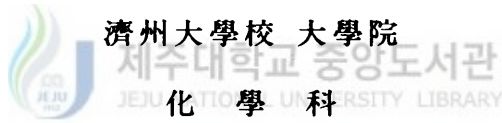


碩士學位論文

화장품 원료개발을 위한 식물 검색



夫 喜 晶

110-431

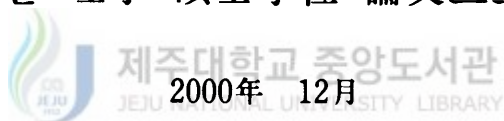
2000年 12月

화장품 원료개발을 위한 식물 검색

指導教授 李 南 昊

夫 喜 晶

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함



夫喜晶의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 鄭 惠 商 印

委 員 姜 昌 禧 印

委 員 李 南 昊 印

濟州大學校 大學院

2000年 12月

**Screening of Cosmetic Biometerials from
Plants Collected in Cheju.**

 **Hee-Jeong Bu**
(Supervised by Professor Nam Ho Lee)

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE
OF MASTER OF NATURAL SCIENCE**

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY**

2000. 12.

목 차

ABSTRACT	i
List of Tables	ii
List of Schemes & List of Figures	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 실험방법	14
1. 재료 및 기기	14
2. 실험방법	14
1) 생리활성 물질들의 추출	14
2) 미백효과 측정	15
3) 항산화활성의 측정	16
4) 항염증효과 측정	16
5) 항균활성 측정	17
III. 결과 및 고찰	19
1. 시료 추출	19
2. 미백효과	19
3. 항산화 활성	28
4. 항염증 효과	29
5. 항균활성	31
1) Gram positive 박테리아에 대한 활성 검색	31
2) Gram negative 박테리아에 대한 활성 검색	31
IV. 결 론	37
V. 참고문헌	39

ABSTRACT

Several solvent extracts were prepared from plants collected in Cheju island, and evaluated to find biological activities related to cosmetics.

Among the extracts examined, the chloroform fraction of *Phytolacea esculenta* exhibited very strong inhibition of tyrosinase activities. *Phytolacea esculenta* showed higher activities than kojic acid. The IC₅₀ for *Phytolacea esculenta* and kojic acid were 15 µg/ml and 37 µg/ml, respectively.

The results of free radical scavenging experiments showed that scavenging activities of methanol fractions of *Cinnamomum camphora* (SC₅₀ : 33 µg/ml), *Eriobotrya japonica* (SC₅₀ : 30 µg/ml), *Achyranthes japonica* (SC₅₀ : 25 µg/ml), *Lespedeza bicolor* (SC₅₀ : 30 µg/ml), *Artemisia princeps* (SC₅₀ : 27 µg/ml) were comparable to those of butylated hydroxytoluene (SC₅₀ : 50 µg/ml) and ascorbic acid (SC₅₀ : 22 µg/ml).

No significant activity of anti-inflammation, however, was found for all of the extracts except *Lespedeza bicolor*, which showed rather slight activities.

Methanol extracts of *Actinidia deliciosa* (500 µg/ml : 7mm) and *Isodon inflexus* (500 µg/ml : 9mm) showed relatively higher activities for the inhibition of Gram-positive bacterial growth than other samples. *Actinidia deliciosa* also showed higher activities in Gram-negative anti-bacterial screening.

List of Tables

Table 1. Inhibition of tyrosinase activity by solvent extractions from plants.	21
Table 2. Inhibition of tyrosinase activity by chloroform extract of the <i>Phytolacca esculenta</i> root.	23
Table 3. Inhibition of tyrosinase activity by chloroform fractions of the <i>Phytolacca esculenta</i> root.	27
Table 4. The free radical scavenging effects of methanol extracts of plants.	28
Table 5. The free radical scavenging effects of ethylacetate extracts of plants.	29
Table 6. The free radical scavenging effects of chloroform extracts of plants. ..	29
Table 7. Inhibition of hyaluronidase activity by solvent extractions from plants.	30
Table 8. The antibacterial activities of MeOH extracts of plants against <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Table 9. The antibacterial activities of ethylacetate extracts of plants against <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Table 10. The antibacterial activities of chloroform extracts of plants against <i>Staphylococcus aureus</i>	33
Table 11. The antibacterial activities of residue extracts of plants against <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Table 12. The antibacterial activities of ethylacetate extracts of plants against <i>Escherichia coli</i> DH5 α	34
Table 13. The antibacterial activities of residue extracts of plants against <i>Escherichia coli</i> DH5 α	34

List of Schemes

Scheme 1. Flow chart for the extraction of the sample.	15
Scheme 2. Flow chart for the fractions of chloroform extraction of <i>Phytolacca esculents</i> root.	25

List of Figures

Figure 1. Structure of skin.	4
Figure 2. The structure of tyrosinase and its inhibitors.	5
Figure 3. The mechanism of skin aging.	7
Figure 4. Antioxidative natural products.	8
Figure 5. The mechanism of strand breakage in hyaluronic acid(I).	10
Figure 6. The mechanism of strand breakage in hyaluronic acid(II).	11
Figure 7. Anti-bacterial natural products.	12
Figure 8. Inhibition of tyrosinase activity by the chloroform extract of <i>Phytolacca esculenta</i> root(IC50 value is 15 μ g/ml).	22
Figure 9. Tyrosinase inhibition effect of chloroform extract of <i>Phytolacca esculents</i> root(Concentration was 15 μ g/ml).	22
Figure 10. Thin layer chromatogram of chloroform extraction of <i>Phytolacca esculents</i> root before flash column chromatography. ...	26
Figure 11. Thin layer chromatogram of chloroform extraction of <i>Phytolacca esculents</i> root after flash column chromatography. ...	26
Figure 12. Inhibition of tyrosinase activity by chloroform fractions of <i>Phytolacca esculenta</i> root.	27
Figure 13. The antibacterial activities of MeOH extracts against <i>Staphylococcus aureus</i>	35
Figure 14. The antibacterial activities of MeOH extracts and residue extracts against <i>Escherichia coli</i> DH5 α	36

I. 서 론

인간의 아름다움에 대한 추구하고 의식행사 등의 필요성에 의하여 화장은 고대로부터 사회와 문화의 발달과 더불어 성장하여 왔다. 문헌상의 기록은 고대 이집트 시대에 화장을 위한 원료들이 등장하고, 고대 중국의 유물에서는 화장을 하는 미인들의 모습들이 등장하기도 한다. 화장원료들의 개발과 화장술의 개발에 대한 관심과 필요성은 화장산업이 꾸준하게 성장하게 되는 원동력이 되고 있다. 특히, 고부가치의 화장품 원료 개발은 신상품의 세계화로 인한 막대한 경제력 가치를 창출할 수 있기 때문에 신물질 개발 및 개발기술의 확보는 국가 경쟁력 제고에 필수적인 것이다.

기술적인 측면에서 보면 화장품은 생체의 구조 및 생리를 이해하고 화학물질의 적용에 대한 영향 등을 이해하고 분석하여 생체피부와 적용물질간의 최적 융화조건을 확보해야하는 것으로서 화학, 생물, 생리학, 약학 등의 기초과학과 응용기술이 복합적으로 적용되는 분야이다. 특히 우리가 사용하고 있는 크림, 로션, 염모제, 퍼머약 등은 화학적 방법을 거쳐 만들어진 제품들이며, 인체의 피부와 모발도 화학 물질들로 이루어져 있어 화장품에서의 화학적인 지식은 필수적이라 할 수 있을 것이다.¹⁸

화장품이란 인체를 청결 또는 미화하고 피부 또는 모발을 건강하게 유지하기 위하여 도찰, 살포, 기타 이와 유사한 방법으로 사용되는 물품으로서 인체에 대한 작용이 경미한 것을 말한다. 다만 사용목적 이외에 사람 또는 동물의 진단, 치료, 경감, 처치, 또는 예방의 목적과 사람 또는 동물의 구조 기능에 약리적인 영향을 주기 위한 목적으로 사용되는 것은 제외한다고⁷ 기존 약사법에 명시하고 있어 그 범위가 모호하고 법적 지원이 미흡하였다. 그러나 2000년 7월부터는 화장품법이 약사법에서 분리되어 새로운 도약을 준비하고 있다. 화장품은 건강한 피부에 사용하는 제품으로써 피부에

대한 안전성, 효능 효과, 사용 편의성 등을 갖추어야 하며 기능으로는 색채효과에 의한 미적 기능, 피부 및 모발의 청결, 보호, 보습, 유연, 노화 억제, 심리적 안정감, 사회적 기능 등을 고루 갖추어야 한다. 세계의 화장품 개발경향도 고기능, 다기능을 갖는 제품들의 개발로 변화되고 있어 한 마디로 치유개념이 도입된 cosmeceutical의 개발에 집중되고 있다. Cosmeceutical은 cosmetics와 pharmaceutical의 합성어로 크게 기능성을 갖는 활성성분의 연구, 효능물질의 경피흡수 방법과 이를 포함한 제형의 연구 및 피부생리에 대한 기초연구에 집중하고 있다.^{79,10)} 따라서 세계 시장경쟁성을 살리기 위해선 기능성 화장품의 범위를 구체적으로 설정하고 연구 개발해 나가야 할 것이다.

7월부터 시행된 화장품법에 제시된 기능성 화장품의 정의를 보면

1. 피부에 멜라닌색소가 침착하는 것을 방지하여 기미, 주근깨 등의 생성을 억제함으로써 피부의 미백에 도움을 주는 기능을 가진 화장품
2. 피부에 침착된 멜라닌색소의 색을 얇게 하여 피부의 미백에 도움을 주는 기능을 가진 화장품
3. 피부에 탄력을 주어 피부의 주름을 완화 또는 개선하는 기능을 가진 화장품
4. 강한 햇빛을 방지하여 피부를 곱게 태워주는 기능을 가진 화장품
5. 자외선을 차단 또는 산란시켜 자외선으로부터 피부를 보호하는 기능을 가진 화장품으로 규정하고 있다. 즉 피부노화, 미백, 자외선 차단 기능을 가진 제품으로 명시되어 있다.

기능성 화장품 개발에서 특히 동양인들에게 많은 관심이 집중되고 있는 분야가 피부 미백에 대한 것이다. 동양에서는 과거로부터 희고 고운 피부가 미의 상징이었으며 이는 곧 미인을 가늠하는 하나의 기준이기도 하였다. 최근 몇 년간 미백제 및 미백화장품 개발에 관한 연구가 활발히 진행중이며, 동양권에서 미백화장품 시장은 폭발적인 고성장을 거듭하고 있다.⁴¹⁾

사람의 피부색은 멜라닌(melanin), 카로틴 및 헤모글로빈의 양에 따라 결정되어 지는데 이중 멜라닌이 가장 결정적인 요소이다. 인체 피부는 표피, 진피, 피하지방층으로 구분될 수 있다. 표피는 다시 가장 바깥쪽부터 각질층, 투명층, 과립층, 유극층, 기저층으로 구분된다. 각질층은 피부의 표면을 말하며 퇴화되면서 떨어져 나간다. 투명층은 손바닥 발바닥과 같이 두터운 부위에 존재하며 엘라이드인(elaidin)이라는 단백질이 있어 피부에 수분침투를 방지해주고 피부 윤기를 유지해준다. 과립층에서는 각질화 과정이 실제로 시작되는 층이며, 유극층의 다세포 사이에는 림프액이 들어 있어서 피부의 혈액순환과 영양공급에 관여한다. 표피부분에서 가장 안쪽에 위치해 있는 기저층에서는 피부의 새세포를 만들어 주는 역할을 담당한다. 피부색을 결정짓는 멜라닌색소도 기저층에서 만들어 지는데 이층에 존재하는 색소세포인 멜라노사이트(melanocyte)에서 티로신(tyrosin)에 의하여 생합성되며 주변 각질세포(keratinocyte)로 전이되어 사람의 피부색을 나타낸다. 멜라닌이 비정상적으로 적게 생산되면 백반증과 같은 피부 병변이 유발된다. 반대로 과잉 생산은 중년 여성들의 주요 고민중 하나인 기미, 주근깨를 형성하며 또한 피부암(melanoma)과도 밀접한 관계가 있다.

진피는 피부의 주체를 이루는 층으로 망상층과 유두층으로 구분되며 피부조직 외에 부속 기관인 혈관, 신경관, 림프관, 땀샘, 기름샘, 모발과 입모근을 포함하고 있다. 진피조직은 교원섬유인 collagen과 탄력섬유인 elastin 및 무코다당류로 구성되어 있으며 우리 신체의 탄력적 균형유지와 피부의 윤기 및 긴장도를 유지하는데 대단히 중요한 역할을 한다. 진피의 수분함유량은 표피의 수분함유량의 60% 정도로 상당히 많은 편이다.^{1,2,5,7}

사람의 피부색은 멜라닌(melanin), 카로틴 및 헤모글로빈의 양에 따라 결정되어 지는데 이중 멜라닌이 가장 결정적인 요소이다. 인체 피부는 표피, 진피, 피하지방층으로 구분될 수 있다. 표피는 다시 가장 바깥쪽부터 각질층, 투명층, 과립층, 유극층, 기저층으로 구분된다. 각질층은 피부의 표면을 말하며 퇴화되면서 떨어져 나간다. 투명층은 손바닥 발바닥과 같이 두터운 부위에 존재하며 엘라이딘(elaidin)이라는 단백질이 있어 피부에 수분침투를 방지해주고 피부 윤기를 유지해준다. 과립층에서는 각질화 과정이 실제로 시작되는 층이며, 유극층의 다세포 사이에는 림프액이 들어 있어서 피부의 혈액순환과 영양공급에 관여한다. 표피부분에서 가장 안쪽에 위치해 있는 기저층에서는 피부의 새세포를 만들어 주는 역할을 담당한다. 피부색을 결정짓는 멜라닌색소도 기저층에서 만들어 지는데 이층에 존재하는 색소세포인 멜라노사이트(melanocyte)에서 티로신(tyrosin)에 의하여 생합성되며 주변 각질세포(keratinocyte)로 전이되어 사람의 피부색을 나타낸다. 멜라닌이 비정상적으로 적게 생산되면 백반증과 같은 피부 병변이 유발된다. 반대로 과잉 생산은 중년 여성들의 주요 고민중 하나인 기미, 주근깨를 형성하며 또한 피부암(melanoma)과도 밀접한 관계가 있다.

진피는 피부의 주체를 이루는 층으로 망상층과 유두층으로 구분되며 피부조직 외에 부속 기관인 혈관, 신경관, 림프관, 땀샘, 기름샘, 모발과 입모근을 포함하고 있다. 진피조직은 교원섬유인 collagen과 탄력섬유인 elastin 및 무코다당류로 구성되어 있으며 우리 신체의 탄력적 균형유지와 피부의 윤기 및 긴장도를 유지하는데 대단히 중요한 역할을 한다. 진피의 수분함유량은 표피의 수분함유량의 60% 정도로 상당히 많은 편이다.^{1,2,5,7}

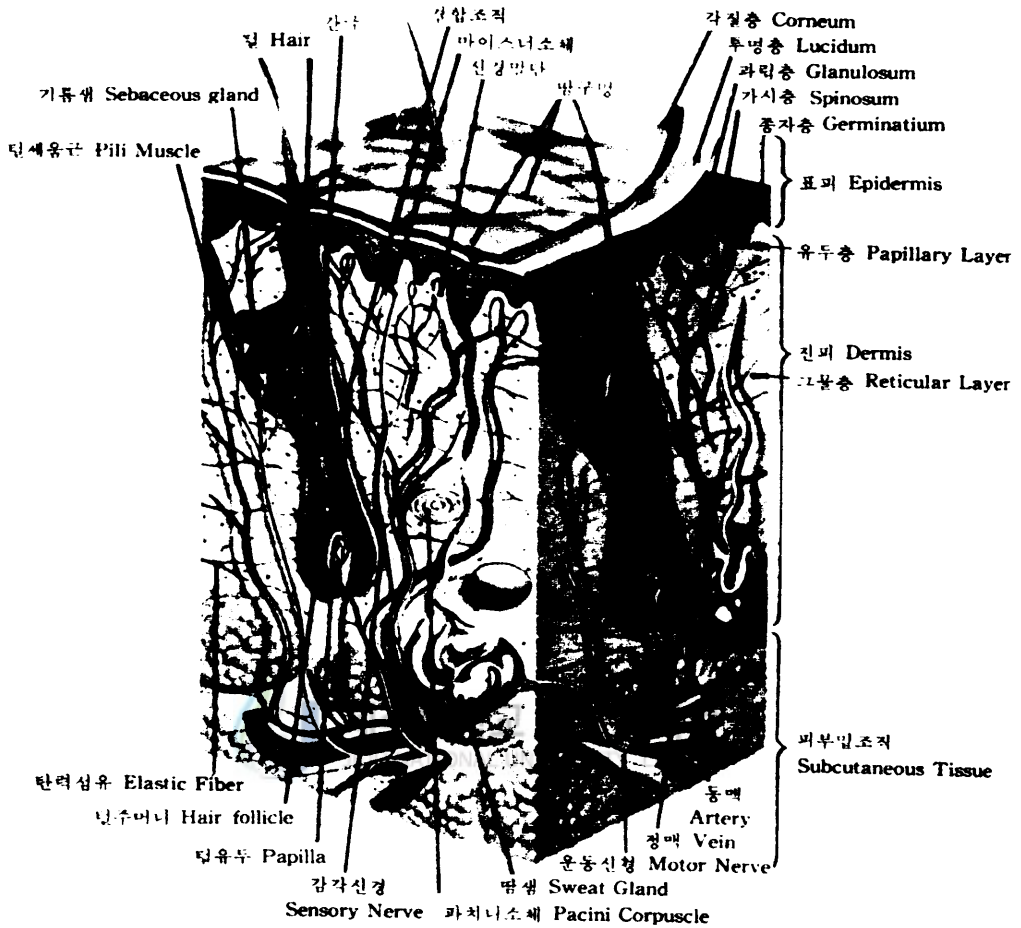


Figure 1. Structure of skin.

현재 알려져 있는 미백 원료들의 작용 메카니즘은 여러 가지가 있는데 타이로시네이즈(tyrosinase)의 활성 저해제 개발이 가장 많이 이용되고 있다.^{12,13} 일반적으로 알려진 효소 저해제의 메카니즘은 주로 두가지로 분류되어진다. 첫째는 타이로시네이즈 활성부위(active site)에 포함되어 있는 구리 이온에 킬레이트(chelate)되는 것으로, 대표적인 효소저해제로는 kojic acid가 상품화 되어 있다. 두 번째는 타이로시네이즈의 활성저해와 메카니즘상 관련이 있으나 구리이온과 킬레이트되는 정도가 약하거나 없는 경우이다. 대표적인 물질로는 미백제의 선두주자인 arbutin이 상품화되어 있

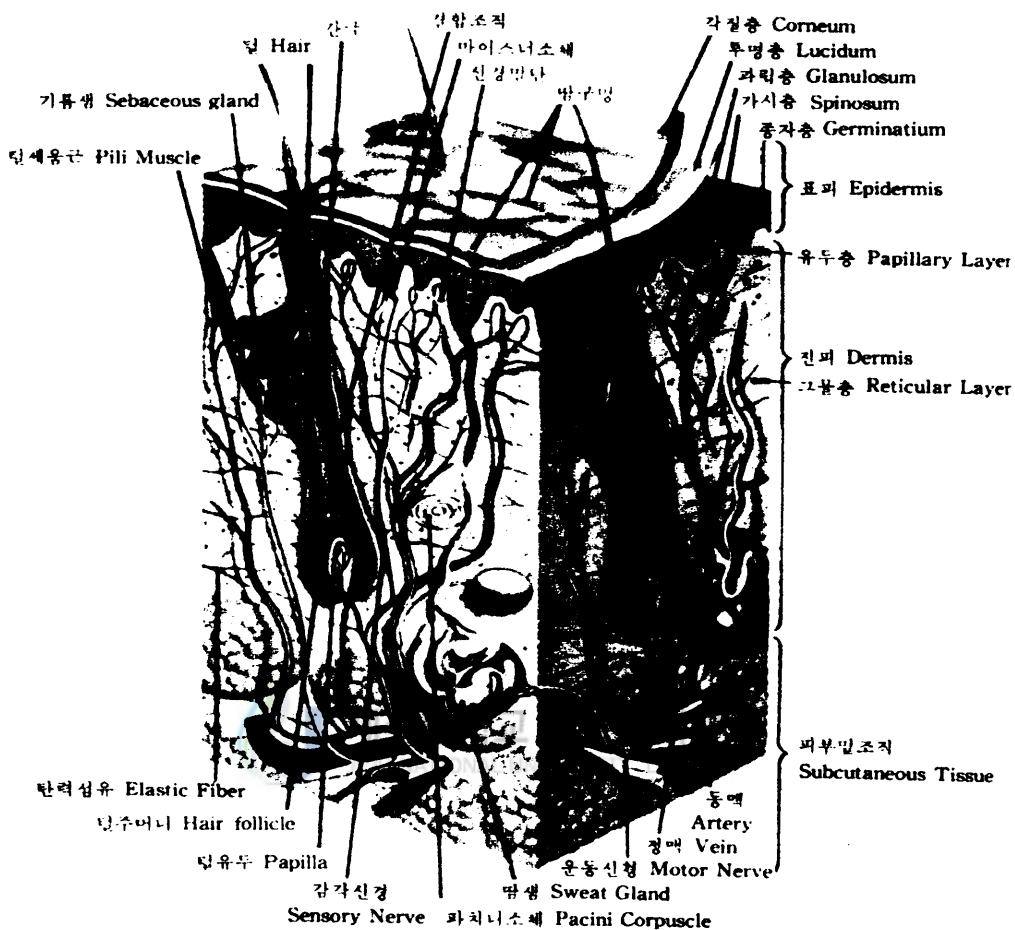


Figure 1. Structure of skin.

현재 알려져 있는 미백 원료들의 작용 메카니즘은 여러 가지가 있는데 타이로시네이즈(tyrosinase)의 활성 저해제 개발이 가장 많이 이용되고 있다.^{12,13} 일반적으로 알려진 효소 저해제의 메카니즘은 주로 두가지로 분류되어진다. 첫째는 타이로시네이즈 활성부위(active site)에 포함되어 있는 구리 이온에 킬레이트(chelate)되는 것으로, 대표적인 효소저해제로는 kojic acid가 상품화 되어 있다. 두 번째는 타이로시네이즈의 활성저해와 메카니즘상 관련이 있으나 구리이온과 킬레이트되는 정도가 약하거나 없는 경우이다. 대표적인 물질로는 미백제의 선두주자인 arbutin이 상품화되어 있

다.^{16.13,15}

미백의 원료로서 천연물이 공급원으로서 주목되어 식물 유래성분의 미백효과에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.^{16.13,15,16} 종래의 미백제로는 vitamin C 및 그 유도체,^{16.20} arbutin 및 kojic acid^{16.16}가 유효 성분으로 허가되어 있다. 최근에 천연물 유래의 성분과 관련된 미백제 연구로는, DL- α -tocopherol ferulate,^{16.21} 안정형 vitamin C 유도체들(L-ascorbic acid-2- β -glucoside),^{16.20} ellagic acid,^{16.22} 3,5-dicaffeoylquinic acid,^{16.23} α -hydroxy acids(AHAs)^{16.24} 등이 있으며, 상백피 추출물인 oxysveratrol과 morusin, 닥나무 추출물인 kazinol F, 그 외에 kojic acid와 유용성 감초 추출물인 glabridin의 병용에 의한 상승적 미백작용에 관한 연구보고도 있다.^{16.25,26}

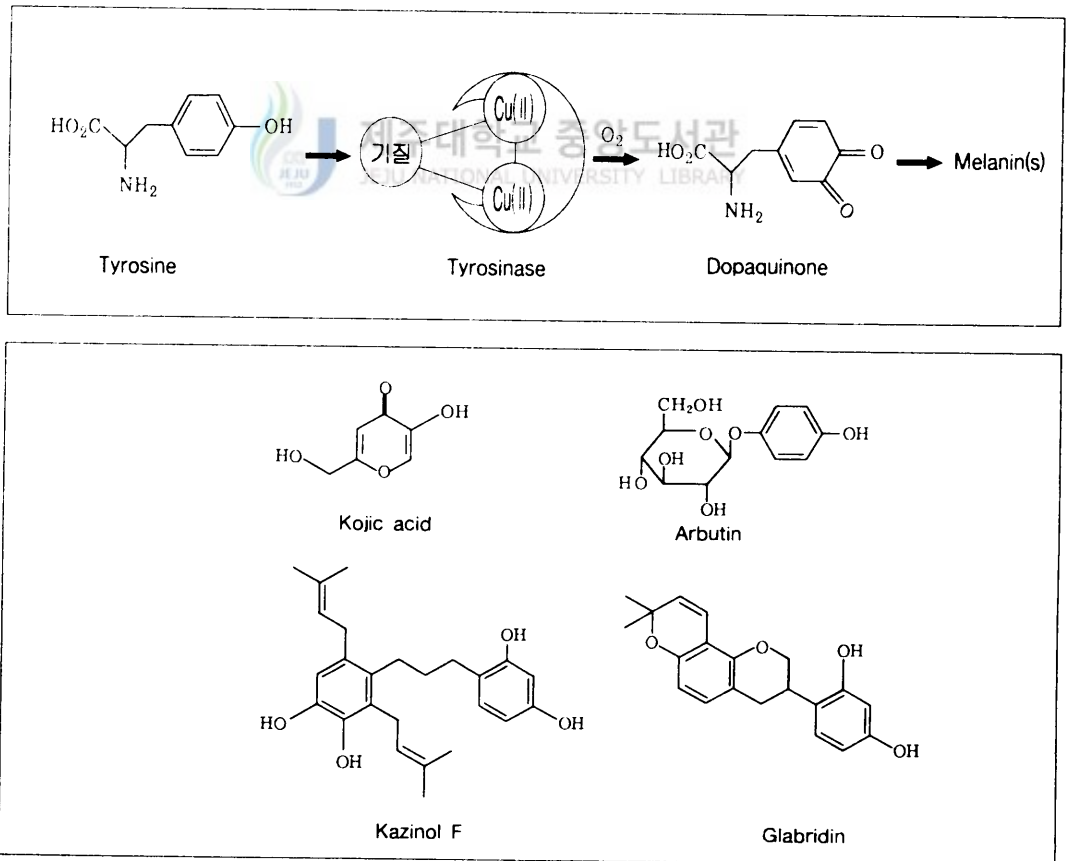


Figure 2. The structure of tyrosinase and its inhibitors.

화장품 개발 분야에서 관심을 갖는 또 하나의 연구 분야는 어떻게 피부노화를 지연할 수 있을까 하는 것이다. 이것은 여성뿐만 아니라 모든 사람들의 희망사항이다. 지금까지 노화에 대한 학설은 프로그램설과 에러 축적설 두 가지로 대별될 수 있다. 프로그램 노화설은 세포의 유전자에 수명을 결정하는 유전자적 우세인 정보가 보존되어 있어 그 프로그램에 따라 노화가 진행된다고 생각하는 설이다.^{16,27} 그 예로 염색체 말단의 텔로머어(telomeres)와 그 길이를 제어하는 효소인 telomerase가 보고되고 있다. 에러 축적설에서는 free radical 설, 가교 결합설, 돌연변이 축적설, 노폐물 축적설 등이 있으며, 여기서는 노화가 여러가지 장애나 노화 물질의 축적에 의해서 진행된다고 생각하는 설이다.^{16,25,28}

이들 노화학설 중에서 free radical설은 이 설이 처음 제안된 이래로 이 이론을 지지하는 수많은 연구 결과들이 나왔으며, 노화와 함께 사망 확률을 증가시키는 원인을 설명하는데 있어서, 특히 피부노화 메카니즘을 이해하고 그 대책을 세우는데 있어서 매력적인 가설임이 입증되고 있다.^{16,25,29,30} 또한 이 학설은 화장품 분야에서도 많이 응용되고 있다. 화학적으로 free radical 이란 홀수 전자를 갖는 원자나 원자단을 말한다. free radical은 짝을 이루지 못하고 있기 때문에 매우 불안정하며, 에너지가 높고, 반응성이 크다. 따라서 free radical은 안정한 산물로 되기 위해서 주위에서 전자를 빼앗아 짝을 이루는 성질이 강한 산화제로 작용을 나타낸다.

피부는 항상 산소와 접촉하고 있고, 또한 태양광선의 자외선에 크게 노출되어 있다. 따라서 활성 산소종으로 유도된 피부의 광산화적 손상 위험이 실질적으로 증가하고 있다. 산소는 생명현상에 필수 불가결한 원소지만 대사 될 때 superoxide radical(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxy radical($\cdot OH$), singlet oxygen(1O_2)과 같은 활성 산소종으로 유도되어 강한 산화제로서의 작용을 나타낸다. 한편으로는 병원체나 이물질들을 제거하기 위한 생체 방어과정에서 O_2^- , H_2O_2 와 같은 활성산소가 대량 발생하며 이들의 강한 살균작용을 통해서 병원체로부터 인체를 보호하는 작용을 한다. 그러나 대량 생성된 활성산소는 생체내에서 항산화제에 의해 완벽하게 방어되지 못하고 생체 구성 성분들인 지질, 단백질, 핵산 등의 생체 분자들은 활성 산소종에 의해 계속적인 산화적 손상을 받아 여러 가지 질병이나 노화가 초래되게 된다. 이러한 점에서 항산화효과가 있는 phenolic 물질(flavonoid 포함)이 화장품의 원료로 폭넓게 사용되고 있음은 당연한 일이다.^{7,16,25,30}

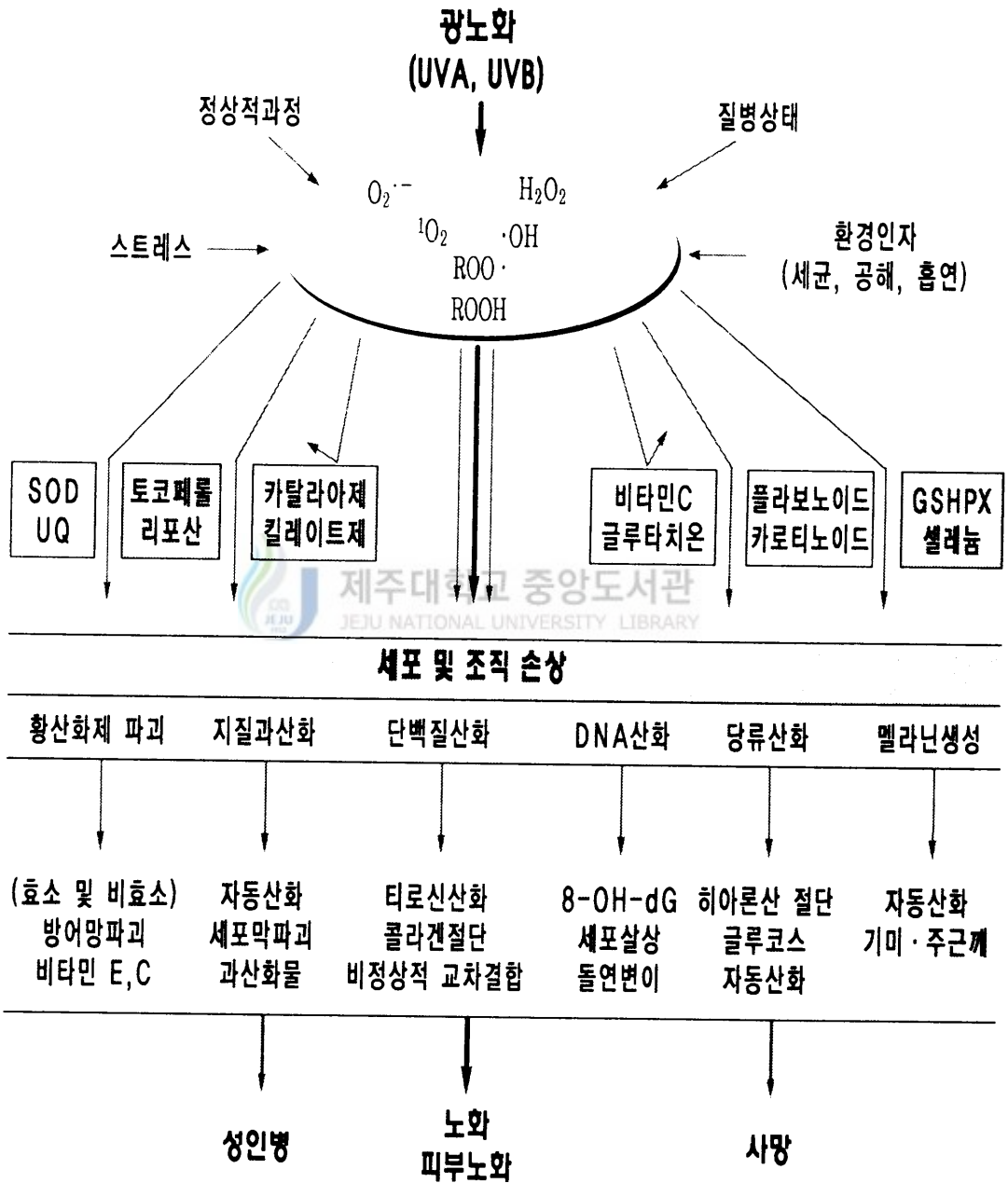


Figure 3. The mechanism of skin aging.

식물에는 다양한 활성 산소종을 제거할 수 있는 항산화 성분들이 다량 함유되어 있다. 식물종자에는 vitamin E인 tocopherol류가 많이 함유되어 있다. 반면에 과일이나 녹황색 야채에는 vitamin C인 ascorbic acid가 많이 들어 있다. vitamin E와 vitamin C 외에도 식물유래의 천연물에는 화장품의 원료로서 특히 중요한 flavonoid, ubiquinone, carotinoid 등이 있다. 이들은 또한 광노화에 있어서 주름 생성과 조직적인 변화들의 개시반응을 효과적으로 지연시킨다.^{16,25}

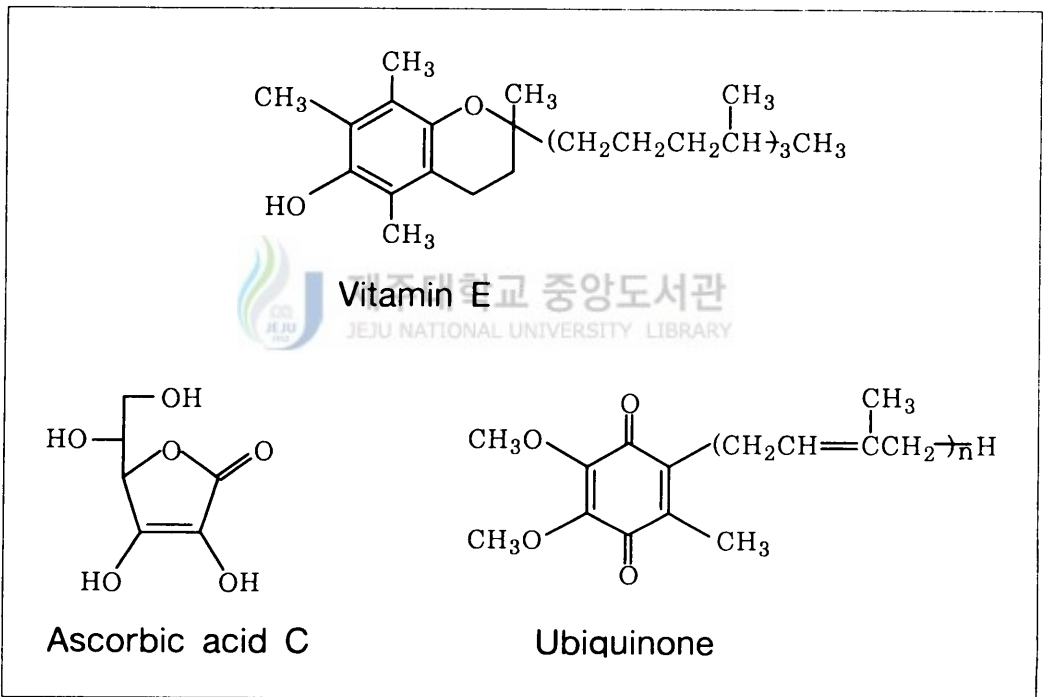


Figure 4. Antioxidative natural products.

우리 피부 진피층에는 hyaluronic acid라는 glucuronic acid과 N-acetylglucosamine으로 된 2당의 중합체가 널리 분포되어 있다. 이 성분은 동물의 안구, 태반, 관절 활액, 혈관폐막, 위점막 등에도 분포되어 있는데 수용액의 점성계수가 대단히 높아 자기 무게의 1000배에 해당하는 물을 흡수할 수 있는 능력을 지니고 있다. Hyaluronic

acid는 조직구조를 유지해줄 뿐만 아니라 윤활작용과 세균 침입을 방어해주는 역할을 한다. 따라서 이것이 파괴될 경우 세균 침입이 용이하게 되어 염증 유발이 더욱 잘 일어나게 된다. 이것은 나이가 들어감에 따라 양이 점차 감소하기도 하는데 자외선에 의한 과도한 노출로 인한 활성산소에 의해서도 파괴될 수 있다. 따라서 hyaluronic acid와 활성산소의 반응은 피부노화와 관련하여서도 현재 많은 관심이 주목되고 있다. 피부가 자외선에 노출되면 염증성 침윤이 일어난다. 또한 병원성 세균에 의한 피부 침투는 호중구와 마크로파지를 염증부위로 동원시킨다. 이러한 염증 과정은 활성산소 생성이 수반되고 이들 활성 산소종은 조직 손상을 일으킨다. 또한 자외선 폭로도 피부 면역을 억제 시켜 세균 감염증 등을 일으킨다. 이와 같이 피부에서의 염증 반응과 세균 감염은 활성 산소종이 관여하는 피부노화를 촉진시킬 수 있다.

Hyaluronic acid는 glucuronic acid와 glucosamine이 β -1 \rightarrow 3 결합과 β -1 \rightarrow 4 결합이 반복해서 연결된 분자량이 큰 다당류이다. hyaluronic acid의 pKa는 2.9이고, 생리적인 pH에서 carboxyl기는 이온화 되어 있다. hyaluronic acid의 생물학적 역할 중의 하나는 세포들 사이의 공간에서 많은 양의 물을 포함할 수 있는 능력이다. 이로 인해 점탄성을 나타내며 충격을 흡수하는 역할을 가지고 있다. hyaluronic acid가 활성 산소종에 계속 노출되면 사슬 절단이 일어나서, hyaluronic acid의 분자량은 10,000 이하로 떨어지게 되고 이와 함께 점도도 떨어져 그 고유 성질인 점탄성을 잃게 된다. 피부의 탄력은 결합조직 성분들인 collagen, elastin과 함께 hyaluronic acid의 점탄성이 크게 기여하고 있다. 따라서 hyaluronic acid 사슬의 절단은 피부 탄력 감소와 피부 수분 감소 그리고 피부노화를 가속화시키게 된다.

Hyaluronic acid의 사슬 절단 과정은 glycoside 결합의 절단을 포함한다. 이는 이당류를 대상으로 한 radical 반응의 산물에 대한 연구들로부터도 알 수 있다. 이들 중에서 가장 가능성이 크다고 믿어지는 경로는 1O_2 이나 $\cdot OH$ 에 의한 수소탈취반응 결과 생성된 탄소(1위치)에 형성된 radical로부터 비롯되는 사슬 절단반응이다[반응(1)과 (2)]. 반응(1)은 β -절단반응이고, 반응(2)는 가수분해반응이다.

또 한가지 중요한 경로로 생각되는 사슬 절단반응은 C(1)에 형성된 탄소 중심의 radical에 분자 산소가 반응하여 hyaluronic acid 과산화 radical이 형성되고 hyaluronic acid 과산화 radical로부터 $O_2^{\cdot -}$ 가 제거됨으로써 일어나는 사슬 절단반응이다. 이 반응에서는 hyaluronic acid 과산화 radical은 $O_2^{\cdot -}$ 를 제거하고 1번 탄소는 카르보양이온이 된다. 이 카르보양이온에 물이 첨가반응($O_2^{\cdot -}$ 의 제거와 물의 첨가)을 일으킨 후 분해된다[반응(3), (4)]. 그외에 hyaluronic acid 과산화 radical이 또 다른 과산화 radical과의 이분자 반응에 의해서도 진행될 수 있다. 여기서는 hyaluronic acid 3차 과산화 radical이 oxy radical로 되고 계속해서 염기 촉매로 유도된 가수분해반응을 거쳐 사슬이 절단된다.

이상과 같이 hyaluronic acid의 사슬 절단반응은 1O_2 이나 $\cdot OH$ 에 의한 수소탈취반응으로 탄소 중심의 radical이 생성되면서 개시되고, 과산화 radical을 경유하는 자동산화반응을 포함하여 사슬 절단이 일어나고 있다. 결론적으로 활성산소에 의한 hyaluronic acid의 사슬절단은 피부노화에 깊이 관여되어 있음으로 기능성 항노화 개발 시에 고려되어야 할 분야이다.^{16,25,31}

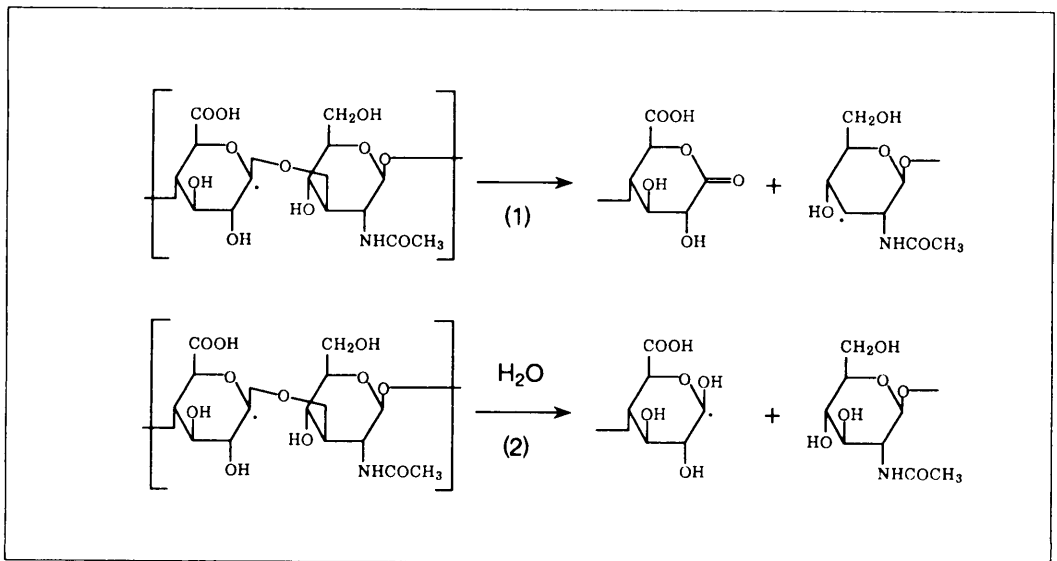


Figure 5. The mechanism of strand breakage in hyaluronic acid(I).

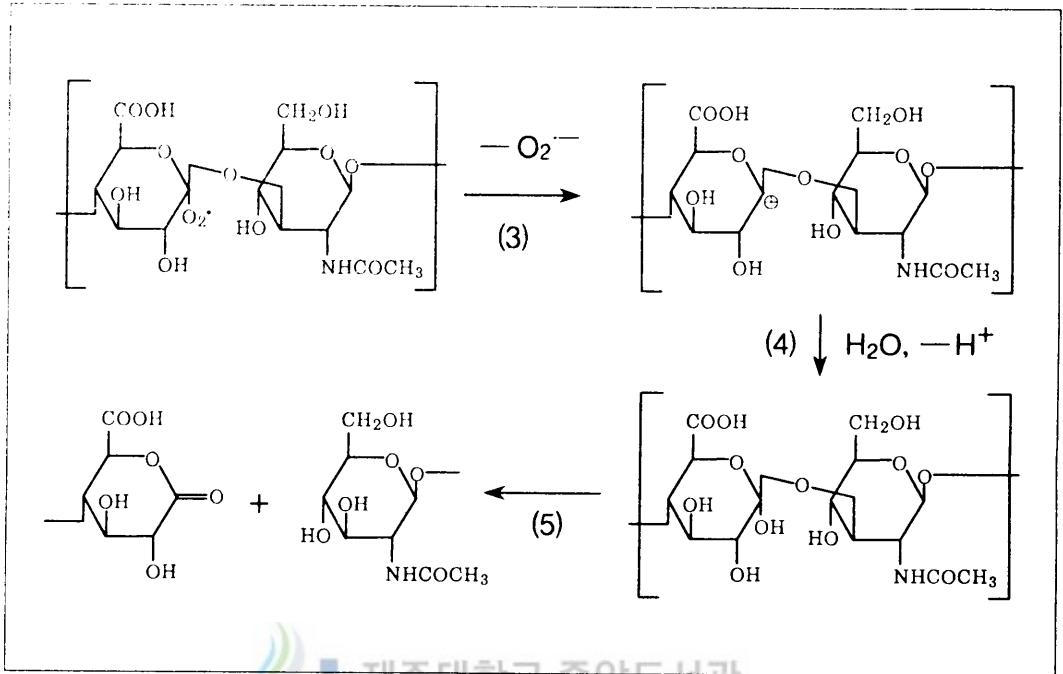


Figure 6. The mechanism of strand breakage in hyaluronic acid(II).

항염증 작용이 있는 천연물로 화장품 등에 사용되는 것으로는 phenol성 화합물, alkaloid, terpenoid를 들 수 있다. phenol성 화합물에는 사철쫂의 esculetin 6,7-magnolol, honokiol, 승마의 isoferulic acid, 울금의 curcumin 등이 있고, alkaloid는 황백, 황련의 berberine, 마황의 pseudoephedrine, ephedroxane 등이 있고, terpenoid류에는 작약의 paeoniflorin, 감초의 glycyrrhizin 등이 알려져 있다.^{16,25,32}

화장품은 피부에 직접 바르는 제품이기 때문에 첨가되는 방부제인 경우도 좀 더 적극적인 안전·안정성을 고려한 물질을 선택해야 한다. 뿐만아니라 세균감염으로 인한 활성 산소의 생성 억제를 시킬 수 있고 화장품 기체의 수용성과 지용성 부분 모두에 대하여 방부능을 갖출 수 있는 물질 개발이 필요하다. 현재 항균 작용을 나타내는 생약으로는 황백, 황련 등의 alkaloid인 berberine이 잘 알려져 있는데, 이 물질은 광범위한 항균 스펙트럼을 가지며 여드름균인 propionibacterium acnes에 대해서도 강한 항균 작용을 나타낸다. 자근의 shikonin류는 항균 활성과 화상, 동상, 습진,

수포 등에 외용되는 연고의 주 생약이다. 민간약으로 습진, 백선, 사마귀 등의 피부질환에 이용된 백굴채는 주성분이 coptisine으로 피부 화농균인 황색 포도상구균에 강한 항균 활성이 있다. 감초의 glabrene, licochalcone, 녹차 및 상백피의 flavonoid, 고삼의 alkaloid 등도 항균 활성이 보고되었다. 한편 생약의 사포닌 성분에는 항진균 활성이 보고되고 있고, 연명피, 해삼, 목근피 등의 사포닌 활성이 확인되었다.¹⁶

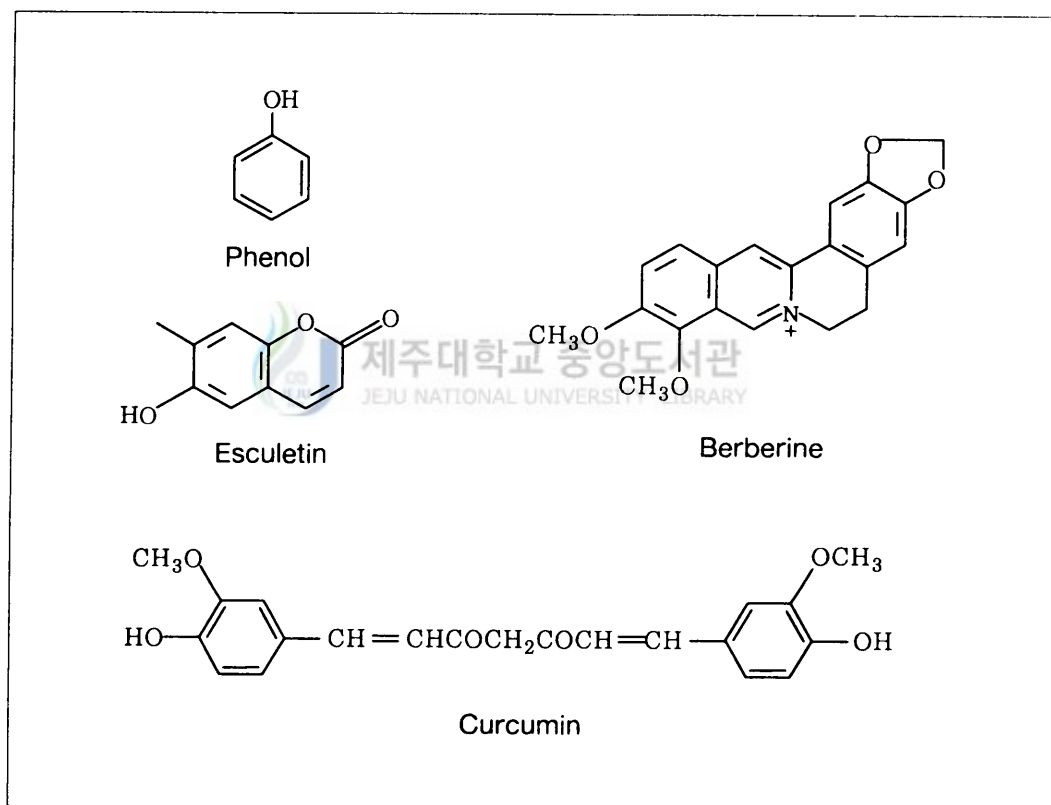


Figure 7. Anti-bacterial natural products.

현재 국내 화장품 생산은 1961년 부정 외래품 판매금지법이 제정된 이후부터 급성장하여 생산액과 수입 화장품 납품가격을 합치면 1996년도에는 3조가 넘는다. 이는 한국의 GNP 의 약 1%가 되지만 2005년도에는 4.8%까지 성장할 것으로 예측되고 있다. 그러나 그 규모는 GNP 의 0.1% 정도로 규모 면에서 취약성을 지니고 있다. 통계

에 따르면, 1997년의 경우 국내의 화장품 제조업체 수는 130여 개이고, 상위 5개 기업의 매출액이 전체의 50% 정도를 차지하고 있다. 이와 같은 양극화 현상은 더욱 가속화될 것이라면 2000년대에는 기술적으로 특화된 벤처기업의 출현이 예상되고 있다. 또한 1994년 이후 수입이 자유화되면서 선진 외국기업의 국내진출이 매우 증가하고 있다. 이들의 국내진출에 대하여 국내 장업체는 연구개발을 통한 기술력 향상과 선진 마케팅기법의 도입을 통한 효율적인 대응이 절실히 필요하다 할 수 있다. 기술개발 측면에서는 연구방향은 선진기업과 별 차이 없이 동일한 추세를 보이지만, 기술개발 능력에서는 차이를 보이고 있다. 최근 들어 국내의 경우도 기술개발 투자비가 매출액의 3%를 상회하는 지속적인 증가 추세를 보이고 있지만, 금액 면에서는 선진기업과 비교가 안 되는 수준이다. 따라서 선진기업의 경쟁에서 국제적으로 우위에 서기 위해서는 더 많은 연구과 신기술 도입 및 관심과 참여가 필요할 것이다.⁹

화장품뿐만 아니라 의약품의 원료로서 천연물에 대한 관심은 증가되고 있다. 천연물을 이용한 약재나 화장재료의 활용은 고대에서부터 시작되었고 지금은 단순히 만병통치 개념의 무분별한 사용이 아닌 생리활성을 지닌 성분을 분리 추출해 내어 좀 더 효율적인 이용 방안을 연구해가고 있다. 특히 현대와 같이 공해에 많이 노출되고 인공적인 것들에 익숙해진 사람들에게 있어서 자연적인 것에 대한 동경은 클 수밖에 없다. 따라서 자연과 화장품들이 시장에서 인기를 독차지하고 있고, 그에 따른 식물 유래성분에 대한 기대와 연구는 가속화되어 질 수밖에 없다.

본 연구에서는 이러한 시대적인 요구에 맞춰 천연물로부터 새로운 생리활성 물질을 분리 추출해 내고 이러한 성분들의 화장품 원료의 가능성을 확인하여, 향후 화장품개발의 기초자료로 활용하는 데 그 목적이 있다.

II. 재료 및 실험방법

1. 재료 및 기기

실험에 사용된 각각의 시료들은 직접 채취하여 사용하였고, methanol, ethylacetate, chloroform 등 추출용매들은 Merck사 제품의 1급 시약을 정제하지 않고 사용하였다.

Tyrosinase 저해 활성 실험에 사용된 tyrosinase는 mushroom에서 추출한 것을 사용하였고(SIGMA, USA), 항산화 활성 측정 시 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)은 Aldrich사(USA)에서 구입하여 사용하였다. Hyaluronidase 저해 활성 실험에 사용된 hyaluronidase는 bovine testes에서 추출한 것을 사용하였고, tyrosine, hyaluronic acid과 함께 모두 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 항균활성에 이용된 균들(황색 포도상구균과 *E. Coli* DH5 α)은 제주의료원과 제주대학교 식품공학과 고영환 교수로부터 협조를 얻어 사용하였다.

효소 활성과 항산화 활성 측정 시 사용한 자외선 분광광도계(UV-visible spectrophotometer)는 Hewlett Packard 8453을 사용하였고, 항온 수조(shaking water bath)는 주식회사 한백의 HB-205SWM 제품을 사용하였다. Aspirator, rotary vacuum evaporator와 digital water bath는 Eyla의 A-3S, N-N와 SB-651을 사용고, vacuum freezer dryer 는 Heto FD 1.0을 사용하였다. 항균 활성 측정 시 사용한 고압멸균기(steam sterilizer)은 KUK JE KAC-080을 사용하였고, 배양기(shaking incubator)와 세포배양기(cell-culture incubator)는 주식회사 존샘의 JS SKI 1000과 JS IN 180 system을 사용하였다.

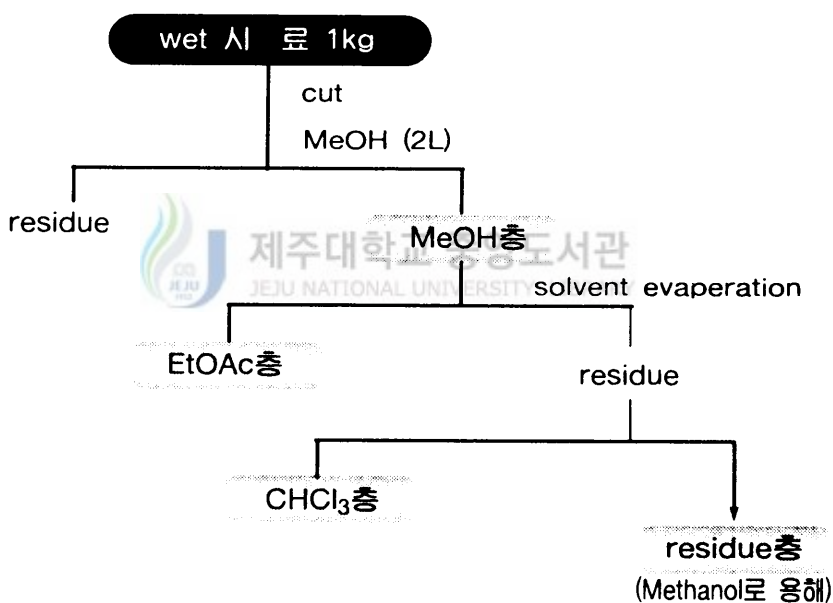
2. 실험방법

1) 생리활성 물질들의 추출

실험에 사용된 각각의 시료들은 1kg씩 채취하여 깨끗이 씻어 이물질을 제거하여

봉퐁이 잘되는 그늘진 곳에서 건조시켰다. 잘 건조된 시료들은 잘게 파쇄하여 methanol 2L에 넣고 1주일 이상 암냉소에 보관하였다. Aspirator를 이용 감압 여과를 시켰고 추출물은 rotary evaporator로 감압하에서 용매를 증발시킨 후에 vacuum freezer dryer로 완전 건조시켜 4°C 냉장 보관하면서 사용하였다.

생리활성검색에 이용된 시료들에서의 추출물은 다음의 순서에 따라 분리 추출되었다.



Scheme 1. Flow chart for the extraction of the samples.

2) 미백효과 측정(Assay for tyrosinase inhibition activity)

Tyrosinase 억제효과는 dopachrome 방법을 이용하여 UV/VIS spectrophotometry로 측정하였다.³³ 50 μ l의 MeOH 용액 혹은 각 층의 시료(1mg/mL)용액을 100 unit/mL mushroom tyrosinase (Sigma Chemical Co), 0.1M potassium phosphate buffer에 섞

은 후 10분간 37°C의 수조에 배양한 후 200mM의 L-tyrosine(10 μ l)을 첨가해 섞은 후 다시 10분간 37°C에서 배양한 후 475nm에서 흡광도를 측정하여 배양 전의 흡광도의 차이로 억제되는 정도를 살폈다. 이때 사용한 분광광도계는 Hewlett Packard 8453을 이용하였다. Tyrosinase 억제정도는 다음과 같이 측정하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition (\%)} = [(D-C)-(B-A)] / (D-C) \times 100$$

A와 B는 각각 시료를 가지는 용액의 배양 전과 후의 흡광도이며, C와 D는 각각 시료를 넣지 않은 용액(기준 용액)의 배양 전과 후의 흡광도이다.

3) 항산화활성의 측정(Assay for free radical scavenging activity)

항산화활성 검색은 DPPH법을 이용하여 시료의 radical 소거효과를 측정하는 Blois법을 활용하였다.^{34,35} DPPH는 짙은 자주색을 나타내며 화합물내 질소 중심의 radical로 radical 전자의 비편재화에 의해 안정화된 구조의 radical로 존재한다. DPPH는 517nm에서 최대 흡수를 나타내며 환원되면 517nm에서 흡수가 없어진다. 따라서 DPPH의 환원 정도는 환원제(예, tocopherol 또는 flavonoid 등의 phenol성 화합물의 환원력에 달려 있다.

0.2mM DPPH(Aldrich) 메탄올 용액 0.5mL에 여러 농도의 시료 메탄올 용액 1mL를 첨가하고 섞은 다음 실온에서 10분간 방치 후 517nm에서 흡광도의 감소를 측정한다. 시료의 환원력의 크기는 radical 소거활성(scavenging activity, SC₅₀)으로 표시하며 SC₅₀은 DPPH의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도로 나타낸다.

4) 항염증효과 측정(Hyaluronidase activity inhibition assay)

Hyaluronidase 억제효과는 Rooster Comb에서 형성된 N-acetylglucosamine의 양을 분광광도계로 측정함으로써 결정하였다.^{15,36,37}

0.1M acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 hyaluronidase (7,900 unit/mL)의 50 μ l를 20 μ l

의 추출 시료 용액(5mg/mL)과 함께 혼합시킨 후 37°C water bath에서 20분간 배양시켰다. 대조군은 추출물 대신에 methanol을 넣고 37°C water bath에서 20분간 배양하였다. 이때 hyaluronidase의 활성을 위해 12.5mM의 CaCl₂ 100 μl를 함께 첨가하여 배양하였다. Ca²⁺의 활성화된 hyaluronidase는 0.1M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 hyaluronic acid (12mg/5mL) 250 μl를 첨가하여 다시 water bath에서 40분간 배양시켰다. 0.4N sodium hydroxide 100 μl 와 0.4M potassium tetraborate 100 μl를 반응 혼합물에 첨가하여 끓는 water bath에서 3분간 배양시킨 후 냉각시켰다. 냉각시킨 반응물에 dimethylaminobenzaldehyde 용액 3mL(4g의 p-dimethylaminebenzaldehyde를 350mL의 100% acetic acid와 10N hydrochloric acid 50mL의 혼합액)를 반응 혼합물에 첨가한 후 37°C water bath에서 20분간 배양한 후 분광광도계를 이용하여 585nm에서 측정하였다.

저해 비율 계산은 다음과 같이 하였다.

$$\text{Hyaluronidase Inhibition(\%)} = \frac{(\text{ODc} - \text{ODs})}{\text{ODc}} \times 100$$

여기서 ODc(optical density)는 대조군의 585nm에서의 OD이고 ODs는 샘플의 585nm에서의 OD이다.

5) 항균활성 측정 (Anti-bacterial assay)

추출한 각 시료들에 대한 항균활성 측정방법은 다음과 같다. 우선 직경이 80mm인 disc를 고압멸균기(10psi, 116°C, 20min)에서 완전히 멸균시켰다. Bottom agar는 beef extract 5g, NaCl 5g, peptone 10g, agar 1.5%를 3차 증류수 1000ml에 혼합해 고압멸균기를 이용해서 멸균시킨 후 사용하였다. 육즙배지는 bottom agar에서 agar를 넣지 않고 준비하였다. 각 용매(methanol, ethylacetate, chloroform)에 녹인 시료들을 micropipette을 이용하여 30 μl씩 도말하여 건조시켰다.

멸균시킨 시험관을 준비하여 5mL의 육즙배지를 넣은 후, 가열하여 멸균시킨 백금선으로 -60°C에서 보관된 400 μl의 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 첨가하여

희석하였다. 준비된 bottom agar plate에 멸균시킨 백금선을 이용하여 황색포도상구균을 streaking하고 streaked bottom agar plate를 37°C 항온기에서 24시간 배양하여 균이 잘 자라도록 하였다. 이로부터 단일종의 황색포도상구균 colony를 멸균된 백금선으로 취하여 시험관의 육즙배지에 접종시키고 37°C의 shaking incubator에서 24시간 배양하였다. 이렇게 배양된 균은 분광광도계를 이용하여 600nm에서 흡광도 1.0D가 되도록 조절하였다. 그리고 이 균배양액은 다시 100배로 희석하여 사용하였다. *E. Coli* DH5 α 균도 이와 같은 절차에 의하여 단일 종의 균배양액을 얻었다.

항균활성 시험은 이렇게 얻어진 균을 이용해 고체배지(bottom agar) 10mL에 100 μ l씩 첨가하여 vortex시킨후 petri dish에 넣어 굳게한 후 각 용매에 녹인 추출 시료들이 도달된 disc를 넣어 추출 분액이 도달되지 않고 용매만 도달하여 건조시킨 disc의 대조군과 비교 확인하였다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 시료 추출

실험에 사용된 시료들 중에서 닭의장풀, 돌외, 우슬, 자리공 뿌리, 환삼덩쿨은 100% methanol에서 추출하지 않고, 80% methanol을 이용하여 Scheme 1의 순서대로 추출하여 사용하였다. 이 시료들은 감압농축을 시켜 완전히 건조시킨 후에는 분말이 아닌 젤과 같은 끈은 상태가 되었다. 이것을 다시 methanol로 용해시키고자 하였으나 80% methanol을 이용하여 추출한 시료들 중에서 닭의장풀, 돌외, 환삼덩쿨은 용해도가 낮아 완전하게 녹지 않았다. 따라서 이들 중 실험에는 methanol에 녹는 부분만 취해서 사용하였다. 이들 용해도가 낮은 시료들은 완전히 건조가 안된 상태에서 용매에 담가졌거나, 물과 혼합한 용매를 사용했기 때문으로 생각된다.

methanol에 의해 추출 건조된 시료들을 다시 ethylacetate를 이용하여 녹는 부분만 취해 건조시키고 잔유물은 다시 chloroform에 녹여서 건조시켜 각 실험에 사용하였는데 두 용매에 대한 용해도가 일정하지 않고, 낮아 항균성 실험에서는 일관성 있는 농도로 실험하는데 약간의 문제가 있었다.

2. 미백효과

사용된 천연물 시료들의 미백효과 성분의 함유 여부를 관찰하기 위하여 methanol 층, ethylacetate 층, chloroform 층, residue 층의 tyrosinase activity 의 inhibition을 측정

하였다. 추출물들은 각각 추출층마다 세 차례의 실험을 하여 평균값을 구하였고, 그 결과는 Table 1에 도표화 하였다.

Tyrosinase inhibition 효과는 sample을 첨가하지 않은 대조군과, enzyme과 sample이 들어있는 반응시료액의 흡광도 차이를 100분율을 이용하여 표현되며 수치가 높을수록 tyrosinase inhibition 효과가 우수한 경우이다.

Table 1은 각 시료들의 tyrosinase inhibition 효과를 도표화 한 것이다. 각 시료들을 세 차례에 걸쳐 실험을 하면서 높은 활성 억제 정도를 나타냈던 시료도 있었으나, 가장 높은 값과 가장 낮은 값을 제외한 세 번의 실험 평균값으로 도표화 시켰다. 이러한 재현성의 문제는 실험 재료가 천연물로써 빛이나 공기에 의한 산화 현상이 작용했을 것으로 판단된다. 이 표에서 보면, 실험에 사용했던 시료들 대부분이 큰 효과가 보이지 않고 있으나, 자리공 뿌리의 chloroform 층에서는 tyrosinase 활성 억제가 크게 나타나고 있다. 따라서 자리공 뿌리의 chloroform 층의 IC_{50} 값을 구하기 위하여 시료 농도에 따른 inhibition을 측정하였다. 그 결과는 Figure 8과 Figure 9에 나타내었고 기존 대표적인 kojic acid와 비교하여 Table 2에 요약하였다.

Table 1. Inhibition of tyrosinase activity by solvent fractions from plants.

(단위:%)

시 료 종 류	MeOH층	EtOAc층	CHCl ₃	residue층
고 사 리 (<i>Pteidim aquilinum</i>)	4.11	4.73	0.66	5.78
녹 나 무 (<i>Cinnamomum camphora</i>)	3.43	3.39	1.45	0.22
닭 의 장 풀 (<i>Commelina communis</i>)	3.57	-1.91	4.27	1.39
돌 외 (<i>Gynostenmma pentaphyllum</i>)	3.51	-0.83	9.47	5.84
번 행 초 (<i>Tetragonia tetragonoides</i>)	-2.97	1.92	5.57	4.25
비 파 (<i>Eriobotrya japonica</i>)	5.71	7.04	8.42	6.5
산 박 하 (<i>Isodon inflexus</i>)	-5.87	1.75	4.91	2.46
쇠 무 료 (<i>Achyranthes japonica</i>)	3.92	-1.45	6.23	0.54
싸 리 (<i>Lespedeza bicolor</i>)	0.08	3.17	1.88	4.07
쑥 (<i>Artemisia princeps</i>)	3.27	-2.55	-0.24	1.94
으름(<i>Akebia quinta</i>)	-5.67	2.89	2.35	-0.54
자리공열매·잎 (<i>Phytolacca esculenta</i>)	3.44	-2.88	-1.64	3.51
자리공뿌리 (<i>Phytolacca esculenta</i>)	0.08	14.47	98.2	13.91
측백 (<i>Thuja orientalis</i>)	1.33	4.58	4.41	5.06
치자 (<i>Gardenia jasminoides</i>)	7.23	0.34	4.25	-0.49
키위 (<i>Actinidia deliciosa</i>)	3.2	5.26	3.24	2.28
환삼덩쿨 (<i>Humulus japonicus</i>)	2.41	-1.32	6.55	-0.64

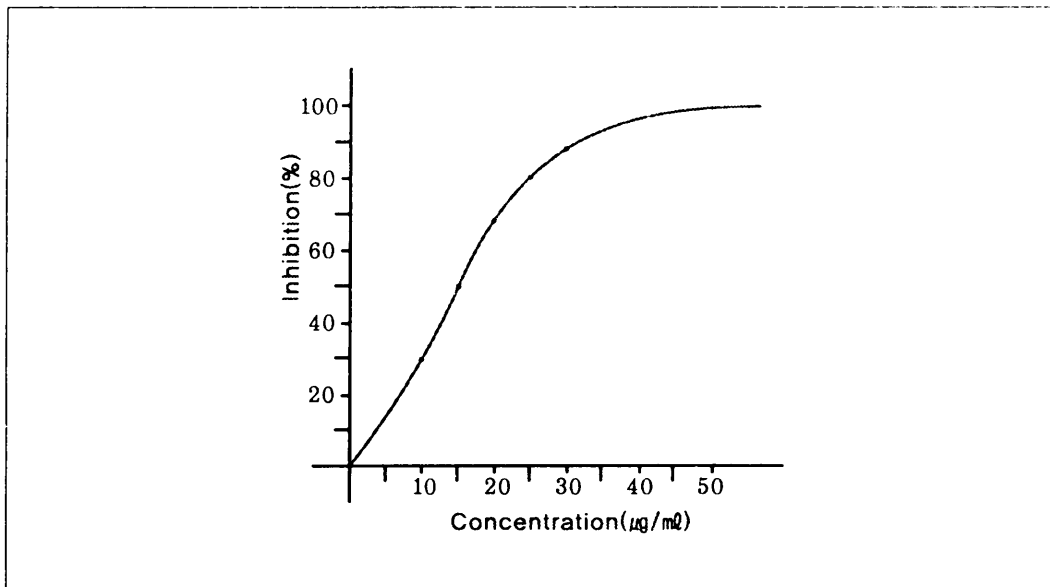


Figure 8. Inhibition of tyrosinase activity by the chloroform extract of *Phytolacca esculenta* root (IC₅₀ value is 15 µg/ml).

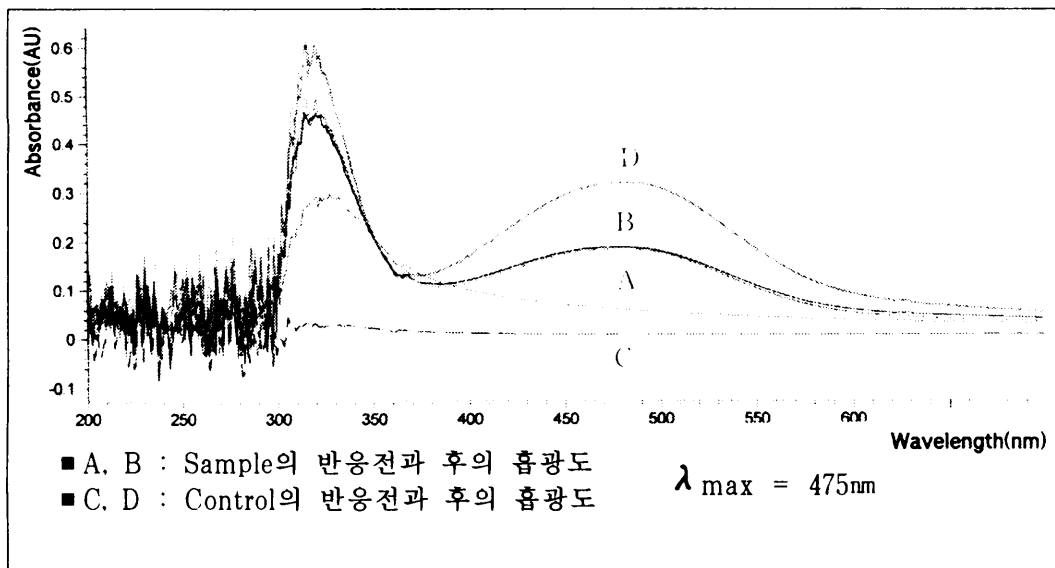


Figure 9. Tyrosinase inhibition effect of chloroform extract of *Phytolacca esculenta* root (Concentration was 15 µg/ml).

Table 2. Inhibition of tyrosinase activity by chloroform extract of the *Phytolacca esculenta* root.

(단위 : %)

시 료 종 류	tyrosinase inhibition(IC ₅₀ .µg/ml)
자리공뿌리(CHCl ₃)	15
kojic acid	37

Table 2는 기존 대표적인 미백제와 비교하여 나타낸 것으로써 그 효과에 있어서 상대적으로 높게 나타나고 있다. 이는 자리공 뿌리의 chloroform층에서 melanin 형성에 관여하는 tyrosinase 효소의 활성을 저해하는 성분이 있는 것으로 추측이 되어 thin layer chromatography를 이용하여 분리하였다. 그리고 flash column chromatography를 이용해서 분류한 후 다시 tyrosinase inhibition activity test를 실시하였다.

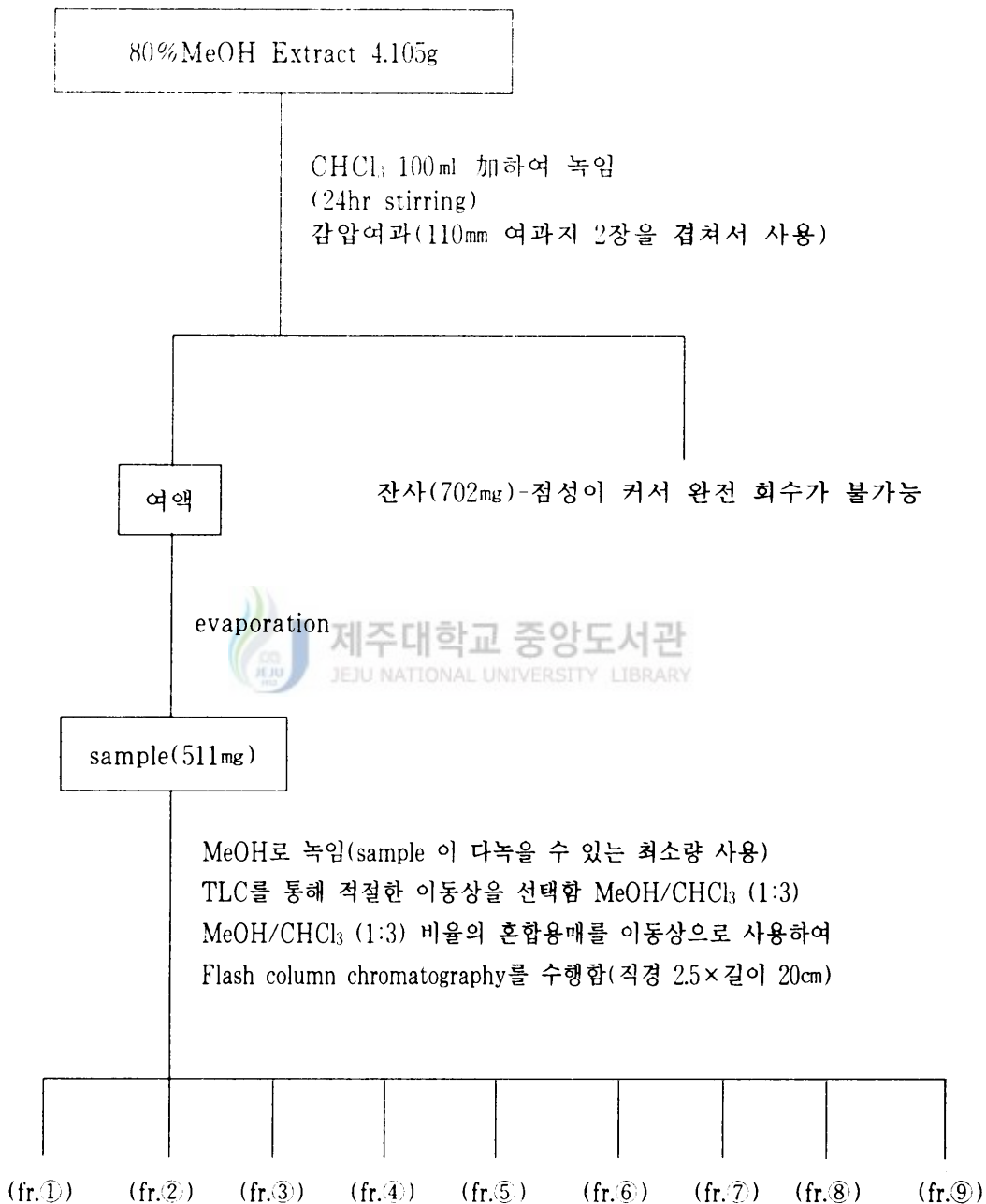
80% MeOH 추출물 7.772g 중 4.105g을 chloroform 100ml에 녹인 후 24시간 동안 교반시켜 감압여과 하였다. 잔사 702mg은 점성이 커서 완전히 회수하기가 어려웠으며 얻어진 것은 vial에 보관하였다. 실험에는 여액만을 취해 농축하여 511mg의 sample을 얻어서 사용하였다. 얻어진 sample을 다 녹일 수 있는 최소량의 methanol로 녹인후 TLC를 통해 column chromatography에 필요한 적절한 이동상이 MeOH/CHCl₃ (1:3) 비율의 혼합용매임을 확인하였다. 가장 적합한 이동상인 MeOH/CHCl₃ (1:3) 비율의 혼합용매를 사용하여 flash column chromatography (직경 2.5cm × 길이 20cm) 한 결과 8개의 fraction과 제일 마지막에 column내에 남아있는 잔유물들을 methanol을 이동상으로 사용하여 얻어낸 methanol fraction의 총 9개의 fraction을 얻을 수 있었다. 이 중 fraction ①은 TLC상에서 spot이 나타나지 않아 실험을 할 수 없었고, 나머지 총8개의 fraction들은 tyrosinase 활성 실험을 하였다. 그 결과를 Figure 10, 11, 12와 Table 3에 정리하였다.

실험 결과는 Table 3에서 보여주는 것 처럼 ②, ③ fraction에서 IC₅₀ 값을 구할 수

있었다. Fraction 번호는 column을 통해 나오는 순서대로 붙인 번호로써 Table 3은 극성이 낮은 부분에 해당이 된다.

Table 3에서의 IC_{50} 값은 Table 2의 혼합물인 상태의 IC_{50} 값보다는 낮게 나오지만 역시 kojic acid 보다는 높은 수치를 나타내고 있다. 혼합물인 상태보다 순수한 물질일 때 그 효과가 낮게 나타나는 경우는 천연물 실험에서 종종 나타나는 결과이다.





Scheme 2. Flow chart for the fractions of chloroform extraction of *Phytolacca esculents* root.

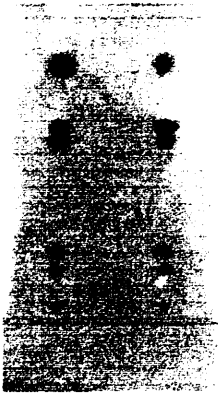
Thin Layer Chromatogram	R _f values
	A = 0.847 B = 0.639 B ₁ = 0.597 C = 0.236 D = 0.167 E = 0.056

Figure 10. Thin layer chromatogram of chloroform extraction of *Phytolacca esculents* root before flash column chromatography.

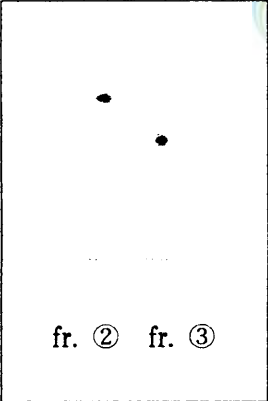
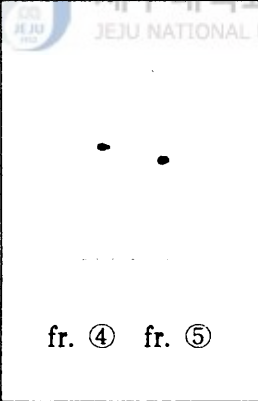
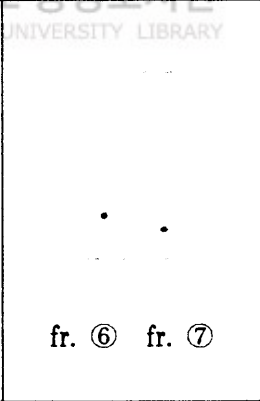
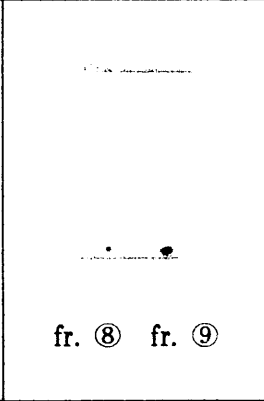
R _f values			
 fr. ② fr. ③	 fr. ④ fr. ⑤	 fr. ⑥ fr. ⑦	 fr. ⑧ fr. ⑨
A = 0.863 B = 0.638	B ₁ = 0.598 B ₂ = 0.525	C = 0.238 D = 0.150	E = 0.05

Figure 11. Thin layer chromatogram of chloroform extraction *Phytolacca esculents* root after flash column chromatography.

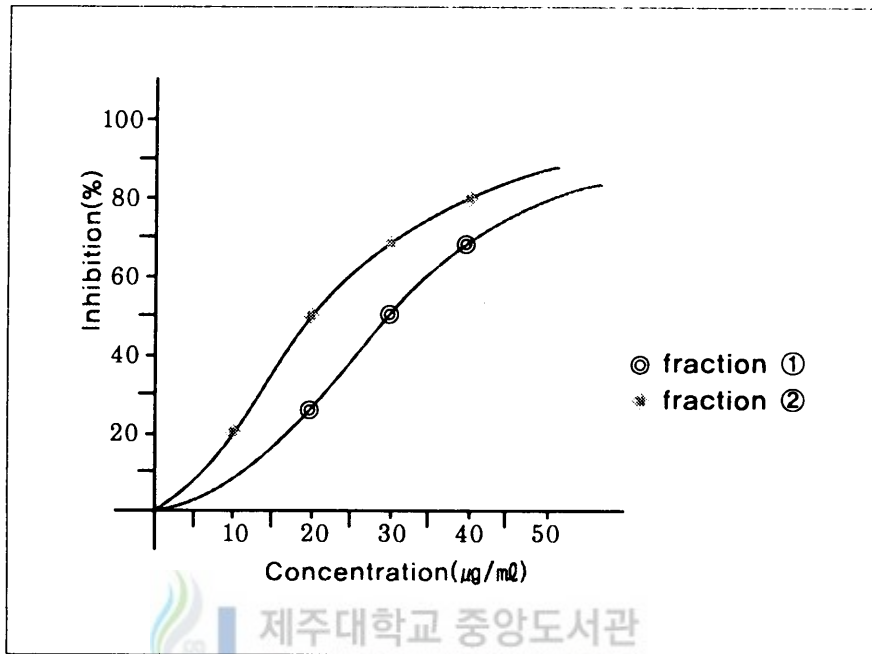


Figure 12. Inhibition of tyrosinase activity by chloroform fractions of *Phytolacca esculenta* root.

Table 3. Inhibition of tyrosinase activity by chloroform fractions of the *Phytolacca esculenta* root.

(단위 : %)

fraction	IC ₅₀ .µg/ml
fr. ①	30
fr. ②	20

3. 항산화 활성

실험에 사용된 시료의 methanol 층, ethylacetate 층, chloroform 층, residue 층의 추출물들을 항산화효과를 DPPH 용액을 이용하여 측정하였다. 각층에 대한 실험은 세 차례에 걸쳐서 하였고 그 결과는 Table 4, Table 5, Table 6에 SC₅₀ 값으로 구하여도표화 하였다.

항산화 효과는 DPPH 용액만 존재하는 대조군과 DPPH 용액과 각 추출물이 들어있는 반응 용액의 흡광도 차이로 표현되며 DPPH 용액의 radical이 제거되면 517nm에서의 흡광도가 감소한다. 이 차이의 값이 클수록 항산화 활성이 높다고 판단된다.

Table 4. The free radical scavenging effects of methanol extracts of plants.

(단위 : %)

시 료 종 류	SC ₅₀ , µg/ml
녹 나 무 (<i>Cinamomum camphora</i>)	33
비 파 (<i>Eriobotrya japonica</i>)	30
산 박 하 (<i>Isodon inflexus</i>)	215
쇠 무 료 (<i>Achyranthes japonica</i>)	25
짜 리 (<i>Lespedeza bicolor</i>)	30
쑥 (<i>Artemisia princeps</i>)	27
으 름 덩 쿨 (<i>Akebia quinta</i>)	70
자리공열매.잎 (<i>Phytolacca esculenta</i>)	200
측 백 (<i>Thuja orientalis</i>)	170
butylated hydroxytolune	50
ascorbic acid	22

Table 5. The free radical scavenging effects of ethylacetate extracts of plants.

(단위 : %)

시 료 종 류	SC ₅₀ . $\mu\text{g/ml}$
녹 나 무 (<i>Cinamomum camphora</i>)	65
비 파 (<i>Eriobotrya japonica</i>)	165
자 리 공 열 매 (<i>Phytolacca esculenta</i>)	100
싸 리 (<i>Lespedeza bicolor</i>)	87

Table 6. The free radical scavenging effects of chloroform extracts of plants.

(단위 : %)

시 료 종 류	SC ₅₀ . $\mu\text{g/ml}$
녹 나 무 (<i>Cinamomum camphora</i>)	87
싸 리 (<i>Lespedeza bicolor</i>)	280

4. 항염증 효과

시료들의 항염증에 대한 효과 측정은 각 시료들의 methanol 층, ethylacetate 층, chloroform 층, residue 층의 hyaluronidase inhibition activity test를 실시함으로써 알 수 있었다. 추출물들은 각각 추출층마다 세 차례의 실험을 하여 평균값을 구하여 Table 7에 정리하였다.

Hyaluronidase inhibition 효과는 tyrosinase inhibition activity 실험에서와 같이 측정되는 값은 sample을 첨가하지 않은 대조군과, enzyme과 sample이 들어있는 반응시료액의 흡광도 차이를 100분율을 이용하여 표현되며 수치가 높을수록 hyaluronidase inhibition 효과가 좋다고 판단된다.

Table 7. Inhibition of hyaluronidase activity by solvent extractions from plants.

(단위 : %)

시료종류	MeOH층	EtOAc층	CHCl ₃ 층	residue층
고사리 (<i>Pteidim aquilinum</i>)	-3.66	2.92	3.24	5.92
녹나무 (<i>Cinnamomum camphora</i>)	-5.28	-6.60	6.51	8.68
닭의장풀 (<i>Commelina communis</i>)	-7.91	4.48	10.95	1.14
들외 (<i>Gynostenmma pentaphyllum</i>)	7.66	1.61	-5.47	12.08
번행초 (<i>Tetragonia tetragonoides</i>)	6.29	0	-0.97	0.06
비파 (<i>Eriobotrya japonica</i>)	0.97	6.39	1.23	-1.03
산박하 (<i>Isodon inflexus</i>)	0.88	-10.56	1.18	-0.49
쇠무릎 (<i>Achyranthes japonica</i>)	-3.54	6.61	7.22	1.36
싸리 (<i>Lespedeza bicolor</i>)	10.51	7.35	3.34	-0.9
쑥 (<i>Artemisia princeps</i>)	-1.62	3.66	-7.63	-1.04
으름 (<i>Akebia quinta</i>)	-8.38	-1.23	8.93	-0.99
자리공열매·잎 (<i>Phytolacca esculenta</i>)	4.95	1.91	-10.62	-2.58
자리공뿌리 (<i>Phytolacca esculenta</i>)	-0.79	11.56	8.79	1.26
측백 (<i>Thuja orientalis</i>)	-2.97	-13.95	-1.96	-1.38
치자 (<i>Gardenia jasminoides</i>)	-5.03	2.36	6.85	1.36
키위 (<i>Actinidia deliciosa</i>)	-7.33	7.8	-3.25	-2.29
환삼덩쿨 (<i>Humulus japonicus</i>)	-2.17	3.82	-4.85	-2.7

5. 항균활성

1) Gram positive 박테리아에 대한 활성 검색

실험에 사용된 추출물들을 methanol 층, ethylacetate 층, chloroform 층, residue 층으로 분획하고 각각을 Gram positive 균인 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균활성을 측정하였다. 그 결과를 Table 8, Table 9, Table 10, Table 11과 Figure 13에 나타내었다.

각 분리 추출 층에 대한 항균활성을 검색한 결과, 대부분의 시료에서 어느 정도의 농도에서는 항박테리아 활성을 나타내었다. 특히 산박하와 키위의 methanol층에서 강한 항균성을 찾을 수 있었다.

2) Gram negative 박테리아에 대한 활성 검색

실험에 사용된 추출물들을 methanol 층, ethylacetate 층, chloroform 층, residue 층으로 분획하고 각각을 Gram negative 균인 *E. Coli* DH5 α 박테리아에 대한 항균활성을 측정하였다. 그 결과를 Table 12, 13과 Figure 14에 나타내었다.

Gram negative 박테리아에 대한 활성 검색에서는 Gram positive 박테리아 활성 검색과는 달리 전체적으로 훨씬 낮은 항박테리아 활성을 보였다. 키위의 methanol 층에서는 여전히 높은 활성을 보여주었다.

Table 8. The antibacterial activities of MeOH extracts of plants against *Staphylococcus aureus*.

(단위 : mm)

시 료 종 류	500($\mu\text{g/ml}$)	300($\mu\text{g/ml}$)	250($\mu\text{g/ml}$)	125($\mu\text{g/ml}$)	62.5($\mu\text{g/ml}$)
고사리 (<i>Pteidim aquilinum</i>)	3		2	1	
녹나무 (<i>Cinnamomum camphora</i>)			1	0.5	
닭의장풀 (<i>Commelina communis</i>)	1				
변행초 (<i>Tetragonia tetragonoides</i>)	3	1.5			
비파 (<i>Eriobotrya japonica</i>)	1.5				
산박하 (<i>Isodon inflexus</i>)	9		8	6	3
쇠무릎 (<i>Achyranthes japonica</i>)	2.5		1.5		
싸리 (<i>Lespedeza bicolor</i>)	4				
쑥 (<i>Artemisia princeps</i>)	0.5				
으름 (<i>Akebia quinta</i>)	2		1		
자리공열매.잎 (<i>Phytolacca esculenta</i>)	0.5				
자리공뿌리 (<i>Phytolacca esculenta</i>)	0.5				
측백 (<i>Thuja orientalis</i>)	2				
치자 (<i>Gardenia jasminoides</i>)	1.5		0.5		
키위 (<i>Actinidia deliciosa</i>)	7		4.3	2.7	1.8
환삼 (<i>Humulus japonicus</i>)	0.5				

Table 9. The antibacterial activities of ethylacetate extracts of plants against *Staphylococcus aureus*.

(단위 : mm)

시 료 종 류	300($\mu\text{g/ml}$)	200($\mu\text{g/ml}$)	100($\mu\text{g/ml}$)	50($\mu\text{g/ml}$)
비 파 (<i>Eriobotrya japonica</i>)		0.8		
산 박 하 (<i>Isodon inflexus</i>)		7.5	6	2.5
쇠 무 료 (<i>Achyranthes japonica</i>)		1	0.5	
짜 리 (<i>Lespedeza bicolor</i>)	1			
측 백 (<i>Thuja orientalis</i>)		1	0.8	0.5
키 위 (<i>Actinidia deliciosa</i>)				1

Table 10. The antibacterial activities of chloroform extracts of plants against *Staphylococcus aureus*.

(단위 : mm)

시 료 종 류	500($\mu\text{g/ml}$)	100($\mu\text{g/ml}$)
선 인 장 열 매 (<i>Opuntia ficus-indica</i>)fruite	1	
짜 리 (<i>Lespedeza bicolor</i>)		1.5
키 위 (<i>Actinidia deliciosa</i>)		2.5

Table 11. The antibacterial activities of residue extracts of plants against *Staphylococcus aureus*.

(단위 : mm)

시 료 종 류	500($\mu\text{g/ml}$)	250($\mu\text{g/ml}$)
닭의장풀 (<i>Commelina communis</i>)		1
으 름 (<i>Akebia quinta</i>)	1.5	
자리공 열매·잎 (<i>Phytolacca esculenta</i>) fruite·leaf	2.5	
자 리 공 뿌 리 (<i>Phytolacca esculenta</i>) root	1.5	

Table 12. The antibacterial activities of ethylacetate extracts of plants against *Escherichia coli* DH5 α .

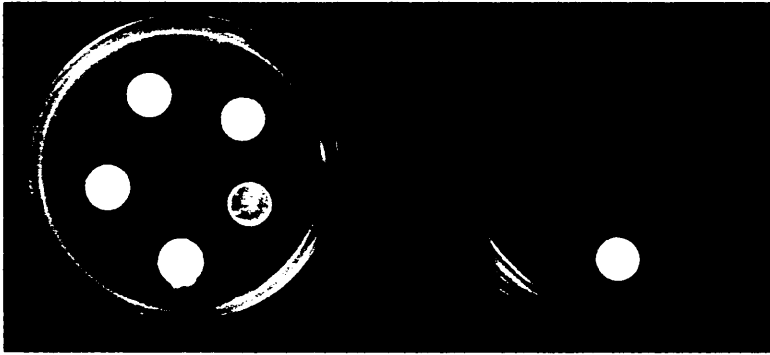
(단위 : mm)

시 료 종 류	500($\mu\text{g/ml}$)	250($\mu\text{g/ml}$)	125($\mu\text{g/ml}$)
번 행 초 (<i>Tetragonia tetragonoides</i>)	1.5	0.5	
키 위 (<i>Actindia deliciosa</i>)	5	3	1.5

Table 13. The antibacterial activities of residue extracts of plants against *Escherichia coli* DH5 α .

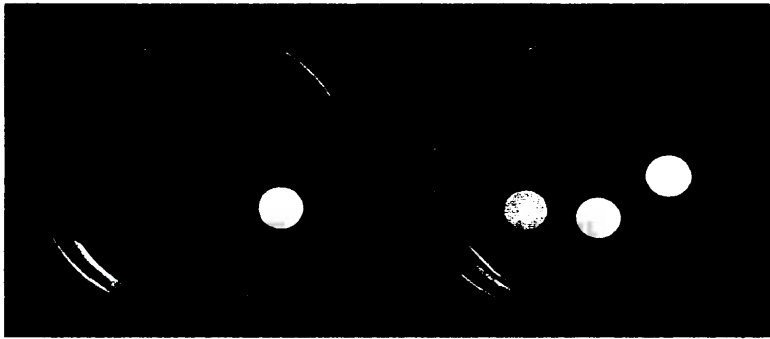
(단위 : mm)

시 료 종 류	500	250	125
녹나무 (<i>Cinnamomum camphora</i>)		1.5	0.5
선인장 열매 (<i>Opuntia ficus-indica</i>) fruite	4	3	1
싸 리 (<i>Lespedeza bicolor</i>)	1		
키 위 (<i>Actindia deliciosa</i>)	5	1.5	



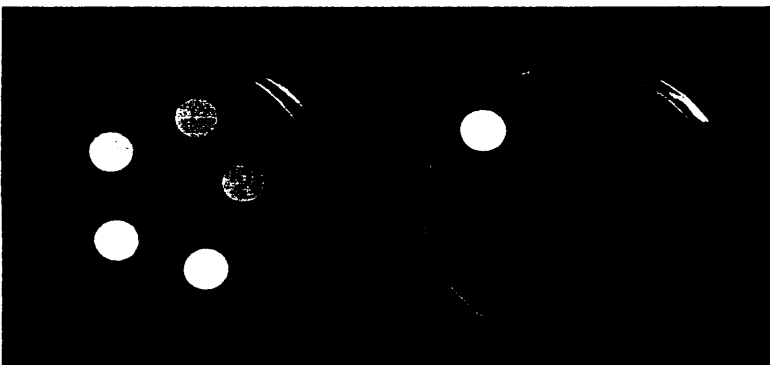
키위

산박하



싸리

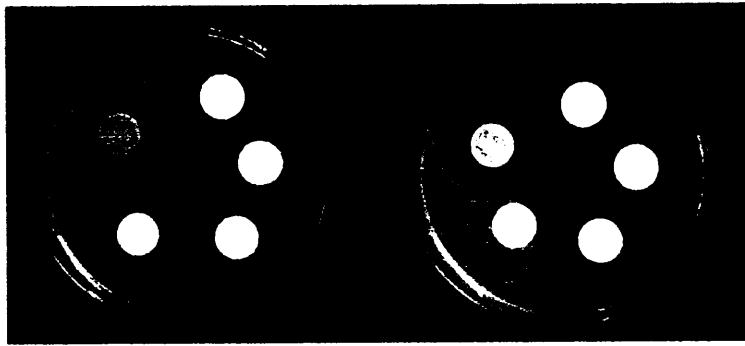
고사리



식물료

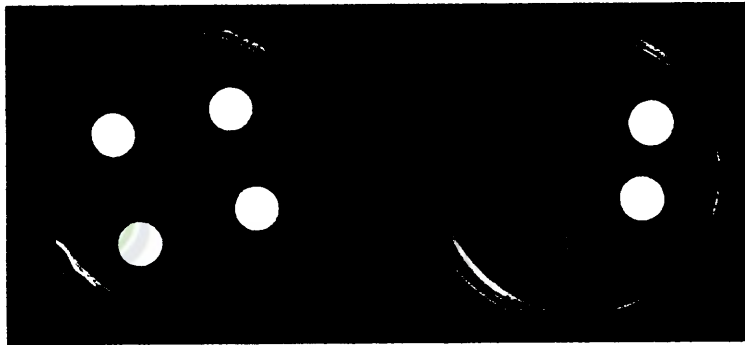
번행초

Figure 13. The antibacterial activities of MeOH extracts against *Staphylococcus aureus*.



키위 residue 총

키위 MeOH 총



선인장 열매 residue 총

싸리 residue 총

Figure 14. The antibacterial activities of MeOH extracts and residue extracts against *Escherichia coli* DH5 α .

IV. 결 론

천연물에서 화장품 원료로서 사용 가능한 식물 검색을 확인하기 위하여 제주도에 서 자생하는 여러 가지 육상식물들을 채집하여 methanol 추출물을 제조하였다. 이 추출물은 다시 ethylacetate와 chloroform 가용성 분획 및 잔사층으로 분획화하여 활성 검색의 시료로 사용하였다.

Tyrosinase 활성 억제를 이용한 미백효과는 dopachrome법을 이용해 UV/VIS spectrophotometry로 측정하였다. 대조군과 실험군의 흡광도 차이를 비교하여 효소 억제 정도를 측정하였는데 값이 클수록 억제 효과가 높다. 실험에 사용된 추출물 중에서는 자리공 뿌리의 chloroform층에서 IC₅₀ 값이 15 μ g/ml로 기존 미백제로 사용되고 있는 kojic acid(IC₅₀ : 37 μ g/ml)와 비교하였을 때 tyrosinase 저해 효과가 높게 나타났다.

항산화 활성은 DPPH 용액만의 대조군이 흡수하는 UV/VIS spectrophotometry에서의 흡광도와 DPPH 용액과 용매추출 분획의 혼합시료용액이 흡수하는 흡광도 차이를 지표로 하여 측정하였다. 실험에 사용된 추출물 중에서는 녹나무 (SC₅₀ : 33 μ g/ml), 비파 (SC₅₀ : 30 μ g/ml), 쇠무릎 (SC₅₀ : 25 μ g/ml), 싸리 (SC₅₀ : 30 μ g/ml), 쑥 (S : 27 μ g/ml) 등의 methanol 분류층에서 free radical 제거 효과가 butylated hydroxoytoluene (SC₅₀ : 50 μ g/ml)와 ascorbic acid (SC₅₀ : 22 μ g/ml)와 비교해서 좋은 효과를 보여주었다.

Hyaluronidase 활성 억제 정도를 측정함으로써 항염증 효과를 측정할 수 있는데 본 실험에 사용된 추출물 중에는 싸리의 methanol 층에서만 미세한 효과가 나타났을 뿐 모든 추출물에서 큰 효과를 찾을 수 없었다. 다만 여러 번 실험중에서 높게 나온 것도 있었지만 가장 큰 값과 작은 값을 제외한 세 번의 실험값 평균으로 도표화 하였다.

천연 원료로부터 항균 성분을 검색하기 위하여 Gram-positive 균과 Gram-negative

균을 이용한 항균활성 실험을 하였는데 G-(+) 균 실험에서는 키위(500 μ g/ml : 7mm)와 산박하(500 μ g/ml : 9mm)에서 다른 추출물에 비해 항균활성이 상대적으로 높게 나왔고, G-(-) 균 실험에서는 키위의 methanol 층과 residue 층에서 각각 500 μ g/ml 에서 5mm의 항균활성 정도를 보였다. 따라서 키위인 경우 G-(+) 균과 G-(-) 균 모두에서 항균활성을 나타내어 천연적인 항균제로서 앞으로 더 많은 연구 가능성을 제시해 주었다.

이러한 결과들로서 천연 식물에서 화장품 원료로의 유용성분을 확인할 수 있었고, 특히 제주도 자생 식물의 화장품 원료로서의 연구 및 개발 가능성을 보여주었다. 그리고 향후 기능성 화장품 원료 개발을 하는 데 기초자료로 이용될 수 있다고 사료된다.



V. 참고문헌

1. 김기연 외 4인, 피부관리학 I : 수문사: 서울, 1997.
2. 김덕록, 화장과 화장품: 도서출판 답게: 서울, 1997.
3. 김연주: 김기연, 화장품학: 청구문화사: 서울, 1999.
4. 김현, 현대미용학: APC: 서울, 1998.
5. 양재덕, 최신화장품학: 장업신보: 서울, 1998.
6. 이혁: 조성태, 한방미용학개론: 청구문화사: 서울, 1995.
7. 하병조, 화장품학: 수문사: 서울, 1999.
8. 하병조, 미용생화학: 형설출판사: 서울, 1999.
9. 장이섭: 이옥섭, 화장품 산업에서의 신기술 동향, *공업화학 전망*, 2000, 25(2).
10. 이섭, 이옥섭 : 화장품 산업에서의 신기술 동향, 2000, 25(2).
11. 이현호, 최근 미백화장품의 개발동향, *대한화장품학회지*, 1997.
12. Maeda K., "Recent studies of melanogenesis and its control." *Fragrance Journal*, 1997, 25(9), 10-18.
13. Mishima, Y.: Hatae, S.: Kondoh, H.: Kadota, M., "Overview of research and development for new third-generation skin-lightening agents." *Fragrance Journal*, 1998, 26(1), 34-44.
14. 안정립, 기능성 화장품의 정의와 동향, *대한화장품학회지*, 1997, 23(1).
15. 이재섭 외 5인, *The Effects of Alpinia katusmadai Extract on Anti-inflammation and Melanogenesis*, *대한화장품학회지*, 1999, 25(1).
16. 박수남, 천연물의 피부 세포에 미치는 영향, *대한화장품학회지*, 1999, 25(2).
17. Okano, Y., "Evaluation of plant extracts as active agents for skin whitening." , *Fragrance Journal*, 1997, 25(9), 56-62.
18. Kubo, M.: Matsuda, H., "Development studies of cuticle and medicinal drugs from natural sources on melanin biosynthesis " , *Fragrance J.*, 1995, 8, 48-55.

19. Kinoshita, Y. " Inhibitors of melanin synthesis derived from lichens. " , *Fragrance Journal*, **1997**, 25(9), 69-73.
20. Egawa, M.; Sakamoto, T.; Kumano, Y., " Whitening effect of vitamin C and its derivatives. " , *Fragrance Journal*, **1997**, 25(9), 28-36.
21. Funasaka, Y.; Ichihashi, M.; Inoue, K., " Inhibitory effect of DL - alpha - tocopheryl ferulate on melanogenesis." , *Fragrance Journal*, **1997**, 25(9), 19-27.
22. Tachibana, S.; Tanaka, Y., " Inhibitory effect of ellagic acid on melanogenesis. " , *Fragrance Journal*, **1997**, 25(9), 37-42.
23. Shinmoto, H., " Regulation of melanogenesis with foodstuffs. " , *Fragrance Journal*, **1997**, 25(9), 63-68.
24. Sinomiya, T.; Hikima, T.; Sakamaki, T., " Application of alpha-hydroxy acid for lightening and whitening cosmetics. " , *Fragrance Journal*, **1997**, 25(9), 49-55.
25. 박수남, 피부노화와 항산화제, *대한화장품학회지*, **1997**, 23(1).
26. Koide, C.; Senoo, M.; Hoshino, I., "Melanogenesis-inhibitory effect of kojic acid-glabridin (oil soluble licorice extract) composite." *Fragrance Journal*, **1997**, 25(9), 43-48.
27. Oikarinen, A.; Kallioinen, M., "A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin" , *Photodermatology*, **1989**, 6, 24-31.
28. Inoue, S., "Prospect of dermatological science in cosmetics for regulating skin aging" , *Fragrance Journal*, **1998**, 1, 45-50.
29. Harman, D. , "Role of free radicals in aging and disease" , *Ann. Y. Acade Sci.*, **1992**, 673, 126-141.
30. Packer, L. , "Oxidative stress, antioxidants, aging and disease" , In: *Oxidative Stress and Aging*, (R. G. Cutler, L. Packer, J. Bertram & A. Mori, eds), *Birkhauser Verlag*, **1995**.
31. Baker, M.S. , "Free radicals and connective tissue damage" , In : *Free radical damage and its control* (C. A. Rice-Evance and R. H. Burdon, eds.) : Elsevier: Amsterdam, **1994**.

32. Takeya, K.. "Antimicrobial and anti-inflammatory activities of crude drugs"
Fragrance Journal, 1995, 8. 56-64.
33. France Patent, 2655268(A), 1991.
34. Y. Frgita: I. Uehara: Y. Marimoto and T. Okuda, *Yakugak Zashi*, 1988,
108, 129.
35. 강국철, " 손바닥선인장으로부터 생리활성 성분의 분리 및 활성 확인 " , 1999.
36. 조완구, 기능성 기초화장품, *대한화장품학회지*, 1997.
37. 조춘구: 한창규, 천연물질의 항균효과, *대한화장품학회지*, 1999, 25(2).

