl₂ fr. with 65% DFP showed higher inhibitory activity than that of arbutin.

B. Selection of Corn BE

The CH₂Cl₂ fr. of Corn BE showed considerable tyrosinase and dopa oxidase inhibitory activities, especially the CH₂Cl₂ fr. containing 65% of DFP showed higher melanogenic inhibitory activity than that of arbutin. In addition, CA, FA and CFP also showed considerable tyrosinase and melanogenic inhibitory activity. Therefore, from control of DFP concentration and the preparation of CH₂Cl₂ fr. containing CA, FA and CFP, the CH₂Cl₂ fr. containing 25% of DFP and 6% of CFP was selected as sample, and was called as **SID Corn BE**.

C. Evaluation of skin-whitening capacity of SID Corn BE

Corn BE showed 16.3% of melanin inhibitory activity at 50 µg/mL, while Corn BE exhibited similar inhibitory activity to arbutin in the melanoma cell. CFP and DFP significantly inhibited expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) involved in the initial pathway of melanin synthesis. Especially, DFP inhibited greatly expression of MITF, but did not show a decrease in quantity of tyrosinase, indicating that the skin-whitening effect of DFP was responsible for other factors including

tyrosinase inhibitory activity. These results suggest that DFP and CFP of Corn BE may be useful as potential sources of skin-whitening agents.

D. Preparation and evaluation methods of nano-capsules for efficient transport to skin

This study produced nano-materials containing SID Corn BE such as nanoemulsion, niosome, liposome and dual-liposome. Particle size of nano-materials was established using particle analyzer and TEM. The nano-materials containing SID Corn BE showed 100 to 200 nm of particle size. From the results of evaluating physical stability of nano-materials to 50°C for a month, niosome and dual-liposome stable better than nanoemulsion and liposome. Physical stability of nano-materials decreased with increasing concentration of SID Corn Be in nano-materials.

From the results of determining quantitative of DFP in SID Corn BE with a variation of storage conditions for 90 days, stability of DFP depending on temperature. Nanoemulsion and G-liposome stable better than niosome and dual-liposome at high temperature. The potency of DFP was preserved 88~90% at 40°C for 90 days. The lotion formulations containing niosome had the highest level of stability of DFP.

Also, the nano-materials and the formulations containing nano-materials, kept at 40 °C for seven months, the yellow direction (b value, colorimeter) increased, respectively. Color stability of the formulations containing SID Corn BE was good.

Transepidermal absorption test of niosome containing SID Corn BE were performed by the OECD guidelines using micro pig skin. Transepidermal absorption total dosage of niosome was 8.52% for 6 hours. However, transepidermal absorption total dosage of control was 5.65%. Transepidermal absorption of niosome was higher than the control, was not superior

E. Standardization, Establishment of standards and test methods, Registration of ICID

This study had standardized SID Corn BE for a manufacturing process, appearance, verification test, purity test, pH, moisture content, ignition residue, microbiological test and quantitative analysis of active agent.

Also, corn bran extracts such as SID Corn BE (*Zea mays* (Corn) Bran Extract), SID Corn CFP (Coumaramido Ferulamidobutane), SID Corn DCP (Bis-Coumaramidobutane) and SID Corn DFP (Bis-Ferulamidobutane) were registered in International Cosmetic Ingredient Dictionary (ICID).

F. Stability of Whitening cosmetics products & Sun screening cosmetics products containing SID Corn BE

This study were prepared whitening cosmetics (skin, essence, lotion, cream) and sun

screening cosmetics (O/W cream, W/O cream) containing 0.1% SID Corn BE. From the results of determining quantitative of DFP in cosmetics, kept at 4°C, 40°C for 90 days, DFP titer of skin formulation was about 80 to 90%.

Also, usability evaluation was conducted with a variation of active agents.

The UV screening effect of SID Corn BE has been estimated by *in vitro* SPF method. *In vitro* SPF of SID Corn BE lower than EHMC (organic sun screening agent). However, UV-A/UV-B ratio of SID Corn BE higher than EHMC because the blocking effect for a wide ranges.

G. KFDA approval of skin-whitening cosmetics and preparation of pilot-products

SID Corn BE is the main ingredient of whitening cream, that is applying for approval as whitening functional cosmetics using unique skin-whitening source. The pilot-products; skin, lotion, and cream were prepared.

3. Evaluation of safety and clinical assesment of applied skin-whitening cosmetics

A. *In vitro* test of skin-whitening activity

SID Corn BE (DFP 25%) showed considerable cell viability with above 80% at 0.1 mg/mL concentration against B16 melanoma cell, and exhibited strong tyrosinase and DOPA oxidase inhibitory activity equivalent to those of arbutin. In particular, SID Corn BE exerted stronger melanogenesis inhibitory activity than that of arbutin.

B Animal test for safety and toxicity of SID Corn BE

To assess the safety and toxicity of SID Corn BE (DFP 25%), photosensitization, phototoxic, single dose toxicity, eye mucous irritation, skin sensitization and skin irritation test were performed. There is no irritation exception for the mild irritation in skin irritation test; primary irritation index of SID Corn BE was calculated to be 0.71.

C. Human patch test for safety of SID Corn BE and SID Corn BE containing cream on human skin

The result of human patch test of 2%, 5% SID Corn BE (DFP 25%) and 0.1% SID Corn BE containing cream was on the low stimulus range, which meant not irritating.

D. Clinical assessment of skin-whitening cosmetics

To assess the skin-whitening efficacy, an 8 weeks double-blind control (without SID

Corn BE)-test (with 0.1% SID Corn BE; DFP 25%) study was performed. After 8 weeks, the test group had significantly improving whitening effect on visual, instrument and self-assessment without irritation.

V. Research performance and plan of performance utilization

From this research project, four kinds of skin-whitening materials registered in ICID, including SID Corn BE, were developed, and three skin-whitening cosmetics, such as skin, lotion, and cream, applied with SID Corn BE were also developed.

Five scientific papers including three SCI papers and two non-SCI papers were published, and additional two papers are being published in progress. One patent was already registered, five patents are being applied.

Three cosmetics(essence, lotion, cream) applied with skin-whitening resource as auxiliary ingredient and major ingredient are planning to industrialize in 2010. In addition, wrinkle-improving and UV protective cosmetics (essence, lotion, cream) applied with skin-whitening resource as auxiliary ingredient are planning to industrialize in 2010.

CONTENTS

Submission	1
Summary	2
Contents	19
Contents (Korean)	21
Chapter 1. Outline of research project	23
Part 1. Objectives	23
Part 2. Necessity	23
1. Technological aspect	23
2. Industrial aspect	24
3. Healthy and environmental aspect	25
4. Political aspect	27
Chapter 2. Current aspects of technological development in Domestic and Foreign	28
Part 1. Current aspects of domestic	28
1. Development of functional materials related to this project	28
2. Development of functional materials	28
Part 2. Current aspects of foreign	29
1. Development of functional materials related to this project	29
2. Development of functional materials	30
Part 3. Situation of technology development	30
Chapter 3. Contents and results of research development	32
Part 1. Goal and content of research	32
1. Goal of research	32
2. Scope of research contents	32
Part 2. Development and production of skin anti-aging materials from corn bran	33
1. Scope of research contents	33
2. Materials and Methods	34
3. Results and Discussion	46
Part 3. Efficacy evaluation, and development of nano-material and whitening cosmetics	64
1. Scope of research contents	64
2. Evaluation of UV protective, antioxidant and whitening capacity of corn bran extract	65

3. Evaluation of whitening activity of corn bran extract	74
4. Development of nano-materials, rheology and safety evaluation	79
5. Standardization, criterion and set-up of analysis method, ICID registration	93
6. Evaluation of safety and stability of whitening and UV protective cosmetics applied corn bran extract	99
7. Approval of functional cosmetics by KFDA	103
8. Preparation of three kinds of pilot-produced whitening cosmetics	104
Part 4. Evaluation of safety of corn bran extract, and clinically efficacy evaluation of whitening cosmetics	106
1. Scope of research contents	106
2. Evaluation of whitening efficacy of corn bran extract (<i>in vitro</i> assay)	106
3. Evaluation of safety and toxicity of corn bran extract (<i>in vivo</i> assay)	108
4. Safety evaluation of cream containing corn bran extract against human skin (human patch test)	110
5. Efficacy evaluation of whitening cosmetics against human skin	112
Chapter 4. Achievement degree of goal and contribution of related field	115
Part 1. Goal achievement degree by year	115
1. First-year	115
2. Second-year	116
3. Third-year	117
Part 2. Contribution to technology development of related field	117
1. Principal technology of cosmetic industry	117
2. Differentiation of cosmetic industry	117
3. Contribution to technology development	119
Chapter 5. Results of research development and plan of result utilization	121
Part 1. Plans of commercialization and industrialization	121
1. Mass production plan of cosmetic products	121
2. Market acquisition and plan	121
3. Industrialization plan	121
Part 2. Presentation of patent and thesis	122
1. Thesis	122
2. Presentation	123
3. Patent	124
Chapter 6. Foreign scientific technology information collected in the process of research development	125
Chapter 7. References	139

목 차

제출문	1
요약문	2
Summary	10
Contents	19
목차	21
제 1 장. 연구개발 과제 개요	23
제 1 절. 연구개발의 목적	23
제 2 절. 연구개발의 필요성	23
1. 기술적 측면	23
2. 산업적 측면	24
3. 보건환경적 측면	25
4. 정책적 측면	27
제 2 장. 국내·외 기술개발 현황	28
제 1 절. 국내 현황	28
1. 본 과제와 관련한 소재개발	28
2. 소재개발	28
제 2 절. 국외 현황	29
1. 본 과제와 관련한 소재개발	29
2. 소재개발	30
제 2 절. 기술개발 위치	30
제 3 장. 연구개발 수행 내용 및 결과	32
제 1 절. 연구목표 및 내용	32
1. 연구목표	32
2. 연구내용 범위	32
제 2 절. 옥수수겨로부터 피부항노화 소재 개발 및 생산	33
1. 연구내용 범위	33
2. 재료 및 방법	34
3. 결과 및 고찰	46
제 3 절. 유효성평가, 나노소재 개발과 미백화장품 개발	64
1. 연구내용 범위	64
2. 옥수수겨추출물의 자외선차단, 항산화활성 및 미백활성 평가	65

3. 옥수수겨추출물 정제분말의 미백활성 평가	74
4. 나노소재 개발, 물성 및 안정성 평가	79
5. 표준화, 기준 및 시험방법 확립, ICID 등재	93
6. 옥수수겨추출물 적용 미백화장품 및 자외선차단 화장품의 안정성 및 역가 평가	99
7. 미백화장품에 대한 KFDA 인증	103
8. 미백화장품 시제품 3종 제조	104
제 4 절. 옥수수겨추출물의 안전성, 적용 미백화장품의 유효성 임상평가	106
1. 연구내용 범위	106
2. 옥수수겨추출물의 미백활성 유효성 평가(<i>in vitro</i> 시험)	106
3. 옥수수겨추출물의 안전성 및 독성 평가(<i>in vivo</i> 시험)	108
4. 옥수수겨추출물 및 옥수수겨추출물 함유 크림의 인체피부 안전성 평가(인체칩포시험)	110
5. 미백화장품의 인체피부 효능 평가	112
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야 기여도	115
제 1 절. 연도별 목표달성도	115
1. 1차년도	115
2. 2차년도	116
3. 3차년도	117
제 2 절. 관련분야 기술발전예의 기여도	117
1. 화장품산업의 주요기술	117
2. 화장품산업의 차별화	118
3. 기술발전예의 기여도	119
제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획	121
제 1 절. 실용화 및 산업화 계획	121
1. 제품 양산계획	121
2. 판로확보 및 마케팅 계획	121
3. 사업화 계획	121
제 2 절. 특허 및 논문성과	122
1. 논문성과	122
2. 학술발표	123
3. 특허성과	124
제 6 장. 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보	125
제 7 장. 참고문헌	139

제 1 장. 연구개발 과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적

본 연구개발의 목적은 옥수수 전분 제조과정에서 부산물로 대량 생산되는 옥수수겨로부터 피부 항노화성 hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD, 하이드록시신나믹유도체)의 분리 및 정제, 항산화 및 항노화활성 평가, 미백 및 자외선차단 유효성 평가, 미백기전 평가, 안전성 및 독성평가 및 임상평가를 통한 신규 기능성 미백성분 개발과 고부가가치의 피부항노화 기능성 미백화장품을 개발함으로써 농산 자연자원 활용과 신규 소재 개발에 의한 농림산업과 화장품 산업에 기여하고자 한다.

제 2 절. 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

21세기 고령화 사회의 도래와 건강과 관련한 수요의 증가에 대비하여 세계 각국이 기술경쟁력 확보를 위해 치열한 경쟁 체제에 돌입하였으며, 막대한 시장잠재력을 가지고 있는 보건산업을 미래핵심 기술로, 각광받고 있는 BT (생명공학기술), NT (나노기술), IT (정보통신기술)와 연계함으로써, 경쟁력 강화는 물론 시장창출을 기대할 수 있으므로 세계 각국은 기술의 융합화에 큰 관심을 쏟고 있다.

옥수수는 쌀, 밀 다음으로 생산이 많은 세계 3대작물의 하나로써 전분 및 지방의 중요자원이며, 아울러 식이섬유소의 보고이다. 그러나 옥수수의 전분제조 과정(dry milling)에서 부산물로 대량 얻어지는 옥수수겨(corn bran)는 난소화성 다당류와 회분을 많이 함유하고 있어 현재 거의 대부분 사료로 사용되고 있어 고부가가치 산업에 활용되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 미활용 옥수수겨로부터 유용 생리활성물질을 추출하여 기능성 신소재로써 개발할 필요가 있다.

지금까지 옥수수로부터 HCAD의 분리 및 동정 그리고 그들의 항당뇨, 항균 및 항산화활성에 관한 일부 연구보고가 발표되었으나 아직까지 그 외의 다른 생리적작용에 관한 연구는 매우 미비한 실정이다. 따라서 옥수수겨의 HCAD의 대량 분리 및 정제 기술 개발과 더불어 그들의 항산화 및 피부항노화 작용을 밝히고 그를 이용한 기능성 미백화장품의 개발이 필요한 실정이다.

화장품분야는 이들 신기술이 융합될 수 있는 대표적인 분야로, 피부보호라는 수동적 개념의 제품에서 천연소재의 활용과 미세 유효물질 전달시스템을 이용한 효능의 극대화 등 적극적 개념의 제품으로 패러다임이 변화하고 있는 추세이다. 21세기 화장품 업계의 화두는 기능성화장품이라고 할 정도로 기능성화장품에 대한 관심과 소비가 증가하고 있으므로, 미래의 화장품개발은 안정성만을 강조한 일반화장품이 아닌, 주름개선, 미백 및 자외선차단 등의 적극적인 개념의 도입이 강화된, 효능·효과를 강조한 기능성화장품에 초점을 맞추어 수행하는 것이 매우 중요하다.

현재 기능성화장품으로 분류되어 있는 화장품은 주름개선제품, 미백제품, 자외선차단 제품군이 있다. 현재 고시되어 있는 기능성성분의 대부분은 매우 불안정한 원료들이기 때문에 다양한 형태의 화장품에 사용되지 못하고 있다. 이에 기존의 기능성 성분보다 피부에의 유효성과 안전성이 높으며 제형에서의 안정성이 확보되는 천연에서 유래된 성분이 그 해답이 될 수 있다.

기능성 미백성분은 알부틴(tyrosinase inhibitor)과 유효성감초추출물(tyrosinase inhibitor, free radical scavenger), 비타민-C 유도체(melanin formation reducer)들이 식약청 고시 성분으로 지정되어 있으며, 최근 **나이아신아마이드, 알파-비사보롤**이 추가되었으나, 한편에서는 성분의 안정성이 낮으며 그 효능에서도 모호한 것으로 알려져 있다. 또한 코직산(kojic acid), 하이드로퀴논(hydroquinone) 등의 좀 더 강력한 미백제들은 특히 그 안전성이 문제되고 있다. 따라서 좀 더 효능이 좋으며 안전성이 확보된 성분의 개발은 매우 중요하며, 절대적으로 필요성이 요구되고 있는 실정이다.

미백 기능성화장품의 작용은 기본적으로 멜라닌자극물질을 조절하는 방법, 멜라닌생성을 억제하는 방법 및 생성된 멜라닌의 분해 및 배출을 촉진시키는 방법이 알려져 있다. 그러나 최근에 멜라닌생성을 조절하기 위하여 MITF (microphthalmia-associated transcription factor)가 중요한 역할을 하며 이의 조절에 관여하는 신호전달 경로들이 관심을 받고 있다. 따라서 개발되는 성분들에 대한 멜라닌합성과 MITF 발현 관계에 대한 연구가 절대적으로 필요하다.

멜라닌합성은 기본적으로 표피 기저층의 멜라노사이트의 멜라노솜에서 시작하여 멜라노솜이 표피의 각질층으로 이동하면서 멜라닌 생성을 알 수 있게 된다. 따라서 미백효과를 주고자 하는 성분이 피부 표피의 기저층까지 흡수가 되어야 하는 어려움이 있다. 일반적으로 *in vitro* 시험에서 유효한 효능을 보이더라도, 실제 제형을 통해 임상시험에서 그 효능이 미미한 경우가 많다. 따라서 유효한 미백제를 나노입자화시켜 피부에의 DDS (drug delivery system) 개념이 포함되지 않으면, 원하는 효능·효과를 얻기가 쉽지 않다. 따라서 개발된 소재에 대한 나노입자화 기술은 매우 중요하다고 볼 수 있다.

2. 산업적 측면

화장품산업은 첨단과학의 응용으로 고부가가치를 창출할 수 있는 미래 유망산업으로, 막대한 시장잠재력을 가지고 있어 2010년에는 8조원 규모의 시장이 예상되며, 동시에 화장품산업은 아름다움과 삶의 풍요로움을 제공하는 문화산업이며 인체에 사용되므로 엄격한 규제를 받고 있는 보건의료산업이기도 하며, 농산물로부터 소재를 개발한다는 측면에서 농산업이라고 볼 수 있다.

세계화장품 시장에서 한국화장품 시장은 2006년에 2.7%(3,749 백만\$)로 5% 이상의 성장을 하였으며, 2008년에는 8%의 성장을 이루었다. 특히 2000년 이후 제정된 화장품법에 의한 미백, 주름개선 및 자외선차단 기능성화장품은 한국에서 매년 20% 이상의 성장과, 세계에서 10% 이상의 성장을 기록하고 있다.

2008년 화장품 유형별 생산실적에 의하면 미백 기능성화장품은 기능성화장품 대비 23% 수준으로 2,552억 원 정도이다. 국내 화장품산업 현실상 상당량의 소재를 수입하는 상황에서 국내 연구자에 의한 신규 미백소재의 개발 및 적용은 산업적 측면에서 매우 중요하다.

옥수수에는 다량의 전분과 지방을 함유하고 있어 현재 그를 이용한 전분 및 유지 산업이 크게 활성화되어 있으나 옥수수 전분제조 과정에서 부산물로 얻어지는 옥수수겨는 항고혈압, 항비만

및 항변비활성이 있는 다량의 식이성섬유소와 식물성스테롤을 함유하고 있는데도 불구하고 필수아미노산(lysine & tryptophane)이 거의 함유되지 않은 불완전 단백질을 함유하고 있고 식품의 산화 및 흡수에 필요한 나이아신(niacin)의 함량이 적어 거의 대부분 사료로써 이용되고 있다. 따라서 미활용 옥수수겨로부터 분리된 HCAD를 미백 기능성 신소재로써 개발한다면 옥수수의 산업 활용도를 더욱 크게 신장시킬 수 있을 것으로 예상된다.

옥수수겨에 유일하게 다량 함유된 HCAD (0.5~1.0%, 건조 옥수수겨)는 선행 연구에서 피부항노화 작용 이외에도 항당뇨, 항균 및 항산화활성을 지니고 있는 생리활성물질로 밝혀지고 있기 때문에 향후 옥수수의 폴리아민유도체는 화장품산업뿐만 아니라 기능성식품 및 의약품 산업에도 크게 기여할 것으로 예상된다.

순위	국가명	금액	점유율(%)	성장률(%)
	해외 전체	136,574	100.0	4.2
1	미국	24,583	18.0	3.0
2	일본	13,408	9.8	1.7
3	중국	9,604	7.0	8.9
10	한국	3,749	2.7	5.2

해외 화장품 시장규모 (2006년 기준, 단위: 백만 달러)
출처: 대한화장품협회-영국 데이터모니터



3. 보건환경적 측면

세계 보건산업시장은 첨단 보건산업기술에 기반을 두어 연평균 6%의 지속적 성장을 거듭해 2010년에는 927조원 규모로 전망된다. 한국은 고령화속도가 미국, 일본 등 선진국에 비해 매우 빠른 것으로 보고되어 있으며, 한국은 2010년에 65세 이상의 노령인구 비율인 노령화 비율이 10.9%로 고령화 사회로의 진입이 예상되며, 이에 건강과 무병장수에 대한 수요는 지속적으로 증가할 전망이다.

최근 고령화 및 미래사회 위원회는 ‘고령친화산업 활성화 전략’을 발표한 바 있다. 급속한 고령화는 위협요인이기도 하지만 새로운 수요를 창출하는 기회요인으로서, ① 위협요인으로는 국가 재정 악화, 경제 저성장과 함께 고령자의 건강, 재무 및 생활 위험이 급증하는 것이며, ② 기회요인으로는 급팽창하고 있는 노인인구의 신규 거대수요를 고령친화산업으로 연결하여 국가 차세대 성장동력으로 전환할 수 있다는 점이다. 이에 국제경쟁력, 시장매력도, 공공성을 기준으로 8개 산업부문의 19개 전략품목을 고령친화산업으로 선정하여 집중 육성하기로 한 바 있다. 또한 한방산업 부문에서의 전략품목으로 **노인용 한방화장품**이 선정되었으며, 최근 화장품산업에서도 고령화에 따른 맞춤형화장품 등이 서서히 부상하고 있다.

국가 \ 노인인구비율	7%	14%	소요연수
한 국	2000년	2019년	19년
일 본	1970년	1994년	24년
독 일	1932년	1972년	40년
영 국	1929년	1976년	47년
미 국	1942년	2013년	71년

산업부문	고령친화산업 활성화를 위한 19개 전략품목
요양	재가요양서비스
기기	재택/원격진단/진료및휴대형다기능건강정보시스템, 한방의료기기, 간호지원및실내외이동지원시스템
정보	홈케어, 정보통신보조기기, 노인용컨텐츠개발
여가	고령친화휴양단지
금융	역모기지제도, 자산관리서비스
주택	고령자용주택개조, 실비고령자용임대주택
한방	한방보건관광, 항노화한방기능성식품, 노인용한방화장품 , 노인성질환한약제제개발
농업	고령친화귀농교육, 전원형고령친화농업테마타운, 은퇴농장

과학기술의 발달로 생활수준이 높아짐에 따라 소비자들은 과거에는 사소하게 여기던 세세한 품질도 심각하게 고려하는 경향을 띠고 있다. 이러한 경향은 앞으로 더욱 커질 것으로, 화장품으로 인하여 발생하는 심하지 않은 피부나 신체의 과민반응, 사용한 물질로 인한 환경오염 문제는 과거 일반 소비자들이 크게 신경 쓰지 않던 사소한 문제의 대표적인 예라고 할 수 있다. 아이러니컬한 점은 과학기술의 발달이 가져온 공해로 인하여 많은 사람들이 과거에는 볼 수 없었던 각종 알레르기 증세에 시달리고 있다는 점이다. 따라서 화장품과 같이 신체에 직접 접촉하는 제품은 더욱 더 신체와 자연에 안전하도록 제조하는 것이 사회적으로 요구되는 추세이다.

옥수수의 HCAD는 피부 항노화작용뿐만 아니라 최근 항당뇨 및 항산화작용을 지니고 있는 생리활성물질로써 주목을 받고 있기 때문에 향후 이를 기능성식품 소재로 개발된다면 최근 사회문제가 되고 있는 당뇨 및 고혈압 환자용 dietary supplement로 사용함으로써 국민보건 향상에 크게 기여할 것으로 예상된다.

본 연구에서 개발한 기술 및 제품은 바로 이와 같은 변화를 고려한 것으로, 국내에서 재배되는 천연 유래의 성분으로서 피부에 안전하면서도 기능성을 줄 수 있는 자외선차단 효과가 있는 미백활성 성분의 개발 기술이다. 이들은 유효성에 기여하는 지표성분이 10% 이상으로서, 폴리아민 유도체 성분은 미백 효과를 줄 수 있으며, 이들을 함유한 제품은 미백 기능성화장품으로 개발될 수 있으며, 피부 세포간성분인 인지질로 캡슐화 함으로써 가일층 안전성 향상, 공기나 자외선과의 접촉 감소를 통한 안정성 향상, 방출속도 조절 등을 통해 안전성과 효능이 증가된 제품을 제조하였다. 이는 최종적으로 본 사업의 기술과 제품 개발은 천연유래 성분을 활용한 피부항노화 제품 개발로 피부 건강을 향상시켜 보건산업에 크게 기여할 것으로 예상된다.

4. 정책적 측면

화장품은 그 역사와 기능을 고려할 때 어느 제품보다도 생명력 있고 널리 사용되는 제품임을 부인할 사람은 없을 것이다. 앞서 언급한 바와 같이 과학기술의 눈부신 발전으로 소비자들은 보다 더 우수한 품질, 더 우수한 성능 혹은 새로운 기능을 가진 제품을 끊임없이 요구하고 있다. 화장품에서도 그러한 경향이 뚜렷이 나타남은 물론, 실제 과학기술의 발달은 주름개선, 미백, 자외선차단 등의 단순기능이 아닌, 과거에는 상상에 그쳤던 복합적인 기능이나 지능적인 기능을 가지는 화장품의 출현을 기대할 수 있게 하였다.

이러한 추세는 전 세계적임은 물론이며, 우리나라가 처한 여러 경제상황을 고려한다면 매우 우수한 제품을 제조하기 위한 기술과 인력을 확보하는 것은 그 중요성을 아무리 강조해도 지나치지 않을 것이다.

과거, 현재, 그리고 미래에도 매우 큰 시장을 형성할 화장품산업은 충분한 기술력을 확보한다는 전제하에 앞으로도 계속 활발히 발전시켜야 할 산업으로 판단되며 기능성화장품에 대한 관심이 고조되고 있는 현 시점은 국가적으로도 이에 대한 정책을 세워 대비해야할 시점이라고 판단된다. 이를 위해서 내수시장은 물론 해외시장으로 진출할 수 있는 기존의 기능을 뛰어 넘는 새로운 추가적인 기능을 가지는 화장품의 제조에 대한 지원이 매우 필요하다.

옥수수겨로부터 기능성 미백화장품의 신소재 개발은 현재 거의 대부분 수입에 의존하고 있는 옥수수를 국내 주요 재배작물로써 다시 일으키는 계기를 마련해 줄 수 있기에 국가 정책적인 차원에서도 옥수수의 산업 활성화를 위해 본 연구의 수행은 꼭 필요한 실정이다.

제 2 장. 국내·외 기술개발 현황

제 1 절. 국내 현황

1. 본 과제와 관련한 소재개발

옥수수겨에 유일하게 존재하는 HCAD의 분리 및 정제 그리고 그들의 생리활성작용에 관한 연구는 본 연구진의 최근 발표 이외에는 거의 없는 실정이다. 또한, HCAD의 생리적 기능과 더불어 그를 이용한 기능성식품 및 화장품의 개발은 거의 이루어지고 있지 않다.

2. 소재개발

미백활성을 갖는 소재는 흑화의 원인인 멜라닌의 생성경로에 따라 많은 연구가 진행되고 있다. 티로시나제의 활성을 억제하는 알부틴, 감초추출물, 달나무추출물 등과 티로시나제 발현을 억제하는 Melasolv, 멜라닌 합성을 차단하는 ascorbic acid 및 그 유도체, Coenzyme Q10과 생성된 멜라노솜이 각질세포로 이동되는 것을 차단시켜 주는 원료 등이 개발되어 있다.

미생물 유래 미백제로 사용하던 코직산(kojic acid)이 발암성 문제가 제기되면서 알부틴이나 ascorbic acid 등의 원료로 대체되었으며, 멜라노사이트 세포주인 Mel-Ab 세포에 대하여 강력한 멜라닌 생합성 저해활성을 보이는 **Terrein**이 개발되었으며, 이는 kojic acid보다 10배 이상의 활성을 보이는 것으로 발표된 바 있다.

식약청 고시 성분 외에 melanin switching agent인 MS-135, 계피산유도체인 **Melasolv**, 속수자추출물을 주성분으로 하는 피토클리어 EL-1, 악티게닌(actigenin)을 주성분으로 하는 연교추출물, 대항추출물 등이 개발되어 기능성 제품에 적용되고 있으며, 또한 미백제로 ellagic acid 및 flavonoid 계열의 화합물 등이 개발되었으며, 백출(Atractylodis rhizoma)로부터 **Selina**란 물질이 분리되어 사용되고 있다.

또한 홍화씨로부터 추출·분리된 식물성유사호르몬으로 알려진 세로토닌유도체가 주성분인 **홍화씨추출물(SID Carthamus SE)**은 식약청에 비고시 주름개선 성분으로 허가받은 성분이나, 강력한 항산화활성을 보이며 멜라닌 생합성을 저해하는 것으로 보고된 바 있으며, 최근 오가피줄기로부터 phenylpropanoid 계열의 성분을 주성분으로 한 **오가피줄기추출물(SID Acanthopanax SE)**은 2009년에 비고시 미백성분으로 허가받은 사례가 있다.

미백작용의 기전과 관련하여 Terrein 화합물은 색소세포 내에 p-ERK 활성을 촉진하여 MITF 발현을 억제하는 것으로 규정되어, 신규 개발되는 소재에 대해 세포 신호전달 기전을 이용한 미백효과 평가가 이루어지고 있다.

주름개선, 자외선차단과 함께 기능성화장품으로 분류되어 있는 미백화장품의 경우도 많은 관련 소재가 연구·개발되고 있으나, 상당량 부분에서는 이미 외국에서 개발되어 있는 소재를 국내 여건에 맞게 재평가하여 미백제로 활용하기도 하며, 국내 연구진 자체에 의해 신규로 개발되어 미백 신소재로의 상품화는 다소 어려움이 따르고 있다.

최근에는 멜라닌 생합성 과정에 관여하는 주요 효소인 tyrosinase가 α -glucosidase에 의한 N-glycan processing을 통해 활성화된 tyrosinase로의 변환을 차단하는 과정을 통한 미백제의

탐색이 시도되고 있다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
LG생활건강	Selina 개발	라끄베르 및 레템 화이트 제품에 적용
분당서울대병원피부과, 한국생명공학연구원	Terrein 미백제 개발	
사임당화장품	오가피줄기추출물 개발	치우천황 제품에 적용
사임당화장품	홍화씨추출물	인현진 제품에 적용
아모레퍼시픽	Melasolv 개발	헤라 화이트 제품에 적용
아모레퍼시픽	대황추출물 개발	설화수 자정 미백 에센스에 적용
코리아나화장품	연교추출물 개발	미취가인 생기진 크림에 적용

소재명	특징	비고
알부틴	Tyrosinase 활성 저해	고시원료
유용성감초추출물	Tyrosinase 활성 저해	고시원료, 항염, 면역증진
닥나무추출물	Tyrosinase 활성 저해	고시원료, 태평양
에칠아스코빌에텔	비타민-C의 안정성 향상, 피부흡수율 향상	고시원료
아스코빌글루코사이드	비타민-C의 안정성 향상	고시원료, 일본 수입원료
마그네슘아스코빌포스페이트	비타민-C의 안정성 향상	고시원료
루시놀(Lucinol)	Tyrosine과 Tyrosinase 결합 방해	전나무 성분, 일본 Pola

제 2 절. 국외 현황

1. 본 과제와 관련한 소재개발

지금까지 옥수수로부터 HCAD의 분리 및 정제 그리고 정량분석에 관한 연구는 다수 보고된 바가 있으나, 옥수수겨에 다량 존재하고 있음이 밝혀지기는 최근이며(Moreau *et al.*, *Lipids*, 36, 839-844, 2002), 특히 그들의 생리활성에 관한 연구는(α -glucosidase 저해작용 1편, aflatoxin 생합성저해 1편) 매우 미비한 실정이다.

최근 미국 농림부연구소(USDA-ARS, ERRC, Philadelphia, USA)는 노르말-핵산으로 추출하여 정제한 옥수수유와 함께 알코올로 추출하여 정제한 옥수수유의 시판을 허락해주도록 FDA에 건의한 바 있다(Moreau, *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 82: 809-815, 2005). 이는 핵산 추출 옥수수유에는 거의 존재하지 않은 HCAD 성분이 알코올추출 옥수수유에 많이 함유되어 있기 때문이며, 이것을 보아도 옥수수겨의 HCAD 중요성을 짐작할 수 있다. 그러나 옥수수겨의 폴리아민유도체의 생리적작용 및 독성에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

2. 소재개발

유럽이나 미국계 회사의 경우는 과거 미백에 큰 관심을 보이지 않다가 최근에 여러 원료를 상용화하고 있다. J&J사는 멜라노솜 transfer 분야를 연구하고 있으며, PAR-2를 콩과 식물에서 추출한 soymilk를 처리하여 색소침착을 억제할 수 있는 제품을 개발한 바 있다.

일본의 주요 화장품 회사들은 초기에 멜라닌 생성의 주 효소인 티로시나제나 TRP-1, TRP-2의 활성을 직접적으로 조절하여 미백제를 개발하여 하였으나 최근에는 멜라닌 합성에 영향을 주는 신호전달물질(cytokine, 사이토카인, 호르몬)을 조절하거나, 멜라노사이트 표면에 있는 수용체를 조절하여 외부 신호전달을 차단함으로써 멜라닌 합성을 억제하는 방향으로 진행되고 있다. 이러한 사이토카인이나 수용체를 조절하여 상용화 된 제품들은 대부분 천연물을 통하여 얻은 유효성분을 이용하고 있다.

또한 일본의 경우 일반적인 미백 메커니즘 외에 색소침착 관련이 예상되는 기저막의 형상변화와 항염증 세포를 타깃으로 한 미백 메커니즘이 주목받기 시작하였다. 항염증효과를 갖는 벗나무엑기스(장미과 *Prunus lannesiana* W. M.)는 자외선에 의한 색소침착의 과정에서 초기단계 자외선에 의한 염증은 각질세포에서 멜라노사이트를 자극하는 전달물질의 방출을 유발하기 때문에 색소침착에 유효한 것으로 알려져 있다. 인도 전통의학에서 만병통치약으로 알려진 나무(인도 백단향, *Melia azadirachta*) 잎추출물인 나무리 프리키프트는 항염증작용 및 B16 멜라닌 생합성 저해효과 외에 사이클로옥시나제의 저해작용이 알려져 있다. 자외선에 의해 각질세포에서 유도된 멜라노사이트 자극물질 프로스타그란딘 E2의 생성을 효율적으로 억제하는 것으로 알려져 있다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Pola	Lucinol ; 전나무 성분 레조르신유도체	폴라 화이트시모 화이트 샷 스팟클리어에 적용
Hayashibara	AA-2G (glucosyl ascorbic acid)	국내에 원료 수입되어 판매
J&J	Soybean Ext	Soya Unify에 적용

제 3 절. 기술개발 위치

국내 화장품시장은 2008년 기준 6조원 이상이나, 화장품 제조에 사용되는 원료는 여전히 국외로부터의 수입의존도가 높으며, 국내 시장에서 차지하는 수입품의 비중은 30% 이상으로 제품 3개중 1개는 수입품이 차지하는 것으로 보고되고 있다. 이에 국내에서 개발된 천연유래 미백 소재의 개발은 국산 화장품의 경쟁력 향상에 기여하며, 기술개발 능력을 인정받으며 기술개발력을 통해 신규 부가가치 소재 개발에 적극 활용할 수 있다.

2000년 이후 국내 화장품법에 의해 공식적으로 식약청에서 허가(적합판정)를 주는 기능성화장품이 탄생하였으며, 한방과 웰빙 선호에 맞물려 천연성분에 대한 기대와 수요가 증가하고 있어, 여러 기관에서 다양한 천연유래 기능성 소재 개발에 노력을 경주하고 있다. 그러나 미백 소재를 포함하여 천연의 자연자원 유래 기능성 소재 개발은 쉽지 않으며, 개발한 소재가 적용

된 제품에 대해 식약청 허가를 통해 미백화장품으로 개발 및 사업화 또한 용이하지 못하다. 이에 본 과제에 의한 옥수수겨의 HCAD를 주성분으로 옥수수겨추출물의 미백소재 개발은 부산물인 옥수수겨로부터 고부가가치의 소재 및 제품 개발에 큰 의의가 있으며, 수입에 의한 기능성 소재가 아닌 국내에서 개발된 경쟁력있는 소재로의 개발에 큰 의의가 있다.

국내에서 개발되는 기능성 소재 중에서 자외선차단제로 사용할 수 있을 정도의 자외선차단 능력이 있는 미백 소재는 거의 알려져 있지 않다. 이와 같은 상황에서 자체 신규 소재의 개발은 새로운 부가가치 제품의 개발로 이어질 수 있으며, 미백제품 외의 주름개선 및 일반 화장품에서의 적용 증가로 부가가치 증대가 기대된다.

옥수수겨로부터 화장품의 신소재의 개발은 옥수수 재배농가의 소득 증대뿐만 아니라 옥수수 자체의 상업적 부가가치를 높일 수 있다. 옥수수겨의 HCAD를 이용한 기능성 미백 신소재 및 화장품의 개발은 옥수수겨에 다량 함유되어 있는 식이성섬유소와 식물성스테롤의 항고혈압, 항암 및 항변비성 생리기능을 배가시키는 계기가 됨으로써 향후 옥수수겨의 산업적 활용도를 크게 증가시킬 수 있다.

최근 사임당화장품은 주성분이 세로토닌유도체인 잇꽃씨추출물을 주름개선 기능성 성분으로 식약청으로부터 인증을 받은 바 있다. 이는 중소기업의 기술적 쾌거이며, 다른 화장품 회사의 피부항노화 신소재 개발에 대한 기폭 역할을 할 것으로 예상되고 있다. 또한, 식물성에스트로겐 성분으로 잘 알려진 마타이레시놀 성분을 20% 이상 함유된 주름개선용 연교(개나리열매)추출물을 개발함으로써 향후 기능성화장품 시장을 확보하고 유지하는 데 큰 역할을 하며, 아울러 그 파급효과가 클 것으로 기대된다. 따라서 이러한 주름 및 미백 화장품 신소재 개발 선례를 바탕으로 본 연구과제에서 옥수수유래 기능성 미백소재의 개발 또한 잇꽃씨추출물과 연교추출물 이상의 산업적 파급효과가 기대된다.

제 3 장. 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구 목표 및 내용

1. 연구목표

옥수수겨로부터 피부 항노화성 hydroxycinnamic acid derivatives (HCAD, 하이드록시신나믹 에씨드유도체)의 대량 분리 및 이를 이용한 피부항노화 기능성 미백화장품을 개발하고자 한다.

- 옥수수겨로부터 피부 항노화성 HCAD (ferulic acid, coumaric acid, diferulate & triferulate 및 polyamine conjugates)의 분리 및 정제
- HCAD의 항산화 및 항노화활성 평가
- HCAD의 대량 분리 및 생산
- HCAD의 미백 및 자외선차단 유효성 평가
- HCAD의 미백기전 평가
- HCAD의 안전성 및 독성 평가
- HCAD를 함유한 나노소재 개발과 이를 함유한 미백화장품의 개발 및 안전성 평가
- HCAD 함유 나노소재 함유 미백화장품의 효능 임상평가

2. 연구내용 범위

가. 옥수수겨로부터 피부항노화 소재 개발 및 생산

- 옥수수겨로부터 HCAD의 분리, 정제, 동정 및 화학적 특성 분석
- 옥수수겨로부터 분리된 HCAD의 물리·화학적 안정성 조사
- 옥수수겨로부터 분리된 HCAD의 항산화활성 측정
- 옥수수 품종별, 가공방법(볶음, 찜, fry 및 microwave 처리) 및 제분방법(dry milling 및 wet milling)에 따른 HCAD의 함량 변화 분석
- 효소처리 및 산 또는 알칼리 처리에 따른 HCAD의 함량 변화 분석
- 여러 칼럼크로마토그래피에 의한 옥수수겨로부터 HCAD의 대량 분리기술 개발
- 효소처리, 용매분획 및 흡착이온수지크로마토그래피에 의한 polyamine conjugates (PCs, 폴리아민유도체)의 대량분리 및 생산
- 산 또는 알칼리처리, 용매분획 및 흡착이온수지크로마토그래피에 의한 ferulate oligomers (diferulate 및 triferulate)의 대량분리 및 생산
- 최종 생산된 HCAD 함유 정제분말의 순도, 함량, 및 화학적 특성에 관한 spec 작성

나. 유효성평가, 나노소재 개발과 적용 미백화장품 개발

- 소재의 미백활성 평가(기존 미백제와 비교)
- 소재의 미백활성 기전 연구
- 소재에 대한 멜라닌생성 세포의 세포독성 평가

- 소재의 자외선차단 평가(기존 자외선차단제와 비교)
- 피부에 효과적인 전달을 위한 나노캡슐(나노입자) 소재 개발 및 물성 평가
- 안정성 및 역가 안정성 평가
- 표준화, 기준 및 시험방법 확립
- ICID (국제화장품원료집) 등재
- 미백화장품 제형 점검 및 제품에 대한 안정성 및 역가 안정성 평가
- 자외선차단 화장품 제형 점검 및 제품에 대한 안정성 및 역가 안정성 평가
- 미백화장품 및 자외선차단 화장품에 대한 사용성 임상평가
- 미백화장품에 대한 KFDA (한국식품의약품안전청) 미백화장품 인증
- 차별화된 유일의 기능성 비교시 미백 소재를 활용하여 미백화장품 3종 개발을 위한 처방 및 생산공정 확립
- 시작품 개발 및 제조

다. 옥수수겨추출물의 안전성, 적용 미백화장품의 유효성 임상평가

- 소재의 미백활성 유효성 평가(*in vitro* 시험)
- 소재의 안전성 및 독성 평가(*in vivo* 시험)
- 소재의 인체피부 안전성 평가(인체접포시험)
- 미백화장품의 인체피부 안전성 평가
- 미백화장품의 인체피부 효능 평가

제 2 절. 옥수수겨로부터 피부항노화 소재 개발 및 생산

1. 연구내용 범위

- 옥수수겨로부터 HCAD의 분리, 정제, 동정 및 화학적 특성 분석
- 옥수수겨로부터 분리된 HCAD의 물리·화학적 안정성 조사
- 옥수수겨로부터 분리된 HCAD의 항산화활성 측정
- 옥수수 품종별, 가공방법(볶음, 찜, fry 및 microwave 처리), 및 제분방법(dry milling 및 wet milling)에 따른 HCAD의 함량 변화 분석
- 효소처리 및 산 또는 알칼리 처리에 따른 HCAD의 함량 변화 분석
- 여러 칼럼크로마토그래피에 의한 옥수수겨로부터 HCAD의 대량 분리기술 개발
- 효소처리, 용매분획 및 흡착이온수지크로마토그래피에 의한 PCs의 대량분리 및 생산
- 산 또는 알칼리처리, 용매분획 및 흡착이온수지크로마토그래피에 의한 ferulate oligomers (diferulate 및 triferulate)의 대량분리 및 생산
- 최종 생산된 HCAD 함유 정제분말의 순도, 함량, 및 화학적 특성에 관한 spec 작성

2. 재료 및 방법

가. 실험재료

본 실험에 사용한 옥수수는 찰옥수수 3품종(대학찰옥수수, 미백찰옥수수 및 흑미백찰옥수수), 사료용 7품종[silage, P3394, 청사옥 (CSO), 광평옥 (KPO), 청안옥 (CAO), 강다옥 (KDO), 장다옥 (JDO)] 및 감미종 2품종(감미옥, 감미찰) 모두 12품종을 사용하였다. 이 중 찰옥수수는 충북 괴산과 강원도 정선에서 각각 생산된 것을 사용하였으며, 사료용 품종 중 “silage”는 경북 대학 김순권 박사로부터, 나머지 6가지 사료용 옥수수 품종은 농촌진흥청 작물시험연구원 문귀현 박사로부터, 그리고 감미종 2품종은 경북농촌진흥원 허창석 연구원으로부터 각각 공급 받아 사용하였다.

한편, 습식법 옥수수 전분 가공부산물인 옥피, 옥배아, corn gluten, corn gluten meal은 삼양 제넥스, 대상 및 신동방에서, 그리고 건식법 옥수수 가공부산물인 옥수수겨는 한국곡산(경기도, 한국)에서 생산된 것을 구입하여 공시재료로 사용하였다.

나. 옥수수겨로부터 PCs의 대량 추출, 분리 및 정제

옥수수겨로부터 3가지 PCs (DCP, CFP, DFP)의 대량추출, 분리 및 정제는 **Fig. 1**과 같이 실시하였다. 즉, 분말 옥수수겨(2 kg)를 노르말-헥산으로 가열추출하여 탈지한 다음 얻어진 탈지박을 80% 에탄올수용액(40 L)을 가하여 ultrasonicator에서 연속적으로 추출한 후 여과 및 농축하여 에탄올추출물(65.6 g)을 얻었다.

다음, 에탄올추출물을 다시 80% 에탄올수용액으로 용해한 후 냉장고에서 하룻밤 방치 후 침전하는 침전물을 원심분리(3,000 rpm, 30분)하여 제거한 후 얻어진 상등액을 부분감압 농축하여 에탄올을 제거하고 여기에 CH_2Cl_2 를 가하여 분획하여 CH_2Cl_2 분획물(4.92 g)을 얻었다. 다음, CH_2Cl_2 분획물을 silica gel 60을 이용하여 Hx-EtOAc-MeOH-TFA (200:200: 100:0.1, v/v) 혼합용매로 flash column chromatography (6 × 40 cm)를 연속적으로 실시하여 튜브 당 5 mL 씩 200개를 분취하고 각 분획을 precoated silica gel TLC (용매는 위와 동일)를 이용하여 분리된 성분을 확인한 다음 같은 성분을 모아 16개의 분획으로 나누었다.

다음, 이들 분획 중 13분획을 60% 메탄올수용액으로 녹인 후 60% 메탄올수용액을 이동상으로 하여 ODS-A column chromatography (2.5 × 30 cm)와 80% 메탄올수용액을 이동상으로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography (2.5 × 40 cm)를 순차적으로 각각 실시하여 *N,N'*-dicoumaroyl-putrescine (**DCP** 13.6 mg, 수율: 0.68 mg%)를 순수하게 분리하였다. 다음 분획 14와 분획 16을 위와 동일한 방법으로 2가지 column chromatography를 순차적으로 실시하여 *N-p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine (**CFP**, 28.8 mg, 수율: 1.44 mg%) 및 *N,N'*-diferuloyl-putrescine (**DFP**, 156.3 mg, 수율: 7.82 mg%)을 각각 순수하게 분리 및 정제하였다.

내부 표준물질로 첨가하여 시료의 화학적 이동값을 δ value (ppm)로 나타내었으며, 아울러 coupling constant (J)는 Hz로 나타내었다.

(3) FAB-MS spectrometry

옥수수겨로부터 분리된 3개 PCs의 질량분석을 위하여 FAB-MS (Fast atom bombardment Mass, Jeol, JMS-700, Tokyo, Japan) spectrometry를 이용하여 측정하였으며, 이때 glycerol 및 *m*-butyl alcohol을 mounting matrix로 사용하여 spectra를 측정하였다.

라. 옥수수겨로부터 분리된 5가지 HCAD의 화학적 특성 측정

(1) 최대흡수 파장 및 흡광물계수 측정

옥수수겨에 존재하는 5 가지 HCAD 중[이미 알려진 두 가지 *p*-coumaric acid (**CA**) 및 ferulic acid (**FA**)를 제외하고] 3 가지 PCs의 최대 흡수파장의 측정은 먼저 각 시료를 MeOH로 용해한 후 적절히 희석하여 시료의 흡광도가 0.5~1.0 사이에 되도록 농도를 조절한 후 UV-vis spectrophotometer를 사용하여 200~350 nm 사이를 스캔하여 측정하였다.

그리고 앞서 측정된 최대흡수파장에서 흡광도를 측정한 후 다음 식에 따라 $A = \epsilon$ (흡광물계수) $\times l$ (cell 길이, 1 cm) $\times C$ (시료 농도, M) 각 PCs의 흡광물계수를 측정하였다.

(2) 선광도(optical rotation) 및 녹는점(m.p.) 측정

각 PCs의 선광도는 Jasco P-1020 polarimeter를 사용하여, 그리고 mp는 Buchi B-540 apparatus를 사용하여 각각 측정하였다.

마. 옥수수겨로부터 분리된 5가지 HCAD의 물리·화학적 요인에 대한 안정성 조사

각 PCs의 물리·화학적 요인에 대한 안정성 측정은 순수한 각 PCs를 메탄올로 충분히 용해한 후 우선 온도를 30~100°C 범위에서 각각 30분 유지시킨 후 측정하였으며, 맑은 날 12~14시 사이 햇빛에 30분간 노출하여 측정하였으며, 자외선 안정성은 UV lamp를 이용하여 장파장 (UV_{365 nm})에서 30분간 조사한 후 측정하였다.

pH는 0.1 N HCl 및 0.1 N NaOH로 표준용액의 pH를 2~10 사이로 조정한 후 10분간 방치 후 측정하였다.

효소에 대한 안정성은 5가지 당분해효소(amylase, glucoamylase, viscozyme, viscozyme, cellulase, Novozyme, Denmark)를 40°C에서 1시간 처리 후 최대 흡수파장에서의 흡광도 감소를 측정하여 산출하였다.

바. 옥수수겨로부터 분리된 5 가지 HCAD의 항산화활성 측정

(1) DPPH radical scavenging activity 측정

옥수수겨로부터 분리된 5개의 HCAD 항산화활성 측정은 DPPH radical을 사용하여 Tagashira 및 Ohtake의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다.

시료 용액(각 화합물을 MeOH에 녹여 100 mg/mL 농도로 만든 stock solution을 적절히 희

석한 것) 200 μ L에 100 μ M의 DPPH를 함유한 메탄올 용액 4 mL을 가해 격렬히 vortex하여 실온에서 10분간 방치 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH의 환원에 의한 흡광도의 감소를 측정하였다. 이 때 DPPH radical 소거활성은 다음 식에 따라 계산하였다. DPPH radical scavenging activity (%) = $(1-A/B) \times 100$, A: absorbance of sample at 517 nm, B: absorbance of control at 517 nm. 여기서 시료를 넣지 않은 control 군을 함께 측정하여 시료의 상대적인 DPPH radical 소거활성을 측정한 후 회귀분석에 의해 산출된 IC₅₀ value (DPPH 라디칼을 50% 저해하는 시료의 농도)를 나타내었다.

(2) Superoxide radical scavenging activity 측정

5가지 HCAD의 superoxide anion 소거활성 측정은 xanthine/xanthine oxidase 효소반응에 의한 superoxide anion 발생계를 이용한 Noro 등의 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 측정하였다.

Xanthine/xanthine oxidase 효소반응에 의해 생성된 superoxide anion으로 인한 NBT의 산화에 의한 흡광도의 변화를 측정하기 위해 먼저 0.05 M Na₂CO₃, 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.15% BSA, 0.75 M NBT 및 시료를 차례로 test tube 넣고 잘 혼합하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후에 xanthine oxidase (23 U/mL)를 넣고 다시 25°C에서 20분간 반응시킨 다음 6 mM CuCl₂를 넣어 반응을 정지시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 각 시료의 superoxide anion의 소거활성은 다음 식에 따라 계산하였다. Superoxide anion scavenging activity (%) = $[1 - \{(A-B)/(C-B)\}] \times 100$, A: absorbance of sample at 560 nm, B: absorbance of blank at 560 nm; C: absorbance of control at 560 nm. 또한, 시료와 효소를 넣지 않은 control 및 blank 군을 함께 각각 측정하여 시료의 상대적인 superoxide radical 소거활성을 측정한 후 회귀분석에 의해 산출된 IC₅₀ value (NBT 산화를 50% 저해하는 시료의 농도)를 나타내었다.

(3) Hydroxyl radical scavenging activity 측정

5가지 HCAD의 hydroxyl radical 소거활성은 Halliwell 등의 방법에 따라 Fenton 반응에 의해 유도된 hydroxyl radical (\cdot OH)에 의한 2-deoxyribose 분해 모델시스템을 이용하여 측정하였다. 즉, 0.1mM FeSO₄, 0.1mM EDTA, 10mM 2-deoxyribose, 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) 및 MeOH (최종농도 1% 이하)로 용해한 시료를 차례로 넣은 반응액에 10 mM의 30% H₂O₂를 첨가하여 37°C에서 4시간 반응시킨 후 생성된 산화분해물을 Ohkawa 등의 방법에 따라 TBA법으로 측정하였다.

반응혼합물에 2.8% trichloroacetic acid (TCA)를 첨가하여 반응을 종료시킨 후 1% TBA를 가하여 100°C에서 15분간 가열하여 발색시킨 다음, 얼음물에서 5분간 급속 냉각하여 532 nm에서 흡광도를 측정한 후, 다음 식에 따라 각 시료의 hydroxyl radical scavenging activity를 측정하였다.

Hydroxyl radical scavenging activity (%) = $[1 - (A/B)] \times 100$, A: absorbance of sample at 532 nm, B: absorbance of control at 532 nm. 이때 시료를 넣지 않은 control 군과 함께 측정하여 시료의 상대적인 hydroxyl radical 소거활성을 측정한 후 위와 동일한 방법으로 IC₅₀ value (2-deoxyribose 산화를 50% 저해하는 시료의 농도)를 계산하였다.

사. 옥수수 품종별, 제분방법 및 가공처리에 따른 HCAD 함량 변화 측정

옥수수 품종별 및 제분방법 및 가공처리에 따른 HCAD 함량 변화의 측정은 다음과 같이 실시하였다. 먼저 옥수수 품종은 앞서 말한 바와 같이 국내에서 생산되는 식용 찰옥수수 3종과, 사료용 옥수수 7종 그리고 감미종 2종을 사용하여 측정하였으며, 제분방법은 습식법 및 건식법으로 옥수수 전분제조 시 부산물로 얻어지는 옥피, 옥배아, 콘글루텐과 옥수수겨를 각각 국내 옥수수 가공업체로부터 제공받아 사용하였다.

한편, 옥수수 가공처리에 따른 5가지 HCAD의 함량 변화를 관찰하기 위해 다음과 같이 5가지 상이한 옥수수 가열처리를 실시하였다. 먼저 옥수수를 분쇄기로 조분쇄한 후 볶음 처리는 가정용 fry pan을 사용하여 200℃에서 5분간 볶음처리하였으며, 찜처리는 가정용 찜통을 이용하여 95-100℃에서 60분간 처리하였다. 또한 microwave처리는 옥수수를 전자레인지(삼성, 한국)에 넣고 5분간 microwave 처리를 하였으며, 팽화처리는 시중 팽화기를 사용하여 온도 220~230℃, 압력 1.5~2.0 kg/cm²에서 5분간 팽화처리하였고, 고온가압증기처리는 가압증기솥(retort, 일신, 한국)을 이용하여 120℃, 1~2기압에서 60분간 처리하였음. 마지막으로 압출성형 처리는 쌍축형압출성형기(FX-60, 밀링산업, 한국)를 사용하여 다음 조건에서 압출성형 처리하였다. 즉, 압출성형기의 스크루 직경은 45.0 mm, 직경과 길이의 비(L/D ratio)는 20:1이며, 배럴 온도 140/130/65℃(배럴순서 1/2/3), 스크루 회전속도 400 rpm, 가수량 100 mL/min, 수분함량 20%, 원료 사입량 200 g/min, 사출구 직경 5.0 mm로 고정하여 압출성형 하였다. 열처리한 모든 시료는 열풍건조기(COBP-15S 신흥건조기, 한국)에서 50℃, 8시간 건조하였으며, 건조된 시료는 가정용 분쇄기(산성, 한국)로 분쇄한 후 35 mesh 표준체(Testing sieve, Chung-gye Sanggong, Co., 한국)를 통과한 분말을 분석시료로 사용하였다.

한편, 옥수수 품종, 제분방법 및 가공처리에 따른 옥수수의 HCAD 함량은 다음과 같이 HPLC를 이용하여 측정하였다. 옥수수분말(100 g)에 80% 에탄올수용액 1 L을 가한 후 2시간 동안 2회 반복하여 ultrasonicator에서 추출한 다음 여과 및 감압농축하여 에탄올추출물을 얻었다. 다음, 에탄올추출물을 80%에탄올 수용액 500 mL에 용해시킨 후 냉장고에서 일야 방치시킨 후 상층액을 다시 원심분리(3,000 rpm, 30분)하여 얻어진 상층액을 감압농축하고 다시 같은 용액으로 용해시킨 후 100 mL로 정용하였다. 이 액 50 mL를 취하여 농축하여 에탄올을 제거시킨 후 여기에 CH₂Cl₂ (200 mL)를 2회 반복하여 가하여 분획하여 하층을 얻은 후 감압농축하여 CH₂Cl₂ 분획을 얻었다. 이 추출물을 80% 에탄올을 10 mL로 용해시킨 후 Sep-pak C₁₈ cartridge(Waters, USA)를 통과시켜 불순물을 제거한 후 적절히 희석시킨 다음 HPLC (Gilson 506B HPLC System coupled with Gilson 170 UV-vis detector, Gilson 231 XL autosampler with a 10 µL loop)로 분석하였다. 이때 HPLC 분석조건으로 YMC-Pack Pro C₁₈ column (46 × 250 mm, YMC Inc., Milford, MA), 용매 A (0.05%v/v H₃PO₄ in 20% MeOH와 용매 B (80% MeOH)를 60분간 구배용출(0~5 min, 80% A, 20% B; 10~15 min, 60% A, 40% B; 20~25 min, 40% A, 60% B; 30~35 min, 20% A, 80% B; 40~50 min, 0% A, 100% B)로, 검출기는 UV 310 nm에서, 그리고 속도는 0.8 mL/min으로 실시하였다. 이때 분리된 5가지 HCAD의 HPLC chromatogram은 Fig. 2와 같고, 시료의 HCAD는 분리된 표준 HCAD의 retention time과 비교하여 확인하였으며, 각 화합물의 calibration curve는 회귀분석그래프를 이용하여 작성한 후(여기서 생략) 각각의 HCAD의 함량을 계산하였다. 이때, 각 HCAD의 linear correlation coefficient는 모두 0.999 이상이었고 각 HCAD의 회수율은 98% 이상이었다.

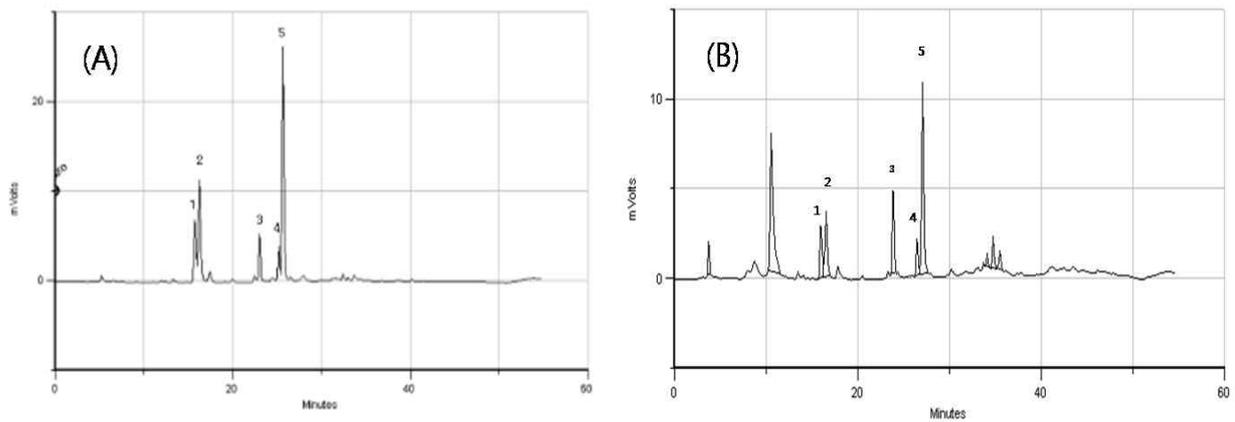


Fig 2. HPLC chromatograms of five different HCAD standards(A) and CH₂Cl₂ fr.(B) from EtOH extract of waxy corn.

1. *p*-Coumaric acid, 2. ferulic acid, 3. *N-p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine (CFP), 4. *N,N'*-dicoumaroylputrescine (DCP), 5. *N,N'*-diferuloylputrescine (DFP).

아. 효소처리 및 산 또는 알칼리 처리에 의한 옥수수겨추출물의 HCAD 함량 변화 측정

옥수수겨에 존재하는 HCAD는 섬유소와 단단하게 결합되어 있어 이를 효과적으로 추출하기 위해 섬유소의 결합을 분해할 수 있는 효소 및 산 또는 알칼리처리에 따라 옥수수겨추출물을 다음과 같이 제조하였다.

옥수수겨(100 g)를 분쇄기로 조분쇄한 다음 이온수(1 L)로 현탁하고 여기에 5가지 당분해효소(viscozyme L, pectinex, celluclast, amylase 및 termamyl, Novozyme, Denmark) 10 mL를 가하여 45°C(termamyl 효소는 가열처리) water bath에서 1 시간 효소처리 후 방냉하고 여과하여 잔사를 얻었다. 잔사는 다시 끓는 물로 2회 수세 후 원심분리(3,000 rpm, 30분)하여 얻은 잔사를 80% 에탄올용액으로 ultrasonicator (Branson, USA)에서 2시간 동안 3회 걸쳐 추출한 후 여과 및 부분감압농축하여 얻어진 추출물을 다시 80% 에탄올로 재용해한 후 하룻밤 냉장고에서 방치하여 얻은 상층을 다시 농축하여 옥수수겨 에탄올추출물을 제조하였다. 다음, 제조된 옥수수겨추출물의 HCAD의 함량분석은 앞과 동일하게 실시하였다.

다음, 분쇄한 옥수수겨(100 g) 분말에 0.1 N HCl (0.1 N NaOH) 및 1.0 N HCl (1.0 N NaOH) 용액(1 L)을 각각 가하여 상온에서 빛을 차단하고 질소로 퍼징하면서 12시간 추출한 후 진한가성소다(6 N NaOH 용액) 및 진한염산 용액을 가하여 pH를 각각 8.0 및 2.0으로 조정 한 후 여기에 에틸아세테이트를 가하여 충분히 흔들여 용매분획하여 얻은 에틸아세테이트층을 무수황산나트륨으로 탈수한 후 여과 및 감압농축하여 에틸아세테이트분획을 얻었다. 이것을 80% 에탄올용액으로 다시 용해한 후 냉장고에서 하룻밤 방치하여 침전물을 제거한 다음 상층을 다시 농축하여 옥수수겨추출물을 얻었다. 이때, 옥수수겨추출물 HCAD의 함량분석은 앞과 동일하게 분석하였다.

자. 용매분획 및 흡착수지 칼럼크로마토그래피에 의한 HCAD 함유 고품질의 옥수수겨추출물(corn bran extract, Corn BE) 제조

피부노화 예방용 미백화장품 원료로 사용하기 위해 옥수수겨로부터 HCAD 함유 고품질의 옥수수겨추출물(Corn BE)을 Fig. 3과 같이 제조하였다.

옥수수겨(10 kg)를 80% 에탄올용액으로 large scale ultrasonicator (500 L, 화신테크, 한국)에서 12시간 2회 반복 추출한 후 여과 및 감압농축하여 에탄올추출물(310.4 g)을 얻은 후 이것을 다시 80% 에탄올용액(10 L)로 용해한 다음 냉장고에서 하룻밤 방치한 후 침전물을 원심분리하여(8,000 rpm, 30분) 제거한 후 다시 부분감압 농축한 다음 여기에 노르말-헥산을 가하여 탈지한 다음, 이온수 (10 L)로 현탁시킨 후 디클로로메탄(20 L × 2회)을 가하여 분획한 후 얻어진 하층을 농축하여 디클로로메탄추출물(31.3 g)을 얻은 후 이것을 헥산-에틸아세테이트-메탄올-물(200:200:100:1, v/v) 혼합용매로 용해시킨 후 하룻동안 냉장고에 방치하여 하층에 침전된 흰 분말을 수거하여 다시 80% 에탄올로 용해시킨 후 회석하고 미리 40%로 평형화시켜 놓은 Diaion HP-20 흡착수지(미쯔비시, 일본) 카트리지(20 cm × 65 cm)가 장착된 large purification system (Biotage, USA)을 이용하여 먼저 40% 에탄올로 수세하여 저분자량의 색소와 CA 및 FA를 용출하여 제거시킨 후 다시 80% 에탄올용액을 통과시켜 흡착된 3가지 PCs (DCP, CFP, DFP)를 용출시켰다. 용출된 80% 에탄올분획을 감압농축한 후 다시 80% 에탄올로 용해시킨 후 냉장고에서 하룻밤 방치하여 침전물을 제거시킨 다음 상층을 감압농축하여 최종 옥수수겨추출물 분말을 얻었다[32 g, 수율: 0.32%, 함량: DPF(25%)].

차. HPLC에 의한 Corn BE의 HCAD 정량분석

앞서 생산된 Corn BE의 5가지 HCAD 즉, CA, FA, CFP, DCP 및 DFP의 정량분석은 최 등 (2007)의 방법을 약간 변형하여 다음과 같이 실시하였다. Corn BE 1.0 g를 100% 메탄올 100 mL로 용해하고 냉장고에서 2시간 방치 후 침전물을 Whatman No. 2 여과지로 여과하여 제거한 후 같은 용매로 100배 희석한 후 0.45 μ m PVDF syringe filter (Whatman, Maidstone, England)를 통과시킨 다음 전보와 동일하게 5가지 HCAD의 함량을 **Table 1**의 조건에서 HPLC로 분석하였다. 이때 5가지 HCAD 표준품과 Corn BE의 HPLC chromatogram은 **Fig. 4**와 같으며, 각 화합물의 검량곡선으로부터 Corn BE의 HCAD의 함량을 계산하였다.

한편, HPLC에 의한 Corn BE의 HCAD 함량 측정 시 분석방법의 검증을 위해 먼저 각 표준액에 대하여 확립된 HPLC 조건에 의하여 3개의 농도(20, 50, 100 μ g/mL)별로 피크 면적비를 구하여 표준품 농도(X축)와 피크 면적비(Y축)에 대한 검량선을 작성한 후 검량선으로부터 직선상의 상관계수를 구하여 확인한 결과, **Fig. 5**와 같이 5 가지 HCAD 모두 직선성(R^2)이 0.999 이상인 상관관계를 나타내어 직선성이 인정되었다. 그리고 검출 한계는 CA 및 FA는 0.1 μ g/g 이었고 3 가지 PCs는 0.05 μ g/g를 나타내었다. 마지막으로 표준액 3개 농도를 각 3회 주입하여 얻은 결과를 검량선에 대입하여 얻은 결과와 참값의 오차정도(회수율, %)로서 정확성을 평가한 결과, 5가지 HCAD 모두 99% 이상으로 나타났다(**Table 2**).

Table 1. HPLC conditions for quantitative analysis of HCAD in corn bran extract

Item	Operating condition
HPLC system	Waters e2690/5 HPLC system equipped with 2998 photodiode array detector and autosampler
Column	YMC-Pack Pro C ₁₈ (5 μ m, 4.6 \times 250 mm, YMC Inc., USA)
Solvent	Sol A; 0.05% H ₃ PO ₄ in H ₂ O, Sol B; 100% MeOH) a linear gradient elution from A to B for 50 min
Detector	UV _{310nm}
Flow rate	0.8 mL/min

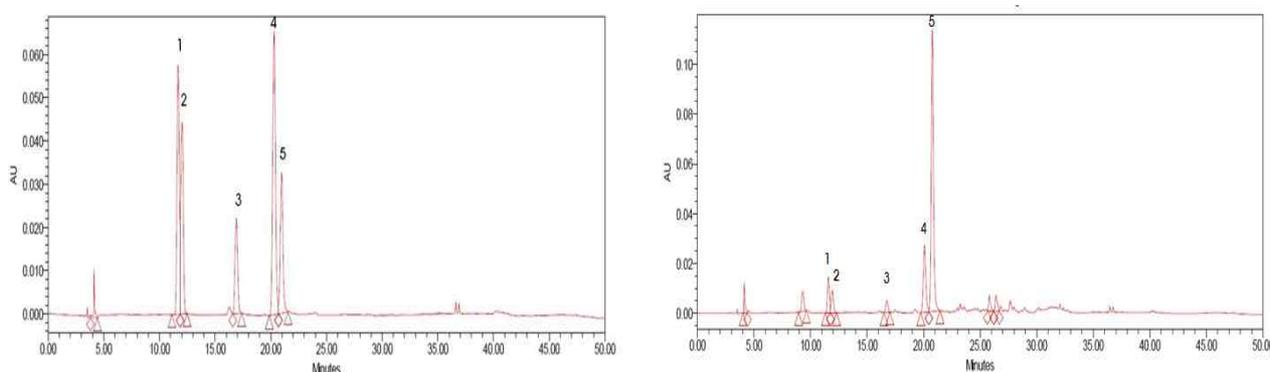


Fig. 4. HPLC chromatograms of five different HCAD standards (A) and EtOH extract (B) of Corn BE. 1. CA, 2. FA, 3. CFP, 4. DCP, 5. DFP.

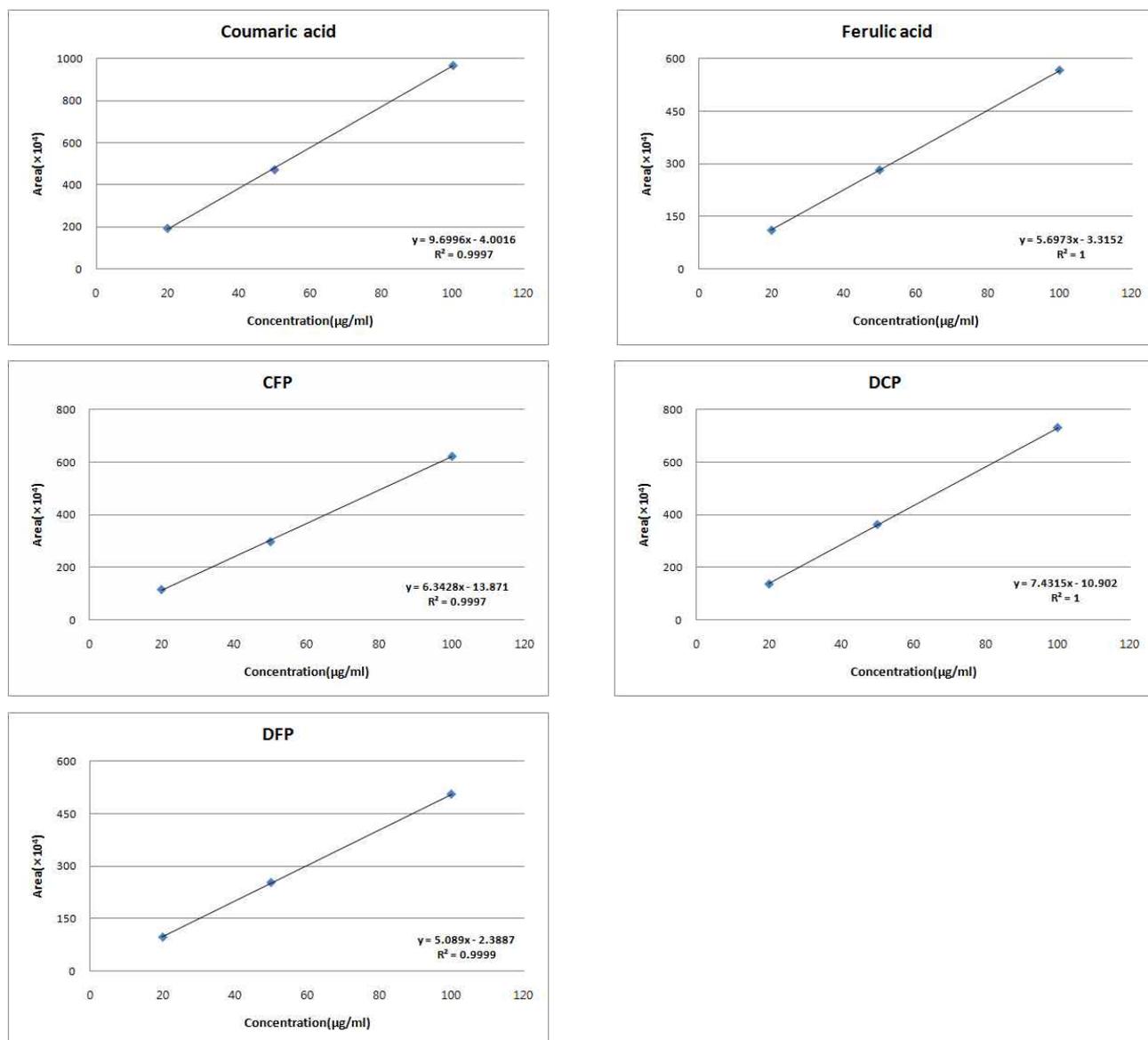


Fig. 5. Calibration curves for quantitative analysis of five HCAD in Corn BE.

Table 2. Data from calibration curves, limits of detection, and recovery of five HCAD

HCAD	Regression equation	Correlation coefficient	Limits of detection($\mu\text{g/g}$)	Recovery(%)
CA	$Y=9.6996X-4.0016$	0.9997	0.10	99
FA	$Y=5.6973X-3.3152$	1.0000	0.10	99
CFP	$Y=6.9428X-13.871$	0.9997	0.05	102
DCP	$Y=7.4915X-10.902$	1.0000	0.05	102
DFP	$Y=5.089X-2.3887$	0.9999	0.05	101

카. Corn BE의 물리·화학적 요인에 대한 안정성 조사

(1) 열 안정성 측정

Corn BE의 열처리에 따른 5가지 HCAD의 안정성은 다음과 같이 실시하였다. 즉, 옥수수겨추출물 5 g를 100% 에탄올용액 500 mL로 용해한 후 옥수수겨추출물 용해액을 뚜껑이 있는 유리병에 20 mL씩 취해 담은 다음, 용해액이 담긴 유리병을 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C 및 100°C로 조절된 water bath에서 30 분간 열처리한 후 서서히 냉각하여, 이를 100% 에탄올용액으로 100배 희석한 후 0.45 µm PVDF syringe filter를 통과시킨 다음 **Table 1**의 조건에서 HPLC로 분석하였다.

(2) pH 안정성 측정

Corn BE의 pH에 따른 5가지 HCAD의 안정성은 다음과 같이 실시하였는데, 앞서 제조된 옥수수겨추출물 용해액을 비커에 20 mL씩 취해 담고 0.1 N HCl 및 0.1 N NaOH 용액으로 pH 2, 4, 6, 8 및 10으로 조절한 다음 용해액을 100% 에탄올로 100배 희석하여 PVDF syringe filter를 통과시킨 후 **Table 1**의 조건에서 HPLC로 분석하였다.

(3) 광 안정성 측정

Corn BE의 광에 따른 5가지 HCAD의 안정성은 다음과 같이 실시하였다. 즉, 옥수수겨추출물 0.1 g를 100% 에탄올수용액 100 mL로 용해한 후 같은 용매로 10배 희석하여 옥수수겨추출물 용해액 1 L (0.1 mg/mL)을 얻었고, 이 액을 vial에 5 mL씩 취한 다음, 태양광처리 시간은 0~60분 까지는 10분 간격으로 하고 1~7시간 사이는 1시간 간격으로 고정하여 실시하였으며, 반면 자외선 처리 시간은 UV 램프를 이용하여 254 및 365 nm에서 각각 1, 2시간 실시하였다. 다음, 광 처리한 옥수수겨추출물 용해액을 0.45 µm PVDF syringe filter를 통과시킨 후 **Table 1**의 조건에서 HPLC로 분석하였다.

타. 광 처리에 따른 Corn BE의 항산화활성 변화

Corn BE의 광 처리에 따른 항산화활성의 변화를 DPPH radical을 이용하여 앞서 방법과 동일하게 측정하였다. 즉, 시료의 농도는 시간별 광 처리한 Corn BE 용액 100 µg/mL와 이 용액 중 2 mL를 농축하여 0.4 mL에 용해한 농축액 500 µg/mL의 두 가지 농도에서 측정하였으며, 이 때 DPPH radical 소거활성은 앞선 계산 방법과 동일하다.

파. Corn BE의 순도, 함량 및 물리·화학적 특성에 관한 품질 spec 작성

(1) 물리·화학적 특성 측정

Corn BE의 물리·화학적 특성으로 건조감량, UV 흡수스펙트럼 및 pH의 측정은 다음과 같이 실시하였다. 먼저 건조감량은 상압가열건조법으로 다음과 같이 실시하였으며, Corn BE 0.2 g를 알루미늄제 칭량용기에 담고 105°C dry oven에 넣어 3시간 동안 건조시킨 다음, 전후의 중량 차이를 수분량으로 산출하여 건조감량으로 하였다. 한편, UV 흡수스펙트럼은 Corn BE 0.1 g를 100% 에탄올용액 100 mL에 용해한 후 50배 희석한 다음 UV-vis spectrophotometer

(Sinco S-3100, Korea)를 사용하여 200~350 nm 사이를 scanning하여 최대흡수파장을 측정하였다. 다음, pH는 Corn BE 0.1 g를 50% 에탄올수용액 100 mL에 용해한 후 이 액을 pH meter (Seven Easy, Mettler Toledo, Switzerland)로 측정하였다.

(2) 중금속(납 및 비소) 함량 측정

개정된 식품공전에서는 시험용액의 제조에 산분해법, microwave 분해법 및 건식회화법을 제시하고 있다. 본 연구에서 Corn BE의 중금속 중 납 및 비소 분석은 microwave 분해법으로 시험용액을 제조하였다. 즉, Corn BE 0.5 g를 테프론 재질의 튜브에 넣고 진한 질산 10 mL를 넣은 다음 microwave (Mars 230/60, Cem, USA)로 200°C에서 lamp time 15분 및 hold time 15분으로 분해하여 방냉한 후 감압 농축하였고, 이를 0.5 N 질산 50 mL로 정용하여 시험용액을 제조하였다. 분해된 시험용액은 **Table 3**의 분석조건에서 ICP-OES (Inductively coupled plasma optical emission spectrometer; Varian 720-ES, Varian, Australia)를 이용하여 측정하였고, 이 때 표준액은 ICP multi-element standard solution IV, 1000 mg/L (Merck, Germany)을 0.5 N 질산에 희석하여 분석하였으며, 납 및 비소의 검량곡선으로부터 Corn BE의 납 및 비소 함량을 계산하였다.

Table 3. ICP-OES operating conditions for quantitative analysis of lead (Pb) and arsenic (As) in Corn BE

Parameter	Value
RF power	1200 Watts
Nebulizer gas flow(Ar)	0.7 L/min
Plasma gas flow(Ar)	15 L/min
Auxiliary gas flow(Ar)	1.5 L/min
Number of replicates	3
Analytical elements	Pb (283.3), As (74.92)

(3) 총 균수 측정

총 생균수는 다음과 같이 실시하였다. 즉, Corn BE 1 g를 멸균증류수 50 mL에 현탁시킨 후 원액 및 2배 희석액 5 mL를 3 M petrifilm aerobic count plate(3M, Mexico, USA)에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 다음, 생성된 colony 수를 눈으로 측정하여 총 균수로 나타내었다.

하. 통계처리

모든 실험 결과들은 3회 반복 측정하여 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 각 처리별 평균치간의 유의성 검정은 SPSS 14.0(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software를 이용하여 분산분석을 실시하였다. 평균간 유의적 차이가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 유의차 검정을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 옥수수겨로부터 3 가지 PCs의 추출, 분리 및 정제

Fig. 1과 같이 탈지 옥수수겨의 에탄올추출물을 다시 80% 에탄올수용액으로 용해한 후 노르말-헥산으로 분획하여 탈지하고 얻어진 하층을 부분 감압농축한 후 CH_2Cl_2 를 가하여 분획한 후 CH_2Cl_2 추출물을 silica gel, ODS-A, 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 순차적으로 실시하여 3가지 PCs, 즉, DCP, CFP 및 DFP를 각각 순수하게 분리 및 정제하였다.

나. 옥수수겨로부터 분리된 3 가지 PCs의 화학구조 동정

옥수수겨로부터 분리된 3개의 PCs의 화학구조를 동정하기 위해 각 화합물의 UV, NMR 및 FAB-MS spectra를 각각 측정하였으며, 아울러 이미 전보에서 보고된 각 화합물의 spectral data와 비교하여 구조를 동정하였다.

먼저 3개의 PCs의 UV 흡수스펙트럼을 측정한 결과 Fig. 6과 같이 DCP는 294 및 310 nm에서, CFP는 294 및 310 nm에서 그리고 DFP는 294 및 320 nm에서 각각 최대 흡수스펙트럼을 나타내었으며, 이로부터 3 가지 PC 화합물이 각각 DCP, CFP 및 DFP임을 쉽게 알 수 있었다.

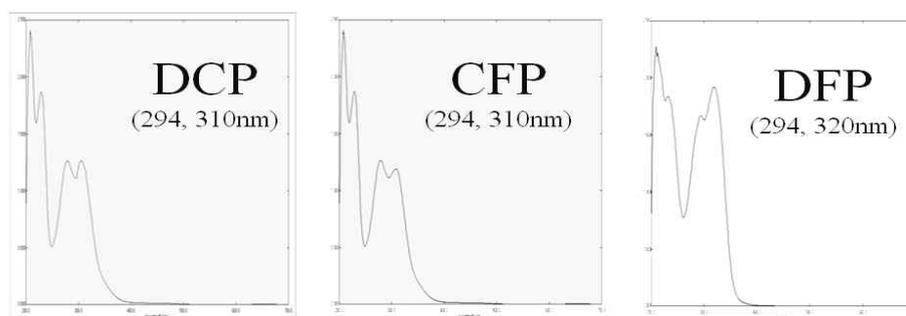


Fig. 6. UV absorption spectra of three PCs(DCP, CFP & DFP) from corn bran. A: DCP, B: CFP, C: DFP.

(1) *N,N'*-Dicoumaroylputrescine (DCP)

흰색의 분말로서 자외선 스펙트럼을 측정한 결과 Fig. 6과 같이 294 와 310 nm에서 강한 UV 흡수 spectrum을 나타내는 것으로 보아 전형적인 cinnamic acid 유도체임을 알 수 있었다. 다음, 분자량을 확인하기 위해 FAB (Fast atom bombardment) MS spectrum을 측정한 결과 Fig. 7과 같이 분자이온 peak $[\text{M}+\text{H}]^+$ 가 m/z 381에서 나타났으며, 아울러 177에서 fragment ion peak를 관찰할 수 있었기에 본 화합물은 DCP임을 추정할 수 있었다.

다음, ^1H -NMR spectrum을 측정한 결과는 Fig. 8과 같다. 먼저 δ 9.82 (2H, br s, OH) 및 7.97 (2H, t, $J=5.2$ Hz, NH)에서 각각 두 개의 OH, NH 관능기를 확인할 수 있었고, δ 7.38 (4H, d, $J=8.4$ Hz, H-2 & 2', H-6 & 6'), 7.30 (2H, d, $J=15.6$ Hz, H-8, 8'), 6.78 (4H, d, $J=8.8$ Hz, H-3 & 3', H-5 & 5'), 6.38 (2H, d, $J=15.6$ Hz, H-7, 7')로부터 두 개의 trans 이중결합과

두 개의 para 치환된 monophenol 화합물임을 알 수 있었으며, 또한 δ 3.16 (4H, m, H-9, 9') 및 1.46 (4H, m, H-10, 10')에서 두 개의 methylene기의 proton signal을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과로부터 본 화합물은 DCP임을 확인할 수 있었다.

한편, ^{13}C -NMR spectrum (Fig. 8)을 보면 δ 165.25 (CO)에서 ketone기를, δ 158.73 (C-4 & 4')에서 OH기의 carbon peak를, δ 138.46 (C-7 & C-7'), 129.10 (C-2 & 2', C-6 & 6'), 125.92 (C-1& 1'), 118.76 (C-8 & 8'), 및 115.69 (C-3 & 3', C-5 & 5') 부근에서 두 개의 trans 이중 결합의 carbon peak와 두 개의 para 치환된 monophenol의 carbon peak들을 각각 확인할 수 있었고 또한, δ 38.32 (C-10 & 10'), 26.79 (C-9 & 9')에서 methylene 기의 carbon peak를 각각 확인할 수 있었다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때 본 화합물은 DCP임을 알 수 있었다.

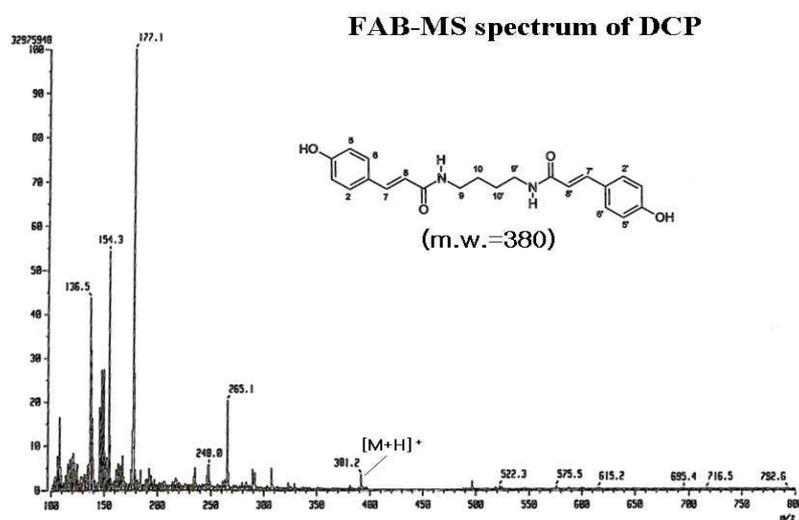


Fig. 7. FAB-MS spectrum of *N,N'*-dicoumaroylputrescine (DCP).

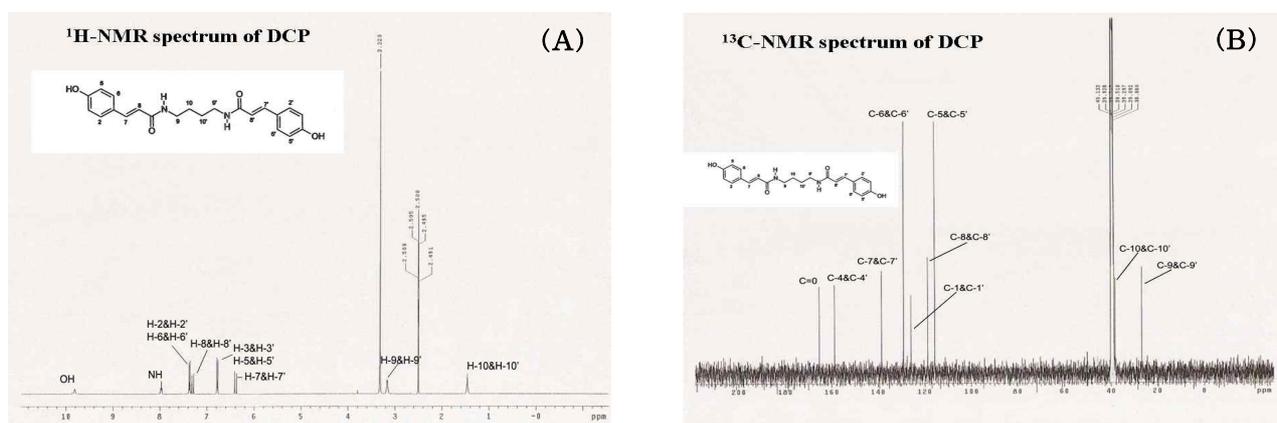


Fig. 8. ^1H (A)- & ^{13}C (B)-NMR spectra of *N,N'*-dicoumaroylputrescine (DCP).

(2) *N-p*-Coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine (CFP)

흰색의 분말로서 Fig. 6에서와 같이 294 nm에서 강한 UV 흡수 spectrum을 나타내는 것으로 보아 전형적인 cinnamic acid 유도체임을 알 수 있었다.

다음, FAB-MS spectrum을 측정한 결과 **Fig. 9**와 같이 분자이온 peak $[M+H]^+$ 가 m/z 411에 나타났으며, OCH_3 한 분자가 이탈된 381에서, 나아가 177에서 fragment ion peaks를 보아 본 화합물은 CFP임을 추정할 수 있었다.

다음, 1H -NMR spectra을 측정한 결과는 **Fig. 10**과 같이 먼저 δ 9.67 (2H, br s, OH) 및 8.01 (2H, t, $J=5.2$ Hz, NH)에서 각각 두 개의 OH, NH 관능기를 확인할 수 있었고, δ 7.40 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2, 6), 7.33 (2H, d, $J=15.7$ Hz, H-8, 8'), 7.14 (1H, d, $J=1.7$ Hz, H-2'), 7.00 (1H, dd, $J=1.7, 8.6$ Hz, H-6'), 6.81 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 6.48 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-7, 7'), 및 6.42 (1H, d, $J=15.2$ Hz, H-3, 5)에서 하나의 para 치환된 monophenol과 하나의 meta 및 para 치환된 diphenol를 확인할 수 있었다. 그리고 δ 3.82 (3H, s, OCH_3)에서 하나의 OCH_3 을 확인할 수 있었고 나머지 1H -NMR spectra는 모두 앞의 DCP와 아주 유사한 spectra를 나타내었다. 따라서 본 화합물은 CFP임을 확인할 수 있었다.

한편, ^{13}C -NMR spectra (**Fig. 10**)을 보면 δ 165.63 (CO)에서 ketone기를, δ 159.13 (C-4) 및 148.55 (C-4')에서 OH기의 carbon peak를, δ 148.14 (C-3'), 139.14 (C-7), 138.86 (C-7'), 129.48 (C-2, 6), 126.76 (C-1'), 126.26 (C-1), 121.80 (C-6'), 119.39 (C-8), 119.10 (C-8'), 116.07 (C-5'), 115.97 (C-3, 5), 및 111.02 (C-2')에서 하나의 para 치환된 monophenol과 하나의 meta 및 para 치환된 diphenol의 carbon peak를 각각 확인할 수 있었다. 그리고 δ 55.83에서 OCH_3 의 carbon peak를 확인할 수 있었고, 이를 제외한 나머지 ^{13}C -NMR spectra는 모두 앞의 DCP와 아주 유사한 spectra를 나타내었다. 따라서 본 화합물은 CFP로서 쉽게 동정할 수 있었다.

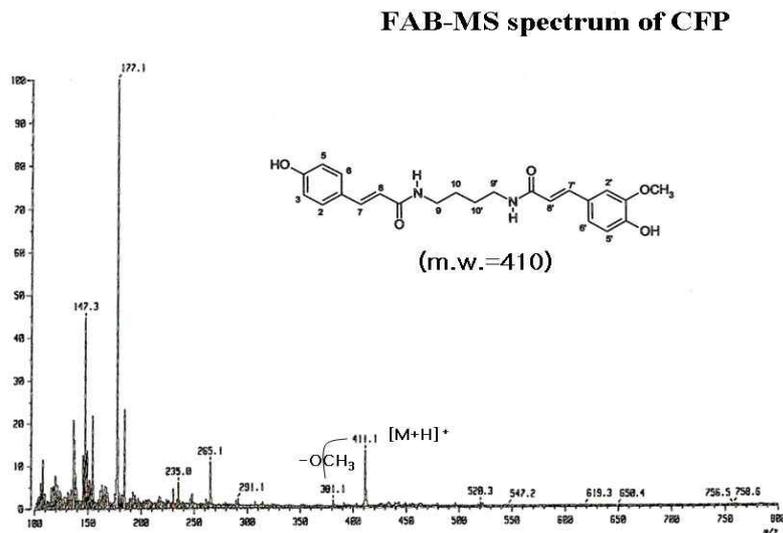


Fig. 9. FAB-MS spectrum of *N-p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine (CFP).

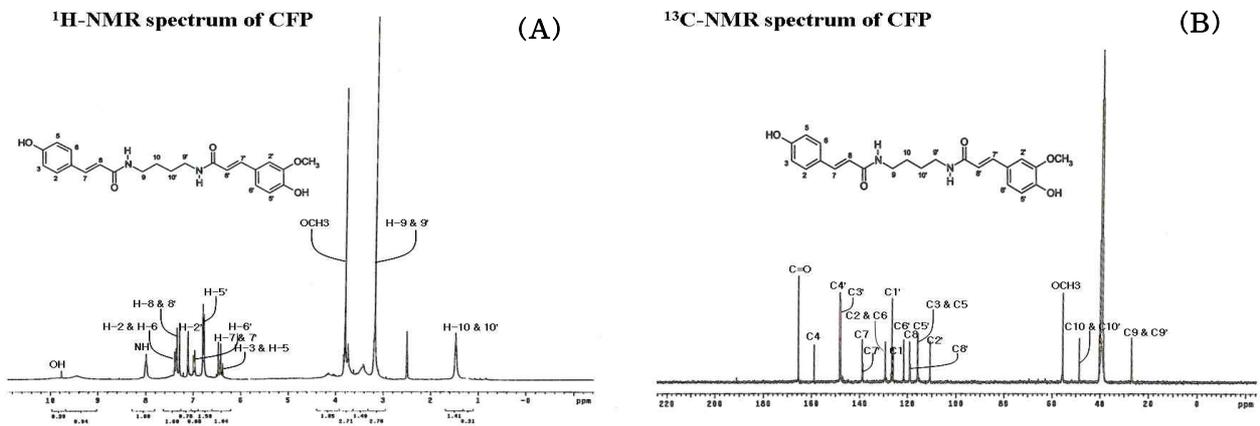


Fig. 10. ¹H(A)- & ¹³C(B)-NMR spectra of *N-p*-coumaroyl-*N'*-feruloylputrescine (CFP).

(3) *N,N'*-Diferuloylputrescine (DFP)

흰색분말로써 자외선 스펙트럼을 **Fig. 6**에서와 같이 320 nm에서 강한 UV 흡수 spectrum을 나타내는 것으로 보아 전형적인 cinnamic acid 유도체임을 알 수 있었다. 다음, FAB-MS spectrum을 측정된 결과 **Fig. 11**과 같이 분자이온 peak $[M+H]^+$ 가 *m/z* 441에서 나타났으며, OCH₃ 한 분자가 이탈된 411 그리고 거기에서 다시 OCH₃ 한 분자가 이탈된 381 peak를 확인할 수 있었으며, 그리고 177에서 fragment ion peaks를 각각 보아 본 화합물은 DFP임을 추정할 수 있었다.

다음, ¹H-NMR spectra를 측정된 결과는 **Fig. 12**와 같이 먼저 δ 9.24 (2H, br s, OH) 및 7.80 (2H, t, *J*=5.2 Hz, NH)에서 각각 두 개의 OH, NH 관능기를 확인할 수 있었고, δ 7.18 (2H, d, *J*=15.7 Hz, H-8, H-8'), 6.94 (2H, d, *J*=1.8 Hz, H-2, 2'), 6.81 (2H, dd, *J*=8.1, 1.8 Hz, H-6, 6'), 6.62 (2H, d, *J*=8.1 Hz, H-5, H-5'), 및 6.26 (2H, d, *J*=15.7 Hz, H-7, 7')에서 두 개의 meta 및 para 치환된 diphenol를 확인할 수 있었고, δ 3.63 에서 두 개의 OCH₃을 확인할 수 있었다. 이를 제외한 나머지 ¹H-NMR spectra는 모두 앞의 DCP와 아주 유사한 spectra를 나타내었다. 따라서 본 화합물은 DFP임을 확인할 수 있었다.

그리고 ¹³C-NMR spectra(**Fig. 12**)를 보면 δ 165.60에서 ketone기를, δ 148.52 (C-4 & 4')에서 OH기의 carbon peak를, δ 148.13 (C-3, 3'), 139.12 (C-7, 7'), 126.77 (C-1, 1'), 121.79 (C-6, 6'), 119.41 (C-8, 8'), 115.96 (C-5, 5'), 및 111.01 (C-2, 2')에서 두 개의 meta 및 para 치환된 diphenol의 carbon peak를 확인할 수 있었고, δ 55.83에서 두 개의 OCH₃의 carbon peak를 확인할 수 있었다. 이를 제외한 나머지 ¹³C-NMR spectra는 모두 앞의 DCP와 아주 유사한 spectra를 나타내었다. 따라서 본 화합물은 DFP로서 쉽게 동정할 수 있었다.

지금까지 옥수수겨로부터 3가지 PCs, DCP, CFP 및 DFP는 최근 LC-MS로 통해 분리된 바가 있으나, 옥수수겨로부터 3가지 PCs가 대량 분리된 것은 본 연구에서 처음이었다.

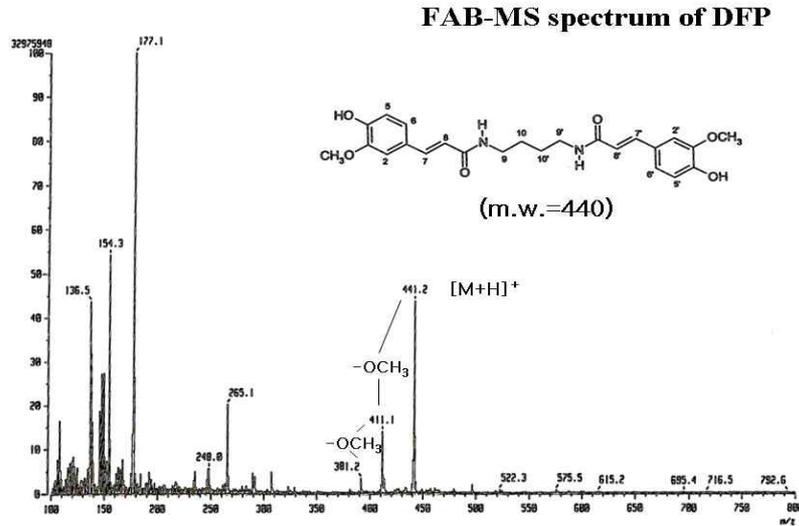


Fig. 11. FAB-MS spectrum of *N,N'*-diferuloylputrescine (DFP).

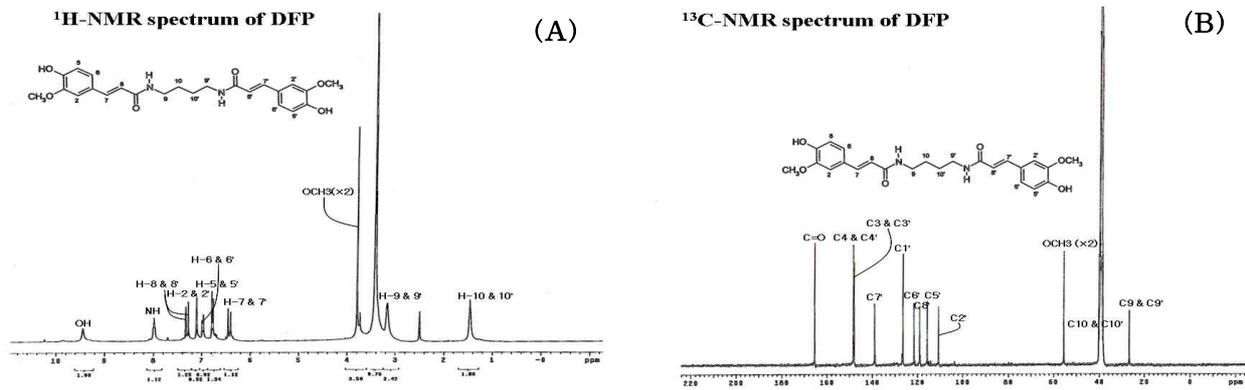


Fig. 12. ¹H(A)- & ¹³C(B)-NMR spectra of *N,N'*-diferuloylputrescine (DFP).

다. 옥수수겨로부터 분리된 5가지 HCAD의 화학적 특성

옥수수겨로부터 분리된 5 가지 HCAD의 최대흡수파장, 흡광몰계수, mp 등 여러 화학적 특성을 측정한 결과는 **Table 4**와 같다. 먼저 DFP는 318 nm에서 최대흡수를 나타내었고 흡광몰계수는 4.60, 선광도는 +16.7, mp는 168°C 이었고, CFP는 313 nm, 4.46, +27.8 및 143°C, 그리고 DCP는 308 nm, 4.40, +45.5 및 130°C 이었다. 그리고 FA 및 CA의 화학적 특성은 이미 보고된 것을 참조하였으며, 그 외 화학적 특성은 **Table 4**와 같다

Table 4. Chemical characteristics of five different HCAD isolated from corn bran

HCAD	Chemical characteristics					
	RT ¹⁾	MeOH λ_{\max} (log ϵ) ²⁾	$[\alpha]_D^{20}$	mp(°C) ³⁾	M.W.	Form
DFP	24.26	318 (4.60)	+16.7	168	440	White powder
CFP	23.74	313 (4.46)	+27.8	143	410	"
DCP	21.36	308 (4.40)	+45.5	130	380	"
FA	19.21	316 (4.32)	+73.3	230	194	"
CA	17.19	305 (4.28)	+89.2	214	164	"

¹⁾Retention time at HPLC analysis

²⁾Molar extinction coefficient expressed as log ϵ

³⁾Melting point

라. 옥수수겨로부터 분리된 5가지 HCAD의 물리·화학적 안정성

옥수수겨로부터 분리된 5 가지 HCAD의 용해성, 온도, 광, 자외선, pH, 및 효소에 대한 안정성을 조사한 결과는 **Table 5**와 같다. 먼저 3 가지 PCs (CFP, DCP & DFP)는 MeOH에 대한 용해성이 우수하고, 온도 및 pH (pH 2 이하 제외)에 대한 안정성이 높은 반면, 빛 및 자외선에 대한 안정성이 떨어지고 아울러 효소에 대한 안정이 떨어졌다. 반면, FA 및 CA와 같은 free cinnamic acid는 용해성, 온도, 빛 및 자외선뿐만 아니라 pH 및 효소에 대해서도 상당히 안정하였다. 이와 같이 3 가지 PCs 화합물이 자외선 및 효소에 대한 안정성이 떨어지는 이유는 그들이 지니고 있는 *trans* 이중결합과 amide 결합 때문에 일어난 것으로 생각된다.

Table 5. Solubility and stability of five different HCAD isolated from corn bran again

HCAD	Solubility and stability							
	Solubility ¹⁾	Heat	Sunlight	UV ²⁾	pH			Enzyme ³⁾
					2-3	4-7	8-10	
DFP	Good	Good	Poor	Poor	Poor	Good	Good	Poor
CFP	"	"	"	"	"	"	"	"
DCP	"	"	"	"	"	"	"	"
FA	"	"	Fair	Fair	"	"	"	Good
CA	"	"	"	"	"	"	"	"

¹⁾Solubility against MeOH

²⁾UV_{365 nm}

³⁾Amylase, pectinase, cellulase, glucoamylase, viscozyme

마. 옥수수겨로부터 분리된 5 가지 HCAD의 항산화작용

옥수수겨로부터 분리된 3가지 PCs와 그들의 모핵인 FA 및 CA의 5 가지 HCAD의 DPPH, superoxide 및 hydroxyl radical scavenging activity를 측정된 결과는 **Table 6**과 같다.

먼저 5가지 페놀화합물의 DPPH radical scavenging activity를 측정된 결과 DFP ($IC_{50}=38.46 \mu M$)가 가장 높았으며, 그 다음으로 FA ($IC_{50} = 45.27 \mu M$) 및 CFP ($IC_{50}=70.37 \mu M$) 순이었으며, CA 및 DCP는 매우 낮은 활성을 나타내었다. 또한, superoxide radical scavenging activity는 DFP ($IC_{50} = 291.62 \mu M$)가 가장 높았으며, 그 다음으로 CFP ($IC_{50} = 488.04 \mu M$) 및 FA ($IC_{50} = 5,312.30 \mu M$) 순이었으며, CA 및 DCP는 매우 낮은 활성을 나타내었다. 한편, 5가지 페놀화합물 중 DCP ($IC_{50} = 164.84 \mu M$)는 α -tocopherol ($IC_{50} = 155.67 \mu M$)과 유사하게 가장 강한 hydroxyl radical scavenging activity를 나타내었으며, 그 다음으로 CFP ($IC_{50} = 192.45 \mu M$) > CA ($IC_{50} = 256.31 \mu M$) > DFP ($IC_{50} = 351.87 \mu M$) > FA ($IC_{50} = 502.11 \mu M$) 순으로 나타났다. 이와 같이 3가지 oxygen species radical 포착활성 모델시스템으로 항산화활성을 측정된 결과 DFP 및 CFP는 FA 및 CA보다 대체적으로 높은 DPPH radical, superoxide anion 및 hydroxyl radical scavenging activity를 나타내었다. 향후 PCs의 항산화작용 기작에 관한 보다 상세한 연구가 필요하며, 기능성식품 및 기능성 미백화장품 소재로서의 활용 가치가 있을 것으로 생각된다.

Table 6. Radical scavenging activity (IC_{50}) of five HCAD isolated from corn bran against DPPH, superoxide and hydroxyl radicals induced by enzymatic and nonenzymatic reactions

Compound	Radical scavenging activity (IC_{50} , μM)		
	DPPH radical	Superoxide radical	Hydroxyl radical
CA	> 1,000	> 20,000	256.31±11.86 ^c
FA	45.27±5.55 ^c	5,312.30±260.02 ^a	502.11±21.11 ^a
CFP	70.37±0.52 ^a	488.04±20.01 ^b	192.45±13.99 ^d
DFP	38.46±2.30 ^c	291.62±4.76 ^c	351.87±13.38 ^b
DCP	> 500	> 10,000	164.84±5.83 ^e
α -Tocopherol	52.34±0.36 ^b	> 10,000	155.67±4.27 ^e

IC_{50} represents the concentration of a compound required for 50% inhibition of DPPH radical, superoxide and hydroxyl radicals.

Data represent mean±S.D. of triplicate determination.

Values with the different superscript letter in each column are significantly different at $p<0.05$.

α -Tocopherol was used as a positive reference.

바. 옥수수 품종별 5가지 HCAD 함량 비교

옥수수 품종별 HCAD 함량을 비교한 결과는 **Table 7**과 같다. 옥수수 품종 중 대체적으로 사료용 옥수수 품종의 세 가지 PCs 함량이 가장 높았으며, 그 다음으로 감미옥수수 및 찰옥수수 순으로 함량이 낮았으며, 두 가지 cinnamic acids (*p*-coumaric 및 ferulic acids) 함량은 몇

품종을 제외하고 거의 미량으로 존재하였다. 이와 같이 옥수수 품종별 HCAD 함량은 다소 차이가 있었다. 그리고 여러 옥수수 품종 중 대조군으로 사용된 미국 옥수수 품종인 “P3394”가 옥수수 중 가장 높은 PCs 함량을 나타내었으며, 그 다음으로 경북대학에서 새로 육종된 “silage” 품종이 높았고 특히 후자는 두 가지 cinnamic acids 함량이 가장 높았다. 한편, 감미옥수수 품종 중 “감미옥” 품종이 “감미찰” 품종보다 세 가지 PCs 함량이 높았으며, 찰옥수수 품종 중 “흑미백” 품종은 세 가지 PCs 함량이 낮은 반면, 두 가지 cinnamic acids 함량이 높게 나타났다. 따라서 국내에서 새로 육종된 옥수수 “silage” 품종을 고 HCAD 함유 기능성 옥수수 품종으로 개발 및 생산하여 농가에 보급할 필요가 있다고 생각된다.

Table 7. Levels of five HCAD of 12 different corn cultivars available in Korea

Cultivar	Cultivar	HCAD (µg/g, dry base)				
		CA	FA	CFP	DCP	DFP
Dent corn	P3394	0.98±0.02	1.96±0.05	43.27±0.84	37.01±0.54	151.26±2.45
	Silage	1.52±0.03	2.50±0.06	20.52±0.34	31.17±0.48	114.35±2.10
	CSO	0.98±0.02	1.91±0.06	35.02±0.54	16.07±0.16	109.50±1.72
	KPO	Tr	Tr	19.71±0.13	4.42±0.10	31.48±0.49
	CAO	Tr	Tr	7.40±0.10	4.67±0.11	12.60±0.22
	GDO	Tr	Tr	5.07±0.11	2.55±0.07	11.90±0.19
	JDO	Tr	Tr	6.87±0.20	4.47±0.10	12.49±0.17
Waxy corn	Daehaek	Tr	Tr	1.96±0.05	0.56±0.05	4.98±0.11
	Mibaek	Tr	Tr	0.50±0.02	0.21±0.04	0.51±0.02
	Black Mibaek	1.39±0.02	2.31±0.06	1.28±0.04	0.42±0.02	2.51±0.06
Sweet corn	Gammiok	Tr	Tr	18.17±0.14	7.01±0.10	85.31±0.83
	Gammichal	Tr	Tr	28.96±0.30	7.40±0.11	37.22±0.45

Values are mean±SD of triplicate determinations.

Statistical analysis is omitted for simplicity.

*Trace (< 1.0 µg/g)

사. 습식법(wet-milling) 및 건식법(dry-milling)에 의해 제조된 옥수수 전분 가공부산물의 5가지 HCAD 함량 비교

습식법(wet-milling) 및 건식법(dry-milling)에 의해 제조된 옥수수 전분가공부산물 중의 HCAD 함량을 측정하여 비교한 결과는 **Table 8**과 같다. 먼저 건식법 처리 시 가공부산물로 얻어지는 옥수수겨가 모든 가공부산물 중 가장 높은 HCAD 함량을 나타내었으며, 특히 세 가지 PCs 함량이 가장 높은 반면, 두 가지 cinnamic acids 함량은 습식법 처리 시 가공부산물로 얻어지는 옥피가 가장 높았다. 한편, 습식법 처리 시 얻어지는 옥배아 및 글루텐도 다소 많은 HCAD 함량을 나타내었으나 옥수수겨 및 옥피보다 HCAD 함량이 다소 낮았다. 따라서 옥수수 가공부산물 중 항산화 및 피부 항노화성 PCs 다량 함유한 옥수수겨를 기능성식품 및 화장품

신소재로 개발할 필요가 있다.

Table 8. Levels of five HCAD in several corn by-products obtained by two different milling processes, dry-milling and wet-milling

Milling	Co.	Corn product	HCAD ($\mu\text{g/g}$, dry base)				
			CA	FA	CFP	DCP	DFP
Wet-milling	SY	Hull	30.65 \pm 0.50	46.82 \pm 0.73	23.32 \pm 0.23	109.01 \pm 1.62	570.74 \pm 5.03
		Germ	17.35 \pm 0.22	30.87 \pm 0.39	23.99 \pm 0.19	64.46 \pm 0.73	257.14 \pm 2.01
		Gluten	17.79 \pm 0.18	35.28 \pm 0.30	35.54 \pm 0.29	42.45 \pm 0.45	243.94 \pm 1.94
	DS	Hull	33.95 \pm 0.63	49.16 \pm 0.45	26.70 \pm 0.20	114.72 \pm 1.82	563.36 \pm 3.94
		Germ	18.06 \pm 0.12	24.67 \pm 0.18	22.01 \pm 0.21	57.34 \pm 0.39	239.68 \pm 2.30
		Gluten	15.21 \pm 0.11	21.39 \pm 0.12	25.86 \pm 0.18	28.26 \pm 0.28	110.62 \pm 1.24
	SDB	Hull	38.92 \pm 0.48	98.74 \pm 1.03	19.92 \pm 0.17	65.38 \pm 0.59	389.54 \pm 1.37
		Germ	16.30 \pm 0.24	41.40 \pm 0.34	13.03 \pm 0.10	16.40 \pm 0.12	84.94 \pm 0.74
		Gluten	16.34 \pm 0.26	13.01 \pm 0.12	25.16 \pm 0.23	20.74 \pm 0.19	111.08 \pm 1.02
Dry-milling	KGS	Bran	18.48 \pm 0.18	25.54 \pm 0.20	63.56 \pm 0.72	368.54 \pm 2.73	1,614.82 \pm 7.93

Values are mean \pm SD of triplicate determinations.

Statistical analysis is omitted for simplicity.

아. 옥수수 가공처리에 따른 5가지 HCAD 함량 변화

옥수수 가공처리(볶음, 찜, 마이크로웨이브, 팽화 및 압출성형)에 따른 HCAD 함량 변화를 조사한 결과는 **Table 9**와 같다. 5가지 HCAD 중 세 가지 PCs 함량은 각 처리에 따라 증감 변화가 크게 나타났으나 두 가지 free cinnamic acid 함량은 모든 처리군에서 다소 증가하였으며, 특히 찜처리 시 대조군보다 약 2.78 및 5.26배로 가장 높은 증가를 보였다. 이와 같이 옥수수를 가열처리하면 옥수수의 세포막에 결합된 *p*-coumaric 및 ferulic acid 배당체가 가수분해하여 유리형으로 전환되어 증가하는 것을 알 수 있었다.

Table 9. Quantitative change of five HCAD in Daehak waxy corn prepared by five different heat pretreatments

Heat pretreatment	HCAD ($\mu\text{g/g}$, dry base)				
	CA	FA	CFP	DCP	DFP
Control	Tr	Tr	14.12 \pm 0.23	7.75 \pm 0.10	36.98 \pm 0.32
Roasting	2.07 \pm 0.03	4.27 \pm 0.10	10.44 \pm 0.18	13.95 \pm 0.21	85.52 \pm 1.02
Steaming	2.78 \pm 0.04	5.26 \pm 0.11	13.01 \pm 0.16	7.37 \pm 0.17	34.92 \pm 0.28
Microwave	2.28 \pm 0.10	5.05 \pm 0.13	12.52 \pm 0.10	10.65 \pm 0.20	81.52 \pm 0.92
Puffing	2.27 \pm 0.05	5.12 \pm 0.09	12.32 \pm 0.09	8.11 \pm 0.13	45.96 \pm 0.39
Extruding	0.85 \pm 0.02	1.65 \pm 0.05	10.17 \pm 0.08	6.62 \pm 0.16	30.48 \pm 0.27

Values are mean \pm SD of triplicate determinations.

Statistical analysis is omitted for simplicity.

Daehak waxy corn used this experiment was stored about three month at room temperature after harvested.

자. 추출방법에 따른 옥수수겨의 5가지 HCAD 함량 비교

옥수수겨로부터 항산화 및 피부 항노화성 HCAD 함유 고품질의 옥수수겨 정제분말 제조를 위해 먼저 옥수수겨 추출방법에 따라 HCAD 함량을 측정하여 비교한 결과는 **Table 10**과 같다. 초음파추출(대조군)에 의해 얻어지는 옥수수겨추출물의 총 HCAD 함량은 2,090.94 $\mu\text{g/g}$ 이었으나 고압추출 경우 대조군보다 낮은 821.8 $\mu\text{g/g}$ 이었으나 초고압추출 경우 2,470.32 $\mu\text{g/g}$ 로 대조군보다 약 1.2배 높았으며, 압출성형처리 후 초음파처리 경우 2,798.04 $\mu\text{g/g}$ 로 대조군보다 약 1.3배 높았으며, 특히 압출성형처리 후 초고압추출 시 2813.53 $\mu\text{g/g}$ 로 대조군보다 약 1.4배 높아 모든 추출방법에서 가장 높은 추출효과를 나타내었다. 이와 같이 압출성형처리 및 초고압추출은 옥수수겨에 존재하는 항암, 항고혈압, 항당뇨, 항산화 및 피부 항노화성 cinnamic acids 및 PCs의 추출수율을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 고품질의 옥수수추출물 제조를 가능케 한다.

Table 10. Comparison of yield and HCAD contents of corn bran according to extraction methods

Extraction method	CH ₂ Cl ₂ fr. (Yield, %)	Diaion HP-20 fr. (Yield, %)	HCAD (µg/g, dry base)					
			CA	FA	CFP	DCP	DFP	Total
Ultrasonicator	0.31±0.04	0.18±0.03	18.48 ±0.18	25.54 ±0.20	63.56 ±0.72	368.54 ±2.73	1,614.82 ±7.93	2,090.94 ±3.72
High pressure	0.28±0.03	0.15±0.01	15.60 ±0.10	24.22 ±0.17	55.40 ±0.43	382.87 ±2.84	1593.31 ±5.84	2,071.4 ±1.30
Ultrahigh pressure	0.38±0.04	0.20±0.01	19.81 ±0.12	26.69 ±0.20	112.22 ±1.20	403.04 ±2.63	1,908.56 ±8.38	2,470.32 ±2.87
Ultrasonicator after extrusion	0.51±0.05	0.25±0.02	37.36 ±0.28	35.19 ±0.32	88.35 ±0.73	469.89 ±2.83	2,167.25 ±3.02	2,798.04 ±1.23
Ultrahigh pressure after extrusion	0.53±0.05	0.25±0.03	37.07 ±0.37	35.18 ±0.37	57.99 ±0.48	472.76 ±3.01	2,210.53 ±3.84	2,813.53 ±1.27

Values are mean±SD of triplicate determinations.

Statistical analysis is omitted for simplicity.

차. 효소 및 산 또는 알칼리 처리에 의한 옥수수겨추출물의 5가지 HCAD의 함량 변화

옥수수겨를 이온수로 현탁시킨 후 5가지 당분해효소를 처리한 후 에탄올 추출, 용매분획 및 흡착수지로 순차적으로 정제하여 최종 얻어진 옥수수겨추출물의 HCAD 함량을 측정하여 비교한 결과는 **Table 11**과 같다. 비처리군인 대조군의 HCAD 함량을 보면 CA 18.48, FA 25.54, CFP 63.56, DCP 368.54 및 DFP 1,614.82 µg/g 이었으나 viscozyme L 처리 경우 두 가지 유리형 cinnamic acids (CA & FA) 함량은 크게 증가한 반면, 3가지 PCs (DCP, CFP, DFP) 함량은 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 한편, Pectinex 및 Celluclast 효소 처리 경우 viscozyme L 처리와 달리 두 가지 cinnamic acids 함량은 크게 증가한 반면, 3가지 PCs 함량은 크게 감소하였으며, 그리고 amylase 및 termamyl 효소 처리 경우 두 가지 cinnamic acids 함량은 미량으로 나타났고 3가지 PCs 함량은 다소 크게 감소하였다. 이와 같이 옥수수겨를 효소처리하면 옥수수겨에 다량 존재하는 arabinoxylan 다당류와 결합되어 있는 HCAD가 끊어져 CA 및 FA 함량이 증가되거나, 아니면 두 가지 cinnamic acids와 amide 형태로 결합된 3가지 PCs가 분해되어 감소한 것으로 추정할 수 있다. 이러한 당 분해효소처리에 의한 옥수수겨추출물의 제조는 옥수수겨에 다량 존재하는 다당류를 제거하거나 당류와 결합된 HCAD를 분리하는 데 큰 효과가 있을 것으로 추정되나 HCAD 함량을 증가시키는데는 효과가 거의 없었다.

Table 11. Comparison of five HCAD contents in corn bran extract prepared by five different enzymatic treatments

Enzymatic treatment	HCAD ($\mu\text{g/g}$, dry base)				
	CA	FA	CFP	DCP	DFP
Control	18.48 \pm 0.18	25.54 \pm 0.20	63.56 \pm 0.72	368.54 \pm 2.73	1,614.82 \pm 7.93
Viscozyme L	92.34 \pm 1.25	76.34 \pm 0.65	60.73 \pm 0.58	330.53 \pm 2.63	1,520.02 \pm 6.83
Pectinex	138.60 \pm 1.45	99.61 \pm 0.74	24.45 \pm 0.11	72.26 \pm 0.68	260.45 \pm 1.62
Celluclast	103.49 \pm 1.62	84.28 \pm 0.64	39.73 \pm 0.28	118.88 \pm 1.29	358.85 \pm 1.92
Amylase	Tr	Tr	72.34 \pm 0.54	160.27 \pm 1.62	538.96 \pm 2.01
Termamyl	Tr	Tr	127.12 \pm 1.35	262.98 \pm 1.64	949.89 \pm 3.82

Values are mean \pm SD of triplicate determinations.

Statistical analysis is omitted for simplicity.

Tr: Trace($< 1.0 \mu\text{g/g}$)

한편, 산과 알칼리 처리에 따른 옥수수겨추출물의 제조와 더불어 그에 함유된 5가지 HCAD 함량을 측정된 결과는 **Table 12**와 같다. 대조군의 HCAD 함량을 보면 CA 18.48, FA 25.54, CFP 63.56, DCP 368.54 및 DFP 1,614.82 $\mu\text{g/g}$ 이었으나 0.1 N HCl 처리 경우 두 가지 free cinnamic acid 함량은 약간 증가하였으나 3가지 PCs 함량을 다소 감소하였으며, 1.0 N HCl 처리 시는 두 가지 cinnamic acids 유리형은 다소 크게 증가하였으나 3가지 PCs 함량은 거의 나타나지 않았다. 반면, 0.1 N NaOH 처리 경우 두 가지 유리형 cinnamic acids는 약간 감소하였으나 3가지 PCs 함량을 다소 크게 감소하였으며, 1.0 N NaOH 처리 시는 두 가지 유리형 cinnamic acids는 약간 남아있는데 반해 3가지 PCs 함량은 거의 소실되었다. 이와 같이 산과 알칼리 처리에 따른 옥수수겨추출물의 HCAD 함량을 측정해 본 결과, 산 처리와 더불어 알칼리 처리 시는 유리형 cinnamic acids는 다소 증가하거나 감소하였으나 3가지 PCs 화합물은 전반적으로 감소하였으며, 특히 알칼리 처리 시는 더욱 크게 감소함을 알 수 있었다. 따라서 옥수수겨추출물의 제조 시, 산 및 알칼리처리 방법은 주된 생리활성 물질의 감소와 더불어 추출물의 색깔에 악영향을 유발함으로써 결코 바람직하지 않는 방법이라 생각된다.

Table 12. Table 12. Comparison of five HCAD contents in corn bran extract prepared by acid and alkali treatments

Acid & alkali treatment	HCAD ($\mu\text{g/g}$, dry base)				
	CA	FA	CFP	DCP	DFP
Control	18.48 \pm 0.18	25.54 \pm 0.20	63.56 \pm 0.72	368.54 \pm 2.73	1,614.82 \pm 7.93
0.1 N HCl	20.23 \pm 0.20	27.35 \pm 0.17	60.43 \pm 0.68	348.29 \pm 2.43	1490.54 \pm 6.34
1.0 N HCl	34.74 \pm 0.23	56.45 \pm 0.35	Tr*	Tr	Tr
0.1 N NaOH	15.87 \pm 0.12	20.76 \pm 0.13	25.76 \pm 0.14	129.76 \pm 1.32	764.56 \pm 3.52
1.0 N NaOH	5.43 \pm 0.08	7.49 \pm 0.08	Tr	Tr	Tr

Values are mean \pm SD of triplicate determinations.

Statistical analysis is omitted for simplicity.

*Trace(< 1.0 µg/g).

카. 옥수수겨로부터 3가지 PCs 함유 고품질의 옥수수겨추출물(corn bran extract, Corn BE) 제조

옥수수겨로부터 항산화 및 피부 항노화성 3가지 PCs 함유 고품질의 옥수수겨추출물(Corn BE)을 피부노화 예방용 기능성미백화장품 소재로 사용하기 위해 Fig. 3과 같이 옥수수겨를 80% 에탄올용액으로 초음파처리 후 얻어진 에탄올추출물을 탈지한 후 용매(CH₂Cl₂) 분획한 다음 Diaion 흡착수지에 흡착하고 난 다음 40% 에탄올용액을 통과하여 이물질을 제거한 후 80% 에탄올용액으로 흡착된 PCs를 용출하고 난 후 농축하여 최종 Corn BE를 제조하였다. 이때 제조된 Corn BE의 최종 수율은 0.32%이었으며, 3가지 PCs 함유량을 보면, DFP (25.2±1.2%), CFP (3.4±0.2%), 및 DCP (1.3±0.2%)이었다(Table 13).

Table 13. Yield and purity of partially purified corn bran extract prepared by ultrasonic extraction, followed by solvent fractionation and Diaion HP-20 column chromatography

Sample	Yield (%)	PCs (% of Corn BE)
Partially purified corn bran extract (Corn BE)	0.32±0.10	DFP (25.2±1.2%), CFP (3.4±0.2%), DCP (1.3±0.2%)

Values are mean±SD of triplicate determinations.

타. Corn BE의 물리·화학적 요인에 대한 안정성

(1) 열 안정성

최종 생산된 Corn BE의 열처리에 따른 5가지 HCAD의 함량의 변화를 조사한 결과는 Table 14와 같다. 먼저 비열처리구인 대조군의 HCAD 함량을 보면 CA 1.45%, FA 2.42%, CFP 1.08%, DCP 4.98% 및 DFP 24.87% 이었으며, 30~100°C 열처리한 경우 CA, FA, CFP, DCP 및 DFP 함량 모두 대조군과 유사하였으며 유의적인 차이는 없었다. 이와 같이 Corn BE의 열처리에 따라 5 가지 HCAD의 함량은 거의 변하지 않고 안정하였기에 향후 Corn BE를 이용한 고품질의 화장품 개발에 무리가 없을 것으로 생각된다.

Table 14. Stability of heat treatment of five HCAD in Corn BE

Temperature (°C)	HCAD (% , corn bran extract)				
	CA	FA	CFP	DCP	DFP
Untreated	1.45±0.02 ^{NS}	2.42±0.01 ^{NS}	1.08±0.04 ^{NS}	4.98±0.06 ^{NS}	24.87±0.06 ^{NS}
30	1.48±0.01	2.56±0.03	1.22±0.04	4.95±0.03	24.95±0.02
40	1.44±0.05	2.57±0.02	1.19±0.03	4.98±0.03	25.26±0.04
50	1.50±0.02	2.48±0.05	1.13±0.05	5.00±0.01	25.32±0.07
60	1.46±0.05	2.49±0.05	0.99±0.04	4.98±0.08	25.04±0.04
70	1.46±0.03	2.43±0.02	1.18±0.05	4.99±0.01	25.03±0.06
80	1.45±0.02	2.43±0.05	1.05±0.04	4.98±0.01	24.97±0.02
90	1.47±0.02	2.42±0.07	1.11±0.04	5.02±0.05	25.05±0.04
100	1.52±0.05	2.58±0.02	1.06±0.02	4.99±0.03	25.00±0.01

Data are mean±S.D. of triplicate determinations.

Not significant($p<0.05$)

(2) pH 안정성

앞서 제조한 Corn BE의 pH 변화에 따른 5가지 HCAD의 함량의 변화를 조사한 결과는 **Table 15**와 같다. 먼저 비처리군(pH 5.15)인 대조군의 HCAD 함량을 보면 CA 1.45%, FA 2.42%, CFP 1.08%, DCP 4.98% 및 DFP 24.87% 이었으며, 옥수수겨추출물의 pH를 2로 조정했을 경우 HCAD의 함량은 CA 1.03%, FA 1.80%, CFP 0.77%, DCP 3.51% 및 DFP 17.60%로 대조군에 비해 약 1.5배 낮은 함량을 나타내었으며, 그 외 pH 4, 6, 8, 및 10으로 조정했을 경우 HCAD 함량은 대조군과 유사하였다. 이와 같이 옥수수겨추출물의 pH를 조정할 경우 pH 2에서는 5가지 HCAD의 함량은 다소 감소하는 경향을 나타내었으므로 향후 옥수수겨추출물을 이용한 고품질의 화장품을 개발을 위해서는 pH를 고려하지 않을 수 없지만, 한편 화장품 베이스의 pH와는 큰 차이가 있기에 옥수수겨추출물을 이용한 화장품의 안정성에는 큰 영향을 주지 않을 것으로 생각된다.

Table 15. Stability of pH treatment of five HCAD in Corn BE

pH	HCAD(% , corn bran extract)				
	CA	FA	CFP	DCP	DFP
Untreated	1.45±0.02 ^a	2.42±0.01 ^a	1.08±0.04 ^a	4.98±0.06 ^a	24.87±0.06 ^a
2	1.03±0.06 ^b	1.80±0.01 ^b	0.77±0.01 ^b	3.51±0.02 ^b	17.60±0.02 ^b
4	1.44±0.10 ^a	2.40±0.06 ^a	1.11±0.02 ^a	4.79±0.07 ^a	23.70±0.01 ^a
6	1.50±0.04 ^a	2.48±0.10 ^a	1.09±0.02 ^a	5.00±0.06 ^a	24.74±0.02 ^a
8	1.46±0.04 ^a	2.49±0.05 ^a	1.03±0.03 ^a	4.98±0.12 ^a	24.68±0.08 ^a
10	1.45±0.01 ^a	2.40±0.04 ^a	1.06±0.03 ^a	4.99±0.08 ^a	23.02±0.05 ^a

Data are mean±S.D. of triplicate determinations.

Values with the different superscript letter in each column are significantly different at $p < 0.05$.

(3) 광 안정성

Corn BE의 광 처리에 따른 5가지 HCAD의 함량의 변화를 조사한 결과는 **Table 16**과 같다. 먼저 비처리군인 대조군의 HCAD 함량을 보면 CA 1.45%, FA 2.42%, CFP 1.08%, DCP 4.98% 및 DFP 24.87% 이었으나, 태양광을 10, 20, 30, 40, 50분 및 7시간까지 시간별로 조사함에 따라 두 가지 유리형 cinnamic acids 함량은 다소 감소하였으며, 3가지 PCs (DCP, CFP, DFP) 중 DFP 함량은 태양광 조사 10분 만에 크게 감소하였으며 시간 경과에 따라 약간 감소하는 경향이었고, DCP 함량은 20분까지 감소하다 30분 이후에는 검출되지 않았다. 그리고 이전에 확인되지 않았던 물질이 14분(RT) 부근에서 새로운 미지의 화합물 1(unknown compound 1, UC-1)이 검출되었으며, 이 peak의 면적은 태양광 조사 30분까지 크게 증가하다가 그 이후 큰 변화 없이 비슷한 면적을 유지하였다. 또한 CFP와 동일한 17분(RT) 부근에서 다른 흡수 spectrum을 나타낸 새로운 미지의 화합물 2(unknown compound 2, UC-2)가 확인되었는데, 그 함량은 20분까지 크게 증가하였다가 30분 이후 서서히 감소하여 1시간 이후 비슷한 함량을 나타내었다. 한편, UV_{254 nm}(UV-C)를 조사한 경우 CA, FA, DCP 및 DFP의 함량은 약간 감소한 반면, UC-2의 함량은 다소 증가하였다. 마지막으로 UV_{365 nm}(UV-A)를 조사한 경우 1시간 처리 시 CA, FA, DCP 및 DFP의 함량이 크게 감소한 반면, UC-1 및 UC-2의 함량은 증가하였는데, 2시간 처리 시와도 비슷한 함량을 나타내었으며, 이는 태양광 처리 시와 유사한 경향이였다. 이와 같이 Corn BE에 태양광 및 UV_{365nm} (UV-A)를 1시간 이상 조사하면 Corn BE의 주된 PC인 DFP의 함량은 크게 감소한 반면, 이전에 확인되지 않았던 UC-1의 면적은 광 조사 1시간까지 증가하다가 그 이후 유지되었으며, UC-2의 함량은 광 조사 20분까지 크게 증가하다가 그 이후 서서히 감소하였다. 이러한 UC-1 및 UC-2의 생성은 Corn BE에 존재하는 *trans*형의 DFP가 광 조사에 의해 *cis*형으로 전환된 것으로 추정할 수 있는 데 이에 대한 상세한 변화 기작은 향후 좀 더 조사할 필요가 있다고 생각된다.

Table 16. Stability of light treatment of five HCAD in Corn BE

Light treatment		HCAD (% , corn bran extract)					
		CA	FA	UC-1 ¹⁾	CFP +UC-2 ²⁾	DCP	DFP
Untreated		1.45±0.02 ^a	2.42±0.01 ^a	0±0	1.08±0.04 ^f	4.98±0.06 ^a	24.87±0.06 ^a
Light	10 min	1.27±0.02 ^b	1.89±0.05 ^b	80438±52 ^d	8.29±0.07 ^a	2.91±0.02 ^b	9.60±0.04 ^c
	20 min	1.15±0.01 ^c	1.83±0.05 ^b	173133±896 ^c	9.90±0.05 ^a	2.69±0.02 ^b	5.59±0.05 ^d
	30 min	0.96±0.05 ^c	1.86±0.03 ^b	311333±975 ^b	7.43±0.06 ^b	ND	1.90±0.07 ^e
	40 min	0.94±0.02 ^c	1.88±0.08 ^b	320989±686 ^b	7.26±0.04 ^b	ND	1.75±0.03 ^e
	50 min	0.95±0.05 ^c	1.88±0.02 ^b	318809±377 ^b	7.25±0.05 ^b	ND	1.87±0.07 ^e
	1 h	0.81±0.06 ^d	1.94±0.01 ^b	341771±691 ^a	6.10±0.05 ^c	ND	1.51±0.04 ^e
	2 h	0.80±0.08 ^d	1.94±0.06 ^b	337044±853 ^a	6.45±0.01 ^c	ND	1.51±0.05 ^e
	3 h	0.80±0.02 ^d	1.94±0.01 ^b	322795±89 ^b	6.27±0.02 ^c	ND	1.40±0.01 ^e
	4 h	0.80±0.01 ^d	1.94±0.03 ^b	320396±278 ^b	6.20±0.01 ^c	ND	1.48±0.02 ^e
	5 h	0.79±0.01 ^d	1.93±0.02 ^b	316514±556 ^b	6.08±0.06 ^c	ND	1.43±0.03 ^e
6 h	0.79±0.03 ^d	1.93±0.06 ^b	309769±733 ^b	5.95±0.06 ^c	ND	1.42±0.01 ^e	
7 h	0.78±0.05 ^d	1.90±0.01 ^b	292423±670 ^b	5.64±0.05 ^c	ND	1.38±0.04 ^e	
UV 254nm	1 h	1.40±0.07 ^a	2.35±0.02 ^a	0	2.86±0.01 ^e	4.64±0.02 ^a	22.25±0.02 ^a
	2 h	1.37±0.03 ^a	2.25±0.04 ^a	0	3.89±0.03 ^d	4.28±0.02 ^a	19.77±0.05 ^b
UV 365nm	1 h	0.88±0.02 ^d	1.93±0.07 ^b	344308±258 ^a	6.82±0.02 ^b	ND	1.64±0.07 ^e
	2 h	0.83±0.04 ^d	1.94±0.03 ^b	349785±442 ^a	6.24±0.05 ^c	ND	1.55±0.01 ^e

Data are mean±S.D. of triplicate determinations.

Values with the different superscript letter in each column are significantly different at $p < 0.05$.

¹⁾Unknown compound-1, presented as area of HPLC peak.

²⁾*N-p-coumaroyl-N'-feruloylputrescine* + Unknown compound-2

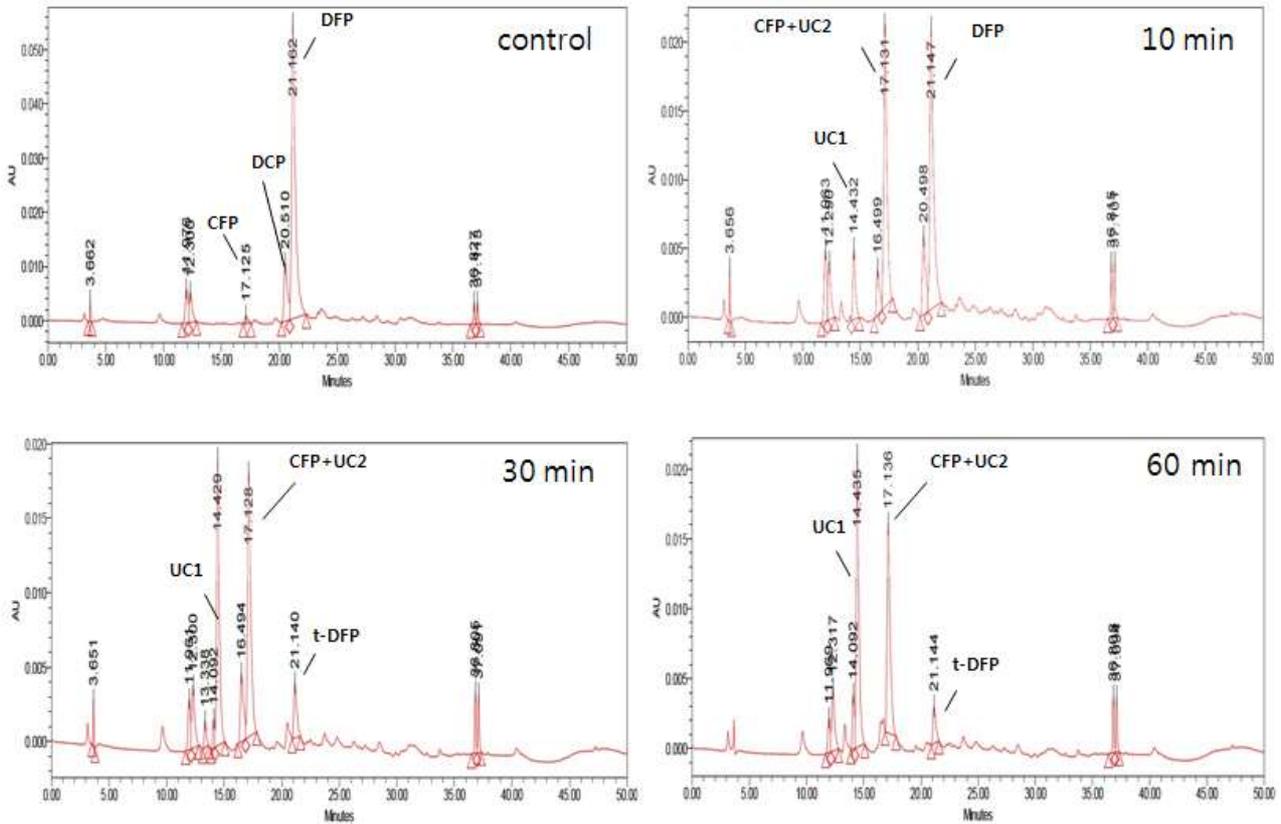


Fig. 13. Changes of HPLC chromatograms of five different HCAD of Corn BE by solar irradiation.

과. Corn BE의 광 처리에 따른 항산화활성 변화

Corn BE의 광 처리 시간에 따른 DPPH 라디칼소거활성 변화를 측정한 결과는 Table 17과 같다. 먼저 비처리군인 대조군의 5 및 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 DPPH 라디칼 소거활성을 보면 각각 8.61% 및 44.62% 이었으며, 태양광, UV_{254nm} (UV-C) 및 UV_{365nm} (UV-A)를 조사한 경우 항산화활성에는 유의적인 차이가 없었다. 앞서 측정한 광 처리 시간에 따른 Corn BE의 HCAD 함량에는 큰 변화가 있었음에도 불구하고 DCP 및 DFP의 감소와 UC1 및 UC2의 생성이 옥수수겨추출물의 항산화활성에는 거의 영향을 주지 않고 유지되므로 옥수수겨추출물을 이용한 화장품의 기능성 및 생리활성에 큰 영향을 주지 않을 것으로 생각된다.

Table 17. Changes of DPPH radical scavenging activity of corn bran extract by sunlight treatment

Light treatment		DPPH radical scavenging activity (%)	
		5 µg/mL	25 µg/mL
Untreated		8.64±0.98 ^{NS}	44.62±2.02 ^{NS}
Light	10 min	10.25±1.05	45.26±3.45
	20 min	9.96±0.92	45.83±3.02
	30 min	10.50±1.12	44.43±3.71
	40 min	9.85±0.88	46.16±2.62
	50 min	10.55±1.21	44.23±3.01
	1 h	10.49±2.00	44.20±2.87
	2 h	9.78±0.12	43.04±3.10
	3 h	9.68±0.75	42.96±2.04
	4 h	9.67±1.89	41.01±2.99
	5 h	9.34±1.02	41.33±3.85
UV _{254nm}	1 h	10.54±0.97	42.39±1.96
	2 h	9.50±1.28	45.97±0.07
UV _{365nm}	1 h	9.64±0.90	40.68±3.52
	2 h	9.58±1.08	44.44±1.73

Data are mean±S.D. of triplicate determinations.

Values with the different superscript letter in each column are significantly different at $p < 0.05$.

하. Corn BE의 순도, 함량 및 물리·화학적 특성에 관한 spec 작성

피부노화 예방용 미백화장품의 원료로 사용하기 위해 제조된 고품질의 Corn BE의 순도, 함량 및 물리·화학적 특성에 관한 spec을 작성한 결과는 **Table 18**과 같다. 먼저 Corn BE의 성상은 연한 노란색 분말로 약간의 특이취가 있으며, 수분함량 6.71±0.40%, 최대흡수파장 317.3±0.5 nm, pH 5.15±0.07이었다. 한편, 순도 시험으로 납(Pb) 및 비소(As)의 함량은 각각 10 ppm 및 2 ppm 이하이었고, 미생물 한도로서 총 균수는 50±5.54 CFU (colony forming unit)/g 이었으며, DFP의 함량은 26.2±1.2% 이었다. 이와 같이 사임당화장품에서 정한 Corn BE의 순도, 함량 및 물리·화학적 특성에 관한 spec에 적합한 Corn BE를 제조할 수 있었으며, 이러한 시험을 통하여 피부노화 예방용 Corn BE의 표준화 및 규격화를 이룰 수 있으며, 향후 사임당 화장품에서 Corn BE를 이용한 기능성 미백화장품을 생산하여 시판하고자 한다.

Table 18. Certificate of physiochemical analysis of Corn BE

Test	Specification	Result
Properties	Light yellow powder with peculiar odor	Light yellow powder with peculiar odor
Moisture(%)	4.0~8.0	6.71±0.40
Identification tests		
UV _{λmax} (nm)	316.0±3.0	317.3±0.5
pH (0.1% in 50% EtOH)	3.5~5.5	5.15±0.07
Purity test		
Lead(Pb)	≤ 10 ppm	15.0±0.5 ppb
Arsenic(As)	≤ 2 ppm	5.0±0.0 ppb
Microbe limit (CFU/g)	≤ 100	50±5.54
DFP content(%)	≥ 25	26.2±1.2

Data are mean±S.D. of triplicate determinations.

Standard deviations are omitted for simplicity.

제 3 절. 유효성평가, 나노소재 개발과 적용 미백화장품 개발

1. 연구내용 범위

- 소재의 미백활성 평가(기존 미백제와 비교)
- 소재의 미백활성 기전 연구
- 소재에 대한 멜라닌생성 세포의 세포독성 평가
- 소재의 자외선차단 평가(기존 자외선차단제와 비교)
- 피부에 효과적인 전달을 위한 나노캡슐(나노입자) 소재 개발 및 물성 평가
- 안정성 및 역가 안정성 평가
- 표준화, 기준 및 시험방법 확립
- ICID (국제화장품원료집) 등재
- 미백화장품 제형 점검 및 제품에 대한 안정성 및 역가 안정성 평가
- 자외선차단 화장품 제형 점검 및 제품에 대한 안정성 및 역가 안정성 평가
- 미백화장품 및 자외선차단 화장품에 대한 사용성 임상평가
- 미백화장품에 대한 KFDA (한국식품의약품안전청) 미백화장품 인증
- 차별화된 유일의 기능성 비교시 미백 소재를 활용하여 미백화장품 3종 개발을 위한 처방 및 생산공정 확립
- 시작품 개발 및 제조

2. 옥수수겨추출물의 자외선차단, 항산화활성 및 미백활성 평가

가. 평가 방법

(1) 자외선차단 평가(기존 자외선차단제와 비교)

UV-visible Spectrophotometer를 이용하여 UV 영역(280~400 nm)에서의 흡광도를 기존 자외선차단제와 비교하였다.

(2) 항산화활성 평가

(가) DPPH radical scavenging activity 측정 : 안정한 라디칼인 DPPH 라디칼을 저해하는 정도로 항산화활성을 평가하였다.

시험방법 : Tagashira 및 Ohtake의 방법에 따라 실시, IC₅₀은 DPPH 라디칼을 50% 저해하는 시료의 농도

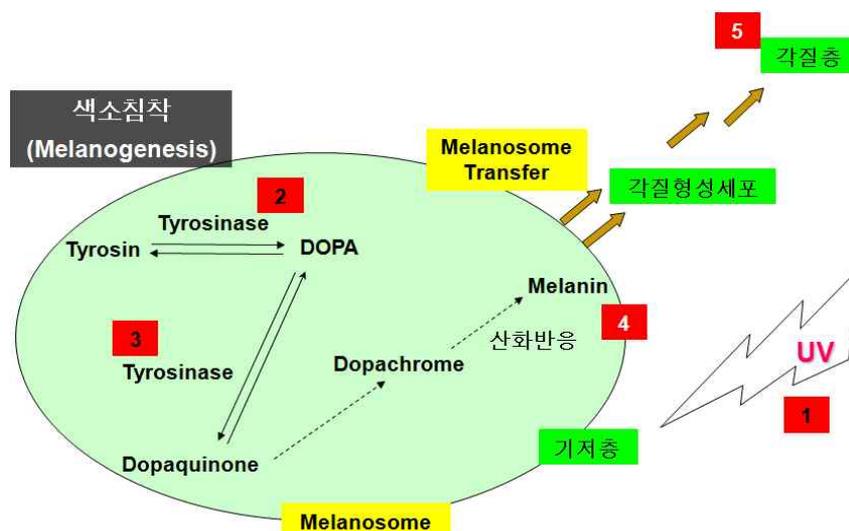
(나) Superoxide radical scavenging activity 측정 : xanthine/xanthine oxidase 효소반응에 의해 생성된 superoxide anion으로 인한 니트로블루테트라졸리움(nitroblue tetrazolium, NBT)의 산화를 저해하는 정도로 항산화활성을 평가하였다.

시험방법 : xanthine/xanthine oxidase 효소반응에 의한 superoxide anion 발생계를 이용한 Noro 등의 방법을 약간 변형하여 xanthine/xanthine oxidase 효소반응에 의해 생성된 superoxide anion으로 인한 NBT의 산화에 의한 흡광도의 변화를 측정, IC₅₀ 은 NBT 산화를 50% 저해하는 시료의 농도

(3) 미백활성 평가

(가) KFDA, 기능성화장품의 유효성 평가를 위한 가이드라인 참조

(나) 멜라닌생성 모식도



(다) 평가방법

① *In vitro* tyrosinase inhibition assay : 모식도 [2]에서와 같이 효소 티로시나제에 의해 티로신이 도파로 산화되므로 티로시나제 효소의 활성을 저해(티로신의 산화를 저해)하는

정도로 미백활성을 평가하였다.

- ② *In vitro* DOPA oxidation inhibition assay : 모식도 [3]에서와 같이 효소 티로시나제에 의해 도파가 도파퀴논으로 산화되므로 티로시나제 효소의 활성을 저해(도파의 산화를 저해)하는 정도로 미백활성을 평가하였다.
- ③ Melanogenesis inhibition assay : 모식도에서와 같이 멜라노사이트의 멜라노솨에서 생성되는 멜라닌을 저해하는 정도로 미백활성을 평가하였다.

시험방법 : 멜라닌 세포를 10% 소혈청(fetal bovine serum, FBS)과 1% 항생제를 첨가한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 1×10^5 세포의 밀도로 접종하고 하루 동안 5% CO₂, 37°C에서 배양. 멜라닌 세포를 세포 배양용 6 well microplate를 사용하여 각 well 당 1×10^5 개씩 분주하고, 여러 농도로 시료가 처리된 10% FBS/DMEM으로 교체하여 배지를 2~3일 동안 배양. 멜라닌 함량을 측정할 세트는 세포를 trypsin-EDTA로 떼어낸 후 3,000 rpm, 10분간 원심분리하여 세포를 회수. 세포 pellet을 PBS로 세척하고 1N NaOH (10% DMSO)를 첨가하여 멜라닌이 추출되도록 50~60°C에 방치. 추출된 멜라닌을 용해한 후 마이크로플레이트 리더기로 490 nm에서 멜라닌의 흡광도를 측정. 멜라닌 함량은 세포당 멜라닌의 흡광도로 표현

(4) 멜라닌 생성 세포의 세포독성 평가(MTT assay)

MTT assay는 세포의 성장을 알아보는 방법으로 yellow tetrazolium salt MTT는 살아있는 세포에서 물에 녹지 않는 formazan crystal로 환원시키고, 이 크리스털은 나중에 DMSO로 녹여서 생성된 크리스털의 양을 분광학적인 방법으로 측정하였다. 살아있는 세포의 수가 많을 수록 이 크리스털의 생성도 많아지므로 이러한 방법을 통해 세포의 성장을 측정하였다.

시험방법 : 세포를 96 well에 적당한 양으로 분주. 미리 적절한 흡광도(0.2~0.8)가 나오도록 세포주에 맞게 세포량과 처리기간을 결정. 시료를 PBS에 녹인 후 농도별로 20 µL씩 각 well에 첨가하여 48시간 배양. 시료를 제거하고, 각 well에 MTT solution을 100 µL씩 첨가. 4시간 동안 배양시킨 후 MTT 희석액을 조심스럽게 제거. 각 well에 100 µL의 DMSO를 첨가하여 15~20분간 shaking. ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도 측정(흡광도는 MTT가 세포의 의해 환원된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 생존 세포수와 비례), (Blank는 세포가 들어있는 well에 MTT 대신 PBS 20 µL을 넣은 것으로 함)

(4) 미백활성 기전 연구

(가) KFDA, 신호전달 기전을 이용한 미백원료의 효력평가 방법에 대한 가이드라인(안)

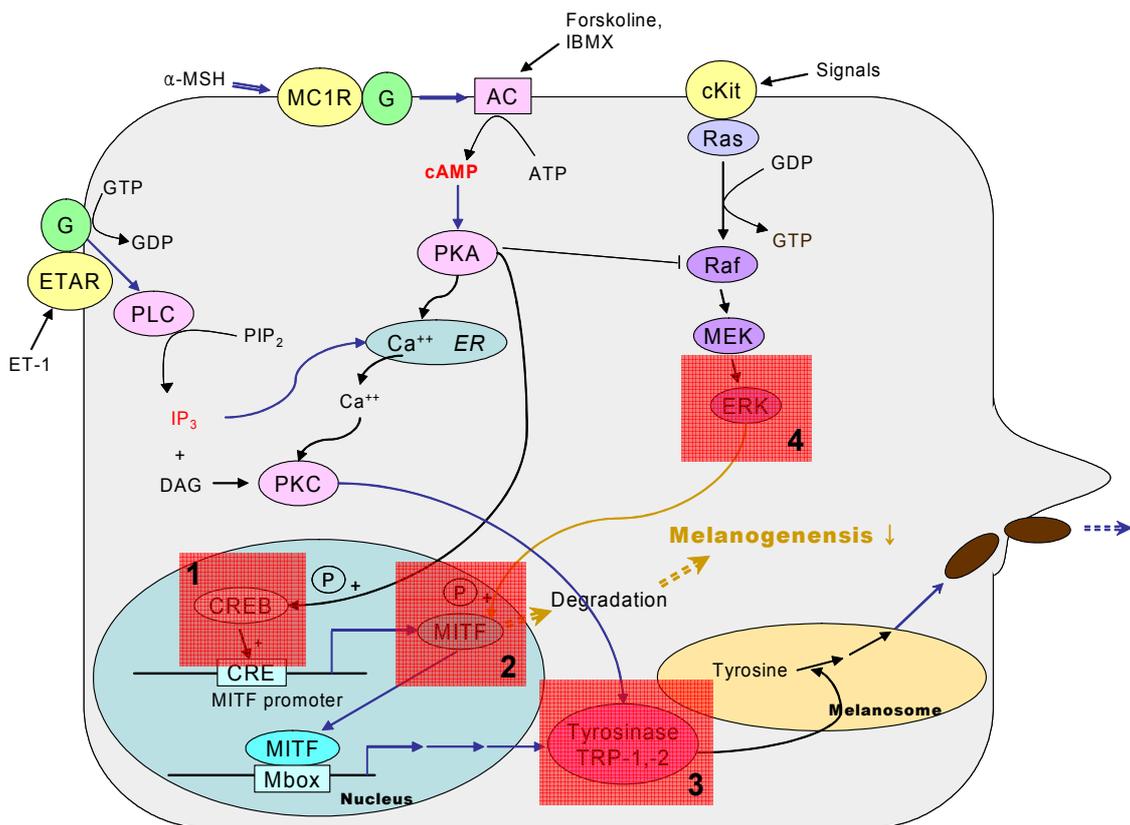
- ① MITF expression inhibition assay : 모식도에서와 MITF (microphthalmia-associated transcription factor)는 인체의 멜라닌 형성 과정에서 핵심적인 역할을 하는 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 속도결정단계에 관여하는 효소인 티로시나제의 발현을 조절. MITF의 발현이 억제되면 전사단계에서 티로시나제의 생성이 억제되므로 미백작용을 가져온다. 따라서 MITF 전사인자의 발현을 저해하는 정도로 미백활성을 평가하였다.
- ② TRP-1, TRP-2 expression inhibition assay : 모식도에서와 MITF에 의해 TRP-1,2 (tyrosinase related protein-1,2)가 발현되므로 TRP-1, TRP-2의 발현을 저해하는 정도

로 미백활성을 평가하였다.

- ③ p-ERK expression assay : ERK (extracellular signal-regulated kinase)의 인산화는 MITF를 인산화시킴으로써 MITF를 분해시켜 멜라닌합성을 억제하므로, p-ERK의 발현 정도로 미백활성을 평가하였다.
- ④ p-CREB expression inhibition assay : CREB (c-AMP responding element binding protein)의 인산화는 전사인자인 MITF의 발현을 증가시켜 티로시나제의 발현을 조절하여 멜라닌 생성을 촉진하므로, p-CREB의 발현을 억제하는 정도로 미백활성을 평가하였다.

시험방법 : 멜라닌생성 세포를 FBS가 함유된 DMEM 배지로 60 mm dish 에 dish 1×10^6 개로 접종한 후 5% CO₂, 37°C 하에서 세포가 dish 바닥에 약 80% 이상 부착될 때까지 배양. 배양 후 배지를 FBS가 포함되지 않은 배지로 교체하여 24시간 배양한 후, 배지를 제거하고 1 μM의 α-MSH와 시료가 적당 농도로 희석된 FBS가 포함되지 않은 배지로 교체한 후 5% CO₂, 37°C 하에서 48시간 배양. 배지를 제거한 세포를 PBS로 두 번 세척하고, 배양된 세포를 세포용해용 완충액에 녹인 후, 단백질을 정량하여 한 샘플 당 10 μg의 단백질을 SDS-PAGE를 이용하여 전기영동. 전기영동된 단백질을 PVDF 용지에 흡착시킨 후, MITF (TRP-1,2, p-ERK, p-CREB도 유사한 방법으로)에 특이적으로 반응하는 항체를 1차 항체로 사용하여 western blot analysis를 실시하여 미백효과를 평가. TRP-1,2, p-ERK, p-CREB도 유사한 방법으로 발현정도를 판단

(가) 신호전달에 의한 멜라닌생성 모식도



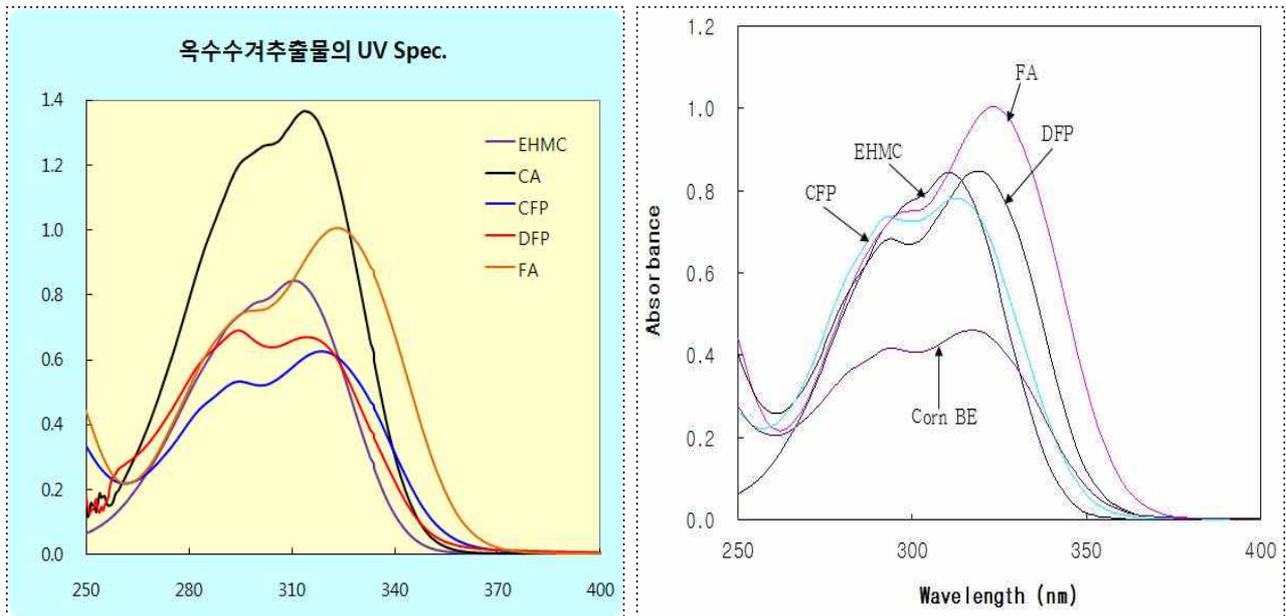
나. 옥수수겨추출물 제조

(1) Fig. 1의 ‘옥수수겨추출물 제조 및 HCAD 분리방법’을 기준으로 제조된 다양한 HCAD가 함유된 옥수수겨추출물

시료	라벨명	농도	녹인 용매	화합물 및 순도	시료명
1차	DFP			93%	DFP001-0K702
	CFP			92%	CFP001-0K702
	FA			Sigma	FA001--0K702
	CA			Sigma	CA001-0K702
	옥수수 CH ₂ Cl ₂ 분획			분말	MC001-0K702
2차	옥수수 EtOAc 분획 (1.5g)			분말	EA-002-0K709
	옥수수 CH ₂ Cl ₂ 분획 (1.5g)			분말	MC002-0K709
3차	# 1 옥수수 fr. ① → Sephadex 80% MeOH fr. ①	0.01g / 4ml	100% EtOH	17% CFP	#1003-0L703
	# 2 옥수수 fr. ① → Sephadex 80% MeOH fr. ①	0.02g / 5 ml	100% EtOH	65% DFP	#2003-0L703
	# 4 옥수수 Sephadex (80% EtOH) fr. B (30-35)	0.01g / 5ml	100% EtOH	70% UC	#4003-0L703
	# 7 옥수수 fr. ⑨ → Sephadex 80% MeOH fr. ②	0.02g / 4ml	100% EtOH	76% UC	#7003-0L703
	# 9 옥수수 CH ₂ Cl ₂ fr. → SiO ₂ fr. ④ → ODS-A 60% MeOH fr. ①	0.24g / 7ml	100% EtOH	70% UC	#9003-0L703
	# 10 옥수수 CH ₂ Cl ₂ fr. → SiO ₂ fr. ⑧ → ODS-A 60% MeOH fr. ②	0.04g / 2ml	100% EtOH	85% DF	#10003-0L703
	# 11 옥수수 fr. A-④	0.08g / 5ml	100% EtOH	55% TF	#11003-0L703

DF : Diferulate, TF : Triferulate

다. 옥수수겨추출물의 자외선차단 평가

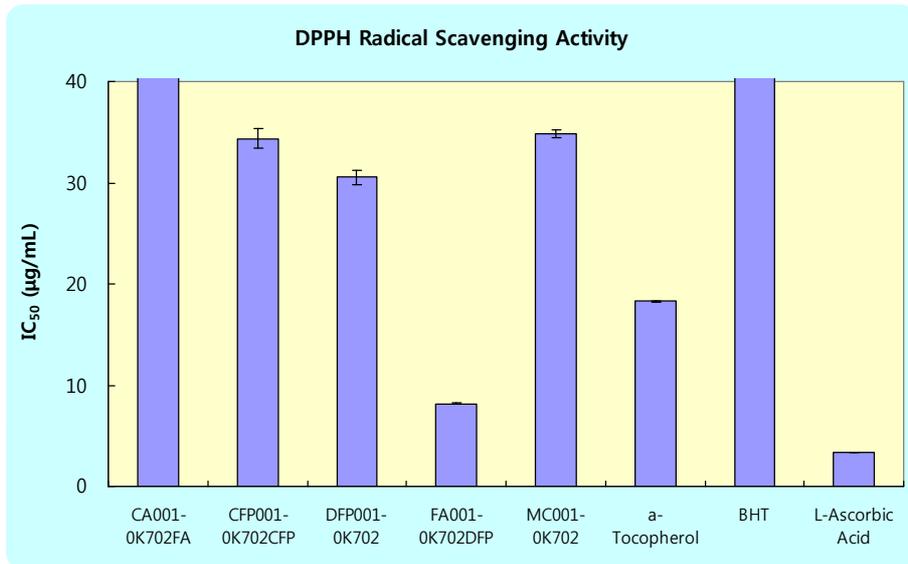


농도 : $1.0 \times 10^{-3}\%$ in DMSO, 측정과장 400~250 nm

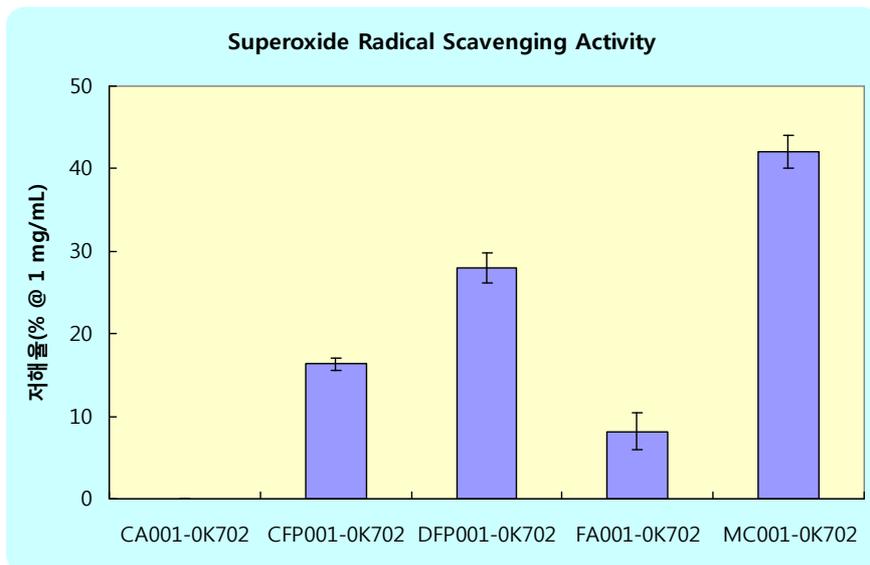
EHMC : ethylhexyl methoxycinnamate

옥수수겨추출물인 CFP, DFP, CH₂Cl₂ 분획물 및 EtOAc 분획물 모두 두 군데에서 최대흡수 파장을 보였다. 같은 농도에서 A(max)의 순서는 CA > FA > EHMC > DFP > CFP > CH₂Cl₂ 분획물 > EtOAc 분획물이며, 기존 합성 자외선차단제인 EHMC와 가장 유사한 정도를 보이는 옥수수겨추출물은 DFP로 추정되었다.

라. 옥수수겨추출물의 항산화활성 평가

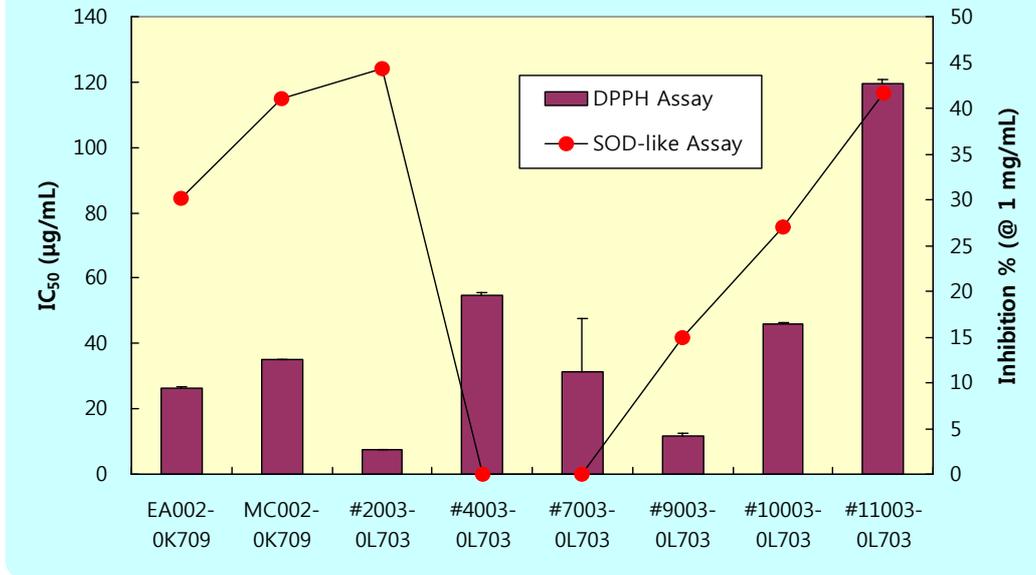


항산화활성 평가로서 DPPH radical scavenging activity는 FA > a-Tocopherol > DFP의 순으로 양호하였으며, HCAD 중에서 CA의 효과가 가장 낮았음. 또한 HCAD 대부분 합성 산화방지제인 BHT보다 양호하였다.



항산화활성 평가로서 superoxide radical scavenging activity는 CH₂Cl₂ 분획물 > DFP의 순으로 양호하였으며, CA는 효과가 나타나지 않았다.

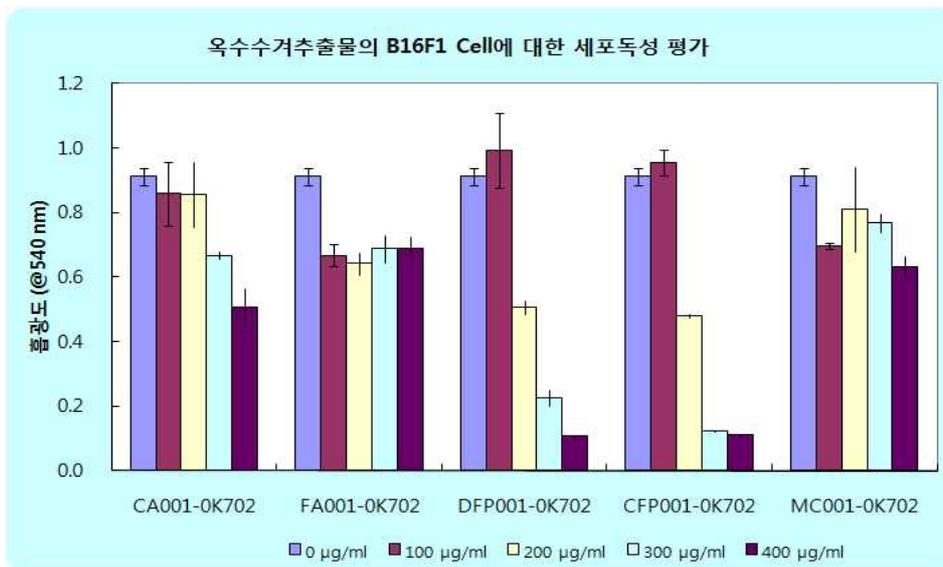
옥수수겨추출물의 항산화효과



DPPH assay에서 IC₅₀을 평가하였다. 대부분의 시료는 강한 항산화활성을 가지고 있었다.

SOD-like assay에서는 1 mg/mL 농도에서 저해율을 평가한 바, CH₂Cl₂ 분획물(# EA002-0K709)과 EtOAc 분획물(# MC002-0K709) 및 Sephadex Column으로 **DFP의 함량을 65%까지 증가시킨 # 2003-0L703** 시료가 **양호한 항산화활성을 보였다.**

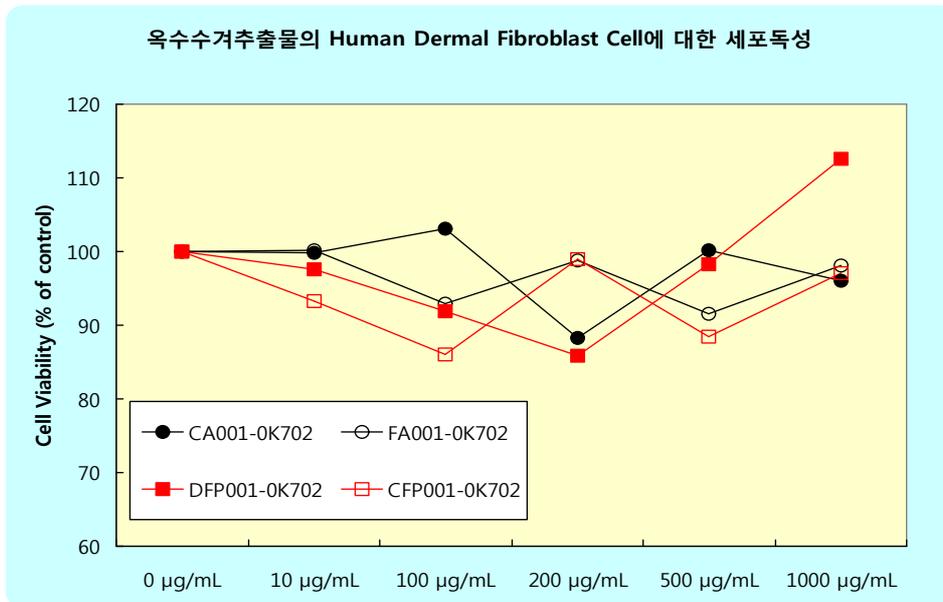
마. 옥수수겨추출물의 멜라닌생성세포(B16F1 Cell)에 대한 세포독성 평가



모든 시료에 대해 500 µg/mL의 농도에서 독성을 보였다(100 µg/mL의 농도 or 500 µg/mL 이하 농도에서 독성이 없는 것으로 평가되었다).

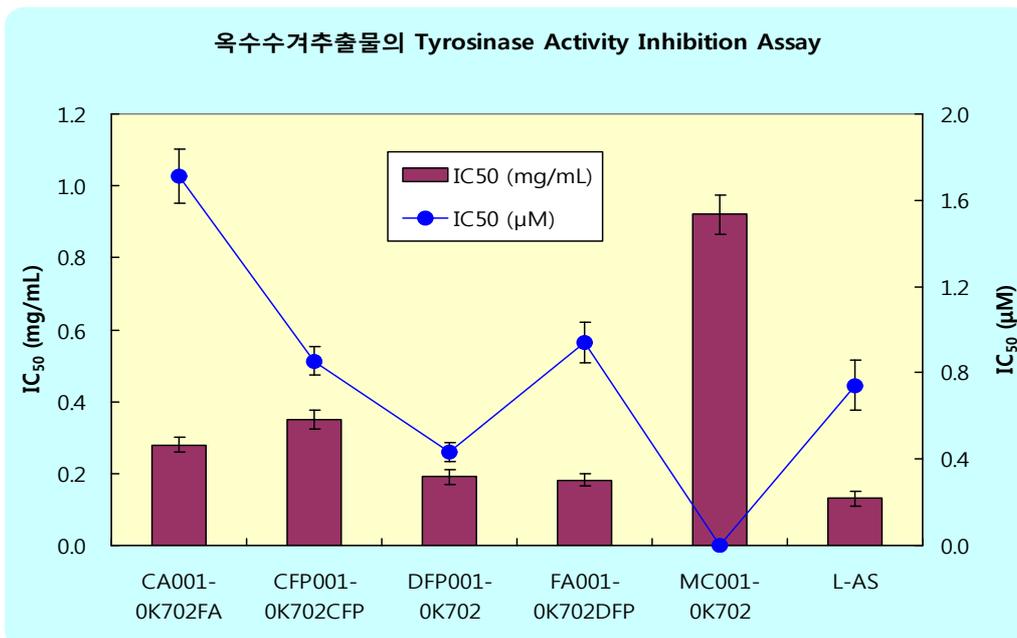
CA 400 µg/mL, FA 500 µg/mL, DFP 200 µg/mL, CFP 200 µg/mL 및 CH₂Cl₂ 분획물은 500 µg/mL 농도 이상에서 독성을 보였다.

바. 옥수수겨추출물의 사람섬유아세포(Human Dermal Fibroblast Cell)에 대한 세포독성 평가



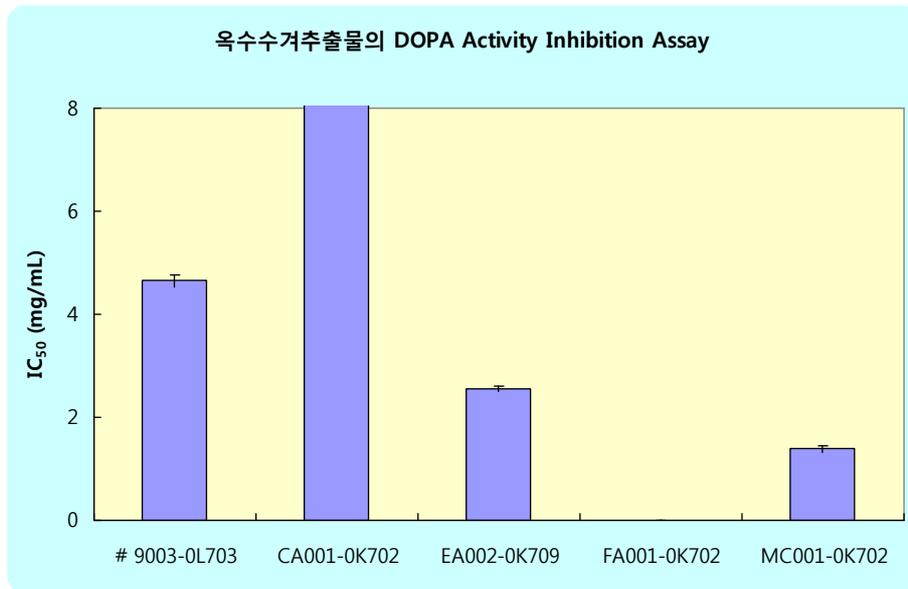
섬유아세포에 대해서는 1000 µg/mL 농도까지 4가지 시료에 대해 세포생존율은 90% 이상으로 양호하였다.

사. 옥수수겨추출물의 미백효과(*in vitro* tyrosinase inhibition assay) 평가

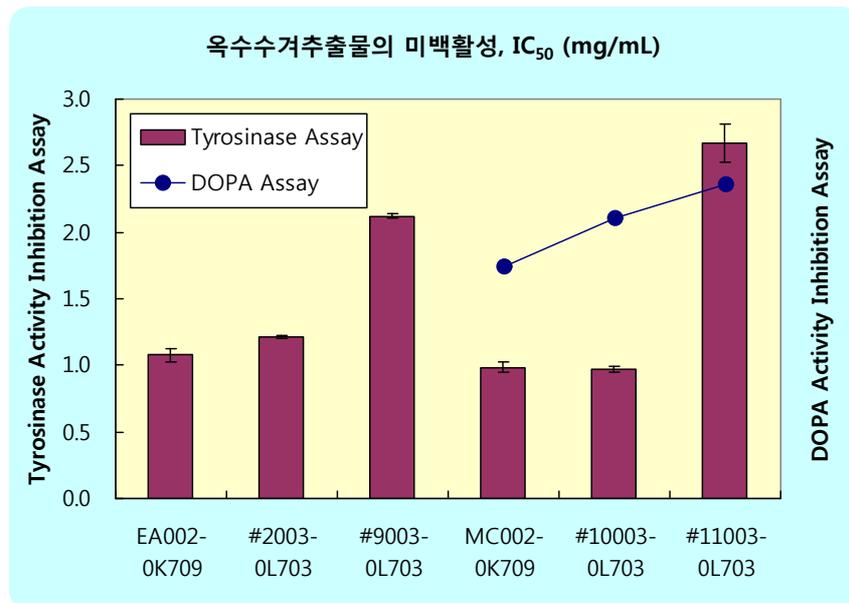


CH₂Cl₂ 분획물(MC001-0K702) 외에 전반적으로 ascorbic acid (L-AS)에 버금가는 미백효과를 보이며, 몰농도 측면에서는 CH₂Cl₂ 분획물(MC001-0K702)과 DFP는 L-AS보다 미백활성이 양호하였다.

아. 옥수수겨추출물의 미백효과(*in vitro* DOPA oxidation inhibition assay) 평가



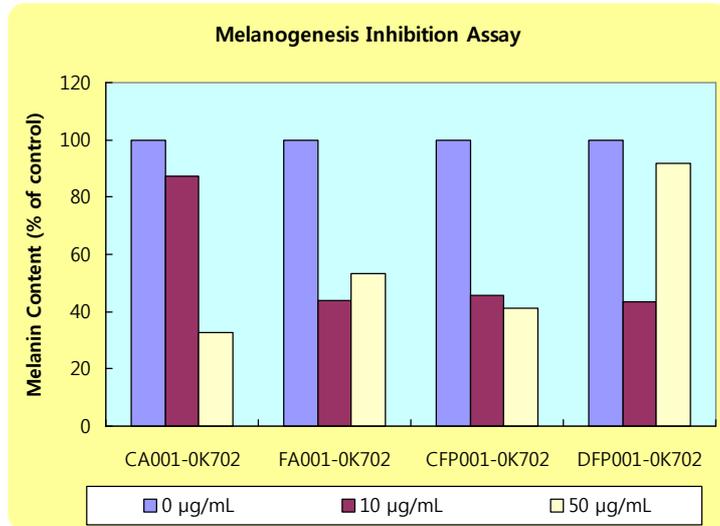
CH₂Cl₂ 분획물과 EtOAc 분획물의 미백활성은 비교적 양호하였으나, CA의 저해율은 IC₅₀ = 10.791 ± 0.751% (@ 10 mg/mL)로 미백활성이 낮았으며 FA는 효과를 보이지 않았다.



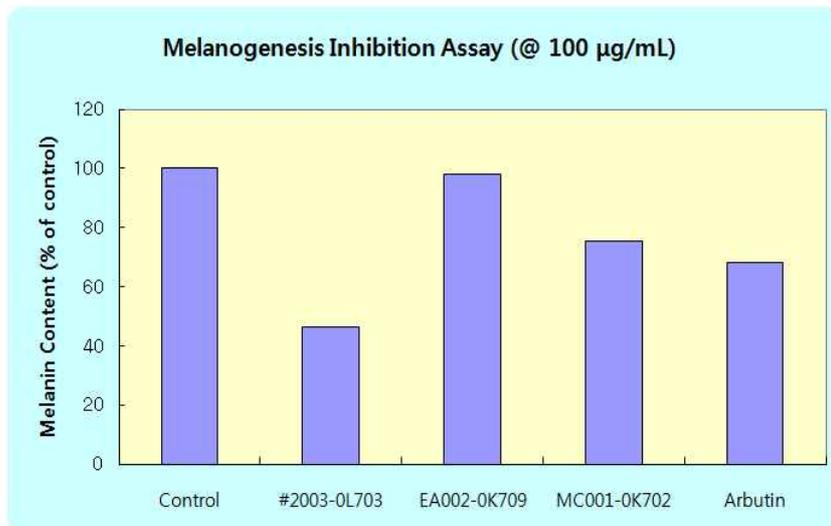
2차, 3차 옥수수겨추출물의 미백활성은 *in vitro* tyrosinase inhibition assay에서 CH₂Cl₂ 분획물(# MC002-0K709)이 양호한 편으로 IC₅₀ = 1.0 mg/mL 수준이며, *in vitro* DOPA inhibition assay에서도 역시 CH₂Cl₂ 분획물(# MC002-0K709)이 양호한 편으로 IC₅₀ = 1.7 mg/mL로 평가되었다

EtOAc 분획물 및 DFP의 함량을 65%까지 증가시킨 # 2003-0L703 시료도 *in vitro* tyrosinase inhibition assay에서 IC₅₀ = 1.0 mg/mL 수준이었다.

자. 옥수수겨추출물의 미백효과(melanogenesis inhibition assay) 평가



CFP의 경우 거의 농도의존적으로 멜라닌 함량이 감소하나, DFP의 경우 10 µg/mL의 농도에서 멜라닌 함량이 43% 수준까지 감소하나, 50 µg/mL의 농도에서는 오히려 멜라닌 함량이 증가하는 경향을 보였다.



시료 100 µg/mL의 농도에서 멜라닌 함량 평가는 CH₂Cl₂ 분획물의 경우 알부틴 동등 정도이며, Sephadex Column으로 DFP의 함량을 65%까지 증가시킨 p# 2003-0L703 시료는 알부틴 보다 양호하였다.

차. 옥수수겨추출물(MC003-0D821)의 선정

(1) 시험결과 및 시료의 선정

(가) 시료 중에서 CH₂Cl₂ 분획물 시료가 비교적 활성이 양호한 편으로 평가되었고, DFP 함량이 65% 수준인 # 2003-0L703 시료의 경우 melanogenesis inhibition assay 평가에서 arbutin보다 양호하였다.

- (나) CA, FA 및 CFP의 경우 tyrosinase inhibition assay 및 melanogenesis inhibition assay 평가에서 비교적 양호한 결과를 보였다.
- (다) 따라서 DFP 함량을 좀 더 높이고, CA와 FA 및 CFP가 함유된 시료의 준비가 요구되었다.

(2) 시료 설명

- (가) MC001-0K702와 MC002-0K709 시료와 마찬가지로 같이 옥수수겨를 에탄올로 추출하고 탈지한 하층을 CH₂Cl₂ 용매로 분획. 분획층을 다시 메탄올수용액을 이동상으로 column 용리하여 분별한 시료로서 MC001-0K702 및 MC002-0K709보다 DFP 함량이 높으며, DFP 외에 다른 HCAD를 함께 포함한 시료
- (나) 성분함량 분석 : **Table 13**에서와 같음

3. 옥수수겨추출물 정제분말의 미백활성 평가

가. 시료준비

(1) 시료

- (가) 옥수수겨 정제분말 : **Corn BE** (DFP~25%, **Table 13**), CFP, DFP
- (나) Ferulic acid (FA, Wako), *p*-coumaric acid (CA, Alfa Aesar)
- (다) Arbutin (Sigma)

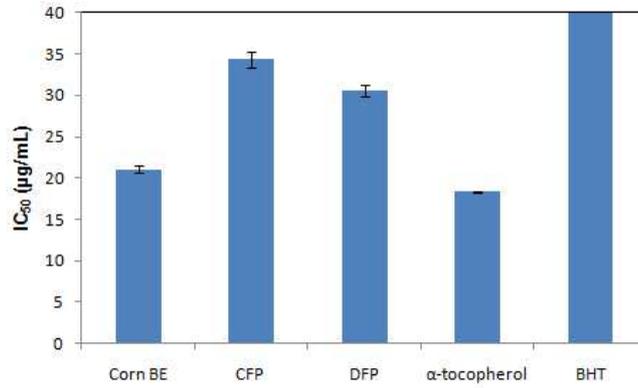
(2) 세포주, 시약 및 기기

- (가) B16F1 (ATCC, USA)
- (나) MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma)
- (다) FBS (fetal bovine serum, Hyclone)
- (라) DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Hyclone)
- (마) Forskolin (Sigma), DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma)
- (바) Microplate reader (EL800, BIO-TEK Instruments, USA), CO₂ incubator (Sanyo, Japan)

나. 평가결과

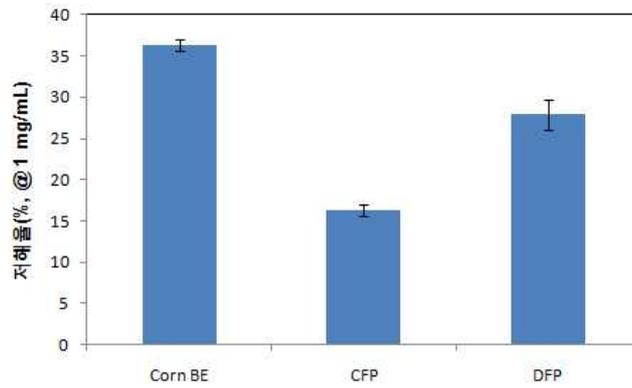
(1) 항산화활성 평가

- (가) DPPH radical scavenging activity



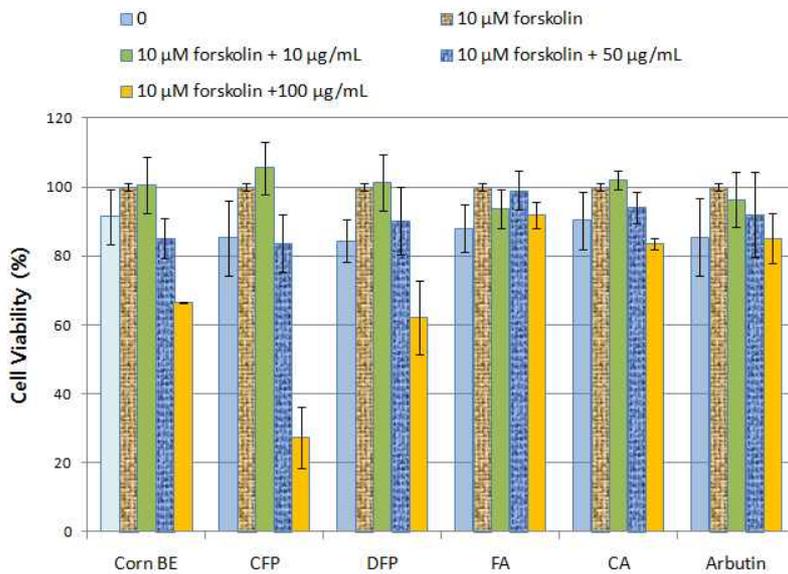
항산화활성 평가로서 DPPH 소거 활성은 α-Tocopherol > Corn BE > DFP의 순으로 양호하였으며, Corn BE의 DPPH 소거 활성은 α-Tocopherol 보다는 낮으나 유사한 정도의 활성을 보였고, 합성 산화방지제인 BHT보다는 양호하였다.

(나) Superoxide radical scavenging activity



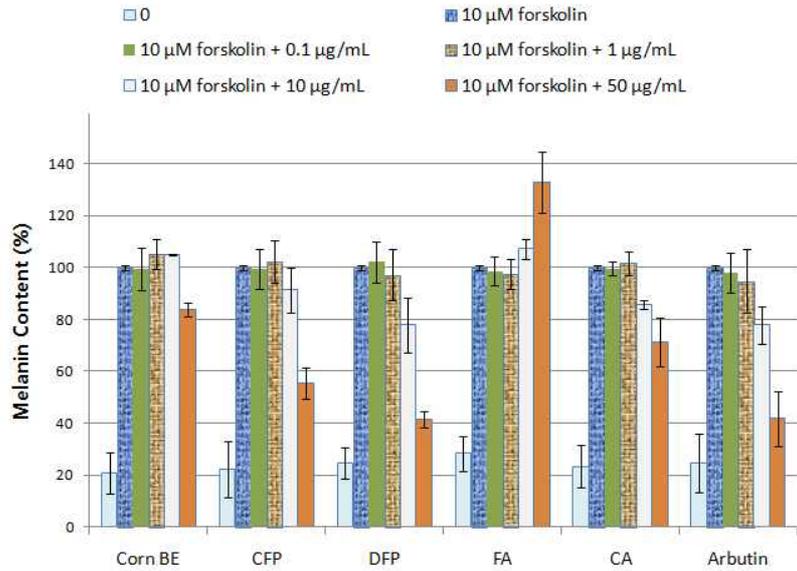
항산화활성 평가로서 활성산소소거 활성은 Corn BE > DFP > CFP의 순으로 양호하였다.

(2) 세포 생존력 평가



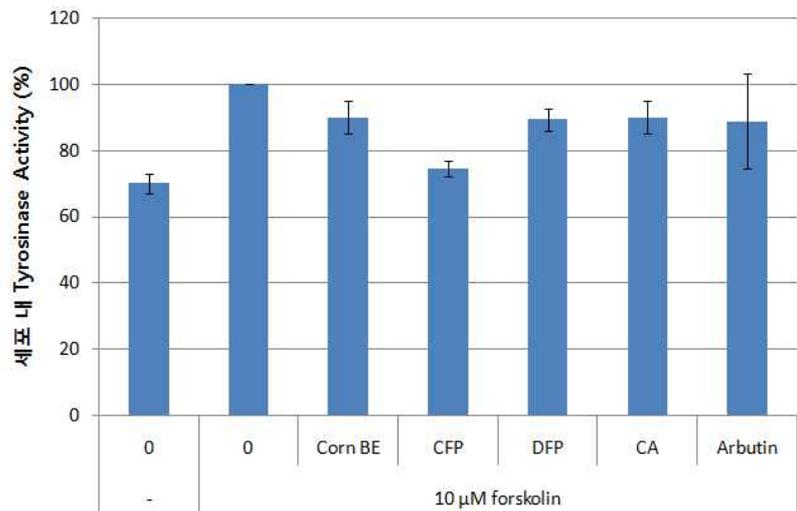
FA, CA, arbutin은 100 µg/mL의 농도까지 80% 이상의 세포 생존율을 보였으나 Corn BE, CFP, DFP의 경우 66%, 27%, 62%의 생존율을 보였다. 이후 진행된 실험은 최대 농도를 50 µg/mL로 결정하였다.

(3) 멜라닌 생합성 저해효과



Corn BE는 50 µg/mL에서 16.332% 멜라닌 생성 저해효과를 보였다. CFP, DFP, CA는 농도의존적으로 멜라닌 생성 저해효과를 보였으며, CFP, DFP는 각각 50 µg/mL에서 44.7 ± 6.0%, 58.5 ± 3.1%의 멜라닌 생성 억제효과를 나타내었고, 58.2 ± 10.8% 억제효과를 나타낸 알부틴과 유사하였다. 반면 FA의 경우는 멜라닌 생성 저해효과를 보이지 않았다.

(4) 세포 내 tyrosinase 활성 저해효과



CFP 50 µg/mL에서 약 25.6%의 세포 내 tyrosinase 활성 저해효과를 보였다. Corn BE는 arbutin과 유사한 정도의 저해효과를 보였다.

(5) 미백기전 : 멜라닌 생성 관련 단백질 발현양상

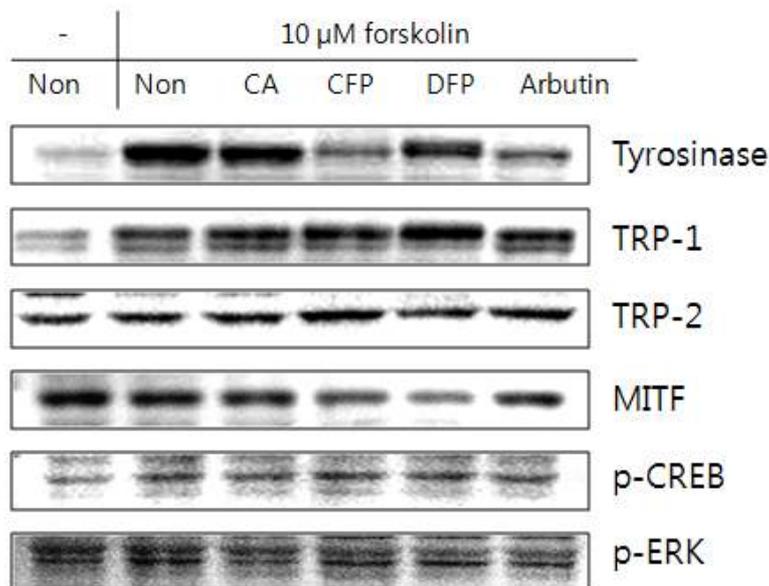
(가) 시약 및 기기

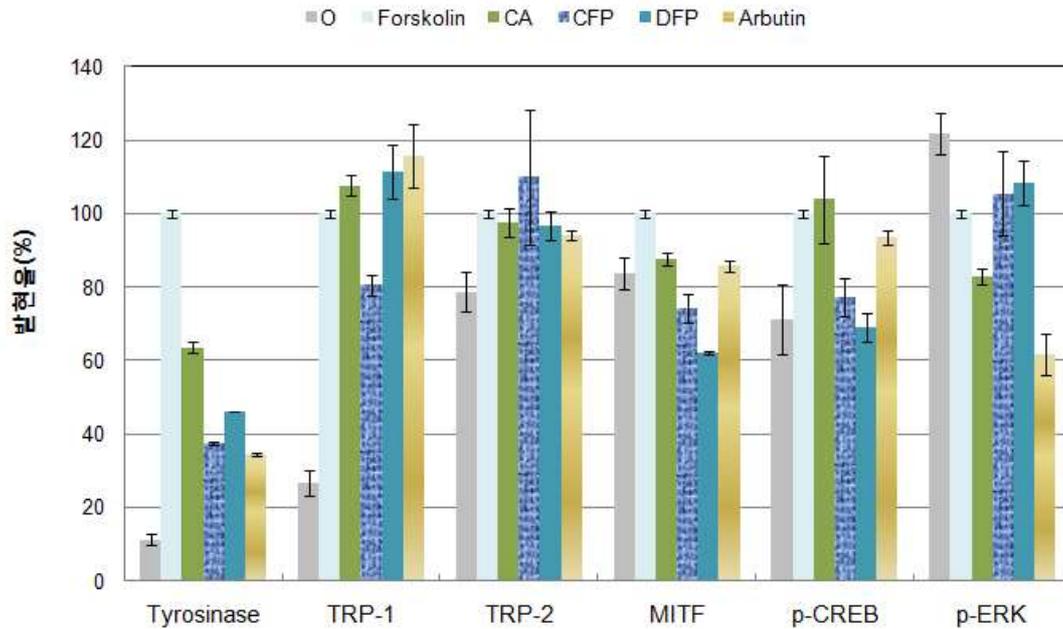
- ① Protein assay reagent (Bio-rad), Trizma base (Sigma), Glycine (Sigma), PVDF membrane (Bio-rad), ECL solution (Bio-rad), Primary antibody, HRP-conjugated secondary antibody (Santa Cruz), Electrophoresis & transfer kit (Bio-rad, USA), Image analysis system (Chemi XRS, Bio-rad, USA)

(나) 실험방법

- ① B16F1 cell을 배양 용기 당 5×10^5 cells가 되게 준비한 후, 24 h 동안 37°C, CO₂ 항온기에서 배양 후 시료(50 µg/mL)를 처리하여 2~3일 동안 배양(양성 대조군으로는 알부틴을 사용)
- ② 배양 후 배양액을 제거하고 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 1회 세척하여 cells를 모음
- ③ Pro-Pre solution을 가하여 단백질을 추출하여 Bradford 방법을 이용하여 단백질 농도를 정량
- ④ 동량의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동시킨 후 PVDF membrane으로 gel의 단백질을 blot
- ⑤ 5% skim milk로 하루 밤 동안 blocking한 후 primary antibody를 3시간 동안 상온에서 반응시킨 후 TBS (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.05% Tween 20)로 10분 간격으로 3회 세척
- ⑥ 1:1000의 비율로 희석한 secondary antibody를 1시간 30분 동안 상온에서 반응. 다시 TBS-T로 10분 간격으로 3회 씻어낸 후, ECL solution으로 발색 후 분석

(다) 결과





- ① Tyrosinase : CA (36%), CFP (62%), DFP (54%), arbutin (65%) 발현 저해
- ② TRP-1 : CFP (19%) 발현량이 감소, 그 외 성분들은 TRP-1의 발현에는 영향 없음
- ③ TRP-2 : 발현에 영향 없음
- ④ MITF : CA (12%), CFP (26%), DFP (38%), arbutin (14%) 발현 저해
- ⑤ p-CREB: CFP (23%), DFP (31%), arbutin (7%) 발현 저해, 항목 ④에서 CFP, DFP의 MITF의 발현량 감소는 MITF 발현을 유도하는 p-CREB의 감소로 인한 결과로 예상되어짐
- ⑥ p-ERK: MITF의 분해를 유도하는 p-ERK의 발현과는 연관이 없어 보임

- 옥수수겨추출물 중 CA, CFP, DFP 및 대조성분인 arbutin에서 tyrosinase의 발현을 저해하였다.
- TRP1 단백질 발현실험에서, CFP만이 TRP1 발현을 저해하였다.
- TRP2의 경우, CA, DFP 및 arbutin에서 발현 저해효과를 보였다.
- 멜라닌 생합성 경로에서 초기에 관여하는 MITF, CREB, ERK 등의 초기인자에 대한 실험에서 **CFP와 DFP에서 MITF의 발현량이 두드러지게 감소함을 확인**할 수 있었다.
- DFP의 경우, MITF 발현량의 현저한 감소에 비해 tyrosinase 양의 감소가 적은 것으로 보아 tyrosinase 활성 저해 외에 다른 요인으로 인해 미백활성이 나타나는 것으로 보인다. 옥수수겨추출물 중 CFP와 DFP는 미백 기능성화장품 소재로서의 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

4. 나노소재 개발, 물성 및 안정성 평가

가. 피부에 효과적인 전달을 위한 나노캡슐(나노입자) 소재 제조 및 평가 방법

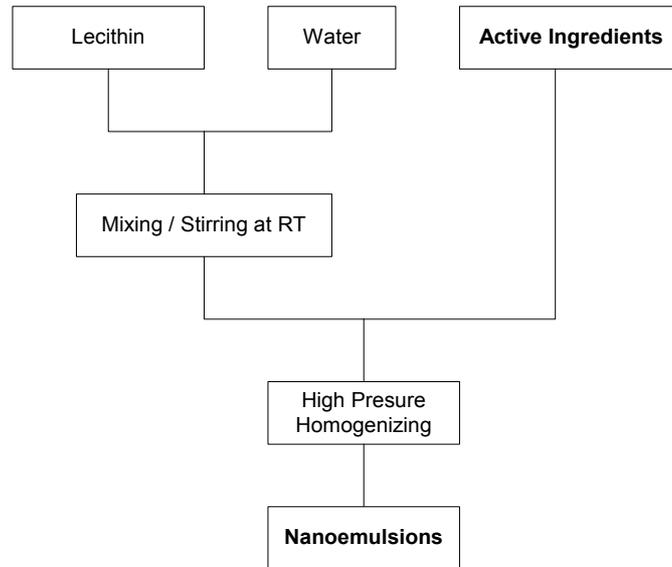
(1) 나노기술(Nano Technology)이란?

- (가) 나노기술을 화장품 산업에 응용한다면, 물리화학적으로 불안정한 생리활성물질을 분자수 준에서 안정화하며, 활성물질만을 선택적으로 피부에 흡수시킴으로써 효능을 극대화하고 피부 부작용을 최소화 할 수 있을 것으로 기대하고 있다. 즉, 생리활성물질을 10~200 nm 미터 수준의 나노입자에 담아 이를 운송체로 하고, 필요에 따라 운송체 표면의 성질을 피부 특성에 적합하도록 변화시킴으로써 생리활성물질을 피부에 선택적으로 전달한다.
- (나) 현재 화장품 분야에 적용하기 위하여 주로 연구되고 있는 나노입자 중 대표적인 것은 나노유화시스템 - 나노에멀전(nanoemulsion), 리포솜(liposome) 등이다. 나노 단위로 입자가 작아지면, 입자가 받는 중력이 작아지고, 큰 입자인 일반유화입자에 비해 잘 변형되지 않고, 표면에서의 응집이 최소화되어 안정도가 증가한다. 나노입자를 제조하기 위한 계면화학적 방법에는 유화제의 HLB 조절, 반전유화법, 전상온도 유화법, D상유화법, 액정유화법 등을 이용하며, 기계적인 방법으로 고전단력, 고압을 걸어 줄 수 있는 고압유화기를 사용하는 방법이 있다.
- (다) 이 중 고압유화기술은 최소량의 유화제를 사용하면서도 안정한 나노입자를 제조할 수 있는 장점이 있어 피부에 안정하고, 피부흡수를 조절할 수 있는 신 제형을 개발하는 연구에 많이 활용되고 있다.
- (라) 화장품 분야에서 나노기술은 여러 가지로 유용하게 사용 될 수 있으며, 나노기술을 이용하여 개발된 기능성 나노입자의 부가가치는 그 자체만으로도 상상을 뛰어넘는 잠재력을 갖고 있다.

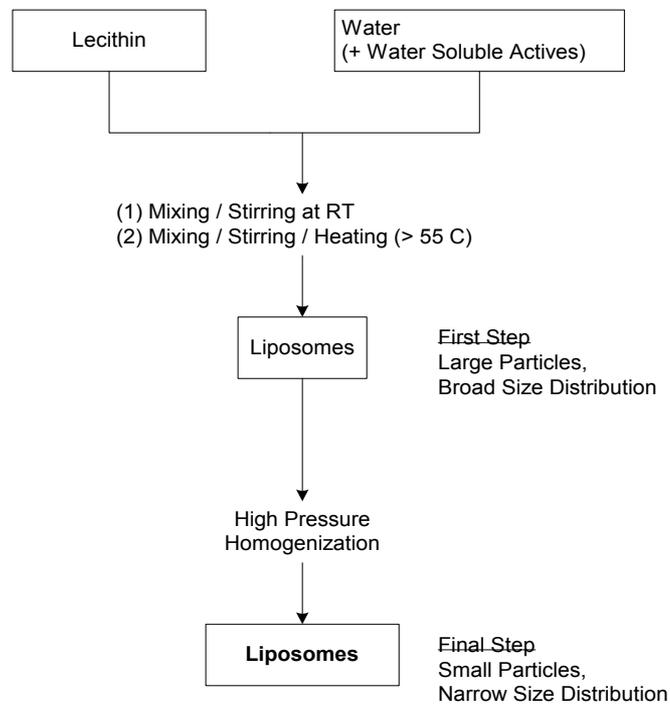
(2) 나노입자의 제조

- (가) 옥수수겨추출물(Corn BE를 **SID Corn BE**로 명명)을 함유하는 나노소재는 나노에멀전(nanoemulsion), 니오솜(niosome), 리포솜(liposome), 듀얼-리포솜(dual-liposome) 나노제형을 사용하여 제조하였다.
- (나) 나노제형의 주된 원료로서 수첨된 레시틴(hydrogenated lecithin, Lipoid Co. Ltd., USA)과 비이온성 계면활성제(sorbitan stearate)를 사용하였으며 유화제, 계면활성제 및 나노제형에 사용된 용매는 일반 시약급 및 화장품 원료등급을 사용하였다.
- (다) 나노제형 제조에 공통적으로 사용된 고압유화장치(High pressure homogenizer)는 Miracle사(Japan)의 Nano Maker를 사용하였다.

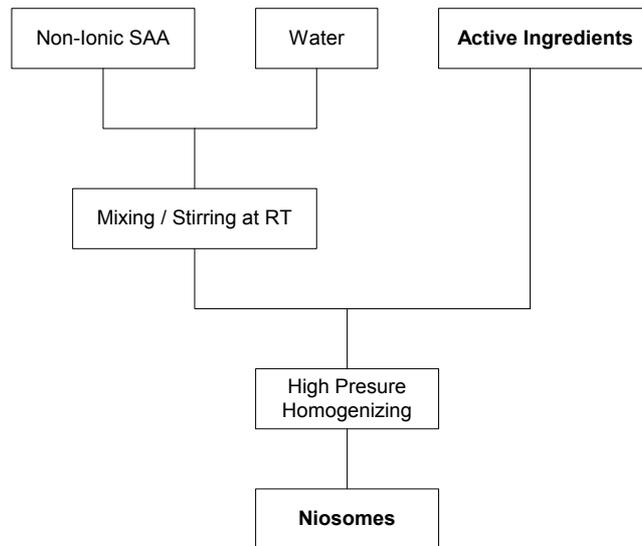
(라) 나노에멀전 제조



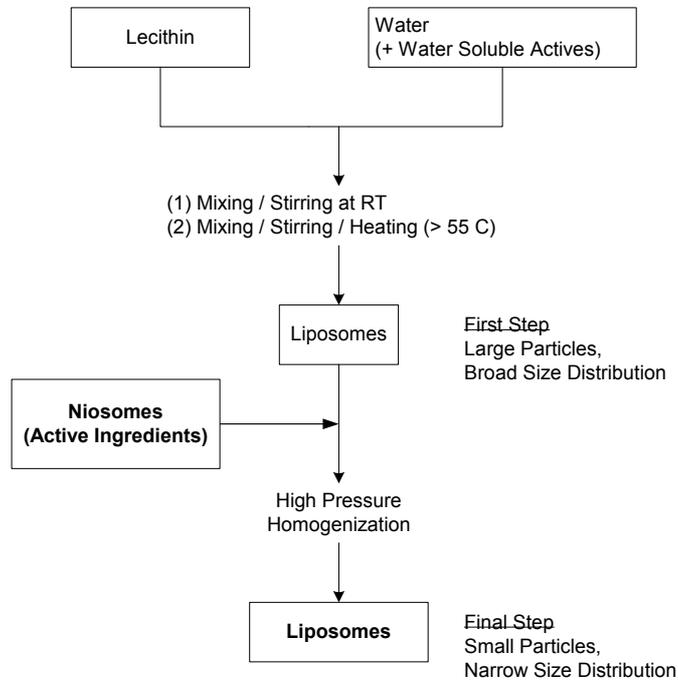
(마) 리포솜 제조



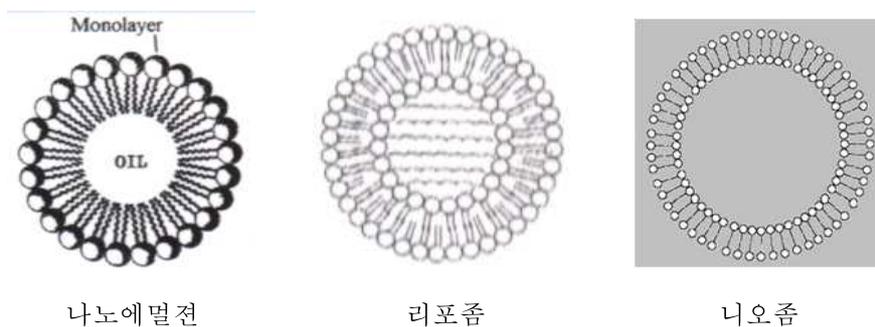
(바) 니오솜 제조



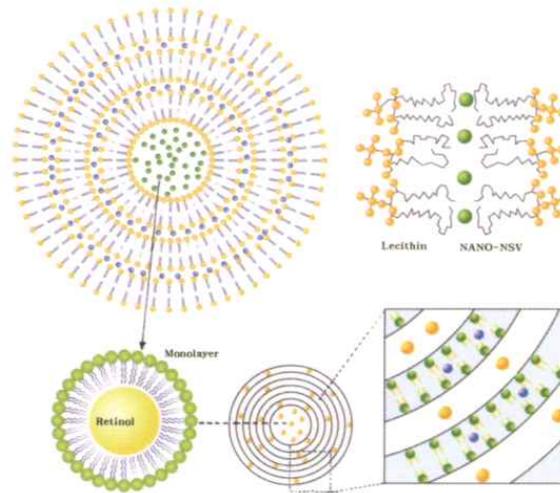
(사) 듀얼리포솜 제조(니오솜을 리포솜에 분산, 유화)



(아) 나노캡슐 입자의 구조



(자) 듀얼리포좀



(3) SID Corn BE를 포함하는 나노제형 제조

Lot No.	내용	Lot No.	내용
# CB-NE 1-1	1% 함유 나노에멀전	# CB-GL 1	1% 함유 리포좀
# CB-NE 2-1	1% 함유 나노에멀전	# CB-NS 1	1% 함유 니오솜
# CB-GL 3-1	1% 함유 리포좀	# CB-DL 1	1% 함유 듀얼리포좀
# CB-NS 4-1	1% 함유 니오솜	# CB-DL 2.5	2.5% 함유 듀얼리포좀
# CB-DL 5-1	1% 함유 듀얼리포좀	# CB-DL 5.0	5.0% 함유 듀얼리포좀

(4) 나노입자의 평가

- (가) SID Corn BE를 함유하는 나노입자의 물성평가는 점도, pH, 입자의 크기 및 분포, 안정도를 각각 평가하였다.
- (나) 점도는 점도계를 사용하여 평가하였으며, 입자의 크기 및 분포는 Particle analyzer (Microtrac S3000, Microtrac Co. Ltd., USA)를 사용하여 평가하였으며, 나노입자의 Morphology는 TEM을 사용하여 평가하였다.
- (다) 입자의 안정도는 1차 관능평가 후, 원심분리기(Micro high speed centrifuge, MICRO 17TR, Hanil science industrial Co. Ltd.)를 이용하여 10,000 RPM에서 10분간 원심분리하여 침전 또는 상의 분리가 일어나는지 비교 평가하였다.

(5) 나노입자의 안정성 평가

- (가) 나노입자의 안정성 평가는 입도 안정성 및 변색 안정성을 각각 평가하였다.
- (나) 입도 안정성은 제조된 나노입자를 냉온 및 50°C에서 30일간 보관한 후, 입도의 변화를 평가하였으며, 변색안정성은 SID Corn BE 원료 자체, 나노제형, 나노제형을 포함하는 제품(로션 타입)에 대하여 냉온, 실온, 향온(40°C)에서 7개월 동안 보관한 후, 색차계 (JP7100F, Juki Co. Ltd., Japan)를 이용하여 변색 안정성을 평가하였다.

나. 나노소재 제조, 물성 및 안정성 평가 결과

(1) 나노소재의 제조

(가) 나노에멀전

Part	원료명	함량(%)	
		# CB-NE 1-1	# CB-NE 2-1
A	Polysorbate 60	1.0	1.0
	BHT	-	-
	Hydrocarbon Type Oil	-	12.0
	Ester Type Oil	1.0	8.0
	Triglyceride Type Oil	1.0	6.0
	Silicone Oil	-	0.4
	Tocopheryl Acetate	0.4	0.6
B	Butylene Glycol	8.0	8.0
	Glycerin	4.0	4.0
	Lecithin	1.0	3.0
	Ceramide	0.4	0.4
	DI-Water	to 100	to 100
C	Ethanol	12.0	8.0
	SID Corn BE	1.0	1.0

- # CB-NE 1-1은 skin type의 나노에멀전 제형이며, # CB-NE 2-1은 lotion type의 나노에멀전 제형, 고압유화는 1,000 bar에서 2회 통과시킨 후 냉각하였다.

(나) G-리포솜

Part	원료명	# CB-GL 3-1
		함량(%)
A	Polysorbate 60	1.0
	Triglyceride Type Oil	8.0
	Tocopheryl Acetate	0.4
	Cholesterol	0.7
B	Glycerin	35.0
	Methylparaben	0.04
	DI-Water	to 100
	Lecithin	3.0
	Ceramide	0.4
	K-Cetyl Phosphate	0.4
C	Silicone Oil	0.8
D	SID Corn BE	1.0
	Butylene Glycol	20.0
	Ethanol	5.0

- # CB-GL 3-1은 polyol인 glycerin을 이용한 리포솜 제형이며 고압유화는 1,000 bar에서 2회 통과시킨 후 냉각하였다.

(다) 니오솜

Part	원료명	# CB-NS 4-1
		함량(%)
A	Sorbitan Stearate	4.0
	Cholesterol	3.3
B	K-Cetyl Phosphate	0.4
	Glycerin	4.0
	DI-Water	to 100
C	Propylene Glycol	20.0
	Butylene Glycol	4.0
	SID Corn BE	1.0
D	Triglyceride Type Oil	18.0
E	Disodium EDTA	0.01
	Methylparaben (10% in Butylene Glycol)	2.0
	Water	7.8

- # CB-NS 4-1은 비이온성 계면활성제인 Sorbitan stearate를 이용한 니오솜 제형이며 고압 유회는 1,000 bar에서 2회 통과시킨 후 냉각하였다.

(라) 듀얼-리포솜

Part	원료명	# CB-DL 5-1
		함량(%)
A	Sorbitan Stearate	1.5
	Cholesterol	1.25
	K-Cetyl Phosphate	0.2
	Triglyceride Type Oil	9.0
B	Glycerin	2.5
	Disodium EDTA	0.01
	DI-Water	25.0
C	Propylene Glycol	10.0
	SID Corn BE	1.0
	Tocopheryl Acetate	0.5
D	PEG Rapeseed Sterol	3.5
	Triglyceride Type Oil	18.0
	Lecithin	3.0
E	Glycerin	4.0
	K-Cetyl Phosphate	0.4
	Disodium EDTA	0.01
	DI-Water	to 100
F	Methylparaben	0.02

- # CB-DL 5-1은 비이온성 계면활성제인 Sorbitan stearate를 이용한 니오솜 제형과 Lecithin을 이용한 리포솜 제형을 결합한 제형이며, 1,000 bar에서 2회 통과시킨 후 냉각하였다.

(2) 나노제형별 물성평가

(가) 나노제형의 일반물성 평가

- ① SID Corn BE를 함유하는 나노제형은 상대적으로 낮은 점도를 보였다.
- ② 이러한 결과는 SID Corn BE의 영향으로 보이며, 특히 주성분인 DPF와 같은 amide 성분들이 구조적으로 유연한 O=C-NH- 그룹을 포함함으로써 나노에멀전의 micelle이나 리포솜의 bilayer 구조에서 안정성을 떨어뜨리는 것으로 보였다.

제형	점도	입도 (nm) (Mv / Mn)	색상	안정도
# CB-NE 1-1	187	2238 / 849	황색의 반투명 액상	하루 경과 후 침전
# CB-NE 2-1	1872	142 / 123	연황색의 반투명 액상	양호
# CB-GL 3-1	1872	130 / 103	투명한 연황색 액상	양호
# CB-NS 4-1	1872	193 / 136	유백색의 불투명 액상	양호
# CB-DL 5-1	2340	147 / 121	미황색의 반투명 액상	양호

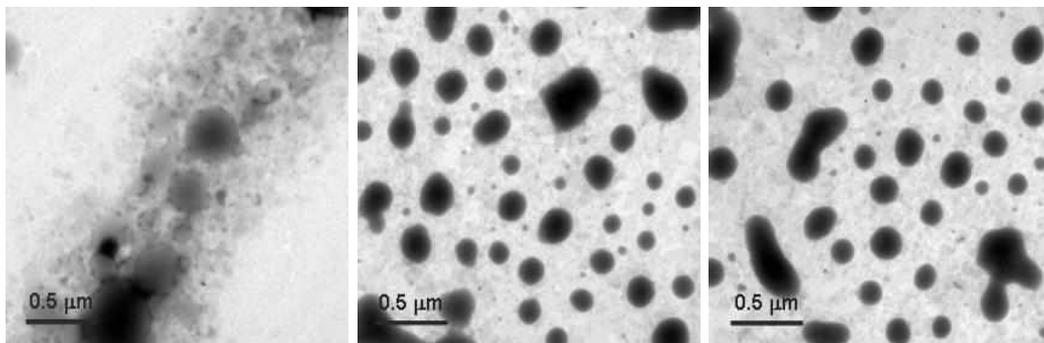
(나) 나노제형의 2차 제조

- ① 나노에멀전의 안정도가 좋지 않아 나노에멀전을 제외하고, SID Corn BE를 포함하는 나노제형인 니오솜(# SID NS 1), 리포솜(# SID GL 1), 듀얼-리포솜(# SID DL 1, # SID DL 2.5, # SID DL 5.0)을 제조하여 입도 분석하였다.
- ② 나노제형은 부피평균 입도의 경우, 150~250 nm 정도의 평균입도를 보였으며, 수평균 입도의 경우는 100~150 nm 정도의 평균 입도를 보였다.

측정시료	Mean diameters (nm)	
	Mv	Mn
# SID GL 1 (1%)	167 ± 36	124 ± 28
# SID NS 1 (1%)	190 ± 43	129 ± 39
# SID DL 1 (1%)	163 ± 39	118 ± 26
# SID DL 2.5 (2.5%)	164 ± 37	123 ± 28
# SID DL 5.0 (5.0%)	259 ± 128	126 ± 22

(다) 나노제형의 Morphology

- ① SID Corn BE를 포함하는 나노제형 중 리포솜, 니오솜, 듀얼-리포솜 제형에 대한 TEM image를 보면 약 200 nm 부근의 구형 또는 타원형을 입자들을 확인할 수 있었다

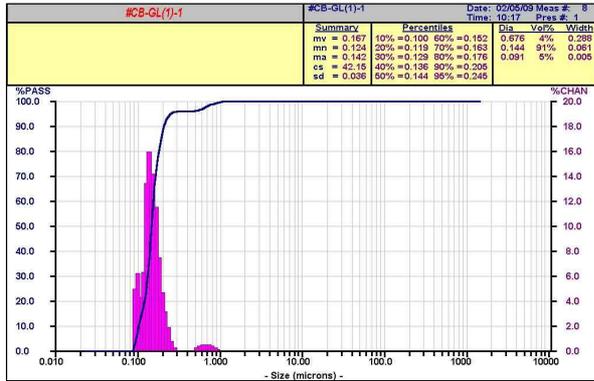


SID GL 1

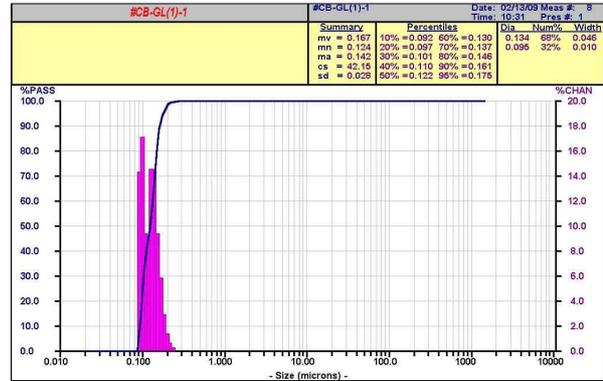
SID NS 1

SID DL 1

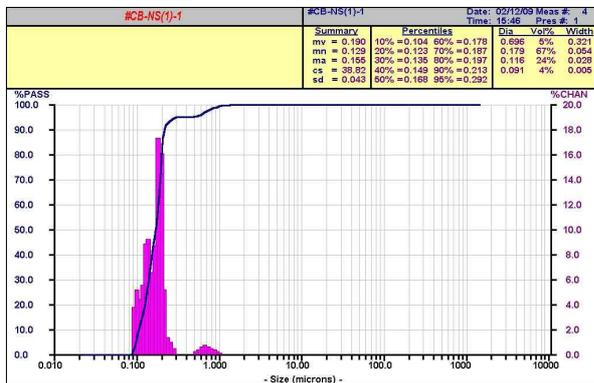
② 나노제형의 입도분석 그래프



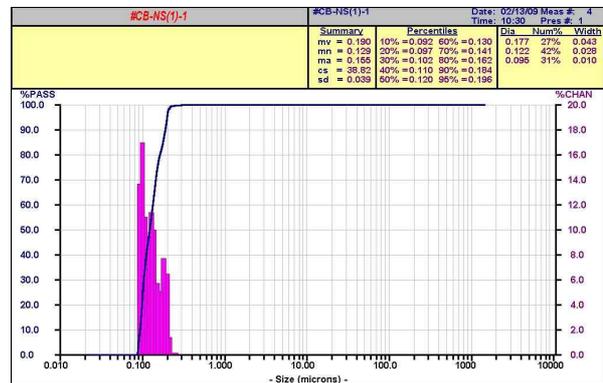
SID GL 1_부피평균 입도



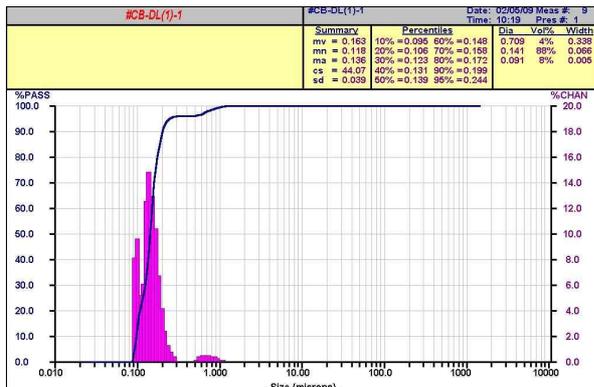
SID GL 1_수평균 입도



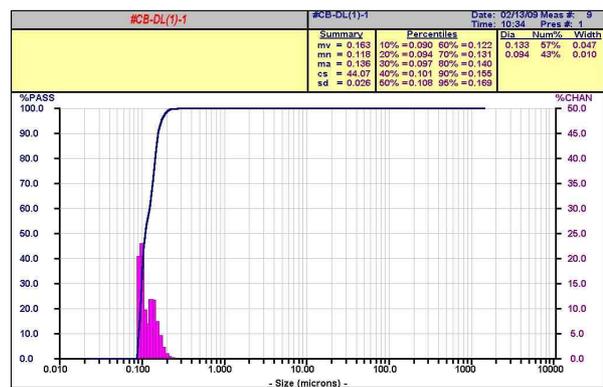
SID NS 1_부피평균 입도



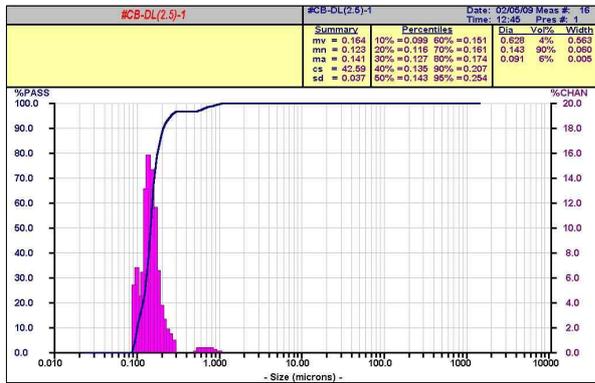
SID NS 1_수평균 입도



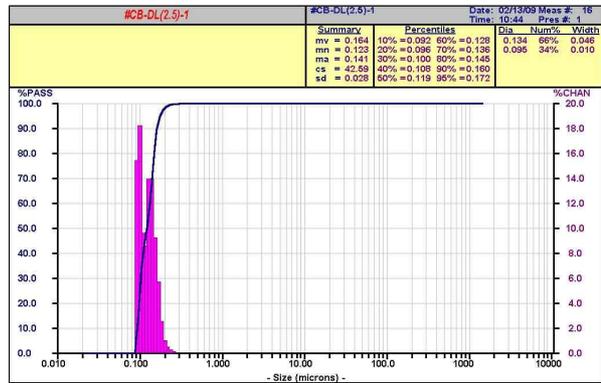
SID DL 1_부피평균 입도



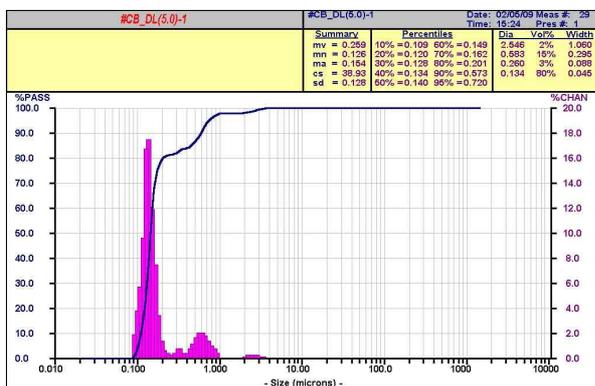
SID DL 1_수평균 입도



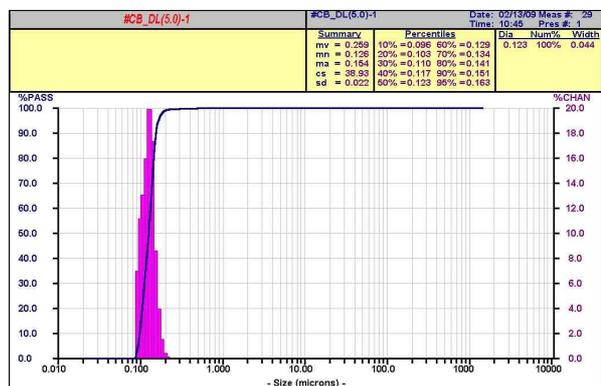
SID DL 2.5_부피평균 입도



SID DL 2.5_수평균 입도



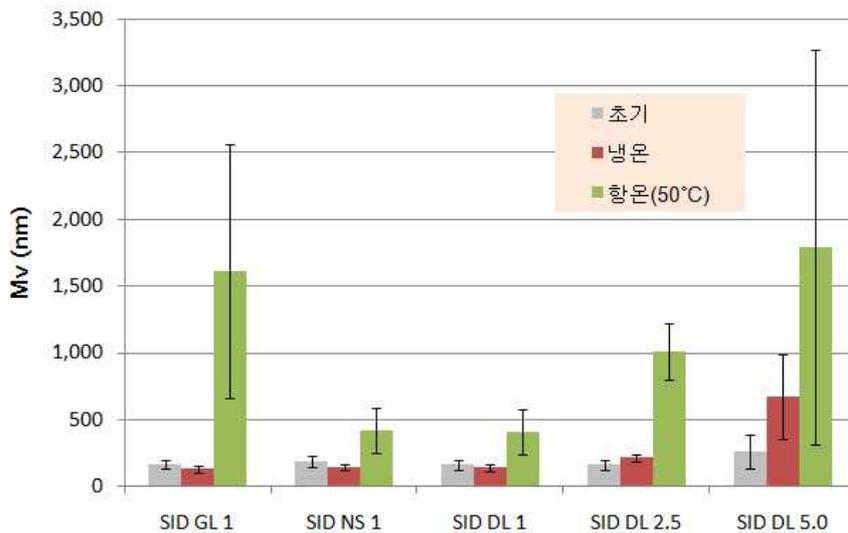
SID DL 5.0_부피평균 입도



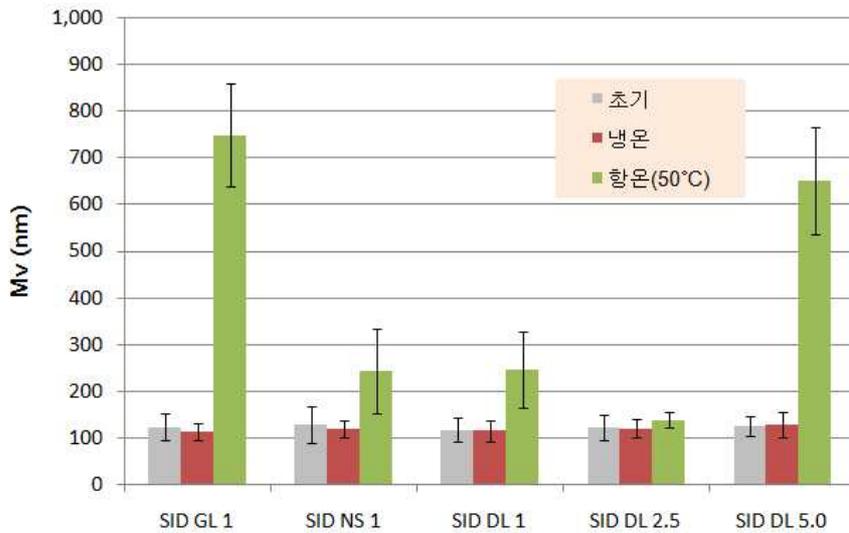
SID DL 5.0_수평균 입도

(3) 나노제형의 안정성 및 역가 안정성 평가

(가) 나노제형의 온도 및 시간에 따른 부피평균 입도 안정성(30일, 50°C 보관)



(나) 나노제형의 온도 및 시간에 따른 수평균 입도 안정성(30일, 50℃ 보관)



SID Corn BE를 함유하는 나노제형의 입도안정성을 비교해 보면 보관조건 및 제형 종류에 따라 안정도의 차이를 확인할 수 있었다.

부피평균 입도의 변화를 보면 1% SID Corn BE를 함유하는 나노제형의 경우 냉온에서는 초기 입도가 거의 유지되었으며, 50℃ 보관시료는 상대적으로 니오솜 제형과 듀얼-리포솜 제형이 안정하였다.

반면에 5% SID Corn BE를 함유하는 듀얼-리포솜의 경우에는 냉온 및 50℃ 보관조건에서 모두 안정성이 떨어지는 것을 확인하였음. 수평균 입도의 변화를 보면 상대적으로 50℃에서의 입도 변화도 작았으며 1% SID Corn BE를 함유하는 니오솜 제형과 듀얼-리포솜 제형이 안정하였다.

(4) 나노제형의 물리적 안정성 평가 : 원심분리

(가) SID Corn BE를 함유하는 나노제형의 물리적 안정성을 평가하기 위하여 원심분리기를 이용하여 10,000 RPM에서 10분씩 1 set로 각각 5회 반복하여 원심분리하고 각각의 횟수마다 나노제형의 안정성을 평가하였다.

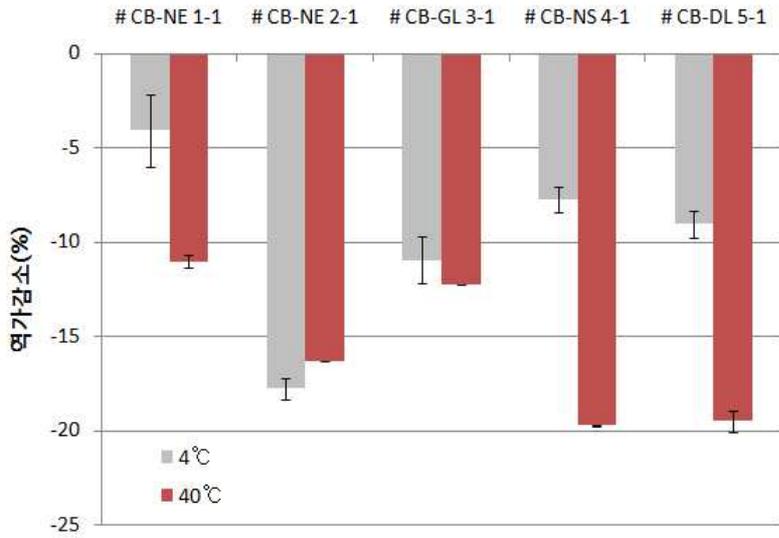
(나) 1% SID Corn BE를 함유하는 리포솜 제형 및 듀얼-리포솜 제형이 상대적으로 양호한 안정성을 보였으며, 5% SID Corn BE를 함유하는 듀얼-리포솜 제형이 상대적으로 안정성이 낮았다.

측정시료	관능평가 결과				
	1차	2차	3차	4차	5차
# SID GL 1	◎	◎	◎	◎	◎
# SID NS 1	◎	◎	○	○	○
# SID DL 1	◎	◎	◎	◎	◎
# SID DL 2.5	◎	◎	◎	○	○
# SID DL 5.0	◎	○	○	○	●

(◎: 양호, ○: 일부 침전 또는 오일 분리, ●: 침전 또는 상분리)

(5) 나노제형의 역가안정성 평가

- (가) 각 나노 제형을 4℃, 40℃에 90일간 보관 후, 지표성분인 DFP의 함량을 정량하여 평가하였다.
- (나) 4℃에 보관의 경우 초기 값에 비해 10%, 40℃에 보관하는 경우는 약 20% 정도의 역가 감소가 있었으며, # CB-GL-3-1의 제형이 그 중 비교적 안정하였다.



(6) 나노제형의 변색안정성 평가

- (가) 일반적으로 미백효과를 갖는 성분들은 갈변이나 황변과 같은 색상변화가 있어, SID Corn BE 및 SID Corn BE를 함유하는 나노제형의 변색안정성을 평가하기 위하여 원료 자체를 용매에 녹인 시료와 나노제형, 그리고 나노제형을 포함하는 로션베이스 제품에 대하여 색차계 기기를 이용하여 UV, 온도에 따른 변색안정성을 평가하였다.
- (나) SID Corn BE의 변색안정성은 명도, 적색(a: red direction), 황색(b: yellow direction) 계열의 변화를 비교하였다.
- (다) 결과 향온(40℃) 조건이나 UV 노출에서도 초기시료와 거의 유사하게 나타나는 것을 확인하였으며, 황색계열의 색상변화를 보면 향온에서 약간의 변화가 있지만 일반적인 미백소재의 변화정도를 감안하면 상당히 양호한 안정성을 갖는 것으로 판단되었다.

① 색상 안정성 평가시료

측정시료	내용	보관조건
A	0.1% SID Corn BE in Propylene glycol	냉온, 실온, 향온, UV노출
B	0.1% SID Corn BE 함유 로션 base	냉온, 향온
C	# CB_GL 3-1 10%함유(0.1% SID Corn BE) 로션 base	
D	# CB_NS 4-1 10%함유(0.1% SID Corn BE) 로션 base	
E	# CB_DL 5-1 10%함유(0.1% SID Corn BE) 로션 base	냉온, 실온, 향온
F	# CB_GL 3-1(1% SID Corn BE)	
G	# CB_NS 3-1(1% SID Corn BE)	
H	# CB_DL 5-1(1% SID Corn BE)	

② 0.1% SID Corn BE in Propylene glycol 원료의 변색안정성 평가

보관조건	L(명도)	a	b	보관기간
초기	95.21	-2.28	5.07	7개월
냉온	95.13	-1.67	4.18	
실온	94.78	-1.82	4.72	
항온(40℃도)	94.80	-2.21	6.05	
UV 노출	94.93	-1.75	5.92	6h UV 조사

- SID Corn BE는 냉온 보관 시료 대비 항온과 광조사 시 b 값이 약간 증가하여 yellow 톤이 증가하나, 비교적 온도와 광에 안정하였다.

③ SID Corn BE 함유(나노제형) 로션 base의 변색안정성 평가

측정시료	보관조건	L(명도)	a	b	보관기간
B	초기	89.02	-1.41	3.87	7개월
	냉온	88.76	-1.38	4.16	
	항온(40℃)	86.65	-1.29	8.07	
C	초기	88.45	-1.68	4.21	
	냉온	87.78	-1.52	4.90	
	항온(40℃)	85.99	-1.41	8.44	
D	초기	88.43	-1.67	4.09	
	냉온	87.93	-1.55	4.36	
	항온(40℃)	86.74	-1.38	7.02	
E	초기	89.18	-1.54	4.53	
	냉온	88.40	-1.46	4.80	
	항온(40℃)	87.26	-1.39	6.93	

④ SID Corn BE 함유 나노제형의 변색안정성 평가

측정시료	보관조건	L(명도)	a	b	보관기간
F	초기	76.98	-3.42	12.19	7개월
	냉온	75.74	-2.92	14.34	
	실온	65.88	-3.07	12.35	
	항온(40℃)	65.71	-1.76	16.08	
G	초기	49.96	-4.21	17.59	
	냉온	50.89	-4.02	18.04	
	실온	57.19	-2.78	18.09	
	항온(40℃)	54.37	-0.86	24.73	
H	초기	73.28	-2.08	14.86	
	냉온	74.91	-1.94	15.56	
	실온	72.78	-1.18	15.16	
	항온(40℃)	75.74	-0.01	17.41	

- SID Corn BE 함유 나노제형과 나노제형 함유 로션의 경우, 냉온 보관 시료 대비 항온에서 b 값이 증가하여 yellow 톤이 증가하나, 비교적 온도에 안정하였다.

(7) SID Corn BE 함유(나노제형) 로션 base의 역가안정성 평가

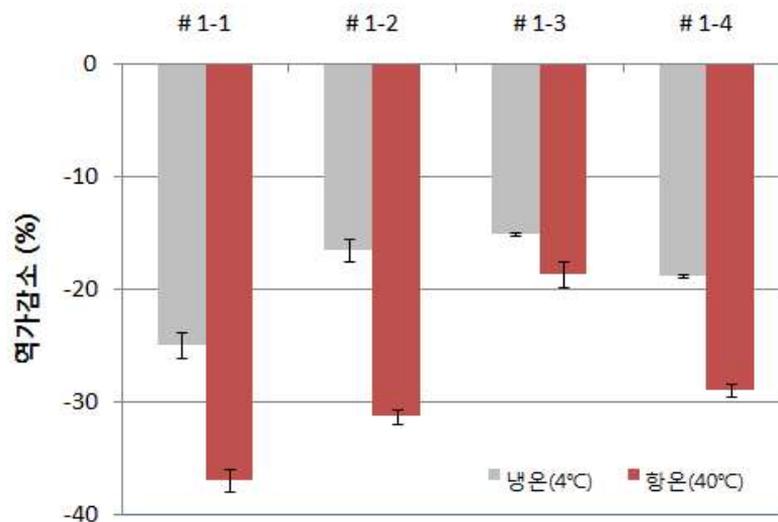
(가) Formulation

성분	# 1-1	# 1-2	# 1-3	# 1-4
SID Corn BE	0.1	-	-	-
EtOH	1.0	-	-	-
#CB_GL 3-1 (Glycerin liposome 제형)	-	10.0		-
#CB_NS 4-1 (Niosome 제형)	-	-	10.0	-
#CB_DL 5-1 (Dual-liposome 제형)	-	-	-	10.0
Lotion base	To 100	-	-	-

- 나노제형은 1% 옥수수겨추출물 함유 제형
- 사용원료: MC003-0D821

(나) 실험조건 : 냉온(4°C) 및 항온(40°C)에서 90일까지 보관, 30일 간격 역가변화 측정

(다) 결과



Reference (# 1-1)에 비해 나노제형에서 상대적으로 역가안정성이 양호하였으며, 니오솜 제형에서 가장 안정하였다.

다. Micro pig를 이용한 나노제형의 경피투과 평가

(1) 시료준비

(가) SID Corn BE : DFP 25% 함유 옥수수겨추출물(MC003-0D821, Table 13)

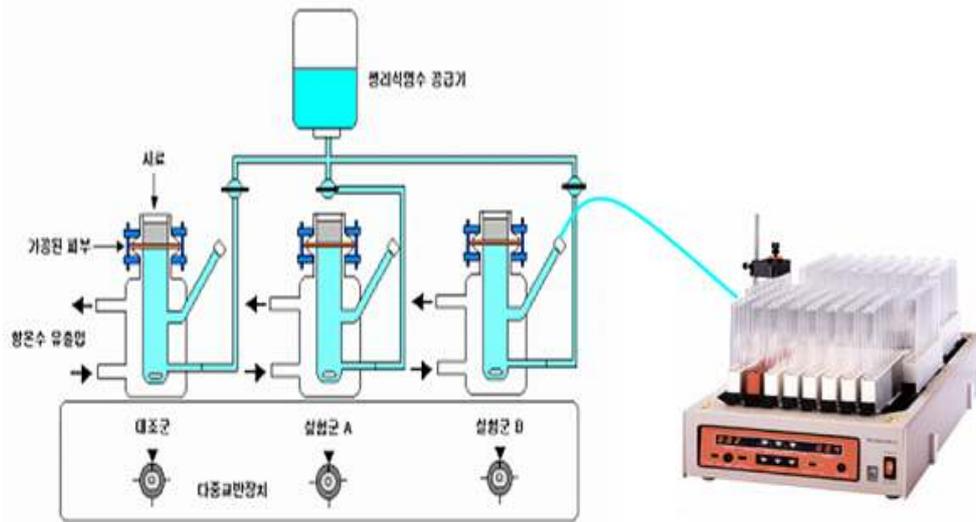
(나) 시료

- ① 시험시료 : SID Corn BE 0.4% 함유 니오솜 제형 (# CB-NS 8-2)
- ① 대조시료 : SID Corn BE 0.4% 함유 1,3-Butylene Glycol (# CB-REF)

(다) 시험기관 : 코씨드바이오팜

(라) 평가방법 : OECD 및 KFDA guide line

(마) 시험장치 : 다중형 경피 투과 평가시스템(Franz Cell Type)



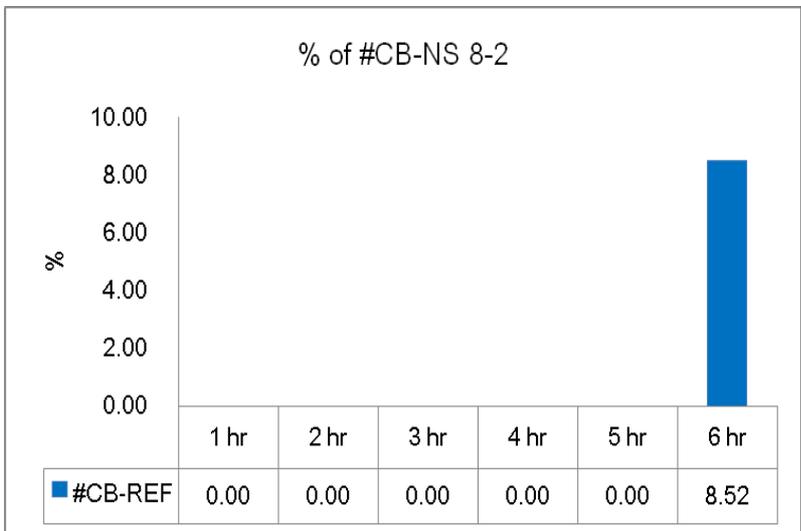
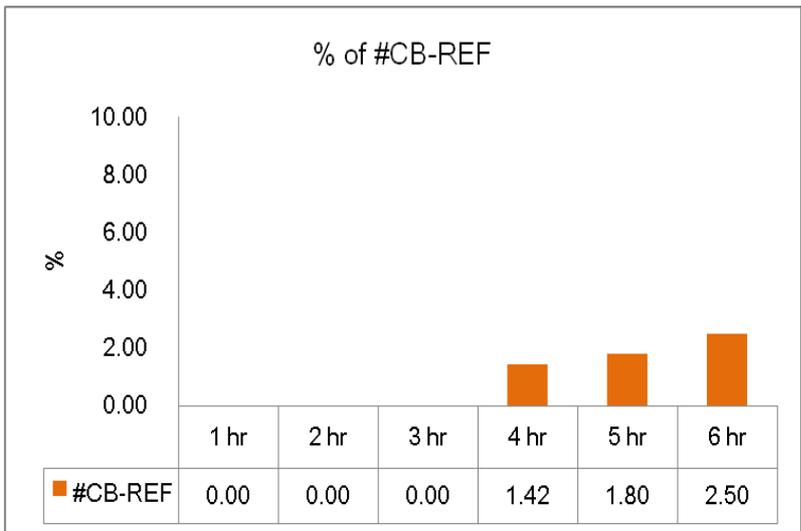
(바) 시험방법

- ① 다중형 경피흡수 장치(Model : GLMS-26, World corporation, Korea)의 receptor 부분에 공간을 채워 넣어 최종적으로 50% 1,3-butylene glycol 수용액을 5 mL이 되게 하고, 다중형 경피흡수 장치의 챔버를 35°C로 충분히 30분 동안 가온하였다.
- ② 조심스럽게 적출된 Micro pig skin을 올려놓고 크램프를 이용하여 단단히 조인 다음 receptor 부분과 피부 사이에 공막이 생기지 않도록 하였다.
- ③ 제공된 시료(# CB-REF, # CB-NS 8-2)를 정밀하게 달아 1 g를 취하여 조심스럽게 각 6개의 donor 부분에 각각 도포하였다.
- ④ 도포한 후 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h 경과한 시점에서 각각의 Cell receptor에서 100 μ L 시료 채취하였다.
- ⑤ 각각의 시료는 전처리 후 HPLC를 이용하여 320 nm에서의 DFP를 정량하였다.
- ⑥ 정량된 농도에 Dilution factor 10을 곱하여 제품의 최종 경피흡수 농도를 결정하였다.

(사) 시료의 물성 및 농도

시료	pH	입도 (nm)		DFP (ppm)
		Mv	Mn	
# CB-NS 8-2	6.19	177	122	1,030
# CB-REF	-	-	-	709

(아) 경피흡수 결과



대조군의 경우 4시간 경과 후부터 경피흡수가 시작되어, 6시간 경과 후 총 경피흡수율은 5.65%였으며, 시험군의 경우 6시간 경과 후 경피흡수가 되었으며, 6시간 경과 후 총 경피흡수율은 8.52%로 시험되었다.

5. 표준화, 기준 및 시험방법 확립, ICID 등재

가. 시료 및 시험방법

(1) 기준 및 시험방법 관련 SID Corn BE의 물성평가

(가) SID Corn BE의 소재 표준화와 관련하여 기준 및 시험방법과 관련된 원료의 제법, 성상, 확인시험, 순도시험, pH, 건조감량, 강열잔분, 미생물한도, 지표성분의 정량법에 대하여 평가하고 1차적인 기준을 설정하였다.

(나) 기준 및 시험방법 평가에 사용된 SID Corn BE

Lot No.	제조일	비고
MC003-0D821	2008. 04. 21	DFP 25% 기준
SCB001-0I807	2008. 11. 07	DFP 20% 기준
SCB003-0K807	2008. 11. 07	DFP 20% 기준
SCB004-0A916	2009. 01. 16	DFP 50% 기준

(다) 확인시험

- ① 원료의 확인시험은 IR spectrometer를 이용한 특성 peak 확인과 UV spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Japan)를 이용한 최대 흡광도 파장(Max λ) 확인하였다.
- ② IR spectrum 분석은 SID Corn BE를 에탄올에 녹인 후, cell 표면에 떨어뜨려 코팅한 시료를 800~4000 cm⁻¹ 범위에서 spectrum을 분석하였다.
- ③ UV spectrum 분석은 SID Corn BE를 20 mg/L의 농도로 에탄올에 녹여 측정파장 600~250 nm 범위에서 UV spectrum을 분석하였다.

(라) 순도시험

- ① 원료의 순도시험은 중금속, 비소 함량을 화장품원료기준(대한화장품협회)에서 지정된 방법에 따라 평가하였다.

(마) pH, 건조감량, 강열잔분, 미생물한도

- ① 원료의 pH는 SID Corn BE 0.1 g를 50% 에탄올수용액 100 mL에 녹인 후 pH meter (Orion 420A+, Thermo electron Co., USA)를 이용하여 평가하였다.
- ② 건조감량(%)은 수분측정기(Infrared moisture determination balance, FD240, Japan)를 이용하여 원료 1 g를 105℃에서 3시간 동안 가온하여 평가하였다.
- ③ 강열잔분과 미생물한도는 화장품원료기준(대한화장품협회)에서 지정된 방법에 따라 평가하였다.

(바) 정량시험

- ① 원료 정량시험은 지표성분인 DPF에 대한 정량시험으로서 HPLC system (Agilent, 1200 series, German)을 사용하여 평가하였다.
- ② 정량시험법은 SID Corn BE 원료 약 75 mg을 정밀하게 달아 메탄올 50 mL를 넣고 초음파로 분산시킨 다음 메탄올을 넣어 정확히 100 mL로 하고 이 액 10 mL를 취해 메탄올을 넣어 정확히 100 mL로 한 후 0.45 μm 여과막을 이용, 여과하여 검액으로 하였다. 따로 DPF 표준품 약 15 mg을 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 녹여 100 mL로 하고 이 액 10 mL를 취해 메탄올을 넣어 정확히 100 mL로 한 후 0.45 μm 여과막을 이용, 여과하여 표준액으로 함. 검액 및 표준액 10 μL씩을 가지고 다음의 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 DPF의 피크면적 A_T, A_S를 측정하였다.

$$N,N'\text{-Diferuloylputrescine의 함량(mg)} = N,N'\text{-Diferuloylputrescine 표준품의 함량(mg)} \times \frac{A_T}{A_S}$$

조작조건

검출기 : 자외부흡광광도계(측정파장 330 nm)

칼럼 : C¹⁸ Luna column

칼럼온도 : 30℃

유량 : 0.8 mL/분

이동상 : 용매 A (100% 메탄올)

용매 B (0.05% 인산·100% 물)의 기울기 용리

※ 용매 A (100% 메탄올)

용매 B (0.05% 인산·100% 물) : 85% 인산(H₃PO₄) 0.5 mL에 정제수를 넣어 1 L로 함

시간	용매 A	용매 B
0	20	80
5	20	80
10	40	60
20	40	60
25	60	40
30	80	20
35	20	80
40	20	80

나. 물성평가 및 시험 결과

(1) SID Corn BE의 일반물성 평가

(가) SID Corn BE의 일반물성은 pH, 건조감량(%), 강열잔분(%), 회분(%)에 대하여 평가하고 결과에 따라 그 기준을 설정하였다. pH는 4개 Lot가 약 4.5 부근의 pH를 나타내었으며 오차범위(일반적으로 ± 1.0)를 고려하여 4.0~6.0의 기준을 설정하였다.

(나) 건조감량(%)은 약 3~5% 정도로 확인 되었으며 5.0% 이하로서 기준을 설정하였다.

(다) 강열잔분(%) 및 회분(%)은 약 2~4% 정도로 확인되었으며 각각 4.0% 이내로 기준을 설정하였다.

(라) Lot별 Corn BE 원료의 일반물성 평가결과

측정시료	pH	건조감량(%)	강열잔분(%)	회분(%)
MC003-0D821	4.50 ± 0.12	5.07 ± 0.25	3.52	3.36
SCB001-0I807	4.49 ± 0.03	4.00 ± 0.62	2.98	2.85
SCB003-0K807	4.48 ± 0.06	4.57 ± 0.21	3.23	3.05
SCB004-0A916	4.81 ± 0.04	3.83 ± 0.31	3.42	2.99

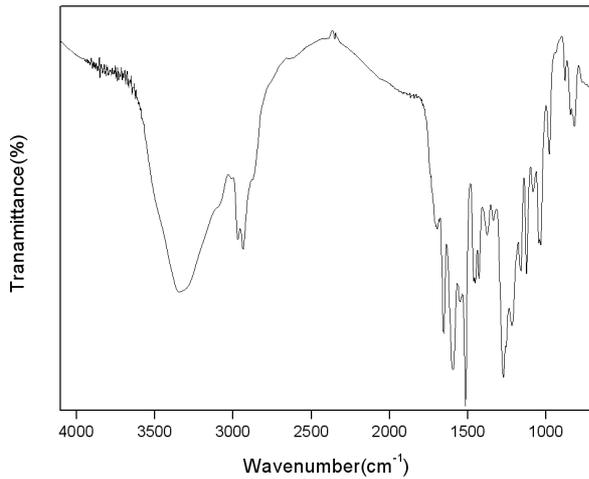
(2) SID Corn BE의 확인시험

(가) IR spectrum

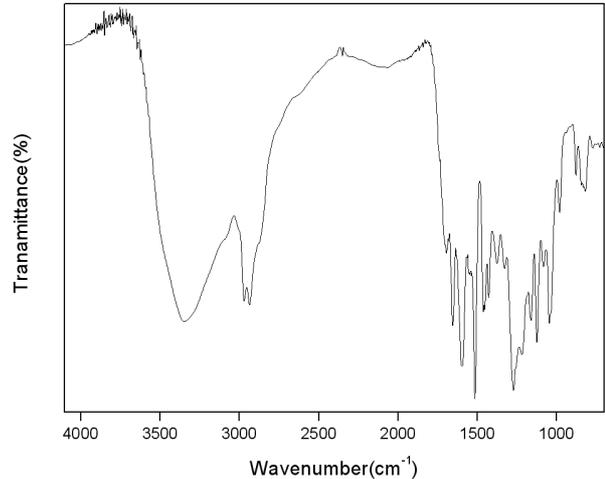
① SID Corn BE의 IR spectrum으로부터 SID Corn BE의 주성분인 DFP의 구조에 따른

특성 peak를 선정하여 확인시험의 기준으로 설정하였다.

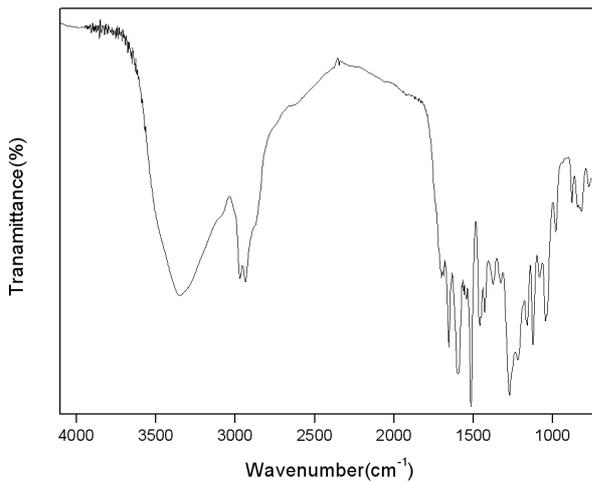
- ② Secondary amide의 구조를 갖는 DFP는 SID Corn BE에서 20% 이상의 함량으로 존재 함으로서 IR spectrum에서 그 특징적인 peak가 나타났다. 특성 peak는 secondary amide N-H stretch peak 및 DFP구조에 포함된 OH- stretch peak가 3500~3200 cm^{-1} 에서 나타나며, NH-bend peak가 1570~1515 cm^{-1} 부근에서 나타나며, C-N stretch peak가 1310~1230 cm^{-1} 에서 강하게 나타나는 것을 확인하였으며 IR spectrum을 이용한 확인시험 기준으로 설정하였다.



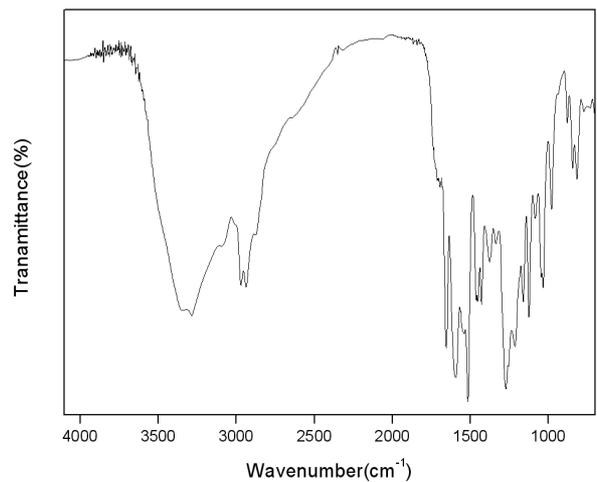
MC003-0D821



SCB001-0I807



SCB003-0K807



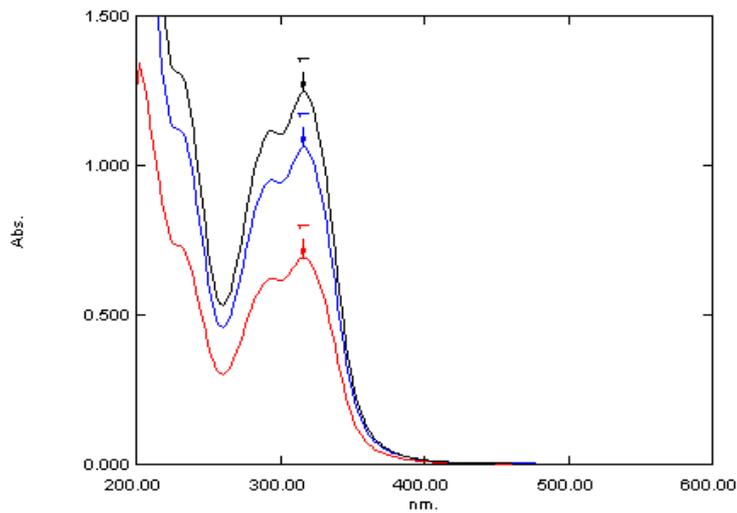
SCB004-0A916

(나) UV spectrum

- ① SID Corn BE의 UV spectrum은 SCB001-0I807을 이용하여 적정농도(최대피크의 흡광도가 1 부근이 되는 농도)를 검색하였으며 각각 30, 26, 17 mg/L의 농도에서 UV spectrum을 분석하였다.
- ② 이 결과를 바탕으로 확인시험 측정농도를 20 mg/L로 설정하고 각각의 SID Corn BE Lot 별로 UV spectrum을 측정하였다.
- ③ SCB001-0I807의 농도별 UV spectrum에서 최대흡수파장 및 흡광도

측정농도(mg/L)	Max λ (nm)	흡광도
30	316.00	1.246
26	316.00	1.061
17	316.00	0.692

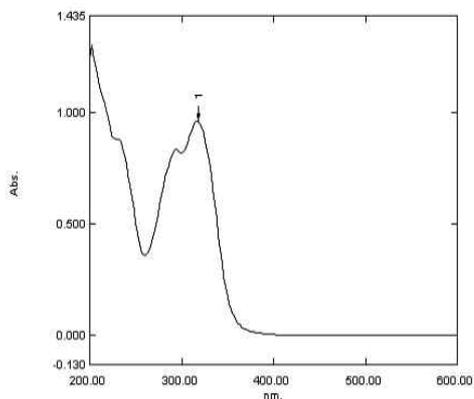
④ SCB001-0I807의 농도별 UV spectrum에서 최대흡수파장 및 흡광도



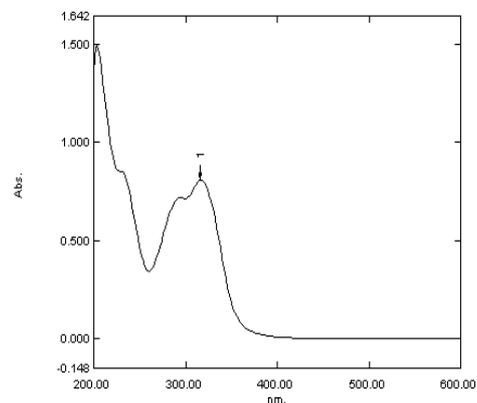
⑤ SID Corn BE의 Lot 별 UV spectrum결과를 보면 각각의 원료가 316.0 또는 318.0 nm 의 파장에서 최대 흡광도 값을 갖는 것으로 확인되었으며 이에 UV spectrum 확인시험 기준을 Max λ = 316.0 ± 4.0으로 설정하였다.

⑥ Lot 별 SID Corn BE의 UV spectrum에서 최대흡수파장 및 흡광도

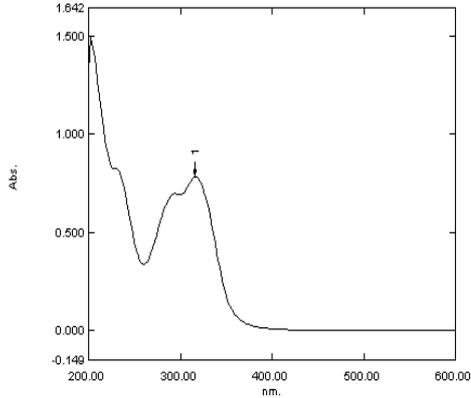
측정시료	Max λ (nm)	흡광도	측정농도(mg/L)
MC003-0D821	318.00	0.962	20
SCB001-0I807	316.00	0.808	20
SCB003-0K807	316.00	0.780	20
SCB004-0A916	316.00	0.692	10



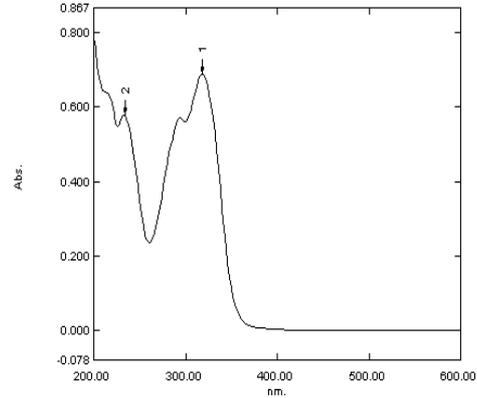
MC003-0D821



SCB001-0I807



SCB003-0K807



SCB004-0A916

(3) SID Corn BE의 순도시험 및 미생물 시험

(가) SID Corn BE의 순도시험은 중금속(납) 및 비소함량을 평가하였으며, 일반적인 추출물 원료의 중금속(납) 및 비소함량 기준인 10 ppm(납) 및 2 ppm(비소) 이하 기준에 적합성 여부를 화장품원료기준의 비색법에 따라 분석결과 기준치 이내로 적합한 것으로 확인하였다.

(나) SID Corn BE의 미생물 시험은 박테리아, 진균, 이스트의 주요 미생물 지표에서 100 cfu/mL 이하의 기준치에 적합한 것으로 확인하였다.

(4) SID Corn BE의 정량시험

(가) SID Corn BE의 정량시험법은 1년차 연구과제에서 확립된 바 있다.

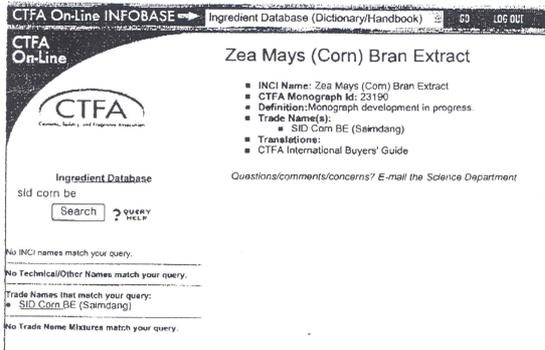
(나) SID Corn BE의 주성분인 DFP의 함량을 SID Corn BE 정량시험법에 따라 측정하였으며, 시료 4종 모두 DFP의 Retention time이 일정한 시간대에서 확인하였다.

(다) SID Corn BE의 Lot 별 DFP 함량(%)

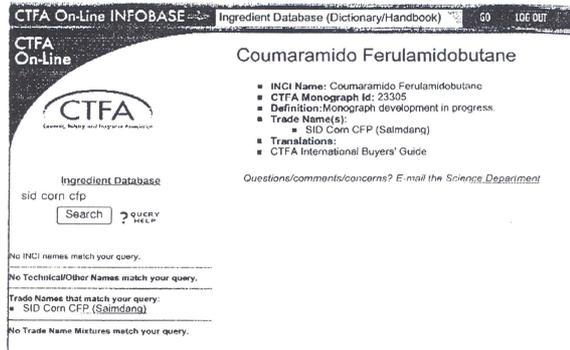
측정시료	DFP 함량(%)
MC003-0D821	25.109 ± 0.805
SCB001-0I807	17.933 ± 0.805
SCB003-0K807	17.006 ± 0.007
SCB004-0A916	50.265 ± 0.186

다. ICID (국제화장품원료집) 등재

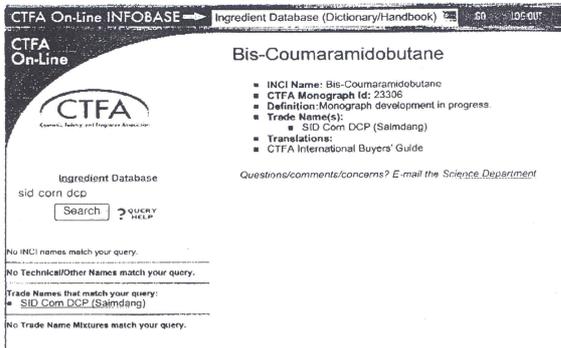
일자	상품명	ICID Name	CTFA File No.	CTFA Mono ID
08-06-12	SID Corn BE	Zea Mays (Corn) Bran Extract	18626	23190
08-06-18	SID Corn CFP	Coumaramido Ferulamidobutane	18631	23305
08-06-18	SID Corn DCP	Bis-Coumaramidobutane	18632	23306
08-06-18	SID Corn DFP	Bis-Ferulamidobutane	18633	23307



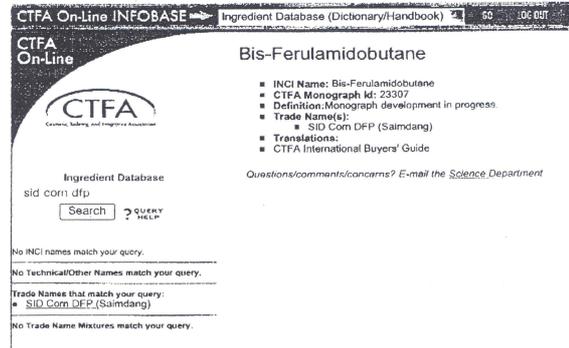
SID Corn BE



SID Corn CFP



SID Corn DCP



SID Corn DFP

6. 옥수수겨추출물 적용 미백화장품 및 자외선차단 화장품의 안정성 및 역가 평가

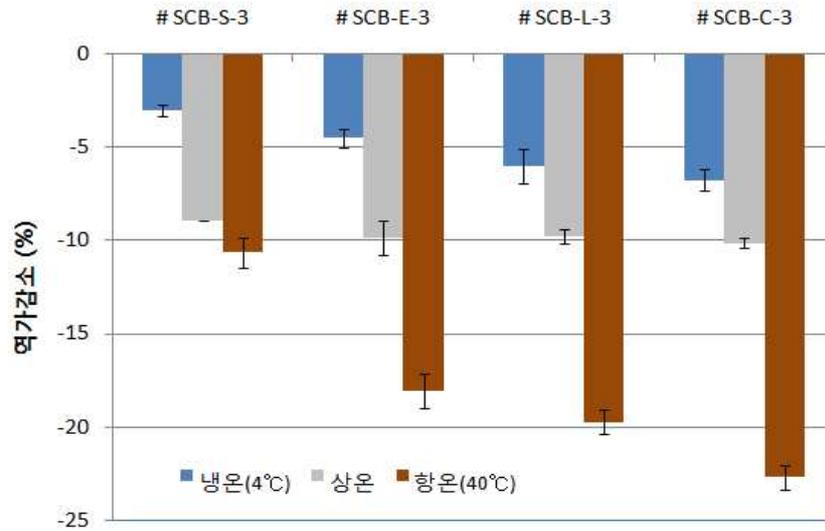
가. 미백화장품

(1) 시료준비

- SID Corn BE : DFP 50% 함유 옥수수겨추출물(SCB005-0G920)

시료	제형	설명
# 나노베이스	SID Corn BE 함유 나노에멀전 베이스	SID Corn BE 0.2% 함유 나노에멀전
# SCB-S-3	화장수 타입	SID Corn BE 함유 나노에멀전 50% 함유된 화장수
# SCB-E-3	에센스 타입	SID Corn BE 0.1% 함유
# SCB-L-3	유액 타입	SID Corn BE 0.1% 함유
# SCB-C-3	크림 타입	SID Corn BE 0.1% 함유

- (2) 실험조건 : 냉온(4°C) 및 향온(40°C)에서 90일까지 보관, 30일 간격 역가변화 측정
 (3) 역가평가



냉온 조건에서는 3~5% 역가감소를 나타내 양호하였으나, 향온 보관 조건에서는 10~20% 정도 역가가 감소하였다. DFP의 역가가 온도 및 제형에 영향을 받는 것으로 보였다.

(4) 변색안정성 평가

- 옥수수겨추출물 함유 미백 4종 제품의 보관 온도별 100일 보관시료 색상비교

	냉온	상온	향온		냉온	상온	향온
화장수				유액			
에센스				크림			

화장수는 거의 변색이 일어나지 않았으며, 에센스가 상대적으로 많이 변색됨. 유액과 크림은 향온에서 약간 변색. 각 제형에 함유된 다른 성분들에 대한 영향도 고려되어야 한다.

(5) 사용성 평가

(가) 시료설명

- 동일한 제형에 각 주성분을 달리하여 비교 평가

- SID Corn BE : DFP 25% 함유 옥수수겨추출물(MC003-0D821)

- ① 미백 화장수 : P (arbutin), Q (control - 첨가하지 않음), R (SID Corn BE)
- ② 미백 에센스: P (arbutin), Q (control), R (SID Corn BE)
- ③ 미백 유액 : J (control), K (SID Corn BE), Q (arbutin)
- ④ 미백 크림 : Q (arbutin), R (SID Corn BE), T (control)

(나) 평가방법

- ① 평가대상 : 자사 연구소 내부인원(10명)
- ② 평가항목 : 퍼짐성, 발림성, 흡수력, 끈적임, 향취, 사용 후 느낌
- ③ 평가점수 : 5 점법으로 평가 / 매우 좋음(5), 좋음(4), 보통(3), 나쁨(2), 매우나쁨(1)
- ④ 평가기간 : 2개월

(다) 평가결과

- 회수율 : 70%, 10명 중 7명 결과 회수

품평항목	미백화장수			미백에센스			미백유액			미백크림		
	P	Q	R	P	Q	R	J	K	Q	Q	R	T
퍼짐성	4.0	4.0	3.9	3.9	4.1	4.0	4.1	4.3	3.9	4.3	4.3	4.3
발림성	4.0	4.0	3.9	3.9	4.3	4.1	4.1	4.3	3.8	4.1	4.0	4.1
흡수력 ⁺	3.9	3.9	3.9									
끈적임	3.3	3.5	3.0	3.4	3.1	2.9	3.8	3.9	3.6	3.6	3.6	3.8
향취	3.1	3.0	2.8	3.1	3.1	2.7	3.1	2.9	3.3	2.9	2.5	3.5
사용 후 느낌	3.5	3.8	3.4	3.4	3.6	3.4	3.8	3.9	3.5	3.6	3.4	3.8
평점	3.6	3.7	3.5	3.5	3.6	3.8	3.8	3.9	3.6	3.7	3.6	3.9

⁺흡수력: 미백화장수만 평가

나. 자외선차단 화장품

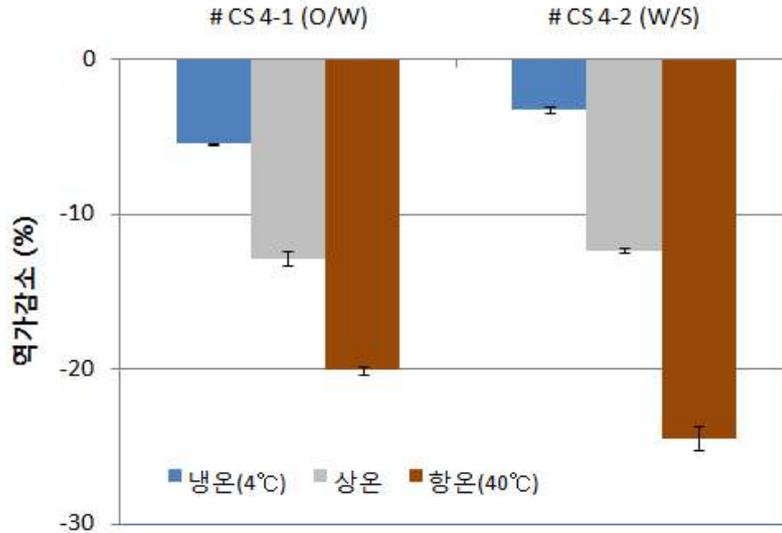
(1) 시료준비

- SID Corn BE : DFP 25% 함유 옥수수겨추출물(MC003-0D821)
- 자사 O/W 및 W/S 크림 타입 자외선차단 제품에 적용

(2) 실험조건 : 냉온(4°C) 및 향온(40°C)에서 90일까지 보관, 30일 간격 역가변화 측정

(3) 역가평가

- 자외선차단 제품 처방에서의 DFP의 역가 안정성은 O/W 타입이나 W/S 타입에서 큰 차이는 없었지만, 미백화장품에 비해 역가 안정성이 좀 더 낮았다.
- DFP의 역가가 40°C 보관 조건에서 80% 정도 역가가 유지되어, 온도 및 제형에 영향을 받는 것으로 나타났다.



(4) 사용성 평가

(가) 시료설명

- SID Corn BE 함유 O/W 타입 및 W/S 타입 자외선차단 제품
- SID Corn BE : DFP 25% 함유 옥수수겨추출물(MC003-0D821)
- ① O/W 타입 : L (control - 첨가하지 않음), K (SID Corn BE)
- ② W/S 타입 : M (control - 첨가하지 않음), N (SID Corn BE)

(나) 평가방법

- ① 평가대상 : 자사 연구소 내부인원(8명)
- ② 평가항목 : 퍼짐성, 발림성, 끈적임, 향취, 사용 후 느낌
- ③ 평가점수 : 5 점법으로 평가 / 매우 좋음(5), 좋음(4), 보통(3), 나쁨(2), 매우나쁨(1)
- ④ 평가기간 : 2개월

(다) 평가결과

품평항목	O/W type Cream		W/S type Cream	
	L	K	M	N
퍼짐성	3.8	3.9	4.2	4.3
발림성	3.8	3.9	4.0	4.0
끈적임	3.2	3.3	3.0	3.1
향취	3.3	3.0	3.3	3.0
사용 후 느낌	3.7	3.6	3.4	3.4
평점	3.6	3.5	3.6	3.6

사용감 측면에서는 대체로 큰 차이가 없는 것으로 나타났으며, 향취에서 옥수수겨추출물이 함유된 시료가 독특한 한방적인 특이취가 나타났다.

(5) 옥수수겨추출물의 자외선차단효과 평가

(가) 내용 : 옥수수겨추출물의 자외선차단 효과를 평가하기 위하여 SPF Analyzer를 이용한 *in vitro* SPF assay를 수행

(나) 시료준비

- SID Corn BE : DFP 25% 함유 옥수수겨추출물(MC003-0D821)

평가지료	내용
5% 옥수수겨추출물 함유 제형	5% 옥수수겨추출물 in patrolatum base
# CS 3-1	5% 옥수수겨추출물 함유 O/W cream base
# CS 3-2	5% EHMC 함유 O/W cream base
# CS 3-3	5% 옥수수겨추출물 및 EHMC 함유 O/W cream base

(다) 평가결과

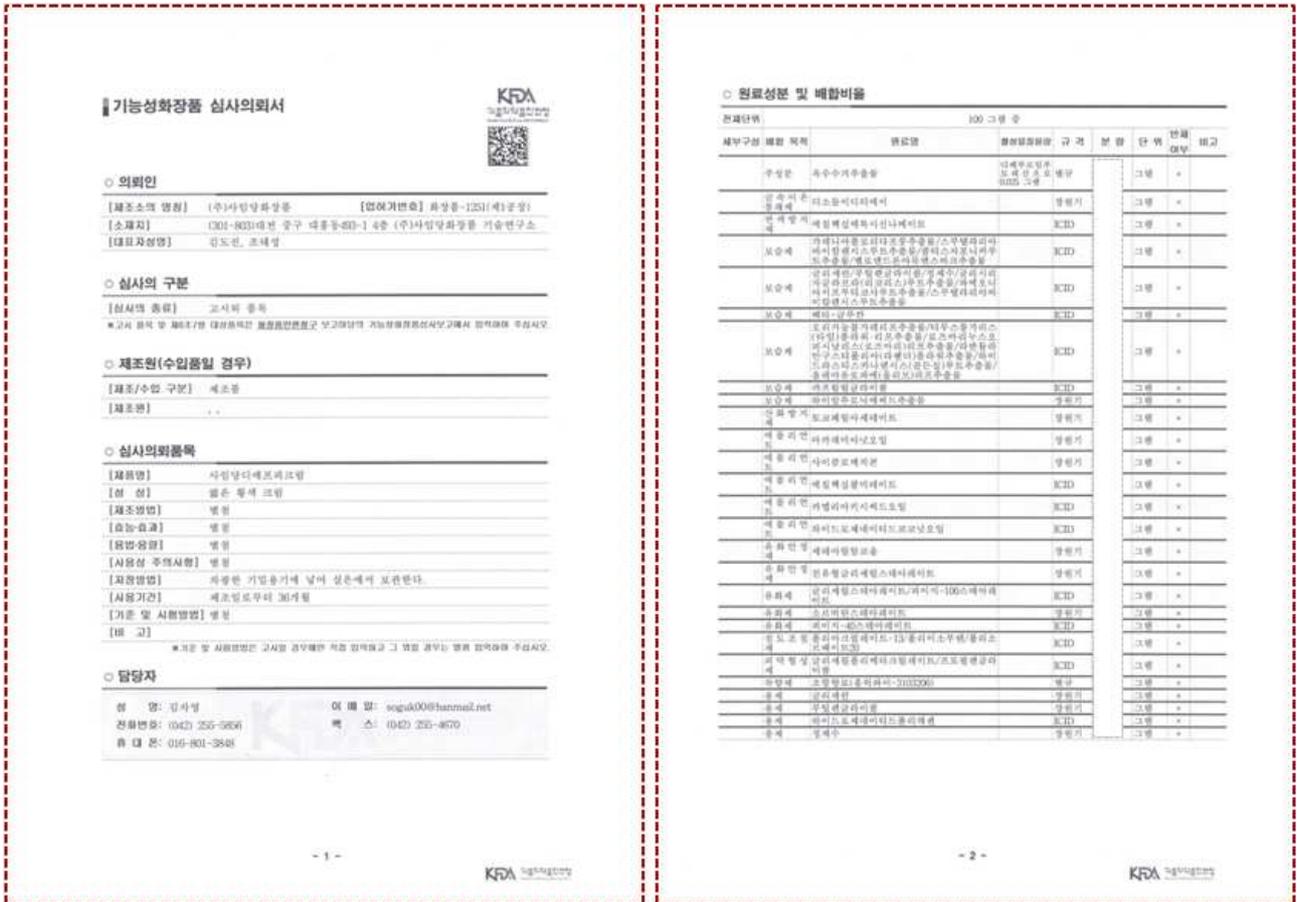
측정시료	SPF	UV-A/UV-B ratio	Critical wavelenth(nm)
5% in Patrolatum	6.24 ± 1.03	0.464	356.0
# CS 3-1	7.71 ± 1.06	0.410	355.0
# CS 3-2	9.70 ± 1.15	0.165	331.3
# CS 3-3	20.9 ± 1.81	0.297	347.4

옥수수겨추출물은 기존 UV-B 자외선차단제인 EHMC보다 SPF (자외선차단능력)은 낮지만 UV-A/UV-B ratio가 커서 좀 더 넓은 영역의 자외선을 차단하였다.

7. 미백화장품에 대한 KFDA 인증

가. KFDA 허가신청

- (1) 제품명 : 사임당 디에프크림
- (2) 일자 : 2010. 02
- (3) 기능성 : 미백화장품
- (4) 주성분 : 옥수수겨추출물(SID Corn BE, MC003-0D821, **Table 13**)
- (5) 기능성화장품 심사의뢰서



8. 미백화장품 시제품 3종 제조

가. 용해도

- (1) 시료 : SID Corn BE (DFP 25% 함유 옥수수겨추출물, MC003-0D821, Table 13)
- (2) 용매 : 물, EtOH, BG, PG, DPG
- (3) 농도 : 1, 5, 10%
- (4) 결과 :

용매	용해도			비고
	1%	5%	10%	
물	현탁	-	-	
EtOH	용해 (클리어)	용해 (클리어)	용해 (클리어)	
1,3-BG	용해 (클리어)	용해 (클리어)	용해 (클리어)	Butylene Glycol
PG	용해 (클리어)	용해 (클리어)	용해 (클리어)	Propylene Glycol
DPG	용해 (클리어)	용해 (클리어)	용해 (클리어)	Dipropylene Glycol

- 용해속도로 상대비교 시 : EtOH >> PG > DPG > 1,3-BG의 용해도 순서

나. 미백 에센스

구분	미백 에센스
SID Corn BE (DFP 25% 함유 옥수수겨추출물, MC003-0D821)	0.1%
성상	미황색 로션상
pH	7.2
점도	6,500 cps
ϕ (O/W)	3.0%
사진	

다. 미백 유액

구분	미백 유액
SID Corn BE (DFP 25% 함유 옥수수겨추출물, MC003-0D821)	0.1%
성상	미황색 로션상
pH	6.4
점도	4,800 cps
ϕ (O/W)	17.0%
사진	

라. 미백 크림

구분	미백 크림
SID Corn BE (DFP 25% 함유 옥수수겨추출물, MC003-0D821)	0.1%
성상	미황색 크림상
pH	7.0
점도	45,000 cps
ϕ (O/W)	20.0%
사진	

제 4 절. 옥수수겨추출물의 안전성, 적용 미백화장품의 유효성 임상평가

1. 연구내용 범위

- 소재의 미백활성 유효성 평가(*in vitro* 시험)
- 소재의 안전성 및 독성 평가(동물시험)
- 소재의 인체피부 안전성 평가(인체침포시험)
- 미백화장품의 인체피부 안전성 평가
- 미백화장품의 인체피부 효능 평가

2. 옥수수겨추출물의 미백활성 유효성 평가(*in vitro* 시험)

가. 개요

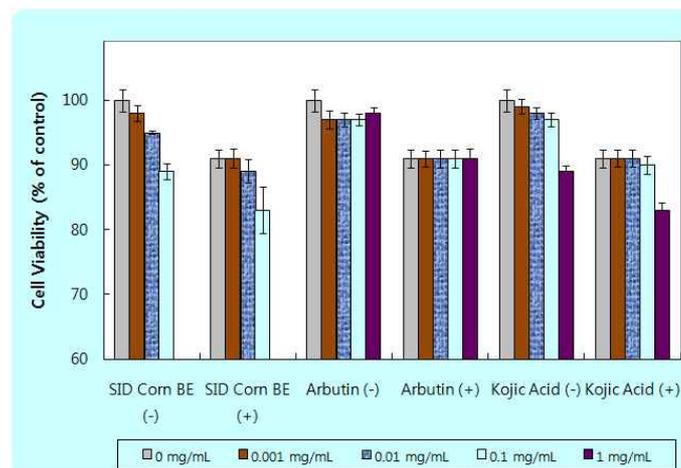
- (1) SID Corn BE : DFP 25% 함유 옥수수겨추출물(MC003-0D821, **Table 13**)
- (2) 시험기관 : 경북대학교 의학전문대학원 분자의학교실
- (3) 시험방법 : KFDA, 기능성화장품의 유효성 평가를 위한 가이드라인

나. 보고서

최종 보고서		
시험 제목	SID Corn BE의 미백 효능 평가 시험	
의뢰기관	의뢰일	2008년 4월
	기관명	(주)사임당화장품 대표이사 조태성, 김도진
	소재지	충청북도 영동군 영동읍 계산리 805-5
	담당자	김 자 영 과장
	소재지	주소 : 충청북도 영동군 영동읍 계산리 805-5 전화 : 042-255-5856 팩스 : 043-744-4857 E-mail : soguk00@hanmail.net
시험기관	기관명	경북대학교 의학전문대학원 분자의학교실
	기관장	조교수 부 용 출 
	소재지	주소 : 대구광역시 중구 동인동 2가 101번지 전화 : 053-420-4946 팩스 : 053-426-4944 E-mail : ycboo@knu.ac.kr
	시험책임자	농학박사 부 용 출 
연구 인력 및 시설	별첨 2. 참조	
시험기간	2008년 4월 2일 ~ 2008년 5월 31일	

다. 결과

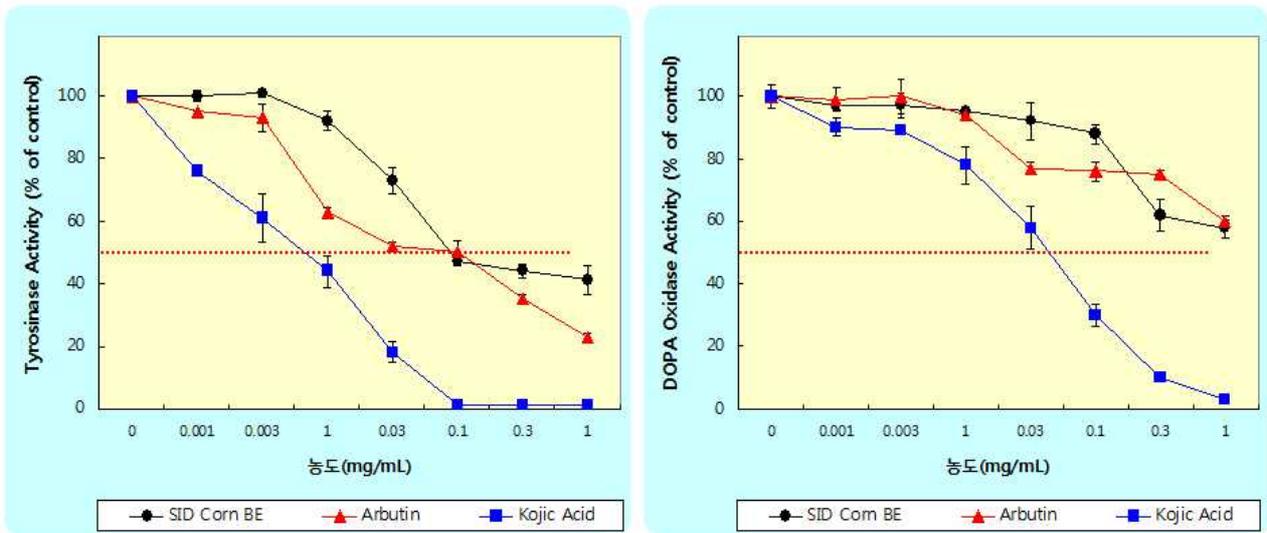
(1) Cell viability



(-) : without α -MSH, (+) : with α -MSH

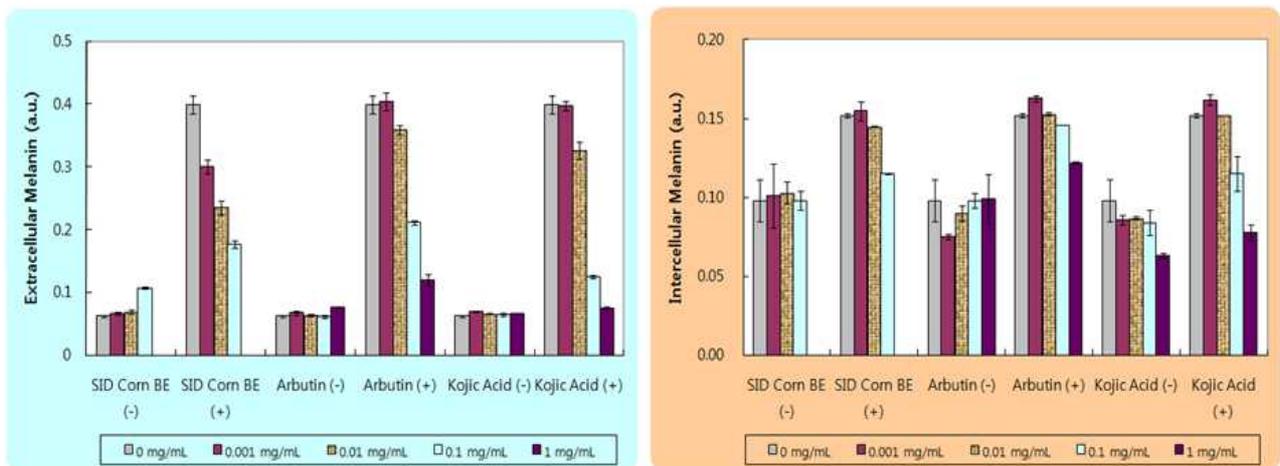
SID Corn BE 0.1 mg/mL 농도에서 80% 이상의 세포생존율을 보였다.

(2) Tyrosinase inhibition assay



Tyrosinase activity inhibition assay에서 SID Corn BE 0.1 mg/mL 농도에서 arbutin과 유사하였으며, DOPA oxidase activity inhibition assay에서는 전반적으로 arbutin과 유사하였다.

(3) Melanogenesis inhibition assay



- (-) : without α -MSH, (+) : with α -MSH

세포 밖 멜라닌 방출 저해시험에서 SID Corn BE는 코직산보다 약하였으나, 알부틴보다 강하였고, 세포 내 멜라닌 축적 저해시험에서는 코직산과 유사하며 알부틴보다 양호하였다.

3. 옥수수겨추출물의 안전성 및 독성 평가(*in vivo* 시험)

가. 개요

(1) SID Corn BE : DFP 25% 함유 옥수수겨추출물(MC003-0D821, Table 13)

(2) 시험기관 : 한국화학시험연구원

(3) 시험방법

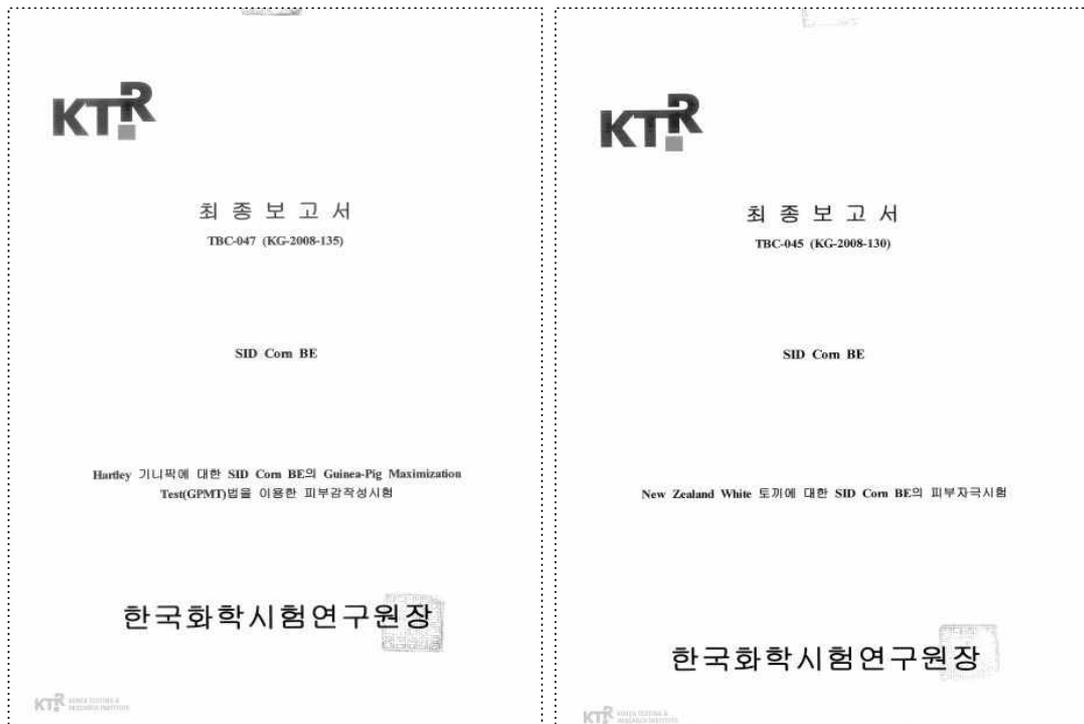
(가) 식약청 고시 제2005-79호(2005. 12. 21) 비임상시험관리기준

(나) 식약청 고시 제2008-17호(2008. 04. 03) 기능성화장품 등의 심사에 관한 규정

(다) 식약청 고시 제2005-60호(2005. 10. 21) 의약품 등의 독성시험기준

나. 보고서





다. 결과

시험명	동물	결과	비고
광감작성시험	기니픽	PAI = 0 (non irritant)	홍반, 가피형성 및 부종 등의 자극성
광독성시험	기니픽	PTI = 0 (non irritant)	홍반, 가피형성 및 부종 등의 자극성
단회투여(경구)독성시험	랫드	치사량 > 2,000 mg/kg	치사량 > 2,000 mg/kg
안점막시험	토끼	AOI = 2.00, 1.33 (non irritant)	안점막의 발적
피부감작성시험	기니픽	감각지수, 빈도지수 = 0 (매우약함)	피부감작성
피부자극시험	토끼	PII = 0.71 (mild irritant)	홍반, 가피형성 및 부종 등의 자극성

SID Corn BE는 피부자극시험에서 일차피부자극지수가 0.71로 mild irritant (약한 자극성) 외에 자극이 없었다.

4. 옥수수겨추출물 및 옥수수겨추출물 함유 크림의 인체피부 안전성 평가(인체접촉시험)

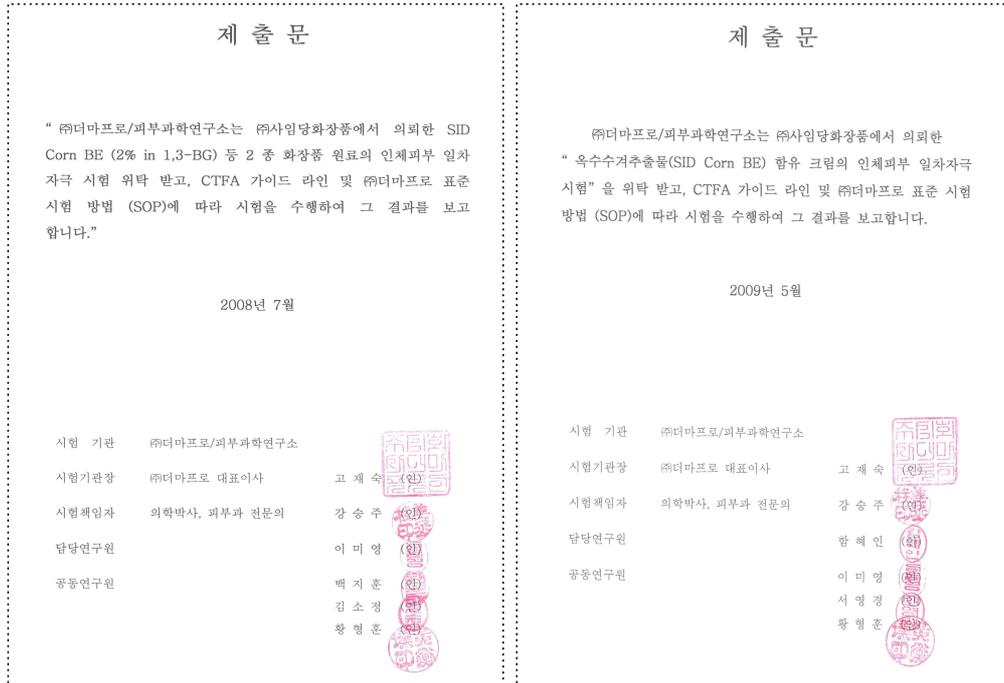
가. 개요

- (1) SID Corn BE : DFP 25% 함유 옥수수겨추출물(MC003-0D821, Table 13)
- (2) 시험기관 : 더마프로
- (3) 시험방법

(가) CTFA Guide Line

(나) 더마프로 표준시험방법(SOP)

나. 보고서



다. 결과

(1) SID Corn BE 원료에 대한 인체첨포시험

- (가) 시료 : SID Corn BE 2%, 5%
- (나) 피시험자 나이 : 31.8 ± 9.7세
- (다) 결과

시료명	No. of Resp.	48hr			72hr			반응도		
		1+	2+	3+	1+	2+	3+	48hr	72hr	Mean
SID Corn BE (2% in 1,3-BG)	1	1	-	-	-	-	-	0.8	0.0	0.4
SID Corn BE (5% in 1,3-BG)	1	1	-	-	-	-	-	0.8	0.0	0.4
Squalane	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

SID Corn BE 2%, 5% 시료에서 1+grade의 피부반응이 1명에게서 관찰되었으나, 72시간 경과 시 모두 소멸되어, 시료 2종은 인체 피부 일차자극 측면에서 저자극 범주의 물질로 판단되었다.

(2) SID Corn BE 함유 크림에 대한 인체첨포시험

- (가) 시료 : ID Corn BE 0.1% 함유 크림
- (나) 피시험자 나이 : 35.2 ± 8.5세

(다) 결과

시료명	No. of Resp.	48hr			72hr			반응도		
		1+	2+	3+	1+	2+	3+	48hr	72hr	Mean
대조군	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
옥수수겨추출물 (SID Corn BE) 함유 크림	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
Squalane (negative control)	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

SID Corn BE 0.1% 함유 크림에서는 아무런 피부반응도 관찰되지 않았다. 본 시료는 인체 피부 일차자극 측면에서 저자극 범주의 물질로 판명되었다.

5. 미백화장품의 인체피부 효능 평가

가. 개요

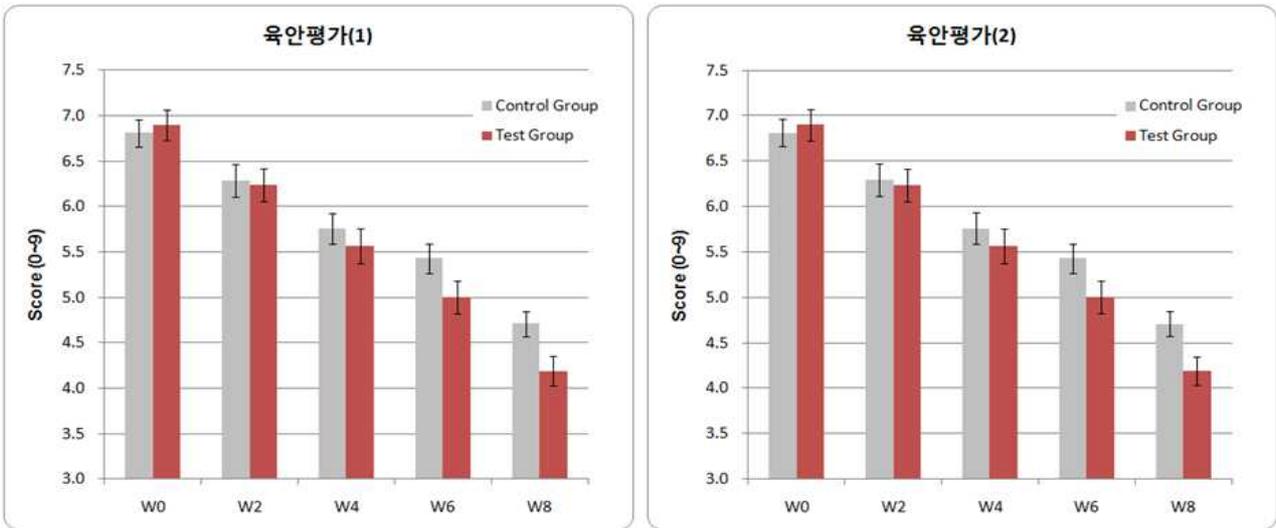
- (1) SID Corn BE : DFP 25% 함유 옥수수겨추출물(MC003-0D821, Table 13)
- (2) 시료 : SID Corn BE 0.1% 함유 크림(시험군), 미함유 크림(대조군)
- (3) 시험기관 : 더마프로
- (3) 시험방법
 - (가) 더마프로 표준시험방법(SOP)
 - (나) 피시험자
 - ① 평가인원 : 21명 / 피부타입 : 건성(5명), 중건성(5명), 중성(7명), 중지성(4명)
 - ② 평균연령 : 39.4 ± 4.7세

나. 보고서

제 출 문	인체 시험결과 소견서
<p>더마프로는 ㈜사임당 화장품에서 의뢰한 "옥수수겨추출물(SID Corn BE) 함유 크림의 피부 미백효과 평가시험"을 위탁 받고, 기능성화장품 등의 심사에 관한 규정 및 ㈜더마프로/피부과학연구원 소의 표준시험방법(SOP)에 따라 시험을 수행하여 그 결과를 다음과 같이 보고합니다.</p> <p style="text-align: center;">2009년 8월</p> <p>시험기관: 더마프로/피부과학연구원 시험기관장: 더마프로 대표이사 시험책임자: 의학박사</p>	<p>1. 제품명 : 옥수수겨추출물(SID Corn BE) 함유 크림 2. 시험기간 : 2009년 5월 18일 - 2009년 7월 29일 3. 시험결과 :</p> <p>가. 유효성 : 옥수수겨추출물(SID Corn BE) 함유 크림은 숙안평가, 멜라닌 지수 측정, 피부색 측정(TTA° value), 효능에 관한 설문평가, 사용성 종합 설문평가 결과 피부 미백에 도움을 주는 제품으로 판단된다. 나. 안전성 : 옥수수겨추출물(SID Corn BE) 함유 크림은 본 시험기간 동안 모든 피험자에게서 피부 이상반응은 관찰되지 않았다.</p> <p>㈜사임당 화장품에서 의뢰한 옥수수겨추출물(SID Corn BE) 함유 크림의 피부 미백효과 평가 결과 본 시험제품은 피부 미백에 도움을 주는 제품으로 판단된다.</p> <p>시험기관: 더마프로/피부과학연구원 시험기관장: 더마프로 대표이사 시험책임자: 의학박사 담당연구원: 의학박사, 피부과 전문의 공동연구원: 의학박사, 피부과 전문의</p>

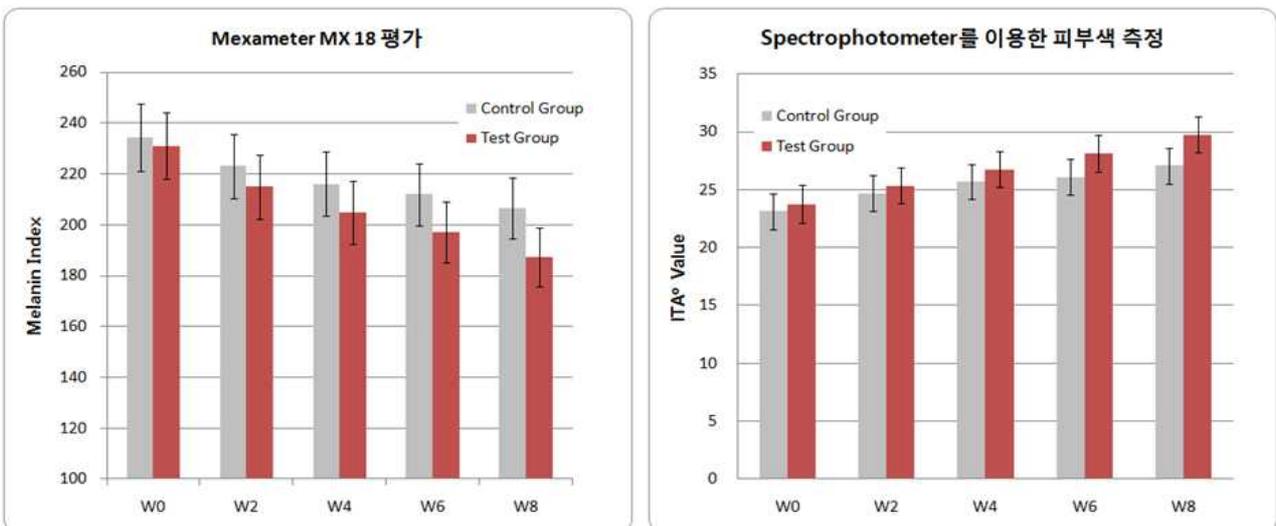
다. 결과

(2) 육안평가



육안평가는 군간 비교 시 시험군이 대조군에 비해 제품 사용 6주, 8주 후 시점에서 피부미백 효과가 유의하게 높았다($p < 0.05$). 각 시점별 제품사용 전과 비교 시 시험군과 대조군 모두 각 평가시점에서 유의한 미백 개선효과를 보였다($p < 0.05$).

(2) 기기평가

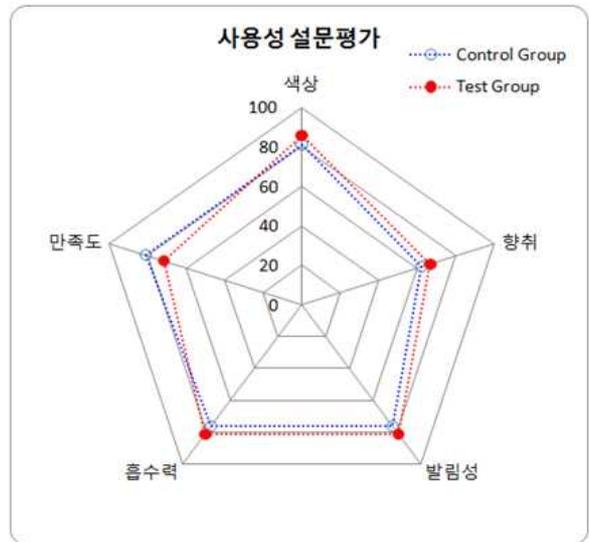
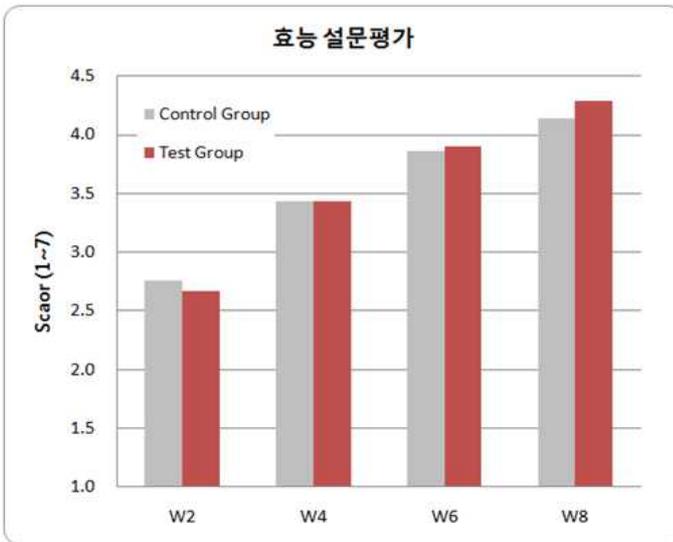


Mexameter를 이용한 시험에서 SID Corn BE 함유 크림은 SID Corn BE 미함유 대조군 크림에 비하여 melanin index (멜라닌지수)가 낮았다.

멜라닌지수(melanin index)는 군간 비교 시 제품사용 4주, 6주, 8주 후 시점에서 시험군이 대조군에 비해 유의한 피부 미백 개선효과를 보였다($p < 0.05$). 또한 각 시점별 제품사용 전과 비교 시 시험군과 대조군 모두 각 평가시점에서 유의한 미백 개선효과를 보였다($p < 0.05$).

ITA° value는 군간 비교 시 제품사용 8주 후 시점에서 시험군이 대조군에 비해 유의한 피부 미백 개선효과를 보였다($p < 0.05$). 또한 각 시점별 제품사용 전과 비교 시 시험군과 대조군 모두 각 평가시점에서 유의한 미백 개선 효과를 보였다($p < 0.05$).

(3) 설문평가



제품의 미백 효능에 관한 설문평가는 사용 6주, 8주 후 시점에서 시험군이 대조군에 비해 높
이 평가되었고, 사용성 종합 설문평가 결과 ‘색’, ‘향’, ‘발림성’, ‘흡수력’ 항목에서 시험군이 대조
군 보다 긍정적 답변비율이 높았다.

피부 안전성 평가 결과, 본 시험기간 동안 총 21명의 피험자에게서 피부 이상반응은 관찰되
지 않았다.

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

제 1 절. 연도별 목표달성도

1. 1차년도

세부과제	목표	평가착안점	달성도(%)
소재개발 및 특성분석	<p>옥수수겨로부터 HCAD의 대량분리 및 생산실험, 동정 그리고 항산화 활성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 옥수수겨로부터 HCAD의 분리, 동정 및 화학적 특성분석 - 옥수수겨로부터 분리된 HCAD의 물리·화학적 안정성 조사 - 옥수수겨로부터 분리된 HCAD의 항산화활성 측정 - 효소처리, 용매분획 및 흡착이온수지 크로마토그래피에 의한 폴리아민유도체의 대량분리 및 생산실험 	<ul style="list-style-type: none"> - 옥수수겨로부터 HCAD 분리 및 특성분석 - 물리·화학적 평가 - 항산화활성 평가 - HCAD 중 폴리아민유도체의 대량분리 	100
소재평가 및 화장품개발	<p>옥수수겨로부터 추출된 HCAD에 대한 유효성, 미백기전 및 자외선차단 관련 효능 평가(<i>in vitro</i> 평가)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 항산화활성 평가, 미백활성 평가 및 미백활성 기전 연구 - 멜라닌생성 세포의 세포독성 평가 - 자외선차단 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 옥수수겨로부터 추출된 HCAD 및 옥수수겨추출물에 대한 항산화활성 및 미백활성 평가 - 미백기전 평가 - 세포독성 및 자외선차단 평가 	100
피부안전성 및 유효성평가	<p>피부 유효성 및 안전성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 소재의 미백활성 유효성 평가(<i>in vitro</i> 평가) - 소재의 안전성 및 독성 평가(동물시험) 	<ul style="list-style-type: none"> - 옥수수겨추출물에 대한 <i>in vitro</i> 미백활성 평가 - 옥수수겨추출물에 대한 동물 독성평가 	100

2. 2차년도

세부과제	목표	평가착안점	달성도(%)
소재개발 및 특성분석	<p>옥수수 가공 및 화학적 처리에 따른 HCAD 정량분석 및 대량 분리기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 옥수수 품종별, 가공방법, 및 제분방법에 따른 HCAD의 함량 변화 분석 - 효소처리 및 산 또는 알칼리 처리에 따른 HCAD의 함량 변화 분석 - 여러 칼럼크로마토그래피에 의한 옥수수겨로부터 HCAD의 대량 분리기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 옥수수 품종별, 가공방법, 및 제분방법에 따른 HCAD의 함량변화 분석 - 효소처리에 따른 HCAD의 함량변화 분석 - 칼럼크로마토그래피에 의한 옥수수겨로부터 HCAD의 대량 분리기술 개발 	100
소재평가 및 화장품개발	<p>소재개발, 소재 표준화 및 원료 등재</p> <ul style="list-style-type: none"> - 피부에 효과적인 전달을 위한 나노캡슐(나노입자) 소재 개발 및 물성평가 - 안정성 및 역가 안정성 평가 - 표준화, 기준 및 시험방법 확립 - ICID (국제화장품원료집) 등재 	<ul style="list-style-type: none"> - 옥수수겨추출물 함유 나노제형 개발 및 평가 - 나노제형의 안정성 및 역가평가 - 표준화 및 기시법 확립 - ICID 등재(4건) 	100
피부안전성 및 유효성평가	<p>소재의 동물 안전성 및 피부 안전성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 소재의 안전성 및 독성 평가(동물시험) - 소재의 인체피부 안전성 평가(인체접포 시험) - 미백화장품의 인체피부 안전성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 옥수수겨추출물에 대한 동물 독성평가 - 옥수수겨추출물 및 함유 크림에 대한 인체접포 시험(저자극성) 	100

3. 3차년도

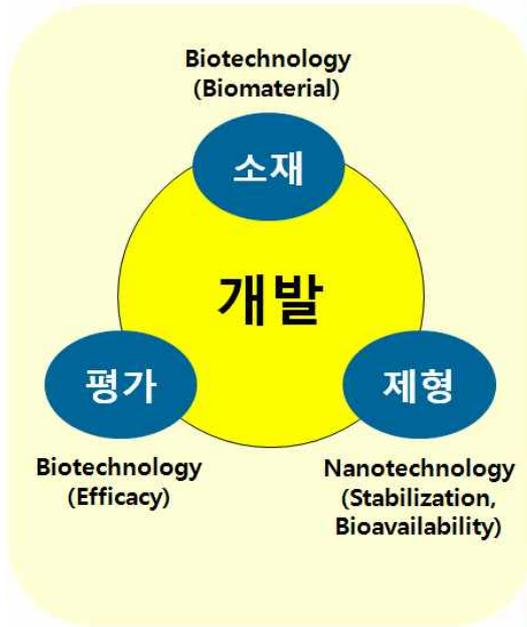
세부과제	목표	평가착안점	달성도(%)
소재개발 및 특성분석	<p>옥수수겨로부터 최종 생산된 HCAD의 물리화학적 spec 작성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 산 또는 알칼리처리, 용매분획 및 흡착이온수지크로마토그래피에 의한 ferulate oligomers의 대량분리 및 생산 - 최종 생산된 HCAD 함유 정제분말의 순도, 함량, 및 화학적 특성에 관한 spec 작성 	<ul style="list-style-type: none"> - 옥수수겨추출물의 대량 분리 및 생산 - 옥수수겨추출물에 대한 규격 작성 	100
소재평가 및 화장품개발	<p>화장품 제형 개발, 제품에 대한 안정성 및 사용성 평가 / 미백화장품 KFDA 인증</p> <ul style="list-style-type: none"> - 미백화장품 제형 점검 및 제품에 대한 안정성 및 역가 안정성 평가 - 자외선차단 화장품 제형 점검 및 제품에 대한 안정성 및 역가 안정성 평가 - 미백화장품 및 자외선차단 화장품에 대한 사용성 평가 - 미백화장품에 대한 KFDA 미백화장품 인증 - 차별화된 유일의 기능성 비고시 미백 소재를 활용한 미백화장품 3종 개발을 위한 처방 및 생산공정 확립 - 시제품 개발 및 제조 	<ul style="list-style-type: none"> - 옥수수겨추출물 함유 미백화장품에 대한 안정성 및 역가 평가 - 옥수수겨추출물 함유 자외선차단 화장품에 대한 안정성 및 역가 평가 - 미백화장품에 대한 KFDA 미백화장품 인증(신청 중) - 옥수수겨추출물 적용 미백화장품 3종 개발 및 시제품 제조 	100
피부안전성 및 유효성평가	<p>미백화장품 임상평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 미백화장품의 인체피부 안전성 평가 - 미백화장품의 인체피부 효능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 옥수수겨추출물 함유 미백 크림에 대한 인체피부 효능 평가 	100

제 2 절. 관련분야 기술발전에서의 기여도

1. 화장품산업의 주요기술

화장품분야의 주요 핵심기술은 소재개발 기술, 제형개발 기술 및 평가기술로 구분된다.

소재는 천연 및 천연유래, 생체친화 및 환경친화 소재개발에 큰 관심이 집중되고 있으며, 제형은 소재의 활성성분을 안정화시키는 제형이나 피부에의 친화성을 향상시켜 피부에의 유효성을 향상시키는 제형에 관심이 집중되고 있다. 또한 평가는 소재개발을 위한 효능 탐색기술이나 제형에 대한 효력을 평가하는 기술, 최근에는 동물시험을 대체할 수 있는 평가법의 개발이 이 슈화되고 있다.



핵심기술	내용
소재기술 • 바이오기술 • 복합화기술	• 천연 및 천연유래 소재 • 생체친화 소재, 환경친화 소재 • 다기능 복합분체
평가기술 • 바이오기술	• 효능성분 스크리닝 • 피부자극 원인규명, 생체대사규명 • 노화유전자 및 노화메커니즘 규명
제형기술 • 나노기술 • DDS기술	• 활성성분 안정화 • 피부친화성증대 • 피부흡수제어, 유효성증대 • 특히 사용감 및 외관의 고급화
감성기술	• Mind Care에 의한 피부건강 • 맞춤형장품, 다양한 기호도 충족 • 다양한 색감, 향취, 사용감 개발 • 디자인 및 외관의 고급화

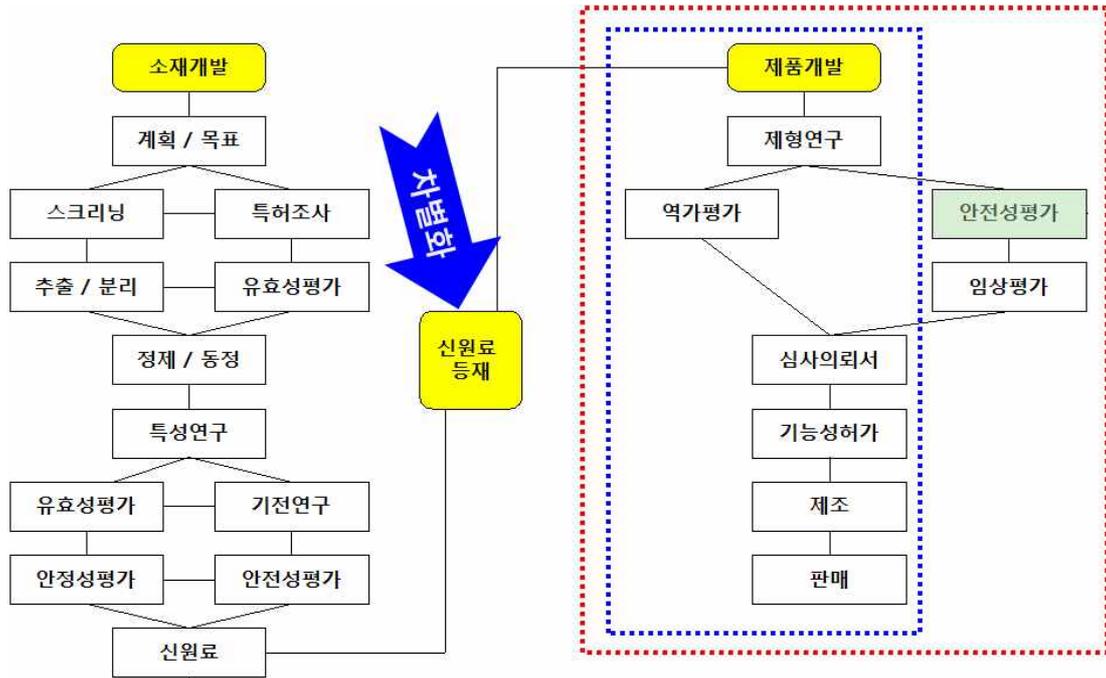
2. 화장품산업의 차별화

화장품의 품질요건 및 개발된 소재의 주요 요건은 안전성, 적용성, 안정성 및 유효성으로 구분된다.

화장품은 주요 요건이 충족되어도 타 경쟁업체와의 차별성이 부각되지 않는다면 다소 상품성의 가치가 감소될 수 있다. 따라서 소재(원료)나 제품에서 차별화를 줄 수 있어야 한다.



차별화를 줄 수 있는 가장 강력한 무기는 신규 소재(신 원료)의 개발로 보인다. 그러나 신규 소재의 개발은 좋은 아이디어가 있어야 하며, 아이디어가 있다 하여도, 최종 적용 및 사업화까지의 목표를 달성하기는 쉽지 않다.



3. 기술발전에의 기여도

본 과제에 의한 옥수수겨추출물은 HCAD, 특히 DFP 및 CFP의 폴리아민컨쥬게이트를 활성 성분으로 하는 천연추출물이다. 기능성 천연추출물 개발에 옥수수겨추출물(SID Corn BE) 개발에 ① 천연물의 추출·분획기술, ② 효소 처리기술, ③ 평가기술(*in vitro* efficacy evaluation technology), ④ 나노소재화·안정화기술이 요구되며, 이외에 ⑤ 안전성시험, ⑥ 임상시험 및 ⑦ 제품화기술이 요구된다.

- (1) 본 과제의 ‘신규소재 개발 및 적용제품의 개발’ 목표를 달성하기 위한 노력으로 화장품에 적용 가능한 신규 소재 4건을 개발, ICID에 등재시켰으며, 안정화 및 유효성을 향상시킬 수 있는 처방 개발이 수행되어, 관련기술의 향상은 물론 타 경쟁제품과는 차별화된 소재 및 제품을 소유할 수 있는 좋은 기회를 얻을 수 있다.
- (2) 국내 기능성화장품 시장은 2008년 11,033억 원으로 전체 시장 대비 17.8% 차지하며, 화장품 전체 시장의 성장보다 3배 이상의 성장을 기대하고 있다. 따라서 많은 화장품 연구자들은 기능성화장품에 적용할 수 있는 신규 소재의 개발에 많은 관심을 가지고 있다. 본 과제를 통해 개발된 옥수수겨추출물은 많은 연구자들이 추구하는 소재 중의 하나로, 연구자들에게 자극이 되는 사례가 될 수 있다.
- (3) 본 과제의 책임자는 천연물 소재 및 기타 신규 소재 개발을 통해 화장품산업의 기술발전에 대한 공로로 2007년 동암화장품연구개발대상을 수상한 바 있으며, 2008년 이달의 엔지니어

상으로 교육과학기술부장관상을 수상한 바 있다. 즉 신규 소재 개발은 기술상을 수상할 만큼 업계의 기술발전에 기여할 수 있는 항목으로 볼 수 있다

- (4) 옥수수겨추출물 함유 제품에 대한 기능성화장품으로서 식약청 심사가 진행 중에 있다. 적합판정의 인증을 받게 되면, 기능성 소재로서 국내 개발 천연추출물은 국내 타 업체는 물론 수입품과도 차별화된 제품의 개발도 기대할 수 있어, 관련 산업에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.
- (5) 또한 화장품 원료의 70~80% 이상이 수입에 의존하고 있는 현실에서 자체적으로 소재 제조기술 확보 및 소재를 제품에 적용함으로써 수입대체 등 경쟁력 확보 등 화장품 산업 활성화에 기여하며, 향장산업뿐만이 아닌 향노화산업인 한방화장품 산업에 대한 연구개발 및 지원사업은 국가적으로 적극 추진이 요구되는 바, 천연물 유래 향노화성분의 개발과 향노화 기능성화장품은 관련산업의 육성 및 활성화와 국민보건 향상에 크게 기여할 수 있다.

제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 실용화 및 산업화 계획

1. 제품 양산계획

본 과제의 주관연구기관인 사임당화장품은 2009년 172억 원 매출액을 기록한 바 있으며, 소재개발, 완제품 제조 및 판매 회사로, 기초, 바디 및 헤어 제품 62종을 제조 및 판매하고 있다.

따라서 따로 양산 계획은 필요하지 않으며, 본 과제를 통해 개발된 소재를 활용, 비고시 미백 기능성 허가를 받게 되면, 기능성 제품의 양산 및 판매가 가능하다.

2. 판로확보 및 마케팅 계획

주관연구기관인 사임당화장품은 전국에 80개 수준의 지사(판매점)를 보유한 방문판매 전문 회사로서, 따로 판로확보가 요구되지 않는다.

본 과제를 통해 개발되는 제품은 향후 회사의 영업방향에 맞추어 수출도 고려할 예정이다.

사임당화장품은 사로매 브랜드에 4종의 미백제품(연백수, 연백에센스, 연백유액, 연백크림)을 판매하고 있으며, 본 과제를 통해 개발되는 미백소재는 기존의 연백라인 처방 또는 수정된 처방에 적용되어 미백화장품으로 판매할 계획이다. 따라서 기존의 미백제품 마케팅 방법이 적용될 예정이다.

3. 사업화 계획

2010년에는 본 과제를 통해 개발된 미백소재를 미백 보조성분으로 적용한 3품목(에센스, 유액, 크림) 사업화, 2011년에는 미백 주성분으로 적용한 3품목(에센스, 유액, 크림)을 사업화할 예정이다. 또한 2012년에는 미백 보조성분으로 적용하여 주름개선 및 자외선차단 화장품을 사업화할 예정이다.

구 분		사업화 년도		
		2010년	2011년	2012년
사업화 제품		미백화장품 3품목 (보조성분으로 적용)	미백화장품 3품목 (주성분으로 적용)	주름개선 화장품 2품목 자외선차단 화장품 2품목
판매 계획 (백만원)	내 수	870	1,100	900
	수 출	0	110	90
	계	870	1,210	990
수입대체효과(백만원)		44	60	50

제 2 절. 특허 및 논문성과

1. 논문성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2007	Antioxidant and Antimelanogenic Activities of Polyamine Conjugates Isolated from Corn Bran and Related Hydroxycinnamic Acids	Choi SW	Choi SW	Lee SK, Kim EO, Oh JH, Yoon KS , Parris N., Hicks KB, Moreau RA	J. of Agricultural and Food Chemistry	55(10)	국외	SCI
2009	옥수수겨 유래 하이드록시신나믹애 씨드 유도체의 멜라닌 생성 저해 효과	Kim MJ	Yoon KS	Im KR, Jung TK, Choi SW	J. of the Society of Cosmetic Scientists of Korea	35(2)	국내	
2009	Effect of Thermal Pretreatment on the Functional Constituents of Waxy Corn (<i>Zea mays</i> L.)	Kim EO	Choi SW	Yu MH, Lee KT, Yoon KS	Food Science and Biotechnology	18(6)	국내	SCI
2010	옥수수의 품종별 및 가공별 hydroxycinnamic acid 유도체 및 anthocyanin 색소의 함량 변화	Yu MH	Choi SW	Kin EO	J. Korean Soc Food Sci Nutr	39(6)	국내	
2010	Effect of Hydroxycinnamic Acid Derivatives from Corn (<i>Zea may</i> L.) Bran on Melanogenic Protein Expression	Kim MJ	Yoon KS	Kim SM, Im KR	The Korean Society for Applied Biological Chemistry	53(4)	국내	SCI

2편 투고준비 중

2. 학술발표

발표자	논문제목	학술발표회	발표일시	Poster No.	개최지
Kim MJ, Im KR, Yoon KS , Choi SW	Skin anti-aging effect of corn (<i>Zea may L.</i>) bran extracts	2009 Asian Societies of Cosmetic Scientists	2009. 03. 04	# 212	일본 요코하마
Kim MJ, Im KR, Yoon KS , Choi SW	The inhibitory effect of hydroxycinnamic acid derivatives from corn (<i>Zea may L.</i>) bran on melanogenesis	2009 대한화장품학회 춘계학술발표회	2009. 04. 10		서울산업 대학교
Yu MH, Seo IH, Kim EO, Yoon KS , Choi SW	Quantitative changes of hydroxycinnamic acid derivatives in corn bran according to extraction and processing methods	한국식품과학회 2009 학술대회 및 정기총회	2009. 05. 28	P01-014	대전 컨벤션센터
Kim EO, Yu MH, Lee KT, Choi SW	Effect of thermal pretreatment on the functional constituents of waxy corn (<i>Zea mays L.</i>)	한국식품 과학회 2009 학술대회 및 정기총회	2009. 05. 28	P01-019	대전 컨벤션센터
Kim EO, Yu MH, Choi SW	Anti-inflammatory activity of polyamine conjugates isolated from corn (<i>Zea mays L.</i>)	한국식품 영양과학회 Food for Health and Longevity 2009 International Symposium and Annual Meeting	2009. 11. 05	OP-02	창원 컨벤션센터

3. 특허성과

가. 특허등록

등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2009	옥수수겨에서 폴리아민킨쥬게이트의 분리방법 및 이의 용도	학교법인 선목학원, 사임당화장품	한국	10-0912431

나. 특허출원

등록연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2008	옥수수겨추출물을 함유하는 피부 주름개선용 화장료 조성물	사임당화장품	한국	10-2008-0042652
2009	압출성형 및 초고압처리에 의한 옥수수겨로부터 폴리아민킨쥬게이트의 추출 및 고품질의 정제분말 제조방법	학교법인 선목학원, 사임당화장품	한국	10-2009-0023648
2009	안정화된 옥수수겨 추출물의 나노리포솜을 함유하는 화장료 조성물	사임당화장품	한국	10-2009-0026175
2009	압출성형 및 초고압처리에 의한 고품질의 옥수수겨 추출물 제조방법	학교법인 선목학원, 사임당화장품	한국	10-2009-0035440
2009	옥수수겨 추출물 함유 자외선차단용 화장료 조성물	사임당화장품	한국	10-2009-0085903

제 6 장. 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 화장품 분야의 경향을 가장 잘 알 수 있는 학회는 IFSCC (The International Federation of Societies of Cosmetic Chemists, 국제화장품과학자회)로 짝수 년에는 Congress, 홀 수년에는 Conference가 열리고, 원료 박람회로는 IN-COSMETICS가 있음
- 2007년 IFSCC Congress에서 발표된 네덜란드 연구자들의 내용과 네덜란드 화장품시장 조사 내용을 소개함
- 2009년 IN-COSMETICS ASIA에는 130여 업체의 기능성 원료들이 전시 되었으며, 이 중 미백 관련 원료를 소개함

I. 네덜란드 화장품 연구 동향

1. Water Distribution and Natural Moisturizer Factor Content in Human Skin Equivalents is Regulated by Environmental Relative Humidity

- Division of Drug Delivery Technology, Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, Leiden University, Leiden
- Human Skin Equivalents (HSEs)는 사람의 피부 자체와 매우 유사성을 가지나 시험관 내 (in vitro)의 조건에서 고려해야할 중요 과정중의 하나는 박리현상이다. 박리현상은 세포사이의 접착 파괴를 포함한다.
- 피부 각층의 박리에 관여한 효소의 활성화는 수분함량 등과 같은 몇 가지 미세환경 요소에 영향을 받게 된다. 수분은 천연보습인자(Natural Moisturizing Factor, NMF)의 유무에 의존하는 것으로 보인다.
- 연구에서는, 피부 자체와 HSE에서 수분과 NMF의 주요 성분의 하나인 Pyrrolidone Carboxylic Acid (PCA)의 수준이 조사되었다.
- 정상 배양조건(93% RH)에서 만들어진 HSE에서 수분과 PCA 함량은 피부 자체에서보다 매우 낮다. HSE에서 수분과 PCA 함량을 증가시키는데 상대습도가 낮은 조건에서 HSE가 재 복원되는 배양조건이 재설정되었다. 40%까지 상대습도가 감소하게 되면 피부 자체와 유사한 정도의 PCA 함량과 정상피부 조직으로 재 복원됨을 알 수 있었다.
- 그러나 재 복원된 조직에서 수화정도는 여전히 낮다. 수분의 주요한 응용은 각질세포를 수화시켜 swelling 시키는 것이다.
- 이와 같은 결과는 HSE에서 각질층에서의 수분 함량에 영향을 주는 요인은 천연보습인자 외에 아직 알려지지 않은 다른 요인에 의해 조절됨을 시사함을 알 수 있다.

2. Novel Design of a Peptide Mixture with Unique Features for Anti-wrinkle Treatment

- DSM R&D Food Specialities, Delft
- 많은 화장품 원료 공급자들은 피부 노화와 관련 화장품 원료로서 바이오활성 펩타이드를 공급하고 있다. 천연 기원의 단백질과 가수분해물들이 피부보습과 같은 유효한 효능을 주지만, 이들 역시 알레르기 위험성을 준다.
- 고효성의 특별한 합성 펩타이드들의 생산은 힘들며 매우 비싸다. DSM에서는 밀크프로테인의 조절된 가수분해 방법으로 펩타이드를 생산하는 새로운 기술을 개발하였다. 개발된 과정은 *Aspergillus niger*로부터 유도된 전에 알려지지 않은 proline-specific endopeptidase를 얻는다는 장점이 있다.
- 효소는 분자량이 500 Dalton 이하의 주로 작은 펩타이드로 구성된 펩타이드 혼합물을 생산하는데 사용된다. 신규 펩타이드 혼합물은 다른 효소들로 처리된 밀크프로테인이나 밀크프로테인 그 자체와 비교하여 알레르기 가능성이 감소됨을 나타내었다.
- 펩타이드 분석결과 트리펩타이드가 주성분이어서, 밀크트리펩타이드(milk tripeptide, MTP)라 명명하였다. 펩타이드는 특별한 분열로 카르복실 말단이 proline이다. 콜라겐, extracellular matrix의 주요 구조적 성분, proline이 풍부하다.
- MTP이 피부 fibroblast에서 콜라겐 생성을 자극한다는 가정을 증명하기 위해 *in vitro* 시험을 진행하였으며, 그 결과 MTP는 cell proliferation, cell viability 및 collagen I 유도에 효과를 나타내었다. 이들 결과에 이어 인체시험을 실시하였다.
- 시험은 0.5% MTP 함유 크림으로 65명의 여성을 대상으로 3개월 동안 피부보습, 탄력 및 주름깊이에 대해 평가하였다. 결과 피부 노화에 대해 확연한 효과를 보였으며, 특히 피부 거칠기 파라미터인 Rz를 크게 감소시켰다.

3. Bio-Switch : Release on Command of Active Ingredients

- TNO Quality of Life, Zeist
- 본 논문은 cross-linked functionalized 바이오고분자를 사용하여 명령에 따라 활성성분을 방출하는 전달체계를 개발하는 데 있다. 분자량이 작은 프로테인과 활성성분과 같은 활성성분이 시도되었다.
- 활성성분의 방출은 효소분해 혹은 미네랄 함량과 같은 외부 자극원으로부터 활동을 통해 착수되었다.

4. What Makes Sprayable Production Spray?

- CP Kelco R&D, Nijmegen

- 화장품 분야에서 물을 기재로 한 스프레이 할 수 있는 제품들이 알려져 있다. 예로 스프레이할 수 있는 자외선차단제, 바디 스프레이 로션, 바디 스프레이 반짝이, 비타민이 풍부한 스프레이, 스프레이 텐닝 제품뿐만 아니라 헤어 fixative, 구강 스프레이, 코 스프레이와 상처치료 스프레이가 있다.
- 스프레이 제품 개발에 여러 주요한 요인들(원료간의 사용성, 입자의 분산성, 방부 등)있지만, 본 논문에서는 가장 근본적으로 중요한 스프레이 능력에 초점을 맞추었다. 좀 더 정확하게, 잘 작동하려면 이들 스프레이 제품들은 올바른 atomization 거동을 보여야 한다.
- 좋은 atomization은 제품의 유동특성(rheological properties)에 강하게 의존한다. 당연히 점도가 낮아야한다고 믿는다. 그러나 본 논문에서와 같이, shear viscosity뿐만 아니라 스프레이 노즐에서 신장 변형 또한 중요한 역할을 하게 된다. 신장 점도는 스프레이가 잘 작동되기 위해서 매우 중요한 열쇠이다.
- 유동 프로파일과 스프레이 패턴의 관계를 여러 점증제 및 안정화제, 산탄검(Xantan Gum), 젤라틴검(Gellatin Gum), 카르복시메틸셀룰로오스(Carboxymethyl Cellulose)에 대해 나타내었다. 이들 결과는 스프레이가 잘되는 올바른 검의 선택에 유용하게 적용될 것이다.

II. 네덜란드 화장품 시장 동향

1. 세계 화장품

가. 세계 화장품 시장 동향

- 2005년 세계화장품 시장은 총 2,537억불 규모로서 전년대비 8.2% 성장하였으며, 2001년 이후 매년 꾸준한 증가세를 보이고 있다.
- 2005년 세계시장의 지역별 시장규모는, 네덜란드가 포함된 서유럽이 765억불로 세계시장의 30.2%를 차지한다.
- 지역별 세계화장품 시장규모(단위 : 10억불)

구분	2000	2001	2002	2003	2004	2005
서유럽	47.6	47.7	51.8	62.9	71.3	76.5
동유럽	8.6	9.5	10.7	12.5	14.8	17.1
북아메리카	46.0	47.5	48.6	49.5	50.3	53.4
라틴아메리카	20.2	19.9	17.7	18.7	23.2	29.0
아시아태평양	42.4	40.4	41.7	45.6	58.2	63.1
호주	2.0	1.9	2.1	2.6	3.1	3.5
아프리카 및 중동	7.5	7.5	7.6	9.0	10.1	11.1
세계(합계)	174.3	174.4	180.1	200.7	230.9	253.7

- 네덜란드를 포함한 주요국의 시장규모는 2005년 미국이 480억불 규모로 전체시장의 18.9%

차지하며 가장 큰 시장을 이루고 있다.

- 주요국의 화장품 시장규모(단위 : 1억불)

구분	2001	2002	2003	2004	2005
미국	442.2	458.7	461.6	468.5	480.5
프랑스	87.2	97.5	122.4	137.9	140.8
네덜란드	18.4	20.7	26.2	29.7	31.0
한국	38.6	45.1	46.9	47.4	54.4

2. 서유럽 화장품

가. 서유럽 화장품 시장 동향

- 2006년 서유럽(EU-15+스위스+노르웨이의)의 화장품(cosmetic+toiletry+perfumery) 시장 매출액은 627억 유로, 2005년 대비 4.2% 증가해 2005년(2.0%)의 하향곡선에서 다시 상향곡선으로 전향하였으나, 이와 같은 판매 증가는 서유럽의 주요 마켓인 독일, 프랑스, 이탈리아의 전반적 경제상황을 반영한 것으로 보인다.
- 2006년에 스위스(-0.4%)와 덴마크(-0.7%)를 제외한 대부분의 서유럽 국가 시장에서는 2005년 대비 플러스 성장했는데 그중에서도 독일(5.5%), 영국(9.0%), 노르웨이(14.6%), 핀란드(5.6%)가 5% 이상의 고성장률을 기록했고, 그 외 프랑스 3.2%, 이탈리아 3.6%, 스페인 4.6%, 네덜란드 0.1%, 벨/룩스 1.8%, 스웨덴 1.6%, 그리스 2.3%, 오스트리아 3.4%, 포르투갈 0.5%, 아일랜드 3.8%는 상대적으로 낮은 성장률을 보였다.

나. 자연화장품의 수요 증가

- 최근 자연화장품(natural/organic cosmetics)의 판매가 계속 성장해 7~8년 전까지만 해도 틈새시장 제품이었던 것이 이제는 주종시장 제품으로 부상하고 있다. 이는 건강식품과 더불어 전반적으로 웰니스(wellness)를 추구하는 경향과 더불어 화장품 분야에서도 북유럽 소비자들을 선두로 화장품 구성성분에 대한 관심이 고조되고 자연 성분의 화장품을 찾는 경향이 짙어지고 있기 때문이다.
- 프랑스에서는 2005년에 자연화장품 판매가 40%로 대폭 증가했는데 이 같은 추세는 계속될 것으로 전망된다. (2005년 3월 TV에서 화장품에 함유된 파라벤스(parabens)와 같은 물질이 위험할 수 있다는 다큐멘터리가 방영되고 그린피스를 비롯하여, 비정부기관들이 화장품에 들어있는 화학성분이 건강을 해칠 수 있다는 캠페인을 벌인바 소비자들의 화장품성분에 대한 주의와 인식이 고조되고 있음)
- 프랑스 자연화장품 주요 제조업체인 Sanoflore사는 올해 이 회사 매출이 2배로 증가할 것을 전망하고 소매업에 따르면 1년 사이에 건강식품과 함께 자연화장품의 매출이 5~15% 증가했다고 한다.

다. 제품 트렌드

(1) 남성용 화장품 수요 증가

- 근래 남성용 화장품 수요가 크게 증가하고 있다.
- 2002~2004년 화장품 전체 시장의 증가율은 1.4%밖에 되지 않았지만 동기간 중 남성용 화장품만은 2.3% 증가했듯이 남성용 화장품의 수요가 부쩍 증가하고 있어 프랑스의 경우 현재 남성 화장품 시장이 전체 화장품 시장의 10% 이상을 차지하고 있다.
- 남성용 화장품으로는 샤워용 젤, 면도용 무스 및 크림, 데오, 향수 및 얼굴 크림, 상피박탈용 마스크, 얼굴피부를 젊게 하는 크림, 주름 없애는 크림 또는 눈 주위용 크림 등의 화장품이 나오고 있는데 이중 향수가 거의 60%를 차지하고 Toiletries가 30%, 얼굴용 크림 등 beauty care가 거의 8%, 나머지는 hair care용품이다.

(2) 노화 방지용 화장품 수요 붐

- 유럽에서는 2차 대전 직후 ‘baby boom’ 시절에 태어난 세대가 이제 경제적으로 안정된 senior세대가 되면서 건강하고 젊게 보이려는 욕망과 더불어 anti-ageing 화장품이 붐을 이루고 있다.
- Anti-ageing 화장품은 피부용 화장품(skin care)에 집중하고 있는데 이 중에서도 주름살방지 화장품이 주류를 이루고 있다. Euromonitor International(마케팅 조사업체)에 따르면 Anti-ageing 화장품은 skin care 화장품 중에서도 성장률이 가장 빠른 제품(2002~03년간 11.4%증가)으로 동품 시장 규모는 70억 달러 이상에 달하는 것으로 추정된다.
- 이 같은 상황에서 세계 유명 화장품 업체들은 anti-ageing 분야에서 시장을 확보하려고 신제품을 다투어 시장에 내놓고 있다.
- 2005년에 Garnier는 콩(soja)과 무화과를 함유한 Garnier’s Skin Naturals를 비롯하여, Beiersdorf도 new Nivea Vital facial cream을 Schwarzkopf & Henkel은 Diadermine Reactivance를 Lancome은 Platineum sun protection cream 등을 내놓았다.
- 최근에는 senior용 anti-ageing 화장품뿐 아니라 주름살이 지기 시작하는 나이의 30~40대 젊은이와 중년세대를 대상으로 한 주름살 방지용 화장품을 내놓기 시작하였다.
- Oenobiol은 30세 이상의 여성용 주름 방지 크림을, Avon은 “Anew”라는 브랜드로 터키시장에 2005년에 시판하기 시작하고 Biotherm은 40대 남성을 대상으로 Biotherm Homme products를 스페인시장에 판매하기 시작하였다.

라. 유통

- 유럽에서는 국가마다 역사적 배경이 다르고 유통 마켓에 대한 법규가 달라 각 유통 채널이 차지하는 비중이 상당히 다르다. 크게 일반 마켓(mass market), 미장원(hairdresser), 화장품 전문 숍(selective distribution)으로 구분된다.
- 일반마켓에서는 90년대 초 까지만 해도 toiletries 제품을 주로 취급하고 기타 화장품은 별로 취급하지 않았는데 90년대 중반 이후 skin care 제품을 취급하기 시작해 지금은 거의 화장품 전반이 판매되고 있어 매출비중으로 볼 때 가장 중요한 유통 채널로 부상하고 있다.

하지만 아직까지도 대중급의 제품이 판매되고 있고 고가 브랜드 제품은 전문 숍에서 판매되고 있음. 전문 숍의 특징은 고객에게 제품과 브랜드 차이점을 설명하고 조언을 제공하는 전문 판매원이 있기 때문에 고가제품 구매 고객은 전문점을 선호하고 있다.

- 전문점의 판매 추이도 국가마다 상당한 차이가 있음. 벨기에/룩셈부르크와 **네덜란드**, 스페인, 이탈리아에서는 전문점의 판매비중이 증가하고 있는 반면 오스트리아와 프랑스, 독일, 스위스, 독일에서는 감소하고 있다.

마. 시사점

- 유럽의 화장품 공급업체는 주로 프랑스(L'Oreal, Sephora, Geurlain, Lancome 등), 독일(Nivea, Benkshire, Henkel 등), 영국(Lancaster), 네덜란드(Elisabeth Arden은 Unilever 그룹에 속함), 미국(RH, Estee Lauder, Avon, Revelon 등)등의 서구 업체들이다.
- 최근에는 고가 일본(Shiseido, Anayake, Ganabo 등)산 제품도 시판되고 있어 한국산 화장품의 경우 최근 수요 증가세를 보이고 있는 자연화장품 분야와 같은 틈새시장을 겨냥할 수 있을 것으로 보인다.
- 유럽시장에 진출하려면 우선 제품이 EU 화장품 지침에 의거한 적합성을 보유해야 하며 라벨링 규정을 준수해야 한다.
- 라벨링 규정 사항은 다음과 같다.
 - (가) 제조자 또는 수입업자 또는 EU 유통자 이름과 주소
 - (나) 내용물의 포장 시 무게 또는 부피(volume)
 - (다) 저장수명(shelf life)이 30개월 미만일 경우, 유효기간
 - (라) 개봉 후 유효기간
 - (마) 사용 주의서(현지어)
 - (바) Batch 번호
 - (사) 소비자가 볼 때 무엇에 사용되는지 분명히 파악하기 어려운 제품의 경우에는 제품의 기능 표시
 - (아) 성분리스트(INCI : International Nomenclature for Cosmetic Ingredients 에 의거한 성분을 무게 순서로 기재)
- 동물실험을 원칙적으로 금지되나 동물시험이 부득이 한 경우에는 동물시험과 의학적 효력을 분명히 표시해야 한다.
- 유통 채널로는 일반 유통채널(Carrefour, Makro 등)과 이와 같은 화장품품 체인이 적격이다.
- 자연화장품의 경우에는 특히 최근 유럽에서 health/fitness 센터가 많이 생기고 이러한 장소에서 자연화장품이 집중적으로 판매되고 있으므로 이러한 유통망을 선정하는 것이 유망하다.

3. 네덜란드 화장품

가. 네덜란드 화장품 시장 동향

- 네덜란드에서 화장품은 화장품뿐 아니라 샴푸, 목욕용품, 치약 등을 포괄한다. 화장품은 주로 드럭스토어, 향수전문점, 슈퍼마켓, 백화점 등을 통해서 유통되는 것이 일반적이나, 일부 제품은 미용실이나 피부관리실 등을 통해서도 판매되고 있다.
- 네덜란드 화장품 업체는 대부분 Nederlandse Cosmetica Vereniging (NVC, Dutch Association for Cosmetics) 회원사로 네덜란드 전체 화장품 매출의 80% 가량을 NVC 회원사들이 차지하고 있다. NCV가 발표한 최근 자료에 따르면, 네덜란드 화장품 시장 규모는 약 10억 유로를 상회하며, 1인당 화장품에 대한 지출은 평균 120유로에 달하는 것으로 나타났다. 또한 NVC에 따르면, 최근 가장 크게 성장하고 있는 분야는 탈취제, 장식용 화장품, 두발용 화장품류로 탈취제와 장식용 화장품 시장은 최근 10% 이상의 성장세를 보이고 있으며, 두발용 화장품도 7%대의 성장률을 기록한 바 있다.
- 주요 수입국 : HS코드(33.04.01)에 속하는 화장품의 주요 수입대상국은 프랑스(27%), 벨기에(15%), 영국(14%), 독일(13%) 등 인근 유럽 국가들이다. 역외국가 중에는 미국이 6%로 가장 큰 수입시장 점유율을 보이고 있다. 아시아 국가의 비중은 매우 미미해서 대만과 일본만이 약 0.3% 정도의 점유율을 보이고 있을 뿐이다.
- 인증: 네덜란드에 화장품을 수출하기 위해서는 EU 지침 Cosmetics Directive (76/768/EEG)에 따라 안전성, 성분 등의 조건이 갖춰져야 한다. 이 지침에 따라 네덜란드 보건사회복지부와 식품검사소 등이 화장품의 수입 적격성을 검토하게 되면, 주요 내용은 아래 홈페이지를 통해 입수할 수 있다.

<http://www.ncv-cosmetica.nl/import/wettelijk>

http://www.europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/index_en.htm

http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/sccp/index_en.html.

- 네덜란드에 유통되는 유명 피부 화장품

Vichy (L'Oreal) - www.vichy.com

Dermolin (Tramedico) - www.dermolin.com

Ahava - www.ahava.nl

Biotherm (L'Oreal) - www.biotherm.com

Unicura - www.unicura.nl

Nivea - www.nivea.com

Sanex (Sara Lee/ DE) - www.sanex.nl

Laboratoires Garnier (L'Oreal) - www.synergie123.nl

Oil of Olaz - www.olaz.nl

La Prairie - www.laprairie.com

Clinique - www.clinique.com

Clarins - www.clarins.com

Dr. van der Hoog - www.dr-vanderhoog.nl

Estée Lauder - www.elcompanies.com

Dove (Unilever) - www.dove.com
L'Oreal - www.loreal.com
Diadermine (Henkel) - www.diadermine.com
Yves Rocher - www.yvesrocher.nl

- 전시회

Beauty Trade Special, Utrecht, Netherlands - www.jaarbeursutrecht.nl
Santé Gezondheidsbeurs - www.gezondheidsbeurs.nl
Huishoudbeurs, Amsterdam, Netherlands - www.rai.nl
Estetika, Brussels, Belgium Droghar Beauty International - www.beauty-international.de

나. 네덜란드 화장품 수입관리제도

- 네덜란드는 2003년 약 4억 2천 5백만 유로의化妆품을 수입하고, 6천 4백만 유로를 수출함으로써 화장품 시장에서 약 3억 6천 1백만 유로의 무역 수지 적자를 기록하였으며 전체 시장 판매의 약 25%를 수입에 의존하고 있다.
- 네덜란드의 화장품 수출입은 모두 증가추세를 보이고 있으며, 수입 증가율이 수출증가율보다 높은 추세를 보이고 있다.
- 대부분의 수입은 유럽의 인근국가로부터 이루어지고 있으며, 미국으로부터의 수입은 전체 수입의 약 15%를 차지하고 있고. 주된 수입품은 향수, 스킨케어, 목욕/샤워 용품 등이다.
- 수출은 매우 적은 편으로 전문화된 스킨케어 제품 및 특수 화장품 등을 인근 유럽과 미국에 수출하고 있다.
- 네덜란드뿐만 아니라 유럽 전체적으로 항노화 유행에 따라, 안티에이징 크림과 코스메슈티컬(치료) 제품들의 판매가 증가되고 있다.

4. 네덜란드 건강 관련 히트상품

○ 유기농식품, 건강음료 등에 관심 집중으로 소비 트렌드 변화

- 최근 네덜란드 소비자들이 건강에 대해 과거보다 더욱 신경을 쓰면서 소비트렌드를 변화시키고 있다. 2000년대 이후 웰빙의 열풍이 세계를 휩쓸고 있는 가운데 이에 대해 큰 관심을 보이지 않고 자연스러운 생활속에서 건강을 유지한다는 네덜란드인들이 지난해 중반 이후 유기농 식품, 동종요법 의약품, 건강관리 상품에 대한 관심을 기울이면서 최근 네덜란드의 새로운 소비패턴으로 건강이라는 개념을 확립시키고 있다. 특히 네덜란드 유기농산물 및 식음료시장의 경우 지난해 이후 약 15%의 성장을 보이면서 네덜란드 식음료시장의 대표적인 성장분야로 떠오르면서 각 기업체들이 관련상품의 개발 및 수입 등에 열을 올리고 있어 주목을 끌고 있다.
- 네덜란드 통계청(CBS)이 발표한 최근 자료에 의하면 지난해 7월 이후 네덜란드 경제인구

중 약 80% 이상이 건강유지를 위해 헬스, 건강유지서비스, 관련상품 구입에 비용을 지출한 경험이 있는 것으로 나타났으며 아울러 응답자의 대부분이 추가비용을 지불하면서도 건강 관련 상품의 지속적인 구입의사를 표명해 네덜란드의 건강관련 상품은 향후 대표적인 수요 확대 품목으로 자리매김할 것으로 전망된다.

- 아울러 소비자들의 이와 같은 성향을 반영하듯 관련 기업들도 점차적으로 건강 관련제품 및 서비스 개발에 집중적으로 투자할 것으로 보이며 현재 한정돼 있는 시장구조는 거의 모든 분야 및 상품으로 까지 확대될 것으로 예상된다.

가. 동종요법 의약품(Homeopathy Medicine)

- 2000년대 들어 네덜란드의 의약품시장의 큰 변화는 기존의 화학적 의약품보다는 질병과 유사한 증상을 유발시키는 자연약품을 복용케 함으로써 자가면역 능력을 키워 치유를 유도하는 동종요법의약품이 대중적인 인기를 누리고 있다.

(가) 약품은 꽃이나 뿌리, 열매, 야채, 씨앗, 꿀 등 다양한 자연산재료에서 추출된 성분을 위주로 제조

- 네덜란드에서 가장 대표적인 동종요법 의약품은 'A. Vogel' 브랜드이다.

(가) 천연항생제의 대표적인 자연식물인 에키나시아(Echinacea)로부터 추출된 성분으로 제조된 A. Vogel은 감기, 피부질환제 등 다양한 제품으로 출시돼 있다.

(나) 네덜란드 의약전문지인 메디다이제스트(Medi Digest)가 지난해 말 조사한 자료에 의하면 네덜란드인의 약 21%가 감기에 걸렸을 시 A.Vogel을 복용하고 있는 것으로 나타나 동종요법 의약품이 가장 효과적이고 신뢰할 수 있는 제품으로 호응을 얻고 있다.

나. 유기농맥주 (Organic Beer)

- 포도주와 함께 네덜란드의 대표적인 주류인 맥주도 이제 유기농법으로 제조돼 큰 인기를 끌고 있다.

- 네덜란드 맥주회사인 Gulpener Bier는 2001년 말부터 유기농법으로 생산된 맥아를 원료로 기본으로 네덜란드 최초의 유기농 맥주인 'Gulper Bier'를 시판해 큰 인기를 끌고 있다.

(가) Gulpner사는 네덜란드 2001년 '자연과의 동화'를 모토로 내걸고 유기농법으로 생산된 보리를 원료로 고급형 건강 맥주시장을 형성하고 있다.

(나) Gulpener 맥주는 다른 제품보다 가격이 약 20% 정도 비싸나 고급맥주의 대명사로 불리며 매년 10% 이상의 매출 확대를 기록하고 있다.

(다) 2004년 Gulpener 맥주는 네덜란드 주류협회가 소비자들을 대상으로 실시한 결과를 바탕으로 한 '가장 맛 좋은 맥주'로 뽑혔을 뿐 아니라 네덜란드 농업부장관으로부터 '환경상(sustainable award)'를 수상한 바 있다.

다. 건강음료 (Healthy Tea)

- 커피, 탄산음료 등이 대표적인 소프트트링크 음료로 인식되고 있는 네덜란드 내에서 건강음료가 새로운 형태의 소프트트링크로 떠오르고 있다.
- 가장 대표적인 건강음료로 부상되고 있는 품목은 녹차로 항암효과, 노화 및 성인병 예방, 비만방지 및 다이어트 효과, 피로회복 및 숙취제거, 체질의 산성화 예방 등 녹차의 효능이 널리 알려지면서 빠르게 시장을 확대하고 있다.
- 네덜란드의 가장 대표적인 슈퍼마켓 체인인 Albert Heijn에서 지난해 판매 신장률이 높은 품목 20위내에 품목이 Zonnatura사의 녹차, 허브차 등 건강음료임을 볼 때 네덜란드 내에서 건강음료 시장은 향후 성장 잠재력이 가장 높은 시장의 하나로 평가될 수 있다.

라. 건강관리 상품 (Herbalife)

- 세계최고의 건강관리 제품기업인 허벌라이프(Berbalife)가 네덜란드에서도 돌풍을 일으키고 있다.
 - (가) 허벌라이프 네덜란드 법인의 매출규모는 2004년 총 58백만 유로로 2000년 25백만 유로와 비교 4년 만에 2.3배로 확대되었으며 금년은 80백만 유로의 매출을 목표로 하고 있다.
- 일대일 맞춤식 체중관리/피부보호/영양공급 서비스 및 관련제품을 판매하고 있는 허벌라이프는 보다 건강하고, 젊은 생활을 유지하려는 네덜란드 남녀노소에게 크게 어필해 가장 대표적인 건강관리 제품이 가장 유망한 미래상품이라는 인식을 갖게 하고 있다.
 - (가) 허벌라이프는 저명한 과학자 및 의사, 뉴트리션 전문가들의 풀로 구성된 개발팀으로부터 웰니즈(welneeds)를 충족할 수 있는 각종 맞춤식 서비스 및 제품의 지속적 공급을 통해 급속히 네덜란드 시장을 확대해가고 있다.
 - (나) 지난해 허벌라이프 네덜란드에서 자체적으로 조사한 제품 이용 결과에 따르면 허벌라이프 제품구입 후 효과를 보고 있다는 응답자가 90%를 넘어 허벌라이프의 성장은 더욱 가속화 될 것으로 보다.

마. 자연화장품 (Natural Cosmetic)

- 화장품 및 보디크림 시장에서도 자연산 제품에 수요가 크게 늘고 있다.
 - (가) 화장품분야에서도 피부에 1차 접촉하는 스킨크림 등에 있어서는 화학제품보다는 자연산 제품에 대한 수요가 크게 늘고 있으며 제품의 원료는 알로에베라 또는 organic 소재를 사용해 제조된 제품 등이 시장을 선도하고 있다.
- 기초화장품 분야에 있어 네덜란드에서 가장 인기를 끌고 있는 자연화장품은 알로에베라 (Aloe Vera) 모이스처 스킨케어 크림이다.
 - (가) 알로에베라 모이스처 스킨케어 크림 중 'Ecolife'는 네덜란드 스킨크림 제품으로는 유일하게 미국 TDH (Ministry of Health) 승인을 득해 제품의 안전성을 인정받은 품목으로 네덜란드 젊은 여성들의 큰 인기를 누리고 있다.

Ⅲ. 화장품 원료 시장 동향

1. IN-COSMETICS ASIA

가. 2009 IN-COSMETICS ASIA 소개

-“Discover innovation”이란 주제로 개최된 이번 전시회는 Natural concept와 High technology ingredients로 전시되었고 금년은 유럽과 동남아 국가들의 화장품 시장은 Natural concept 중 Food가 주는 안전성과 효능효과 전달력을 주는 Food concept 이었고, 동북아 국가들은 Nano-technology에 의한 Delivery system, 인체 피부의 기능을 더욱 활성화시키기 위해 Peptide 등 효능효과가 우수한 의약품적 고기능의 성분을 활용한 제품의 기능이 소비자들의 Needs에 부합하는 화장품에 대해 많은 관심이 집중된 시장임을 알 수 있었고 약 130여 업체들의 각종 기능성 원료를 가지고 각 업체만의 특징적인 기능과 효과를 중심으로 전시를 한 박람회였다. 몇 가지 미백원료에 대한 종류 및 간단한 특징에 대해서 다음과 같이 기술에 본다.

2. 전시된 미백 원료 종류 및 특징

가. Chromabright (Lipotec)

- INCI명 : Dimethylmethoxy Chromanyl Palmitate
- 광노화 예방 및 티로시나아제 활성을 억제하여 피부 톤을 밝게 개선해줌
- In vitro 실험에서
 - (가) mushroom 티로시나아제 활성도의 37% 저해
 - (나) Human 티로시나아제 활성도가 43% 감소
 - (다) 멜라노사이트에서 Kojic acid보다 더 우수하게 미백 기능

나. PLMs (Lipotec)

- INCI명 : Water & Glycerin&PEG-40 Hydrogenated Castor Oil & Carrageenans & Propylene Glycol & Phospholipids & Magnesium Ascorbyl Phosphate & Phenoxyethanol & Methylparaben & Ethylparaben & Propylparaben & Butylparaben & Isobutylparaben
- PLMs(Plurilamellar Multivesicular Liposomes): 리포솜내에 MAP 2% 함유
- 피부 브라이팅 효과 증진, 모이스춰라이징 효과, 항산화 및 콜라겐합성 증진

다. Radical Sponge (Vitamin C60 Bioresearch Corporation)

- INCI명 : Fullerenes & PVP & Butylene glycol & Water
- Free radical scavenging
- 프리라디칼에 의한 멜라닌 형성저해 효과
- 프리라디칼에 의한 Cytoprotective 효과

라. Sepiwhite MSH (SEPPIC)

- 친수성인 Essential amino acid인 Pheylalanine과 친유성인 Undecyllenic acid와 결합하여 형성된 Amphiphilic 구조의 안정한 형태의 백색 파우더
- INCI명 : Undecylenoyl phenylalanine
- 멜라노사이트 내 cAMP를 저해함으로써 근본적으로 티로시나제 활성을 저해 효과
- 기존 미백성분인 알부틴, 코직산, 하이드로퀴논에 비해 cAMP 세포내 활성을 감소시킴

마. Biobenefity (Ichimaru Pharcos Co., Ltd.)

- Terpenoid 계로 세포에서 UV에 의해 광노화, 색소침착 및 콜라겐 분해를 일으키는 NF- κ B 인자의 활성도를 조절하는 기능을 갖는 활성 성분인 Cynaropicrin 함유
- INCI명 : Butylene Glycol & Water & Cynara Scolymus (Artichoke) Leaf Extract
- 염증이거나 UV 광에 의한 멜라노사이트의 증식을 예방
- 피부 탄력성과 미백 기능의 향상

바. Clairju (Ichimaru Pharcos Co., Ltd.)

- Clear와 Juice의 합성어로 멜라노사이트에 의해 만들어진 멜라노솜을 먹는 식세포인 케라티노사이트의 활성을 저해하는 Melanin Rejector
- INCI명 : Butylene Glycol & Water & Hydrolyzed Prunus Domestica
- 일반 미백제는 멜라노사이트의 멜라닌 생합성을 저해하는데 비해 멜라노솜을 먹는 케라티노사이트의 식욕을 예방하는 메커니즘
- 멜라닌 식세포의 저해 및 화이트닝 효과

사. Herba White (Bioland)

- Mulberry root, Licorice root, Sophora root, Diospyros kaki leaf, Cornus kousa stem 등이 함유된 식물 복합체
- 활성산소 소거 기능
- 멜라닌 형성 저해 및 티로시나제 활성 저해 효과
- Bioland 기타소재
 - (가) β -알부틴- 비정상적인 색소축적에 의해 기미, 주근깨, 점 등의 생성을 억제하고 광노화에 의한 피부 병변들 증과다 멜라닌 생합성을 저해
 - (나) Mulberry root Extract/Powder- 티로시나제의 활성을 억제함으로써 피부 미백에 탁월한 효과, 유해산소를 제거, 활성 억제를 통한 피부 노화 예방 효과, 항균항염 작용
 - (다) BIO-OSLP(Licorice)-Glabridin을 지표물질로 한 성분으로 멜라닌 생성에 관여하는 티로신의 산화를 촉매하는 티로시나제의 작용을 억제하는 물질

아. BioGenic VitaC-100, 200, 300 (BioGenics)

- 빛, 열, 수분 및 산화되어가는 조건하에서도 순수 비타민 C의 안정성을 획기적으로 확보한 신물질
- 미백효과, 면역력 증강, 피부 보습력 강화 및 신진대사 증진
- 콜라겐생합성 및 멜라닌 환원 기능

(가) VitaC-100

- ① 순수비타민 C를 안정화하여 수계 처방에도 안정하게 사용 가능
- ② INCI명 : Ascorbic Acid & Zinc Citrate & Thiocctic Acid & Cyclomethicone & Dimethicone/Vinyl Dimethicone Crosspolymer & Dimethicone & Polymethyl Methacrylate & Silica Silylate

(나) VitaC-200

- ① 순수 비타민 C를 안정화시킨 Solution 으로 피부, 피지에 흡수율을 증진시키기 위해 안정화시킨 물질

(다) VitaC-300

- ① 순수 비타민 C의 고함량을 효과적이면서 안정적으로 전달이 가능한 비수계 처방 가능
- ② INCI명 : Ascorbic Acid & Silica Silylate & Cyclomethicone & Dimethiconol

자. Darkout (Provitalgroup)

- Hypoxoside가 풍부한 Hypoxis Rooperi의 뿌리줄기에서 추출한 성분
- 멜라닌 생합성 과정에서의 티로시나제 저해 효과
- 항산화 및 콜라겐 합성 촉진

차. Stavector Ellagic Acid (Durae Corporation)

- 포도, 딸기, 석류, 녹차잎 등에서 발견되는 폴리페놀류와 Ellagitannin으로 구성된 성분
- 화이트닝 및 주름개선 효과
- 피부 탄력성 증진 및 콜라겐 생성 증진효과
- 피부조직과 콜라겐의 상처 보호 및 대사과정 촉진

카. SulforaWhite (Mibellebiochemistry)

- 스위스 겨자과의 야채인 다닥냉이[Garden cress] 새싹에 풍부한 Sulforaphane을 리포솜화한 성분
- INCI명: Lepidium Sativum Sprout Extract & Glycerin & Lecithin & Phenoxyethanol & Water
- 멜라닌 생성 저해효과
- 항산화효과와 밝은 피부톤으로 개선효과

타. Bio-Oxiwhite (BST)

- 항산화와 식물성 화이트닝 기능을 가진 성분의 복합체
- INCI명 : Scutallarts balcatansis Root Extract & Petashtes japonicus Leaf Extract & Glycyrrhiza glabra Root Extract & Lactobacillus Ferment

(가) 프리라디칼 소거 작용

(나) 티로시나제 활성 저해 효과

파. Campo Songyi Total Extract 60% (Campo)

- 한국산 송이버섯에서 추출한 성분

- 항산화 작용 및 미백 효과
- 피부 면역력 증진 및 보습효과
- 혈액순환 촉진 및 신진대사 촉진

제 7 장. 참고문헌

- A. Hagiwara, K. Miyashita, T. Nakanishi, M. Sano, S. Tamano, and T. Kadota, Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn colour, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethyl hydrazine, *Cancer Letters* **171**, 17 (2001).
- A. Plate, D. D. Gallaher, The potential health benefits of corn components and products, *Cereal Foods World* **50**, 305 (2005).
- A. Sen, D. Bergvomsp, S. S. Miller, J. Atkinson, R. G. Fulcher, and J. T. Arnason, Distribution and microchemical detection of phenolic acids, flavonoids, and phenolic acid amides in maize kernels, *J. Agric Food Chem* **42**, 1879 (1994).
- B. A. Cevallos-Casals, and L. A. Cisneros-Zevallos, A comparative study of antimicrobial, antimutagenic and antioxidant activity of phenolic compounds from purple corn and bilberry colourant extracts. In Book of Abstracts of the Institute of Food Technologists Technical Program Abstracts, Chicago, IL, USA, Poster **14(E-1)**, 29 (2003).
- B. A. Cevallos-Casals, and L. A. Cisneros-Zevallos, Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of andean purple corn and redfleshed sweet potato compared to synthetic and natural colourants, *Food Chem* **86**, 69 (2004).
- B. Halliwell, J. Gutteridge, and O. I. Aruoma, The deoxyribose method: A simple “test tube” assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals, *Anal Biochem* **165**, 215 (1987).
- C. Jimenez-Cervantes, J. C. Garcia-Borron, P. Valverde, F. Solano, and J. A. Lozano, Tyrosinase isoenzymes in mammalian melanocytes, 1. Biochemical characterization of two melanosomal tyrosinases from B16 mouse melanoma. *Eur J. Biochem* **217(2)**, 549 (1993).
- C. M. Hasler, Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. *Food Technol* **52**, 63 (1998).
- C. S. Suher, and J. K. Chun, Relationships among the roasting conditions, colors and extractable solid content of roasted barley, *Korean J. Food Sci Technol* **13**, 334 (1981).
- Corn cultivars. <http://www.jeilseed.com>
- D. Strack, and V. Wray, The anthocyanins. In *The flavonoids*. Harvone JB(ed.), Chapman & Hall, London, UK. 234 (1994).
- E. Graf, Antioxidant potential of ferulic acid, *Free Rad Biol Med* **13**, 435 (1992).
- E. O. Kim, M. H. Yu, K. T. Lee, K. S. Yoon, and S. W. Choi, Effect of thermal pretreatment on the functional constituents of waxy corn (*Zea mays* L.), *Food Sci Biotechnol* **18**, 1336 (2009).
- E. Steingrimsson, N. G. Copeland, and N. A. Jenkins, Melanocytes and the

- microphthalmia transcription factor network, *Annu Rev Genet* **38**, 365 (2004).
- F. Sosulski, K. Krygier, and L. Hogge, Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours, *J. Agric Food Chem* **30**, 337 (1982).
 - F. Francis, Food colourants: Anthocyanins, *Crit Rev Food Sci Nutr* **28**, 273 (1989).
 - F. Natella, M. Nardini, M. D. Felice, and C. Scaccini, Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure-activity relation, *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1453 (1999).
 - F. Shashidi, and P. K. Wanasundara, Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* **32**, 67 (1992).
 - G. Block, and L. Langseth, Antioxidant vitamins and disease prevention, *Food Technol* **148**, 80 (1994).
 - G. C. Yen, 1990. Influence of seed roasting process on the changes in composition and quality of sesame (*Sesame indicum*) oil, *J. Sci Food Agric* **50**, 563 (1990).
 - G. E. Piérard, EEMCO guidance for the assessment of skin colour, *J. Eur Acad Dermatol Venereol* **10**(1), 1 (1998).
 - G. Hunt, C. Todd, J. E. Creswell, and A. J. Thody, Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle 4DPhe 7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes, *J. Cell Sci*, **107**(Pt1), 205 (1994).
 - G. Wong, and J. Pawelek, Melanocyte-stimulating hormone promotes activation of pre-existing tyrosinase molecules in Cloudman S91 melanoma cells, *Nature* **255**(5510), 644 (1975).
 - H. E. Miller, F. Rigelhof, L. Marquart, R. Prakash, and M. Kanter, 2000. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables, *J. Am College Nutr* **19**, 312S (2000).
 - H. K. Kim, Current status and prospect of nutraceuticals, *Food Indus Nutr* **9**, 1 (2004).
 - H. Z. Hill, W. Li, P. Xin, and D. L. Michell, Melanin: a two edged swords, *Pigment Cell Res.*, **10**, 158 (1997).
 - J. E. Mellon, and R. A. Moreau, Inhibition of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* by diferuloylputrescine and p-coumaroylferuloylputrescine, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6660 (2004).
 - J. Lee, E. Jung, J. Park, K. Jung, E. Park, J. Kim, S. Hong, J. Park, S. Park, S. Lee, and D. Park, Glycyrrhizin induces melanogenesis by elevating a cAMP level in B16 melanoma cells, *J. Invest Dermatol* **124**(2), 405 (2005).
 - J. Lee, K. Jung, Y. S. Kim, and D. Park, Diosgenin inhibits melanogenesis through the activation of phosphatidylinositol-3-kinase pathway (PI3K) signaling, *Life Sci* **81**(3), 249 (2007).
 - J. Pawelek, Melanoma cells in culture, *Methods Enzymol.*, **58**, 564 (1978).
 - J. Yamada, and Y. Tomita, Antimutagenic activity of caffeic acid and related

- compounds, *Biosci Biotechnol Biochem* **60**(2), 328 (1996).
- K. Iwai, N. Kishimoto, Y. Kakino, K. Mochida, and T. Fujita, In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans, *J. Agric. Food Chem.*, **52**(15), 4893 (2004).
 - K. K. Adom, and R. H. Liu, Antioxidant activity of grains, *J. Agric Food Chem* **50**, 6182 (2002).
 - K. T. Lee, J. Y. Lee, Y. J. Kwon, F. Yu, and S. W. Choi SW, Changes in functional constituents of grape (*Vitis vinifera*) seed by different heat pretreatments. *J. Food Sci Nutr* **9**: 144 (2004).
 - *Korea Food and Drug Administration*, Food Standard Code(Appendix), Seoul, Korea, 3 (2002).
 - L. P. Zhang, and Z. Z. Ji, Synthesis, antiinflammatory and anticancer activity of cinnamic acids, their derivatives and analogues, *Yao Xue Xue Bao* **27**, 817 (1992).
 - L. R. Ferguson, I. F. Lim, A. E. Pearson, J. Ralph, and P. J. Harris, Bacterial antimutagenesis by hydroxycinnamic acids from plant cell walls, *Mutat. Res.* **542**, 49 (2003).
 - L. Roussel, A. Vieille, I. Billet, and J. C. Cheftel, Sequential heat gelatinization and enzymatic hydrolysis of corn starch in an extrusion reactor. Optimization for a maximum dextrose equivalent, *Lebensm Wiss Technol* **24**, 449 (1991).
 - L. Saulnier, J. Vigouroux, and J. F. Thibault, Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran, *Carbohydr Res* **272**, 241 (1995).
 - M. E. Ramos-Nino, M. N Clifford, and M. R. Adams, Quantitative structure activity relationship for the effects of benzoic acids, cinnamic acids and benzaldehydes on *Listeriamonocytogenes*, *J. Appl Bacteriol* **80**(3), 303 (1996).
 - M. J. Kim, K. R. Im, K. S. Yoon, and S. W. Choi, The inhibitory effect of hydroxycinnamic acid derivatives from corn (*ZeamayL.*) bran on melanogenesis, *J. Soc Cosmet Scientists Korea* **35**(2), 143 (2009).
 - M. Naczk, and F. Shahidi, Phenolic compounds in plant foods: Chemistry and health benefits, *Nutraceutical & Food* **8**, 200 (2003).
 - M. Ohnishi, T. Matuo, T. Tsuno, A. Hosoda, E. Nomura, H. Taniguchi, H. Sasaki, and H. Moricita, Antioxidant activity and hypoglycemic effect of ferulic acid in STZ-induced diabetic mice and KK-^y mice, *BioFactors* **21**, 315 (2004).
 - M. Oka, M. Ichihashi, and A. K. Chakraborty AK, Enhanced expression of protein kinase Csubspecies in melanogenic compartments in B16 melanoma cells by UVB or MSH, *J. Invest Dermatol* **106**(2), 377 (1996).
 - M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
 - *National Rural Living Science Institute*, Food Composition Table 48, Six Revision, RDA, Suweon, Korea, 13 (2002).
 - P. Kadlec, M. Skulinova, J. Kaasova, Z. Bubnik, V. Pour, J. Dostalova, H. Valentova, and

- V. Hosnedl, Changes in composition of pea during germination, microwave treatment and drying, *Food Sci Biotechnol* **12**, 213 (2003).
- P. R. Gordon, C. P. Mansur, and B. A. Gilchrest, Regulation of human melanocyte growth, dendricity and melanization by keratinocyte derived factors, *J. Invest. Dermatol.*, **92**(4), 565 (1989).
 - P. S. Friedmann, and B. A. Gilchrest, Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes, *J. Cell Physiol*, **133**(1), 88 (1987).
 - R. A. Moreau, A. Nunez, and V. Singh, Diferuloylputrescine and p-coumaroyl-feruloylputrescine, abundant polyamine conjugates in lipid extracts of maize kernels, *Lipids*, **36**, 839 (2002).
 - R. A. Moreau, and K. B. Hicks, The composition of corn oil obtained by the alcohol extraction of ground corn, *Cereal Chem* **82**, 109 (2005).
 - R. A. Moreau, K. B. Hicks, and M. J. Powell, Effect of heat pretreatment on the yield and composition of oil extracted from corn fiber, *J. Agric Food Chem* **47**, 2869 (1999).
 - R. Halaban, S. H. Pomerantz, S. Marshall, and A. B. Lerner, Tyrosinase activity and abundance in Cloudman melanoma cells, *Arch Biochem Biophys*, **230**(1), 383 (1984).
 - S. Briganti, E. Camera, and M. Picardo, Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment Cell Res.*, **16**, 101 (2003).
 - S. Pascual-Teresa, C. Santos-Buelga, and J. C. Rivas-Gonzalo, LC-MS analysis of anthocyanins from purple corn cob, *J. Sci Food Agric* **82**, 1003 (2002).
 - S. W. Choi, S. K. Lee, E. O. Kim, J. H. Oh, K. S. Yoon, N. Parris, K. B. Hicks, and R. A. Moreau, Antioxidant and antimelanogenic activities of polyamine conjugates from corn bran and related hydroxycinnamic acids, *J. Agric Food Chem* **23**, 1090 (2007).
 - S. W. Choi, S. K. Lee, E. O. Kim, J. H. Oh, K. S. Yoon, N. Parris, K. B. Hicks, and R. A. Moreau, Antioxidant and antimelanogenic activities of polyamine conjugates from corn bran and related hydroxycinnamic acids, *J. Agric. Food Chem.* **55**, 3920 (2007).
 - S. W. Choi, W. W. Kang, and T. Osawa, Isolation and identification of anthocyanin pigments in black rice, *Foods Biotechnol* **3**, 131 (1994).
 - *Statistic of Death Cause*. Korea National Statistical Office, Seoul. (2006).
 - T. Niwa, U. Doi, and T. Osawa, Inhibitory activity of corn-derived bisamide compounds against α -glucosidase, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 90 (2003).
 - T. Noro, O. Yasushi, M. Toshio, U. Akira, and S. Fukushima, Inhibition of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3984 (1983).
 - T. Tsuda, F. Horio, K. Uchida, H. Aoki, and T. Osawa, Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside rich purple corn colour prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice, *J. Nutr* **133**, 2125 (2003).
 - V. Dewanto, X. Wu, and R. H. Liu, Processed sweet corn has higher antioxidant activity, *J. Agric Food Chem* **50**, 4959 (2002).
 - V. Perez-Alvarez, R. A. Bobadilla, and P. Muriel, Structure hepatoprotective activity

- relationship of 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) derivatives, *J. Appl Toxicol* **21**(6), 527 (2001).
- V. Singh, D. B. Johnston, R. A. Moreau, K. B. Hicks, B. S. Dien, and R. J. Bothast. Pretreatment of wet-milled corn fiber to improve recovery of corn fiber oil and phytosterols, *Cereal Chem* **80**, 118 (2003).
 - W. J. Duensing, A. B. Roskens, and R. J. Alexander, Corn dry milling: Processes, products, and application, In *Corn chemistry and technology*. 2nd ed. AACC International, St. Paul, MN, USA. 407 (2003).
 - Y. H. Hyun, G. B. Sun, S. J. Eun, and D. S. Kim. Food material, Hyungseul Publishing Co, Daegu, Korea. 55 (2008).
 - Y. J. Kwon, K. T. Lee, T. M. Yun, and S. W. Choi, Effect of heat pretreatment on the functional constituents of rice germ, *J. Food Sci Nutr* **9**, 330 (2004).
 - Y. S. Veliogu, G. Mazza, L. Gao, and B. D. Oomah, Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, *J. Agric Food Chem* **46**, 4113 (1998).
 - Z. D. Yang, Optimization of anthocyanins extract from purple corn (*Zea mays* L.) and identification of anthocyanin of extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Inter J. Food Sci Technol* (2009) (in print).