

**Essential oil과 polyphenol 화합물을 이용한
실버세대의 체취 개선용 소취-기능성
기초 화장품 개발**

Development of deodorizing cosmetics for the aged
using essential oil and polyphenol compounds

순천대학교 산학협력단

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Essential oil과 polyphenol 화합물을 이용한 실버세대의 체취 개선용 소취-기능성 기초 화장품 개발에 관한 연구” 과제(세부과제 “소취활성 천연물 소재 스크리닝 및 피부 기능성 분석”, “기능성 화장품의 피부 안정성 효능 임상평가”, “화장품 포장, 용기 디자인 설계 및 시제품 제조”)의 보고서로 제출합니다.

201 년 월 일

주관연구기관명 : 순천대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 송 원 섭

세부연구책임자 : 송 원 섭

연 구 원 : 임 요 섭

협동연구기관명 : 조선대학교

협동연구책임자 : 이 숙 영

연 구 원 : 이 현 화

연 구 원 : 장 은 숙

협동연구기관명 : 전남대학교 부속병원

협동연구책임자 : 윤 숙 정

연 구 원 : 최 지 영

협동연구기관명 : (주)다랑쉬

협동연구책임자 : 강 남 석

연 구 원 : 김 미 경

요 약 문

I. essential oil과 polyphenol 화합물을 이용한 실버세대의 체취 개선용 소취-기능성 기초 화장품 개발

Development of deodorizing cosmetics for the aged using essential oil and polyphenol compounds

II. 연구개발의 목적 및 필요성(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

본 연구는 노인의 체취를 중심으로 피부분비취(노네날 알데하이드 등)와 지린내(암모니아 등)를 target으로 한 방향성-탈취계 노인전용 미용제품 개발을 목적으로 한다.

- 전남구례군 특산식물(산수유, 옥잠화, 박하, 원추리)로부터 방향성 소재 및 polyphenol 함유 소재 선발
- polyphenol 화합물 함유 추출물 조제 및 essential oil 추출
- 분리된 추출물과 정유의 방향성 및 nonenaldehyde에 대한 탈취력 분석
- 노인냄새 탈취소재와 수분보습·영양보습성 식물소재를 이용한 화장품조성물의 배합 조건 및 제조공정 확립
- 최종 화장품 조성물의 탈취력 및 피부 개선 기능성, 안정성 분석
- 시제품 제조 및 시제품의 피부 안전성, 임상평가
- 시제품의 포장용기 디자인 설계 및 마케팅 전략 구축
- 관련기술에 대한 학술발표 및 특허출원

III. 연구개발 내용 및 범위(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

기초 화장품의 조성물 최적배합조건 및 제조공정 확립

-시제품 조성물의 배합조건 분석 :

* 탈취능 천연물과 수분, 영양보습 천연물을 배합한 화장품 조성물의 제조:

* 기초 화장품 조성물의 개발 범위: 유연화장수, 스킨로션, 영양크림, 에센스, 수분보습 마스크팩, 바디로션

* 피부세포에 대한 독성 시험(안전성 테스트) * 조성물의 피부상재균에 대한 항균활성 분석

* 조성물의 탈취효능 분석: Triangle Test법에 의한 취기의 threshold의 측정, 추출물 및 정유가 취기에 미치는 효과 측정, 탈취력 평가

피부조직의 유해산소대사효소 활성화도 측정(Xanthine oxidase, Superoxide dismutase, Catalase, Glutathione peroxidase, Glutathione S-transferase)

* 조성물의 수분보습, 영양보습력 분석

-시제품 제형별 제조공정 분석 : 각 제형별로 기본공정을 중심으로 탈취소재와 수분, 영양 보습 소재의 첨가량과 첨가시기 등을 결정토록 한다.

-조성물 배합성분의 안정성 평가 : 방향성의 변질 분석, 탈취력의 지속성 분석, 조성물의

색상변화 분석

소취활성 천연물 소재 스크리닝 및 피부 기능성 분석

-산수유, 옥잠화, 원주리, 박하로부터 방향성 및 탈취능 천연물 조제 및 기능성 분석:

* 전남 구례군의 특산식물(산수유 외 3종)로부터 방향성 소재선발 및 정유 분리:

수증기 증류법에 의한 정유 추출

* Polyphenol(축합형 탄닌류) 고함유 소재선발 및 추출물 분리 :

· 식물체로부터 아세톤 추출물의 분리 : 식물 3.5 kg 에 60% acetone을 가하여 실온에서 24 시 간 추출 한 후 원심 분리 (5000X g, 30 min)하여 상정액과 침전물을 얻고, 이 침전물에 다시 60% acetone을 가하여 위와 같은 추출과정을 4회 반복한다. 각각의 상정액을 모아 농축, 여과하여 chlorophyll을 제거하고 rotary evaporator로 농축한 후 acetone 추출물로서 분획을 위한 시료로 사용.

· 탄닌 화합물의 정제 및 동정 : Liphophilic-Sephadex LH-20 column (7x 100 an)과 MCI-gel CHP 20P column (3 x 50 em)을 이용하여 농축 시료를 column부피의 1/20량 주입하고 normal phase type으로서 EtOH을 100%→0%까지 및 reverse phase type~로 MeOH을 100%→0%까지 gradient로 column의 5배 부피의 용매를 Fig. 1과 같이 용출하여 6가지 순수한 탄닌을 분리. 분리된 탄닌은 IR(PERKIN-ELMER IR-1330, U.S.A)은 KBr 정제법으로, 1H-NMR (BRUKER AM-300, Japan)은 TMS[Tetramethylsilane;(CH₃)₄Si]를 기준 물질로 하여 측정용매 CDCl₃+DMSO-D₆+D₂O를 이용하여 측정하고, MS (JEOL JMX-DX 300, Japan)은 negative ion FAB-Masssystem에 의해 분자량을 측정. 분리된 탄닌은 (+)-catechin (A), (-)-epicatechin-3-0-gallate(B), (-)-epigallocatechin-3-0-gallate(C), (+)- gallo- catechin (D), (-)-epigallocatechin (E), procyanidin B-3-3-0-gallate(F)로 동정.

* 피부세포 증식효과 분석: keratinocyte cell(HaCat cell)를 이용한 분석

* 추출물의 항산화활성 분석: DPPH radical 소거능, SOD 활성, APX활성, Catalase 활성

* 추출물의 미백효과 분석: 세포내 멜라닌 생성량 측정 및 멜라닌생성 저해물질 스크리닝

-추출물의 방향성 및 노인냄새 제거능 분석 :

* 정유의 방향성 및 마스킹 효능에 대한 관능검사: 20명의 실험군을 대상으로 8항목으로 구성된 관능평가표에 의하여 방향성 및 마스킹 효능 평가

* Polyphenol 화합물을 함유한 혼합 추출물이 노인의 피부 분비취(노네날 알데하이드)와 배뇨장애 지린내(암모니아 등)의 소취에 미치는 영향 및 관능검사

최종 시제품의 임상평가

-시제품의 피부 안전성 평가: 피부상태가 양호한 지원자 5명을 대상으로 표준화된 기법을 이용하여 단기, 장기 테스트를 한다.

-시제품의 노인냄새 개선효과 평가: 노인냄새의 주요 원인물질인 Nonenaldehyde를 target 으로 하여 5명의 고령자를 대상으로 표준법을 적용하여 시제품의 탈취력을 평가한다.

- 시제품의 피부건조 개선을 위한 수분보습 효능 평가: 음성 대조군과 양성 대조군을 설정하고, 실험군 5명(피부상태가 건조한 고령자를 중심으로)을 대상으로 표준화된 방법을 이용하여 평가한다.
- 시제품의 영양보습 효능 평가: 음성 대조군과 양성 대조군을 설정하고, 실험군 5명(피부상태가 건조하고 각질화가 심한 고령자를 중심으로)을 대상으로 표준화된 방법을 이용하여 평가한다.
- 시제품의 피부가려움증 해소효과 평가: 피부 가려움증이 심한 고령자 5명을 선정하여, 일정부위를 대상으로 1개월 동안 시제품을 처리하여 평가한다.
- 시제품의 각질 제거능 및 피부탄력 개선효과 평가: 70세 이상의 고령자 5명을 선정하여, 각질현상이 심한 부위를 중심으로 1개월 동안 시제품을 처리하여 음성대조군(5명)과 표준법에 준하여 측정, 분석

화장품의 포장, 용기 디자인 설계 및 시제품 제조

-화장품의 포장, 용기 디자인 설계

-pilot plant 스케일의 제조공정 확립 및 시제품 제조: 분산 공정(수용성 점증제: 용해탱크, agi mixer) → 유화 공정(항산화제, 보습제, 고급지방산, 정제수 등: 용해탱크, 열교환기, homo mixer, paddle mixer, 온도기록계, 압력계, 냉각기, 여과장치) → 가용화 공정(보습제, 중화제, 점증제, 수렴제, 산화방지제 등: 용해탱크, agi mixer, 여과장치) → 혼합 공정(식물성 추출물, 기능성 천연물질 등: 혼합기, 믹서, 여과장치) → 분쇄 공정(분체, 결합제, 방부제, 산화방지제, 첨가제, 보습제 등: 분쇄기, 믹서, 여과장치) → 반 제품 제조 → 성형 및 포장 공정(용기, 바킹, 캡, 알루미늄 접시, 케이스, 성형천) → 시제품 생산/ 이상과 같은 기본공정으로 진행하면서, 크림 및 에멀전 타입으로 제형화한 베이스에 천연 추출물 및 생리활성물질의 목적별 첨가기술 개발, 첨가할 기능성 추출물과 천연물의 특성, 안정성 등에 따라 최적배합비율 및 첨가 형태 결정, 천연추출물 혼합 제조시 물성변화 등 특성 구명

-마케팅 전략 구축 :

- * 노인요양원 방문을 통한 시제품의 임상실험 및 제품 홍보:
- * 온라인, 오프라인을 통한 제품 판매

전략 구축 :

- ▶ 식물성 천연화장품의 제품시장 분석 ▶ 국내외 천연화장품 제품의 소비자 반응도 분석
- ▶ 수요시장 분석에 따른 상품화전략 방향설정 ▶ 제품의 목표시장 전략수립
- ▶ 생산제품의 시장확산을 위한 촉진전략 수립 ▶ 제품의 소비자 반응도 분석
- ▶ 제품의 가격 및 제품전략 수립 ▶ 제품의 브랜드 이미지 전략수립
- ▶ 제품의 공격적 마케팅 전략수립 ▶ 제품의 지속적 유지관리 전략수립

IV. 연구개발결과(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

제 1차년도 세부과제 (주관기관)

(1) 산수유, 옥잠화, 원추리, 박하 삼백초, 녹차등의 천연화장료 조성물 제조

-산수유, coenzyme Q10 로션

<수분층> : 글리세린 8.0g, 히드로모이스춰 4.0g, 보존제 0.1g, 젤-에이전트 2.0g

<유분층> : 바이탈에멀전 3.0g, 세토스 2.0g, 저팬왁스 1.0g, 동백유 10.0g, 동백버터 3.0g

<유화 후에 넣는 재료> :

젤-폴리머 12.0g

산수유열매 농축물 3.0g

coenzyme Q10 3.0g

에센셜오일 10방울

-박하, coenzyme Q10 로션

<수분층>

정제수 60.0g

글리세린 8.0g

히드로모이스춰 4.0g

보존제 0.1g

젤-에이전트 2.0g

<유분층>

바이탈에멀전 3.0g

세토스 2.0g

저팬왁스 1.0g

동백유 10.0g

동백버터 3.0g

<유화 후에 넣는 재료>

젤-폴리머 12.0g

박하잎 농축물 3.0g

coenzyme Q10 3.0g

에센셜오일 10방울

-고보습 옥잠화 하이루론산 스킨

<수분층>

정제수 170.0g

솔르졸 3.0g

하이루론산 5.0g

히드로모이스춰 5.0g

<유화 후에 넣는 재료>

리피듀어PMB	3.0g
옥잠화팅크처	20.0g
보존제	0.4g
에센셜오일	12~20방울

-고보습 원추리 하이루론산 스킨

<수분층>

정제수	170.0g
솔르졸	3.0g
하이루론산	5.0g
하이드로모이스취	5.0g

<유화 후에 넣는 재료>

리피듀어PMB	3.0g
원추리팅크처	20.0g
보존제	0.4g
에센셜오일	15~20방울

-산수유 비가열 수분크림

<수분층>

정제수	40.0g
글리세린	6.0g
하이드로모이스취	6.0g
꽃소금	1.0g
산수유열매농축물	5.0g

PM	6.0g
----	------

<유화 후에 넣는 재료>

콜라겐	3.0g
PMB	3.0g
보존제	0.1g
에센셜오일	2~3방울

-박하 비가열 수분크림

<수분층>

정제수	40.0g
글리세린	6.0g
하이드로모이스취	6.0g

꽃소금	1.0g
박하농축물	5.0g

PM	6.0g
----	------

<유화 후에 넣는 재료>

콜라겐	3.0g
PMB	3.0g
보존제	0.1g
아로마오일	2~3방울

-산수유, 박하 노화방지 영양크림

<수분층>

정제수	30.0g
글리세린	5.0g
하이드로모이스춰	3.0g
크림-폴리머	8.0g

<유분층>

크림베이스	9.0g
동백유	4.0g
방부제	0.2g

<유화 후에 넣는 재료>

젤-에이전트	3.0g
산수유열매 농축물	3.0g
박하잎 농축물	3.0g
박하, 옥잠화,라벤더 에센셜오일	각5방울

-산수유, 당귀, 상백피, 녹차 썬 미백 로션

<수분층>

정제수	130.0g
글리세린	8.0g
하이드로모이스춰	8.0g
보존제	0.5g
젤-에이전트	4.0g

<유분층>

바이탈에멀전	5.0g
세토스	4.0g
저펜왁스	2.0g
동백유	8.0g
호호바	7.0g
TiO2	5.0g
자외선흡수제	10.0g

<유화 후에 넣는 재료>

젤-폴리머	30.0g
산수유농축물	3.0g
당귀농축물	3.0g
상백피농축물	3.0g
녹차농축물	3.0g
박하, 라벤다에센셜오일	20방울

-산수유, 삼백초, 상백피, 녹차농축물 미백&노화방지 에센스

<수분층1>

정제수	30.0g
젤-폴리머	15.0g
글리세린	4.0g
하이드로모이스춰	4.0g
보드카	4.0g
보존제	0.1g

<수분층2>

솔르졸	1.0g
아로마오일	3~5방울

<유화 후에 넣는 재료>

젤-에이전트	2.0g
PMB	3.0g
콜라겐	3.0g
산수유, 삼백초, 상백피, 녹차 농축물	8.0g

-산수유, 삼백초, 상백피, 녹차농축물 미백&노화방지 마스크쉬트팩

<수분층>

정제수	60.0g
1%증점제용액	20.0g
하이드로모이스춰	9.0g

글리세린	7.0g
보드카	7.0g
솔르졸	2.0g
에센셜오일	0.2g
보존제	0.3g

<유화 후에 넣는 재료>

PMB	2.0g
콜라겐	2.0g
산수유, 삼백초, 상백피, 녹차농축물	10.0g
캐비어추출물	1.0g

-산수유, 삼백초, 상백피, 녹차농축물 미백&노화방지 peel-off pack

<수분층1>

정제수	7.0g
하이드로모이스춰	5.0g
보존제	0.2g
산수유, 삼백초, 상백피, 녹차농축물	10.0g
코엔자임Q10	3.0g

<수분층2>

아로마오일	5방울
보드카	10.0g
솔르졸	1.0g
필름-폴리머	80.0g

-손 보습, 살균소독액

알로에베라겔	40.0g
무수알콜	60.0g
하이루론산	8.0g
산수유, 삼백초, 어성초, 녹차 농축물	10.0g
레몬 에센셜오일	5방울
라벤더에센셜오일	5방울
박하에센셜오일	5방울
티트리에센셜오일	10~15방울

(2) 산수유, 옥잠화, 원추리, 박하식물의 피부상재균에 대한 항균활성

본 실험에 사용된 재료는 모두 구례군에서 채취한 것을 사용하였다. 채취한 재료들은 모두 그늘에서 완전히 말린 후 methanol, ethanol, CH_2Cl_2 용액에 2주간 침적시키어서 진공냉동 추출을 하였다. 추출된 재료들은 동결건조 시키어서 실험에 이용하였다.

사용된 균주는 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pityrosporum ovale*, *Listeria monocytogens*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Candida albicans* 이다. 해당균주는 모두 한국종균협회에서 분양받아 고체배지에서 실험하였다. 실험배지는 nutrient medium과 trypticase soy medium 이었다. 배양방법은 멸균된 petri dish를 사용하여 각각의 배지에 균주를 접종하고 살균된 paper disc를 배지위에 올려 놓아서 각각의 식물(산수유, 박하, 원추리, 옥잠화)에 농도별로 처리하였다. 배양후 paper disc둘레의 억제띠의 넓이를 조사하였다.

(3) 산수유, 옥잠화, 원추리, 박하식물의 피부세포에 대한 세포독성분석

Human Dermal Fibroblasts 세포를 24시간이상 배양기에서 배양을 한 후 PBS로 세척을 한 다음에 methanol에서 추출한 산수유, 박하, 옥잠화, 원추리식물의 추출물을 각각의 배지에 농도별로 접종을 하였다. CO_2 배양기에서 37°C 에서 24시간동안 배양을 한 후 MTT용액을 처리한 후 37°C 에서 배양하였다. 반응한 formazan을 isopropanol을 처리하여 용해시킨 후 570nm의 흡광도로 분석하였다. 세포 생존율은 대조군과 비교하여 백분율로 표시하였다.

산수유, 박하, 옥잠화, 원추리 추출물을 3가지 농도(5ug/mL, 10ug/mL, 15ug/mL)로 처리 하여 섬유아세포의 생존율에 미치는 영향을 조사하였음. 처리 농도가 많아질수록 모든 처리구에서 세포의 생존율이 높아 졌으며, 특히, 산수유 열매와 박하 전초 추출물에서 가장 세포의 생존율이 높았음. 이러한 결과를 토대로 앞으로 섬유아세포와 각질세포에 대한 세포독성 실험이 필요하며 실버세대의 소취제거 및 피부질환 개선 화장품이 개발되어 산업화 될 수 있을 것으로 판단됨.

(4) 산수유, 옥잠화, 원추리, 박하식물의 자외선 차단 효과

UVA 조사를 이용하여 MMP-1의 발현측정을 함으로써 발현저해 정도를 분석함으로써 발현억제효과를 알아 보고자 하였다. 즉, 자외선 차단 효과를 측정코져 하였다.

UV를 조사하기 이전에 배지를 씻은 후 PBS로 세척한 후에 serum성분을 제거 하였다. UV등에 필터를 처리하여서 UVA를 24시간 쬐였다.

배양배지는 DMEM배지에 진공 고압 추출한 산수유, 옥잠화, 원추리, 박하추출물을 각각 2.0mg/ml 처리하여서 24시간동안 배양하였다.

UVA 조사에 의한 MMP-1의 발현측정은 Dunsmore방법(Dunsmore et al., 1996)을 이용하였으며 산수유열매추출물과 산박하잎 추출물에서 MMP-1 발현저해 효과가 나타나 자외선 차단 효과가 있는 것으로 판단되지만 원추리, 옥잠화의 꽃과 뿌리 추출물에서는 그효과가 아주 미미하였다. 따라서 앞으로 더 많은 실험이 필요하다고 생각되며 추출용매와 특히 추출물들의 고농축에 대한 연구들도 병행되어져야 한다고 판단된다.

제 1차년도 조선대학교(협동과제)

(1) 전남 구례군의 특산식물(산수유 외 3종)로부터 방향성 소재선발 및 정유 분리

essential oil의 추출에는 수증기 증류법, 압착법, 흡수법, 용매 추출법 등 여러 가지 방법이 있으나, 본 실험에서는 수증기 증류법(Hydro distillation)을 이용하여 정유를 추출하였다. 깨끗하게 세척된 식물체를 일정크기로 절단하여 원형플라스크에 증류수와 함께 넣은 후, Fig. 1.과 같이 수증기 증류장치를 이용하여 5시간 동안 수증기 증류하였다. 증류되어 상층에 모아진 essential oil과 수용성 정유성분을 함유한 하층의 floral water를 각각 분리하여 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

박하의 전초로부터 20mL의 정유가 분리 되었으며, 원추리와 옥잠화는 꽃으로부터 정유가 함유된 화장수를 500mL 씩 조제 하였다.

(2) 추출물의 항산화활성 분석(DPPH radical 소거능, SOD 활성, CAT 활성)

① 옥잠화, 비비추, 원추리, 은방울꽃, 산수유의 DPPH radical 소거능 : 산옥잠화, 비비추, 원추리, 은방울꽃, 산수유를 식물 부위별로 추출하여 DPPH radical 소거능을 분석한 결과, 옥잠화의 경우엔 꽃 추출물이 가장 좋은 활성을 보였고, 원추리는 잎 추출물이 뿌리보다 높았으며, 비비추는 매우 저조한 활성을 보였다. 은방울꽃 전초 추출물이 4종의 추출물 중 가장 높은 DPPH radical 소거능을 나타냈다.

② 산수유 꽃, 산수유 열매, 박하의 DPPH radical 소거능

산수유 꽃의 추출물은 Vt C와 비교할 정도로 높은 DPPH radical 소거능을 보였으며, 열매 추출물도 표준물질인 BHT와 유사한 소거능을 나타냈다. 박하 추출물의 경우엔 산수유 열매와 유사하게 표준물질인 BHT와 유사한 소거능을 나타냄을 알 수 있었다.

BHT의 RC50; 198.93 ug/ml, Vt C의 RC50; ≤ 25 ug/ml

③ 항산화 효소의 활성 측정

식물은 고착생활을 하기 때문에 외부 스트레스에 대한 환경적응 능력이 다른 생물체보다 높은 것으로 생각되며, 다른 생물체보다 많은 종류의 항산화 물질을 생산한다. 세포는 세포의 구성성분을 보호하고 산화환원상태를 유지하기 위해 효소학적 및 비효소학적 방어시스템을 지니고 있다. 식물에서 비효소학적 방어시스템에는 천연 항산화제로 알려진 ascorbic acid, glutathione, α -tocopherol, carotenoids 등이 있고, 효소적 방어시스템에는 superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase 등과 같은 효소들이 있다. 박하의 4종의 SOD, APX 그리고 CAT의 항산화 효소 활성 능력을 측정하였다. -효소액 조제 : 각각의 생체시료를 extraction buffer (50mM phosphate buffer, pH 7.0; 1% Triton X-100; 1% PVP-40)에 1:4의 비율로 혼합한 후 균질화 시키고 12000rpm에서 20분동안 원심분리한 다음 상층액을 취하여 항산화 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 albumin을 표준물질로 사용하여 BCA protein assay 방법에 따라 측정하였다.

-Catalase(CAT) 활성 측정 : Catalase활성은 Aebi (1984) 방법에 의하여 측정하였다. 50

mM potassium phosphate (pH 7.0)에 10 mM H₂O₂ 와 반응 효소액을 가하였다. 240nm에서 2 분간의 흡광도 변화를 관찰하고 1분동안에 1uM의 H₂O₂를 분해하는 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

CAT는 생체내의 유해한 산소들을 신속히 처리하여 세포를 보호하는 항산화계 효소로 APX와 함께 H₂O₂를 분해 소거하는 대표적인 효소이다. 산옥잠화잎에서 14.2U/mg protein으로 가장 높게 나왔고 산옥잠화 꽃에서 13.6U/mg protein, 박하와 원추리꽃에서 각각 8.9U/mg protein, 8.8U/mg protein, 원추리 잎에서 7.8U/mg protein으로 낮은 함량을 보였다.

-SOD (Superoxide dismutase) 활성측정 : SOD 활성은 Beauchamp and Fridovich(1971)의 방법을 응용하여 측정하였다. 50 mM carbonic buffer (pH 10.2), 0.1 mM EDTA, 0.1mM Xanthine, 0.025 mM nitroblue tetrazolium(NBT), 효소액이 포함된 용액을 25°C에서 10분간 반응한 후 Xanthine oxidase(3.3 • 10⁻⁶mM)를 참가하여 반응을 측정하였다. SOD 활성 측정은 550nm에 30초 단위로 5분간 흡광도를 측정하였다.

SOD 활성을 측정한 결과 옥잠화 꽃에서 16.8U/mg protein로 가장 높게 나왔고 박하 13.8U/mg protein, 옥잠화 잎과 원추리 꽃에서 각각 13.2U/mg protein, 12.4U/mg protein, 원추리 잎에서 10.9U/mg protein으로 낮은 함량을 보였다.

(3) 추출물의 미백효과 분석

- 백합과식물(옥잠화, 비비추, 원추리, 은방울꽃)의 tyrosinase 활성 저해효과(미백효과) 분석:

산옥잠화 뿌리와 지상부 그리고 은방울꽃 전초의 추출물에서 비교적 좋은 in vitro tyrosinase 저해활성을 보였다.

- 배초향, 구절초, 삼백초, 레몬, 박하로부터 추출한 정유의 tyrosinase 저해활성(미백활성)

이미 분석한 백합속 추출물의 in vitro tyrosinase 저해활성을 보완하기 위한 대체 식물을 조사하기 위하여 배초향, 구절초, 삼백초, 레몬, 박하에서 분리한 정유에 대하여 분석한 결과, 구절초, 레몬, 박하에서 유의할 만한 결과를 얻었다.

- 세포내 멜라닌 생성량 측정 및 멜라닌생성 저해물질 스크리닝 :

멜라닌 세포는 자외선 등과 같은 외적, 내적 자극에 의해 기미, 주근깨, 흑색종 등의 피부질환을 일으킨다. 여성들은 이러한 피부변화에 민감하게 반응하고 피부착색에 대한 관심은 날로 증가하고 있다. 이에 보다 안정적이면서 효과적으로 작용을 할 수 있는 미백 소재에 대한 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구는 옥잠화, 박하, 원추리, 산수유를 이용하여 B16F10 melanoma cell에 멜라닌 생성에 영향을 미치는지 조사하였다.

① 추출물의 세포에 대한 독성 실험 :

B16F10 흑색종세포주를 각 well에 1×10⁴개의 농도로 넣어준 다음 1일 후 각 약물들을 일정농도로 넣어준다. 각 약물을 처리하여 2일째에 MTT 용액(0.5mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 살아있는 세포는 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan침전물이 형성되며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 DMSO를 150μl씩 넣어 용해하여 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

분석결과, 세포 농도가 70% 이상 생존 가능한 추출물의 농도는 100ug/mL 로 나타났으며, 이 농도를 기준으로 melanin 함량 저해능을 분석하였다.

② melanine 생성량 측정

멜라닌은 멜라닌 세포의 세포소기관인 멜라닌소체(melanosome)에서 일련의 효소 반응에 의해 생성된다. 본 실험은 상기의 실험에서 B16F10 세포의 생존에 영향을 미치지 않았던 농도를 결정하여 산수유, 옥잠화, 원추리, 박하 추출물을 대상으로 세포내에서 멜라닌 생성에 미치는 영향을 살펴보았다(Fig.5~8). 멜라닌 정량은 Hosei등 (Hosoi et al., 1985)의 방법을 변형하여 사용하였다. 멜라닌 세포인 B16 흑색종세포를 배양하여 24well plate에 각 well당 세포를 1×10^4 cell/well로 각각의 세포생존율에 따라 농도를 처리한 후 48시간 배양하였다. 48시간 배양한 후 각 well를 PBS로 세척한 후 1% DMSO가 첨가된 1N NaOH 용액으로 60°C에서 1시간 동안 용해하였으며, ELISA reader를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) 추출물이 인간 각질세포(keratinocyte : HaCat Cell)의 세포생존율에 미치는 영향

본 실험에 사용된 세포주는 Skin Keratinocyte의 Hacat cell로 DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium)에 10%(V/V) Fetal Bovine Serum와 항생제(Antibiotic antimycotic)을 첨가한 후 37°C의 배양기에서 배양하였다. 산옥잠화(꽃, 잎, 뿌리), 원추리(전초, 뿌리) 추출물에 대한 세포성장 억제 활성효과는 MTT assay를 통해확인하였다. 96well에 3×10^4 cell/mL의 농도로 접종하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간동안 배양시킨 후 25~800 μ g/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그후 MTT를 처리하여 MTT가 생존 세포의 효소작용에 의해 환원되도록 4시간을 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan결정을 DMSO를 첨가하여 녹인후 540nm에서 흡광도를 측정하여 Cell의 생존율을 구하였다. 산옥잠화 추출물에 의한 효과는 저조하였으나 원추리(전초)추출물의 경우 800 μ g/mL의 농도에서 약 30%의 세포생존율을 저해하였다.

제 2차년도 협동과제

1. 식물추출물로부터 노인피부 분비취(2-nonenal) 생성 억제화합물 분리

노인냄새(2-nonenal) 생성 메카니즘과 항산화 활성물질과의 관계 분석

(1) 인간체취(human body odor)와 관련된 물질

인간의 체취(Human body odor)와 관련된 물질은 매우 다양하며 40대 이전과 이후의 연령 별로 살펴보면 냄새물질의 종류와 양에 상당한 차이가 있음을 알 수 있다. 이 물질 중 40대 이후부터 고령화가 되면서 독특하게 나타나는 노인의 피부 분비취는 aldehyde류 중 2-nonenal이 그 원인 물질임이 밝혀졌다.

(2) 노인냄새 원인물질(2-nonenal)의 구조적 특성 및 불쾌취의 특성

2-nonenal(노인냄새의 원인물질)은 unsaturated aldehyde류이며, 극미량(3-4 ppm)에서도 특이적으로 불쾌한 기름냄새와 풀냄새를 유발하게 된다.

(3) 2-nonenal 생성 & 불포화지방산 & 과산화지질과의 관련성

2-nonenal 생성 & 불포화지방산 & 과산화지질과의 관계를 살펴보면, 사람은 연령이 증가함에 따라 피부표면을 구성하고 있는 지질(skin surface lipids) 중 ω 7 unsaturated fatty acids와 lipid peroxides(과산화지질)가 증가한다 (Fig. 3, 4). 이 중 palmitoleic acid와 과산화지질의 양이 증가 할수록 2-nonenal의 생성량도 증가하게 된다. 즉, palmitoleic acid는 과산화지질에 의하여 산화적으로 분해(oxidative degradation) 되었을 경우, Fig. 5. 와 같은 기작에 의하여 2-nonenal로 변하게 된다.

(4) 2-nonenal의 생성기작

(5) 항산화 활성화합물에 의한 노인냄새(2-nonenal) 생성억제 기작 설계

항산화 활성화합물에 의한 노인냄새(2-nonenal) 생성 억제 : 따라서 본 연구에서는 피부의 불포화지방산인 palmitoleic acid가 과산화지질에 의하여 산화되어지는 것을 억제시키므로써 노인 피부분비취의 생성을 개선하기 위한 방법으로 항산화활성이 높은 식물성 소재로부터 항산화 활성 화합물을 분리, 정제하여 노인냄새 개선 소재로 활용하는 것을 목적으로 하였다.

2. 5종 식물 추출물의 항산화활성 분석

(1) 추출물 조제

- 대상식물 : 산수유, 옥잠화, 원추리, 박하, 은방울꽃

(2) 추출물의 Polyphenol 함량

5종의 폴리페놀 함량을 분석한 결과, Table 2.에서와 같이 박하 추출물에서 가장 높았으며, 산수유의 경우엔 $27.17\mu\text{g}/\text{ml}$, 은방울꽃은 $21.12\mu\text{g}/\text{ml}$, 옥잠화는 $11.71\mu\text{g}/\text{ml}$, 원추리의 경우엔 $8.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 함유되어 있었다.

(3) 추출물의 DPPH radical 소거능

① 산수유(꽃, 열매), 옥잠화(진초), 원추리(잎, 뿌리), 박하(진초), 은방울꽃(진초)의 DPPH radical 소거능 : 5종의 추출물에 대하여 DPPH radical 소거능을 분석한 결과, 산수유 열매과옥

추출물(RC₅₀ : 234.51 ug/ml)이 가장 우수한 활성을 보였으며, 박하 추출물(RC₅₀ : 292.18 ug/ml)과 은방울꽃 추출물(RC₅₀ : 617 ug/ml)도 유의할만한 소거능을 보였다. 나머지 옥잠화, 원추리의 부위별 추출물은 유의할만한 항산화활성을 보이지 않았다.

(4) SOD 유사활성 및 CAT 활성

SOD 활성을 측정한 결과, 산수유 열매(17.8 U/mg)이 우수한 효소활성을 보였으며, 그 밖의 은방울꽃 추출물과 옥잠화 잎, 원추리 잎과 꽃, 박하 추출물은 10.9~13.8 의 범위로 유사한 활성을 나타냈다. (Fig. 12., Table 3.).

CAT 활성을 분석한 결과, 산수유 열매(13.9 U/mg)와 옥잠화 잎 추출물(14.2 U/mg)이 우수한 활성을 보였으며, 은방울꽃과 원추리 잎, 원추리 꽃, 박하 추출물은 7.8~9.8 U/mg의 범위에서 유사한 활성을 나타내었다

3. 산수유 열매로부터 항산화 화합물 분리정제, 구조분석

(1) 추출물의 조제 및 항산화 활성 분석:

- 추출물의 조제 : 건조된 산수유 열매 2 kg에 70% EtOH 15L를 첨가하여 초음파 추출기로 3시간 3회 추출한 후, 여과한 다음 감압농축하여 조추출물 541g 을 얻었다.

- 추출물의 DPPH radical 소거능(백분율) : 산수유 EtOH 추출물에 대하여 농도별(15.5~500ug/ml)로 DPPH radical 소거능을 분석한 결과, 농도가 125ug/ml에서부터 소거능에 대한 유의할 만한 수치를 보였으며 최종농도인 500ug/ml에서는 90% 이상의 소거능을 나타내었다.

(2) 추출물의 용매 분획 및 항산화 활성 분석 :

- 추출물의 용매분획 : 추출물을 90% EtOH 2L에 녹인 다음 hexane을 동량 가한 후 분획할 때기를 이용하여 3회 분획을 하여 불필요한 hexane 층을 제거하고, 90% EtOH층을 다시 농축하여 이를 증류수 1L에 녹인 후, 동량의 ethylacetate(EtOAc)를 가한 후 분획을 3회 실시하여 EtOAc 층을 얻었으며, BuOH에 대하여도 상기와 같은 방법으로 3회씩 분획을 하였다. 용매분획물들에 대하여 활성을 확인하고, TLC 패턴을 조사하였다.

- 용매 분획물의 DPPH radical 소거능(백분율) : 4종의 용매 추출물을 농도별(15.5~500 ug/ml)로 DPPH radical 소거능을 분석한 결과, 모든 농도범위에서 EtOAc 추출물의 활성이 우수하게 나타났으며, hexane 층과 부탄올층은 유사한 활성을 보였고, 물층이 가장 낮은 소거능을 보였다. 용매별로 라디칼 소거능을 IC₅₀ 값으로 비교해보면 EtOAc ext(25.6ug/ml) > BuOH ext(110ug/ml) > Hexane ext(140.6ug/ml) > Water ext(500<ug/ml)의 순으로 나타났다.

- 용매 분획물의 DPPH radical 소거능(IC₅₀ value)

- 용매 분획물의 SOD 유사활성 : 용매별 추출물을 농도별(100~1000 ug/ml)로 SOD 유사활성을 분석한 결과, EtOAc ext > BuOH ext > Hexane ext > Water ext 의 순으로 나타나 상기의 DPPH radical 소거능의 경우와 동일한 결과를 보였다. 특히 EtOAc 추출물의 경우엔 표준물질인 Vt C와 비교했을 때 상당히 우수한 SOD 유사활성을 보였다는 것을 알수 있었다.

- 용매 분획물의 Polyphenol 함량 및 Flavonoid 함량 ;

각각의 용매 추출물에 함유되어있는 polyphenol 함량과 flavonoid 함량을 분석한 결과, EtOAc ext > BuOH ext > Hexane ext > Water ext 의 순으로 나타났으며, EtOAc 추출물이 가장 우수하였다.

(3) 용매 분획 추출물(EtOAc ext)의 silica gel column chromatography

- EtOAc ext의 open column :

각 분획에 대한 활성을 기초로 하여 활성을 나타낸 분획으로부터 Sili-cagel, RP-C₁₈, Sephadex LH 20, Licroprep RP-C₁₈, Toyopearl HW 40 등의 컬럼 충진제를 이용한 컬럼 크로마토그래피 및 MPLC, HPLC, Recycling Prep LC를 이용하여 활성성분을 순수하게 분리하였다.

각 용매의 분획물들(Hexane, EtOAc, BuOH, Water)을 활성 분석한 후, 그 효과가 가장 크게 나타난 분획 추출물로부터 활성성분을 분리하기 위한 1차 단계로 silica gel을 충진제로 사용하여 column chromatography를 수행하였다. 선발된 EtOAc 추출물에 대하여 Hexane : Acetone 용매비율을 10:1 → 9:1 → 8:1 → 6:1 순으로 용출하였으나 용출속도가 너무 늦어 전개용매의 비율을 5:1 → 4:1 → 3:1 → 2:1 순으로 조절하면서 용출하였다. 7개의 fraction을 얻어 TLC로 확인하였다.

(4) 활성이 우수한 fraction(Fr 4)의 RP-C₁₈ column chromatography

Fr 4를 RP로 전개한 결과, 4개의 fractions을 분리함.(4 fraction의 양적확보를 위하여 10회 반복하여 RP를 진행하고 있음.)

활성이 우수한 fraction으로부터 소분획을 얻기 위해 RP-C₁₈을 충진제로 사용하여 column chromatography를 수행하였다. Fraction에 대하여 MeOH : Water 1:3 → 1:2 → 1:1의 용매비율로 분리하여 얻어진 fraction들의 TLC 패턴을 분석하였다.

(5) 각 fraction들의 HPLC profile 비교분석

- HPLC 분석조건 : 컬럼 이동상 용매는 (A) pump HPLC용 MeOH : (B) pump Water(3차 증류수)와 0.1% formic acid을 이용하며 용매비율은 MeOH/Water(30/70/V/V)로 gradient 조절하고, 유속은 1ml/min로 설정하였다. 시료의 주입량은 30ul로 하며 UV 205nm와 254nm로 검출하였다.

- HPLC profile의 비교분석 및 활성 화합물의 분리 정제 : 세분화된 fraction들의 HPLC profile를 비교분석하여 target 화합물의 위치와 분리정제를 위한 기본정보를 확인한 후, 특정 화합물의 순수분리를 위한 과정을 진행하였다.

(6) 항산화 화합물에 의한 palmitoleic acid의 산화저해활성 분석

산수유 분획물 및 화합물의 항산화효과를 분석하기 위하여 palmitoleic acid에 대하여 0.1% BHT와 시료를 0, 10, 30 및 50ul 첨가한 후 50°C에서 7일간 저장하면서 과산화물가를 측정하였는데, 시료를 첨가하지 않은 대조구는 저장 1, 3, 5 및 7일 후에 과산화물기가 60, 117, 140 및 187 meq/kg 이었는데, 0.1% BHT 10ul 첨가시는 9, 23, 30 및 36 meq/kg이었고, 시료를 첨

가한 시험구에서는 10ul 첨가했을 때 11, 33, 36 및 42 meq/kg, 30ul 첨가했을 때는 8, 22, 27 및 30 meq/kg, 50ul 첨가했을 경우엔 6, 20, 22 및 25 meq/kg로 나타났다.

제 3차년도 협동과제(전남대학교 부속병원)

1. 피부 자극도

시험을 완전히 종료한 피시험자 28명을 대상으로 단회칩포시험 후 평가기준에 의거한 피부 자극도의 판독 결과는 아래에 기술한 표 1과 같다. 피부자극반응의 결과를 통해 자극도를 평가할 때 인체피부반응에서 적용되는 세계적인 공통기준은 정해진 바 없으나, 통상 50명 이하의 자원자를 대상으로 하는 시험에서는 단회 칩포시험의 판독시 총자원자의 20%를 초과하는 빈도로 반응이 출현하는 시료 (본 시험의 경우 28명 의 20%인 6명 이상) 혹은 매회 판독시 +2 이상 자극반응이 총 자원자의 10% 초과하여 관찰된 시료 (본 시험의 경우 총 6점 기준 피부자극지수 1.785 이상)는 유의하게 자극을 유발할 가능성이 있는 물질로 간주할 수 있다.

총 28명의 피시험자를 대상으로 시료 16종에 대한 48시간 단회밀폐칩포시험을 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 자극도가 가장 높은 것으로는 시제품 시료인 14번 (5.506)
- 2) 잠재적으로 자극이 높을 것으로 추정되는 시료는 동일한 수준으로 출현한 시료 7, 8번 (1.336)
- 3) 이외에 시료 2, 15번 (1.190) 그리고 16번(1.042), 10번(0.893)순으로 자극지수가 관찰되었다.
- 4) 시료 14번은 유의하게 자극을 유발하고 있는 수준이므로 주의해야 하며, 대규모 집단에 노출시 시료 7, 8번도 잠재적인 자극가능성이 높을 것으로 예측할 수 있었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

1. 활용방안

- 개발제품의 범위 : 노인냄새 개선효과가 있는 유연화장수, 스킨로션, 영양크림, 에센스, 수분보습 마스크팩, 바디로션
- 각각의 기술에 대하여 다음과 같은 내용으로 특허출원(시기: 2010년~2011년)
- 본 연구에서 개발된 원천기술을 활용하여 다양한 용도의 소취, 탈취기능성 미용제품
- 본 연구사업과 연계한 지속적인 연차별 제품 개발로 수출 활성화에 활용.
- 기능성 물질이 함유된 추출물과 이를 이용한 임상실험 결과는 산학의 신속한 협력 및 연구를 통한 활발한 교류로 산업적으로 사용될 수 있음.
- 다양한 과학적 실험 결과를 토대로 다른 미지의 천연물에 대해 연구를 진행할 수 있음.

2. 기대성과

(1) 기술적 측면

- 식물성 소재를 이용하여 노인냄새(Nonenaldehyde)를 개선할 수 있는 '고령자전용 기초화장품'에 대한 기술을 확보.
- 식물성 화장료 조성물에 노인의 건조피부와 가려움증을 해소할 수 있는 '수분보습을 강화'시킬 수 있다.

- 국내 자생식물을 소재로 한 국내 순수기술로 개발되므로 기존의 국외관련 기술과도 차별화를 시킬 수 있을 것으로 판단됨.

(2) 경제, 산업적 측면

- 본 연구소재로 사용될 식물은 전남 구례군의 대표적인 특산식물인 '산수유, 원추리, 옥잠화, 박하'가 1차적인 가공제품의 틀에서 고급형 화장품의 형태로 제품화 되므로써 지역 특산 식물의 산업화 증대에 크게 기여할 것으로 판단됨.

- 고가의 수입 탈취화장품을 사용해 오던 실버 소비자들에게 좀 더 저가인 국내 상품을 사용토록 하므로써 유사제품에 대한 수입대체효과가 있을 것으로 판단함.

- 실버세대를 위한 생활용품의 다양화가 절실하게 요구되고 있는 '노인요양기관'에서의 고령자 간호에도 상당한 편이성을 제공할 것으로 사료됨.

- 식생활이 유사한 아시아권의 국가를 목표로 한 '수출상품'으로도 충분한 틈새시장이 있을 것으로 판단됨.

Summary

I. Development of Deodorizing-Function Cosmetics for Body Odor Improvement of the Silver Generation using Essential Oil and Polyphenol Compounds

II. The objectives and necessity of research and development (The title may be changed depending on necessity.)

This study is purposed to develop the beauty product of aromatic-deodorizing series for exclusive use of the aged with an aim at the skin secretional smelling (Nonenal Aldehyde and etc) and urinous smelling (Ammonia and etc) intensively of the body odor of the aged.

- Selection of the aromatic material and polyphenol contained material from the special products (Corni, fragrant plantain, peppermint, hemerocallis fulva) of Gurae-gun, Cheonnam.
- Prescription of the polyphenol contained chemical and extraction of essential oil
- Analysis on the aromaticity and the deodorizing power of the extracts and extracted oil
- The mixing condition of the cosmetics complication and manufacturing process establishment using the vegetable materials for deodorizing material for body odor of the aged and moisture retaining · nutritional wetness retaining
- Analysis on the deodorizing power, skin improvement function and stability of the complication of final cosmetics material.
- Pilot production and the clinical evaluation on the skin stability for the skin of the pilot product
- Design for the packing container for the pilot product and establishment of the marketing strategy
- Academic presentation and patents application for the related technology.

III. Details and scope of the research and development (The title may be changed depending on necessity.)

Establishment of the optimum mixing condition of the basic cosmetics complication and manufacturing process

- Analysis on the mixing condition of the pilot product complication:
- * Production of the cosmetics material complication mixture of natural substances for deodorizing power and nutritional moisture keeping :
- * Development scope of the basic cosmetics material complication: soft beauty wash, skin lotion, nutrition cream, essence and moisture keeping mask pack and body lotion
- * Toxicity test on the skin cell (Safety test) * Analysis on the antibacterial activity of the complication against the permanent staying bacterial
- * Analysis on the deodorizing power of the complication : Measurement of threshold on the bad odor by the Triangle Test method

Measurement on the effect of the extract and extracted oil on the bad odor and evaluation on the deodorizing power

Measurement on the activity of the metabolic enzyme for the superoxide in the skin tissue (Xanthine oxidase, Superoxide dismutase, Catalase, Glutathione peroxidase, Glutathione S-transferase)

* Analysis on the moisture power keeping and nutritional moisture keeping power of the complication

-Analysis on the manufacturing process for each production method of pilot product : It is to decide the adding amount and timing of the deodorizing material, moisture, nutritional moisture keeping material focusing on the basic process of each production method.

- Evaluation on the safety of the complication mixing ingredient: Analysis on the denatured aromaticity, resistivity of deodorizing power and color change of the complication

Screening of the deodorizing active natural substances and analysis on the functionality

- Prescription of the natural substance with aromaticity and deodorizing power from the Corni, fragrant plantain, peppermint, hemerocallis fulva and analysis on the functionality:

* Selection of the aromatic material and separation of extracted oil from three plants (Corni and 3 species) of Gurae-gun, Cheonnam: Extract of the oil by the steam distillation.

* Selection of substance with high content of polyphenol (Condensed tannin) and extracts separation :

· Separation of acetone extract from vegetable substance : Extract from the mixture of vegetable 3.5kg and 60% of acetone for 24 hours in room temperature and obtain the floating liquid and the precipitated substance from centrifuging (5000X g, 30 min) of the extracts and add 60% of acetone on the precipitated substance and repeat the above extraction process in 4 times. Skim off the floating liquid in each process and concentrate and remove the chlorophyll by filtering. Use it for the specimen for fraction after concentration with the rotary evaporator.

· Purification and identification of tannin compound: Inject the concentrated specimen with amount of 1/20 column volume using the Liphophilic-Sephadex LH-20 column (7x 100 μ m) and MCI-gel CHP 20P column (3 x 50 cm) and separate it into 6 pure tannins by elution 5 times of column volume with gradient of 100%→0% of EtOH in normal phase type and 100%→0% of EtOH in reverse phase type as indicated in Fig. 1. Measure the molecular weight of the separated tannin with KBr purification method of IR(PERKIN-ELMER IR-1330, U.S.A) and measure the ¹H-NMR (BRUKER AM-300, Japan) in use of the CDCl₃+DMSO-D₆+D₂O with reference material of TMS[Tetramethylsilane;(CH₃)₄Si] and measure the molecular weight of the MS (JEOL JMX-DX 300, Japan) with negative ion FAB-Masssystem. Identity the separated tannin with (+)-catechin (A), (-)-epicatechin-3-O-gallate(B), (-)epigallocatechin-3-O-gallate(C), (+)- gallo- catechin (D), (-)-epigallocatechin (E), procyanidin B-3-3-O-gallate(F)..

* Analysis on the skin cell proliferation effect: Analysis with keratinocyte cell(HaCat cell)

- * Antioxidation activity analysis on the extracts: DPPH radical removing power, SOD activity, APX activity, Catalase activity
- * Analysis on the whitening effect of the extracts: Measurement on the intercellular melanin creation quantity and screening the inhabitant for melanin creation.
- Analysis on the aromaticity of the extract and removing power of the body odor of the aged :
- * Sensual inspection on the aromaticity and masking efficacy of the extracted oil : Evaluation on the aromaticity and masking efficacy by the sensory evaluation table which is constituted of 8 items for the experimental group of 20 persons.
- * The effect and sensory inspection on the deodorizing of the skin secretional smelling (Nonenal Aldehyde and etc) of the aged and urinous smelling (Ammonia and etc) from the urinary tract disorder by the mixture of extract containing the polyphenol

Clinical evaluation on the final pilot product

- Evaluation on the safety of the pilot product on the skin: Perform the short and long term test using the standardized skill for 5 applicants with excellent skin condition
- Evaluation on the improving effect of the pilot product on the body odor of the aged : Evaluate the deodorizing power of the pilot product with application standard method for 5 aged people with aiming at the Nonenaldehyde which is the material for the main cause of the body odor of the aged.
- Evaluation on the moisture keeping efficacy for improving the skin dryness of the pilot product: Evaluate with standardized method for 5 persons of experiment group (Mainly for the aged with dry skin) by setting negative reference group and positive reference group
- Evaluation on the moisture keeping efficacy of the pilot product: Evaluate with standardized method for 5 persons of experiment group (Mainly for the aged with dry skin and severe keratinization) by setting negative reference group and positive reference group
- Evaluation on the skin itching removing effect of the pilot product: Evaluate after treatment with the pilot product for 5 persons of the aged with severe skin itching.
- Evaluation on the keratin removing power and improving effect of skin elasticity: Select 5 aged person over 70 and measure and analyze the negative reference group (5 persons) by means of standardization method after treatment on the part of severe keratinization for 1 month.

Design the packing and container of the cosmetics and production of the pilot product

- Design the packing and container of cosmetics
- Establishment of the production process in pilot plant scale and production of pilot product : Dispersion process (Water solvable thickeners: Tank for solving, agi mixer) → Saponification process(Antioxidant, moisturizer, poly fatty acid, refined water and etc: Tank for solving, heat exchanger, homo mixer, paddle mixer, thermometer recorder, pressure gauge, cooler, filtering device) → Solubilization process (Moisturizer,

neutralization reagent, thickener, astringent, Antioxidant and etc: Tank for solving, agi mixer, filtering device) → Mixing process (Vegetable extracts, functional natural substance and etc: Mixer, filtering device) → Pulverizing process(Pulverized powder, binding agent, preservatives, additive, moisturizer and etc: Pulverizer, mixer, filtering device) → Semi product production→ Injection and packing process (Container, packing, cap, aluminum dish, case, injection cloth) → Pilot product production/ Development of the adding technology for each objective of the natural extract and physiological active agent to the formulated base in cream and emulsion type while the above process is processed as a basic process, Decision of the optimum mixing ratio and addition type depending on the function extracts to be added and characteristics of the natural substances and safety, Identification of the characteristics such as the physical property change in mixed production of the natural extracts.

-Establishment of marketing strategy :

* Clinical experiment and promotion of the pilot product by means of visiting to the recuperation center for the aged:

* Product sales through the on line and off line

Strategy establishment :

- ▶ Analysis on the market of the vegetable natural cosmetics
- ▶ Analysis on the consumer reaction for the domestic and foreign natural cosmetics
- ▶ Setting the direction of product making depending on the demand market
- ▶ Establishment of the strategy of the target market of the product
- ▶ Establishment of the acceleration strategy for market distribution of the products
- ▶ Analysis on the consumer reaction of the product
- ▶ Establishment of the price and strategy for the product
- ▶ Establishment of the product brand image strategy
- ▶ Establishment of aggressive marketing strategy
- ▶ Establishment of the consistent maintenance strategy for the product

IV. R&D result (The title may be changed depending on necessity.)

The 1st year sub task (Holding organization)

(1) Production of the natural cosmetics material complication such as Corni, fragrant plantain, peppermint, hemerocallis fulva, Saurus chinensis and green tea

-Corni, coenzyme Q10 lotion :

<Moisture layer> : Glycerin 8.0g, Hydromoiature 4.0g, Preservatives 0.1g, Gel-agent 2.0g

<Oily ingredient layer> : Vital emulsion 3.0g, Cethos 2.0g, Japan wax 1.0g, Camellia oil 10.0g, Camellia butter 3.0g

<Substance adding after saponification> :

Gel-polymer 12.0g

Corni fruit concentration 3.0g

coenzyme Q10 3.0g

Essential oil 10 drops

-Peppermint, co-enzyme Q10 lotion :

<Moisture layer> :

Refined water 60.0g

Glycerin 8.0g

Hydromoiature 4.0g

Preservatives 0.1g

Gel-agent 2.0g

<Oily ingredient layer> :

Vital emulsion 3.0g

Cethos 2.0g

Japan wax 1.0g

Camellia oil 10.0g

Camellia butter 3.0g

<Substance adding after saponification>

Gel-polymer 12.0g

Peppermint leaf concentration 3.0g

coenzyme Q10 3.0g

Essential oil 10 drops

-High moisturized Hosta plantaginea Hyalironic acid skin :

<Moisture layer>

Refined water 170.0g

Solu-sol 3.0g

Hyalironic acid 5.0g

Hydromoiature 5.0g

<Substance adding after saponification>

Lipidure PMB 3.0g

Hosta plantaginea tincture 20.0g

Preservatives 0.4g

Essential oil 12~20 drops

-High moisturized a day lily Hyalironic acid skin

<Moisture layer>

Refined water 170.0g

Solu-sol 3.0g

Hyalironic acid 5.0g

Hydromoiature 5.0g

<Substance adding after saponification>

LipidurePMB 3.0g

a day lily tincture 20.0g

Preservatives 0.4g

Essential oil 15~20 drops

-Corni non-heated moisturizing cream :

<Moisture layer>

Refined water 40.0g

Glycerin 6.0g

Hydromoiature 6.0g

Fine salt 1.0g

Corni fruit concentration 5.0g

PM 6.0g

<Substance adding after saponification>

Collagen 3.0g

PMB 3.0g

Preservatives 0.1g

Essential oil 2~3 drops

-Peppermint non-heated moisturizing cream :

<Moisture layer>

Refined water 40.0g

Glycerin 6.0g

Hydromoiature 6.0g

Fine salt 1.0g

Peppermint concentration 5.0g

PM 6.0g

<Substance adding after saponification>

Collagen 3.0g

PMB 3.0g

Preservatives 0.1g

Aroma oil 2~3 drops

-Corni, Peppermint antiageing nutrition cream :

<Moisture layer>

Refined water 30.0g

Glycerin 5.0g

Hydromoiature 3.0g

Cream-Polymer 8.0g

<Oily ingredient layer>

Cream base 9.0g

Camellia oil 4.0g

Preservatives 0.2g

<Substance adding after saponification>

Gel-agent 3.0g

Corni fruit concentration 3.0g

Peppermint leaf concentration 3.0g

Peppermint, Hosta plantaginea, Lavender Essential oil each 5 drops

-Corni, Korean angelica , Morus alba L. , green tea sun whitening lotion :

<Moisture layer>

Refined water 130.0g

Glycerin 8.0g

Hydromoiature 8.0g

Preservatives 0.5g

Gel-agent 4.0g

<Oily ingredient layer>

Vital emulsion 5.0g

Cethos 4.0g

Japan wax 2.0g

Camellia oil 8.0g

Jjoba 7.0g

TiO₂ 5.0g

UV absorbent 10.0g

<Substance adding after saponification>

Gel-polymer 30.0g

Corniconcentration 3.0g

Korean angelica concentration 3.0g

Morus alba L. concentration 3.0g

green tea concentration 3.0g

Peppermint, Lavender Essential oil 20 drops

-Corni, Saurus chinensis, Morus alba L., green tea concentration whitening & antiageing essence

< Moisture layer1>

Refined water 30.0g

Gel-polymer 15.0g

Glycerin 4.0g

Hydromoiature 4.0g

Voddka 4.0g

Preservatives 0.1g

<Moisture layer2>

Solu-sol 1.0g

Aroma oil 3~5 drops

<Substance adding after saponification>

Gel-agent 2.0g

PMB 3.0g

Collagen 3.0g

Corni, Saurus chinensis, Morus alba L. , green tea concentration 8.0g
-Corni, Saurus chinensis, Morus alba L., green tea concentration whitening & antiageing
mask sheet pack

<Moisture layer>

Refined water 60.0g

1% thickener solution 20.0g

Hydromoiature 9.0g

Glycerin 7.0g

Vodka 7.0g

Solu-sol 2.0g

Essential oil 0.2g

Preservatives 0.3g

<Substance adding after saponification>

PMB 2.0g

Collagen 2.0g

Corni, Saurus chinensis, Morus alba L. , green tea concentration 10.0g

Caviar extract 1.0g

-Corni, Saurus chinensis, Morus alba L., green tea concentration whitening &
antiageingpeel-off pack :

<Moisture layer 1>

Refined water 7.0g

Hydromoiature 5.0g

Preservatives 0.2g

Corni, Saurus chinensis, Morus alba L., green tea concentration 10.0g

Co-enzyme Q10 3.0g

<Moisture layer 2>

Aroma oil 5 drops

Vodka 10.0g

Solu-sol 1.0g

Film-polymer 80.0g

- Hand moisturizer, sterilization solution:

Aloe veragel 40.0g

absolute alcohol 60.0g

Hyalironic acid 8.0g

Corni, Saurus chinensis, Houuttuyniae Herba, green tea concentration 10.0g

Lemon Essential oil 5 drops

Lavender Essential oil 5 drops

Peppermint Essential oil 5 drops

Tea tree Essential oil 10~15 drops

(2) The materials of Corni, *Hosta plantaginea*, a day lily, Peppermint which were adopted for the antibacterial activity experiment for the permanent bacteria on the skin were collected from Gurae-Gun. The collected material were immersed into the methanol, ethanol and CH_2Cl_2 solution for 2 weeks and the extracted by method of vacuum freezing. The extracts were dried in freezing condition and used for the experiment.

The adopted strains are *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pityrosporum ovale*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium ammoniagenes*, and *Candida albicans*. Every strain was received from Korea Inoculant Association and the experiment was performed on the solid culture bed. The experiment beds were nutrient medium and trypticase soy medium. With regards to the culturing method, the strain was inoculated on each culturing bed using the sterilized petri dish and processed depending on the concentration of each plants (Corni, Peppermint, a day lily, *Hosta plantaginea*) by putting the sterilized paper disc on the culturing bed. The area of the curbing band at the exterior of the paper disc after culturing.

(3) Cellular toxicity analysis on the skin cell of the plant

Human Dermal Fibroblasts cells for cellular toxicity analysis on the skin cell of the Corni, *Hosta plantaginea*, a day lily and Peppermint were cultured more than 24 hours in the culture medium and cleaned with the PBS and the extracted Corni, Peppermint, *Hosta plantaginea*, a day lily from the methanol were inoculated each culturing bed depending on the concentration. It was cultured in 37°C and 24 hours in CO_2 culture medium and cultured in 37°C after treating with MTT solution. It was analyzed with the 570nm absorbance after solving the reacted formazan with isopropanol. The survival ratio of the cell was marked with percentage by comparing with the reference group. The extracts of Corni, Peppermint, *Hosta plantaginea*, and a day lily were treated with 3 concentrations (5ug/mL, 10ug/mL, 15ug/mL) and the influence on the survival ratio of the fibroblasts was surveyed. The survival ratio of the cell was increased in every treatment group as the treatment concentration increased. Especially, the survival ratio of the cell was the highest in the corni fruit and peppermint extract. The cell toxicity experiment is necessary for the fibroblast and keratin cell based on these results in the future and it is considered that the cosmetics of deodorizing and skin improvement for the silver generation will be developed and commercialized.

(4) UV blocking effect of Corni, *Hosta plantaginea*, a day lily and Peppermint

The expression measurement of MMP-1 using the UVA survey was performed and the expression inhibiting level was analyzed to know the expression inhibiting effect. In the other words, the UV blocking effect was measured.

The culturing bed was washed before surveying the UV and washed with PBS and serum element was removed. UVA was projected for 24 hours by fitting the filter on the UV lamp.

The extracts of corni, *Hosta plantaginea*, a day lily, Peppermint which were extracted in vacuum on the dMEM culturing bed were treated by each 2.0mg/ml and cultured for 24 hours. Dunsmore method (Dunsmore et al., 1996) was used for the MMP-1 expression measuring by UVA projection.

It is considered as there is an UV blocking effect because the MMP-1 expression inhibiting was appeared on the corni fruit extract and peppermint leaf extract, but its effect was negligible in the extracts of flower and roots of the a day lily and *Hosta plantaginea*. Therefore, it is considered that more experiment shall be made in the future and it is considered that the studies on the extract solvents and high concentration of the extracts shall be performed at the same time.

The 1st year Chosun Univerity(Joint task)

(1) Selection of the aromatic material and separation of extracted oil from special plants (Corni and 3 species) of Gurae-gun, Cheonnam: There are many ways in the extraction of the essential oil such as the hydro distillation, compressing method, absorption method, solvent extraction method. But the hydro distillation was adopted for extracting the oil. The plants cleaned neatly and cut into the fixed size and put into the round flask with distilled water and hydro distilled using the steam distillation equipment for 5 hours as indicated in Fig. 1. The essential oil collected at the top through distillation and the floral water at the bottom which contains the water solvable oil ingredients were separated and kept in the refrigerator for use.

20mL of oil was separated form the entire plant of peppermint and the 500mL of face wash containing the oil was made from the flowers of the a day lily and Hosta plantaginea

(2) Analysis on the antioxidation activity of the extracts (DPPH radical removing power, SOD activation, CAT activation):

① DPPH radical removing power of the Hosta plantaginea, Hosta longipes, a day lily, a lily of the valley and Corni: The extracts from each part of the Hosta plantaginea, Hosta longipes, a day lily, a lily of the valley and Corni were analyzed for the removing power for DPPH radical. Hosta plantaginea extract from the flower showed the highest activity and the extract from the leaves of a day lily was higher than that from roots and Hosta longipes showed the very poor activity. The extract from entire plant of a lily of the valley showed the highest DPPH radical removing power out of 4 types of extracts.

② DPPH radical removing power of the Corni flower, Corni fruit and Peppermint :

BHT의 RC50; 198.93 ug/ml, RC50 of Vt C; ≤ 25 ug/ml

The extract from the flower of corni showed high DPPH radical removing power comparable to Vt C and the extract from the fruit showed similar removing power with BHT which is the standard material. In case of the peppermint extract showed the similar removing power with BHT which is standard material as similarly with corni fruit.

③ Measurement of activity of antioxidant enzyme

It is considered that the environment adaptation capacity of the plant against the external stress is bigger than that of other living bodies because it lives by fixing. It produces more kinds of the antioxidants than other living bodies. The cell has the enzymatic and non-enzymatic defensive system to protect the constituent element of the cell and to maintain the oxidation and reduction state. There are scorbic acid, glutathione, α -tocoperol and carotenoids which were know as natural antioxidants for the non-enzymatic defensive system of the plant and there are enzymes like superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase for enzymatic defensive system. The SOD and APX of 4 species of peppermint and antioxidant enzyme activation capacity of the CAT were measured.

- Enzyme solution production : Each live specimen were mixed in 1:4 ratio into the extraction buffer (50mM phosphate buffer, pH 7.0;1% Tritox X-100; 1% PVP-40) and uniformed and the upper layer liquid was skimmed off after centrifuging in 12000rpm for 20 minutes and it was used for measuring the antioxidation activity measurement. Albumin was used for standard material for measuring the protein quantity and measurement was performed according to the BCA protein assay.

-Catalase(CAT) activity measurement : The catalase activity was measured by the method of Aebi (1984). 10 mM H₂O₂ and reaction enzyme solution were added to the 50 mM potassium phosphate (pH 7.0). The absorption change was observed in 240nm for 2 minutes and the quantity of the enzyme decomposing the H₂O₂ in 1uM was set for 1 unit for decomposing the H₂O₂.

CAT is a antioxidant series enzyme to protect the cell by rapid processing on the harmful oxygens in vivo and it is a representative enzyme to decompose and remove the H₂O₂together with APX. The highest protein in 14.2U/mg was extracted from the leaves of *Hosta plantaginea*, 13.6U/mg protein from *Hosta plantaginea* flower, 8.9U/mg protein and 8.8U/mg protein from the flowers of Peppermint and a day lily respectively, and it was 7.8U/mg protein from a day lily leaves which showed the low contents.

-SOD (Superoxide dismutase) activity measurement : SOD activity was measured with the application of Beauchamp and Fridovich(1971) method. The solution of the 50 mM carbonic buffer (pH 10.2), 0.1 mM EDTA,,0.1mM Xanthine, 0.025 mM nitroblue tetrazolium(NBT) and enzyme solution were reacted form 10 minutes in 25°C and the reaction was measured by adding Xanthine oxidase($3.3 \cdot 10^{-6}$ mM). The absorbance was measured for 5 minutes in 30 seconds unit in 550nm for SOD activity.

The measurement result of the SOD activity showed as the highest in 16.8U/mg protein from the flower of *Hosta plantaginea*. It was 13.8U/mg protein in peppermint, 13.2U/mg protein and 12.4U/mg protein from the *Hosta plantaginea* leaves and a day lily flowers respectively, and the low contents of 10.9U/mg protein was shown from the leaves of a day lily.

(3) Analysis on the whitening effect of the extracts:

- Analysis on the tyrosinase activity inhibiting effect (Whitening effect) of the Liliaceae plant (*Hosta plantaginea*, *Hosta longipes*, a day lily, a lily of the valley):

Comparatively good in vitro tyrosinase inhibiting activity was shown in the extracts from the roots and the part above the ground of *Hosta plantaginea* and entire part of the a lily of the valley.

- Tyrosinase inhibiting activity (Whitening activity) of the oil extracted from *Aqastache rugosa*, *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* (Maxim.) Kitamura, *Saurus chinensis*, lemon and Peppermint

The oils extracted from *Aqastache rugosa*, *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* (Maxim.) Kitamura, *Saurus chinensis*, lemon and Peppermint were analyzed to

survey the substitutional plant to amend in vitro tyrosinase inhibiting activity of the extracts from the Liliaceae plants which were analyzed in the above. The significant results were obtained from the *Chrysanthemum zawadskii* Herbich var. *latilobum* (Maxim.) Kitamura, lemon and peppermint.

- Measurement on the intercellular melanin creation quantity and screening the inhabitant for melanin creation.:

The melanin cells cause the dermatological diseases such as the melasma, freckles and melanoma by the external and internal stimulus such as the UV. Women react sensitively to these skin changes and the interest on the coloring on the skin has been increasing day by day. Therefore, the studies on the development of the whitening material which is stable and reactive to this have been performed actively. The influences on the melanin cell creation on the B16F10 melanoma cell were surveyed using *Hosta plantaginea*, Peppermint, a day lily and Corni in this study.

① Toxicity experiment on the cell of the extracts :

The strain of the B16F10 melanoma cell was put into each well in concentration of 1×10^4 units and each chemicals were put in constant concentration. Each chemical was processed and MTT solution (0.5mg/mL) was added in the 2nd day and cultured for 4 hours. The living cell creates the violet insoluble formazan precipitation by reacting with MTT and the upper layer was skimmed off to solve this and put and solve DMSO by $150 \mu\text{l}$ and absorbance was measured with ELISA reader in 540nm and it was compared with the reference group.

The analysis results showed 100ug/mL of the extract concentration which is for more than 70% of the survival and the melanin contents inhibiting power was analyzed based on this concentration.

② Melanine creation condition measurement :

Melanine is created by a series of enzyme reaction in the melanosome which is the element of the melanin cell. The influences on the intercellular melanin creation on the extracts from Corni, *Hosta plantaginea*, a day lily and Peppermint were observed (Fig.5~8) with determining the concentrations which were not influential to the survival of the B16F10 cell in the above experiment . The measuring the weight of the melanin was made in adoption of the method from Hosoi et al. (1985). The melanin cell, B16 melanoma cell was cultured and the concentration process was made depending on each survival ratio of the cell by putting 1×10^4 cell/well into 24 well plates and cultured for 48 hours. Each well was washed with PBS and it was solved into the 1N NaOH solution with addition of 1% DMSO for 1 hour in 60°C. The absorbance in 405nm was measured using the ELISA reader.

(4) The influence of the extracts on the human keratin cell survival ratio (keratinocyte: HaCat Cell)

The cell strain used in this experiment is the Hacat cell of Skin Keratinocyte and it was cultured in the culture medium in 37°C after adding the antibiotics (Antibiotic antimycotic) of 10%(V/V) Fetal Bovine Serum to DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium). The inhibiting activity effect of cell growth on the extracts from the Hosta plantaginea(Flower, leaf and root) and a day lily(Entire plant and root) was confirmed through the MTT assay. It was inoculated in 3×10⁴ cell/mL concentration on 96 wells and cultured in the 5% CO₂ culture medium of in 37°C for 24 hours and processed in 25~800µg/mL concentration and cultured for 24 hours. It was processed with MTT and cultured for 4 hours to be reduced by the enzymic reaction of the survived cells. The culture solution was removed and solve the created formazan crystal in each well by adding DMSO and the survival ration of the cell was obtained by measuring the absorbance. The effect by the Hosta plantaginea extract was low, but in case of the a day lily(entire plant), it inhibited the cell survival ratio by 30% around in 800µg/mL concentration.

Joint task in the 2nd year

1. Separation of the compound from plant extracts for inhibiting the creation of the secretional odor (2-nonenal) from the skin of the aged

Analysis on the relation between the body odor of the aged (2-nonenal) creation mechanism and antioxidation active material

(1) Materials related with human body odor

The materials related with the human body odor are very diversified and there are considerable differences in its kinds and quantity of the smelling materials when it is looked into for the age before and after 40s. Out of these materials, it was revealed that the body odor of the aged which is appeared uniquely in the process of ageing after 40s was from the 2-nonenal out of aldehyde likes.

(2) The structural characteristics of the material (2-nonenal) causing the body odor of the aged and characteristics of the odor

2-nonenal(The cause material of the body odor of the aged) is an unsaturated aldehyde likes and it creates the unpleasant oily smelling and grass smelling with a micro quantity (3-4 ppm).

(3) The relation among 2-nonenal creation & unsaturated fatty acid & lipid peroxide

When the relation among 2-nonenal creation & unsaturated fatty acid & lipid peroxide is looked into, the ω7 unsaturated fatty acids and lipid peroxides of the lipids constituting the epithelial cell as the age of human increases. (Fig. 3, 4). The creation of the 2-nonenal is increased as the quantity of the palmitoleic acid and lipid peroxide are increased. In the other words, when the palmitoleic acid is decomposed by oxidation (oxidative degradation) by the lipid peroxide, it is changed into 2-nonenal by the metabolism shown in Fig. 5.

(4) 2-nonenal creation mechanism

(5) Design of the inhibiting metabolism against the creation of the body odor of the aged (2-nonenal) by the antioxidation active material

Inhibiting the creation of the body odor of the aged (2-nonenal) by the antioxidation active material : Accordingly, this study was purposed to utilize the material for improving the body odor of the aged by separation and purifying the antioxidation active material from the plant material with high antioxidation activity as a method to improve the secretional odor from the skin of the aged by inhibiting the oxidation of the palmitoleic acid on the skin which is the unsaturated fatty acid by the peroxide.

2. Analysis on the antioxidation activity on 5 species of the plant extracts

(1) Extract production

- Object plant : Corni, *Hosta plantaginea*, a day lily, Peppermint, a lily of the valley

(2) Polyphenol contents in the extract

The analysis result on 5 polyphenol contents revealed that the Peppermint extract was the highest as shown in Table 2. It was $27.17\mu\text{g}/\text{ml}$ for corni, and $21.12\mu\text{g}/\text{ml}$ for a lily of the valley, $11.71\mu\text{g}/\text{ml}$ for *Hosta plantaginea* and $8.5\mu\text{g}/\text{ml}$ for a day lily.

(3) DPPH radical removing power of the extracts

① DPPH radical removing power for corni(Flower and fruit), *Hosta plantaginea*(Entire plant), a day lily(Leaf and root), Peppermint(Entire plant), a lily of the valley (Entire plant) : The analysis result of the removing power of the DPPH radical of 5 extracts showed that corni fruit flesh extract (RC50 : 234.51 ug/ml) was most excellent activity and the extracts from the Peppermint (RC50 : 292.18 ug/ml) and the a lily of the valley (RC50 : 617 ug/ml) showed t the significant removing power. The other extracts from each part of the *Hosta plantaginea* and a day lily did not show significant antioxidation activity.

(4) SOD similar activity and CAT activity

The analysis result of the SOD revealed that the corni fruit (17.8 U/mg) showed the excellent enzymatic activity and similar activities were shown in the extracts from the a lily of the valley, *Hosta plantaginea* leaf, leaf and flower of a day lily and peppermint in range of $10.9\sim 13.8$. (Fig. 12., Table 3.). The analysis result of the CAT activity, it was revealed that corni fruit (13.9 U/mg) and *Hosta plantaginea* leaf extract (14.2 U/mg) showed excellent activity and flower of the lily of the valley, leaf of a day lily and peppermint extract showed similar activity in range of $7.8\sim 9.8\text{ U/mg}$.

3. The separational purification of the oxidation compound from the corni fruit and structure analysis

(1) Production of the extracts and analysis on the antioxidation activity:

- Production of the extracts : Add 70% EtOH 15L to 2 kg of dry corni fruits and extracts 3 times for 3 hours with the extractor and filtered it and obtained 541g of crude extract was obtained by the reducing pressured concentration.

- DPPH radical removing power of the extracts(Percentage) : The analysis results of the removing power of the DPPH radical for the corni EtOH extract, the significant data of the

removing power for DPPH radical for each concentration (15.5~500ug/ml) was shown and more than 90% of removing power was shown in the final concentration of 500ug/ml.

(2) The extract solution fraction and actioxidation activity analysis :

- The extract was solved into 90% EtOH 2L and same amount of hexane was added and the unnecessary hexane layer was removed by 3 times of fraction with fraction funnel and 90% EtOH layer was concentrated again and solved it 1L of distilled water and same amount of the ethylacetate (EtOAc) was added and the fraction was performed in 3 times and the EtOAc layer was obtained, with regards to the BuOH, it was fractioned by 3 times with the same manner in the above. The activities of the solution fractioned material were checked and TLC patterns were surveyed

- The analysis result of the DPPH radical removing power of 4 species of extracts for each concentration (15.5~500 ug/ml), the activity of EtOAc extract was excellent in every concentration range and the hexane layer n the butanol layer showed similar activity and water layer showed the lowest removing power. When the radical removing power for each solvent is compared with IC₅₀data,itwasappearedinorderofEtOAcext(25.6ug/ml) BuOH ext(110ug/ml) Hexane ext (140.6ug/ml) Water ext(500<ug/ml).

- DPPH radical removing power of solvent fractioned material (IC₅₀value)

- SOD similar activity of solvent fractioned material : The analysis result of the SOD similar activity of solvent fractioned material for each solution and each concentration (100~1000 ug/ml) showed the order of EtOAc ext> BuOH ext> Hexane ext> Water ext. It was the same result with the DPPH radical removing power in the above. Especially, it was known that when the EtOAc extract was compared with the standard material of Vt C, it showed considerably excellent SOD similar activity.

- Polyphenol content and Flavonoid content of the solvent fractioned material ;

When the Polyphenol content and Flavonoid content contained in each solvent extract were analyzed, it showed the order of EtOAc ext> BuOH ext> Hexane ext> Water ext and EtOAc extract was the most excellent.

(3) Silica gel column chromatography of the solvent fractioned extract (EtOAc ext)

- EtOAc ext open column :

The active elements were separated in purification from the fractions which showed the activity base on the activity of each fraction with use of the column chromatography and MPLC, HPLC, Recycling Prep LC using the column filler such as the Silica-gel, RP-C18, Sephadex LH 20, Licroprep RP-C18 and Toyopearl HW 40.

The fractioned materials (Hexane, EtOAc, BuOH, Water) of each solvent was actively analyzed and column chromatography was performed with use of the silica gel as a filler for the first step to separate the active elements from the fractioned extracts which displayed he biggest effect. The elution was made with the solvent ratio of Hexane : Acetone in order of 10:1 → 9:1 → 8:1 →6:1 for the selected EtOAc extracts, but the elution was performed by adjusting the ratio of the developing solvent in order of 5:1 →

4:1 → 3:1 → 2:1 as the elution speed was so slow. It was checked with TLC by obtaining 7 fractions.

(4) RP-C18 column chromatography of fraction(Fr 4) with excellent activity

4 fractions were separated after developing Fr with RP (RP is performed by 10 times of repetition to acquire the quantity of 4 fractions)

The column chromatography was performed to obtain the sub fraction from the excellent fraction in its activity with use of the RP-C18 as a filler. MeOH of the fraction: The TLC pattern of the fractions obtained by the separation of Water 1:3 → 1:2 → 1:1 solvent ratio.

(5) HPLC profile comparison and analysis on each fraction

- HPLC analysis condition : (A) MeOH for pump HPLC : (B) pump Water(3 times distilled water) and 0.1% formic acid were used for the column mobile phase solvent and solvent ratio was MeOH/Water(30/70/V/V) and it is controlled with gradient and the flowing speed was set in 1ml/min. The specimen injection quantity was 30ul, and UV 205nm and 254nm were detected.

- HPLC profile compared analysis and separational purification of the active compound : The location of the target compound and basic information for the separational purification were checked by comparing the HPLC profiles of the segmented fractions and the process of the pure separation of a certain compound was performed.

(6) Analysis on the oxidation inhibiting activity of the palmitoleic acid by the antioxidation compound

0.1% BHT and 0, 10, 30 and 50ul of specimens were added to the palmitoleic acid to analyze the antioxidation effect of the corni fractioned material and compound and the peroxide value was measured by keeping in 50°C for 7 days. The peroxide value of the reference group without addition of the specimen was 60, 117, 140 and 187 meq/kg after 1, 3, 5 and 7 days of storage respectively, when the 0.1% BHT 10ul was added, it was 9, 23, 30 and 36 meq/kg. In the test group with addition of the specimen, when 10ul was added, it was 11, 33, 36 and 42, when it was in 30ul, it was 8, 22, 27 and 30 meq/kg and when 50ul was added, it was 6, 20, 22 and 25 meq/kg.

The 3st year Joint task(Chonnam National University Hospital)

1. Level of stimulating on the skin

The results from the reading of the skin stimulating level according to the evaluation standard after the single time attachment test for 28 experimentees who finished the test to the end are described in the following Table 1. There is no world wide standard which can be applied to the human skin reaction when the stimulating level is evaluated by the skin stimulating reaction result, but the specimen(More than 6 persons which are 20% out of 28 persons in this test) which appears the reaction frequency exceeding 20% of the total volunteers by determining with single attachment test in the test for less than 50 volunteers usually or the specimen (More than 1.785 skin stimulating index on the base of

points in this test) observed by exceeding 10% of the total volunteer can be regarded as the substance which has the potentiality of creating significantly.

The single sealed attachment test for 16 specimens for 48 hours for 28 experimentees was performed and the following results were obtained.

- 1) The highest stimulating level was No. 14 which is the specimen for the pilot product (5.506)
- 2) The specimens estimated for the highest stimulation potentially were No. 7 and 8 which were appeared in same level. (1.336)
- 3) Besides those, the stimulating index was observed in order of No. 2, 15 (1.190), 16(1.042) and 10 (0.893).
- 4) Special care shall be taken for No. 14 because it was the level creating the significant stimulation. The No. 7 and 8 are estimated as potential stimulation when they are exposed in large scale groups.

V. Research achievement and performance utilization plan (The title may be changed depending on necessity.)

1. Utilization

- Scope of the development of product : Soft face wash, skin lotion, nutrition cream, essence, moisturizing mask pack and body lotion with effect of improving the body odor of the aged,
- The application of the patent with the following contents for each technology (Period: 20010 ~ 2011)
- Beauty product for reducing the odor and deodorizing and functional in many purposes utilizing the source technology which was developed in this study.
- Utilization to the activation of the export with consistent yearly product development in link with this research project
- The extracts containing the functional substance and the clinical experiment result can be used for industrially with the active exchange through the rapid cooperation between industry and academy and study
- The study can be processed for the other unknown natural substances based on diverse scientific experiment results.

2. Expectation

(1) In terms of technology

- Acquiring the technology for the 'basic cosmetics for exclusive use for the aged' which can improve the odor of the aged (Nonenaldehyde) in use of the vegetable material
- It can 'strengthen the moisture keeping' to solve dry skin and itching of the aged by the vegetable cosmetics complication
- It is considered that it can be differentiate with related foreign technologies as it is developed with pure domestic technology with the subject from the native plants

(2) In terms of economy and industry

- It is considered that it can contribute greatly to the expansion of the industrialization of the local special plants because it is made into products in high level cosmetics in the 1st processed product frame with the plants from the representative specially produced plants of 'Corni, a day lily, Hosta plantaginea and Peppermint' from Gurae-gun, Cheonnam.

- It is considered that there will be an import alternating effect for the similar products because it makes for the silver consumers who have use the expensive imported deodorizing cosmetics use the cheaper domestic product.

- It is considered that there will be a considerable convenience for nursing the aged in 'the elderly recuperation institution' where the diversification of the life goods for the silver generation is severely requested.

- It is considered there will be a sufficient niche market for 'export product' with the targets of Asian countries with similar eatery life

CONTENTS

Chapter 1. Summary of the subject of Research and Development_43

Chapter 2. Present situation of technical development on domestic and abroad_44

Chapter 3. Results and contents of the R&D's accomplishment_43

Chapter 4. Proportion of achievement on object and contribution to related fields_146

Chapter 5. Plan for applying of the results of R&D_148

Chapter 6. Foreign scientific and technical information gathering from the procedure of the R&D_153

Chapter 7. Literature Cited_157

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요_43
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황_44
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과_45
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도_146
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획_148
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보_153
- 제 7 장 참고문헌_157

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 노인냄새의 원인물질인 nonenaldehyde와 배뇨장애로 유발되는 냄새를 탈취, 개선할 수 있는 essential oil과 polyphenol 화합물(축합형 탄닌류)을 산수유, 옥잠화, 원추리, 박하로부터 추출하고, 탈취능 소재에 수분·영양보습성 식물소재가 첨가된 화장료 조성물을 조제하여, 특유한 노인냄새를 개선하고 동시에 건조피부로 인한 가려움증을 해소할 수 있는 60세 이상의 고령자 전용 기초화장품(유연화장수, 스킨로션, 영양크림, 에센스, 바디로션, 수분보습 팩)을 개발하고자 하며 노인의 체취를 중심으로 피부 분비취(노네날 알데하이드 등)와 지린내(암모니아 등)를 target으로 한 방향성-탈취계 노인전용 미용제품 개발을 목적으로 하며, 현재의 40~50대가 노인층으로 진입하는 2020년 이들의 자산규모는 현재의 노인층보다 훨씬 클 것이며 경제적으로 자립할 수 있는 여력을 갖게 됨에 따라 건강상태나 피부 타입에 부합하는 노인전용 미용제품의 필요성은 매우 높다고 할 수 있다.

2. 연구개발 범위

- 전남 구례군 특산식물(산수유, 옥잠화, 박하, 원추리)로부터 방향성 소재 및 polyphenol 함유 소재선발
- polyphenol 화합물 함유 추출물 조제 및 essential oil 추출
- 분리된 추출물과 정유의 방향성 및 nonenaldehyde에 대한 탈취력 분석
- 노인냄새 탈취소재와 수분보습·영양보습성 식물소재를 이용한 화장료 조성물의 배합조건 및 제조공정 확립
- 최종 화장료 조성물의 탈취력 및 피부 개선 기능성, 안정성 분석
- 시제품 제조 및 시제품의 피부 안전성, 임상평가
- 시제품의 포장용기 디자인 설계 및 마케팅 전략 구축

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

○ 2008년도 통계청 분석에 따르면 우리나라는 2000년에 고령화사회에 진입하였으며, 2026년이 되면 초고령화 사회로 변화되어 고령인구수가 급증에 따른 노인전문 요양원 및 병원시설이 요구될 뿐만 아니라, 실버세대 전용 웰빙 생활용품의 필요성과 다양성이 요구되고 있다.

○ 우리나라 화장품은 20세기 들어와 화장품이 산업화되기 시작한 이래 화장품이 소득 수준의 향상에 따라 수요가 증가하는 소득 탄력성이 큰 고부가가치 상품으로 인식되어 왔지만, 실버세대를 위한 타이틀을 가진 실버 세대를 위한 전용 화장품은 없다고 보아도 과언이 아니다. 따라서, 실버 세대는 계층 고유의 제품이 아닌 40대 이후 중년을 위한 화장품을 쓰고 있는 실정이다.

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 세계적으로 유명한 일본의 화장품 회사인 시세이도는 노인들의 몸에서 풍기는 기분 나쁜 냄새를 제거할 수 있는 화장품을 개발하였다. 시세이도는 노인들에게서 나는 불쾌한 체취를 없애는 획기적인 기술을 개발해 이를 생산 판매하는 별도의 회사를 설립하여 샴푸, 로션, 파우더, 스프레이 형태의 제품을 만들고 있다.

-특허: Deodorant, 국제특허 PCT/JP2006/309106

-특허: 제한, 소취화장료 및 제조방법, 국제특허 2008-184395(p2008-184395A)

○ 유럽의 경우 제품의 내용과 함께 실버 소비자를 위한 제품의 시각적 특성을 부각 시켰다. 그 예로 니베아(Nivea)는 고령자들을 배려해 독일에서 상품 판매량을 크게 신장시켰다. 니베아는 원거리에서도 잘 볼 수 있도록 화장품의 글씨크기를 확대하는 한편, 포장지의 경우 나이트 크림은 달 디자인과 함께 어두운 파란색을, 데이 크림은 태양디자인과 함께 흰색을 채택하여 포장만으로도 쉽게 구분할 수 있도록 배려하고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 개발

1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2008.1 2.~2009 .11.)	-세부1 : 기초 화장품의 조성물 최적배합조건 및 제조공정 확립	-화장료 조성물의 배합조건 분석	90%	<ul style="list-style-type: none"> * 탈취능 천연물과 수분, 영양보습 천연물을 배합한 화장료 조성물의 제조 * 피부세포에 대한 독성 시험 (안전성 테스트) * 조성물의 피부상재균에 대한 항균활성 분석 * 조성물의 탈취효능 분석 * 조성물의 자외선 차단효과 분석
	-협동 : 소취활성 천연물 소재 스크리닝 및 피부 기능성 분석	-산수유, 옥잠화, 원추리, 박하로부터 방향성 및 탈취능 천연물 조제, 기능성 분석	90%	<ul style="list-style-type: none"> * 전남 구례군의 특산식물 (산수유 외 3종)로부터 방향성 소재선발 및 정유 분리: 수증기 증류법에 의한 정유 추출 * 피부세포 증식효과 분석 keratinocyte cell(HaCat cell)를 이용한 분석 * 추출물의 항산화활성 분석 DPPH radical 소거능, SOD 활성, Catalase 활성 * 추출물의 미백효과 분석: 세포내 멜라닌 생성량 측정 및 멜라닌생성 저해물질 스크리닝

* 연구를 수행한 연도만 기재

2. 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>-산수유, 옥잠화, 원추리 박하로부터 방향성 및 탈취능 천연물 조제, 기능성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> * 전남 구례군의 특산식물로부터 방향성 소재선발 및 정유 분리 * 피부세포 증식효과 분석 * 추출물의 항산화활성 분석 * 추출물의 미백효과 분석 	<ul style="list-style-type: none"> * 전남 구례군의 특산식물 산수유 외3(중)로부터 방향성 소재선발 및 정유 분리: 수증기 증류법에 의한 정유 추출 * 피부세포 증식효과 분석 keratinocyte cell(HaCat cell)를 이용한 분석 * 추출물의 항산화활성 분석 DPPH radical 소거능, SOD 활성, Catalase 활성 * 추출물의 미백효과 분석: 세포내 멜라닌 생성량 측정 및 멜라닌생성 저해물질 스크리닝
<p>-화장료 조성물의 배합조건 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> * 탈취능 천연물과 수분, 영양보습 천연물을 배합한 화장료 조성물의 제조 * 피부세포에 대한 독성 시험 * 피부상재균에 대한 항균활성 분석 * 탈취효능 분석 * 조성물의 자외선 차단효과 분석 	<ul style="list-style-type: none"> * 탈취능 천연물과 수분, 영양보습 천연물을 배합한 화장료 조성물의 제조: 혼합될 각각의 추출물과 정유의 향이 잘 조화될 수 있도록 최적 배합비를 결정 * 기초 화장료 조성물의 개발 범위 스킨, 로션, 영양크림, 에센스, 수분보습 마스크팩, 바디로션, 수분, 영양보습력이 강한 식물성 소재를 강화시키며, 자외선차단 소재를 첨가. * 피부세포에 대한 독성 시험(안전성 테스트): <ul style="list-style-type: none"> · 정상피부 세포인 HaCaT (Immortalize Human Keratinocyte) 세포 분석 * 조성물의 피부상재균에 대한 항균활성 분석: 방부 및 살균효과를 확인하기 위해 노인의 몸과 의류 및 주변공간에서 많이 발견되는 유해한 세균들 대상으로 정유 및 추출물의 항균활성을 스프레이딩과 paper disk법을 사용하여 실시

		<p>* 조성물의 탈취효능 분석 Triangle Test법에 의한 취기의 threshold의 측정, 추출물 및 정유가 취기에 미치는 효과 측정, 탈취력 평가</p> <p>* 조성물의 자외선 차단효과 분석 UVA조사법과 피부의 조직학적 관찰, 피부조직의 유해산소대사효소 활성도 측정(Xanthine oxidase, Superoxide dismutase, Catalase, Glutathione peroxidase, Glutathione S-transferase)</p>
--	--	---

3. 세부연구수행 결과(자유기술)

세부과제 (주관기관; 순천대학교)

(1) 산수유, 옥잠화, 원추리, 박하 삼백초, 녹차등의 천연화장료 조성물 제조

-산수유, coenzyme Q10 로션

<수분층> : 글리세린 8.0g, 하이드로모이스취 4.0g, 보존제 0.1g, 젤-에이전트 2.0g

<유분층> : 바이탈에멀전 3.0g, 세토스 2.0g, 저팬왁스 1.0g, 동백유 10.0g, 동백버터 3.0g

<유화 후에 넣는 재료> :

젤-폴리머 12.0g

산수유열매 농축물 3.0g

coenzyme Q10 3.0g

에센셜오일 10방울

-박하, coenzyme Q10 로션

<수분층> :

정제수 60.0g

글리세린 8.0g

하이드로모이스취 4.0g

보존제 0.1g

젤-에이전트 2.0g

<유분층> :

바이탈에멀전 3.0g

세토스 2.0g

저팬왁스 1.0g

동백유 10.0g

동백버터 3.0g

<유화 후에 넣는 재료>

젤-폴리머 12.0g

박하잎 농축물 3.0g

coenzyme Q10 3.0g

에센셜오일 10방울

-고보습 옥잠화 하이루론산 스킨

<수분층>

정제수 170.0g

솔르졸 3.0g

하이루론산 5.0g

하이드로모이스취 5.0g

<유화 후에 넣는 재료>

리피듀어PMB 3.0g

옥잠화팅크처 20.0g

보존제 0.4g

에센셜오일 12~20방울

-고보습 원추리 하이루론산 스킨

<수분층>

정제수 170.0g

솔르졸 3.0g

하이루론산 5.0g

하이드로모이스취 5.0g

<유화 후에 넣는 재료>

리피듀어PMB 3.0g

원추리팅크처 20.0g

보존제 0.4g

에센셜오일 15~20방울

-산수유 비가열 수분크림

<수분층>

정제수 40.0g

글리세린 6.0g

하이드로모이스취 6.0g

꽃소금 1.0g

산수유열매농축물 5.0g

PM 6.0g

<유화 후에 넣는 재료>

콜라겐 3.0g

PMB 3.0g

보존제 0.1g

에센셜오일 2~3방울

-박하 비가열 수분크림

<수분층>

정제수	40.0g
글리세린	6.0g
하이드로모이스취	6.0g
꽃소금	1.0g
박하농축물	5.0g
PM	6.0g

<유화 후에 넣는 재료>

콜라겐	3.0g
PMB	3.0g
보존제	0.1g
아로마오일	2~3방울

-산수유, 박하 노화방지 영양크림

<수분층>

정제수	30.0g
글리세린	5.0g
하이드로모이스취	3.0g
크림-폴리머	8.0g

<유분층>

크림베이스	9.0g
동백유	4.0g
방부제	0.2g

<유화 후에 넣는 재료>

젤-에이전트	3.0g
산수유열매 농축물	3.0g
박하잎 농축물	3.0g
박하, 옥잠화,라벤더 에센셜오일	각5방울

-산수유, 당귀, 상백피, 녹차 찐 미백 로션

<수분층>

정제수	130.0g
글리세린	8.0g

하이드로모이스취	8.0g
보존제	0.5g
젤-에이전트	4.0g

<유분층>

바이탈에멀전	5.0g
세토스	4.0g
저펜왁스	2.0g
동백유	8.0g
호호바	7.0g
TiO2	5.0g
자외선흡수제	10.0g

<유화 후에 넣는 재료>

젤-폴리머	30.0g
산수유농축물	3.0g
당귀농축물	3.0g
상백피농축물	3.0g
녹차농축물	3.0g
박하, 라벤다에센셜오일	20방울

-산수유, 삼백초, 상백피, 녹차농축물 미백&노화방지 에센스

<수분층1>

정제수	30.0g
젤-폴리머	15.0g
글리세린	4.0g
하이드로모이스취	4.0g
보드카	4.0g
보존제	0.1g

<수분층2>

솔르졸	1.0g
아로마오일	3~5방울

<유화 후에 넣는 재료>

젤-에이전트	2.0g
PMB	3.0g
콜라겐	3.0g

산수유, 삼백초, 상백피, 녹차 농축물 8.0g

-산수유, 삼백초, 상백피, 녹차농축물 미백&노화방지 마스크쉬트팩

<수분층>

정제수	60.0g
1%증점제용액	20.0g
하이드로모이스취	9.0g
글리세린	7.0g
보드카	7.0g
솔르졸	2.0g
에센셜오일	0.2g
보존제	0.3g

<유화 후에 넣는 재료>

PMB	2.0g
콜라겐	2.0g
산수유, 삼백초, 상백피, 녹차농축물	10.0g
캐비어추출물	1.0g

-산수유, 삼백초, 상백피, 녹차농축물 미백&노화방지 peel-off pack

<수분층1>

정제수	7.0g
하이드로모이스취	5.0g
보존제	0.2g
산수유, 삼백초, 상백피, 녹차농축물	10.0g
코엔자임Q10	3.0g

<수분층2>

아로마오일	5방울
보드카	10.0g
솔르졸	1.0g
필름-폴리머	80.0g

-손 보습, 살균소독액

알로에베라겔	40.0g
무수알콜	60.0g
하이루론산	8.0g
산수유, 삼백초, 어성초, 녹차 농축물	10.0g
레몬 에센셜오일	5방울

라벤더에센셜오일	5방울
박하에센셜오일	5방울
티트리에센셜오일	10~15방울

(2) 산수유, 옥잠화, 원추리, 박하식물의 피부상재균에 대한 항균활성

본 실험에 사용된 재료는 모두 구례군에서 채취한 것을 사용하였다. 채취한 재료들은 모두 그늘에서 완전히 말린 후 methanol, ethnol, CH_2Cl_2 용액에 2주간 침적시키어서 진공냉동 추출을 하였다. 추출된 재료들은 동결건조 시키어서 실험에 이용하였다.

사용된 균주는 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pityrosporum ovale*, *Listeria monocytogens*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Candida albicans* 이다. 해당균주는 모두 한국종균협회에서 분양받아 고체배지에서 실험하였다. 실험배지는 nutrient medium과 trypticase soy medium 이었다. 배양방법은 멸균된 petri dish를 사용하여 각각의 배지에 균주를 접종하고 살균된 paper disc를 배지위에 올려 놓아서 각각의 식물(산수유, 박하, 원추리, 옥잠화)에 농도별로 처리하였다. 배양후 paper disc둘레의 억제 띠의 넓이를 조사하였다.

Table 1. Antimicrobial activity of fruit of *Cornus officinalis* extracts by different solvents.

Strains	Clear zone on plate(mm) ¹⁾								
	Methanol(mg)			Ethanol(mg)			Ch ₂ Cl ₂ extracts(mg)		
	5	10	20	5	10	20	5	10	20
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	5	8	-	2	6	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	3	7	-	2	7	-	-	-
<i>Pityrosporum ovale</i>	-	-	6	-	-	5	-	-	-
<i>Listeria monocytogens</i>	-	3	8	-	-	5	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	6	11	-	3	8	-	-	-
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	-	6	10	-	-	6	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	6	10	-	3	6	-	-	-

Table2. Antimicrobial activity of *Isodon inflexus* extracts by different solvents.

Strains	Clear zone on plate(mm) ¹⁾								
	Methanol(mg)			Ethanol(mg)			Ch ₂ Cl ₂ extracts(mg)		
	5	10	20	5	10	20	5	10	20
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	7	-	-	4	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	8	-	-	5	-	-	-
<i>Pityrosporum ovale</i>	-	-	5	-	-	5	-	-	-
<i>Listeria monocytogens</i>	-	-	8	-	-	4	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	6	-	-	5	-	-	-
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	-	-	5	-	-	5	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	6	-	-	5	-	-	-

Table 3. Antimicrobial activity of root of *Hemerocallis fulva* extracts by different solvents.

Strains	Clear zone on plate(mm) ¹⁾								
	Methanol(mg)			Ethanol(mg)			Ch ₂ Cl ₂ extracts(mg)		
	5	10	20	5	10	20	5	10	20
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	3	7	-	-	5	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	2	6	-	-	7	-	-	-
<i>Pityrosporum ovale</i>	-	-	3	-	-	3	-	-	-
<i>Listeria monocytogens</i>	-	-	8	-	-	3	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	3	8	-	-	5	-	-	-
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	-	2	6	-	-	5	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	3	7	-	-	5	-	-	-

Table 4. Antimicrobial activity of flower of *Hemerocallis fulva* extracts by different solvents.

Strains	Clear zone on plate(mm) ¹⁾								
	Methanol(mg)			Ethanol(mg)			Ch ₂ Cl ₂ extracts(mg)		
	5	10	20	5	10	20	5	10	20
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	4	-	-	4	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	5	-	2	4	-	-	-
<i>Pityrosporum ovale</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogens</i>	-	-	6	-	-	3	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	5	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	-	-	4	-	-	5	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	4	-	-	4	-	-	-

Table 5. Antimicrobial activity of flower of *Hosta plantaginea* extracts by different solvents.

Strains	Clear zone on plate(mm) ¹⁾								
	Methanol(mg)			Ethanol(mg)			Ch ₂ Cl ₂ extracts(mg)		
	5	10	20	5	10	20	5	10	20
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	2	7	-	-	5	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	6	-	-	5	-	-	-
<i>Pityrosporum ovale</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogens</i>	-	-	5	-	-	2	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	5	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	-	-	5	-	-	3	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	3	-	-	3	-	-	-

Table 6. Antimicrobial activity of root of *Hosta plantaginea* extracts by different solvents.

Strains	Clear zone on plate(mm) ¹⁾								
	Methanol(mg)			Ethanol(mg)			Ch ₂ Cl ₂ extracts(mg)		
	5	10	20	5	10	20	5	10	20
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	2	8	-	-	5	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	6	-	-	5	-	-	-
<i>Pityrosporum ovale</i>	-	-	3	-	-	3	-	-	-
<i>Listeria monocytogens</i>	-	2	6	-	-	4	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	5	-	-	5	-	-	-
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	-	-	6	-	-	4	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	4	-	-	4	-	-	-

(3) 산수유, 옥잠화, 원추리, 박하식물의 피부세포에 대한 세포독성분석

Human Dermal Fibroblasts 세포를 24시간이상 배양기에서 배양을 한 후 PBS로 세척을 한 다음에 methanol에서 추출한 산수유, 박하, 옥잠화, 원추리식물의 추출물을 각각의 배지에 농도별로 접종을 하였다. CO2 배양기에서 37°C에서 24시간동안 배양을 한 후 MTT용액을 처리한 후 37°C에서 배양하였다. 반응한 formazan을 isopropanol을 처리하여 용해시킨 후 570nm의 흡광도로 분석하였다. 세포 생존율은 대조군과 비교하여 백분율로 표시하였다.

산수유, 박하, 옥잠화, 원추리 추출물을 3가지 농도(5ug/mL 10ug/mL, 15ug/mL. 로 처리하여 섬유아세포의 생존율에 미치는 영향을 조사하였음. 처리 농도가 많아질수록 모든 처리구에서 세포의 생존율이 높아 졌으며, 특히, 산수유 열매와 박하 전초 추출물에서 가장 세포의 생존율이 높았음. 이러한 결과를 토대로 앞으로 섬유아세포와 각질세포에 대한 세포독성 실험이 필요하며 실버세대의 소취제거 및 피부질환 개선 화장품이 개발되어 산업화 될 수 있을 것으로 판단됨.

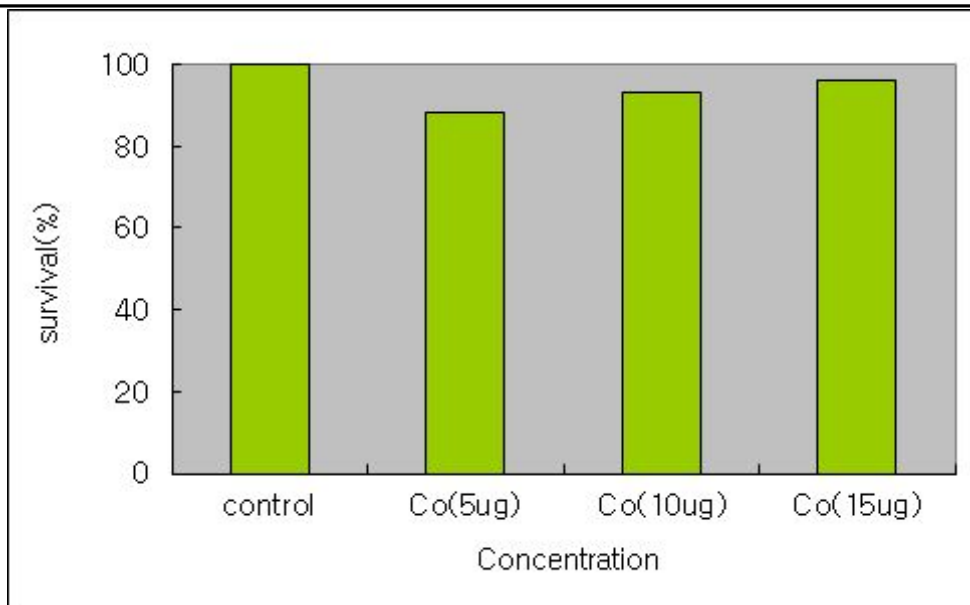


Fig.1 Cell viability of human dermal fibroblasts treated with *Cornus officinalis* extract to incubation for 24hour.

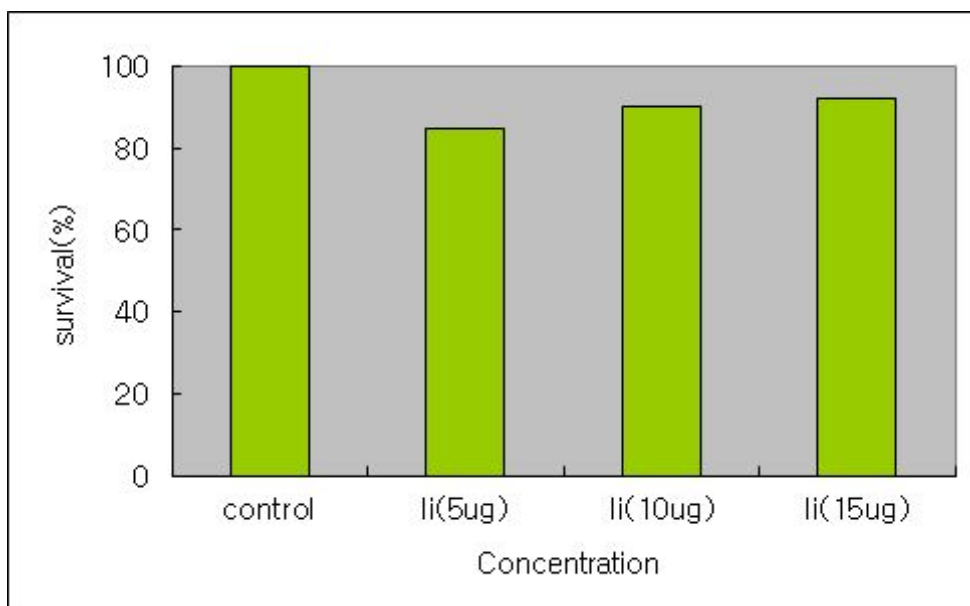


Fig.2 Cell viability of human dermal fibroblasts treated with *Isodon inflexus* extract to incubation for 24hour.

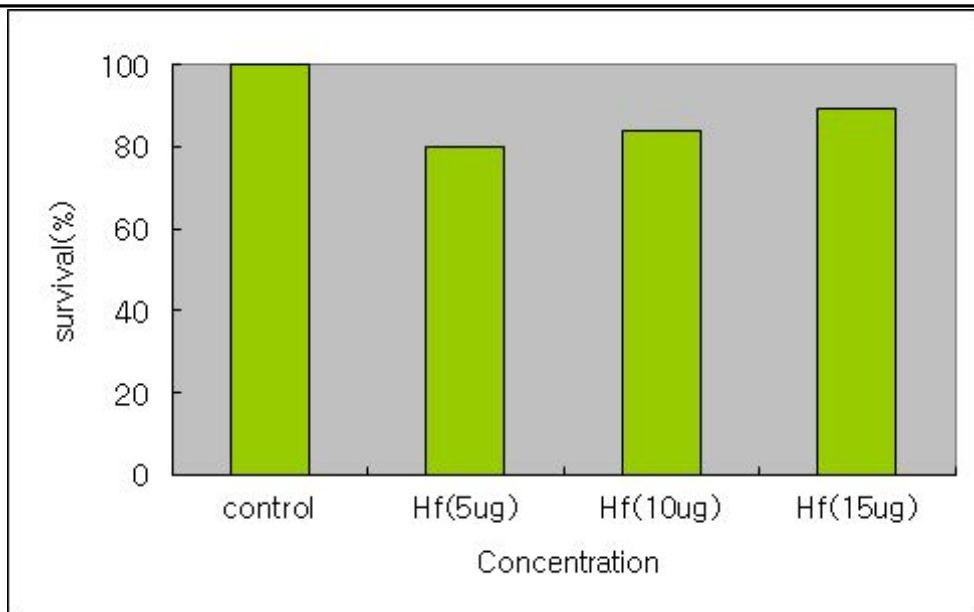


Fig.3 Cell viability of human dermal fibroblasts treated with *Hemerocallis fulva* (flower) extract to incubation for 24hour.

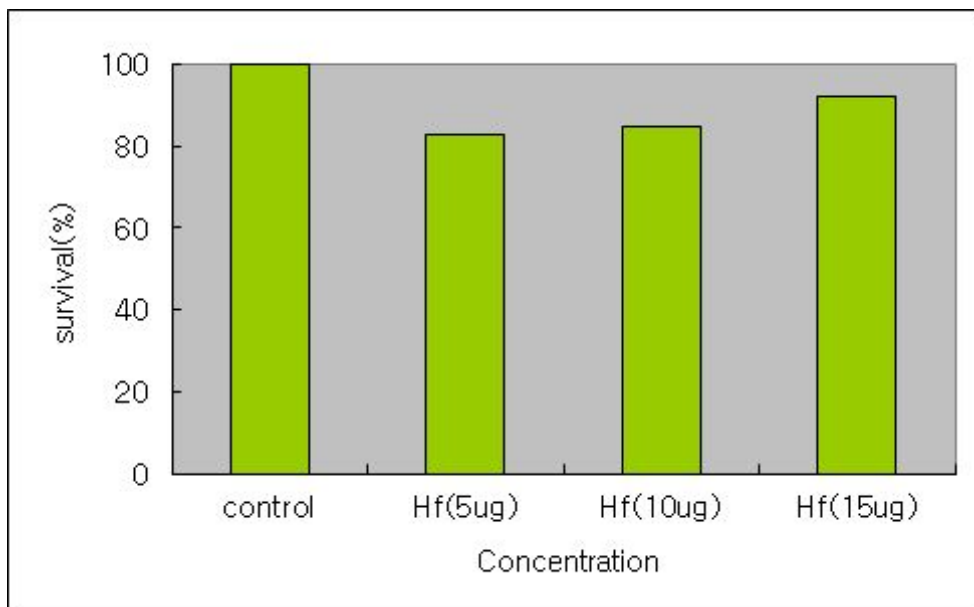


Fig.4 Cell viability of human dermal fibroblasts treated with *Hemerocallis fulva* (root) extract to incubation for 24hour.

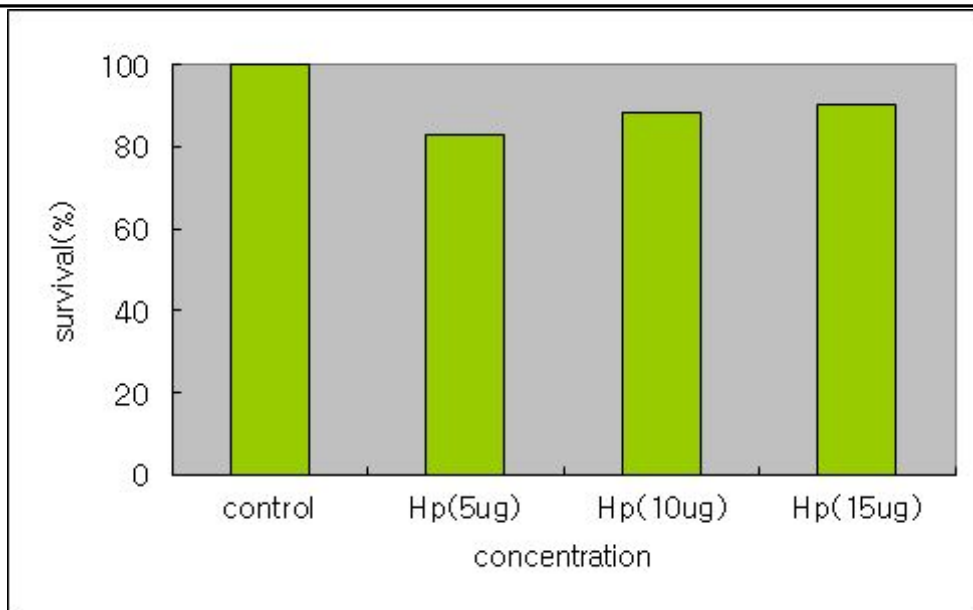


Fig.5 Cell viability of human dermal fibroblasts treated with *Hosta plantaginea* (flower) extract to incubation for 24hour.

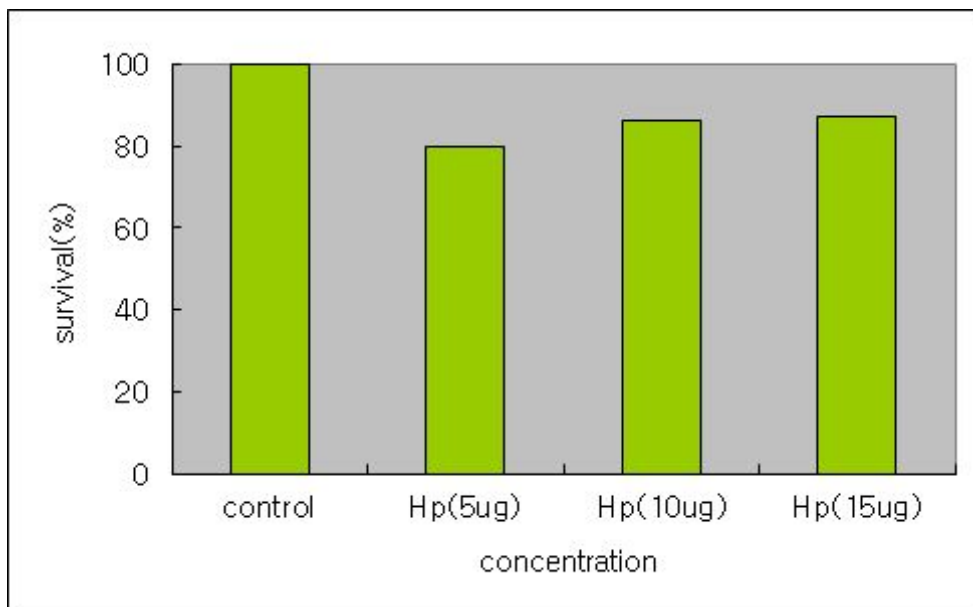


Fig.6 Cell viability of human dermal fibroblasts treated with *Hosta plantaginea* (root) extract to incubation for 24hour.

(4) 산수유, 옥잠화, 원추리, 박하식물의 자외선 차단 효과

UVA 조사를 이용하여 MMP-1의 발현측정을 함으로써 발현저해 정도를 분석함으로써 발현억제효과를 알아 보고자 하였다. 즉, 자외선 차단 효과를 측정코져 하였다.

UV를 조사하기 이전에 배지를 씻은 후 PBS 로 세척한 후에 serum 성분을 제거 하였다 UV 등에 필터를 처리하여서 UVA를 24시간 쬐었다.

배양배지는 DMEM배지에 진공 고압 추출한 산수유, 옥잠화, 원추리, 박하추출물을 각각 2.0mg/ml 처리하여서 24시간동안 배양하였다.

UVA 조사에 의한 MMP-1의 발현측정은 Dunsmore방법(Dunsmore *et al.*, 1996)을 이용하였다.

산수유열매추출물과 산박하잎 추출물에서 MMP-1 발현저해 효과가 나타나 자외선 차단 효과가 있는 것으로 판단되지만 원추리, 옥잠화의 꽃과 뿌리 추출물에서는 그효과가 아주 미미하였다. 따라서 앞으로 더 많은 실험이 필요하다고 생각되며 추출용매와 특히 추출물들의 고농축에 대한 연구들도 병행되어져야 한다고 판단된다.

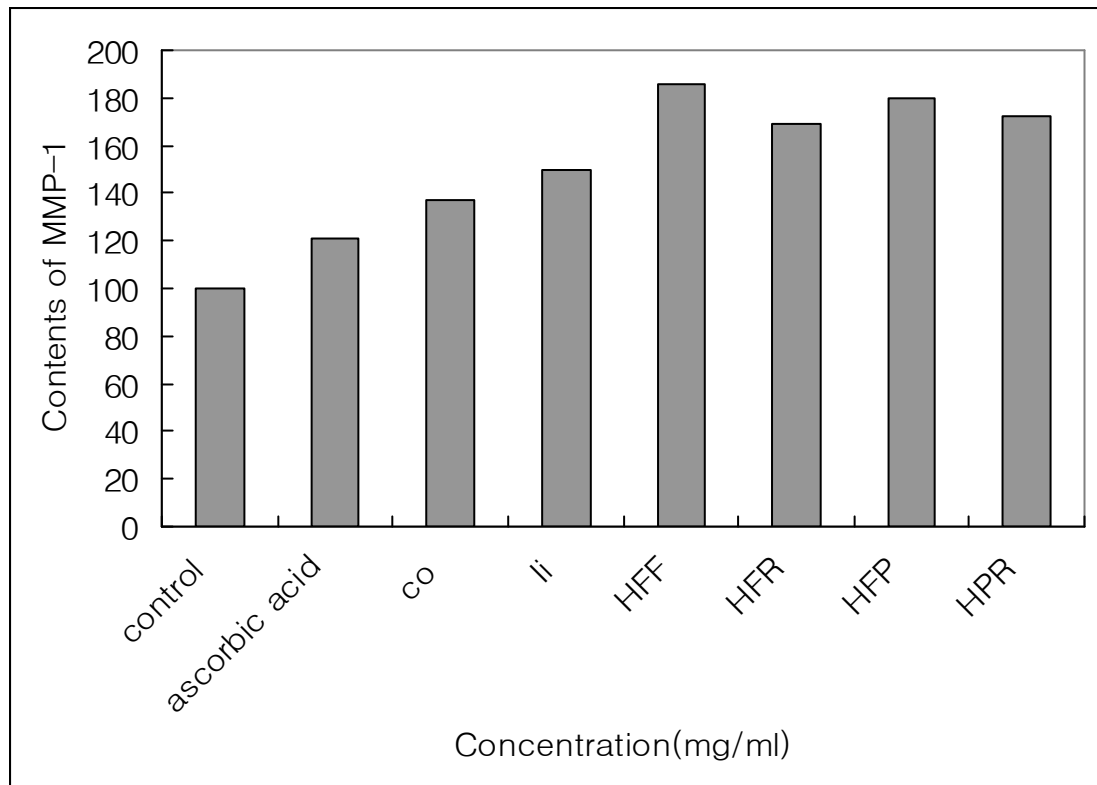


Fig.1 Effect of revelation of MMP-1 treated with plant extract to incubation for 24hour.

- CO : *Cornus officinalis*
- li : *Isodon inflexus*
- HFF : *Hemerocallis fulva* (flower)
- HFR : *Hemerocallis fulva* (root)
- HPF : *Hosta plantaginea* (flower)
- HPR : *Hosta plantaginea* (root)

협동과제 (조선대학교)

(1) 전남 구례군의 특산식물(산수유 외 3종)로부터 방향성 소재선발 및 정유 분리:

essential oil의 추출에는 수증기 증류법, 압착법, 흡수법, 용매 추출법 등 여러 가지 방법이 있으나, 본 실험에서는 수증기 증류법(Hydro distillation)을 이용하여 정유를 추출하였다. 깨끗하게 세척된 식물체를 일정크기로 절단하여 원형플라스크에 증류수와 함께 넣은 후, Fig. 1. 과 같이 수증기 증류장치를 이용하여 5시간 동안 수증기 증류하였다. 증류되어 상층에 모아진 essential oil과 수용성 정유성분을 함유한 하층의 floral water를 각각 분리하여 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

박하의 전초로부터 20mL의 정유가 분리 되었으며, 원추리와 옥잠화는 꽃으로부터 정유가 함유된 화장수를 500mL 씩 조제 하였다.



Fig. 1. Hydro distillation apparatus for extraction of essential oil and floral water.

(2) 추출물의 항산화활성 분석(DPPH radical 소거능, SOD 활성, CAT 활성):

① 옥잠화, 비비추, 원추리, 은방울꽃, 산수유의 DPPH radical 소거능 : 산옥잠화, 비비추, 원추리, 은방울꽃, 산수유를 식물 부위별로 추출하여 DPPH radical 소거능을 분석한 결과, 옥잠화의 경우엔 꽃 추출물이 가장 좋은 활성을 보였고, 원추리는 잎 추출물이 뿌리보다 높았으며, 비비추는 매우 저조한 활성을 보였다. 은방울꽃 전초 추출물이 꽃의 추출물 중 가장 높은 DPPH radical 소거능을 나타냈다.

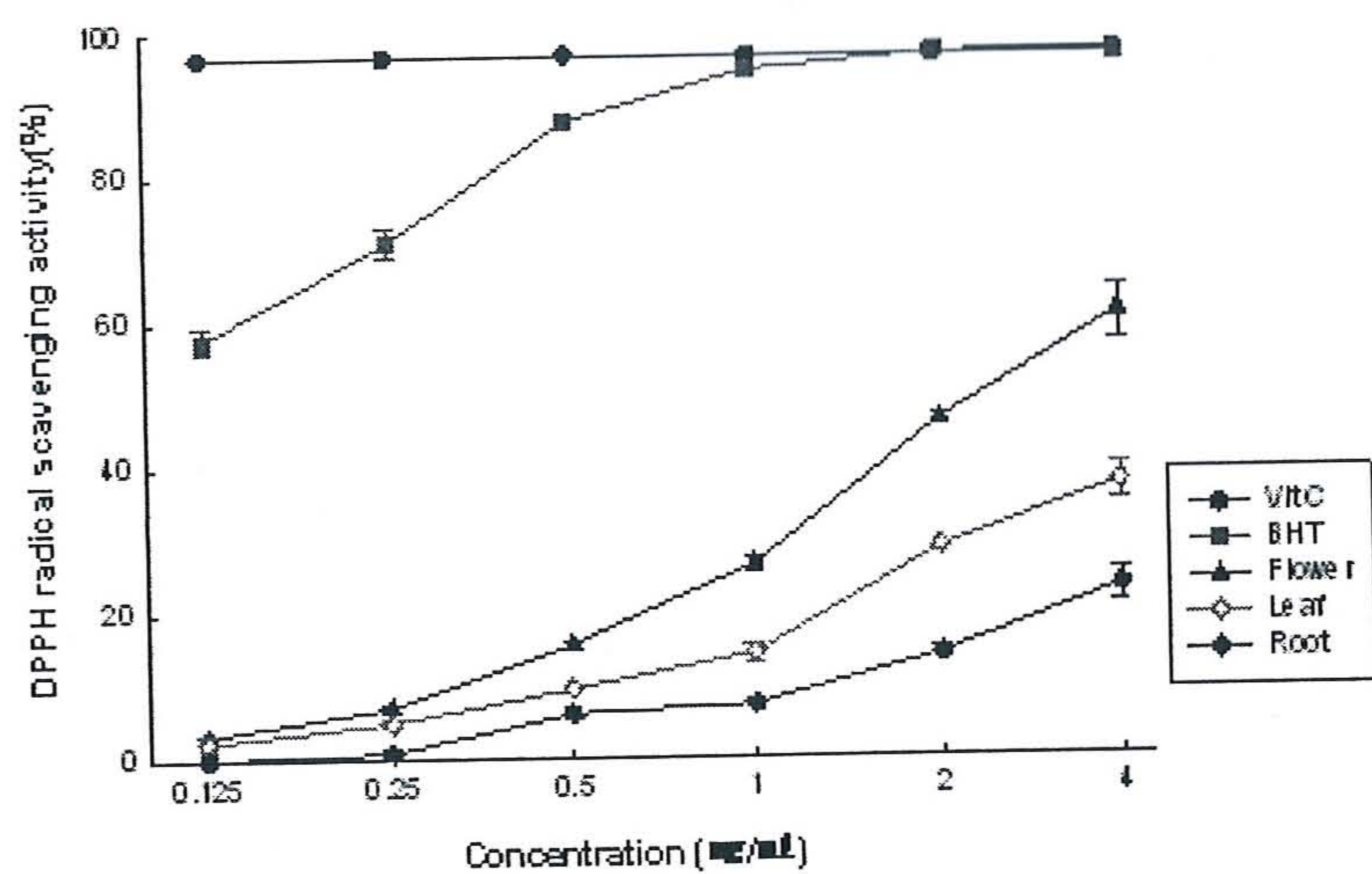


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *Hosta lancifolia*.

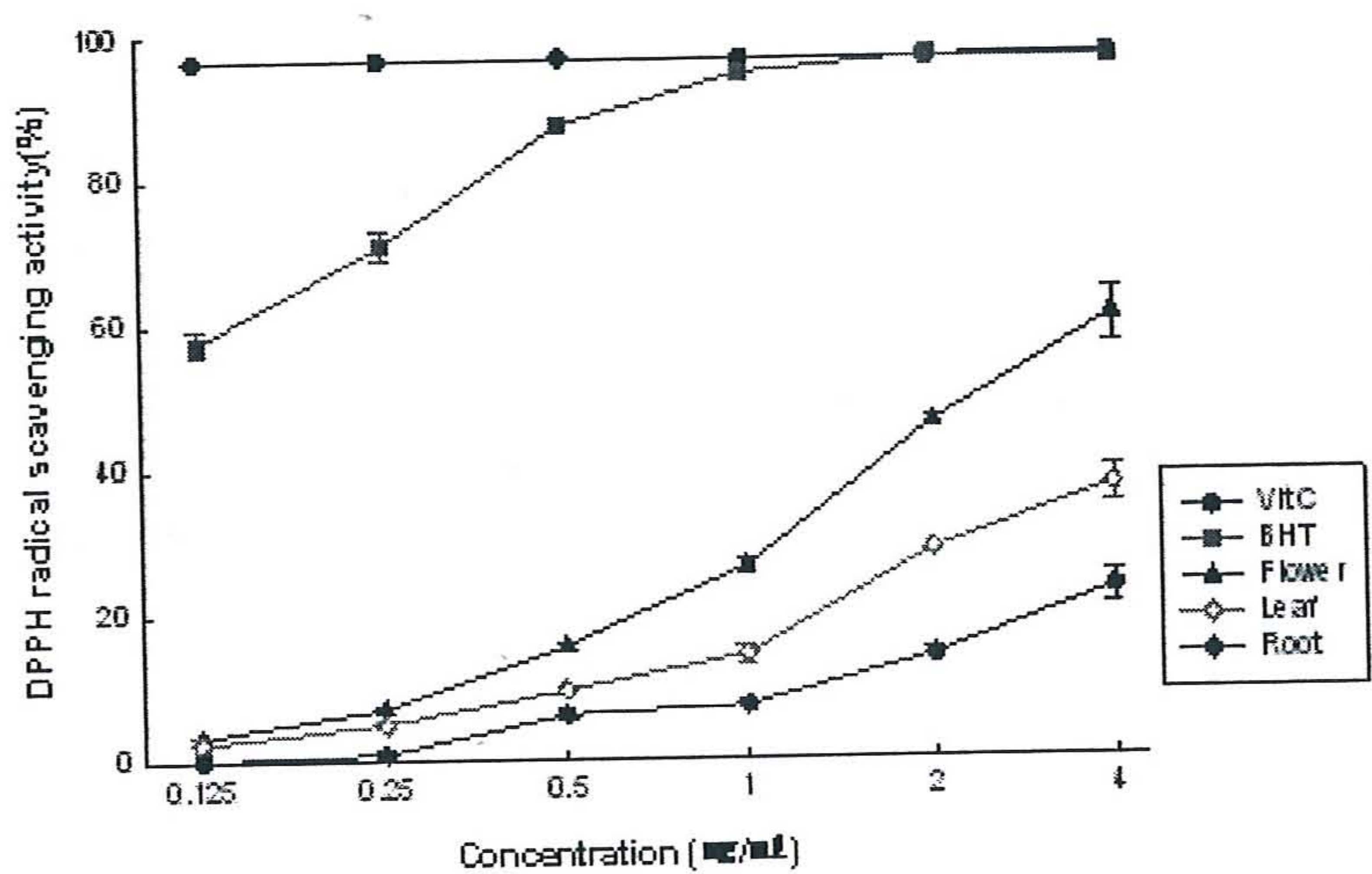


Fig. 3. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *Hemerocallis aurantica BAKER*.

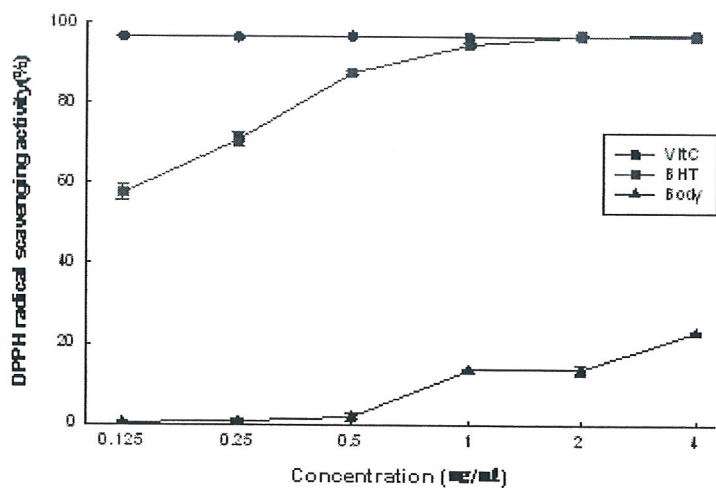


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *Hosta longipes*.

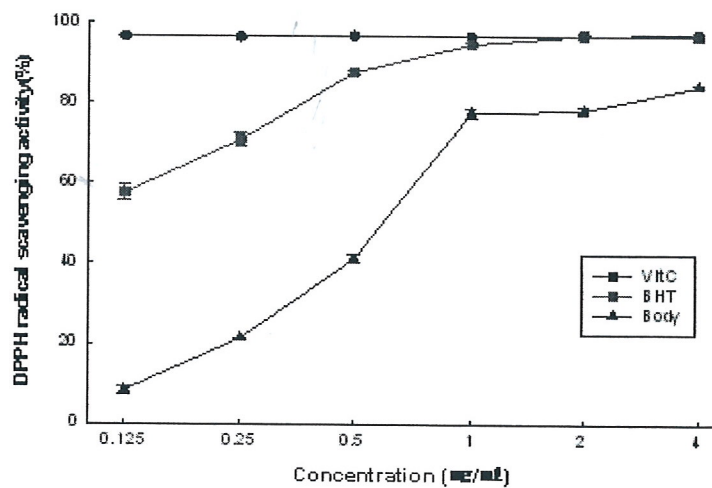


Fig. 5. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *Convallaria keikei*.

Korean name(Scientific name)	Part used	RC ₅₀ (mg/ml)
산옥잠화(<i>Hosta lancifolia</i>)	Flower	2.524
산옥잠화(<i>Hosta lancifolia</i>)	Leaf	≥4
산옥잠화(<i>Hosta lancifolia</i>)	Root	≥4
원추리(<i>Hemerocallis aurantica BAKER</i>)	Root	1.942
원추리(<i>Hemerocallis aurantica BAKER</i>)	Leaf	0.978
비비추(<i>Hosta longipes MATSUMURA</i>)	Whole plant	≥4
은방울꽃(<i>Convallaria keikei MIQ</i>)	Whole plant	0.617
BHT		0.101
Vit.C		0.0068

② 산수유 꽃, 산수유 열매, 박하의 DPPH radical 소거능 :

산수유 꽃의 추출물은 Vit C와 비교할 정도로 높은 DPPH radical 소거능을 보였으며, 열매 추출물도 표준물질인 BHT와 유사한 소거능을 나타냈다. 박하 추출물의 경우엔 산수유 열매와 유사하게 표준물질인 BHT와 유사한 소거능을 나타냄을 알 수 있었다.

BHT의 RC₅₀; 198.93 ug/ml, Vit C의 RC₅₀; ≤ 25 ug/ml

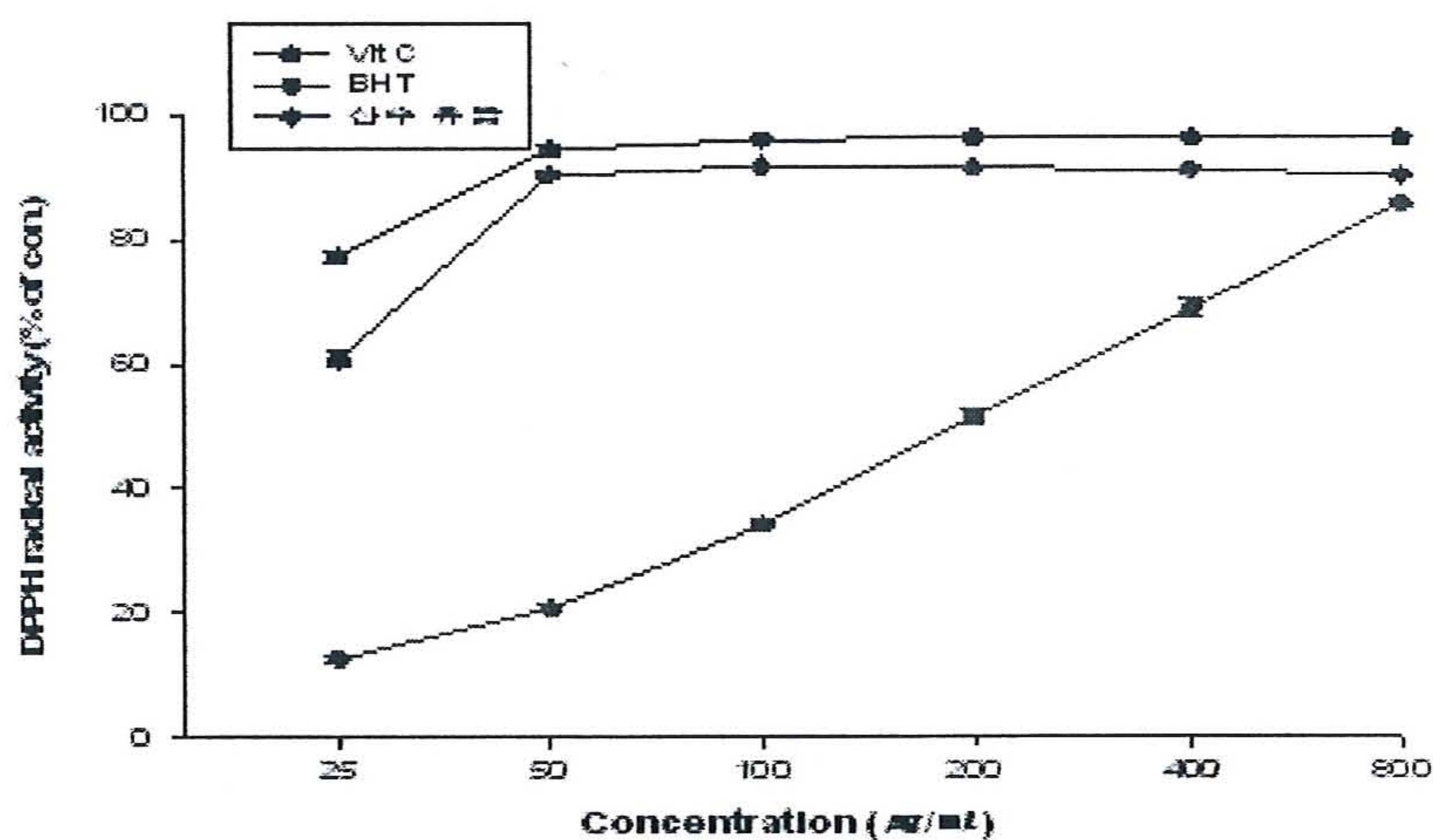


Fig. 6. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *Cornus officinalis*. flower
RC₅₀; ≥ 800ug/ml

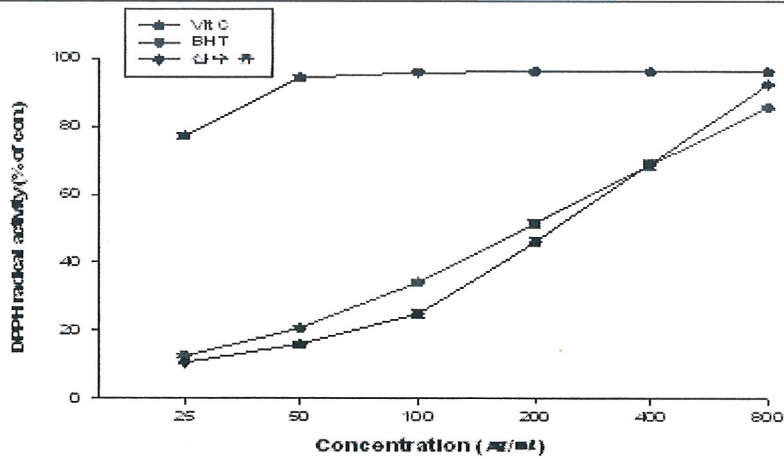


Fig. 7. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *Cornus officinalis*.
RC50: 234.51ug/ml

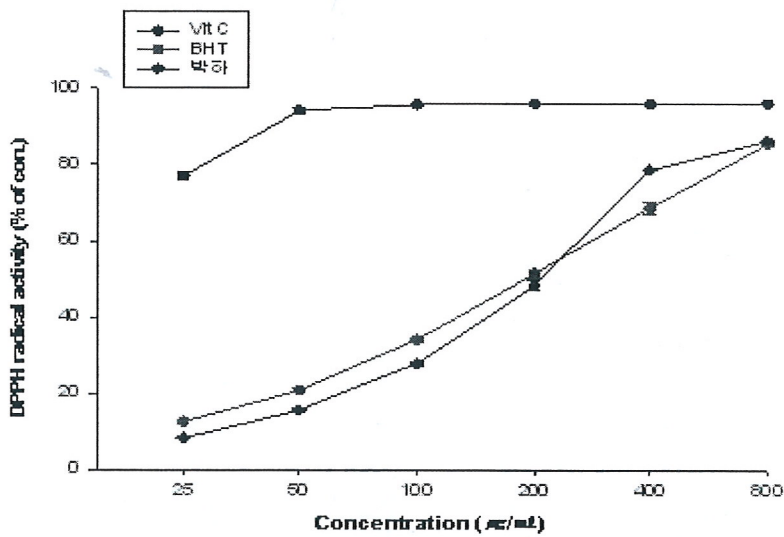


Fig. 8. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *Isodon inflexus*
RC50; 292.18ug/ml

③ 항산화 효소의 활성 측정

식물은 고착생활을 하기 때문에 외부 스트레스에 대한 환경적응 능력이 다른 생물체보다 높은 것으로 생각되며, 다른 생물체보다 많은 종류의 항산화 물질을 생산한다. 세포는 세포의 구성성분을 보호하고 산화환원상태를 유지하기 위해 효소학적 및 비효소학적 방어시스템을 지니고 있다. 식물에서 비효소학적 방어시스템에는 천연 항산화제로 알려진 ascorbic acid, glutathione, α -tocopherol, carotenoids 등이 있고, 효소적 방어시스템에는 superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase 등과 같은 효소들이 있다.

-효소액 조제 : 각각의 생체시료를 extraction buffer (50mM phosphate buffer, pH 7.0; 1% Triton X-100; 1% PVP-40)에 1:4의 비율로 혼합한 후 균질화 시키고 12000rpm에서 20분동안 원심분리한 다음 상층액을 취하여 황산화 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 albumin을 표준물질로 사용하여 BCA protein assay 방법에 따라 측정하였다.

-Catalase(CAT) 활성 측정 : Catalase활성은 Aebi (1984) 방법에 의하여 측정하였다. 50 mM potassium phosphate (pH 7.0)에 10 mM H₂O₂ 와 반응 효소액을 가하였다. 240nm에서 2분간의 흡광도 변화를 관찰하고 1분동안에 1uM의 H₂O₂를 분해하는 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

CAT는 생체내의 유해한 산소들을 신속히 처리하여 세포를 보호하는 항산화계 효소로 APX와 함께 H₂O₂를 분해 소거하는 대표적인 효소이다. 산옥잠화잎에서 14.2U/mg protein으로 가장 높게 나왔고 산옥잠화 꽃에서 13.6U/mg protein, 박하와 원추리꽃에서 각각 8.9U/mg protein, 8.8U/mg protein, 원추리 잎에서 7.8U/mg protein으로 낮은 함량을 보였다.

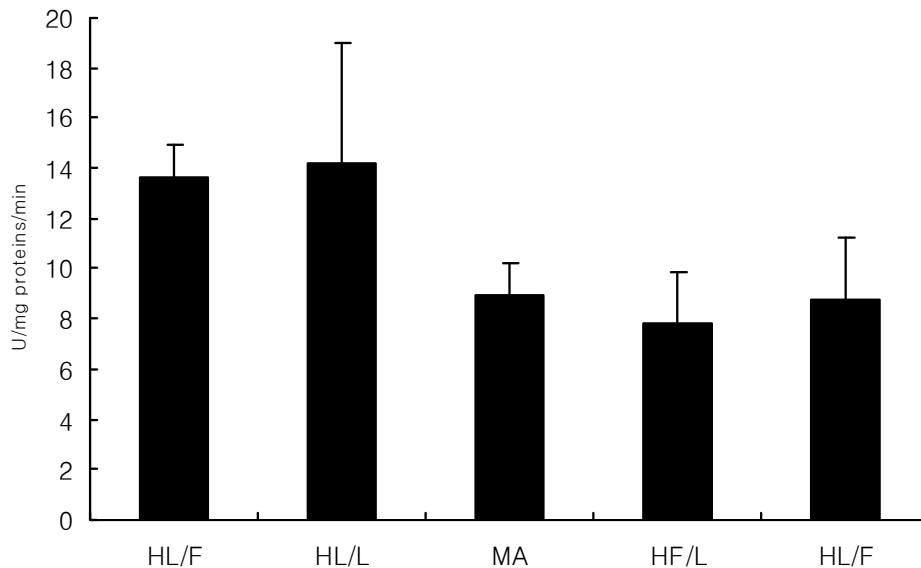


Fig. 9. Catalase activity

HL/F; 옥잠화 꽃, HL/L; 옥잠화잎. MA; 박하, HF/L; 원추리 잎, HF/F; 원추리 꽃

-SOD (Superoxide dismutase) 활성측정 : SOD 활성은 Beauchamp and Fridovich(1971)의 방법을 응용하여 측정하였다. 50 mM carbonic buffer (pH 10.2), 0.1 mM EDTA, 0.1mM Xanthine, 0.025 mM nitroblue tetrazolium(NBT), 효소액이 포함된 용액을 25°C에서 10분간 반응한 후 Xanthine oxidase(3.3 •10⁻⁶mM)를 참가하여 반응을 측정하였다. SOD 활성 측정은 550nm에 30초 단위로 5분간 흡광도를 측정하였다.

SOD 활성을 측정한 결과 옥잠화 꽃에서 16.8U/mg protein으로 가장 높게 나왔고 박하 13.8U/mg protein, 옥잠화 잎과 원추리 꽃에서 각각 13.2U/mg protein, 12.4U/mg protein, 원

추리 잎에서 10.9U/mg protein으로 낮은 함량을 보였다.

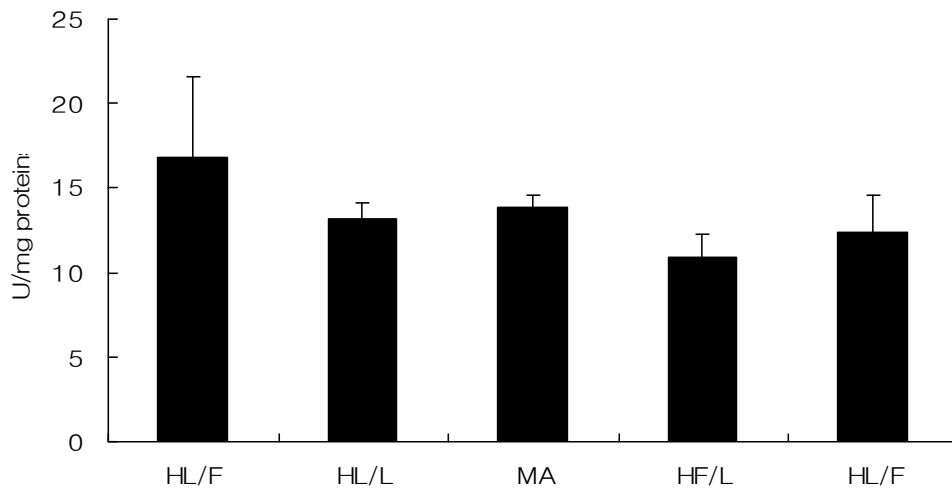


Fig. 10. SOD activity

HL/F; 옥잠화 꽃, HL/L; 옥잠화잎. MA; 박하, HF/L; 원추리 잎, HF/F; 원추리 꽃

Table 1. CAT and SOD activities of *Hosta lancifolia*, *Isodon inflexus*, *Hemerocallis fulva*.

Sample	CAT activity	SOD activity
<i>Hosta lancifolia</i> flower	13.6	16.8
<i>Hosta lancifolia</i> leaf	14.2	13.2
<i>Isodon inflexus</i>	8.9	13.8
<i>Hemerocallis fulva</i> leaf	7.8	10.9
<i>Hemerocallis fulva</i> flower	8.8	12.4

(3) 추출물의 미백효과 분석:

백합과식물(옥잠화, 비비추, 원추리, 은방울꽃)의 tyrosinase 활성 저해효과 (미백효과) 분석:

산옥잠화 뿌리와 지상부 그리고 은방울꽃 전초의 추출물에서 비교적 좋은 in vitro tyrosinase 저해활성을 보였다.

Table 2. Tyrosinase Inhibition Effect of 옥잠화, 원추리, 비비추, 은방울꽃

Lily family plants	Inhibition effect of tyrosinase activity(%)	
	500ppm/extracts	1000ppm/extracts
<i>Hosta lancifolia</i> leaf	5.5	10.2
<i>Hosta lancifolia</i> root	6.2	11.5
<i>Hosta lancifolia</i> flower	3.5	4.5
<i>Hemerocallis fulva</i> leaf	5.7	9.8
<i>Hemerocallis fulva</i> root	5.4	8.6
<i>Hosta longipes</i>	6.7	9.5
<i>Convallaria keikei</i>	6.9	10.2

배초향, 구절초, 삼백초, 레몬, 박하로부터 추출한 정유의 tyrosinase 저해활성 (티백활성)

이미 분석한 백합속 추출물의 in vitro tyrosinase 저해활성을 보완하기 위한 대체 식물을 조사하기 위하여 배초향, 구절초, 삼백초, 레몬, 박하에서 분리한 정유에 대하여 분석한 결과 구절초, 레몬, 박하에서 유의할 만한 결과를 얻었다.

Table 3. Tyrosinase inhibition effect of essential oil extracts

Sample	Concentration(%)	Tyrosinase inhibition activity(%)
<i>Agastache rugosa</i> flower	1	5.1
	0.5	4.9
	0.1	-
<i>Agastache rugosa</i> leaf	1	8.0
	0.5	5.6
	0.1	-
<i>Saururus chinensis</i>	1	25.7
	0.5	14.9
	0.1	11.9
<i>Dendranthema zawadskii</i> var. <i>latilobum</i> (Maxim.) Kitam.	1	28.8
	0.5	27.5
	0.1	11.7
<i>Citrus limon</i>	1	23.3
	0.5	22.5
	0.1	22.0
<i>Isodon inflexus</i>	1	31.8
	0.5	29.1
	0.1	17.0
Vit.C	1	62.9
	0.5	62.6
	0.1	61.0

(3)-3. 세포내 멜라닌 생성량 측정 및 멜라닌생성 저해물질 스크리닝 :

멜라닌 세포는 자외선 등과 같은 외적, 내적 자극에 의해 기미, 주근깨, 흑색종 등의 피부 질환을 일으킨다. 여성들은 이러한 피부변화에 민감하게 반응하고 피부착색에 대한 관심은 날로 증가하고 있다. 이에 보다 안정적이면서 효과적으로 작용을 할 수 있는 미백 소재에 대한 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구는 옥잠화, 박하, 원추리, 산수유를 이용하여 B16F10 melanoma cell에 멜라닌 생성에 영향을 미치는지 조사하였다.

① 추출물의 세포에 대한 독성 실험 :

B16F10 흑색종세포주를 각 well에 1×10^4 개의 농도로 넣어준 다음 1일 후 각 약물들을 일정농도로 넣어준다. 각 약물을 처리하여 2일째에 MTT 용액(0.5mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 살아있는 세포는 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 DMSO를 $150 \mu\text{L}$ 씩 넣어 용해하여 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

분석결과, 세포 농도가 70% 이상 생존 가능한 추출물의 농도는 $100 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 이 농도를 기준으로 melanin 함량 저해능을 분석하였다.

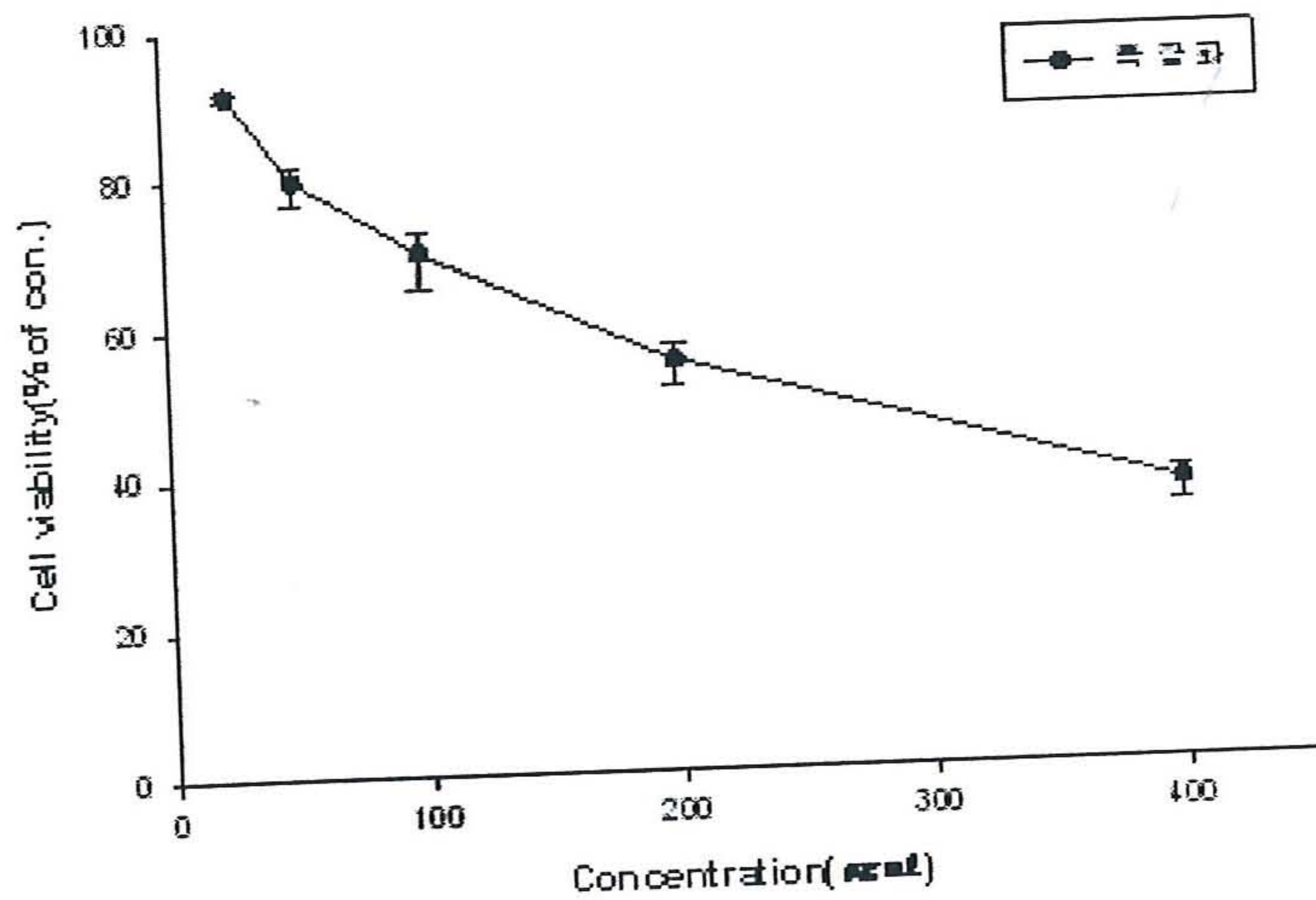


Fig. 11. Effect of the extracts from *Hosta plantaginea* on B16F10 cells viability.

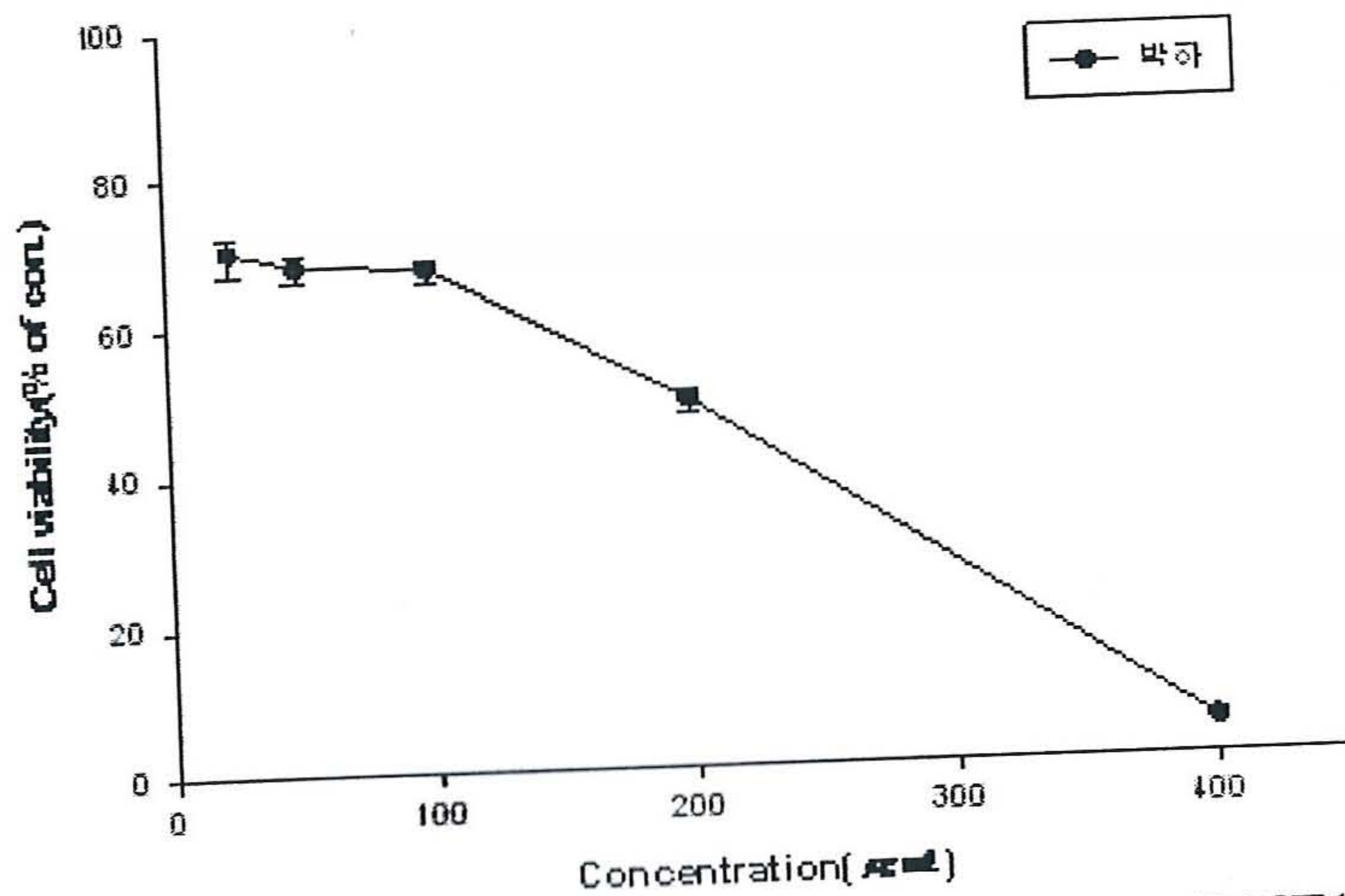


Fig. 12. Effect of the extracts from *Isodon inflexus* on B16F10 cells viability.

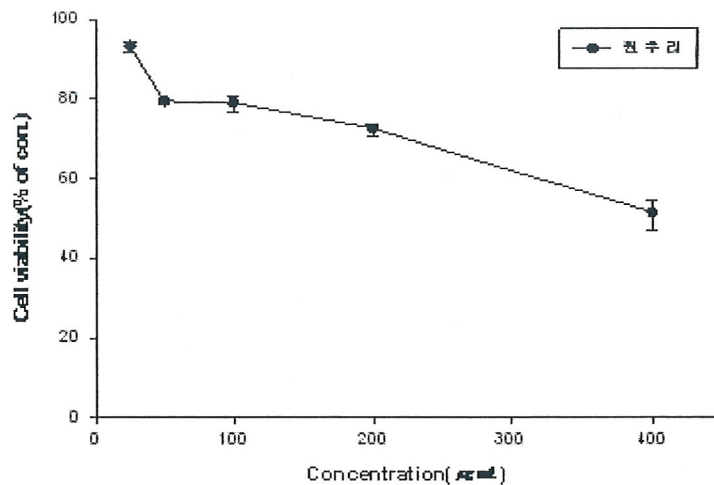


Fig. 13. Effect of the extracts from *Hemerocallis fulva* L. on B16F10 cells viability.

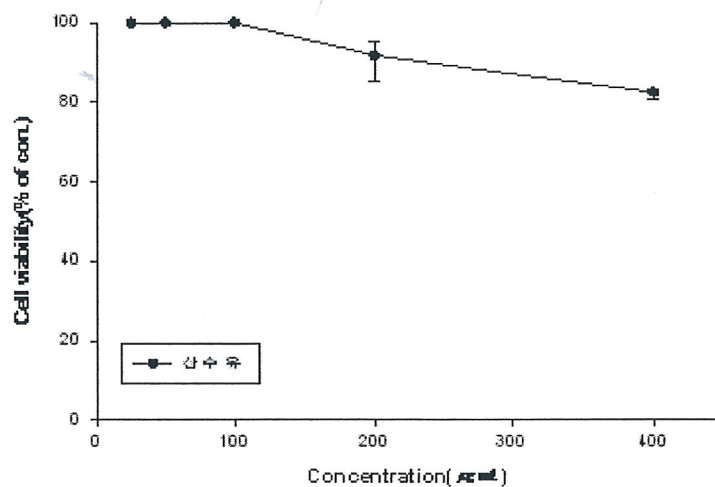


Fig. 14. Effect of the extracts from *Cornus officinalis* on B16F10 cells viability.

concentration (µg/ml)	<i>Hosta plantaginea</i>	<i>Isodon inflexus</i>	<i>Hemerocal lis fulva</i> L.	<i>C o r n u s officinalis</i>
400	37.26	4.85	51.6	85.8
200	54.9	49.35	72.57	91.8
100	69.88	67.58	77.03	100
50	82.77	68.18	79.5	100
25	85.57	70.32	89.97	100

② melanine 생성량 측정 :

멜라닌은 멜라닌 세포의 세포소기관인 멜라닌소체 (melanosome)에서 일련의 효소 반응에 의해 생성된다. 본 실험은 상기의 실험에서 B16F10 세포의 생존에 영향을 미치지 않았던 농도를 결정하여 산수유, 옥잠화, 원추리, 박하 추출물을 대상으로 세포내에서 멜라닌 생성에 미치는 영향을 살펴보았다(Fig.5~8). 멜라닌 정량은 Hosei등 (Hosoi *et al.*, 1985)의 방법을 변형하여 사용하였다. 멜라닌 세포인 B16 흑색종세포를 배양하여 24well plate에 각 well당 세포를 1×10^4 cell/well로 각각의 세포생존율에 따라 농도를 처리한 후 48시간 배양하였다. 48시간 배양한 후 각 well를 PBS로 세척한 후 1% DMSO가 첨가된 1N NaOH용액으로 60°C에서 1시간 동안 용해하였으며, ELISA reader를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

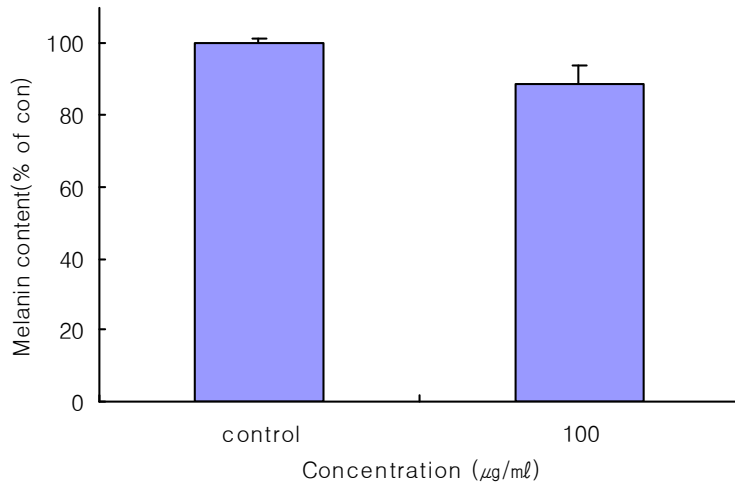


Fig. 15. Inhibitory effect of *Isodon inflexus* extracts on melanin production in B16F10 cells.

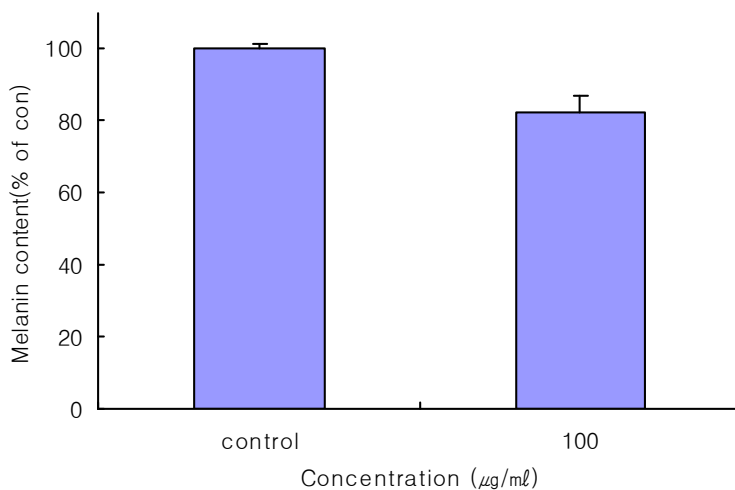


Fig. 16. Inhibitory effect of *Hosta plantaginea* extracts on melanin production in B16F10 cells.

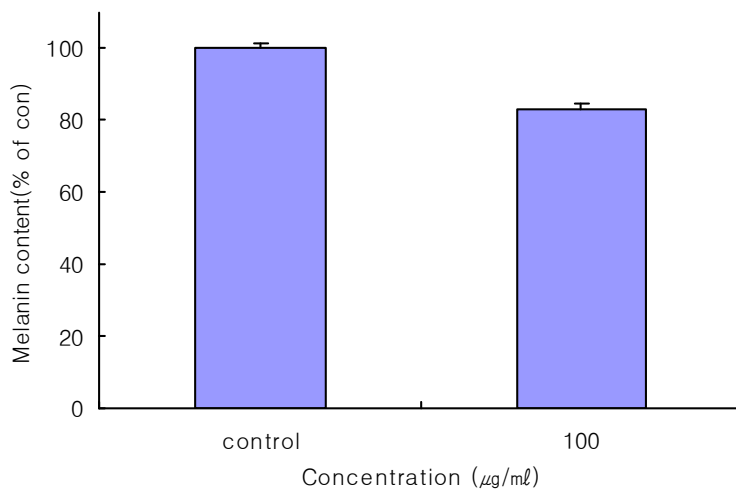


Fig. 17. Inhibitory effect of *Hemerocallis fulva* L. extracts on melanin production in B16F10 cells.

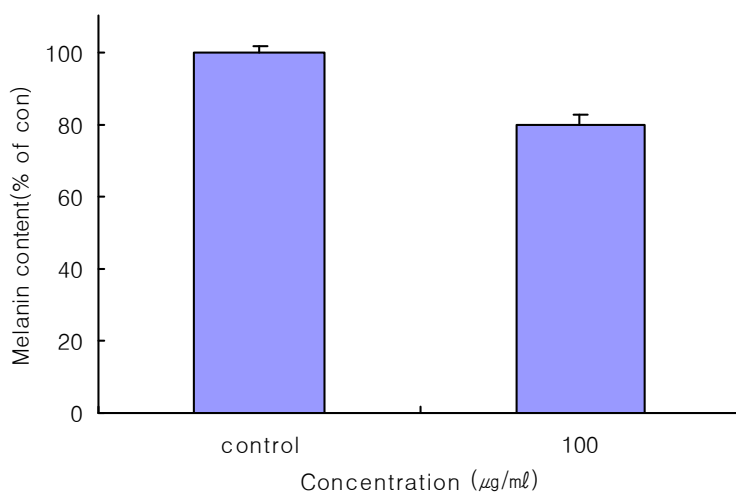


Fig. 18-a. Inhibitory effect of *Cornus officinalis* extracts (concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$) on melanin production in B16F10 cells.

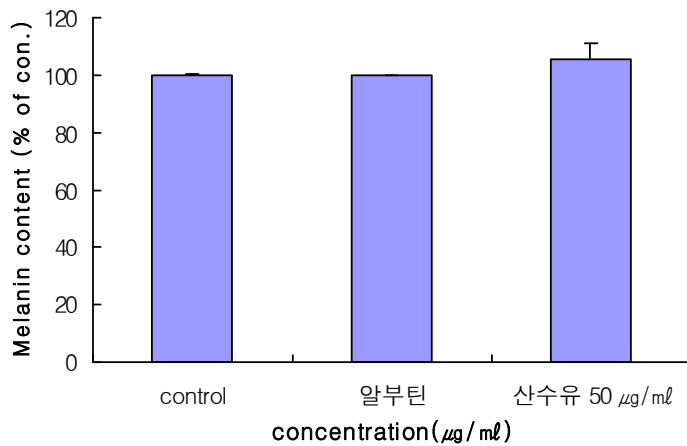


Fig. 18-b. Inhibitory effect of *Cornus officinalis* extracts (concentration of 50 µg/ml) on melanin production in B16F10 cells.

	control	arbutin	<i>Isodon inflexus</i>	<i>Hosta plantaginea</i>	<i>Hemerocallis fulva</i> L.	<i>Cornus officinalis</i>	
			100µg/ml	100µg/ml	100µg/ml	100µg/ml	50µg/ml
Melanin content(%)	100±1.2	99.89±0.24	88.75±5.2	82.6±4.36	82.9±1.99	79.7±2.86	105.74±5.5

(4) 추출물이 인간 각질세포(keratinocyte : HaCat Cell)의 세포생존율에 미치는 영향

본 실험에 사용된 세포주는 Skin Keratinocyte의 Hacat cell로 DMEM(Dulbecco's modified Eagle Medium)에 10%(V/V) Fetal Bovine Serum와 항생제 (Antibiotic antimycotic)를 첨가한 후 37°C의 배양기에서 배양하였다. 산옥잠화(꽃, 잎, 뿌리), 원추리(전초, 뿌리) 추출물에 대한 세포성장 억제 활성효과는 MTT assay를 통해 확인하였다. 96well에 3×10⁴ cell/ml의 농도로 접종하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간동안 배양시킨 후 25~800µg/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 MTT를 처리하여 MTT가 생존 세포의 효소작용에 의해 환원되도록 4시간을 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan을 DMSO를 첨가하여 녹인 후 540nm에서 흡광도를 측정하여 Cell의 생존율을 구하였다. 산옥잠화 추출물에 의한 효과는 저조하였으나 원추리(전초) 추출물의 경우 800µg/ml의 농도에서 약 30%의 세포생존율을 저해하였다.

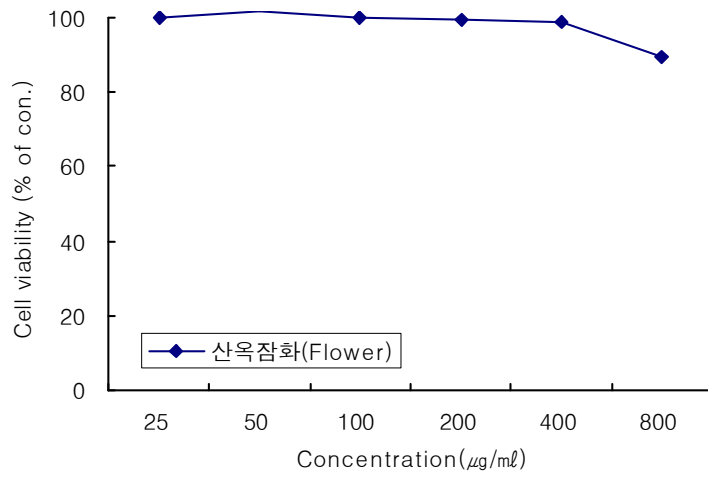


Fig. 19. Effect of the extracts from *Hosta lancifolia* flower on HaCat cells viability.

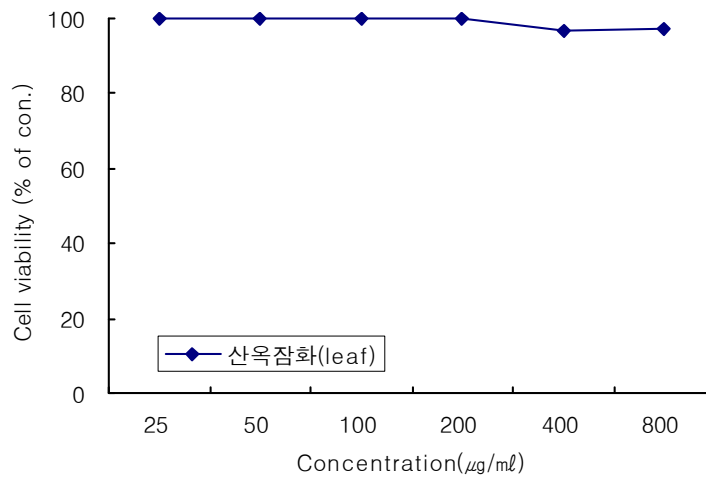


Fig. 20. Effect of the extracts from *Hosta lancifolia* leaves on HaCat cells viability.

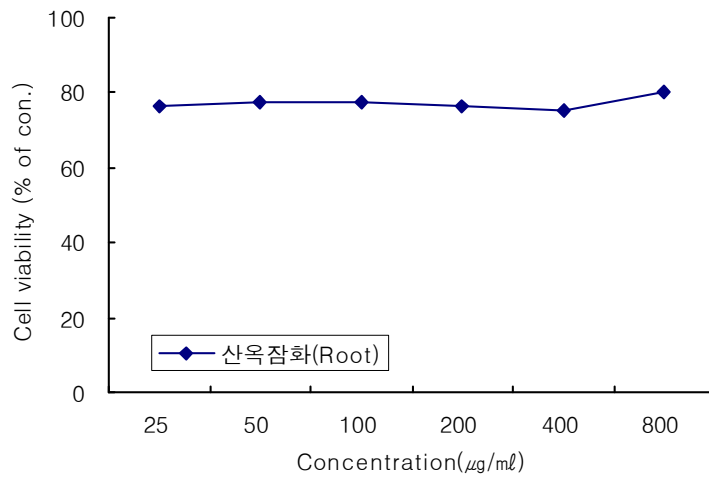


Fig. 21. Effect of the extracts from *Hosta lancifolia* roots on HaCat cells viability.

* *Hosta lancifolia* (옥잠화)의 부위별 세포 생존율(Hacat)

농도 (μg/ml)	옥잠화(Flower)	지상부(Leaf)	뿌리(Root)
25	99.86	100.00	76.59
50	101.63	100.00	77.44
100	99.95	100.00	77.63
200	99.33	100.00	76.32
400	98.72	96.51	75.47
800	89.46	97.27	80.20

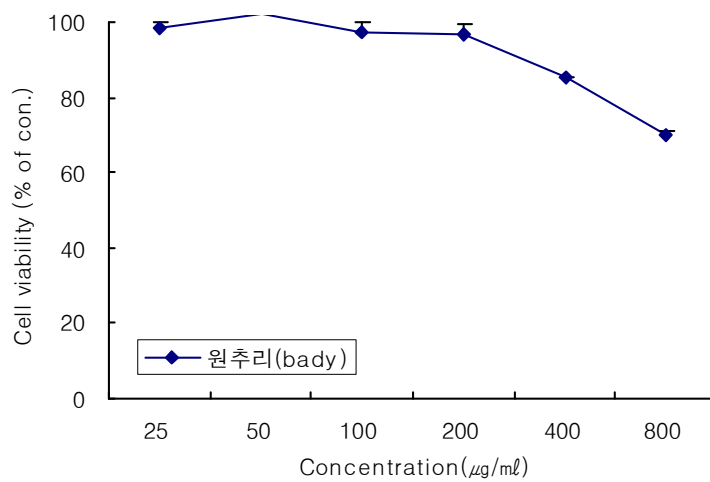


Fig. 22. Effect of the extracts from *Hemerocallis aurantica* whole plant(원추리 전초) on HaCat cells viability.

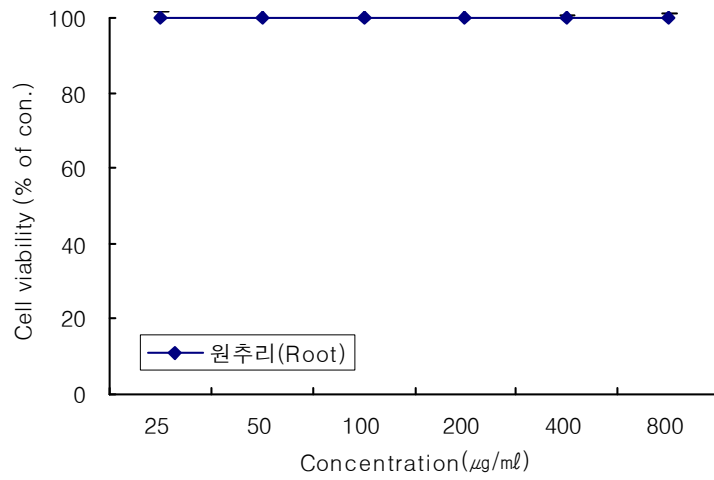


Fig. 23. Effect of the extracts from *Hemerocallis aurantica* root(원추리 뿌리) on HaCat cells viability.

* *Hemerocallis aurantica* (원추리)의 부위별 세포생존율(Hacat)

농도 (µg/ml)	원추리(bady)	원추리(root)
25	98.54	100.00
50	101.95	100.00
100	97.32	100.00
200	96.78	100.00
400	85.03	100.00
800	69.93	100.00

세부과제 (주관기관; 순천대학교)

Essential oil의 노인 배뇨장애취에 대한 탈취능 분석

몇가지 식물(옥잠하, 원추리, 왕원추리, 산수유, 박하) 추출물이 배양 NIH3T3 섬유모세포의 세포생존율과 세포부착율에 미치는 세포독성에 관한 연구

A Study on the Cytotoxic Effects of Some Plant Extracts on the Cell viability and Cell Adhesion Activity in Cultured NIH3T3 Fibroblast

서 론

최근 식물이나 한약재의 추출물중에 항암효과를 비롯한 항산화, 항염, 항균과 같은 여러 생리활성을 나타내는 성분들이 다량 함유되어 있다고 알려지면서 이를 이용한 병변의 치료적 약물 개발은 물론 화장품제조나 의약품제조 및 건강식품등의 제조에 많은 노력을 기울이고 있다(Kim 등, 2002; Wang 등, 2006; Gate 등, 2007). 지금까지 식물로 부터 추출정제된 추출물을 살펴보면 페놀화합물(phenol compound)을 비롯한 터펜, 카로틴, 이소프란유도체, 탄닌 및 스테로이드등이 알려져 있다(Hirota 등, 2000; Krizkova 등, 2000). 이들은 과일을 비롯한 채소류, 견과류등에 풍부하게 들어 있어 쉽게 섭취할 수 있다(Sun 등, 2002; Jung 등, 2003). 특히, 페놀화합물과 같은 성분들은 이의 분자구조에 수산기(OH⁻)를 비롯하여 카르복실기(COOH⁻)와 같은 사슬(chain)를 가지고 있는데 수산기는 다른 화합물과 친화력이 강하기 때문에 결합한 후 항염이나 항독소, 항산화등과 같은 약리활성을 나타낸다고 보고된 바 있다(De-Heredia 등, 2001; Han 등, 2006). 대체로 식물로 부터 정제된 천연추출물은 기존의 화학제에 비하여 독성이 미약하거나 또는 거의 없어 각종 식품첨가물이나 미용재료등에 활용도가 높아가고 있다(Goldberg 등, 1999; Krizkova 등, 2000). 한편, 층층나무과를 비롯하여 광대나물과, 백합과, 물푸레과등에 속하는 식물들도 페놀화합물과 같은 약리활성을 나타내는 성분들을 함유하고 있다고 제시된 바 있다(Yang 등, 1973; Seo 등, 1999). 이에 대한 몇가지의 예를 들어보면 다음과 같다. 백합과에 속하는 옥잠화(*Hosta longissima* HONDA)는 7-8월에 개화하는 여러해살이풀로 맛은 담백하며 시원하다. 층층나무과에 속하는 산수유(*Macrocapium officinale* NAKAI)는 낙엽활엽수로 씨를 약으로 사용하며 맛은 시고 뚝으며 성질은 따뜻하고 독이 없다. 코르긴갈릭산을 비롯하여 타르타릭산, 말릭산, 비타민 A, 주석산 및 능금산등 다양한 성분을 가지고 있다. 산수유는 오래전 부터 현기증을 비롯한 중이염, 강장, 수렴등에 널리 사용되어 왔다(김과 소, 1995). 백합과에 속하는 원추리(*Hemerocallis fulva* L)는 여러해살이풀로서 뿌리를 약재로 사용한다. 맛은 달고 성질은 서늘하며 뿌리는 약간의 독이 있다. 뿌리에는 비타민A,C를 비롯하여 아르기닌, 콜린, 아스파라긴 및 글루코사이드등 많은 성분들이 함유되어 있다. 오래전 부터 유선염을 비롯한 부종 및 수종등에 사용되어 왔다(장, 2003). 백합과에 속하는 왕원추리(*Hemerocallis fulva* var. Kwanso REGL)는 여러해살이풀로 뿌리를 약재로 사용한다. 아데닌을 비롯한 콜린, 아르기닌성분등을 함유하고 있으며 원추리와 비슷하게 수종을 비롯한 월경과다, 황달, 유선염등에 사용되어 왔다(장, 2003). 광대나물과에 속하는 박하(*Mentha canadensis*

var. piperascens HARA)는 여러해살이풀로 잎과 줄기를 약재로 사용되어 왔다. 시원스럽고 향긋한 향을 풍기며 주성분은 멘톨을 비롯하여 캄펜, 리모넨등을 함유하고 있다. 오래전 부터 두통을 비롯한 오심, 소화불량, 부스럼에 사용되어 왔으며 박하유는 동물실험에서 중추신경억제 및 심근마비를 일으킨다고 알려져 있다(김과 소, 1995). 그러나 몇몇 식물추출물중에는 간혹 독성을 나타내는 성분이 들어 있을 수가 있으며 다량 사용시 각종 부작용을 유발할 수 있는 경우가 있다(Hrota 등, 2000; Leung 등, 2007). 따라서 실제로 이들 추출물의 적용전에는 이에 대한 안전성에 대한 평가가 이루어져야 하기 때문에 세포독성에 대한 검색은 물론 임상적 실험에 대한 과정이 반드시 필수적 이다(Lavid 등, 2001; Li 등, 2007). 위에서 열거한 추출물은 물론이고 그 밖에도 다른 추출물에 대한 안전성평가에 대한 기초자료가 매우 부족하기 때문에 이에 대한 연구가 시급한 실정에 있다(Kikuzaki 등, 1993; Kim 등, 2003). 한편, 세포독성을 측정하는 시험관내분석법(in vitro assay)으로 가장 널리 알려진 것으로는 비색분광법(colorimetric assay)이 있는데 이는 초생체염색약(supravital dye)을 사용하여 세포내 소기관의 효소활성을 측정하는 방법의 하나이다(Mosmann, 1983). 예를 들면, MTT분석법은 사립체의 막효소의 활성을 청색의 formazan MTT로 환원된 물질을 검색하는 방법이며, NR분석법은 용해소체의 효소활성을, XTT분석법은 사립체핵에 대한 활성을 각각 정량하는 분석방법이다(Mosmann, 1983; Borenfreund와 Puerner, 1984; Goodwin, 1995).

본 연구에서는 옥잠화를 비롯한 왕원추리, 원추리, 산수유 및 박하추출물에 대한 세포독성을 조사하기 위하여 MTT분석법과 NR분석법에 의한 세포생존율(cell viability)과 XTT분석법에 의한 세포부착율(cell adhesion activity)을 배양 NIH3T3섬유모세포(mouse skin fibroblast)를 재료로 조사하였다.

재료 및 방법

재료

배양세포

본 실험에 사용한 NIH3T3섬유모세포는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하여 사용하였다.

시약

본 실험에 사용한 MTT, NR, XTT는 Sigma Chemical Co.(U.S.A)에서 구입하였으며Eagle's minimum essential medium(EMEM), fetal bovine serum(FBS), fungizone, penicillin G, streptomycin은 Gibco Chemical Co.(U.S.A)에서 구입하였다. 그 밖에 시약은 특급시약을 구하여 실험에 사용하였다.

실험기기

CO₂ incubator(Forma Scientific Co. U.S.A), 위상차도립현미경(Olympus, Japan), 무균대(SH-BCB1, SAMHEUNG, Korea), ELISA reader(THERMOmax, U.S.A)를 각각 사용하였다.

약재추출

본 실험에 사용한 약재인 옥잠화(*Hosta longissima* HONDA: HL), 왕원추리(*Hemerocallis fulva* var. Kwanso, REGL, HFVK), 원추리(*Hemerocallis fulva* L: HF), 산수유(*Macrocapium officinale* NAKAI: MO) 및 박하(*Mentha canadensis* var. *piperascens* HARA: MCVP)는 구례에서 구입하였다. 각 약재의 추출은 산수유70g, 박하70g은 각각 1L의 메탄올과, 왕원추리 600g, 원추리 600g 및 옥잠화 600g은 각각 6L의 메탄올과 함께 넣어 일정 시간 정치한 다음 추출하였다. 메탄올추출액은 농축시킨 후 여과과정을 거쳐 다시 농축시킨 후 본 실험에 사용하였다.

세포배양

NIH3T3섬유모세포(mouse skin fibroblast)의 배양은 배양용기(25cm² flask, Nunc)에 넣어 계대배양하여 사용하였다. 세포배양을 위한 배양액은 EMEM에 10%FBS를 비롯하여 fungizone(25ug/ml), penicillin G(25U/ml), streptomycin(25ug/ml)을 첨가하여 사용하였다. 세포배양은 위의 배양액에 세포를 넣어 37°C, 5%CO₂/95%O₂로 조절된 습기찬 정온기내에서 배양하였으며, 배양된 세포는 0.25% trypsin(Gibco Chemical Co. U.S.A)으로 처리하여 Turk혈구계산기로 1x10⁵cell/well이 되도록 산정하였다. 세포의 계대배양시 3일 간격으로 배양액을 교환하여 주었다.

세포독성 측정

세포독성을 측정하기 위하여 배양중인 NIH3T3섬유모세포에 25, 50, 100, 150, 200ug/ml농도의 각각의 시료를 48시간 동안 처리한 다음 MTT분석법과 NR분석법에 의한 세포생존율을, XTT분석법에 의한 세포부착율을 각각 정량하였다. 세포독성은 Borenfreund와 Puerner(1984)의 독성판정기준에 따라 화학제의 세포독성[고독성: (IC₅₀<100uM(ug/ml), 중간독성: 100uM(ug/ml)≤IC₅₀<1000uM(ug/ml), 저독성: 1000uM(ug/ml)≤IC₅₀<2000uM(ug/ml), 무독성: 2000uM(ug/ml)≤IC₅₀)]과, 추출액의 세포독성[고독성: (IC₅₀<10uM(ug/ml), 중간독성: 10uM(ug/ml)≤IC₅₀<100uM(ug/ml), 저독성: 100uM(ug/ml)≤IC₅₀<200uM(ug/ml), 무독성: 200uM(ug/ml)≤IC₅₀)]을 적용하였다.

MTT(Tetrazolium MTT)분석은 Mosmann(1983)의 분석방법에 의하였으며, 실험은 각 추출물의 시료를 농도별로 배양 NIH3T3섬유모세포에 48시간 동안 처리하여 배양하였다. 배양이 완료된 후 실험전날 제조한 50ug/ml가 포함된 배양액을 well당 1ml씩 넣어 3시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 배양액을 버리고 PBS로 3회 세척한 다음 웰으며ePBylsmifo외으세척을 well당 2ml씩 넣어 실온에서 5분 동안 방치한 다음 용해된 formazan MTT를 ELISA re 세척으로 550nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

NR(Neutral red)정량은 Borenfreund와 Puerner(1984)의 방법에 의하여 행하였으며, MTT분석법과 동일하게 배양 NIH3T3섬유모세포에 시료를 48시간 동안 처리하였다. 처리후 당일 제조한 50ug/mlNR을 well당 1ml씩 넣어 37°C로 조절된 항온기에서 3시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 배양액을 버리고 PBS로 3회 세척하였다. 세척후 1% formaldehyde-1% CaCl₂를 well당 0.5ml씩 넣어 세포를 고정한 다음 1% glicial acetic acid-50% ethanol을 well당 2ml씩 넣은 다음 실온에서 15분 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 ELISA reader로 540nm에서 흡

광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

XTT(Tetrazolium XTT)정량은 1mg laminin으로 처리된 배양용기에 NIH3T3섬유모세포를 1×10^5 cell/well로 넣은후 각 추출물시료를 48시간 동안 처리하였다. 배양이 완료된 후 실험 전날 제조한 50ug/ml를 well당 200ul씩 넣어 3시간 동안 배양하였다. 배양완료후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide를 well당 2ml씩 넣어 실온에서 10분간 처리한 다음 ELISA reader로 450nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

통계처리

본 실험의 결과자료는 SPSS(version 12)에 의하여 행하였으며 mean±SD로 표시하였다. 자료에 대한 검정은 ANOVA의 변형인 일변량분산분석(ANCOVA)에 의하여였으며 p-value가 .05미만인 경우를 유의한 것으로 하였다.

결과 및 고찰

옥잠화(Hosta lonissima HONDA: HL)추출물의 세포독성

옥잠화(HL)추출물의 세포독성을 측정하기 위하여 MTT분석법, NR분석법에 의한 세포생존율 정량 및 XTT분석법에 의한 세포부착율을 정량한 결과는 표 1과 같다. 표 1에서와 같이 MTT 분석법에서 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 농도에서 세포생존율은 각각 대조군에 비하여 94.6%, 88.1%, 78.5, 70.4%($p < 0.05$), 64.7%($p < 0.05$)로 나타났다. 또한, NR분석법에 있어서는 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 농도에서 세포생존율이 각각 99.8%, 84.2%, 79.9%, 66.2%, 53.1%($p < 0.05$)로 나타났다. XTT분석법에 있어서는 세포부착율이 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 농도에서 각각 88.7%($p < 0.05$), 77.3%($p < 0.001$), 69.9%($p < 0.001$), 68.8%($p < 0.001$), 67.8%($p < 0.001$)로 나타났다(표 1, 그림 1). 위의 3종류의 분석법 결과에서 옥잠화추출물은 200ug/ml에서 IC_{50} 농도 보다 높게 나타남으로서 Borenfreund와 Puerner(1984)의 독성판정기준에 따라 화학제의 세포독성은 중간-무독성의 범위로 나타났으며, 추출액의 세포독성은 무독성인 것으로 나타났다. Borenfreund와 Puerner는 모든 화학제의 세포독성을 IC_{50} (MTT₅₀, NR₅₀, XTT₅₀)값이 100uM(ug/ml)미만인 경우 고독성이라 하였으며, 100uM(ug/ml)에서 1000uM(ug/ml)미만인 경우를 중간독성, 1000uM(ug/ml)에서 2000uM(ug/ml)미만인 경우를 저독성, 2000uM(ug/ml)이상인 경우를 무독성이라 하였다. 추출물의 경우에 있어 세포독성은 화학제의 세포독성 농도의 1/10에서 동일한 독성값을 나타낸다고 하였다. 따라서 옥잠화추출물은 3종류 분석법 모두에서 200ug/ml에서 IC_{50} 이 나타나지 않았기 때문에 무독성인 것으로 나타났다.

Table 1. Cytotoxicity of HL extract on cultured NIH3T3 fibroblast

Concentration of HL(μ g/ml)	cell viability(%)		cell adhesion activity(%)
	MTT	NR	XTT
control	251.44±67.9(100)	204.57±83.2(100)	117.57±15.6(100)
25	237.78±64.4(94.6)	204.14±106.5(99.8)	104.29±19.1(88.7)*

50	221.44±78.3(88.1)	172.29±93.8(84.2)	90.86±24.7(77.3)***
100	197.33±81.6(78.5)	163.43±87.7(79.9)	82.14±22.4(69.9)***
150	176.89±86.1(70.4)*	135.43±65.4(66.2)	80.86±26.3(68.8)**
200	162.78±72.6(64.7)*	108.57±50.0(53.1)*	79.71±18.4(67.8)***

The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments and asterisks of * and *** are significantly different from the control at *p<0.05 and ***p<0.001, respectively.

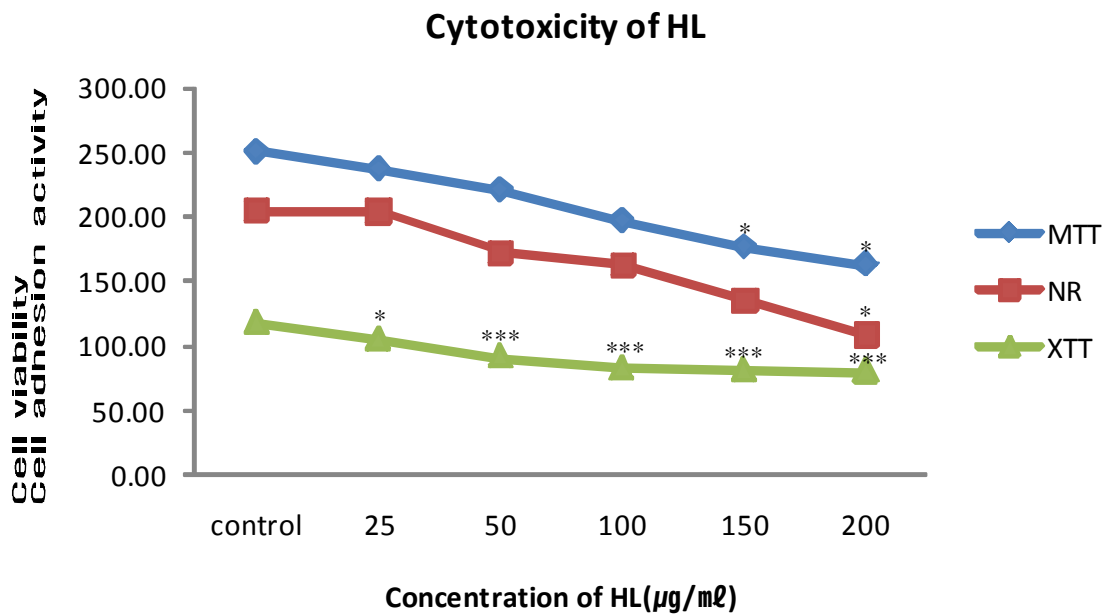


Fig. 1. Cytotoxicity of HL extract. Cytotoxicity was measured on HL(25µg, 50µg, 100µg, 150 µg and 200µg)extract. The data indicates the mean ± SD for triplicate experiments and significantly different from the control.*p<0.05,***p<0.001

왕원추리(Hemerocallis fulva. L var. Kwanso REGL: HFVK)추출물의 세포독성

배양 NIH3T3섬유모세포에 왕원추리(HFVK)추출물의 시료를 농도별로 처리한 결과 세포생존율과 세포부착율의 결과는 표 2과 같다. 표 2에서와 같이 MTT분석법에서 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 농도에서 세포생존율은 각각 대조군에 비하여 84.9%, 79.8%, 72.6%(p<0.01), 65.0%(p<0.001), 61.3%(p<0.001)로 나타났다. 또한, NR분석법에 있어서는 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 각 농도에서 세포생존율이 각각 92.7%, 78.0%, 66.8%, 54.4%, 51.6%로 나타났다. XTT분석법에서는 세포부착율이 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 농도에서 각각 90.1%(p<0.05), 77.8%(p<0.05), 68.3%(p<0.001), 66.6%(p<0.001), 65.3%(p<0.001)로 나타났다(표 2, 그림 2). 위의 실험결과로 부터 왕원추리추출물은 200ug/ml에서 옥잠화추출물에서 처럼 IC₅₀ 값보다 모두

높게 나타남으로서 화학제의 세포독성은 중간-무독성의 범위에 있는 것으로 나타났으며, 추출액의 세포독성은 옥잠화추출물에서 무독성인 것으로 나타났다.

Table 2. Cytotoxicity of HFVK extract on cultured NIH3T3 fibroblast

Concentration of HFVK($\mu\text{g/ml}$)	cell viability(%)		cell adhesion activity(%)
	MTT	NR	XTT
control	211.90 \pm 54.6(100)	177.00 \pm 100.2(100)	120.14 \pm 16.2(100)
25	179.80 \pm 61.4(84.9)	164.00 \pm 119.6(92.7)	108.29 \pm 17.2(90.1)
50	169.00 \pm 42.0(79.8)	138.00 \pm 91.8(78.0)	93.43 \pm 25.1(77.8)*
100	153.90 \pm 37.6(72.6)**	118.29 \pm 72.8(66.8)	82.00 \pm (21.0(68.3)***
150	137.70 \pm 40.8(65.0)***	96.29 \pm 61.6(54.4)	80.00 \pm 16.5(66.6)***
200	130.00 \pm 47.5(61.3)***	91.29 \pm 61.8(51.6)	78.43 \pm 16.7(65.3)***

The data indicate the mean \pm SD for triplicate experiments and asterisks of *, ** and *** are significantly different from the control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, respectively.

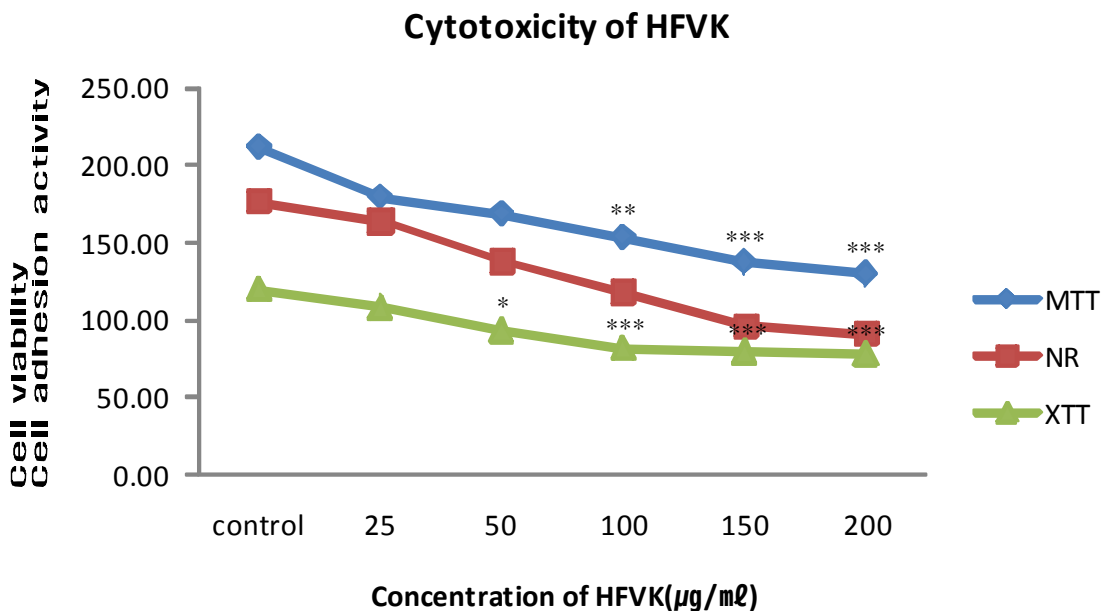


Fig. 2. Cytotoxicity of HFVK. extract. Cytotoxicity was measured on HFVK (25 μg , 50 μg , 100 μg , 150 μg and 200 μg). The data indicate the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

원추리(*Hemeracallis fulva*, L: HF)추출물의 세포독성

원추리(HF)추출물의 세포독성을 조사하기 위하여 배양중인 NIH3T3섬유모세포에 원추리추출물의 시료를 위의 추출물과 동일한 농도별로 처리한 결과는 표 3과 같다. 표 3에서와 같이 MTT분석법에서 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 농도에서 세포생존율은 각각 대조군에 비하여 84.2%, 66.6%, 58.1%(p<0.01), 54.7%(p<0.001), 41.9%(p<0.001)로 나타났다. 또한, NR분석법에 있어서는 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 농도처리에서는 세포생존율이 각각 94.9%, 63.6%(p<0.01), 61.7%(p<0.01), 45.6%(p<0.001), 38.4%(p<0.001)로 나타났다. XTT분석법에서는 세포부착율이 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 농도에서 각각 88.9%(p<0.01), 73.0%(p<0.001), 66.6%(p<0.001), 61.6%(p<0.001), 59.3%(p<0.001)로 나타났다(표 3, 그림 3). 위의 실험결과에서 보는 바와 같이 원추리추출물은 200ug/ml에서 XTT분석법에서는 IC₅₀ 값보다 모두 높게 나타난데 비하여 MTT분석법에서는 200ug/ml에서, NR분석법에서는 150ug/ml와 200ug/ml에서 각각 IC₅₀ 값이 나타났다. 따라서 화학제의 세포독성은 중간독성인 것으로 나타났으며, 또한 추출액의 세포독성은 저독성인 것으로 나타났다.

Table 3. Cytotoxicity of HF on cultured NIH3T3 fibroblast

Concentration of HF(μ g/ml)	cell viability(%)		cell adhesion activity(%)
	MTT	NR	XTT
control	200.46 \pm 60.1(100)	160.78 \pm 62.2(100)	113.63 \pm 6.2(100)
25	168.85 \pm 61.5(84.2)	152.56 \pm 62.7(94.9)	101.00 \pm 9.4(88.9)***
50	133.46 \pm 56.4(66.6)	102.33 \pm 41.0(63.6)**	83.00 \pm 14.1(73.0)***
100	116.38 \pm 69.1(58.1)**	99.22 \pm 35.9(61.7)**	75.63 \pm 13.3(66.6)***
150	109.62 \pm 59.5(54.7)***	73.33 \pm 30.4(45.6)***	70.00 \pm 6.9(61.6)***
200	83.92 \pm 44.0(41.9)***	61.67 \pm 20.7(38.4)***	67.38 \pm 6.8(59.3)***

The data indicate the mean \pm SD for triplicate experiments and asterisks of ** and *** are significantly different from the control at **p<0.01 and ***p<0.001, respectively.

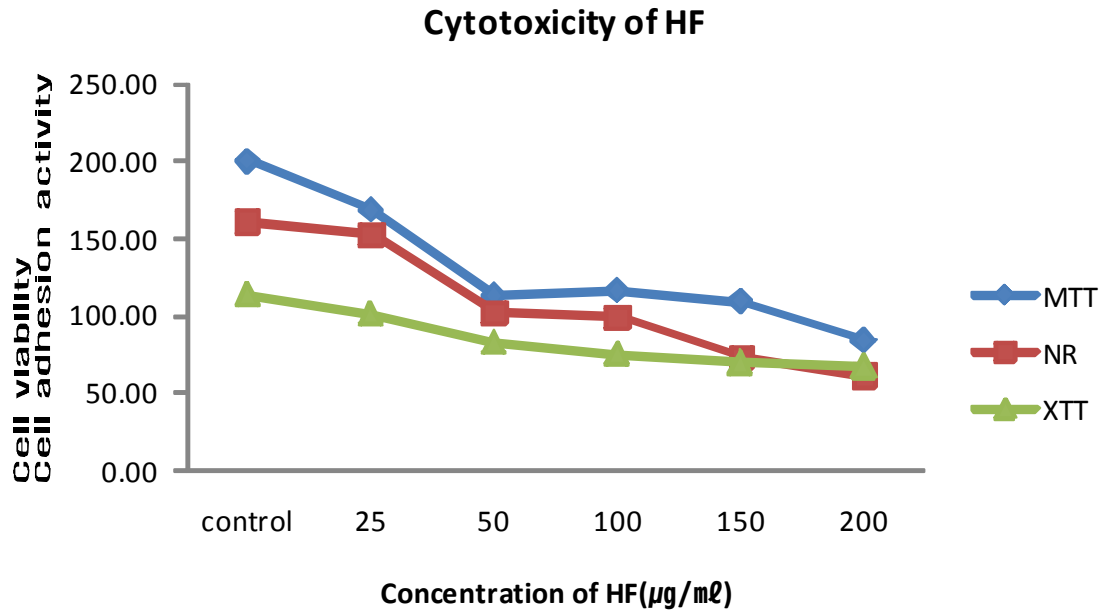


Fig. 3. Cytotoxicity of HF extract. Cytotoxicity was reacted with HF (25µg, 50µg, 100µg, 150µg and 200µg). The data indicates the mean ± SD for triplicate experiments and significantly different from the control.

p<0.01, *p<0.001

산수유(Macrocapium officinale NAKAI: MO)추출물의 세포독성

배양중인 NIH3T3섬유모세포에 산수유(MO)추출물의 시료를 농도별로 48시간 동안 처리한 결과 세포생존율과 세포부착율에 대한 정량분석 결과는 표 4와 같다. 표 4에서 보는 바와 같이 MTT분석법에 있어서 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 농도에서 세포생존율은 각각 대조군에 비하여 96.4%, 95.2%, 84.9%, 71.0%, 65.2%로 각각 나타났다. 또한, NR분석법에 있어서는 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 각 농도에서 세포생존율이 각각 92.3%, 80.7%, 78.5%, 62.1%, 56.9%(p<0.05)로 나타났다. XTT분석법에 의한 세포부착율은 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 농도에서 각각 94.9%, 91.0%, 85.7%, 84.8%, 77.6%로 나타났다(표 4, 그림 4). 위의 3종류의 분석법의 결과에서 처럼 산수유추출물은 200ug/ml에서 위의 추출물에서와 같이 IC₅₀ 값보다 모두 높게 나타남으로서 화학제의 세포독성은 중간-무독성인 것으로 나타났으며, 추출액의 세포독성은 무독성인 것으로 나타났다.

Table 4. Cytotoxicity of MO extract on cultured NIH3T3 fibroblast

Concentration of MO(µg/ml)	cell viability(%)		cell adhesion activity(%)
	MTT	NR	XTT
control	284.20±99.6(100)	158.22±70.4(100)	126.29±42.6(100)
25	274.00±119.8(96.4)	146.11±89.1(92.3)	119.86±44.0(94.9)

50	270.60±100.0(95.2)	127.67±75.0(80.7)	114.86±44.1(91.0)
100	241.40±101.7(84.9)	124.22±70.8(78.5)	108.29±42.2(85.7)
150	201.80±70.8(71.0)	98.33±61.1(62.1)	107.14±50.6(84.8)
200	185.20±108.7(65.2)	90.00±55.9(56.9)	98.00±48.6(77.6)

The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments.

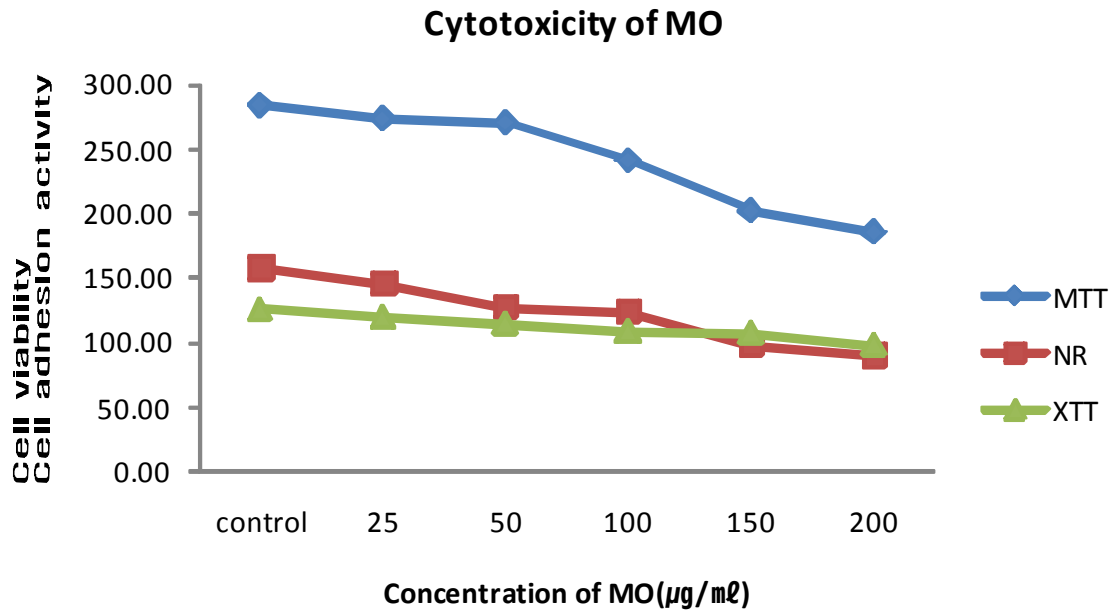


Fig. 4. Cytotoxicity of MO extract. Cytotoxicity was measured on MO (25µg, 50µg, 100µg, 150µg and 200µg). The data indicates the mean ± SD for triplicate experiments.

박하(Mentha canadensis var. piperascens HARA: MCVP)추출물의 세포독성

박하(MCVP)추출물의 세포독성을 MTT, NR 및 XTT분석법에 의하여 조사한 결과는 표 5와 같다. 표 5에서와 같이 MTT분석법에 의한 세포생존율 정량에서 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 각 농도에서 세포생존율은 대조군에 비하여 97.6%, 84.1%, 69.5%($p < 0.01$), 53.8%($p < 0.001$), 45.4%($p < 0.001$)로 각각 나타났다. 또한, NR분석법에 의한 세포생존율에 있어서는 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 농도처리에서 각각 96.9%, 69.5%, 63.4%($p < 0.05$), 52.3%($p < 0.01$), 47.2%($p < 0.01$)로 나타났다. XTT분석법에 의한 세포부착율은 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 농도에서 각각 90.0%, 81.6%, 70.9%, 65.8%($p < 0.05$), 59.9%($p < 0.05$)로 나타났다(표 5, 그림 5). 위의 실험결과에서 처럼 박하추출물은 원추리추출물처럼 XTT분석법에서는 200ug/ml에서 IC_{50} 값보다 높게 나타난데 비하여 MTT분석법과 NR분석법에서는 각각 200ug/ml에서 IC_{50} 값이 나타났다. 따라서 Borenfreund와 Puerner(1984)에 의한 화학제의 세포독성은 중간독성인 것으로 나타났으며, 추출액의 세포독성은 무독성인 것으로 나타났다.

Table 5. Cytotoxicity of MCVP extract on cultured NIH3T3 fibroblast

Concentration of MCVP($\mu\text{g/ml}$)	cell viability(%)		cell adhesion activity(%)
	MTT	NR	XTT
control	212.67 \pm 41.1(100)	156.11 \pm 67.8(100)	127.33 \pm 34.6(100)
25	207.58 \pm 45.0(97.6)	151.11 \pm 67.8(100)	114.56 \pm 34.5(90.0)
50	178.92 \pm 66.6(84.1)	108.56 \pm 60.1(69.5)	103.89 \pm 43.9(81.6)
100	147.83 \pm 72.0(69.5)**	99.00 \pm 58.6(63.4)*	90.22 \pm 43.4(70.9)
150	114.50 \pm 56.3(53.8)***	81.56 \pm 40.5(52.3)**	83.78 \pm 45.2(65.8)*
200	96.50 \pm 55.6(45.4)***	73.67 \pm 31.8(47.2)**	76.33 \pm 44.6(59.9)*

The data indicate the mean \pm SD for triplicate experiments and asterisks of *, ** and *** are significantly different from the control at. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, respectively.

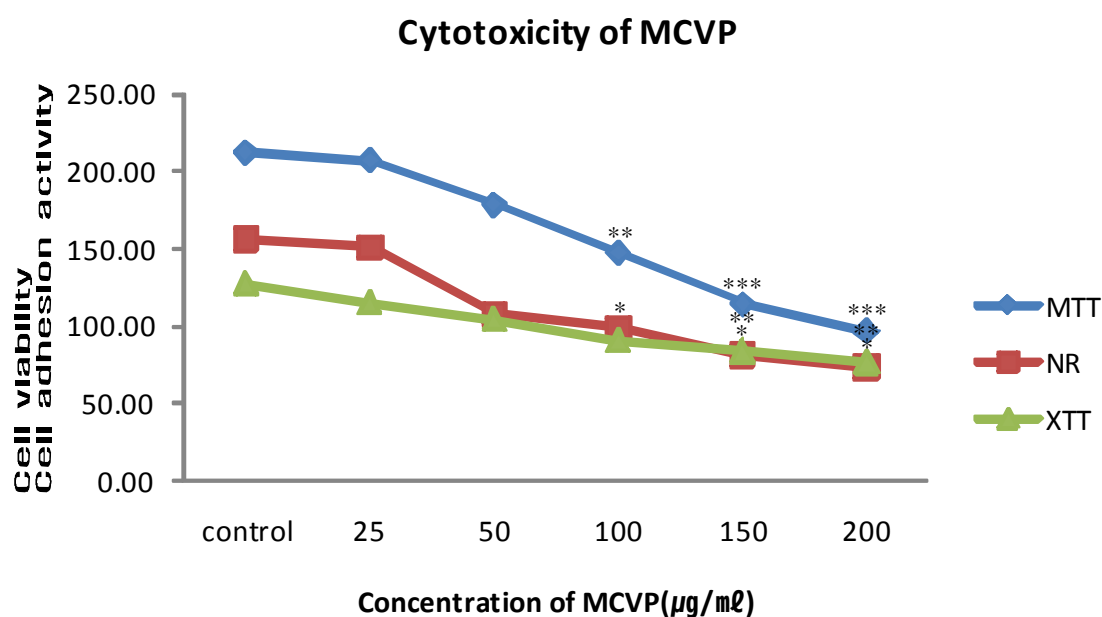


Fig. 5. Cytotoxicity of MCVP extract. Cytotoxicity was reacted with MCVP (25 μg , 50 μg , 100 μg , 150 μg and 200 μg). The data indicates the mean \pm SD for triplicate experiments and significantly different from the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

고 찰

본 연구는 옥잠화[HL(*Hosta longissima* HONDA)], 왕원추리[HFVK(*Hemerocallis fulva* var. Kwanso REGL)], 원추리[HF(*Hemerocallis fulva* L)], 산수유[MO(*Macrocapium officinale* NAKAI)] 및 박하[MCVP(*Mentha canadensis* var. *piperascens* HARA)]와 같은 몇 종류의 추출물에 대한 세포독성을 조사하기 위하여 비색분광법인 MTT분석법을 비롯하여 NR분석법 및 XTT분석법을 적용하여 각각 세포생존율(cell viability)과 세포부착율(cell adhesion activity)을 조사하였다. 최근 식물추출물중에는 중금속류에 대한 항독효과(detoxic effect)를 비롯하여 자유라디칼에 대한 항산화효과(antioxidative effect) 및 피부염과 같은 염증에 대한 항염(anti-inflammatory effect)등의 생리활성성분을 가지고 있다고 제시된 바 있다(박과 강, 1998; Lavid 등, 2001). 따라서 색소침착이나 미백을 위한 화장품의 원료나 자유라디칼에 의한 광노화와 같은 제품생산, 또는 병변의 치료제개발등 이의 사용용도가 광범위하게 적용되고 있다(Krizkova 등, 2000; 박 등, 2002; 양, 2003). 그러나 무엇보다도 중요한 것은 이들 추출물의 사용에 있어서 안전성평가에 대한 문제 때문에 세포독성의 검증은 필수적이 아닐수 없다(Peterson 등, 1981; 김 등, 1998). 최근 시험관내 분석(in viro assay)방법이 개발되면서 정확하면서도 간단한 분석법이 고안되고 있다(Michikawa 등, 1994; Kim 등, 2002; 변 등, 2005). 특히, MTT를 비롯한 NR, XTT, SRB, MTS, LDH등은 세포내의 소기관의 효소활성이나 세포막 독성을 측정하는데 있어 매우 유용한 분석도구의 하나이다(Mosmann, 1983; Goodwin 등, 1995). 따라서 본 연구에서는 이를 적용하여 위 추출물들에 대한 세포독성을 조사하였다. 본 실험에 있어서 각 추출물들을 25-200ug/ml의 농도에서 3종류의 분석법으로 분석한 결과 옥잠화, 왕원추리, 산수유추출물들은 200ug/ml에서 IC₅₀값이 나타나 않아 Borenfreund와 Puerner(1984)의 화학제의 세포독성기준에 의하여 중간-무독성인 것으로 나타난 반면, 원추리와 박하는 중간독성인 것으로 나타났다.

Borenfreund와 Puerner(1984)는 화학제를 대상으로 이의 세포독성을 각각 100, 1000, 2000uM(ug/ml)를 한계농도로 하여 IC₅₀값이 나타나는 농도에 따라 독성정도를 정하였으며, 농축된 추출물의 세포독성농도는 화학제의 독성기준농도의 1/10과 독성이 같도록 정하였다. 따라서 본 실험에서 분석한 추출물중 옥잠화, 산수유, 왕원추리, 박하는 추출물의 세포독성기준에 따라 모두 무독성인 것으로 나타났다. 박하의 경우에는 저독성의 가능성도 배제할 수는 없다. 원추리추출물에 있어서는 NR분석법에서 150ug/ml와 200ug/ml에서, MTT분석법에서는 200ug/ml에서 각각 IC₅₀값이 나타남으로서 저독성인 것으로 나타났다. MTT분석법은 사립체내막의 succinic dehydrogenase의 효소활성을 측정하는 것으로서(Mosmann, 1983), 본 실험의 MTT분석법에서 원추리와 박하추출물이 200ug/ml에서 다른 추출물에 비하여 IC₅₀값의 세포생존율이 나타남으로서 가장 민감하게 반응하였으며, 다음이 왕원추리, 옥잠화, 산수유추출물순으로 나타났다. 또한, NR분석법은 용해소체의 효소활성을 측정하는 것으로서(Borenfreund와 Puerner, 1984), MTT분석법에서 처럼 원추리와 박하추출물이 200ug/ml에서 IC₅₀값이 나타나

NR분석법에 민감하게 반응하였으며 왕원추리, 옥잠화, 산수유추출물 순으로 나타났다. 한편, XTT분석법은 사립체핵의 활성을 측정하는 것으로서(Goodwin 등, 1995), 200ug/ml에서 원추리추출물이 XTT분석법에서 가장 민감하게 반응하였으며 그 다음으로 박하, 왕원추리, 옥잠화, 산수유추출물 순으로 나타났다. 위와 같tMTT분석법따라 각 분석법에 반응하는 정도에 차이가 있는 것은 아마도 각 추출물을 구성하고 있는 마도들간의 약은 아의 차이나 또는 이들이 세포에 작용하는 부위가 서로 각각 다르기 때문인 것으로 생각된다(Goodwin 등, 1995; 양, 2003). 예를 들면, 본 실험에서 원추리추출물은 사립체효소(MTT분석법)를 비롯한 용해소체(NR분석법), 사립체핵(XTT분석법) 모두에 민감하게 작용한 반면, 박하추출물은 사립체효소(MTT분석법)와 용해소체(NR분석법)에, 옥잠화추출물은 용해소체(NR분석법)에, 산수유와 왕원추리추출물은 용해소체(NR분석법)에 가장 민감하게 반응하였다. 그러나 식물추출물들에 대한 세포독성에 대한 기전을 더욱 자세히 밝히기 위해서는 독성에 관여하는 세포내 수용체를 비롯하여 신호전달체계등의 측면에서 연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

옥잠화[HL(*Hosta longissima* HONDA)], 왕원추리[HFVK(*Hemerocallis fulva* var. *Kwanso* REGL)], 원추리[HF(*Hemerocallis fulva* L)], 산수유[MO(*Macrocapium officinale* NAKAI)] 및 박하[MCVP(*Mentha canadensis* var. *piperascens* HARA)]추출물에 대한 세포독성을 조사하기 위하여 각 추출물을 배양 NIH3T3섬유모세포에 25, 50, 100, 150, 200ug/ml의 농도별로 48시간 동안 처리한 후 MTT분석법과 NR분석법에 의하여 세포생존율(*cell viability*)을 정량하였으며, 또한 XTT분석법에 의하여 세포부착율(*cell adhesion activity*)을 각각 정량하였다. 본 실험 결과에서 옥잠화, 왕원추리, 산수유추출물은 MTT, NR 및 XTT분석법에 있어서 200ug/ml에서 모두 IC₅₀값이 나타나지 않아 Borenfreund와 Puerner(1984)의 독성판정기준에 따라 IC₅₀(MTT₅₀, NR₅₀, XTT₅₀)값을 기준으로 한 화학제의 세포독성은 중간-무독성인 것으로 나타났으며, 원추리와 박하추출물은 중간독성인 것으로 나타났다. 또한 추출물의 세포독성에 있어서는 옥잠화, 산수유, 왕원추리, 박하는 무독성으로 나타났으며 원추리추출물은 저독성인 것으로 나타났다.

각 추출물의 반응 민감도(*responsive sensitivity*)에 있어서는, 원추리추출물은 사립체효소(MTT분석법)와 용해소체효소(NR분석법), 사립체핵(XTT분석법)에 민감하게 작용한 반면, 박하추출물은 사립체효소(MTT분석법)와 용해소체효소(NR분석법)에, 옥잠화, 왕원추리, 산수유추출물은 모두 용해소체효소(NR분석법)에 가장 민감하게 작용하였다. 세포배양은 화학제나 또는 식물추출물의 독성효과나 효능을 검정하는데 유용한 재료이며, MTT, NR 및 XTT분석법과 같은 시험관내 비색분석법(*colorimetric assay*)은 세포독성을 정량적으로 측정하는데 매우 적합한 분석도구라고 생각된다.

제 2차년도 협동과제 (조선대학교)

1. 식물추출물로부터 노인피부 분비취(2-nonenal) 생성 억제화합물 분리
가. 노인냄새(2-nonenal) 생성 메카니즘과 항산화 활성물질과의 관계 분석

(1) 인간체취(human body odor)와 관련된 물질

인간의 체취(Human body odor)와 관련된 물질은 매우 다양하며 40대 이전과 이후의 연령별로 살펴보면 냄새물질의 종류와 양에 상당한 차이가 있음을 알 수 있다. 이 물질 중 40대 이후부터 고령화가 되면서 독특하게 나타나는 노인의 피부 분비취는 aldehyde류 중 2-nonenal이 그 원인 물질임이 밝혀졌다. (Table 1.)

Table 1. Some compounds detected in body odor by GC/MS analysis

Compounds	Detection rate (%)	
	<40 y (n = 9)	≥40 y(n = 13)
Hydrocarbons		
1-Octene	11	8
Decane	11	23
Undecane	22	23
Dodecane	67	69
Alcohols		
1-Butanol	11	8
1-Hexanol	11	15
2-Ethylhexanol	89	85
Octanol	11	8
1-Decanol	11	15
Amyl alcohol	11	8
Hexadecanol	11	8
Octadecanol	11	8
Acids		
Acetic acid	22	23
Butyric acid	22	15
Ketones		
4-Methyl-2-pentanone	11	8
6-Methyl-5-heptenone	89	77
Aldehydes		
Hexanal	33	23
Heptanal	11	15
Octanal	89	85
Nonanal	89	85
Decanal	89	69
2-Nonenal	0	69

(2) 노인냄새 원인물질(2-nonenal)의 구조적 특성 및 불쾌취의 특성

2-nonenal(노인냄새의 원인물질)은 unsaturated aldehyde류이며, 극미량(3-4 ppm)에서도 특이적으로 불쾌한 기름냄새와 풀냄새를 유발하게 된다 (Fig. 1, 2, Stahl, 1973).

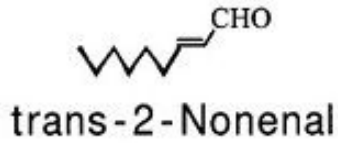
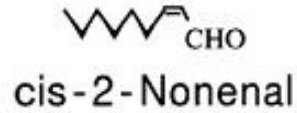


Fig. 1. 2-nonenal의 구조

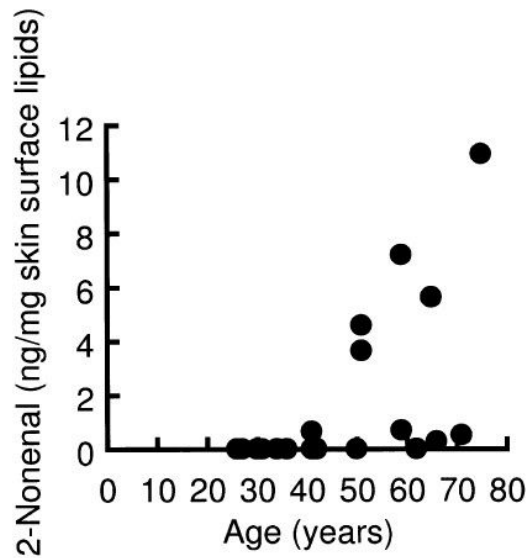


Fig. 2. Effect of aging on the amount of 2-nonenal in body odor

(3) 2-nonenal 생성 & 불포화지방산 & 과산화지질과의 관련성

2-nonenal 생성 & 불포화지방산 & 과산화지질과의 관계를 살펴보면, 사람은 연령이 증가함에 따라 피부표면을 구성하고 있는 지질(skin surface lipids) 중 ω7 unsaturated fatty acids와 lipid peroxides(과산화지질)가 증가한다 (Fig. 3, 4). 이 중 palmitoleic acid와 과산화지질의 양이 증가 할수록 2-nonenal의 생성량도 증가하게 된다. 즉, palmitoleic acid는 과산화지질에 의하여 산화적으로 분해(oxidative degradation) 되었을 경우, Fig. 5. 와 같은 기작에 의하여 2-nonenal 로 변하게 된다.

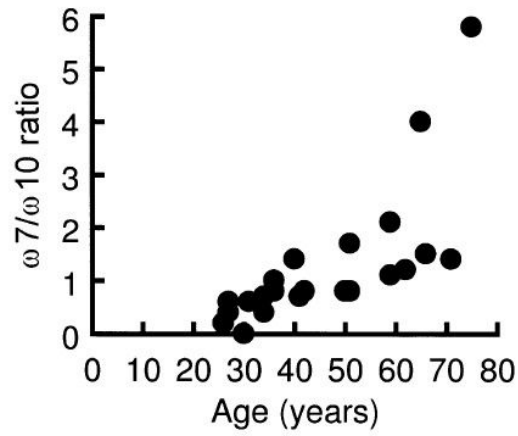


Fig. 3. Effect of aging on the quantitative ratio of $\omega 7$ monounsaturated fatty acids to $\omega 10$ monounsaturated fatty acids

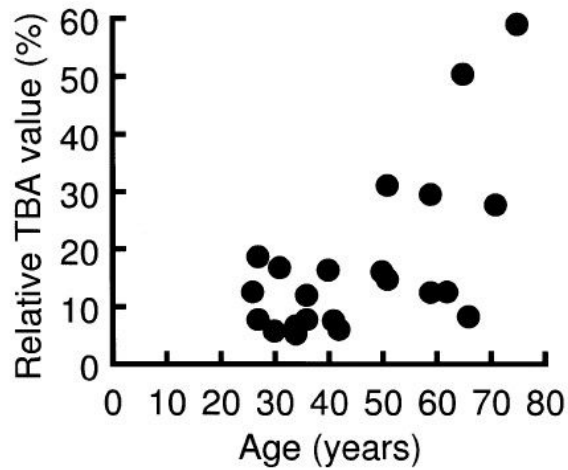


Fig. 4. Effect of aging on the amount of lipid peroxides in skin surface lipids.

(4) 2-nonenal의 생성기작

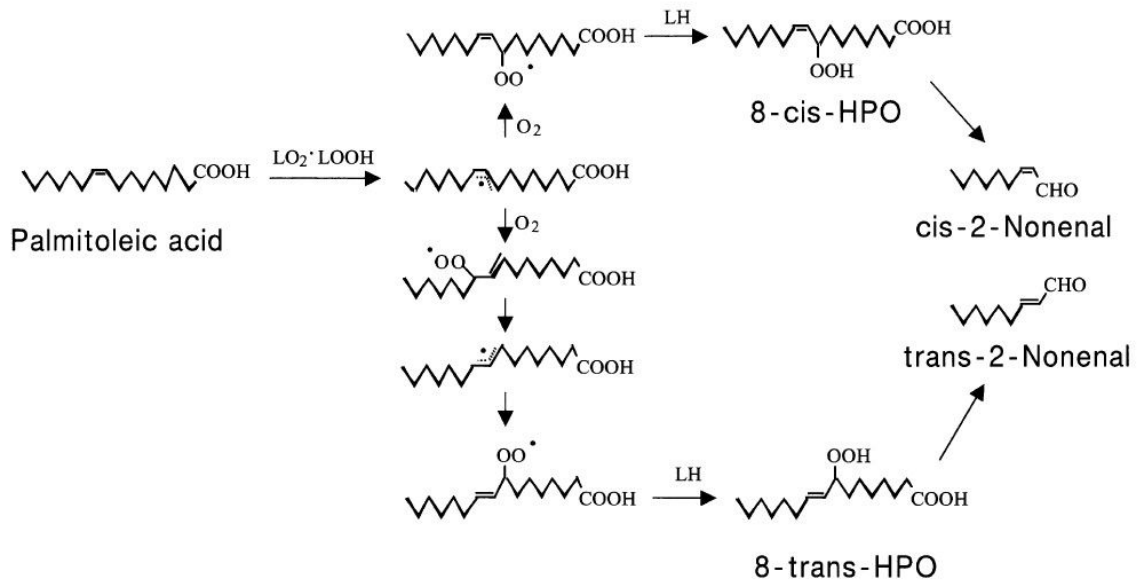


Fig. 5-a. The scheme of oxidative degradation of palmitoleic acid accelerated by lipid peroxides

* LO_2^\bullet : lipid peroxy radical, * $LOOH$: lipid peroxide, * LH (lipid), * HPO (hydroperoxide)

(5) 항산화 활성화합물에 의한 노인냄새(2-nonenal) 생성억제 기작 설계

항산화 활성화합물에 의한 노인냄새(2-nonenal) 생성 억제 : 따라서 본 연구에서는 피부의 불포화지방산인 palmitoleic acid가 과산화지질에 의하여 산화되어지는 것을 억제시키므로서 노인 피부분비취의 생성을 개선하기 위한 방법으로 항산화활성이 높은 식물성 소재로부터 항산화 활성 화합물을 분리, 정제하여 노인냄새 개선 소재로 활용하는 것을 목적으로 하였다.

(1) 대상식물들의 주요 특성 :

① 산수유(*Cornus officinalis*) : 산수유는 전라남도 구례군의 특산식물로 생산량이 매년 증가추세에 있으나 용도가 한방에 국한되어 있어 재배농가 소득창출에 크게 기여하지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 산수유를 화장품 소재로서 개발하여 그 용도와 사용범위를 넓히므로써 재배농가와 관련 기업의 경제활성화에 촉진시키기 위하여 수행되었다.

산수유 열매의 주요성분은 saponin, tannin, ursolic acid(triterpene계 saponin), gallic acid, malic acid, tartaric acid, cornusin A-F, vitamin A, loganin 등이 있으며, 종자의 지방유에는 palmitic acid, oleic acid, linolic acid 등이 함유되어 있다. 피부미용과 관련된 산수유의 주요 생리활성을 살펴보면, 세포막 보호능과 수렴효과(사포닌 15% 함유)가 있으며, 유해산소 제거에 의한 피부개선, 피부세포 증식능과 피부에 활력과 생기를 보강한다고 알려져 있다. 산수유에 함유된 uronic acid는 섬유아세포의 MMP(matrix metalloprotenase)-1의 활성을 억제(1차년도 본 연구팀의 실험결과) 하므로써 자외선차단효과가 있음을 알 수 있으며, 물 추출물 및 용매분획 추출물은 항균활성과 항산화능, 항히스타민 작용이 있는 것으로 보고되었다. 또한 ursolic acid는 melanoma 세포의 증식을 억제하고, loganin은 주름을 개선하며, 에텔 분획물은 항염증작용과 진정작용, 부종 억제효과가 있는 것으로 보고되었다.

② 옥잠화 : 피부미용과 관련된 옥잠화의 주요활성을 살펴보면, AHA 표피노외각질을 효율적으로 제거하므로써 세포재생 및 피부 생리활성을 촉진하며, 보습작용과 피부탄력증진, 세포대사촉진, 항산화능이 있다.

③ 원추리 : 원추리는 전라남도 구례군의 대표적인 야생화로 구례야생화연구소에 의해 다양한 연구가 진행되고 있으며 이를 재료로 한 화장수와 수분젤이 개발되었고, 최근에는 농가에 의해 친환경적으로 대량재배되고 있으며, 미백효과가 우수한 것으로 보고되어있다.

④ 박하 : 박하는 우리나라의 대표적인 방향성 식물로서 피부미용과 관련된 주요활성을 살펴보면, 항산화활성, 보습효과, 미백능, 주름개선효과, 가려움증과 염증을 예방하는 것으로 알려져 있다.

⑤ 은방울꽃

(나) 추출물의 Polyphenol 함량

polyphenol은 항산화기능과 피부노화 방지 및 유연성을 증진시키며, 미백기능이 우수하며, 피부에 알러지를 유발할 가능성도 낮아 피부를 개선하기 위한 천연 소재로 알려져 있다.

● **방법** : 총 폴리페놀함량은 Folin-Denis법에 따라 약간 변형하여 측정하였다. 5종의 식물 소재로부터 분리된 추출물 0.1 g에 methanol 10ml을 가하여 70℃에서 30분 동안 추출한 후 1mg/ml로 만들어서 사용하였다. 검액 50 μ l에 증류수 650 μ l를 넣은 후 Folin-Denis reagent를 50 μ l 가하여 3분동안 실온에서 반응시켰다. 반응시킨 후 10% Na₂CO₃ 포화용액을 100 μ l을 첨가하고, 최종 볼륨을 1mL로 맞추기 위해 증류수 150 μ l을 넣어 잘 혼합시켰다. 37℃ water bath에서 1시간 반응시킨 후 UV-Vis spectrophotometer를 사용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 시료 용액 대신 methanol 용액을 동일하게 처리하며, 표준곡선은 tannic acid (Sigma Co., USA)의 농도를 0~500 μ g/mL 이 되도록 하고 이로부터 총 페놀함량

을 구하였다.

● **결과** : 5종의 폴리페놀 함량을 분석한 결과, Table 2.에서와 같이 박하 추출물에서 가장 높았으며, 산수유의 경우엔 27.17 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 은방울꽃은 21.12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 옥잠화는 11.71 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 원추리의 경우엔 8.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 함유되어 있었다.

Table 2. Total polyphenol content of extracts

Plant name(Parts used)	Total Polyphenolics($\mu\text{g}/\text{ml}$)
<i>Convallaria keikei</i>	21.12
<i>Cornus officinalis.</i>	27.17
<i>Hemerocallis fulva</i> L.	8.5
<i>Hosta plantaginea</i> L.	11.71
<i>Isodon inflexus</i>	77.15

(다) 추출물의 DPPH radical 소거능

● **방법** : 항산화활성 검색은 DPPH법을 이용하여 시료의 radical 소거효과를 측정하는 Blois의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. $1 \times 10^{-4}\text{M}$ DPPH와 농도별 추출물을 각각 100 μl 씩 취하여 혼합한 30분간 암 상태에서 방치한 후 잔존 radical 농도를 ELISA Reader(Bio-RAD, USA)를 이용하여 517nm에서 측정하였다. 시료의 환원력의 크기는 라디칼 소거활성(Scavenging activity)으로 표시하며, RC_{50} 은 DPPH 농도가 1/2로 감소하는데 필요한 시료의 양(μg)으로 나타내며 항산화 물질로 잘 알려진 BHT(butylated hydroxytoluene)와 Vit C(ascorbic acid)를 비교하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity}(\%) = (\text{Ac}-\text{As})/\text{Ac} \times 100$$

Ac : 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

As : 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

● **결과** :

① 산수유(꽃, 열매), 옥잠화(전초), 원추리(잎, 뿌리), 박하(전초), 은방울꽃(전초)의 DPPH radical 소거능 : 5종의 추출물에 대하여 DPPH radical 소거능을 분석한 결과, 산수유 열매과옥 추출물(RC_{50} : 234.51 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 가장 우수한 활성을 보였으며, 박하 추출물(RC_{50} : 292.18 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 은방울꽃 추출물(RC_{50} : 617 $\mu\text{g}/\text{ml}$)도 유의할만한 소거능을 보였다. 나머지 옥잠화, 원추리의 부위별 추출물은 유의할만한 항산화활성을 보이지 않았다 (Fig. 6~11).

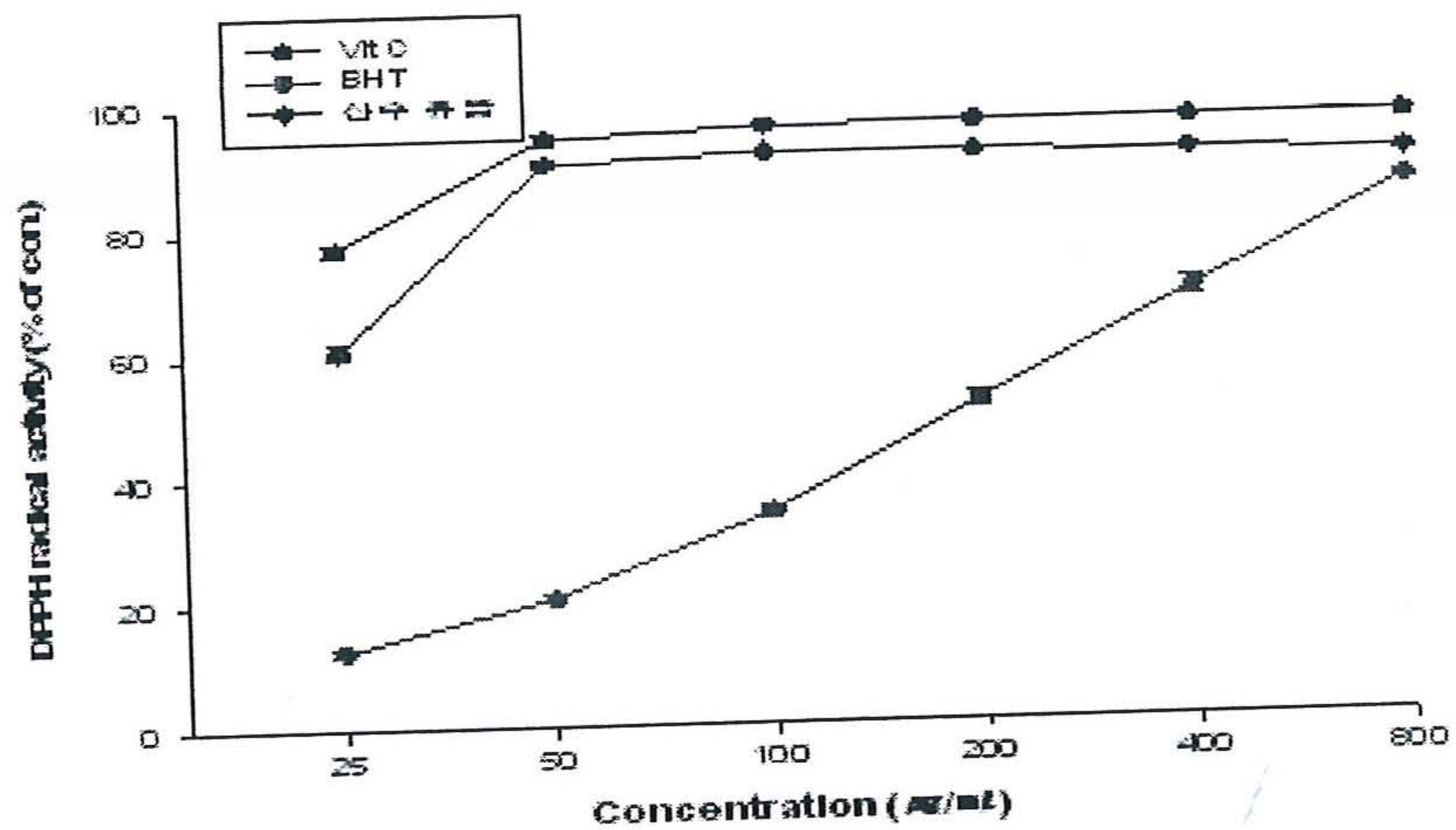


Fig. 6. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *Cornus officinalis*. flower

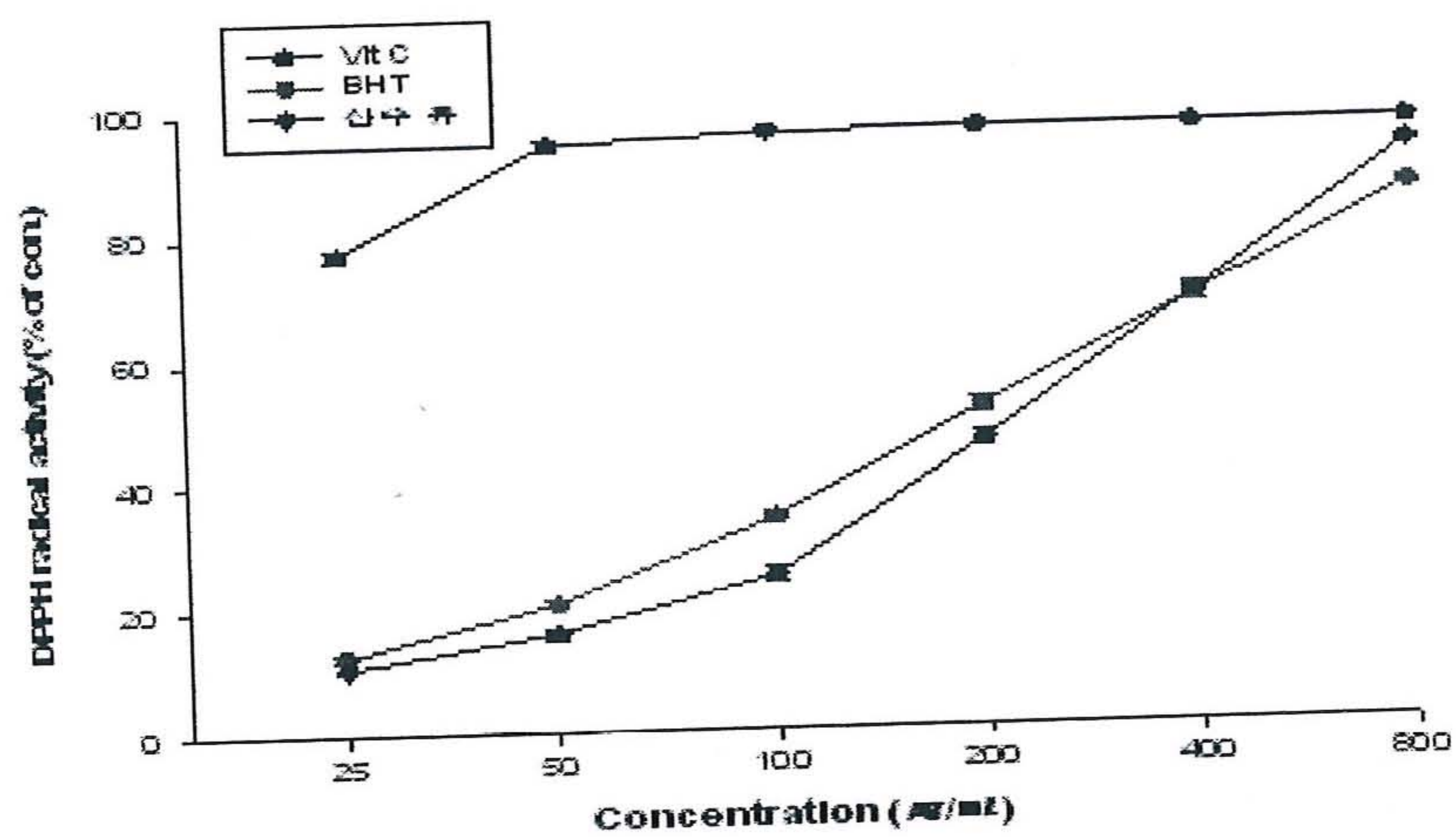


Fig. 7. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *Cornus officinalis*.

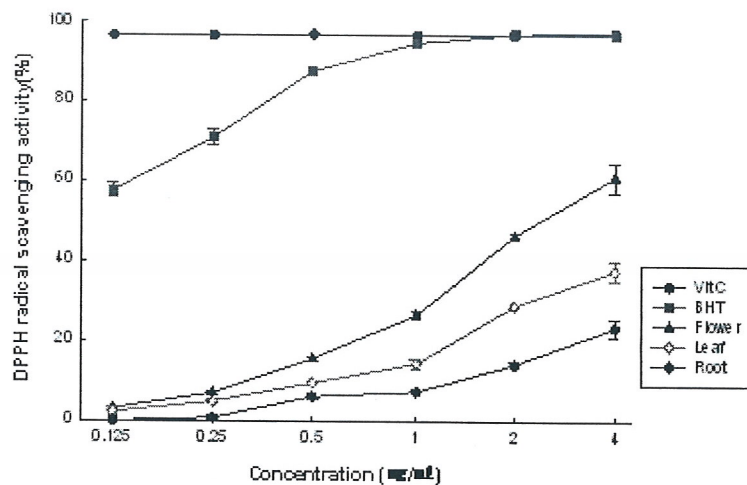


Fig. 8. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *Hosta lancifolia*

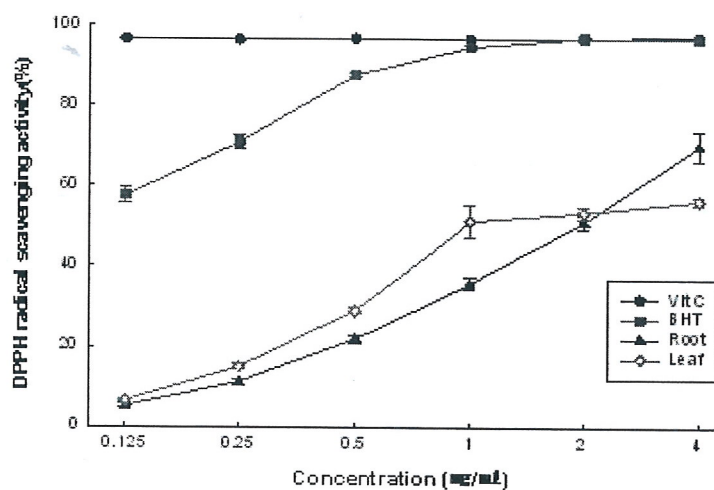


Fig. 9. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *Hemerocallis aurantica BAKER*

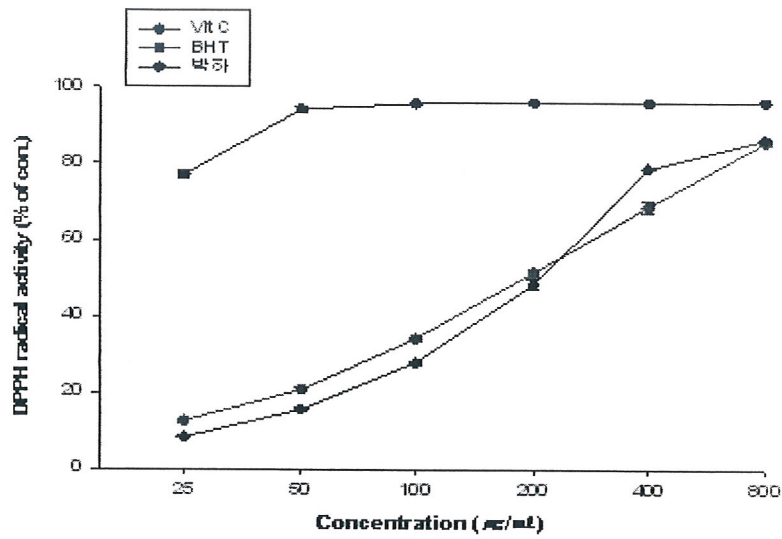


Fig. 10. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *Isodon inflexus*

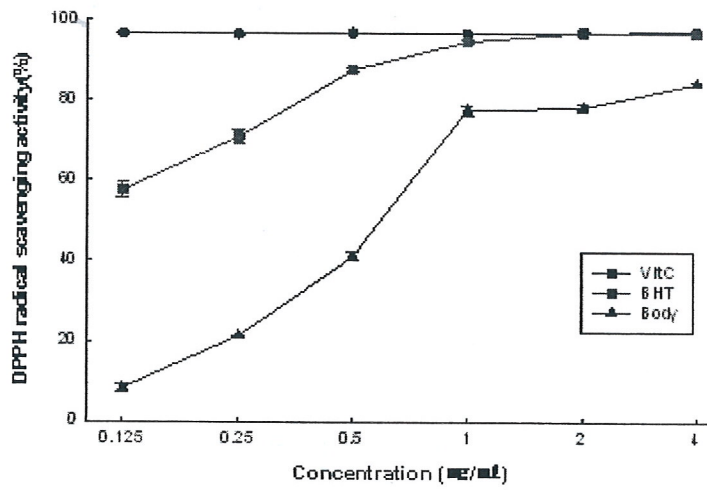


Fig. 11. DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *Convallaria keikei*

Korean name(Scientific name)	Part used	RC ₅₀ (ug/ml)
박하(<i>Mentha arvensis</i> var.)		292.18
산수유(<i>Hosta lancifolia</i>)	Flower	≥ 800
	Flesh	234.51
옥잠화(<i>Hosta lancifolia</i>)	Flower	2524
	Leaf	≥ 4000
	Root	≥ 4000
원추리(<i>Hemerocallis aurantica</i> BAKER)	Root	1942
	Leaf	978
은방울꽃(<i>Convallaria keikei</i> MIQ)	Whole plant	617
	BHT	101
	Vit.C	6.8

(라) SOD 유사활성 및 CAT 활성

● **방법** : SOD 활성은 Beauchamp and Fridovich(1971)의 방법을 응용하여 측정하였다. 50 mM carbonic buffer (pH 10.2), 0.1 mM EDTA,, 0.1mM Xanthine, 0.025 mM nitroblue tetrazolium(NBT), 효소액이 포함된 용액을 25°C에서 10분간 반응한 후 Xanthine oxidase(3.3 • 10⁻⁶mM)를 참가하여 반응을 측정하였다. SOD 활성 측정은 550nm에 30초 단위로 5분간 흡광도를 측정하였다.

catalase는 생체내의 유해한 산소들을 신속히 처리하여 세포를 보호하는 항산화계 효소로 항산화효소 H₂O₂를 분해 소거하는 대표적인 효소이다. 항산화효소(antioxidative enzyme)가 풍부한 음식을 섭취하는 것은 암이나 심장병 등의 발병가능성을 줄여준다고 생각되어왔으며 항산화효소가 신체의 노화현상을 지연시킨다는 연구보고도 있다. 이러한 항산화효소가 풍부한 보충제로는 알파 토크페롤(α -tocopherol)과 같은 지용성 비타민 E, 베타 카로틴(β -carotene), 수용성 비타민 C, 셀레늄(Se), 녹차, 클로렐라, 녹황색 야채 등이 있다고 한다. 그 중에서도 비타민 E는 세포막과 관련이 많기 때문에 인간에게 있어서 가장 중요한 지용성 항산화제(antioxidant)로 알려져 있다. 비타민 C는 수용성 과산화 radical을 제거하고 또 환원된 비타민 E를 재생시키는 역할도 한다. catalase활성은 Aebi (1984) 방법에 의하여 측정하였다. 50 mM potassium phosphate (pH 7.0)에 10 mM H₂O₂ 와 반응 효소액을 가하였다. 240nm에서 2분간의 흡광도 변화를 관찰하고 1분동안에 1uM의 H₂O₂를 분해하는 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

● 결과 :

SOD 활성을 측정한 결과, 산수유 열매(17.8 U/mg)이 우수한 효소활성을 보였으며, 그 밖의 은방울꽃 추출물과 옥잠화 잎, 원추리 잎과 꽃, 박하 추출물은 10.9~13.8 의 범위로 유사한 활성을 나타냈다. (Fig. 12., Table 3.).

CAT 활성을 분석한 결과, 산수유 열매(13.9 U/mg)와 옥잠화 잎 추출물(14.2 U/mg)이 우수한 활성을 보였으며, 은방울꽃과 원추리 잎, 원추리 꽃, 박하 추출물은 7.8~9.8 U/mg의 범위에서 유사한 활성을 나타내었다 (Fig. 12., Table 3.).

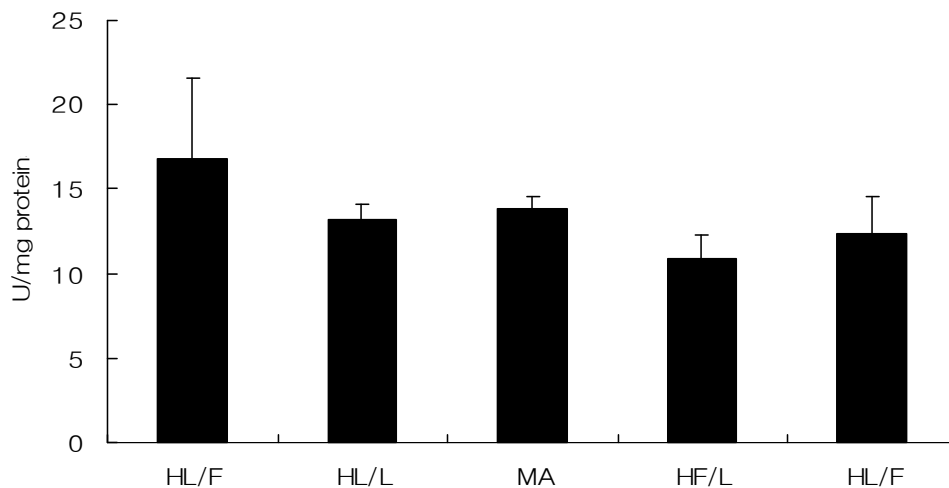


Fig. 12. 5종 식물 추출물의 SOD activity

HL/F; 산수유 열매, HL/L; 옥잠화잎. MA; 박하, HF/L; 원추리 잎, HF/F; 원추리 꽃

Table 3. CAT and SOD activities of *Cornus officinalis*, *Hosta plantaginea* leaf and flower, *Isodon inflexus* leaf, *Convallaria keikei* leaf.

Sample	CAT activity(U/mg)	SOD activity(U/mg)
<i>Cornus officinalis</i> .	13.9	17.8
<i>Hosta plantaginea</i> leaf	14.2	13.2
<i>Hemerocallis fulva</i> leaf	7.8	10.9
<i>Hemerocallis fulva</i> flower	8.8	12.4
<i>Isodon inflexus</i>	8.9	13.8
<i>Convallaria keikei</i>	9.8	13.2

3. 산수유 열매로부터 항산화 화합물 분리정제, 구조분석

5종의 추출물 중, DPPH radical 소거능과 SOD 및 CAT 활성이 가장 우수한 산수유 열매 추출물로부터 노인물질(2-nonenal)의 원인물질인 palmitoleic acid의 산화를 억제할 수 있는 항산화 화합물을 분리하고, 구조를 분석하였다.

(1) EtOH 추출물의 조제 및 용매분획물 조제

산수유 열매 과육 900 g을 50 % Ethyl Alcohol (2 l)을 용매로 사용하고 Digital Heating Mantle를 이용하여 80°C상에서 3시간 가열하여 2회 추출한 다음 그 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하여 총 추출물 307.5 g을 얻었다. 총 추출물을 증류수 1.7 l에 현탁시킨후 이로부터 용매극성에 따라 순차적으로 동량의 hexane 1.7 l씩 3회 분획하고 hexane층은 다시 감압 농축하여 이와같은 방법(Fig. 2)으로 EtOAc, BuOH에 대하여 3회 반복하여 분획물을 조제하였다

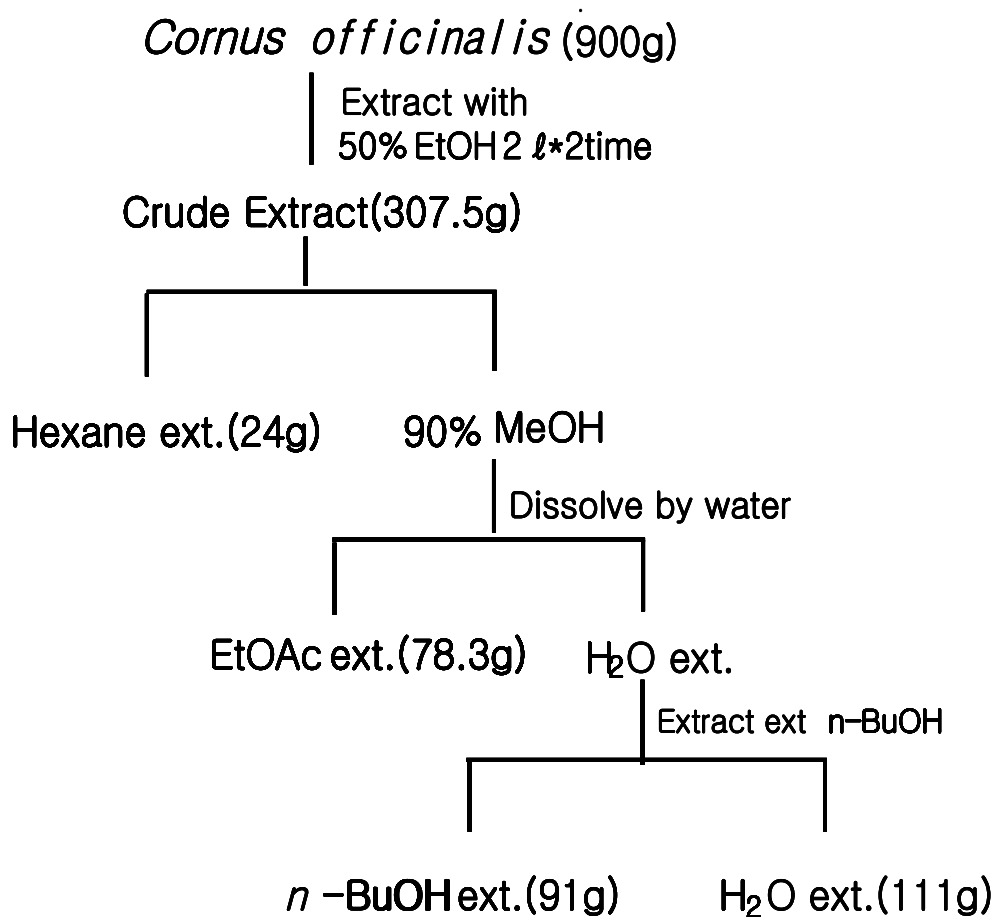


Fig 13. Extraction and fractionation procedures.

(2) EtOAc 분획물의 Silica column chromatography

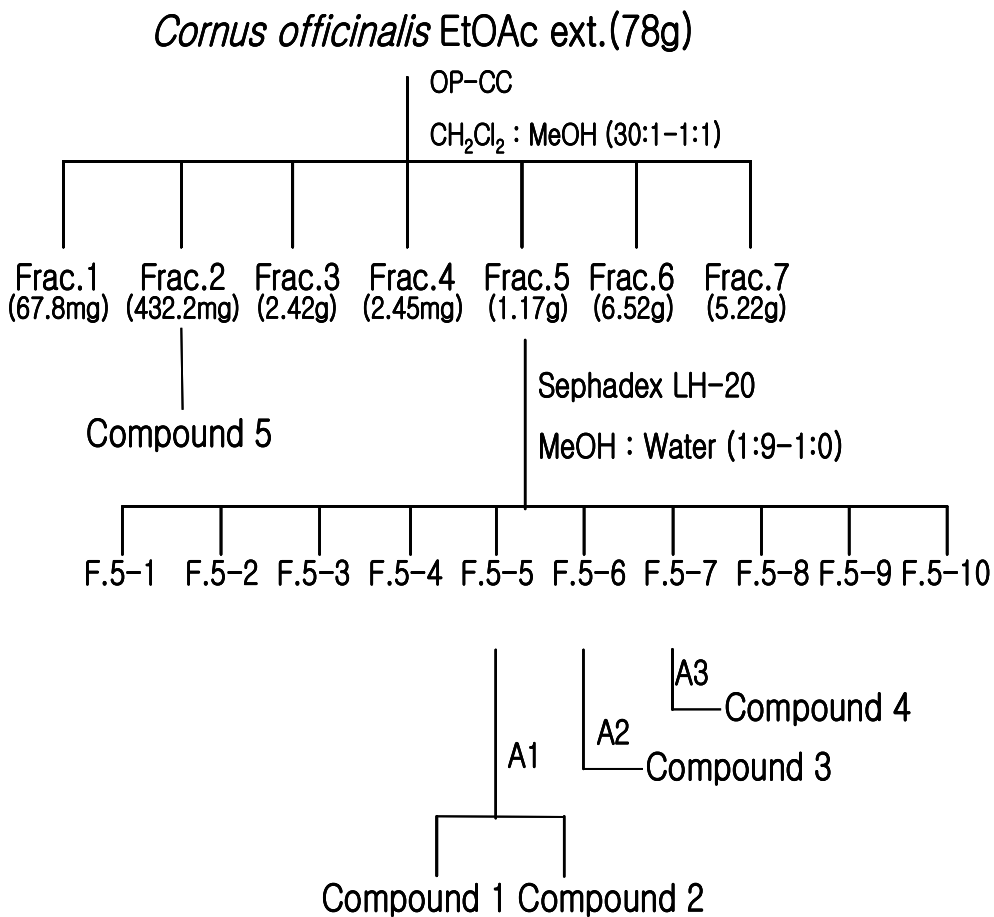
추출물 EtOAc 분획 (78.3g)에 대해 CH₂Cl₂:MeOH 용매를 이용하여 Silica gel column chromatography (30:1 ~ 0:1)를 실시하여 모두 7개의 소 분획을 얻었다 (Fig. 3).

(3) 활성분획물의 Sephadex LH-20 column chromatography

EtOAc 분획으로부터 분리된 7개의 Fraction들에 대하여 항산화 활성을 분석한 결과, 활성이 가장 높게 나타난 Fraction 5를 Sephadex LH-20 Column chromatography를 이용하여 MeOH:Water (1:9 ~ 1:0)의 조건으로 10 % ~ 100 %까지 10개의 분획을 얻었다.

(4) Compound의 HPLC profile 분석

7개의 분획물 중 활성이 가장 높은 분획물 2를 HPLC system, RP-C18 (20× 250mm, 4 μ m MeCN/H₂O+0.1% Formic acid)을 이용하여 Compound 5를 분리하였다. 분획물 5는 Sephadex LH-20 column chromatography를 이용하여 얻은 50 % 분획을 HPLC system을 이용하여 Compound 1을 분리하였고, 60 %에서는 Compound 2와 Compound 3, 70 %에서는 Compound 4를 얻을 수 있었다.



A : Gilson HPLC system, RP-C18(20× 250mm, 4 μ m MeCN/H₂O+0.1% Formic acid)
 A1 ; MeCN:Water 5:5 A2 ; MeCN:Water 6:4 A3 ; MeCN:Water 7:3

Fig 14. Isolation of compounds from EtOAc fraction in *Cornus officinalis*.

(5) HPLC에 의한 활성물질 분리, 정제

- Compound 1의 분리

EtOAc 분획을 silica gel column chromatography를 이용하여 나눈 7개의 분획물 중 5번 분획물을 MeOH:Water 용매를 이용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 시행하였다. 이후 10% ~ 100%까지 10가지 분획물 중 분리되어진 50% 분획물을 이동상 용매 MeCN:Water (33:67)로 HPLC를 이용하여 compound 1을 얻었다.

- Compound 2의 분리

EtOAc 분획을 silica gel column chromatography를 이용하여 나눈 7개의 분획물 중 5번 분획물을 MeOH:Water 용매를 이용하여 Sephadex LH-20 column을 시행하였다. 이후 10% ~ 100%까지 10가지 분획물을 얻어 분리되어진 50% 분획물을 이동상 용매 MeCN:Water (35:65)로 HPLC를 compound 2를 얻었다.

- Compound 3의 분리

EtOAc 분획을 silica gel column chromatography를 이용하여 나눈 7개의 분획물 중 5번 분획물을 MeOH:Water 용매를 이용하여 Sephadex LH-20 column을 시행하였다. 이후 10% ~ 100%까지 10가지 분획물을 얻어 분리되어진 50% 분획물을 이동상 용매 MeCN:Water (35:65)로 HPLC를 compound 3를 얻었다.

- Compound 4의 분리

EtOAc 분획을 silica gel column chromatography를 이용하여 나눈 7개의 분획물 중 5번 분획물을 MeOH:Water 용매를 이용하여 Sephadex LH-20 column을 시행하였다. 이후 10% ~ 100%까지 10가지 분획물을 얻어 분리되어진 50% 분획물을 이동상 용매 MeCN:Water (43:57)로 HPLC를 compound 4를 얻었다.

- Compound 5의 분리

EtOAc 분획을 silica gel column chromatography를 이용하여 나눈 7개의 분획물 중 2번 분획물을 이동상 용매 MeCN:Water (9:92)로 HPLC를 이용하여 compound 5를 얻었다.

(6) Compound 의 DPPH radical 소거능

산수유 열매 4가지 용매 추출물 중 가장 높은 DPPH 소거 활성을 지닌 ethyl acetate 층을 구조 분석한 결과 총 5가지의 물질을 동정하였다. 동정된 물질의 항산화 효과를 비교 분석하기 위해 DPPH radical 소거능을 조사하였다 (Table 4).

분석한 결과, gallic acid (15.63 ug/ml), cornuside (33.82 ug/ml), (7R)-O-Methyl morroniside (250 ug/ml), (7S)-O-Methyl morroniside (250 ug/ml), 그리고 loganin (308 ug/ml)의 순으로 나타났다 gallic acid와 cornuside 가 가장 높은 활성을 나타냈는데 대조군으로 사용된 합성 비타민인 BHT의 소거능에 비교하여 월등히 높은 항산화 활성을 보여주었다. 항암제로 쓰이는 cisplatin 의 세포 독성에 gallic acid가 SOD 유사 활성을 증가시키고, 세포 생존율도 증가시켰다. 또한 항산화 효과도 vitamin E와 거의 같게 나타났다고 보고 하였는데 이

는 본 실험결과와도 일치하였다 (Lim 2009).

DPPH-radical scavenging activity를 측정하기 위하여 80 uM과 120 uM의 농도로 gallic acid가 포함된 시료를 분석한 결과 80uM의 gallic acid의 처리에서는 활성이 22.2% (p<0.05)로 나타난 반면, 120 uM의 gallic acid 처리에서는 57.6% (p<0.01)로 나타났다. 특히, 120 uM의 gallic acid의 활성은 비교군으로 사용한 30 uM의 vitaminE활성인 58.8% (p<0.01)와 거의 유사한 것으로 나타났다고 보고하였다 (Seo *et al.* , 2009).

산수유 열매의 기능성 소재로서의 개발 가능성을 탐색하기 위해 현재 많은 연구가 진행되고 있고 본 실험에서도 산수유 열매 추출물로부터 항산화 효능이 뛰어난 성분들을 분리 정제하였다. 이들을 재료로 하는 건강기능성 식품 및 신약제의 개발을 위해 각 물질들의 생리및 약리 활성에 대한 연구가 진행되어야 할것으로 사료된다.

Table 4. DPPH radical scavenging activity of compounds in *Cornus officinalis* extracts

DPPH radical scavenging activity	
Fraction	RC ₅₀ [‡] (ug/mL)
Loganin	308 ± 2.1
(7S)-O-Methyl morroniside	278 ± 1.9
(7R)-O-Methyl morroniside	250 ± 3.2
cornuside	33.82 ± 1.4
gallic acid	15.63 ± 0.9
Vitamin C	6.8 ± 1.3
control	BHT
	101 ± 0.9

‡ Extract concentrations, which show 50% DPPH radical scavenging activity, were determined by interpolation.

(7) HPLC profile of Compounds

HPLC, RP-C18 (20× 250mm, 4μm)의 컬럼과 UV 254nm파장, 2 ml/mln의 유속에서 Compound 1은 ACN:Water의 33:67로 이동상을 이용한 gradient system에서 분석 조건을 검토한 결과 Total lunning time 53분에서 19분대에 피크가 분리된 것을 관찰 하였다 (Figure 5). Compound 2와3은 ACN:Water의 35:65로 Total lunning time 45분에서 각각 Compound 2번과 3번 피크가 26분과 27분대에 분리된 것을 관찰 할 수 있다 (Figure6).

Compound 4는 MeOH:Water의 43:57로 Total lunning time 50분에서 29분대에 피크가 분리된 것을 관찰 하였다 (Figure 7).

Compound 5는 ACN:Water의 9:92로 Total lunning time 32분에서 13분대에 피크가 분리된 것을 관찰 하였다 (Figure 8)

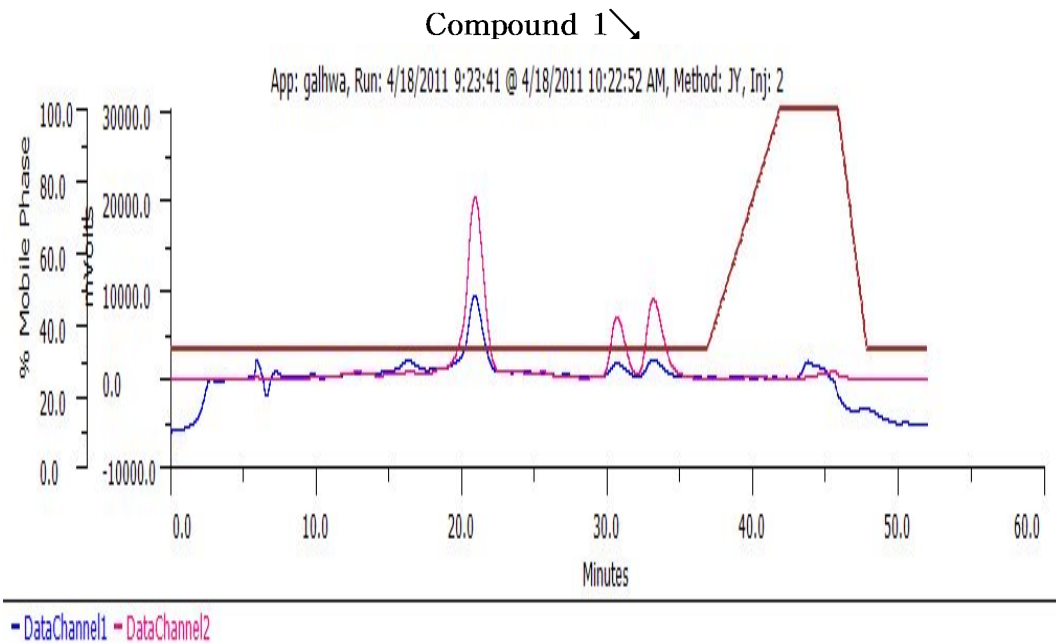


Fig. 15. HPLC profile of compound 1

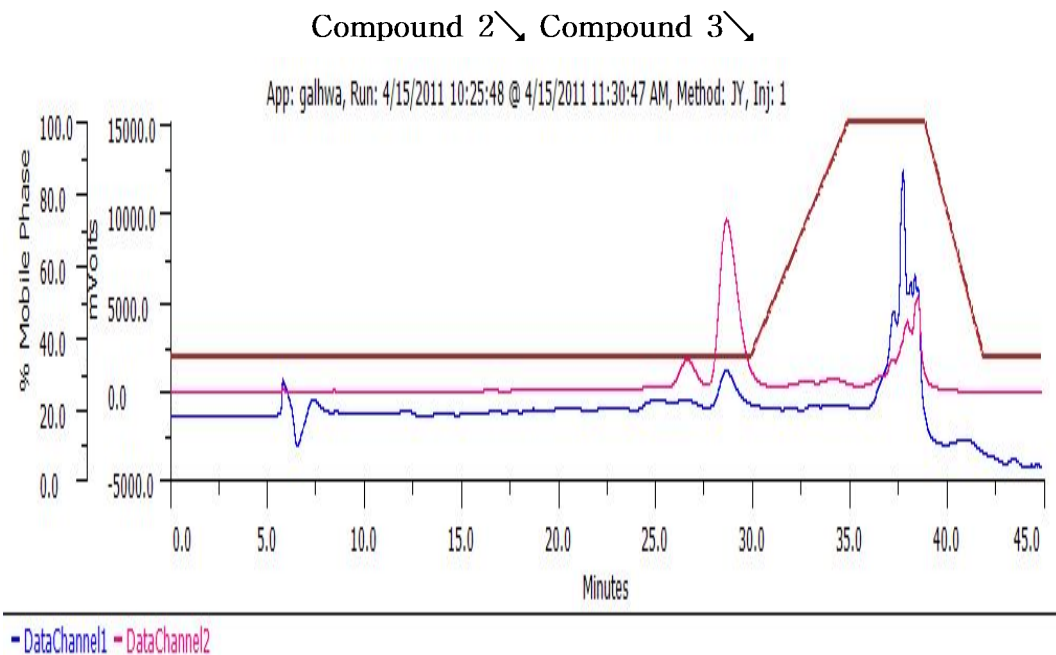


Fig.16. HPLC profile of compound 2 & 3

Compound 4

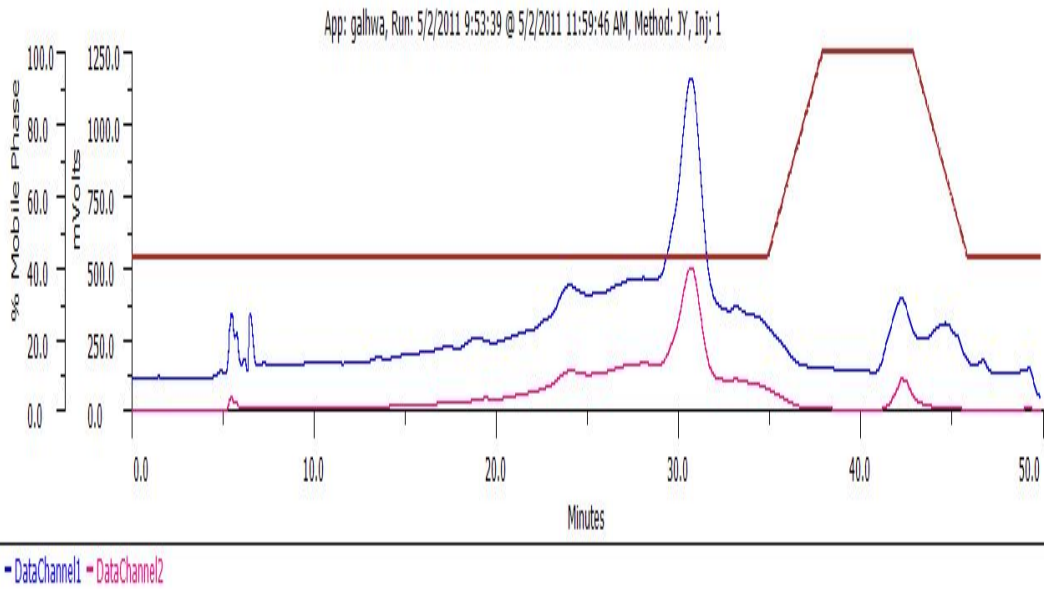


Fig.17. HPLC profile of compound 4

Compound 5

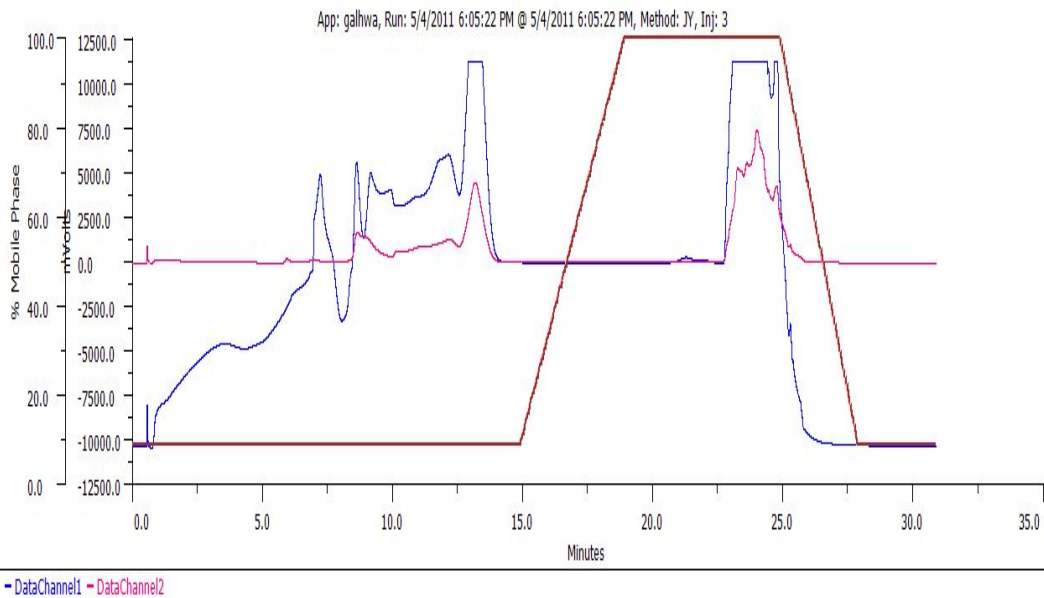


Fig.18. HPLC profile of compound 5

(8) Compound 구조 결정

- Compound 1의 구조

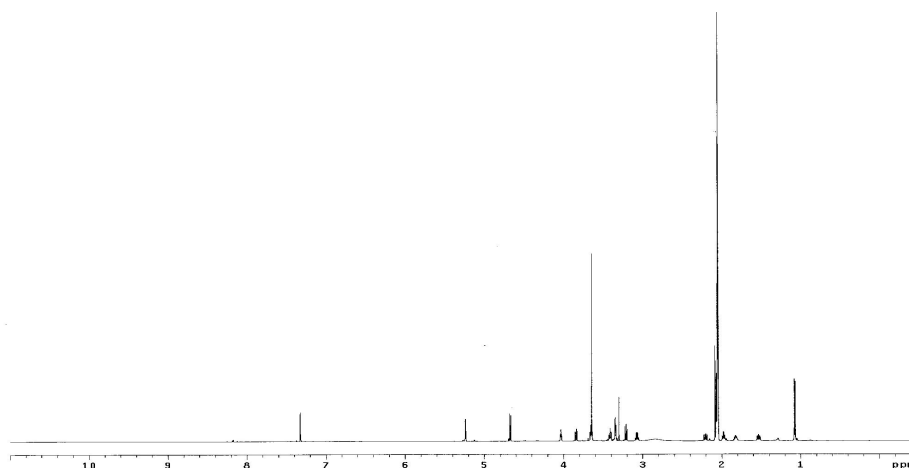
Loganin(3,4,5-Trihydroxybenzoic acid; loganic acid)

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 7.42 (1H, s)에서 특징적인 iridoid 골격의 H-3 peak 를 확인하였고, δ 3.70 (3H, s) 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 δ 52.4를 통해 C-11의 carboxyl 탄소가 methyl기로 치환되어 있음을 알 수 있었다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 4.67 (1H, d, $J = 8.0\text{Hz}$)과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 glucose singnal δ 100.8, 79.3, 78.8, 72.3, 63.5로부터 glucose 배당체임을 알 수 있었다 (Fig.9). 이상의 결과 문헌치와 비교하여 Loganin으로 동정하였다 (Fig. 10) (Prasada *et al.*, 2000).

$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$, White amorphous powder, m.p ($^{\circ}\text{C}$) 235-240, $[\alpha]_{\text{D}} -83^{\circ}$ (H_2O). FABMS m/z 413 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ IR ν_{max} (KBr, cm^{-1}) 3460, 3300, 1710, 1650, 1430

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Acetone- d_6) : δ 1.12 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-10), 1.65 (1H, m, H-6). 1.90 (1H, m, H-8), 2.06 (1H, m, H-6ax), 2.25 (1H, m, H-9), 3.15 (1H, m, H-5), 3.20-3.42 (4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 3.68 (1H, dd, $J = 11.0, 5.2$ Hz, H-6' a), 3.70 (3H, s, OCH_3), 3.93 (1H, dd, $J = 11.0, 5.2\text{Hz}$, H-6' b), 4.06 (1H, t, $J = 4.8$ Hz, H-7), 4.67 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 5.30 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H-1), 7.42(1H, s, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, Acetone- d_6) : δ 170.3 (C-11), 152.9 (C-3), 114.8 (C-4), 100.8 (C-1'), 98.5 (C-1), 79.3 (C-5'), 78.8 (C-3'), 75.8 (C-7), 75.5 (C-2'), 72.3 (C-4'), 63.5 (C-6'), 52.4 (OCH_3), 47.3 (C-9), 41.6 (C-6), 40.7 (C-8), 32.9 (C-5), 14.2 (C-10)



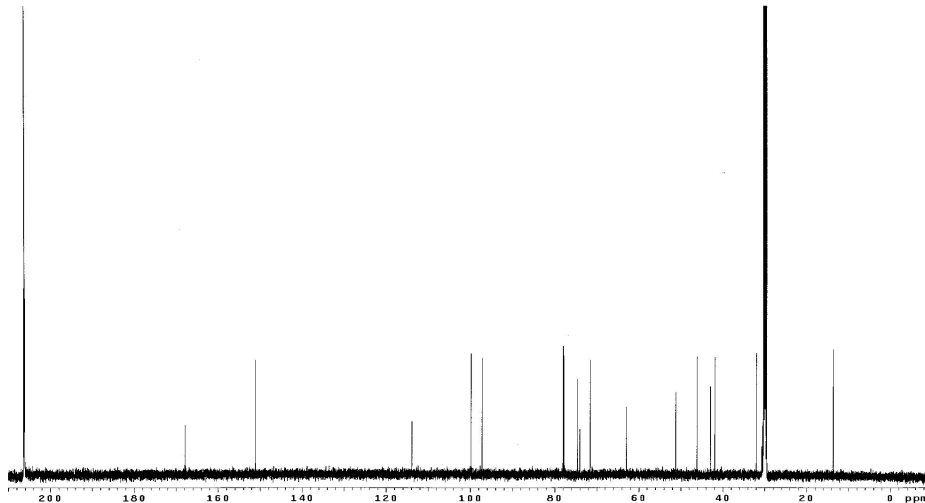


Fig.19. ^1H -NMR (500 MHz, Acetone- d_6) and ^{13}C -NMR (125 MHz, Acetone- d_6) spectrum of compound 1

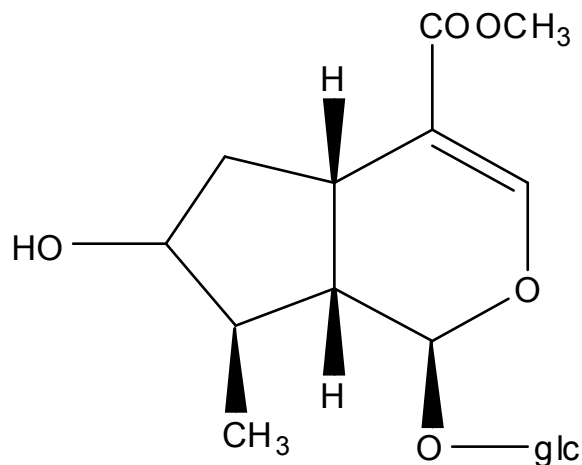


Fig. 20. Structure of Loganin(3,4,5-Trihydroxybenzoic acid; loganic acid)

Loganin은 iridoid glycoside 화합물로서, 주로 *Flos lonicerae*, 산수유 열매, *Strychnos nuxvomica*에 존재하며, 면역조절 기능과 항염활성, 항쇼크 효과 등이 있다고 보고 되었다 (Mathad *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 1999, Guo *et al.*, 2001).

최근에 loganin이 마우스에서 scopolamine로 유도된 기억 impairment를 유의적으로 향상시킬 뿐만아니라 reverse 시키며, hippocampus와 frontal cortex에서 acetylchol inesterase 활성을 저해한다고 하였으며 (Kwon *et al.*, 2009), 신경세포인 SH-SY5Y에서 JNK와 p38, ERK 1/2 MAPKs의 인산화를 억제하므로써 과산화수소로 유도된 apoptos

is로부터 신경세포를 보호하는 것으로 나타났다 (Kwon *et al.*, 2011).

또한 loganin은 마우스 실험에서 hepatic injury와 비정상적인 대사상태와 연관된 diabetic complications와 산화적 스트레스에 의해 유도된 염증에 대하여 보호효과가 있다고 보고되었으며 (Yamabe *et al.*, 2010) loganin을 마우스 조골세포에 처리했을 때 세포분화 표지인자인 alkaline phosphatase의 활성을 증가시키며, 콜라겐 type I과 osteocalcin 함량을 증가시키는 것으로 나타났다 (Li *et al.*, 2010). 이상과 같이 다양한 생리적 활성을 가지고 있는 산수유의 loganin은 전임상, 임상단계의 실험을 통하여 안전성이 입증된다면 향후 의약신소재로서의 가치가 있을 것으로 사료된다.

- Compound 2의 구조

(7S)-O-Methylmorroneiside

^1H - NMR spectrum 및 ^{13}C -NMR Spectrum에서 morroneiside와 유사한 특징을 보였으며, ^1H - NMR spectrum에서 δ 3.59 (3H,s)의 methoxyl group이 C-7에 치환되어 있음을 확인하였다. ^1H -NMR spectrum에서 δ 4.65 (1H, d, $J = 2.8\text{Hz}$ H-7)와 1.42 (1H, td, $J = 1$ 2.0, 3.6 Hz, H-6_{ax}), 1.82 (1H, dd, $J = 14.0, 4.4$ Hz, H-6_{eq})을 문헌치와 비교하여 7S임을 확인하였다 (Fig. 11). 이상의 결과를 문헌치와 비교하여 (7S)-O-Methylmorroneiside로 동정하였다 (Fig. 12) (Zhang *et al.*, 2009).

$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$, Yellowish oil, m.p ($^{\circ}\text{C}$) 103-104, FABMS m/z 443 $[\text{M}+\text{Na}]^+$,
IR ν_{max} (KBr, cm^{-1}) 3395, 2939, 1705, 1638, 1077

^1H - NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 1.25 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-10), 1.42 (1H, td, $J = 12.0, 3.6$ Hz, H-6_{ax}), 1.72 (1H, m, H-9), 1.82 (1H, dd, $J = 14.0, 4.4$ Hz, H-6_{eq}), 2.95 (1H, dt, $J = 12.4, 4.4$ Hz H-5), 3.25 (3H, s, OCH_3), 3.10-3.30 (4H, m, H-2',3', 4', 5'), 3.59 (3H, s, OCH_3), 3.79 (1H, m, H-6'), 4.19 (1H, m, H-8), 4.65 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-7), 4.70 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 5.80 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-1), 7.41 (1H, s, H-3)

^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 167.3 (C-11), 153.0 (C-3), 110.2 (C-4), 98.7 (C-7), 98.1 (C-1'), 94.2 (C-1), 77.2 (C-5'), 76.6 (C-3'), 73.7 (C-3'), 70.3 (C-4'), 64.9 (C-8), 61.4 (C-6'), 53.6 (7- OCH_3), 50.3 (11- OCH_3), 39.0 (C-9), 32.4 (C-6), 26.6 (C-5), 18.2 (C-10)

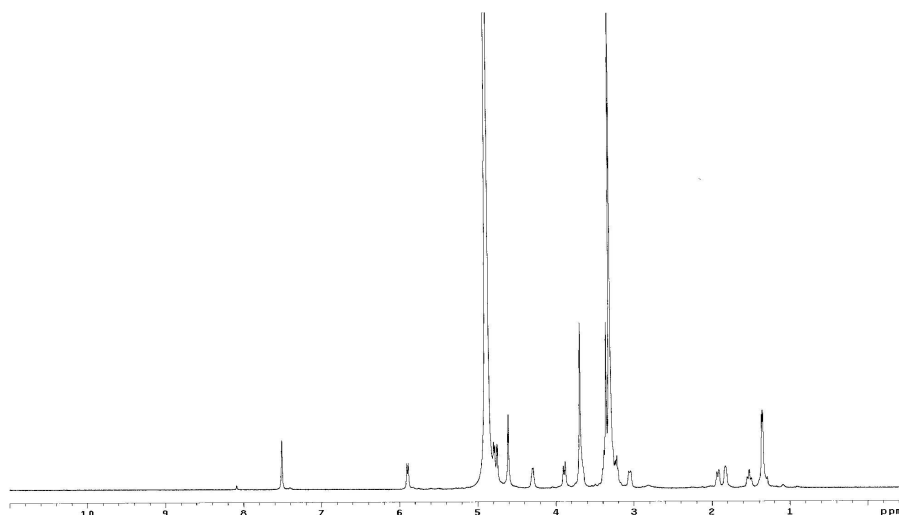


Figure 11. ^1H -NMR (500MHz, CD_3OD) and ^{13}C -NMR (125MHz, CD_3OD) spectrum of compound 2

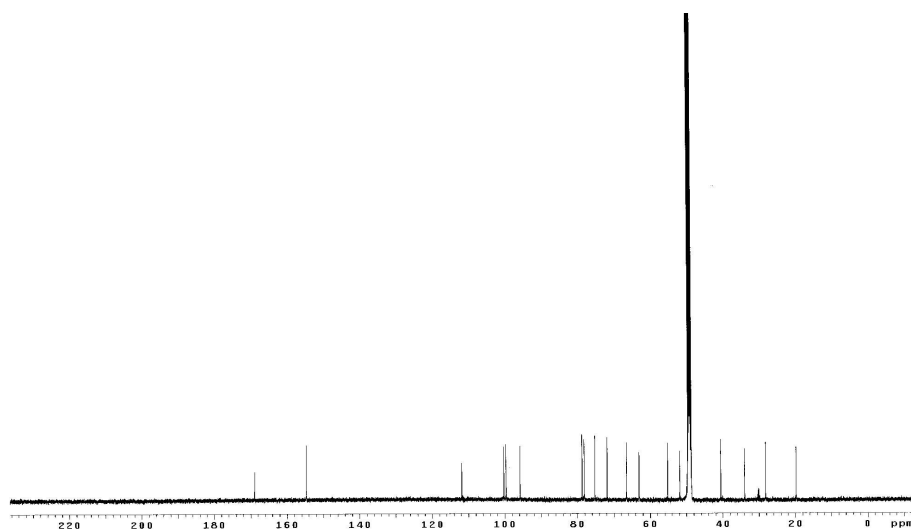


Fig.21. ^1H -NMR (500MHz, CD_3OD) and ^{13}C -NMR (125MHz, CD_3OD) spectrum of compound 2

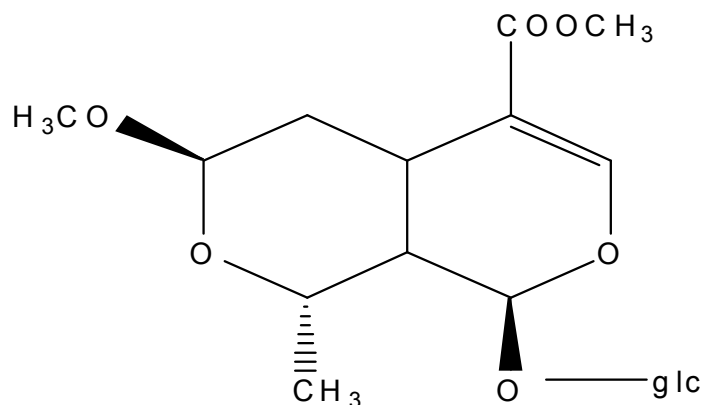


Fig. 22. Structure of (7S)-O-Methylmorrisonide

- Compound 3의 구조

(7R)-O-Methylmorrisonide

^1H - NMR spectrum 및 ^{13}C -NMR Spectrum에서 morrisonide와 유사한 특징을 보였으며, ^1H - NMR spectrum에서 δ 3.59 (3H,s)의 methoxyl group이 C-7에 치환되어 있음을 확인하였다. ^1H -NMR spectrum에서 δ 4.65 (1H, d, J =8.5Hz H-7)와 1.07 (1H, td, J =13.1 Hz, H-6_{ax}), 1.91 (1H, dd, J = 11.5 Hz, H-6_{eq})을 문헌치와 비교하여 7R임을 확인하였다 (Fig. 13). 이상의 결과를 문헌치와 비교하여 (7R)-O-Methylmorrisonide로 동정하였다 (Fig. 14) (Wang *et al.*, 2008).

$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$, Yellowish oil, m.p ($^{\circ}\text{C}$) 144-145, FABMS m/z 443 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 443

IR ν_{max} (KBr, cm^{-1})3396, 2923, 1702, 1640, 1407

^1H - NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 1.07 (1H, q, J = 13.1 Hz, H-6_{ax}), 1.31 (1H, d, J = 7.0, Hz, H-10), 1.70 (1H, m, H-9), 1.91 (1H, d, J = 11.5, Hz, H-6_{ax}), 2.73 (1H, dt, J = 13.0, 4.0 Hz H-5), 3.10-3.30 (4H, m, H-2',3', 4', 5'), 3.40 (3H, s, OCH_3), 3.60 (3H, s, OCH_3), 3.79 (1H, d, J = 11.0 Hz, H-6'), 3.86 (1H, d, J = 5.0 Hz, H-8), 4.40 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-7), 4.70 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1'), 5.70 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-1), 7.41 (1H, s, H-3)

^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 169.4 (C-11), 153.3 (C-3), 111.5 (C-4), 105.5 (C-7), 100.7 (C-1'), 96.5 (C-1), 73.9 (C-5'), 78.8(C-3'), 75.9 (C-2'), 75.0 (C-4'), 72.5(C-8), 63.7(C-6'), 57.7 (7- OCH_3), 52.6 (11- OCH_3), 41.0 (C-9), 36.5 (C-6), 32.5 (C-5), 20.5 (C-10)

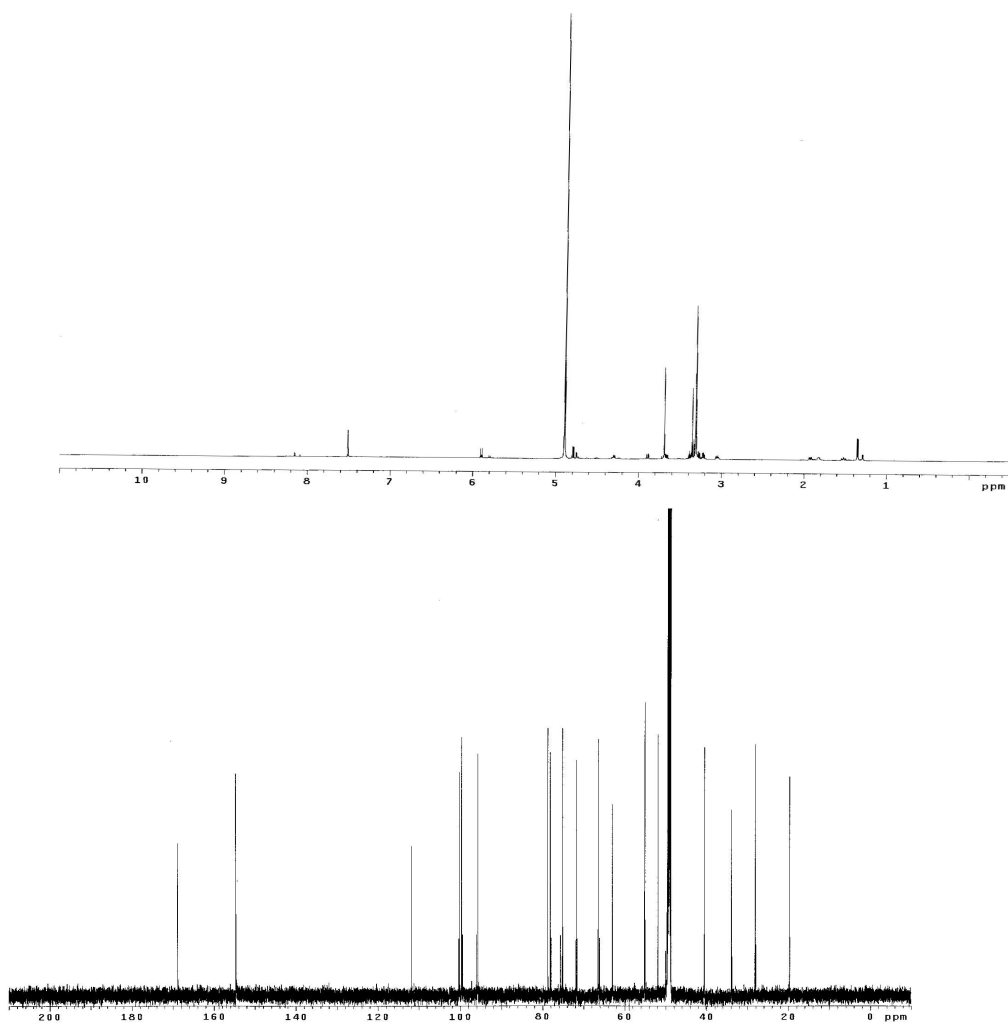


Fig.23. ^1H -NMR (500MHz, CDCl_2) and ^{13}C -NMR (125MHz, CD_3OD) spectrum of compound 3

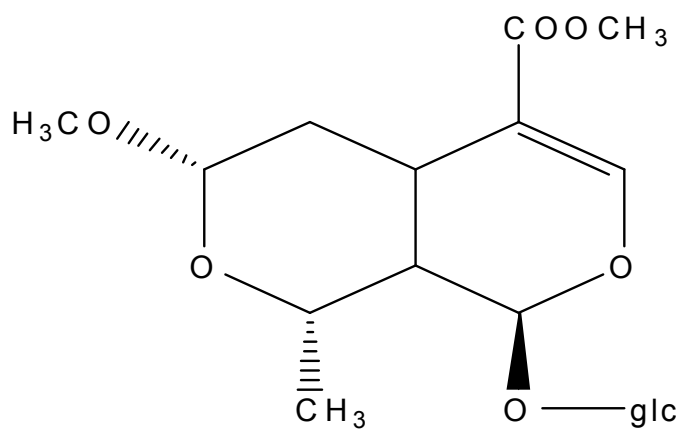


Fig. 24. Structure of (7R)-O-Methylmorrisonide

Carbocyclic iridoid glycoside로 알려진 morroniside는 iridoid 중 주요한 활성물질로 cornaceae, caprifoliaceae, sarraceniaceae, hydrangeaceae와 같은 식물에 많이 존재하는데 특히 산수유에 함유되어 있는 주된 활성성분이며 가장 풍부한 iridoid glycoside류에 속한다. 이 화합물은 항산화활성, α -glucosidase 저해능, 항염증 활성을 나타내며, 대장암세포에 대하여도 상당한 억제능을 보이는 것으로 보고 되었다 (Zhirui *et al.*, 2011).

Morroniside는 1형과 2형 당뇨에서 hepatic injury 및 renal injury를 보호하며, 지질과 염증반응을 통하여 간과 신장에 유익한 역할을 하는 것으로 보고 되었으며 loganin과 마찬가지로 morroniside를 마우스 조골세포에 처리했을 때 세포분화 표지인자인 alkaline phosphatase의 활성을 증가시키며, 콜라겐 type I과 osteocalcin 함량을 증가시키는 것으로 나타났다 (Li *et al.*, 2010).

- Compound 4의 구조

Cornuside (7-galloylsecologanol)

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 7.39 (1H, s)에서 특징적인 iridoid 골격의 H-3 peak를 확인 하였고, δ 4.62 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1')의 anomeric protone과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 glucose singnal로부터 glucose 배당체임을 알 수 있었다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 7.03 (2H, s, H-2', 6')의 galloyl moiety와 δ 1.91 (1H, dq, $J = 14.0, 6.5$ Hz, H-6a), 2.00 (1H, dq, $J = 14.0, 7.0$ Hz, H-6b), 4.16 (2H, m, H-7)의 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ stem을 확인할 수 있었다 (Fig. 15). 이상의 결과를 문헌치와 비교하여 cornuside로 동정하였다 (Fig. 16) (YASUHIKO *et al.*, 2007).

$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$ White amorphous powder, $[\alpha]_{\text{D}} -91^\circ$ (MeOH), FABMS m/z 565 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, IR ν_{max} ($\text{KBr}, \text{cm}^{-1}$) 3394, 1693, 1624, 1315, 1240, 1076

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) : δ 1.91 (1H, dq, $J = 14.0, 6.5$ Hz, H-6a), 2.00 (1H, dq, $J = 14.0, 7.0$ Hz, H-6b), 2.58(1H,dt, $J = 8.5, 6.5$ Hz, H-9), 2.86 (1H, q, $J = 6.5, 4.9$ Hz, H-5), 3.10 (1H, dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz, H-2''), 3.17 (1H, dd, $J = 9.5, 9.0$ Hz, H-4''), 3.24 (1H, overlapped by the solvent signal, H-5''), 3.29 (1H, t, $J = 9.0$ Hz, H-3''), 3.52 (3H, s, CH_3), 3.58 (1H, dd, $J = 12.0, 6.0$ Hz, H-6'',a), 3.81 (1H, dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz H-6'',b), 4.16 (2H, m, H-7), 4.62 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-1'), 5.17 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-10), 5.20 (1H, d, $J = 17.5$ Hz, H-10), 5.48 (1H, d, $J = 6.5$ Hz, H-1), 5.72 (1H, ddd, $J = 17.5, 10.5, 8.5$ Hz, H-8), 7.03 (2H, s, H-2', 6'), 7.39 (1H, s, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) : δ 31.0 (C-6), 32.4 (C-5), 46.1 (C-9), 52.5 (OCH_3), 63.5 (C-6''), 65.1 (C-7), 72.3 (C-4'), 75.4(C-2''), 78.7 (C-3''), 79.1 (C-5''), 98.4 (C-1), 100.9(C-1'), 110.9 (C-2', 6'), 112.2 (C-4), 120.4 (C-10), 112.4 (C-1'), 13

6, 4 (C-8), 140.5 (C-4'), 147.2 (C-3', 5'), 154.5 (C-3), 169.2 (C-7'), 170.0 (COOC
H₃)

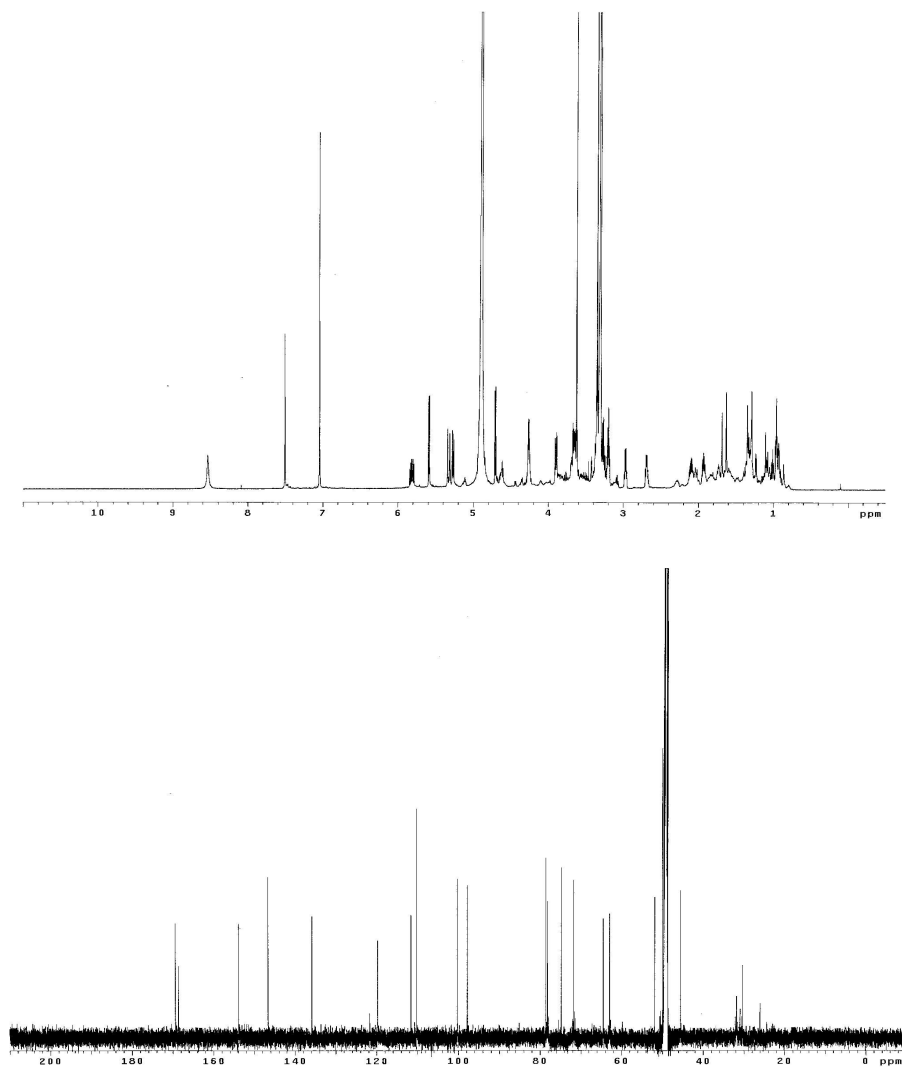


Fig.25. ¹H-NMR (500MHz,CD₃OD) and ¹³C-NMR(125MHz,CD₃OD)
spectrum of compound 4

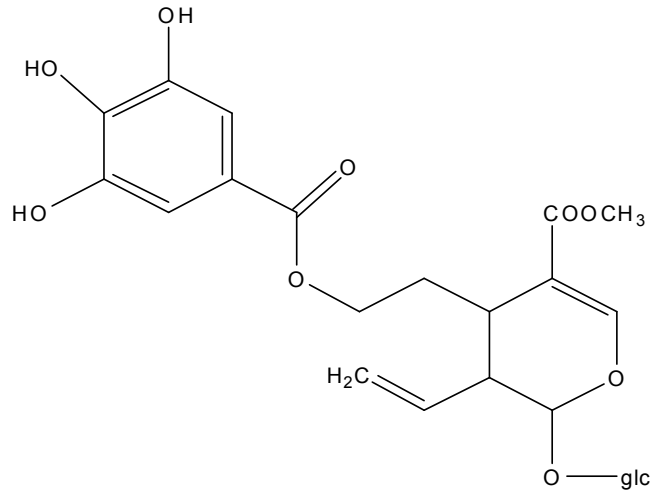


Fig. 26. Structure of Cornuside (7-galloylsecologanol)

Cornuside는 secoiridoid glucoside 또는 bisiridoid glucoside 화합물로서, 인체 endothelial cell 에서 씨도카인으로 유도된 전염증 (proinflammatory)과 접착분자들의 발현을 억제하며, oxygen-glucose deprivation에 의해 유도된 장애로부터 쥐의 cortical cell를 보호하며, 마우스 대식세포에서 LPS로 유도된 NO 생성을 저해한다고 보고 되었다 (Kang *et al.*, 2007).

- Compound 5의 구조

Gallic acid (3,4,5-Trihydroxybenzoic acid)

$^1\text{H-NMR}$ spectrum의 δ 7.11 (2H, s, galloyl-H)에서 singlet의 peak만을 확인하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 모두 5개의 peak가 관찰되었으며 δ 146.4 (C-3,5), δ 110.6 (C-2,6)은 각각 2개의 탄소에 해당하는 integral을 보이므로 대칭구조의 aromatic 화합물임을 확인하였다. 그리고 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ 168.6에서 carboxyl group을 확인하였고, δ 146.4 (C-3,5)과 δ 139.2 (C-4)에서 3개의 oxygenated aromatic carbon의 존재를 확인하였다 (Fig. 17). 이상의 결과를 문헌치와 비교하여 gallic acid로 동정하였다 (Fig. 18) (Sharma *et al.*, 1998).

$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$, White amorphous powder, m.p ($^\circ\text{C}$) 258-265, EIMS m/z 170 $[\text{M}]^+$ IR ν_{max} (KBr, cm^{-1}) 3392, 1687, 1616, 1427, 1330

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) : δ 7.11 (2H, s, galloyl-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) : δ 110.6 (C-2, 6), 122.3 (C-1), 139.2 (C-4), 146.4 (C-3, 5), 168.6 (C=O)

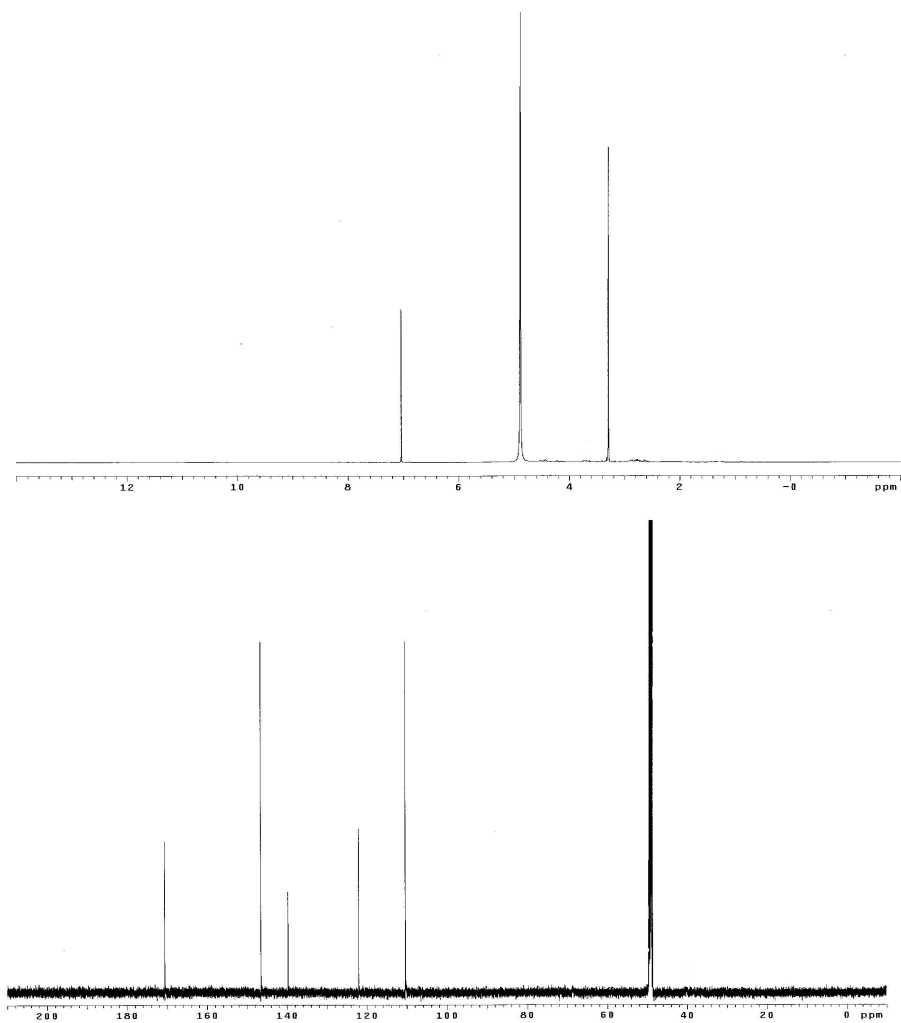


Fig.27. $^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CD_3OD) and $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CD_3OD) spectrum of compound 5

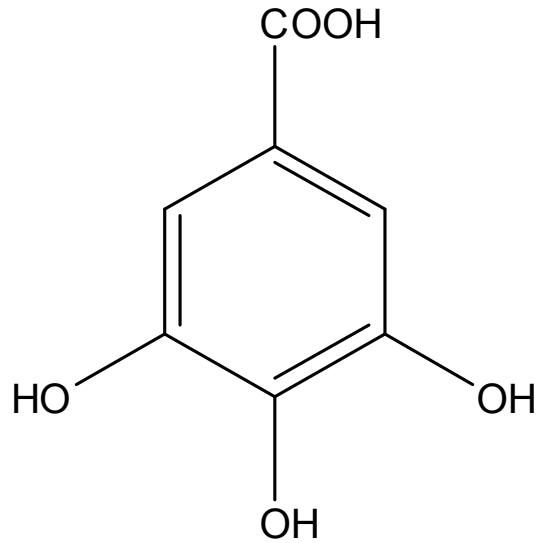


Fig. 18. Structure of Gallic acid (3,4,5-Trihydroxybenzoic acid)

4. 항산화 화합물에 의한 palmitoleic acid의 산화저해활성 분석

● **방 법** : 산수유 열매 추출물로부터 분리된 항산화 화합물이 palmitoleic acid(PA)의 산화를 억제하는지 분석하기 위하여 아래 표와 같이 시료를 조제하여 각각의 혼합시료를 37°C에서 3일 동안 반응시켰다.

3일 후 반응용액을 분액 깔대기에 옮겨 chloroform 25 ml를 가하여 2~3회 반복 추출한 다음 chloroform 추출액에 acetic acid 25ml과 포화 KI용액 1ml를 가하여 암실에서 5분간 방치한 다음 증류수 50ml를 가하여 1/100N Na₂S₂O₃ 용액으로 적정하였다. UV-spectrum analysis에 의해 산화된 PA 함량을 과산화물값(peroxide value, POV)으로 측정하므로써 화합물들의 palmitoleic acid에 대한 산화억제력을 분석하였다.

Sample	Sample composition
Negative control	Mix 1mg of palmitoleic acid with 0.1mg of squalene-HPO (lipid peroxide).
Positive control	Mix 1mg of palmitoleic acid with 1mg of BHT(Vt E, C, naringenin, tannic acid)
Mixture with compound	Mix 1mg of palmitoleic acid with 1mg of fraction or compound from <i>Cornus officinalis</i>

● 결 과 :

산수유 분획물 및 화합물의 항산화효과를 분석하기 위하여 palmitoleic acid에 대하여 0.1% BHT와 시료를 0, 10, 30 및 50ul 첨가한 후 50℃에서 7일간 저장하면서 과산화물가를 측정하였는데, 시료를 첨가하지 않은 대조구는 저장 1, 3, 5 및 7일 후에 과산화물기가 60, 117, 140 및 187 meq/kg 이었는데, 0.1% BHT 10ul 첨가시는 9, 23, 30 및 36 meq/kg이었고, 시료를 첨가한 시험구에서는 10ul 첨가했을때 11, 33, 36 및 42 meq/kg, 30ul 첨가했을 때는 8, 22, 27 및 30 meq/kg, 50ul 첨가했을 경우엔 6, 20, 22 및 25 meq/kg로 나타났다.



Fig. 4. Changes in the peroxide value with the addition of *Corni fractus* water extract during autoxidation of linoleic acid of 50℃ for 7 days.

◆ : 50 μl (0.1% BHT). ■ : 30 μl (D.W).
 ▲ : 10 μl (*Corni fractus*). ✕ : 30 μl (*Corni fractus*).
 * : 50 μl (*Corni fractus*).

제 3차년도

1. 화장품 포장, 용기 디자인 설계가. 스킨

354 C	먹 70%	은박
-------	-------	----

2도 인쇄 + 박 1도, CCP 350g, 무광코팅, 하단십자막음

단상자 크기 : 50 x 50 x 144 mm

354 C	먹 70%	은박
-------	-------	----

2도 인쇄 + 박 1도

용기 : 48.5 x 142 mm



인쇄크기 153 x 100 mm



나. 예뻐전

354 C	먹 70%	은박
-------	-------	----

2도 인쇄 + 박 1도, CCP 350g, 무광코팅, 하단십자막음

단상자 크기 : 50 x 50 x 144 mm

354 C	먹 70%	은박
-------	-------	----

2도 인쇄 + 박 1도

용기 : 48.5 x 142 mm



인쇄크기 153 x 100 mm



다. 에센스

354 C	먹 70%	은박
-------	-------	----

2도 인쇄 + 박 1도, CCP 350g, 무광코팅, 하단심자막용

단상자 크기 : 46 x 46 x 109 mm

354 C	먹 70%	은박
-------	-------	----

2도 인쇄 + 박 1도

용기 : 44.5 x 107 mm



인쇄크기 140 x 69 mm



라. 영양크림

354 C	먹 70%	은박
-------	-------	----

2도 인쇄 + 박 1도, CCP 350g, 무광코팅, 하단심자막용

단상자 크기 : 53.5 x 53.5 x 47 mm

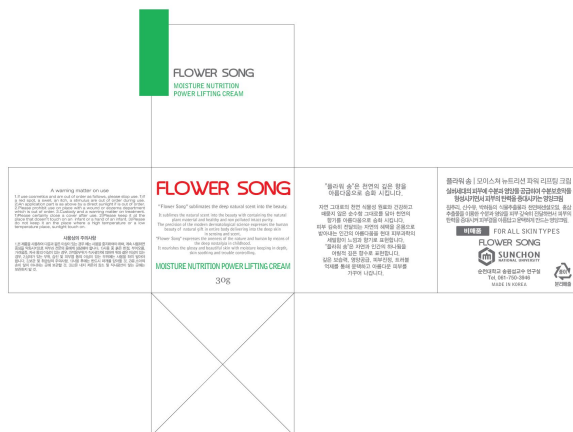
354 C	먹 70%	은박
-------	-------	----

2도 인쇄 + 박 1도

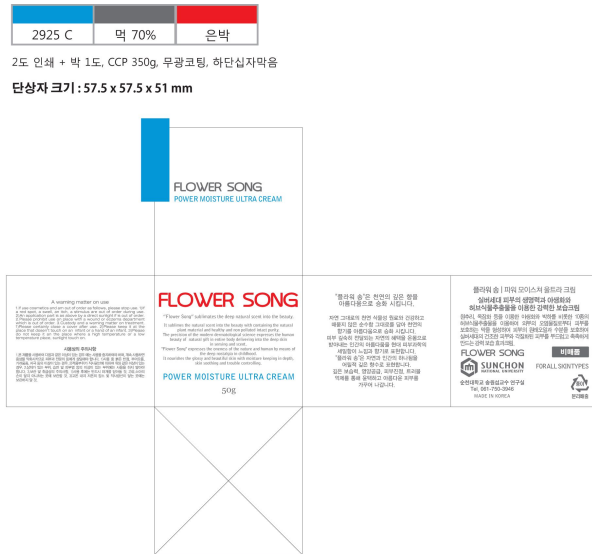
용기 : 52 x 45 mm



인쇄크기 164 x 25 mm



마. 수분크림.

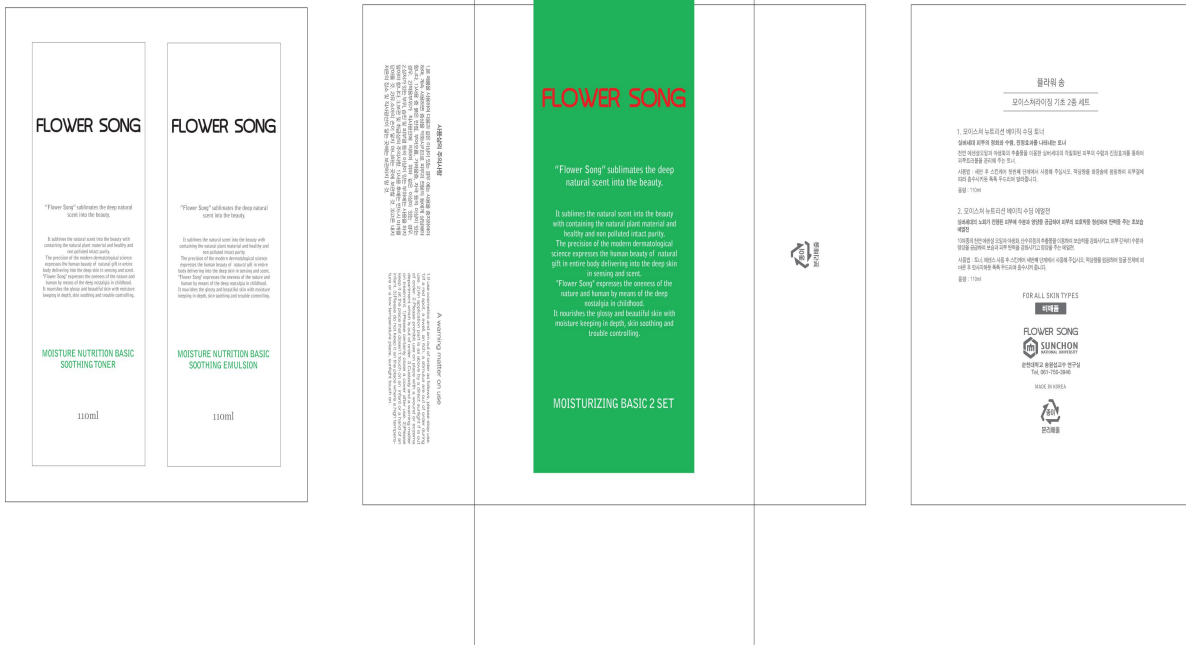


마. 스킨&에멀전 세트



2도 인쇄 + 박 1도, CCP (7g), 무광코팅, 하단심자막음

134 x 168 x 55 mm



2. 시제품 제조

가. 산수유, coenzyme Q10 로션

<수분층> : 글리세린 8.0g, 히드로모이스춰 4.0g, 보존제 0.1g, 젤-에이전트 2.0g

<유분층> : 바이탈에멀전 3.0g, 세토스 2.0g, 저팬왁스 1.0g, 동백유 10.0g, 동백버터 3.0g

<유화 후에 넣는 재료> :

젤-폴리머 12.0g

산수유열매 농축물 3.0g

coenzyme Q10 3.0g

에센셜오일 10방울

나. 박하, coenzyme Q10 로션

<수분층> :

정제수 60.0g

글리세린 8.0g

히드로모이스춰 4.0g

보존제 0.1g

젤-에이전트 2.0g

<유분층> :

바이탈에멀전 3.0g

세토스 2.0g

저팬왁스 1.0g

동백유 10.0g

동백버터 3.0g

<유화 후에 넣는 재료>

젤-폴리머 12.0g

박하잎 농축물 3.0g

coenzyme Q10 3.0g

에센셜오일 10방울

다. 고보습 옥잠화 하이루론산 스킨

<수분층>

정제수 170.0g

솔르졸 3.0g

하이루론산 5.0g

히드로모이스춰 5.0g

<유화 후에 넣는 재료>

리피듀어PMB 3.0g

옥잠화팅크처 20.0g

보존제	0.4g
에센셜오일	12~20방울

라. 고보습 원추리 하이루론산 스킨

<수분층>

정제수	170.0g
솔르졸	3.0g
하이루론산	5.0g
하이드로모이스취	5.0g

<유화 후에 넣는 재료>

리피듀어PMB	3.0g
원추리팅크처	20.0g
보존제	0.4g
에센셜오일	15~20방울

마. 산수유 비가열 수분크림

<수분층>

정제수	40.0g
글리세린	6.0g
하이드로모이스취	6.0g
꽃소금	1.0g
산수유열매농축물	5.0g

PM	6.0g
----	------

<유화 후에 넣는 재료>

콜라겐	3.0g
PMB	3.0g
보존제	0.1g
에센셜오일	2~3방울

바. 박하 비가열 수분크림

<수분층>

정제수	40.0g
글리세린	6.0g
하이드로모이스취	6.0g
꽃소금	1.0g
박하농축물	5.0g

PM 6.0g

<유화 후에 넣는 재료>

콜라겐 3.0g

PMB 3.0g

보존제 0.1g

아로마오일 2~3방울

사. 산수유, 박하 노화방지 영양크림

<수분층>

정제수 30.0g

글리세린 5.0g

하이드로모이스춰 3.0g

크림-폴리머 8.0g

<유분층>

크림베이스 9.0g

동백유 4.0g

방부제 0.2g

<유화 후에 넣는 재료>

젤-에이전트 3.0g

산수유열매 농축물 3.0g

박하잎 농축물 3.0g

박하, 옥잠화, 라벤더 에센셜오일 각5방울

아. 산수유, 당귀, 상백피, 녹차 썬 미백 로션

<수분층>

정제수 130.0g

글리세린 8.0g

하이드로모이스춰 8.0g

보존제 0.5g

젤-에이전트 4.0g

<유분층>

바이탈에멀전 5.0g

세토스 4.0g

저펜왁스	2.0g
동백유	8.0g
호호바	7.0g
TiO2	5.0g
자외선흡수제	10.0g

<유화 후에 넣는 재료>

젤-폴리머	30.0g
산수유농축물	3.0g
당귀농축물	3.0g
상백피농축물	3.0g
녹차농축물	3.0g
박하, 라벤다에센셜오일	20방울

자. 산수유, 삼백초, 상백피, 녹차농축물 미백&노화방지 에센스

<수분층1>

정제수	30.0g
젤-폴리머	15.0g
글리세린	4.0g
하이드로모이스춰	4.0g
보드카	4.0g
보존제	0.1g

<수분층2>

솔르졸	1.0g
아로마오일	3~5방울

<유화 후에 넣는 재료>

젤-에이전트	2.0g
PMB	3.0g
콜라겐	3.0g
산수유, 삼백초, 상백피, 녹차 농축물	8.0g

3. 시제품 팩 제조

(1). 다량쉬 하이드로겔 팩의 특징

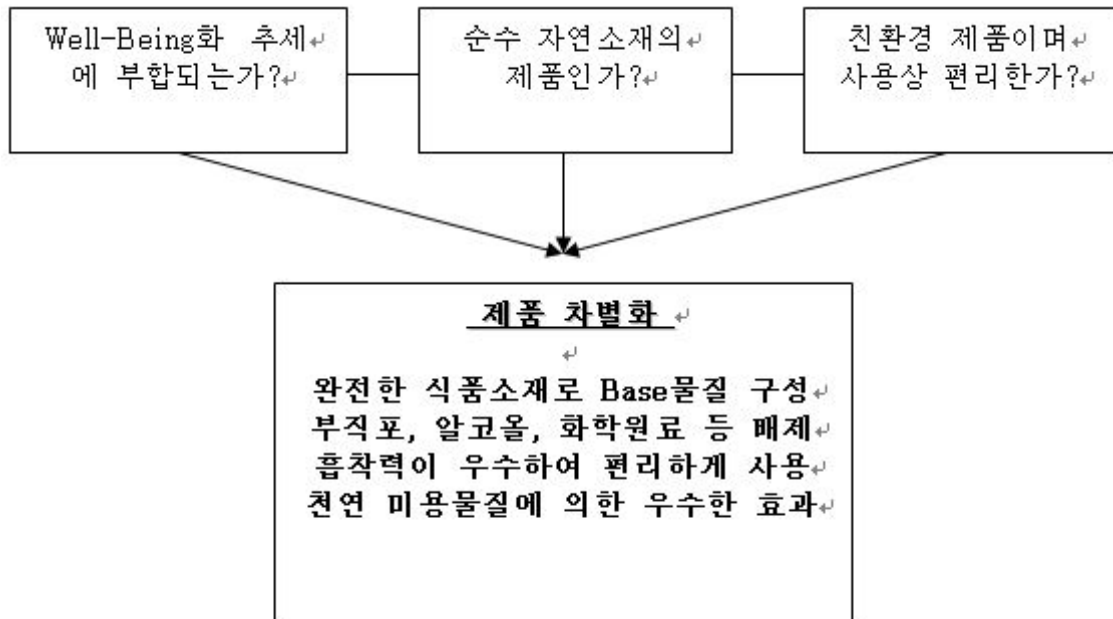
가. 기술력

바이오테크 고분자 신기술로 개발한 친환경 네츄럴팩으로써 80℃이상 물에서 자연분해(Hydro Gel화)되고 분해된 액(100% 에센스)은 세안 및 목욕시 바디 크림으로 사용하면 촉촉하고 부드러워 촉감이 매우 좋다.

- (1) 얼굴 등 피부에 부착하고 있으면 시간이 경과함에 따라 자연 흡수되어 점점 얇아짐(2시간 이상 경과시 종잇장과 같이 얇아짐)
- (2) 조성물특허(제0593591호)와 실용신안(제0262428호)의 지적재산권 확보
- (3) 세계최초 개발한 독창적이고 대중적인 제품으로써(제너보다 2년 앞서서 개발하였음)
- (4) 인간의 미용욕구를 충족시키고 미용수준을 획기적이고 과학적으로 업그레이드시킨 수준 높은 맛사지 팩임.

나. 제품력

- (1) 제품이 자연그대로의 신선감과 싱그러움을 그대로 피부에 전달할 수 있는 미역, 다시마, 한천 등의 해조류, 알로에, 장미추출물 등 다수의 피부에 좋은 천연 미용재료를 추출하여
- (2) 바이오테크 고분자 하이테크 신기술로 응집시켜 만든 친환경 네츄럴에센스팩으로써 피부보습, 윤택, 탄력, 미백 등의 효능을 천연성분 그대로 신선하게 만끽할수 있는 질적으로 우수한 고품격 팩이며
- (3) 미국 FDA 피부안전성 테스트(67가지) 통과, 국내 국가공인검사기관인 한국생활용품시험연구원 및 한국소비과학연구센터로부터 피부감작성시험, 알레르기테스트, 안자극시험, 경구독성시험 등을 통과한 공신력과 안전성이 인정되는 우수제품임



(가) 제품에 독창성, 우수성, 탁월한 세계적 경쟁력 확보

① 피부에 좋은 천연 미용성분으로만 이루어진 ****세계최초의 일체형 겔 마스크임****.

* 현재 시중에 유통중인 마스크는 모두 팩소재(부직포, 셀룰로스 등)에 미용액(skin water)을 적셔서 만드는 형태이며 세계최초 바이오테크 고분자 신기술에 의한 독자적 네츄럴팩

② 해조식물의 분말에 여러가지 미용성분이 첨가되어, 탄력있는 팩형태로 성형된 환경 친화형 제품이므로, 얼굴에 팩을 하고 있는 동안, 수분이 자연스럽게 피부로 흡수되어 얇아짐.(최초 두께 0.9mm → 약 30분후 0.4mm)

* 사용하고 난 팩 제품을 약 70~80℃의 물에 넣고 저어주면 모두 녹아 없어지는 것을 확인하실 수 있습니다.

알코올 성분이 전혀 첨가되지 않은 제품이며, Alcohol free의 천연 조성물로만 이루어졌기 때문에 피부자극이 없어 어떠한 피부타입에도 사용하실 수 있습니다.

천연겔로 만든 팩이므로 밀착성이 대단히 우수하여, 팩을 하시는 동안에도 집안에서 얼마든지 다른 가사활동을 하실 수 있습니다.

미국 FDA, 국내 국가공인검사기관 피부안전성진단, 알레르기테스트, 감작성시험, 경구독성(먹어도 이상없음), 안자극시험, 품질보증Q 등을 득한 안전성과 신뢰성이 인정되는 제품임.

세계최초 신기술 네츄럴맛사지팩 조성물 특허, 실용신안 등의 지적재산권 확보

인류 미용맛사지 수준을 한단계 업그레이드 시킨 대중적 미용성으로 수요자 욕구를 충족시킬 수 있는 고품격 제품임.

3. Natural Gel Pack과 부직포팩의 차이점

구분	Natural Gel	부 직 포
구성	<p>○ Gel팩의 구성 물질은</p> <ul style="list-style-type: none"> - 미역, 다시마, 한천으로 구성된 해조류 추출물과 알로에추출물, 장미추출물, 녹차추출물 등의 자연 그대로의 추출물(에센스오일)을 주 베이스로 하여 - 콜라겐, 로얄젤리, 진주 등의 성분과 - 특별히 캐비어추출물 등 그외 피부에 좋은 성분들을 필요에 따라 함축시켜 - 바이오테크고분자 기술로 얼굴, 목, 눈 등 피부에 맞사지 하기 좋도록 탄력있고 부드럽게 제품화 시킴으로써 자연성분 그대로의 신선하고 영양분(에센스 오일 등)을 피부에 전달 최상의 미용효과 창출 할 수 있는 친환경 팩으로써의 특징. (그외 일반 보습제로써 하이룬산 등 각종 미용 보조물질 투입 가능) 	<p>○ 부직포팩의 구성은</p> <ul style="list-style-type: none"> - 부직포에 PG, 글리세린 등 각종 화학적 피부보습제를 부직포에 도포시켜서 - 인위적이고 화학적인 팩으로써 과거 전근대적 팩이라 할수 있음
느낌	<ol style="list-style-type: none"> ① 자연추출물 그대로의 에센스와 오일 등으로 구성되어 있어 신선한 청량감으로 상큼함을 더해준다. ② 겔(Gel) 구성 자체가 자연 그대로의 추출물 즉, 에센스 오일 등의 성분을 고분자 하이테크 기술로 응축시켜 만들므로써 ③ 겔(Gel) 자체에서 고영양에센스 적정량의 성분이 계속 마르지 않고 방출되게 과학적으로 만들어져 있어(물기가 있을때는 에센스 방출이 멈추어짐) ④ 우선 내용물을 꺼내서 사용시 팩자체 적정 에센스 성분만 액이 방출되어 있어 손으로 집었을때와 눈으로 볼 때 참신하고 신선함을 느낄수 있고 	<ol style="list-style-type: none"> ① 인위적이고 화학적 느낌으로 피부 부착시 개운하지 못하고 팩 자체의 신선감이 전혀 없음 ② 부직포에 화학적인 보습, 탄력제 등을 인위적으로 부직포 위에 도포시킴으로써 ③ 맞사지액 자체가 서로 조합 엉키는 현상이 있고 액 자체가 그대로 부직포 위에 일정량이 존재하게 되어 있고 ④ 이를 얼굴 등 피부에 도포시 맞사지 액 자체가 점진적 적량 조절없이 한꺼번에 쏟아지므로써 얼굴에 질퍽함과 피부를 타고 줄줄 흘러내리는 현상이 있을수 있고

구분	Natural Gel	부 직 포
	<p>⑤ 팩을 얼굴 등 피부에 시행 부착했을때도 팩에 묻어있는 적정량의 에센스 성분만 피부에 닿게 되고 팩을 시행하는 동안 계속 마르지 않고 에센스가 팩 자체를 녹이면서(분해되면서) 적정량이 방출되면서 피부에 흡수되기 때문</p> <p>⑥ 팩을 떼어낸 후에도 적정량의 수분만 얼굴 등 피부에 남아 있어 신선하고 상큼함을 더 해준다.</p> <p>⑦ Gel팩은 자연추출물이 엉켜진 분자와 분자 사이에 유관상 보이지 않지만 미세한 구멍(피부가 숨구멍이 있듯이)이 있어 피부에 부착시 피부부착 겔 이면에 팩자체 성분이 분팩 구멍을 통해 안으로 흡수되므로써 피부에 보다 충분한 영양분을 공급할수 있도록 구성되어 있음</p> <p>⑧ 팩이 밀착력이 탁월하여 간편하게 꺼내어 얼굴에 부착 움직이면서 맞사지 가능</p> <p>⑨ 따라서, 네츄럴 겔팩 겔(Gel) 전체가 에센스, 오일 등의 자연추출물로 구성되면서 시간이 지남에 따라 지속적으로 적정량이 방출 피부에 흡수됨으로써</p> <p>⑩ 30분정도 지나면 겔(Gel) 자체 팩 두께가 당초 0.7m/m 정도에서 0.5m/m 정도로 얇아지며</p> <p>⑪ 1시간이 지나면 당초 팩 두께 1/2 정도 얇아지고 2시간이상 경과시 전성분이 충분한 영양분이 피부에 흡수되어 종잇장같이 점점 얇아지는 특징이 있으며</p> <p>⑫ 특히, 네츄럴 겔팩은 80℃이상 뜨거운 물에 넣고 저었을 때 1분이내 완전 분해되는 친환</p>	<p>⑤ 특히, 내용물을 꺼내었을 때 부직포에 많은 액을 도포함으로써 질퍽한 액이 도포된 부직포를 한참 골고루 펴서 얼굴에 붙여야 하고 이때 느낌은 대단히 불쾌하고 개운치 못한 느낌을 줄수 있음</p> <p>⑥ 밀착력이 네츄럴 겔팩에 비해 다소 미흡한 편임.</p> <p>⑦ 팩을 20~30분 하고난후에 떼어냈을때도 화학적인 미용액만 흡수되고 부직포는 그대로 남아있게 인위적이고 화학적이라는 점을 느낄수 밖에 없음.</p>

	<p>경 네츄럴 팩임을 입증할수 있음. (이러한 성분이 서서히 분해되어 피부에 흡수된다는 것을 입증 및 판단 가능)</p>	
--	---	--

구분	Natural Gel	부 직 포
<p>효능 및 효과</p>	<p>① 자연 그대로의 신선함을 피부에 그대로 충분한 에센스 영양분을 공급하여 전달함으로써 한층 피부를 생동감 있고 신선하고 상큼하게 가꾸어 나갈수 있다는 특징 (네츄럴팩임으로 냉장보관하였다 사용하면 신선감이 더 있고 네츄럴팩임으로 찢어질수 있는 특징이 있음)</p> <p>② 제4세대 팩으로써 미용 욕구를 충족시키고 그 수준을 업그레이드 시킨 과학적 친환경 팩으로써 객관적 안전성과 공신력이 인정되는 팩임. (각종 인증기관 검사서 존재)</p>	<p>① 인위적이고 화학적 성분 피부에 흡수하여</p> <p>② 일시적으로 피부미용 효과를 기할수 있을수 있으나 장기적 측면에서는 각종 피부 부작용 등을 유발할 가능성을 배제할수 없음</p> <p>③ 과거 제1세대 전근대적인 팩이라 할수 있음.</p>

4. 상품기술서

	상 품 명	산수유, 박하 내추럴 맛사지팩
	재질 / 성분	산수유, 박하, 오이,알로에,해초,키위,레몬,감귤 등 6종 젤타입
제 품 개 요	<ul style="list-style-type: none"> • 산수유, 박하, 오이, 알로에, 해초, 키위, 레몬, 감귤 성분 그대로 추출하여 천연벌꿀 및 순도 99.9%이상의 은이온수, 토코페롤, 비타민C 등은 혼합하여 만든 천연 내추럴팩으로써 • 기존 부직포팩과 같이 PG, 글리세린 등의 보습 화학약품을 사용하지 않으므로써 피부에 자연 그대로의 신선감과 싱그러움 그리고 촉촉하고 부드러운 느낌을 더해줌 • 또한, 랑쉬내추럴팩은 10분이내의 짧은시간내 맛사지 효과를 충분히 볼수 있으며 20~30분이 경과시 팩에 영양소가 피부에 침투 팩이 종이장과 같이 얇아지는 특징이 있으며 특히 70C 이상 물에 녹아버리는 내추럴 친환경팩입니다. 	
제품의 특징	<ol style="list-style-type: none"> 1) 내추럴팩은 산수유, 박하, 오이,알로에,해초,키위,레몬,오렌지에서 자연그대로 추출한 성분과 천연벌꿀, 토코페롤, 비타민C 등을 혼합하여 만든 팩으로써 10분이내 짧은시간내 피부 모공속에 다양한 내추럴 영양성분을 공급해주므로써 맛사지 효과를 최대한 창출할수 있는 “초간편스피드팩”입니다. 2) 또한, 내추럴팩은 20분이상 얼굴에 부착하고 있으면 모든 영양소가 피부에 흡수되어 종이장과 같이 얇아지며 기존 흔하게 사용해오고 있는 부직포팩과 달리 70C 이상 물에서 분해되는 천연 친환경팩이며 3) 특히, 기존 부직포팩은 PG, 글리세린 등의 화학약품을 사용 인위적인 피부보습과 촉촉함을 조성하는 반면 랑쉬내추럴팩은 이러한 화학약품을 전혀 쓰지않고 자연성분 그대로를 피부에 공급해주므로써 알레르기 등의 부작용이 없고 피부에 신선감과 청량감 그리고 싱싱함을 더해줌 4) 또한, 순도 99.9% 이상의 순수 은이온수를 사용하므로써 살균위생 청결한 청정피부를 유지할수 있으며 5) 내추럴팩은 아래와 같은 고른 영양성분을 내포하고 있어 2~3일 간격으로 산수유, 박하, 오이→알로에→해초→키위→레몬→감귤 순으로 “프로그램”을 시행하므로써 한층 피부를 아름답게 가꿀수 있는 특징이 있습니다. <ul style="list-style-type: none"> • 오이팩 : 열진정, 미백, 보습, 노화억제, 기미, 주근깨 (비타민A,C, 무기질, 펠로산 등) • 알로에팩 : 피부보습, 피부재생, 건성 및 지성피부 중성화 (알로에틴, 스테로이드, 아미노산, 사포닌 등) • 키위팩 : 노화방지, 피부미백, 피부내 콜라겐 합성 촉진 (비타민C : 사과 20배, 귤의 5배, 비타민E 등) • 해초팩 : 보습, 기미, 잔주름, 모공축소 (카로틴류, 크산토펜류, 엽록소, 비타민B₂ 등) • 오렌지팩 : 모세혈관 강화, 항산화(노화방지), 항균, 항염 (비타민C, D-리보텐, 시네후린 등) • 레몬팩 : 미백, 각질제거, 피부이완 및 수축 (비타민C, 시트르산, 당, 시트랄 등) 6) 그리고, 랑쉬내추럴팩은 세계적 유수 검사기관 미국FDA 안전성 검사필, 국내 국가공인기관(한국생활용품시험연구소, 한국소비과학연구센터) 피부감작성 시험 및 알레르기테스트, 안자극시험(눈에 이상없고), 경구독성시험(먹어도 이상없음), 살균력테스트, 품질보증Q 등을 득한 안전성과 신뢰성을 인정받은 공인제품이며 특히, 세계최초 특허(실용신안 1건, 조성물특허 2건)을 받은 창의적이고 독창적이며 대중적 미용제품으로써 맛사지팩이 수준을 획기적으로 업그레이드시킨 제품입니다. 	

5. 네츄럴팩 제품의 특징

가. 네츄럴팩은 산수유, 박하, 미역, 다시마 등의 해조류, 알로에에서 자연 그대로 추출한 성분과 미백기능성으로 인정된 알부틴(Arbutin), 보습력이 탁월한 기가화이트(Gigawhite), 레드와인(Red wine), 피부윤택 및 탄력을 유지할수 있는 실크단백질(Silk protein)과 99.9%이상의 은이온수, 천연벌꿀 등을 혼합하여 만든 팩으로써 10분 이내 짧은 시간내 피부 모공속에 다양한 네츄럴 영양성분을 공급해주므로써 맛사지 효과를 최대한 창출할수 있는 초간편 스피드팩임.

또한, 랑쉬네츄럴팩은 20분 이상 얼굴에 부착하고 있으면 모든 영양소가 피부에 흡수되어 종이장과 같이 얇아지며 기존 흔하게 사용해오고 있는 부직포팩과 달리 70℃ 이상 물에서 분해되는 천연 친환경팩이며

특히, 기존 부직포팩은 PG, 글리세린 등의 화학약품을 사용 인위적인 피부보습과 촉촉함을 조성하는 반면 네츄럴팩은 이러한 화학약품을 전혀 쓰지 않고 자연성분 그대로를 피부에 공급해주므로써 알레르기 등의 부작용이 없고 피부에 신선감과 청량감 그리고 싱싱함을 더해줄뿐 아니라 허브식물인 천연 로즈플라워어터와 천연 라벤다워터를 투입하여 자연 그대로의 허브팩화 하므로써 허브아로마(향)요법에 의한 스트레스해소는 물론 피부진정 작용으로 정신건강과 피부건강을 동시에 만족시킬수 있는 천연 기능성팩이면서 순도 99.9% 이상의 순수 은이온수를 사용하므로써 살균위생 청결한 청정피부를 유지할수 있으며

본팩은 자연 그대로의 신선감과 청량감 등의 싱그러움과 풍부한 영양소를 그대로 피부에 충분히 공급해주며 일반 부직포팩과 실리콘(하이드로겔)팩과 달리 하이테크고분자 기술에 의한 자연성분 추출물을 응축시켜 제품화하므로써 팩을 하고 있으면 팩 자체에서 수분이 생성되어 피부에 충분한 영양공급이 가능하고 여기에 눈에는 보이지 않지만 팩자체 미세한 틈(구멍)이 있어 팩을 붙이고 있으면 팩이면에 미백, 보습성분 등의 맛사지 성분이 얼굴쪽으로 빨려들어와 피부에 흡수되므로써 30분 이상 붙이고 있으면 종이장과 같이 얇아지는 특징이 있음

또한, 밀착력이 뛰어나 움직이면서 맛사지 가능하고 성분 대부분이 나노(Nano) 입자화되어 있어 10분 이내 짧은 시간내 피부흡수 맛사지 효과 최대한 창출 가능

나. 팩의 특징 집중 부각

(1) 팩 자체 구성 주요성분 자체가 자연 그대로의 네츄럴 100% 에센스 성분으로 구성되어 있어 충분한 영양분 흡수는 물론 신선감과 상큼함을 더해준다는 점 강조

주요성분

- 다이아몬드는 5,000년전부터 고대 인도 전설적인 미인인 무갈여왕들이 다이아몬드 가루와 식물추출물을 혼합 독특한 미용법을 이용 아름다움을 지속시켜 왔으며
- 특히, 수세기동안 다이아몬드는 피부탄력과 브라이트닝(미백) 효과가 뛰어나 피부에 좋은 영향을 주고 노폐물제거에 우수한 것으로 알려져 있으며
- 피부를 촉촉하고 부드럽게 해주고 피부진정 및 수렴효과가 탁월한 미역, 다시마, 한천 등의 해조류 추출물, 장미추출물, 알로에 및 녹차 등의 식물성 추출물과
- 피부를 탄력있고 윤택하게 가꾸어주는 콜라겐 성분 등 다양한 고영양 에센스 성분을 고분자 신기술로 응축시켜 만든 친환경 네츄럴 팩으로써 피부를 한층 아름답게 가꾸어 줍니다.

(2) 피부에 잘 흡수되는 친환경 네츄럴팩임을 리얼하게 강조

① 물에 녹는 모습 리얼하게 시연 - 부직포팩과 비교 시연

⇒ 80℃ 이상 물에 자연 분해되는 친환경 네츄럴팩임을 강조(부직포팩 녹지않는 모습 비교 시연)

② 뜨거운 물에 분해되고 - 10여분후 물이 완전히 식었을 때

⇒ 투명한 100% 에센스 영양크림 탄생장면 시연

- 이렇게 만들어진 100% 에센스 투명 영양크림을 얼굴, 몸, 손 등 신체부위에 바를 경우 100% 에센스로 구성되어 있어 피부가 한층 촉촉하고 부드럽다.

- 특히, 목욕, 세안시 비누사용후 발라주시면 아주 촉촉하고 부드러운 최상의 피부유지

③ 투명 또는 검정색 라운드형 용기를 준비 (위를 블록하게 놓는다)

그 위에 팩을 붙인다음 그안에서 열을 가했을 때 점진적으로 녹아 흘러 내리는 모습 시연
“이렇게 피부에 흡수된다”는 점을 강조팩 자체 영양분이 본 장면과 같이 피부에 충분히 흡수(보통 20~30분 정도)

다. 부직포팩과 비교 시연

비이커 2개에 80℃ 이상 물을 준비하여 부직포팩과 다이아몬드 하이드로겔팩을 동시 주입 분해되는 모습 비교시연

① 부직포 팩

- 인위적이고 화학적인면 부각 (분해되지 않고 찢어지지 않는점 강조)

- 인위적으로 부직포에 액을 도포함으로써 액이 줄줄 흘러내리고 느낌이 개운치 못하다는 점 강조

② 하이드로겔(Hydro Gel) 팩

- 자연 그대로의 친환경 네츄럴팩으로써 주변에 서식하는 자생식물에서 그 성분을 추출한 순수식물성 에센스 성분으로서

- 이러한 피부에 좋은 영양분들을 그대로 고분자 신기술로 응축시켜 만들므로써 팩 자체가 영양덩어리으로써 영양분이 한꺼번에 쏟아지지 않고 피부에 붙이고 있으면 계속 적정량의 영양분과 수분 즉, 에센스 성분이 방출됩니다.

- 피부에 신선함과 상큼함을 더해줍니다.

- 순수한 추출물로 구성된 에센스 100% 영양성분으로 구성되어 있어 당연히 찢어질수밖에 없음 (만약, 찢어지지 않는다면 이것은 전근대적 부직포팩과 무엇이 다르겠는가?)

6. Diamond Hydro Gel pack 특징

가. 전근대적 부직포팩이 화학적 미용재료로 팩위에 도포함으로써 얼굴에 팩을 시행할 경우 액이 한꺼번에 표출되고 팩 밖으로 줄줄 흘러내림으로써 다소 개운치 못한 불쾌감을 줄수 있으나 Diamond Hydro Gel pack은 이와는 차별화된 특징을 지니고 있다.

① 피부를 밝게 해주는 다이아몬드 성분과 팩 자체 성분이 주변에 있는 해조류, 식물 등 자연 그대로의 식물추출물로 형성되어 있어 신선한 식물성 에센스 영양분을 충분히 피부에 공급함으로써 부직포팩이 인위적이고 화학적인것과 달리 피부에 신선감과 청량감 그리고 상큼함을

더해줄수 있는 친환경 팩임.

※ 5000년 전부터 고대 인도 무갈여왕들이 아름다움을 추구하기 위하여 미용재료로 사용해 왔으며 인도 전통건강학문 아유르베다에도 전해져 내려오고 있음.

② 본 팩을 전신 영양보습화장수 및 영양크림으로 간편하게 만들어 사용할수 있다는점.

- 다이아몬드 하이드로겔팩을 사용하다가 남은 것은 버리지 말고 냉장보관 하였다가

- 80℃이상 더운물에 적정량을 넣고 분해하고 식히면 투명한 고영양분 100%에센스가 만들어 집니다.

- 이렇게 만들어진 투명에센스 성분을 세안, 목욕시 등 피부에 바르면 피부가 대단히 촉촉하고, 부드러운 참신감을 느낄수 있습니다.

• 사용했던 팩을 재사용하기 위하여 분해하는게 다소 꺼리시는 분께서는 사용하지 않은 새로운 팩을 뜨거운물에 분해 사용하시면 편리하게 효과를 볼수 있습니다.

• 대만 수출품은 대만소비자들이 영양보습 화장수 또는 영양크림으로 재사용 합니다.

• 본 팩 자체가 Gel화된 100% 영양크림 에센스로써 언제든지 액체상태의 영양크림 에센스로 변형 가능

7. 마케팅 분석 및 유통 전략

가. 마케팅 분석

- 4C 분석: 회사(Company), 소비자(Consumer), 경쟁사(Competitors), 유통(Channel)

- SWOT분석

Strength	Weakness
<ul style="list-style-type: none"> ▪ CEO의 역량 ▪ 회사의 재무구조 ▪ 회사의 브랜드 이미지 ▪ 회사의 시장점유율 ▪ 우수한 기술력과 know how ▪ 고객의 브랜드 성향 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 유통되고 있는 제품
Opportunity	Threat
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 로하스와 웰빙에 의한 실버화장품에 대한 선호도 ▪ 실버화장품과 기능성 화장품에 대한 국가의 지원 정책 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 주요 화장품 업체들의 실버화장품 출시 경쟁심화 ▪ 소비자보호법의 강화로 인하여 소비자들의 권리 및 영향력 증가 ▪ 다국적 유통업체의 국내시장 점유와 전문점 운영 ▪ 기능성 화장품 시장의 소비자들의 선택폭 증가

- 유통 전략

- ▶ 제품력 : 세계최초 신개발 네츄럴 기능성팩
- ▶ 실질적 인증제도 확립
 객과적 인증 : 미국FDA 안전성테스트, 국내국가공인검사기관 안전성테스트, 품질보증Q 등
- ▶ 고급브랜드 및 고가전략
- ▶ 광고 및 유통의 차별화
- ▶ 소비자들의 신뢰를 바탕으로한 방문판매와 샘플링 제공.
- ▶ VIP 고객 마케팅과 클럽조성
- ▶ 온라인과 오프라인 전문점 개설
- ▶ 외국 수출을 위한 바이어들의 전문 매장개설

기능성 화장품의 피부 안전성 효능 임상평가

1. 결과 보고서 요약문

시험제목 및 시험 제품	침포시험을 통한 원료 및 화장품에 대한 안전성 평가
시험목적	화장품 시제품 및 원료에 대한 인체피부 자극도 평가
시험의뢰기관	의뢰일: 2011년 12월 3일
	의뢰기관 송원섭 교수 (주관연구책임자)
	공동연구자: 교수 김 성 진
연구기관	기관명 : 전남대학교 의과대학 피부과학교실
	기관장 : 주임교수 김 성 진 (인)
	시험부서: 전남대학교 의과대학 피부과학교실
	시험책임자: 교수 윤 숙 정 (인)
시험물질관리책임자	소 속: 전남대학교 의과대학 피부과학교실
	관리 책임자: 교수 윤 숙 정
연구원의 구성	소 속: 전남대학교 의과대학 피부과학교실
	책임자: 교수 윤 숙 정
	공동연구: 교수 김 성 진 전남대학교 의과대학 피부과학교실
	연구원: 한정현, 전남대학교 의과대학 피부과학교실 전공의 4년차
	연구보조원: 정영량, 전남의대 의과학연구소 (주)에코덤
연구보조원: 오상미, 전남의대 의과학연구소 (주)에코덤	
시험조정 책임자	윤 숙 정: 전남대학교 의과대학 피부과학교실 송 원 섭: 국립 순천대학교 원예학과
시험일	의뢰번호 : 해당사항 없음
	시험기간 : 2011년 12월 5일 - 12월 9일
	시험물질 최초 국소 도포일 : 2011년 12월 5일
	시험물질 자극도 평가기간 : 2011년 12월 7일 - 12월 9일
	보고서 제출일 : 2011년 12월 13일
결 과	<p>시험시료 16종을 대상으로 자극도가 높은 것으로는 시제품 시료인 14번 (5.506)이었고 그 다음으로는 동일한 자극지수 수준으로 출현한 시료 7, 8번(1.336)이 상당히 높았고 시료 2, 15번 (1.190) 그리고 16번 (1.042), 10번(0.893)순으로 관찰되었다.</p> <p>시료14번 은 유의하게 자극을 유발하고 있는 수준이므로 주의해야 할 것으로 보이며 시료 7, 8번도 잠재적인 자극가능성이 높은 소재로 추정할 수 있었다.</p>

2. 시험 목적

단회 첩포시험을 통해 피부자극반응과 감각도를 예측하고 평가하는 방법은 연구자와 규제기관의 기준에 따라 다소 차이가 있지만 화장품 제품개발 단계에서 빈번하게 사용되는 유용한 시험기법이다. 화장품 시료의 구성성분으로 사용될 물질의 피부에 대한 자극 혹은 감각 능력은 단순히 그 물질 구조적, 화학적인 특성에 의하여 미리 예측될 수 있거나 시험관내 독성평가나 동물시험을 통해 일차적으로 검증된 결과로 확인할 수 있다. 그러나 기제의 조성 및 적용상의 특성으로 인해 실제 사용상황에서는 서로 다른 결과를 나타내는 수가 많은데, 이는 피부의 자극-감각 정도가 개체의 유전환경적인 요인, 즉 적용되는 노출 당시의 많은 조건들(피부 접촉 농도, 접촉 시간, 노출 당시 피부 상태)에 의해 크게 영향을 받기 때문이다. 1950년대 이후 화장품의 자극도 혹은 감각 가능성을 예측하기 위한 여러 종류의 시험 방법이 개발되었으며, 그 중 반복누적 자극시험으로는 Draize 시험법, Shelanski-Shelanski 시험법, 변형된 Draize 시험법, Kligman의 자극극대화 시험법(maximization test) 등이 알려져 있으나 비교적 빠른 시간내에 간편하게 자극여부를 판별하기 위해서 개방형 혹은 밀폐첩포형 단회 첩포시험도 흔히 이용된다.

본 임상시험에서는 피부자극 유발도를 평가하기 위하여 시료 16종을 대상으로 48시간 단회 밀폐첩포시험을 수행하였으며 장업계에서 통용되는 평가기준(예, CTFA guideline)을 응용하여 Frosch & Kligman의 고안된 측정 평가법으로 자극정도를 평가, 분석하였다.

시료번호	시료명	시험농도
1	산수유 E	AS IS
2	박하 E	AS IS
3	옥잠화 E	AS IS
4	원추리 E	AS IS
5	박하 M	AS IS
6	산수유 M	AS IS
7	박하 M	AS IS
8	옥잠화 M	AS IS
9	원추리 M	AS IS
10	박하 H	AS IS
11	옥잠화 H	AS IS
12	산수유 H	AS IS
13	플라워 송 모이스처 뉴트리션 베이직 수딩 에센스	AS IS
14	플라워 송 모이스처 뉴트리션 베이직 수딩 에멀전	AS IS
15	플라워 송 모이스처 뉴트리션 파워 리프팅 크림	AS IS
16	플라워 송 파워 모이스처 울트라 크림	AS IS

자극지수	피부증상 혹은 징후의 형태
+ 1	Slight erythema, either spotty or diffuse
++ 2	Moderate uniform erythema
+++ 3	Intense erythema with edema
++++ 4	Intense erythema with edema & vesicles
- (negative)	음성 반응
? 0.5	인지가능할 수준으로 미약한 홍반
IR (irritant reaction)	기타 여러 형태의 자극반응 (접착자극을 포함)
NT (not tested)	자극반응의 발생 혹은 여타 이유에 의해 검사중단

$$\frac{\sum(\text{Each Score}; 1,2,3,4: \text{매 판독시 관찰값의 합})}{\text{최대평점 } 4 \times \text{전체 참여자원자의 수} \times \text{3회 판독차수}} \times 100$$

3. 시험 시료 16종

4. 제품 처방 의뢰자 내부자료

5. 임상시험 기간 및 내용

(1) 시험 기간 : 2011년 12월 5일 ~ 2011년 12월 9일

시험 첫날(12월 5일) 자원자의 배부에 시료 포함하는 첩포를 48시간 적용하였다. 이후 첩포를 제거하고 30분~1시간 후에 피부상태를 검사하였다(1차판독, 12월 7일). 24시간 경과 후 2차 판독(12월 8일), 48시간 경과 후 3차 판독(12월 9일)을 병행하여 처음 관찰된 1차 판독시의 자극 반응의 양상이 어떠한 변화를 보이는지 2, 3차 판독 때에 특별한 변화가 있는지 추적 관찰하였다.

6. 단회 첩포시험 중 피시험자에 대한 관리

(1) 시험기관에서 피시험자 관리

가. 임상시험 관리 기준(GCP)

시험 의뢰자 및 시험담당자가 본 시험을 실시, 평가하고 결과를 기록하는데 있어 GCP(Good Clinical Practice) 및 인권 윤리 정신을 준수하도록 하고 또한 국내 관련법규에 따라 수행하였다.

피시험자는 시험과정에 관한 교육을 받고 처음 방문 시 참여동의서와 함께 피부의 상태, 피부질환의 경력, 피부질환의 여부를 다시 검사 받았으며 특기할 만한 기타사항이 있으면 설문지와 증례기록지에 기술하도록 하였다.

나. 피시험자 동의

피부임상시험을 실시하기 전 시험담당자는 피시험자에게 다음 사항을 충분히 설명하고, 자유의지에 의한 시험참가 동의서를 문서로 얻었으며 동의한 날짜와 서명을 증례기록서에 기입하였다.

(2) 피시험자 선정과 제외기준

가. 선정기준

다음에 기술된 조건에 적합한 지원자를 피시험자로 선정한다.

- ① 19세 이상 50세 이하(만18세-49세)의 건강한 정상 성인 남녀로 피시험자 제외기준에 포함되지 않는 자
- ② 시험에 앞서 시험의 목적, 내용 등에 대해 충분히 설명을 듣고 자발적으로 동의서에 서명한 지원자
- ③ 시험기간 동안 추적관찰이 가능한 자

나. 제외기준

- ① 임신부 및 수유부
- ② 정신과적 질환이 있는 경우
- ③ 아토피성 피부염 등 특정 피부 질환의 과거력이나 현증이 있는 경우
- ④ 현재 진행 중인 습진성 피부병변이 평가부위에 심한 자원자
- ⑤ 알콜이나 기타 약물중독자
- ⑥ 시험 시작 1 주 이내에 전신적으로 스테로이드 제제의 투여를 받은 경우
- ⑦ 시험 시작 1 주 이내에 등에 국소 스테로이드 제제를 도포한 경우
- ⑧ 시험 시작 2 주 이내에 등의 일광 화상을 입은 경우
- ⑨ 시험참가 3 개월 내에 retinoid 제제를 사용한 경험이 있는 경우
- ⑩ 사용중 부작용 발생으로 본인 혹은 연구자가 임상시험을 지속할 수 없다고 판단한 경우

(3) 부작용을 포함한 안전성의 평가 및 보고 방법

가. 평가방법 및 항목

- ① 시험 진행의 부작용으로 추측되는 현상은 환자 기록지에 빠짐없이 기록한다.
- ② 피부자극상태를 평가하기 위해 시험 담당자가 피시험자의 상태를 보고 매 평가시 아래의 항목에 기록한다.

가려움증(), 빨갱게 부어오름(), 통증 따가움()
기간은 언제 (일, 주) 시작하여 언제까지(일, 주)
시료 위치 : 1(), 2(), 3(), 4(), 5(), 6(),
7(), 8(), 9(), 10(),,,,,, 40()
임상적 치료를 필요로 하였습니까? 예(), 아니오()

나. 보고방법

- ① 연구책임자는 연구원 및 피시험자에게 시험 진행에 관한 전반적인 설명을 하였고 시험기간 동안 나타나는 모든 현상에 대하여 보고하도록 미리 교육을 실시하였다.
- ② 시험 진행기간 동안 나타나는 모든 제반 증상에 대하여 종류, 발생기간, 정도, 처치, 치료약제 결과에 대하여 환자증례기록지(CRF)에 기입한다.
- ③ 연구책임자는 임상시험결과를 보고 시 연구기간 중 발생한 모든 증상을 서술하고 관련 정도의 예측평가를 기록한다.
- ④ 임상시험 진행도중 예측이 가능하였던 부작용 및 이상반응이 발생할 경우 24시간 내에 시험 의뢰자에게 보고한다.

(4) 피시험자의 중지 및 탈락에 대한 기준설정

가. 시험중지 기준

다음과 같은 사항으로 인하여 시험이 중단된 경우, 시험담당자는 증상 발현일, 이유, 처치 및 임상증상, 검사소견, 경과를 기록하여야 하며 특정한 평가를 하고 피시험자를 추적 조사하여야 한다(2, 3, 4항).

- ① 피시험자가 임상시험에 의한 부작용으로 거부 의사를 제시한 경우
- ② 다른 질환이 동반되어 임상시험을 진행할 수 없게 된 피시험자
- ③ 본 화장품 시료 적용 후 부작용이 초래된 피시험자
- ④ 기타 부득이한 사유가 본 시험과 직접적인 관련이 있는 경우

나. 시험탈락 기준

① 추적조사의 탈락:

피시험자가 시험기간 중 불가피한 사유로 참여를 못해 시험의 진행이 불가능할 경우 시험담당자는 피시험자를 추적하여 누락의 이유를 정확히 밝혀야 하며 피시험자의 건강여부를 기록하여야 한다.

- ② 시험계획서의 위반
- ③ 시험담당자와 피시험자간의 부정적인 인자의 발생

- ④ 시험담당자의 지시에 불응하는 피시험자의 경우
- ⑤ 시험부위에 과도한 일광(자외선) 등 자극을 받아 시험평가에 중대한 영향을 줄 경우

7. 시험 방법

단회 밀폐칩포시험은 시료의 접촉에 따른 피부자극 반응을 유발하는 칩포부착 단계와 반응 여부를 관찰하여 평가하는 단계로 구분된다. 이 임상 시험에서는 시험시료에 대하여 다음과 같이 칩포시험을 시행하였다.

(1) 칩포부착단계

① 피부자극을 평가하기 위한 칩포로는 IQ Chamber 를 (Chemotechnique Diagnostics, Sweden)를 사용하였다.

- IQ chamber는 폭 68 mm 길이 142 mm의 직사각형모양의 무자극성 접착테이프 위에 inert polyethylene chamber가 2열로 각 열 당 5개씩 총 10개가 배열되어 있고 각 chamber volume은 최대 65 microliter, 면적은 9x9 mm로 구성되어 있다. 각 chamber 간 간격은 열간 12mm 행간 20mm로 지정되어 있다.

- IQ chamber는 시료부착부위가 직사각형으로 자극반응의 판정에 있어 정상피부와 의 경계 부위가 뚜렷한 장점이 있고 알루미늄 금속재질을 이용하는 Finn chamber와 달리 플라스틱 chamber를 이용함으로써 무기이온을 포함하는 시료와 교차반응을 일으키는 빈도가 낮다고 알려져 최근 유럽의 연구자들간에 사용빈도가 높은 칩포재료로 각광받고 있다.

- 시료를 피시험자의 좌, 우측 배부에 밀폐 상태로 고루 부착하였다. 배부의 정중앙선은 피하였다.

② 칩포는 48 시간 동안 부착하였고 부착 후 30분 - 1시간이 경과(혹은 테이프 접촉반응이 뚜렷이 완화된 시점까지 기다린 후)한 다음 1차 자극 반응을 평가하였다.

- 자극 반응의 평가 기준은 국제 접촉 피부염 연구 그룹(ICDRG)의 판독 기준을 응용하여 Frosch & Kligman의 고안된 측정 평가법으로 사용하였다.

③ 2차 평가는 24 시간 후 수행되었다.

④ 3차 평가는 2차 평가 24시간 후 반복하였다.

단회 밀폐칩포시험 후 매번 평가하였던 각 시료의 피부 자극정도는 평균 피부 자극 지수를 계산하는데 응용되었다. 매회 시료별 피부 자극도는 다음 공식에 준하여 기록되었다.

피부자극도의 판정기준은 개별 시료에서 판독차수에 따라 출현하는 반응강도 및 빈도의 양상을 통해 추측할 수 있다.

8. 시험 결과

(1) 연구 대상자

피시험 자원자는 피부과 의사인 시험 책임자와 연구원의 병력조사, 문진 및 시진과 필요한 경우 촉진 등을 통해 피험자의 선정 및 제외 기준에 적합한 건강한 성인 남녀 28명으로 선발되었으며, 연령분포는 만 19세에서 37세 사이, 평균 연령은 24.8±4.1세 성비는 여자와 남자 각 19명:9명 이었다.

(2) 피부 자극도

시험을 완전히 종료한 피시험자 28명을 대상으로 단회 첩포 시험 후 평가 기준에 의거한 피부 자극도의 판독 결과는 아래에 기술한 표 1과 같다. 피부 자극 반응의 결과를 통해 자극도를 평가할 때 인체 피부 반응에서 적용되는 세계적인 공통 기준은 정해진 바 없으나, 통상 50명 이하의 자원자를 대상으로 하는 시험에서는 단회 첩포 시험의 판독시 총 자원자의 20%를 초과하는 빈도로 반응이 출현하는 시료 (본 시험의 경우 28명 의 20%인 6명 이상) 혹은 매회 판독시 +2 이상 자극 반응이 총 자원자의 10% 초과하여 관찰된 시료 (본 시험의 경우 총 6점 기준 피부 자극지수 1.785 이상)은 유의하게 자극을 유발할 가능성이 있는 물질로 간주할 수 있다.

시험 시료 16종을 대상으로 상기 기준으로 살펴보았을 때 자극도가 높은 것으로는 시제품 시료인 14번 (5.506)과 동일한 수준으로 출현한 시료 7, 8번 (1.336)이 가장 높았고 시료 2, 15번 (1.190) 그리고 16번 (1.042), 10번 (0.893) 순으로 자극지수가 관찰되었다. 시료 14번은 유의하게 자극을 유발할 수준이므로 주의해야 할 것으로 사료되었고 시료 7, 8번도 잠재적인 자극 가능성이 높은 것으로 추정할 수 있었다.

이 연구에 응용된 단회 첩포 시험은 연구자의 취향이나 시험 물질의 특성에 따라 24시간 혹은 48시간 첩포 중에서 선택할 수 있는데 본 임상 시험은 48시간 첩포와 이후 3차에 걸친 판독과정으로 자극 반응을 평가하였다. 이는 24시간 첩포 후 2차에 걸쳐 하는 평가 방법에 비해 시료와 피부의 접촉 시간을 연장시키고 반응의 강도 추이를 반복적으로 평가함으로써 상대적으로 높은 반응 정도를 보일 수 있지만, 한 차례 만으로 수행되는 단회 첩포 시험의 결과가 갖는 기술적인 한계를 극복하고 화장품 처럼 피부에 대한 자극 가능성이 낮은 물질을 적용하는 경우에는 24시간 보다는 48시간 첩포 시험을 통해 사소한 피부 반응이라도 쉽게 간과하지 않는 장점이 있다.

표 1. 피부 자극 반응 판독 결과의 요약

$$\frac{** \sum(\text{Each Score}; 1,2,3,4 \text{ at each of three reading}) \times 100}{4 (\text{Maximum score}) \times 28 (\text{No. of total subjects}) \times 3 (\text{총 자극 평가 횟수})} = 336$$

자원자	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16														
1														1.0	1.0	0.5														
2		1.0	1.0	0.5	0.5			0.5	0.5																					
3	0.5	1.0						0.5	1.0										0.5											
4																														
5																			0.5											
6																			0.5											
7																			0.5											
8					0.5	0.5	0.5	0.5																						
9														0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	0.5										
10																														
11																														
12														0.5	0.5					0.5	0.5									
13										0.5																				
14								0.5	0.5												0.5	0.5								
15																					0.5	0.5	0.5							
16																														
17								0.5	0.5	0.5																				
18									0.5																					
19																														
20																							1.0	1.0						
21										0.5	0.5												1.0	0.5	0.5	0.5	0.5			
22																														
23																											1.0	0.5		
24																												0.5	0.5	
25		0.5	0.5	0.5	0.5			0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5									1.0	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	
26																									0.5	0.5				
27																														
28		0.5	0.5	0.5	0.5			0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5									0.5	0.5	0.5				
총반응합	1.5	4.0	1.5	0.5	0.5	2.0	4.5	4.5	2.5	3.0	1.0	1.0	2.0	8.5	4.0	3.5														
반응자수	1	3	3	1	1	2	5	6	4	4	1	1	2	14	4	3														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16														

9. 결 론

총 28명의 피시험자를 대상으로 시료 16종에 대한 48시간 단회밀폐척포시험을 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 자극도가 가장 높은 것으로는 시제품 시료인 14번 (5.506)
- 2) 잠재적으로 자극이 높을 것으로 추정되는 시료는 동일한 수준으로 출현한 시료 7, 8번 (1.336)
- 3) 이외에 시료 2, 15번 (1.190) 그리고 16번(1.042), 10번(0.893)순으로 자극지수가 관찰되었다.
- 4) 시료 14번은 유의하게 자극을 유발하고 있는 수준이므로 주의해야 하며, 대규모 집단에 노출시 시료 7, 8번도 잠재적인 자극가능성이 높을 것으로 예측할 수 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구성과 목표 달성도

(단위 : 건수)

구분		특허		신제품				유전자원 등록	논문		기타 (학회발표)
		출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표								2	1	
	달성									8	
2차년도	목표								2	2	
	달성								2	4	
3차년도	목표	1							1		
	달성	2							1	2	3
계	목표	1							1	4	3
	달성	2							1	4	11

* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

2. 연구성과 목표 달성도

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이 전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	4		2	2	1
	달성	2	6		10	2	1

3. 연구성과 관련분야 기여도

가. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해연도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

나. 인력활용/양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
42	1	5	12	24	31	11			42

다. 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

라. 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
천연화장품 천연비누 제조사 자격증취득	천연화장품과 천연비누제조 의 이론과실제	순천대학교 평생교육원	120회	240시간	140명
천연화장품 천연비누 만들기	천연화장품 천연비누 제조실습	순천시 문화원	30회	60시간	50명

4. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
150		2	152	1	-	1

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 논문게재 및 학술발표회 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009.5.7.	Inhibitory Ethanol Extract of <i>Ephendra sinica</i> on Melanogenesis in SK-MEL2	유민정	이숙영	이현화, 송원섭, 박열	한국약용작물학회 심포지엄 및 춘계학술발표회 초록집	제17권 별책 1호 p285~286	국내	-
2009.10.26~27.	목향 뿌리 추출물의 항미생물 활성(Antimicrobial activities of the crude extracts from roots in <i>Saussurea lappa</i>),	김용균	김근형	박찬웅, 박열, 이숙영	제4회 한국식물과 학협의회 공동심포지엄(자원식물학회)	초록집 D-53, p239	국내	-
2009.10.26~27.	구례군 특산식물 추출물의 항산화 활성(Antioxidant activities of the extracts from some endemic plants in Gurye county),	장은숙	이숙영	송원섭, 이현화, 김현철, 김두식	제4회 한국식물과 학협의회 공동심포지엄(자원식물학회)	초록집 D-26, p225	국내	-
2009.10.26~27.	호장근 추출물의 항산화효과와 HaCaT 세포의 보호 효과[DPPH radical scavenging activity and protective effect on skin cell of extract from <i>Reynoutria japonica</i> roots]	유민정	이숙영	이현화, 강주연, 김종세, 송원섭, 김두식	제4회 한국식물과 학협의회 공동심포지엄(약용작물학회)	초록집 C-87, p189	국내, 2009년도 한국약용작물학회 춘계학술발표회 포스터 발표상 수상: 제 09-23호	-

2009.7.15	산수유(<i>Cornus officinalis</i>)의 항균활성과 tyrosinase억제 효과	송원섭	송원섭	이숙영	제3회 중.한청장 고원야생화연구소 심포지엄	p5~9	국제(중국)	심포지엄
2009.5.7	中國 佛手柑의 부위별 폴리페놀, 플라보노이드 성분과 Tyrosinase활성의 비교	임요섭	송원섭	김은식, 주덕용, 이필재, 광수	한국약용작물학회 심포지엄 및 춘계학술 발표회 초록집	제17권 별책 1호	국내	학술 발표
2009.5	한국, 중국과 미국 석류(<i>Punica granatum</i>) 과피의 추출물의 항균 및 면역활성 분석	송원섭	이필재	진영욱, 문수근, 주덕용	한국자원 식물학회 춘계학술 발표회		국내	학술 발표
2009.5	중국 五夷岩茶의 추출물 종류에 따른 항균 및 면역활성	송원섭	박문수	신동영, 신수철, 임요섭	한국자원 식물학회 춘계학술 발표회		국내	학술 발표
2010	질경이 추출물의 항산화 효과 및 각질세포 보호효과	유민정	이숙영		한국인체미용예술학회지	11(3): 15~25.	국내	학진 등재
2010	상백피 추출물의 피부상재균에 대한 항균활성과 항산화 효과.	유민정	이숙영	김공민, 송원섭, 김수관	한국인체미용예술학회지	11(2): 87~98.	국내	학진 등재
2010	실버세대용 식물성 탈취 조성물의 방부효과.	김공민	이숙영	송원섭, 홍근표, 김용근, 김병훈, 김승연	대한피부미용학회	p29	국내	학술 발표

2010	식물 추출물을 소재로 한 실버세대용 탈취 조성물의 배합조건 분석	장은숙	이숙영	송원섭, 권수정, 유민정, 김병훈, 박열	대한피부미용학회	p32	국내	학진 등재
2010	구례군 특산식물 추출물의 <i>in vitro</i> tyrosinase 저해효과	장은숙	이숙영	권수정, 김중세, 양영기, 김두식, 송원섭	한국약용작물학회 춘계 학회 포스터 발표 II-45	초록집 제18권 별책 1호: p331	국내	학술 발표
2010	구례 특산식물 추출물이 B16F10 Melanoma Cell의 멜라닌 생성억제에 미치는 영향	장은숙	이숙영	강주연, 전지훈, 박열, 김두식, 송원섭	한국약용작물학회 춘계 학회 포스터 발표 II-44	초록집 제18권 별책 1호: p329	국내	학술 발표
2010.2.25	Essential oil과 polyphenol 화합물을 이용한 실버세대의 체취 개선용 소취 기능성 기초화장품 개발	이숙영	송원섭	김두식	전남실버복지연구센터와 한중야생화연구소 공동심포지엄 “실버세대의 건강과 생활”	초록집 36~49	국내	심포지엄
2010.5.14 .~5.15	구례군 자생식물 배초향(<i>Agastache rugosa</i>)추출물의 항산화 활성과 항고혈압 효과.	윤재호	이순옥	김두식, 이숙영, 부희옥, 송원섭	한국자원식물학회 춘계 학술 발표회	p.139.	국내	학술 발표
2010.5.14 .~5.15	구례군 자생식물 배초향(<i>Agastache rugosa</i>)추출물의 Melanin 생성억제와 미백효과.	윤재호	문현정	이순옥, 김두식, 이숙영, 송원섭	한국자원식물학회 춘계 학술 발표회	p.140.	국내	학술 발표

2010.5.14 ~5.15	구례군 자생식물 산수유(<i>Cornus officinalis.</i>)추출물 의 Melanin생성억제와 미백효과.	윤재호	김두식	이순옥 문현정 이숙영 송원섭	한국자원 식물학회 추계학술 발표회	p.142.	국내	학술 발표
2010.	몇 가지 식물추출물이 배양 NIH3T3 섬유모세포의 세포생존율과 세포부 착률에 미치는 세포독성에 관한 연구.	임요섭	송원섭	서영미 박승택 김신무	대한임상 검사학회 지	42(3) : 116-124.	국내	
2010	함초(<i>Salicornia herbacea</i>)추출물 의 Tyrosinase 활 성억제와 면역활성.	부희옥	배춘식	박수현 황성진 송원섭	한국자원 식물학회 국제 추계학술 발표회	p.44.	국내	학술 발표
2010	갈대(<i>Phragmites communis</i>) 부위별 폴리페놀 플라보노이드 성분과 Tyrosinase 활성 억제 효과.	윤재호	박문수	부희옥 송원섭	한국자원 식물학회 추계학술 발표회	p.61	국내	학술 발표
2010	산귤나무(<i>Citrus sunki sakurai</i>)추출물의 Tyrosinase 효소 활성과 Melanin생성 억제.	윤재호	부희옥	이순옥 송원섭	한국자원 식물학회 추계학술 발표회	p.62.	국내	학술 발표
2011	천연화장품 신소재 개발을 위한 감귤류 (<i>Citrus</i>)의 생리 및 면역활성.	김은식	진영옥	윤재호 주덕용 송원섭	한국자원 식물학회 국제 추계학술 발표회	p.76.	국내	학술 발표

2011	키위의 메탄올과 에탄올 추출물의 항산화 활성과 tyrosinase 저해 활성.	김은식	진영욱	윤재호 주덕용 송원섭	한국자원 식물학회 국제 춘계학술 발표회	p.78	국내	학술 발표
2011	갈대(<i>Phragmites communis</i>)의 추출용매별 생리활성 효과.	윤재호	박문수	부희욱 송원섭	한국자원 식물학회 국제 춘계학술 발표회	p.75	국내	학술 발표
2011	한국, 미국 이란, 석류피 생리활성 및 면역활성.	윤재호	박문수	정의수 최경민 송원섭	한국자원 식물학회 국제 춘계학술 발표회	p.77	국내	학술 발표
2011	천연색소 함유 화장료 조성물의 열 및 광 요인에 따른 색차변이.	부희욱	배춘식	박수현 황성진 송원섭	한국자원 식물학회 국제 춘계학술 발표회	p.44	국내	학술 발표

2. 연구성과활용 계획

- 특허출원 1.

출원일자 2012.03.27

특기사항 심사청구(무)공개신청(무)참조번호(001)

출원번호 10-2012-0031179(접수번호 1-1-2012-0245022-35)

출원인명칭 순천대학교 산학협력단(2-2004-012754-5)

대리인성명 송원섭 이숙영 차영주 민용태

발명의명칭 식물 유래정유를 유효성분으로 포함하는 소취제 조성물

- 특허출원 2.

출원일자 2012.03.27

특기사항 심사청구(무)공개신청(무)참조번호(002)

출원번호 10-2012-0031180(접수번호 1-1-2012-0245023-81)

출원인명칭 순천대학교 산학협력단(2-2004-012754-5)

발명자성명 송원섭 이숙영 차영주 민용태

발명의명칭 식물 유래 정유 및 폴리페놀화합물을 유효성분으로 포함하는 채취 제거용 화장료 조성물

- 개발제품의 범위 : 노인냄새 개선효과가 있는 수분·영양보습-스킨 소프너, 로션, 영양크림 등
- 각각의 기술에 대하여 2건의 특허출원(시기: 2010년~2011년) 및 기술이전 실시
- 관능성 및 소비자 선호도 조사를 위한 시제품 제조하여 화장품 박람회에 출시(시기: 2010년~매년)
- 본 연구의 참여업체(다량쉬) 보유 판매망을 통한 시범 마케팅 실시(시기: 2011년~2012년)
- 본 연구에서 개발된 원천기술을 활용하여 다양한 용도의 소취, 탈취기능성 미용제품 개발 가능

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 관심 가져야 할 실버 화장품 시장(2005/09/14)

최근 들어 매스컴에서는 우리나라의 낮은 출산율과 고령화에 대한 보도가 끊이지 않고 있다. 그도 그럴 것이 우리나라는 현재 세계에서 가장 낮은 출산율과 가장 빠른 속도로 진행되는 고령화 문제에 봉착해 있다.

2002년 우리나라의 출산율은 OECD 국가들의 평균치인 1.7명보다 훨씬 낮은 1.17명으로 집계됐다. 65세 이상의 인구 비율이 7%를 넘는 고령화 사회에 들어선 것은 이미 지난 2000년이였다. 2019년에는 고령사회(14% 이상)에 진입한다. 그리고 불과 7년 뒤인 2026년에는 고령인구 비율이 20%를 넘는 초고령 사회가 될 것이다.

고령화의 속도도 선진국보다 빠르다. 고령인구 비율이 7%에서 20%로 증가하는 데 걸린 기간을 비교해 보면 더욱 충격적이다. 프랑스가 1백56년, 영국이 92년, 미국 86년, 이탈리아와 독일이 각각 80년, 일본이 36년 소요되는 반면 우리나라는 26년에 불과하다.

경제성장을 지속시키기 위해서는 인구의 양적 확충과 질적 향상이 필요하다. 인구의 양적인 확대를 통한 노동력의 확충 방안으로는 출산장려, 여성과 고령 인력의 활용 등을 들 수 있다.

고령화 추세의 한국 사회는 이제 새로운 인재로 여성 인력을 활용해야 하는 상황을 맞고 있다. 여성

인력을 활용하지 않으면 안 되는 시대가 왔기 때문에 사회 전체가 여성에 대해 전향적인 시각을 가질 때가 됐다.

또 고령화의 속도에 비해 아직까지 우리나라는 실버 산업에 대한 관심이 취약한 실정이다. 땀 박질하는 노인 수에 비해 노인복지시설 수는 거북 걸음을 면치 못하고 있다.

반면 일본에선 노인인구 급증으로 실버 산업이 날로 번창하고 있다. 휠체어, 특수침대, 입욕보조용구 등 실비용품 매출은 매년 10%에 가까운 성장을 거듭, 39조엔 규모의 시장을 형성하고 있다. 2025년에는 1백55조엔 규모로 커질 전망이다.

시세이도나 가네보 등 화장품 업체들도 노인 대상 제품 개발은 물론 캠페인도 벌이고 있다. 미국 또한 노인용 화장품만도 3백여 가지에 이를 정도로 다양한 실비용품들이 나와 있다.

우리나라도 실버 산업의 잠재시장은 거대하다. 보건사회연구원에 따르면 실버타운을 포함한 실버산업의 시장규모는 지난해 16조원에 달한다. 오는 2000년에는 25조원에 달할 전망이다.

그러나 우리나라에는 국산 실비용품이 거의 나와 있지 않은 실정이다. 대부분이 수입품인데다 백화점에서는 전문코너를 찾아보기 힘들다. 베이비산업과 백화점 신세대용품 코너가 날로 번창하는 것과는 극히 대조적인 모습이다.

우리나라 화장품 업체들도 이러한 고령화 사회에 대비해 여성 인력의 활용의 확충과 함께 노인용 화장품 개발에 눈을 돌려야 할 때가 왔다.

<http://sanyuwha2.blog.me/17375787>

2. 일본실버화장품(2011/04/01)

최근 들어 매스컴에서는 우리나라의 낮은 출산율과 고령화에 대한 보도가 끊이지 않고 있다. 그도 그럴 것이 우리나라는 현재 세계에서 가장 낮은 출산율과 가장 빠른 속도로 진행되는 고

령화 문제에 봉착해 있다.

2002년 우리나라의 출산율은 OECD 국가들의 평균치인 1.7명보다 훨씬 낮은 1.17명으로 집계됐다. 65세 이상의 인구 비율이 7%를 넘는 고령화 사회에 들어선 것은 이미 지난 2000년이였다. 2019년에는 고령사회(14% 이상)에 진입한다. 그리고 불과 7년 뒤인 2026년에는 고령인구 비율이 20%를 넘는 초고령 사회가 될 것이다.

고령화의 속도도 선진국보다 빠르다. 고령인구 비율이 7%에서 20%로 증가하는 데 걸린 기간을 비교해 보면 더욱 충격적이다. 프랑스가 1백56년, 영국이 92년, 미국 86년, 이탈리아와 독일이 각각 80년, 일본이 36년 소요되는 반면 우리나라는 26년에 불과하다.

경제성장을 지속시키기 위해서는 인구의 양적 확충과 질적 향상이 필요하다. 인구의 양적인 확대를 통한 노동력의 확충 방안으로는 출산장려, 여성과 고령 인력의 활용 등을 들 수 있다.

고령화 추세의 한국 사회는 이제 새로운 인재로 여성 인력을 활용해야 하는 상황을 맞고 있다. 여성인력을 활용하지 않으면 안 되는 시대가 왔기 때문에 사회 전체가 여성에 대해 전향적인 시각을 가질 때가 됐다.

또 고령화의 속도에 비해 아직까지 우리나라는 실버 산업에 대한 관심이 취약한 실정이다. 땀 박질하는 노인 수에 비해 노인복지시설 수는 거북 걸음을 면치 못하고 있다.

반면 일본에선 노인인구 급증으로 실버 산업이 날로 번창하고 있다. 휠체어, 특수침대, 입욕보조용구 등 실비용품 매출은 매년 10%에 가까운 성장을 거듭, 39조엔 규모의 시장을 형성하고 있다. 2025년에는 1백55조엔 규모로 커질 전망이다.

시세이도나 가네보 등 화장품 업체들도 노인 대상 제품 개발은 물론 캠페인도 벌이고 있다. 미국 또한 노인용 화장품만도 3백여 가지에 이를 정도로 다양한 실비용품들이 나와 있다.

리나라도 실버 산업의 잠재시장은 거대하다. 보건사회연구원에 따르면 실버타운을 포함한 실버 산업의 시장규모는 지난해 16조원에 달한다. 오는 2000년에는 25조원에 달할 전망이다.

그러나 우리나라에는 국산 실비용품이 거의 나와 있지 않은 실정이다. 대부분이 수입품인데다 백화점에서는 전문코너를 찾아보기 힘들다. 베이비산업과 백화점 신세대용품 코너가 날로 번창하는 것과는 극히 대조적인 모습이다.

우리나라 화장품 업체들도 이러한 고령화 사회에 대비해 여성 인력의 활용의 확충과 함께 노인용 화장품 개발에 눈을 돌려야 할 때가 왔다.

<http://tmoz.me/bbs/115412>

3. 일본 실버전용 화장품 판매현황 (허정애, 이정민; 2009)

- 일본기능성 화장품 시장규모<표1> 는 전년 대비 0.6% 증가한 1조 6천 5백억엔으로 화장품 시장에 있어서의 비중은 74.9%였다. 스킨케어 시장에서의 향 노화는 일본사회의 고령화 및 중,고 연령층의 피부케어 의식이 높아져 수요가 확대되고 있다.

출처 : (주) 후지경제사이트, 2007.

<표1> 일본 기능성 화장품 시장 분석 조사 결과

	2006년	2007년 예상	2006년 대비
스킨케어	9,802억엔	9,885억엔	100.8%
베이스	2,856억엔	2,831억엔	99.1%
바디케어	1,076억엔	1,084억엔	100.8%
헤어케어	2,860억엔	2,913억엔	101.9%

합계	1조6,954억 엔	1조6,713억 엔	100.7%
화장품시장	2조2,143억 엔	2조2,189억 엔	100.2%
기능성화장품 시장	74.9%		75.3%

가네보에서도 50대 후반에서 60대 여성을 위한 브랜드 CHLCCA를 2008년 여름 신상품으로 발매 하였으며, 50대 여성의 피부를 위한 고기능성 스킨케어 제품으로 닥터시라보의 Aqua Collagen-Gel Enrich-Lift도 발매되어 판매되고 있다(<http://www.ci.lado.com>; 허정애, 이정민; 2009)

4. 하노버 실버산업 박람회- 독일 실버산업의 기회와 전망(2006/11/30)

- 화장품, 의약품, 기능성 가구 등이유망진출 분야 -

가. 독일 실버산업 현황

가. 고령화 시대로 접어드는 독일

- 2005년 기준 독일인구는 8,243.8만 명, 1km² 당 인구밀도는 236명이며 15세 이하 분포도는 15%정도에 그침.
- 현재 독일 남자의 평균수명은 75.9 세, 여성은 81.6세이며 수명기간이 늘어가는 추세임. 96년 기준 60세 이상의 인구는 1750만 명이었으나, 2000년에는 1930만 명으로 늘어났으며, 2030년에는 2600만 명으로 늘어날 전망이다.

나. 독일 실버세대의 구매능력

- 고령화 추세로 인해 60세 이상의 실버세대의 재할 제품 구매력이 증가하고 있으며, 이미 실버산업은 독일 내에 새로운 고부가가치 산업으로 자리잡음.
- 독일의 실버세대의 연간구매력은 약 1700억 유로로 추산되며, 이는 독일전체 구매력의 20%임.

다. 실버세대의 구매성향 분석

- 구매력이 풍부한 실버세대는 우수한 품질과 디자인, 동시에 사용이 절대적으로 편리해야 한 제품을 추구하며 고가의 제품을 선호하지만, 경제력이 약한 층은 디자인은 제 외하고 사용이 간편한 기기를 선택한다고 함.

라. 전망 및 시사점

- 지금의 실버세대는 이전세대와는 달리 일반 청장년층과 비슷한 사고 및 생활패턴을 갖고 있어, 차별화된 마케팅 전략이 중요함.
- 현재 한국업체가 진출하기 유망한 실버상품으로는 화장품(주름제거, 피부 보호용 의약품), 각종 사용이 쉽고 디자인이 추가된 기능성 제품의 가구, 가전기기 및 여가 및 취미생활용 제품으로 분석됨.

마. 독일의 실버 화장품

- (1)티나니아를 이용한 발관리 화장품.
- (2)비오팀 실버 로션

(3)비오틴 실버 크림

(4)유기농 실버 화장품

http://www.globalwindow.org/wps/portal/gw2/kcxml/04_Sj9SPykssy0xPLMnMz0vM0Y_QjzKLd423CDQASYGZAR76kehiXiYIsSB9b31fj_zcVP0A_YLc0ThyR0dFAHPA0Kw!/delta/base64xml/L3dJdyEvd0ZNQUFzQUMvNEIVRS82X0VfOEw1?1=1&workdist=read&id=2006579

5. 프랑스 랑콤, 실버화장품 개발 (2007/11/18)

- 플래티넘 하이드록시(a)-칼슘™ 라인

랑콤이 개발한 55세 이상의 실버세대를 위한 화장품이 국내에 곧 출시될 것으로 보여 주목된다.

국내 출시 예정인 랑콤의 ‘플래티넘 하이드록시(a) - 칼슘™’은 현재 캘리포니아 주립대에서 피부학 교수로 재직 중인 피부 노화의 세계적인 권위자 피터 M. 엘리아스 교수(Peter M. Elias)와 랑콤연구소가 공동 연구 끝에 개발한 ‘칼슘 하이드록시 아페타이트’ 복합체를 세계 최초로 스킨케어 제품에 적용시킨 혁신 제품으로 출시 전부터 뜨거운 관심을 모으고 있다.

랑콤에 따르면 플래티넘 하이드록시(a)-칼슘™은 피부의 칼슘량을 증가시키는 칼슘 하이드록시 아페타이트가 함유되어 있으며 세포 간의 물질 교환을 촉진시키는 인삼 추출물과 진피 구성 요소의 생성을 활발히 하는 효모 추출물이 함유되어 있어 얼굴과 목 등에 밀도 있고 견고한 리프팅 효과를 체험할 수 있으며 생기 있게 빛나는 피부톤을 만들어 주며, 즉각적인 영양 공급과 마치 우유처럼 발리는 부드러운 사용감으로 민감한 피부도 사용이 가능하며 빛나는 수정의 이미지를 통한 패키징으로 한층 고급스러운 느낌을 받을 수 있다. 또한 랑콤연구소가 ‘헤마트론 (Hematron)’이라는 미세 순환 측정 기구를 통해 피부의 미세 순환에 효과적이라고 밝혀낸 ‘오 드 보너르 (Eau du Bonhearu)’향이 적용되어 사용하는 동안 여성들이 웰빙을 만끽할 수 있게 하고, 기분을 전환시키는 것은 물론, 바른 뒤 오랫동안 안정감을 유지할 수 있도록 했다.

랑콤 측은 “실버 세대에 접어들게 되면 뼈와 마찬가지로 피부 또한 칼슘 결핍이라는 새로운 적과 대면하게 된다”면서 “플래티넘 하이드록시(a)-칼슘™은 이러한 실버 세대 이상 여성들을 위한 최초의 솔루션”이라고 강조했다.

한편 제품은 리퀴드 텍스처의 스킨이 즉각적이고 지속적인 보습 효과를 제공하는 ‘컴플리트 리스트럭처링 로션’과 피부에 영양 및 수분을 집중적으로 공급해 주는 ‘에멀전’, 피부 조직을 강화해주는 ‘에센스’, 자외선 차단 효과가 우수한 혁신적인 스킨케어 제품인 ‘크림 SPF15’, 눈과 입술 주위에 연약한 피부를 위해 개발된 트리트먼트로 입술 주위의 수직 주름을 포함한 다양한 주름을 완화시켜 주는 ‘아이 앤드 립 콘투어 크림’ 등 총 5종으로 구성되어 있다.

<http://blog.naver.com/midal105?Redirect=Log&logNo=50024633483>

제 7 장 참고문헌

- Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth.* 1984. 9: 7-9.
- Bowman JP, Berger RS, Mills OH, Kligman AM, Stoudemayer T. The 21-day human cumulative irritation test can be reduced to 14 days without loss of sensitivity. *J Cosmet Sci* 54:443-449, 2003
- Bae H.A., H.B. Baek, H.I. Park, M.G. Choung, E.H. Sohn, S.H. Kim, D.S. Kim, I.M. Chung, E.S. Seong, C.Y. Yu and J.D. Lim. 2011. Effect of Fermentation Time on the Chemical Composition of Mulberry (*Morus alba L.*) Leaf Teas. *Koran J. Medicinal crop Sci.*) 19(4) : 276-286.
- COLIPA Guideline. Cosmetic Product Test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility. 2nd Edition, 1997
- CTFA Safety Testing Guideline : The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc. Washington, D.C. 20023, 1981
- De Heredia JB, Torregrosa J, Dominguez JR, Peres JA. Kinetic model for phenolic compound oxidation by Fenton's reagent. *Chemosphere.* 2001. 45(1): 85-90.
- Draize JH. Dermal toxicity. Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics. The Assoc. of Food & Drug Officials of the United States. Texas State Dept of Health, Austin, Texas, pp. 46, 1959
- Frosch PJ, Kligman AM. The soap chamber test. A new method for assessing the irritancy of soaps. *J Am Acad Dermatol.* 1:35-41, 1979
- Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J cancer.* 2007. 121(10): 2225-2232.
- Goldberg DM, Hoffman B, Yang J, Soleas GJ. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. *J Agric Food Chem.* 1999. 47(10): 3978-3985.
- Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts XTT and MTS. *J Immunol Methods.* 1995. 179:95-99.
- Han DS, Jeon SW, Yang SJ, Choi BN, Suk SH, Hong GY, Song HJ. The Effect of Poncirin on Hexavalent Chromium in NIH3T3 Fibroblasts in Vitro. *The Korea J Herbology.* 2006. 21(1): 101-107.
- Hirota A, Taki S, Kawaii S, Yano M, Abe N. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean miso and antiproliferative activity of isoflavones from soybean miso toward the cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000. 64(5): 1038-1040.
- Im D.Y., and K.I. Lee. 2011. Antioxidative and Antibacterial Activity and Tyrosinase Inhibitory Activity of the Extract and Fraction from *Taraxacum coreanum* Nakai. *Medicinal Crop Sci.*) 19(4): 238-245.
- Yang T.H, Liu SH, Sun MH. Constituents of the fruits of *Cornus officinalis*. *Taiwan Yao Hsueh Tsa Chih.* 1973. 22:1-5.
- Jung HA, Jung MJ, Kim YJ, Chung HY, Choi JS. Inhibitory activity of flavonoids from *Prunus davidiana* and other flavonoids on total ROS and hydroxyl radical generation. *Arch Pharm Res.* 2003. 26(10): 809-815.

- Johansen JD. Fragrance contact allergy: a clinical review. *Am J Clin Dermatol.* 4:789-798, 2003
- Jo M.H., I.K. Ham, G.H. Lee, J.K. Lee, G.S. Lee, S.K. Park, T.I. Kim and E.M. Lee. 2011. Comparison of Active Ingredients between Field Grown and *In Vitro* Cultured Rhizome of Korean Native Ginger(*Zingiber officinale* Roscoe). *Koran J. plant Res.* 24(4) : 404-412.
- Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J Food Sci.* 1993. 58: 1470-1410.
- Kim HS, Lee YS, Oh SK, Lee KC, Lee GM, Lee J, Lee SB, Kim JH, Yu JK, Kang YS, Kim SS, Song HJ, Park ST : Effect of Ramulus et Uncus Uncariae on Glucose Oxidase-Induced Toxicity in Cultured Cerebral Neurons. *Korean J Oriental Physiol & Pathol* 16(5): 1016-1019, 2002.
- Kim SR, Kang SY, Lee KY, Kim SH, Markelonis GJ, Oh TH, Kim YC(2003) Anti-amnestic activity of E-p-methoxycinnamic acid from *Scrophularia buergeriana*. *Brain res Cogn Brain Res* 17(2): 454-461.
- Krizkova L, Nagy M, Polonyi J, Dobias J, Belicova A, Grancai D, Krajcovic J. Phenolic acids inhibit chloroplast mutagenesis in *Euglena gracilis*. *Mutat Res.* 2000. 469(1): 107-114.
- Kligman AM. Updating the maximization test for identifying contact allergens. *Contact Dermatitis*, 1:231-239, 197
- Kligman AM. The identification of contact allergens by human assay. 1. A critique of standard methods. *J Invest Dermatol*, 47:369-374, 1966
- Kligman AM. The identification of contact allergens by human assay. 2. Factors influencing the induction and measurement of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*, 47:375-392, 1966
- Kligman AM. The identification of contact allergens by human assay. 3. the maximization test : A procedure for screening and rating contact sensitizers. *J Invest Dermatol*, 47:393-408, 1966
- Kim J.S., H.J. Park and H.Y. Park. 2011. Antioxidative Activity and Flavonol Glycosides Analysis in Callus Derived from Leaf Tissue of *Ginko* Biloba L. *Koran J. plant Res.* 24(4) : 461~471.
- Kim Y.H., K.S. Kim, J.Y. Park and Y.T. Kim. 1990. Glycosidically Bound Volatile Components in Apricot. *Korean J. Food Sci. Technol* Vol. 22, No. 5, pp. 549~554.
- Lavid N, Schwartz A, Yarden O, Tel-Or E. The involment of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily(*Nymphaeaceae*). *Planta.* 2001. 212: 323-331.
- Leung HW, Lin CJ, Hour MJ, Yang WH, Wang MY, Lee HZ. Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol.* 2007. 45(10): 2005-2013.
- Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Hung YP, Liu TW, Liu JW. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome in vitro anticancer effects on human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol.* 2007. 113(1): 115-124.
- Lee S.E., J.H. Lee, J.K. Kim, G.S. Kim, Y.O. Kim, J.S. Soe, J.H. Choi, E.S. Lee, H.J. Noh and S.Y. Kim. 2011. Anti-inflammatory Activity of medicinal Plant Extracts. *Medicinal Crop Sci.* 19(4): 217-226.
- Lim J.H., Y.M. Park, J.S. Kim, H.J. Jeong and E.W. Seo. 2011. Effect of *Cnidium officinale* Extract on Recovery Capability of Allergic Contact-Dermatitis in Rat. *Koran J. plant Res.* 24(4) : 430-437.

- Lee S.H., H.J. Rim, D.J. Kim, K.S. Kim. 1992. A Studies on the Chemical Composition of Apricot Seed. Korean J. Food & Nutrition Vol. 5. No. 1,~5.
- Lee N.R., J.S. Han, J.S. Kim and J.E. Choi. 2011. Effects of Extraction Temperature and Time on Ginsenoside Content and Quality in Ginseng (*Panax ginseng*) Flower Water Extract. Koran J. Medicinal crop Sci.) 19(4) : 271-275
- Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU(1994) Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J Neurosci Res 37:62-70.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. J Immunol Methods 65: 55-63, 1983.
- Moon J.W., Zhi. Chen and W.S. Song. 2011. Antitussive Effect of *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia. Korean J. Plant. Res. 24(6) : 729~732.
- Moon J.W., Z.Chen. and W.S. Song and S.H Baek. 2011. Study on Antimicrobial Activity of Extracts from *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K.C. Hsia and *F. ussuriensis* Maxim. Korean J. Plant. Res. 24(6) : 719~723.
- Peterson A, Lewne M, Walum E. Acute toxicity of organic solvents, heavy metals, and DDT tested in cultures of mouse neuroblastoma cells. Toxicol Lett. 1981. 9: 101-108.
- Park J.H., J.A. Kwon, Y.J. Yoon, H.S. Han, M.W. Han, Y.I. Lee, I.S. Kim, J.I. Lee and S.C. Kang. 2011. Antioxidative Constituents from Fruit of *Sorbaria sorbifolia* var. *stellipila* MAX. Koran J. plant Res. 24(4) : 337-342.
- Park K.J., W.S. Song, Mohammad Nazrul Islam, J.I. Lee. and Y.S. Kim. 2011. Effect of Mechanochemical Pretreatment on the Extraction of Functional Materials from *Houttuynia cordata*. Korean J. Plant. Res. 24(3) : 309~313.
- Park Y.H., J.W. Park, T.S. Kim, S.A. Choi and S.J. Chun. 1984. Triglyceride Compositions of Peach Kernel and Apricot Kernel Oil. J. Korean Agricultural Chemical Society Vol. 27, No. 4, Dec.
- Rhim M.Y and M.Y. Choi. 2011. The Antioxidative Effects of *Rhododendron brachycarpum* Extracts. Koran J. plant Res. 24(4) : 456-460.
- Rhim T.J. and M.Y. Choi. 2011. The Antioxidative Effects of *Rhododendron brachycarpum* Extracts. Koran J. plant Res. 24(4) : 456~460.
- Lim J.H., Y.M. Park, J.S. Kim, H.J. Jeong and E.W. Seo. 2011. Effect of *Cnidium officinale* Extract on Recovery Capability of Allergic Contact-Dermatitis in Rat. Koran J. plant Res. 24(4) : 430~437.
- Song W.S., K.J. Park and E.S. Choung. 2011. Antioxidant Activity of *Saururus chinensis* Pretreated by Mechanochemical Technology. Korean J. Plant. Res. 24(3) : 314~318.
- Seo K, Lee SW, Yang KH. Antimicrobial and Antioxidative of *Corni fructus* extracts. Kor J Postharvest Sci Technol. 1999. 6(1):99-106.
- Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of Common Fruits. J Agric Food Chem. 2002. 4;50(25): 7449-7454.
- Seo Y.C., W.Y. Choi, J.S. Cho, H.W. Lim, C.S. Yoon, C.J. Ma and H.Y. Lee. 2011. Comparison on Cosmetic Activities of Acer Mono Bark and Sap. Medicinal Crop Sci.) 19(4): 264-270.
- Seo Y.C., J.S. Kim, W.Y. Choi, J.S. Cho, H.W. Lim, C.S. Yoon, C.J. Ma and H.Y. Lee. 2011. Comparison on Cosmetic Activities of Acer mono Bark and Sap. Koran J. Medicinal crop Sci.) 19(4) : 264-270.

- Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonoids. J Agric Food Chem. 2006. 54(26):9798-9804.
- Yoo S.J., S.H. Kim, M.S. Jun, H.T. Oh, H.J. Choi and S.S. Ham. 2007. Antioxdative, Antimutagenic and Cytotoxic Effects of Prunus ameniaca Extracts. Korean J. Food Preserv vol. 14, No. 2 pp. 220-225, April.
- 강주연, 김명미, 장은숙, 송원섭, 이숙영. 2011. 산수유 열매 추출물의 항산화 활성 및 피부 분비취의 억제능. 한국자원식물학회 국제 춘계학술발표회. p.50
- 강환구, 황선덕, 김형식, 정종식, 이병욱. 2007. 멜라닌 분해능을 지닌 미백용 기능성 화장품원료의 개발., 한국생물공학학회지 제22권 제1호, 7-15.
- 김영미, 장은숙, 박상혁, 김광상, 송원섭, 이숙영. 2011. 옥잠화 원추리, 은방울꽃, 박하의 항산화 활성 및 화장품 소재로서의 가치평가. 한국자원식물학회 국제 춘계학술발표회. p.49.
- 김은식, 진영욱, 윤재호, 주덕용, 송원섭. 2011. 천연화장품 신소재 개발을 위한 감귤류 (*Citrus*)의 생리 및 면역활성. 한국자원식물학회 국제 춘계학술발표회. p.76.
- 김은식, 진영욱, 윤재호, 주덕용, 송원섭. 2011. 키위의 메탄올과 에탄올 추출물의 항산화 활성과 tyrosinase 저해 활성. 한국자원식물학회 국제 춘계학술발표회. p.78.
- 김경란, 김영목, 이은우, 이대성, 이명숙. 2009. Feline calicivirus에서 항바이러스 활성을 가지는 천연식물자원 탐색. Journal of Life Science 19(7) : 928~933.
- 김영, 한재건, 한지혜, 정향숙, 김철희, 권민철, 이학주, 강하영, 최근표, 이현용. 2008. 곰의말채 부위별 추출물의 항암 및 면역증진 효과. Korean J. Medicinal Crop Sci.) 16(5) : 349-355.
- 허진철, 우상욱, 권미애, 김보배, 이숙희, 이진만, 최종욱, 정신교, 이상한. 2007. 포도 품종별 메탄올 추출물로부터 면역활성 분석. Korean J. Food Preserv. 14(4) : 419~424.
- 김현구, 권영주, 김영언, 남궁배. 2004. 마이크로웨이브 추출조건에 따른 참취 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 항산화 작용의 변화. Korean Journal of Food Preservation. 11(1) : 88~93.
- 김영구, 이현용, 오덕환. 2004. 포도종자의 처리별 추출조건 및 저장에 따른 항산화활성 및 총 폴리페놀함량의 변화. Korean Journal of Food Preservation. 11(4) : 455~460.
- 김일혁, 김정희, 김종원, 김창민, 유승도, 황완균(1998) 신약품식물학. 서울:학창사.
- 김재배, 소배근. 동양전통약물 원색도감. 영림사. 1995, p. 230.
- 권민철, 한재건, 하지혜, 오성호, 김영, 정향숙, 최근표, 황 백, 이현용, 2008. 병풀의 초음파 추출시 용매에 따른 면역활성 증진 효과. Korean J. Medicinal Crop Sci.) 16(5) : 294-300.
- 문정욱, 천즈, 송원섭. 2011. 중국 청장고원의 패모 항균활성과 약리작용. 한국자원식물학회 국제 춘계학술발표회 p.6.
- 민상기, 박은희, 박연결, 권순목, 김남호, 정영아, 진성현, 유평중. 2009. 자생식물 열수추출액의 항바이러스 효능검색. The annual Report of Busan Metropolitan City Institute of Health & Environment. 19(1) 9~19.
- 부희욱, 배춘식, 박수현, 황성진, 송원섭. 2011. 천연색소 함유 화장품 조성물의 열 및 광 요인에 따른 색차변이. 한국자원식물학회 국제 춘계학술발표회.p.44.
- 부희욱, 윤재호, 광수, 이순욱, 송원섭. 2010. 함초(*Salicornia herbacea*)추출물의 Tyrosinase 활성억제와 면역활성. 한국자원식물학회 춘계학술발표회. p.63.

- 박명오, 이명호, 이희재, 한두석(2002) NIH3T3 섬유모세포에 대한 니켈의 세포독성과 ferulic acid의 독성경감효과. 대한구강해부학회지 26(2) : 105-114.
- 박용기, 강병수. 현삼의 항산화작용에 관한 연구. 대한본초학회지. 1998. 13(1): 201-220.
- 변성희, 양재하, 김상찬. 2005. 현삼메탄을 추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 nitric oxide 생성에 미치는 영향. 대한본초학회지. 20(2) : 7-16.
- 실전마케팅 전략, 2006. SP마케팅연구소.
- 송원섭. 2010. 중국 재배종 석류 추출물의 항균활성과 항산화 작용. 전남실버복지연구센터와한·중 야생화연구소 공동심포지엄(실버세대의 건강과 생활) P.95.
- 송원섭. 2008. 천연화장품 개발을 위한 보이차 추출물의 항산화 활성. 자연자원연구소 연합회 자연·자원연구 8(1) : 16~19.
- 윤재호, 박문수, 부희옥, 송원섭. 2011. 갈대(*Phragmites communis*)의 추출용매별 생리활성 효과. 한국자원식물학회 국제 춘계학술발표회. p.75.
- 윤재호, 부희옥, 정의수, 최경민, 송원섭. 2011. 한국, 미국 이란, 석류피 생리활성 및 면역활성. 한국자원식물학회 국제 춘계학술발표회. p.77.
- 윤재호, 박문수, 부희옥, 광수, 송원섭. 2010. 갈대(*Phragmites communis*) 부위별 폴리페놀 플라보노이드 성분과 Tyrosinase 활성 억제 효과. 한국자원식물학회 추계학술발표회. p.61.
- 윤재호, 천즈, 부희옥, 이순옥, 광수, 송원섭. 2010. 산골나무(*Citrus sunki sakurai*)추출물의 Tyrosinase 효소 활성과 Melanin생성 억제. 한국자원식물학회 추계학술발표회. p.62.
- 윤재호, 이순옥, 김두식, 이숙영, 부희옥, 송원섭. 2010. 구례군 자생식물 배초향(*Agastache rugosa*)추출물의 항산화 활성과 항고혈압 효과. 한국자원식물학회 춘계학술발표회 p.139.
- 윤재호, 문현정, 이순옥, 김두식, 이숙영, 송원섭. 2010. 구례군 자생식물 배초향(*Agastache rugosa*)추출물의 Melanin 생성억제와 미백효과. 한국자원식물학회 춘계학술발표회 p.140.
- 윤재호, 김두식, 이순옥, 문현정, 이숙영, 송원섭. 2010. 구례군 자생식물 산수유(*Cornus officinalis*)추출물의 Melanin 생성억제와 미백효과. 한국자원식물학회 춘계학술발표회 p.142.
- 양홍석. 시험관내에서 Ferulic Acid와 Vitamin E의 세포독성 평가. 대한구강해부학회지.2003. 27(1): 1-10.
- 이진태, 정수현, 조우아, 강보연, 최은영, 정연숙, 손애랑. 2005. 백출과 삼백초를 이용한 기능성 한방화장품 소재에 관한 연구. The Journal of Applied Oriental Medicine. 5(1):7-14.
- 이주연, 2007. 실버화장품 시장 현황과 마케팅 동향. Journal of the Korean Society of Fashion & Beauty. 5(2) pp.23~30
- 임요섭, 한성수. 1997. 살충제 Carbofuran이 쥐의 조직에 미치는 형태적 변화와 Phenobarbital Sodium 및 3-Methylcholanthrene에 의한 억제효과. 한국환경농학회지. 16(1) : 61-66.
- 임요섭, 송원섭, 서영미, 박승택, 김신무. 2010. 몇 가지 식물추출물이 배양 NIH3T3 섬유모세포의 세포생존율과 세포부 착률에 미치는 세포독성에 관한 연구. 대한임상검사학회지. 42(3) : 116-124
- 지선옥. 2009. 상백피 추출물의 항산화 활성 및 미백효과. Korean J. Plant Res. 22(2) : 145~151.
- 지원대, 정민선, 정현채, 최용규, 권대준, 김성영, 정영건. 2001. 오미자 물추출물의 세균증식 억제효과. J.Fd Hyg. Safety 16(2),89-95.
- 장은숙, 강주연, 전지훈, 박열, 김두식, 송원섭, 이숙영. 2010. 구례특산식물 추출물이 B16F10 Melanoma Cell의 멜라닌 생성억제에 미치는 영향. 한국약용작물학회 심포지엄 및 춘계학술

발표회 p.329.

- 장은숙, 권수정, 김종세, 양영기, 김두식, 송원섭, 이숙영. 2010. 구례군 특산식물 추출물의 *in vitro* tyrosinase 저해효과. 한국약용작물학회 심포지엄 및 춘계학술 발표회 p.331.
- 하명희, 박우포, 이승철, 허호진, 조성환. 2007. 매실박 메탄올 추출물의 항균 특성. Korean Journal of Food Preservation. 14(2) : 183~187
- 허정애, 이정민. 2009. 실버 전용 화장품 신태 분석에 관한 소고. 한국메이크업디자인학회지. 5(1) : pp.1-9.
- 황은주, 이숙영, 권수정, 박민희, 부희옥. 2006. 발아 메밀 추출물의 항산화·항균활성 및 세포독성. Korean J. Medicinal Crop Sci.) 14(1) : 1-7.
- 황혜정, 한완수, 윤광로. 2001. 사과외 총 페놀함량 정량분석. Analytical Science & Technology. 14(5) : 377-383.

대한화장품 공업협회, <http://kcia.or.kr/>

<http://www.amorepacific.co.kr>

http://blog.naver.com/sac_art/60134975156

<http://sanyuwha2.blog.me/17375787>

<http://tmoz.me/bbs/115412>

http://www.globalwindow.org/wps/portal/gw2/kcxml/04_Sj9SPykssy0xPLMnMz0vM0Y_QjzKLd423CDQASYGZAR76kehiXiYIsSB9b31fj_zcVP0A_YLc0IhyR0dFAHPA0Kw!/delta/base64xml/L3dJdyEvd0ZNQUFzQUMvNElVRS82X0VfOEw1?1=1&workdist=read&id=2006579

<http://blog.naver.com/midal105?Redirect=Log&logNo=50024633483>

[http:// cabingirl.blog.me/120128712176](http://cabingirl.blog.me/120128712176)