

황금(黃芩)의 에탄올추출물에 의한 화장품 방부효과

황신혜 · 박창호*

경희대학교 공과대학 화학공학과, 그린에너지 센터, 산학협력기술연구원

Preservation of Cosmetics by Ethanol Extract of *Scutellaria baicalensis* GEORGE

Shin Hye Hwang and Chang-Ho Park*

Department of Chemical Engineering, Kyung Hee University, Yongin-si, 446-701, Korea.

Abstract Ethanol extract (1.0 wt%) of *Scutellaria baicalensis* GEORGE practically satisfied CFTA (The cosmetics, Toiletory, and Fragrance Association) standard in its antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* which were inoculated in skin toner and skin lotion. At concentrations of the extract less than 1.0 wt% the survival rate was the best for *S. aureus* and the worst for *P. aeruginosa*. The antimicrobial effect seems to be due to the damage to the bacterial cell wall as evidenced by the images of a Field Emission-Scanning Electron Microscope. The extract also showed a high anti-oxidant effect, and superoxide dismutase (SOD)-like activity reached 80% at 1,000 ppm. These findings suggest that the extract of *Scutellaria baicalensis* GEORGE is applicable to cosmetics as a natural preservative and an anti-oxidant.

Keywords: *Scutellaria baicalensis* GEORGE, ethanol extract, antimicrobial activity, anti-oxidant, cosmetics

서 론

미생물에 의한 화장품의 오염을 방지하여 사용기간을 연장하기 위해 기존에 화장품에 첨가하는 물질은 파라벤류 (parabens)의 방부제 (preservative) 물질이다. 이 물질은 인체의 조직 내부에 축적되며 유방암 세포 등에서 정상세포에 비해 월등히 높은 농도로 측정된다. 또한 파라벤이 여성 호르몬의 일종인 에스트로겐과 유사한 작용을 하는 것이 알려졌으며 이는 파라벤이 내분비계를 교란하는 물질로 작용할 수 있음을 시사한다(1).

화장품 산업계에서는 화학적 방부제의 이러한 부작용을 극복하기 위하여 천연항균물질을 방부제로 사용하기 위한 연구가 진행되어 왔다. 예를 들어, 알칼로이드 (alkaloids), 플라보노이드 (flavonoids), 피토알렉신 (phytoalexin), 항균펩타이드에 대한 연구보고와 유기산과 지방산 등의 항균성에 대한 보고가 있으며, 이들 물질의 항균작용은 산의 pH에 의한 효과 및 킬레이트에 의한 효과가 주 항균

메커니즘일 것으로 추정했다(2, 3). 본 연구에서는 꿀풀과의 다년생 초본식물인 황금(黃芩)의 에탄올 추출물이 화장품 오염세균에 대해 갖는 항균효과를 연구하였다. 황금(*Scutellaria baicalensis* GEORGE)은 그 뿌리가 노란색이며 오래 전부터 동양의학 문헌에 각종 염증에 대한 효과가 알려져 왔다. 특히 폐와 대장의 화(火)와 열(熱)을 제거하는 효능이 알려져 있는데 한의학에서 말하는 폐(肺)는 폐(lungs) 자체뿐만 아니라 대장(large intestine)과 피부(skin)를 포함하고 있음을 생각한다면, 황금의 유효성분 중에는 피부와 밀접한 관계를 가지고 있는 화장품의 기능을 향상시킬 수 있는 성분이 있을 것으로 예상된다. 예를 들어 황금의 주요성분인 바이칼린(baicalin), 바이칼레인(baicalein), 워고닌(wogonin) 등의 약리작용 중 알레르기를 억제하는 효능도 있을 것이라고 예상할 수 있다. 황금은 그 약리작용인 항산화, 항암, 항염효과(4) 및 신경보호(neuroprotective) 기능(5) 뿐만 아니라 아토피성 피부용 한방화장품 제형화 연구에서 황금추출물의 안정성과 기능성 강화에 기능에 대해 보고되었다(6). 본 연구에서는 황금 추출물이 기존의 파라벤류 방부제를 대체할 수 있는 천연 방부제로 사용될 수 있는 가능성을 탐색하고 또한 항산화 효과를 검증하였다.

*Corresponding author

Tel: +82-31-201-2531, Fax: +82-31-204-8114
e-mail: chpark@khu.ac.kr

재료 및 방법

황금추출액의 제조

대아약업사 (Daegu, Korea)에서 구입한 황금 (50 g)을 70% 에탄올과 1 : 5 (wt%)의 비율로 혼합하여 속시렛 추출기 (Soxhlet Device SEW 600, 창신과학, Korea)를 이용하여 추출하였으며, 그 추출물을 동결건조하여 보관 및 사용하였다. 멸균된 3차 증류수에 동결건조된 황금을 희석시켜 농도별 (1, 5, 및 10 wt%)로 황금추출액을 제조하였다.

시약 및 기기

방부제 유효성 측정실험에는 (주)아마란스 (Busan, Korea)에서 skin toner와 skin lotion의 base물질을 제공받아 사용하였으며, SOD유사활성 (Superoxide dismutase-like activity) 평가실험에는 pyrogallol (Sigma-Aldrich Co., USA)을 사용하였다. 세포형태변화 Field Emission-Scanning Electron Microscope (LEO SUPRA 55, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였고, SOD유사활성 평가는 UV/vis spectrophotometer (UVmini-1240, SHIMADZU, Japan)를 이용하였다.

균주

황금추출액의 항균력 검색 실험에 사용된 균주는 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), 그람 음성균인 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) 및 진균인 *Candida albicans* (ATCC 10231)이었으며 다림바이오텍 (Seoul, Korea)에서 분양 받았다. 계대배양을 위한 액체배지로는 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*는 Nutrient broth (Difco, USA)를 사용하였고, *C. albicans*는 YM broth (Difco, USA)를 이용하였다.

항균 효과 (clear zone) 측정

황금추출물의 항균력 시험은 disk method를 이용하였다(7). *S. aureus*, *P. aeruginosa* 및 *C. albicans*를 각각 50 mL 액체배지에 접종하고 35°C에서 24시간 배양한 후 각각 고체배지에 균일하게 도말하였다. 그리고 멸균된 8 mm paper disk를 0, 1, 5, 10 wt%로 농도를 달리한 황금추출용액에 침지하여 포화시킨 후 고체배지 위에 일정한 간격으로 놓고 35°C에서 24시간 배양시킨 후 disk 주위의 clear zone의 직경을 측정하였다.

황금추출물의 challenge test

방부제의 유효성 측정에 사용되는 방법 중 미국화장품

협회의 방법, 즉 CTFA (The cosmetics, Toiletry, and Fragrance Association)법을 기준으로 테스트하였다(8). CTFA법은 100 g의 용기에 화장품 50 g을 넣고 세균은 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL, 진균은 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL을 접종하여 7일 이내에 처음 접종 균수의 99.9%가 사멸되면 방부제로서의 유효성을 인정하는 방법이다. 본 실험에서는 세균 5×10^6 CFU/mL와 진균 5×10^5 CFU/mL를 각각 skin toner와 skin lotion화장품에 접종시켜 35°C, 100 rpm으로 조정된 shaking incubator에 두고 0, 3, 12 시간과 1~7일 까지 샘플을 취하여 고체배지에서 균일하게 도말한 후 colony수를 측정하였다.

황금추출물 처리 후 세포형태 변화 관찰

1.0 wt%의 황금추출물 첨가하고 24시간 경과 후 각 균주의 형태적 변화를 전계방출형 주사전자현미경 (Field Emission-Scanning Electron Microscope)으로 관찰하였다. Sampling한 균주를 건조한 분말시료를 3분간 Pt-coating한 후 FE-SEM (LEO SUPRA 55, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 $\times 50000$ 및 $\times 100000$, $\times 150000$ 배율로 촬영하였다.

Superoxide dismutase 유사활성 (SOD-like activity) 검증

SOD 유사활성은 Marklund의 방법에 따라 측정하였다(9). 각 시료용액 0.2 mL에 Tris-HCl 완충용액 (50 mM Tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL 가하여 25°C에서 10분간 반응 시킨 후 1.0 N HCl 0.1 mL를 가하여 반응을 정지시키고, 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 실험구와 대조구의 흡광도 감소율로 나타내었다. 황금에 의한 산화 저해율, 즉 SOD-유사 활성은 아래 식과 같이 계산하였다.

산화저해율 (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{황금을 첨가한 경우의 흡광도}}{\text{황금을 첨가하지 않은 경우의 흡광도}} \right) \times 100$$

결과 및 고찰

항균 효과 (Clear zone) 측정

균주를 도말한 고체배지 위에 0, 1, 5, 10 wt%로 농도를 달리한 황금추출물에 침지된 disk paper를 놓고 배양시켜 *S. aureus*, *P. aeruginosa* 및 *C. albicans*에 대한 황금추출물의 항균력을 측정된 결과 disk paper 주위의 clear zone의 크기가 황금추출물의 농도가 높을수록 커지는 것

을 확인하였다(Fig. 1).

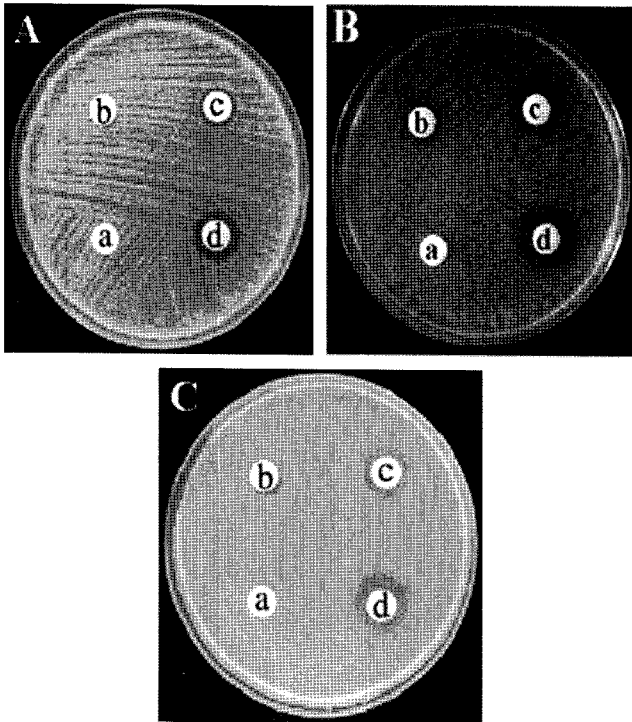


Fig. 1. Inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis* GEORGE extract on the growth of *Pseudomonas aeruginosa* (A), *Staphylococcus aureus* (B) and *Candida albicans* (C). The disks were immersed in the extract of *Scutellaria baicalensis* GEORGE at concentrations of 0 wt% (a), 1.0 wt% (b), 5.0 wt% (c), and 10.0 wt% (d).

황금추출물의 challenge test

S. aureus, *P. aeruginosa* 및 *C. albicans*가 접종된 두 종류의 화장품 (skin toner 와 skin lotion)을 고체배지에 희석, 도말하여 균수를 측정하였다. 각 균주에 대하여 방부제가 첨가되지 않은 control과 paraben계열의 화학방부제가 첨가된 positive control 그리고 0.1, 0.5 및 1.0 wt% 농도의 황금추출물이 첨가된 세가지, 즉 총 다섯 가지 경우에 대해 시간에 따른 균수 (CFU/mL)의 변화를 측정하고 CTFA법을 기준한 방부력테스트 (즉 7일 이내 접종균수의 99.9%가 사멸)를 통과하기 위해 필요한 황금추출물의 농도를 결정하였다(Fig. 2-4).

*S. aureus*가 접종된 skin toner의 경우 positive control과 0.5 wt% 및 1.0 wt% 황금추출물을 첨가하였을 때 접종된 균수가 7일 후 99.9%이상 감소되어 방부력테스트의 기준에 적합하였다. 특히 1.0 wt% 황금추출물은 화학방부제가 첨가된 positive control군과 비슷하거나 더 빠른 감소율을 보였다. *S. aureus*가 접종된 skin lotion에 대해서는 positive control과 1.0 wt% 황금추출물에서만 CTFA 기준에 적합하였다(Fig. 2).

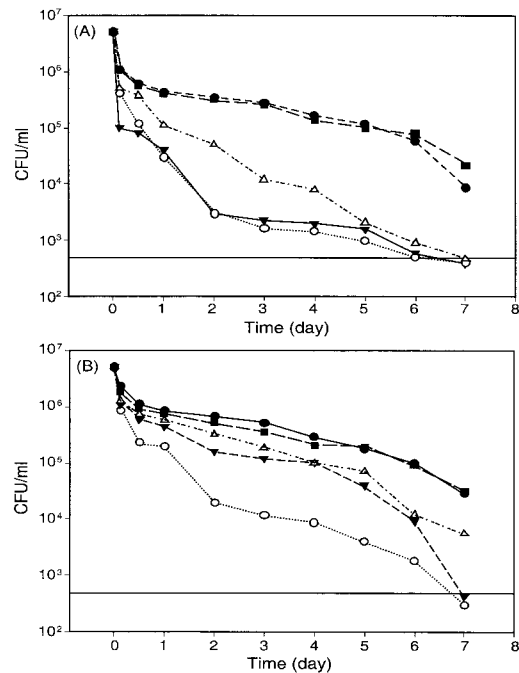


Fig. 2. No. of survived *Staphylococcus aureus* (CFU/mL) at different concentrations of *Scutellaria baicalensis* GEORGE in skin toner (A) and skin lotion (B) (● : control, ○ : positive control, ▼ : 1.0 wt%, △ : 0.5 wt%, ■ : 0.1 wt%, — : CTFA cut line of 99.9% cell death). control : no preservative, positive control: paraben preservative.

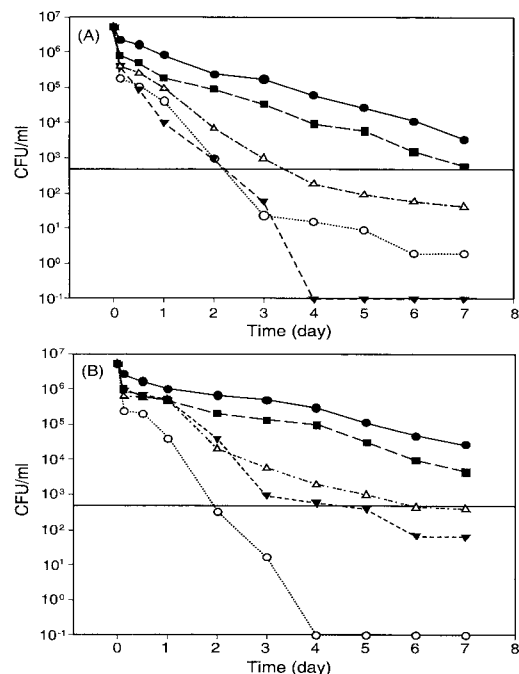


Fig. 3. No. of survived *Pseudomonas aeruginosa* (CFU/mL) at different concentrations of *Scutellaria baicalensis* GEORGE in skin toner (A) and skin lotion (B) (● : control, ○ : positive control, ▼ : 1.0 wt%, △ : 0.5 wt%, ■ : 0.1 wt%, — : CTFAcut line of 99.9% cell death). control : no preservative, positive control : paraben preservative.

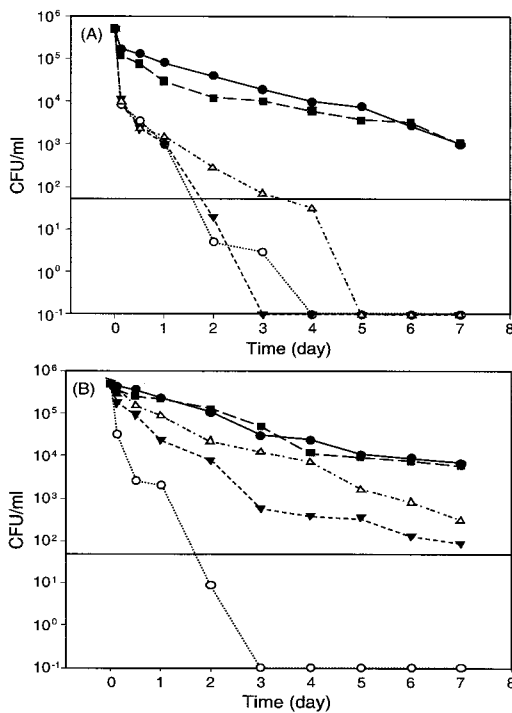


Fig. 4. No. of survived *Candida albicans* (CFU/mL) at different concentrations of *Scutellaria baicalensis* GEORGE in skin toner (A) and skin lotion (B) (● : control, ○ : positive control, ▼ : 1.0 wt%, △ : 0.5 wt%, ■ : 0.1 wt%, — : CTFAcut line of 99.9% cell death). control : no preservative, positive control: paraben preservative.

*P. aeruginosa*가 접종된 skin toner에서도 positive control 과 0.5 wt%, 1.0 wt% 황금추출물을 첨가한 경우에 CTFA 기준에 적합하였다. 특히 1.0 wt% 황금추출물은 3일 후에 이미 99.9% 감소율을 보여 positive control보다 방부력이 더 강하였다. *P. aeruginosa*가 접종된 skin lotion에서도 positive control, 0.5 wt%, 1.0 wt% 황금추출물에서 CTFA 기준에 적합하였다(Fig. 3).

*C. albicans*가 접종된 skin toner에서는 1.0 wt% 황금추출물은 접종된 균을 3일 만에 완전 사멸시켰고, positive control이 4일 째, 0.5 wt% 황금추출물이 5일째에 접종된 균을 완전 사멸시켜 CTFA기준에 적합하였다. *C. albicans*가 접종된 skin lotion에서는 positive control의 경우만 접종된 균이 3일 만에 완전 사멸되었고 황금추출물을 첨가한 경우는 1.0 wt%의 농도에서도 CTFA기준에 적합하지 않았다(Fig. 4).

이상의 결과로 1.0 wt% 황금추출물은 skin lotion에 *C. albicans*을 접종한 경우에 사멸율 (99.8%)이 CTFA 기준 (99.9%)에 약간 미달한 것을 제외하고는 모든 균에 대해 CTFA법의 기준에 만족하는 방부력이 있는 것으로 알 수 있었다.

동일한 황금추출물의 농도에서 균주별 반응을 비교하면 skin toner의 경우 0.1 wt%의 황금추출물을 첨가하였을 때 제 7일 째 균주의 생존율은 *S. aureus* 0.42%, *C. albicans*

0.22%, *P. aeruginosa* 0.012%의 순서로 낮아졌다(Table 1). Skin lotion의 경우 0.5 wt%의 황금추출물에 의한 균주별 생존율도 같은 순서로 감소하여 *S. aureus* (0.11%), *C. albicans* (0.062%) 및 *P. aeruginosa* (0.008%) 이었다 (Table 2). 이러한 결과를 종합할 때 황금추출물의 방부력은 *P. aeruginosa*에 대하여 가장 강한 반면 *S. aureus*에 대하여 가장 작았다. 이것은 *S. aureus*는 그람양성균으로서 그람음성균인 *P. aeruginosa*보다 펩티도글리칸 층이 두꺼워 세포외벽이 더 단단하기 때문에 황금추출물에 의한 세포막파괴가 덜 심했기 때문으로 사료되어진다.

Table 1. Survival of microorganisms (%) when 0.1 wt% extract of *Scutellaria baicalensis* GEORGE was added to skin toner

	5 th day		6 th day		7 th day	
	CFU/mL	(%)	CFU/mL	(%)	CFU/mL	(%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.0×10^5	2.0	8.2×10^3	1.64	2.1×10^4	0.42
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5.8×10^3	0.12	1.5×10^3	0.03	6.0×10^2	0.012
<i>Candida albicans</i>	3.7×10^3	0.74	3.3×10^3	0.66	1.1×10^3	0.22

Table 2. Survival of microorganisms (%) when 0.5 wt% extract of *Scutellaria baicalensis* GEORGE was added to skin lotion

	5 th day		6 th day		7 th day	
	CFU/mL	(%)	CFU/mL	(%)	CFU/mL	(%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.0×10^4	1.4	1.2×10^4	0.24	5.7×10^3	0.11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9.7×10^2	0.019	4.3×10^2	0.008	4.0×10^2	0.008
<i>Candida albicans</i>	1.6×10^2	0.32	8.1×10^2	0.162	3.1×10^2	0.062

황금추출물처리에 의한 세포형태 변화

황금추출물 (1.0 wt%)로 처리 한 *S. aureus*, *P. aeruginosa* 및 *C. albicans*과 처리하지 않은 대조구 세포들을 전계방출형 주사전자현미경 (FE-SEM)으로 비교 관찰한 결과 황금추출물로 처리 된 균주들의 세포막이 파괴되었고 그람 양성 균인 *S. aureus*보다 *P. aeruginosa* 와 *C. albicans*의 경우 세포의 팽창 정도가 더 심하였다(Fig. 5-7).

Superoxide dismutase 유사활성 (SOD-like activity) 검증

황금추출물의 항산화 능력은 그 농도에 따라 증가했고 1,000 ppm에서 약 80%의 활성을 나타내었다(Fig. 8). 황금추출물의 이러한 결과는 문헌상에 보고된 다른 물질의 항산화 능력, 즉, 사과 착즙액의 14.6%, 케일 농축액의 26.7%, 키위 착즙액의 27.6%, 무 착즙액의 24.1%(10), 소엽 (*Perilla frutescenes* var. *acuta*) 추출물 1,000 ppm에서의 25%(11), 한국산 약용식물의 20%미만(12)과 비교할 때 높은 수준이었다.

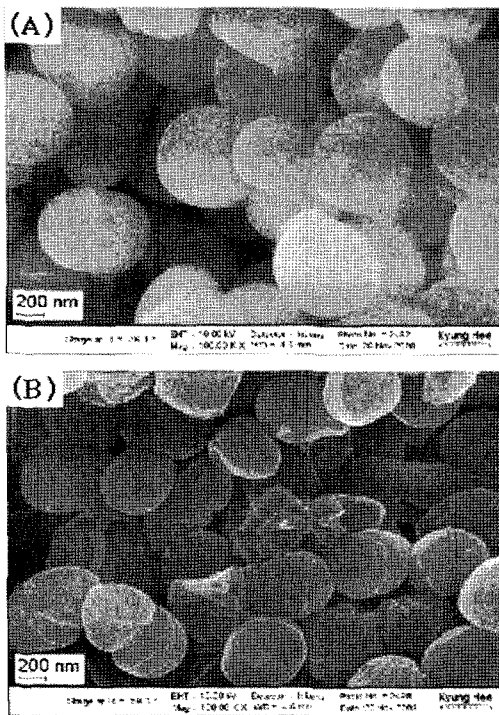


Fig. 5. Field Emission-Scanning Electron Microscope of *Staphylococcus aureus* cells not-treated (A) and treated with 1.0 wt% extract of *Scutellaria baicalensis* GEORGE (B). (magnification: $\times 100,000$).

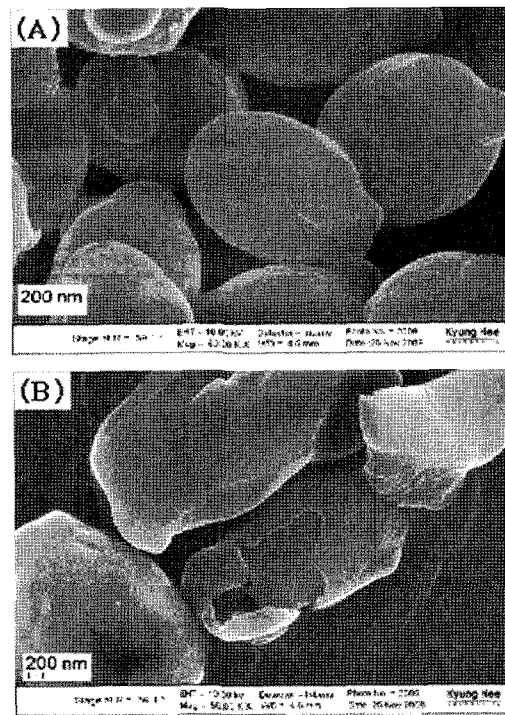


Fig. 7. Field Emission-Scanning Electron Microscope of *Candida albicans* cells not-treated (A) and treated with 1.0 wt% extract of *Scutellaria baicalensis* GEORGE (B). (magnification: $\times 50,000$).

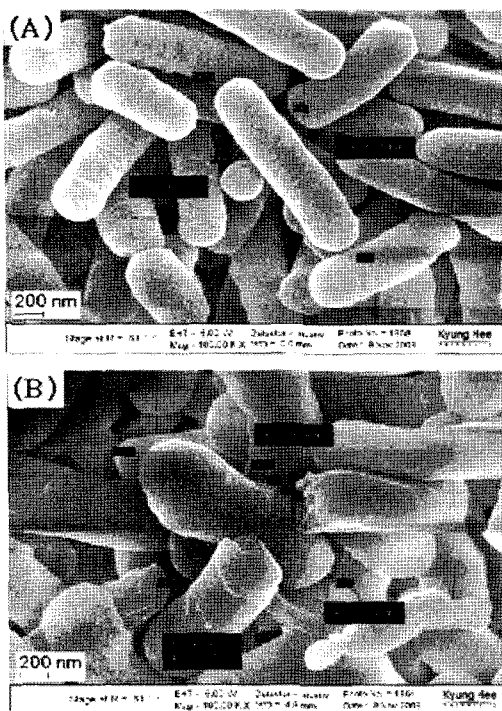


Fig. 6. Field Emission-Scanning Electron Microscope of *Pseudomonas aeruginosa* cells not-treated (A) and treated with 1.0 wt% extract of *Scutellaria baicalensis* GEORGE (B). (magnification: $\times 100,000$).

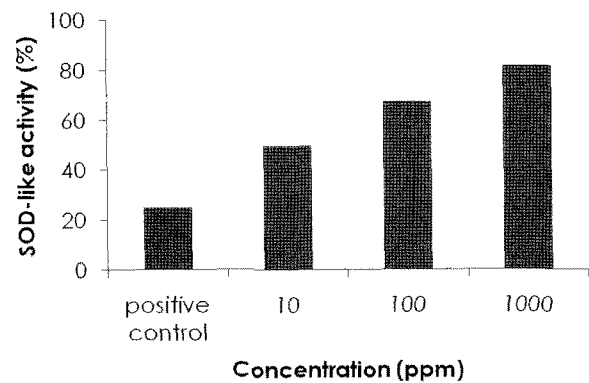


Fig. 8. SOD (superoxide dismutase)-like activity of solutions treated with different concentrations of *Scutellaria baicalensis* GEORGE extract. (Positive control : *Perilla frutescens* var. *acuta*).

요약

Skin toner와 skin lotion의 두 가지 화장품 formulation에 기존의 파라벤류 방부제 대신 황금 (黃芩) 추출물 (1.0 wt%)을 첨가하고 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) 및 *Candida albicans* (ATCC 10231) 균주를 접종하였을 때 이 균주들은 7일 이내에 99.9% 이상의 사멸율을 보여 황금추출물

이 CTFA기준을 만족하는 항균력이 있음을 확인하였다. 다만 skin lotion에 접종된 *Candida albicans*의 경우 사멸율은 CTFA기준에 약간 미달하는 99.8%이었다. 또한 황금추출물의 농도가 1.0 wt% 이하일 때 균주의 생존율은 그람 양성균인 *S. aureus*가 가장 높고 그람 음성균인 *P. aeruginosa*가 가장 낮았다. 전계방출형 주사전자현미경 (FE-SEM)을 이용한 세포형태변화 관찰 결과 황금추출물이 *P. aeruginosa*에 대하여 더 큰 방부력을 갖는 것은 이 균주의 세포막이 황금추출물에 의해 더 심하게 손상되기 때문으로 사료된다. 고농도의 황금추출물이 더 높은 항산화 효과를 나타냈으며 1,000 ppm에서 80%정도의 SOD-유사활성을 나타내었다.

사 사

이 연구는 2006년도 경희대학교 연구비 지원에 의한 결과임. (KHU-20060578)

접수 : 2009년 5월 28일, 게재승인 : 2009년 7월 30일

REFERENCES

1. Lee, S. H., S. J. Kim, J. R. Park, E. H. Jo, N. S. Ahn, J. S. Park, J. W. Hwang, J. Y. Jung, Y. S. Lee, and K. S. Kang (2006), Oestrogenic activity of parabens *in vitro* estrogen assays, *J. Fd. Hyg. Safety* **21**, 100-106.
2. El-Shenawy, M. A. and E. H. Marth (1989), Inhibition or inactivation of *Listeria monocytogenes* by sodium benzoate together with some organic acids, *J. Food Prot.* **52**, 771-778.
3. Bizri, J. N. and I. A. Wahem (1994), Citric acid and antimicrobials affect microbiological stability and quality of tomato juice, *J. Food Sci.* **59**, 130-135.
4. Shim, K. S., S. N. Kim, M. H. Kim, Y. S. Kim, S. Y. Ryu, Y. K. Min, and S. H. Kim (2008), *Scutellaria baicaliensis* Georgi extract inhibit RANKL-induced osteoclast differentiation, *Nat. Prod. Sci.* **14**, 182-186.
5. Son, D., P. Lee, J. Lee, H. Kim, and S. Y. Kim (2004), Neuroprotective effect of wogonin in hippocampal slice culture exposed to oxygen and glucose deprivation, *Eur. J. Pharma.* **493**, 99-102.
6. Park, C. I. (2006), Study on the development of cosmetic emulsion cream for patients with atopic dermatitis using *Scutellariae baicalensis*, *Kor. J. Herbology* **21**, 47-53.
7. Piddock, L. J. V. (1990), Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria, *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 307-318.
8. Farrinton, J. K., E. L. Martz, S. J. Wells, C. C. Ennis, J. Holder, J. W. Levchuk, K. E. Avis, P. S. Hoffman, A. D. Hitchins, and J. M. Madden (1994), Ability of laboratory methods to predict in-use efficacy of antimicrobial preservatives in an experimental cosmetic, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4553-4558.
9. Marklund, S. and G. Marklund (1974), Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474.
10. Hong, H. D., N. K. Kang, and S. S. Kim (1998), Superoxide dismutase-like activity of apple juice mixed with some fruits and vegetables, *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 1484-1487.
11. Choi, E. Y. (2003), A study on the utilization of cosmetics natural materials using the physiological activities function of *Perilla frutescens var. acuta*, *Daegu Haany University.* 23-26.
12. Lim, J. D., C. Y. Yu, M. J. Kim, S. J. Yun, S. J. Lee, N. Y. Kim, and I. M. Chung (2004), Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants, *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **12**, 191-202.