

http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2021.7.4.683

JCCT 2021-11-84

초임계 대마종자 추출물의 화장품 효능과 경피흡수증진 효과

Cosmetic Efficacy of Supercritical *Cannabis sativa* Seed Extracts and Enhancement of Skin Permeation

이광원*, 박신성**, 박수인***, 신문삼****

Kwang Won Lee*, Shinsung Park, Su In Park***, Moon Sam Shin******

요약 본 연구의 목적은 온도조건 별로 밀도요동 초임계 유체를 이용하여 추출한 대마종자 추출물의 수율 측정과 생리활성능을 평가하고, 리포솜 제형으로 난용성 추출물의 용해를 가능하게 하여 경피투과도를 증진시키는 데 있다. 수율 측정 결과, 60°C로 추출한 대마종자가 가장 높게 나타났고, 항산화 실험에서 total polyphenol content assay, DPPH radical scavenging assay, ABTS+ radical scavenging assay 결과, 최고농도에서 45°C 추출물의 폴리페놀 함량과 radical 소거능이 가장 크게 나타났다. 항균실험 결과, *Propionibacterium acnes* 균주에서만 clear zone이 나타났다. 추출물을 3차 정제수에 용해시킨 제형보다 리포솜으로 캡슐화한 제형에서 particle size의 감소와 zeta potential의 절댓값 증가를 확인하여 제형 안정성을 확인하였고, 경피투과도의 증진 또한 확인하였다. 이러한 실험결과를 바탕으로 난용성인 초임계 대마종자 추출물을 화장품의 기능성 천연물 소재로써 활용 가능성을 확인하였다.

주요어 : 대마종자, 초임계 이산화탄소, 효능평가, 리포솜, 경피투과 증진

Abstract The purpose of this study is to measure the yield and to evaluate the physiological activity of *Cannabis sativa* seed(Hemp seed) extracts extracted using a density fluctuation supercritical carbon dioxide for each temperature condition-30°C(HSSE30), 45°C(HSSE45), 60°C(HSSE60), and to enable dissolution of the poorly water-soluble extracts by liposome formulation and to enhance the skin permeability. As a result of the yield measurement, HSSE60 showed the highest yield, and in the antioxidant activities, HSSE45 had the highest total polyphenol content, and showed the highest DPPH, ABTS+ radical scavenging activities at the highest concentration of the extracts. As a result of the antimicrobial susceptibility testing, a clear zone appeared only in the *Propionibacterium acnes* strain. It was confirmed that particle size was reduced and the absolute value of the zeta potential increased in the case of the formulation in which the extracts were in liposomes than in the formulation in which the extracts were dissolved in deionized water, and the skin permeability was improved. Based on these experimental results, we confirmed the possibility of using the hemp seed supercritical carbon dioxide extracts, a poorly water-soluble extract, can be applied as a functional natural material for cosmetics.

Key words : Hemp Seed, Supercritical Carbon Dioxide, Efficacy Evaluation, Liposome, Enhancement of Skin Permeability

*정회원, 을지대학교 시니어헬스케어학과 석사과정 (제1저자) Received: September 9, 2021 / Revised: September 19, 2021
**정회원, 을지대학교 미용화장품과학과 학사과정 (참여저자) Accepted: September 28, 2021
***정회원, 을지대학교 시니어헬스케어학과 박사과정 (교신저자) *Corresponding Author: sooo_30@naver.com, msshin@eulji.ac.kr
****정회원, 을지대학교 미용화장품과학과 교수 (공동교신저자) Dept. of Senior Healthcare majored in Cosmetic Formulation & Pharmacology, Eulji University, Korea
접수일: 2021년 9월 9일, 수정완료일: 2021년 9월 19일
게재확정일: 2021년 9월 28일

1. 서 론

피부는 인체의 경계가 되며 외부에 직접 노출되어 있어, 인체를 보호하는 제 1차 방어막 역할을 한다[1]. 현대사회에서는 특히 피부에 대한 관심이 증대됨에 따라 깨끗하고 맑은 피부가 미의 일차적인 기준이 되었다[2]. 특히 안면 피부는 외부에 직접 노출되어 있고, 사람과 사람이 마주할 때 제일 처음 보여지는 곳으로, 미관상 더욱 관심을 가질 수밖에 없는 부분이며, 외적인 아름다움 뿐만 아니라 내적인 아름다움까지 우리나라를 수 있어 삶의 질을 높이는 데 중요하다[2].

천연추출물은 살아 있는 유기체로부터 생성된 물질을 추출한 것을 의미하는데, 이렇게 동식물로부터 추출된 성분은 오래전부터 질병 치유하는 데에 기초가 되어왔다. 하지만 천연추출물의 문제점으로는 추출하는 원물에 대비해서 낮은 수율과 지속적인 원물 공급이 어렵고, 복잡한 화학구조로 인해 직접 합성이 어려운 단점이 있다. 이러한 단점을 해결하기 위해 최근 연구자들은 뛰어난 생리활성 가능성이 있는 천연물로부터 약물을 개발하기 위해 문제점을 해결하고자 하는 연구가 지속되고 있다[3].

대마종자(*Cannabis sativa*, Hemp seed : HS)는 뽕나무과(Moraceae)에 속하고, 아시아, 캐나다, 미국, 칠레, 유럽이 원산지이며, 보통 씨를 냉압착하여 오일을 추출한다. 오랫동안 섬유 작물로 재배되었으며, 종실의 기름 함량이 많고 불포화지방산의 비율이 높은 특징을 지닌다[4]. 오일은 황녹색을 띠고, 포화지방산인 palmitic acid와 stearic acid, 불포화지방산인 oleic acid, linoleic acid, linolenic acid를 포함하고 있으며, 민감성 및 건성 피부치료에 효과적인 것으로 알려져 있다[4]. 선행연구로 이산화탄소 초임계 유체를 통해 400bar, 40°C 조건에서 추출한 HS의 수율 측정, 향산화능 실험 결과가 있지만, 온도조건을 달리하고 보조용매를 사용할 경우의 대한 연구가 부족한 실정이다[5].

초임계 추출법은 특정 유체의 임계점(critical point) 이상의 압력과 온도 조건을 충족시켜 각종 생리활성 물질을 추출하는 방법으로, 초임계 유체는 기체와 액체의 중간 성격을 띤다. 기체의 높은 확산성, 낮은 점성, 낮은 표면장력 특성과 액체의 높은 밀도, 높은 용해도 특성을 가지고 있어, 추출 물질의 구조에 빠르게 침투하여 유효성분을 효율적으로 추출이 가능하다[6]. 초임계

유체로 널리 쓰이는 이산화탄소는 상대적으로 임계온도(31°C)를 특성이 띠며, 인체에 무해하며, 비교적 저렴한 가격으로 널리 사용된다[6].

최근 이산화탄소를 이용한 초임계 추출법으로 천연물을 추출하는 연구가 지속되었으나, 이산화탄소의 화학 특성인 비극성으로 인해 극성물질의 성분 추출이 용이하지 않은 것으로 알려져 있다. 이를 보완하기 위한 방법으로 알코올 계열의 극성 보조용매(cosolvent)를 이용하여 추출한다면, 추출효율의 향상이 가능하다 결과가 보고되었다[6].

1960년대, Alec Bangham이 수상에서 인지질로 둘러싸인 소포체 구조가 형성되는 것을 처음 발견하였고, 이를 리포솜(liposome)이라고 명명하였다[7]. 리포솜은 지질 분자들이 수용액에 분산될 때 자발적으로 형성되는 지질 분자들의 회합체로[8], 내부에는 친수성 약물을, 지질막 사이에는 친유성 약물을 캡슐화 할 수 있고[8], 생체막 구조와 유사한 지질이중층 구조로 인체에 대한 독성이 적어 인체에 부작용 없이 투여가 가능할 뿐만 아니라[8], 물질의 효과적인 전달 등의 면에서 활용도가 높아[8], 생리활성성분에 대한 약물전달시스템(drug delivery system)으로 많은 연구가 되고 있다[7]. 리포솜은 수십 nm ~ 수십 μ m 단위로 그 크기가 다양하며, 리포솜의 크기는 리포솜의 순환 반감기를 결정하는 중요한 매개 변수이다[7,8].

리포솜이 실질적으로 산업에 이용되는 데에 어려운 이유로는, 현탁액 상태에서의 불안한 안정성 때문에 봉입 효율의 재현성 및 캡슐화 된 약물의 유출 등 리포솜 제조 방법들이 대체로 대량생산에 적합하지 않았기 때문이었다[7]. 이러한 문제점을 극복하고 리포솜을 산업화하여 사용하기 위해서, 최근에 Mayhew 등은 고압유화기(Microfluidizer)를 사용하여 고농도의 지질현탁액을 작은 크기의 리포솜으로 제조하는 방법이 보고되었다[7].

따라서 본 연구는 대마종자(*Cannabis sativa* Seed)를 이산화탄소 초임계 유체로 추출하여 수율을 측정하고, 향산화, 항균 효과를 *in vitro* 실험을 통하여 검증하였다. 또한 난용성 대마종자의 초임계추출물을 제형에서 용해시키기 위해 리포솜으로 캡슐화하고, 그 리포솜의 안정성을 확인하기 위해 particle size와 zeta potential을 측정하였다. 또한 리포솜으로 안정화시킨 난용성 추출물의 경피투과도 증진을 확인하기 위해 Franz diffusion cell test를 시행하였다. 이러한 연구를 통하여 초임계

추출법을 통한 대마종자 추출물을 화장품의 유효성분으로 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

항산화 및 항균 실험에 사용된 시약은 Sigma aldrich (USA)의 제품을 사용하였다. 추출에 사용된 기기는 초임계 추출 장치(Ari instrument, Korea), CO₂ (SeongnamGas, Korea), 감압농축기(EYELA, Japan)가 있다. 항산화 및 항균 실험에는 Multi-Mode Microplate Reader(BioTek, USA), 파이펫(Gilson, France)이 사용되었다. 리포솜 제조에는 High Pressure Homogenizer (Micronox, Korea)를 이용하였고, particle size 측정 장치로 Nanotracs Flex particle size analyzer(Microtrac, USA), zeta potential 측정 장치로 Stabino® particle charge mapping system (Particle Metrix, USA)를 사용하였다. 경피투과도 측정 장치로 Franz Diffusion Cells and Systems (PermeGear, USA), 인공피부로 Neoderm-E(Tegoscience, Korea), 분석기기는 High performance liquid chromatography (HPLC)(Acme 9000, Young Lin, Korea), 컬럼은 Sunfire™ C18 (3.5µm 4.6×150nm, Waters, USA)를 사용하였다. 항균실험에 사용된 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes* 균주들은 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 분양받아 사용하였다.

2. 시료추출

초임계 이산화탄소를 이용하여 대마종자를 다음의 조건으로 추출하였다. 추출조의 압력은 350bar으로 모두 동일 조건으로 추출하였으며, 온도조건을 30°C, 45°C, 60°C로 달리하였다. 분리조의 압력은 50bar, 온도 조건 25°C로 추출하였고, 공용매로 99% 에탄올을 사용하였다. CO₂ 유속은 60mL/min으로 2시간 30분간 추출하였고, 에탄올은 5mL/min으로 투입하였다. 추출 후에 공용매를 모두 휘발시키기 위해 농축 과정을 거쳐 최종 추출물을 얻었다.

3. 수율 측정

각각의 조건별로 원물 100g을 추출조에 넣은 후, 분리조에서 추출물을 획득하고, 보조용매를 사용하였기

때문에 감압농축기를 이용하여 농축을 한 후, 최종 추출물의 무게를 측정하였다. 다음의 식을 사용하여 Hemp seed supercritical fluid 30°C extracts (HSSE30), Hemp seed supercritical fluid 45°C extracts(HSSE45), Hemp seed supercritical fluid 60°C extracts(HSSE60)의 수율을 구하였다.

$$\text{수율 (\% w/w)} \\ = (\text{최종 추출물의 무게 (g)}/\text{원물의 무게 (g)})\times 100$$

4. 항산화 실험

1) Total polyphenol content assay(TPC assay)

총 폴리페놀(total polyphenol content) 측정법은 Folin-denis' method를 응용하여 측정하였다[9]. 10mg/mL 농도로 시료를 희석하여 각 well에 10µL를 넣고, Folin ciocalteu's reagent를 40µL를 가한 뒤에 3분을 반응시켰다. 그 후 20% Na₂CO₃ 150µL를 첨가하였다. 직후에 Multi-Mode Microplate Reader를 이용하여 760nm로 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid를 사용하여 검량선을 작성하였으며, 폴리페놀의 함량은 gallic acid equivalents(mg GAE/g extract)로 나타내었다[10].

2) DPPH radical scavenging assay

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) assay는 Blois의 방법에 기반하여 측정하였다[11]. 이 assay는 발색법 중 하나이며, DPPH는 radical 상태에서 보라색을 띠고, 전자를 받아 환원이 되면 노란색의 DPPH-H로 색이 바뀌게 된다[12]. 시료 10µL에 0.2mM DPPH 용액 190µL을 넣고, 실온 조건에서 암실에서 30분 반응을 시킨 후, Multi-Mode Microplate Reader로 520nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능을 비교하기 위해 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} \\ = (1-\text{시료 첨가군 흡광도}/\text{시료 무첨가군 흡광도})\times 100$$

3) ABTS+ radical scavenging assay

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) assay는 Van den Berg의 실험방법을 응용하였다[13]. 청록색을 띠는 ABTS+ radical이 항산화 물질에 의해 투명한 색이 되는 원리를 이용한 방법이다.

ABTS working solution을 ABTS와 potassium persulfate를 섞어 최종 농도 7.4mM, 2.64mM로 만든 후에, 24시간 반응시켜 ABTS+ radical이 형성되도록 하였다. ABTS working solution은 734nm로 흡광도를 측정하여 0.7 ± 0.1 를 맞춘 뒤 실험에 사용하였다.

시료 10 μ L에 ABTS working solution을 190 μ L 첨가하고 실온 조건에서, 암실에서 20분간 반응 시킨 후에 Multi-Mode Microplate Reader로 734nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS+ radical 소거능을 비교하기 위해 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{ABTS+ radical scavenging activity (\%)} \\ = (1 - \text{시료 첨가군 흡광도} / \text{시료 무첨가군 흡광도}) \times 100$$

5. 항균 실험

대마종자 초임계 추출물의 항균 활성을 측정하기 위해서 disc diffusion test를 시행하였다[14]. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* 균주는 Muller-Hinton medium을 사용하여 37°C에서 24시간 배양 후에 1회 계대배양하여, *Propionibacterium acnes* 균주는 Reinforced Clostridial medium을 사용하여 혐기성 조건에서 37°C에서 72시간 배양 후에 1회 계대배양하여 분광광도계로 600nm에서 OD값을 0.5로 맞춘 뒤 실험하였다. 양성대조군으로 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*는 40mg/mL의 methyl paraben을, *Propionibacterium acnes*는 40mg/mL의 salicylic acid를 사용하였다.

6. 리포솜 제조

1) 리포솜 제형 제조

리포솜 제형은 다음의 Table 1의 처방대로 제조하였다. A상을 교반을 하며 75°C까지 가온하고, B상도교반을

표 1. 리포솜 제조 처방

Table 1. Prescription for liposome manufacturing

Phase	Ingredient	Content(%)
A (Water phase)	Glycerin	60
	Hydrogenated Soy Lecithin	5
	Water	8
	1,2-Hexandiol	2
B (Oil phase)	Dimethicone	24
	HSSE60	1

HSSE60: Hemp seed supercritical fluid extract 60°C.

하며 75°C까지 가온을 한 뒤, A상에 B상을 천천히 가하면서 Homogenizer를 이용하여 3,000rpm으로 1시간 교반하였다. 이렇게 제조한 pre-emulsion을 particle size가 작고 균일한 리포솜을 제조하기 위해 1200bar의 압력으로 Microfluidizer를 3회 통과시켜 리포솜(Formulation 1)을 제조하였다.

2) Particle size 및 Zeta potential 측정

제형에서의 안정성을 측정하기 위해 particle size와 zeta potential을 측정하였다. 난용성 추출물인 HSSE60이 1%가 되도록 dimethyl sulfoxide(DMSO)가 1% 첨가된 3차 정제수에 용해시킨(Formulation 2) 후에, 3차 정제수로 10분의 1 희석하여 측정하였고, HSSE60 1% 리포솜(Formulation 1)도 마찬가지로 3차 정제수에 10분의 1 희석하여 실험하였다.

7. 경피투과도 실험

경피투과도는 Franz Diffusion Cells and Systems를 이용하여 측정하였다. 인공피부 Neoderm®-E를 각질층이 위로 향하도록 receptor chamber 위에 올려놓고, donor chamber를 인공피부 위에 올려 고정시킨 후 receptor chamber에 receptor medium인 PBS(Sigma aldrich, USA)를 8.5mL 채워주었다. 항온수조를 이용하여 온도는 37°C를 유지하였다. 30분간 receptor medium과 인공피부를 안정화시킨 후, Formulation 1과 Formulation 2 500 μ L를 1.326665cm² 면적의 인공피부에 각각 도포하였다. 투과된 시료가 균일하게 혼합되도록 magnetic stir bar를 500rpm으로 유지하면서 4, 8, 12, 16, 20, 24시간마다 각각 sampling port를 통해 투과된 시료가 용해되어있는 receptor medium을 500 μ L 채취하고, 동량의 receptor medium을 보충해주었다. 채취한 receptor medium은 HPLC를 이용하여 정량하였다[15].

8. 통계처리

수율 측정을 제외한 모든 실험은 각 세 번의 실험을 통해 결과를 얻었고, 실험에 의해 얻어진 값들의 평균과 표준편차로 나타내었다. 항균실험을 제외하고 SPSS 18.0 프로그램(SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 이용해 t-test를 실시하였고, p값이 0.05 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

III. 실험 결과 및 고찰

1. 대마종자의 수율 측정

대마종자의 초임계추출물, HSSE30, HSSE45, HSSE60의 수율은 다음의 Table 2에 나타내었다. 같은 압력 조건에서 추출온도가 올라갈수록 수율이 더 높게 나타났다. 선행 연구에서 에탄올 추출법으로 대마종자를 추출할 경우 수율이 23.00%로 보고되었고[5], 이와 비교하면 45°C, 60°C에서 초임계 유체로 추출한 수율이 더 높게 나타났음을 알 수 있다.

표 2. HSSE30, HSSE45, HSSE60의 수율 측정의 결과
 Table 2. Result of yield measurement of HSSE30, HSSE45, HSSE60

Sample	Yield(%)
HSSE30	19.64
HSSE45	29.33
HSSE60	34.24

HSSE30: Hemp seed supercritical fluid 30°C extracts, HSSE45: Hemp seed supercritical fluid 45°C extracts HSSE60: Hemp seed supercritical fluid 60°C extracts.

2. 대마종자의 항산화 실험 결과

1) Total polyphenol content assay

알칼리조건에서 Folin-ciocalteu's reagent의 phosphomolybdic /phosphotungstic acid complex으로 페놀성 화합물에 있는 전자가 이동하여 청자색 환원물이 생성된다[16]. 온도조건에 따른 추출물의 total polyphenol content의 측정 결과는 다음의 Table 3에 나타내었다. HSSE45에서 5.06 ± 0.07mg GAE/g extract으로 가장 높게 측정되었으며, HSSE45 > HSSE60 > HSSE30 순서대로 함량이 높았다.

표 3. 대마종자 초임계추출물의 총 폴리페놀 함량
 Table 3. Total polyphenols of supercritical fluid extracts from Hemp Seed

Sample	Total polyphenol content (mg GAE/g extract)
HSSE30	2.87 ± 0.13
HSSE45	5.06 ± 0.07
HSSE60	4.18 ± 0.04

Values represent the mean ± SD of three independent experiments. HSSE30: Hemp seed supercritical fluid 30°C extracts, HSSE45: Hemp seed supercritical fluid 45°C extracts, HSSE60: Hemp seed supercritical fluid 60°C extracts.

2) DPPH radical scavenging assay

DPPH assay는 간단하게 이용할 수 있는 측정법으로, 천연물의 항산화능을 측정하기 위해 널리 알려진 방법이다. DPPH는 organic nitrogen radical로 짙은 보라색을 띠며, 항산화능이 있는 성분과 접촉하면 hydrogen radical의 전자를 받아 환원되어 안정적인 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazine으로 비가역적으로 전환되며 짙은 보라색이 노란색으로 바뀌는 특징을 가진다[17]. 2.5~20 mg/mL 농도에서 모든 HSSE 시료에서 농도의존적으로 DPPH radical 소거능이 증가하는 결과가 나타났다. 특히, HSSE45의 농도 2mg/mL에서 35.52 ± 0.76%로 가장 뛰어난 소거능을 보였으며, HSSE60 농도 20mg/mL에서 30.85 ± 0.21%, HSSE30 농도 20mg/mL에서 11.18 ± 0.64%의 소거능이 나타났다(Figure 1).

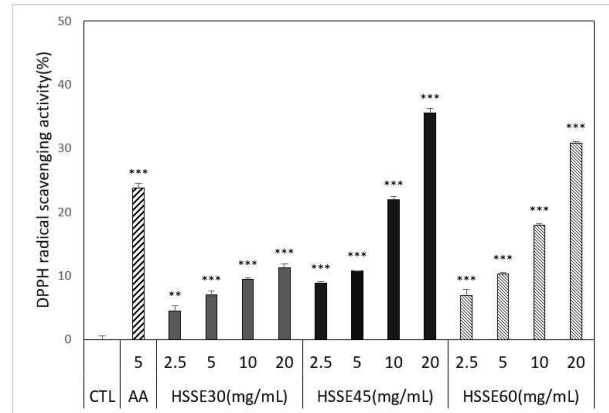


그림 1. 대마종자 추출물의 DPPH 라디칼 소거능(%)
 Figure 1. DPPH radical scavenging activity of HSSE30, HSSE45, HSSE60

Positive control: L-ascorbic acid 23.74 ± 0.67% (radical scavenging activity) at a concentration of 5µg/mL., **P<0.01, ***P<0.001 vs control, CTL: control, AA: L-ascorbic acid, HSSE30: Hemp seed supercritical fluid 30°C extracts, HSSE45: Hemp seed supercritical fluid 45°C extracts HSSE60: Hemp seed supercritical fluid 60°C extracts.

3) ABTS+ radical scavenging assay

ABTS+ radical은 산화제에 의해 산화되어 생성되며, 이는 상당히 안정하기 때문에 산화촉진제를 필요로 하지 않는다[18]. 2.5~20mg/mL 농도에서 모든 HSSE 시료에서 농도의존적으로 ABTS+ radical 소거능이 증가하는 결과가 나타났다. 각각의 시료 중 최고 농도에서 HSSE45는 42.97 ± 0.29%, HSSE60은 41.05 ± 1.20%, HSSE30은 38.28 ± 0.83%의 소거능을 보였다(Figure 2).

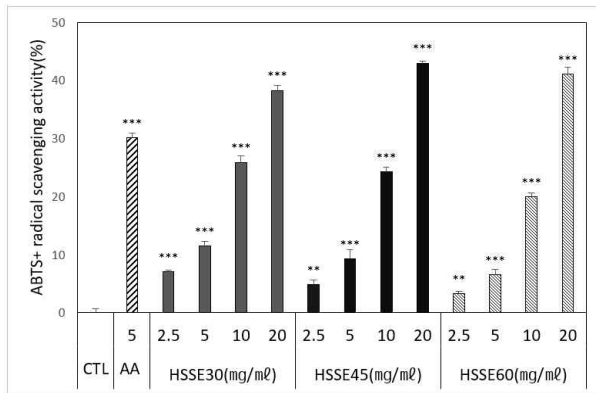


그림 2. 대마종자 추출물의 ABTS+ 라디칼 소거능(%)
 Figure 2. ABTS+ radical scavenging activity of HSSE30, HSSE45, HSSE60
 Positive control: L-ascorbic acid 30.15 ± 0.73% (radical scavenging activity) at a concentration of 5µg/mL, **P<0.01, ***P<0.001 vs control, CTL: control, AA: L-ascorbic acid, HSSE30: Hemp seed supercritical fluid 30°C extracts, HSSE45: Hemp seed supercritical fluid 45°C extracts HSSE60: Hemp seed supercritical fluid 60°C extracts.

3. 항균 실험 결과

Disc diffusion test는 균을 도말한 agar plate medium 위에 시료를 흡수시킨 disc를 올려 배양한 후, 균의 성장을 억제하는 만큼 disc 주변으로 확산된 시료의 inhibition zone(clear zone)의 지름을 측정하는 방법이다[19].

다음과 같이 Table 4에 실험결과를 나타냈으며, *Propionibacterium acnes* 균주에서만 성장을 억제하는 효과를 보였고, 40mg/mL농도에서 HSSE60은 10.25 ± 0.50mm, HSSE45는 9.87 ± 0.47mm, HSSE30은 9.75 ±

0.28mm, 80mg/mL 농도에서 HSSE60은 11.12 ± 0.25mm, HSSE45는 10.43 ± 0.42mm, HSSE30은 10.37 ± 0.47mm로 농도의존적으로, 온도의존적으로 clear zone이 더 크게 측정되었다. HSSE에는 *Propionibacterium acnes*를 억제하는 물질을 함유하고 있고, 특히 온도를 높여 추출을 할 경우 그 물질의 함량이 더욱 많이 추출되는 것으로 사료된다.

4. Particle size 및 Zeta potential 측정 결과

1) Particle size

콜로이드상에서는 입자의 크기는 중요하다. 입자크기가 작을수록 중력의 영향이 적어지고, 이로 인해 브라운 운동도 영향을 적게 받아 저장기간 중 크리밍 또는 침전 현상이 발생하지 않기 때문이다[20]. 또한, 응집이 일어나지 않아서 분산상태에서 분리가 일어나지 않고, 작은 입자 자체가 변형되지 않는 특성이 있으므로 합일 현상의 발생이 억제되기 때문이다[19].

Formulation 1과 Formulation 2의 particle size를 다음의 Table 5에 나타내었다. Formulation 2의 경우 6000nm 이상으로 측정이 되었고, Formulation 1은 104.57 ± 5.93nm로 측정되었으며, 리포솜 제조 시에 난용성 추출물을 용해시키면서 입자크기 또한 줄일 수 있었다.

2) Zeta potential

Zeta potential이란 액체에 부유하는 콜로이드 입자의 표면 전기적 특성으로서, 단위는 mV를 사용한다[21].

표 4. 대마종자 추출물의 clear zone 직경 측정 결과
 Table 4. The result of clear zone diameter of HSSE30, HSSE45, HSSE60

Strain	Concentration(mg/mL)	Clear zone(mm)				
		Control	PC	HSSE30	HSSE45	HSSE60
<i>Staphylococcus aureus</i>	40	-	9.00±0.00 ^a	-	-	-
	80	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	40	-	9.50±0.49 ^a	-	-	-
	80	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	40	-	8.83±0.25 ^a	-	-	-
	80	-	-	-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	40	-	9.75±0.27 ^b	9.75 ± 0.28	9.87 ± 0.47	10.25 ± 0.50
	80	-	-	10.37 ± 0.47	10.43 ± 0.42	11.12 ± 0.25

Values represent the mean ± SD of three independent experiments, PC: Positive control, a: Methyl paraben, b: Salicylic acid, HSSE30: Hemp seed supercritical fluid 30°C extracts, HSSE45: Hemp seed supercritical fluid 45°C extracts HSSE60: Hemp seed supercritical fluid 60°C extracts.

표 5. 60°C로 추출한 대마종자 초임계추출물의 입자크기
 Table 5. Particle size of Hemp seed supercritical fluid 60°C extracts

	Formulation 1	Formulation 2
Particle size(nm)	104.57 ± 5.93	≥6000

Zeta potential은 일반적으로 절댓값이 30.00mV 이상이면 입자들 사이의 반발력에 의해 van der Waals 인력이 생기지 않을 정도로 충분한 거리를 두기 때문에 입자들이 뭉치지 않아 안정하다고 알려져 있다.

Zeta potential 측정 결과, Formulation 2는 -113.37 ± 0.21mV, Formulation 1는 -141.80 ± 0.20mV로 측정되었다(Table 6). 리포솜으로 HSSE60을 캡슐화했을 경우, 입자들의 표면 전하의 절댓값을 증가시킬 수 있었다.

표 6. 60°C로 추출한 대마종자 초임계추출물의 제타전위.
 Table 6. Zeta potential of Hemp seed supercritical fluid 60°C extracts.

	Formulation 1	Formulation 2
Zeta potential(mV)	-141.80 ± 0.20	-113.37 ± 0.21

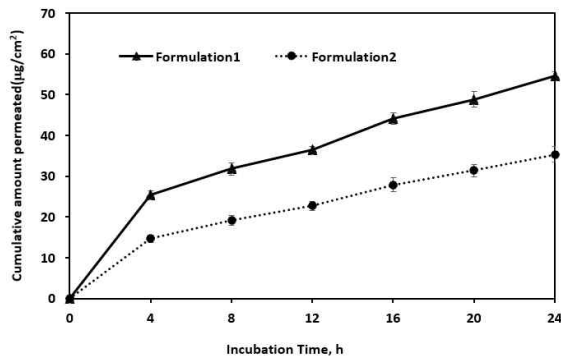


그림 3. 24시간 동안 Formulation 1, Formulation 2의 경피투과도 프로파일
 Figure 3. Epidermal penetration profiles of Formulation 1, Formulation 2 over 24hours

표 7. 60°C로 추출한 대마종자 초임계추출물의 제형에 따른 경피투과도 실험 결과

Table 7. The result of epidermal penetration experiment according to the type of formulation with Hemp seed supercritical fluid 60°C extracts

Cumulated permeation(µg/cm ²)	0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h
Formulation 1	0	25.36 ± 1.02	31.74 ± 1.51	36.39 ± 0.85	44.13 ± 1.36	48.77 ± 1.87	54.63 ± 0.88
Formulation 2	0	14.64 ± 0.95	19.19 ± 1.25	22.66 ± 1.16	27.88 ± 1.66	31.32 ± 1.53	35.26 ± 1.91
P-value		***	***	***	***	***	***

***P<0.001 vs control(Formulation 2).

5. 경피투과도 실험 결과

24시간 동안의 시간 경과에 따라 경피투과도는 지속적으로 증가했으며, Formulation 1과 Formulation 2의 최종 24시간 후 경피투과도는 각각 54.63 ± 0.88µg/cm², 35.26 ± 1.91µg/cm²로, Formulation 1이 1.54배 더 높은 투과도를 보였다. 시간 경과에 의한 자세한 경피투과도와 통계적 유의성을 다음에 나타냈다(Table 7, Figure 3).

IV. 결론

본 연구에서는 대마종자 초임계 추출물에 대한 수율 측정 및 항산화, 항균 효능을 평가하였고, 수율이 가장 높게 나타난 HSSE60에 리포솜 기술을 적용하여 입자크기를 감소시켜, 경피흡수를 증가시키고자 하였다.

수율은 HSSE30은 19.64%, HSSE45는 29.33%, HSSE60은 34.24%로 높은 수율이 측정되었다. Total polyphenol content는 HSSE45에서 5.06 ± 0.07mg GAE/g, HSSE60에서 4.18 ± 0.04mg GAE/g, HSSE30 2.87 ± 0.13mg GAE/g으로 검량되었다. DPPH radical scavenging assay 결과, 농도 20mg/mL에서 HSSE45는 35.52 ± 0.76%, HSSE60은 30.85 ± 0.21%, HSSE30은 11.18 ± 0.64%의 소거능이 나타났다. ABTS+ radical scavenging assay 결과, 최고농도에서 HSSE45는 42.97 ± 0.29%, HSSE60은 41.05 ± 1.20%, HSSE30은 38.28 ± 0.83% 소거능을 보였으며, 농도의존적으로 소거능이 증가하는 결과를 보였다. 항산화 실험에서는 최고농도에서 HSSE45 > HSSE60 > HSSE30 순으로 항산화능이 크게 나타나는 일정한 경향을 보였다.

항균 실험에서는 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* 균주를 제외한 *Propionbacterium*

acnes 균주에서만 clear zone이 나타났고, HSSE60 > HSSE45 > HSSE30 순으로 clear zone이 크게 나타났다.

Formulation 1과 Formulation 2의 particle size는 각각 $104.57 \pm 5.93\text{nm}$ 와 6000nm 이상으로 측정되었다. Formulation 1과 Formulation 2의 zeta potential은 각각 $-141.8 \pm 0.20\text{mV}$, $-113.37 \pm 0.21\text{mV}$ 로 측정되었다. 이로써 particle size의 감소와 zeta potential의 절댓값 증가로 Formulation 1의 제형이 더욱 안정하다는 것을 확인할 수 있었다[20, 21]. Franz diffusion cell 실험 결과, Formulation 1, Formulation 2의 최종 24시간 후 경피 투과도는 각각 $54.63 \pm 0.88\mu\text{g}/\text{cm}^2$, $35.26 \pm 1.91\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로, 리포솜 기술을 이용해 경피투과도를 약 1.54배 증가시킬 수 있었다.

본 연구에서는 대마종자 초임계 추출물을 대상으로 총 폴리페놀 함량을 검량하였고, 피부세포의 산화를 방지하기 위한 추출물의 항산화 효능을 평가하였으며, *Propionibacterium acnes* 균주에 대한 항균효과를 확인할 수 있었다. 수율이 가장 높게 측정된 60°C 로 추출한 추출물에 리포솜 기술을 적용하여 난용성 추출물을 용해시키고, particle size를 100nm 내외로 축소시키며, zeta potential의 절댓값도 증가시킬 수 있었다. 이를 통해 리포솜을 제조하였을 경우 제형안정성이 증가됨을 확인하였고, 경피흡수도 증가시킬 수 있는 것을 확인하였다. 이로써 대마종자 초임계 추출물은 높은 수율과 여러 생리활성 물질이 함유되어 있어 화장품의 기능성 천연물 소재로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

References

- [1] Byun HS, Um YS, Hur IH, Sim SY, Kim KJ. The Quality of Life of Skin Disease Patients, Particularly Acne Patients. *Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology*. 2006;19(1):65-78. DOI: <http://dx.doi.org/10.6114/jkood.2014.27.3.026>
- [2] Lee SH, Lee KO, Kim SO. Effects of Skin Care on Users' Mental Health and Self-esteem. *Journal of the Korean Society of Cosmetology*. 2009;15(1):155-167.
- [3] Patwardhan B, Vaidya ADB, Chorghade M. Ayurveda and Natural Products Drug Discovery. *Ayurveda and Natural Products Drug Discovery*. Current Science. 2004;86(6):789-799.
- [4] Park SH. Influence of Hempseed and Hempseed Helichrysum Oil Blend on Mice with Induced Atopic Dermatitis. Ph.D. Dissertation, Chosun University, 2019.
- [5] Hong SH, Sowndhararajan K, Joo TW, Lim CM, Cho HE, Kim SM, Kim GY, Jhoo JW. Ethanol and supercritical fluid extracts of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) increase gene expression of antioxidant enzymes in HepG2 cells. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 2015;4(2):147-152. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(15\)30012-9](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(15)30012-9)
- [6] Kim ID, Kwon RH, Heo YY, Jung HJ, Kang HY, Bae Jin Ha BJ. Supercritical Extraction of Oriental Herb : Anti-aging and Anti-wrinkle Effects. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*. 2008;23(6):529-534.
- [7] Yang SJ. Study on the Stability of Biotin Encapsulated by Nano Liposome. Master's Thesis Dissertation, Jeju National University, 2020.
- [8] Park SH, Kim MH. Physical Property and Stability of Liposome Prepared from Egg Yolk Phospholipids at Various Storage Conditions. *Korean Society for Food Science of Animal Resources*. 2008;28(5):549-554. DOI: 10.5851/kosfa.2008.28.5.549
- [9] Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1965;16(3):144-158.
- [10] Lee SH, Lee SO. Polyphenol contents and antioxidant activities of lentil extracts from different cultivars. *Journal of Korean Society of Food Science Nutrition*. 2016;45(7):973-979. DOI: <https://doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.7.973>
- [11] Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 1958;181(4617):1199-1200. DOI: <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- [12] Heo SH, Park SI, An GM, Shin MS. Physiological Activity of Robinia pseudo acacia Leaf Extracts and Enhancement of Skin Permeation Using Polymer Micelles and Cell Penetrating Peptide. *The Journal of the Convergence on Culture Technology*. 2019;5(3):271-282. DOI: <https://doi.org/10.17703/JCCT.2019.5.3.271>
- [13] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Riceevans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999;26(9/10):1231-1237. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

- [14]Ko MO, Kang HJ, Hwang JH, Yang KW. Screening of the antibacterial effects by ethanol extracts from natural plant in Jeju against *Propionibacterium acnes*. *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 2018;44(1):59-66. DOI: <https://doi.org/10.15230/SCSK.2018.44.1.59>
- [15]Park JS. The antioxidative, antimicrobial Activity and tyrosinase activity inhibitory effect of extracts from parts of *Robinia pseudo acacia*. Master's Thesis Dissertation, Soongsil University, 2008.
- [16]Hong JI, Kim HJ, Kim JY. Factors Affecting Reactivity of Various Phenolic Compounds with the Folin-Ciocalteu Reagent. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2011;40(2):205-213. DOI: <https://doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.2.205>
- [17]Kim MJ, Park EJ. Feature Analysis of Different In Vitro Antioxidant Capacity Assays and Their Application to Fruit and Vegetable Samples. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2011;40(7):1053-1062. DOI: <https://doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.7.1053>
- [18]An GM. Epidermal Permeation Experiment and Cosmetic Material Development using Polymer Micelle (PCL-PEG) Formulation of *Red pinus densiflora* and *Petroselinum crispum* extract. Master's Thesis Dissertation, Eulji University, 2020.
- [19]Biemer JJ. Antimicrobial Susceptibility Testing by the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 1973;3(2):135-140.
- [20]Cho WG. Nanoemulsions: a Novel Vehicle for Cosmetics. *Journal of Society of cosmetic scientists of Korea*. 2011;37(1):1-21. DOI: <https://doi.org/10.15230/SCSK.2011.37.1.001>
- [21]Lee JK, Kim SC, Kim HJ, Lee CG, Ju CH, Lee LC. A study on the Zeta Potential Measurement and the Stability Analysis of Nano Fluids using a Particle Image Processing System. *Journal of ILASS-Korea*. 2003;8(1): 16-22.

※ 본 연구는 2017년도 과기정통부의 재원으로
한국연구재단 바이오·의료기기개발사업의 지
원을 받아 수행되었음 (No. 2017M3A9D8
048416).