



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

博士學位論文

濟州島 天然 植物資源의 機能性  
化粧品 素材의 探索 適用을 위한  
生理活性 研究

濟州大學校 大學院

動物生命工學專攻

梁 京 月

2020 年 2 月

濟州島 天然 植物資源의 機能性 化粧品 素材 適用을 위한 生理活性 研究

梁 京 月

二〇二〇

濟州島 天然 植物資源의 機能性  
化粧品 素材 適用을 위한  
生理活性 研究

指導教授 柳 然 喆

梁 京 月

이 論文을 農學博士學位 論文으로 提出함

2020 年 2 月

梁京月の 農學博士學位 論文을 認准함

審査委員長 農學博士 이 왕 식 (인)

委 員 農學博士 민 태 선 (인)

委 員 農學博士 송 민 호 (인)

委 員 理學博士 김 준 모 (인)

委 員 農學博士 류 연 철 (인)

濟州大學校 大學院

2020 年 2 月

# 목 차

要約 (國文) .....	vi
Abstract .....	viii
I. 서 론 .....	1
II. 연 구 사 .....	4
1. 화장품 종류 및 화장품 산업의 변화와 방향 .....	4
2. 피부와 면역 .....	10
3. 기능성화장품 및 cosmeceutical .....	16
4. 제주 천연 화장품 소재 .....	20
5. 항산화와 항염증 .....	28
6. 전망 .....	31
III. 제주산 복분자 딸기 추출물의 항염증 효과 .....	32
1. 요약 .....	32
2. 서론 .....	33
3. 재료 및 방법 .....	35
1) 재료 및 추출 .....	35
2) 추출물의 활성 측정을 위한 cell 배양 .....	35
3) 추출물의 생리활성 평가 및 특성 분석 .....	36
4) 통계처리 .....	38

<b>4. 결과 및 고찰</b> .....	39
1) 복분자 딸기 추출물의 세포 독성 측정 .....	39
2) 복분자 딸기 추출물의 NO 생성 억제 활성 .....	40
3) 복분자 딸기 추출물의 PGE <sub>2</sub> 생성 억제 활성 .....	41
4) iNOS 및 COX-2 발현 억제 .....	42
5) 전염증성 cytokines(TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) 생성 억제 .....	44
<b>5. 결론</b> .....	46
IV. 제주산 겨울딸기 잎 추출물의 항산화 활성 및 항염증 효과 .....	47
<b>1. 요약</b> .....	47
<b>2. 서론</b> .....	48
<b>3. 재료 및 방법</b> .....	50
1) 재료 및 추출 .....	50
2) 추출물의 활성 측정을 위한 cell 배양 .....	50
3) 추출물의 생리활성 평가 및 특성 분석 .....	51
4) 통계처리 .....	54
<b>4. 결과 및 고찰</b> .....	55
1) Total Phenol 및 flavonoid contents .....	55
2) DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능 .....	56
3) 세포 생존율 평가 .....	57
4) Nitric Oxide(NO) 생성 저해 활성 평가 .....	58
5) Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) 생성 저해 활성 평가 .....	59
6) Pro-inflammatory cytokine(TNF- $\alpha$ , IL-6) 생성 저해 활성 평가 .....	59
7) iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 활성 평가 .....	59
<b>5. 결론</b> .....	60

V. 제주산 순비기나무 ( <i>Vitex rotundifolia</i> ) 잎과 열매 essential oil의 성분 및 생리활성 분석 .....	63
<b>1. 요약</b> .....	63
<b>2. 서론</b> .....	64
<b>3. 재료 및 방법</b> .....	66
1) 재료 및 추출 .....	66
2) 추출물의 활성 측정을 위한 cell 배양 .....	66
3) 추출물의 생리활성 평가 및 특성 분석 .....	68
4) 통계처리 .....	70
<b>4. 결과 및 고찰</b> .....	71
1) 순비기나무 열매, 잎 에센셜 오일의 성분 분석 .....	71
2) DPPH 라디칼 소거능 .....	74
3) ABTS 라디칼 소거능 .....	74
4) RAW 264.7 macrophges cell을 이용한 세포독성과 NO 저해활성 .....	76
5) RAW 264.7 macrophges cell을 이용한 염증성 사이토카인 억제효과 측정 .....	78
6) 순비기나무 잎, 열매 에센셜 오일의 항균 활성 .....	81
<b>5. 결론</b> .....	83
VI. 결 론 .....	84
VII. 참고문헌 .....	86
감사의 글 .....	101

## 표 및 그림목차

표 II-1. 화장품의 분류 .....	5
표 II-2. 세계의 화장품 인증제도 .....	9
표 II-3. 피부의 구조와 기능 .....	12
표 II-4. 피부의 생리작용 .....	13
표 II-5. 기능성 화장품 개념 .....	17
표 II-6. 화장품, 의약외품, 의약품 차이 .....	19
표 V-1. <i>Vitex rotundifolia</i> 잎의 에센셜 오일 성분 .....	72
표 V-2. <i>Vitex rotundifolia</i> 열매의 에센셜 오일 성분 .....	73
표 V-3. <i>Vitex rotundifolia</i> . 에센셜 오일의 IC <sub>50</sub> 값 .....	75
표 V-4. <i>Vitex rotundifolia</i> 오일의 항균 활성 .....	82
그림 II-1. 피부의 구조 .....	11
그림 II-2. 제주 화산송이 및 화산송이 함유 클렌징 폼 .....	22
그림 II-3. 제주 애기감굴 및 애기감굴 함유 비누 .....	22
그림 II-4. 제주 백년초 및 백년초 마스크팩 .....	23
그림 II-5. 제주 동백 및 동백 마사지 솔트 .....	24
그림 II-6. 제주왕벚꽃 및 왕벚꽃 토너 .....	25
그림 II-7. 자유라디칼을 발생하는 환경 및 유해인자와 그에 따른 세포의 영향 .....	29
그림 II-8. 대식세포의 가소성과 조직손상 .....	30



그림 III-1. <i>Rubus coreanus</i> extract의 RAW 264.7 세포 내 독성 평가	39
그림 III-2. <i>Rubus coreanus</i> extract의 RAW 264.7 세포 내 nitro oxide (NO) 생산 억제 효과	40
그림 III-3. RSL의 RAW 264.7 세포 내 PGE <sub>2</sub> 생산 억제 효과	41
그림 III-4. RSL의 RAW 264.7 세포 내 iNOS (a)와 COX-2 (b) 발현 억제 효과	43
그림 III-4. RSL의 RAW 264.7 세포 내 전염증성 cytokine인 TNF-α (a), IL-1β (b), IL-6 (c) 생성 억제 효과	45
그림 IV-1. 겨울딸기 잎의 페놀과 플라보노이드 함량	55
그림 IV-2. 겨울딸기 잎의 DPPH (A)와 ABTS (B) 라디칼 소거능	56
그림 IV-3. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포의 생존율	57
그림 IV-4. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포의 NO저해 효과	58
그림 IV-5. RAW 264.7 세포의 PGE <sub>2</sub> 저해 효과	59
그림 IV-6. RBM의 RAW 264.7 세포 내 전염증성 cytokine인 TNF-α (A), IL-6 (B) 생성 억제 효과	60
그림 IV-7. RBM의 RAW 264.7 세포 내 iNOS (A)와 COX-2 (B) 발현 억제 효과	61
그림 V-1. <i>Vitex rotundifolia</i> 잎(A)과 열매(B)에서 추출한 에센셜 오일의 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성과 NO 저해 효과	77
그림 V-2. <i>Vitex rotundifolia</i> 잎(gray bar)과 열매(black bar)에서 추출한 에센셜 오일의 RAW 264.7 세포에 대한 IL-1β (A), IL-6 (B), TNF-α (C) 및 PGE <sub>2</sub> (D) 생성 억제 효과	80

# 濟州島 天然 植物資源의 機能性 化粧品 素材 適用을 위한 生理 活性 研究

梁 京 月

濟州大學校 動物生命工學專攻

## 要約

화장품 산업은 사람들의 외모에 대한 아름다움을 추구하려는 욕구를 충족시켜주기 위한 이미지 산업이자 고부가가치가 창출되는 산업이다. 이러한 화장품 산업은 다른 업종에 비해 시장의 변화에 민감하여 지속적인 연구를 통한 소재개발과 신상품의 생산이 빈번하게 이루어지고 있다. 현대인들에게 있어서 화장품은 단순한 아름다움 뿐 아니라 다양한 기능이 추가되어 날씨의 급격한 변화와 환경의 위협으로부터 피부보호, 관리 및 피부의 항상성을 유지하기 위한 도구로, 항산화, 항노화, 항염증 및 항균 등의 효과를 나타낼 수 있는 기능성 화장품의 수요가 점점 늘어나고 있다.

화장품 생산에 이용하기 위한 원료 개발을 위해 피부에 안전하고, 다른 화장품 소재와의 상용성 등을 고려하여야 한다. 천연 및 유기농 자원은 안전성 뿐 아니라 이미지 마케팅 측면에서도 좋은 화장품 원료가 될 수 있다. 제주도는 이러한 천연 및 유기농 식물 자원을 활용하여 안전한 화장품, 청정 자연친화적 화장품의 이미지를 구축할 수 있는 입지를 갖추고 있다.

따라서 본 연구에서는 제주도에 자생하는 복분자딸기, 겨울딸기 추출물 및 순비기나무의 잎과 열매에서 추출한 오일을 활용하여 항산화, 항염증 및 항균 활성을 확인하여 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 검토하였다.

복분자 딸기 (*Rubus coreabus* Miquel)와 겨울딸기 (*Rubus buergeri* Miquel)은 다양한 종류의 식물 화학 물질을 함유하고 있으며 항염증, 항균 및 항암 효과와 같은 광범위한 생리 활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 복분자딸기 줄기 및 잎 추출물의 항염증 효과 및 겨울딸기 잎 추출물의 항산화 및 항염증 활성을 평가하였다. 복분자딸기 추출물은 nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub>

(PGE<sub>2</sub>)과 같은 전염증성 물질의 생성과 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible NO synthase (iNOS)와 같은 전염증성 물질 생산을 위한 단백질의 발현을 농도 의존적으로 억제하였으며, RAW 264.7 세포 독성은 관찰되지 않았다. 또한 겨울딸기 추출물이 처리된 RAW 264.7 세포는 NO, PGE<sub>2</sub>, iNOS 및 COX-2를 상당히 억제 하였다.

순비기나무 (*Vitex rotundifolia*) 열매는 자유라디칼 소거, 항알러지, 진통 효과 및 항종양 활성을 포함한 다양한 질병 치료를 위한 전통 약재로 사용되어 왔다. 순비기나무 잎 및 열매에서 추출된 오일은 각각 13 및 8종류의 화합물로 구성되었다. 순비기나무 잎에서 추출된 에센셜 오일의 DPPH 및 ABTS (IC<sub>50</sub>)의 소거 활성은 각각 34.2 및 143.7 µg/mL로 나타났다. 순비기나무의 잎과 열매 오일은 전염증성 사이토카인 중 하나인 IL-1β 발현을 농도 의존적으로 억제시켰다. 순비기나무의 에센셜 오일은 클린다마이신 내성을 가진 여드름균주 *Propionibacterium acnes* (CCARM 9009)에 대한 강력한 항균 효과를 나타내었고, MIC가 62.5 µg/ml이고 MBC가 250 µg/ml 인 것으로 분석되었다.

본 연구에서 이용된 복분자딸기, 겨울딸기 추출물 및 순비기나무에서 추출한 오일은 화장품 및 의약품 성분의 새로운 원료로서의 잠재력을 가지고 있으며, 본 연구의 결과는 기능성 화장품 개발 및 생산을 위한 기초 자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

이러한 신소재의 개발은 제주특별자치도 화장품 산업 진흥 조례 및 제주화장품 인증제도 시행 등에 발맞추어 화장품 소재의 수입 대체, 수출 경쟁력 강화 등을 위한 화장품 소재공급 거점화를 가능하게 할 수 있을 것으로 판단된다.

# Study of the Bioactivity for Functional Cosmetics Using Natural Plant Resource in Jeju Island

Kyongwol Yang

Department of Animal Biotechnology  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## Abstract

The cosmetics industry is an imaging-industry that satisfies the beauty of people's appearance and creates high-added value. The cosmetics industry is more sensitive to changes in the market than other industries, and the development of new materials and the production of new products are frequently performed through continuous research. For modern people, cosmetics are the instruments which is not only satisfying the beauty but also added various functionalities to protect and maintain skin from sudden changes in weather and external environmental threats. There is an increasing demand for functional cosmetics that can show the effects of antioxidant, anti-aging, anti-inflammatory and antibacterial.

In order to develop raw materials for the production of cosmetics, the safety of the skin and compatibility with other cosmetic materials should be considered. Natural and organic resources can be good cosmetic ingredients not only for safety but also for image marketing. Jeju Island is well positioned to build safe cosmetics and clean nature-friendly cosmetics by utilizing these natural and organic plant resources.

Therefore, in this study, the antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities were investigated by using *Rubus coreabus* Miquel and *Rubus buergeri* Miquel extract and oils extracted from *Vitex rotundifolia* that were grown in Jeju Island.

*Rubus coreabus* Miquel and *Rubus buergeri* Miquel contain various bioreactive chemicals and are known to have anti-inflammatory, antibacterial and anticancer effects. In this study, we evaluated the anti-inflammatory effect of *Rubus coreabus* Miquel stem and leaf extracts and the antioxidant and anti-inflammatory activities of *Rubus buergeri* Miquel leaf extract in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Rubus coreabus* Miquel extracts concentration-dependently inhibited the production of nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), cyclooxygenase-2 (COX-2), and inducible NO synthase (iNOS), and no toxicity was observed in the RAW 264.7 cells. In addition, RAW 264.7 cells treated with *Rubus buergeri* Miquel extract inhibited NO and PGE<sub>2</sub> production and iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

*Vitex rotundifolia* fruit has been used as a traditional medicine for the treatment of various diseases, including free radical scavenging, anti-allergic, analgesic and anti-tumor activity. Oil extracted from *Vitex rotundifolia* leaves and fruits consisted of 13 and 8 kinds of compounds, respectively. The scavenging activities of DPPH and ABTS (IC<sub>50</sub>) of essential oils extracted from *Vitex rotundifolia* leaves were 34.2 and 143.7 µg/mL, respectively. Leaf and fruit oils of *Vitex rotundifolia* inhibited IL-1β expression in a concentration dependent manner. Essential oil of *Vitex rotundifolia* showed strong antimicrobial effect against clindamycin-resistant acne-causing strain *Propionibacterium acnes* (CCARM 9009) with MIC of 62.5 µg / ml and MBC of 250 µg / ml.

*Rubus coreabus* Miquel and *Rubus buergeri* Miquel extract and essential oil extracted from *Vitex rotundifolia* used in this study have potential as a new materials for cosmetic and pharmaceutical ingredients. In addition, the results of this study can be used as basic data for the development and production of functional cosmetics.

The development of these new materials can make Jeju Island be a base for supplying natural cosmetics materials to replace imports of cosmetics materials and strengthen export competitiveness.

## I. 서론

화장품 산업은 사람들 외모의 아름다움에 대한 욕구를 충족시켜주는 이미지 산업으로, 고부가가치가 창출되는 산업이다. 화장품은 우리의 일상과 깊은 관계가 있으며, 소비량이 지속적으로 증가하고 있다. 화장품 산업은 시대, 국가의 사회적 관습, 가치관, 유행의 변화에 영향을 받아 다른 업종에 비해 기호성과 유행성이 강하여 시장의 변화에 민감하며 제품의 주기(상품 수명, Life cycle)가 짧아 급속도로 발전하고 있으며, 신상품 개발이 빈번하게 이루어지고 있다 (Kim 과 Na, 2009). 현대인들의 생활수준과 과학의 발달로 평균수명이 향상되고 삶의 질이 높아짐에 따라 국민들의 화장품 소비 형태가 단순한 아름다움의 추구를 위한 것에서 항노화, 항산화 등 다양한 기능성이 추가된 제품의 수요가 늘어나고 있다 (Kim, 2012). 또한 날씨의 급격한 변화, 미세먼지 등 환경의 위협으로 민감해진 피부를 관리가 필요할 뿐 아니라, 웰빙(Well-being) 시대로 접어들면서 기초화장품의 기본기능인 아름다운 피부의 유지 및 회복 뿐 아니라 외부 환경으로부터 유해물질을 차단하고 피부 내부로의 유입을 차단하여 항상성을 유지할 수 있는 기능성 화장품에 대한 구매 수요가 늘어나고 있다. 이에 따라 기능성 화장품 산업은 고부가가치를 창출할 수 있는 첨단 미래형 산업으로 발전하고 있다. (Lee 등, 2013).

기능성 화장품은 피부 구성물질을 증가시키거나, 피부 탄력을 약화시키는 혹은 피부의 노화 등을 촉진시키는 물질을 억제시킴으로써 주름 및 피부탄력 개선, 미백 등 피부개선 효과를 나타낸다 (Cho, 2011). 이러한 주름개선 및 미백 효과를 나타낼 수 있는 기능성 화장품은 주로 1990년대 말에서 2000년대 초부터 많은 연구가 이루어져 왔으며, 이에 대한 여성들의 관심도가 증가하였다 (Lee 와 Park, 2000). 화장품법 제2조 2항에 기능성 화장품에 대하여 피부의 미백, 주름개선에 도움을 주는 제품, 자외선으로부터 피부를 보호, 모발의 영양공급 및 피부나 모발의 기능 약화, 건조함 등을 방지하거나 개선하는 데 도움을 주는 제품이라고 명시되어 있다. 화장품 산업의 최근 트렌드는 이러한 기능성 화장품 시장의

변화 및 기술력의 중요성을 더욱 높이고 있다. 특히 의약품과 화장품의 경계가 모호해지면서 ‘코스메슈티컬 (Cosmeceutical)’이라는 용어가 새롭게 등장하였다. 코스메슈티컬은 화장품 (Cosmetic)과 의약품 (Pharmaceutical)의 합성어로, 이러한 코스메슈티컬 화장품은 ‘High Tech Formulation’을 기반으로 기존 화장품에 의약품에 사용되는 생리활성 및 약리성을 띠는 소재를 첨가하여 제조된다. 소비자들은 의약품에 사용되던 원료가 화장품원료에 도입되어 의약품의 효과를 화장품 통해 피부건강을 유지하여 아름다움과 젊음을 추구하고 있으며 이러한 기능성 화장품의 지속적인 개발 및 생산을 통해 소비자들의 기대심리에 부응하고 있다. 이와 같은 기능성 화장품에 이용될 수 있는 소재를 개발하기 위해서는 피부의 생리적 기능과 피부세포의 역할을 이해하고, 이를 바탕으로 피부표면에서 나타날 수 있는 여러 가지 현상의 종합적인 연구를 통해서 개발되어야 한다. 또한 화장품 산업에 이용되는 소재의 경우 피부에 안전하며, 다른 화장품 원료와의 상용성이 좋은 소재를 이용하여야 한다 (Cheon 등, 2006). 불안정한 기능성 화장품의 소재는 화학 혹은 광화학적 반응을 통해 빠르게 분해된다는 문제점을 가지고 있어 안정성 문제와 함께 제품의 효과를 제대로 발휘할 수 없으므로 전달, 저장 시스템의 개발 및 이를 적용할 수 있는 기술 개발이 필요하다 (Lee 등, 2005). 화장품은 일상생활에서 매일 혹은 장기간에 걸쳐 이용되기 때문에 사용상 안전하고 부작용이 없어야 한다. 따라서 소비자들은 친환경적이며 건강하고 안전한 화장품을 구매하고자 하는 욕구가 있어 천연 및 유기농 소재를 이용한 화장품에 대한 관심이 높아지고 있다. 유기농 화장품은 2009년 석면 파동 이후 급성장을 이루고 있으며, 일부 스킨케어를 위한 제품으로부터 시작하여 전체 제품군으로 확대되고 있고, 특히 영·유아, 임산부용, 트러블, 아토피 등 천연성분을 특화시킨 유기농 화장품이 등장하고 있다. 또한 다양한 유기농화장품 제품군의 등장 뿐 아니라, 이러한 제품들의 트렌드가 일회성이 아닌 지속(순환) 가능하고 친환경적인 측면으로 진화하고 있어 이 이상의 가치를 지니고 있다.

한편, 현대인의 질병 예방에 대한 관심 및 항염증, 항산화 관련 화장품 산업의 발전에 따라 천연 항산화제 및 항염증 성분이 포함된 화장품에 대한 요구가 증가하고 있으며, 특히 천연 식물 자원의 활성에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다 (Masaki 등, 1995). 제주도는 청정 지역의 이미지와 더불어 유기농 화장품 산

업 육성에 알맞은 입지를 점유하고 있다. 제주도는 유네스코 지정 세계 최초 지질환경 분야 3관왕을 이루고, 세계7대 자연경관에 선정된 제주도는 청정 지역으로써 유기농 화장품 원료의 소재를 발굴하기 위한 최적의 조건을 갖추고 있다. 또한 지리학적으로 난류와 한류가 교차하는 길목에 위치해 있어 많은 해양자원이 존재할 뿐 아니라 아열대 기후로 난대성 농작물과 식물들이 풍부하며, 해안 용천수나 화산송이와 같은 제주만의 독특한 소재를 가지고 있다. 따라서 청정한 제주의 향토 자연환경자원 이미지를 활용한 유기농화장품 원료의 개발과 이를 적용한 천연화장품 개발에 대한 조건을 만족시키고 지역전략사업으로 발전시키기에 충분하며 (Ahn 과 Yi, 2017) 제주도 지자체에서도 화장품 산업을 신동력 산업으로 육성하기 위한 전략을 수립하고 있다. 제주의 많은 천연자원 중 자생식물은 약 2,100여 종으로 우리나라 어느 지역보다 종 다양성이 높으며 이미 감귤, 오갈피, 당근, 구아바, 브로콜리, 쑥, 선인장, 양배추, 아스파라거스, 일엽초, 유근피, 알로에, 고구마, 비트, 아욱, 피망, 근대 등 다양한 농작물들이 국제 인증을 받은 유기농산물로 등록되어 있고, ICID (International Cosmetic Ingredient Dictionary, 세계 화장품원료집)에 200개 이상의 종이 등재되어 있어 국내에서는 단일지역으로는 가장 많은 천연 소재가 개발되고 있어 유기농 화장품 생산을 위한 기본적인 조건을 충족하고 있다. 따라서 본 연구에서는 제주도의 천연자원을 활용하여 피부의 면역력을 회복시키고 피부건강을 지키기 위한 기능성 화장품 원료 개발을 위하여 제주 식물자원들 중 겨울딸기 (*Rubus buergeri* Miguel) 및 복분자딸기 (*Rubus coreanus* Miguel) 추출물로부터의 항산화 및 항염활성과 순비기나무 (*Vitex rotundifolia*) 잎과 열매로부터 오일을 추출하여 항균력 등 생리활성 연구를 수행하여 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 검토하고자 하였다.



## Ⅱ. 연 구 사

### 1. 화장품 종류 및 화장품 산업의 변화와 방향

화장품이란 ‘사람의 신체를 청결히 하고, 아름답게 하며, 더욱 매력적으로 변화시켜 주기 위해 사용하는 물품 또는 피부와 모발을 건강하게 유지하기 위해 신체에 바르거나 뿌리거나, 그밖에 이와 유사한 방법으로 사용하는 물품으로 인체에 대한 작용이 적은 것’을 말한다 (김경영 외, 2019). 화장품은 신체 보호 및 보존, 종교적인 의식을 위한 이용에서부터 현대에 들어서는 인간의 본능적 욕망으로 자기 자신을 아름답고 매력 있게 표현하기 위한 이용 및 항노화, 항산화를 통한 피부 건강관리를 위해서 이용된다. 여성의 사회진출로 인한 경제활동 인구의 증가나 남성과 유아 등 소비 계층 확대에 힘입어 화장품 시장은 계속 증가하고 있다. 화장품 산업은 의료, 바이오 등 다양한 산업과 융·복합이 가능한 산업으로, 피부과학, 생화학, 면역학, 콜로이드 과학 등 다양한 분야의 기술력이 결합된 산업이다. 화장품은 사용 부위, 사용 목적 또는 제품의 구성성분, 형상 등에 의해 여러 가지로 분류된다. 피부용 화장품에는 스킨케어(기초), 메이크업 및 바디 케어 화장품이 포함되어 있으며, 샴푸, 염모제 등 모발, 두발, 두피용 화장품과 치약 등 구강용 화장품 및 향수와 같은 방향용 제품군들도 화장품의 종류에 포함되어 있다. <표 II-1>에 대표적으로 많이 이용되는 화장품의 분류에 대해 나타내었다 (光正武夫, 2004).

표 II-1. 화장품의 분류 (光正武夫, 2004)

분류		사용목적	주요제품	
피부용	스킨케어 화장품 (기초 화장품)	세정	세안크림, 폼	
		정돈	화장수, 마사지크림, 팩	
		보호	모이스처크림, 유액	
	메이크업 화장품	베이스	파운데이션	
		포인트	립스틱, 아이섀도우, 아이라이너, 매니큐어	
	바디 케어 화장품	목욕, 샤워	비누, 입욕제	
		자외선 차단	선블럭, 선오일	
		제한, 방취	데오드란트	
		탈색, 제모	탈색, 제모크림	
		방충	방충 로션, 방충 스프레이	
모발, 두발, 두피용	헤어 케어 화장품	두발용	세정	샴푸
			트리트먼트	린스, 헤어 트리트먼트
			정발	헤어 왁스, 헤어 리퀴드, 포마드
		웨이브	퍼머넌트 웨이브 로션	
		염모, 탈색	헤어 컬러, 컬러 린스, 헤어 블리치	
	두피용	육모, 양모	육모제, 헤어토닉	
		트리트먼트	스캘프 트리트먼트	
구강용	구강용 화장품	치마제	치약	
		구강청량제, 구강청결제	가글, 구강 스프레이	
방향용	방향 화장품	방향	향수	

세계 화장품 시장은 2018년 495억 달러에서 매년 8% 이상 성장하여 2024년에 850억 달러에 이를 것으로 예상하고 있으며, 앞으로 노화방지, 자외선 차단과 같은 화장품, 생물학적 활성을 띠는 화장품 소재가 성장 잠재력을 이룰 것으로 보고되고 있다 (Orbis Research, 2019). 앞으로의 화장품 산업의 방향은 크게 세 가지로 언급할 수 있다. 첫째로 기후변화 및 환경오염 등 외부환경으로부터 피부를 보호하고 개선시키기 위해 환경오염과 관련된 ‘공해’, ‘미세먼지’ 등의 단어가 화장품 산업이 나아가야 할 방향을 제시하고 있다 (박장서와 김지현, 2019). 피부는 신체 중 가장 큰 조직이며, 병원체 및 자외선 조사를 포함한 자연 스트레스 요인 뿐만 아니라 화학 유기 독성 물질 및 오염 물질과 같은 인위적 스트레스 요인으로부터 신체를 보호하기 위한 물리적 장벽으로 중요한 역할을 한다 (Lephart, 2018). 그러나 이러한 환경오염으로 인해 자외선 뿐 아니라 오존, 일산화탄소 (CO), 질소산화물 (NOx), 황산화물 (SOx), 중금속, 미세먼지 (PM10, PM2.5), 담배연기, 환경스트레스 유도물질인 다환 방향족 탄화수소 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAHs) 등은 피부와 DNA를 손상시킴으로써 피부나 모발의 노화를 촉진시킨다. 공해와 같은 환경오염은 피부를 건조시키고, 산소결핍에 의해 피부 생기와 탄력이 감소하며, 표피층의 재생속도가 저하 (less skin turnover)되고, 피부조직 내 항산화물질 활성 감소, 피지분비 및 민감성이 증가한다. 특히 최근 우리나라에서 큰 이슈가 되고 있는 미세먼지(입자상 물질)는 유해한 부유 물질을 포함하고 있어, 피부의 항상성, 면역 메카니즘의 저해로 피부 질환을 일으키는 등 피부 건강을 악화시킨다. 미세먼지는 활성산소종 (Reactive Oxygen Species, ROS)의 생성 및 염증성 물질의 분비를 통해 피부의 산화 스트레스를 유도하고, 콜라겐의 분해, 탈모, 피부암 발생 등을 유발한다 (Kim 등, 2016). 이러한 이유로 안티폴루션 (anti-pollution) 효능이 있는 화장품은 새로운 피부 건강을 위해 개발되고 있으며 (Seo 등, 2018), 유해한 환경과 심리적 불안감으로부터 피부와 건강을 지키기 위해 외부의 유해물질을 씻어낼 수 있는 세정용 기초 화장품(폼), 민감해진 피부에 영양과 수분 공급에 도움이 되는 에센스 등이 출시되고 있다.

둘째, 현대인들은 아름다움을 추구하는 경향이 지속될 뿐 아니라 고령화 사회로 접어들기 시작하면서 정신적, 육체적 건강과 아름다움을 추구하는 과정에서 건강한 피부를 유지하여 사회적 자신감과 개성을 얻기 위하여 노력하고 있다 (Choi 등, 2012). 피부 노화는 노인들 뿐 아니라 젊은층에서도 진행되는데, 피부 노화의 원인은 외재적 요인과 내재적 요인이 있다. 외재적 요인은 오염이 많은 도시와 자외선에 많이 노출되는 시골 등을 생각해 볼 수 있는데, 햇빛에 의한 피부 손상과 흡연이 피부, 특히 입가 주름에 대한 주요 원인이 된다 (Farage 등, 2008). 내재적 원인은 가족력을 포함한 유전인자를 포함한다. 노화에 대한 유력한 메커니즘은 자유라디칼(free radical) 생성에 따른 신체의 산화 또는 ‘산화적 스트레스’이다 (강태진, 2011). 자유라디칼은 전자를 잃게 되었을 때 거의 모든 분자로부터 만들어지며, 이것은 세포에서 자유에너지 (free energy)가 안정적인 산소와 결합할 때 세포 호흡 과정 중에 미토콘드리아에서 생성된다. 이를 방지하기 위한 항산화제(anti-oxidant)는 자유라디칼과 병합하거나 중화하여 손상을 완화하는 역할을 한다. 피부 노화가 진행되면 콜라겐 생성이 느려지고 피부 세포의 회전율이 감소하는데, 자외선, 방사선 노출 및 외부 독소의 유입등으로 인해 노화가 촉진된다 (Shah 등, 2017). 또한 노화가 진행될수록 피부의 구조를 지지하는 섬유조직인 콜라겐과 탄력섬유가 경화되고 불용성이 되고, 콜라겐 분자와 피부에 탄력섬유가 가교화 과정에 놓이며, 세포 사이의 섬유질과 그 사이를 채우는 수분이 많이 함유된 기질(ground substance)이 감소하여 피부가 탄력을 잃는다 (Kim 등, 2010). 또한 노화 된 피부는 건성 및 가려움증을 유발하여 2차적으로 피부 감염을 일으켜 면역 장애, 혈관 관련 합병증, 피부 종양이 발생할 가능성이 높다 (Wolff 등, 2005; Schwartz 등, 2006). 이러한 변화에 맞추어 피부노화에 따른 항상성 등 기능저하 방지, 피부 재생 및 고령화 징후 등을 제거할 수 있는 세정과 미용 목적 외의 특수한 기능이 부여된 기능성 화장품을 개발하기 위한 시도가 이루어지고 있다. 이러한 기능성 화장품 시장은 건강한 노년을 위한 항노화 제품 및 서비스 시장이 형성되고 있으며, 건강과 외모에 대하여 관심이 많은 젊은 층의 수요도 함께 증가하고 있다 (이봉진, 2017).

셋째, 소비자의 친환경 추구하고 건강한 화장품 성분에 대한 인식 향상, 안전에 대한 관심과 함께 자연주의를 추구하는 경향이 늘어나면서, 환경에 피해를 주지 않으면서 민감한 피부에도 적용 가능한 자연주의를 표방하는 화장품이 인기를 끌고 있다. 자연주의 화장품은 대표적으로 천연화장품과 유기농화장품을 들 수 있다. 천연화장품은 식물성성분으로 만들며 화학방부제와 인공향 등 최소한 화학 성분 첨가제만 넣은 화장품으로 1%의 천연성분이 함유되어 있더라도 천연화장품이란 용어를 사용할 수 있다 (정삼철 외, 2014). 반면 유기농 화장품은 95% 이상이 식물성 천연 성분만을 사용하고 유기농 원료를 주성분으로 만든 화장품으로 화학방부제와 인공향 등 어떠한 유해한 화학성분도 사용하지 않는 제품이다 (Lim 등, 2016). 우리나라에서는 2010년부터 식품의약품안전처에서 ‘유기농 화장품 표시·광고 가이드라인’을 마련하여 시행해오고 있다. 이에 따라 유기농 화장품은 전체 구성성분의 10% 이상이 유기농 원료로 구성되거나, 물 및 소금을 제외하고 내용물의 전체 구성 성분 중 70% 이상이 유기농 원료로 구성되어야 한다 (Lee 등, 2013). 세계의 유기농 화장품 인정 제도는 미국의 USDA, QCS, 프랑스의 Eco-cert, 독일의 BDIH, 영국, 벨기에, 이탈리아 중심의 COSMOS 등이 있다. 우리나라에서도 2018년 한국화학융합시험연구원에서 유럽의 COSMOS 인증 기관으로 지정을 받아 국내 기업의 천연, 유기농 화장품의 시험평가와 인증획득을 지원하고 있다. <표 II-2>에는 세계의 유기농 화장품 인증 제도를 나타내었다.

표 II-2. 세계의 유기농 화장품 인증제도 (박외숙, 2014)

국가	인증기관	마크	내용	인증범위
프랑스	Eco-cert		- 농산물 및 그 가공품에 대해 유기농 제품 여부 심사	화장품 및 원료
미국	USDA		- 미국 농무부 유기농 인증마크로, 95% 이상의 원료가 유기농이어야 함	화장품 및 원료
	QCS		- Florida Certified Organic Growers & Consumers에서 제공하는 유기농 인증마크 - USDA에서 관리함	원료 인증
독일	BDIH		- 독일의 자연주의 화장품 및 의약품, 식품, 식품첨가물, 개인위생제품 등의 무역업체와 기업들이 만든 연합단체	화장품, 식품, 식품첨가물, 천연 식품
스위스	Bio Swiss		- 100% 오가닉, 90% 이상이 스위스에서 생산된 재료를 사용하는 제품에 부여	식품, 화장품 원료
뉴질랜드	Bio Gro		- 뉴질랜드의 비영리단체 New Zealand Biological Producers and Consumers Council Inc (NZBPCC)에 의해 주어지는 유기농 인증	화장품
호주	BFA		- Biological Farmers Australia 인증	화장품

## 2. 피부와 면역 (염증)

피부는 다양한 세포들이 신체의 건강과 생존을 위하여 복합적인 역할을 하는 역동적 기관으로, 조직학적으로 피부는 표피(epidermis), 진피(dermis) 및 피하조직(subcutaneous tissue 혹은 hypodermis)의 3가지 구조로 이루어져 있다. 그림 II-1과 표 II-3에 피부의 구조를 나타내었다. 피부는 신체를 덮어 외부로부터 여러 자극, 유해요소 등으로부터 생체를 보호하고, 체온유치, 비타민 합성 등의 역할을 하고 있으며, 그 면적은 1.2 - 2.2 m<sup>2</sup>이다. 피부는 1차 방어 조직이자 가장 큰 면역기관이다 (조은경, 2015). 피부의 기능은 면역과 외부의 물리, 화학적 자극으로부터 보호할 뿐 아니라 보습, 자외선으로부터 피부 보호, 항산화, 체온 조절, 외부 감각 수용, 지용성 물질의 흡수, 기타 감정 전달 등의 기능을 한다 (표 II-4). 피부표면의 피지막은 기름에 수분이 섞여있는 유중수(W/O)형 타입의 유화상태로 pH 4.5 - 6.5의 약산성을 띄고 있으며 피부를 윤기있게 보호하는 역할을 한다. 땀을 많이 흘릴 경우 이 피지막은 수중유(O/W) 형태로 바뀌게 되어 피지막은 유중수와 수중유 형태를 오가게 된다. 그 결과 피부의 수분증발을 막고 유분공급이 원활하게 이루어져 윤기 있는 피부가 유지되고 외부의 자극, 유해물질 및 세균으로부터 인체를 보호할 수 있다. 각종 기초화장품은 이러한 피지막의 효과를 응용하여 보습과 유분공급을 원활하게하기 위하여 개발되었다 (김경영 외, 2019).

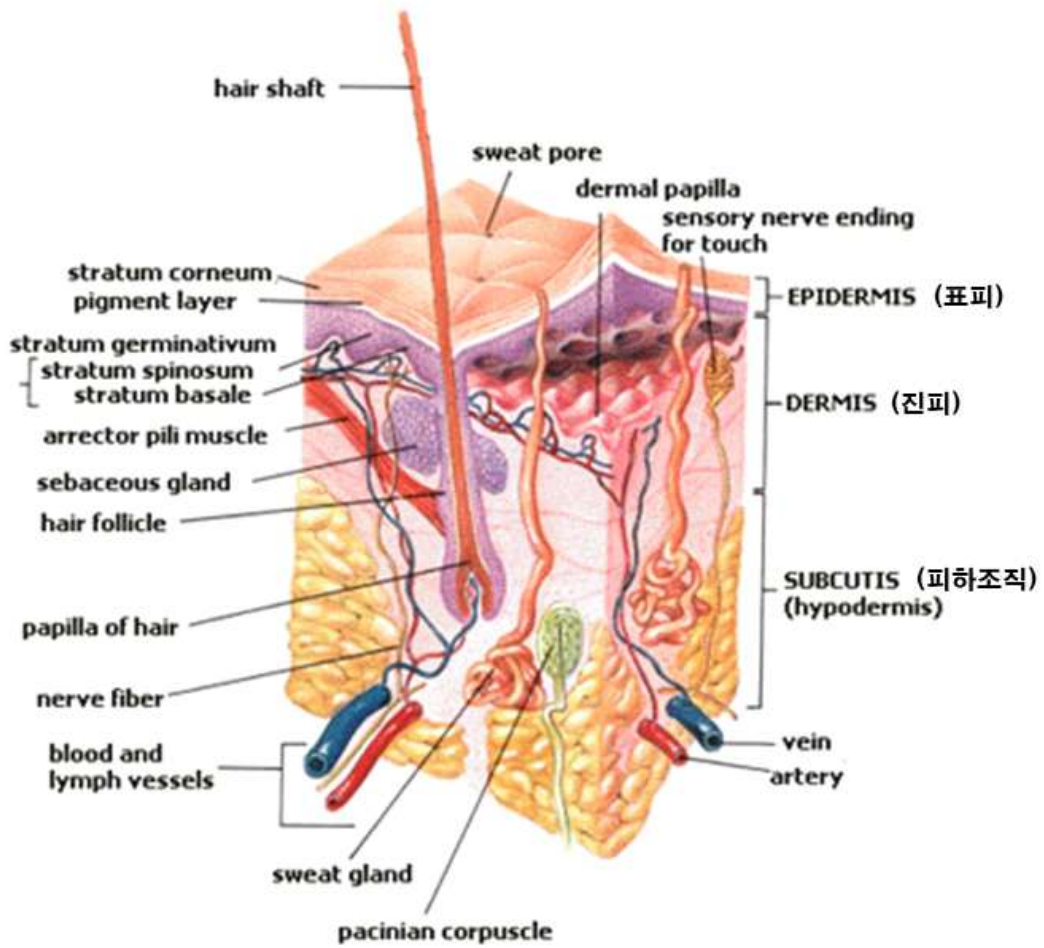


그림 II-1. 피부의 구조 (adopted from wikipedia, <https://ko.wikipedia.org/wiki/%ED%94%BC%EB%B6%80>).



표 II-3. 피부의 구조와 기능 (김경영 외, 2019).

피부조직	구성	기능
표피	각질층	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 외부의 화학자극이나 물리적 충격으로부터 인체 보호 (피부장벽)</li> <li>- 수분증발 억제</li> <li>- 천연보습인자 (Natural Moisturizing Factor, NMF) 생성</li> </ul>
	투명층	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 수분 침투 방지</li> <li>- 자외선 반사 (멜라닌 색소가 올라오지 않음)</li> </ul>
	과립층	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 외부의 수분 침투와 내부의 수분 배출을 방지</li> <li>- 빛을 산란시켜 자외선 흡수 및 외부물질에 대한 방어</li> </ul>
	유극층	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 인체면역에 관여하고 림프순환을 통한 물질교환</li> <li>- 랑게르한스세포 : 외부 이물질인 항원을 면역담당세포인 T-림프구에 전달</li> </ul>
	기저층	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 각질형성세포 : 세포분열을 통해 새로운 세포를 만들어 내고 각화과정 (keratinization)을 통해 각질을 형성하여 피부를 물리적 충격에서 보호</li> <li>- 멜라닌형성세포 : 유기색소인 멜라닌을 만들고 자외선 흡수를 통해 인체 보호</li> <li>- 머켈세포 : 촉각수용체로서 피부의 촉각을 감지</li> </ul>
진피	유두층	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유두돌기의 모세혈관을 통한 표피층 및 진피층에 각종 영양분 공급</li> <li>- 표피 각화를 원활하게 하고 피부에 긴장감과 탄력을 줌</li> </ul>
	망상층	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 피부의 탄력성과 팽창성</li> <li>- 노화가 되면 망상층의 콜라겐, 엘라스틴 및 무코 다당류 등이 감소하여 주름 형성</li> </ul>
피하조직		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 진피와 근육, 뼈 사이에 위치하고 지방을 다량 함유</li> <li>- 피하지방은 잉여 에너지나 영양을 저장하는 에너지원</li> <li>- 외부 압력으로부터 신체 보호</li> <li>- 열 전도를 방지하여 체온 유지</li> </ul>

표 II-4. 피부의 생리작용 (光正武夫, 2004)

역할	생리작용
물리화학적 방어	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 피부 최외층인 각질층에서 기계적 자극과 화학물질에 저항</li> <li>- 교원섬유와 피하지방조직이 외부에서 받는 힘을 완충</li> <li>- 각질층은 pH 5 정도로 약산성으로 유지되어 미생물 번식 제어</li> </ul>
보습	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 각질층 내 존재하는 수용성 성분인 아미노산과 피롤리돈 카복시산 등 아미노산 대사물이 함유된 천연보습인자가 피부의 수분 보유에 중요한 역할을 함</li> <li>- 각화 과정에서 생성된 세포 간 지질은 수분의 증발, 천연보습인자의 아미노산 방출을 제어함</li> </ul>
자외선 방어	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 멜라노사이트로부터 생성된 멜라닌과 천연보습인자 성분 중 하나인 우로카닌산이 자외선 방어에 기여</li> </ul>
항산화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 자유라디칼의 분해를 위한 효소성, 비효소성 항산화 분자의 존재로 종합적인 항산화 시스템 구축</li> </ul>
면역	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 랑게르한스세포를 통해 항원성을 인식하여 T-림프구 증식</li> <li>- 각질형성세포에 의해 각종 염증반응의 발현에 관여하는 사이토카인 생산</li> <li>- 염증성 사이토카인 방출을 통해 혈관확장, 세포침윤, 유종 등 염증반응 유발</li> </ul>
체온조절	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 피부모세혈관의 확장 및 수축에 의한 피부 혈류량 변화와 발한에 의한 기화열에 의해 체온 조절</li> <li>- 각질층과 피하조직 자체에 의한 열 발산 제어</li> </ul>
감각	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 외부변화를 수용하고 피부감각을 나타냄</li> <li>- 압각, 촉각, 온도감각, 통각</li> </ul>
흡수	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 지용성 물질의 여피 흡수</li> <li>- 스테로이드 (남·여성호르몬, 부신피질호르몬), 비타민 (A, D, E, K)</li> </ul>
기타	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 감정 전달 (홍조, 창백)</li> <li>- 비타민 D 합성 (표피 내에 존재하는 비타민 D의 전구체에 자외선 조사)</li> </ul>

피부 면역계를 구성하는 세포는 혈액과 면역체계의 모체세포인 조혈모세포로부터 유래된 각종 수지상세포와 림프구, 호산구, 호중구, 비만세포, 각질형성세포, 섬유아세포, 혈관내피세포 및 신경세포가 있다. 이 피부면역세포들은 사이토카인, 케모카인 및 뉴로펩타이드를 이용하여 다양한 세포 사이에 체계적이고 능동적인 상호 작용을 통해 면역 반응을 일으킨다. 피부면역시스템 담당세포 또는 면역 시스템 간 전달 기작이 유전적 또는 환경적 요인에 의해 면역기능이 과활성화 혹은 상실될 수 있다. 이 경우 건선, 아토피성 피부염, 자극성 접촉성 피부염 및 알레르기성 접촉성 피부염과 같은 급성, 만성 및 염증성 피부 질환이 발생하여 각종 가려움증, 통증, 백반증, 홍반, 각질, 피부발진이 일어나거나 피부가 두꺼워 진다 (김혜원, 2019). 피부는 림프구와 항원제시세포 (antigen presenting cells, APCs)로 구성된 특수한 피부면역계를 이룬다. 피부면역계는 비특이성 자연면역 (innate immunity)와 특이성 획득면역 (acquired/adapted immunity)로 나눌 수 있다. 자연면역계는 피부의 물리화학적 특성 (방수, 외부와의 격리), 비병원성 미생물 분포에 따른 유해균 억제, 표면 pH, 항균펩타이드, 자유지방산 분비, 라디칼 포획, 멜라닌에 의한 방어인 constitutive innate immunity와 사이토카인, 히스타민 및 매크로파지 (macrophage) 등 1차 면역세포의 활성화 및 유입에 의한 방어인 acquired innate immunity로 나뉜다. 획득면역은 염증반응 지속 시 감마인터페론 (gamma interferon, IFN- $\gamma$ )이 분비되면서 형성된 면역인자들에 의해 피부 특이적 T cell이 유입되어 항원을 잡아먹는 대식세포의 역할을 하거나, CLA<sup>+</sup> (cutaneous lymphocyte-associated antigen) memory T cell (피부 림프구 항원 기억 T세포)과 같은 특정 타입으로 분화하여 면역반응을 매개한다 (조은경, 2015). 표피 내의 세포인 각질형성세포는 자연면역 반응과 피부 염증반응에 참여하는 사이토카인을 분비하고, 랑게르한스 세포는 피부를 통해 들어오는 항원을 포획하는 연속된 망을 형성하여 T세포에 항원을 제공하여, T세포를 활성화시켜 접촉성 피부염을 일으키는 T세포로 분화한다. T세포를 표적으로 하는 항체치료가 발전되면서 감마인터페론을 비롯한 T세포 반응과 관련된 여러 사이토카인을 표적으로 하는 치료가 개발되고 있다 (Lew, 2002).

면역반응 중 염증 반응은 본래 손상된 조직과 병원균의 침입으로부터 신체를 방어하기 위해 가장 먼저 일어나는 원시적인 보호 반응으로 알려져 있다. 하지만 지속적인 염증 반응은 세포나 조직의 기능장애 및 괴사를 일으키고 당뇨, 종양, 류머티즘 관절염 등의 염증 질환으로 발전할 수 있다 (Medzhitov, 2008; Jeong 등, 2012). 염증반응은 침입으로 인한 조직의 손상에 대해 구조나 기능을 회복시킬 수 있는 유익한 체내방어기전이다. 그러나 반복되는 염증은 조직 손상의 원인이 되었고 이에 따라 염증을 일으키는 물질을 찾아 제거하고자 하는 시도가 있었다 (Lee 등, 2009). 염증반응에 관여하는 주요 세포로 잘 알려진 macrophage (대식세포)는 여러 자극뿐만 아니라 면역세포들이 분비하는 cytokine 등에 의해 활성화되어, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) 및 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 와 같은 전염증성 cytokine들의 생산과 NO 및 PGE<sub>2</sub>와 같은 염증인자들의 생성을 촉진한다 (Shao 등, 2013). 염증 과정은 다량의 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 등 염증 인자가 Nitric Oxide Synthase (NOS) 및 cyclooxygenase (COX)에 의해 형성된다. NO는 혈압조절 및 응고, 면역기능 등의 역할을 하며 NOS에 의해 형성된다 (Garthwaite, 2010).

### 3. (고)기능성 화장품, cosmeceutical 및 anti-pollution

최근 세계적으로 약리적 활성 성분을 가지는 유기농 화장품이 다양하게 개발되고 있다. 천연물로부터 새로운 방법에 의해 추출된 원료가 포함되고, 천연 또는 합성의 고분자 화합물의 종류와 약리적 기능을 나타내는 성분이 많아 현대 화장품산업에서의 화장품과 의약품 사이의 구분이 좁아지고 있다 (Kim 과 Lee, 2018). 환경변화 등 유해요소가 늘어남에 따라 민감성 피부를 가진 사람이 증가하면서 안전한 성분과 자극이 적고 피부건강에 효과적인 기능성이 화장품의 인기가 높아졌다. 우리나라에서 기능성 화장품은 화장품법 제2조2항에 의해 다섯 가지 항목으로 명시되어 있다 (표 II-5). 기능성 화장품은 ‘피부의 미백에 도움을 주는 제품, 피부의 주름개선에 도움을 주는 제품, 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는 데에 도움을 주는 제품, 모발의 색상 변화·제거 또는 영양공급에 도움을 주는 제품, 피부나 모발의 기능 약화로 인한 건조함, 갈라짐, 빠짐, 각질화 등을 방지하거나 개선하는 데에 도움을 주는 제품’ 중 어느 하나에 해당되는 것으로 총리령으로 정하는 화장품을 말한다 (식약처, 2019). 기능성화장품을 개발하기 위하여 요구되는 지식 및 연구는 다음과 같다 (경기열, 2010). 첫째, 기능성 화장품에 적용할 신소재의 개발 및 기능 부여를 위해 피부의 생리적 메커니즘을 연구하여 새로운 작용원리 및 기전을 밝혀야 한다. 둘째 이미 효능이 알려진 소재 도입, 천연물로부터 성분 추출 및 정제를 통한 효율 검증, 신소재의 개발 및 유도체 합성을 혹은 이 세가지를 접목하여 기존 화장품이 가지고 있는 효능을 개선시킬 수 있는 새로운 소재를 개발할 필요가 있다. 셋째, 피부 내부로 유효성분의 효율적인 전달, 불안정한 성분의 안정화, 화장품 신소재 성분의 흡수 촉진 및 유효성분의 용해도 및 분산효율을 향상시키는 기술을 개발할 필요가 있다. 넷째로는 개발된 화장품의 성분과 신소재의 효능을 객관적으로 측정할 수 있어야 한다.

표 II-5. 기능성 화장품 개념 (식약처, 2019)

연번	종류	범위
1	피부의 미백에 도움을 주는 제품	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 피부에 멜라닌색소가 침착하는 것을 방지해 기미·주근깨 등의 생성을 억제함으로써 피부의 미백에 도움을 주는 기능을 가진 화장품</li> <li>- 피부에 침착된 멜라닌색소의 색을 얇게 하여 피부의 미백에 도움을 주는 기능을 가진 화장품</li> </ul>
2	피부의 주름개선에 도움을 주는 제품	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 피부에 탄력을 주어 피부의 주름을 완화 또는 개선하는 기능을 가진 화장품</li> </ul>
3	피부를 곱게 태워 주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는 데에 도움을 주는 제품	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 강한 햇빛을 방지해 피부를 곱게 태워주는 기능을 가진 화장품</li> <li>- 자외선을 차단 또는 산란시켜 자외선으로부터 피부를 보호하는 기능을 가진 화장품</li> </ul>
4	모발의 색상 변화·제거 또는 영양 공급에 도움을 주는 제품	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 모발의 색상을 변화[탈염(脫染)·탈색(脫色)]을 포함]시키는 기능을 가진 화장품(다만, 일시적으로 모발의 색상을 변화시키는 제품은 제외)</li> <li>- 체모를 제거하는 기능을 가진 화장품(다만, 물리적으로 체모를 제거하는 제품은 제외)</li> </ul>
5	피부나 모발의 기능 약화로 인한 건조함, 갈라짐, 빠짐, 각질화 등을 방지하거나 개선하는데 도움을 주는 제품	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 탈모 증상의 완화에 도움을 주는 화장품(다만, 코팅 등 물리적으로 모발을 곱게 보이게 하는 제품은 제외)</li> <li>- 여드름성 피부를 완화하는 데 도움을 주는 화장품(다만, 인체세정용 제품류로 한정)</li> <li>- 튼살로 인한 붉은 선을 얇게 하는 데 도움을 주는 화장품</li> </ul>

이처럼 소비자들의 건강한 피부에 대한 관심 및 의학지식이 발전하면서 화장품에 대한 인식이 과거와는 많이 달라졌다. 국민생활수준의 향상으로 삶의 질은 높아졌으나, 노화와 주름으로부터 해방, 밝은 피부를 원하는 등 사람들은 다양한 피부 문제로 인한 스트레스를 받게 되었다. 이러한 소비자들의 아름다움을 추구하려는 욕구와 맞물려 기능성 화장품 중에서도 피부학과 의학적 이론 배경을 바탕으로 만들어진 화장품인 코스메슈티컬(Cosmeceutical)이 1980년대 중반부터 주목을 받기 시작했다. 코스메슈티컬은 화장품을 뜻하는 Cosmetic 과 의약품을 뜻하는 Pharmaceutical가 합성된 신조어로, 화장품에 의약품의 이미지와 효능을 담아 피부의 재생과 회복에 중점을 두고, 피부의 구조나 기능에 영향을 미쳐 치료 및 예방 작용을 하는 화장품을 뜻한다 (이아름, 2017; 임수진 외, 2017). 이 용어를 처음 사용한 미국의 Kligman 박사는 “코스메슈티컬은 화장품으로 판매되는 약학적 성능을 가지는 국소 제제”라고 정의하였다 (Pandey 와 Sonthalia, 2019). 코스메슈티컬은 단순히 기능이나 미용 효과를 강조하는 기존 화장품과는 다르다. 피부의 구조와 기능에 작용할 수 있고, 피부건강에 도움이 되는 활성물질을 함유하여 전통적인 화장품의 정의에는 해당하지 않지만 의약품으로 간주될 수 없다 (Rodrigo 등, 2010). 종래의 화장품은 치료나 예방을 목적으로 사용되지 않는 의약품 또는 의약외품과 구분된다 (표 II-6). 코스메슈티컬 제품은 화장품과 의약품의 정의를 충족하는데, 예를 들어 비듬 방지 샴푸의 경우, 샴푸 자체는 모발과 두피의 세정과 정돈을 위해서 이용되는 화장품이지만, 비듬 방지 혹은 치료라는 명목으로 이용되기 때문에 약물로써 간주될 수 있다 (Joshi 와 Pawar, 2015). 불소 함유 치약과 땀 배출 억제, 탈취 기능을 포함한 자외선 차단제도 이러한 화장품과 약물의 조합인 코스메슈티컬이라고 할 수 있다 (Ligade 와 Udupa, 2010). 그러나, 코스메슈티컬 제품은 피부 치료에 도움을 줄 수 있지만, 생물학적으로 치료를 목적으로 하는 효과를 반드시 가질 필요는 없다고 언급하고 있다 (Kligman, 2005; Kadunc 등, 2013).

의학과 과학의 발달에 따라 생명공학, 인체공학 뿐 아니라 첨단 나노공학 등이 접목된 융합기술기반 복합소재가 개발되어 피부건강에 효과적인 성분과 피부에 효율적으로 전달하는 기술 개발이 이러한 코스메슈티컬 화장품 시장을 선도하고 있다 (조진우 외, 2019). 코스메슈티컬은 의학과 심미적 영역을 교차하면서 피부 문제로 인한 스트레스로부터 삶의 질을 향상시키는 데 도움을 줄 수 있다 (Guerrero, 2011).

표 II-6. 화장품, 의약외품, 의약품의 차이 (박외숙, 2014)

구분	화장품	의약외품	의약품
사용 대상	일반, 정상인	일반, 정상인	환자
사용 목적	청결, 미화, 건강유지	위생, 청결	질병진단, 예방, 치료
사용 기간	장기간, 지속적	장기간, 지속적	일정 기간
사용 범위	전신	특정 부위	특정 부위
부작용	없어야 함	없어야 함	어느정도는 무방
처방	임의 사용 가능	임의 사용 가능	의사 처방 필요

코스메슈티컬 제품은 브랜드샵, 약국, 마트 등 용이하게 구매가 가능하다는 점에서 소비자들 사이에 급속도로 성장하는 블루오션시장이라고 할 수 있다. 또한 이러한 제품들은 과학기술의 발전으로 다양한 소비자의 피부 타입에 따라 적절한 형태로 개발될 수 있다 (Dreno 등, 2014). 반면에, 허위 및 과장제품을 확인하기 어렵고 관련 규제 of 사각지대에 놓여 있어 코스메슈티컬 시장의 개척과 지속적인 성장을 위한 화장품 원료 표준화 및 그에 따른 적절한 규제가 필요하다 (Saha, 2012).



#### 4. 제주 천연 화장품 소재

제주지역은 다양한 생물종의 보고이자 친환경 이미지를 간직하고 있어 다양한 지역 특산 소재들이 화장품 원료로 이용되고 있으며, 국내에서 가장 많은 천연 화장품 소재가 개발되고 있다. 다양한 제주 천연 소재를 이용한 유기농 화장품 등은 깨끗한 제주 자체의 브랜드, 청정지역에서 생산된 원료라는 점을 강조하여 화장품 등 뷰티 산업에 있어서 중심지로 거듭날 수 있는 입지조건을 가지고 있다.

##### 1) 화산송이

화산이 폭발할 때 용암이 굳어서 만들어진 붉은 빛깔의 돌을 화산송이라고 하며, 제주어로 ‘가벼운 돌’을 뜻한다. 제주의 독특한 천연 지하자원이며, 제주도 특별법으로 유통이 엄격하게 관리되고 있다. 화산송이는 돌에 미세한 많은 구멍이 뚫려있는 천연 세라믹으로, 이 미세한 구멍들이 피부의 먼지와 노폐물을 흡착하여 모공을 줄여주는 역할을 한다. 또한 천연 미네랄이 함유되어 있고 천연상태에서 원적외선 방사율 92%, 탈취율 97% 및 세균 살균력 99.9%를 보이는 뛰어난 기능성 천연소재이다. 모공, 트러블, 디톡스, 각질 및 피지조절 등의 효과를 보여 화산송이 기초화장품, 마스크팩, 핸드크림 샴푸 등의 제품이 출시되고 있다 (그림 II-2).

##### 2) 감귤 셀룰로오스

감귤을 원료로 하여 *Gluconacetobacter* sp.가 생산하는 셀룰로오스는 매우 미세한 망상구조로 구성되어 있으며, 목질계 및 합성섬유와 비교하여 100배 이상의 얇은 직경과 높은 표면적을 갖고 있어 높은 수분 보유력과 생체적 합성을 나타

내어 의료용 소재 및 화장품 제형에 활용성이 뛰어나다. 감귤 셀룰로오스 겔은 밀도가 낮아 제형에 유리하여 마스크팩, 로션, 크림 등 화장품 소재로 활용하기 쉬우며, 단백질 성분이 다른 셀룰로오스 겔 보다 적어 순수한 상태의 셀룰로오스 겔을 얻을 수 있다. 감귤 셀룰로오스 마스크팩은 단시간 내에 수분 및 영양분 공급이 가능하고 탄력과 피부톤 개선에 효과가 있으며, 피부의 유수분기 밸런스를 잡아주는 역할을 한다.

### 3) 애기감귤

애기감귤은 과피 색이 녹색인 미숙과 상태의 감귤로 과피에는 플라보노이드, 과육에는 구연산이 많이 함유되어 있으며, 비타민 A, C, E가 다량 함유되어 있다. 애기감귤은 완숙과보다 약 4배 이상의 식이섬유와 플라보노이드가 함유되어 있어 항산화작용, 순환기계질환 예방, 항염, 항균, 면역증강, 모세혈관 강화, 멜라닌 합성 억제를 통한 자외선 차단, 미백 등에 효능이 있다. 또한 혈중 콜레스테롤 저하 및 중금속 해독 효능을 가진다 (그림 II-3).

### 4) 마유 (馬油)

말의 지방조직에서 추출한 지방성분으로, 예로부터 제주도 뿐 아니라 아시아 지역에서 화상이나 아토피 피부염 치료제로 사용되어 왔다. 주요 성분으로 팔미톨레산 (palmitoleic acid), 올레인산 (oleic acid), 세라마이드 등이 있으며 보습, 피부보호, 피부장벽 강화, 피부세포재생촉진, 자외선차단, 항균 등의 효능이 있다. 또한 마유는 알레르기 접촉성 피부염 개선 효과가 있으며 피부 조직세포와 알레르기성 천식, 축농증, 만성 두드러기, 아토피 피부염에 중요한 기능을 하는 혈청 면역글로불린 E (IgE)을 조절하여 피부상태를 개선시키는 효능이 있음을 밝혔다 (Lee 등, 2013). 마유의 성분은 사람의 피지와 흡사하여 피부에 흡수가 잘 되고 거부감이 없는 천연원료로 각광받고 있다. 발효된 마유를 이용하여 생산된 영양 크림, 썬젤, 핸드크림 등이 있다.



그림 II-2. 제주 화산송이 및 화산송이 함유 클렌징 폼.



그림 II-3. 제주애기감귤 및 애기감귤 함유 비누.

## 5) 백년초

부채선인장에 속하는 손바닥선인장에서 6월에 열매가 열리고 자라 12월에 수확을 시작한다. 100가지 질병을 고칠 수 있고, 이 열매를 먹으면 백년을 산다고 하여 백년초라는 이름을 가지게 되었다. 이 손바닥선인장은 한방울의 물도 없이 3년을 버틸수 있다고 하고, 예로부터 해독, 해열진정, 기관지천식, 소화불량, 위경련, 변비, 가슴통증, 혈액순환, 위장병, 비염 등에 민간약재로 사용되어 왔다. 또한 페놀성 물질과 플라보노이드 성분이 다른식품보다 많아 고혈압, 암, 노화 억제에 효과가 있다. 식이섬유, 비타민C, 칼슘, 칼륨 등이 풍부하고 벌레물린 곳, 화상치료 등에 사용되어 왔다. 화장품으로 이용할 경우 진정, 수분공급, 콜라겐 형성, 피부톤 개선의 효과가 있으며 백년초 스킨, 로션, 수분크림, 비누, 팩 등이 상품화되었다 (그림 II-4).



그림 II-4. 제주백년초 및 백년초 마스크팩.

## 6) 동백

아열대기후에서 볼 수 있으며, 한반도에서는 제주도와 남해안 (경남, 전남, 부산)에서 주로 서식한다. 꽃은 leucoanthocyanin, anthocyanin 등이 함유되어 있다. 과실에는 지방유, camellin, thachysaponin이 들어 있고 thachysaponin을 가수 분해한 후, camelliagenin A, B, C를 얻으며 잎에는 I-epicatechol, d-catechol이 들어 있다. 예로부터 동백열매의 오일은 등불을 밝히거나 머릿기름으로 사용하기도 하였고, 천식과 아토피에 효과를 보였다. 동백꽃이 피부의 항산화에 도움이 된다는 사실이 밝혀지면서 피부노화 예방과 피부건강을 위한 다양한 화장품들이 출시되고 있다. 또한 동백꽃은 강심작용, 항암작용, 장출혈, 자궁출혈, 토혈, 해수, 코피, 대변 출혈, 아메바성이질, 타박상, 화상, 부스럼, 머릿기름, 식용유, 등유, 유두(乳頭)가 짓물러서 갈라지고 통증이 심한 증상에 효능이 있다. 동백오일의 올레인산은 피부 진정, 보습에 효과가 있으며, 자외선 차단에도 효과가 있으며 또한 콜라겐 형성에도 도움을 준다. 동백 스킨, 로션, 수분크림, 헤어오일, 샴푸 등이 출시되었다 (그림2-5).

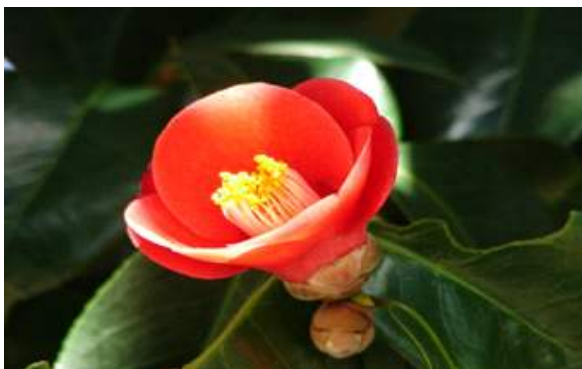


그림 Ⅱ-5. 제주동백 및 동백 마사지 솔트.

## 7) 왕벚꽃

제주왕벚꽃은 피부병, 항암 효능으로 알려진 전통적인 민간약재의 원료로 사용되어 왔으며, 비타민 A, B, C, E 및 사쿠라닌 (sakuranin) 등 각종 유효성분이 함유되어 있다. 왕벚꽃은 화피의 라디칼 소거능과 우수한 피부 진정 효능이 확인되었으며, 플라보노이드를 유효성분으로 하여 항염증, 피부진정, 항산화, 항노화 제품에 적용할 수 있는 천연 소재로 활용되고 있다 (Hong 등, 2019; Park 등, 2008) (그림 II-6).



그림 II-6. 제주왕벚꽃 및 왕벚꽃 토너.

## 8) 해조류 (Seaweed)

해조류는 요오드, 철분, 칼슘, 칼륨 등 무기질이 많이 함유되어 있고, 식이섬유가 풍부하여 식용으로 많이 이용하고 있다. 해조류는 칼슘, 칼륨, 철분, 구리 등 각종 무기질과 알긴산 (alginate), 후코이단 (fucoidan) 등이 풍부하게 함유되어 있어 피부보습, 상처 회복, 혈액순환 활성화, 각화주기 정상화 등의 효능이 있다. 또한 항염, 보습, 피부탄력 회복, 피부진정, 디톡스의 효과가 있다. 특히 제주도의

투스, 감태, 미역 추출물 등은 항산화 및 항염증 효과가 있는 생리활성물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있어 피부세포의 보호에 좋은 화장품원료로 각광받고 있다 (Cui 등, 2019).

#### 9) 제주조릿대

제주조릿대는 한라산 일대에서 넓게 분포되어 자생하는 특산식물로, 다양한 약리효과로 예로부터 전통약재로 사용되어왔다 (Kim, 2018). 그러나 제주조릿대는 번식력이 강해 다른 식물들의 성장을 저해하고 있어 문제가 심각하다. 제주조릿대의 화장품 등의 응용은 제주조릿대의 번식을 적절하게 막아 한라산 생태 종의 다양성을 회복시킬 수 있다는 점에서 긍정적인 면으로 평가받고 있다 (Lee 와 Lee, 2017). 제주조릿대는 파라-쿠마린산 ( $p$ -coumaric acid)를 포함한 페놀성 항산화제, tannin, flavonoid 등이 풍부하고, 멜라닌 생합성을 억제하여 다양한 미백 케어 제품과 항노화 제품에 적용되고 있다.

#### 10) 유채

아시아, 유럽 등 세계적으로 널리 재배되고 있으며, 우리나라에서는 99%가 제주도에서 서식하고 있다. 비타민 A, C 함량이 풍부하여 식품으로도 이용되며, 루틴 (rutin) 등 항산화 효과가 우수하여 피부 노화를 지연시키고 예방한다. 또한 손, 발의 염증, 부종을 없애주는 것으로 알려져 있다. 유채는 유채대, 유채씨, 유채유, 유채박 등 모든 부분을 화장품, 식품 등의 산업에 활용할 수 있다. 유채는 다양한 아미노산을 함유하고 있으며 추출물은 활성산소 억제, 라디칼 소거능 등 항산화 활성이 뛰어난 것으로 알려져 있다 (Kim 과 Na, 2013).

#### 11) 황칠

황칠나무는 우리나라의 남해안과 제주도 한라산 일대에서 자라는 상록수로, 공예품에 사용하는 도료의 원료로서 이용되어 왔다. 황칠의 잎, 줄기 및 뿌리는 진

정작용과 강장작용 등의 효능을 보여 편두통과 생리통 등에 효과적이며, 항암작용과 항산화 작용이 있는 것으로 보고되었다 (Mo 와 Oh, 2013). 황칠은 멜라닌 생합성 억제 효과가 보고되어 미백 등을 위한 원료로 사용되고 있다 (Park 등, 2014).

## 12) 홍해삼

홍해삼은 한국, 일본 등 아시아일대에서 자생하고 타우린, 탄닌, 비타민 B1, B2, B3 등을 포함하여 항암, 비만, 고혈압, 피부면역, 항산화에 효과적이다 (Jeon 등, 2017). 또한 홍해삼 추출물은 tyrosinase 활성을 억제하며 높은 미백과 주름개선효과를 내는 것으로 밝혀졌다 (Jeon 등, 2018).

## 13) 알로에베라

알로에베라(Aloe vera)잎은 겔 형태로 되어 있으며 약 98%가 수분으로 이루어져 있다. 총 고형물 함량은 0.66%며 당, 단백질, 지질, 미네랄 및 페놀성분으로 구성되어있고 항종양, 항산화, 항염증, 피부질환의 완화 및 주름개선 등의 효과가 있다 (Seol 등, 2012; Yoon 과 Pyo, 2013).

## 14) 애기달맞이

애기달맞이꽃은 달맞이꽃에 비해 아주 작아서 붙여진 이름으로써 달맞이꽃의 효능을 보면 달맞이꽃의 민간요법으로 통제로 갈아 외상에 바르거나 피부에 발진이나 종기가 나면 그것을 환부에 바르기도 하였다. 달맞이꽃의 씨앗에서 얻은 유지속에는 필수지방산이 다량으로 함유 되어있다. 달맞이꽃의 뿌리를 월견초라고 하며 감기로 열이 높고 인후염이 있을 때 물에 넣고 달여서 복용하며 종자는 월견자라고 하여 고지혈증에 사용한다. 애기달맞이 추출물은 항산화, 항염, 항암 및 항균활성이 뛰어난 것으로 보고되고 있다.



## 5. 항산화와 항염증

산소는 호기성 호흡을 하는 생물에게는 꼭 필요한 요소이나, 호흡과 환경적 요인에 의해 반응성이 큰 활성산소로 변화하면 노화 및 각종 질환을 유발할 수 있다. 피부의 노화 요인에는 여러 가지 환경, 심리적인 요소, 호르몬 변화 등이 있는데, 시간이 흘러감에 따라 생기는 내인성 노화와 오랫동안 자외선에 노출되어 생기는 광 노화가 있다 (Kim 등, 2008). 이러한 활성산소에 의한 노화 등을 방지하기 위한 활성 산소 조절 혹은 감소시킬 수 있는 항산화제로는 효소계열의 superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase 등과 페놀성 화합물, flavone 유도체, carotenoids, 아미노산 등 천연 항산화물질과 BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene) 등과 같은 합성 항산화제가 있다 (Kang 등, 2005). 그러나 합성 항산화제는 안정성 측면에서 문제가 대두되어 식품에 사용량이 규제 되고 있다 (Choe 와 Yang, 1982). 이에 따라 근래에는 천연물질 중 항산화 및 항염 활성이 높은 물질을 탐색하고 분리하여 안전성이 높은 합성 항산화제를 개발하려는 연구가 활발히 이루지고 있다. 페놀계 화합물은 식물에 함유되어 있는 2차 대사산물들 중 하나로 구조의 다양성을 가지고 있으며 phenolic hydroxyl기는 단백질,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  등의 2가 금속이온 및 거대 분자들에 결합하는 성질을 가짐으로 항산화 활성 등과 같은 생리활성을 나타낸다 (Rice-Evans 등, 1997). 한편, 정상적인 세포에서도 대사과정의 산물로 활성 산소종인 과산화수소 ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radical ( $OH^\cdot$ ), superoxide anion radical, singlet oxygen ( $^1O_2$ ) 만들어내며 catalase, superoxide dismutase (SOD)와 같은 인체내 효소에 의해 제거되는 항산화 방어체계에 의해 균형을 유지한다 (김종평 과 유익동, 1998; Madamanch 등, 2005). 또한 비효소적 항산화제인 vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -carotene, 플라보노이드는 활성 산소종을 직접 소거하거나 활성 산소종에 의한 연쇄 반응을 차단하여 산화적 손상을 저해한다 (Allen 과 Tresini, 2000). 그러나 이러한 생체방어체계가 오작동하거나 각종 물리, 화학적 요인들에

의하여 활성산소의 생성이 시스템의 용량을 초과하게 될 경우 산화적 스트레스 (oxidative stress)가 야기된다. 따라서 자유라디칼을 소거할 수 있는 화합물 (free radical scavengers) 또는 과산화물 생성 저해물질과 같은 항산화제들은 이들 산화물들에 기인하는 노화 및 각종 질환의 억제 또는 치료제로서 이용된다 (김중평과 유익동, 1998). 이러한 정상세포의 항산화 방어체계는 많은 양의 자외선에 노출될 경우 붕괴되어 피부의 구성물질인 지질, 단백질, 다당, 핵산 등과 반응하여 피부에 영향을 준다 (그림 II-7).

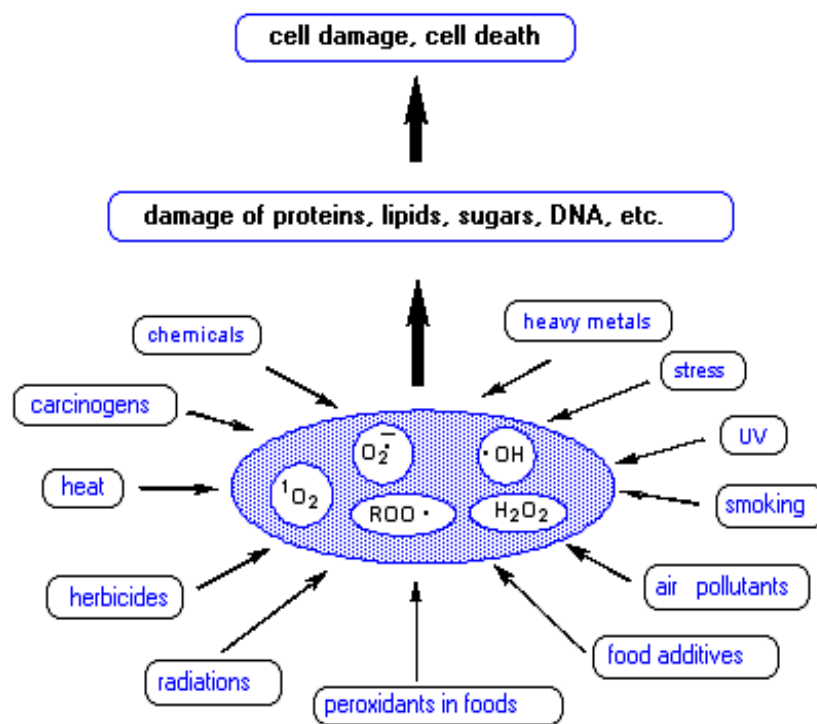


그림 II-7. 자유라디칼을 발생하는 환경 및 유해인자와 그에 따른 세포의 영향 (김중평과 유익동, 1998).

염증반응은 조직에 상처로 인한 감염 등이 일어날 경우 신체를 보호하기 위한 기전으로 자유라디칼, 사이토카인 등의 자극성 물질에 대한 방어 반응 중 하나로 알려져 있다 (Nathan, 1992). 실험에 사용한 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7은 LPS로 자극을 받으면 전염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokine)을 방출하게 되고 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현을 유도하며 nitric oxide (NO)를 생성하여 염증반응을 일으키게 된다 (McDaniel 등, 1996). 특히 NO는 자체로서도 염증과 세포 손상을 유발 하지만, 활성 산소종인 superoxide와 결합하게 되면 반응성이 더욱 강한 peroxynitrite의 형태로 전화되어 세포 파괴를 유발하게 된다 (Radi 등, 1991). 결국 세포에서 NO 생성의 저해는 항염 활성 뿐 아니라 체내에서 산화 스트레스를 저해하는 것에도 관련되어 있다 (그림 II-8).

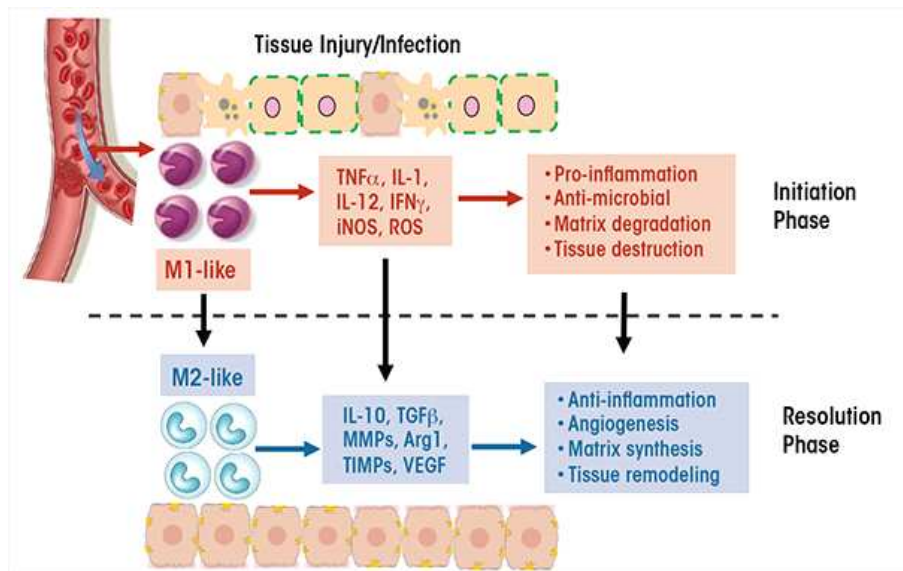


그림 II-8. 대식세포의 가소성과 조직손상 (adapted from wikipedia).

## 6. 전망

화장품 산업은 다른 산업에 비해 비교적 수명이 짧고, 기호성과 유행성이 제품의 판매에 상당한 영향을 주기 때문에 생산 구조적인 면에서 제품이 사양이 다양하여 다품종 소량 생산 체제를 갖추고 있다. 화장품 산업은 노령화 사회로의 진입에 따른 노화지연 및 미의 유지에 대한 관심이 높아짐으로써 발전 가능성이 크다.

제주도는 세계적으로 유명한 화산섬이며, 유네스코 자연과학분야 3관왕에 빛나는 섬으로 국내에서 최대 생물종 다양성을 보유하고 있으며 또한 국내 유일의 화산암반수를 이용한다. 따라서 제주는 맑고 깨끗한 환경, 자연과의 공존이라는 최고의 가치를 내세워 청정 및 천연 이미지를 이용한 천연화장품 개발 및 생산이 가능하므로, 제주도 특화 산업으로 발전시킬 수 있다. 제주특별자치도에서도 2002년부터 제주건강뷰티 생물산업을 전략산업으로 육성하기 시작하였고, 2015년에는 제주특별자치도 화장품 산업 진흥 조례 제정과, 2016년부터는 제주화장품 인증제도를 시행함으로써 화장품 소재의 수입 대체, 수출 경쟁력 강화를 위한 화장품 소재공급 거점화가 가능할 것으로 전망하고 있다.

### Ⅲ. 제주산 복분자 딸기 추출물의 항염증 효과

#### 1. 요약

복분자 딸기 (*Rubus coreabus* Miquel)은 한반도 남쪽 및 제주도에서 발견되며 열매는 항암, 항산화 및 항염증 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나, LPS로 자극된 염증성 사이토카인 및 그 매개체의 발현에 대한 복분자딸기 줄기 및 잎 추출물 (*R.coreabus* stem and leaf, RSL)의 억제 효과는 아직 조사되지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 복분자딸기 줄기 및 잎 추출물의 항염증 효과를 평가하였다. 이 연구에서 RSL은 nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible NO synthase (iNOS)와 같은 전 염증성 사이토카인의 생성을 농도 의존적으로 억제 하였으며, RAW 264.7 세포 독성은 관찰되지 않았다. 이 결과는 RSL이 화장품 및 의약품 성분의 새로운 원료가 될 수 있음을 나타낸다.

## 2. 서론

현대인은 서구화된 식생활로 인한 비만과 환경오염 및 스트레스 등으로 인한 염증 관련 질환이 계속 증가하고 있다 (Vlassara, 2005). 염증 반응은 본래 손상된 조직과 병원균의 침입으로부터 신체를 방어하기 위해 가장 먼저 일어나는 원시적인 보호 반응으로 알려져 있다. 하지만 지속적인 염증 반응은 세포나 조직의 기능장애 및 괴사를 일으키고 당뇨, 종양, 류머티즘 관절염 등의 염증 질환으로 발전할 수 있다 (Medzhitov, 2008; Kaplanski 등, 2003; Hofseth 등, 2006; Jeong 등, 2012). 염증반응은 침입으로 인한 조직의 손상에 대해 구조나 기능을 회복시킬 수 있는 유익한 체내 방어기전이다. 그러나 반복되는 염증은 조직 손상의 원인이 되었고 이에 따라 염증을 일으키는 물질을 찾아 제거하고자 하는 많은 노력이 있었다 (Lee 등, 2009; Ji 등, 2004). 염증반응에 관여하는 주요 세포로 잘 알려진 macrophage(대식세포)는 여러 자극뿐만 아니라 면역세포들이 분비하는 cytokine 등에 의해 활성화되어, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) 및 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 와 같은 전염증성 cytokine들의 생산과 NO 및 PGE<sub>2</sub>와 같은 염증인자들의 생성을 촉진한다 (Iwalewa 등, 2007; Shao 등, 2013). 염증 과정은 다량의 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 등 염증 인자가 Nitric Oxide Synthase (NOS) 및 cyclooxygenase (COX)에 의해 형성된다. NO는 혈압조절 및 응고, 면역기능 등의 역할을 하며 NOS에 의해 형성된다 (Garthwaite, 2010; Crane 등, 1998). 복분자 딸기 (*Rubus coreanus*)는 장미과 낙엽관목에 속하며 중부 이남의 지역과 제주도뿐만 아니라 중국과 일본에 서식하는 것으로 알려져 있다 (Yuk, 1990). 한방에서는 복분자 딸기의 열매를 복분자라 하며, 다양한 플라보노이드, 페놀 화합물 및 테르페노이드가 포함되어 있다고 알려져 있으며, 전통적으로 간, 정력 감퇴, 신정보강 및 빈뇨 등을 치료하는데 사용되었다 (Bae, 2000; Kim 등, 1997). 또한, 복분자의 생리활성은 polyphenol에 의한 항산화 활성, 항균활성 및 항염증 작용 등이 알려져 있다 (Kim 등, 2001; Choi

등, 2003; Cha 등, 2001). 그러나 이러한 효능은 열매에 국한되어 있으며, 복분자 딸기(잎과 줄기)에 대해서는 아직까지 항염증 효능 및 그 기전에 대해서는 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 제주산 복분자딸기의 잎과 줄기를 복합 추출하여 RAW 264.7 cell에서 발생하는 염증 반응에 대한 억제 효과 및 기능성 소재로서의 가능성을 검토하고자 하였다.

### 3. 재료 및 방법

#### 1) 재료 및 추출

본 연구에 사용된 복분자 딸기(*Rubus coreanus* Miquel)의 잎과 줄기는 2018년 제주특별자치도 서귀포시 대정읍에서 2월에 채집되었으며 제주생물자원(주)으로부터 제공받았다. 복분자 딸기(잎과 줄기)는 70% 에탄올을 이용하여 실온에서 24시간 동안 2회에 걸쳐 추출하였으며, 필터로 여과한 후 감압농축기를 사용하여 농축하였다. 농축된 추출물을  $-110^{\circ}\text{C}$ 에서 동결 건조(LABOGENE, KOREA)한 후 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 실험에 사용하였다.

#### 2) 추출물의 활성 측정을 위한 cell 배양

본 연구에서 사용된 RAW 264.7 세포는 Murine macrophage cell line으로 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양받아 10% fetal bovine serum (FBS)와 100 units/mL penicillin-streptomycin 이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, USA) 배양액을 사용하여  $37^{\circ}\text{C}$  incubator(5%  $\text{CO}_2$ )에서 2~3일 간격으로 계대배양을 실시하였다.



### 3) 추출물의 생리활성 평가 및 특성 분석

#### (1) 복분자 딸기 추출물의 세포 독성 측정

RAW 264.7 cell을 24 well plate에  $3.0 \times 10^5$  cells/mL만큼 분주하여 37°C, 5%, CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 18시간 전 배양한 후 시료와 LPS(1 µg/mL)를 동시 처리하고, 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT를 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 다음 MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 첨가하여 살아있는 세포와의 반응으로 생긴 침전물을 용해시킨 후 96 well plate에 옮겨 담아 ELISA reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 군에 대한 평균 흡광도를 측정하였으며, 대조군의 흡광도 측정값과 비교하여 세포독성을 평가하였다.

#### (2) 복분자 딸기 추출물의 NO 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 24 well plate에  $3.0 \times 10^5$  cells/mL로 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 18시간 전 배양시켰다. 이후 시료와 LPS (1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후 상층액 100 µL와 Griess 시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100 µL를 96 well plate에서 혼합하여 10분간 실온 암소에서 반응시킨 후 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 형태로 측정하였다.

### (3) Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell( $3.0 \times 10^5$  cells/mL)에 시료와 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 함유한 450  $\mu\text{L}$ 의 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양 배지를 원심 분리(12,000 rpm and for 3 min) 하여 얻어진 상층액의 PGE<sub>2</sub> 함량을 측정하였다. 모든 시료는 정량 전까지 냉동보관(-20 $^{\circ}\text{C}$ ) 하여 사용하였다. PGE<sub>2</sub>는 mouse enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였다.

### (4) 전염증성 cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell은  $1.8 \times 10^5$  cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 분주하고, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 18시간 동안 전 배양하였다. 이후 다양한 농도의 시료 50  $\mu\text{L}$ 와 LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 함유한 450  $\mu\text{L}$ 의 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm and for 3 min) 하여 얻어진 상층액의 전염증성 cytokine 생성 함량을 ELISA kit를 이용하여 정량하였다.

### (5) Western blot analysis

RAW 264.7 cell( $3.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 배양한 후 시료와 LPS(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 세포를 PBS를 이용해 2회 세척하고 lysis buffer [1 $\times$ RIPA (Upstate Cell Signaling Solution, NY, USA), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinin, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pepstatin, and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin]를 이용해 1시간 동안 lysis 시킨 후 원심분리 (15,000 rpm, 30 min) 하여 단백질 상층액을 분리하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 기준으로 Bio-Rad protein assay reagent를 사용하여 정량하였다. 정량한 단백질을 10%의 polyacrylamid gel에 전

기영동하고 poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane (Milipore, 138 Burlington, MA, USA)에 200 mA, 2시간 동안 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% 탈지분유를 포함한 0.05% Tween20/Tris-buffered saline (0.05% T/TBS)에 넣고 상온에서 1시간 blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체 반응은 iNOS antibody (1:5,000, Calbiochem, Philadelphia, PA, USA), COX-2 antibody (1:1,000, BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA),  $\beta$ -actin antibody clone AC-74 (1:10,000, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 4°C에서 하루밤 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 membrane은 0.05% T/TBS 용액으로 3회 세척 후 peroxidase-conjugated된 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch, West grove, PA, USA)를 1:5,000 또는 1:10,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응한 뒤 0.05% T/TBS 용액으로 3회 세척하였다. 단백질은 ECL kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 imaging densitometer (model GS-700, Bio-rad, USA)를 통해 측정하였다.

#### 4) 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였고, 그 결과는 평균값±표준편차로 나타냈으며 통계적 분석은 SPSS 10.0 프로그램을 이용하여 각 처리구 간의 유의성 ( $p < 0.05$ ,  $0.01$ )을 검증을 위해 분산분석(analysis of variance, ANOVA)후 tukey test로 다중 비교를 실시하였다.

#### 4. 결과 및 고찰

##### 1) 복분자 딸기 추출물의 세포 독성 측정

RAW 264.7 세포에 대한 복분자 딸기의 잎과 줄기 추출물(RSL)의 세포독성을 알아보기 위해 MTT 분석법을 이용하여 세포 생존율을 조사하였다. 그 결과 RSL 추출물은 모든 농도에서 무처리군과 비교 시 유의적인 차이를 보이지 않아 세포의 생존율에 영향을 주지 않음을 확인 하였다 (그림 III-1). 따라서 RSL 추출물은 처리한 농도 내에서 세포독성이 없는 것으로 사료되어 추후 실험에서 위의 농도를 사용하여 실험을 진행하였다.

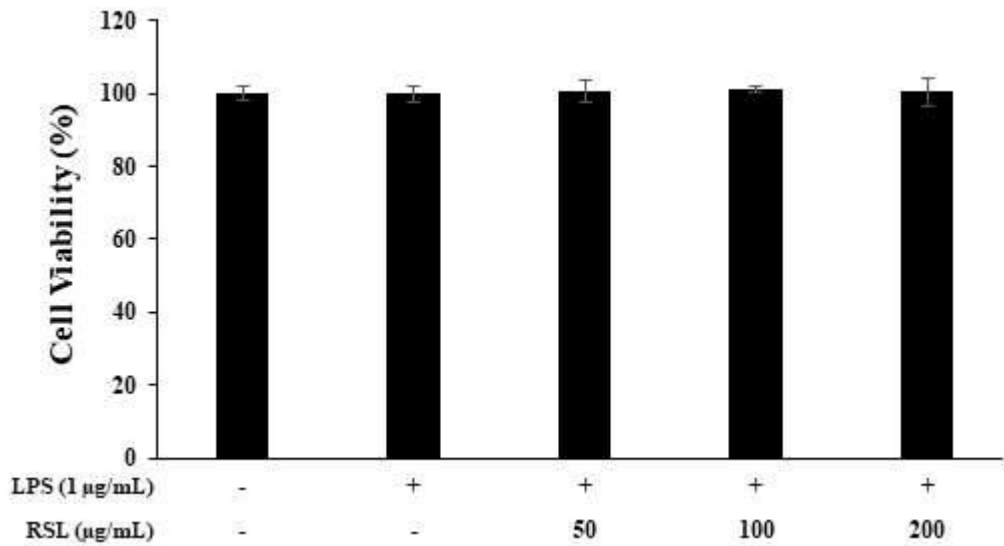


그림 III-1. *Rubus coreanus* extract (RSL)의 RAW 264.7 세포 내 독성 평가.

## 2) 복분자 딸기 추출물의 NO 생성 억제 활성

염증을 유발하는 원인이 되는 활성산소 Nitric oxide (NO)의 생성에 RSL 추출물이 어떠한 영향을 미치는지에 대해서 조사하였다(Fig. 2). RAW 264.7 세포에 RSL 추출물(50, 100, 200 µg/mL)과 LPS(1 µg/mL)를 동시 처리하여 NO 생성량을 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 양을 측정하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군과 비교했을 시 RSL 추출물은 50 µg/mL 농도에서 NO 생성을 48%, 100 µg/mL 농도에서는 66%, 200 µg/mL에서는 71%로 농도 의존적으로 NO의 생성량을 감소시키는 것으로 나타났다 (그림 III-2). 따라서 RSL 추출물은 대식세포의 NO의 생성을 감소시킴으로써 염증 발생에 의한 질환 유발을 효과적으로 제어할 수 있을 것으로 사료된다.

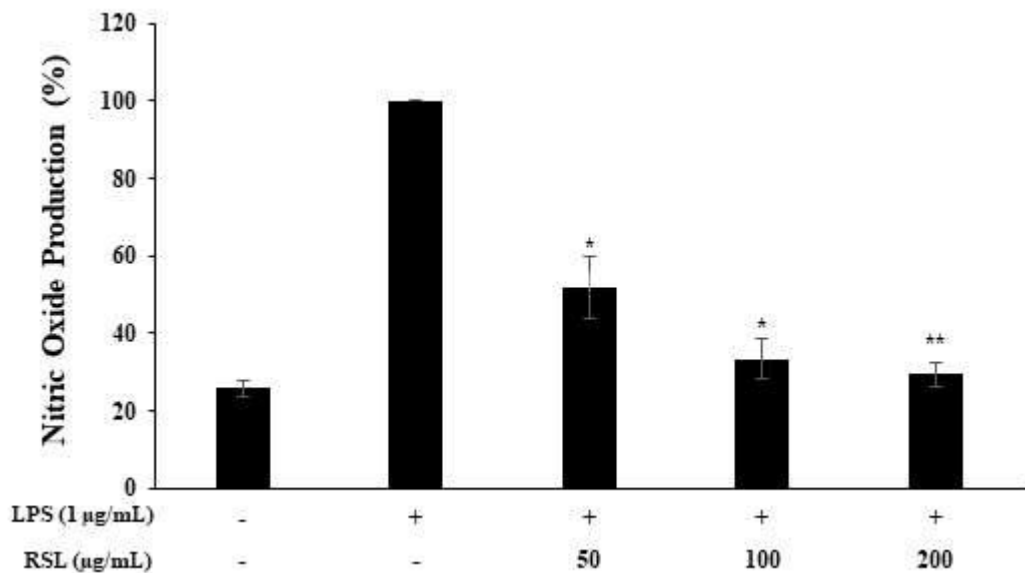


그림 III-2. *Rubus coreanus* extract (RSL)의 RAW 264.7 세포 내 nitro oxide (NO) 생산 억제 효과.

### 3) 복분자 딸기 추출물의 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 활성

COX-2 유래 PGE<sub>2</sub>는 면역 관련 세포의 활성을 유도해서 염증반응을 일으키며 Th2 세포의 활성을 유도해 염증성 사이토카인을 과도하게 생성하는 원인으로 알려져 있다 (Jang 등, 2006). RSL 추출물을 상기의 NO 실험과 동일한 농도로 처리하여 RAW264.7 세포에서 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제 활성을 측정하였다. 측정 결과, LPS가 첨가되어 염증이 유발된 군과 비교했을 시 RSL 추출물이 첨가된 각각의 처리 농도(50, 100, 200 ug/ml)에서 농도 의존적으로 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3-3). 특히 200 µg/mL 농도에서는 RSL 추출물의 활성이 55%로 PGE<sub>2</sub> 생성을 억제 하는 것으로 나타났다. 따라서 RSL 추출물은 LPS로 인해 생성량이 증가된 PGE<sub>2</sub>를 감소시킴으로써 항염증 효과를 나타내는 것으로 확인하였다.

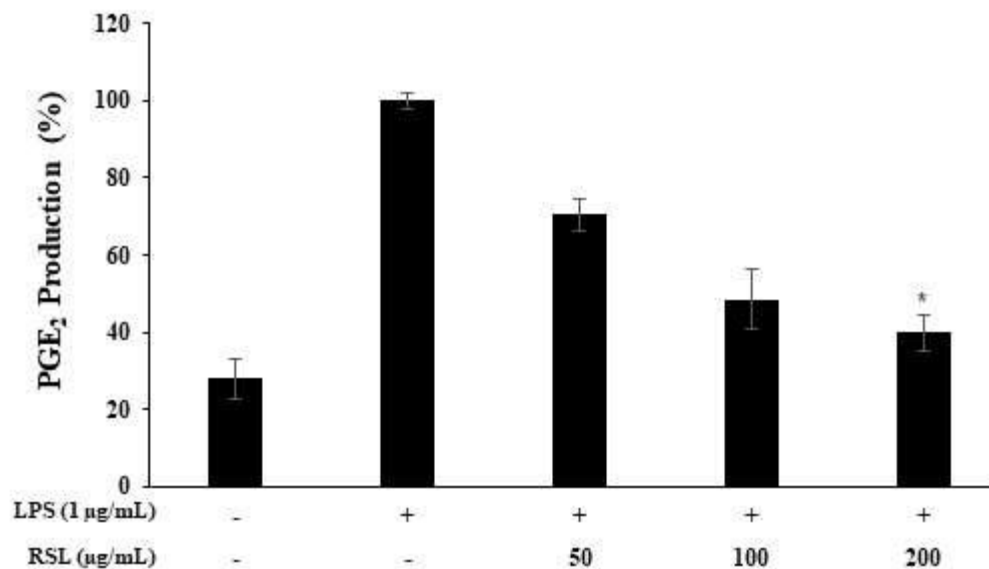


그림 III-3. RSL의 RAW 264.7 세포 내 PGE<sub>2</sub> 생산 억제 효과.

#### 4) iNOS 및 COX-2 발현 억제

LPS에 의해 자극을 받은 NF- $\kappa$ B는 핵 내로 이동하여 COX-2 및 iNOS와 같은 여러 염증관련 효소의 전사를 활성화하며, iNOS 및 COX-2에서 유래한 NO와 PGE<sub>2</sub>는 급성 및 만성 염증의 발병 기전에 중추적인 역할을 한다(20). 따라서 본 실험에서는 RSL 추출물에 의한 염증의 억제가 어떠한 경로에 의한 것인지 확인하기 위해 RAW264.7 세포를 LPS로 자극한 후 RSL 추출물을 농도별로 처리하여 각 신호 전달물질의 발현 정도를 관찰하였다. 실험 결과, 무침가군과 비교하여 LPS (1 ug/ml)에 의해 생성이 증가된 iNOS 단백질 발현양이 RSL 추출물을 처리했을 때 농도 의존적으로 크게 감소한 것을 확인하였다(Fig. 3-4a). 또한, LPS에 의해 다량 생성된 COX-2 단백질 발현 양 역시 RSL 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다 (Fig. 3-4b). 이로써 RSL 추출물에 의한 염증 억제가 NF- $\kappa$ B의 신호 전달과정을 통해 이루어지고 있음을 확인하였으며, 이러한 결과는 NO, PGE<sub>2</sub>, iNOS, COX-2의 발현을 효과적으로 감소시킴으로써 항염증 효과를 나타내는 것임을 시사했다.

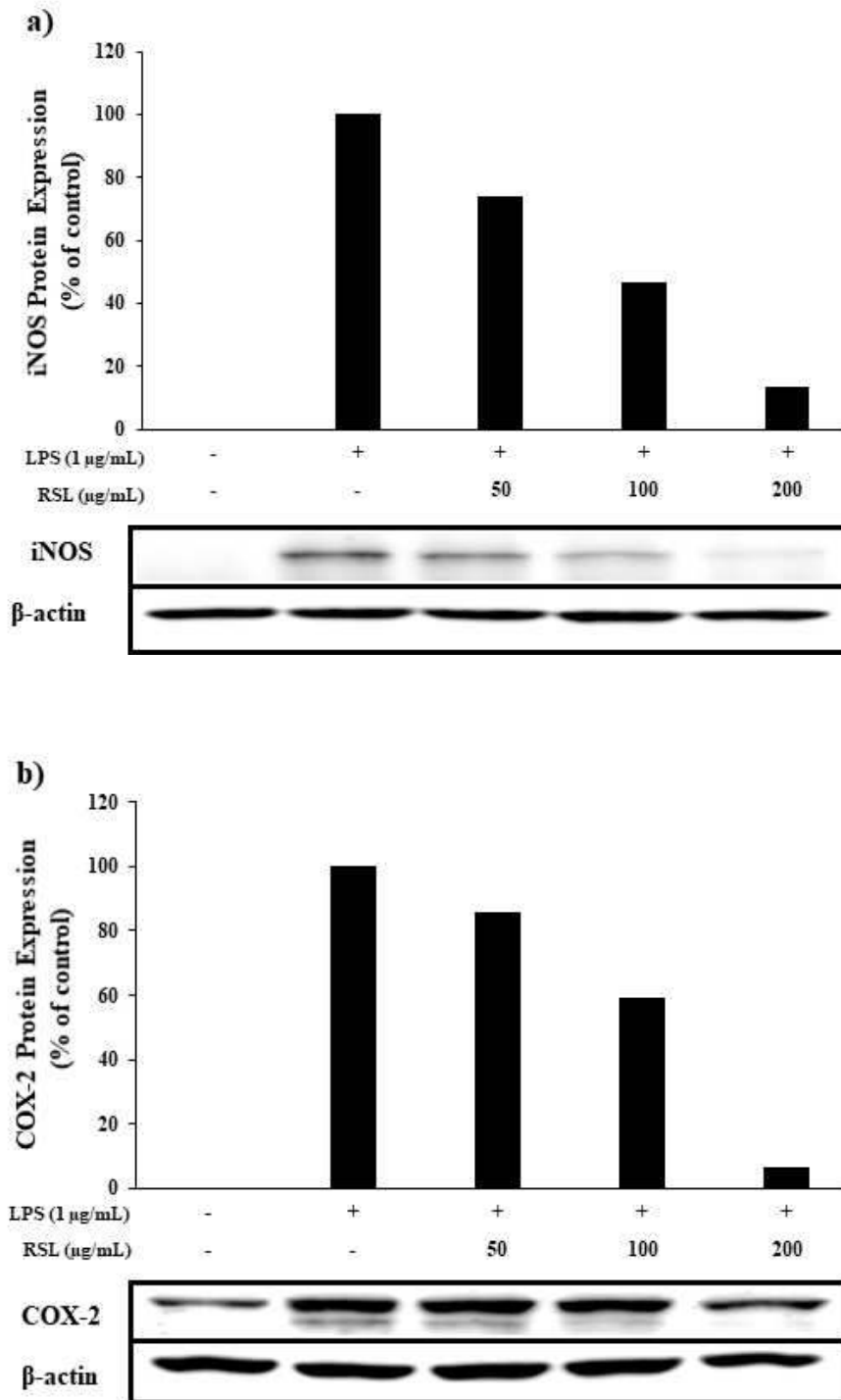


그림 III-4. RSL의 RAW 264.7 세포 내 iNOS (a)와 COX-2 (b) 발현 억제 효과.



##### 5) 전염증성 사이토카인 (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) 생성 억제

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6는 염증반응을 조절하는 대표적 전염증성 사이토카인으로 알려져 있으며, 이러한 사이토카인은 면역세포의 활성화, 증식 및 분화를 조절하는 것으로 알려져 있다 (Badwin, 1996). 따라서 본 실험에서는 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에 RSL 추출물을 처리한 후 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, 의 생성량을 측정하여 각각의 발현량을 조사하였다(Fig. 3-5). LPS에 의해 RAW264.7 세포의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 생성량이 유의적으로 증가된 것을 확인하였으며, RSL 추출물 (50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 처리군에서는 LPS에 의해 증가된 IL-1 $\beta$ , IL-6의 생성량이 농도 의존적으로 억제된 것을 확인하였다(Fig. 3-5b, 3-5c). 특히, RSL 추출물 처리군의 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서는 IL-1 $\beta$ 와 IL-6 분비량이 각각 50% 와 70% 이상으로 억제됨을 확인 하였다. 반면 TNF- $\alpha$ 의 생성능은 LPS처리군과 비교했을 때 억제능이 미비하게 관찰되는 것으로 보아 RSL 추출물이 TNF- $\alpha$  생성 기작에는 크게 관여하지 않는 것으로 사료된다(Fig. 3-5a). 그러나 RSL 추출물은 IL-1 $\beta$ 와 IL-6 생성량 감소에는 뛰어난 효과가 있는 것으로 보아 RSL 추출물은 사이토카인 발현에 관여함으로써 염증반응을 억제할 수 있음을 시사한다.

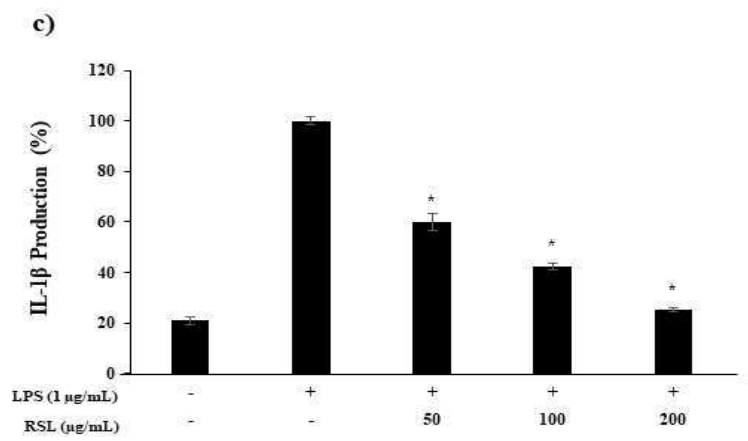
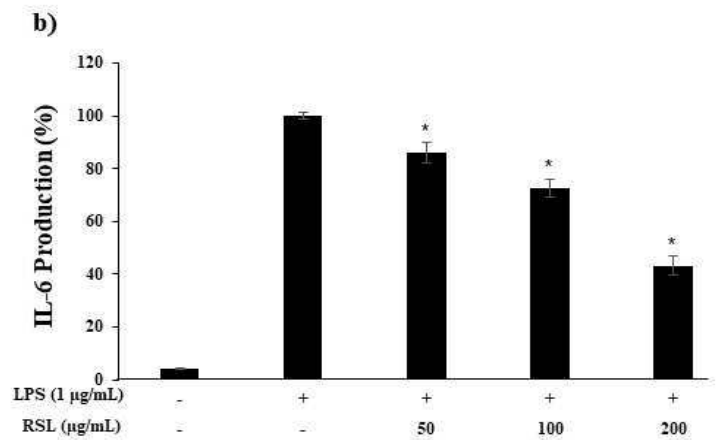
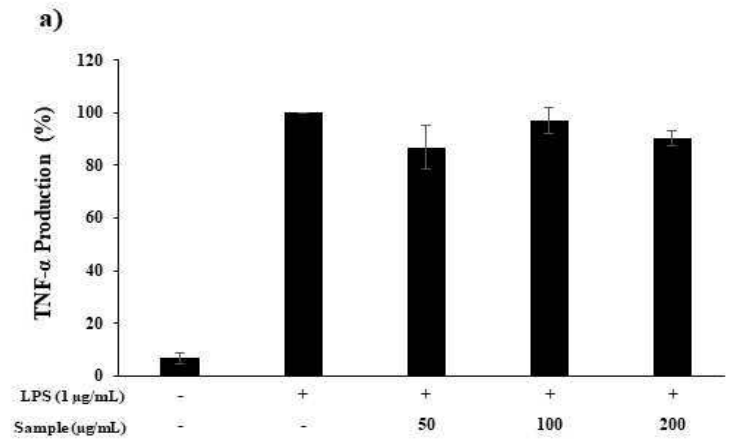


그림 III-5. RSL의 RAW 264.7 세포 내 전염증성 cytokine인 TNF-α (a), IL-1β (b), IL-6 (c) 생성 억제 효과.

## 5. 결론

본 연구에서는 RSL 추출물의 항염 효과를 확인하기 위해 Nitric oxide (NO) 저해 활성, Prostaglandin E2 생성 저해 활성과 전염증성 사이토카인 생성 억제, iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 효과를 측정하였다. RSL 추출물은 RAW264.7 세포에 대하여 전 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다. 또한, RSL 추출물은 LPS 자극에 의한 NO 생성을 농도 의존적으로 억제 했다. 게다가 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 활성 측정 결과 LPS 자극으로 분비된 PGE<sub>2</sub> 생성을 억제하였으며 전염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6의 분비량을 농도 의존적으로 억제하였다. 대표적인 염증 관련 신호 전달 경로인 NF- $\kappa$ B 관련 유전자의 발현을 검토한 결과 RSL 추출물에 의해 iNOS 및 COX-2의 발현이 유의적으로 억제 되었다. 따라서 RSL 추출물은 천연 항염증 기능성 화장품 소재로의 가능성을 제시하는 결과로 사료된다.

## IV. 제주산 겨울딸기 잎 추출물의 항산화 활성 및 항염증 효과

### 1. 요약

겨울딸기 (*Rubus buergeri* Miquel)은 다양한 종류의 식물 화학 물질을 함유하고 있으며 항염증, 항균 및 항암 효과와 같은 광범위한 생리 활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 그러나, RAW 264.7 대식세포에서의 염증에 대한 억제 효과의 기본 메커니즘은 아직 밝혀지지 않았다. 본 연구에서 우리는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 겨울딸기 잎 추출물 (RBM)의 항산화 및 항염증 활성을 조사하였다. RBM 처리된 RAW 264.7 세포는 NO, PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 사이토카인이 억제되었음을 확인하였다. 또한, RBM은 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 iNOS 및 COX-2를 상당히 억제 하였다. 이러한 결과는 RBM이 항산화제 및 항염증제로 사용하기 위한 잠재력을 가지고 있음을 나타내었다.

## 2. 서론

인간의 선천적 면역계는 외부 감염 시 최초의 방어선을 구성하는 역할을 하며, 침입한 병원체를 대해 초기에 인지를 하고 연속적인 염증촉진 반응을 개시 한다 (Mogensen, 2009). 이와 같은 염증반응에는 주로 대식세포(Macrophage)가 관여하며, 염증 매개 인자를 발현하여 외부 감염에 대한 적절한 반응을 하는 것으로 알려져 있으며 (Halliwell, 1996), 염증반응으로 인해 생성된 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)이나 nitric oxide(NO)는 체세포에도 손상을 입힐 수 있는 것으로 보고되어있다 (Apel 과 Hirt, 2004; Bogdan, 2015; Murphy, 1999). 이들이 생성되는 또 다른 원인으로서는 과도한 스트레스 및 과음, 흡연, 피로 등이 있으며, 그로 인해, DNA, 단백질, 세포 분자들의 손상 및 암, 심혈관 질환, 당뇨 등과 같은 다양한 질병이 발생할 수 있다 (Alfadda 와 Sallam, 2012; Reuter 등, 2010; Jeong 등, 2012; Hofseth 와 Ying, 2006). 이러한 염증 인자들은 외부 자극과 면역 세포들이 분비하는 사이토카인 등에 의해 대식세포가 활성화로 인해 생성되며, interleukin-6 (IL-6) 및 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )와 같은 전염증성 사이토카인들에 의해 생성이 촉진된다 (Yeom 등, 2004; Jeong 등, 2012). 보고된 메커니즘에 따르면, 생성된 사이토카인들이 inducible nitric oxide synthase(iNOS)를 발현시켜 과도한 NO를 생성하고, 또한 cyclooxygenase-2 (COX-2) 단백질을 과발현함으로써 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)를 합성하여 염증반응을 유지시킨다 (Kim 등, 2019; Guzik 등, 2003). 이와 같은 역할을 하는 사이토카인은 보다 상위 기전에 존재하는 인자들에 의해 조절되며, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B)와 mitogen-activated protein kinase (MAPKs)의 활성 억제는 염증 반응을 치료하는데 있어 중요한 이점이 되며, iNOS, COX-2 및 사이토카인등과 함께 많은 항염증 연구에서 실험적 지표로 여겨지고 있다 (Paik 등, 2003; Ghosh 와 Hayden, 2008; Park 등, 2012). 한편, 현대인의 질병 예방에 대한 관심 및 항염증, 항산화 산업의 발전에 따라 천연 항산화제 및 항염

증제에 대한 요구가 증가하고 있으며, 특히 천연 식물 자원의 활성화에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다 (Masaki 등, 1995). 본 연구에서는 산딸기속 식물에 주목하였으며, 이들은 세계적으로 400여종이 존재한다. 산딸기속 식물은 다양한 종류의 phytochemical 물질을 함유하여 항산화능, 항염증, 항균, 항암효과 등 폭넓은 생리활성을 가진다고 알려져 있다 (Zhang 등, 2010). 이들의 과실(Berry)은 flavonoid, tannin, phenolic acid와 같은 생리활성이 높은 페놀성 화합물을 높은 수치로 함유하며 항산화 및 항염증 활성을 나타내는데, 이와 같은 활성은 특히 안토시아닌과 ellagic acid에 의한 것으로 연구되어 있다 (Bobinaite 등, 2012). 현재 복분자딸기(*Rubus coreanus*) (Ku 와 Mun, 2008; Yang 등, 2007), 레드라즈베리(*Rubus idaeus*) (Tosun 등, 2009; Venskutonis 등, 2007), 블랙베리(*Rubus fruticosus*) (Zia-Ul-Haq 등, 2014; Machado 등, 2015), 진들딸기 (*Rubus chamaemorus*) (Thiem 과 Goslinska, 2004; McDougall 등, 2011) 등 여러 산딸기속 식물에 대한 이화학적 특성 연구가 진행되어있으며, 이들의 생리활성 연구 결과 역시 다수 보고되어있다. 반면, 산딸기속 식물 중 하나인 겨울딸기(*Rubus buergeri* Miq uel)는 이화학적 연구 및 생리활성연구가 미흡하며 보고되어진 바가 거의 없다. 이들은 우리나라의 제주도 낮은 지대 (해발 700 m 이하)의 숲 속에서만 자라는 상록 덩굴성 반관목이며, 약명은 한매이고, 열매는 한방과 민간에서 명안, 지사, 음위, 강장, 양모 등에 사용되어졌다고 알려져 있으나 (Kang 등, 2005), 과학적인 근거가 제시되어있지 않으므로, 본 연구에서는 겨울딸기의 항산화와 항염증 효능에 대한 기능성 분석을 실시함으로써, 생리활성 연구를 수행하고자 하였다.

### 3. 재료 및 방법

#### 1) 재료 및 추출

본 연구에 사용된 겨울딸기 잎(*Rubus buergeri* Miquel)은 2018년 1월에 제주특별자치도 제주시 한림읍 한림리에서 채집되었으며, 제주식물자원연구소에서 구입하였다. 건조된 겨울딸기 잎을 분쇄한 후, 400 g을 취하여 70% Ethanol 2 L를 첨가하였다. 이후, 60°C에서 3시간 동안 가열한 뒤, 상온에서 16시간 추출하였다. 추출액은 paper filter로 여과하여 감압 농축한 뒤, 동결건조를 통해 시료화 하였다.

#### 2) 추출물의 활성 측정을 위한 cell 배양

RAW264.7 세포는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였으며, Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Gibco, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/mL penicillin-streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. RBM의 세포 생존을 평가는 24-well plate에 RAW 264.7 세포를  $8.0 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 24시간 전 배양 후 시료와 LPS(1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 이후, MTT assay 방법에 따라 세포 생존율을 평가하였다 (Denizot 와 Lang, 1986).

### 3) 추출물의 생리활성 평가 및 특성 분석

#### (1) 총 페놀 함량

총 페놀 함량은 시료의 페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색하는 원리를 이용한 Folin-Ciocalteu법을 통해 측정되었다 (Kujala 등, 2000). 겨울딸기 잎 추출물(RBM) 70  $\mu$ L와 2 N Folin-Ciocalteu 용액(Sigma, USA) 70  $\mu$ L를 혼합하여 3분간 실온반응 시킨 후, 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (Sigma, USA) 70  $\mu$ L를 첨가하여 1시간 방치하였다. 이후, Microplate reader (Thermo Fisher, USA)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid를 표준으로 작성한 표준곡선으로부터 정량하였으며 측정단위는 mg(Gallic acid)/g(시료)을 사용하였다.

#### (2) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 질산알루미늄법을 통해 측정하였다 (Zhishen 등, 1999). RBM 100  $\mu$ L와 2% aluminium chloride hexahydrate 100  $\mu$ L를 1:1 비율로 혼합하여 상온에서 20분 동안 반응 후, 430 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이에 따른 플라보노이드 함량은 quercetin으로 작성한 표준곡선으로부터 mg Quercetin equivalents (QE)/g 로 나타내었다.

#### (3) DPPH 라디칼 소거능

DPPH법은 전자나 수소원자에 의해 자유 라디칼이 비 라디칼이 되면 자유라디칼의 특유의 색이 사라지게 되는 DPPH의 성질을 이용한 방법이다 (Stagos 등, 2012). DPPH Radical scavenging activity 측정은 네 그룹으로 나뉘어서 시험하였다. A group은 0.1 mM 2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl radical 용액



(DPPH 시약) 150  $\mu$ L과 시료용액의 용매를 동량으로 혼합한 control group, B group은 methanol 150  $\mu$ L와 시료용액의 용매를 동량으로 혼합한 control group의 Blank, C group은 DPPH 시약 150  $\mu$ L와 일정농도의 시료를 동량으로 혼합한 experimental group, D group은 methanol 150  $\mu$ L와 일정농도의 시료를 동량으로 혼합한 control group의 Blank이다. 각각의 group을 25 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 시킨 후, 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

#### (4) ABTS 라디칼 소거능

ABTS radical을 이용한 항산화 활성 측정은 시료 내의 활성물질이 ABTS free radical을 소거하여 청록색의 radical 특유의 색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 Van den Berg 등의 방법을 변형하여 측정하였다 (Van den Berg 등, 1999). 7.4 mM ABTS 용액과 2.6 mM Potassium persulfate 용액을 24시간 동안 암반응시켜, ABTS radical을 형성시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 2.0이 되도록 희석하여 working solution(WS)을 제조하였다. WS과 RBM을 동량 혼합 후, 10분 동안 암반응 하였으며, ABTS 라디칼 소거능은 시료 무첨가군 대비 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity(\%)} = [(\text{시료첨가군}/\text{무첨가군})] \times 100$$

#### (5) Nitric Oxide(NO) 생성 저해 활성 평가

RAW 264.7 세포(8.0  $\times$  10<sup>4</sup> cell/well)를 24시간 전 배양 후 시료와 LPS(1  $\mu$ g/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하였으며, Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 생성된 NO를 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였다. 세포배양액 100  $\mu$ L와 Griess 시약을 동량 혼합하여 10분간 암반응 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 측정한 흡광도 값을 결과로 나타내었다.

(6) Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성 저해 활성 평가

RAW 264.7 세포(8.0 × 10<sup>4</sup> cell/well)에 시료와 LPS(1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후, 배양액으로 분비된 PGE<sub>2</sub>의 함량을 control 대비 백분율로 나타내었다. PGE<sub>2</sub> 함량은 PGE<sub>2</sub> ELISA Kit (R&D Systems, MN, USA)를 이용하여 측정 하였다.

(7) Pro-inflammatory 사이토카인(TNF-α, IL-6) 생성 저해 활성 평가

RAW 264.7 세포를 24-well plate에 8.0 × 10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 전 배양 후, 시료와 LPS(1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양 하였다. 전염증성 사이토카인의 생성량은 Mouse TNF-α ELISA Kit(Invitrogen, California, USA), Mouse IL-6 ELISA Kit(BD Biosciences, California, USA)를 이용하여 측정하였다.

(8) Western Blot

RAW 264.7 세포(3.0 × 10<sup>5</sup> cells/well)를 18시간 전 배양 후 시료와 LPS (1 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 세포를 PBS로 2회 세척하고 lysis buffer를 이용해 1시간 동안 lysis 시킨 후 원심분리하여 단백질 상등액을 분리하였다. 단백질 농도는 BCA kit(Bio-Rad, USA)를 이용하여 정량하였다. 정량한 단백질을 10%의 polyacrylamide gel에 전기영동하고 Poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane (Milipore, USA)에 200 mA, 2시간 동안 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% 탈지분유를 포함한 0.05% Tween 20/Tris-buffered saline (0.05% T/TBS)에 넣고 상온에서 blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰다. 1차 항체 반응은 iNOS antibody(1:500, Bio-rad, USA), COX-2 antibody(1:1000, Rockland Immunochemicals, Inc., USA), β-actin antibody(1:10,000, Sigma, USA)를 이용하여 4℃에서 18시간 반응시킨 후 T/TBS로 4회 세척한 다음 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch, USA)를

1:10,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응한 뒤 T/TBS로 3회 세척하였다. 단백질은 ECL kit(Bio-Rad, USA) 사용하여 imaging densitometer를 통해 측정하였다.

#### 4) 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였으며, 그 결과는 평균값  $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 통계적 분석은 각 처리구 간의 유의성( $p < 0.05, 0.01$ ) 검증을 위해 분산분석 (analysis of variance, ANOVA)후 student's t-test로 다중비교를 실시하였다.

#### 4. 결과 및 고찰

##### 1) Total Phenol 및 flavonoid contents

페놀성 분자들은 천연물에 폭넓게 존재하며, 체내에서 항산화 및 항비만, 항염증 등에 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Shin, 2019). 본 연구에서는 겨울딸기 잎 추출물의 phenol 및 flavonoid 함량을 조사하여 그림 IV-1에 나타내었다. 실험 결과, 추출물 내의 phenol 및 flavonoid 함량은 각각 52.7 mg/g, 11.9 mg/g으로 나타났다. 이는, Kim 등 (2014)과, Lee 등 (2014)에 의해 보고된 산딸기 속 식물의 함량에 비해 높은 수치로서, RBM이 비교적 높은 페놀 및 플라보노이드 함량을 나타내며 그에 따라 생리활성에도 영향을 미칠 것으로 사료된다.

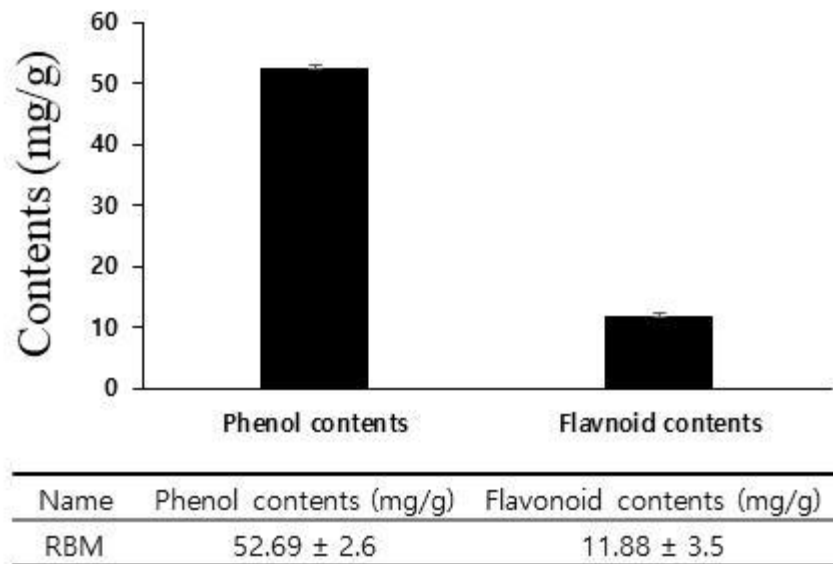


그림 IV-1. 겨울딸기 잎의 페놀과 플라보노이드 함량.

## 2) DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능

DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능은 비교적 짧은 시간 내에 항산화 활성을 측정할 수 있는 방법으로, 방향족 아민류 및 페놀성 화합물 등에 의해 환원되는 원리를 기반으로 하며, 항산화 물질을 탐색하는데 널리 사용되고 있다 (Que 등, 2006). 겨울딸기 잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 조사한 결과, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 대조군 대비 86.6%, 72.8%, 69.2%로 농도의 증가에 따라 소거능이 증가함을 확인할 수 있었으며(그림 IV-2A), ABTS radical 소거능은 각각 55.1%, 37.7%, 21.6%의 소거활성을 나타내었다(그림 IV-2B). 따라서, 겨울딸기 잎 추출물은 두 종류 free radical에 대해 소거 활성을 가지며, 가장 고농도인 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 대조군에 비해 DPPH radical은 31%, ABTS radical은 79% 감소한 수치를 보여줌으로 Kim 등 (2014) 의 연구결과와 비슷한 효능을 나타내었으며, 이는 RBM를 포함한 산딸기 속의 식물 추출물이 항산화 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

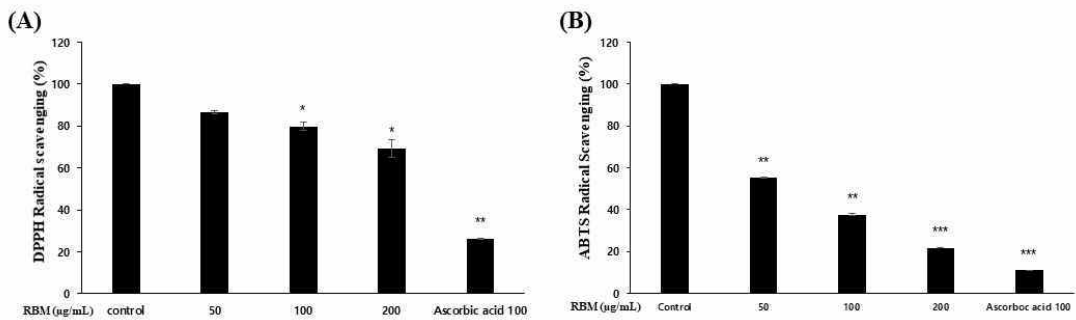


그림 IV-2. 겨울딸기 잎의 DPPH (A)와 ABTS (B) 라디칼 소거능.

### 3) 세포 생존율 평가

추출물에 의한 세포 독성 범위를 확인하기 위하여 RAW 264.7 마우스 유래 대식세포에 시료를 농도별로 처리한 후 MTT assay를 실시하여 그림 IV-3에 나타내었다. 겨울딸기 잎 추출물의 시험 농도는 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 설정하였으며, 그에 따른 세포 독성을 측정하였다. Control 대비 LPS처리군은 91.1%로 90% 이상의 생존율을 나타내었으며, 겨울딸기 추출물은 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 90.6%, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 85.7%, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 86.0%로 전 농도에서 85% 이상의 생존율을 나타냄으로써 RAW 264.7 세포에 대하여 독성이 미미한 것으로 조사되었다. 따라서 이후 시험들은 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 수행되었다.

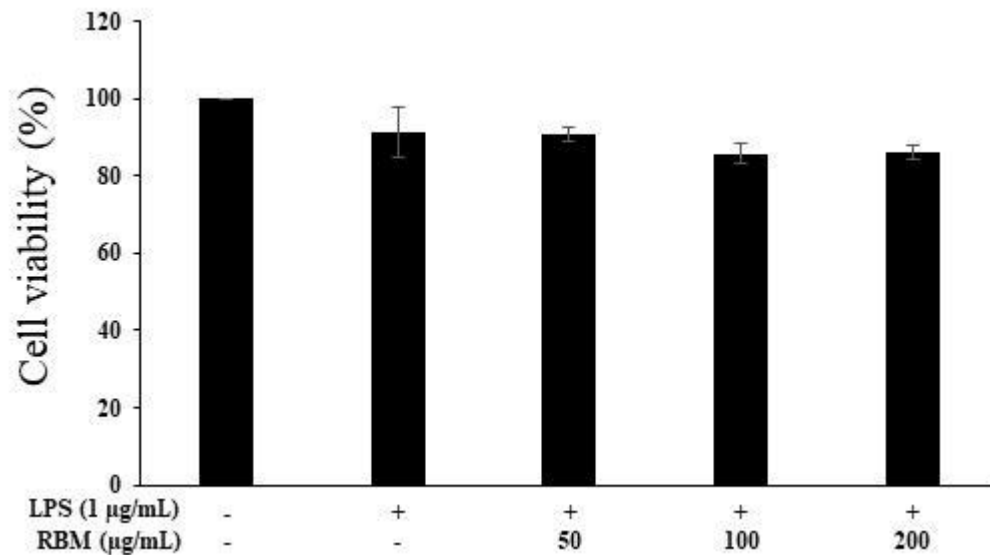


그림 IV-3. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포의 생존율.

#### 4) Nitric Oxide(NO) 생성 저해 활성 평가

NO는 외부의 침입이나 사이토카인의 자극으로 NOS 효소에 의해 L-arginine 으로부터 형성되는 반응성이 강한 free radical로써 면역조절 기능을 수행하지만, 과량으로 생성될 경우 염증반응을 심화시키고 세포 돌연변이 및 종양발생 등의 병적 반응을 초래한다 (Kim 등, 2012; Jung 등, 2019). 본 연구에서는 RAW 264.7 세포에 LPS 처리를 함으로써 세포 내 NO의 생성을 유도하였으며, 추출물을 농도별로 처리하여 항염증 활성을 조사하였다. 그 결과, LPS 처리군은 미처리군에 비하여 NO 생성량이 74% 증가하였으며 이는 LPS에 의해 세포가 충분히 활성화되었음을 나타낸다. 추출물의 처리에 따라, 50 µg/mL 농도에서는 LPS 처리군 대비 91.87%의 수치를 나타내었으며, 100 µg/mL에서는 56.03%, 가장 고농도인 200 µg/mL에서는 42.9%의 수치를 나타내어 농도 의존적으로 저해 활성이 증가함을 확인하였다(그림 IV-4). 특히 200 µg/mL농도에서는 LPS 처리군 대비 NO 생성량이 57.1%로 크게 감소하였으며, 이 결과는 겨울딸기 추출물이 항염 효능을 나타내는 것을 의미한다.

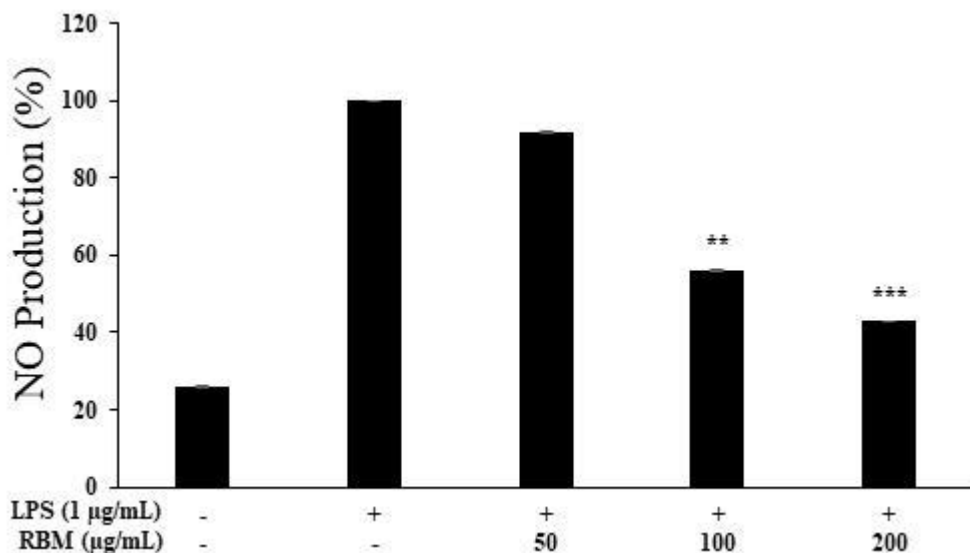


그림 IV-4. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포의 NO (nitric oxide) 저해 효과.

### 5) Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성 저해 활성 평가

PGE<sub>2</sub>는 염증 매개체로서 염증반응과 면역반응에 관여하고 혈관신생(angiogenesis) 활성화, 부종 및 발열 등 암을 유발하는 물질로 알려져 있다(Ninnemann, 1984; Masferrer 등, 1994). 본 연구에서는 LPS 처리를 통해 PGE<sub>2</sub>의 생성을 control 대비 73.4% 증가시켰으며, 추출물의 처리를 통해 PGE<sub>2</sub> 생성 저해 활성을 평가하였다. 그 결과, 겨울딸기 잎 추출물 50 µg/mL 농도에서 LPS 처리군 대비 48.8%, 100 µg/mL에서 16.2%, 200 µg/mL에서 7.5%의 수치를 나타내었다(그림 IV-5). 위 결과로 추출물의 농도가 증가함에 따라 생성량이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있으며, 가장 고농도인 200 µg/mL 농도에서 측정된 PGE<sub>2</sub> 생성량은 LPS 처리군보다 95.9% 감소한 결과로, 이는 겨울딸기 추출물이 NO 저해 활성뿐만 아니라 PGE<sub>2</sub>의 생성에도 크게 영향을 미치는 것으로 판단되며, 보다 높은 항염 활성을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

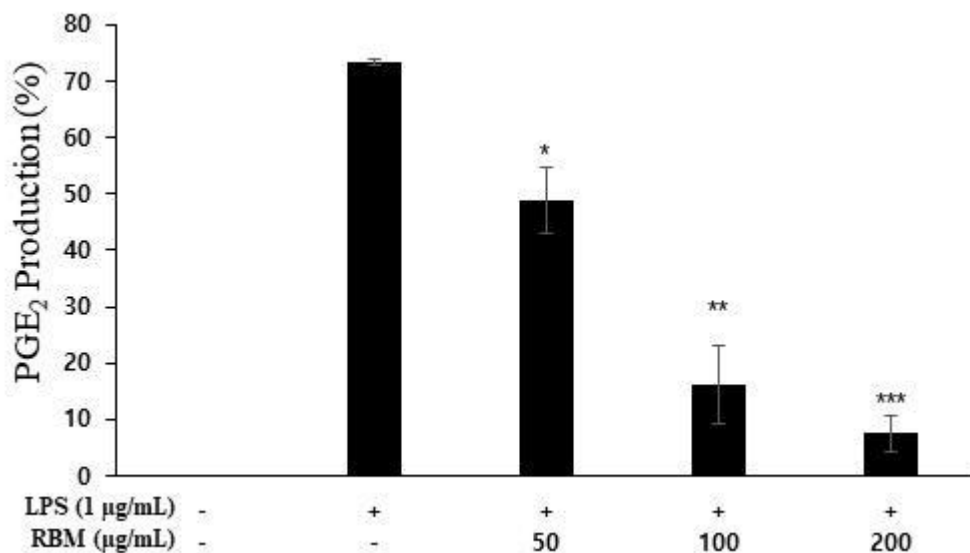


그림 IV-5. RAW 264.7 세포의 PGE<sub>2</sub> 저해 효과.



## 6) Pro-inflammatory cytokine(TNF- $\alpha$ , IL-6) 생성 저해 활성 평가

대식세포의 활성화로 인해 분비되는 TNF- $\alpha$ , IL-6과 같은 사이토카인은 일반적인 염증 과정과 면역반응에 관련된 세포작용을 조절한다. 그 중 IL-6는 면역글로불린 합성 증진 및 plasma cell 분화 유도등 다양한 작용을 한다고 보고되어있으며, TNF- $\alpha$ 는 T림프구의 성장 및 활성화 등을 조절하며 항암 작용을 나타내기도 하지만 과하게 생성 될 경우 혈압강하 및 혈관 확장으로 혈장의 손실을 초래한다고 조사되어있다 (Woo 등, 2018). 본 연구 결과, IL-6생성량은 LPS 처리군이 대조군 대비 92.0%로 유의한 상승을 보였으며, 겨울딸기 추출물 50  $\mu\text{g/mL}$ 에서 88.4%, 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 72.6%, 200  $\mu\text{g/mL}$ 에서 33.8%로 모든 시료 처리군에서 LPS 처리군보다 유의적으로 감소하는 경향을 보였다(그림 IV-6B). 반면, TNF- $\alpha$ 의 생성량은 대조군 대비 LPS 처리군이 80.2% 증가하였으나, 추출물 처리군에서는 유의한 감소 경향을 확인하지 못하였다 (그림 IV-6A). 이는 겨울딸기 추출물이 TNF- $\alpha$ 보다 IL-6의 생성 기전에 많은 영향을 미치는 것으로 사료되며, 이와 같은 IL-6의 조절은 겨울딸기 추출물이 항염 활성을 나타내는데 기여할 것으로 사료된다.

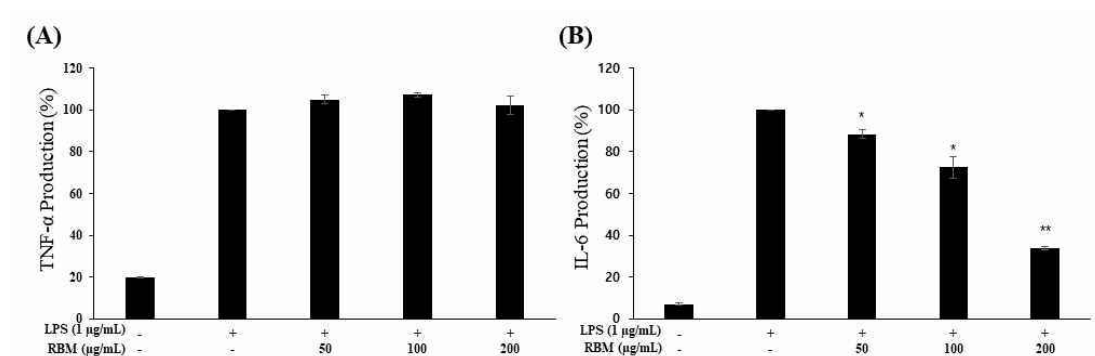


그림 IV-6. RBM의 RAW 264.7 세포 내 전염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$  (A), IL-6 (B) 생성 억제 효과.

## 7) iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 활성 평가

iNOS 및 COX-2는 면역세포를 자극하여 염증성 매개체를 합성하는 것으로 보고되어있으며, 그 중 iNOS는 산화질소 합성 효소로서 염증자극이나 LPS 등에 의해 유도되며, 장기간에 걸쳐 산화질소를 생성하여 염증반응을 매개한다. 또한, COX-2는 PGE<sub>2</sub>를 합성하는 효소로서 병적인 환경에서 발현되며, 이것을 억제할 경우 항염 효과 뿐만 아니라 암 억제에도 관련이 있다고 알려져 있다 (Lee 등, 2018). 본 연구결과, iNOS와 COX-2 모두 대조군에서는 거의 발현되지 않았으며 LPS 처리군에서 발현량이 증가한 것을 확인하였다. 겨울딸기 추출물이 iNOS의 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 추출물의 농도가 상승함에 따라 iNOS 단백질의 발현이 억제되었으며(그림 IV-7A), COX-2 단백질의 발현량 역시 유의하게 감소하였다(그림 IV-7B). 특히, 200 µg/mL 농도에서는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 현저하게 감소시켰으며, 이는 겨울딸기 잎 추출물이 두 단백질의 발현을 조절하여 항염 효과를 나타내는 것을 시사한다.

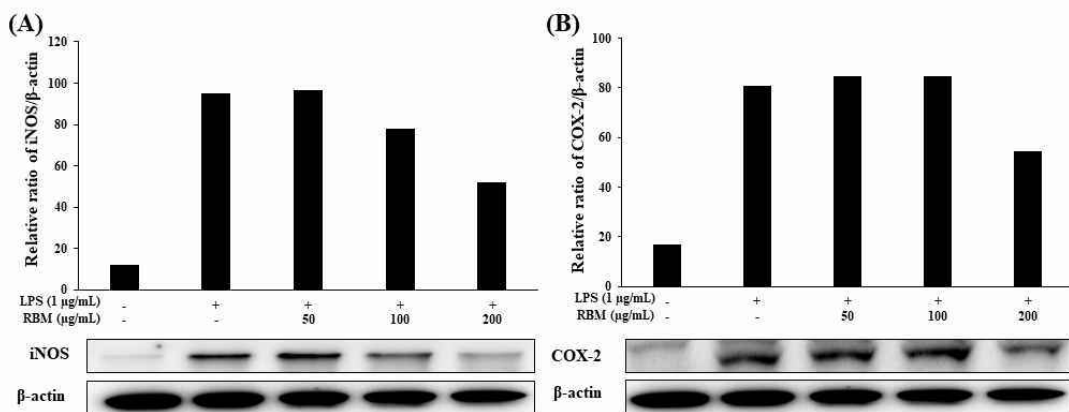


그림 IV-7. RBM의 RAW 264.7 세포 내 iNOS (A)와 COX-2 (B) 발현 억제 효과.

## 5. 결론

본 연구는 겨울딸기의 잎 추출물의 항산화 및 항염증 효과를 조사한 결과, 겨울딸기 잎 추출물 내의 phenol 및 flavonoid 함량은 각각 527.0 mg/g, 118.9 mg/g으로, 비교적 높은 함량을 나타내었으며, DPPH 및 ABTS free radical 소거능 실험을 실시한 결과, free radical에 대해 농도가 증가할수록 높은 소거능이 나타났다. LPS에 의해 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포를 통해 겨울딸기 추출물에 대한 항염증 연구를 실시한 결과 LPS 자극에 의해 생성된 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성량 및 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현이 추출물의 처리 농도에 따라 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 이들의 발현에 영향을 미치는 요소로 알려져 있는 전염증성 사이토카인 중 하나인 IL-6의 생성을 효과적으로 저해하여 전염증성 사이토카인의 조절에 기여하고 있음을 나타낸다. 위의 연구결과는 Yang 등 (2007)의 연구 결과인 산딸기 속의 복분자 추출물과 비등한 항염 효과를 나타내며, 이는 산딸기 속 식물이 항염 효과를 나타내는 화합물을 함유하고 있을 것이라 추측되며, 이에 관한 추가적인 연구가 진행 되어야 할 것으로 사료된다. 결론적으로, 본 연구에서는 겨울딸기 추출물이 항산화 효과 및 항염효과가 있음을 입증하는 근거를 제시하였으며, 기능성 식품 및 화장품 소재로서 활용될 수 있는 기초적인 정보를 제공할 것으로 사료된다.

## V. 제주산 순비기나무 (*Vitex rotundifolia*) 잎과 열매 essential oil의 성분 및 생리활성 분석

### 1. 요약

순비기나무 (*Vitex rotundifolia*) 열매는 자유라디칼 소거, 항알러지, 진통 효과 및 항종양 활성을 포함한 다양한 질병 치료를 위한 전통 약재로 사용되어 왔다. 순비기나무 잎 및 열매에서 추출된 오일은 각각 13 및 8종류의 화합물로 구성되었다. 잎에서 추출된 오일의 주성분은 N-(2-methyl-.alpha.-phenyl benzyl) aniline (35.8%), [4-(4-Methoxyphenyl)-4-methyl-2,5-dioxo-1-imidazolidiny] acetic acid (12.5%), Androstane-3,6,17-trione (9.3%) 및 2-hydroxy-12-methoxy-19-norpodocarpa- 4,8,11,13-tetra-3-one (8.6%)로 분석되었다. 또한, 열매의 오일은 Linoleic acid (46.8%), Ethyl linoleate (20.9%), Oleic acid (13.0), and Ethyl Oleate (11.2%)로 분석되었다. 항산화 효과는 DPPH 및 ABT 라디칼 소거 활성에 의해 측정되었다. 항산화 효과는 순비기나무 열매보다 잎에서 더 좋은 결과를 나타내었는데, 잎에서 추출된 에센셜 오일의 DPPH 및 ABT (IC<sub>50</sub>)의 소거 활성은 각각 34.2 및 143.7 µg/mL였다. 항염증 활성은 산화 질소 (NO) 생성 및 lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 RAW 264.7 세포에 의해 유도된 IL-1β의 억제에 의해 측정되었다. 순비기나무의 잎과 열매 오일은 IL-1β 발현을 농도 의존적으로 억제시켰다. 순비기나무의 에센셜 오일은 클린다마이신 내성을 가진 여드름균주 *Propionibacterium acnes* (CCARM 9009)에 대한 강력한 정균 효과를 나타내었고, MIC가 62.5 µg/ml이고 MBC가 250 µg/ml인 것으로 분석되었다.

## 2. 서론

식물에서 추출한 에센셜 오일(essential oil)의 향을 흡입함으로써 두통, 피로, 불면증 등 여러 가지 스트레스성 증상과 질병을 치료하는 것은 보완대체의학의 한 방법으로 효과가 빠른 자연 치유방법이다 (Worwood, 2016). 천연 에센셜 오일은 식물의 생화학적 구조상 테라핀, 에스테르, 세스퀴테르펜, 알코올, 페놀, 알데하이드, 케톤, 유기산으로 이루어져 있으며 비타민, 호르몬과 향생물질, 살균물질을 함유하고 있다 (Mitscher 등, 1980). 염증반응과 관련된 Nitric Oxide (NO)는 크기가 작고 매우 불안정한 무기 저분자 라디칼이고, prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 등의 염증인자가 inducible NO synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase-2(Cox-2)에 의해 형성되며 (Monacada 등, 1991; Nathan, 1992; Knowles 와 Mocada, 1992) 이러한 염증은 각종 사이토카인과 protein의 관여는 물론 free radical 등 다양한 면역계 세포와 염증 매개인자에 관여한다 (Yun 등, 2008).

제주 해안에는 다양한 염생식물(Halophyte)이 자생한다. 대표적으로 가장 많이 연구된 식물로는 나문재(*Suaeda glauca*), 갯질경(*Limonium tetragonum*), 통통마디(*Salicornia europaea* L), 방석나물(*Suaeda australis* (R. Br.) Moq.)이 있고 현재까지 40여종이 보고되었으며 (Kim 과 Song, 1983), 염생식물이 가지는 기능성을 산업적으로 이용하기 위한 연구가 진행되고 있다 (Karadeniz 등, 2014; Zhao 등, 2014). 염생식물의 한 종류인 순비기나무(*Vitex rotundifolia*)는 마편초과(*Verbenaceae*) 낙엽 활엽 관목으로서 우리나라에서는 제주도, 울릉도, 남부지방의 해변 모래땅에서 자생하고 (Yeoh 등, 1996) 중국과 일본에서도 자생하는 것으로 알려져 있다 (Lee, 1998). 또한 이에 관해서 항암, 항산화, 항알러지, 진통효과, 에스트로젠 유사 작용 등이 연구되었다 (You 등, 1998; Ono 등, 1999; Miyazawa 등, 1995; Okuyama 등, 1998; Hu 등, 2007). 또한 한국, 중국, 일본에서는 예부터 순비기나무의 건조한 열매를 만형자라 하여 강장, 해열, 두통치료를 목적으로 사용하였다 (Jang 등, 2002; Kimura 등, 1996). 순비기나무의 정유성분에 대해 보고된

분석은 잎, 줄기, 꽃, 열매에 대해 물, 에탄올, 고압열수로 추출물을 얻어 SOD-like activity, xanthine oxidase 및 tyrosinase에 대한 활성 연구가 있었고 또는 메탄올 추출물에서 세포독성, LPS에 의한 NO 생성저해 및 DPPH법에 의한 항산화 활성 검색 등이 있었는데, 증류법에 의한 오일이나 메탄올 추출물에 대한 연구가 대부분이다 (Jang 등, 2002; Joo 등, 2007; Choi 등, 2010). 이에 본 연구는 제주에 자생하고 있는 염생식물 중 한 종류인 순비기나무의 잎과 열매를 유기용매와 발효주정을 이용한 정제법을 통해 오일을 추출하여, 오일 분석을 통해 항산화, 염증매개인자, 항균력의 이용 가능성을 확인하고자 한다.

### 3. 재료 및 방법

#### 1) 재료 및 추출

본 실험에서 사용한 제주산 순비기나무의 잎과 열매는 각각 2016년 6월, 11월에 제주도 구좌읍 행원리 지역에서 자생하는 것을 채취하여 이물질을 제거하고 동결 건조하여 사용하였다. 순비기나무 잎 202.7 g과 열매 399.3 g을 각각 헥산 2 L, 3 L에 3시간 동안 교반 추출하였고, 여과 후 감압 농축기를 이용하여 농축하였다. 농축 과정으로 용매를 휘발시켜 콘크리트를 회수하였고 여기에 발효주정 500 mL를 혼합하여 가용성인 정유 성분을 분리하였고 용매를 다시 제거하여 최종적으로 얻어진 오일을 실험에 사용하였다.

#### 2) 추출물의 활성 측정을 위한 cell 배양

##### (1) 항염증 활성 측정을 위한 세포 배양

실험에 사용한 murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 unit/mL penicillin-streptomycin(GIBCO Inc, NY, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GIBCO Inc, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다. LPS(*E. coli* serotype 0111:B4)는 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

##### (2) 항균 활성 측정을 위한 균주 배양

여드름균 *Propionibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089), 표피포

도상구균 *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711) 및 황색포도상구균 *Staphylococcus aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708)를 항생제내성균주은행 (Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양받아 사용하였다. 균주를 배양하기 위한 배지로 luriaertani agar, tryptic soy agar 및 gifu anaerobic medium을 Difco La.(Sparks, MD. USA)에서 구입하여 사용하였다. *S.aureus* 및 *S.epidermidis*의 경우 37°C 호기 조건에서 배양하였고 24시간마다 계대 배양을 실시하였다. *P.acnes*는 37°C 혐기성 조건에서 배양 하였으며 24~48시간마다 계대 배양하여 실험에 사용하였다.



### 3) 추출물의 생리활성 평가 및 특성 분석

#### (1) 에센셜 오일의 GC/MSD 성분분석

에센셜 오일은 gas chromatography mass spectrometry detector(GC/MSD)를 이용하여 분석하였다. Column은 DB-1HT(0.1 $\mu$ m x 30 m x 0.32 mm, Agilent, USA), carrier gas는 He을 사용하여 유속 1.5 mL/min으로 하였다. 검출기 온도는 270 $^{\circ}$ C, 온도 프로그램은 40 $^{\circ}$ C에서 5분 유지시켰고 100 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C/min 속도로 승온 시켜 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지, 230 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C/min으로 승온 시켜 5분간 유지하였다. GC/MSD 분석은 GC와 동일한 조건에서 수행하였고, MSD의 온도는 312 $^{\circ}$ C로 유지하였다. GC system 및 mass spectrometry detector는 Agilent 사의 7890A 및 5975C 모델을 사용하였고 GC/MSD에 의해 분석된 정유 성분은 기기의 Wiley 138 database를 이용하여 해석하였다.

#### (2) DPPH 라디칼 소거능 평가

항산화 활성은 변형된 Blois (1958)의 방법을 이용하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical에 대한 전자공여능(Electron donating ability, EDA)을 측정하였다. 추출물의 전자공여능 측정을 위해, 시료 20  $\mu$ L에 0.2 mM DPPH 용액 180  $\mu$ L를 넣고 10분간 반응시킨 후 UV-Spectrophotometer를 사용하여 잔여하는 DPPH free radical을 517 nm에서 측정하였다. DPPH radical 소거 활성은 시료 용액의 첨가구와 비첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다. 대조군으로는 butylated hydroxytoluene (BHT)을 사용하였다.

#### (3) ABTS 라디칼 소거능 평가

Pellegrini 등 (1999)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시험 용액은 증류수에 7 mM ABTs와 2.45 mM potassium persulfate를 첨가하고 상온에서 16시간 배양

하여 ABTs 양이온(ABTs+)을 생성시킨 후 734 nm에서 흡광도의 값이 0.7 이하가 되도록 희석하여 제조하였다. 그다음 ABTs+ 용액 100  $\mu$ L에 시료 100  $\mu$ L을 가하여 6분 후에 흡광도 값을 측정하였다. 대조군으로는 butylated hydroxytoluene(BHT)을 사용하였다.

#### (4) MIC (minimum inhibitory concentration) 와 MBC (minimum bactericidal concentration) 평가

최소억제농도(MIC, minimum inhibitory concentration)는 미생물의 성장을 막는 항생물질의 최저 농도로 미생물에 대한 MIC 값이 낮으면 낮을수록 시료 물질은 그 미생물에 대한 감수성이 높다고 할 수 있다. MIC 측정은 액체배지희석법(broth dilution method)을 변형하여 사용하였다. 96 well plate에 시료를 포함하는 배지를 100  $\mu$ L 넣어준 후 균 현탁액의 농도를  $2 \times 10^5$  CFU/mL가 되도록 조절하여 100  $\mu$ L씩 넣어주었다. *S.epidermidis*는 37°C에서 24시간 배양하였으며, *P.acnes*는 37°C, 혐기성 조건에서 48시간 배양하였다. 이후 균의 증식이 나타나지 않는 최저 농도를 확인하였다. 또한 MIC 값이 낮다고 해서 기준 농도에서의 균이 모두 사멸한 것은 아니며, 시료의 영향으로 균의 성장을 방해하여 균이 자라지 않아 사멸로 판단될 수 있다. 따라서 최소사멸농도(MBC, minimum bactericidal concentration)를 추가적으로 측정하였는데, 이는 MIC 값이 나타난 그 이상의 농도의 시료 배양액들을 하드 배지(1.5% agar)에 처리하여 colony를 형성하는지 확인하는 방법이다. 1.5% agar를 포함하는 배지에 MIC를 진행한 시료 배양액을 streaking 하여 배양하였다. *S.epidermidis*는 37°C에서 24시간 배양하였으며, *P.acnes*는 37°C, 혐기성 조건에서 48시간 배양하여, colony가 형성되지 않는 최저 농도를 확인하였다.

#### (5) 세포독성과 nitric oxide(NO) 생성 저해능 측정

murine macrophage cell line RAW 264.7 세포를 10% fetal bovine serum(FBS)과 100 unit/mL penicillin-streptomycin(Gibco Inc., Grand Island,

NY, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Gibco Inc.)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다. NO 생성 저해능은 RAW 264.7 세포를 1×10<sup>5</sup> cells/mL로 조절하여 96 well plate에 접종하였고, 여러 농도의 시료를 처리하여 1시간 동안 반응시킨 후 lipopolysaccharide(LPS, Sigma) 100 ng/mL를 처리하여 24시간 배양한 후 세포배양 상등액 100 µL과 Griess 시약 (1%(w/v) sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphyl) ethylenediamine(Sigma) in 2.5(v/v) phosphoric acid) 100 µL을 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시켜 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)의 검량선과 비교하여 환산하였다 (Misko 등, 1993). 세포독성 평가는 WST-1(EZ-CyTox enhanced cell viability assay kit; Daeil Lab Service, Seoul, Korea) 방법을 이용하여 세포 생존율을 3회 반복 측정하였으며, 각 농도에 대한 흡광도를 측정하여 RAW 264.7 세포에 대한 독성 정도를 확인하였다.

#### (6) Pro-inflammatory cytokine 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell(1.5×10<sup>5</sup> cells/mL)을 24시간 배양한 후 LPS를 1 µg/ml로 처리하여 사이토카인 생성을 자극하였고, 동시에 시료를 농도 별로 처리하였다. 24시간 배양 후 원심분리(12,000 rpm, 3 min)하여 얻어진 상층액은 IL-1β, IL-6, TNF-α, PGE<sub>2</sub> 에 대해 murine enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(R&D systems, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### 4) 통계분석

모든 실험은 3회 반복으로 실시하였고, 모든 통계자료는 SPSS 12 program(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다.

#### 4. 결과 및 고찰

##### 1) 순비기나무 열매, 잎 에센셜 오일의 성분 분석

순비기나무 에센셜 오일의 추출 수율은 동결 건조된 시료인 잎 0.84%, 열매 6.06% 기준으로 계산되었으며, 얻어진 에센셜 오일은 GC/MSD로 분석하였다. 순비기나무 잎 에센셜 오일의 주요 성분은 표 V-1에 나타내었으며 N-(2-methyl- $\alpha$ -phenylbenzyl)aniline이 35.8%로 가장 많은 비중을 차지하였다. 다음으로는 [4-(4-Methoxyphenyl)-4-methyl-2,5-dioxo-1-imidazolidinyl]acetic acid(12.5%), 2-hydroxy-12-methoxy-19-norpodocarpa-4, 8, 11, 13-tetra-3-one(8.6%), 4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde(7.6%), pyrrolo(3,2,1-JK), carbazole(5.7%) 순으로 함유되었다. 순비기나무 열매 에센셜 오일의 주요 성분은 표 V-2에 나타내었으며 Linoleic acid가 46.8%로 가장 많은 비중을 차지하였고 다음으로는 ethyl linoleate(20.9%), oleic acid(13.0%) 순으로 함유되어 있음을 확인하였다. Kim 등 (2014)은 순비기나무의 줄기를 수증기 증류법을 이용하여 추출한 오일에서 manoyl oxide(14.3%),  $\alpha$ -terpineol(13.1 %) and  $\alpha$ -pinene(10.0 %)의 함량을 보고하였고, Jang 등 (2002)은 열매에서  $\alpha$ -pinene(20.24%), 1,8-cineole(11.47%),  $\beta$ -pinene(9.79%),  $\alpha$ -terpineol(7.08%), sabinene(3.68%)의 함량을 보고하였으나 함량은 추출 부위 및 추출방법의 차이에 따라 다른 결과가 발생하는 것으로 생각된다.

표 V-1. *Vitex rotundifolia* 잎의 에센셜 오일 성분

연번	반응 시간 (min)	성분명	% Area	순도 (%)
1	57.5	6,13-DIHYDRO-5,11-DIMETHYL- 6,13-METHANOL	2.0	99
2	58.1	PYRROLO(3,2,1-JK)CARBAZOLE	5.7	99
3	58.7	2-hydroxy-12-methoxy-19 -norpodocarpa-4,8,11,13-tetra-3-one	8.6	99
4	60.5	KOLAVELOOL	1.4	99
5	62.4	Heptadeca-2,15-diyne	1.5	99
6	63.3	(4R,5R)-5-METHYLSPIRO(3.5)NONAN-1-ONE	3.1	99
7	63.8	4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde	7.6	99
8	64.0	N-(2-methyl-.alpha.-phenyl benzyl)aniline	35.8	99
9	64.3	Benzoic acid	4.4	99
10	65.8	2,4-Pentanedione	4.8	99
11	65.9	3a,7a-Dihydro-3a-(chloromethyl)-4,6-dime	2.7	99
12	67.9	Androstane-3,6,17-trione	9.3	96
13	68.5	[4-(4-Methoxyphenyl)-4-methyl-2,5-dioxo-1- imidazolidinyl]acetic acid	12.5	99
Total			99.4	

표 V-2. *Vitex rotundifolia* 열매의 에센셜 오일 성분

연번	반응 시간 (min)	성분명	% Area	순도 (%)
1	57.8	Palmitic acid	2.0	99
2	58.3	Ethyl palmitate	1.5	99
3	60.2	Linoleic acid, methyl ester	1.9	99
4	61.1	Linoleic acid	46.8	99
5	61.3	Oleic acid	13.0	98
6	61.4	Ethyl linoleate	20.9	99
7	61.6	Ethyl Oleate	11.2	96
8	68.5	2-(3'-hydroxyphenylamino)-8-methyl-3H- phenoxazin-3-one	2.2	90
Total			99.5	

## 2) DPPH 라디칼 소거능

순비기나무 잎과 열매 에센셜 오일의 DPPH radical 소거 활성 실험 결과 잎 에센셜 오일에서 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거 활성을 보였으며, 라디칼을 50% 저해하는 농도인 inhibition concentration(IC)<sub>50</sub> 값은 434.2 µg/mL로 나타났다. 반면, 열매 에센셜 오일에서는 라디칼 소거 활성이 미미한 것으로 확인되었다(표 V-3). 순비기나무 잎을 메탄올 추출한 실험에서는 100 µg/mL 농도에서 24.29%, 1000 µg/mL 농도에서 71.98% 저해하는 유사한 실험 결과를 보였다(Choi 등, 2010).

## 3) ABTS 라디칼 소거능

ABTS는 비교적 안정한 free radical로써 DPPH 방법과 함께 항산화 활성을 스크리닝 하는데 많이 이용되고 있다. 또한 lipophilic 또는 hydrophilic 항산화 물질의 측정에 적용 가능한 방법으로 이 방법에 의한 항산화 활성은 ABTS 라디칼을 억제하거나 소거하는 것에 의해 이루어진다. 순비기나무 잎과 열매 에센셜 오일의 ABTS radical 소거 활성 실험 결과 잎 에센셜 오일에서 농도 의존적으로 좋은 ABTS 라디칼 소거 활성을 보였으며, 라디칼을 50% 저해하는 농도인 inhibition concentration(IC)<sub>50</sub> 값은 143.7 µg/mL로 나타났다. 열매 에센셜 오일에서도 농도 의존적인 라디칼 소거 활성을 나타내었지만 IC<sub>50</sub> 값은 500 µg/mL 이상으로 잎 에센셜 오일에 비해 낮은 효과를 확인할 수 있었다.(표 V-3).

표 V-3. *Vitex rotundifolia*. 에센셜 오일의 IC<sub>50</sub> 값

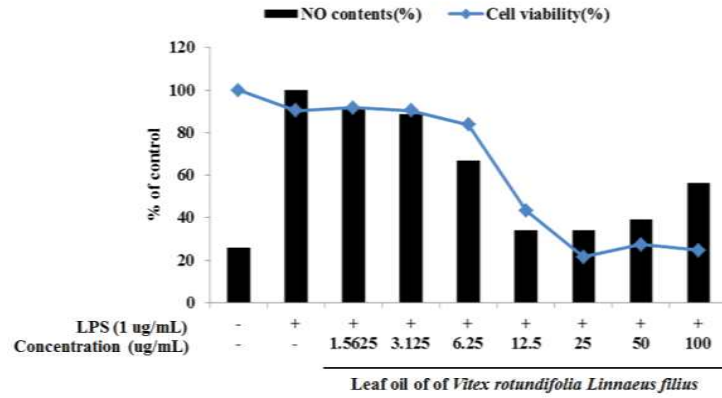
Sample	IC <sub>50</sub> Value (μg/mL)	
	DPPH	ABTS
Leaf oil	434.2	143.7
Fruit oil	>500	>500
Positive control (BHT)	32.8	13.1



#### 4) RAW 264.7 macrophages cell을 이용한 세포독성과 NO 저해활성

순비기나무 잎, 열매 에센셜 오일을 시료로 사용하여 RAW264.7의 세포 생존율을 WST-1 방법을 이용하여 측정하였다. 분석 결과 잎 오일의 경우 6.25 µg/mL 이하의 농도에서(그림 V-1A), 열매 오일은 50 µg/mL 이하의 농도에서(그림 V-1B) 세포 생존율이 100%에 근접한 것을 확인할 수 있었다. Lipopolysaccharide (LPS)를 대식세포에 처리하여 nitric oxide(NO)를 유도 시킨 후 시료를 처리하여 NO 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 LPS 처리에 의해 nitric oxide 생성이 유도됨을 확인할 수 있었고, 순비기나무 열매 오일은 세포독성이 없는 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 µg/mL 농도 범위에서 미미하였지만 농도 의존적인 nitric oxide 저해효과를 나타내었다. LPS와 rIFN-γ로 자극된 RAW 264.7 세포에서 순비기나무 열매 메탄올 추출물은 1000 µg/mL까지 세포독성이 관찰되지 않고, 실시한 최고 농도인 1000 µg/mL에서 생성되는 NO를 효과적으로 저해한다는 것을 보고하였다 (Choi 등, 2010). 또한 같은 식물에서도 오일 추출방법에 따라 항산화 활성이 높다고 알려진 폴리페놀 함량 차이가 60% 이상 차이가 발생하기도 하며, 이는 추출 온도에 따른 차이라고 보고된 바가 있다 (Jang 등, 2002).

A



B

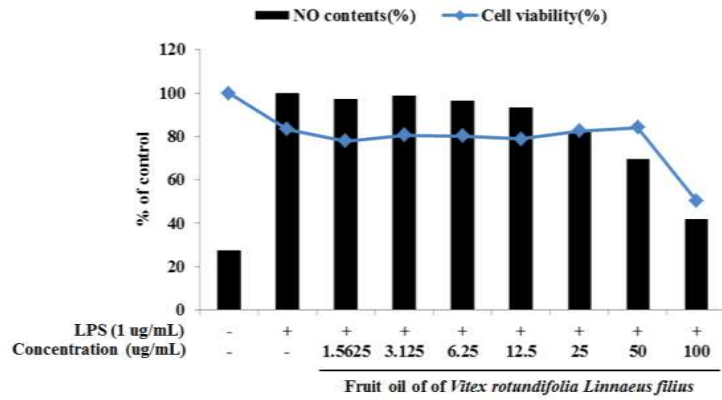
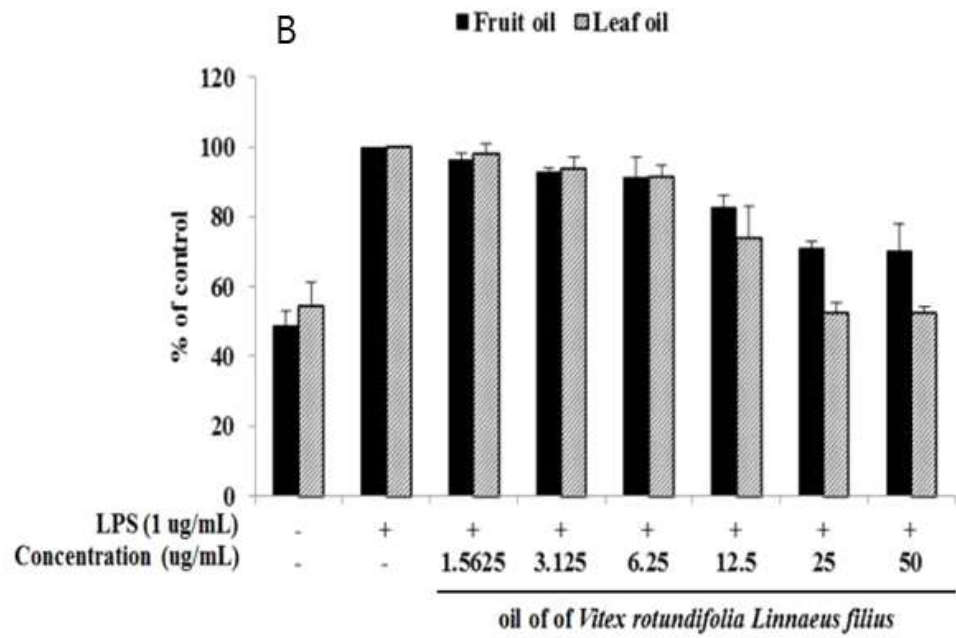
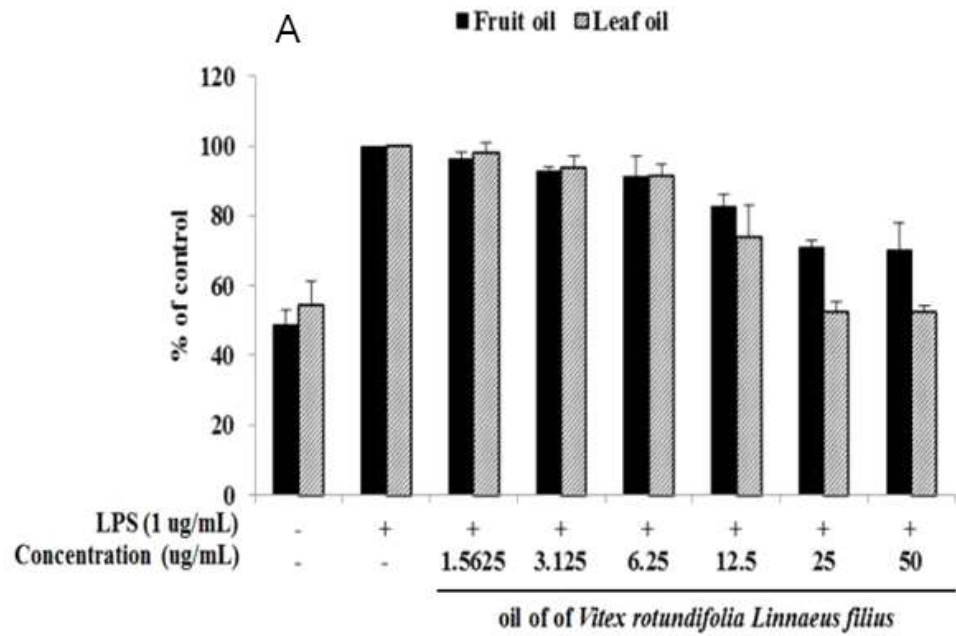


그림 V-1. *Vitex rotundifolia* 잎(A)과 열매(B)에서 추출한 에센셜 오일의 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성과 NO 저해 효과.

##### 5) RAW 264.7 macrophages cell을 이용한 염증성 사이토카인 억제효과 측정

염증성 사이토카인으로 대표되는 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 염증 반응을 매개하는 물질로, 특히 초기 염증 반응에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다 (Monacada 등, 1991). LPS로 유도된 염증성 사이토카인 억제효과를 측정한 결과 IL-6 와 TNF- $\alpha$ 는 순비기나무 오일에 의해 억제효과가 없는 것으로 나타났다(그림 V-2A, 5-2B). 반면, 순비기나무 열매와 잎 오일 둘 다 IL-1 $\beta$  발현을 농도의존적으로 억제하는 결과를 보였다(그림 V-2C). PGE<sub>2</sub> 의 발현에서는 순비기나무 열매와 잎 오일의 활성이 상반되게 나타났는데, 열매 오일은 농도의존적으로 억제하는 결과를 보였으나 잎 오일은 농도 의존적으로 증가하는 결과를 보였다. 또한 잎 오일은 비교적 낮은 농도인 3.125  $\mu$ g/mL에서 가장 높은 PGE<sub>2</sub> 저해능이 나타났다.(그림 V-2D) 이는 Choi 등 (2010)이 보고한 iNOS 단백질 발현이 저해와 NF- $\kappa$ B의 핵 내 translation 억제 활성을 볼 때, 순비기나무 잎 오일은 염증성 매개인자 억제 효과가 있을 것으로 확인된다.



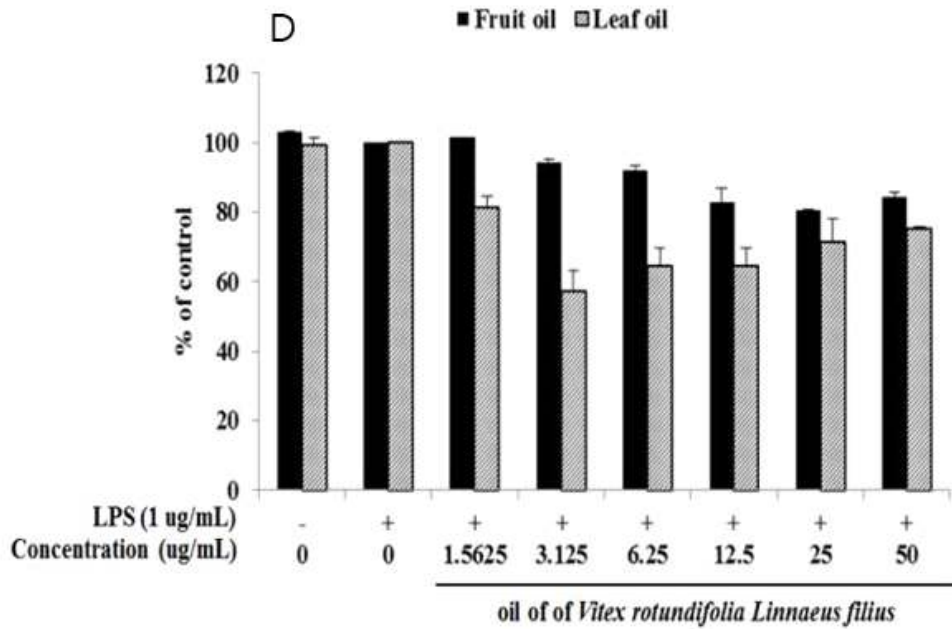
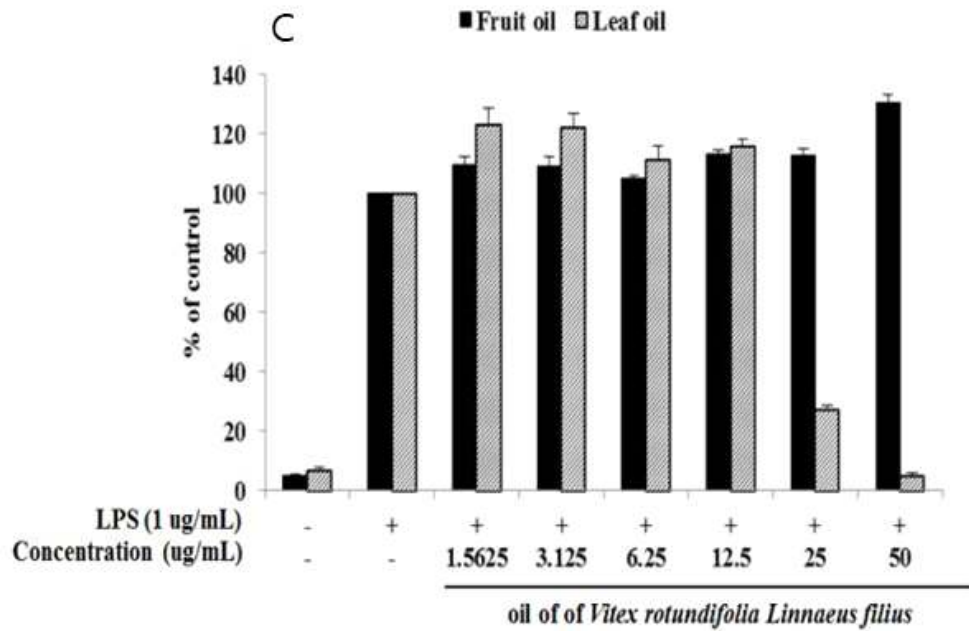


그림 V-2. *Vitex rotundifolia* 잎(gray bar)과 열매(black bar)에서 추출한 에센셜 오일의 RAW 264.7 세포에 대한 IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), TNF- $\alpha$  (C) 및 PGE<sub>2</sub> (D) 생성 억제 효과.

## 6) 순비기나무 잎, 열매 에센셜 오일의 항균 활성

지금까지 보고되거나 생산된 피지 과잉 생산 억제, 모낭 벽 과각화, 여드름 유발 균주 억제에 사용하는 환부 도포제나 구강 복용용 약으로는 benzyl peroxide, erythromycin, azelaic acid, clindamycin, tetracycline 등이 있으나 (Park 등, 2008), 피부건조증, 과민증 유발, 특히 항생제에 대한 내성 발생 등의 부작용이 있어 지속적인 사용이 어려운 상황이다 (Sohn 등, 2006; Weon 등, 2011). 이에 따라 항균효과가 있으면서 부작용이 없고 항생제 내성이 생기지 않는 천연물 유래 여드름 치료제 개발에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다. 천연물 유래 에센셜 오일의 경우 팔마로사와 제라늄의 주요 성분인 geranol 등이 우수한 항균력을 보인다고 보고되어 있다. 순비기나무 잎과 열매 에센셜 오일의 항균 활성을 확인하기 위해 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소사멸농도(minimum bactericidal concentration, MBC)를 측정하였다. 실험은 가장 높은 농도를 2000 µg/mL로 하여 two-fold-dilution 법으로 시료의 농도를 두 배씩 희석하며 실시하였다. 순비기 잎, 열매 오일의 항균 활성 결과는 표 V-4에 나타난 바와 같이 대체적으로 잎 오일이 열매 오일 보다 좋은 항균 활성을 나타내었다. 특히 잎 오일은 여드름균인 *P. acnes* 중에서 clindamycin 내성균인 *P. acnes* CCARM9009(MIC; 62.5 µg/mL, MBC; 250 µg/mL)에 대해 우수한 항균 활성을 보였으며, *P. acnes* CCARM0081, CCARM9010과 여드름 유발균인 표피포도상구균 *S. epidermidis* CCARM3709에서도 좋은 항균 활성을 나타내었다. 열매 오일에서는 실험에 사용된 10 종의 균주 중 *P. acnes* CCARM9009(MIC; 62.5 µg/mL, MBC; 1000µg/mL)에서 가장 좋은 활성을 나타내었으며 마찬가지로 clindamycin 내성균인 *P. acnes* CCARM9010(MIC; 500 µg/mL, MBC; >2000)에서 비교적 좋은 활성을 나타내고 있다.

표 V-4. *Vitex rotundifolia* 오일의 항균 활성

		피부 병원균의 약물 내성 패턴 (MIC; $\mu\text{g/mL}$ )	잎 추출 오일		열매 추출 오일	
			MIC	MBC	MIC	MBC
<i>P. acnes</i>	CCARM 0081	Susceptible	250	500	1000	>2000
	CCARM 9009	Clindamycin (64)	62.5	250	62.5	1000
	CCARM 9010	Clindamycin (64)	250	500	500	>2000
	CCARM 9089		1000	1000	>2000	>2000
<i>S. epidermidis</i>	CCARM 3079	Susceptible	250	500	2000	>2000
	CCARM 3710	Erythromycin (>32) Clindamycin (>16) Chloramphenicol (64)	500	500	>2000	>2000
	CCARM 3711	Tetracycline (>32)	500	2000	2000	>2000
<i>S. aureus</i>	CCARM 0027		500	2000	2000	>2000
	CCARM 3707		500	1000	2000	>2000
	CCARM 3708		500	1000	2000	>2000

## 5. 결론

순비기나무 에센셜 오일은 헥산을 이용하여 추출하고 주정을 사용하여 정제하였다. 추출 수율은 순비기나무 잎 0.84%, 순비기나무 열매 6.06%로 얻어졌다. 얻어진 에센셜 오일은 GC/MSD를 이용하여 분석한 결과, 잎 오일은 N-(2-methyl- $\alpha$ -phenylbenzyl)aniline이 35.8%, 열매 오일은 linoleic acid가 46.8%로 가장 많은 함량을 나타내었다. 잎과 열매 에센셜 오일의 항산화 활성을 측정한 결과, 잎 에센셜 오일이 DPPH 및 ABTS 라디칼에 대해 좋은 소거 활성을 보였다. 마찬가지로 RAW264.7 macrophage를 이용한 항염증 활성 측정 결과도 잎 에센셜 오일에서 염증인자인 nitric oxide(NO) 및 pro-inflammatory cytokine에 대해 농도 의존적으로 좋은 억제 효과를 나타냈고, 세포 독성 측정 결과 또한 잎 에센셜 오일이 일정 농도(잎; 6.25  $\mu$ g/mL, 열매; 50  $\mu$ g/mL) 범위 안에서 100%에 가까운 세포 생존율을 확인할 수 있었다. 미생물 10 종에 대한 항균 활성 실험에서는 잎과 열매 에센셜 오일 대부분이 활성을 나타냈으나 잎 에센셜 오일에서 보다 좋은 항균효과를 나타내었다. 여드름 균인 *P. acnes* 중 clindamycin에 대한 항생제 내성균인 CCARM9009에서 잎과 열매 오일 둘 다 좋은 활성을 나타냄을 확인하였다. 따라서 순비기나무 잎과 열매 에센셜 오일은 항산화, 항염, 항균과 관련한 기능성 소재로써 다양하게 활용될 수 있을 것이라 기대된다.



## VI. 결 론

화장품 산업은 우리의 일상과 깊은 관계가 있는 산업으로, 화장품에 대한 구매 수요가 지속적으로 늘어나고 있으며, 고부가가치를 창출할 수 있는 미래형 산업으로 발전하고 있다.

화장품 산업에 이용되는 소재는, 피부에 안전하며 다른 화장품 원료와의 상용성이 좋은 소재를 이용하여야 하는데, 이는 화장품이 일상생활에서 매일 혹은 장기간에 걸쳐 이용되기 때문이다. 따라서 사용상 안전하고 부작용이 없어야 한다. 소비자들은 피부건강을 지킬 수 있고 인체에 안전한 화장품을 사용하고자 하는 욕구가 있으며, 이러한 소비자들의 욕구는 천연 및 유기농소재를 이용한 화장품에 대한 관심으로 및 소비 행태로 표출되었다.

또한 현대인의 질병, 염증, 산화, 노화 등을 예방 및 치료할 수 있는 화장품에 대한 요구가 증가하고 있으며, 특히 천연 식물자원의 활성화에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 제주도는 이러한 천연 식물 자원이 많이 자생하고 이쓰며, 제주도의 화장품 산업은 이러한 풍부한 식물 자원을 활용할 수 있다는 점에서 최적의 입지를 갖추고 있다고 할 수 있다.

본 연구에 이용된 복분자딸기 (*Rubus coreabus*), 겨울딸기 (*Rubus buergeri*) 및 순비기나무 (*Vitex rotundifolia*)는 기존에 항암, 항산화, 항염증 작용을 하는 것으로 알려진 제주도에서 자생하는 식물이며 각 식물 자원의 항염 및 항산화 활성을 확인하기 위하여 2종류의 딸기 추출물과 순비기나무 잎과 열매에서 추출한 essential oil을 이용하여 생리활성을 확인하였다.

복분자딸기 추출물은 RAW 264.7 세포에 대하여 세포독성이 관찰되지 않았고 LPS 자극에 의한 NO 및 PGE<sub>2</sub> 생성을 억제하였으며 전염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6의 분비량을 농도 의존적으로 억제하였다. 대표적인 염증 관련 신호 전달 경로인 NF- $\kappa$ B 관련 유전자의 발현을 검토한 결과 iNOS 및 COX-2의 발현이 유의적으로 억제된 것을 확인하였다.

겨울딸기 잎 추출물 내의 phenol 및 flavonoid 함량은 각각 527.0 mg/g, 118.9

mg/g으로, 비교적 높은 함량을 나타내었으며, DPPH 및 ABTS 자유라디칼 소거능은 농도가 증가할수록 높게 나타났다. LPS에 의해 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포를 통해 겨울딸기 추출물에 대한 항염증 연구를 실시한 결과 LPS 자극에 의해 생성된 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성량 및 iNOS 및 COX-2 단백질의 발현이 추출물의 처리 농도에 따라 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 이들의 발현에 영향을 미치는 요소로 알려져 있는 전염증성 사이토카인 중 하나인 IL-6의 생성을 효과적으로 저해하여 전염증성 사이토카인의 조절에 기여하는 것으로 나타났다.

순비기나무에서 얻어진 에센셜 오일은 GC/MSD를 이용하여 분석한 결과, 잎 오일은 N-(2-methyl- $\alpha$ -phenylbenzyl)aniline이 35.8%, 열매 오일은 linoleic acid가 46.8%로 가장 많은 함량을 나타내었다. 잎과 열매 에센셜 오일은 DPPH 및 ABTS 라디칼에 대해 좋은 소거 활성을 보였다. 마찬가지로 RAW264.7 macrophage를 이용한 항염증 활성 측정 결과도 잎 에센셜 오일에서 염증인자인 nitric oxide(NO) 및 pro-inflammatory cytokine에 대해 농도 의존적으로 좋은 억제 효과를 나타냈고, 세포 독성 측정 결과 또한 잎 에센셜 오일이 일정 농도(잎; 6.25  $\mu$ g/mL, 열매; 50  $\mu$ g/mL) 범위 안에서 100%에 가까운 세포 생존율을 확인할 수 있었다. 미생물 10 종에 대한 항균 활성 실험에서는 잎과 열매 에센셜 오일 대부분이 활성을 나타냈으나 잎 에센셜 오일에서 보다 좋은 항균효과를 나타내었다. 여드름 균인 *P. acnes* 중 clindamycin에 대한 항생제 내성균인 CCARM9009에서 잎과 열매 오일 둘 다 좋은 활성을 나타냄을 확인하였다.

복분자 딸기, 겨울딸기 추출물 및 순비기나무에서 추출한 에센셜 오일은 천연 항염증, 항산화, 항균 활성이 있는 기능성 화장품 소재로의 가능성을 제시하고 있으며, 본 연구에서 나타난 결과를 통해 화장품 산업에 응용하기 위한 기초적인 정보를 제시할 수 있다.

제주도는 건강뷰티 생물산업을 전략적으로 육성하고 있고, 조례 및 인증제도 시행 등으로 화장품 소재공급 거점화를 위한 노력을 지속하고 있다. 이러한 제도적 움직임과 급변하는 화장품 시장 변화에 맞추어 지속적인 천연 원료의 개발과 이를 통한 화장품 생산을 통해 소비자의 아름다움과 젊음을 추구하는 기대심리에 부응하기 위한 기술력 확보가 필요할 것으로 사료된다.

## VI. 참고문헌

- 강태진 (2011) 피부 노화의 원인. *BioWave* 13(3), 1-15.
- 경기열 (2010) 기능성화장품 연구개발 동향. *KIC News* 13(4), 1-10.
- 김경영, 배유경, 이은주, 김수미, 김은애, 송다해, 안경민, 최수기 (2019) 에센스 화장품학. 메디시언.
- 김중평, 유익동 (1998) 노화억제를 위한 항산화제 연구. *생명공학동향* 62, 25-36.
- 김혜원 (2019) 피부면역과 피부장벽. *J. Skin Barrier Res.* 21(1), 53.
- 박외숙 (2014) 화장품 과학. 자유아카데미.
- 박장서, 김지현 (2019) 필(必)환경시대 뷰티헬스케어 개발 트렌드. *Bio Economy Report*. 한국바이오경제연구센터.
- 식품의약품안전처 (2019) 화장품법 (법률 제16298호). 한국법제연구원.
- 이봉진 (2017) 기능성 화장품 시장동향. *KIC News* 20(3), 46-47.
- 이아름 (2017) 코스메슈티컬(Cosmeceutical) 산업동향. *융합 Weekly TIP (Technology Industry Policy)*. 융합정책연구센터.
- 임수진, 박순만, 유재성 (2017) 코스메슈티컬(Cosmeceutical) 기본 시장 동향. *보건산업브리프* 257. 한국보건산업진흥원.
- 정삼철, 김봉우, 김대용, 남개원, 조석철 (2014) 충북 유기농 화장품 산업 발전방안. *미래기획 연구총서* 14-01. 충북연구원.
- 조은경 (2015) 피부 면역과 면역인자들에 의한 피부 생리 조절. *분자세포생물학 뉴스레터* 2015-4.
- 조진우, 조동현, 김용호 (2019) 나노복합소재를 이용한 천연활성물질 기반 고기능성 화장품. *KEID PD Issue Report* 19-3. 한국산업기술평가관리원.
- 光正武夫 (2004) 新化粧品學. 南山堂.
- Ahn, S., Yi, E. (2017) A study on textile design for infant and children's clothes with the motive of Jeju natural resource persimmon. *Res. J. Costume Cult.* 25(6), 741-756.

- Alfadda, A.A., Sallam R.M. (2012) Reactive oxygen species in health and disease. *Biomed. Res. Int.* ID 936486.
- Allen, R.G., Tresini, M. (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 28(3), 463-499.
- Apel, K., Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 55, 373-399.
- Bae, G.H. (2000) The Medicinal Plants of Korea. *Kyohak Publishing Co., Ltd*, Seoul, Korea.
- Baldwin, A.S.Jr. (1996) The NF- $\kappa$ B and I  $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 649-683.
- Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nat.* 81, 1199 - 1200.
- Bobinaitė, R., Viškelis, P., Venskutonis, P.R. (2012) Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid, and radical scavenging capacity in various raspberry (*Rubus* spp.) cultivars. *Food Chem.* 132(3), 1495-1501.
- Bogdan, C. (2015) Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. *Trends Immunol.* 36(3), 161-178.
- Cha, H.S., Park, M.S., Park, K.M. (2001) Physiological activities of *Rubus coreanus* Miquel. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 33(4), 409-415.
- Cheon, S., Joe, W., Kim, Y., Jang, M., Sung, J., Kang, B., Choi, E., Son, J., Back, W., Lee, C., An, B., Lee, J. (2006) Study on the anti-oxidant and cosmeceutical activity of *Taraxacum platycarpum*. *Kor. J. Herbol.* 21(4), 109-113.
- Cho, Y. (2011) Characteristics of cosmetic with whitening compounds from phellodendron amurense. *J. Appl. Biol. Chem.* 54(2), 108-113.
- Choe, S.Y., Yang, K.H. (1982) Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Kor. J. Food Sci. Biotechnol.* 14(3), 283-288.

- Choi, E.J., Cho, H.B., Yoon, H.S. (2012) Developments of culture media for human skin stem cell, and evaluation of efficacy of cosmetics containing culture media. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 10(4), 949-960.
- Choi, J., Lee, K.T., Ha, J., Yun, S.Y., Ko, C.D., Jung, H.J. Park, H.J. (2003) Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentonic acid obtained from *Rubus coreanus*. *Biol. Pharm. Bull.* 26(10), 1436-1441.
- Choi, J.K., Cha, D.S., Lee, Y.J., Ko, S.H., Park, H.J., Lee, S.Y., Choi, J.H., Jeon, H. (2010) Effects of *Vitex rotundifolia* on radical scavenging and nitric oxide production. *Orien. Pharm. Experiment. Med.* 10(2), 51-58.
- Crane, B.R., Arvai, A.S, Ghosh, D.K., Wu, C., Getzoff, E.D., Stuehr, D.J., Tainer, J.A. (1998) Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Sci.* 279(5359), 2121-2126.
- Cui, Y.R., Kim, H., Je, J., Wang, L., Oh, J., Jia, L., Jeon, Y. (2019) Protective Effects of Antioxidant Active Fractions Derived from the Edible Seaweed *Hizikia fusiformis* in Oxidatively Stressed Human Dermal Fibroblasts. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* 52(1), 35-42.
- Denizot, F., Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89(2), 271-277.
- Dreno, B., Araviiskaia, E., Berardesca, E., Bieber, T., Hawk, J., Sanchez-Viera, M., Wolkenstein, P. (2014) The science of dermocosmetics and its role in dermatology. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 28(11), 1409-1417.
- Farage, M.A., Miller, K.W., Elsner, P., Maibach, H.I. (2008) Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Inter. J. Cosmetic Sci.* 30(2), 87 - 95.
- Garthwaite, J. (2010) New insight into the functioning of nitric oxide receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. *Mol. Cell Biochem.* 334(1-2), 221-232.

- Ghosh, S., Hayden, H.S., (2008) New regulators of NF- $\kappa$ B in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 837-848.
- Guerrero, D. (2011) Dermocosmetic management of the red face and rosacea. *Ann. Dermatol. Venereol.* 138(3), 215-218.
- Guzik, T.J., Korbust, R. Adamek-guzik, T. (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol Pharmacol.* 54(4), 469-487.
- Halliwell, B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 33-50.
- Hofseth, L.J., Ying, L. (2006) Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis. *Biochim. Biophys Acta.* 1765(1), 74-84.
- Hu, Y., Hou, T.T., Xin, H.L., Zhang, Q.Y., Zheng, H.C., Rahman, K., Qin, L.P. (2007) Estrogen-like activity of volatile components from *Vitex rotundifolia* L. *Indian J. Med. Res.* 126(1), 68-73.
- Iwalewa, E.O., McGaw, L.J., Naidoo, Y., Eloff, J.N. (2007) Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of south african origin used to treat pain and inflammatory conditions. *Afr. J. Biotechnol.* 6(25), 2868-2885.
- Jang, S.I., Jun, C.S., Kwak, K.C., Bae, M.S., Lee, J.H., Kim, K.Y., Yun, Y.G., Chai, G.Y. (2006) Evaluation of korean phytomedicinal plants on inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production and cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-stimulated U937 cells. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* 20(2), 455~459.
- Jang, S.J., Kim Y.H., Kim, M.K., Kim K.W., Yun, S.E. (2002) Essential Oil Composition from Leaves, Flowers, Stems, and Fruits of *Vitex rotundifolia* L. fil. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 45(2), 101-107.
- Jeon, M., Kim, E., Kim, G., Lee, S., Jung, I., Kim, S., Kim, Y. (2018) Whitening Effect and Skin Regeneration Effect of Red Sea Cucumber Extract. *J. Life Sci.* 28(6), 681-687.

- Jeon, M.J., Lim, E.G., Kim, G.Y., Lee, S.J., Jung, I.C., Kim, S., Kim, Y.M. (2017) Anti-inflammatory Effects and Improving Atopic Dermatitis of Ethanol Extracts of Red Sea Cucumber. *Kor. Soc. Biotech. Bioeng. J.* 32(4), 335-341.
- Jeong, H.R., Sung, M.S., Kim, Y.H., Ham, H.M., Choi, Y.M., Lee, J.S. (2012) Anti-Inflammatory Activity of *Salvia plebeia* R. Br. Leaf through Heme Oxygenase-1 Induction in LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages. *J. Kor. Soc Food Sci Nutr.* 41(7), 888-894.
- Jeong, J.B., Hong, S.C., Jeong, H.J., Koo, J.S. (2012) Antiinflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Kor. J. Plant Res.* 25(3), 299-307.
- Ji, J.D., Lee, Y.H., Song, G.G. (2004) Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>): Roles in immune responses and inflammation. *J. Rheum. Dis.* 11(4), 307-316.
- Joo, E.Y., Lee, Y.S., Kim, N.W. (2007) Polyphenol compound contents and physiological activities in various extracts of the *Vitex rotundifolia* stems. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 36(7), 813-818.
- Joshi, L.S., Pawar, H.A. (2015) Herbal cosmeticss and cosmeceuticals: an overview. *Nat. Prod. Chem. Res.* 3(2), 170.
- Jung, K.I., Kim, B.K., Kang, J.H., Oh, G.H., Kim, I.K., Kim, M. (2019) Antioxidant and anti-inflammatory activities of water and the fermentation liquid of sea tangle (*Saccharina japonica*). *J. Life Sci.* 29(5), 596-606.
- Kadunc, B., Palermo, E., Addor, F., Metsavaht, L., Rabello, L., Mattos, R. Martins, S. (2013) Tratado de cirurgia dermatoló gica, cosmiatria e laser da sociedade Brasileira de dermatologia. 2nd ed. Rio de Janeiro: Elsevier Health Sciences.
- Kang, I.H., Cha, J.H, Han, J.H., Lee, S.W., Kim, H.J., Kwon, S.H., Whang, W. K. (2005) Isolation of anti-oxidant from domestic *Crataegus pinnatifida* B

- unge leaves. *Kor. J. Pharmacogn.* 36(2), 121-128.
- Kang, Y.K., Ko, M.R., Kang, S.Y., Riu, K.Z. (2005) Several factors affecting to rooting of stem cuttings in *Rubus Buergeri* Miquel. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 13(3), 77-80.
- Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A. Farnarier, C. (2003) IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* 24(1), 25-29.
- Karadeniz, F., Kim, J., Ahn, B.N., Kwon, M.S., Kong, C.S. (2014) Effect of *Sa licornia herbacea* on Osteoblastogenesis and Adipogenesis in Vitro. *Mar. drugs* 12(10), 5132-5147.
- Kim, C., Bu, H.J., Lee, S.J., Hyun, C.G., Lee, N.H. (2014) Chemical compositions and anti-inflammatory activities of essential oils from *Aster spathulifolius* and *Vitex rotundifolia maxim.* *J. App. Pharm. Sci.* 4(10), 12-15.
- Kim, C.S., Song, T.G. (1983) Ecological studies on the halophyte communities at western and southern coasts in Korea. *Kor. J. Ecol.* 6(3), 167-176.
- Kim, K.E., Cho, D., Park, H.J. (2016) Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. *J. Life Sci.* 152(1), 126-134.
- Kim, H.J., Na, Y.K. (2009) The effect of brand loyalty on customer-brand relationship quality, brand trust, identification. *J. Kor. Soc. Cosmetol.* 15(4), 1179-1191.
- Kim, I.H., Lee, J.H. (2018) Cosmetic Effects of Ethanol Extract from the Drumstick-tree, *Moringa oleifera* Leaf. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* 33(1), 34-40.
- Kim, J. (2012) A study on cosmeceuticals usage actual condition and purchasing behavior of female undergraduates. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* 38(4), 339-356.
- Kim, J.E., Lee, S., Yoo, K.M., Lee, K.H., Kim, K.T., Lee, M.H., Hwang, I.K. (2014) Quality characteristics of ginseng seed oil obtained by different ex



- traction methods. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 43(3), 439-445.
- Kim, J.M., Jeon, S.W., Lee, G.W., Nam, H.J., Kim, Y.B. (2010). Study of preventing method for skin aging and wrinkles. *Kor. J. Physiol. Pathol.* 24(4), 533-542.
- Kim, L.S., Youn, S.H., Kim, J.Y. (2014) Comparative study on antioxidant effects of extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 43(9), 1357-1362.
- Kim, M. (2018) Anti-oxidant and Anti-inflammatory Potentials of *Sasa quelpaertensis* Leaf Residue Extracts. *J. Life Sci.* 28(6), 738-744.
- Kim, M.J., Chung, Y.C., Kim, S.S., Lim, C.K., Park, K.J., Choi, Y.H., Park, T.J., Kim S.Y., Hyun, C.G. (2019) Anti-inflammatory effect of *Sechium edule* extract in LPS-stimulated RAW 264.7 cells via p-JNK and p-p38 down-regulation. *Kor. Soc. Biotech. Bioeng. J.* 34(2): 99-106.
- Kim, M.S., Pang, G.C., Lee, M.W. (1997) Flavonoids from the leaves of *Rubus coreanus*. *Yakhak Hoeji.* 41(1), 1-6.
- Kim, S.H., Jung, H., Shin, Y.C., Ko, S.G. (2008) Research of traditional herbal medicine for anti-aging, inhibition effect of wrinkle and whitening effect in the skin. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* 22(3), 691-698.
- Kim, S.M., Na, M.S. (2013). Physicochemical properties and antioxidative activities of Rapeseed meal. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng.* 28(2), 92-98.
- Kim, T.G., Kang, S.Y., Jung, K.K, Kang, J.H., Lee, E., Han, H.M., Kim, S.H. (2001) Antiviral activities of extracts isolated from *Terminalis chebula* Retz., *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* Miq., and *Rheum palmatum* L. against hepatitis B virus. *Phytother. Res.* 15(8), 718-720.
- Kim, Y.S., Lee, S.J., Hwang, J.W., Kim, E.H., Park, P.J., Jeong, H.H. (2012) Anti-inflammatory effects of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves on RAW 264.7 macrophages. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 41(9), 1205-1210.
- Kimura, T., But, P.P.H., Guo, J.X., Sung, C.K., Han, B.H (1996) In internation

- al collation of traditional and folk medicine. *World Scientific*. Singapore.
- Kligman, A. (2005) The future of cosmeceuticals: an interview with Albert Kligman, MD, PhD. Interview by Zoe Diana Draelos.
- Knowles, R.G., Mocada S. (1992) Nitric oxide as signal in blood vessels. *TIB* S. 17, 399-402.
- Ku, C.S., Mun, S.P. (2008) Antioxidant activities of ethanol extracts from seeds in fresh Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) and wine processing waste. *Bioresour Technol.* 99(10), 4503-4509.
- Kujala, T.S., Loponen, J.M., Klika, K.D., Pihlaja, K. (2000) Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta v ulgaris*) root: Distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48(11), 5338-5342.
- Lee, B.M., Kwon, S.B., An, S., Ahn, K.J. An, I. (2013) The guideline of cosmetics' labels and advertisements and regulations for verification in Korea. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 11(1), 11-15.
- Lee, E.J., Whang, E.Y., Whang, K., Lee, I.S., Yang, S.A. (2009) Anti-allergic effect of *Zizania latifolia* turcz Extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 41(6), 717-721.
- Lee, G.T., Kwon, J.Y., Bae, D.J., Yu, C.S., Lee, M.H., Oh, S.R., Jang, D.I. (2005) Development of cosmeceutical cosmetics using enzyme bio-conversion system. *J. Soc. Cosmet. Scientist Korea* 31(1), 111-114.
- Lee, H., Park, K. (2000) Segmentation of the Cosmeceuticals Market: Based on Consumer Usage Behavior. *J. Kor. Soc. Cloth. Text.* 24(4), 560-570.
- Lee, H.H., Moon, Y.S., Yun, H.K., Park, P.J. Kwak, E.J. (2014) Contents of bioactive constituents and antioxidant activities of cultivated and wild raspberries. *Kor. J. Hortic. Sci.* 32(1), 115-122.
- Lee, J.Y., Yoo, D.H., Jeong, Y.S., Joo, S.H., Chae, J.W. (2018) Verification of Anti-inflammatory Activities of the Ethanol Extracts of *Glechoma hederacea* var. *longituba* in RAW 264.7 Cells. *J. Life Sci.* 28(4), 429-434.

- Lee, S.H., Lee, M.S. (2017) The research on antioxidative effect of *Sasa quelpaertensis* extractum and assessment of cytotoxicity. *J. Korea Academia-Ind. cooperat. Soc.* 18(3), 687-693.
- Lee, T.B (1998) In Illustrated Flora of Korea. *Hyangmoonsa*. Seoul.
- Lee, Y.S., Yoon, J, Kim, B., Park, C.I., Yoo, W.K., Cho, J.W. Kim, M.R. (2013) Effects of Horse oil on the DNCB-induced Contact Hypersensitivity in Balb/c Mice. *Kor. J. Herbol.* 28(4), 77-81.
- Lephart, E. (2018) Equol's anti-aging effects protect against environmental assaults by increasing skin antioxidant defense and ECM proteins while decreasing oxidative stress and inflammation. *Cosmetics* 5(16), 1-17.
- Lew, W. (2002) Psoriasis as a T-cell-mediated Immunologic Disease. *Immune Network* 2(4), 189-194.
- Ligade, V.S., Udupa, N. (2010) Pharmaceuticals, cosmeceuticals and nutraceuticals: An overview of regulation 1<sup>st</sup> Ed. *Career Publication*. Maryland.
- Lim, S.H., Lee, E.H., Park, D.H. (2016). Effectiveness assessment of water-extract of some esculent plants based on functional compounds and physiological activity. *J. Kor. Soc. Cosmetol.* 22(4), 653-659.
- Machado, A.P.D.F., Pasquel-Reátegui, J.L., Barbero, G.F., Martínez, J. (2015) Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food. Res. Int.* 77(3), 675-683.
- Madamanchi, N.R., Hakim, Z.S., Runge, M.S. (2005) Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: The disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J. Thromb. Haemost.* 3(2), 254-267.
- Masaki H., Sakaki, S., Atsumi, T., Sakurai, H. (1995) Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* 18(1), 162-166.
- Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Manning, P.T., Hauser, S.D., Leahy, K.M., Smith, W.G., Seibert, K. (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci.* 91(8), 3228–3232.
- McDaniel, M.L., Kwon, G., Hill, J.R., Marshall, C.A., Corbett, J.A. (1996) Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211(1), 24–32.
- McDougall, G.J., Martinussen, I., Junttila, O., Verrall, S., Stewart, D. (2011) Assessing the influence of genotype and temperature on polyphenol composition in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) using a novel mass spectrometric method. *J. Agric. Food Chem.* 59(20), 10860–10868.
- Medzhitov, R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nat.* 454, 428–435.
- Misko, T.P., Schilling, R., Salvemini, D., Moore, W., Currie, M. (1993) A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal. Biochem.* 214(1), 11–16.
- Mitscher, L.A., Park, Y.H., Clark, D., Beal, J.L. (1980) Antimicrobial agents from higher plants. Antimicrobial isoflavanoids and related substances from *Glycyrrhiza glabra* L. var. *typica*. *J. Nat. Products* 43(2), 259–269.
- Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S.I. Kameoka, H. (1995) Antimutagenic activity of (+)-polyalthic acid from *Vitex rotundifolia*. *J. Agricult. Food Chem.* 43(12), 3012–3015.
- Mo, J., Oh, S. (2013) Tyrosinase inhibitory activity and melanin production inhibitory activity of the methanol extract and fractions from *Dendropanax morbilifera* Lev. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 11(2), 275–280.
- Mogensen, T.H. (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(2), 240–273.
- Monacada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109–142.
- Murphy, M.P. (1999) Nitric oxide and cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 1411(2–3), 401–414.
- Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FA*

- SEB J.* 6(12), 3051-3064.
- Ninnemann, J.L. (1984) Prostaglandins in inflammation and disease. *Immunol. today* 5(6), 173-175.
- Okuyama, E., Fujimori, S., Yamazaki, M., Deyama, T. (1998) Pharmacologically Active Components of *Vitex rotundifolia*. II. The Component Having Analgesic Effects. *Chem. Pharm. bull.* 46(4), 655-662.
- Ono, M., Yamamoto, M., Masuoka, C., Ito, Y., Yamashita, M., Nohara, T. (1999) Diterpenes from the fruits of *Vitex rotundifolia*. *J. Nat. products* 62(11), 1532-1537.
- Orbis Research (2019) Global Insights on Emerging Trends, Product Type (Skin Care, Hair Care & Lip Care), Distribution Channel, Key Strategies & Growth Prospect.
- Paik, Y.H., Schwabe, R.F., Bataller, R., Russo, M.P., Jobin, C., Brenner, D. (2003) Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 37(5), 1043-1055.
- Pandey, A., Sonthalia, S. (2019) Cosmeceuticals. *StatPearls Publishing*. Treasure Island. Florida.
- Park, J. An, B., Lee, J., Park, T., Kwon, O., Son A., Cho, Y., Hyun, S., Kim, H., Kim, D. (2008) A Study on the cosmeceutical activities of *Prunus Sargentii* R. *Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 51(1), 70-78.
- Park, S.A., Lee, H.M., Ha, J.H., Jeon, S.H., Park, S.N. (2014) Inhibitory effects of *Dendropanax morbiifera* leaf extracts on melanogenesis through down-regulation of tyrosinase and trp-2. *Appl. Chem. Eng.* 25(5), 468-473.
- Park, S.M., Byun, S.H., Kim, Y.W., Cho, I.J., Kim, S.C. (2012) Inhibitory effect of Mori Folium ethanol extract on proinflammatory mediator in lipopolysaccharide activated RAW 264.7 cells. *Kor. J. Herbol.* 27(3), 31-38.

- Park, S.S., Sung, S.H., Ryu, Y.B., Cho, Y.U., Park, K.H., Gal, S.W. (2008) Growth inhibition of *Propionibacterium acnes* by mycelial culture broth of *Paezilomyces japonica* in the Mulberry leaf extract. *J. Mushroom Sci. Prod.* 6(2), 99-100.
- Que, F., Mao, L., Zhu, C., Xie, G. (2006) Antioxidant properties of Chinese yellow wine, its concentrate, and volatiles. *Lwt. Food Sci. Technol.* 39(2), 111-117.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 266(7), 4244-4250.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26(9-10), 1231-1237.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal B.B. (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49(11), 1603-1616.
- Rice-Evans, C. Miller, N., Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2(4), 152-159.
- Rodrigo, F.G., Gomes, M.M., Silva, A.M., Lopes, P. (2010) *Dermatologia*. 4th ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Saha, R. (2012) Cosmeceuticals and herbal drugs: practical uses. *Inter. J. Pharm. Sci. Res.* 3(1), 59-65.
- Schwartz, R.A., Janusz, C.A., Janniger, C.K. (2006) Seborrheic dermatitis: an overview. *Am. Fam. Physician* 74(1), 125 - 130.
- Seo, C.R., Ha, T.H., Moon, J.Y., Kim, J.M., Park, B.K., Lee, J.W., Park, J.O., Shin, J.H. (2018). Protective effect of cosmetics containing red beet against cigarette smoke-induced oxidative damage in human skin. *J. Soc. Cosmet. Scientist Korea* 44(2), 111-116.
- Seol, N.G., Jang, E.Y., Sung, J.H., Moon, G.W., Lee, J. (2012) Antioxidant

- capacities of Aloe vera (*Aloe vera* Linne) from Jeju Island, Korea. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 44(5), 643-647.
- Shah, F., Sarheed, O., Ramesh, K.V.R. (2017) A Prospective Study of Knowledge and Perception towards the Efficacy of Anti-Aging Cosmetics among Female Population of Ras Al Khaimah, UAE. *J. Cosmet. Dermatol. Sci. Appl.* 7(3), 275-289.
- Shao, J., Y. Li, Z. Wang, M. Xiao, P. Yin, Y. Lu, X. Qian, Y. Xu, and J. Liu (2013) A novel naphthalimide derivative, exhibited anti-inflammatory effects via targeted-inhibiting TAK1 following down-regulation of ERK1/2- and p38 MAPK-mediated activation of NF- $\kappa$ B in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 17(2), 216-228.
- Shin, E.H. (2019) Chemical properties and antioxidants ability of sword bean (*Canavalia gladiata*) pod extract. *Culi. Sci. Hos. Res.* 25(8), 127-134.
- Sohn, H.Y., Kim, Y.S., Kum, E.J., Kwon, Y.S., & Son, K.H. (2006) Screening of anti-acne activity of natural products against *Propionibacterium acne s.* *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 34(3) 265-272.
- Stagos, D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., Panagoulis, C., Reri, E., Skaltsounis, L., Tsatsakis, A., Kouretas, D. (2012) Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic lamiaceae species. *Food Chem Toxicol.* 50(11), 4115-4124.
- Thiem, B., Goślińska O. (2004) Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves. *Fitoterapia* 75(1), 93-95.
- Tosun, M., Ercisli, S., Karlidag, H., Sengul, M. (2009) Characterization of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) genotypes for their physicochemical properties. *J. Food Sci.* 74(7), 575-579.
- Van den Berg, R., Haenen, G.R., van den Berg, H., Bast, A.A.L.T. (1999) Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity

- (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 66(4), 511-517.
- Venskutonis, P.R., Dvaranauskaite, A., Labokas, J. (2007) Radical scavenging activity and composition of raspberry (*Rubus idaeus*) leaves from different locations in Lithuania. *Fitoterapia* 78(2), 162-165.
- Vlassara, H. (2005) Advanced glycation in health and disease role of the modern environment. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1043(1), 452-460.
- Weon, J.B., Ahn, J.H., Ma, C.J. (2011) Antibacterial Activity of Some Medicinal Plants against *Propionibacterium acnes*. *Kor. J. Pharmacogn.* 42(1) 98-101.
- Wolff, E.F., Narayan, D., Taylor, H.S. (2005) Long term effects of hormone therapy on skin rigidity and wrinkles. *Fertil. Steril.* 84(2), 285 - 288.
- Woo, Y.M., Kim, O.J., Jo, E.S., Jo, M.Y., Ahn, M.Y., Lee, S.H., Kim, A. (2018) Enhancement of the anti-inflammatory activities of *Aralia continentalis* Kitagawa extracts fermented by *Lactobacillus plantarum*. *J. Life Sci.* 28(12), 1438-1447.
- Worwood, V.A. (2016) The Complete Book of Essential Oils and Aromatherapy, Revised and Expanded: Over 800 Natural, Nontoxic, and Fragrant Recipes to Create Health, Beauty, and Safe Home and Work Environments. *New World Library*. San Francisco. CA.
- Yang, H.M., Lim, S.S., Lee, Y.S., Shin, H.K., Oh, Y.S., Kim, J.K. (2007) Comparison of the anti-inflammatory effects of the extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 39(3), 342-347.
- Yeoh, Y., Kang, S.S., Chung, H.G., Chung, M.S., Chung, M.G. (1996) Genetic and clonal diversity in Korean populations of *Vitex rotundifolia* (Verbenaceae). *J. Plant Res.* 109(2), 161-168.
- Yeom, M.J., Choi, B.H., Han, D.O., Lee, H.J., Shim, I.S., Kim, S.H., Hahm, D.H. (2004) In Vitro inhibition of pro-inflammatory mediator mRNA



- expression by Nephrite in lipopolysaccharide-induced mouse macrophage cells. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* 18(6), 1622-1627.
- Yoon, M.Y., Pyo, Y.H. (2013) A Study on the Aloe vera extract as the Anti-aging Cosmetic Ingredient. *J. Kor. Soc. Cosmetol.* 19(5), 931-936.
- You, K.M., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P. (1998) Vitexicarpin, a flavonoid from the fruits of *Vitex rotundifolia*, inhibits mouse lymphocyte proliferation and growth of cell lines in vitro. *Planta Medica* 64(06), 546-550.
- Yuk, C.S. (1990) Coloured Medicinal Plants of Korea. *Academy Publishing Co., Ltd.* Seoul, Korea.
- Yun, H.J., Heo, S.K., Lee, Y.T., Park, W.H., Park, S.D. (2008) Anti-inflammatory Effect of Evodia Officinalis DODE in Mouse Macrophage and Human Vascular Endothelial Cells. *Kor. J. Herbol.* 23(1), 29-38.
- Zhang, L., Li, J., Hogan, S., Chung, H., Welbaum, G.E., Zhou, K. (2010) Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chem.* 119(2), 592-599.
- Zhao, Y., Wang, X., Wang, H., Liu, T., Xin, Z. (2014) Two new noroleanane-type triterpene saponins from the methanol extract of *Salicornia herbacea*. *Food Chem.* 151(15), 101-109.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. Jianming, W. (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64(4), 555-559.
- Zia-Ul-Haq, M., Riaz, M., De Feo, V., Jaafar, H., Moga, M. (2014) *Rubus fruticosus* L.: constituents, biological activities and health related uses. *Molecules.* 19(8), 10998-11029.

## 감사의 글

나이는 숫자에 불과하다 하는 마음으로 늦은 박사학위논문을 쓰게 되었습니다. 부족한 점들이 많았지만 여러분들의 큰 도움으로 시작과 마무리를 잘할 수 있었습니다.

열정으로 회사를 키우며 배움의 열망을 갖고 하나씩 하나씩 터득하며 오늘 열심히 살아가고 있습니다.

저와 함께하고 도와주신 모든 분들에게 인사를 드리고 싶습니다.

고인이 되신 故 정동기 교수님의 따뜻한 보살핌으로 지금까지 학문의 길을 걸을 수 있었습니다. 하늘에서도 기뻐하실 것이라 믿습니다. 감사합니다. 또한 부족한 저를 지도학생으로 선택 받아 주신 제주대학교 류연철 교수님께도 감사의 말씀 드립니다. 석사과정으로 진학하여 늦은 공부를 다시 시작하게 해준 경남과학기술대학교 조광근 교수님, 그리고 제가 일과 연구 모두 매진할 수 있도록 방향을 잡아주신 제주대학교 현창구 교수님, 선문대학교 김승영 교수님과, 박사학위논문 심사위원장 제주대학교 이왕식 교수님, 심사위원 제주대학교 민태선 교수님, 충남대학교 송민호 교수님, 중앙대학교 김준모 교수님께도 감사의 말씀 드립니다.

오래 전 고등학교를 졸업한 후 다니던 대학을 중도 휴학 하여 늘 학업을 마무리 하고 싶던 아쉬움이 그동안 한으로 남았습니다. 다시 공부를 하니 늦은 나이에나마 최고의 업적인 박사학위논문을 쓸 수 있는 날이 왔고, 이 자리에 설 수 있었습니다. 너무도 감사하고 행복합니다.

10년 6개월 동안 지켜봐주시고 용기와 힘을 준 사랑하는 남편과 아들, 딸과 그 밖에 도와주신 많은 분들에게 이 논문을 바칩니다.