

잘피(*Zostera marina*)의 항산화 효능과 화장품 응용에 관한 연구

이소연, 양재찬, 김보애*
목원대학교 생의약화장품학부

A Study on the Antioxidative Effects of *Zostera marina* and its Application in Cosmetics

So-Yeon Lee, Jae-Chan Yang, Bo-Ae Kim*
Division of Biomedical & Cosmetics, Mokwon University

요약 본 연구는 해양현화식물인 잘피 추출물의 화장품소재로서 활용가능성을 확인하기 위해 항산화 효능을 확인하였고 잘피 추출물이 함유된 에멀션의 시간과 보관 온도에 따른 제형 안정성을 확인하였다. 잘피를 용해하여 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical assay와 SOD (superoxide dismutase)-like activity를 통해 항산화 시험을 진행하였으며 잘피 추출물이 함유되어 있는 에멀션의 pH, 점도를 측정하고 Turbiscan LAB을 이용하여 입자의 분산상을 확인하였다. 에멀션은 28일 동안 25°C±1°C, 40°C±1°C 항온조에 보관하여 일주일 간격으로 측정하였다. 그 결과 잘피 추출물은 5.00 mg/ml농도에서 86.21%의 DPPH radical 소거활성을 확인하였고 99.24%의 SOD 유사활성을 나타내었으며 농도 의존적으로 항산화 효과가 있는 것을 확인 하였다. 에멀션의 pH, 점도, 입자 안정성을 28일 동안 각 항온조에 보관하여 측정하였을 때, 보관 기간에 따른 물성의 변화가 미미하여 잘피 추출물이 함유된 제형은 시간과 보관 온도에 따라 안정한 것으로 확인되었다. 상기의 결과를 통해 70% 에탄올로 추출한 잘피 추출물은 피부노화를 예방하기 위한 항산화 화장품 소재로서 응용이 가능할 것으로 사료된다.

Abstract In order to use the sea flowering plant, *Zostera marina*, as a cosmetic ingredient, this study was conducted to evaluate its antioxidant effect. We confirmed the formulation stability of the emulsion containing *Zostera marina* extracts. We studied the antioxidant activity of the dissolved *Zostera marina* extracts through the DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity assay and SOD (superoxide dismutase)-like activity assay. Also, the pH, viscosity and particle dispersion of the emulsion containing *Zostera marina* extracts were measured using a Turbiscan LAB. The emulsions were measured at one-week intervals in a thermostat chamber (25°C±1°C, 40°C±1°C) for 28 days. The extracts of *Zostera marina* showed a DPPH radical scavenging rate of 86.21% and SOD-like activity of 99.24% at 5.00 mg/ml and exhibited a dose-dependent increase in their antioxidant activity. We measured the stability of the pH, viscosity and emulsion particles using the Turbiscan LAB in a thermostat chamber for 28 days. The formulations to which the *Zostera marina* extracts were added were considered to be stable, due to their negligible physical property changes over time during storage. The results suggest that the *Zostera marina* extracts with 70% ethanol (v/v) could be used in cosmetics as an antioxidant for the anti-aging of skin.

Keywords : Antioxidant, Emulsion Stability, Skin Aging, Turbiscan LAB, *Zostera marina*

*Corresponding Author : Bo-Ae Kim(Mokwon Univ.)

Tel: +82-42-829-7569 email: kba@mokwon.ac.kr

Received September 20, 2016

Revised (1st January 20, 2017, 2nd February 27, 2017)

Accepted March 10, 2017

Published March 31, 2017

1. 서론

피부는 신체의 가장 외곽에서 화학적, 물리적, 생화학적 자극인 외부환경으로부터 직접적으로 영향을 받으며 장벽 역할을 수행하며 신체에 있어 일차적인 방어 기능을 담당한다[1]. 피부는 표피, 진피, 피하조직으로 이루어져 있으며 외곽에 위치한 표피는 외부로 수분과 전해질의 손실을 억제함으로써 피부의 건조를 막아주며 UV, 미세먼지, 물리적 마찰, 미생물 등 외부 환경에 대한 적응과 면역 반응을 통해 신체를 보호하고, 항상성을 유지하여 피부가 정상적인 대사를 할 수 있는 환경을 제공한다[2-3]. 대사과정 중 유기물로부터 유래된 전자는 미토콘드리아에 있는 전자전달계(Electron transport chain)를 통해 산소로 전달되어 에너지를 생성하고, 전자를 받은 산소는 수소양이온과 물로 결합한다[4]. 이러한 과정에서 일부가 물이 되지 않고 전자만 받아 적은양의 superoxide가 생성되며 catalase와 SOD(Super oxide dismutase)로 인해 제거된다[5]. 하지만 UV 및 환경오염으로 인해 가해지는 신체외부의 자극과 스트레스로인한 내부에서의 지속적인 자극은 과량의 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)을 발생 시킨다[6].

ROS는 superoxide radical이나 hydroxyl radical과 같은 free radical을 보유하는 화학종을 말한다. Free radical은 홀수 전자를 갖는 원자나 원자단을 말하며 이와 같이 전자가 짝을 이루지 못하는 상태일 경우 에너지가 높고 매우 불안정하기 때문에 안정한 산물로 되기 위해 주위에 있는 전자를 끌어들이어 짝을 이루려는 성질을 갖는다[7]. 물리적, 화학적, 생화학적으로 발생된 체내의 ROS는 미생물 및 오염물질을 제거하는데 중요한 역할을 하지만 이는 세포막을 이루는 인지질, 단백질, DNA 등 고분자들을 공격하여 세포손상, 염증, 유전독성 및 장애를 일으키며 각종 질병의 원인이 되기도 한다[8-9]. Superoxide, lipid peroxy radical, hydrogenperoxide 등과 같은 ROS가 과하게 발생할 경우 cytokine (pro-inflammatory cytokine)인 IL-1 (interleukin-1), IL-6 (interleukin-6), TNF- α (tumor necrosis factor- α) 등 다양한 염증인자가 발생되며[10-11], 피부세포에서 염증인자로 유도된 과도한 염증으로 인해 조직세포에 손상이 발생된다[12]. 이러한 자극을 지속적으로 받아 생기는 산화적인 스트레스는 피부노화를 가속화시킨다. 피부의 외곽에 위치한 keratinocyte는 외부의 자극을 받으면 여러 가지

cytokine을 생성하게 되며, 시냅스를 통한 전달로인해 주위의 각질 세포에서도 cytokine을 생성되어 연쇄적인 염증반응을 일으킨다[13]. 이로 인한 ROS의 증가는 세포핵에 위치한 AP-1 (active transcription factor)을 자극하여 진피와 표피에서의 collagen 분해 효소(Matrix Metallo proteinase, MMPs)의 발현을 촉진하고 진피 세포에서 collagen 유전자 발현을 방해하여 피부내 탄력을 저하시키기 때문에 주름생성이 가속화된다[14]. 노화의 원인은 복잡적이며 여러 가설들이 있지만 대표적으로 산화물은 피부노화에 주된 원인으로 알려져 있으며 주름개선 고시 원료들 역시 항산화제 역할을 한다. 항산화제로서 BHT (butylated hydroxytoluene), BHA (butylated hydroxyanisole)와 같은 폐놀성 물질들이 사용되었으나 인체에 대한 독성, 발암성등과 같은 부작용이 보고된바 있다[15]. 때문에 독성이 있는 합성원료를 대체하기 위해 다양한 방법으로 연구되고 있다. 국내에서는 천연에서 유래된 물질에 기능성 펩타이드를 결합하여 항산화 효능과 콜라겐 합성효과가 우수한 화장품 소재가 연구된 바 있으며[16] 천연물 자체로서 화장품에 이용하기 위한 항산화제에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다[17,18].

본 연구에서는 바다 식물 가운데 유일하게 뿌리로 영양을 흡수하고 햇빛을 받아 꽃을 피우는 현화식물로서 잘피(*Zostera Marina*)를 사용하였다. 잘피속에 속하는 애기거머리말 (*Zostera japonica*)과 거머리말 (*Zostera asiatica*)은 항산화활성, 항염증, 암세포 증식 억제 효능에 대하여 연구된바 있으며[19-21] 인체 암세포에 대한 세포독성 효과가 있다고 알려져 있다[22]. 또한 잘피의 지표물질로 알려진 luteolin에 대한 연구로는 항산화, 항염증, 미백 등의 효능이 보고된 바 있으나[23-24] 주로 식품 분야에 국한하여 연구가 이루어져 왔다. 잘피 (*Zostera Marina*)의 피부에서의 생리활성 검증 혹은 화장품 소재로서의 연구는 현재 부족한 실정이다.

본 실험에서는 잘피 추출물에서 잘피의 지표물질로 알려진[25] luteolin을 분석하였으며 피부에서의 약리활성 가능성을 다양하게 연구하고자 전체 (*Zostera marina* Whole), 뿌리 (*Zostera marina* Root), 잎줄기 (*Zostera marina* Leaf stem)로 부위를 나누어 실험을 진행 하였고 DPPH radical 소거 활성과 SOD 유사활성 평가를 진행 하여 항산화 효능을 확인하였다. 또한 화장품 소재로서 활용 가능성을 확인하기위해 예멸선에 잘피 추출물을 적용하고 28일 동안 보관하여 pH 측정, 점도 측정,

Turbiscan LAB으로 입자를 관찰하였고 이를 통해 제형 안정성을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험 재료 및 기기

본 실험에서 사용한 잘피는 (주)마린에코텍에서 제공 받았으며, 인천 웅진군 대청면 대청리에서 2015년 06월에 채취하였고 10일간 건조한 잘피를 전체, 뿌리, 잎-줄기로 나누어 밀봉한 뒤 제공받았다. 에탄올은 주정판매월드(주)(Korea)에서 구입하여 사용하였고 항산화 실험에 사용된 DPPH (1, 1 - Diphenyl - 2 - picrylhydrazyl)와 ascorbic acid는 Sigma-Aldrich Co.(Saint Louis, USA)에서, methanol은 DUKSAN (iansan, Korea)에서, SOD like activity-kit는 DOGEN Bio Co. (seoul, Korea)에서 구입하여 실험하였다. 에멀션 안정성 평가에 사용된 기기는 Homo mixer (TK Auto homomixer Mark II, Tokushuki - kakogyo, Japan), Multi-room incubator (JSMI-04CP 4room chamber, JSR)를 사용하였다. pH측정은 Denver Instrument (Denver Instrument, UB-10 pH/mV meter)사의 pH meter을 이용하였으며 점도 측정에는 Brookfield Viscometer (Brookfield Engineering Laboratories 11 Commerce Bivd. Middleboro. MA 02346, USA)를 이용하여 측정하였다. Turbiscan LAB은 Formulation SA(31240 L'Union, France)사의 기기를 사용하였다.

2.2 추출물의 제조

건조된 잘피를 전체, 뿌리, 잎-줄기 부분으로 나누어 분쇄한 다음 이를 70% 에탄올에 상온에서 24시간 동안 침지 추출하였고 여과지로추출물을 2회 감압 여과한 후 회전증발농축기로 55°C에서 감압 농축하여 4°C에서 보관하여 실험에 사용하였다.

2.3 잘피 지표물질 성분분석

항산화효과를 나타내는 생리활성물질을 분석하기 위해 HPLC/UV분석을 통해 잘피의 지표물질인 luteolin과 잘피 추출물을 용매에 녹여 Table 1.과 같은 조건에서 분석하였으며 흡광도는 350nm에서 측정하였다.

Table 1. Operating conditions of HPLC for *Zostera marina* extracts.

HPLC conditions	
Column	C-18 column
HPLC temperature information	Injector temperature : room temperature Detector temperature : room temperature
Solvent/Wavelength	Water : MeOH (1:0 → 0:1) / 350nm
Injection volume	10 μ l
Flow rate	0.3 mL/min

2.4 DPPH radical 소거활성 측정

잘피 추출물을 20% ethanol(v/v)에 용해하여 DPPH radical에 대한 소거능 시험을 실행하였다[26]. 용매에 잘피를 각 농도 별로 용해한 후 96-well plate에 시료를 분주하고 DPPH를 0.2 mM로 methanol에 용해하여 시료에 처리하였다. 교반 후 상온에서 30분간 방치하고 microplate reader를 이용하여 492nm에서 흡광도를 측정하였고 radical 소거능은 시료 용액 첨가구와 시료용액 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다. ascorbic acid를 대조군으로 사용하였다.

2.5 SOD-like activity 측정

잘피 부위별 추출물을 20% ethanol용매로 녹인 후 농도별로 96-well plate에 분주하고 WST (Water soluble tetrazolium salt)와 xanthine oxidase를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응 하였다. 450nm에서 흡광도를 측정하였고 양성 대조군으로는 항산화 효능이 있다고 잘 알려진 ascorbic acid를 사용하였다. SOD유사활성은 다음 계산식을 이용하여 잘피 추출물의 첨가구와 무첨가구에 대한 흡광도 차이를 백분율로 산출하여 측정하였다[27].

$$\text{SOD-like activity(\%)} = \frac{\text{시료 무첨가구의 흡광도} - \text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구의 흡광도}} \times 100$$

2.6 에멀션 제조

본 실험에서 사용된 에멀션은 Table 2.의 처방으로 제조하였다. 잘피 추출물을 1.00%가 되도록 70% 보습제 (Glycerin : Propylene glycol : Water = 3 : 4 : 3, w/w)에 용해하여 stock solution을 제조하여 실험에 사용하였다. 에멀션 처방의 수상과 유상을 계량하여 75~80°C에서 가열하여 용해시킨 후, Homo mixer를 이용하여 4,500

Table 2. Formulation of emulsion containing *Zostera marina* extract. (% , W/W)

Component	Control	1%	5%	10%
Water	63.15	62.15	58.15	53.15
Cetostearyl alcohol	3.00	3.00	3.00	3.00
Glyceryl monostearate	1.50	1.50	1.50	1.50
PEG-100 Stearate	1.00	1.00	1.00	1.00
Polyoxyethylene (40) Stearate	1.00	1.00	1.00	1.00
Sorbitan stearate	1.00	1.00	1.00	1.00
Propyl paraben	0.10	0.10	0.10	0.10
Caprylic/Capric Triglyceride	5.00	5.00	5.00	5.00
Squalane	4.00	4.00	4.00	4.00
Neopentyl Glycol Dicaprate	5.00	5.00	5.00	5.00
Shear butter	1.00	1.00	1.00	1.00
Dimethicone	0.40	0.40	0.40	0.40
Glycerin	3.00	3.00	3.00	3.00
Dipolyglycol	4.00	4.00	4.00	4.00
Methyl paraben	0.25	0.25	0.25	0.25
Triethylamine	1.20	1.20	1.20	1.20
Ethylenediaminetetraacetic acid Tetrasodium salt	0.40	0.40	0.40	0.40
Xanthan gum	2.00	2.00	2.00	2.00
Carbomer 940	3.00	3.00	3.00	3.00
<i>Zostera marina</i> Stock Solution	-	1.00	5.00	10.00

rpm으로 1분간 유회한 후 TEA (Triethanolamine)를 넣고 다시 3분간 유회하였다. 그 후, 45°C이하에서 잘피 전체 추출물 stock solution을 가하여 다시 2분간 유회한 후, 28°C까지 냉각시킨 에멀션을 실험에 이용하였다.

2.7 제형 안정성 평가

2.7.1 pH 측정

pH측정은 pH meter을 이용하여, 25±1°C에서 측정하였으며 측정하기 전에 유리전극을 표준화 한 후 측정하였다. 3회 반복하여 측정하였으며 시료는 25°C, 40°C에

보관한 추출물을 함유한 에멀션과 대조군 에멀션을 실험에 이용하였다. 측정 3시간 전에 25°C 항온조에 보관하여 온도를 상온으로 맞춘 후 실험을 진행하였다.

2.7.2 점도측정

잘피 추출물을 함유한 에멀션과 대조군 에멀션의 점도 측정은 Brookfield Viscometer를 이용하여 측정하였다. 스피들(spindle) no. 4(64)로 25±1°C에서 측정하였으며 30 rpm에서 3회 반복하여 측정하였다. 시료는 25°C, 40°C에서 28일 동안 보관 하여 측정하였다.

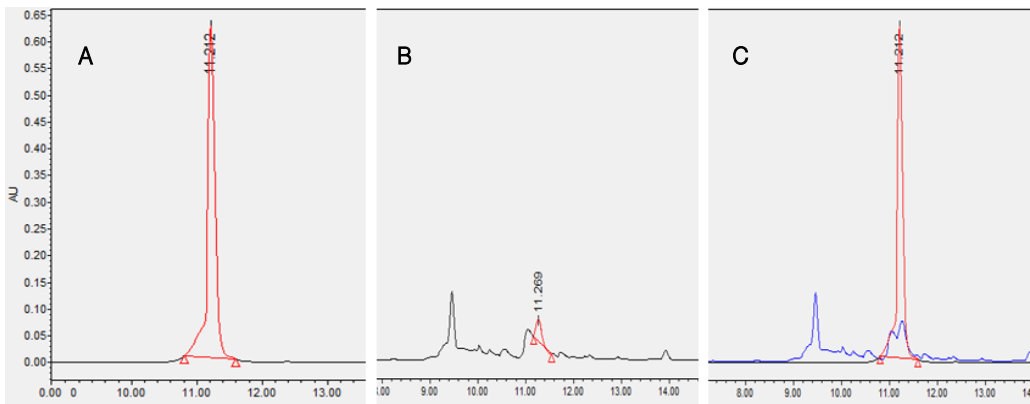


Fig. 1. The HPLC chromatogram. A : luteolin(Reten tion time : 11.212 min), B : *Zostera marina* (Retention time : 11.269 min), C : *Zostera marina* and luteolin.

2.7.3 Turbiscan을 이용한 제형 안정성 평가

잘피 추출물이 함유된 에멀션 입자의 유동성을 관찰하기 위해 전용용기에 20 ml 에멀션을 담고 25°C, 40°C에서 보관하여 28일 동안 보관하며 관찰하였다. 측정 3시간 전에 25°C 항온조에 보관하여 온도를 상온으로 맞춘 후 실험을 진행하였으며 backscattering(%)의 수치를 측정하여 평균값을 구하였다.

2.8 통계분석

각각의 실험은 각각 3회 실시 하였으며, 실험결과는 각 항목에 따라 Student's t-test를 이용하여 0.05 유의수준에서 검증하였다.

3. 결과

3.1 잘피 지표물질 성분 분석 결과

잘피 추출물과 luteolin 표준용액을 이용하여 HPLC 분석 조건을 설정하여 분석을 진행하였다. 그 결과 luteolin의 retention time은 11.212분에 나타났으며 잘피 추출물에서의 luteolin은 11.269분에 나타남을 확인하였다. 잘피 추출물과 luteolin 표준용액을 함께 분석한 결과 retention time(Retention time : Luteolin 11.212 분, *Zostera marina* 11.269 분)이 확인되었다(Fig. 1). 잘피를 분리하지 않고 추출하여 분석한 결과 luteolin이 잘피에 0.036% 함유되어 있다고 Kim[25]등이 연구한 바 있으며 본 연구에서 확인한 바와 같이 잘피 추출물과 luteolin 표준 용액은 같은 retention time에 peak를 확인하여 잘피 전체 추출물에서 luteolin을 확인하였다.

3.2 DPPH radical 소거 활성

DPPH는 항산화 검색방법으로 특히 페놀이나 방향족 과의 항산화 활성의 측정에 이용된다. diphenylpicrylhydrazine은 가지고 있는 흡수의 전자로 인해 525nm에서 강한 흡

수 띠를 보이며 페놀과 같은 수소 혹은 전자를 제공해주는 전자 공여체와 반응하게 되면 공여체로부터 전자나 hydrogen radical을 생성하게 된다. 공여된 전자는 비가역적으로 반응하며 이때 흡수 띠도 사라지므로 진보라색의 DPPH는 황색을 띄며 이때 생기는 흡수과장의 차이를 흡광도로 측정함으로써 radical소거 활성을 알 수 있다[28]. 본 연구에서는 잘피 부위별 추출물의 항산화효능을 확인하기 위해 DPPH radical 소거활성을 측정하였다.

20% ethanol 용매에 잘피 부위별 추출물을 5.00, 2.50, 1.50, 1.00, 0.50 mg/ml농도로 용해하여 실험한 결과 잘피 전체 5.00 mg/ml농도에서 86.21%의 소거활성을 보였으며 뿌리와 잎줄기 또한 5.00 mg/ml농도에서 각각 85.96%, 85.79%의 radical 소거능을 확인하였다. 이는 양성 대조군인 ascorbic acid와 radical 소거능을 비교했을 때 잘피 전체, 뿌리, 잎줄기 각각 5.01, 5.18, 5.36% 차이로 비슷한 활성을 나타낸 것으로 확인되었다. 잘피 전체, 뿌리, 잎줄기 순으로 높은 활성을 나타내었으며 모든 시료에서 농도의존적으로 높은 활성을 보였다.(Fig. 2).

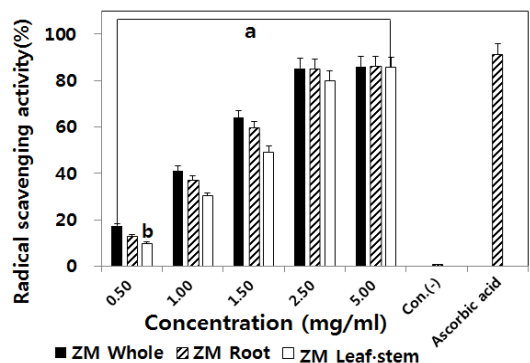


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity(%) of *Zostera marina* extract with 20% ethanol. ^{a,b}Means with different superscripts are significantly different (p < .005).

Table 3. Statistic(p-value) of DPPH radical scavenging activity

	(mg/ml)				
	0.50	1.00	1.50	2.50	5.00
ZM Whole	0.0011090	0.0000423	0.0000005	0.0000005	0.0000005
ZM Root	0.0009420	0.0006414	0.0001132	0.0000005	0.0000034
ZM Leaf • stem	0.0043841	0.0006413	0.0002464	0.0000069	0.0000033

3.3 SOD-like activity

잘피 부위별 추출물을 20% ethanol 용매를 이용하여 각각 5.00, 2.50, 1.50, 1.00, 0.50 mg/ml 농도로 용해한 후 SOD 유사활성을 측정된 결과 활성이 가장 크게 나타난 잘피 전체 추출물 5.00 mg/ml 농도에서 99.24%의 유사활성을 보였으며 이는 양성대조군인 ascorbic acid보다 11.85% 더 높게 나타남을 확인하였다. 또한 잘피 뿌리와 잎줄기 추출물에서도 5.00 mg/ml에서 각각 98.30, 98.64%의 활성을 보였다. ascorbic acid와 유사활성을 비교했을 때 잘피 뿌리, 잎줄기에서 각각 10.91, 11.25% 더 높게 나타났으며 모든 시료에서 농도 의존적으로 활성이 증가함을 확인하였다. SOD 유사활성은 잘피 전체, 뿌리, 잎줄기 순으로 높게 나타났고 농도가 낮아질수록 그 경향은 뚜렷하게 나타났으며(Fig. 3). 이는 DPPH 저해능 시험결과와 비슷한 경향성을 보였다.

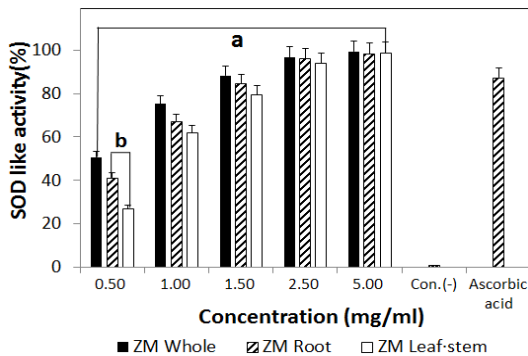


Fig. 3. SOD-like activity(%) of *Zostera Marina* extract with 20% ethanol. ^{a,b}Means with different superscripts are significantly different ($p < .005$).

S. Chanda[29]등에 의하면 식물의 부위별 유효성분의 함량은 모두 다르며 특히 그에 따라 효능 부위가 달라진다고 알려져 있다. 또한 부위별 조성 차이는 지상 식물뿐만 아니라 해조류 또한 부위별 성분의 함량은 다르다고 이[30]가 발표한바있으며 그와 관련된 연구들이 진행된

바있다. 따라서 항산화 효능이 있는 luteolin의 함량은 부위별로 다를 것으로 보이며 항산화 시험 결과 또한 DPPH assay와 SOD유사활성 시험에서 전체, 뿌리, 잎줄기 순으로 높은 항산화 효능을 보인 것으로 확인하였다. 잘피 추출물에 luteolin을 함유 하고 있다는 사실은 잘 알려져 있으며 본 연구에서도 잘피 전체 추출물에서 luteolin이 함유되어 있는 것을 확인하였으나 부위별로 효능이 다른 이유가 luteolin의 함량의 차이에서 비롯되었는지 확인하기 위해서는 정량적인 분석결과를 확인할 필요가 있다.

3.4 제형 안정성 평가 결과

3.4.1 pH 측정 결과

잘피 추출물을 함유한 에멀션의 안정성을 확인하기 위해 에멀션에 잘피 추출물을 1.00, 5.00, 10.00% 첨가하여 28일 동안 25°C, 40°C항온조에 보관하며 시간경과에 따른 pH의 변화를 관찰 하였다. 그 결과 25°C에서 보관한 에멀션의 경우 대조군 에멀션의 평균 pH는 7.28이었으며 잘피 추출물의 농도에 따른 pH는 대조군과 비교했을 때 평균적으로 ± 0.11 이내의 차이를 나타내었다. 대조군의 보관기간에 따른 pH는 1일차에서 7.28이었으며 평균 ± 0.04 이내의 변화를 나타내었으며 잘피 추출물의 농도별 각 에멀션의 pH변화는 1.00, 5.00, 10.00% 에서 각각 평균 ± 0.15 , ± 0.07 , ± 0.05 이내의 변화를 보여 대조군과 비슷한 변화양상을 보였다. 검정 통계량(p value)은 1.00, 5.00, 10.00% 에멀션에서 각각 $p = .68$, $p = .09$, $p = .004$ 였으며 1.00, 5.00% 에멀션은 신뢰수준 95%에서 $p > .05$ 이므로 시간 변화에 따른 pH변화는 유의미한 변화가 없음을 확인하여 안정한 것으로 확인되었으나 10.00%에멀션에서는 $p < .05$ 이므로 시간 변화에 따른 점도변화는 유의미한 변화가 있는 것으로 확인되었다.

40°C에서 보관한 대조군 에멀션의 평균 pH는 7.30이며 잘피 추출물의 농도에 따른 pH는 대조군 대비 평균

Table 4. Statistic(p -value) of SOD-like activity radical scavenging activity

	(mg/ml)				
	0.50	1.00	1.50	2.50	5.00
ZM Whole	0.000180	0.000086	0.000001	0.000090	0.000004
ZM Root	0.003775	0.000177	0.000110	0.000005	0.000044
ZM Leaf • stem	0.002807	0.000214	0.000030	0.000006	0.000006

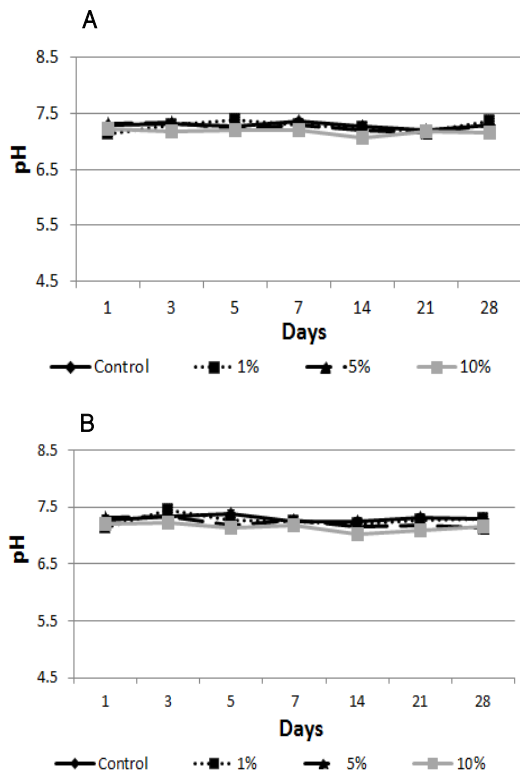


Fig. 4. pH change of the emulsion containing *Zostera marina* extract with 70% ethanol(v/v) and control emulsion for 28 days. A : storage temperature was 25°C (1.00, 5.00% : $p > .05$, 10.00% : $p < .01$), B : storage temperature was 40°C (1.00, 5.00% : $p > .05$, 10.00% : $p < .01$).

± 0.15 이내의 차이를 나타내었다. 대조군의 보관기간에 따른 pH변화는 ± 0.05 이내였으며 잘피 추출물 각 농도 별 에멀션의 기간에 따른 pH변화는 1.00, 5.00, 10.00% 에서 각각 평균 ± 0.15 , ± 0.11 , ± 0.08 이내의 변화를 보였다(Fig. 4). 검정 통계량은 1.00, 5.00, 10.00% 에멀션에서 각각 $p = .20$, $p = .08$, $p = .002$ 였으며 1.00, 5.00% 에멀션은 신뢰수준 95%에서 $p > .05$ 이므로 시간 변화에 따른 pH변화는 유의미한 변화가 없음을 확인하여 안정한 것으로 확인되었으나 10.00%에멀션에서는 $p < .05$ 이므로 시간 변화에 따른 점도변화는 유의미한 변화가 있는 것으로 확인되었다.

3.4.2 점도 측정 결과

잘피 추출물 1.00, 5.00, 10.00% 함유한 에멀션과 대조군을 25°C, 40°C 항온조에서 28일 동안 보관하고 일

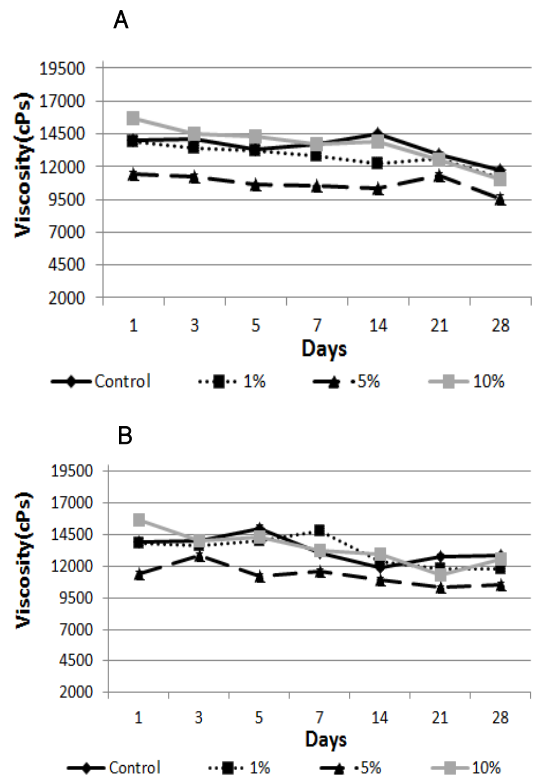


Fig. 5. Viscosity change of the emulsion containing *Zostera marina* extracts with 70% ethanol(v/v) and control emulsion for 28 days. A : storage temperature was 25°C (1.00, 5.00% : $p < .05$, 10.00% : $p > .05$), B : storage temperature was 40°C (1.00, 10.00% : $p > .05$, 5.00% : $p < .01$)

정기간에 걸쳐 측정하여 시간경과에 따른 점도의 변화를 관찰하였다. 그 결과 25°C에서 보관한 대조군 에멀션에서 평균 점도는 13466.67 cPs였으며 잘피 추출물의 농도에 따른 점도는 대조군과 비교했을 때 1.00, 5.00, 10.00% 에서 각각 평균 ± 709.52 , ± 2733.33 , ± 661.90 차이를 보였다. 대조군의 보관기간에 따른 점도는 1일차에서 13966.67 cPs였으며 평균 ± 805.56 이내의 변화를 나타내었다. 잘피 추출물의 농도별 각 에멀션의 기간에 따른 점도변화는 1.00, 5.00, 10.00% 에서 각각 평균 ± 1294.44 , ± 816.67 , ± 2322.22 이내의 변화를 나타내었다. 검정 통계량은 1.00, 5.00, 10.00% 에멀션에서 각각 $p = .04$, $p = .0001$, $p = .61$ 이었으며 10.00% 에멀션은 신뢰수준 95%에서 $p > .05$ 이므로 시간 변화에 따른 점도변화는 유의미한 변화가 없음을 확인하여 안정한 것으로 확인되었으나 1.00, 5.00%에멀션에서는 $p < .05$ 이

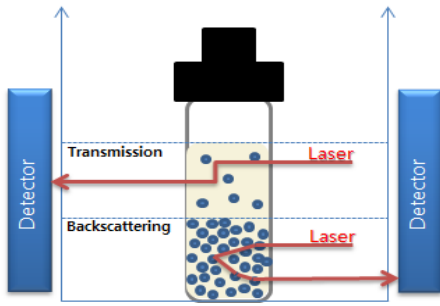


Fig. 6. Schematic principle of Turbiscan LAB.

므로 시간 변화에 따른 점도변화는 유의미한 변화가 있는 것으로 확인되었다.

40°C에서 보관한 대조군 에멀션에서 평균 점도는 13380.95 cPs였으며 잘피 추출물의 농도에 따른 점도는 대조군과 비교했을 때 1.00, 5.00, 10.00% 에서 각각 평균 ±819.05, ±2109.52, ±795.24 차이를 보였다. 대조군의 보관기간에 따른 점도는 1일차에서 13966.67 cPs였으며 평균 ±1050.00이내의 변화를 나타내었다. 잘피 추출물의 농도별 각 에멀션의 기간에 따른 점도변화는 1.00, 5.00, 10.00 에서 각각 평균 ±1166.67, ±711.11, ±2566.67 이내의 변화를 나타내었다(Fig. 5). 검정 통계량은 1.00, 5.00, 10.00% 에멀션에서 각각 $p = .62$, $p = .001$, $p = .90$ 였으며 1.00, 10.00% 에멀션은 신뢰수준 95%에서 $p > .05$ 이므로 시간 변화에 따른 점도변화는 유의미한 변화가 없음을 확인하여 안정한 것으로 확인되었으나 5.00%에멀션에서는 $p < .05$ 이므로 시간 변화에 따른 점도변화는 유의미한 변화가 있는 것으로 확인되었다. 잘피 추출물이 함유된 에멀션과 대조군 에멀션을 비교했을 때 25°C, 40°C에서 잘피 추출물 5.00% 함유 에멀션을 제외한 모든 에멀션에서 비슷한 점도를 나타내는 것을 확인하였다. 대조군을 포함한 모든 에멀션에서 기간이 지남에 따라 점도가 서서히 낮아지는 추세를 보였으나 변화의 폭이 크지 않은 것을 확인하였으며 잘피 추출물을 5.00% 함유한 에멀션이 다른 에멀션에 비해 낮은 점도를 기록하였으나 대조군 에멀션과 비슷한 양상으로 변하는 것을 확인하였다.

3.4.3 에멀션의 입자 유동성 관찰

계면활성제는 서로 섞이지 않는 유상과 수상을 유화하여 열역학 적으로 안정한 에멀션을 만든다. 이때 분산상 입자의 비가역적 변화인 응집과 가역적 변화인 creaming

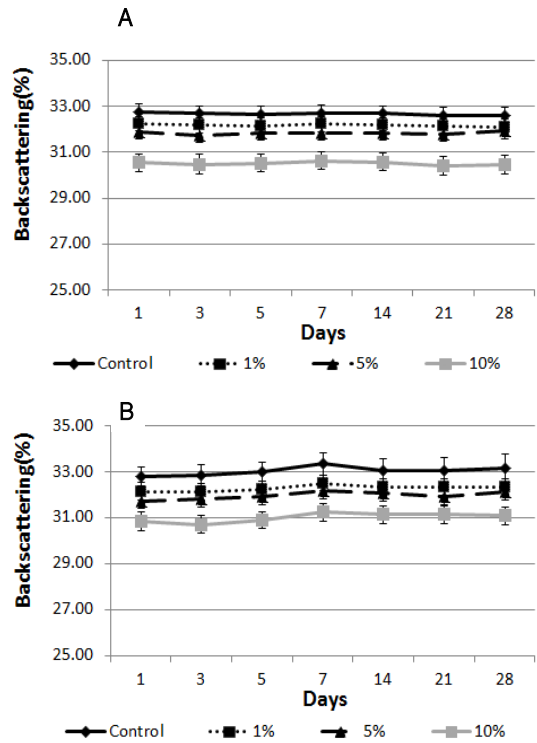


Fig. 7. The change of backscattering (%) according to concentration of *Zostera marina* extract and control emulsion for 28 days. A : storage temperature was 25°C(1.00, 5.00, 10.00%: $p < .0001$), B : storage temperature was 40°C(1.00, 5.00, 10.00%: $p < .0001$)

및 침전에 의해 불안정해질 수 있다. 광학분석 기기인 Turbiscan LAB 은 분산상의 입자 유동을 다중광산란법 (multiple light scattering method)을 이용하여 불투명하거나 농축된 콜로이드상을 별도의 회석과정 없이 단일 기기로 안정성을 측정할 수 있어 빠르고 정확하게 측정이 가능하다[31-32].

Turbiscan LAB 측정 장비는 에멀션을 전용용기에 담아 광원을 비쳤을 때, 빛 세기의 변화를 시간에 따라 측정하여 분산상태를 평가한다. 농도가 진한 시료의 경우 광원에서 조사된 빛을 반사하여 backscattering되고 시료의 농도가 묽은 경우에는 조사된 빛이 transmission된다. backscattering 및 transmission된 빛은 detector에서 검출되어 per cent(%)값으로 변환된다. 시료가 균질하게 분산되면 시료 전체 높이 혹은 시간에 따라 동일한 산란광의 세기를 얻게 되며 침전 또는 creaming현상으로 인해 시료 top과 bottom 부분에서 농도구배가 생기거나 응집

현상으로 인해 입자 크기가 증가하면 산란되는 산란광의 세기도 변화하게 된다.

에멀션의 상안정성 확인 시 육안관찰의 경우 오직 상분리에 의한 변화만 관찰할 수 있기 때문에 응집과 같은 콜로이드상 내의 변화는 관찰하기 어렵고 실험자의 주관적인 판단결과 이기 때문에 정량화가 어려운 단점이 있다. 또한 가혹 조건에서도 분산안정성을 확인하기 위해서는 몇 주, 몇 개월 등 소요기간이 있기 때문에 Turbiscan LAB 측정 장비는 안정한 에멀션의 조성을 결정하고 평가하는데 있어 정확하고 정량적인 평가가 가능하며 연구 기간을 단축할 수 있는 장점이 있다.

본 연구에서는 잘피 추출물이 1.00, 5.00, 10.00% 함유된 에멀션과 대조군 에멀션을 시간경과에 따른 입자의 상태를 확인하기 위해 28일 동안 25°C, 40°C항온조에 보관하며 Turbiscan LAB을 통해 입자의 유동성을 관찰하였다. 시료의 중간 부분인 2-40mm를 관찰하였으며 backscattering(%)의 평균값을 확인하였다. 그 결과 25°C에서 보관한 대조군 에멀션의 backscattering은 평균 32.67%였으며 잘피 추출물이 1.00, 5.00, 10.00% 함유된 에멀션은 각각 평균 32.18, 31.83, 30.51%로 농도 의존적으로 낮은 값을 보였으며 28일 동안 값이 거의 변하지 않았다. 40°C에서 보관한 대조군 에멀션의 backscattering은 평균 33.03%였으며 잘피 추출물이 1.00, 5.00, 10.00% 함유된 에멀션은 각각 평균 32.28, 31.93, 31.00%로 농도 의존적으로 낮은 값을 보였으며 28일 동안 값이 거의 변하지 않았다(Fig. 7). 이는 잘피 추출물이 함유된 에멀션이 농도 의존적으로 유화입자이동으로 인한 분리현상 등이 일어날 것을 예상할 수 있으며 에멀션에 적용 시 농도 조절에 유의해야 한다는 것을 확인하였다. 하지만 온도별 보관기간에 따른 변화는 미미하므로 적당한 농도를 정하여 에멀션에 첨가할 경우 입자 안정성에 크게 문제가 되지 않을 것으로 판단된다. 25°C 및 40°C 조건에서 보관한 모든 에멀션의 검정 통계량은 $p < .0001$ 로 집단 간 유의미한 차이가 있는 것으로 확인되었으나 대조군의 기간에 따른 입자 변화와 실험군에서 기간에 따른 입자 변화가 거의 일치하므로 입자의 안정성에는 이상이 없는 것으로 판단된다.

4. 결론

본 연구는 잘피 추출물을 정성분석하여 항산화

효과를 나타내는 지표물질을 확인하였고 잘피 추출물의 항산화 시험을 진행하였다. 또한 잘피 추출물이 함유된 에멀션을 제조하여 제형의 안정성을 확인하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 잘피 추출물과 luteolin 표준용액을 HPLC/UV로 분석한 결과 유사한 retention time(luteolin 11.212 분, *Zostera marina* 11.269 분)에서 peak가 확인되어 잘피 추출물이 luteolin을 함유하는 것으로 확인되었다.
- 2) DPPH radical 소거활성을 측정하여 잘피 추출물의 항산화 효능을 확인한 결과 잘피 전체, 뿌리, 잎줄기의 가장 높은 농도에서 각각 86.21, 85.96, 85.79%의 활성을 보였으며 대조군과 유사한 DPPH radical 소거활성을 확인하였다.
- 3) SOD 유사활성(superoxide dismutase-like activity)을 측정하여 잘피 추출물의 항산화 효능을 확인한 결과 잘피 전체, 뿌리, 잎줄기의 가장 높은 농도에서 각각 99.24, 98.30, 98.64%의 활성을 보였으며 양성 대조군보다 약 10.00%이상 높은 활성을 보였다.
- 4) 잘피 추출물이 함유된 에멀션의 안정성을 확인하기 위해 에멀션의 pH, 점도, Turbiscan LAB으로 입자상태를 측정된 결과 28일 동안 각 수치의 변화가 미미하므로 잘피 추출물이 함유된 에멀션은 안정한 것으로 확인되었다.

위와 같은 결론을 바탕으로 잘피 추출물은 농도 의존적으로 항산화 효과가 있는 것으로 확인되었다. 이는 잘피에 함유되어 있는 luteolin으로 인한 것으로 보이며 잘피 추출물이 함유되어 있는 크림의 안정성이 확인되어 잘피는 항산화 효능이 있는 화장품 소재로서 활용 가능할 것으로 판단된다.

References

- [1] P. M. Elias, "Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation", *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 80, pp. 44-49, 1983.
DOI: <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12537108>
- [2] I. H. Song, "Changes in Fine Structures of keratinocytes Differentiation in Vitro-Study for Artificial Skin-", *the Korean J. Anat.*, vol. 29, no. 2, pp. 159-170, 1996.
- [3] Y. Yamaguchi, K. Takahashi, B. Z. Zmudzka, A. Kornhauser, S. A. Miller, T. Tadokoro, W. Berens, J. Z. Beer, V. J. Hearing, "Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects

- against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis", *the FASEB J.*, vol. 20, no. 9, pp. 1486-1488, 2006.
- [4] E. L. Seifert, C. Estey, J. Y. Xuan, M. E. Harper, "Electron Transport Chain-dependent and -independent Mechanisms of Mitochondrial H₂O₂ Emission during Long-chain Fatty Acid Oxidation", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, pp. 5748-5758, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.026203>
- [5] J. W. Kim, B. J. Cho, G. S. Han, "Effects of gradual loaded exercise on antioxidative enzymes response in normal and obese men", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, vol. 11, no. 10, pp. 3820-3825, 2010.
- [6] K. Apel, H. Hirt, "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction", *Annual Review of Plant Biology*, vol. 55, pp. 373-472, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- [7] J. K. Hong, "A Study on Skin Aging Caused by Free-Radical and on Efficacy of Antioxidant Vitamins", *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, vol. 7, no. 2, pp. 51-62, 2009.
- [8] C. M. Bergamini, S. Gambetti, A. Dondi, C. Cervellati, "Oxygen, Reactive Oxygen Species and Tissue Damage", *Current Pharmaceutical Design*, vol. 10, no. 14, pp. 1611-1626, 2004. DOI: <https://doi.org/10.2174/1381612043384664>
- [9] H. G. Kang, T. J. Kim, H. J. Bae, H. J. Moon, M. K. Kim, D. H. Kim, S. w. Han, H. J. Lee, H. Y. Yang, M. K. Kim, "Effects of Reactive Oxygen Species on DNA Stability in Human Spermatozoa", *Korean Journal of Biomedical Laboratory Sciences*, vol. 7, no. 4, pp. 181-190, 2001.
- [10] J. C. Ansel, T. A. Luger, D. Lowry, P. Perry, D. R. Roop, J. D. Mountz, "The expression and modulation of IL-1 alpha in murine keratinocytes", *JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, vol. 140, no. 7, pp. 2274-2282, 1988.
- [11] L. Zuo, A. H. Hallman, W. J. Roberts, P. D. Wagner, M. C. Hogan, "Superoxide release from contracting skeletal muscle in pulmonary TNF- α overexpression mice", *A J P: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 306, no. 1, pp. 1522-1490, 2013.
- [12] G. M. Halliday, "Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis", *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 571, no. 1, pp. 107-120. 2004.
- [14] B. L. Diffey, P. R. Tanner, P. J. Matts, N. J. Frank, "In vitro assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products", *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 43, no. 6, pp. 1024-1035, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1067/mjd.2000.109291>
- [15] A.A.M Botterweck, H Verhagen, R.A Goldbohm, J Kleinjans, P.A van den Brandt, "Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study", vol. 38, no. 7, pp. 599 - 605, 2000,
- [16] H. S. Jung, M. Y. Song, H. S. Kim, H. H. Seo, J. H. Lee, K. R. Lee, I. Hong, S. H. Moh, "Development of Anti-Wrinkle Materials using Galloyl-Peptide Derivatives", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, vol. 16, no. 8, pp. 5452-5457, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2015.16.8.5452>
- [17] M. J. Kim, Y. G. Kim, H. S. Kim, C. Cheong, K. H. Jang, S. A. Kang, "Effects of Antioxidant Activities in Ethanol Extract of Apple Peel, Grape Peel, and Sweet Potato Peel as Natural Antioxidant", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, vol. 15, no. 6, pp. 3766-3773, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2014.15.6.3766>
- [18] H. S. Kim, M. J. Kim, C. Cheong, S. A. Kang, "Antioxidant Properties in Water and 70% Ethanol Extracts of Houttuynia Cordata Thunb", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, vol. 14, no. 10, pp. 5091-5096, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2013.14.10.5091>
- [19] E. I. Khasina, E. A. Kolenchenko, M. N. Sgrebneva, V. V. Kovalev, Yu. S. Khotimchenko, "Antioxidant Activities of a Low Etherified Pectin from the Seagrass *Zostera marina*", *Russian Journal of Marine Biology*, vol. 29, no. 4, pp. 259-261, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1025493128327>
- [20] K. F. Hua, H. Y. Hsu, Y. C. Su, I. F. Lin, S. S. Yang, Y. M. Chen, L. K. Chao, "Study on the Antiinflammatory Activity of methanol Extract from Seagrass *Zostera japonica*", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 2, pp. 306 - 311, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0509658>
- [21] M. E. Jung, J. W. Hong, J. I. Lee, C. S.Kong, J. S. Chang, Y. W. Seo, "Inhibitory Effect of *Zostera japonica* on Growth of Human Cancer Cells", *Ocean and Polar Research*, vol. 34, no. 4, pp. 385-394, 2012. DOI: <https://doi.org/10.4217/OPR.2012.34.4.385>
- [22] J. W. Hong, M. E. Jung, J. I. Lee, H. J. Kim, J. S. Chang, Y. W. Seo, "Cytotoxic Effect of *Zostera asiatica* on Growth of Human Cancer Cells", *KSB Journal*, vol. 27, no. 4, pp. 227-231, 2012. DOI: <https://doi.org/10.7841/ksbj.2012.27.4.227>
- [23] G. Seelinger, I. Merfort, C. M. Schempp, "Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin", *Planta Medica*, vol. 74, no. 14 pp. 1667-1744, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0028-1088314>
- [24] M. Y. Choi, H. S. Song, H. S. Hur, S. S. Sim, "Whitening activity of luteolin related to the inhibition of cAMP pathway in α -MSH-stimulated B16 melanoma cells", *Archives of Pharmacol Research*, vol. 31, no. 9, pp. 1166 - 1171, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1284-4>
- [25] J. H. Kim, Y. H. Cho, S. M. Park, K. E. Lee, J. J. Lee, B. C. Lee, H. B. Pyo, K. S. Song, H. D. Park, Y. P. Yun, "Antioxidants and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 expression from leaves of *Zostera marina* L.", *Archives of Pharmacol Research* vol. 27, no. 2, pp. 177-183 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02980103>
- [26] M. J. Kim, Y. G. Kim, H. S. Kim, C. Cheong, K. H. Jang, S. A. Kang, "Effects of Antioxidant Activities in ethanol Extract of Apple Peel, Grape Peel, and Sweet Potato Peel as Natural Antioxidant", *Journal of the*

Korea Academia-Industrial cooperation Society, vol. 15, no. 6, pp. 3766-3773, 2014.

DOI: <http://dx.doi.org/10.5762/KAIS.2013.14.10.5091>

- [27] H. S. Kim, H. Yun, "The Antioxidant Effect of Cheonggukjang, Fermented Using the New Strain, *Bacillus amyloliquefaciens* NBF11-1", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, vol. 16, no. 8, pp. 5343-5350, 2015.
DOI: <http://doi.org/10.5762/KAIS.2015.16.8.5343>
- [28] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *LWT - Food Science and Technology*, vol. 28, no. 1, pp. 25-30, 1994.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- [29] S. Chanda, R. Dave In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview, *African Journal of Microbiology Research* vol. 3, no. 13, pp. 981-996, 2009.
- [30] Y. J. Lee, A Study on Mineral and Alginic acid Contents by Different Pars of Sea Mustards(*Undaria pinnatifida*), *Korean J. FOOD CULTURE*, vol. 19, no. 6, pp. 691-700, 2004.
- [31] K. J. Cho, W. K. Cho, J. P. Lee, M. S. Kim, J. S. Kim, S. J. Hwang, "Evaluation of Glyceryl Monooleate(GMO) W/O Emulsion Stability by using Turbiscan ®LAB", *Journal of Pharmaceutical Investigation*, vol. 39, no. 4, pp. 249-255, 2009.
DOI: <https://doi.org/10.4333/KPS.2009.39.4.249>
- [32] C. Lemarchand, P. Couvreur, C. Vauthiera, D. Costantini, R. Gref, "Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan LAB", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 254, no. 1, pp. 77 - 82, 2003.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00687-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00687-7)

양 재 찬(Jae-Chan Yang)

[정회원]



- 2007년 8월 : 전북대학교 고분자 나노공학과 Ph. D
- 1992년 8월 ~ 2010년 3월 : LG생 활건강 화장품연구소
- 2010년 4월 ~ 현재 : 목원대학교 생의약화장품학부 교수

<관심분야>

화장품 제형 개발, 화장품 소재개발

김 보 애(Bo-Ae Kim)

[정회원]



- 2007년 2월 : 경북대학교 생화학 이학석사
- 2011년 8월 : 대구한의대학교 화장품약리학 Ph. D
- 2012년 3월 ~ 현재 : 목원대학교 생의약화장품학부 교수

<관심분야>

화장품 천연소재 개발, 유효성 평가

이 소 연(So-Yeon Lee)

[준회원]



- 2015년 2월 : 목원대학교 생의약화 장품학부 졸업
- 2017년 2월 : 목원대학교 화학과 화장품전공 석사 졸업

<관심분야>

화장품화학, 화장품 소재개발