

화장품에 적용한 오배자·계피·로즈마리 추출물의 항균활성 및 안정성 검증

전형철^{1,*} · 이재남^{2,†}

¹건국대학교 산업대학원 향장학과, 석사

²건국대학교 산업대학원 향장학과, 조교수

(2020년 7월 23일 접수: 2020년 8월 31일 수정: 2020년 8월 31일 채택)

Antimicrobial Activities and Stability of *Rhus Javanica* L., *Cinnamomum Verum* and *Rosmarinus Officinalis* Extracts Used in the Manufacture of Cosmetics

Hyeong Cheol Jeon^{*} · Jae-Nam Lee[†]

^{1,2,†}Department of Cosmetology, Graduate School of Engineering, Konkuk University,
120, Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, 05029, Korea

(Received July 23, 2020; Revised August 31, 2020; Accepted August 31, 2020)

요 약 : 본 연구에서는 인체에 해가 없으며 항균작용 및 항산화 효과가 있는 오배자, 계피, 로즈마리 추출물을 이용하여 천연방부제 소재로서의 활용 가능성을 연구하였다. 실험식물의 추출방법으로는 계피의 경우 70% ethanol 추출, 오배자는 열수추출법, 로즈마리는 70% ethanol 추출과 열수추출법을 이용하였다. 실험 방법으로는 항균력, DPPH를 통한 항산화능, 화장품의 challenge test, 화장품 안정성 및 안전성 평가를 진행하였다. 시험 결과, 항균력 시험에서 오배자 추출물은 세균류, 계피 추출물은 진균류에서 항균력이 우수, 로즈마리 추출물의 경우 항균력이 미비해 제외, 복합 추출물(오배자·계피)의 경우는 1:1비율로 조합한 복합 추출물(complex C)에서 항균효과, 복합 추출물의 최소저해농도(MIC)와 최소살균농도(MBC)에서는 5종의 실험균주에서 억제효과와 살균효과, 천연 단일 추출물과 복합 추출물(complex C)에서는 항산화능이 확인 되었다. 또한 합성 방부제 대신 complex C 10%를 화장품에 적용한 시험에서 제형의 안정성 및 안전성이 확인되었다. 따라서 본 연구를 통해 천연방부제 원료로서의 발전 가능성을 확인할 수 있었다.

주제어 : 오배자, 계피, 로즈마리, 항균, 안정성

[†]Corresponding author

(E-mail: jn386@konkuk.ac.kr)

*This article is a revision of the first author's master's thesis from University.

*이 연구는 2019년 제 1 저자의 석사논문에서 발표된 것을 수정·보완하여 작성됨

Abstract : This study attempted to investigate the usefulness of *Rhus javanica* L., *Cinnamomum verum* and *Rosmarinus officinalis* extracts which have antimicrobial and antioxidant effects without any harm on human health as natural preservatives. In terms of extraction, extraction by 70% ethanol and hot-water extraction were used for *Cinnamomum verum* and *Rhus javanica* L. respectively. For *Rosmarinus officinalis*, a mixed method (70% ethanol and hot-water extraction) was adopted. In terms of experimental methods, antimicrobial effects, antioxidant activity through DPPH and safety and stability of cosmetics were assessed, and a challenge test was performed, and the results found the followings: According to an antimicrobial test, good antimicrobial effects were found in bacteria (*Rhus javanica* L. extract) and fungi (*Cinnamomum verum* extract). In contrast, the *Rosmarinus officinalis* extract was set aside because of poor antimicrobial activity. In the mixed extract (*Rhus javanica* L. + *Cinnamomum verum*), antimicrobial effects were observed in 'complex C (mixed in a 1:1 ratio)' while both inhibitory and sterilizing effects were found in 5 different test strains at minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). In addition, antioxidant effects were detected in non-mixed extract and mixed extract ('complex C'). Furthermore, a test on cosmetics which adopted '10% complex C' instead of synthetic preservative revealed safety and stability. Therefore, this study has confirmed the potential of the *Rhus javanica* L., *Cinnamomum verum* and *Rosmarinus officinalis* extracts as materials for natural preservatives.

Keywords : *Rhus javanica* L., *Cinnamomum verum*, *Rosmarinus officinalis*, Anti-bacterial, stability

1. 서론

화장품은 유변학, 미생물학, 계면화학 등 여러 학문들과 밀접하게 연관되어 있으며 고분자성 지질과 물이 주성분으로 기타 여러 가지 물질들과 혼합되어 이루어져 있다. 특히 미생물의 탄소원이 되는 솔비톨과 글리세린, 질소원이 되는 아미노산 유도체와 단백질 등이 혼합되어 있어 곰팡이와 세균 등에 취약하여 오염되기 쉽다. 미생물에 의해 화장품이 오염되면 물질대사에 의해 아민, 유화수소, 지방산, 암모니아의 점도변화 및 pH 변화에 의해 변색, 변취를 유발한다. 그러므로 화장품의 안정성과 안전성을 유지하기 위해 적절한 기능을 가진 물질을 선택하여 방부제로 사용해야 한다[1].

일반적으로 화장품에 많이 사용되는 화학 방부제로는 페녹시에탄올(Phenoxyethanol), 파라벤류(Paraben), 이미다졸리디닐우레아(Imidazolidinylurea), 쿼터늄-15(Quaternium-15), 클로로페네신(Chlorphenesin) 등이 있다. 이와 같은 화학 방부제들은 미생물의 성장을 방해하고 제품에 대한 안정성을 부여함과 동시에 접촉성 피부염 및 피부 알러지, 피부자극, 내성균 유발의 원인이 되기도 한다[2-3]. 뿐만 아니라 허용 범위 내 사용

의 경우에도 장기간 사용 시는 지속적인 체내 축적으로 인한 급·만성 독성, 돌연변이 및 암유발 등의 문제들이 발생할 가능성이 높다[4].

이와 같은 화학방부제의 문제점을 해결하기 위해 제품의 안전성 및 안정성, 우수한 경제성을 갖춘 천연 방부제에 대한 활발한 연구가 진행되고 있으며, 향신료, 우유, 어류 등의 식품류나 한약재, 정유 등에 의해 천연 항균성 물질들이 보고되고 있다[5]. 또한, 확장된 세계 유통시장으로 인한 방부 첨가물의 사용이 꾸준히 증가됨에 있어 합성방부제에 대한 대체제로서[6], 여러 항균 스펙트럼을 가지며 인체에 안전하면서도 방부력을 갖춘 천연소재에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

본 연구의 오배자(*Rhus javanica* L.)는 옻나무과에 속하며 낙엽소교목인 불나무 혹은 그 외의 동속 식물 잎에 진딧물이 자상을 주어 생긴 벌레집이다. 주요성분의 tannin은 높은 함량을 나타내며 항균작용, 지사작용, 선 분비 억제작용을 나타낸다. 이러한 오배자는 항균작용과 항산화 및 간보호, 항혈전 등의 약리작용을 하는 것으로 보고되고 있으며, 최근에는 오배자를 이용하여 미백작용과 주름효과에 대한 연구가 진행되었다[7-9].

계피(*Cinnamomum verum*)는 계피나무의 외피

를 건조시킨 것으로 발열, 두통, 감기 등의 치료에 활용한다[10, 11]. 계피의 생리활성 기능에 대한 실험에서 항균효과[12, 13], 항알러지효과[14], 면역항체의 증강효과[15], 항암효과[16] 등이 밝혀졌다. 그리고 로즈마리(*Rosmarinus officinalis*)는 꿀꿀과로 상록성의 다년초이며 약용, 향료, 식용, 미용 및 관상용으로 사용하고 있다[17]. 주요 성분으로는 1,8-cineole, camphor, α -pinene, borneol, apigenin, β -carotene, rosmanol, rosmarinic acid, carnosol, carnosic acid, tannin 등이 알려져 있으며[18], 이러한 성분에 따라 항산화[19-22], 항암[23, 24], 항균활성[25, 26] 등의 여러 가지 효과가 있음이 보고되고 있다. 그러나 이와 같은 선행연구들은 단일 추출물에 대한 연구를 주로 하였으며, 본 연구와 같이 복합 추출물간 상호작용을 통한 항균활성 및 안정성 등을 검증한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 오배자, 계피, 로즈마리 추출물간의 상호작용에 대한 항균활성, 항산화를 확인하고, 화장품 제형의 안전성 및 안정성을 확인함으로써 천연방부제의 소재로의 활용 가능성을 알아보기 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 실험재료

2.1.1. 재료 및 추출

본 실험에서 사용된 오배자(*R. javanica*), 계피(*C. verum*), 로즈마리(*R. officinalis*)는 삼흥건재 약업사(서울, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 열수 추출물은 시료의 원물을 이용하여 시료 무게와 증류수의 비율을 1:3 비율로 첨가해주고 121°C, 1.2기압의 autoclave (JSAC-60, JSR)에서 15분간 끓인 다음 거즈로 1차 필터 한 다음, 8,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 Whatman No.2를 이용하여 여과 후 냉장 보관하여 바로 사용하였다. Ethanol 추출물은 시료의 원물을 이용하여 시료 무게와 70% ethanol의 비율을 1:3 비율로 첨가해주고 80°C, 1.2기압의 autoclave (JSAC-60, JSR)에서 60분간 끓인 다음 거즈로 1차 거른 후 8,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상층액을 Whatman No.2를 이용하여 여과 후 냉장 보관하여 바로 사용하였다.

2.1.2. 실험 시약

본 실험의 항산화능 측정에 사용된 시약은 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Sigma Chemical (USA), 2,6 Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT)로 Junsei에서 구입하여 사용하였다. Autoclave (JSAC-60, JSR), Shaking incubator (JSBI-200©, JSR), Clean bench (JSCB-1200SB, JSR), ELISA Leader (Infinite M200PRO Nano-quant, TECAN), 원심분리기(Mega 17R, 한일과학산업), pH Meter (Seven easy S20, METTLER TOLEDO), Homo mixer (Model 2.5, PRIMIX), 펌프(W2V10, WOOSUNG AUTOMA), Water Bath (KSB- 201), 점도계(DV2T, Brookfield) 등의 기기를 이용하여 실험하였다.

2.1.2. 실험 균주 및 배양

본 실험에서 사용한 시험균주는 *Escherichia coli* (*E. coli*, KCTC 1041), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, KCTC 1636), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, KCTC 3881), *Candida albicans* (*C. albicans*, KCTC 7270), *Aspergillus niger* (*A. niger*, KCTC 6906)는 균주은행(한국생명공학 연구원 유전자은행)에서 분양받아 사용하였다. 균주의 배양은 고체 배지에 배양된 각각의 균주를 단일 colony를 취하여 멸균된 액체 배지 300 mL에 접종하여 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*는 tryptic soy broth (TSB)에서 37°C, 150 rpm으로, *C. albicans*는 potato dextrose broth (PDB)에서 25°C, 150 rpm으로, *A. niger*는 potato dextrose agar (PDA)에서 25°C로 고체 배양하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 추출물의 항균력 시험

2.2.1.1. 단일 추출물의 항균력 시험

추출물의 항균성을 확인하기 위해 세균류인 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*는 TSA에, 진균류인 *C. albicans*, *A. niger*는 PDA에 각각의 균주를 100 μ L씩 취해서 고체 배지에 균일하게 도말하고, 그 위에 멸균된 8 mm paper disc를 올려놓은 뒤 단일 추출물(오배자, 계피, 로즈마리)을 40 μ L씩 떨어뜨려 흡수시키고 TSA는 37°C, 24시간 이상, PDA는 25°C, 48시간 이상 incubator

에서 배양한 후 paper disc 주변으로 생성된 clear zone의 직경(mm)을 측정하여 관찰하였다.

2.2.1.2. 복합 추출물의 항균력 시험

복합 추출물의 조합비 설정은 단일 추출물의 항균력 시험과 같은 방식으로 하며 복합 추출물의 항균력을 확인한 후, 항균력이 가장 우수한 복합 추출물을 선정하여 조합비에 따른 항균력을 확인 하였다.

2.2.2. 최소저해농도(MIC)와 최소살균(MBC) 농도 측정

항균활성이 우수한 추출물의 최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration; MIC)는 추출물의 농도가 2배 희석계열이 되도록 제작한 액체배지에 각각의 시험균을 접종하고, 세균 3종 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*를 40 μ L씩 Tryptic Soy Borth (TSB)액체 배지에 접종 후 37°C, 24시간, 진균 2종인 *C. albicans*, *A. niger*를 40 μ L씩 Potato Dextrose Broth (PDB)액체 배지에 접종 후 25°C, 48시간 배양한 뒤 96well palte에 미리 배양된 시료와 alamar blue시약을 100 μ L씩 분주 후 2시간을 반응시켜 발색 여부를 확인하였다.

최소살균농도(Minimum Bactericidal Concentration; MBC)는 최소저해농도(MIC)의 발색여부를 확인 후 발색된 농도의 시료를 새로운 배지에 100 μ L씩 접종하여 세균 3종 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*를 TSA에 37°C, 24시간, 진균 2종 *C. albicans*, *A. niger*를 PDA에 25°C, 48시간 배양한 뒤 증식이 일어나지 않은 농도를 확인하고 이를 최소살균농도(MBC)로 나타내었다.

2.2.3. DPPH를 통한 항산화능 측정

각 추출물과 항균활성이 좋은 복합추출물을 선택하여 항산화능을 측정하였다. DPPH 8 mg을 에탄올 50 ml과 혼합하여 20분간 잘 교반하고, 20분 후 정제수 50 ml를 넣고 20분간 혼합한 후 Whatman No.2 여과지에 필터 하여 DPPH시약을 만들었다. 각 추출물과 복합추출물 샘플 500 μ L와 제조된 DPPH시약 2.5 ml를 넣고 빛에 노출되지 않게 암소에서 30분간 반응 시킨 후 ELISA Leader (Infinite M200PRO Nanoquant, TECAN)를 사용하여 528 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 BHT를 사용하였다.

그리고 DPPH 농도별 항산화능 측정은 DPPH를 통한 항산화능 측정법과 같은 방식으로 하며 항균력이 우수한 복합추출물의 농도에 따른 항산화능을 측정하였다.

2.2.4. 화장품의 Challenge Test

2.2.4.1. 화장품 제조

실험에서 사용한 화장품의 처방은 아래와 같이 제조하였으며, 화장품 제형(로션)의 조성비는 Table 1과 같다. A상과 B상을 75°C까지 가온 후 완전 용해하여 A상에 B상을 조금씩 투입하며 homo mixer (Model 2.5, PRIMIX)를 이용하여 4,500 rpm에서 10분간 유회한 후 온도가 60°C이하로 떨어질 때 C상을 투입하고 4,500 rpm에서 5분간 교반 후 35°C이하로 서서히 저어주며 냉각을 하였다.

2.2.4.2. Challenge Test

본 실험에서 복합 추출물의 방부력이 화장품(제형)에 적용하였을 때에도 방부효과가 있는지를 알아보기 위하여 challenge test를 진행하였다. Challenge Test는 CTFA (The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association)에서 제안한 기준에 따라 진행하였다. 각 시험물질이 적용된 화장품에 *E. coli* 4 x 10⁷ CFU/mL, *P. aeruginosa* 7 x 10⁷ CFU/mL, *S. aureus* 3 x 10⁸ CFU/mL, *C. albicans* 5 x 10⁶ CFU/mL, *A. niger*를 접종한 후 세균은 37°C에, 진균은 25°C에 각각 보관하였다. 접종당일, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28일의 sample과 대조균을 각 균에 알맞은 조건의 고체배지에 도말하고 incubator (JSBI-200©, JSR)에 배양한 후, 실험 경과일에 대한 접종 균의 사멸 결과로 방부력을 측정하였다.

2.2.5. 화장품 안정성 및 안전성 평가

2.2.5.1. 화장품 안정성

식품의약품안전처에서 고시한 화장품의 안정성 시험 가이드라인과 생물의약품 안정성시험 가이드라인을 바탕으로 한 달간 온도(4°C, 25°C, 45°C, 4°C→45°C→25°C cycling, -16°C↔25°C cycling)와 광(光)에서 positive control과 복합 추출물을 함유한 화장품 제형의 안정성 시험을 하였다. 한 달간 7일 마다 pH, 점도, 원심, 경시변화(변색

Table 1. The formulation of cosmetic

Phase	Ingredient	Control	Positive control	Sample		
				1	2	3
A	D. I. Water		to 100			
	Refined Glycerine		5			
	Keltrol Advanced Performance		0.15			
	Propandiol		5			
	Betaine		0.5			
B	TCG-M		5			
	LEXFEEL N5		5			
	Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil		2.5			
	Olea Europaea (Olive) Fruit Oil		2.5			
	OLIVEM® 1000		3			
	SP ARLACEL 2121		1			
	MBAL-FL-(MV)		1			
Lanette® O		0.5				
C	Phenoxyethanol	-	1	-	-	-
	complex C	-	-	5	7	10

complex C = complex extracts in the ratio of 1:1 of *R. javanica* and *C. verum*

및 변취)를 관찰함으로써 안정성을 종합적으로 평가하였다.

2.2.5.2. 화장품 안전성 평가

화장품 안전성 평가는 Patch test를 통한 피부 자극 시험방법으로 ICDRG (International Contact Dermatitis Research Group)의 측정법을 참고·변형하여 challenge test 및 화장품 안정성 시험에서 효과가 좋았던 복합 추출물 10%적용 화장품 제형(로션)으로 피부자극 테스트 시험을 진행하였다. Finn chambers® on scanpor® (Smart practice, USA)를 사용하였으며 복합 추출물 10%적용 로션을 15 μ l씩 적하한 후 첩포하여 30분, 24시간이 경과한 뒤 패치를 제거하고 24시간 뒤 자극 유무를 육안으로 검사하였다.

2.2.6. 통계처리

본 연구의 실험은 각각 3회 실시하여 평균값으로 나타내었으며, Student's t-test를 이용하여 $p < 0.05$ 유의수준에서 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 추출물의 항균력 시험

3.1.1. 단일 추출물의 항균력 시험

본 연구에서 사용한 오배자, 계피, 로즈마리 단일 추출물의 항균력 시험을 진행 하였으며, paper disc 주위로 증식 저지환(Clear zone, mm)의 직경크기를 측정하여 항균효과를 확인하였다(Table 2). 오배자추출물의 경우 *P. aeruginosa*와 *S. aureus*에서 비교적 항균력이 우수하였고, *E. coli*, *C. albicans*, *A. niger*에서는 항균력이 약하게 나타났다지만 3개의 단일 단일추출물 중 세균에서의 항균력이 가장 좋은 것으로 나타났다. 계피추출물의 경우 진균류인 *C. albicans*, *A. niger*에서는 합성방부제보다도 항균력이 우수한 것으로 나타났다. 로즈마리 ethanol 추출의 경우는 *S. aureus*를 제외한 나머지 균에서 항균력이 약하게 나타나 이후 시험에서는 완전히 제외하였다. 따라서 단일추출물끼리의 조합에 의해서 합성방부제

Table 2. Anti-bacterial activity of *R. javanica*, *C. verum*, *R. officinalis* extracts

Size of clear zone (Diameter, mm)			<i>E. coli</i>	<i>p. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Ingredient	Extraction filter						
A	<i>R. javanica</i>	Hydrothermal	15	23	20	14	10
B	<i>C. verum</i>	70% ethanol	11	15	17	30	35
C	<i>R. officinalis</i>	70% ethanol	12	13	20	10	10
D	<i>R. officinalis</i>	Hydrothermal	0	0	0	0	0
E		Phenoxyethanol	17	25	21	27	35
F		Alcohol	0	12	10	0	13
G		Water	0	0	0	0	0

Table 3. Anti-bacterial activity of complex extracts

Size of clear zone (Diameter, mm)			<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Complex extracts							
A	<i>R. officinalis</i> : <i>C. verum</i>		9	10	20	25	25
B	<i>R. javanica</i> : <i>R. officinalis</i>		13	15	20	11	10
C	<i>R. javanica</i> : <i>C. verum</i>		15	16	23	25	23
D	<i>R. javanica</i> : <i>C. verum</i> : <i>R. officinalis</i>		13	14	22	20	17
E		Phenoxyethanol	16	20	23	27	25
F		Alcohol	9	0	0	11	13

A = complex extracts in the ratio of 1:1 of *R. officinalis* and *C. verum*

B = complex extracts in the ratio of 1:1 of *R. javanica* and *R. officinalis*

C = complex extracts in the ratio of 1:1 of *R. javanica* and *C. verum*

D = complex extracts in the ratio of 1:1:1 of *R. javanica*, *C. verum* and *R. officinalis*

정도의 항균력 효과를 기대해 볼 수 있을 것으로 사료된다.

3.1.2. 복합 추출물의 항균력 시험

각 추출물들의 상호작용을 알아보기 위한 복합 추출물의 항균력 시험 결과는 Table 3에 나타내었다. 로즈마리추출물을 같이 혼합한 복합 추출물들의 경우 효과가 더 떨어지는 현상이 나타났고, complex C와 complex D의 경우 병원균 5종에 대한 항균력이 모두 나타났다. 그러나 세 가지 추출물을 모두 혼합한 complex D 보다 오배자 추출물과 계피 추출물을 1:1로 혼합한 complex C가 항균활성이 더 우수하였으며, 합성방부제와 거의 비슷하게 나타남을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통해 complex C에 사용된 단일 추출물들

의 조합비에 따라 항균력 차이가 있을 것으로 사료된다.

Table 4는 complex C에 사용된 단일 추출물인 오배자추출물과 계피 추출물의 조합비를 달리 설정하여 항균력 시험을 진행한 결과를 나타낸 것이다. complex C-1과 complex C-3의 경우 계피 추출물의 비율이 높아 진균에서의 항균력이 complex C보다 우수하지만 세균에서의 항균력이 낮았고, complex C-4의 경우 진균에서의 항균력이 가장 약한 것으로 나타났으며, complex C-2의 경우 complex C와 병원균 5종에서 항균효과가 비슷하게 보일 수 있으나 complex C가 미비하게나마 항균력이 좋은 것으로 확인되었다. 즉, 오배자 추출물 조합 함량에 따라 복합추출물은 세균에서의 항균력 차이는 크게 없었지만, 계피

Table 4. Anti-bacterial activity of complex C extracts according to combination ratio of *R. javanica* and *C. verum* extracts

complex extracts		Size of clear zone (Diameter, mm)				
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
C	<i>R. javanica</i> : <i>C. verum</i> (1:1)	16	18	22	25	23
C-1	<i>R. javanica</i> : <i>C. verum</i> (2:3)	16	15	21	27	28
C-2	<i>R. javanica</i> : <i>C. verum</i> (3:2)	17	17	23	23	23
C-3	<i>R. javanica</i> : <i>C. verum</i> (1:4)	12	13	20	35	30
C-4	<i>R. javanica</i> : <i>C. verum</i> (4:1)	18	19	22	18	13

C = complex extracts in the ratio of 1:1 of *R. javanica* and *C. verum*

C-1 = complex extracts in the ratio of 2:3 of *R. javanica* and *C. verum*

C-2 = complex extracts in the ratio of 3:2 of *R. javanica* and *C. verum*

C-3 = complex extracts in the ratio of 1:4 of *R. javanica* and *C. verum*

C-4 = complex extracts in the ratio of 4:1 of *R. javanica* and *C. verum*

Table 5. Anti-bacterial activity of complex C extracts on various concentration

Strains	Concentration (mg/mL)								
	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.19
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>A. niger</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+

(+ : Active, - : Non-active)

추출물 조합 함량에 따라서는 진균에서 항균력의 차이가 나타났다. 또한 오배자 추출물과 계피추출물을 1:1 비율로 섞은 복합 추출물(complex C)은 항균 효과가 좋은 것으로 확인되어 이후 모든 실험에서는 complex C를 가지고 실험을 진행하였다.

3.1.3. 최소저해농도(MIC)와 최소살균농도(MBC)

Complex C의 병원균 5종에 대한 최소저해농도와 최소살균농도를 측정된 결과는 Table 5에 나타내었다. MIC의 농도가 낮을수록 미생물의 저해력이 높은 것으로 판단되며, 반대로 농도가 높은 곳에서 저해되면 항균활성이 떨어지는 것으로 판단한다. *E. coli*에서는 3.13 mg/mL의 농도에서부터 억제효과를 나타내었고 *P. aeruginosa*,

*S. aureus*에서는 0.39 mg/mL에서 변화를 확인할 수 있었으며 *C. albicans*는 1.56 mg/mL에서 *A. niger*는 0.78 mg/mL의 농도에서부터 억제효과를 확인할 수 있었다. 최소살균농도(MBC)는 최소저해농도를 측정하여 육안으로 보았을 때 발색여부를 확인 후 발색된 농도의 시료를 새로운 고체 배지에 도말하여 측정하였다. 측정결과 *E. coli*와 *C. albicans*는 6.25 mg/mL의 농도에서 살균효과를 확인 하였고, *P. aeruginosa*, *S. aureus*는 0.78 mg/mL에서 확인할 수 있었으며 *A. niger*는 1.56 mg/mL의 농도에서부터 살균효과를 확인할 수 있었다.

3.2. DPPH를 통한 항산화능 측정

단일 추출물과 복합 추출물인 complex C의 항산화능 측정을 위해 양성 대조군으로 BHT를 사용하여 DPPH를 측정하였다. 그 결과 양성 대조

군인 BHT가 75.78%로 가장 강한 항산화능을 보였고, 단일 추출물 오배자는 69.82%, 계피는 68.99%, 로즈마리는 55.78% 순으로 항산화능을 보였다. 또한 복합 추출물인 complex C의 경우는 66.78%의 항산화능을 나타냄으로서 단일 추출물의 오배자, 계피보다는 조금 떨어지지만 비슷한 것으로 확인하였다(Fig. 1). complex C의 농도별 DPPH를 확인 결과에서는 complex C 함량이 1%, 3%, 5%, 10%의 경우 70%대의 항산화능을 보였으며, complex C 함량이 30%, 50%, 100%의 경우는 80%대의 항산화능을 보였다(Fig. 2).

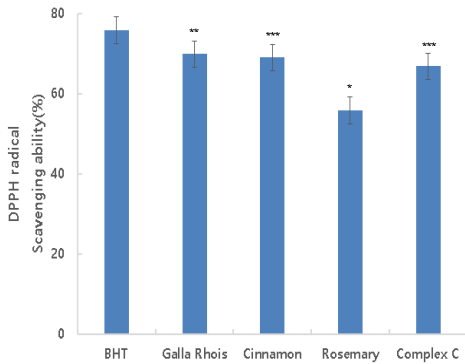


Fig. 1. DPPH free radical scavenging ability of single extracts.

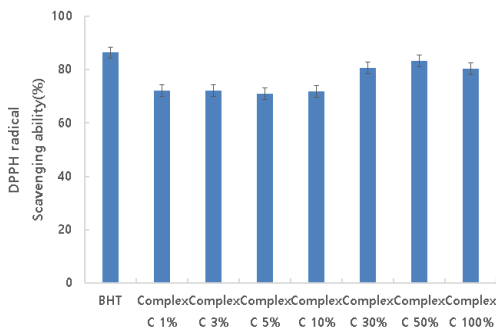


Fig. 2. DPPH free radical scavenging ability of complex extracts about various concentration.

3.3. 화장품의 Challenge Tesst

본 실험에서는 최종 선정된 complex C를 합성 방부제 대신 첨가하였을 때 화장품 제형에서도

동일한 방부효과를 나타내는지 알아보기 위해 CTFA에서 제안한 기준에 따라 challenge test를 진행하였다. 제형에 첨가한 농도는 아무것도 첨가하지 않은 control과 phenoxyethanol이 1% 첨가된 positive control의 대조군, complex C를 5%, 10% 첨가 적용된 실험군1, 실험군2로 구분하여 접종당일, 1일, 2일, 3일, 7일, 14일, 21일, 28일 동안 challenge test를 하였다. 그 결과는 Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6에 나타내었다. control(무방부제)의 제형에서 세균의 경우 7일차 안에 모두 사멸, *A. niger*는 시간이 지남에 있어 균수가 증가하다 감소하고 다시 증가하는 현상을 보였고, *C. albicans*의 경우 28일(4주) 동안 사멸하지 않고 계속 발생하였다(Fig. 3). positive control (phenoxyethanol 1%)의 제형에서는 3일차 안에 병원균 5종의 균이 사멸하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 실험군1(complex C 5% 적용)의 제형에서 세균의 경우 1일차 안에 모두 사멸, *A. niger*는 2일차 안에 사멸, *C. albicans*는 실험기간 28일 동안 사멸하지 않고 계속 발생하여 천연방부제로써의 역할로는 부족하다고 사료된다(Fig. 5). 실험군 2(complex C 10% 적용)의 제형에서는 세균 2종인 *P. aeruginosa*와 *S. aureus*의 경우 0일차부터 균이 증식하지 않았으며, *E. coli*와 *A. niger* 경우 1일차 안에 모두 사멸, *C. albicans*의 경우 3일차 안에 균이 사멸된 것으로 나타났다(Fig. 6). 그러므로 complex C의 경우 화장품 제형에서 10%로 적용하였을 때 천연방부제로써 가장 적합하다고 판단된다.

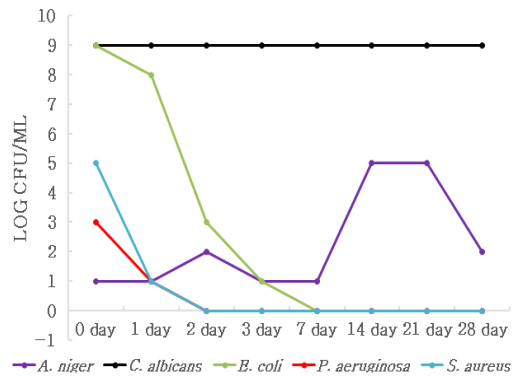


Fig. 3. Variation of microorganisms of control (non-preservative) over time (0-28days).

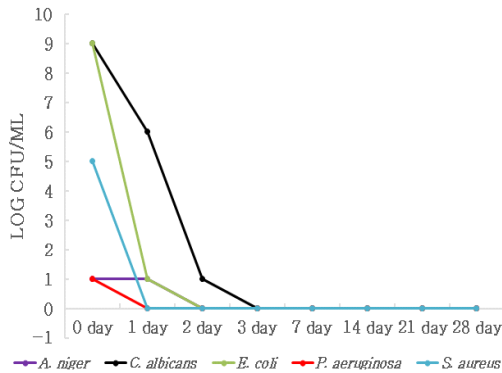


Fig. 4. Variation of microorganisms of positive control (phenoxyethanol 1%) over time(0-28days).

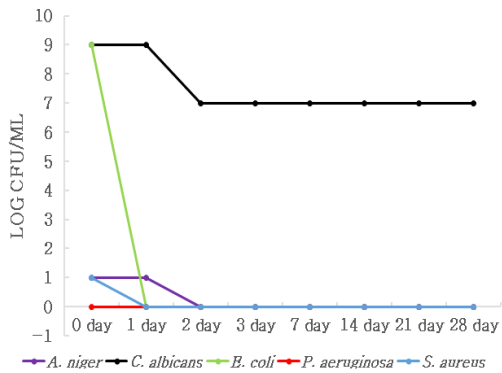


Fig. 5. Variation of microorganisms of Experimental group 1 (complex C 5%) over time (0-28days).

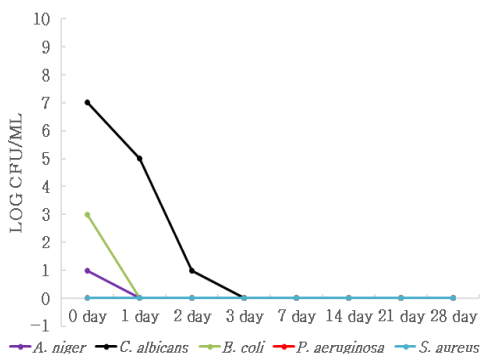


Fig. 6. Variation of microorganisms of Experimental group 2 (complex C 10%) over time (0-28days).

3.4. 화장품 안정성 및 안전성 평가

3.4.1. 화장품 안정성 평가

Challenge test에서 결과치가 가장 좋았던 실험군 complex C 10%를 적용한 화장품 제형과 positive control인 phenoxyethanol을 적용한 제형을 식품의약품안전처에서 2011년 6월에 고시한 화장품 한정성시험 가이드라인을 바탕으로 다양한 온도[4℃, 25℃, 45℃, cycle (-16↔25℃), cycle (4℃↔25℃↔45℃), 자연광]에 넣고 1개월간 안정성 시험을 하였다. 7일마다 점도, pH, 원심, 경시변화(색상 및 성상)과정을 측정하였고 측정된 결과는 Table 6, Table 7과 같다. Positive control인 phenoxyethanol 1%를 적용한 제형은 점도 3,575~4,240(64 Spindle, 50 rpm, 2 min), pH 6.15~6.52, 원심 0(8,000 rpm, 5 min)값을 보였으며 4주간 성상 및 색상, 향취 등 경시변화 없이 안정한 것으로 평가하였다(Table 6). Complex C 10%를 적용한 제형은 점도 3,315~3,930(64 Spindle, 50 rpm, 2 min), pH 4.14~4.27, 원심 0(8,000 rpm, 5 min) 변동 값을 보였고 4주간 성상 및 색상, 향취 등 경시변화 없이 안정한 것으로 평가하였다(Table 7). 따라서 complex C의 경우 화장품 제형에 10%를 적용 시 제형의 안정도 역시 합성방부제를 적용한 제형과 같이 문제가 없으며 한 달간의 안정성 경과를 지켜본 결과 complex C는 천연방부제로써 제형에 사용해도 무방하다고 판단된다.

3.4.2. 화장품 안전성 평가

화장품 안전성을 평가하기 위해 피부자극도 판정을 위한 첩포 시험(Patch test)을 실시하였다. 첩포 후 30분, 24시간이 경과한 뒤 첩포를 제거하고 24시간 뒤 자극유무를 육안으로 관찰 후 판정한 결과는 Table 8과 같다. complex C 10%를 적용한 화장품 제형(로션)의 경우 10명의 모든 피험자에서 자극 반응을 보이지 않았다. 이상의 결과로 피부에 안정한 천연 방부제로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

Table 6. Stability results of positive control (phenoxyethanol 1%) for 4 weeks

Temperature	Test item	Days				
		1day	1week	2weeks	3weeks	4weeks
4°C	Viscosity		4,027	4,120	4,115	4,240
	pH		6.50	6.47	6.43	6.43
	Centrifugation		0	0	0	0
	Exterior		-	-	-	-
25°C	Viscosity	3,575	3,750	3,860	3,850	3,800
	pH	6.44	6.53	6.52	6.53	6.49
	Centrifugation	0	0	0	0	0
	Exterior	-	-	-	-	-
45°C	Viscosity		3,207	3,575	3,175	3,330
	pH		6.45	6.41	6.37	6.37
	Centrifugation		0	0	0	0
	Exterior		-	-	-	-
Cycle (4°C↔25°C↔ 45°C)	Viscosity		3,020	3,100	3,215	3,325
	pH		6.31	6.38	6.31	6.15
	Centrifugation		0	0	0	0
	Exterior		-	-	-	-
Cycle (-16↔25°C)	Viscosity		3,570	3,580	3,620	3,495
	pH		6.50	6.43	6.40	6.44
	Centrifugation		0	0	0	0
	Exterior		-	-	-	-
Natural light	Viscosity		3,825	3,775	3,680	3,684
	pH		6.43	6.42	6.47	6.48
	Centrifugation		0	0	0	0
	Exterior		-	-	-	-

4. 결론

본 연구에서는 인체에 해가 없으며 항균작용 및 항산화 효과가 있는 오배자, 계피, 로즈마리 추출물을 이용하여 천연방부제 소재로서의 활용 가능성을 연구하였다. 실험 방법으로는 항균력, DPPH를 통한 항산화능, 화장품의 challenge test, 화장품 안정성 및 안전성 평가를 진행하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

단일 추출물의 항균력 시험에서는 오배자 추출물의 경우 세균류에서 비교적 높은 항균력을 나타냈고, 진균류의 경우 계피 추출물이 항균력이

우수하였으며, 로즈마리 추출물의 경우는 *S. aureus*를 제외한 나머지 균에서의 항균력이 미비한 것을 확인하였다. 추출물의 시너지 효과를 확인하기 위한 복합 추출물의 항균력 시험에서는 오배자 추출물과 계피 추출물의 복합 추출물 (complex C)이 세균과 진균류에서의 항균효과가 좋았으며, 1:1비율로 조합하였을 때 효과가 가장 좋은 것을 확인하였다. 혼합 추출물로 최소저해농도(MIC)와 최소살균농도(MBC)를 측정한 결과에서는 최소저해농도(MIC)의 경우 *E. coli*에서 3.13 mg/ *P. aeruginosa*, *S. aureus*에서는 0.39 mg/ *C. albicans*는 1.56 mg/ *A. niger*는 0.78

Table 7. Stability results of Experimental group (complex C 10%) for 4 weeks

Temperature	Test item	Days				
		1day	1week	2weeks	3weeks	4weeks
4°C	Viscosity		3,900	3,960	3,930	3,810
	pH		4.27	4.27	4.19	4.23
	Centrifugation		0	0	0	0
	Exterior		-	-	-	-
25°C	Viscosity	3,930	3,820	4,120	3,840	3,928
	pH	4.19	4.30	4.23	4.18	4.16
	Centrifugation	0	0	0	0	0
	Exterior	-	-	-	-	-
45°C	Viscosity		3,750	3,725	3,525	3,520
	pH		4.39	4.27	4.20	4.15
	Centrifugation		0	0	0	0
	Exterior		-	-	-	-
Cycle (4°C↔25°C↔4 5°C)	Viscosity		3,560	3,730	3,690	3,780
	pH		4.30	4.22	4.18	4.20
	Centrifugation		0	0	0	0
	Exterior		-	-	-	-
Cycle (-16↔25°C)	Viscosity		3,315	3,800	3,575	4,010
	pH		4.30	4.20	4.14	4.19
	Centrifugation		0	0	0	0
	Exterior		-	-	-	-
Natural light	Viscosity		3,875	3,948	3,730	4,125
	pH		4.28	4.23	4.22	4.23
	Centrifugation		0	0	0	0
	Exterior		-	-	-	-

Table 8. The result is patch tests of sample (complex C 10%)

No.	Volunteers			Sample (complex C 10%)		
	Name	Age	Sex	After 30mins	After 24hrs	After removal
1	K. M. J	64	W	-	-	-
2	J. J. E	32	W	-	-	-
3	J. H. C	29	M	-	-	-
4	K. J. T	31	M	-	-	-
5	L. S. M	29	W	-	-	-
6	C. S. M	29	M	-	-	-
7	K. J. S	29	M	-	-	-
8	L. J. W	30	M	-	-	-
9	B. J. Y	27	W	-	-	-
10	K. I. W	28	M	-	-	-
				0	0	0
				±	0	0
				+	0	0
				++	0	0
				+++	0	0

mg에서 억제효과가 나타났고, 최소살균농도 (MBC)의 경우 *E. coli*와 *C. albicans*는 6.25 mg/ *P. aeruginosa*, *S. aureus*는 0.78 mg/ *A. niger*는 1.56 mg에서 살균효과를 확인하였다. DPPH radical 소거능을 측정한 결과에서는 오배자 추출물 69.82%, 계피 추출물 68.99%, 로즈마리 추출물 55.78%, complex C 66.78%, 양성 대조군으로 사용한 BHT는 75.78%를 나타내었으며, 천연 추출물의 경우 항산화가 양성 대조군인 BHT보다는 낮지만 항균활성과 항산화를 갖는 추출물은 오배자와 계피추출물을 혼합한 complex C인 것으로 확인하였다. 화장품의 Challenge Test 결과에서는 phenoxyethanol이 1% 첨가된 positive control의 화장품 제형에서는 3일차 안에 병원균 5종의 모든 균이 사멸하는 것으로 나타났고, complex C 10% 적용한 경우는 3일차에 모두 사멸된 것으로 확인되어 천연방부제로써 가장 적합하다고 판단된다. 화장품 안정성 및 안전성 평가 결과에서는 complex C 10% 적용한 화장품 제형이 4주 시험기간 다양한 온도조건에서 색상 및 변색, 변취 등 이상이 없어 제형의 안정성이 확인되었다. 안전성 확인을 위한 patch test 결과에서는 실험대상자 모두 자극이 없는 것으로 나타나 피부에 안전한 물질로 사료되었다.

결론적으로, 오배자·계피·로즈마리의 세 가지 추출물의 시너지 효과는 미비하였지만, 오배자와 계피 추출물을 1:1 비율로 혼합한 complex C 10%를 화장품 제형에 적용하였을 때 합성방부제인 phenoxyethanol과 비슷한 방부활성을 나타내었으며, 제형의 안정성과 안전성에서도 이상 없음을 확인하였다. 따라서 화학 방부제를 대체하는 인체에 무해한 천연방부제 원료로서 화장품 산업에서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. M. J. Kim, T. K. Jung, I. G. Hong, K. S. Yoon, "Comparison of anti-microbial oils as natural preservatives", *Journal of the society of cosmetic scientists of korea*, Vol.32, No.2 pp. 99-103, (2006).
2. S. Y. Yang, H. O. Boo, "Phenolic Compounds, Antimicrobial Effects and Tyrosinase Inhibition Activities of Cucumber Grown Greenhouse According to Cultivars and Growth Stages", *Korean Journal of plant Resources, Korean J Plant Res*, Vol.26, No.5 pp. 645-651, (2013).
3. D. Y. Jang, J. C. Yang, "A Study on the evaluation of antimicrobial activity of extracts from *Rhus javanica* L fruit", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.37, No. 1 pp. 145-152, (2020).
4. H. S. Cho1, S. W. kang, J. H. Kim, M. J. Choi1, H. W. Yu, E. T. Park, H. S. Chun, "Antioxidant and Antimicrobial Activities of Combined Extracts of *Galla rhois*, *Achyranthes japonica* Nakai, *Terminalia chebula* Retz and *Glycyrrhiza uralensis*", *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, Vol.29, No.1 pp. 29-35, (2014).
5. I. Manou, L. Bouillard, M. J. Devleesscheouwer, A. O. Barel, "Evaluation of the preservative properties of thymus vulgaris essential oil in topically applied formulation under a challenge test", *Journal of Applied Microbiology*, Vol.84, No.3 pp. 368-376, (1998).
6. J. H. Kim, E. J. Do, G. S. Lee, "Investigation of Anti-microbial Activity of Herbal Medicines Used as Natural Preservatives Based on the Analysis of Papers and Patents", *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*, Vol.29, No.1 pp. 101-113, (2015).
7. H. C. Jo, K. S. Han, E. Y. An, "Gall formation on different age, habitat, and parasite position in *Rhus javanica* L", *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, Vol.8, No.4 pp. 304-311, (2000).
8. S. H. Choi, J. S. Kim, D. S. Jang, Y. B. Yu, Y. C. Kim, J. S. Lee, "Antibacterial activities of *Galla Rhois* extracts against fish pathogenic bacteria", *Journal of fish pathology*, Vol.18, No.3 pp. 239-245, (2005)
9. E. M. Cho, J. T. Bae, H. B. Pyo, G. S. Lee, "Antimicrobial plant extracts as an alternative of chemical preservative:

- Preservative efficacy of Terminalia chebula, Rhus japonica (gallut) and Cinnamomum cassia extract in the cosmetic formular", *Journal of Society of cosmetic scientists of Korea*, Vol.34, No.4 pp. 325-331, (2008).
10. C. S. Ryuk, Korean Medicinal Plant Book, pp.1-666, Academy Book, (1990).
 11. K. S. Chang, Y. Kang, J. P. Lee, S. Y. Park, J. H. Shin, Y. J. Jung, J. Y. Park, K. W. Ha, J. I. Park. Studies on the quality control method of cinnamomi cortex, cinnamomi ramulus and cassiac cortex interior. pp.223-232, The Annual Report of KFDA, (1998).
 12. Chaudhry, N.M.A, P. Tariq, "Anti-microbial activity of Cinnamomum cassia against diverse microbial flora with its nutritional and medicinal impacts", *Pakistan Journal of Botany*, Vol.38, No.1 pp. 169-174, (2006).
 13. N. S. Alzoreky, N. Nakahara, "Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia", *International Journal of Food Microbiology*, Vol.80, No.1 pp. 223-230, (2003).
 14. K. H. Park, D. S. Koh, Y. H. Lim, "Anti-allergic compound isolated from Cinnamomum cassia", *Journal of the Korean society of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, Vol.44, No.1 pp. 40-42, (2001).
 15. N. H. Lee, J. H. Rho, C. K. Han, K. S. Sung. "Effect of various hen feed supplements on IgY level in eggs and laying rates", *Journal of Animal Science and Technology*, Vol.41, No.2 pp. 155-166, (1999).
 16. H. R. Chung, J. Y. Lee, D. C. Kim, W. I. Hwang, "Synergistic effect of Panax ginseng and Cinnamomum cassia Blum cassia Blume mixture on the inhibition of cancer cell growth in vitro", *Journal of Ginseng Research*, Vol.23, No.2 pp. 99-104, (1999).
 17. M. M. Ozcan, J. C. Chalchat, "Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey", *International Journal of Food Science and Nutrition*, Vol.59, No.7 pp. 691-698, (2008).
 18. T. Allaf, V. Tomao, K. Ruiz, K. Bachari, M. ElMaataoui, F. Chemat, "Deodorization by instant controlled pressure drop autovaporization of rosemary leaves prior to solvent extraction of antioxidants", *LWT - Food Science and Technology*, Vol.51, No.1 pp. 111-119, (2013).
 19. O. I. Aruoma, J. P. Spencer, R. Rossi, R. Aeschbach, A. Khan, N. Mahmood, A. Munoz, A. Murcia, J. Butler, B. Halliwell, "An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and Provençal herbs", *Food and Chemical Toxicology*, Vol.34, No.5 pp. 449-456, (1996).
 20. M. B. Perez, N. L. Calderon, C. A. Croci, "Radiation-induced enhancement of anti-oxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)", *Food Chemistry*, Vol.104, No.2 pp. 585-592, (2007).
 21. R. S. Rodriguez, A. Visentin, D. Maestri, M. J. Cocero, "Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents", *Journal of Food Engineering*, Vol.109, No.1 pp. 98-103, (2012).
 22. N. M. Jacotet, Laguerre M, Fabiano-Tixier AS, Tenon M, Feuillère N, Bily A Chemat F. "What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield, composition, and activity of the extracts", *Electrophoresis*, Vol.39, No.15 pp. 1946-1956, (2018).
 23. V. M. González, G. Reglero, D. Ramírez, A. Molina, "Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract as a potential complementary agent in anticancer therapy", *Nutrition and Cancer*, Vol.67, No.8 pp. 122-1229, (2015).
 24. J. Moore, M. Yousef, E. Tsiani, "Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract

- polyphenols", *Nutrients*, Vol.8, No.11 pp. 731, (2016).
25. J. H. Song, H. D. Kwon, W. K. Lee, I. H. Park, "Antimicrobial activity and composition of extract from Smilax china Root", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.27, No.4 pp. 574-584, (1998).
26. M. M. Ozcan, O. Erel, E. E. Herken, "Antioxidant activity, phenolic content, and peroxide value of essential oil and extracts of some medicinal and aromatic plants used as condiments and herbal teas in Turkey", *Journal of Medicinal*, Vol.12, No.1 pp. 198-202, (2009).