

역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 이용한 금화규 추출물의 분석 및 마스크팩 제형 응용

김영호*, 김제원*, 김정현*, 맹휘주*, 박세환*, 박정래*, 이민구*, 엄서준*, 심재호**

*,** 한라대학교 화학공학과
e-mail: jhsim@halla.ac.kr

RP-HPLC Analysis of Hibiscus hamabo Extracts and Their Application in Facial Mask Formulations

YeongHo Kim*, JeWon Kim*, JeongHyun Kim*, HweJu Maeng*, SeHwan Park*,
JeongRae Park*, MinGu Lee*, SeoJun Yeom*, JaeHo Sim**

*Dept. of Chemical Engineering, Halla University

요 약

Hibiscus hamabo Siebold & Zucc.(금화규)는 다양한 생리활성 성분을 함유하고 있어 화장품 소재로서의 활용 가능성이 주목받고 있다. 본 연구에서는 H. hamabo 추출물을 대상으로 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 이용하여 특이성, 직선성을 분석하였다. 이를 바탕으로 H. hamabo 추출물을 원료로 한 마스크팩 시제품을 제조하였으며, 보습력, 피부 진정 효과 및 화장품 소재로서의 적용 가능성을 평가하였다. 예비 실험 결과, 금화규 추출물의 첨가가 제형의 수분 공급 능력을 향상시키고 민감성 피부에 긍정적 효과를 제공할 수 있음을 확인하였다. 이상의 결과는 RP-HPLC 분석을 통해 규명된 H. hamabo 추출물이 기능성 화장품, 특히 마스크팩 개발을 위한 유망한 천연 소재임을 시사하며, 식물 기반의 지속 가능한 스킨케어 소재 수요 충족에 기여할 수 있음을 보여준다.

1. 서론

콜라겐(Collagen)은 몸 속에서 세포와 세포가 떨어지지 않도록 접착제와 같은 역할을 하는 경단백질로 피부의 진피를 구성하는 주성분이다. 피부 건조 증량의 75%를 차지하며[1], 광노화 및 급성 피부장벽 손상에 의해 유발되는 피부 진피 및 표피층의 손상을 회복, 보호하는 등의 효과가 있다[2].

콜라겐 분자는 α -chain으로 이루어진 삼중 나선 구조로 되어 있으며, 각 체인은 Gly-X-Y 구조의 아미노산 배열로 이루어져 있다. X와Y 위치에 주로 프롤린(Proline)과 4-하이드록시플로린(4-Hydroxyproline)으로 구성되며[3] 분자구조의 특성상 자체적으로 20% 정도를 수화할 수 있고, 이 정도가 동물체의 노화에 따라 달라진다[4]. 단백질 가수분해효소는 충분한 수분이 존재해야만 활성화될 수 있어 건조한 상태에서의 피부는 각질층의 분리가 원활하지 못해 피지선이 제 기능을 하지 못하게 되어 피부 건조증이 유발된다[5]. 따라서 보습효과가 있을 것으로 예상되는 콜라겐에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다[6].

기존의 콜라겐 산업은 주로 동물 유래의 콜라겐이 사용되어 왔다. 하지만 최근 들어 비건(vegan) 트렌드의 확산과 동물복지 및 환경 문제에 대한 인식 제고로 비건 뷰티가 새로운 트렌드로 부상하고 있으며, 식물성 콜라겐에 대한 관심 또한 증가할 것으로 전망된다[7-8]. 식물성 콜라겐은 동물 유래 콜라겐과는 구조적으로 차이가 있으나, 콜라겐과 유사한 기능을 나타내는 펩타이드 혹은 당단백질을 포함하고 있어, 식물성 자원을 이용한 지속가능한 소재 개발의 가능성을 제시한다[9].

금화규는 아욱과 3개 종군 중 1종인 닥풀속으로, 닥풀(황촉규)의 학명인 "Ablemoschus Manihot (L.) Medic."과 일치하며[10], 국내에서는 황금 해바라기, 골든 히비스커스로 불리기도 한다. 금화규는 myricetin, cannabiscitrin, glycerolmonopalmitate, 2, 4-dihydroxy benzoic acid, guanosine, adenosine, maleic acid, heptatriacontanoic acid, 1-triacontanol, tetracosane, beta-sitosterol등의 다양한 성분을 함유하고[11], Flavonoid와 점질성 물질(점액질)이 풍부하여 한방에서는 피부 진정과 보습에 활용되며 콜라겐 유사 성분을 함유한다고 알려져 있다[12-13]. 또한 Flavonoid 등과 같은 식이성 항산화제는 비효소적 항산화제로 산화에 따른 스트레스와 관련 있는 질병의 예방에 효과가 있는 것으로

알려져 있다[14].

따라서 본 연구는 금화규로부터 콜라겐 유사 성분을 추출하고, 식물 유래 추출물의 정확한 분석을 위하여 HPLC를 활용하여 성분을 확인함으로써, 식물성 콜라겐의 존재 가능성과 특성을 규명함과 동시에 미용 마스크팩을 제형하여 추출한 콜라겐 유사 물질의 효능을 확인하고자 하였다.

고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, High Performance Liquid Chromatography)는 고압 정량펌프를 사용한다는 점에서 고전적인 LC와 기본원리는 비슷하다. 본 연구에서는 그 중 비극성 정지상에 극성 이동상을 사용하는 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC, Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography)법을 사용하여 수용액 시료의 분리를 향상시키고 tailing 현상을 줄일 수 있도록 하였다[15].

2. 실험

본 연구에서 사용된 금화규 분말은 국내에서 재배된 금화규(Ablemoschus Manihot (L.) Medic.)의 잎 부분을 분말화한 것을 대림상사에서 구매하여 사용하였다.

2.1 추출

금화규 분말 추출물은 금화규 분말과 증류수의 비율이 1:100(w/v)이 되도록 혼합한 후, 12시간 동안 열수 추출하였다. 추출된 시료를 원심분리기(High-speed Centrifuges -1580, Labogene)로 supernatant liquid을 분리하였다. 구연산 나트륨(citric acid, 99.5%, Samchun)을 첨가하여 시료의 pH를 3~4로 조절한 뒤, 펩신(pepsin) 0.2mL를 첨가하고 40℃에서 2시간 30분간 교반하였다. 펩신 하에서 효소 반응이 종료된 시료는 동결건조기(FDB-5503, Operon)를 이용하여 동결건조하였으며, 최종적으로 믹싱볼에서 분말화 하여 분석용 시료 콜라겐 분말 추출물로 사용하였다.

2.2 HPLC 분석조건

본 연구에 사용한 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)는 LC-4000(JASCO, Japan), 고정상으로 컬럼은 FinepakSIL, C18T-5(250mm×4.6mm, 5 μ m, JASCO)를 사용하였고, 이동상 용매로는 Acetonitrile(ACN), DW를 사용하여 (ACN:DW=40:60(v/v)) 아이소크라틱기법(Isocratic Elution)으로 분리하였으며, 유속은 1.0ml/min, 컬럼오븐의 온도는 35℃, UV Detector는 UV-4075(JASCO, Japan)을 이용하여 226nm 파장에서 해당 성분들을 검출하였다.

2.3 Sample 제조

실험에 사용한 표준용액은 증류수(D.W.) 99.99mL에 추출한 콜라겐 분말 0.01g을 혼합 후 교반하여 100ppm의 콜라겐 수용액을 제조하였다. 제조된 표준용액을 증류수(D.W.)로 희석하여 필요한 농도로 조절한 후, 필터(0.45 μ m syringe filter, Avantor)로 여과하여 사용하였다.

2.4 Standard 제조

시판 중인 콜라겐 분말(koco200 premium collagen 100%, Cnabiotech) 0.01g을 용량 플라스크에 정밀하게 취하고, 증류수(DW)를 99.99mL를 추가하여 100ppm의 HPLC 분석용 콜라겐(Standard solution) 으로 사용하였다.

2.5 유효성 평가 (Validation)

유효성 평가(Validation) 시약의 제조는 콜라겐을 함유한 복합체제로, 정확하게 계량된 콜라겐 0.03g과 증류수(DW) 99.97mL를 첨가하여 300ppm의 콜라겐 수용액을 제조한 후, 제조한 시료를 각각 80 μ g/ml, 90 μ g/ml, 100 μ g/ml, 110 μ g/ml, 120 μ g/ml로 총 5개의 유효성 평가 시약을 제조하여 평가실험에 사용하였다.

추출된 콜라겐의 유효성 평가를 위해 특이성, 직선성, 검출한계(LOD, Limit Of Detection) 및 정량한계(LOQ, Limit Of Quantitation)를 산출하여 ICH Guideline에 따라 분석 방법을 검증하였다.

2.6 마스크팩 제형

위의 실험과정을 통해 검증된 콜라겐을 효능을 확인하기 위해 마스크팩을 제형하였다. 증류수 82.2g에 추출한 콜라겐 100,000ppm 과 글리세린 5g, 프로필렌글라이콜 8g, 소듐하이알루로네이트 1g, 토코페롤 1~5g, 베타인 0.1~5g, 판테놀 0.1~5g, 알란토인 0.1~5g, 소듐클로라이드 0.5g, 칼슘클로라이드 0.5g, 마그네슘 클로라이드 0.5g, 잔탄검 0.5g, 포타슘클로라이드 0.5g, 1,2 헥산다이올 1g, 아르기닌 1g, 카보머 0.1g, EDTA-2NA 0.05g, 오일 0.05g을 첨가 후 교반하여 마스크팩 에센스를 제조한 후 마스크팩 시트와 용액을 함께 밀봉하여 보관해 마스크팩을 완성하였다.

3. 결과

3.1 콜라겐 추출결과

정확한 수율을 확인하기 위해 같은 조건 하에서 3회 반복하여 실험한 결과 약 26%의 수율을 나타내는 것으로 확인되었다.

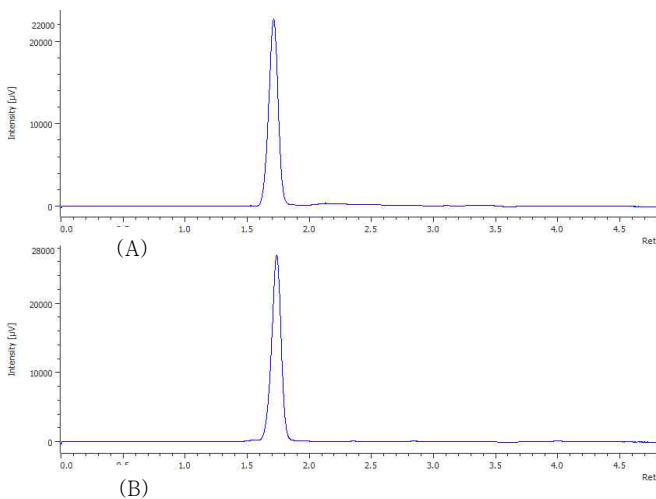
[표 1] Result of Collagen Extracts

No.	금화규 분말(g)	추출 콜라겐(g)	수율(%)
1st.	1.0	0.265	26.5
2nd.	1.0	0.266	26.6
3rd.	1.0	0.266	26.6

3.2 특이성 확인

콜라겐의 최대 흡수파장은 PDA Detector(PDA-4015, JASCO, Japan)를 사용하여 200nm부터 600nm까지의 흡수 파장을 분석한 결과, 콜라겐은 226nm에서 최대 흡수 파장을 나타내어 각 지표성분의 UV 흡수 파장을 정하였다.

특이성을 확인하기 위하여 시판 중인 콜라겐 분말과 시료에서의 분리도 및 머무름 시간(Retention Time, RT)을 확인하기 위해 표준용액과 시료 전처리를 동일한 방법으로 처리한 결과 표준용액(Standard Solution)의 피크 검출 시간과 샘플용액(Sample Solution)의 피크 검출 시간이 일치하였다. 비교 결과 두 크로마토그램에서 동일한 RT에서 단일피크가 검출되었다[그림 1].

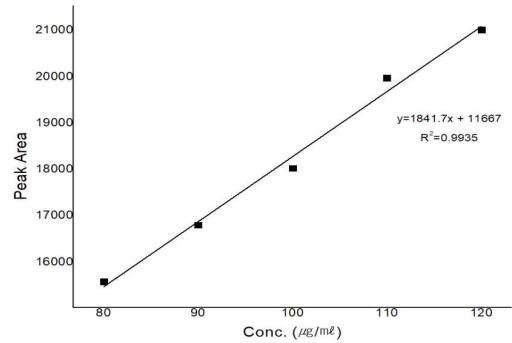


[그림 1] The HPLC chromatograms of collagen, (A) Sample solution (B) Standard solution

3.3 직선성

분석 대상물질의 농도에 비례하여 일정 범위 내에 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 판단하기 위한 직선성을 검토하였다. 직선성은 상기 2.3항에서 제조된 표준용액을 사용하여 각기

다른 80%~120% 범위의 5가지 농도에 대하여 반복 측정 후, 면적비를 통하여 검량선을 구하고, 직선성의 상관계수(R^2)를 계산하여 확인한 결과 R^2 값이 0.99 이상으로 각 성분의 직선성이 유효함을 확인하였다.



[그림 2] Result of Linearity Property.

3.4 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

각 성분의 검출 및 정량이 가능한 최저농도를 확인하기 위하여 검출한계와 정량한계를 측정하였다. 검출한계 및 정량한계는 가장 낮은 농도 구간에서의 표준편차와 검량선의 기울기를 적용하여 계산한 값으로, 검출한계(LOD)는 $1.06\mu\text{g/ml}$ 이고, 정량한계(LOQ)는 $3.22\mu\text{g/ml}$ 를 나타내었다. 본 방법은 3 이상의 농도 수준에서 신뢰성 있는 정량이 가능함을 확인하였다.

3.4 마스크팩 확인

추출한 식물성 콜라겐을 주요 성분으로 하여 마스크팩 제형을 개발하였다. 증류수(82.2 g)를 기반으로 콜라겐(100,000 ppm), 글리세린, 프로필렌글라이콜, 소듐하이알루로네이트, 토코페롤, 베타인, 판테놀, 알란토인 등 콜라겐을 중심으로 피부 탄력, 다양한 보습 및 피부 보호 성분을 첨가하여 마스크팩 에센스를 제조하였으며, 이후 시트와 함께 밀봉하여 최종 제품을 완성하였다.

완성된 제형은 시판 중인 일반 마스크팩과 유사한 물리적 특성과 사용감을 나타내었으며, 실제 적용 결과 또한 기존 제품과 크게 차이가 없는 촉촉함과 피부 밀착감을 제공하였다. 이를 통해 본 연구에서 제조한 콜라겐 함유 마스크팩이 기존 상용 제품과 유사한 수준의 제형적 안정성과 사용감을 확보했음을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- [1] G. H. Kim, "Edible collagen", Hallym University Medical Center, https://hallym.hallym.or.kr/hallymuniv_sub.asp?left_menu=left_health&screen=ptm802&Health_No=21
- [2] J. K. Kim, J. H. Lee, I. H. Bae, et al., "Beneficial Effect of a Collagen Peptide Supplement on the Epidermal Skin Barrier". *Korean J Food Sci Technol*, Vol. 43, No. 4, pp. 458–463, 2011
DOI : <http://dx.doi.org/10.9721/kjfst.2011.43.4.458>
- [3] H. J. Gwak, H. Ahn, W. J. Lee, et al., "Manufacturing and Material Analysis of Collagen/Chitosan Conjugated Fibers for Medical Application". *Textile Coloration and Finishing*, Vol. 33, No. 3, pp. 131–140, 2021
DOI : <https://doi.org/10.5764/TCF.2021.33.3.131>
- [4] Y. H. Kim, E. J. Park, R. Yang, "The Flow Behavior of Skin Collagen". *Korean J Food Sci Technol*, Vol. 27, No. 4, pp. 576–581, 1995
- [5] A. H. Kim, Y. S. Kim, Z. Piao, et al., "Cutaneous hydration effect of collagen hydrolysate containing collagen tripeptides". *Korean J Food Sci Technol*, Vol. 50, No. 4, pp. 420–429, 2018
DOI : <https://doi.org/10.9721/KJFST.2018.50.4.420>
- [6] H. S. Kim, W. K. Hong, M. H. Lee, et al., "The Effect of Low Molecule Collagen Peptide on Skin Anti-glycation and Collagen Synthesis as a Skin Aging Therapy". *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol. 47, No. 2, pp. 147–153, 2021.
DOI : <https://doi.org/10.15230/SCSK.2021.47.2.147>
- [7] E. H. Song, "A study on the perception and future needs of millennials on vegetarianism following the spread of the vegan trend", Major in Nutrition Education Graduate School of Education Chonnam National University, 2022
DOI:10.23173/jnu.000000067604.24010.0007711
- [8] J. I. Hwang, K. R. Kim, "A study on the relationship between vagan beauty and the beauty industry", *Journal of Digital Convergence*, Vol. 19, No. 1, pp. 45–49, 2021
DOI : <https://doi.org/10.14400/JDC.2021.19.1.045>
- [9] Y. J. Lee, "Development of application technology using collagen-degrading extremophiles for high value-products of vegetable collagen peptides", Industry-Academic Collaboration Foundation Seowon Univ, 2022
- [10] Y. H. Jeon, "The Antioxidant Activity of Abelmoschus manihot jinhuakui Extracts", Department of Biological Engineering Graduate School of Konkuk University, 2020
- [11] X. Y. Lai, Y. Y. Zhao, H. Liang, "Studies on chemica constituents in flower of Abelmschus Manihot", *China Journal of Chinese metria medica*, Vol. 31, Issue 19, pp. 1597–1600, 2006
- [12] N. Li, "Chemical constituents, clinical efficacy and molecular mechanisms of the ethanol extract of Abelmoschus manihot flowers in treatment of kidney diseases", *Phytother Res* 35, pp. 198–206, 2021
DOI : 10.1002/ptr.6818
- [13] H. J. Kwun, S. H. Beom, J. A. Hyun, et al., "An In Vitro Study on the Activity of Abelmoschus manihot L. Flower Extract on Skin Anti-wrinkle and Skin Whitening", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol. 47, No. 4, pp. 353–360, 2021
DOI : <http://dx.doi.org/10.15230/SCSK.2021.47.4.353>
- [14] Ames BN, Gold LS, Willett WC, "The causes and prevention of cancer", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 92, Issue 12, pp. 5258–5265, 1995
DOI : 10.1073/pnas.92.12.5258
- [15] D. S. Lee, "Principles and Applications of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)", *Journal of the Korea Society of Analytical Sciences*, Vol. 6, No. 4, 1993.