

화장품 소재로서의 노니 추출물에 관한 특성연구

김 승 희 · 장 혜 진[†]

건국대학교 일반대학원 생물공학과
(2016년 3월 15일 접수, 2016년 5월 20일 수정, 2016년 5월 27일 채택)

Study on the Bioactive Characteristics of *Morinda citrifolia* as a Cosmetic Raw Material

Seung-Heui Kim and HYE-JIN JANG[†]

Department of Bioengineering, Graduate School of Konkuk University, 120 Neungdong-ro,
Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea

(Received March 15, 2016; Revised May 20, 2016; Accepted May 27, 2016)

요약: 본 연구에서는 노니(*Morinda citrifolia*, MC)의 항산화력, 세포독성, 항노화 효과 등 생리활성을 규명하여 화장품 제제로서의 응용 가능성을 연구해 보고자 하였다. 노니는 열대성 식물로서 2000년 넘게 폴리네시아인들의 식량과 민간요법제로 사용되어 왔으며 항균성, 항암, 항염증, 면역력을 높일 수 있다고 보고되고 있다. DPPH 소거능에 대한 *in vitro* 노니 추출물의 항산화 활성은 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량 측정을 통하여 알아보았다. 항노화 작용에서 HDF 세포에 대한 세포독성이 없음을 확인하였고, 50 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 노니 추출물 첨가 시 MMP-1 발현이 뚜렷이 감소되었음을 확인하였다. 또한 *in vivo* 실험에서는 노니 추출물을 함유한 크림을 제조하여 30 ~ 50대 여성 22명을 대상으로 4주간 아침·저녁으로 도포하게 한 후 각질함량, 멜라닌 지수, 모공수, 피부색상 및 눈밀 주름수의 변화를 비교·측정하였다. 그 결과로 각질함량은 대조군 그룹(control group)에서는 다소 증가한 반면에 노니 함유 크림 그룹(experimental group)에서는 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한 눈밀 주름수의 변화에서 노니 함유 크림 그룹에서만 제품 사용 4주후 주름수가 감소하였다. 이상의 결과로 노니 추출물은 많은 MMP-1 발현 메커니즘을 제한하며, 천연 항노화 화장품 제제로서 고무적인 가능성을 기대해 보고자 한다.

Abstract: This study attempted to investigate the possibility of the use of *Morinda citrifolia* (MC) as a cosmetic ingredient from its physiological activities such as antioxidant activity, cytotoxicity and anti-aging effect. MC is a tropical plant that has been used as traditional polynesian foods and medicines for over two thousand years. It has been reported that this shrub can improve antimicrobial, anti-cancer and anti-inflammatory effects and strengthen an immune system. The *in vitro* antioxidant activity of MC was performed to see the DPPH scavenging activity by measuring total polyphenol content and total flavonoid content. As a result, a lack of any cytotoxicity was confirmed in human dermal fibroblasts (HDF) cell. When MC extract at a concentration of over 50 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was added, MMP-1 expression considerably diminished. In an *in vivo* test, in addition, cream containing MC extract was prepared and applied to a total of 22 women in their 30 ~ 50s in ages in the morning and in the evening for four weeks. Changes in keratin, melanin index, pore, skin color and wrinkles under the naked eyes were then comparatively measured. Keratin levels slightly increased in the control group but decreased in the experimental group. In addition, wrinkles diminished in the experimental group. This study found that MC extract controls many MMP-1 related mechanisms with great potential for use as a natural ingredient of anti-aging cosmetics.

Keywords: antioxidant, anti-aging, anti-wrinkle, MMP-1, cosmetics

[†] 주 저자 (e-mail: vita3535@hanmail.net)
call: 02)954-1656

1. 서 론

현대사회는 소득 증대와 의학의 발달로 고령화 사회가 되면서 건강 뿐 아니라 외모에 대한 관심이 높아졌고, 화장품 시장에서도 제품의 효과 및 효능이 뛰어난 기능성을 강조한 화장품 선호하고 있으며, 다양한 건강 기능성 소재가 연구 개발되고 있다[1]. 인체는 산화촉진물질(prooxidant)과 산화억제물질(antioxidant)이 균형을 이루고 있지만, 여러 요인들로 인하여 불균형이 이루어질 때가 있다. 이러한 불균형 시에는 산화적 스트레스(oxidative stress)로 인하여 생리적 장애 및 질병을 일으키게 된다[2]. 산화적 스트레스의 직접적 원인이 되는 활성산소(reactive oxygen)는 호기성 물질의 다양한 물질 대사과정에서 지속적으로 생성되는 부산물이다. 특히 자유 라디칼(free radical) 중에서 가장 많은 부분을 차지하는 활성산소들은 불안정하고 반응력이 높아 여러 생체 물질과 쉽게 반응하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 초래한다. 따라서 활성산소를 제거할 수 있는 항산화제를 사용하면 피부 자체의 항산화 네트워크를 회복시켜 피부조직을 보호하고 색소침착과 같은 피부노화를 늦출 수 있으며, 암을 유발시킬 수 있다고 알려져 있는 합성 항산화제보다는 인체에 안전하고 항산화 효과가 뛰어난 천연 항산화제의 연구 개발이 필요하다. 다양한 세포실험 및 동물실험, 임상실험을 통하여 피부효능을 갖는 천연물의 생리활성 성분을 위한 연구로 녹차 카테킨, 베타카로틴, 이소플라본 등의 천연소재가 주름을 개선하고, 보습을 향상시키며, 탄력을 증진시키는 등과 같은 특정 피부효능을 나타내는 것이 보고된 바 있다. 이와 같이 항멜라닌과 항노화 작용에 효과적인 천연소재의 생리활성 특성개발은 피부미용 분야에서 핵심적으로 다뤄져야 할 부분이다. 이러한 연구를 통해 다양한 천연물질들의 항산화·항균·항염·항멜라닌·항노화 효과 등을 과학적으로 입증하고자 노력 중이며 천연물의 생리활성 성분에 대한 연구도 가속화되고 있다[3].

노니는 열대성 식물로서 하와이나 타이티 섬에서 자생하고 있으며 주로 화산지질의 열대성 기후인 남태평양 섬들을 중심으로 주로 분포되어 있고, 나무의 크기는 4.5 ~ 6.0 m이고 열매는 감자크기 정도로 연중 수확이 가능하다. 지역에 따라 Indian mulberry, Ba Ji Tian, nono, nonu, cheese fruit, nhau로 불리기도 한다.

2000년 넘게 폴리네시아인들의 식량과 민간요법제로 사용되어 왔는데 항균성, 항 바이러스성, 항암, 감기, 알레르기, 저혈압, 항염증, 면역력을 높일 수 있다고 보고되고 있다[4]. 노니의 열매를 추출하여 현대인의 스트레스 해소는 물론 건강 및 영양 보조, 만병통치약으로까지 각광을 받고 있으며, 암세포의 성장률과 확산을 줄여주고 암세포혈관의 퇴화 및 세포자살을 유발할 수 있다고 보고된 바 있으며 이러한 생리활성의 기전은 항산화 능력을 발판으로 하고 있다[5,6]. 또한 노니 추출물에서는 일반적으로 xeronine과 관련된 성분이 생리활성물질로 보고되어 있는데, 특히 이 성분은 일종의 인삼 사포닌(saporine) 성분과 유사한 것으로 에너지 대사에 영향을 끼치는 단백질의 활성을 강화시키고, 에너지 대사를 촉진 시킨다. 한편 Wang 등의 연구에 의하면 노니 잎으로부터 새로운 flavonol 배당체로서 iridoid glycoside를 발견하였으며 이 물질은 mouse epidermal JB6 cell에서 AP-1활성과 세포의 변형을 억제한다고 보고하였다[7].

따라서 본 연구에서는 식용으로 그 안전성이 확보된 노니 열매로부터 추출, 분획과정을 거쳐 주요한 화합물을 분리, 동정하여 생리활성을 실험하였고, 노니 추출물을 함유한 크림을 제조하여 인체의 안면 부위에 적용하여 피부의 개선정도를 분석하고 이를 통하여 노니 추출물을 화장품 원료로 활용하는데 효과적인 방안을 모색하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 기기

본 연구에서 실험재료로 사용된 노니 파우더는 2015년 2월, J식품사(Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 노니 추출물은 노니의 10배 무게의 50% 에탄올을 넣은 후 실온에 72 h 두었다가 원심 분리기(Hanil science industrial co., Ltd, SUPRA25K, Korea)에서 9,000 rpm으로 15 min 상층액과 침점물을 3회 반복하여 원심 분리한 후 Whatman No.2 여과지로 상층액을 여과하여 그 상층액은 화장품 제조에 사용하였고, 멸균 필터지를 이용하여 필터링한 다음, 에탄올을 증발시키기 위하여 감압농축기(EYELA, Japan)로 에탄올을 제거한 후 3일 동안 동결 건조하여 세포 실험을 하였다. 실험에 사용된 시약은 1,1-diphenyl-2-picryl (DPPH), butylated

hydroxy toluene (BHT), 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), glucose, caffeic acid, quercetin, arbutin, pyrogallol, griess reagent, tris-HCl buffer (tris (hydroxymethyl) amino-methane + EDTA), aluminium nitrate, potassium acetate, sodium phosphate buffer를 사용하고(Sigma, USA), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone, USA), α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)와 L-tyrosine, fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, formaldehyde, arbutin, phosphate buffered saline solution (PBS), easy blue, chloroform, isopropanol (Sigma, USA)를 구입하여 사용하였다. 저해제로 SP600125 (JNK inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor), PD98059 (ERK/MEK inhibitor), LY294002 (PI3K inhibitor)를 구입하여 사용하였고(Calbiochem, USA), 그 외의 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

2.2. 세포 배양

Human dermal fibroblast (HDF) 세포를 본 실험에 사용하기 위하여 세포 배양을 실시하였다. 세포 배양은 high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma, USA)과 1%와 penicillin/streptomycin (Sigma, USA)를 100 IU/50 μ g/mL을 첨가하여 37 °C로 유지되는 5% CO₂, 상대습도 100% 습윤 배양기 (Sanyo Electric Co., Japan)에서 배양하였다.

2.3. 항산화 측정

2.3.1. 총 Polyphenol 함량 측정

노니 추출물의 총 폴리페놀 함량(total polyphenol content), TRC은 caffeic acid (Sigma, USA)를 표준물질로 사용하여, Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정하였다[8]. 시료를 0.5, 1, 1.5, 2 mg/mL가 되게 희석한 후 시료 400 μ L에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 시약 400 μ L을 혼합하여 실온에서 3 min간 방치한 후 10% NaCO₃ 용액 400 μ L를 혼합하고 다시 실온에서 차광된 상태로 1 h 동안 반응시켰다. 반응 후 96-well plate에 200 μ L씩 분주한 후 microplate reader를 이용하여 800 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{폴리페놀 함량 측정(\%)} = 100 - \left\{ \frac{\text{무첨가군 흡광도}}{\text{첨가군 흡광도}} \times 100 \right\}$$

2.3.2. 총 Flavonoids 함량 측정

노니 추출물의 총 플라보노이드 함량 측정 방법에는 moreno를 이용하여 측정하였다[9]. 시료를 1, 3, 5 mg/mL가 되게 희석한 후 시료 100 μ L에 10% aluminium nitrate 20 μ L와 1 M potassium acetate 20 μ L 및 에탄올 860 μ L를 차례로 첨가한 후 혼합하였다. 그 후 실온에서 40 min 간 방치하고 96-well plate에 200 μ L씩 분주한 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{플라보노이드 함량 측정(\%)} = \left\{ \frac{\text{무첨가군 흡광도}}{\text{첨가군 흡광도}} \times 100 \right\}$$

2.3.3. DPPH Radical 소거능 측정

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay는 free radical에 대한 시료의 항산화 활성을 평가하기 위한 것으로 Blois (1958)의 방법을 이용하여 노니 추출물에서의 DPPH radical 소거능 측정을 하였다. 0.1 mM 농도의 DPPH (Sigma, USA)용액 180 μ L에 노니 추출물 시료를 20 μ L씩 96-well plate에 첨가하고 37 °C에서 20 min 간 배양하였다. 배양 후 microplate reader를 이용하여 517 nm로 흡광도를 측정하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거활성(\%)} = 100 - \left[\left(\frac{\text{시료첨가군흡광도}}{\text{시료무첨가군흡광도}} \right) \times 100 \right]$$

2.4. MMP-1 생성 억제능 측정

2.4.1. 세포독성 측정

Neutral red (NR) assay를 이용하여 사용된 시료의 독성 실험을 수행하였다[10]. 세포 주는 HDF 세포를 사용하였으며, 96-well plate에 3 × 10⁴ cells/well의 농도로 분주하고 노니 추출물을 각각 농도가 되도록 첨가한 후 24 h 동안 37 °C에서 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포부착 확인 후 시료를 농도별로 무혈청 배지에 희석하여 처리한 후 48 h 배양하였다. 배양한 세포는 배양액을 NR solution이 1% 포함된 무혈청 배지로 교환하여 3 h 배양한 다음 현미경 하에서 NR의 결정화 유무를 확인하였다. 세포고정액으로 formaldehyde 용액 10%가 첨가된 phosphate buffered saline (PBS)을 각 well에 100 μ L로 20 min 처리하여 고정하였다. NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 49% 에탄올, 50%

증류수)을 각 well에 100 μ L씩 분주하여 세포 내의 NR를 추출하여 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

2.4.2. MMP-1 생성 억제능 측정

HDF 세포를 96-well plate에 3×10^4 cells/well당씩 부착시켜 12 h 후 상층액을 버리고 DMEM에 녹인 추출물을 농도별로 처리한 후 UVB를 20 min간 조사하고 24 h 배양하였다. 그리고 배양 상층액 100 μ L를 96-well plate에 옮긴 후 coating buffer 100 μ L를 첨가한 후 overnight시켰다. 또한 배양 상층액 제거 후 washing buffer (0.1% Tween 20을 함유)로 3번 washing 하였다. Blocking buffer (0.1% BSA 함유) 100 μ L 처리 후 37 $^{\circ}$ C에서 1 h 반응시키고, 배양 상층액 제거 후 buffer로 3번 washing 한다. 1,000배 희석한 primary antibody (anti-MMP-1 mouse antibody)를 50 μ L처리 후 37 $^{\circ}$ C에서 1 h 방치한 후 배양 상층액 제거와 washing buffer로 3번 washing한다. 4,000배 희석한 secondary antibody (alkaline phosphate conjugated anti-mouse IgG antibody)를 50 μ L처리 후 37 $^{\circ}$ C에서 1 h 방치한다. 배양 상층액 제거 후 washing buffer로 5번 washing 한다. 1 mg/mL의 농도로 녹인 p-nitrophenyl phosphate (pNPP) 100 μ L를 각 well당 처리 후 37 $^{\circ}$ C 암실에서 1 h 방치한다. 그 후 405 nm 흡광도에서 측정한다. 본 실험은 HDF 세포에 대한 노니 추출물의 MMP-1 발현 변화를 알아보기 위하여 노니 추출물을 HDF 세포에 24 h 동안 처리한 후 배양 상층액을 취하여 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)방법으로 MMP-1 함량을 측정하였다.

2.4. 노니 함유 크림 제조 방법

실험에 사용된 크림 제형은 Table 1의 처방에 따라 대조군(control)과 노니 추출물을 포함하는 그룹(experiment)으로 나누어 다음과 같이 제조하였다. (A)상과 (B)상을 각각 70 $^{\circ}$ C까지 가온하여 완전 용해한 후, (A)상을 (B)상에 투입하고 호모믹서 4,000 rpm에서 15 min 간 교반하여 유회시킨다. 그 다음 40 $^{\circ}$ C 이하로

Table 1. The Experimental Formulation of the Cosmetic Product Cream Samples (Composition (%))

	Ingredients	Control group	Experimental group
A	D.W	51	50
	Hyaluronic acid	5	5
	Beta-glucan	5	5
	Glycerine	5	5
	EDTA-2Na	0.01	0.01
B	Cyclomethicone (DC345)	5	2
	Grape seed oil	5	1
	Cetearyl glucoside	1	1
	1,2-Hexanediol	3	3
	Montanov 202	1	1
	Panthenol	1	1
	Glyceryl stearate/PEG-300 stearate	1	1
	Cetearyl alcohol	0.5	0.5
	Dimethicone	0.2	0.2
	BHT	0.03	0.03
C	Xanthan gum (1%)	14.26	14.26
	MC extracts	-	1
	Buthylene glycol	2	2
	Dicaprylate/Dicaprate		
	Total	100.0	100.0

냉각 후 (C)상을 (A) + (B)상에 투입하여 5 min 동안 4,000 rpm으로 교반하여 점도 있는 크림 제형을 얻어 실험에 사용하였으며, (A), (C)상은 두 그룹 모두 구성 성분이 동일하고, (B)상의 경우 실험군은 노니 추출물 1.5%를 포함하여 제조하였다.

2.5. 임상 평가 방법

본 실험 참여자는 서울 지역에 거주하는 30 ~ 50대의 여성을 연구 대상자 대조군 11명, 실험군 11명으로 나누어 제조한 크림(실험 기간에는 본 제품만을 사용)을 2015년 7월 18일부터 2015년 8월 18일까지 4주 동안 아침, 저녁(하루 2번 세안 후) 사용하여 수분, 유분, 각질 함량, 눈밑 주름수의 실험 전, 후를 비교 실험하였다.

2.5.1. IRB 승인

본 연구의 임상 평가를 위해 다음과 같이 IRB 승인을 받았다.

과제명	노니 추출물의 피부 생리활성 및 화장품에의 응용에 관한 연구
과제번호	7001355-201507-HR-064
승인 유효기간	승인일(2015-07-14) ~ 2016-07-13
심의 기관	건국대학교 기관생명윤리위원회

2.5.2. 임상 대상 선정 기준

- ① 30 ~ 50세까지 건강한 여성으로 연구 참여에 동의한 사람
- ② 가임 혹은 임신 또는 수유중이 아닌 사람
- ③ 아토피, 알레르기 피부질환이나 유전병·염증·외상·내분비질환이 없는 사람
- ④ 정신과적, 내외적인 병원치료를 받지 않는 사람
- ⑤ 스테로이드가 함유된 피부 외형제를 1개월 이상 사용하지 않은 사람
- ⑥ 동일한 실험에 참가한 뒤 12개월 경과 한 사람
- ⑦ 그 외 연구자의 판단으로 실험에 부적합하다고 생각되는 사람은 제외

2.5.3. 피부 측정 방법 및 기기

본 실험은 정확한 피부 측정을 위해 실험자들은 일정한 시간대를 정한 뒤 준비된 동일한 클렌저를 사용한 후 측정시의 실내 환경 조건은 실내 온도 22 ~ 24 ℃, 실내 습도 40 ~ 60%를 유지하는 항온, 항습의 실내 조건에서 클렌징 후 30 min이 경과된 후에 측정하였다. 측정 시에는 정확도를 위해 얼굴의 오른쪽 볼(코 옆에서 3 cm 지점)부위의 일정한 부위를 3회 반복 측정하였다. 노니 추출물을 포함한 제품 사용 전, 사용 4 주후 유분, 수분, 각질, 주름 수를 측정하였다.

- ① 멜라닌 측정: 빛을 방출해 피부에서 반사되는 빛을 측정하는 기구인 Mexameter[®]RMX 18 (C.K electronic, Germany)를 이용하여 피부의 멜라닌 지수를 측정하였다[11].
- ② 피부 색상 측정: 피부의 표면 색상은 spectrophotometer CM-2500d를 이용하여 측정하여 CIE Lab 표색계의 색상 값인 명도 지수 L과 색 좌표 지수인 a와 b 값을 측정하였다. Spectrophotometer CM-2500d은 분광색채계로 시료면의 파장별 세기를 측정하여

색도 좌표를 구하는 기기이다[13].

- ③ 피부각질 측정: Skin visiometer[®]SV-600 (C.K electronic, Germany)를 이용해 피부 표면의 각질량을 측정하였다. 측정 부위에 comeofix 테이프를 피부표면에 올려놓고 5 s 간 눌러 묻어나온 각질을 카트리지에 끼우고 특별한 광원을 조사하여 얻어진 image로 다른 두께의 각질층이 5가지색으로 보여지고 모니터링 되어 간접적으로 각질함량을 계산해낸다[14].
- ④ 눈밑 주름수, 모공수 측정: 안면피부평가는 과학적 피부 분석 시스템인 Robo skin nalyzer (CS 50, RAS, Japan)을 사용하였다[15].

2.5.4. 통계 분석

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차(Mean ± S.D.)로 표기하였으며 통계처리는 SPSS Window Version 23.0 (SPSS Inc., Illinois, USA)을 이용하여 분석하였으며 유의성 검증은 paired *t*-test를 사용하여 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적 유의성의 차이가 있는 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항산화 효과

3.1.1. 총 Polyphenol 함량

각종 천연물로부터 분리된 천연의 항산화제중에서 식물에 다량 존재하고 있는 페놀성 화합물과 플라보노이드 등은 항산화, 항균, 항염증 작용 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 밝혀져 많은 식물들을 대상으로 연구가 활발히 진행되고 있으며[16]. 식물 추출물들이 화장품 성분으로 이용될 때 갖는 중요한 특징 중 하나는 이러한 높은 항산화 활성이다[17]. 선행 논문에서 노니는 xeronine의 전구물질인 proxeronine을 다량 함유하고 있어 인체 내에서 생화학적 반응에 의해 생리활성 물질인 xeronine이 만들어지기 때문에 인체 기능 조절을 가능하게 한다고 보고하고 있으며, 이런 활성 물질과 함께 페놀성 화합물 및 플라보노이드는 함량이 높아 항산화 활성이 높게 나타난다고 하였다. 특히 에탄올 추출물이 물 추출물의 항산화 활성보다 높게 나타남을 알 수 있다[18]. 본 연구에서는 노니 추출물의 함량을 카페인산(caffeic acid)를 표준물질로 총 폴리페

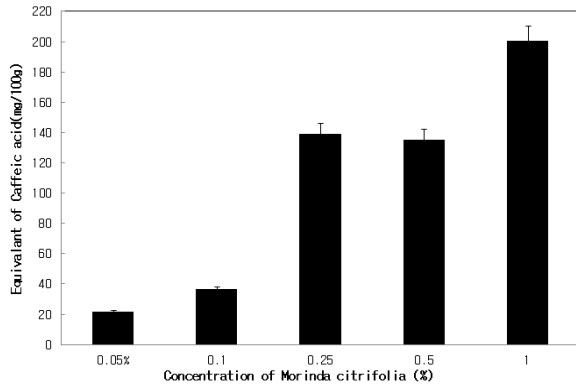


Figure 1. Change of total polyphenol concentration of MC.

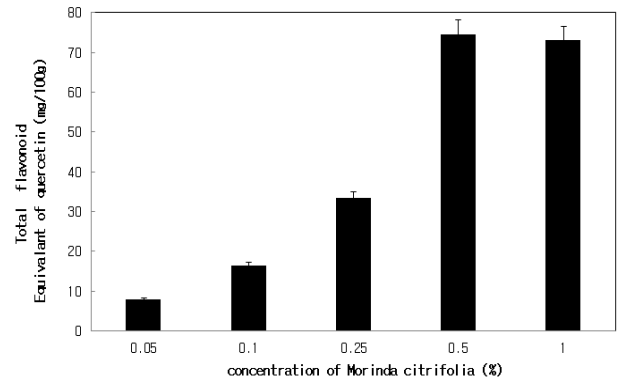


Figure 2. Change of total flavonoid concentration of MC.

놀 함량을 측정하였다. 노니 추출물 1% 농도로 처리하였을 때 폴리페놀 함량이 200.4 mg/mL의 수치를 보였다. 이러한 항산화 활성은 주로 페놀성 화합물에 의한 것으로 알려져 있다[19]. 결과적으로 노니의 항산화 활성 효과는 높은 폴리페놀 성분으로부터 야기되는 부분이라 사료된다[20].

3.1.2. 총 Flavonoid 함량

플라보노이드는 방향족 폴리페놀로서 크게 iso-flavones, chalcones, flavanones, flavones, flavonols, flavanon-3-ols, anthocyanidins, flavan-3-ols, proanthocyanidins, flavans, flavan-3,4-diols 및 dihydrochalcones의 13가지로 분류되며[21] 생체 내 산화작용을 억제한다고 알려져 있는 성분으로서 항산화력을 나타내는 지표라고 할 수 있으며, 면역조절제로 사용되어 왔고, 최근 항균작용, 항진균 바이러스작용, 혈관계 조절작용, 강장작용, 항염증작용, 항암작용 등의 다양한 생리활성이 밝혀지고 있다[22,23]. 본 연구에서는 항산화력이 뛰어나다고 보고된 quercetin과 비교하여 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 그 결과 Figure 2와 같이 총 플라보노이드 함량이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 대조군인 quercetin에 상응하여 비교하였을 때 플라보노이드 함량이 노니 추출물이 0.5%일 때 74.5 mg의 높은 플라보노이드 함량이 관찰되었다.

3.1.3. DPPH Radical 소거능

DPPH는 화학적으로 안정된 free radical을 가지고 있는 수용성 물질로 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물 등에 의해 환원되어 짙은 자색으로 탈

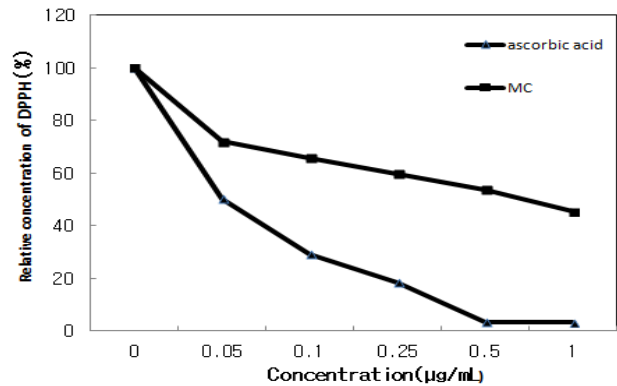


Figure 3. MC of DPPH radical residual activity.

색되며[24], 식물 또는 식품에서 추출물 또는 특정 혼합물의 free radical 소거능을 평가하기 위해서 DPPH 시험이 널리 이용되고 있다[25]. 본 실험에서 노니 추출물은 ascorbic acid에 비해 낮은 DPPH 자유 라디칼 소거능을 보였으나 오미자 추출물의 경우 1 µg/mL 농도에서 55%와 비교 시 노니 추출물은 1 µg/mL 농도에서 24%로 비교 시 노니 추출물은 1 µg/mL 농도에서 55%로 2배 이상의 radical 소거능이 있는 것으로 나타났다. 노니 에탄올 추출물은 합성 항산화제 중에 가장 널리 사용하고 있는 0.1% BHT와 비슷한 활성을 나타내었고 에탄올 추출물의 활성이 물 추출물의 활성보다 높게 나타난 것으로 보고 되었다[18]. 또한 Gwak 등의 선행 연구에서는 노니 과실 50% 에탄올 추출물 5 mg/mL의 농도에서 DPPH 소거능이 71% 활성을 갖는다고 하였다[28]. 따라서, 앞으로 노니 추출물은 기능에 맞게 효과적인 방법으로 사용된다면 항노화 기능성 화장품에의 응용이 가능하리라 사료된다.

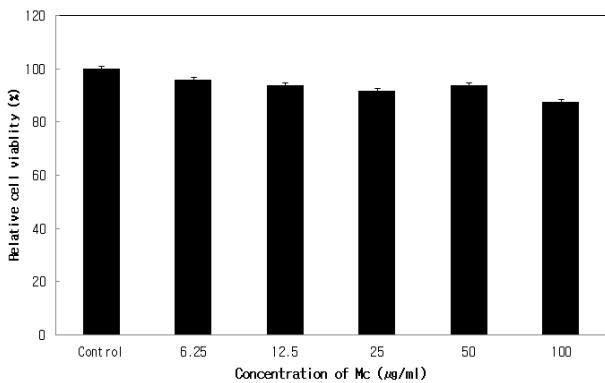


Figure 4. The effect of treated with MC on the cell viability in HDF cells.

3.2. 항노화 효과

3.2.1. HDF 세포에 대한 세포독성 측정

노니 추출물의 MMP-1의 발현 변화 측정을 통한 항노화 효과를 보기 위해 HDF 세포의 농도별로 처리하여 NR 실험을 통해 세포 생존율과 독성을 측정하였다. Figure 4는 노니 추출물을 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 농도별로 첨가하였을 때 세포독성 실험결과, 6.25 ~ 100 µg/mL까지 모든 농도 범위에서 세포 생존율 87% 이상을 유지하여 본 실험에 사용된 농도에서는 세포 생존율에 영향을 주지 않는 것으로 나타나 노니 추출물 농도 100 µg/mL까지 실험이 가능한 것으로 관찰되었다.

3.2.2. MMP-1 생성 저해능

HDF 세포에 UVB가 조사되면 세포내 DNA 손상뿐만 아니라 광노화현상이 발생하며, HDF 세포의 광노화는 성장을 저해하며 MMP의 발현을 촉진하여 진피층에 존재하는 콜라겐의 분해를 촉진시킨다[26]. MMP 발현은 UVB로 인해서 활성화되는 전사인자인 NF-κB에 의하여 촉진된다. HDF 세포에 조사된 UVB는 ROS를 증가시켜 염증성 전사인자 NF-κB를 활성화시키고, 활성화된 NF-κB는 핵 내로 이동하여 MMP의 발현을 촉진하게 되며 발현된 MMP는 진피층에 존재하는 콜라겐의 분해를 촉진시킨다[27]. 이러한 MMPs의 발현과 활성이 증가하게 되면 콜라겐 분해를 촉진시켜 피부노화를 일으키는 중요한 원인이 되고 있다. 본 연구는 노니 추출물이 MMP-1 발현에 미치는 변화를 알아보기 위하여 시료를 HDF 세포에 MMP-1의 함량을

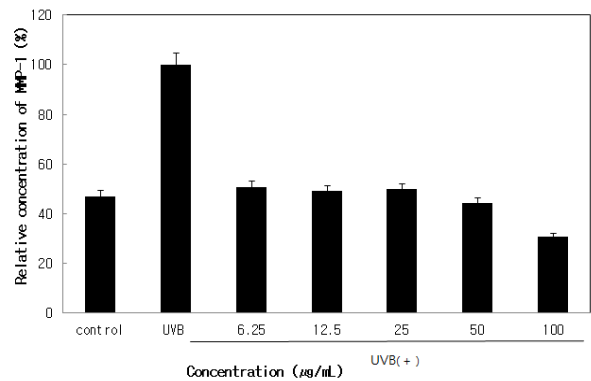


Figure 5. Inhibition of MMP-1 production in HDF cell treated with MC.

측정하였으며, 그 결과는 Figure 5와 같다. HDF 세포에 자외선을 조사하지 않은 경우에는 MMP-1 발현이 감소, 반면 HDF 세포에 자외선을 조사한 경우에는 MMP-1 발현이 증가하였다. UVB 100 mJ/cm²를 조사한 HDF 세포에 노니 추출물 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL을 농도별로 처리하였을 때 모두 농도 의존적으로 MMP-1 발현이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 대조군에 비하여 노니 추출물 50, 100 µg/mL 농도에서 각각 56%, 70%의 MMP-1 발현이 감소되었음을 관찰할 수 있었다. 또한 선행논문에서 노니 추출물이 농도 의존적으로 콜라겐 생합성 촉진하였고[12], 발현된 MMP는 콜라겐의 분해를 촉진하여 주름생성과 탄력감소를 야기 시킨다. 본 실험에서도 MMP 발현 억제능이 뛰어난 결과를 나타내어 노니 추출물은 천연 물질로서 주름 개선의 항노화 화장품의 소재로서 응용 가능성이 있다고 사료된다.

3.3. 노니 추출물을 포함하는 화장품의 임상 효능평가

3.3.1. 제품 사용전 피부 측정 비교

본 연구의 모든 실험은 동일한 조건하에 3회 이상 반복 측정하여 평균 ± 표준편차(Mean ± S.D.)로 표기하였으며, 통계 처리는 SPSS window version 23.0 (SPSS Inc., Illinois, USA)을 이용하여 분석하였으며, 유의성 검증은 paired t-test를 사용하여 p 값이 0.05 미만 일 때 통계적으로 유의성 차이가 있는 것으로 판정하였다. 각질수, 눈밑주름, 멜라닌지수, 모공수, L, a, b 값 모두 실험 전 대조군과 실험군의 두 그룹간 동질성을 검증하였다. 제품 사용 전 피부 측정 비교 결과 그룹의

Table 2. Examination of Skin Homogeneity between Test Groups

	Control group (n = 11)		Experimental group (n = 11)		<i>t</i>	<i>p</i>
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		
Keratin	266.82	31.34	236.36	27.86	1.772	0.116
Wrinkles under the eyes	2.68	1.01	3.18	1.46	-1.144	0.279
Melanin	161.73	33.70	160.82	59.87	0.125	0.902
Appreciable pores	1106.27	67.11	1069.45	10.64	0.247	0.809
Wide open pores	20.46	44.58	25.82	17.52	-0.041	0.968
Blackhead pores	434.27	19.31	470.91	25.26	-0.465	0.651
L	57.84	19.02	62.34	26.03	-1.929	0.082
a	11.91	2.34	11.41	2.20	0.516	0.611
b	23.29	3.67	20.97	5.32	1.193	0.247

Table 3. Comparison of Skin Keratin, Melannin, Wrinkle under Eyes and Color Values in Control Group before and after Experiment (***p* < 0.01)

	Before		After		<i>t</i>	<i>p</i>
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		
Keratin	266.81	31.34	267.0	29.55	-0.043	0.966
Wrinkles under the eyes	2.68	1.01	2.36	0.70	1.884	0.088
Melanin	161.73	33.70	169.18	37.96	-0.235	0.249
Appreciable pores	1106.27	67.11	938.10	65.05	1.241	0.059
Wide open pores	20.46	44.58	16	14.98	1.048	0.052
Blackhead pores	434.27	19.31	424.81	17.70	-1.842	0.110
L	57.84	19.02	62.41	4.36	-4.577**	0.001
a	11.91	2.34	11.98	2.29	-0.104	0.920
b	23.29	3.67	21.47	3.61	1.571	0.147

동질성 검정을 살펴본 결과는 Table 1과 같다.

3.3.2. 대조군의 제품 사용 전, 후 피부 측정 비교

대조군의 제품 사용 전, 후 각질수, 눈밑 주름수, 멜라닌지수, 모공수, 피부 색조 비교를 살펴본 결과는 Table 2와 같다. 대조군에서 실험 전과 후의 비교 결과 멜라닌 지수는 실험 전, 후 평균 7.45 상승하였으며 눈 밑 주름수와 모공수는 소량의 감소가 있었다. L 값은 평균 4.57의 상승하였고 a, b 값은 각각 평균 0.07, 1.82의 감소가 있었다.

3.3.3. 실험군의 제품 사용 전, 후 피부 측정 비교

실험군의 제품 사용 전, 후 피부 측정된 결과를 보

면 각질 수는 평균 61.63 줄었고 눈에 띠는 모공수/크게 열린 모공수/블랙헤드 모공수 모두 유의하게 줄었으며 특히 눈에 띠는 모공수와 블랙헤드 모공수가 각각 153.54, 55.91로 크게 줄어들었음을 알 수 있었다. 피부 밝기를 나타내는 L 값은 사용 전 62.34에서 사용 후 64.56로 유의미하게 증가하였다. 특히 눈 밑 주름수는 3.18에서 2.09로 유의하게 줄어들었고, 이는 선행논문의 눈 밑 주름수 1.2에서 0.6의 감소했다는 결과와 일치하였으며, 노니 추출물이 주름 개선 효과가 있다는 것을 확인하였다[12]. 이러한 결과는 노니 추출물이 항노화 화장품의 원료로서 가능성이 있다고 사료된다.

Table 4. Comparison of Skin Keratin, Melannin, Wrinkle under Eyes and Color Values in Experimental Group before and after Experiment (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

	Before		After		<i>t</i>	<i>p</i>
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		
Keratin	266.81	31.34	267.0	29.55	-0.043	0.966
Wrinkles under the eyes	2.68	1.01	2.36	0.70	1.884	0.088
Melanin	161.73	33.70	169.18	37.96	-0.235	0.249
Appreciable pores	1106.27	67.11	938.10	65.05	1.241	0.059
Wide open pores	20.46	44.58	16	14.98	1.048	0.052
Blackhead pores	434.27	19.31	424.81	17.70	-1.842	0.110
L	57.84	19.02	62.41	4.36	-4.577**	0.001
a	11.91	2.34	11.98	2.29	-0.104	0.920
b	23.29	3.67	21.47	3.61	1.571	0.147

Table 5. Comparison of Skin Keratin, Melannin, Wrinkle under Eyes and Color Values between Test Groups after Experiment (** $p < 0.01$)

	Control group (n = 11)		Experimental group (n = 11)		<i>t</i>	<i>p</i>
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		
Keratin	267.0	29.54	201.73	32.40	3.63**	0.004
Wrinkles under the eyes	2.36	0.70	2.09	0.73	0.944	0.361
Melanin	169.18	37.96	159.64	54.97	-0.066	0.948
Appreciable pores	938.10	65.05	915.90	97.72	-0.586	0.570
Wide open pores	16	14.98	20.55	13.91	-0.829	0.426
Blackhead pores	424.81	17.70	415	20.85	-1.278	0.229
L	62.41	4.36	64.56	23.87	-1.398	0.192
a	11.98	2.29	12.52	7.47	-1.398	0.192
b	21.47	3.61	20.26	2.65	1.453	0.176

3.3.4. 실험 후 그룹간 각질수, 눈밑주름, 모공수 및 색조값 비교
대조군과 실험군의 제품사용 후 피부 측정 결과는 각질수는 대조군보다 실험군에서 평균 65.27가 유의하게 줄어들었음을 확인하였다. 눈밑주름도 대조군 2.36, 실험군이 2.09로 더 줄어들었으며 멜라닌 지수는 대조군 169.18, 실험군에서 159.64로 실험군이 더 낮게 나타났다. 눈에 띄는 모공수와 블랙헤드 모공수에서는 대조군보다 실험군에서 모공수가 더 줄어들었음을 알 수 있었다. L 값은 대조군에서 62.41, 실험군이 64.56으로 더 높았지만 유의수준 5%에서 유의미하지 않았다.

4. 결 론

노니 추출물의 항산화 효과와 항노화 효과를 통해 화장품 소재로서 가능성을 확인하였다. 항산화 활성을 측정하기 위하여 폴리페놀 함량, 플라보노이드 함량, DPPH radical 소거능을 측정한 결과 각각 200.4 mg/100 g, 74.5 mg/100 g, 55%로 측정되어 높은 항산화력을 확인하였다. 노니 추출물의 항노화 활성 측정하기 위하여 MMP-1 발현 억제능을 측정한 결과 70% 억제능을 나타내어 노니 추출물은 MMP 발현 억제능이 뛰어난 천연물질로서 주름 개선의 항노화 화장품의 소재로서 응용 가능성이 있음을 확인하였다. 노니를 함유한 화

장품의 임상실험을 통해 노니 추출물을 함유하는 화장품을 제조하여 대조군과 비교한 결과 사용군의 각질수의 감소, 눈밑 주름수 감소, 모공수가 통계적으로 유의미한 변화를 보여 노니 추출물이 주름관련 항노화 개선에 효과가 있는 다기능성 화장품에 적용할 수 있는 천연 소재임을 확인할 수 있었다. 따라서, 노니 추출물은 항산화 및 주름 개선에 영향을 미치는 화장품의 소재로써 충분한 가치가 있는 것으로 사료된다.

Reference

1. H. S. Lee, S. H. Lee, E. J. Kim, and C. H. Jung, Simultaneous analysis of antimicrobial three straight chain 1,2-alkanediols in cosmetics by gas chromatography, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **40**(1), 37 (2014).
2. J. M. McCord, Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation, *Fed. Proc.*, **46**(7), 2402 (1987).
3. H. I. Oh, H. B. Park, M. S. Ju, S. Y. Jung, and M. S. Oh, Comparative study of anti-oxidant and anti-inflammatory activities between *Curcumae longae* Radix and *Curcumae longae* Rhizoma, *Korea J. Herbol.*, **25**(1), 83 (2010).
4. J. S. Yoo, J. T. Hwang, E. S. Yoo, and B. S. Cheun, Study on herbal extract on the Noni (*Morinda citrifolia*), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **19**(2), 110 (2004).
5. H. Y. Choi, Master's Thesis Dissertation, Chung Ang Univ., Seoul, Korea (2004).
6. H. Y. Choi, B. C. Choi, and S. S. Sim, Antioxidant effects of Noni (*Morinda citrifolia*) extracts treated with HCl and trypsin, *Yakhakhoe Chi.*, **49**(5), 411 (2005).
7. M. Wang, H. Kikuzaki, K. Csiszar, C. D. Boyd, A. Maunakea, S. F. Fong, G. Ghai, R. T. Rosen, N. Nakatani, and C. T. Ho, Novel trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni), *J. Agric. Food. Chem.*, **47**(12), 4880 (1999).
8. S. Sang, X. Cheng, N. Zhu, M. Wang, J. W. Jhoo, R. E. Stark, V. Badmaev, G. Ghai, R. T. Rosen, and C. T. Ho, Iridoid glycosides from the leaves of *Morinda citrifolia*, *J. Nat. Prod.*, **64**(6), 799 (2001).
9. H. Mori, T. K. Arai, H. Ishii, N. Endo, and K. Fukuda, Effects of 6-ormylpterin, a xanthine oxidase inhibitor and a superoxide scavenger, on production of nitric oxide RAW264.7 macrophages, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1474**(1), 93 (2000).
10. E. Borenfreund and J. A. Puerner, Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicol. Lett.*, **24**(2), 119 (1985).
11. B. H. So, Device evaluation of skin effect, *The Journal of Skin Barrier Research*, **8**(1), 68 (2006).
12. J. N. Lee, S. W. Kim, Y. K. Yoo, G. T. Lee, and K. K. Lee, Anti-wrinkle effect of *Morinda citrifolia* (Noni) extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **32**(4), 227 (2006).
13. E. J. Lee, Master's Thesis Dissertation, Konkuk Univ., Seoul, Korea (2012).
14. E. J. Kim, Master's Thesis Dissertation, Wonkwang Univ., Iksan, Korea (2009).
15. E. J. Kim, Master's Thesis Dissertation, Konkuk Univ., Seoul, Korea (2013).
16. J. W. Chon, H. Y. Kweon, Y. Y. Jo, M. K. Park, Y. H. Son, and H. S. Lee, A study on the development of functional cosmetics using silk-gland powder of silkworm, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **38**(2), 163 (2012).
17. J. Y. Lee, K. R. Im, T. K. Jung, K. S. Yoon, The inhibitory effects of *Alnus japonica* steud. Extract on melanogenesis, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **39**(2), (2013).
18. E. Y. Jo, Master's Thesis Dissertation, Dong-A Univ., Pusan, Korea (2009).
19. Y. G. Oh, H. Y. Seo, Y. M. Choi, and D. S. Jung, Evaluation of antioxidant activity of the extracts from the aerial parts of *Cnidium officinale* Makino, *Korean J. Med. Crop Sci.*, **18**(6), 373 (2010).
20. C. H. Woo, Y. W. Eom, M. H. Yoo, H. J. You, H. J. Han, W. K. Song, Y. J. Yoo, J. S. Chun, and

- J. H. Kim, Tumor necrosis factor-alpha generates reactive oxygen species via a cytosolic hospholipase, *J. Biol. Chem.*, **275**(41), 32357 (2000).
21. J. Peterson and J. Dwer, Taxonomic classification helps identify flavonoid containing foods on asemi-quantitative food frequency question naire, *J. Am. Diet. Assoc.*, **98**(6), 682 (1998).
22. J. H. Choi, E. Y. Lee, J. S. Kim, G. B. Choi, S. G. Jung, Y. S. Ham, D. C. Seo, and J. S. Heo, Physiological activities according to cultivars and parts of ulsan pear, *J. Korean Soc. Appo. Biol. Chem.*, **49**(1), 43 (2006).
23. M. J. Kim. Master's Thesis Dissertation, Konkuk Univ., Seoul, Korea (2013).
24. M. R. Al-Sereitia, K. M. Abu-Amerb, and P. Sena, Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and its therapeutic potentials, *Indian J. Exp. Biol.*, **37**, 124 (1999).
25. Y. M. Choi, H. Kim, J. J. Shin, J. M. Park, and J. Lee, The antioxidant activities of the some commercial teas, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **32**(5), 723 (2003).
26. J. Kim, C. W. Lee, E. K. Kim, S. J. Lee, N. H. Park, H. S. Kim, H. K. Kim, Y. P. Jang, and J. W. Kim, Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced expression in human dermal fibroblasts, *J. Ethnopharmacol.*, **137**(1), 427 (2011).
27. S. Kang, J. H. Chung, J. H. Lee, G. J. Fisher, Y. S. Wan, E. A. Duell, and J. J. Voorhees, Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **120**(5), 835 (2003).
28. M. K. Gwak, H. S. Choi, and J. H. Hong, Extraction procedures for free radical scavenging activity from Noni fruit (*Morinda citrifolia*), *Korean J. Med. Crop Sci.*, **19**(1), 38 (2011).