ORIGINAL ARTICLE

Beauty Food Activities of Isolated Phenolic Compounds from *Ulmus pumila*

Kyung-Bum Kim · Bun-Sung Jo · Ju-Yeong Lee · Ki-Tae Park ·
Bong-Jeun An · Sun-Ho Lee · Young-Je Cho*

유근피(*Ulmus pumila*)로부터 분리한 페놀성물질의 미용식품활성

김경범 · 조분성 · 이주영 · 박기태 · 안봉준 · 이선호 · 조영제*

Received: 29 July 2012 / Accepted: 2 November 2012 / Published Online: 31 December 2012

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2012

Abstract Phenolic compounds of 17.9 ± 1.0 mg/g were extracted from *Ulmus pumila* with 70% ethanol. The elastase inhibitory activity related with forming wrinkle was shown an excellent wrinkle improvement effect in 70% ethanol extracts as 55.5–69.5% at phenolic concentration of 50–200 $\mu\text{g/mL}$. The tyrosinase inhibitory activity related with skin-whitening was 24% in 70% ethanol extracts at phenolic concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$. The astringent activity of 70% ethanol extracts was shown activity of 71% at phenolic concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$ therefore it is judged that there is a high effect on pores reduction of the skin. The

hyaluronidase inhibitory activity of *U. pumila* extracts was confirmed anti-inflammation effect of 80% at phenolic concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$. Antimicrobial activity of *U. pumila* water extracts was shown each 8.7, 10.0, 11.1 and 11.8 mm clear zones on *Propionibacterium acnes* at phenolic concentration of 50–200 $\mu\text{g/mL}$. The stability of the multi-functional cosmetic (lotion) added *U. pumila* extracts was very stable for 28 days without changing of pH and viscosity also it's stable on temperature and sun lights. As the concentration of extracts was increased, the color of lotion was getting dark, but the sensory evaluation was high at score of 8.5.

K.-B. Kim · B.-S. Jo
School of Food Science, Kyungpook National University, Sangju 742-711,
Republic of Korea

J.-Y. Lee
School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu
702-701, Republic of Korea

K.-T. Park
School of Culinary Art & Baking technology, Dongju College University,
Busan 604-715, Republic of Korea

B.-J. An
Department of Cosmeceutical Science, Daegu Hanny University,
Gyeongsan 712-715, Republic of Korea

S.-H. Lee
The Institute of Marine Biotechnology, Andong National University,
Andong 760-749, Republic of Korea

Y.-J. Cho
School of Food Science & Biotechnology/Food & Bio-Industry Research
Institute, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of
Korea

*Corresponding author (Y.-J. Cho: yjcho@knu.ac.kr)

Keywords anti-microbial activity · astringent effect ·
beauty food activity · phenolic compounds · tyrosinase · elastase ·
Ulmus pumila

서론

현대는 풍요로운 경제적, 문화적 혜택과 더불어 성인성 질환과 고령화 사회에 따른 삶의 질에 대한 인식이 동반 성장되고 있다(Jung과 Kim, 2003; Kim 등, 2004; 2011).

생체 내에서 대사과정 중에 발생하는 여러 가지 유해 산물에 의한 생체방어 균형이 깨지면서 발생하는 질환(Aruoma, 1998)들에 대한 예방 및 치료의 목적으로 식물류에 들어 있는 천연 생리활성 소재들을 이용하려는 시도가 이루어지고 있다(Azuma 등, 1999; Park, 2003). 또한 웰빙문화가 전개됨에 따라 유기농 식품의 식품시장의 점유율이 높아지고 있는 것과 같은 맥락에서 사람의 외관을 돋보이게 하여주는 화장품에도 웰빙 문화가 강하게 확산되어 천연화장품과 한방화장품에 대한 수요도 급격

하게 증가하고 있다. 이에 따라 최근 삶의 질 향상을 위한 건강식품의 섭취와 더불어 기능성화장품의 수요가 증가하여 천연, 한방 화장품의 개발이 주목받고 있는 실정이다. 특히 한방 약용작물의 약리적 기능이 과학적으로 입증되면서 이를 이용한 한방화장품의 개발이 활발히 이루어지고 있다(Cho, 2011; Cho 등, 2011).

느릅나무과(Ulmaceae)에 속하는 유근피(榆根皮, *U. pumila* L.)는 낙엽교목으로 잎은 타원형이며 밑은 뾰족하며 톱니가 있고 대황록색의 작은 꽃이 4–5월에 피는데, 전국 각지에 야생하며 일본, 중국에 분포하는 것으로, 껍질을 건조한 것을 유백피라고 한다(Yuk, 1990). 한방에서 유근피는 무독하며, 종창, 관절염, 상처치료약 및 염증에도 탁월한 효과가 있다고 보고되어 있으며(Duke, 1985), 느릅나무 과실은 항 진균작용이 있다고 보고되어 있다(Kim, 1997). 또한 유근피에는 다양한 생리활성 물질이 함유되어 있는데, flavonoid인 (+)-catechin과 그 배당체인 (+)-catechin-5-O-β-D-apiofuranoside가 분리되었다(Son 등, 1989). 유근피에는 암의 발생에 관여하는 matrix metalloproteinase-9을 억제하는 물질이 존재하고 있는 것으로 알려져 있으며(Han 등, 2003), Lee와 Kim (2001)은 유근피속에 신경독성의 작용을 방하는 생리활성 물질인 ulmicin을 연구 보고하였다.

본 연구에서는 한국산 약용식물인 유근피로부터 페놀성 물질을 분리하여 미용식품에 적용하기 위한 기초자료를 얻고자 미백효과, 주름개선효과, 수렴효과, 항염증효과 및 여드름균을 포함한 피부상재균 억제효과 등의 약리적 미용식품 활성을 탐색하여 산업화에 적용하고자 하였다.

재료 및 방법

재료. 본 실험에 사용한 유근피는 시중 한약상에서 구입하여 40 mesh로 분쇄하여 4°C에서 저온저장하며 시료로 사용하였다.

추출물의 제조. 시료 추출은 물(열수)추출물의 경우 건조 유근피 1 g에 증류수 200 mL를 가하고 액이 100 mL가 될 때 까지 가열 증발시킨 후 냉각하고, 상온에서 24시간 교반 추출하였으며, ethanol 추출물은 시료에 100 mL의 각 농도별 ethanol을 가하여 24시간 동안 상온에서 교반 추출하였다. 추출액은 Whatman No. 1 filter paper로 여과한 후 필요에 따라 rotary vacuum evaporator (Eyela NE, Japan)에서 농축하여 시료로 사용하였다.

Phenol성 화합물 정량. 총 페놀 화합물은 Folin-Denis 방법(Folin과 Denis, 1912)으로 측정하였으며, 시료 1 mL에 95% ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 1 N Folin-ciocalteu reagent 0.5 mL를 넣어 잘 섞어주고, 5분간 방치한 후, 5% Na₂CO₃ 1 mL를 가한 후, 흡광도 725 nm에서 1시간 이내에 측정하여 gallic acid를 이용한 표준곡선으로부터 양을 환산하였다.

주름개선(Elastase 저해) 효과 측정. Elastase 저해활성 측정은 Lee 등(1999)의 방법에 따라 측정하였다. 기질로서 *N*-succinyl-(L-Ala)₃-*p*-nitroanilide를 사용하여 37°C에서 20분간 기질로부터 생성되는 *p*-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.5 mL씩 시험관에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (2.5 U/mL)용액 0.5 mL를 가한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 *N*-succinyl-(L-Ala)₃-*p*-nitroanilide (0.5 mg/mL)를 첨가하여 20분간 반응시켜 측정하였

다. Elastase 저해율(%)은 1-(시료첨가군의 흡광도/대조구의 흡광도)×100으로 나타내었다.

티백(Tyrosinase 억제) 효과 측정. Tyrosinase 저해활성 측정은 Imokawa와 Mishima의 방법(1980; 1981)에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA-chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해율(%)은 1-(반응구의 흡광도/대조구의 흡광도)×100으로 나타내었다.

수렴효과(Astringent effect) 측정. Astringent 활성측정은 Lee 등(2002)의 방법에 따라 측정하였다. 피부 단백질과 유사한 혈액 단백질(hemoglobin)을 사용하여, 원심분리관 용기에 각각의 시료용액과 헤모글로빈 용액을 1:1로 넣어서 진탕 혼합한 다음 1,500 rpm에서 3분간 원심분리 후 576 nm에서 흡광도를 측정하였다. Astringent 활성은 1-(시료첨가군의 흡광도/대조구의 흡광도)×100으로 나타내었다.

항염증(Hyaluronidase [HAase] 억제) 효과 측정. HAase 저해활성 측정은 sodium-hyaluronic acid (HA)로부터 형성된 *N*-acetylglucosamine을 glucosazoline 유도체로 변형시킨 후 *p*-dimethylamino benzaldehyde (DMAB)로 발색시켜 흡광도를 측정하여 효소 활성을 측정하였다(Choi 등, 2003). Hyaluronidase 저해율(%)은 1-(시료첨가군의 흡광도/대조구의 흡광도)×100으로 나타내었다.

피부상재균에 대한 항균 활성 측정. 실험에 사용한 균주는 피부상재균으로써 세균각막염, 안검결막염 등의 원인균인 *Staphylococcus epidermidis*는 표준균주인 KCTC 1917, 공기, 토양 등의 자연계에 광범위하게 분포하고 있어 식품에 쉽게 오염되기 때문에 식중독의 원인균인 *Staphylococcus aureus*는 표준균주인 KCTC 1039 및 병원성 대장균인 *Escherichia coli*는 표준균주인 KCTC 1039를 여드름의 원인균으로 알려진 *Propionibacterium acnes*는 표준균주인 KCTC 3320균주를 사용하였다. *P. acnes*배양은 미호기성 조건을 유지시켜주기 위해서 10% CO₂ incubator를 이용하였고, incubator의 습도는 항상 95% 이상으로 유지하였으며, agar plate상에서 배양은 37°C로 48–72시간 동안 실시하였고(Gavidson과 Parish; 1989) *S. epidermidis*, *S. aureus* 및 *E. coli* 배양에는 nutrient medium을 사용하였으며, agar plate상으로 37°C의 BOD incubator에서 24–48시간 동안 실시하였다. Disc method에 의한 항균활성 검색은 최적배지 agar plate에 준비한 균 배양액 100 μL를 분주하여 멸균 유리봉으로 도말한 다음, 멸균된 지름 8 mm 크기의 disc paper를 올려놓고 0.45 μm membrane filter로 제균한 유근피 추출물 100 μL에 phenolic 함량이 50 μg/100 μL, 100 μg/100 μL, 150 μg/100 μL, 200 μg/100 μL가 되도록 분주하였다. 대조구로는 멸균수 100 μL를 흡수시켜 24시간 동안 배양하여, disc 주위의 clear zone 생성 유무(Stevenson et al., 2000)와 직경을 측정함으로써 항균활성을 계산하였다.

유근피 추출물을 첨가한 복합기능성 화장품(로션)의 제조. 유근피 추출물을 첨가한 화장품(로션)은 B, C상인 수상과 유사인 A 상으로 나누어 80°C까지 가열하여 용해시켰다. 미리 분산한 B 상과 C 상을 A 상에 넣고 교반한 후, D 상을 투입하고 mixer를 이용하여 3,000 rpm에서 폴리머가 균일하게 분산될 때 까지 완전히 유화시켜 주었다. 이 유화액을 45°C까지 냉각한 후 E, F, G 상을 투입, mixer를 이용하여 교반한 후 35°C에서 종료하고,

Table 1 Recipe of lotion with *U. pumila* extracts

Phase	Ingredient	Content (%)
A	Stearic Acid	0.50
	Cetanol	1.50
	Glyceryl Stearate & PEG-100 Stearate	0.30
	Sorbitan Ester & Sucrose Ester	2.00
	Polyoxyethylene Sorbitan Monostearate	0.35
	Sorbitan Monostearate	0.25
	Glycerin	7.00
	Glyceryl Trioctanoate	1.50
	Liquid Petrolatum	3.00
	Methyl Polysiloxane	0.30
	DL α -Tocopheryl Acetate	0.10
	Butyl Paraben	0.05
	Propyl Paraben	0.10
B	Purified Water	54.51
	Dipotassium Glycyrhizate	0.05
	Disodium Ethylenediaminetetraacetate	0.02
	Methyl Paraben	0.20
	Imidazolidinyl Urea	0.15
C	Purified Water	10.00
	Carbomer 941 (2% solution)	6.00
	Carbomer 940 (2% solution)	1.50
D	Triethanolamine	0.20
E	Fragrance	0.12
F	Purified Water	10.00
	<i>U. pumila</i> extracts	0.50

냉각시킨 후 탈포하는 방법으로 제조하였으며, 그 처방은 Table 1과 같다.

저장기간 중 복합 기능성화장품의 pH 및 점도 안정성 측정. pH 측정은 pH meter (Sartorius PB-20, Thermo Scientific, Japan)를 이용하여 상온(25±1°C)에서 28일간 보관한 화장품의 pH를 측정하였다(Kim 등, 2000). 점도 측정은 Brookfield viscometer (Brookfield LVDV-II+, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., USA)를 이용하여 25°C에서 No. 4 spindle로 6 rpm에서 1분간 점도를 측정하였으며, 기포의 영향을 줄이기 위해 제조 시 탈포 처리를 하였고, 3회 반복하여 평균값을 얻었으며, 1회 측정 후 3시간 뒤에 다시 측정하여 28일 동안 측정한 값을 나타내었다.

온도 및 인공광에 따른 기능성화장품의 색상 및 색상 안정성 측정. 유근피 추출물을 첨가한 제품의 온도(incubation)에 따른 안정성 시험법은 Table 2와 같이 소정의 온도 조건(25, 45°C)에 보관하여, 경시적 변화에 따른 상태변화를 육안으로 평가하였다. 또한 인공광은 온도 40°C, 광원까지의 거리 20.3 cm에서 6 시간동안 인공광을 비추고 변색, 변취, 증발, 부유, 침전, 상의 분리 등을 관찰하였다(Kim 등, 2000).

자연광 및 온도순환(cycle chamber)에 따른 로션의 색상 및 색상 안정성 측정. 자연광에 의한 화장품 제형의 분리도는 15일간 햇빛에 노출시킨 화장품을 원심분리기(Himac CR-21E, Hitachi, Japan)를 이용하여 2,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 화장품 제형의 안정성 유무를 육안으로 확인하였다. 온도순환에 따른 화장품의 안정성 시험은 유근피 추출물을 첨가한 제품을 투명 용기에 담아 -4, 25, 45°C에서 각각 24시간 보관한

Table 2 Check points in stability test of the cosmetics containing *U. pumila* extracts in constant temperature conditions (25, 45°C)

Temperature (°C)	Time (Day)	Check points
25	1	Separation
	3	
	7	
	14	Discoloration
	28	Creaming deterioration
45	28	Viscosity
	56	pH etc.

Table 3 The expression method of patch test

Reaction	Expression
Negative	-
Imperfection erythema	±
Erythema	+
Small blister, Papule, Edema	++
Big blister, Necrosis	+++

Table 4 The content of total polyphenol in *U. pumila* extracts

Sample	Phenolic content (mg/g)	
	Water extracts	70% ethanol extracts
<i>U. pumila</i> L.	16.2±1.1	17.9±1.0

The data were expressed as the mean ± SD (n=3).

후 이를 1 cycle로 하여 10 cycle까지 반복 시행하여 온도 순환에 따른 색상 및 색상을 육안으로 변색, 변취, 증발, 부유, 침전, 상의 분리 등을 확인하였다(Kim 등, 2004).

첨포 시험. 화장품의 안전성 실험인 patch test는 상온에서 1개월 보관한 화장품을 팔 안쪽 부위의 피부에 Finn chamber on Scanpor 테이프를 사용하여 24시간 동안 밀폐 접촉한 후 피부의 반응을 육안으로 확인하였으며, 판정기준은 국제 접촉피부염 연구회의 판정인 Table 3을 기준으로 판정하였다(Abberer, 1993; Matsumura 등, 1995).

결과 및 고찰

Phenol성 물질의 추출. 식물체에 널리 분포되어 있는 phenolic compounds는 식물의 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조를 가지며, 분자구조 내에 phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 거대 분자들과 결합하는 성질이 있어 다양한 생리기능을 가진다고 보고되어 있다(Andarwulan과 Shetty, 1999; Choi 등, 2003). 따라서 유근피로부터 phenolic compounds를 추출하기 위하여 물과 인체에 무해한 용매인 ethanol을 추출용매로 선별하여 pheno성 물질의 용출이 가장 높다고 보고한 Cho (2011)의 보고에 따라 70% ethanol을 추출용매로 사용하여 phenolic compounds의 용출량을 알아보았다. 그 결과 Table 4에서와 같이 추출한 유근피의 물과 에탄올 추출물의 total phenolic compound의 양은 각각 16.2±1.1, 17.9±1.0 mg/g이었다.

주름개선(Elastase 저해) 효과. Elastase는 진피 내 피부탄력을 유지하는데 중요한 기질 단백질인 엘라스틴을 분해하는 효소이며, 다른 중요한 기질 단백질인 콜라겐을 분해할 수 있는 비 특이적 가수분해 효소이다(Lee 등, 1999). 따라서 elastase 저해제

Fig. 1 The effect inhibition on elastase of ethanol extracts from *Ulmu pumila*. The data were expressed as the mean $\pm$ SD (n=3). A: Concentration of ethanol, B: Concentration of phenolics.

는 피부 주름을 개선하는 작용을 나타내며 ursolic acid, vitamin C 등이 elastase 저해제로 이용되고 있다(Roth 등, 1980). 또한 elastase는 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 조직 파괴에 직접적인 원인이 되어 피부 주름 및 탄력성 손실을 유발한다(Dewitt 등, 1981). 이러한 주름 생성과 관련된 elastase 저해 활성을 측정된 결과 Fig. 1에서와 같이 물추출물 보다는 ethanol 추출물의 주름개선효과가 우수하였으며, 70% ethanol 추출물에서 $53.5 \pm 0.9\%$ 의 elastase 저해효과가 확인되었다. 이러한 결과는 생리활성이 추출물에 존재하는 phenolic compound의 함량과 밀접한 관계가 있으며, ethanol 농도별로 추출하였을 때 phenolic compound의 용출이 70%에서 가장 높으며 phenolic compound의 함량에 따라 생리활성의 분포가 결정된다고 보고한 Cho (2011)의 연구 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 또한 70% ethanol 추출물의 phenolic compound를 50–200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 positive control로 사용한 vitamin C의 0.71–12.1%에 비하여 유근피 추출물의 elastase 억제효과가 더 우수하였으며, 50–200 $\mu\text{g/mL}$ 의 phenolics 농도에서 55.5–69.5% 정도의 주름개선효과를 확인할 수 있었다. Kim 등(2004)은 한약재 복합 추출물 1 mg/mL 농도에서 64% 이상의 elastase 저해 활성을 나타내었다고 보고하였으며, 5 mg/mL 농도에서는 71% 이상의 elastase 활성저해를 나타내어 농도 의존적으로 저해활성이 나타나며, 함초 추출물 농도가 20–100 $\mu\text{g/mL}$ 로 증가하면 elastase 저해활성도 2.9–32.5%로 농도 의존적으로 증가한다고 보고하였다. Vitamin C와 유근피 추출물의 elastase 저해활성을 비교 하였을 때 상대적으로 본 시료가 매우 높은 저해 활성을 나타내어 유근피 추출물이 식물성 유사 호르몬과 같이 elastase 저해활성이 있음을 알 수 있었다.

Fig. 2 Inhibition rate of the *U. pumila* extracts on tyrosinase. The data were expressed as the mean $\pm$ SD (n=3).

미백(Tyrosinase 저해) 효과. Tyrosinase는 구리를 함유한 효소로서 melanin 합성의 초기단계인 L-tyrosine에서 L-3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA), DOPA에서 L-dopaquinone으로 전환되어 최종적으로 멜라닌이 형성되어 피부흑화의 원인이 된다(Imokawa와 Mishima, 1980). Tyrosinase는 melanin 생합성 과정에서 중요한 역할을 하므로 tyrosinase 억제제를 피부의 melanin 색소 생성을 조절할 수 있는 물질로 사용할 수 있다(Laskin과 Piccini, 1986). 따라서 유근피 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 Fig. 2에서와 같이 70% ethanol 추출물의 phenolic compound를 50–200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 positive control로 사용한 kojic acid의 11.9–55.2%에 비하여 상대적으로 유근피 추출물의 미백효과가 낮게 측정되었으며, 50–200 $\mu\text{g/mL}$ 의 phenolics 농도의 70% ethanol 추출물에서 9.4–23.9% 정도의 미백효과를 확인할 수 있었다. Kim 등(2011)은 한약재 복합 추출물을 1 mg/mL의 농도로 처리했을 때 34%, 5 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 65% 이상의 tyrosinase 저해 활성이 나타난다고 보고한 결과와 vitamin C의 저해 효과와 비교하였을 때 본 시료의 저해활성은 약하였으나 유근피 추출물의 처리 농도를 더 높인다면 농도 의존적으로 저해활성이 나타날 것으로 판단되어졌다. 또한 유근피 추출물은 기존 미백제와 같이 mushroom tyrosinase에 직접적인 저해활성이 있는 것으로 판단되었다.

수렴 효과(Astringent effect). 수렴작용의 원리는 피부 단백질이 고분자 flavonoids와 결합하여 가교결합을 형성하여 피부가 수축되는 현상을 말한다(Tsuji 등, 2001). 수렴이란 뜻에는 기본적으로 주름이 지고 혹은 움추린다는 의미가 있으며, 수렴제는 단백질과 결합하는 성질을 가지기 때문에 일반적으로 헤모글로빈의 단백질이 추출물과 결합하는 정도에 따라서 수렴효과 정도를 판단할 수 있다(Roth 등, 1980). 이러한 수렴작용에는 외용 작용에 의해서 피부와 점막의 표면에 난용성의 피막을 형성하고, 조직을 조밀하게 하여 세포막의 투과성을 감소시키는 효과가 있다고 할 수 있다(DeWitt 등, 1981). 추출용매 농도별 유근피 추출물의 astringent 활성을 측정된 결과 Fig. 3에서와 같이 추출물에 용출된 phenolic compound의 함량에 따라 생리활성의 분포가 결정된다고 보고한 Cho (2011)의 연구 결과와 같이 70% ethanol을 용매로 사용하였을 때 $32.9 \pm 2.9\%$ 정도의 최대 효과를 나타내어 70% ethanol 추출물에서 phenolic compound의 농도가 가장 높을 것이라 판단되었으며, 물 추출

Fig. 3 The effect inhibition on astringent effect of ethanol extracts from *U. pumila*. The data were expressed as the mean $\pm$ SD (n=3). A: Concentration of ethanol, B: Concentration of phenolics.

물에 비하여 ethanol 추출물의 astringent 효과가 탁월하게 우수한 것을 확인하였다. 또한 70% ethanol 추출물의 phenolic compound를 50–200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리 하였을 때 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도인 경우 positive control로 사용한 tannic acid의 21.5 $\pm$ 0.5%에 비하여 유근피 추출물의 astringent 효과가 37.7 $\pm$ 0.9%로 더 우수하였으며, 100–150 $\mu\text{g/mL}$ 의 phenolics 농도에서는 대조구와 비슷한 효과를 나타내었으며, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 phenolics 농도에서도 tannic acid의 62.4 $\pm$ 5.5%에 비하여 69.4 $\pm$ 1.5%로 유근피 에탄올 추출물의 astringent 효과가 더 우수하였다. 따라서 유근피 추출물의 경우 저농도에서 고농도까지 positive control인 tannic acid 보다 더 우수한 결과를 나타내어 모공축소 및 피부 보호작용이 우수한 화장품에 적용이 가능할 것으로 판단되었다. 이는 Lee 등(2002)이 함초 추출물 10,000 ppm에서 50%의 astringent 효과를 나타냈다고 보고하였으며, 도화 에탄올 및 아세톤 추출물의 경우 5,000 ppm에서 30%의 활성을 나타낸다고 보고한 결과보다 높아 유근피 추출물의 astringent 효과가 더 우수함을 확인할 수 있었다.

항염증(Hyaluronidase 저해) 효과. 염증은 외부자극에 대한 생체조직의 방어반응으로, 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응이다. 면역세포가 생체에 침투한 미생물 및 생체이물질 등을 인식하면 면역세포가 활성화되어, 면역세포에서 염증반응의 원인이 되는 많은 인자를 분비함으로서 염증반응을 유발시킨다. 고분자 다당인 hyaluronic acid (HA)는 진피층의

Fig. 4 The effect inhibition on hyaluronidase inhibition of ethanol extracts from *U. pumila*. The data were expressed as the mean $\pm$ SD (n=3). A: Concentration of ethanol, B: Concentration of phenolics.

선유아세포로부터 산출되어, 표피 및 진피에 있어서 주요한 세포의 매트릭스로서 glucuronic acid와 glucosamine이 반복해서 연결된 점액성 mucopolysaccharide이다. 또한 HA는 염증 형성의 중요 요소인 macrophage의 phagocytic ability를 저해하는 한편, HA 분해 산물 혹은 저분자 HA는 상처 치유 과정에서 inflammation, fibrosis collagen deposition을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이는 결국 고분자 HA의 분해효소인 HAase의 저해에 의해 HA의 고분자 형태를 유지하게 함으로서 항염증 효과를 기대할 수 있다(Ghosh, 1994). 따라서 염증억제 효과를 확인하기 위하여 유근피 추출물의 hyaluronidase 저해활성을 측정한 결과 Fig. 4에서와 같이 물추출물과 ethanol 추출물에서 70% 이상의 높은 저해 양상을 나타내었으며, 가장 억제력이 우수한 70% ethanol 추출물의 phenolic compound를 50–200 $\mu\text{g/mL}$ 의 phenolics 농도로 처리하였을 때 positive control로 사용한 vitamin C에 비하여 상대적으로 유근피 추출물의 hyaluronidase 억제효과가 대단히 높게 측정되었으며, 50 $\mu\text{g/mL}$ phenolics의 매우 낮은 농도에서도 80%의 항염증효과를 나타내어, 유근피 추출물을 항염증 효과나 아토피 억제효과를 활용하는 제품에 적용할 수 있을 것이라 판단하였다.

항균 활성. 지구상에 존재하는 천연물에는 많은 종류의 항균활성을 가진 생리활성 물질이 존재하는데, 이는 매우 적은 양으로도 고부가가치를 얻을 수 있는 물질로서 오래전부터 이에 대

Table 5 Antimicrobial activity of *U. pumila* water and ethanol extracts

<i>Ulmus pumila</i> extracts	Clear zone (mm)									
	Phenolic contents (μg/100 μL)									
	Water extracts					70% Ethanol extracts				
	0 ¹⁾	50 ²⁾	100 ³⁾	150 ⁴⁾	200 ⁵⁾	0 ¹⁾	50 ²⁾	100 ³⁾	150 ⁴⁾	200 ⁵⁾
<i>P. acnes</i>	-	8.7	10.0	11.1	11.8	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾0 μg/100 μL of phenolics content, ²⁾50 μg/100 μL of phenolics content, ³⁾100 μg/100 μL of phenolics content, ⁴⁾150 μg/100 μL of phenolics content, ⁵⁾200 μg/100 μL of phenolics content, ⁶⁾Not detected

Table 6 Sensory evaluation of lotion with 0.4% *U. pumila* extracts

Sample	Color	Spreadability	Flavor	Overall acceptability
<i>U. pumila</i> extracts lotion	7.5±1.5	8.6±0.5	8.8±2.2	8.5±1.6

The data were expressed as the mean ± SD (n=3).

한 연구가 이루어져 이미 수많은 종류가 산업적으로 유용하게 활용되고 있다(Laskin 등, 1986; Lee와 Woo, 1998). 일반적으로 호르몬과 외부적 영향에 의해 피지가 모낭관 밖으로 배출되지 못하여 피부 모공이 막힌 경우, 피부 상재균들의 증식에 의해 야기되는 것이 여드름이며, 일반적으로 피부 상재균 중 피부에 염증을 유발할 수 있는 균으로 *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* 등이 보고되어 있으며, 특히 피부 여드름 유발 원인 균으로 *Propionibacterium acnes*가 알려져 있다. 이러한 피부 트러블을 일으키는 다양한 균에 대한 유근피 추출물의 항균활성을 측정된 결과 Table 5에서와 같이 유근피 물 추출물의 경우 50–200 μg/mL의 phenolics 농도에서 *Propionibacterium acnes*에 대한 항균활성이 각각 8.7, 10, 11.1 및 11.8 mm의 clear zone이 검출되어 여드름균에 대한 항균효과가 있음이 확인되었고, *S. epidermidis*, *S. aureus*에 대한 항균효과는 거의 없는 것으로 확인 되었다.

유근피 추출물을 첨가한 로션의 제조 및 관능 평가. 위와 같이 다양한 미용식품활성을 가지는 유근피 추출물을 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0%의 농도로 첨가된 로션을 제조한 결과 Fig. 5와 같이, 유근피 추출물의 첨가 농도가 증가할수록 로션의 색이 연한 갈색으로 짙게 나타났으며, 또한 30일 이상 관찰한 결과 제품의 물성에 이상을 주는 상(phase)의 분리가 없었고, 응집과 침전 현상이 일어나지 않아 안정성을 육안으로 확인할 수 있었다. 유근피 추출물이 첨가된 로션의 관능평가 결과를 Table 6에서와 같이 6가지 문항에 대해서 끈적임이 없이 가장 부드러운 것과 보습감, 바름성, 바른 후의 피부상태가 가장 좋은 것은 0.4%의 유근피 추출물이 들어간 로션인 반면에 로션의 색상이 가장 좋은 것은 0.2%의 유근피 추출물이 첨가된 로션이 가장 좋은 반응을 보였다. 로션을 사용한 후 다른 사람에게 추천해주고 싶은 농도의 로션은 0.4%의 유근피 추출물이 첨가된 로션으로 나타났다. 이 결과로 미루어 보아 유근피 추출물이 많이 첨가될수록 사용감면에서는 더 좋은 반응을 보였으나, 유근피 추출물의 농도가 진해질수록 로션의 색상이 어두워지는 것이 문제시 되었다. 따라서 향후 화장품의 안정성시험은 0.4% 유근피 추출물이 함유된 제품으로 시행하였다. 0.4%의 유근피 추출물이 들어간 로션의 경우 색깔의 관능평점이 7.5로 다소 낮은 평가를

Fig. 5 Photograph of the lotion containing *U. pumila* extracts

받았으나 이는 추출물의 첨가에 따른 부가적인 효과로 판단하였으며, 바름성과 향은 각각 8.6점과 8.8점의 높은 평가를 받았으며, 전체적인 기호도 역시 8.5점 이상의 높은 평가를 받았다.

유근피 추출물을 첨가한 로션의 pH 및 점도 변화. 유근피 추출물을 첨가한 로션의 pH 변화 측정 결과, Fig. 6A와 같이 실온(25°C)에서 보관한 유근피 추출물을 첨가한 로션의 pH를 28일 동안 측정한 결과 유근피 추출물이 첨가되지 않은 로션일 경우 pH가 6.1–6.2로 pH의 변화가 거의 없었으며, 0.4%의 농도로 첨가한 로션에서는 6.0–6.2로 대조구와 거의 같은 pH를 나타내었으며, 28일 동안 pH 변화는 거의 없었다. 점도는 액체가 일정방향으로 운동할 때, 그 흐름에 평행한 평면의 양측에 내부 마찰력이 생기는 성질을 말한다. 점도는 온도에 영향을 받으며, 그 변화 정도는 유체의 종류에 따라 다르다. 또한 점도계를 이용한 측정시 spindle, speed 조건, sample container size, sample 온도, 시간, 기포 등에 따라 점도값이 달라질 수 있다. 본 실험에서는 유근피 추출물을 첨가한 로션의 저장기간 중 점도를 측정한 결과 Fig. 6B와 같이 유근피 추출물이 첨가되지 않은 로션일 경우 점도가 12,000–15,000 cP로 수치상의 큰 변화는 없었으며, 유근피 추출물을 0.4%의 농도로 첨가한 로션은

Fig. 6 pH and viscosity change of the lotion containing *U. pumila* extracts. A: pH stability, B: viscosity stability, 0: normal lotion, 0.4: lotion with 0.4% extracts

대조구에 비해 추출물의 첨가로 점도가 약간 낮아져 10,000–12,000 cP 사이에 분포하였고, 시간에 따른 변화는 나타나지 않았으나 대조구에 비해 점도가 약간 낮게 나타났다.

유근피 추출물을 첨가한 로션의 온도 및 광안정성. 화장품 사용성에 큰 영향을 줄뿐 아니라 화장품이 갖는 미적외관, 이미지의 손실에도 영향을 줄 수 있는 온도에 대한 안정성을 알아보기 위하여 유근피 추출물을 첨가한 로션을 고온(40°C)에서 외관의 산패, 변색, 변취, 점도, 증발, 부유, 침전, 탁도(투명도), 분리 등을 관찰하였고, 저온에서는 응고, 침전, 탁도(투명도), 결정석출, 분리 등의 화학적물리적 변화 관찰을 통하여 안정성 평가를 실시한 결과 Table 7과 같이 0, 25, 40°C의 온도에 보관한 유근피 추출물을 첨가한 로션은 56일 동안 모든 온도 조건에서 안정성을 나타내었다. 유근피 추출물을 첨가한 로션의 인공광에 대한 안정성을 관찰한 결과 Table 8과 같이 0.5, 1, 2,

Table 9 Results of sun test of the lotion containing *U. pumila* extracts

Sample	Concentration (%)	Storage time (Day)	
		7	15
Stability	Normal lotion	0	0
	0.2	0	0
	0.4	0	0
	<i>U. pumila</i> extracts lotion	0.6	0
	0.8	0	0
	1.0	0	0

O: Color unchanged, X: Color changed

4, 6시간 동안의 변퇴색, 발색, 변취, 산패 등의 변화를 관찰하였는데 육안으로 모두 안정함을 나타내었다. 유근피 추출물을 첨가한 로션을 햇빛이 잘 드는 실외에 보관하여 7, 15일 동안의 자연광에 의한 색조변화 및 냄새 변화를 관찰한 결과 Table 9와 같이 모든 농도의 유근피 추출물을 첨가한 로션은 색조변화와 냄새 변화없이 안정함을 나타내었다.

온도순환(cycle chamber) 및 냉해동순환(freeze&thaw cycling)에 따른 안정성. 온도순환(Cycle chamber)에 따른 안정성 시험법은 우리나라와 같이 4계절이 뚜렷한 나라에서 화장품의 저온 및 고온의 보관조건에 따른 물성변화와 온도 변화에 따라 유효가용화에서의 물성변화를 관찰하기 위하여 실시한다. 제품의 대부분은 고온에서 가수분해 현상 등이 빨리 일어나며, 저온인 경우는 부피팽창, 용해도차에 의한 계면막 손상, 침전 등이 일어나는데 이러한 현상을 짧은 기간내에 확인하기 위해 온도순환(Cycle chamber)에 따른 안정성 시험을 진행하였다. 유근피 추출물이 첨가된 로션을 -10, 0, 10, 25, 40°C에서 각각 24시간 보관한 후 온도 순환에 따른 안정성을 시험한 결과 Table 10과 같이 10 cycle 모두에서 상의 분리와 변색, 변취 없이 안정함을 육안으로 확인할 수 있었다. Freeze와 Thaw를 반복하여 변화시켜 그 과정에서 물성이 안정한 경우와 불안정한 경우를 확인하기 위하여 가속조건에서 화장품의 여러 가지 물리화학적 변화를 freeze & thaw 시험법을 이용하여 확인하였다. 유근피 추출물을 첨가한 로션을 급격한 온도 변화 조건인 25와 -10°C의 온도 변화를 주어 3일과 7일간 안정성을 관찰한 결과 Table 11과 같이 상의 분리와 변색, 변취 없이 모두 안정함을 육안으로 관찰할 수 있었다.

Table 7 Results of stability test of the lotion containing *U. pumila* extracts in constant temperature conditions (0, 25, 40°C)

	Temperature (°C)	Storage time (Day)						
		1	3	5	7	14	28	56
Stability	0	O	O	O	O	O	O	O
	25	O	O	O	O	O	O	O
	40	O	O	O	O	O	O	O

O: Stable, X: Unstable

Table 8 Results of artificial sun lamp test of the lotion containing *U. pumila* extracts

	Condition	Storage time (h)				
		0.5	1	2	4	6
Stability	*Temperature: 40°C *Distance from light source: 20.3 cm	O	O	O	O	O

O: Color unchanged, X: Color changed

Table 10 Results of stability test of the lotion containing *U. pumila* extracts in cycle chamber condition

	Cycle (Times)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stability	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

O: Stable, X: Unstable

Table 11 Results of stability test of the lotion containing *U. pumila* extracts in freeze & thaw cycling condition

	Temperature (°C)	Storage time (Day)	
		3	7
Stability	-10 / 25	O	O

O: Stable, X: Unstable

Table 12 Results for patch test of the lotion containing *U. pumila* extracts

Group	No. of patch tested	24 h
Female	10	*-
Male	10	*-

* -: Negative

유근피 추출물을 첨가한 로션의 첩포 시험. 개발된 화장품 원료나 화장품을 이용할 때 피부 트러블이 일어나지 않는 것을 확인하기 위하여 사람의 팔과 등 부위에 첩포 시험을 시행하였다. 본 실험은 남녀 대학생 20명을 대상으로 실시한 첩포 시험의 결과로 Table 12와 같이 나타내었다. 판정시간은 24시간 후에 첩포를 벗겨내고 국제 접촉 피부염 연구회의 기준으로 측정한 결과 모두 음성반응을 보였다.

초 록

유근피에 함유된 페놀성 물질은 70% ethanol을 용매로 하여 추출하였을 때 17.9±1.0 mg/g이 용출되었다. 주름 생성과 관련된 elastase 저해 활성은 50–200 µg/mL phenolics 농도의 70% ethanol 추출물에서 55.5–69.5%의 제해효과를 확인할 수 있었다. 유근피 추출물의 미백효과와 관련된 tyrosinase 저해활성은 200 µg/mL phenolics 농도의 70% ethanol 추출물에서 24%의 제해효과가 측정되었다. Astringent 활성은 200 µg/mL phenolics 농도의 70% ethanol 추출물에서 71%의 활성을 나타내어 모공축소 효과가 높을 것으로 판단되었다. 유근피 추출물의 hyaluronidase 저해활성은 50 µg/mL phenolics의 농도에서 80%의 염증억제 효과가 확인되었다. 유근피 추출물의 항균활성은 물 추출물의 경우 50–200 µg/mL의 phenolics 농도에서 *Propionibacterium acnes*에 대한 항균활성이 각각 8.7, 10, 11.1 및 11.8 mm의 clear zone이 확인되었다. 유근피 추출물을 첨가하여 제조한 복합 기능성 화장품(로션)의 안정성은 28일 동안 pH 및 점도의 변화가 없었고, 온도 및 광에 대하여 안정하였다. 제조한 로션은 추출물의 첨가 농도가 증가함에 따라 색도는 어둡게 나타났으나, 사용감 면에서 8.5점 정도의 좋은 점수를 나타내었다.

Keywords anti-microbial activity · astringent effect · beauty food activity · phenolic compounds · tyrosinase/elastase · *Ulmus pumila*

참고문헌

- Aberer W, Andersen KE, and White IR (1993) Should patch testing be restricted to dermatologists only. *Contact Dermatitis* **28**, 1–2.
- Andarwulan N and Shetty K (1999) Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and *Ahrobacterium*-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.). *J Agric Food Chem* **47**, 1776–80.
- Aruoma OI (1998) Free radical, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc* **75**, 199–212.
- Azuma K, Nakayama M, Koshika M, Ippoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K et al. (1999) Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J Agric Food Chem* **47**, 3963–6.
- Cho YJ (2011) Characteristics of cosmetic with whitening compounds from *Phellodendron amurense*. *J Appl Biol Chem* **54**, 108–13.
- Cho YJ, An BJ, and Kim JH (2011) Application of isolated tyrosinase inhibitory compounds from Persimmon leaves. *Korean J Life Sci* **21**, 976–84.
- Choi SI, Lee YM, and Heo TR (2003) Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity in vitro of traditional herbal medicine extracts. *Korean J Biotech Bioeng* **18**, 282–8.
- DeWitt DL, Rollins TE, Day JS, Gauger JA, and Smith WL (1981) Orientation of the active site, and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide synthase in the *Endoplasmic reticulum*. *J Biol Chem* **256**, 10375–82.
- Duke JA (1985) Handbook of medicinal herbs, p.495, CRC press, USA.
- Folin O and Denis W (1912) On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* **12**, 239–49.
- Gavidson PH and Parish ME (1989) Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *J Food Technol* **43**, 148–54.
- Ghosh P (1994) The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease : interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. *Clin Exp Rheumatol* **12**, 75–82.
- Han KJ, Lee KS, Kong KH, and Cho SH (2003) Separation and purification of substance having matrix metalloproteinase-9 inhibition effect in *Ulmus davidiana* Planen. var. *japonica* Nakai. *Anal Sci Technol* **16**, 179–84.
- Imokawa G and Mishima Y (1980) Isolation and characterization of tyrosinase inhibitors and their differential action on melanogenic subcellular compartments in amelanotic and melanomas. *Br J Dermatol* **103**, 625–33.
- Imokawa G and Mishima Y (1981) Isolation and characterization of tyrosinase inhibitors using tyrosinase binding affinity chromatography. *Br J Dermatol* **104**, 531–9.
- Jung SW and Kim MK (2003) Effect of dried powders of chamomile, sage, and green tea on antioxidative capacity in 15-month-old rats. *Korean Nutr Soc* **36**, 699–710.
- Kim CM, Shin, MG, Ann DK, and Lee KS (1997) The encyclopedia of oriental herbal medicine. pp. 3348–50, Publication Jungdam, Korea.
- Kim MJ, Kim JY, Choi SW, Hong JT, and Yoon KS (2004) Anti-wrinkle effect of safflower (*Cathamus tinctorius*) seed extract. *J Soc Cosmet Scientistis Korea* **30**, 15–22.
- Kim MR, Hwang JH, Yun JK, Han KH, Do EJ, Lee JS et al. (2011) Antioxidation and antiaging effect of mixed extract from Korean medicinal herbs. *Korean J Herbology* **26**, 111–7.
- Kim SH, Nah JW, and Song KD (2000) Enhancement of mechanical properties of EVA emulsion. *Appl Chem* **4**, 280–3.
- Laskin JD and Piccinini LA (1986) Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B-16/C3 melanoma. *J Biol Chem* **261**, 16626–35.
- Lee EY and Woo GY (1998) Ultrafiltration and Separation Process Optimization of Hen Egg White lysozyme as Natural Antimicrobial

- Enzyme. *Korean J Food Sci Technol* **30**, 397–406.
- Lee JT, Jeong YS, and An BJ (2002) Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials. *Korean J Herbology* **17**, 51–60.
- Lee KT, Lee SY, Jeong JH, and Jo BK (1999) New anti- wrinkle cosmetics. Cheonan (Korea). Coreana cosmetics Co., Ltd.. Korea.
- Lee MK and Kim YC (2001) Five novel neuroprotective triterpene esters of *Ulmus davidiana* var. *japonica*. *J Nat Prod* **64**, 328–31.
- Matsumura H, Oka K, Umekage K, Akita H, Kawai J, Kitaawa Y et al. (1995) Effect of occlusion on human skin. *Contact Dermatitis* **33**, 231–5.
- Park SJ, Lee HY, and Oh DH (2003) Free radical scavenging effect of seed and skin extracts from campell early grape (*Vitis labruscana* B.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* **32**, 115–8.
- Roth GJ, Siok CJ, and Ozols J (1980) Structural characteristics of prostaglandin synthetase from sheep vesicular gland. *J Biol Chem* **255**, 1301–4.
- Son BH, Park JH, and Zee OP (1989) Catechin glycoside from *Ulmus davidiana*. *Arch Pharm* **21**, 217–22.
- Stevenson TH, Lucia LM, and Acuff GR (2000) Development of selective medium for isolation of *Helicobacter pylori* from cattle and beef samples. *Appl Environ Microbiol* **66**, 723–7.
- Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, and Imokawa G (2001) The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem Photobiol* **74**, 283–90.
- Yuk CS (1990) Korean medicinal plant pictorial book. p 76, Publication Jinmyeong, Korea.