

## 정향과 황련 혼합물의 항균 및 항염증 활성 연구

이은홍<sup>1</sup> · 정은미<sup>1</sup> · 권현지<sup>2</sup> · 이지혜<sup>3</sup> · 우봉현<sup>4</sup> · 박성민<sup>5</sup> · 박진한<sup>6</sup> · 정지욱<sup>7,†</sup>

<sup>1</sup>대구한의대학교 일반대학원 제약공학과, 학생

<sup>2</sup>건국대학교 일반대학교원 첨단중개의학과, 학생

<sup>3</sup>대구한의대학교 산학협력단, 박사 후 연구원

<sup>4</sup>(주)비셀

<sup>5</sup>올패스바이오

<sup>6</sup>대구한의대학교 화장품제약대학 K-뷰티비즈니스학과, 교수

<sup>7</sup>대구한의대학교 화장품제약대학 바이오산업융합학부, 교수

(2023년 11월 23일 접수: 2023년 12월 29일 수정: 2023년 12월 29일 채택)

## Anti-inflammatory and anti-bacterial effects of a mixture of *Syzygium aromaticum* and *Coptis japonica*

Eunhong Lee<sup>1\*</sup> · Eun-mi Jung<sup>1</sup> · Hyun-Ji Kwon<sup>2</sup> · Jihye Lee<sup>3</sup> · BongHyun Woo<sup>4</sup>  
Sungmin Park<sup>5</sup> · Jinhan Park<sup>6</sup> · Ji Wook Jung<sup>7,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu haany University, Korea

<sup>2</sup>Advanced Translational Medicine, Konkuk University, Korea

<sup>3</sup>Daegu Haany University Industry Academic Cooperation Foundation, Korea

<sup>4</sup>BCEL Corp

<sup>5</sup>AllpassBio

<sup>6</sup>Department of K-Beauty Business, College of Cosmetics and Pharm, Daegu Haany University

<sup>7</sup>Division of Biotechnology and Convergence, College of Cosmetics and Pharm,  
Daegu Haany University

(Received November 23, 2023; Revised December 29, 2023; Accepted December 29, 2023)

**요약** : 본 연구는 정향, 황련 추출물을 혼합하여 *Malassezia furfur*에 대한 항균 능력을 확인하고 최적의 혼합물을 만들어 항산화 및 항염증 능력을 평가하기 위해 수행되었다. 정향과 황련을 70% 에탄올, 100% 메탄올, 열수로 추출하여 항균 능력을 평가하여 정향은 100% 메탄올 추출물, 황련은 열수 추출물이 가장 항균 능력이 높은 것을 확인하였다. 또한 두 추출물을 혼합하여 비율별로 항균 능력을 평가하였을 때 9:1 비율이 가장 우수한 활성을 보였고 혼합물의 항산화 활성이 뛰어난 것을 확인하였다. Raw 264.7 세포에서 생존율에 영향을 미치지 않는 1, 10, 50, 100 µg/mL에서 LPS를 이용하여 염증 반응을 유도하고 항염증 활성을 확인한 결과 10, 50, 100 µg/mL에서 No 생성 저해율과 IL-6 발현 저해율 및 COX2, iNOS 단백질 발현 저해 활성이 뛰어난 것을 확인하였다. 본 연구를 통해 정향 메탄올 추출물 및

†Corresponding author  
(E-mail: jwjung@dhu.ac.kr)

황련 열수 추출물의 혼합물은 항균, 항염증 효능이 뛰어나기에 기능성 화장품의 천연 소재로써 사용이 가능할 것으로 사료된다.

주제어 : 항균, 항산화, 항염증, *Malassezia furfur*, 정향, 황련

**Abstract** : This study was conducted to check the anti-bacterial ability against *Malassezia furfur* by mixing *Szygium aromaticum* and *Coptis japonica* extracts and to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory ability by creating an optimal mixture. *Szygium aromaticum* and *Coptis japonica* were extracted with 70% ethanol, 100% methanol, and water to evaluate the antibacterial ability, and it was confirmed that 100% methanol extract of *Szygium aromaticum* and *Coptis japonica* water extract had the highest anti-bacterial ability. In addition, when the two extracts were mixed and the anti-bacterial ability was evaluated by ratio, the ratio of 9:1 showed the best activity, and it was confirmed that the antioxidant activity of the mixture was excellent. In Raw 264.7 cells, LPS was used to induce inflammatory responses and confirmed anti-inflammatory activity at 1, 10, 50, and 100  $\mu$ g/mL that did not affect survival, and it was confirmed that NO-production inhibition and IL-6 expression inhibition and COX2 and iNOS protein expression inhibition activity were excellent at 10, 50, and 100  $\mu$ g/mL. Through this study, it is thought that the mixture of *Szygium aromaticum* 100% methanol extract and *Coptis japonica* water extract can be used as a natural ingredient in functional cosmetics because of its excellent antibacterial and anti-inflammatory effects.

**Keywords** : anti-inflammatory, anti-bacterial, *Malassezia furfur*, *Szygium aromaticum*, *Coptis japonica*

## 1. 서론

피부는 신체의 가장 바깥에서 신체를 보호하는 역할을 하기 때문에 환경 변화나 외부인자로부터 오는 자극을 가장 많이 받는 부위이며 첫인상을 결정짓는 중요 요인 중 하나이기 때문에 미용에 대한 관심이 높다[1]. 특히 현대사회에서는 국민소득의 수준이 높아짐에 따라 일반적인 피부뿐만 아니라 두피, 모발에 관한 체계적인 이론 및 전문 분야가 확립되고 있는 추세이다[2]. 그 중에서도 두피는 두부를 외부에서 오는 물리적 자극과 화학적인 변화를 완화하고 보호하며, 모발과 직접적으로 관계가 있는 피부조직으로써 독소나 노폐물을 몸에서 배출하는 역할을 한다[3]. 하지만 문명의 발달에 따른 환경오염, 사회적 구조의 심화, 과도한 업무 및 스트레스, 불규칙한 생활 습관 등의 요인으로 두피 질환 환자가 증가하고 있으며 그 중 비듬이 대표적이다[4]. 비듬은 피부 각화 과정에서 두피 각질세포가 탈락하는 현상으로 일반적으로 문제가 없지만 과도하게 발생할 경우 가려움증을 동반하며 비듬증을 거쳐 지루성 두피

염으로 이어진다[5]. 이러한 지루성 두피염은 만성적인 염증 상태를 보이며 주로 붉은 반점 및 비듬의 형태로 나타나고 증상이 지속될 경우 통증 유발할 수 있다[6].

*Malassezia furfur*(*M. furfur*)는 비듬을 유발하는 피부 사상균의 한 종류로 특정 조건에서 피부 표면에 감염을 일으키는 원인이 되며 지루성 두피염과 피부염, 습진, 가려움 등을 유발한다[7]. 이러한 *M. furfur*는 정상적으로 사춘기 이후 두피에서 생존하는 총 균의 46%를 차지하는데 여기서 다양한 요인에 의해 과다하게 증식할 경우 비듬이 생성되고, 83%를 넘으면 지루성 두피염이 발병한다[8]. 현재 *M. furfur*에 감염된 두피에는 항진균, 항염증제를 처방하는데, 의약품과 마찬가지로 ketoconazole, terbinafine, zinc pyrithione (ZPT), climbazole, piroctone olamine 등의 뛰어난 항균 능력을 가진 azole계 화학물질을 포함한 샴푸가 주로 사용되고 있지만 화학 물질로 인한 접촉성 피부염이나 환경 독성 등의 문제점이 대두되고 있는 추세이다[5]. 이에 화학물질을 대체하기 위해 인체에 무해하고 환경 독성

을 일으키지 않는 항균 및 항염증 천연 소재의 중요성이 더욱 커지고 있다[9].

*M. furfur*로 인해 발생하는 염증을 방지할 경우, 세균 번식이 더 쉬운 환경이 되면서 가벼운 비듬증이 만성염증성 질환인 지루성 두피염으로 악화될 수 있다[10]. 염증은 외부의 병원체, 항원, 생체 내 자극 물질에 대한 방어반응으로서 다양한 매개 물질이 관여하는데 그중에서도 대식세포는 면역세포의 한 종류로 외부 자극에 반응하여 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )이나 interleukin(IL)-6과 같은 전염증성 cytokine을 생성시키고 염증반응을 일으킨다[11]. 대식세포가 면역 반응을 일으킬 때 생성되는 nitric oxide(NO)는 세포 외 자극으로 활성화되어 inducible NOS (iNOS)에 의해 과도하게 합성될 경우 염증을 일으키며 조직의 손상, 유전자 변이 또는 신경 손상 등을 유발한다. 대식세포에서 발현되는 cyclooxygenase-2 (COX-2) 단백질 또한 PGE2의 합성에 관여하여 염증반응과 퇴행성 질환을 야기한다[12].

정향(*Syzygium aromaticum*)은 도금양과로 열대 지방에서 재배되는 상록교목인 정향나무의 꽃봉오리 부분으로 가장 널리 사용되는 향신료의 한 종류로서 서양에서는 향신료와 방부제로서 사용되고 동양에서는 이노제, 치통, 강위제 등의 한약재로 사용되고 있다[13]. 정향의 성분은 정유가 15-20%이며 그 중 70-85%를 차지하는 eugenol은 향기의 주성분으로[14] 항산화, 항염증, 항균, 항바이러스, 항알레르기 등의 효능을 지녔다고 보고되었다[15,16,17,18].

황련(*Coptis japonica*)은 미나리아재비과에 속해 있는 다년생 초본인 황련과 동속식물의 뿌리줄기를 건조한 것으로 한약재로서 가슴이 답답하고 잠을 자지 못하거나 구토, 설사 등의 용도로 주로 사용되었으며, 이는 현대 의학적 관점에서 볼 때 항염증, 항균, 해독, 해열 등의 작용으로 해석된다[19]. 황련은 항산화, 항균, 항염증 등의 작용이 뛰어난 것으로 이미 많은 연구가 보고되었으며[20,21], 특히 항염증 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다[22].

현재 각 추출물을 활용한 단일 시료의 항염증 및 항산화 등의 연구는 다수 진행되었지만 비듬균에 대한 혼합물의 추출 용매 및 비율에 대한 연구는 전무하다. 따라서 본 연구에서는 항균 및 항염증 효과가 뛰어난 두 한약재의 추출물을 각 비율별로 혼합하여 *M. furfur*에서 항균 효과를

최적으로 나타내는 혼합비를 확립하고 혼합물의 항염증 및 항산화 효과를 확인하여 두피 개선 천연 기능성 화장품 소재로써 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 추출물 제조

본 실험에서 이용된 정향, 황련은 동일약업사(Daegu, Korea)에서 건조된 약재들을 구입하였다. 100 g의 약재에 각 용매 70% 에탄올, 100% 메탄올, 증류수 1000 mL 넣어 추출하였다. 유기용매는 60°C에서 2시간으로 2번, 증류수는 100°C에서 2시간으로 2번 추출 후 watman filter paper(No.2, GE Healthcare, UK)를 사용하여 여과하였고, rotatory vacuum evaporator(Eyela, Japan)으로 감압 농축하였다. 동결 건조(Eyela, Japan)한 건조물은 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

### 2.2. *Malassezia furfur* 항균 활성 분석

정향과 황련 추출물의 항균력을 확인하기 위해 leeming and notman gar modified mLNB 배지(10 g Bacteriological peptone, 10 g Glucose, 2.0 g Yeast extract, 8.0 g ox-bile desiccated monostearate, 10 mL glycerol, 0.5 g glycerol monostearate, 5.0 mL tween 60, 20 mL olive oil per liter)에 *M. furfur*를 접종하고 30°C, 150 rpm으로 72 h 진탕배양 하였다. 진탕배양한 *M. furfur*를 18°C, 13000 rpm으로 회수하고 PBS를 사용하여 동일한 조건으로 2회 세척하여 균액을 준비하였다. 준비한 균액을 희석하여 600 nm에서 흡광도를 측정하고 테스트에 적절한 농도로 조정하여 현탁액을 준비하였다. 항균력의 비교는 한천평판확산법(Agar diffusion method)을 사용하여 진행하였고 농도를 조정한 현탁액을 mLNA 배지에 접종한 후 각각의 추출물이 점적한 페이퍼디스크(10 mm, Advantec)를 얹고 30°C에서 6일간 배양하면서 페이퍼디스크 주위에 형성된 생육 저지환의 크기를 확인하였다.

### 2.3. DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay

DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay는 Blois의 방법[23]에 따라 실험을 진행하였다. 0.2

mM 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 100  $\mu$ L를 각 시료 100  $\mu$ L에 첨가하여 상온에서 30 min 간 차광한 뒤 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 ascorbic acid를 사용하여 비교분석 하였으며 라디칼 소거능은 아래의 식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거활성(\%)} = (1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

#### 2.4. ABTS+ radical scavenging assay

ABTS+ radical scavenging assay는 Rics-Evans등의 방법[24]에 따라 실험을 진행하였다. 7.4 mM 2,2 Azino-bis 와 2.6 mM potassium persulfate를 1:1 비율로 혼합하여 암실에서 차광한 후 24 h 동안 반응시켜 사용하였다. 734 nm의 흡광도에서 값이  $0.700 \pm 0.001$ 가 되도록 제조하여 사용했으며 시료 용액과 ABTS+ 용액 100  $\mu$ L를 혼합하고 상온에서 1 min 동안 차광하여 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 ascorbic acid를 사용하여 비교분석 하였으며 라디칼 소거능은 아래의 식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{ABTS+ 라디칼 소거활성(\%)} = (1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

#### 2.5. Total polyphenol contents

Total polyphenol contents는 Folin-Denis의 방법[25]에 따라 실험을 진행하였다. 시료 용액 10  $\mu$ L와 folin-cicalteu reagent 10 $\mu$ L, 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200  $\mu$ L을 혼합하여 30 min 동안 상온에서 차광하여 730 nm에서 흡광도를 측정한다. gallic acid를 표준물질로서 사용했으며, 검량선을 작성하고 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

#### 2.6. Reducing power assay

Reducing power assay는 Oyaizu의 방법[26]에 따라 실험을 진행하였다. 시료 용액 300  $\mu$ L 와 1 % potassium ferricyanide 300  $\mu$ L, 0.2 M phosphate buffer 300  $\mu$ L를 혼합하여 50 °C 에서 20 min 반응한다. 반응이 끝나면 10% TCA 300  $\mu$ L 혼합 후 centrifuge에서 12000 rpm으로 10 min 반응한다. 반응이 끝난 용액의 상층액을 새로운 tube에 500  $\mu$ L 옮기고 증류수 500  $\mu$ L, 0.1% ferric chloride 100  $\mu$ L 혼합 후 10 min 반응하여 96 well plate에 100  $\mu$ L을 분주하여

700 nm에서 흡광도를 측정한다.

#### 2.7. 세포 생존율 측정(MTT Assay)

Raw264.7 Cell은 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Korea)에 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific, Korea), 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher, Korea)을 포함시켜 제조한 배지를 사용하고, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하여 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bormide (MTT) 분석을 위하여 100  $\mu$ L씩  $1 \times 10^5$  cells/mL 단위로 96well plate에 분주하고 24 h 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 배지를 제거하고 새로운 배지 90  $\mu$ L을 넣은 후 정향 메탄올 추출물과 황련 열수 추출물을 9:1 비율로 혼합한 혼합물을 1, 10, 50, 100  $\mu$ g/mL 농도로 각각 10  $\mu$ L씩 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24 h 배양하였다. 각 well에 5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 10  $\mu$ L씩 넣고 2 h 배양한 후, 배지를 모두 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Duksan, Korea)를 각 well당 100  $\mu$ L씩 첨가하여 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.8. NO 생성 저해 활성 분석

Raw 264.7 cell은  $2 \times 10^5$  cells/mL 비율로 24 well plate에 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24 h 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 새로운 배지 450  $\mu$ L을 넣은 후 정향 메탄올 추출물과 황련 열수 추출물을 9:1 비율로 혼합한 혼합물을 1, 10, 50, 100  $\mu$ g/mL 농도로 50  $\mu$ L씩 첨가하였다. 혼합물 첨가 후 2 h 배양하고 lipopoly-saccharide(LPS)를 1  $\mu$ g/mL 농도로 처리하고, 37 °C ,5% CO<sub>2</sub>에서 24 h 배양하였다. 각 well의 상층액 100  $\mu$ L과 1% sulfanilamide와 0.1% n-1-naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride (NED)를 1:1 비율로 혼합한 용액 100  $\mu$ L을 혼합하고 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.9. IL-6 cytokine 저해 활성 측정

Raw 264.7 cell은  $2 \times 10^5$  cells/mL 비율로 60×15 mm Cell culture dish에 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24 h 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 새로운 배지 2700  $\mu$ L을 넣은 후 정향 메탄올 추출물과 황련 열수 추출물을 9:1 비율로

혼합한 혼합물을 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 30  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하였다. 혼합물 첨가 후 2 h 배양하고 LPS를 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하고, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ 에서 24 h 배양하였다. 배양이 끝난 세포의 상층액을 사용하여 IL-6 cytokine 저해 활성을 측정하였다. 96 well plate에 100  $\mu\text{L}$ 씩 각 항체를 희석한 coating buffer(0.1 M carbonate, p.H 9.5)를 분주하여 coating하고 4°C 에서 12 h 방치한다. 반응이 끝난 96well plate는 PBST를 이용하여 세척하고 증류수에 9:1 비율로 희석한 FBS를 100  $\mu\text{L}$ 씩 분주하여 1 h 동안 blocking 한다. blocking이 끝난 well은 다시 세척 후 각 Sample과 표준물질을 100  $\mu\text{L}$ 씩 분주하고 2 h 동안 반응한다. 그 후 다시 세척하고 Detection과 Enzyme 을 1:1 비율로 혼합하여 100  $\mu\text{L}$ 씩 분주하고 1 h 동안 반응한다. 반응이 끝나면 세척한 well에 TMB Substrate 100  $\mu\text{L}$  분주 후 37°C에서 반응 후 1N Phosphoric Acid를 100  $\mu\text{L}$ 씩 분주하여 반응을 멈추고 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.10. Western blot을 통한 단백질 발현 확인

iNOS, COX-2 단백질 발현 확인을 위해 Raw 264.7 cell을  $2 \times 10^5$  cells/mL 비율로 60×15 mm Cell culture dish에 분주하고 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ 에서 24 h 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 새로운 배지 2700  $\mu\text{L}$ 을 넣은 후 정향 메탄올 추출물과 황련 열수 추출물을 9:1 비율로 혼합한 혼합물을 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 30  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하였다. 혼합물 첨가 후 2 h 배양하고 LPS를 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하고, 37 °C ,5%  $\text{CO}_2$ 에서 24 h 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 단백질을 정량하여 10% polyacrylamide gel에서 전기 영동하였다. 단백질이 이동한 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane을 5% skim milk으로 30 min 동안 blocking 한다. 1차 항체를 넣고 4°C에서 12 h 방치한 후 TBST로 세척하고 2차 항체를 넣어 실온에서 2 h 반응한다. LAS 4000 mini system(GE Healthcare, USA)을 사용하여 단백질의 관찰을 촬영하였다.

#### 2.11. 통계처리

모든 실험은 3회 반복해 측정하였고 결과는 mean  $\pm$  standard deviation(SD)로 나타냈으며 항산화 실험 및 항염증 실험은 유의성 검정을 위해 Statistical Package for the Social Sciences(SPSS)

software package(version 22.: IBM, USA)을 이용하였다. 각 처리군 사의 유의성 검증은 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)을 이용하여 유의성을 확인하고  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple rage test를 이용하여 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. *Malassezia furfur* 항균 활성 분석

정향과 황련을 70% 에탄올, 100% 메탄올, 증류수를 이용하여 추출하고 각 추출물의 *Malassezia furfur* 항균 활성을 분석하기 위해 disk plate method에 의한 생육저지환을 측정하였다. 정향 추출물은 100% 메탄올 추출물이 20 mm으로 유일하게 활성을 나타냈으며, 황련 추출물은 100% 메탄올 추출물이 12 mm, 열수 추출물이 14 mm으로 열수 추출물이 가장 높은 활성을 나타냈다(Table 1). 이를 통해 정향 메탄올 추출물과 황련 열수 추출물의 최적의 혼합비를 확인하였을 때, 혼합물 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1의 비율에서 각 18, 19, 20, 17, 17, 17, 20, 21, 24 mm의 생육저지환을 형성하였고(Table 2) 이는 Lee 등의 실험[27]에서 정향 메탄올 추출물은 5% 농도에서 *S. aureus*에 대해 나타낸 17 mm의 생육저지환이나 Kim 등의 실험[28]에서는 황련 에탄올 추출물과 피톤치드 50% 혼합물이 *M. furfur*에 나타낸 3.20 mm의 생육저지환보다 높은 활성을 보임을 확인하였다.

#### 3.2. DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay

정향 메탄올 추출물과 황련 열수 추출물을 9:1 비율 혼합물의 자유 라디칼 소거활성을 확인하기 위하여 DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay를 실시하였다. DPPH 라디칼 소거능은 불안정 유리기에 환원성 기능이 있는 proton ion을 제공하여 안정화를 유도하는 것으로[29], 본 연구에서 9:1 혼합물은 10, 100, 500, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각  $32.34 \pm 6.2$ ,  $89.09 \pm 2.8$ ,  $90.91 \pm 1.2$ ,  $91.36 \pm 0.5\%$ 의 활성을 보였으며(Fig. 2.) Park 등의 실험[30]에서 에탄올 95%로 추출한 정향 추출물은 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 에서  $7.86 \pm 2.15\%$ 의 활성을 나타낸 것과 비교했을 때 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의

낮은 농도에서도 뛰어난 자유 라디칼 소거 활성을 보임을 확인하였다.

### 3.2. ABTS+ radical scavenging activity

ABTS+ radical scavenging activity은 자유 라디칼 소거 활성을 보는 실험 중 하나로 산화물 일으키는 물질을 만나 시험 용액이 청록색에서 투명하게 탈색되는 것의 흡광도를 측정한다. 본 연구에서 9:1 비율 혼합물은 10, 100, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각  $33.12 \pm 3.3$ ,  $99.65 \pm 0.1$ ,  $99.68 \pm 0.2$ ,  $98.85 \pm 0.2\%$ 를 나타내었다(Fig. 3.). Shin 등의 실험[31]에서 *Z. diesingiana* 추출물이 20 mg/mL에서 각각  $96.26 \pm 1.0\%$ 의 활성을 나타낸 것과 비교했을 때 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에서도 뛰어난 항산화능을 보임을 확인하였다.

### 3.3. Total Polyphenol contents

페놀은 식물 내에서 생산되는 2차대사의 산물로서 천연 항산화제로 사용되고 있다[32]. 정향 메탄을 추출물과 황련 열수 추출물을 9:1 비율 혼합물의 페놀 총 함량을 측정하기 위하여 Total Polyphenol contents을 실시하였다. Total Polyphenol contents는  $258.54 \pm 5.6$  mg TAE/g로(Table 3) Kim 등의 실험[33]에서 가장 높은 페놀 함량을 가진 자두 껍질 분말 시료의  $178.3 \pm 6.6$  mg TAE/g 보다 높은 함량을 나타낸다.

### 3.4. Reducing power assay

Reducing power assay는 ferric-ferricyanide ( $\text{Fe}^{3+}$ )혼합물이 수소를 공여하면서 유리 라디칼이 안정화되는 과정에서 ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ )로 전환되는 환원력을 흡광도 값으로 나타내는 방법이다[34]. 본 연구에서 사용한 정향 메탄을 추출물과 황련 열수 추출물을 9:1 비율 혼합물은 10, 100, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각  $0.15 \pm 0.02$ ,  $0.24 \pm 0.15$ ,  $0.78 \pm 0.45$ ,  $0.85 \pm 0.32\%$ 로 양성대조군 ascorbic acid 100  $\mu\text{g/mL}$ 의  $1.17 \pm 0.12\%$ 에 가까운 활성을 보였으며(Fig. 4), Song 등의 실험[35]에서 겨우살이 추출물과 칩뿌리 추출물과 비교했을 때 높은 활성을 보인다.

### 3.6. 세포 생존율 측정 (MTT assay)

정향 메탄을 추출물과 황련 열수 추출물 9:1 혼합물이 Raw 264.7 세포 생존율에 미치는 확인하기 위해 MTT assay를 실시하였다. 정향 황련

혼합 추출물을 농도 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 결과 농도 의존적으로 세포 생존율이 상승하였으며 각 농도에서  $112.6 \pm 5.6$ ,  $111.7 \pm 4.2$ ,  $115.1 \pm 7.4$ ,  $121 \pm 4.9$ ,  $128.2 \pm 5.0\%$ 의 세포 생존율을 확인할 수 있었다(Fig. 5.). Hong 등의 실험[36]과 비교하였을 때 혼합물이 농도 의존적으로 세포 생존율을 증가시키기에 농도 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 로 항염증 활성 평가 실험을 진행하였다.

### 3.7. NO 생성 저해 활성 분석

정향 메탄을 추출물과 황련 열수 추출물 9:1 혼합물의 항염증 활성을 평가하기 위해 Raw 264.7 세포에 LPS 처치를 통해 NO 생성을 유발하여 혼합물의 NO 생성 저해 활성 분석하였다(Fig. 6). Raw 264.7 세포에 LPS 처치를 통해 NO 생성을 유발하였을 때, LPS 단독 처리군에서 높은 NO 생성율을 보였으며 혼합물을 농도 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 결과, 각 농도에서  $86.19 \pm 7.7$ ,  $70.27 \pm 2.8$ ,  $55.86 \pm 4.5$ ,  $45.62 \pm 6.2\%$  활성을 나타내었다. 농도 의존적으로 NO 생성율을 저해함을 확인할 수 있었으며 Choi 등의 실험[37]에서 전나무 잎 추출물 50  $\mu\text{g/mL}$ 와 비교했을 때 혼합물의 항염증 활성이 우수함을 확인하였다.

### 3.8. IL-6 cytokine 저해 활성 측정

정향 메탄을 추출물과 황련 열수 추출물 9:1 혼합물의 IL-6 cytokine 저해 활성 측정을 위하여 Raw 264.7 세포에 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도의 혼합물을 전처리하고 LPS를 이용하여 염증 반응을 유도하였다. 세포 상층액의 IL-6 cytokine을 ELISA kit를 통해 측정하였다(Fig. 7). LPS를 처리하지 않은 군과 단독 처리군을 비교하였을 때  $64.2 \pm 4.0$ ,  $220.8 \pm 31.9$  ng/mL 발현량을 보였으며 염증 반응이 충분히 발현되었음을 확인하였다. 또한 혼합물 1, 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도 처리군에서 각각  $238.4 \pm 60.4$ ,  $153 \pm 21.7$ ,  $119.3 \pm 36.7$ ,  $109.8 \pm 8.9$  ng/mL의 발현량을 보이며 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 가장 낮은 발현량을 보였다. 이는 Kim 등의 실험[38]과 비교하였을 때, 다시마 뿌리 추출물보다 뛰어난 IL-6 저해 활성을 보이며 혼합물의 항염증 효능이 뛰어난을 시사하는 바이다.

### 3.9. Western blot을 통한 COX-2와 iNOS

#### 단백질 발현 확인

COX2와 iNOS는 염증 생성 과정에서 매개체 역할을 하는 효소[39]로 정향 메탄올 추출물과 황련 열수 추출물 9:1 혼합물의 단백질 발현 저해를 확인하기 위하여 Western blot을 실시하였다. 본 연구에서는 LPS를 처리하지 않은 군에서 단백질이 거의 발현되지 않았으나 LPS 단독 처리 군은 단백질 합성량이 크게 상승함을 보였다. 혼합물 100 µg/mL에서 각각 COX2는  $41.15 \pm 15.4\%$ , iNOS는  $12.35 \pm 1.71\%$  수준으로 매우 감소하였으며(Fig. 8) Kwak 등의 실험[40]에서 복숭아꽃 에탄올 추출물 100 µg/mL에서 대조군에 비하여 각각 COX2가 85.5%, iNOS가 60.9%로 감소한 것과 비교해보았을 때, 혼합물의 항염증 효능이 뛰어난 것을 확인하였다.

## 4. 결론

본 연구에서는 정향과 황련을 70% 에탄올, 100% 메탄올, 증류수로 추출하여 *Malassezia furfur*에서 용매별 추출물에 대한 항균 활성을 평가하였다. 각 추출물로 생육저지환을 확인하였을 때 정향 100% 메탄올 추출물과 황련 열수 추출물이 가장 뛰어난 효능을 보였으며 두 추출물을 혼합한 결과 9:1 비율의 혼합비가 24 mm의 생육저지환을 생성하여 최적의 효과를 나타내었다. 또한 혼합물의 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH assay, ABTS+ radical scavenging assay, Total polyphenol contents, reducing power assay을 실시한 결과 100-1000 µg/mL까지 우수한 항산화능을 보였으며 염증과 관련된 대식세포의 한 종류인 Raw 264.7 세포에서의 생존율을 확인했을 때, 100 µg/mL까지 독성을 나타내지 않았다. 염증 반응을 유도하는 LPS를 처리하여 NO의 생성 억제 효과를 확인한 결과 100 µg/mL에서 LPS 단독 처리군과 비교하여  $45.62 \pm 6.22\%$ 의 억제 효과가 있음을 확인하였다. 염증 반응을 일으킨다고 알려져있는 IL-6 cytokine 저해 활성을 확인한 결과 농도 의존적으로 저해 활성이 상승하며 100 µg/mL에서  $109.8 \pm 8.9$  ng/mL을 보였다. 염증 반응에 중요한 매개체로서 작용하는 COX2와 iNOS의 발현을 저해를 보기 위해 western blot을 실시하였고 혼합물 100 µg/mL 농도에서 각 단백질을  $41.15 \pm 15.4$ ,  $12.35 \pm$

1.71%로 감소시킴을 확인하였다.

이와 같은 결과를 종합하여 정향 100% 메탄올 추출물과 황련 열수 추출물 9:1 비율 혼합물은 항균 및 항산화, 항염증 활성이 우수하여 화장품의 천연소재로써 활용가능성이 높을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2022년도 중소벤처기업부의 기술개발사업 지원에 의한 연구입니다. [S3308484]

본 연구는 중소기업기술정보진흥원의 “창업성장기술개발사업(디딤돌, S3308484)”사업의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다.

## References

1. Y. M. Yoon, S. H. Bae, S. K. An, Y. B. Choe, K. J. Ahn and I. S. An, “Effects of Ultraviolet Radiation on the Skin and Skin Cell Signaling Pathways”, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol*, Vol.11, No.3 pp. 417-426, (2013).
2. S. M. Dang and E. S. Lee, “The Effect of a Scalp Type and Awareness on Self-scalp Management Behavior”, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol*, Vol.11, No.6 pp. 1147-1153, (2013).
3. M. S. Lee, J. S. Joung and D. Y. Park, “The Effects of Arctium lappa L. Root Extracts on the Scalp and Hair”, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol*, Vol.13, No.1 pp. 43-48, (2015).
4. J. S. Han, “Scalp Demodex alopecia have a decisive effect”, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol*, Vol.9, No.1 pp. 1, (2011).
5. J. Y. Um, B. M. Jin and Y. K. Cho, “Isolation and Identification of Antifungal Compounds against *Malassezia* species from *Cinnamomum cassia* Blume.”, *Korean Society of Cosmetics and Cosmetology*, Vol.10, No.3 pp. 331-344, (2020).
6. S. K. Cho, H. J. Kim, W. Y. Chung and

- E. J. Hwang, "A Scalp Keratin Detection Method Based on Atrous Convolution and Faster R-CNN for Diagnosis of Seborrheic Scalpitis", *KTCP*, Vol.27, No.9 pp. 440-445, (2021).
7. K. A. Seo, and S. H. Li, "A Study on the Anti-bacterial Effect and Dandruff Scalp Empovement of Malassezia furfur of Chamaecyparis obtusa", *Kor J Aesthet Cosmetol*, Vol.13, No.3 pp. 285-293, (2015).
8. I. H. Lee, M. J. Kim, J. H. Choi, C. H. Kim, and S. H. Choi, "Antifungal effect of bilobalide and ginkgolide extracted from leaves of Ginkgo biloba against Pityrosporum ovale", *KSBB Journal*, Vol.25, No.2 pp. 173-178, (2010).
9. Y. M. Ha, B. B. Lee, H. J. Bae, K. M. Je, S. R. Kim, J. S. Choi, and I. S. Choi, "Anti-microbial activity of grapefruit seed extract and processed sulfur solution against human skin pathogens.", *Journal of Life Science*, Vol.19, No.1 pp. 94-100, (2009).
10. J. M. Lee, and J. S. Kim, "The Effect of Shampoo and Mist on the Seborrheic Oil Scalp.", *Kor J Aesthet Cosmetol*, Vol.12, No.4 pp. 526-531, (2014).
11. H. Yang, K. H. Oh, and Y. C. Yoo, "Anti-inflammatory effect of hot water extract of aronia fruits in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.44, No.1 pp. 7-13, (2015).
12. H. Jeon, J. Y. Lee, S. H. Ko, Y. J. Lee, S. Y. Lee, H. J. Park, and T. Y. Shin. "Anti-inflammatory Effect of MeOH Extract of Cibotium barometz in IFN- $\gamma$  and LPS-stimulated Mouse Peritoneal Macrophage.", *Korean Journal of Pharmacognosy*, Vol.41, No.2 pp. 108-114, (2010).
13. R. G. Leuschner, and J. Zamparini, "Effects of spices on growth and survival of Escherichia coli 0157 and Salmonella enterica serovar Enteritidis in broth model systems and mayonnaise.", *Food Control*, Vol.13, No.6-7 pp. 399-404, (2002).
14. J. Jang, D. H. Kang, J. Yoon, and H. S. Kim, "Separation and Purification of Antimicrobial Substance from Syzygium aromaticum Merrill et Perry for Treatment of Microbial Vaginosis.", *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, Vol.33, No.4 pp. 285-292, (2018).
15. H. H. Leem, E. O. Kim, M. J. Seo, and S. W. Choi, "Antioxidant and anti-inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove (Eugenia caryophyllata Thunb.)", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.40, No.10 pp. 1361-1370, (2011).
16. N. Kim, and J. Kim, "Preparation of Hydrophobic Antimicrobial Compounds Encapsulated Nanoparticles Using Alkoxysilane-functionalized Amphiphilic Polymer Precursor and Their Antimicrobial Properties.", *Journal of Adhesion and Interface*, Vol.18, No.1 pp. 13-24, (2017).
17. Y. H. Kim, and B. S. Park, "The effect of eugenol on the induction of apoptosis in HSC-2 human oral squamous cell carcinoma.", *Journal of Korean Society of Dental Hygiene*, Vol.15, No.3 pp. 523-529, (2015).
18. S. H. Kim, T. Y. Shin, H. Y. Kim, Y. M. Lee, E. H. Lee, B. K. Shin, and H. M. Kim, "Inhibition of immediate allergic reaction by eugenol." *Yakhak Hoeji*, Vol.40, No.6 pp. 679-683, (1996).
19. H. K. Kim, and S. U. Hong, "The anti-inflammatory effects of Huang-Lyun (Coptidis Rhizoma, CR) on injured tissue after burn elicitation.:", *The Journal of Korean Medicine*, Vol.32, No.2 pp. 1-13, (2011).
20. E. H. Kim, Y. A. Jang, S. B. Kim, H. H. Kim, and J. T. Lee, "Antimicrobial, antifungal effect and safety verification using BCOP assay of extracts from Coptis



- japonica.”, *Journal of Applied Biological Chemistry*, Vol.61, No.3 pp. 297–304, (2018).
21. J. W. Lee, H. S. Han, and Y. J. Lee, “Anti-inflammatory effect of *Coptidis Rhizoma* extract.”, *The Korea Journal of Herbology*, Vol.29, No.5 pp. 83–90, (2014).
  22. S. K. Lee, I. Lee, S. H. Shin, E. Y. Kim, and B. C. Shin, “Effects of *Coptidis Rhizoma* on the Anti-inflammation and Motor Recovery in Photothrombotic Brain Infarction Model in Rats”, *The Korea Journal of Herbology*, Vol.24, No.1 pp. 179–189, (2009).
  23. M. S. Blois, “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical”, *Nature*, Vol.181, pp. 1199–1200, (1958).
  24. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay”, *Free Radical Biology Medicine*, Vol.26, No.9–10 pp. 1231–1237, (1999).
  25. Folin, O. and Denis, W. “On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents.”, *Journal of biological chemistry*, Vol.12, No.2 pp. 239–243, (1912).
  26. M. Oyaizu, “Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine”, *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, Vol.44, No.6 pp. 307–315, (1986).
  27. O. H. Lec, S. H. Jung, and J. Y. Son, “Antimicrobial activity of clove extract by extraction solvents.”, *J. Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol.33, No.3 pp. 494–499, (2004).
  28. J. H. Kim, S. J. Kwack, Y. K. Cho, B. K. Kim, J. G. Kim, E. Lee, and K. J. Kim, “The effect of *Coptidis rhizoma*, Chinese galls and phytoncide in *Malassezia furfur*.”, *Journal of Life Science*, Vol.25, No.7 pp. 748–756, (2015).
  29. E. J. Kim, J. Y. Choi, M. R. Yu, M. Y. Kim, S. H. Lee, and B. H. Lee, “Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants.”, *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.44, No.3 pp. 337–342, (2012).
  30. Y. M. Park, S. J. Kim, K. H. Jo, E. J. Yang, and S. T. Jung, “Anticariogenic and antioxidant activities from medicinal herbs.”, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.35, No.3 pp. 284–293, (2006).
  31. S. H. Shin, and S. M. Kan, “The antioxidation effect of brown algae extract.”, *Journal of the Korean Society of Cosmetology*, Vol.27, No.4 pp. 851–858, (2021).
  32. N. Y. Park, D. G. Han, GE-GE, M. J. Bae, H. J. Kim, S. G. Kim, E. Y. Choi, and B. J. An, “Verification of antioxidant activity from velvet bean (*Mucuna pruriens*) extract.”, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.49, No.1 pp. 9, (2023)
  33. M. Y. Lee, M. S. Yoo, Y. J. Whang, Y. J. Jin, M. H. Hong, and Y. H. Pyo, “Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels.”, *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.44, No.5 pp. 540–544, (2012).
  34. Y. H. Kim, Y. J. Lee, S. O. Park, S. J. Lee, and O. H. Lee, “Antioxidant compounds and antioxidant activities of fermented black rice and its fractions.”, *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.45, No.2 pp. 262–266, (2013).
  35. H. S. Song, Y. H. Park, S. K. Kim, W. K. Moon, D. W. Kim, and K. Y. Moon, “Downregulatory effect of extracts from mistletoe (*Viscum album*) and pueraria root (*Pueraria radix*) on cellular NF- $\kappa$ B activation and heir antioxidant activity.”, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.33, No.10 pp.

- 1594–1600, (2004).
36. J. H. Hong, E. S. Jang, M. C. Gil, G. W. Lee, and Y. H. Cho, “Anti-inflammatory Effects of *Rumohra adiantiformis* Extracts Fermented with *Bovista plumbea* Mycelium in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells.”, *Journal of Life Science*, Vol.33, No.6 pp. 471–480, (2023).
37. Y. J. Choi, M. H. Park, Y. S. Kim, and K. I. Jung, “Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Abies holophylla* leaf extract in LPS-induced RAW 264.7 cells.”, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol.9, No.6 pp. 569–577, (2020).
38. B. K. Kang, K. B. W. R. Kim, M. J. Kim, S. W. Bark, W. M. Pak, B. R. Kim, and D. H. Ahn, “Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Laminaria japonica* root on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells.”, *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.46, No.6 pp. 729–733, (2014).
39. Y. J. Surh, K. S. Chun, H. H. Cha, S. S. Han, Y. S. Keum, K. K. Park, and S. S. Lee, “Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation.”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol.480, pp. 243–268, (2001).
40. C. S. Kwak, and H. I. Choi, “In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extract and sequential fractions of flowers of *Prunus persica* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.”, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.44, No.10 pp. 1439–1449, (2015).