

카카오 추출물의 알칼로이드 성분이 함유된 겔제형의 개발

강선영*

용인대학교 교양학부

Development of Gel Formulation Containing Alkaloid of Cacao Extract

Sun -Young Kang*

The Faculty of Liberal Arts, Yong-In University, Yong-In 17092, Korea

Abstract - In this study, methanol (CAME) and ethanol (CAEt) extract of *Theobroma cacao* L. were tested to see possibility as natural functional cosmetic agent. Cacao extract and cacao extract loaded gel were evaluated for various properties such as antioxidant, antimicrobial, cell viability, anti-inflammatory. Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide (LPS) stimulated raw 264.7 cells, at concentration of 0.125~1 $\mu\text{g/ml}$ a dose-dependent manner. Gel formulation (3% extract) were stable for 60day in both extract. In conclusion, gel containing extract of *Theobroma cacao* L. indicated strong possibility for functional cosmetic ingredient.

Key words - Alkaloid, Cacao, Extract, Functional cosmetics, Transdermal gel

서 언

천연추출물에 대한 관심과 연구가 다양해지면서 기능성 소재로서의 가능성을 평가하기 위한 폭넓은 연구가 이루어지고 있다. 천연추출물에 함유되어 있는 유용물질을 식물 속에 들어 있는 화학물질을 의미한다. 이들 화학물질은 햇빛을 받아 열매의 껍질이나 잎사귀에서 식물이 자신을 스스로 방어하기 위해 만들어내는 '독성물질'이다. 이러한 독성물질은 강력한 항산화 물질들을 생성하여 활성산소로 인한 피해를 줄일 수 있을 뿐만 아니라, 세균이나 곰팡이가 침투하지 못하게 식물 스스로 만들어 내는 것이다(Chomnawang *et al.*, 2005). 이러한 유용물질을 식품, 의약품, 화장품에 적용시키기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다(Colven and Pinnell, 1996; Rusconi and Conti, 2010). 현재 국내 화장품 회사들은 다양한 효능 검증이 된 천연 소재의 추출물을 확보하여 제품화에 노력하고 있다. 대표적으로 기능성 화장품 중 미백 고시 원료 중 하나인 알부틴은 유기화합물로 하이드로퀴논(hydroquinone)에 glucose가 붙은 형태를 가지고 있다. 하지만, 하이드로퀴논은 피부 알레르기 및 피부

자극을 유발하여 화장품 원료로 사용이 금지되고 있다. 안전한 미백소재를 개발하기 위해 알파비사보롤, 알파리포익산, 닥나무 추출물, 상백피 추출물 등으로 대체하는 제품들이 소개되고 있다. 또한, 손상된 피부 재생을 돕기 위해 합성 화합물을 대신하여 부작용이 없이 사용할 수 있는 병풀(*Centella asiatica*)의 주요 성분인 asiaticoside가 함유된 마데카솔 연고와 고대부터 화상 및 상처치료제로 알려진 알로에 그리고 부작용을 줄이면서 창상치유를 촉진시키는 프로폴리스 등이 함유된 겔(gel), 연고 제제가 상용화되어 판매되고 있다.

카카오(*Theobroma cacao*)는 아욱과에 속하는 상록수로 중·남 아메리카가 원산지인 열대 식물이다. 열매를 뿔아 만든 가루는 코코아라고 하며, 초콜릿의 주원료이다. 카카오는 polyphenol의 함량이 높다고 알려졌으며(Karim *et al.*, 2014) 카카오의 주요 phenol 화합물은 monomers (catechin, epicatechin), epicatechin-(4 β →8)-catechin (procyanidin B1), epicatechin-(4 β →8)-epicatechin (procyanidin B2) 등의 dimers와 [epicatechin-(4 β →8)] 2-epicatechin (procyanidin C1)과 같은 trimmers의 구조를 가지고 있다. 또한, 알칼로이드(alkaloid) 화합물로 퓨린(purine)계에 속하는 caffeine, theobromine 성분이 함유되어 있다. 카카오를 활용한 항산화, 항노화, tyrosinase 억제능에 관한 연구와 항염증 및 항균성이 탁월하다는 보고가 있다

*교신저자: beausunny@nate.com
Tel. +82-70-4202-1099

(Scapagnini *et al.*, 2014; Smit and Blackburn, 2005). 또한, 국외의 선행연구에서도 카카오의 다양한 활성에 대한 연구가 많이 진행되고 있다(Smit *et al.*, 2004). 하지만 카카오 추출물의 생리활성 성분의 함량 평가 및 약리적 효과를 입증하는 연구는 다양하나 제형 개발의 연구는 매우 미비하다. 약리적 효능을 가지는 천연소재의 유기화합물의 대부분이 소수성 성질을 가지고 있으며 경구, 경피, 경피 등의 체내에 사용하기 위해 제형 개발은 필수적이다.

본 연구에 앞서 저자들은 카카오 추출물을 천연색소로 활용하여 항균 효과가 있는 메이크업 제품을 개발하였다(Kang, *et al.*, 2014). 본 연구에서는 카카오에 함유된 알칼로이드계 화합물 caffeine, theobromine 성분을 Gas Chromatography (GC)로 정성 및 정량적 분석을 하였다. 추출물의 성능 평가를 위해 항산화, 항균, 항염증 실험을 진행하였다. 또한, 약리적 효능을 가진 염기성의 카카오 추출물을 피부외용제로 활용하기 위해 gel 제형으로 제조하고 일정기간 동안 물성을 비교한 후 물리적 안정성을 평가하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 기기

카카오(Theobroma cacao L.)분말은 Navitas Naturals (USA)사에서 제조한 것으로 100% 순수 분말을 구입하여 사용하였다. EtOH, MeOH 등 각종 용매는 특급 시약을 사용하였다. 카카오 추출물에 사용된 분석 시약은 시그마알드리치사(USA)에서 구입하였다.

카카오 추출물 제조

카카오 분말 100 g을 70% EtOH (CAEt)와 70% MeOH (CAME)를 이용하여 하루 동안 침적시킨 후 여과하여 사용하였다. 이 여액의 일부는 회전증발농축기(RV10, IKA®, Germany)를 이용하여 온도 80~90°C, 회전 속도 250 rpm으로 감압여과 농축 후 진공, 동결 건조하여 분말화하였다.

카카오 추출물 GC-MS 분석

카카오 추출물은 GC-MS (Shimadzu, GC MS-QP2010, Kyoto, Japan)를 이용하여 분석하였다. Column은 Agilent사의 DB-5MS (0.32 mm I.d. × 60 m, 0.25 μm)를 사용하였고, detector는 MS이고 ESI mode에서 70 eV의 에너지로 이온화하였으며, TIC의 SCAN mode에서 검출이온질량범위 35~350으로 설정하여 각

질량스펙트럼 중에서 가장 강도가 강한 main fragmentation을 중심으로 라이브러리를 검색하여 물질을 확인, 분석하였다. Injector temperature는 260°C, detector 온도는 280°C이며, carrier gas는 helium을, flow rate는 5 μl/min를 사용하였다. Oven 온도는 최초 40°C에서 5 분 동안 유지한 후 4°C/min 속도로 200°C까지 상승 시킨 후, 200°C에서 20°C/min 속도로 280°C까지 온도를 상승시킨 후 20 분간 유지하였다.

항산화 평가

항산화 효과를 측정하기 위한 전자공여능을 측정하였다. 각 시료용액 2 ml에 0.2 mM의 DPPH 1 ml 넣고 교반 한 후 30 분간 암실에서 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다. Superoxide dismutase 효소활성은 Fridovich의 방법을 변형하여 측정하였다(Blois, 1958; Fridovich, 1975). SOD 효소 활성 검정은 분석용 Kit (Sigma사, 19160)를 사용하여 측정하였다. 즉, SOD의 효소활성이 NBT (Nitroblue Tetrazolium)의 환원을 저해하는 능력을 검정하는 photochemical NBT method를 사용하였다. 반응액은 50 mM carbonic buffer (pH 10.2), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM Xanthine, 0.025 mM NBT로 하였으며, NBT 환원 저해율을 흡광도 450 nm에서 측정하였다.

항균평가

디스크 확산법에 의한 추출물의 항균활성 검정은 다음과 같이 수행하였다. 100 μl (1×10⁷ CFU/ml)씩을 도말하였다. 멸균된 페이퍼디스크를 배지 위에 4 개씩 올려놓고, 미리 적정 농도로 희석된 추출물을 20 μl씩 점적한 후, 37°C에서 24 시간 동안 배양한 후 생성된 생육저해환의 크기를 조사하여 항균 활성을 검정하였다.

세포 생존율 측정

카카오 추출물 천연소재의 생체 내 세포 독성에 안전성을 평가하기 위해 섬유아세포(Human fibroblast, KCLB-21947)를 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 MIT assay를 이용하여 관찰하였다. 카카오 추출물을 첨가시킨 Gel 제형용 0.1 g/ml의 비율로 세포 배양 배지에 첨가하여 37°C에서 72 시간 용출하여 사용하였다. CCD-986SK 세포를 배양액에 24 시간 배양(1×10⁵ cell/ 96well)한 후 용출액을 처리하였다. 24 시간 후 배양액을 버리고 Well 당 20 μl의 MTT 용액을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 4 시간 동안 반응시킨 후, 배양액

을 버리고 DMSO 100 μ l씩 넣어 formazan을 용해한 후, ELISA 측정기(ELX 808, Biotek Instruments, Vermont, USA)를 이용하여 570 nm에서 측정하였다.

염증저해능 평가

Nitric Oxide (NO)의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess 반응을 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 세포는 DMEM 배지를 이용하여 1×10^4 cells/ml로 조절한 후 96 well plate에 접종하고 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 20 시간 전 배양하였다. 세포에 1 μ g/ml의 LPS (Lipopoly Saccharide)와 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/ml의 카카오 추출물에 함유된 Gel을 처리하여 24 시간 재배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후 동량의 Griess 시약(1% sulfanilamide+0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 첨가하여 실온에서 10 분간 반응시키고, microplate reader (Model 550, Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite (NaNO)의 농도별 표준 곡선과 비교하여 산출하였다.

카카오추출물 함유 Gel 제조

카카오 추출 분말을 첨가하여 기능성 Gel을 제조하였다(Smit *et al.*, 2004). 카카오 추출물이 첨가되지 않는 대조군과 카카오 추출물이 첨가된 실험군 Gel (CAEt-Gel, CAME-Gel)을 점증제, 결합제, pH 조절제를 첨가하여 각각 제조하였다(Table 1).

카카오 Gel의 pH 측정법

pH 측정은 온도별 저장 및 태양광선 노출 하에 있는 카카오 추출물 함유 Gel을 매회 1 g을 취하여 증류수로 15 ml 채운 후 sonicator로 1시간 동안 sonication 시킨 후 pH를 측정하였다. pH 표준 용액으로 측정 전 pH 보정에 정확성을 기하였고 측정 시 온도를 25 \pm 1 $^{\circ}$ C로 유지하였다.

카카오 Gel의 점도 측정법

실험에 사용된 Gel을 T-bar spindle을 이용하여 Brookfield 점도계로 점도를 측정하였다. 즉 크립을 일정한 가속도로 회전하는 spindle에 움직이는 크립의 점성 저항 torque값을 검출하여 점도를 측정하는 기기를 사용하여 측정하였다. 본 실험에서는 spindle의 종류와 회전수를 spindle D, 94 rpm으로 15 초 간격으로 5 번 측정하여 평균과 편차 값을 구하였고, 온도별로 저장되어 있는 크립은 항온조에서 꺼낸 후 3 시간이 지난 후에 측정하였다.

결과 및 고찰

성분분석

카카오분말을 각 용매로 추출한 결과 CAEt 추출물은 30%, CAME 추출물은 36.5%의 수득률을 확인하였다. 카카오 추출물의 GC-MS 분석결과 유기질소를 포함하고 있는 화합물로 주요 성분으로는 CAEt 추출물에서 caffeine 25.01%, theobromine 58.68%가 확인되었으며, CAME 추출물에서도 caffeine 29.98%, theobromine 51.66% 검출되었다(Fig. 1). 또한, 용매 성분을 제외한 CAEt 추출물의 잔여 성분 16.31% 내에 trichloroacetic acid 0.31%, pyrrolo 0.78%, 불포화지방산계인 palmitic acid 0.91%, oleic acid 0.57%를 확인하였다. CAME 추출물에서는 용매 성분을 제외한 18.64% 내에 L-tyrosine 0.38%, pyrrolo 1.11%, 불포화지방산계인 palmitic acid 0.8%, oleic acid 0.52% 성분이 확인되었다. 특히, theobromine 성분은 카카오 씨에 들어 있는 알칼로이드 성분으로 메틸화되면서 caffeine이 된다(Fischer *et al.*, 2007). 카카오, 녹차, 커피 등에 함유된 알칼로이드(alkaloid)성분은 의약품에서는 흥분제, 강심제, 이뇨제로 사용된다. 하지만 화장품에 적용시 피부의 신진대사를 촉진시켜 피하지방 축적을 억제해 주며 모공을 조여주는 작용이 있다고 보고되었다.

Table 1. Composition of gel formulations

Ingredient	Control	CAEt-Gel	CAME-Gel
Carbopol 934 (% w/v)	2	2	2
Propylene glycol	2	2	2
Ethanol	5	5	5
Triethanolamin	q.s to neutralize the gel base	q.s to neutralize the gel base	q.s to neutralize the gel base
Water	Q.S	Q.S	Q.S
Extract	-	3	3

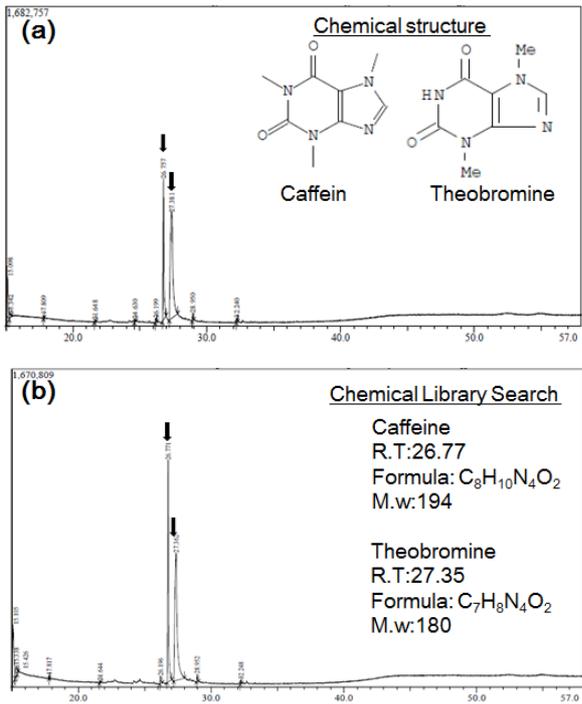


Fig. 1. GC-MS chromatogram of CAEt (a) and CAME (b) extract.

항산화능

전자공여능 측정은 지질과산화 연쇄반응에 관여하는 산화성 free radical에 전자를 공여함으로써 free radical의 생성 억제 정도를 간접적으로 측정할 수 있다. 카카오 추출물의 free radical 소거활성을 측정할 결과를 보면, 대조군으로 선정한 quercetin의 경우 IC₅₀ 값이 11.34 µg/ml이며, 카카오의 추출 조건이 CAEt 추출물에서 IC₅₀ 값은 43.14 µg/ml, CAME 추출물에서는 IC₅₀ 값은 35.42 µg/ml로 관찰되었다(Fig. 2).

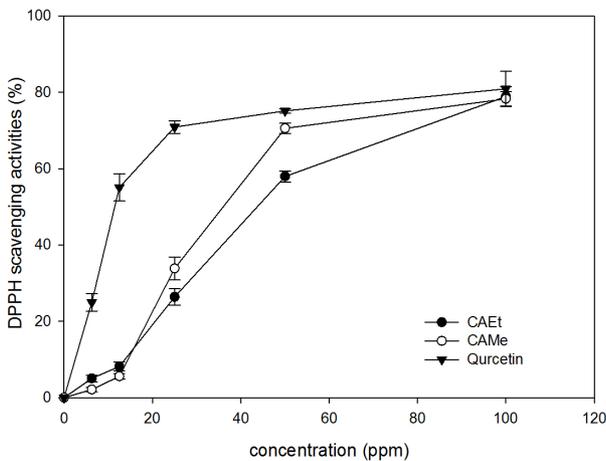


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of the cocoa extract.

SOD (Super Oxide Dismutase)와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로 식물내의 유기화합물은 superoxide의 반응성을 억제한다. 따라서 이 SOD 유사물질은 체내의 superoxide를 제거함으로써 산화적 장애를 방어하고 노화억제 효과를 기대할 수 있다. 양성 대조군으로 BHT (Butylated hydroxytoluene)의 IC₅₀ 값은 5.24 µg/ml, CAEt에서 IC₅₀ 값은 90.9 µg/ml, CAME의 IC₅₀ 값은 52.6 µg/ml로 관찰되었다. MeOH 조건에서 더 많은 항산화능 성분이 추출되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 2).

항균성평가

카카오 추출물의 항미생물 효과를 평가하기 위하여 paper disc법을 이용하여 *S. aureus*, *S. epidermidis*의 미생물에 대한 inhibition zone의 지름을 측정하였다. 그 결과 *S. aureus*에서 CAME로 추출한 100 mg/ml농도에서 높은 저해환을 관찰하였다. 카카오 추출물의 항미생물 효과를 평가하기 위하여 paper disc법을 이용하여 *S. aureus*, *S. epidermidis*의 미생물에 대한 inhibition zone의 지름을 측정하였다. 그 결과 *S. aureus*에서 CAME로 추출한 100 mg/ml농도에서 12.4±1.25의 높은 저해환을 나타냈다. 카카오 추출물이 30 mg/ml (3%) 첨가된 Gel 그룹에서도 CAME 추출물이 함유된 Gel에서 농도 의존적으로 균이 저해되는 저해환을 확인할 수 있었다(Table 2).

John *et al.* (2012)의 연구에서 카카오 콩 껍질을 용매별로 분획하여 얻은 추출물에서는 100 mg/ml에서 acetone 13.11±0.42, EtOH 10.98±0.31, MeOH에서 10.87±0.13의 저해능을 관찰되었으며, MeOH 용매로 추출한 추출물이 더 높은 항균성을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과들은 향후 기능성 화장품 개발에 있어 유효한 천연소재로서 응용가치가 높음을 시사하는 것으로 카카오 추출의 조건에 따라 항균 효능의 차이를 기대할 수 있었다.

Table 2. Antibacterial activities of cacao extract against bacterial test organism

mg/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	CAEt	CAME	CAEt	CAME
1.25	8.36±0.12	8.3±0.2	6.9±0.21	7.58±1.2
25	8.96±0.24	8.35±1.3	7.2±0.32	8.69±1.3
50	9.36±1.23	10.2±2.14	8.69±1.2	8.98±2.1
100	10.36±2.32	12.4±1.25	9.8±1.5	9.6±1.6
Gel	9.45±1.2	9.87±1.5	7.5±1.3	8.8±1.5

Paper disc diameter: 6 mm

독성평가

화장품 소재로 안전성을 확인하기 위해 가장 많이 사용되는 세포독성 실험을 통해 평가하였다. MTT assay 방법으로 추출물과 추출물이 첨가된 겔 제형의 일정 농도를 배지에 용출시켜 세포 생존률을 평가하였다. CAEt, CAME 추출물과 추출물이 3% 첨가된 겔 제형의 세포독성을 평가한 결과이다(Fig. 3). CAEt, CAME 추출물에서 세포독성이 나타나지 않았음을 알 수 있었다. 또한, 각 추출물이 함유된 겔 제형에서도 독성을 관찰할 수 없었다. CAEt, CAME 추출물이 높은 농도에서도 세포 안전성을 나타낸 화장품 배합시 고농도까지 사용이 가능하며 다양한 범위에 폭넓게 사용이 가능할 수 있을 것이라 기대된다.

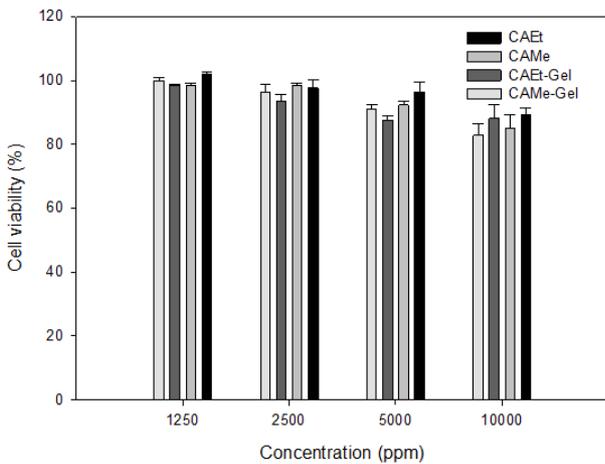


Fig. 3. Effect of cacao extract loaded gel on the cell viability of CCD-986SK cells. Data presented as means±S.D. of three independent experiments.

Nitric Oxide assay 염증저해능 평가

Nitric Oxide (NO)는 대식세포 등의 면역세포로부터 생성되어 혈관을 확장시키거나 암조직의 성장을 억제하고, 바이러스나 세균들의 증식을 저해하거나 직접 사멸시키는 등 인체 면역염증반응에 있어서 중요한 역할을 하지만(Nam *et al.*, 2015) 과잉 배출시 만성 염증질환 악화 등의 문제점이 발생되기도 한다. LPS는 지질다당체로 산화적 스트레스를 유발시킨 Raw 264.7 세포에서 생성되어 배양액 중으로 유리된 NO의 농도를 NO⁻²의 형태로 Griess 시약으로 정량화했다. NO가 매우 불안정하며 NO⁻²형태로 즉시 변환되기 때문에 LPS를 처리한 군은 LPS를 처리하지 않은 군보다 NO생성이 6배가량 증가되었으며, 이러한 LPS로 산화적 스트레스를 유발시킨 연구는 많이 보고된 바 있다(Choi *et al.*, 2015). 산화적 스트레스 유발 상황에서 CAME 함유

겔은 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. CAEt-Gel 또한 흡사한 결과를 나타냈다. 이때 CAME-Gel의 1000 ppm 농도 일 때 값은 6.21±1.45으로 확인할 수 있었다(Fig. 4). 산화적 스트레스 유발 상황에서 CAME의 NO 생성 억제작용은 CAME추출물의 항산화, 항염증 효과에 기인한 것으로 기능성 화장품뿐만 아니라 cosmeceutical에도 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

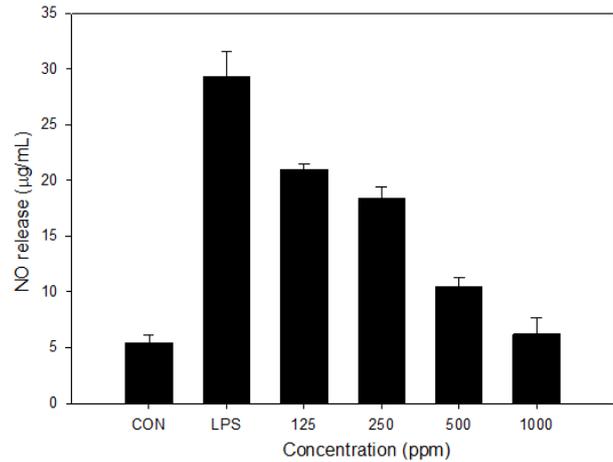


Fig. 4. Inhibition of LPS-induced NO production by CAME loaded gel. Data presented as means±S.D. of three independent experiments.

카카오 Gel 제형 물성평가

피부표면의 pH는 약산성으로 알려져 있다. 경피용 Gel, 연고 등의 제품에 이상적인 pH는 5.5~6.5이며 현재 사용되고 있는 대부분의 피부외용제는 연고 제형과 Gel 제형을 구분된다. 연고 제형은 oil base로 지용성 성질로 효능이 강력하지만 씻어내지 않으면 약효 흡수 후 피부를 계속 덮고 있어 모낭염의 문제를 일으킬 수 있다. 하지만 Gel 제형의 외용제 경우 친수성 성분이 감염주위에 세균이 침투되는 것을 방지할 수 있으며 전극을 띄는 균의 접근을 억제 시킬 수 있다. 일반적으로 알칼로이드계 화합물은 염기성으로 화장품 및 피부외용제 제형 개발시 다양한 문제점을 나타낸다. 카카오 추출물 함량이 3% 이상 첨가될 때 Gel 제형이 상분리가 일어나는 것을 관찰하였다.

3%의 CAME 추출물 함유 Gel 제형에서 상분리 및 pH변화를 관찰한 결과 60일 동안 pH를 일정하게 유지하는 것을 관찰하였다(Fig. 5a). 현재 상용화되고 있는 수분형 Gel 제품으로 알로에 조성 Gel의 점도는 3,000 CPS이며 CAEt, CAME 추출물 함유 Gel의 경우 CAEt 추출물 첨가군은 4,500 CPS이고 CAME 추출물이 첨가된 군은 4700 CPS로 확인되었다(Fig. 5b). 카카오 추

출물을 OH-와 COOH-기는 점도에 영향을 주었으며 시간에 지남에 따라 500 CPS범위의 오차가 관찰되었다.

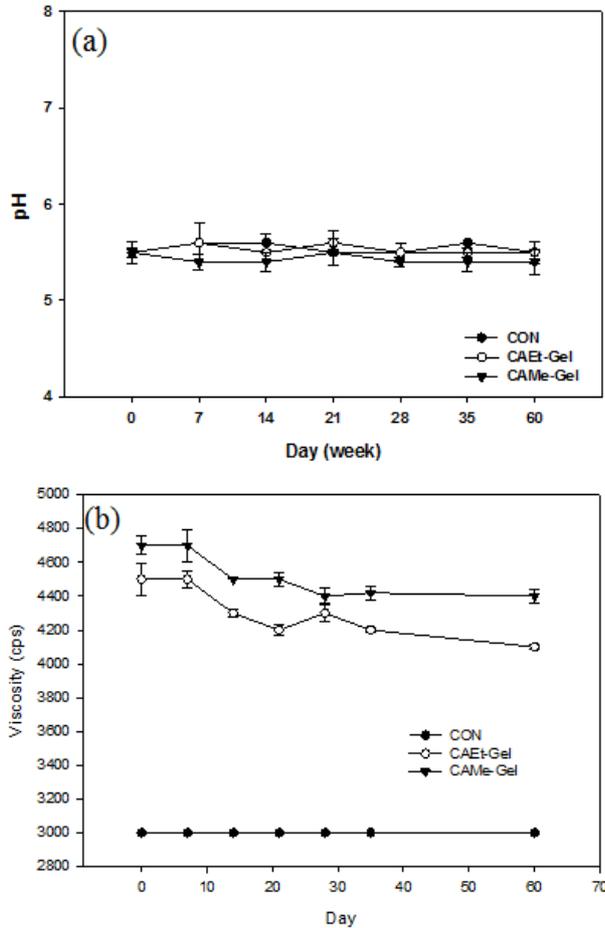


Fig. 5. Stability test of solution formulation including cacao extract loaded gel for 60 days. (a) pH change, (b) viscosity change.

적 요

본 연구에서는 카카오 추출물의 알칼로이드계 성분의 함량을 관찰하고 항산화, 항균, 항염증 활성을 확인하였다. CAEt, CAME추출물 함유 Gel을 제조하여 물리적 안정성을 관찰하였다. 카카오 추출물의 생리활성을 관찰하기 위해 DPPH, SOD 측정을 진행하였으며 세포독성 및 LPS로 유발시킨 일산화질소의 소거능에 대한 연구를 진행하였다. 또한 알칼로이드계 푸린 구조를 가진 카카오 추출물을 첨가시킨 Gel을 제조하여 60일 동안 상온에서의 안정성을 평가하였다. 카카오 추출물의 항산화 활성 검증에서는 CAEt 추출물에서 IC₅₀ 값은 43.14 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CAME

추출물의 IC₅₀ 값은 35.42 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 관찰되었다. SOD 측정에서도 CAEt 추출물에서 IC₅₀ 값은 90.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CAME 추출물의 IC₅₀ 값은 52.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 관찰되었다. MeOH 조건에서 추출한 CAME 추출물의 항산화능이 높은 것을 알 수 있었다. 추출물 3%가 함유된 gel (CAEt-Gel, CAME-Gel)을 제조하였다. 항균활성 측정 결과 CAME 추출물이 함유된 gel 제형이 더 높은 항균성을 나타내는 것을 확인하였다. MIT assay로 관찰한 세포독성은 80% 이상의 세포 생존율을 보였으며, LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 NO 발생을 관찰한 결과 CAME-Gel을 처리한 군에서 NO 생성량이 유의하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 위와 같은 결과를 근거로 카카오 추출물의 알칼로이드계 성분을 인체내에 적용하기 위해 제조한 Gel은 화장품 및 의약품 소재로 다양한 활용이 가능할 것으로 사료된다.

사 사

본 논문은 한국연구재단(과제번호: 2015S1A5B5A07041459)의 지원으로 이루어진 연구 결과임.

References

- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1399.
- Choi, M.H., Y.J. Jeon and H.J. Shin. 2015. Anthocyanin analysis of pressure-extracted Korean blueberry juice and *in vitro* anti-inflammatory in raw 264.7 cell line. *KSBBJ*. 30:191-196 (in Korean).
- Chomnawang, M.T., S. Surassmo, V.S. Nukoolkarn and W. Gritsanapan, 2005. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J. Ethnopharmacol.* 101:330-333.
- Colven, R.M. and S.R. Pinnell. 1996. Topical vitamin C in aging. *Clin. Dermatol.* 14:227-234.
- Fridovich, I. 1975. Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 44:147-159.
- Fischer, T.W., U.C. Hipler and P. Elsner. 2007. Effect of caffeine and testosterone on the proliferation of human hair follicles *in vitro*. *Int J Dermatol.* 46:27-35.
- John, N.A., F. Zhong and J.M. Kebitsamang. 2012. *In vitro* hypoglycemic and cholesterol lowering effects of dietary fiber prepared from cocoa (*Theobroma cacao* L.) shells. *Food Funct.* 3:1044-1050.

- Kang, S.Y., J. Kim and J.H. Kim. 2014. Manufacture & evaluation of mascara containing *Theobroma cacao* L. J. Kor. Soc. Cosm. 20: 713-720 (in Korean).
- Karim, A.A., A. Aziant, A. Ismail, P. Hashim, S.S.A. Gani, B.H. Zainudian and N.A. Abdullah. 2014. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. BMC Complement Altern Med. 14: 381-394.
- Nam, J.H., J.T. Seo, Y.H. Kim, K.D. Kim, D.L. Yoo, J.N. Lee, S.Y. Hong, S.J. Kim, H.B. Sohn, H.S. Kim, B.S. Kim, J.S. Shin, K.T. Lee and H.J. Park. 2015. Inhibitory effects of extracts from *Arabis glabra* on lipopolysaccharide induced nitric oxide and prostaglandin E2 production in RAW 264.7 macrophages. Korean J. Plant Res. 28(5):568-573 (in Korean).
- Rusconi, M. and A. Conti. 2010. *Theobroma cacao* L., the food of the Gods. A scientific approach beyond myths and claims. Pharmacol Res. 61:5-13.
- Scapagnini, G., S. Davinelli, L.D. Renzo, A.D. Lorenzo, H.H. Olarte, G. Micali, A.F. Cicero and S. Gonzalez. 2014. Cocoa bioactive compounds: significance and potential for the maintenance of skin health. Nutrients 6:3202-3213.
- Smit, H.J. and R.J. Blackburn. 2005. Reinforcing effects of caffeine and theobromine as found in chocolate. Psychopharmacology (Berl) 181:101-106.
- Smit, H.J., E.A. Gaffan and P.J. Rogers. 2004. Methylxanthines are the psycho-pharmacologically active constituents of chocolate. Psychopharmacology (Berl) 176:412-419.

(Received 26 June 2017 ; Revised 22 August 2017 ; Accepted 18 September 2017)