

노니 추출물의 주름개선 효과연구

이 정 노[†] · 김 상 우 · 유 영 경 · 이 강 태 · 이 건 국

코리아나 화장품 송파기술연구소
(2006년 11월 14일 접수, 2006년 11월 20일 채택)

Anti-wrinkle Effect of *Morinda citrifolia* (Noni) Extracts

Jung Noh Lee[†], Sang Woo Kim, Young Kyoung Yoo, Ghang Tai Lee, and Kun Kook Lee

Coreana Cosmetics Songpa R&D Center, 204-1 Jeongchon-ri Senggeo-eup, Cheonan-si 330-830, Korea
(Received November 14, 2006; Accepted November 20, 2006)

요약: 주름생성의 주요 원인은 자외선, 공기 오염, 담배 연기, 스트레스 등을 들 수 있다. 특히, 자외선은 피부에 다양한 형태로 영향을 주어 깊은 주름, 잔주름, 피부거침, 피부건조와 같은 현상을 발생시켜 피부노화를 유발시킨다. 이러한 주름 생성 해결 및 피부 노화 문제의 해결은 화장품에서 가장 활발하게 연구되는 분야 중 하나이다. 최근에 열대 식물인 노니로부터 추출한 유효성분이 주름 개선에서 가장 중요한 콜라겐 생합성을 촉진하는 효과를 확인하였으며, 특히 노니 추출물로부터 분리한 스코폴레틴(scopoletin)이 이러한 효과를 주는 활성 성분임을 확인하였다. 스코폴레틴은 인체 섬유아 세포를 이용한 콜라겐 합성 촉진 효과 시험에서 농도 의존적으로 콜라겐 합성을 촉진하는 활성을 보였다(0.2 µg/mL-89.5% 콜라겐 생합성 촉진). 또한, 주름 개선 효과를 확인하기 위해 3% (v/v) 노니 추출물을 함유한 크림을 이용하여 12주 동안 임상연구를 수행하여, 안면의 주름 감소 정도를 측정하였으며 이 제품이 주름을 감소시켜주는 뛰어난 효과가 있다는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 노니 추출물이 주름 개선 효과가 매우 높으며, 노화 방지 원료로서 이용 가능성이 매우 높다는 것을 보여주는 것이라 할 수 있다.

Abstract: Wrinkle formation is mainly attributed to the environmental factors such as UV rays, air pollution, smoking and stress etc. Especially, UV rays induce premature skin aging which is characterized by deep wrinkle, leathery dryness etc. Recently, researches on the wrinkle formation and its prevention have been the main theme in cosmetics fields. We have studied the various plant extracts having anti-wrinkle effects and finally showed that Noni (*Morinda citrifolia*) extracts have the efficacy of promoting the type I collagen synthesis in normal human fibroblast, using PICP assay. We purified one active compound from Noni extracts and identified its structure. It was identified as 6,7-Dimethoxy-2H-1-Benzopyran-2-one; scopoletin by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR, Mass analysis. Scopoletin increased collagen synthesis in a dose dependent manner (89.5% at 0.2 µg/mL). In order to verify the anti-aging effectiveness of the cream containing 3% noni extracts, we performed the *in vivo* test with some female volunteers for 12 weeks. It reduced the signs of aging, especially face wrinkles. From these results, we conclude that the noni extracts could be used as a useful anti-wrinkle agent.

Keywords: anti-wrinkle, noni extracts, scopoletin, collagen, morinda citrifolia

1. 서 론

피부의 노화는 시간의 흐름에 따른 생리적 노화(chronological aging) 과정과 외부 환경에 의한 외인성 노화(extrinsic aging)로 나누어 진다[1]. 피부노화에 영향을 미치는 외부인자들은 바람, 온도, 습도, 담배연기, 공해, 자외선 등이 있으며, 특히 가장 주요원인인 자외선에 의

한 피부노화를 일컫어 광노화라고 한다. 자외선은 유해한 활성화 산소를 많이 만들어내고, 피부 세포에서 유전자 돌연변이를 유발할 뿐만 아니라, 신호 전달 체계나, 세포 주기, 또는 암 유발 등에 관련된 유전자들의 발현을 변화시킨다[2]. 노화된 피부의 대표적 증상은 잔주름 및 주름의 발생이다. 이는 피부진피조직의 교원질 중 주 단백질인 콜라겐의 현저한 감소에 의해서라고 할 수 있다[3,4]. 콜라겐은 진피의 90% 이상을 차지하고 있으면서 피부의 장력과 강도를 부여하기 때문에 외부로부터의 자극에 대

[†] 주 저자 (e-mail: jnlee200@coreana.co.kr)

해 피부를 보호하고 유지시킨다. 때문에 콜라겐의 감소는 피부노화와 매우 깊은 관계를 가지고 있고[5], 이러한 문제를 해결하기 위해 많은 치료제나 약물이 이용되는데 대표적인 것들이 비타민 A와 그 유도체, 비타민 C와 그 유도체, 그외 많은 항산화제가 있다. 하지만 이러한 물질들은 화장품에 이용시 안정성, 안전성 등에 많은 문제점이 있어 이를 해결하고자 많은 노력을 기울이고 있다. 이를 해결하기 위해 많은 연구를 지속하던 중 노니추출물에서 콜라겐합성에 효과가 있는 것을 발견하였다. 노니(*Morinda citrifolia*)는 인도네시아 모로카 제도 원산의 약용 식물이다. 약 6000년 전부터 열매 및 잎은 식용이나 약용으로 이용되고, 뿌리 및 줄기는 염색에 이용되었으며, 약 2000년 전에 해양민족과 함께 태평양 연안으로 전파되었다. 인도네시아에서는 멘크드, 파체, 디바 등으로 불리며, 만병에 효과가 있는 약으로서 지금도 “자무”라는 전통치료약으로 이용되고 있다. 본 연구에서는 콜라겐 합성을 촉진하는 노니추출물의 주름 개선 기능성 화장품으로의 제품 개발 연구를 수행하기 위해 유효성분을 분리하여 구조를 규명하였으며, 이 물질이 농도 의존적으로 효과가 있는 것을 확인하였다. 또한 추출물 및 제형상에서의 유효성분의 안정성을 확인하였으며, 피부 안전성 및 전문임상기관에서의 유효성 평가를 실시하여 주름 개선 기능성 소재로의 가능성을 연구 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 기기

본 실험에 사용된 노니는 인도네시아산 노니 열매를 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 시약으로는 phosphate buffered saline (PBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 및 용매 등은 Sigma사의 제품을 사용하였다. HPLC는 Waters 2695_2487을 이용하였고 ^1H NMR (300 MHz), ^{13}C NMR (150 MHz)과 GC-Mass는 Varian사의 기기를 이용하였다. 피부 세포는 인체 섬유아 세포(normal human fibroblast)를 이용하였으며 임상진행은 엘리트 피부 과학연구소에서 수행하였다.

2.2. 노니 추출물에서의 활성성분의 분리 정제 및 화학 구조 결정

2.2.1. 노니추출물의 제조 및 분리 정제

완전 건조시킨 노니열매 1 kg를 70% EtOH에서 추출하였다. 70% EtOH추출액을 필터 후 45°C에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 극성 차이를 이용하여 *n*-hex, CHCl_3 , EtOAc, *n*-BuOH 및 물 분획으로 나누었다. 이 분획 중

활성에 효과가 있는 분획을 silical gel column, HP-20, Sephadex LH20 컬럼크로마토그래피, 재결정 등을 실시하여 활성물질을 얻었다.

2.2.2. 기기분석

순수하게 정제된 활성성분의 구조분석을 위해 TLC, FT-IR, UV, ^1H , ^{13}C NMR, GC-Mass 등의 분석 기기를 통해 실시하였다. 또한 유효성분의 함량 분석 및 안정성 시험은 HPLC를 이용하였으며, 컬럼은 Kromasil C₁₈, 검출기는 2487UV 검출기를 이용하였다. 측정과장은 305 nm, 유속은 1.0 mL/min, 이동상은 18% ACN으로 분석하였다.

2.3. 생물활성 측정

2.3.1. 콜라겐 합성효과

피부의 주름개선 효과를 검증하는 콜라겐 합성효과를 보기 위하여 사람 섬유아세포를 96 well-plate에 1×10^4 cells/well 씩 분주하여 10% FBS/DMEM 배지로 24 h 배양시킨 다음, 새로운 serum-free 배지와 적정 농도 범위에서 단계적으로 희석한 시료를 가하고, 다시 24 h 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액을 가지고 pro-collagen Type I C-peptide EIA kit (MK101, Takara Bio Inc., Japan)를 이용하여 콜라겐 양을 측정하였다. 콜라겐 측정키트에 포함된 표준용액을 희석한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 농도 곡선을 작성하였으며, 각 배지에 포함된 총 단백질의 양으로 보정하여 콜라겐 발현량을 산정하였다.

2.3.2. 인체 철폐시험

피부 일차 자극을 평가하기 위한 인체 철폐시험을 CTFA guideline에서 제시한 방법에 약간의 변형을 가하여 실시하였다. 평소 피부 질환 및 알러지가 없는 20명의 피험자(남자 10명, 여자 10명)를 대상으로 실시되었으며, 연령 분포는 24 ~ 34, 평균 28세였다. 우선, 철폐 부위인 전박을 70% 에탄올로 닦아내고 건조시킨 후, 시험물질이 적용된 finn chambers (Epitest Ltd Oy, Finland)를 시험 부위에 철폐하였다. 24 h 후에 철폐를 제거하고 30 min, 24 h, 48 h에 자극 발생 유무를 평가하였다. 평가기준은 international contact dermatitis research group (ICDRG)의 판정 기준에 따랐으며, 피부 자극 유발 가능성의 평가는 다음 계산식으로부터 계산된 평균값으로 하였다[6,7].

$$\text{Mean Score} = \frac{\text{Grade} \times \text{No. of responses} \times 100 \times \frac{1}{3}}{3(\text{Maximum grade}) \times 20(\text{Total subjects})}$$

Grade Score

- 0 : No reaction
- ++ 0.5 : Weak positive reaction (erythema)
- + 1 : Moderate positive reaction (erythema)
- ++ 2 : Strong positive reaction (erythema, edema)
- +++ 3 : Severe positive reaction (erythema, edema, vesicles)

2.3.3. 자극감 시험(Stinging Potential Test)

노니추출물을 함유하는 크림의 주관적 자극을 평가하기 위하여 자극감 시험을 수행하였다. Stinger는 steam generator (Vaporzone 707, Taiwan)를 사용하여 15 min 동안 충분히 sweating시키고 나서 충분한량의 시료를 손에 묻혀 시험물질을 각각 왼쪽과 오른쪽의 코 주위 및 뺨을 중심으로 강하게 비빈다. 20명의 피험자(남자 10명, 여자 10명)를 대상으로 실시하였으며 연령 분포는 23세 ~ 33세, 평균 연령은 29세였다. 피험자들은 주관적인 자극(stinging, itching, burning, etc)의 자극 정도를 평가하게 된다. 즉 0 = 자극 없음, 1 = 자극 약간 있음, 2 = 자극이 강함, 3 = 자극이 매우 강함으로 표시한다. 또한, 적용 후 자극 반응이 나타나는 시간에 따라 30 sec, 2.5 min, 5 min, 8 min 등의 4구분으로 나뉘었으며, 30 sec 이내에 나타나는 경우를 intense stinging (4점), 2.5 min mild stinging (3점), 5 min moderate stinging (2점), 그리고 8 min 이내에 나타나는 경우를 delayed stinging (1점)으로 구분하여 평가하였다. 자극의 정도는 하기의 공식으로부터 계산된 자극양성율로 판정하였다.

Response rate (%)

$$= \frac{\text{Response score} \times 100}{\text{Maximum score}(30 \times \text{total subjects} \times \text{No. of response})}$$

2.3.4. 노니추출물 함유 크림의 피부 주름개선효과

노니추출물을 함유하는 크림의 주름개선효과를 확인하기 위하여 평소 병력이 없는 피부를 가진 30 ~ 50대 한국인 여성 24명을 대상으로 하였다. 노니추출물을 3% 함유한 크림을 시험제품으로 하며, 함유하지 않은 크림을 대조군으로 하였다. 시험은 총 12주간 실시하였으며 아침과 저녁 피부 손질시 사용하게 하였다.

2.3.4.1. 육안평가

양측 눈가의 주름상태에 대해서 danelle's criteria를 수정 보완한 주름평가 기준에 의거 2인의 연구자가 독립적으로 평가하였다. 매 평가시점 마다 주름상태의 등급을 기록하고, 평균값을 취하여 분석하였다.

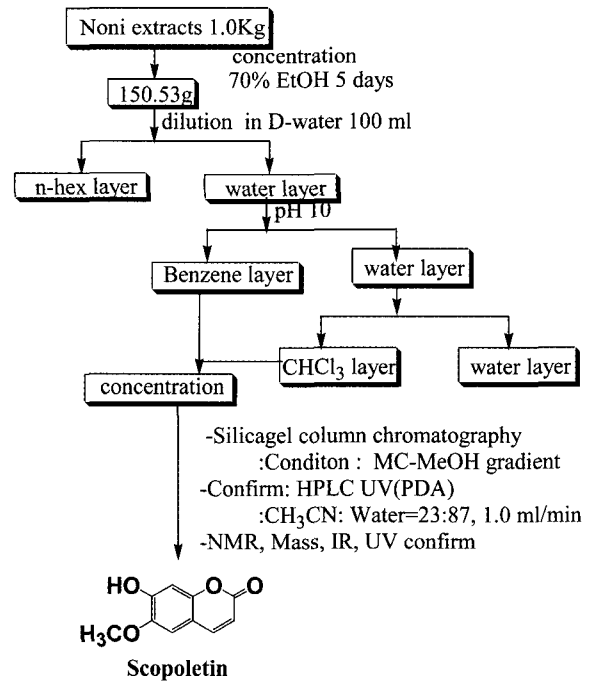


Figure 1. The structure of scopoletin isolated from Noni extracts.

2.3.4.2. 기기평가(화상분석법을 이용한 주름 평가)

피부주름의 상태는 제작한 피부모사판(skin replica, 온도 20 ~ 22℃, 습도 45 ~ 55%)을 Visiometer SV600 (Courage + Khazaka, Germany)을 이용하여 주름의 파라메타인 R1 (skin roughness), R2 (maximum roughness), R3 (average roughness), R4 (smoothness depth) 및 R5 (arithmetic average roughness)를 측정하였다.

2.3.4.3. 통계분석

대조군과 시험군 각각에서 육안평가 점수와 기기를 이용한 측정치인 R1, R2, R3, R4 및 R5 값에 대해 4주, 8주 및 12주 후 시점에서 사용 전과 비교시 통계적으로 유의한 변화 여부를 알아보기 위해서 SPSS package program의 paired t-test 방법을 이용하였고, 통계적으로 유의차 여부에 대해서는 independent t-test를 이용하여 검증하였다. 연구에 참여한 피험자 특징, 안전성과 효능에 관한 자가평가, 제품의 사용성 종합평가 분석은 기술적 통계를 이용하였다. 모든 통계결과는 p < 0.05일 때 유의한 차이가 있는 것으로 하였다.

3. 결 과

3.1. 노니추출물의 유효성분

노니 열매 1 kg을 70% 에탄올 용액으로 추출하여 Figure

Table 1. Collagen Synthesis Effect of Noni Extracts

Noni Extracts (%)	Abs. at 450 nm	Collagen type I (ng/mL)	Productivity (%)
Control	1.799	363.39	100.00
TGF- β (10 ng/mL)	2.430	686.40	188.88
0.1	1.719	334.32	92.00
0.2	1.809	367.16	101.04
0.5	1.910	407.18	112.05
1.0	2.025	457.37	125.86

Table 2. Collagen Synthesis Effect of Scopoletin

Scopoletin (0.2 μ g/mL)	Abs. at 450 nm	Collagen type I (ng/mL)	Productivity (%)
Control	1.799	363.39	100.00
TGF- β	2.430	686.40	188.88
0.1	2.296	599.89	165.08
0.2	2.433	688.49	189.46
0.5	2.210	550.43	151.47
1.0	2.164	525.70	144.66

1의 방법대로 각각을 분획하였다. 분획물중 CHCl_3 과 benzene 층에서 콜라겐 합성효과를 확인하고 이 분획물을 컬럼 크로마토 그래피 방법을 이용하여 분리 후 MeOH에서 재결정 후, 기기분석을 실시하였다. ^1H NMR (300 MHz, MeOH- d_6) δ : 7.59(1H, d), 6.92(1H, s), 6.85 (1H, s), 6.27(1H, d), 3.96(3H, s); ^{13}C NMR (150 MHz, MeOH- d_6) : 162.45, 150.72, 150.05, 145.11, 144.09, 112.38, 111.18, 107.95, 103.23, 49.88, 49.46, 48.60 : MS (m/z): (M + 1) 193.0 data를 확인 한 결과 6,7-dimethoxy-2H-1-benzopyran-2-one; scopoletin으로 동정되었다. 이를 Figure 1에 나타내었다.

3.2. 콜라겐 생합성 촉진효과

노니추출물과 스코플레틴의 콜라겐 합성 작용을 확인하기 위해, 이미 효과가 있는 것으로 알려진 TGF- β (10 ng/mL)를 양성대조군으로 하여 사람 섬유아세포에서 실험을 실시하였다. Table 1에서 알 수 있듯이 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 노니추출물이 1.0%에서 25%의 콜라겐 생성을 촉진함을 확인하였다. 노니 추출물에서 분리한 유효성분인 스코플레틴의 콜라겐합성효과를 확인한 결과 0.1 ~ 0.2 μ g/mL 등의 낮은 농도에서도 65 ~ 89%를 촉진함을 확인하였다. 이를 Table 2에 나타내었다.

Table 3. Stability Data of Scopoletin by HPLC

Test materials	25°C	50°C	0°C
Noni Extracts	-0.24%	+1.26%	-0.05%
Noni Cream (3%)	+0.13%	+0.75%	-0.04%

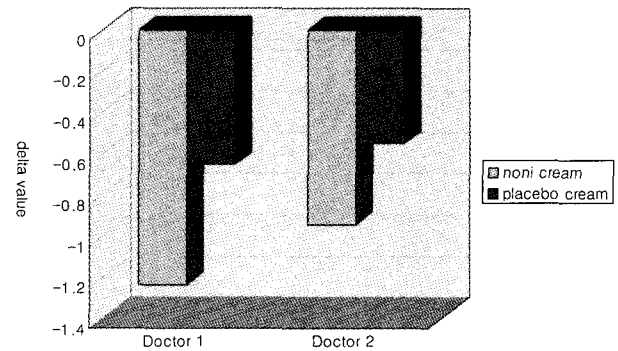


Figure 2. Data of cream contained noni extracts.

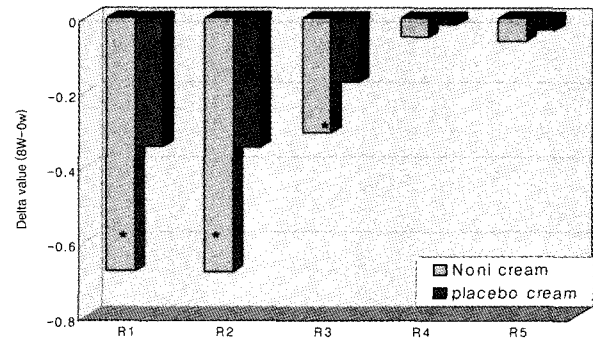


Figure 3. Data of contained noni extracts.

3.3. 스코플레틴의 안정성시험

스코플레틴의 안정도를 측정하기 위하여 노니 추출물 및 노니 추출물 함유제품에서의 스코플레틴 함량 변화를 측정하였다. HPLC를 이용하여 8주간의 실험을 실시한 결과, 0°C, 25°C, 50°C에서 모두 안정함을 확인 할 수 있었다(Table 3).

3.4. 피부주름 개선효과

3.4.1. 육안 평가

Figure 2는 노니 함유 제품의 주름 개선 효과를 육안으로 평가하여 나타낸 것이다. 이 결과는 노니 크림을 사용한 피검자의 주름이 대조군을 사용한 피검자보다 현저히 개선되는 것을 보여주며, 통계적으로 유의한 수준($p < 0.05$)의 감소이다.

Table 4. Results of Skin Irritation & Stinging Potential Test

Test materials	Irritation test	Stinging potential test
Placebo cream	0.84	0.28
Noni cream (3%)	0.57	0.42

3.4.2. 기기평가

Figure 3은 기기 평가에 의한 노니 함유 제품의 주름 개선 효과를 보여 준다. 이 결과에서도 노니 추출물은 피부 주름을 대조군에 비해 현저하게 감소시켜주는 것을 보여주며 이 결과들은 모두 통계적으로 유의한 수준의 차이 ($p < 0.05$)를 가지는 것으로 나타났다($\Delta R1, \Delta R2, \Delta R3$).

3.5. 인체첨포시험과 자극감시험

노니추출물의 누적첨포자극 및 주관적 자극에 대한 평가를 실시한 결과, 노니추출물을 함유한 제형은 무자극으로 판정되었다. 자극감 시험에서는 노니 추출물을 함유하지 않는 대조 크림과 비교하였을 때 오히려 자극을 감소시켜주는 결과를 얻었다(Table 4).

4. 고 찰

최근들어, 천연 소재를 이용한 기능성 화장품 개발은 지속적으로 증가하는 추세이며, 웰빙 트렌드에 맞는 소재 개발들이 매우 활발하게 진행되고 있다. 특히, 연구 대상도 국내에 자생하는 천연 식물 외에 해외에서 자생하는 천연 식물까지 연구폭이 확대되고 있다. 본 연구도 이러한 트렌드에 맞게 수행된 연구라고 할 수 있다. 노니는 열대지방에서 자생하는 천연식물로서 우리에게도 매우 친숙한 원료이다. 이미 음료로서는 판매되고 있으며, 효능 효과도 많이 알려져 있다. 이번 연구는 노니추출물의 주름 개선 기능성 화장품 원료로서의 이용 가능성에 대한 것이다. 본 연구자들은 먼저 노니추출물이 사람의 섬유아 세포에서 콜라겐 합성효과가 있는 것을 확인하였으며, 노니추출물의 유효성분을 분리하여 천연에 존재하면서 항균 및 항바이러스 효과를 갖고 있는 쿠마린 계열인 스코폴레틴임을 확인하였다. 스코폴레틴은 0.1 ~ 0.2 $\mu\text{g}/$

mL에서도 165 ~ 189%의 콜라겐 생합성을 촉진하여주는 것을 보였으며 기준물질로의 가능성을 알아보기 위하여 0°C, 25°C, 50°C 8주간 스코폴레틴의 안정성을 확인 한 결과, 안정함을 확인할 수 있었다. 또한, 사람을 대상으로 실시한 임상시험에서도 노니 함유 크림은 매우 우수한 주름 개선 효과를 보였으며, 피부 자극도 없는 것으로 나타났다. 상기의 결과를 종합해 보면, 노니 추출물은 천연 추출물로서 안전성, 유효성, 안정성이 매우 뛰어난 원료이며, 주름 개선 기능성 원료로서의 이용가능성이 매우 높을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. S. Claude, K. Manabu, M. Laura, and P. Lester, Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line, *Free radical Bio & Med.*, 26, 174 (1999).
2. E. Cadenas, Biochemistry of oxygen toxicity, *Ann Rev. Biochem.*, 58, 79 (1989).
3. M. Yaar and B. A. Gilchrest, Aging versus photo aging: postulated mechanisms and effectors, *J. Investing Dermatol. Symp. Proc.*, 3, 47 (1998).
4. J. J. Li, Z. Dong, M. I. Dawson, and N. H. Colburn, Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids the transrepress AP-1 without transactivation retinoic acid response element, *Cancer Research*, 56, 483 (1996).
5. C. Huang, W. Y. Ma, M. I. Dawson, M. Rincon, R. A. Flavell, and Z. Dong, Blocking activator protein 1 activity, but not activation retinoic acid response effect of retinoic acid, *Proc. Acad. Sci., USA*, 94, 5826 (1997).
6. T. Fisher and H. Maibach, Finn chamber patch test technique, *Cont. Derm.*, 11, 137 (1984)
7. R. E. Mitchell, Chronic solar dermatosis: a light and electron microscopic study of the dermis, *J. Invest. Dermatol.*, 48, 203 (1967).