

비누풀 잎 추출물로부터 천연 계면활성제 개발

장아름, 김효정, 김광수, 박은경*

Development of a Natural Surfactant from Extracts of *Saponaria officinalis* L.

A Reum Jang, Hyo Jeong Kim, Kwang Soo Kim, and Eun Kyung Park*

접수: 2013년 6월 13일 / 게재승인: 2013년 6월 25일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, saponin content of extract from modified preconditioning process was investigated in *Saponaria officinalis* L. for cosmetic natural surfactant. Saponin content in steamed leaves from *S. officinalis* L. was about three times more than that in dried leaves (tea saponin and quillaja saponin). And saponin extracts from steamed leaves was excellently shown in both forming force and forming stability. In emulsion activity, saponin extracts from steamed leaves had a similar level to quillaja saponin and tea saponin. Saponin extracts from steamed leaves in *S. officinalis* L. showed non-toxic effect below in 1,000 µg/mL of concentration and dose-dependent inhibition of NO production. From the experiment, the extracts of *S. officinalis* L. showed good cosmetic agent.

Keywords: Cosmetic surfactant, *Saponaria officinalis* L., Forming force, Anti-inflammation

1. 서론

화장품에 사용되는 계면활성제는 수상부분과 유상부분을 잘 섞이게 하기 위해서, 계면에 흡착하여 계면의 자유에너지를 낮추어 계면의 성질을 현저히 변화시키는 물질로서, 한 분자 내에서 물과 친화성을 갖는 친수성기와 친유성기(오일)를 동시에 갖는 물질이다 [1].

화장품에서 사용되는 계면활성제는 화장품의 주성분으로 사용되며, 화장품 내 계면활성제의 기능은 세정기능(세안제, 신체 세정제, 모발 세정제), 유화제 기능(크림, 로션), 가용화제 기능(스킨, 에센스) 등이 사용된다.

화장품 분야에서 현재까지 많이 사용되는 화학 계면활성제는 피부자극이 크고 과다한 탈지성으로 각질층의 건조를 유발하여 피부를 거칠게 하며 염증과 피부질환을 일으키는 부작용이 있기 때문에 최근 피부의 자극을 최소화 하는 천연 계면활성제를 개발하는 연구가 계속되고 있으며 대체하려는 경향이 뚜렷하다.

천연 계면활성제는 크게 지방산, 인지질, 단백질유도체, 사포닌, 기타 등으로 구분할 수 있으나 아직까지 화장품에 널리 사용되는 경우는 드물었다 [2].

비누풀(*Saponaria officinalis* L.)은 석죽과의 다년생 초본으로 주성분으로는 트리테펜(terpene), 수지, 점액, 식물성스테롤, 비타민 C, 소량의 휘발성 오일 등의 성분을 함유하며, 천연계면활성 성분인 사포닌을 다량 함유하고 있다.

본 연구에서는 비누풀(*S. officinalis* L.)의 전처리 방법을 변형하여, 사포닌 함량이 높은 공정을 확인하였으며, 유화력, 기포력 및 염증억제작용 측정을 통하여 천연 계면활성제로서 화장품 소재 개발 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

본 실험에 사용한 비누풀(*S. officinalis* L.)은 수원 하광교 65-1, 한마음 농장과 전남 장성군 남면 분향리 1083-6 학사농장에서 재배하여 사용하였다. 건조과정을 거친 비누풀 잎을 분쇄

하여 50% 에탄올로 추출 및 감압농축하여 사용하였다.

세포배양에 사용된 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM), penicillin-streptomycin 및 fetal bovine serum (FBS) 은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 배양용기는 Falcon (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 제품을 사용하였다. Lipopolysaccharide (LPS), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), DMSO, 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), vitamin C, L-NMMA, Griess reagent는 Sigma-aldrich사 (St. Louis, Mo, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 시료의 분리 및 분석을 위한 column은 Shiseido (Japan)에서 HPLC 분석을 위한 quillaja saponin은 Sigma-Aldrich사, tea saponin은 Biolnad사 (Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

2.2. 유효성분의 추출 및 성분 분석

비누풀 잎 추출물의 유효성분 추출방법은 다음과 같은 방법으로 추출하였다 [3].

비누풀 잎 전처리 과정을 변형하여 2가지 방법으로 추출을 시행하였다. 건조된 비누풀 잎은 분쇄기를 이용하여 200 mesh 정도로 작게 분쇄한 다음 50% 에탄올로 45°C에서 3시간 침지, 1회 추출하였다. 내용물은 200 mesh에 1차 여과를 한 후, 10,000×g 속도로 원심분리를 한 후 filter (Adventec 5A) 하였다. 사포닌 성분을 정제하기 위하여 추출한 용매에 활성탄을 처리하여 30분간 반응시킨 후 filter (0.45 μm)한 다음 rotary evaporator를 이용하여 농축하였다. 전처리 과정을 변형한 비누풀 잎은 증기에 1회 쪄서 말린 것을 상기와 같은 방법으로 추출하여 사포닌 추출 및 정제 과정을 거쳤으며, 비누풀 잎 추출물의 성분 분석을 위해 HPLC 를 이용하여 분석하였다. Quillaja saponin 분석조건은 C₁₈ CapcellPAK UG 120 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Shiseido) column을 이용하였으며 아래와 같은 조건으로 수행하였다. 검출기는 Waters 996 / photodiode array detector (203 nm)를 사용하였다. Quillaja saponin 분석의 methanol solvent 농도는 0~5 min : 20%, 5~30 min : 60%, 100%로 증가시켰으며 유량은 1.0 mL/min를 사용하였다. Tea saponin 분석조건은 상기와 동일하며 methanol과 acetonitrile 7:3 (V/V) 혼합액을 이동상으로 하여 분석하였다 [4].

2.3. 용해성

용해성은 측정 용액을 1% 농도로 각종 유기용매에 소량씩 첨가하여 강하게 교반한 후 용해 정도를 육안으로 확인하였다.

2.4. 거품력 및 거품 유지력

거품력 (forming force)은 Ross-Miles 시험방법 [5]을 변형하여 평가하였다. 각 시료 5% 수용액 200 mL을 magnetic stirrer를 이용하여 10분간 교반한 뒤, homogenizer를 이용하여 20초 또는 shaking한 후 glass cylinder 를 이용하여 거품의 양을 측정하여 3회의 측정값 평균을 구하여 측정하였다.

거품 유지력 (forming stability)은 상기와 동일한 방법으로

거품이 일어나는 시점에서 수용액 윗부분부터 거품 양을 측정하였으며 10분 간격으로 60분간 거품 유지력을 측정하였다 [6].

2.5. 유화활성

유화활성 (emulsion activity)은 측정용액 2 mL (5%)을 pH 7의 0.2 M phosphate buffer 완충액 3 mL와 혼합한 후 각각의 기질을 2 mL 넣고 1분간 강하게 교반하여 유화시킨 다음 60°C에서 30분간 방치하였다 [7].

2.6. 세포배양

본 실험에 사용한 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양을 위한 DMEM 배지에 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5%, CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

2.7. 세포생존율 측정

세포독성은 MTT 시약을 이용하여 세포생존율을 측정하는 Mosmann의 방법 [8]을 변형하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 1×10⁵ cells/mL 농도로 24 well plate에 각각 분주하고 하루 안정화시킨 뒤, serum free 배지로 교환한 후 비누풀 증기 추출물을 농도별로 처리하여 배양하였다. MTT 용액 (5 μg/mL)을 첨가하고 4시간 동안 환원반응을 유도한 후 formazan 결정을 용해하기 위하여 배양액을 제거하고 200 μL의 DMSO를 첨가하였다. 이를 micro plate reader 를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포만 배양한 대조군을 기준으로 처리군의 세포생존도 (%)를 계산하였다.

2.8. Nitric Oxide (NO) 생성 및 정량

Raw 264.7 세포를 24 well plate에 2×10⁵ cells/mL로 세포를 분주하고 24시간 동안 세포를 안정화시킨 후 비누풀잎 추출물 (10, 100, 500 및 1000 μg/mL)과 LPS (1 μg/mL)을 동시에 처리하여 대조군을 뺀 모든 well에 모두 넣어서 자극하였다. NO 생성량은 24시간 배양한 배양배지를 수집하여 원심분리 (4000 rpm, 3 min)하여 상등액을 얻었다. Griess reagent를 이용하여 96 well plate에 배양액 100 μL와 Griess reagent (1% sulphanilamide와 0.1% naphthylethylenediamide를 포함한 5% (v/v) phosphoric acid) 100 μL을 섞어 1분간 반응시킨 후 540 nm 흡광도에서 측정하였다 [9]. NO 생성 대조군인 L-NMMA를 10 μg/mL의 되도록 시료와 같은 방법으로 처리하여 NO 생성 저해 효능을 비교하였다. Standard NO (sodium nitrite)에 대한 표준 곡선의 r² 값은 0.99 이상이다.

2.9. 자료 및 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 하였으며 *P* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 비누풀잎 추출 및 성분 분석

비누풀 잎 추출물에 대한 HPLC 분석은 대조군으로 사포닌 함량이 다량 함유되어 있는 quillaja saponin, tea saponin과 비교하였다.

비누풀 건잎 추출물과 비누풀 증기 잎 추출물의 사포닌 함량 (quillaja saponin, tea saponin)을 비교한 결과 비누풀 증기 잎 추출물의 사포닌 함량이 비누풀 건잎 추출물보다 약 3배 높았다 (Table 1).

HPLC spot에서 대조군인 quillaja saponin은 10분에서 12분 사이 큰 peak를 확인할 수 있으며 tea saponin은 2분에서 3분 사이에 큰 peak를 확인할 수 있었다 (Fig. 1, 2).

3.2. 용해성

비누풀 건잎, 증기 잎 추출물의 용해도를 비교한 결과, 물에서 용해가 잘 되었고, 메탄올, 에탄올에서는 용해는 되었으나 성상이 탁하였으며, 클로로포름, 디클로로메탄, 부탄올, 헥산에서는 용해가 되지 않았다. 에틸아세테이트에서는 분산되어 있는 상태였다.

Table 1. Contents comparison of tea saponin and quillaja saponin in the extracts of steamed and dry leaves of *Saponaria officinalis* L.

	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	
	tea saponin	quillaja saponin
Steamed	6.44	27.94
Dry	2.49	9.71

위의 실험결과로부터 비누풀 건잎, 증기 잎 추출물의 용해도는 극성이 높은 용매에서 친수성이 강한 상태임을 확인하였다 (Table 2).

3.3. 거품력 및 거품 유지력

비누풀 잎 추출물의 거품력 및 거품 유지력을 측정한 결과와 Fig. 3에 나타나 있다.

비누풀 건잎 추출물, 비누풀 증기 잎 추출물을 기준으로 천연계면활성제로 알려진 quillaja saponin, tea saponin과 비교하였으며, 화장품에 사용되는 계면활성제인 tween 20을 비교하였다.

거품의 높이를 수치화하여 비누풀 건잎 추출물은 28 mm, 비누풀 증기 잎 추출물은 76 mm이며 quillaja saponin, tea saponin 및 tween 20의 거품 높이는 70 mm, 68 mm, 80 mm로 나

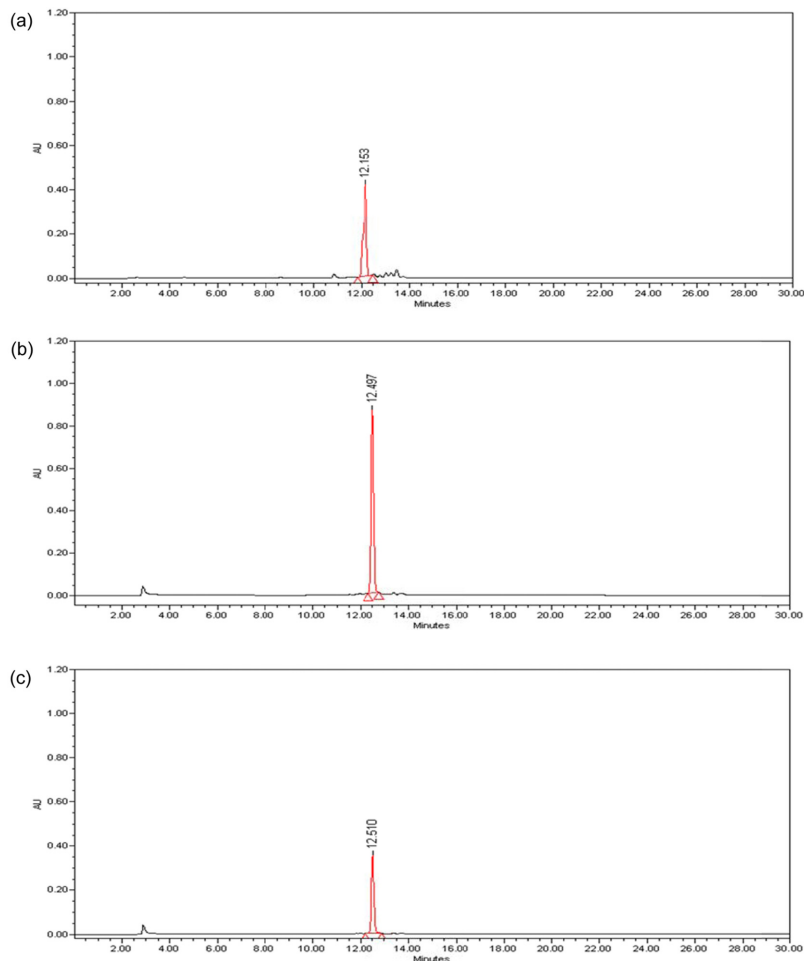


Fig. 1. HPLC chromatograms for (a) quillaja saponin, (b) *Saponaria officinalis* L. (steamed), and (c) *Saponaria officinalis* L. (dry).

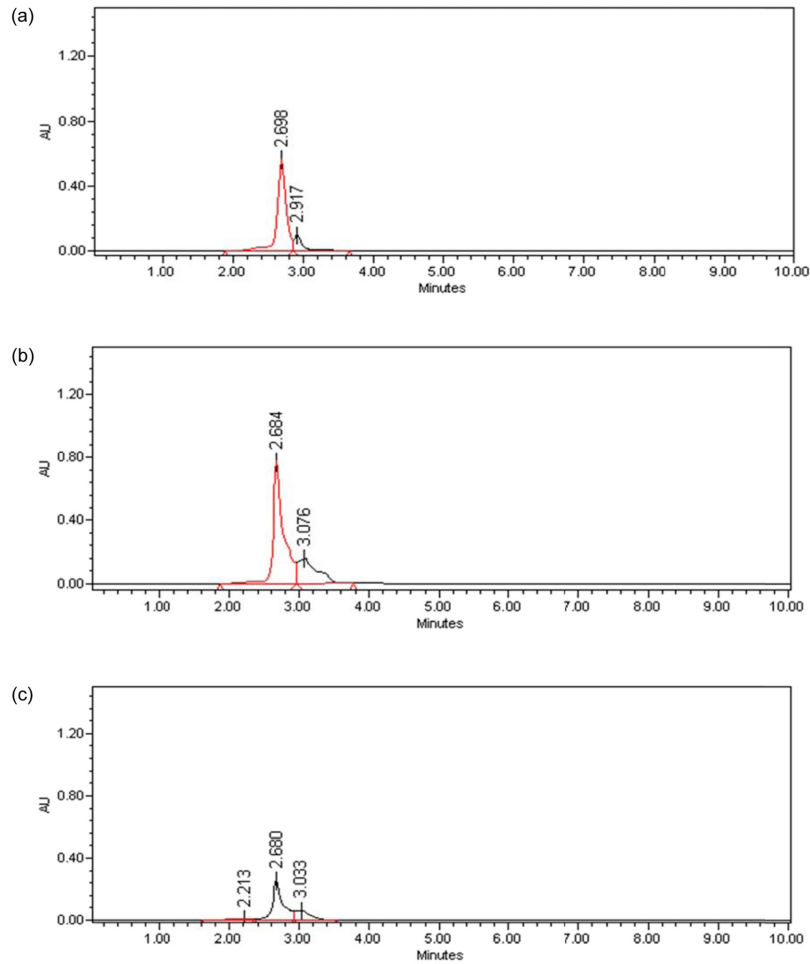


Fig. 2. HPLC chromatograms for (a) tea saponin, (b) *Saponaria officinalis* L. (steamed), and (c) *Saponaria officinalis* L. (dry).

Table 2. Solubility of *Saponaria officinalis* L. extract for various solvents

Solvent	Solubility
Water	soluble
Methanol	Weak soluble
Ethanol	Weak soluble
Dichloroform	Insoluble
Chloroform	Insoluble
Hexane	Insoluble
<i>n</i> -Butanol	Insoluble
Ethyl acetate	Insoluble but disperse

타났다.

거품 유지력은 10분 간격으로 60분간 관찰하여 시료의 거품 높이를 측정하여 수치화 하였다.

각 시료의 거품 유지력은 시간이 흐를수록 거품이 줄어드는 경향을 나타내고 있으나, quillaja saponin, tea saponin, Tween 20 과 유사한 차이의 거품 유지력을 나타내었다.

거품 조밀도는 비누풀 증기 및 추출물 > tea saponin > quillaja saponin 순으로 비누풀 증기 및 추출물이 quillaja saponin, tea saponin보다 우수한 조밀도를 확인하였다.

3.4. 유화활성

비누풀 증기 및 추출물의 유화활성은 Table 3 나타났으며, 유화활성은 olive oil, 현미유, Tween 20의 유화 활성을 비교한 결과 유화 활성은 100%를 기준으로 했을 시, Tween 20은 80%, 비누풀 증기 및 추출물은 77%를 나타내었다.

3.5. 세포독성

비누풀 증기 및 추출물의 세포독성을 알아보기 위해 RAW 264.7 세포에 농도 의존적으로 처리하여 24시간 후 세포 생존율을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다.

비누풀 증기 및 추출물을 농도별로 10, 100, 500, 및 1000 µg/mL로 24시간 처리한 결과 세포 생존율이 90% 이상으로 대조군과 비교했을 시 독성이 거의 나타나지 않았다. 따라서 비누풀 증기 및 추출물을 이용한 활성 측정 시 세포생존율에 영향을 주지 않은 1000 µg/mL 이하의 농도 범위에서 진행하였다.

3.6. Nitric oxide (NO) 생성 저해능

LPS로 유도된 RAW 264.7 세포의 NO 생성 억제효과를 살펴

Table 3. Emulsion performance of the extracts of steamed leave of *Saponaria officinalis* L. and several surfactants at 5 wt% concentration

Emulsion performance (유효력 %)				
	Olive Oil	현미유	Tween 20	<i>Saponaria officinalis</i> L. (steam)
Emulsion activity	77%	71%	80%	77%

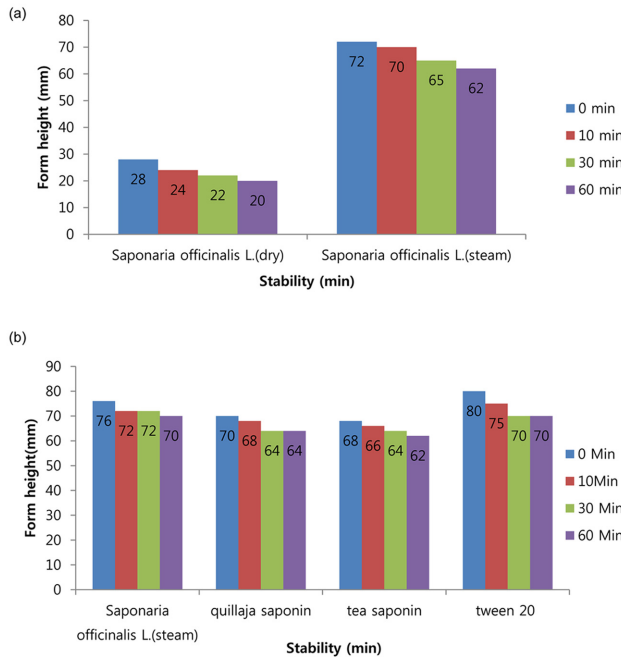


Fig. 3. Foaming force and foaming stability of *Saponaria officinalis* L. extract (a) and several surfactants at 5 wt % concentration (b).

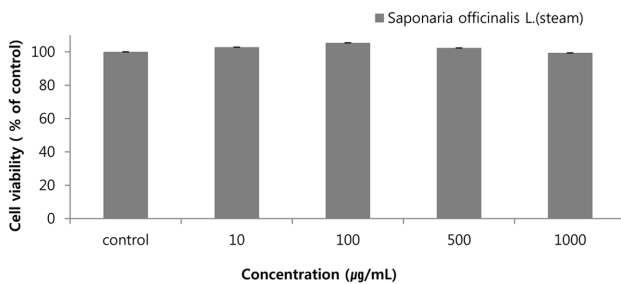


Fig. 4. Effect of *Saponaria officinalis* L. (steam) extract the viability of RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/mL) were incubated for 24 hrs in DMEM containing Free FBS and were treated for 24 hrs with *S. officinalis* L. (steam) extract (10-1000 µg/mL). Results were expressed as % negative control. Each data value is presented as mean±S.D. of three experiments. * $p < 0.05$.

보기 위해서 NO 생성을 억제하는 물질로 대표적으로 알려진 L-NMMA 를 처리하여 대조군으로 사용하여 측정할 결과는 Fig. 5와 같다.

세포만 대조군의 경우 3.25 µM의 매우 낮은 농도의 NO가 검출된 반면, LPS를 처리할 경우 16.67 µM이 검출되어 RAW 264.7 세포가 LPS에 의해 활성화됨으로써 NO 생성을 현저히 증가시키는 것을 확인한 후, 비누풀 증기 잎 추출물을 10-

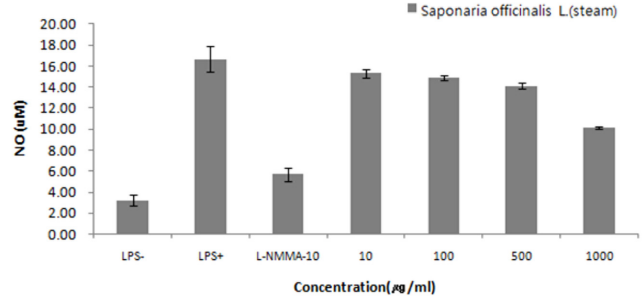


Fig. 5. Inhibition of NO production in RAW 264.7 cells by *Saponaria officinalis* L (steam) extract. RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/mL) were incubated for 24 hrs in DMEM containing Free FBS and were treated for 24 hrs with *Saponaria officinalis* L (steam) extract with or without LPS (1 µg/mL). NO released into the cell culture medium was measured by the Griess reagent in the nitrite form. Each data value is presented as mean±S.D. of three experiments. *Represent significant difference from LPS control. * $p < 0.05$.

1000 µg/mL로 농도로 처리하였을 때, 15.31, 14.88, 14.13, 10.13 µM의 NO 생성 저해능을 나타내었다. 따라서 비누풀 증기 잎 추출물은 LPS 에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 NO의 생성을 농도 의존적이고 유의적으로 감소시키는 것을 알 수 있었다.

4. 결론

본 연구에서 비누풀 잎 추출물 전처리 과정을 변형하여 사포닌 함량을 높이고 계면활성제 성분을 효과적으로 추출할 수 있었다.

천연계면활성제로 알려져 있는 quillaja saponin, tea saponin 과 비교하여 사포닌 함량을 측정할 결과 비누풀 증기 잎 추출물이 비누풀 건잎 추출물에 비해 약 3배 높은 함량을 나타내었고, tea saponin의 경우 대조군으로 사용한 tea saponin peak 외에 두 가지 성분을 포함하는 것으로 나타났다.

비누풀 증기 잎 추출물의 거품력 및 거품 유지력은 화장품에 사용하는 비이온계면활성제인 Tween 20과 비슷한 수치를 나타내었다.

비누풀 증기 잎 추출물은 화장품에 유상으로 사용되는 olive oil, 현미유에 대해서 약한 유효 활성을 나타내었다.

10-1000 µg/mL의 농도에서 RAW 264.7 세포에 독성을 나타내지 않았으며, NO 생성량을 농도 의존적으로 억제하는 것을 보여주었다.

본 연구결과 비누풀 잎 추출물은 화장품용으로 거품력이 우수하나 유효력은 약하게 나타났으며, 추출물에 의한 세포

독성이 없는 농도에서 농도 의존적으로 NO 생성 억제를 확인하였다.

전처리를 변형한 비누풀 및 증기 추출물은 화장품 소재로서 거품력이 좋은 세제류 및 워시 타입용으로써 사용가능성이 보여지며, 추후 임상과 관련 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

감사

본 연구는 중소기업청 농공상용합형 기술개발사업 (S2063240)에 의한 연구지원으로 수행하였으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Kosaric, N. (1992) Biosurfactants in industry. *Pure Appl. Chem.* 64: 1731-1737.
2. Shim, S. H. and K. R. Park (2006) Characterization of biosurfactant producing *Pseudomonas* sp. G314, *Korean J. Microbiol.* 42: 286-293.
3. Kim, D. W., Y. J. Kim, Y. J. Lee, J. W. Min, S. Y. Kim, and D. C. Yang (2008) Conversion of ginsenosides by repetitive steamings and dryings process of Korean ginseng root and its inhibition of BACE-1 activity. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.* 22: 1557-1561.
4. An, L. K., Y. Kimura, and H. Okuda (2003) Anti-obesity Effect of Tea Saponins. *International Symposium on Green Tea* 6: 73-80.
5. Denkov, N. D. (2004) Mechanisms of foam destruction by oil-based antifoams. *Langmuir* 20: 9463-9505.
6. Rigano, L., N. Lionetti, and R. Otero (2009) Quillaja triterpenic saponins - The natural formers. *SOFW-J.* 135: 4-2009.
7. Kim, H. J., S. K. Park, B. Y. Kim, S. K. Hong, S. K. Cho, and D. U. Kim (2008) Development of a natural surfactant from extracts of *Platycodon grandiflorum*. *Korean Chem. Eng. Res.* 46: 227-232.
8. Mosmann, T. (1983) Rapid colorometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
9. Wang, S., Y. Chen, D. He, L. He, Y. Yang, J. Chen, and X. Wang (2007) Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with Gastrodia and Uncaria decoction, a traditional Chinese formulation. *J. Ethnopharmacol.* 114: 458-462.