J. Soc. Cosmet. Sci. Korea
Vol. 50, No. 3, September 2024, 239-250

pISSN 1226-2587
eISSN 2288-9507
http://dx.doi.org/10.15230/SCSK.2024.50.3.239

매화, 금은화, 감국, 대나무 복합추출물(로얄테라티가드™)을 이용한 보습, 진정 및 항산화 효과

차 윤 정[*,†] · 김 성 재[**,†] · 김 운 하[*] · 박 서 연[**] · 하 서 은[**] · 이 승 지[**,††]

[*](주)제로투세븐
[**](주)인투바이오 C&I 센터

(2024년 7월 22일 접수, 2024년 8월 30일 수정, 2024년 9월 10일 채택)

Moisturizing, Soothing, and Antioxidant Effects from *Prunus mume* Flower, *Lonicera japonica* Flower, *Chrysanthemum indicum* Flower, and *Phyllostachys bambusoides* Complex Extracts (Royal TheraTea Guard™)

Youn Jeong Cha[1,†], Sung Jae Kim[2,†], Woon Ha Kim[1], Seo Yeon Park[2], Sea Win Ha[2], and Seung Ji Lee[2,††]

[1]Zero to Seven Inc., 18F, 76, Sangamsan-ro, Mapo-gu, Seoul 03926, Korea
[2]C&I Center, IN2BIO

(Received July 22, 2024; Revised August 30, 2024; Accepted September 10, 2024)

요 약: 본 연구에서는 외부 환경요인에 의한 피부 손상을 예방하기 위해 왕실의료의 치료법 중 내복약인 다음(茶飮)에서 피부 보호 효과에 유효한 의미가 있는 매화, 인동덩굴, 국화, 대나무 복합추출물(로얄테라티가드™, RTG)을 통해 피부 안전성, 항산화, 보습, 및 항염증 효과를 확인하였다. HaCaT 세포에서 세포독성 시험 결과, RTG 복합추출물은 0.125, 0.25, 0.5, 1% 농도에서 세포 생존율의 변화가 없었고, 인체 첩포 시험에서도 피부 자극지수 0.00점을 기록하여 피부 자극이 없는 성분임을 확인하였다. 항산화 효과는 497.83 μg GAE/g의 폴리페놀 함유량과 DPPH radical 소거 활성 평가를 통해 확인되었으며, catalase 활성 증가를 통해 피부의 산화 스트레스 감소 효과가 입증되었다. 염증 완화 효과는 미세먼지 처리 후 각질형성세포에서의 염증 완화 및 tape stripping을 통한 피부 홍반 감소를 확인하였다. 보습 효과는 히알루론산 합성 효소(HAS)2, 3와 피부 장벽 인자 keratin1의 발현 증가 및 피부 수분 함량 증가와 피부 거칠기 감소를 통해 확인되었다. 이상의 결과로, RTG 복합추출물은 외부환경 요인으로 인한 피부 손상을 방지하는 화장품 소재로 활용될 수 있음을 시사한다.

Abstract: In this study, we investigated the skin safety, antioxidant, moisturizing, and anti-inflammatory effects of a composite extract of *Prunus mume* flower, *Lonicera japonica* flower, *Chrysanthemum indicum* flower, and *Phyllostachys bambusoides* (Royal TheraTea Guard™, RTG), which has been used as an internal medicine in the royal medical treatment for preventing skin damage caused by external environmental factors. In a cytotoxicity test on HaCaT cells, RTG complex extract showed no change in cell viability at concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, and 1%, and a skin irritation index of 0.00 in a human patch test, confirming that it is non-irritating to the skin. The antioxidant effects was confirmed by the presence of 497.83

†주 저자 (e-mail: cyj1122@goongbe.com)
call: 02-740-3632
(e-mail: lab@in2bio.com)
call: 031-5183-5009
††교신저자 (e-mail: lab@in2bio.com)
call: 031-5183-5009

μg GAE/g of polyphenols and increased DPPH radical scavenging activity, with a significant increase in catalase activity in the stratum corneum, showing potential as an antioxidant that protects cells from oxidative stress. The anti-inflammatory effects was observed through reduced erythema in skin stimulated by tape stripping and treated with fine dust in keratinocytes. The moisturizing effects was shown by increased expression of hyaluronan synthase (HAS)2, 3 and keratin1 in keratinocytes treated with fine dust compared to the control group, as well as increased skin moisture content and decreased skin roughness. These results suggest RTG can be used as a cosmetic ingredient to prevent skin damage caused by external environmental factors.

Keywords: *Royal TheraTea Guard™, skin safety, antioxidant, skin moisturizing, anti-inflammatory*

1. 서 론

신체의 가장 크고 가장 바깥쪽 기관인 피부는 환경적 요인에 대해 물리적, 화학적, 면역학적 장벽 역할을 한다. 피부는 환경적 스트레스 요인에 장기간, 반복적으로 노출되면 정상적인 방어 능력을 초과할 때마다 피부 장벽 기능이 교란되어 다양한 피부 질환이 발생하게 된다[1]. 자외선(UV)은 가장 많이 연구된 환경 위험 요소 중 하나이며, 또 다른 주요 요소로는 대기 오염이 있다[2]. 자외선과 대기 오염 물질 등의 환경적 스트레스는 효소적(glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase and catalase) 및 비효소적(vitamin E, vitamin C and glutathione) 항산화 능력의 고갈을 초래한다. 자유 라디칼 및 반응성 산소 종이 생성되어 지질이 풍부한 원형질막과 상호 작용하여 지질 과산화 반응 연쇄를 시작한다. 또한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 염증 매개체의 방출을 자극하여 호중구 및 기타 식세포의 축적을 초래하며, 이들 세포는 추가로 자유 라디칼을 생성하여 악순환을 초래한다[1,3]. ROS 생성에 의한 tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), interleukin 1α (IL-1α) 같은 전염증성 사이토카인의 증가는 아토피 피부염, 여드름, 건선 등의 염증성 피부 질환의 악화를 초래한다[4]. 또한 피부의 신진대사를 저하시켜 피지조절 기능을 약화시키며 가려움증, 건조증 등의 피부 문제를 유발한다[5]. 환경 스트레스부터 피부를 보호하기 위한 방안으로 노출을 줄이는 것 외에도 잠재적인 보호 전략은 피부의 수분 보유량을 증가시키고 수분의 손실을 예방하며 피부 장벽을 복구하고, 항산화제를 통한 ROS 제거 및 소거, 항염증 물질을 사용한 염증 감소 등에 중점을 두어야 한다[2,3,6]. 본 연구에서는 점차 증가하고 있는 외부환경 요인에 의한 피부손상을 방지하고자 피부의 항산화 능력을 강화하고 피부를 보호하며 동시에 피부 수분 유지 및 염증반응을 억제 조절할 수 있는 천연물을 탐색하여 화장품 소재로써 활용 가능성을 알아보고자 하였다. 피부 손상을 방지하는 천연물은 왕실의료의 치료법 중 내복약인 다음(茶飮)에서 찾고자 하였다. 다음(茶飮)은 조선 왕들의 가벼운 증상 치료를 위해 자주 이용되었고, 임상적인 치료효과가 뚜렷하여 탕제에 버금가는 빈도로 사용된 처방이다[7]. 본 실험에 사용된 소재는 다음(茶飮)에 사용되는 차(茶)제제에서 피부 보호 효과에 유효한 의미가 있는 금은화, 매화, 대나무, 국화를 이용하였고 단일 천연 물질의 효능을 이용하기보다 천연물의 혼합을 통한 상호작용으로 효과가 상승된다는 연구 보고를 통해 복합추출물에 대한 효능을 확인하고자 한다[8].

매화나무(*Prunus mume, P. mume*)는 봄을 미리 알리는 나무라 하여 춘고초라 하고 장미목, 장미과, 벚나무속에 속한다. 매화나무의 꽃은 차로서도 애용되며 높은 폴리페놀을 함유하고 있고, 항산화, 콜라겐 분해효소 억제 효과가 있으며[9-11], 꽃봉오리 추출물은 멜라닌 생합성을 억제하는 효과가 있다[12]. 금은화(*Lonicera japonica* flower, *L. japonica* flower)는 인동과(Caprifoliaceae)에 속하는 인동덩굴(*L. japonica*)의 꽃으로 항산화, 항염증, 항알러지 및 아토피 완화 등이 보고된 바 있다[13-16]. 감국(*Chrysanthemum indicum* flower, *C. indicum* flower)은 9 ~ 10 월에 개화하는 가을꽃으로 국화목, 국화과, 산국속에 속하는 꽃으로 염증과 피부재생에 뛰어난 효과가 있는 것으로 알려져 있다[17,18]. 또한 UVB에 의한 세포 사멸과 광노화, 활성산소 증가 억제 효과가 있고[19], 전통적으로 다양한 면역관련 질환과 고혈압 예방, 다양한 감염성 질환의 예방 및 치료에도 사용한 것으로 알려져있다[17]. 대나무는 예로부터 우리나라를 비롯한 아시아에서 자생하는 화본과(Gramineae)에 속하는 식물로 생장력이 매우 뛰어난 특징이 있으며 우리나라에서 자생하는 대표적인 죽종으로 왕대(*Phyllostachys bambusoides, P. bambusoides*)와 솜대(*Phyllostachys nigra* Munro var. *henonis* Stapf ex Rendle)가 있다[20]. 대나무의

잎과 줄기에는 다양한 폴리페놀과 아미노산, 실리카 등을 함유하고 있고 항염, 항산화, 항노화 및 항균 활성이 높은 것으로 알려져 있다[21,22]. 이밖에도 항산화, 항비만, 대사증후군 억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다[23].

4 가지 소재는 1 주 일간 용매에 침지시킨 후 압력차를 통해 속이 비어 있는 대나무 내부로 이동시킴으로써 유효성분을 효과적으로 추출하는 기술을 적용하여 복합추출물(로얄테라티가드™, Royal TheraTea Guard™, RTG)을 얻었다. 본 연구에서는 RTG 복합추출물이 피부 손상을 방지하여 피부를 보호하는 기능으로 피부 안전성, 항산화, 항염, 보습효과를 평가하고자 하며 화장품 원료로서의 가능성을 확인하고자 인체 피부와 함께 *in vitro*에서 각질형성세포에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 재료

미세먼지(PM_{10})는 Sigma-Aldrich (USA)에서 European reference material CZ100 (ERM-CZ100)을 구입하였으며, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Welgene, Korea)에 현탁하여 50 ㎍/mL 농도로 만들어 사용하였다. 세포 생존능 측정 및 배양을 위해 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin은 Welgene (Korea)에서 구입하였으며, cell viability assay kit (WST-8)는 BioMAX (Korea)에서 구입하여 사용하였다. 매화, 금은화, 감국은 제주자원식물연구소(Korea)에서 구입하였고, 대나무는 담양 대나무나라(Korea)에서 구입한 왕대(*P. bambusoides*)를 사용하였다.

2.2. 추출

추출물은 내부공간이 손상되지 않도록 절단된 대나무 줄기(*P. bambusoides* stem) 4 kg, 금은화(*L. japonica* flower) 125 g, 매화(*P. mume* flower) 12.5 g, 감국(*C. indicum* flower) 125 g, 대나무 잎(*P. bambusoides* leaf) 500 g과 함께 25 kg 중량의 10% 1,2-hexanediol (Symrise, Germany)에 내압 용기에서 1 주 일간 침지시켰다. 1 주 일간의 침지가 완료 되면 감압펌프(A-1000S, EYELA, Japan)를 이용하여 대나무 내부의 기체를 제거해 주기 위해 0 ~ 0.1 bar로 24 h 동안 감압하였다. 감압 후 추출기 내부를 2 ~ 3 bar로 가압하여 24 h 동안 압력을 유지시켰다. 이러한 감압/가압 공정을 1 주 일간 반복하여 대나무 추출물을 회수하고 프리필터로 (AF-101H, HYUNDAI MICRO, Korea) 감압여과 여과하고 1 주 일간 상온에서 숙성 한 후 0.45 ㎛ 멤브레인(Cartridge Filters 0.45 ㎛ pore size, hydrophilic PVDF, 90 mm membrane, Durapore®, USA)을 사용하여 여과해 제작하였다. 제작된 매화, 금은화, 감국, 대나무 복합추출물은 RTG 복합추출물(Royal TheraTea Guard™)로 명명하였다. 각 추출법에 따른 추출 효율을 비교하기 위하여 동일한 추출 조건에서 감압/가압공정을 제외한 일반 추출물을 제작하였다.

2.3. 아미노산 분석

본 연구의 RTG 복합추출물의 아미노산의 함량을 알아보기 위해 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)를 이용하여 분석하였다. TLC plate (TLC Silica Gel 60 F_{254}, Merck KGaA, Germany)에 4 ㎕의 일반 추출물과 RTG 복합추출물을 점적하고 건조한 후 butanol (DAEJUNG, Korea), glacial acetic acid (DUKSAN, Korea), water (DAEJUNG, Korea) (3 : 1 : 1 v/v) 전개용매를 이용하여 RTG 복합추출물을 전개 시켰다. 그 후 105 ℃에서 5 min 간 건조 후 ninhydrin (DUKSAN, Korea) solution (0.25 g of ninhydrin dissolved in 12.5 mL of ethanol)을 분사하여 105 ℃에서 5 min 간 추가로 건조시켜 아미노산을 염색해 분석하였다.

2.4. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 일반 추출물과 RTG 복합추출물에 각각 20 ㎕에 10% Folin-Ciocalteau's phenol reagent (JUNSEI, Japan)를 40 ㎕ 처리한 후 700 mM의 sodium carbonate (Na_2CO_3, DUKSAN, Korea)용액을 140 ㎕첨가하여 35 ℃에서 30 min 간 정치시켰다. 이후 spectrophotometer (SPECTRAmax Microplate Spectrophotometer, Molecular Devices, USA)를 사용하여 765 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며 표준물질은 gallic acid (DUKSAN, Korea)를 사용하여 표준곡선에 의한 기울기와 절편 값을 구한 후 흡광도 값을 대입하여 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

2.5. DPPH Radical 소거 활성 측정

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical소거 활성 측정은 DPPH radical 시약(Sigma-Aldrich, USA)을 methanol (Merck KGaA, Germany) 과 혼합하여 0.15 mM의 농도로 제조하였으며 일반 추출물과 RTG 복합추출물에 각각 1 : 1 (v/v)으로 혼합한 후 35 ℃ 암실에서 30 min 간 반응시켰

다. 이후 518 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical 소거율을 계산하였다.

2.6. 세포 배양

인간 피부각질형성세포주(HaCaT, human keratinocyte)는 경희대학교 유전공학과 분자피부생명공학 실험실(Korea)에서 분양받아 사용하였다. 본 실험에 이용한 각 세포의 배양은 10% FBS과 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37 ℃, 5% CO_2 incubator에 적응시켜 계대 배양 하였다.

2.7. 세포 생존능 평가

세포 생존능은 WST-8 분석법을 이용하였다. 1×10^4 cells/well의 HaCaT 세포를 96 well plate에 분주하여 24 h 동안 배양한 후 RTG 복합추출물을 각각 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 및 1%의 농도로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. WST-8 시약을 첨가하여 1 h 동안 37 ℃, 5% CO_2 incubator (BB15 CO_2 incubator, Thermo Fisher Scientific, Germany)에서 배양하였다. ELISA reader (SPECTRAmax Microplate Spectrophotometer, Molecular Devices, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. Quantitative Real Time PCR

Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), macrophage-derived chemokine (MDC), thymus and activation regulated chemokine (TARC), hyaluronan synthase 2 (HAS2), hyaluronan synthase 3 (HAS3), keratin1 및 IL-6유전자 발현을 보기 위하여 HaCaT 세포의 total RNA extraction reagent (RNAiso PLUS, Takara, Japan)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 AccuPower RT PreMix (Bioneer, Korea)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 1 μL cDNA, 10 pmol primers, 10 μL SYBR Green PCR supermix (Bio Rad, USA) 혼합하여 반응액을 제조하였다. 반응액을 제조 후 CFX96 real-time system (Bio Rad, USA)를 이용하여 95 ℃에서 5 min 동안 primary denaturation 한 후 denaturation, annealing, polymerization을 각각 95 ℃에서 30 s, 60 ℃에서 30 s, 72 ℃에서 15 s로 총 40 cycle을 수행하였고, 매 cycle이 끝난 후 형광강도를 측정하였다. PCR 결과는 각 결과 별 melting curve로 검증하였다. 각 유전자의 threshold cycle (Ct)값을 GAPDH의 Ct값으로 표준화한 후, Ct값의 변화량을 비교 분석하여 유전자 발현량을 확인하였고, 유전자의 primer는 Table 1과 같다.

2.9. 피부 안전성 확인 시험

RTG 복합추출물의 안전성을 확인 위해 finn chamber를 이용한 인체 첩포 시험을 실시하였다. 시험은 대한피부과학연구소 생명윤리위원회로부터 IRB 승인(KDRI-IRB-240119)을 받아 수행하였다. 피시험자 선정기준에 부합하고 제외기준에 해당되지 않는 연구 대상자 31 명(남자 1 명, 여자 30 명, 평균 연령: 49 ± 8)을 대상으로 착색이나 피부 손상이 없는 평편한 등 부위에 첩포 시험을 실시하였다. 시험 부위를 70% ethanol로 세정 후 15 μL의 시료를 24 h 동안 첩포 시켰다. 24 h 후에 패치를 제거하고, 제거 30 min, 48 h, 72 h 후 시험 부위를 육안 판독한다. 피부 반응 육안 평가는 ICDRG의 판정기준과 PCPC의 안전성 평가 가이드라인을 응용한 판정 기준에 따라 판독하며 피부 반응 점수를 이용하여 다음 계산식으로 자극 지수를 계산한다.

$$\text{자극지수} = \frac{\Sigma \text{irritaion score at 24, 48 and 72 h}}{\text{Total number of observations}}$$

평균 자극 지수를 산출한 후 Draize Dermal Classification System 및 Environmental Protection Agency (EPA) Standard

Table 1. The List of Primers Used in This Study

Gene	Forward primer	Reverse primer
CYP1A1	5'-AGTACCTCAGCCACCTCCAAG-3'	5'-GAGGTCTTGAGGCCCTGATT-3'
MDC	5'-CAGCACGAGGGACCAATGTG-3'	5'-CTTGGGGTCCGAACAGATGG-3'
TARC	5'-ACTGCACTCCTGGTTGTCCT-3'	5'-AAGGTTAGCAACACCACGCC-3'
HAS2	5'-GTCCCTACCGAGTCTCTTCT-3'	5'-TTTTTAAGTTTCCGCTTCTG-3'
HAS3	5'-GGTTGGACCTACAAGGAGGC-3'	5'-GGTTCATGCTGGTGTCCTCA-3'
IL-6	5'-TAACAGTTCCTGCATGGGCGGC-3'	5'-AGGACAGGCACAAACACGCACC-3'
Keratin-1	5'-ATTTCTGAGCTGAATCGTGTGATC-3'	5'-CTTGGCATCCTTGAGGGCATT-3'
GAPDH	5'-ATGGAAATCCCATCACCATCTT-3'	5'-CGCCCCACTTGATTTTGG-3'

Procedure Dermal Classification System을 응용한 다음 결과 판정표에 따라 자극성의 정도를 판정한다.

자극 지수		자극성 평가
0 ≤	< 0.02	비자극 non-irritancy
0.02 ≤	< 0.25	저자극 low irritancy
0.25 ≤	< 1	경자극 slight irritancy
1 ≤	< 2.5	중자극 moderate irritancy
2.5 ≤		강자극 severe irritancy

2.10. 피부 항산화 지수 개선 효능 평가 시험

RTG 복합추출물에 대하여 피부 각질층 항산화 효과를 평가를 위해 피부 각질층을 채취하여 각질층내 항산화 활성(catalase activity)를 평가하였다. 시험은 대한피부과학연구소 생명윤리위원회로부터 IRB 승인(KDRI-IRB-240227)을 받아 수행하였다. 피시험자 선정기준에 부합하고 제외기준에 해당되지 않는 연구 대상자 22 명(남자 1 명, 여자 21 명, 평균 연령: 51 ± 9)을 대상으로 시험 제품을 아침, 저녁 1 일 2 회씩 안면부에 2 주간 도포하였다. 도포 개시전과 도포 2주 후 항온, 항습조건에서 Corneofix D100 (Minolta, Japan)을 이용하여 시험 부위의 각질을 채취하고 catalase assay kit (K733-100, Biovison, USA)를 통해 항산화 활성을 평가하였다. 시료 적용 부위는 비익(alare)에서의 수평선과 동측 동공중심선(mid-pupillary line)의 교차 지점으로 미온수로 세정한 다음 항온항습실에서 30 min 후 각질을 채취하여 항산화 활성을 분석하고 피부 각질층 항산화 효과를 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{개선율(\%)} = \sum_{k=1}^{n}\left(\frac{k^{th}\text{ 연구 대상자 시험 후 측정치} - k^{th}\text{ 연구 대상자 시험 전 측정치}}{k^{th}\text{ 연구 대상자 시험 전 측정치}} \times 100\right)/n$$

2.11. 물리적 자극에 의해 손상된 피부 진정 효능 평가 시험

RTG 복합추출물에 대하여 외부 자극에 의해 장벽이 손상된 피부에 대한 진정 효과를 평가 위해 Tewameter TM-300 (Courage+Khazaka, Germany)와 Chromameter CR-400 를 이용하여 경피수분손실량(TEWL)과 피부 붉은기(a-value)를 측정하였다. 시험은 대한피부과학연구소 생명윤리위원회로부터 IRB 승인(KDRI-IRB-240226)을 받아 수행하였다. 피시험자 선정기준에 부합하고 제외기준에 해당되지 않는 연구 대상자 21 명(남자 1 명, 여자 20 명, 평균 연령: 48 ± 6)을 대상으로 시험 제품을 아침, 저녁 1 일 2 회씩 전완부에 2 일간 도포하였다. Scotch® Magic™ Invisible Tape로 stripping하여 피부 자극을 일으켜 홍반을 유발하였다. 물리적 자극 직후 2 개의 시험 부위를 무작위로 시료 사용 부위, 무처치 부위로 선정하고 물리적 자극 전, 물리적 자극 후, 24 h 후, 48 h 후 항온, 항습조건에서 피부 수분 손실량을 측정하여 피부 회복 과정을 평가하고 피부색 측정을 통해 붉은기 변화를 평가하였다. 시험 부위는 전완부의 손목으로부터 10 cm 이상 떨어진 지점으로 미온수로 세정한 다음 항온항습실에서 30 min 후 시료 사용 부위, 무처치 부위 각각 TEWL과 a-value를 측정하였다.

$$\text{TEWL변화량} = \sum_{k=1}^{n}(k^{th}\text{ 연구 대상자 물리적 자극 직후 측정값} - k^{th}\text{ 연구 대상자 시료 사용 후 측정값})/n$$

$$\text{a-value 변화량} = \sum_{k=1}^{n}(k^{th}\text{ 연구 대상자 물리적 자극 직후 측정값} - k^{th}\text{ 연구 대상자 시료 사용 후 측정값})/n$$

2.12. 피부 수분 함량 및 거칠기 개선 시험

RTG 복합추출물에 대하여 피부 수분 함량과 피부 거칠기 개선 평가를 위해 Corneometer® CM 825 와 Antera 3D CS (Miravex, Ireland)의 피부 거칠기 (Roughness, Texture: small, A.U.)를 이용하여 측정하였다. 시험은 대한피부과학연구소 생명윤리위원회로부터 IRB 승인(KDRI-IRB-240225)을 받아 수행하였다. 피시험자 선정기준에 부합하고 제외기준에 해당되지 않는 연구 대상자 22 명(남자 1 명, 여자 21 명, 평균 연령: 51 ± 9)을 대상으로 시험 제품을 아침, 저녁 1 일 2 회씩 안면부에 2 주간 도포하였다. 도포 개시전과 도포 2 주 후 항온, 항습조건에서 피부의 정전용량을 측정하여 피부 수분량을 평가하고 피부의 3 차원 형상 이미지로부터 데이터를 추출하고 피부 거칠기 개선 정도를 수량화하여 피부 변화를 분석하였다. 수분 함량 측정은 비익(alare)에서의 수평선과 동측 동공중심선(mid-pupillary line)의 교차 지점을 측정하였고 거칠기 측정은 비익(alare)에서의 수평선과 동측 동공중심선(mid-pupillary line)의 교차 지점을 포함한 6 × 6 cm 크기로 구획하고 미온수로 세정한 다음 항온

항습실에서 30 min 후 수분 함량 및 거칠기를 측정하였다.

수분함량 개선율(%)=

$$\sum_{k=1}^{n}\left(\frac{k^{th}\text{ 연구 대상자 시험 후 측정치} - k^{th}\text{ 연구 대상자 시험 전 측정치}}{k^{th}\text{ 연구 대상자 시험 전 측정치}}\times 100\right)/n$$

거칠기 개선율(%)=

$$\sum_{k=1}^{n}\left(\frac{k^{th}\text{ 연구 대상자 시험 전 측정치} - k^{th}\text{ 연구 대상자 시험 후 측정치}}{k^{th}\text{ 연구 대상자 시험 전 측정치}}\times 100\right)/n$$

2.13. 통계처리

본 연구에서 얻어진 실험결과는 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation; SD)로 표기하였고, student's *t*-test로 통계학적 유의성을 검증하였다($p < 0.05$). 인체적용시험은 paired *t*-test, wilcoxon signed rank test를 이용하여 분석하였다. 분석 결과 *p*-value가 0.05 미만인 경우, 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. RTG 복합추출물의 아미노산 및 총 폴리페놀 함량

RTG 복합추출물의 아미노산을 확인하기 위하여 감압/가압 공정을 거치지 않은 일반 추출물과 RTG 복합추출물을 각각 TLC로 전개하고 ninhydrin으로 아미노산을 염색하였다. 실험 결과, 일반추출물과 RTG 복합추출물을 비교하였을 때 RTG 복합추출의 아미노산의 띠가 더 진하게 검출되어 아미노산의 총량이 더 많다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 감압/가압 공정을 통하여 추출방법이 일반적인 추출물보다 아미노산을 효과적으로 추출할 수 있었다(Figure 1). 폴리페놀 추출 효율을 확인하기 위하여 실험을 수행하였다. 실험 결과 일반 추출의 경우 폴리페놀의 양은 272.86 μg GAE/g, 감압/가압 공정이 적용된 RTG 복합추출물의 경우 폴리페놀의 양은 497.83 μg GAE/g로 약 2 배가량 높았다. 그러므로 감압/가압 처리를 통해 대나무 내부로 용매를 이동시켜 추출하는 방법이 일반 추출방법보다 뛰어남을 확인할 수 있었다(Table 2). 일반적인 추출이 진행되기 위해서는 용매가 물질의 내부로 침투된 후 물질과 용매의 용해도, 확산 등과 같은 물리, 화학적 거동이 동반되어야 한다. 식물과 같은 원물에서 추출을 원활하고 빠르게 하는 방법으로는 원물을 분쇄하여 표면적을 증가시키고, 용해도가 높은 용매를 사용하고, 용매에 흐름을 주는 등 다양한 방법이 있다[24]. 유체는 압력이 높은 곳에서 낮은 곳으로 이동한다. 감압을 통하여 대나무 내부의 기체를 제거한 후 가압하면 대나무 내부의 압력이 외부보다 현저하게 감소되게 된다. 따라서 외부에서 내부로 추출 용매가 유입되게 되는 것이다. 이 과정에서 대나무의 목질부를 용매가 통과하게 되는데 통과 과정에서 목질부의 성분들을 용매와 함께 내부와 외부의 압력이 동일 할 때까지 내부로 이동된다. 즉, RTG 복합추출물의 아미노산 함량과 폴리페놀의 함량차이는 대나무 줄기 외부에 있는 추출물이 내부와의 압력 차이에 의해 내부로 이동하면서 세포 사이사이를 통과하며 아미노산과 폴리페놀과 같은 물질들을 내부로 이동시키면서 발생하는 효과로 사료된다. 또한 가압 과정에서 Henry의 법칙에 의해 압력이 증가함에 따라 용매의 기체 포화도가 증가하여 기체가 용매뿐만 아니라 원물의 내부로 더 많이 녹아들게 되고 급격히 압력을 내리는 감압과정에 의해 기체포화도는 감소하게 된다[25]. 감소한 기체포화도에 의해 원물과 용매에 녹아있는 기체들이 팽

Figure 1. Thin layer chromatography of normal extracts and RTG extracts.

Table 2. Total Polyphenol Contents of Normal Extracts and RTG Extracts

	Total polyphenol (μg GAE/g)
Normal extracts	272.86
RTG extracts	497.83

창하며 공기방울을 형성시키고 발생한 공기방울이 터지면서 발생되는 전단응력에 의해 원물인 매화, 금은화, 감국, 대나무의 추출에 영향을 미쳤을 것으로 예상된다[26,27].

3.2. RTG 복합추출물의 DPPH Radical 소거 활성

일반 추출물과 RTG 복합추출물의 항산화 효능의 차이를 확인하기 위하여 DPPH radical 소거 활성을 살펴보았다. 그 결과, 일반추출물과 RTG 복합추출물의 항산화 효과가 농도 의존적으로 높아짐을 확인할 수 있었다. 또한, 두 추출물을 비교하였을 때 일반 추출물보다 감압/가압공정을 적용한 RTG 복합추출물에서 항산화 효과가 우수함을 확인할 수 있었다(Figure 2). 따라서 앞선 아미노산, 폴리페놀 실험 결과와 항산화 효과를 종합하였을 때 일반적인 추출방법으로 제작한 추출물보다 감압/가압 추출공정을 적용하여 제작한 RTG 복합추출물이 우수함을 증명할 수 있었다.

3.3. RTG 복합추출물의 HaCaT 세포에 대한 독성

HaCaT 세포에 RTG 복합추출물을 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1%의 농도로 처리하여 24 h 동안 배양 한 후, 세포 생존율을 관찰하였다. 그 결과, HaCaT 세포에서 control군의 생존율이 100% 일 때, RTG 복합추출물 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1% 농도에서는 유의성 있는 세포 독성이 관찰되지 않았다(Figure 3). 따라서, RTG 복합추출물의 미세먼지(PM_{10})로 인한 피부 보호 효과를 확인하기 위하여 1% 이하의 농도에서 실험을 진행하였다.

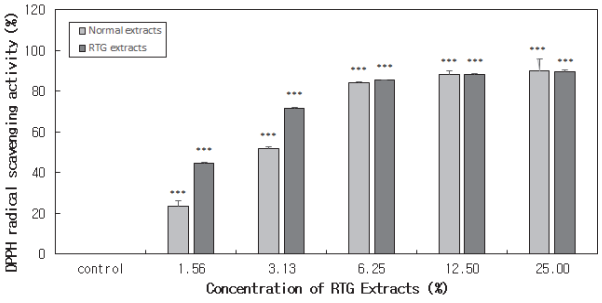

Figure 2. DPPH radical scavenging activity of normal extracts and RTG extracts at various concentration (N = 3). $^{***}p < 0.001$ significant as compared to control.

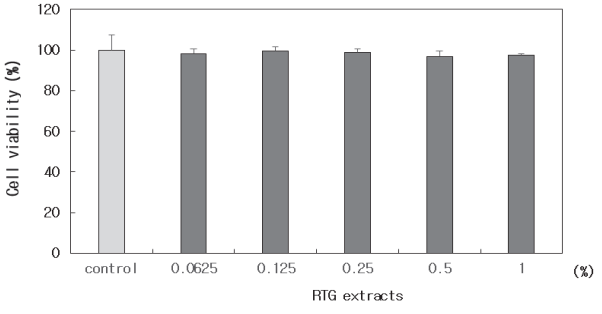

Figure 3. The cytotoxicity of RTG extracts in HaCaT cells. The cell viability was measured by WST-8 assay. HaCaT cells were incubated with or without RTG extracts as indicated doses for 24 h.

3.4. HaCaT 세포에서 미세먼지 자극에 대한 CYP1A1 mRNA 발현증가

HaCaT 세포에 미세먼지 현탁액을 25, 50, 100 μg/mL의 농도로 처리하여 4 h 동안 배양한 후, 미세먼지에 의해 활성화되는 CYP1A1 mRNA 발현을 관찰하였다. 그 결과, HaCaT 세포에서 미세먼지를 처리한 세포는 농도 의존적으로 유의성 있는 CYP1A1 mRNA 발현이 증가되었다(Figure 4). 따라서, 미세먼지로 인한 CYP1A1 mRNA 발현이 증가됨을 확인하기 위하여 50 μg/mL의 농도를 선정하여 모든 분석에 적용하였다.

3.5. HaCaT 세포에서 미세먼지로 인한 염증성 사이토카인(MDC, TARC, IL-6) mRNA 발현에서 RTG 복합추출물의 효과

HaCaT 세포에 RTG 복합추출물을 0.25, 0.5, 1%의 농도로 20 h 전처리하고, 미세먼지(50 μg/mL)로 4 h 동안 자극 후, 아토피 피부염에 관련이 있는 염증성 사이토카인인 MDC, TARC 및 IL-6 mRNA 발현을 관찰하였다. 그 결과,

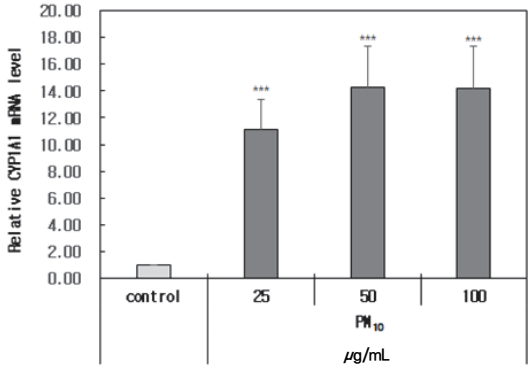

Figure 4. The effects of PM_{10} on CYP1A1 mRNA expression in HaCaT cells. The CYP1A1 mRNA expression were measured by Quantitative real time PCR. HaCaT cells were incubated with or without PM_{10} as indicated doses for 4 h (N = 3). $^{***}p < 0.001$ significant as compared to control.

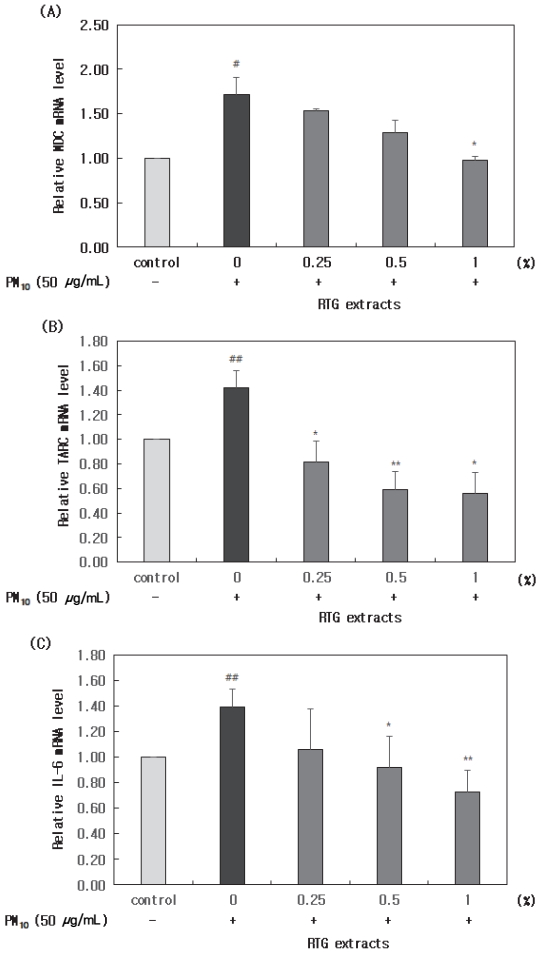

Figure 5. The effects of RTG extracts on PM-induced pro-inflammatory cytokines in HaCaT cells. The mRNA expression of (A) MDC and (B) TARC (C) IL-6 cytokines were measured by Quantitative real time PCR. HaCaT cells were pre-treated with RTG extracts for 20 h, and then incubated with PM_{10} as indicated doses for 4 h (N = 3). $^{\#}p < 0.05$ and $^{\#\#}p < 0.01$ compared with control, $^{*}p < 0.05$ and $^{**}p < 0.01$ compared with PM_{10} 50 μg/mL.

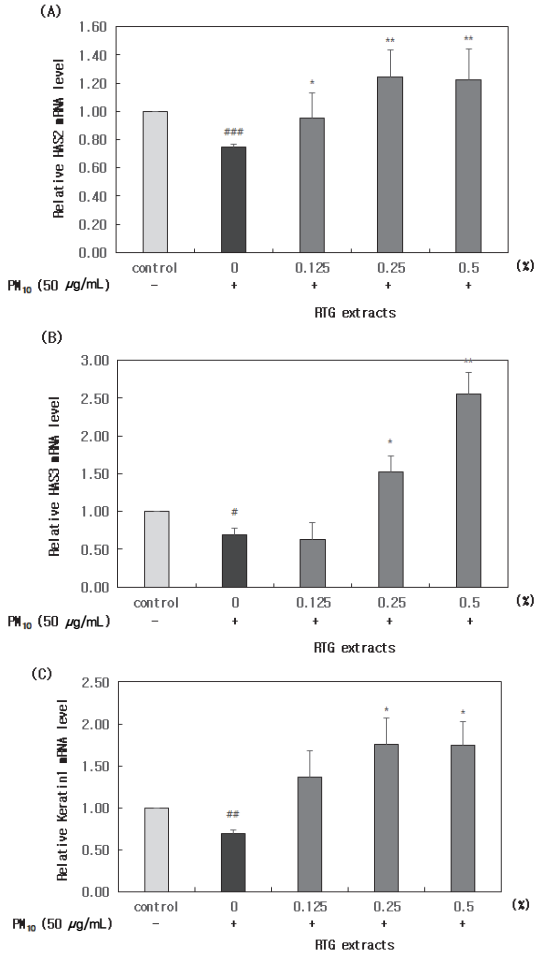

Figure 6. The effects of RTG extracts on PM-induced HAS2, 3 and keratin-1 mRNA in HaCaT cells. The mRNA expression of (A) HAS2, (B) HAS3 (C) keratin-1 were measured by Quantitative real time PCR. HaCaT cells were pre-treated with RTG extracts for 20 h, and then incubated with PM_{10} as indicated doses for 4 h (N = 3). $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$ and $^{\#\#\#}p < 0.001$ compared with control, $^{*}p < 0.05$ and $^{**}p < 0.01$ compared with PM_{10} 50 μg/mL.

RTG 복합추출물 처리군에서 미세 먼지 처리에 의해 증가된 MDC, TARC 및 IL-6 mRNA 발현량이 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다(Figure 5).

3.6. HaCaT 세포에서 미세먼지로 인한 피부보습(HAS2, 3) 및 피부장벽(Keratin-1) mRNA 발현에서 RTG 복합추출물의 효과

HaCaT 세포에 RTG 복합추출물을 0.125, 0.25, 0.5%의 농도로 20 h 전처리 하고, 미세먼지(50 μg/mL)로 4 h 동안 자극 후, 피부보습인자인 HAS2, 3 및 피부장벽 인자인 keratin-1 mRNA 발현을 관찰하였다. 그 결과, RTG 복합추출물 처리군에서 미세먼지 처리에 의해 감소된 HAS2, 3 및 keratin-1 mRNA 발현량이 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다(Figure 6).

3.7. 인체 첩포 시험에 의한 피부 자극 평가 결과

총 31 명의 연구 대상자를 대상으로 RTG 복합추출물에 대한 피부자극 유발여부를 확인하기 위하여 인체 첩포 시험을 실시하였으며 중도탈락자 없이 31 명의 연구 대상자

가 모두 시험을 완료하였다. 피험자들의 피부 반응 점수를 이용하여 자극 지수를 산출한 결과 피부자극 지수 0.00점으로 RTG 복합추출물은 피부자극을 유발하지 않는 성분임을 확인하였다(Table 3).

3.8. 피부 항산화 지수 개선 효능 평가 시험

총 2 주간 22 명의 연구 대상자를 대상으로 RTG 복합추출물의 항산화 효과를 실시하였으며 중도탈락자 없이 22 명의 연구 대상자가 모두 시험을 완료하였다. 피부 각질층 내 항산화 활성(catalase activity)을 측정한 결과 시료를 사용하기 전 부위의 항산화 활성은 19.78 ± 6.63, 시료를 2 주 사용한 후 항산화 활성은 24.16 ± 6.95로 시험 전에 비해 통계적으로 유의한 수준($p < 0.001$ by paired *t*-test)으로 항산화 활성이 28.23%증가하였다(Table 4).

3.9. 물리적 자극에 의해 손상된 피부 진정 효능 평가 시험

총 21 명의 연구 대상자를 대상으로 RTG 복합추출물의 물리적 자극에 의한 피부 진정 효과를 실시하였으며 중도탈락자 없이 21 명의 연구 대상자가 모두 시험을 완료하였다. Tape Stripping에 의해 자극을 가한 후, 시료를 사용한 시험 부위와 사용하지 않는 대조 부위의 경피수분손실량(TEWL)과 피부 붉은기(a-value)의 변화를 확인하였다. 시험부위와 대조 부위의 시험 전 동질성을 확인하기 위해 경피수분손실량(TEWL) 및 피부 붉은기(a-value)의 수치를 확인한 결과 물리적 자극 전 및 자극 직후 모두 시험 부위와 대조 부위 측정값 간의 통계적으로 유의한 수준($p < 0.05$)의 차이를 확인할 수 없어 물리적 자극 전후의 시험 부위 간 동질성을 확인할 수 있었다 (Figure. 7, 8). 물리적 자극 후 시험부위에 시료를 24, 48 h 처리 후 경피수분손실량(TEWL)과 피부 붉은기(a-value)를 측정한 결과 경피수분손

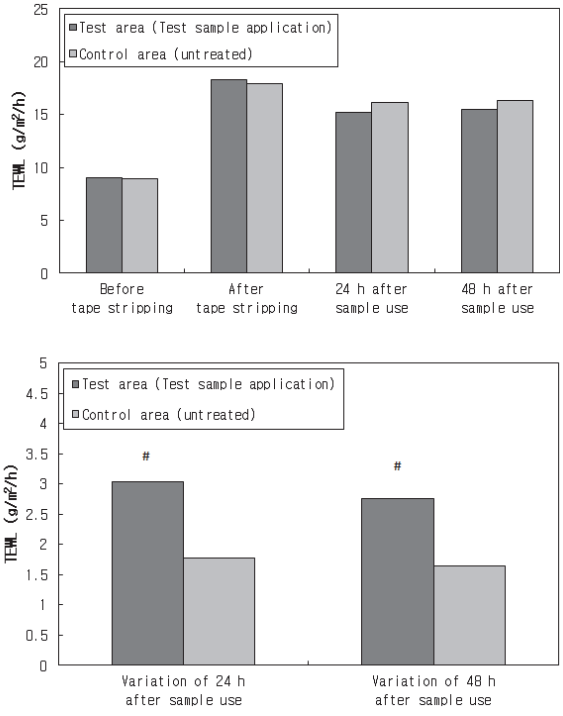

Figure 7. The skin calming effects of RTG extracts after physical stimulation were assessed. (A) Transepidermal water loss (TEWL) and (B) Variation of the TEWL were measured and calculated by Tewameter TM-300 instrument. The data (N = 21) represent the mean values. Statistically significant differences compared to the placebo control are indicated by $^{\#}p < 0.05$.

Table 3. The Results of the Patch Test

Test materials	Irritation index
Blank	0.00
RTG extracts (100%)	0.00

Table 4. Statistical Analysis Results of Catalase Activity, Skin Water Content and Skin Roughness

Analysis	Before application	2 Weeks	Improvement rate (%)	*p*-value
Catalase activity (nmol/min/mg/mL)	19.78 ± 6.63	24.16 ± 6.95	28.23	< 0.001[1)]
Skin water content (Corneometer value, A.U.)	44.16 ± 11.30	52.97 ± 9.90	23.82	< 0.001[1)]
Skin roughness (Texture: small, A.U.)	6.97 ± 1.19	6.62 ± 1.14	4.92	< 0.001[2)]

*Test metrials : RTG extracts 100%

1)By paired *t*-test

2)By Wilcoxon signed rank test

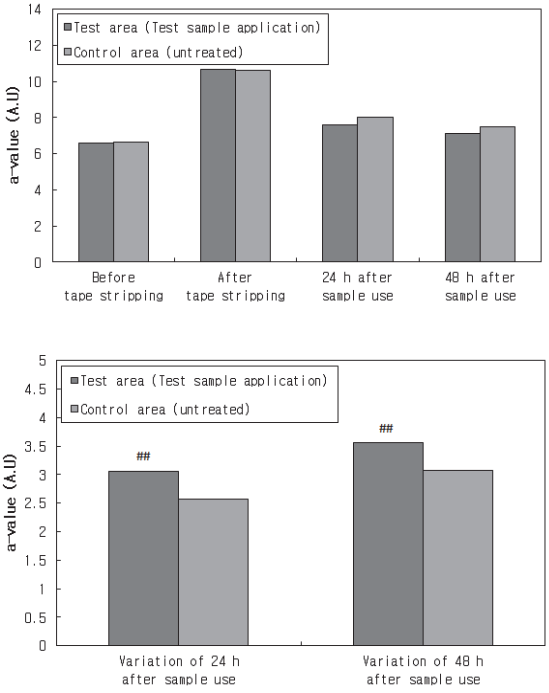

Figure 8. The skin calming effects of RTG extracts after physical stimulation were assessed. (A) a-value and (B) Variation of a-value were measured and calculated by Chromameter CR-400 instrument. The data (N = 21) represent the mean values. Statistically significant differences compared to the placebo control are indicated by $^{\#\#}p < 0.01$.

실량(TEWL) 값은 tape stripping을 20 회 적용하여 자극을 유발하였을 때 시험 부위에서 18.28 ± 5.49 g/m^2/h, 대조 부위에서 17.95 ± 6.14 g/m^2/h로 측정되었으며, 두 부위의 자극 반응 정도는 통계적으로 비슷한 수준임을 확인하였다. 시료를 시험부위에 24, 48 h 사용한 결과, 시험 부위의 경피수분손실량은 각각 3.04 ± 4.72 g/m^2/h, 2.76 ± 3.19 g/m^2/h 감소하였으며, 대조 부위의 경피수분손실량은 각각 1.77 ± 3.34 g/m^2/h, 1.65 ± 2.12 g/m^2/h감소하여, 시료 사용 24 h 후부터 시험 부위의 경피수분손실량이 대조 부위에 비해 통계적으로 유의한 수준 ($p < 0.05$ by wilcoxon signed rank test)으로 감소하는 것을 확인하였다(Figure 7). 피부 붉은기를 나타내는 a-value 측정값은 tape stripping을 20 회 적용하여 자극을 유발하였을 때 시험 부위에서 10.66 ± 1.36 대조 부위에서 10.59 ± 1.33로 측정되었으며, 두 부위의 자극 반응 정도는 통계적으로 비슷한 수준임을 확인하였다. 시료를 시험 부위에 24 h 사용한 결과 시험 부위의 피부 붉은기는 3.06 ± 1.35 감소하였으며 대조 부위의 피부 붉은기는 2.57 ± 1.36 감소하여 시험 부위의 피부 붉은기가 대조 부위에 비해 통계적으로 유의한 수준($p < 0.01$ by paired *t*-test)으로 감소하는 것을 확인하였다. 48 h 사용한 결과 시험 부위의 피부 붉은기는 3.56 ± 1.38 감소하였으며 대조 부위의 피부 붉은기는 3.08 ± 1.49 감소하여 시험 부위의 피부 붉은기가 대조 부위에 비해 통계적으로 유의한 수준($p < 0.01$ by wilcoxon signed rank test)으로 감소하는 것을 확인하였다(Figure 8).

3.10. 피부 수분 함량 및 거칠기 개선 시험

총 2 주간 22 명의 연구 대상자를 대상으로 RTG 복합추출물의 보습 효과를 실시하였으며 중도 탈락자 없이 22 명의 연구 대상자가 모두 시험을 완료하였다. 피부 수분함량을 측정한 결과 시료를 사용하기 전 수분함량은 44.16 ± 11.30, 시료를 2 주 사용한 후 수분함량은 52.97 ± 9.90로 시험 전에 비해 통계적으로 유의한 수준($p < 0.001$ by paired *t*-test)으로 피부 수분함량이 23.82% 증가하였다 (Table 4). 피부 거칠기 개선 정도를 측정한 결과 시료를 사용하기 전 거칠기 지수는 6.97 ± 1.19, 시료를 2 주 사용한 후 거칠기 지수는 6.62 ± 1.14로 시험 전에 비해 통계적으로 유의한 수준($p < 0.001$ by wilcoxon signed rank test)으로 피부 거칠기가 4.92%감소하였다(Table 4).

4. 결 론

본 연구에서는 매화, 금은화, 감국, 대나무 복합추출물의 피부 안전성, 항산화 효과, 피부 보습 효과 및 항염 효과를 확인하여 외부 환경 요인에 의한 피부 손상을 방지하는 화장품 소재로 제안하고자 하였다. RTG 복합추출물의 화장품 소재로서의 안전성을 확인하기 위해 HaCaT 세포에서 세포독성을 측정한 결과, 0.125, 0.25, 0.5, 1% 농도에서 세포 생존율에 변화가 없었고, 인체 첩포 시험에서 피부 자극 지수가 0.00점으로 나타나 RTG 복합추출물이 피부 자극을 유발하지 않는 성분임을 확인하였다. RTG 복합추출물의 항산화 효과를 확인하기 위해 폴리페놀 497.83 μg GAE/g이 함유되어 있음을 확인하였고, DPPH 라디칼 소거 활성능 평가 결과, 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거 활성이 높아지는 것을 확인하였다. 실제 사람 피부에서 항산화 효과를 확인하기 위해 피부 각질층의 catalase 활성 여부를 측정한 결과 유의미하게 증가하였고, 이는 활성산소로부터 세포를 보호하는 항산화제로서의 기능이 충분하다

는 것을 시사한다[27]. RTG 복합추출물의 염증으로부터 세포 보호 효과를 측정하기 위해 각질형성세포에 염증 유발 인자인 미세먼지(PM_{10})를 처리하였고, tape stripping으로 자극을 유발한 피부의 홍반을 감소시키는 것을 확인함으로써 외부 자극으로 인한 염증을 완화할 수 있음을 알 수 있었다. RTG 복합추출물의 환경적 스트레스에 대응한 피부 보습 효과를 확인하기 위해, 각질형성세포에 미세먼지(PM_{10})를 처리하여 피부 보습 능력을 평가하는 지표인 히알루론산 합성 효소 HAS2, HAS3와 피부 장벽 인자 keratin-1의 발현 여부를 확인한 결과, 미세먼지 처리 대조군 대비 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다[6,28]. 또한 RTG 복합추출물을 인체 피부에 도포했을 때 피부 수분 함량이 유의미하게 증가하고 피부 거칠기(roughness)가 감소하는 것을 확인하였다. 이상의 결과를 종합하면 RTG 복합추출물은 실제 사람 피부에서 항산화, 항염, 보습 개선 효과와 *in vitro* 효능을 동시에 확인하여 외부 환경 요인에 의한 피부 손상을 방지하는 화장품 소재로 응용될 수 있다고 판단된다.

References

1. P. Puri, S. K. Nandar, S. Kathuria, and V. Ramesh, Effects of air pollution on the skin: A review, *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, **83**(4), 415 (2017).
2. S. E. Mancebo and S. Q. Wang, Recognizing the impact of ambient air pollution on skin health, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **29**(12), 2326 (2015).
3. S. Pillai, C. Oresajo, and J. Hayward, Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation − a review, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **27**(1), 17 (2005)
4. K. E. Kim, D. Cho, and H. J. Park, Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases, *Life Sci.*, **152**, 126 (2016).
5. S. K. Seo, C. S. Koo, B. M. Son, S. K. Lee, E. M. Kang, M. O. Kim, J. H. Hong, S. H. Kim, and M. S. Shin, Anti-pollution capacity of mixtures of *Anemarrhena asphodeloides* root extract, β-glucan and poly-γ-glutamic acid from stimulation with particulate matter, *J. Invest. Cosmetol.*, **12**(4), 313 (2016).
6. S. Y. Ahn, S. Y. Gil, O. S. Kwon, Y. H. Chang, and M. H. Jin, Skin hydration effect of *Brasenia schreberi* mucilage polysaccharide extract, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **43**(3), 223 (2017).
7. J. O. Kim, J. H. Oh and N. I. Kim, A study on the use of the medicinal tea in Chosun Dynasty, *Korean J. Ori. Med.*, **15**(3), 11 (2009).
8. W. Y. Jiang, Therapeutic wisdom in traditional Chinese medicine: a perspective from modern science, *Trends Pharmacol. Sci.*, **26**(11), 558 (2005).
9. D. H. Kim, Y. O. Bok, H. S. Lee, W. H. Woo, and Y. J. Mun, Antioxidant activities of *Prunus mume* flower buds extract by various solvents, *J. Physiol. Pathol. Korean Med.*, **31**(3), 188 (2017).
10. J. Shi, J. Gong, J. Liu, X. Wu, and Y. Zhang, Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components, *LWT Food Sci. Technol.*, **42**(2), 477 (2009).
11. M. Kim and S. Park, Bioactivities of feral peach (*Prunus persica* Batsch var. *davidiana* Max.) flower extracts and *Prunus mume* flower extracts, *J. Appl. Biol. Chem.*, **64**(2), 133 (2021).
12. S. Nakamura, K. Fujimoto, T. Matsumoto, S. Nakashima, T. Ohta, K. Ogawa, H. Matsuda, and M. Yoshikawa, Acylated sucroses and acylated quinic acids analogs from the flower buds of *Prunus mume* and their inhibitory effect on melanogenesis, *Phytochemistry*, **92**, 128 (2013).
13. H. R. Jeong, J. M. Kim, J. Y. Kang, J. H. Moon, M. J. Kim, H. L. Lee, M. J. Go, S. Y. Gu, H. J. Kim, and H. J. Heo, Antioxidant activity and neuroprotective effect of ethyl acetate fraction of *Lonicera japonica* on H_2O_2-induced oxidative stress, *Korean J. Food Preserv.,* **28**(7), 968 (2021).
14. Y. G. Yun, G. M. kim, S. J. Lee, S. H. Ryu, and S. I. Jang, Inhibitory effect of aqueous extract from *Lonicera japonica* flower on LPS-induced inflammatory mediators in RAW 264.7 macrophages, *Kor. J. Herbology*, **22**(3), 117 (2007).
15. S. C. Kim, J. R. Lee, K. I. Choi, S. J. Park, Y. K. Kwon, and S. H. Byun, Effect of lonicerae flos-skin on contact hypersensitivity induced by repeat elicitation of

DNCB, *Kor. J. Herbology*, **21**(1), 9 (2006).
16. S. H. Ahn and H. H. Kim, *Lonicera japonica* inhibits atopy dermatitis in NC/Nga mouse through regulation of iNOS by NF-κB suppression, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **24**(2), 278 (2010).
17. R. H. Kim, J. H. Song, M. S. Shon, K. S. Chun, S. U. Choi, and G. N. Kim, Evaluation of water extract prepared from *Chrysanthemum indicum* Linne as nutri-cosmetic and cosmetic material *in vitro* model, *Asian J. Beauty Cosmetol.*, **14**(1), 78 (2016).
18. D. Y. Lee, G. Choi, T. Yoon, M. S. Cheon, B. K. Choo, and H. K. Kim, Anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum indicum* extract in acute and chronic cutaneous inflammation, *J. Ethnopharmacol.*, **123**(1), 149 (2009).
19. S. Sun, P. Jiang, W. Su, Y. Xiang, J. Li, L. Zeng, and S. Yang, Wild chrysanthemum extract prevents UVB radiation-induced acute cell death and photoaging, *Cytotechnology*, **68**(2), 229 (2016).
20. M. H. Choi, D. S. Kim, and H. J. Shin, Wrinkle improvement effect of silica extracted from domestic bamboo stems, *KSBB J.*, **32**(4), 293 (2017).
21. M. H. Choi, Y. J. Seo, and H. J. Shin, Application of domestic bamboo stems mainly for inner beauty product development: A review, *KSBB J.*, **32**(1), 1 (2017).
22. H. S. Choi, G. C. Kim, and H. J. Shin, Comparison of antimicrobial and antioxidant activities by different extraction methods in Korean bamboos, *KSBB J.*, **27**(2), 131 (2012).
23. J. Y. Hwang, and J. S. Han, Inhibitory effects of *Sasa borealis* leaves extracts on carbohydrate digestive enzymes and postprandial hyperglycemia, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **36**(8), 989 (2007).
24. Q. W. Zhang, L. G. Lin, and W. C. Ye, Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review, *Chin. Med.,* **13**, (2018) Doi: 10.1186/s13020-018-0177-x
25. White, W. M. Henry's Law. In encyclopedia of geochemistry, ed. W. M. White, 339. Springer, Cham (2018).
26. H. Woo and J. H. Kim, Effect of air stone pore size and gas flow rate on the recovery efficiency of paclitaxel from biomass in gas bubble-assisted extraction, *Korean J. Chem. Eng.*, **40**, 1425 (2023).
27. L. M. Anaya-Esparza, E. F. Aurora-Vigo, Z. Villagrán, E. Rodríguez-Lafitte, J. M. Ruvalcaba-Gómez, M. Á. Solano-Cornejo, V. M. Zamora-Gasga, E. Montalvo-González, H. Gómez-Rodríguez, C. E. Aceves-Aldrete, and N. González-Silva, Design of experiments for optimizing ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from plant-based sources, *Molecules,* **28**(23), 7752 (2023).
28. L. Hellemans, H. Corstjens, A. Neven, L. Declercq, and D. Maes, Antioxidant enzyme activity in human stratum corneum shows seasonal variation with an age-dependent recovery, *J. Invest. Dermatol.*, **120**(3), 434 (2003).
29. M. Y. Chang, J. J. Kim, and C. K. Lee, Moisturizers in cosmetics-classification of moisturizers by action mechanism, *The Journal of Skin Barrier Research*, **9**(1), 18 (2007)