

## 국내산 블렌딩 정유의 항산화 및 항염 효과 연구

정숙희<sup>1,†</sup> · 이은경<sup>2</sup>

<sup>1</sup>남부대학교 향장미용학과, 교수

<sup>2</sup>남부대학교 산학협력단 치유향기상용화사업단, 연구원

(2021년 11월 3일 접수: 2021년 12월 10일 수정: 2021년 12월 13일 채택)

### A study on antioxidant and anti-inflammatory effects of domestic blended essential oils

Sook Heui, Jung<sup>1,\*†</sup> · Eun Kyung, Lee

<sup>1</sup>Department of Cosmetology Science, Nambu University, Gwangju, 62271, Republic of Korea

<sup>2</sup>Nambu University Industry-Academic Cooperation Foundation, Healing Aroma Commercialization  
Project Group, Gwangju, Gwangju, 62271, Republic of Korea

(Received November 3, 2021; Revised December 10, 2021; Accepted December 13, 2021)

**요 약** : 국내산 소재를 이용한 단일 추출물의 안전성 실험 및 화장품 소재로서의 선행 연구는 실시되어 왔지만, 개별 추출하여 식물의 특성을 극대화 및 효과 간섭 가능성에 대한 복합 혼합물에 대한 연구가 미비한 상황이다. 이에 본 연구는 배초향, 적송, 강황, 생강, 산미나리씨, 불수감에 대한 정유 추출에 따른 GC-MSD, 블렌딩 오일의 세포독성, 항산화, 항염을 확인하여 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다. GC-MSD 향기성분을 분석한 결과 주요 성분으로는 배초향은 Estragole, 적송은  $\alpha$ -Pinene, 강황과 생강은 Zingiberene, 산미나리씨 Anethole, 불수감 D-Limonene이 동정되었다. 세포독성이 확인되지 않은 100  $\mu$ L/mL의 농도에서 NO 생성 70.62% 억제, DPPH 라디칼 소거능 64.03%, ABTS 라디칼 소거능 89.55%을 보였다. 이를 통하여 블렌딩 정유는 화장품 및 식품, 의약품 산업 분야에서 항산화 및 항염 효능이 있는 원료로서 유용하게 활용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

**주제어** : 블렌딩오일, 향기성분, 항산화, 항염, 의약품산업

**Abstract** : Previous studies have been conducted on domestic materials as a single extract. Research on complex mixtures for maximizing plant characteristics by individual extraction and potential interference with effects is insufficient. Therefore, this study confirmed the GC-MSD according to the extraction of essential oils for *Agastache rugosa* O. Kuntze(AR), *Pinus densiflora* Sieb. et Zuccarini(PD), *Curcuma longa*, *Curcuma domestica*(CC), *Zingiber officinale* Roscoe(ZR), *Foeniculum vulgare* Miller(FV), and *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle(CS). The cytotoxicity, antioxidant, and anti-inflammatory properties of the blending oil were confirmed to confirm its potential as a

<sup>†</sup>Corresponding author

(E-mail: skin1004@nambu.ac.kr)

cosmetic material. As a result of analyzing GC-MSD aroma components, the main components were estragole of AR,  $\alpha$ -Pinene for PD, Zingiberene for CC and ZR, Anethole from FV, and D-Limonene for CS. At a concentration of 100  $\mu$ L/mL with no confirmed cytotoxicity, NO production was inhibited by 70.62%, DPPH radical scavenging activity was 64.03%, and ABTS radical scavenging activity was 89.55%. Through this, blended essential oil suggests the possibility of useful application as a raw material with antioxidant and anti-inflammatory effects in the cosmetic and food industries.

*Keywords* : Blending oil, Aroma ingredient, Antioxidant, Anti-inflammatory, Pharmaceutical industry

## 1. 서론

정유(Essential Oil)는 식물의 2차 대사산물 중 인체에 약리효과를 나타내는 성분으로 이루어진 휘발성 유기화합물로, 주로 식물의 내분비선에서 분비되며 식물체 내에서 생합성되어 생성되고, 수증기 증류법, 용매추출법, 압착법 등에 의해 추출하는데, 수소, 탄소, 산소 등이 화학물질이 기본 구조로 이루어져 있으며, 테르펜류, 에스테르, 알데하이드, 옥사이드, 케톤, 알콜, 등의 다양한 성분과 함량이 존재한다(Rapper *et al.*, 2013).

주요 성분인 알코올, 케톤 및 페놀 등의 화학 성분은 치료학적 특성을 갖는 것으로 피부나 코 점막을 통해 신체에 흡수되어 혈액과 호르몬, 효소와의 반응 등으로 약리학적, 생리학적 및 심리학적 반응 작용을 통해 신체에 진정 또는 자극 등으로 신체 스스로 면역, 치유능력을 향상시켜 신진대사와 관련된 만성적 질병치료에 영향을 준다(Dunn *et al.*, 1995). 이러한 기능성을 가지고 있는 소재 대부분을 해외에서 수입하고 있어 국내에서 수급 가능한 새로운 소재 확보가 필요한 실정이다(Shin *et al.*, 2021).

본 연구에서 사용된 6종의 소재를 살펴보면 배초향(AR, *Agastache rugosa* O. Kuntze)은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본으로 줄기는 네모지며, 잎의 모양은 난상 심장형으로 뒷면에만 약간 털이 있고 자주색의 꽃이 핀다(Hong *et al.*, 2020). 주로 diterpene류, 페닐프로판노이드 화합물, 폴리페놀 화합물(rosmarinic acid) 및 플라보노이드계 화합물(tilianin, acacetin, agastachin)들이 다량 함유되어 있다(Han *et al.*, 1987).

적송은 우리나라 소나무(PD, *Pinus densiflora* Sieb. et Zuccarini)종으로써, 가장 널리 분포되어 있다(Im, 1996). 솔잎은 예로부터 약용식품으로도 널리 이용되어 왔으며 동의보감 등의 전통 의학

서에 따르면 솔잎은 특유의 유난히도 푸른빛을 띠는 것은 송진의 주성분인 정유로 terpene유 물질 때문이며, 솔잎의 주성분인 테르펜탄을 분석한 결과 말초혈관을 확장시켜 혈액 순환을 촉진함으로써 뇌세포의 활력으로 뇌기능이 향상시키는데 도움을 주는 것으로 보고되었다(Jang, 1997).

강황(CC, *Curcuma longa*, *Curcuma domestica*)은 생강과에 속하는 다년초 초본으로 노란색을 내는 향신료로 열대 및 아열대 지방에서 재배되며 남아시아와 동남아시아에서 재배되어 왔으며, 해독작용이 있어 전통적으로 염증 치료용 약용식물로 사용되어 왔는데, 최근 국내 진도군에서 재배가 늘어가고 있는 추세이다(kim, 2006; Kim *et al.*, 2011).

생강은 생강과(ZR, *Zingiber officinale Roscoe*)에 속하는 여러해살이 초본식물로 특유의 매운맛과 방향성 향기를 지니고 있어 전 세계적으로 널리 애용되고 있으며(Sung, 2010), 생강의 주요 성분으로는 hydrocarbon류, ketone류, alcohol류 등의 증류 성분과(Surh, 1999), zingiberene,  $\alpha$ -cadinene 등의 향기 성분 등이 있으며, 항염증(Lee *et al.*, 2006)이 보고되고 있다.

산미나리씨(FV, *Foeniculum vulgare Miller*)는 산형과의 다년생 식물로서 그 특유의 향으로 인해 고대시대로부터 약재 및 향신료로 이용되었으며, 에센셜 오일의 성분은 trans-anethole 72.86%, fenchone 12.93%, limonene 6.37%, estragol 3.41%,  $\alpha$ -pinene 1.22%, camphene 0.19%이다(Josiane *et al.*, 2003).

불수감(CS, *Citrus medica L. var. sarcodactylis Swingle*)은 쌍떡잎식물 쥐손이풀 목 운향과 감귤속에 속하는 과일로, 우리나라에서는 남해안 지역을 중심으로 전남 고흥과 완도에서 주로 생산하고 있다(Park, 14). 과일 표피에 정유량이 많고 그 향기가 매우 좋아 잎, 줄기, 꽃, 열매의 천연

방향성을 활용한 차와 향수, 비누, 화장품, 향신료로 무궁무진한 기능성의 소재이다(Jeong, 2014).

이러한 6종의 소재를 활용한 혼합물의 국내 연구로는 '아토피 피부염의 손상된 피부장벽에 대한 혼합 오일(배초향, 로즈마리, 라벤더)의 회복 효과'(Seo, 2014), '솔잎, 녹차 및 비타민나무 잎 혼합 추출물의 항산화 효과'(Ji *et al.*, 2021), '불수감과 유자 추출물의 항균성과 항산화 활성'(Park *et al.*, 2013), 등 활발하게 이루어지고 있지만, 국내산으로 개별 추출하여 식물의 특성을 극대화 및 효과 간섭 가능성에 대한 복합 혼합물에 대한 연구가 미비한 실정이다.

이에 본 연구에서는 6종의 국내산 소재의 향기 성분분석과 블렌딩 정유의 세포독성, 항산화, 항염 효과를 검증할 기초자료로 제공하고자 한다.

## 2. 실험

### 2.1. 재료

#### 2.1.1. 원물

본 실험에 사용된 원물은 배초향(경북 청송), 적송(경남 의령), 강황(전남 진도), 생강(경상남도 함양), 산미나리씨(경북 영천), 불수감(전남 순천)을 2021년 9월에 구입하여 품질을 자체 검증하였고, 원물은 ultrasonic cleaner를 이용하여 불순물을 제거하고, 수세하여 실험에 사용하였다.

#### 2.1.2. 시약 및 기기

RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(KCLB, Korea)으로부터 분양 받아 사용하였고, Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, USA), Fetal Bovine Serum (Atlas Biologicals, USA), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Calcium or Magnesium (Lonza, Switzerland), lipopolysaccharide (Sigma-Aldrich, USA), DPPH(Sigma-Aldrich, USA), Nitric Oxide Detection Kit (iNtRon Biotechnology, Korea), CellTiter96® Aqueous One Solution Cell Proliferation AssayPromega (Madison, USA)를 구입하여 실험에 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 동시 연속식 수증기 증류 추출(Hanil Lab Tech, Korea), gas chromatography-mass selective detector (Thermo scientific, USA), : ISQ LT single

quadrupole Mass Spectrometer (Thermo scientific, USA), CO<sub>2</sub> incubator (Panasonic, USA), filter paper (Advantec No.2, Japan), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA) 등이다.

### 2.2. 방법

#### 2.2.1. 지용성 향기성분 추출

지용성 성분 즉 정유 추출은 잘게 부순 각 부위별 시료 500 g과 증류수 3 L을 혼합하여 동시 연속식 수증기증류 추출(Simultaneous Distillation Extraction, SDE) 장치에 투입한 후 100°C에서 6 h 실시하였다. 추출 후 무수황산나트륨을 혼합하여 냉장고에서 12 h 탈수시킨 후 사용하였다.

#### 2.2.2. 향기 성분 분석

SDE 장치에서 추출한 시료의 성분 분석을 위한 분석은 DB-5MS column(60m x 0.25mm, 0.25um)이 장착된 Trace 1310을 사용하여 실시하였다. 50°C에서 분당 5°C로 승온하여 300°C에서 15 min 유지하였다. 시료 주입구 온도와 검출기 온도는 각각 200°C로 하였고 carrier 가스는 헬륨을 사용하여 1 mL/min 속도로 흘려보냈다. Electron impact/mass spectrometer(EI/MS)의 조건으로 ionization energy를 70eV, MS source와 MS quad 온도는 각각 230°C와 150°C로 하여 진행하였으며, EM voltage는 200으로 설정하였다. 시료는 splitless mode로 1 μL를 주입하여 분석을 실시하였다. GC-MSD로 각 peak의 total ion chromatography(TIC)를 얻은 후 Wiley/NBS library와 비교하고 문헌상에 보고된 데이터와 비교하여 각각의 성분을 동정하였다.

#### 2.2.3. 혼합 정유(HE)

수증기 증류(steam distillation) 법으로 추출된, 배초향, 적송, 강황, 생강, 산미나리씨, 불수감을 동일 비율로 블렌딩하여 사용하였다.

#### 2.2.4. 세포독성

MitochondrialNADH-dehydrogenase는 MTT, MTS등과 같은 tetrazolium salt를 환원시켜 색상을 갖은 formazan을 형성한다. 따라서 살아있는 세포 즉 dehydrogenase를 발현하고 있는 세포의 수와 formazan의 생성은 비례하여 살아있는 세

포를 정량화 할 수 있다. 독성실험은 MTT를 주로 사용했으나 MTT보다 감도가 좋은 것이 MTS이며 원리는 같다. 시료의 세포에 대한 독성은 Desai 등의 방법(Desai *et al.*, 2008)에 준하여 측정하였다. mitochondrialdehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것으로 96well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well의 RAW264.7 세포를 분주하고 18 h 배양한 후 시료를 농도별로 처리하고 24 h 배양하였다. 20  $\mu$ L의 MTS solution을 첨가한 후 CO<sub>2</sub> 배양기(37°C, 5%)에서 4 h 반응시킨 후 ELISA Reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다(Park *et al.*, 2013).

Cell viability(%)=시료 처리 군의 흡광도/대조군의 흡광도 $\times$ 100

#### 2.2.5. DPPH 라디칼 소거능 측정

항산화 측정은 DPPH radical 소거 활성으로 Blois(Blois, 1958)의 방법을 변형하여 DPPH에 대한 수소 전자 공여 효과로 측정하였다. 96well plate에 0.4 mM DPPH 용액 100  $\mu$ L와 농도별 시료 100  $\mu$ L을 1:1로 혼합하여 실온에서 30 min 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 대조군으로는 대표적 항산화 물질인 ascorbic acid를 이용하여 1000  $\mu$ g/mL 처리하였고 음성대조군으로는 DPPH 용액에 시료를 처리하지 않은 군으로 진행하였다. 3회 반복 실험을 통해 얻은 결과를 전자 공여능(electron donating ability, EDA)백분율로 나타내었다.

EDA(%)=(1-시료 처리 군 흡광도)/시료 무 처리 군 흡광도 $\times$ 100

#### 2.2.6. NO 생성 억제효과

RAW 264.7 세포에서의 항염 효과를 확인하기 위하여, 일산화질소 생산의 지표로서 배양 상층액 내에 안정된 NO 산화물인 이산화질소(nitrogen dioxide, NO<sub>2</sub>)를 Griess reagent system을 이용하여 측정하였다(Murakami *et al.*, 2000). RAW264.7 세포를 10% FBS를 포함한 DMEM에 현탁시킨 후 96well plate에  $1 \times 10^4$  cells/mL의 세포를 120  $\mu$ L씩 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 배양하였다. 그런 다음, 시료를 농도별로 세포배양배지로 희석하여 분주하고,

1 h 후 10  $\mu$ g/mL LPS를 시료 처리군에 첨가하여 18 h 동안 반응을 유도하였다 새로운 96well plate에 배양액을 100  $\mu$ L을 옮겨 담아, Nitric Oxide Detection Kit를 이용하여 Substrate Solution Buffer 1 50  $\mu$ L을 분주하고 10 min, Substrate Solution Buffer 2를 분주하여 20 min 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정한다 다음 LPS만 처리한 대조군과 비교하여 나타내었다.

NO synthesis(%)=시료 처리 군의 흡광도/대조군의 흡광도 $\times$ 100

#### 2.2.7. 통계 처리

본 연구의 실험 결과는 3회 반복하여 얻은 값을 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었고, 통계학적 분석은 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS ver. 24.0; IBM, Korea) 프로그램을 이용하여 대조군에 관한 실험 군의 유의성은 Student's t-test를 이용하여  $p < 0.05$  일 때 유의한 것으로 판단하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 지용성 성분 추출

배초향, 적송, 강황, 생강, 산미나리씨, 불수감의 수증기증류 추출의 정유 수율은 각각 0.12%, 0.1%, 0.2%, 0.075%, 0.17%, 1%를 나타내었다.

#### 3.2. 정유 향기 성분 분석

##### 3.2.1. 배초향 정유 분석

수증기 증류법으로 배초향의 잎과 줄기부분의 정유 향기 성분은 Table 2 와 같다. 주요 검출된 성분으로는 95.88%가 Estragole로 차지하였다.

이는 선행연구와 비슷한 결과를 나타내었는데, 주 화합물인 estragole이 잎에 64.4%가 함유되어 있다고 보고되었고(Lee *et al.*, 1994), estragole의 함량이 46.7 - 94.6%에 달한다고 하였으며(Charles *et al.*, 1991), estragole의 함량이 80%에 달한다고 보고(Shin *et al.*, 1991)하였다. 이외에도 많은 연구자들이 배초향 에센셜 오일의 주성분은 estragole이라 보고하고 있다(J. Baik, 2016).

배초향에서 추출된 estragole 성분은 인지 기능 강화효과를 나타내고(Choi *et al.*, 2016), 항진균 효과가 나타났다(Park *et al.*, 1997).

Table 1. Yields of steam distillation extracts from AR, PD, CC, ZR, FV, CS

Sample	Dry weight of sample(g)	Oils extractable content(g)	Yield (%)
AR	500	0.6	0.12
PD	500	0.5	0.1
CC	500	1	0.2
ZR	500	0.375	0.075
FV	500	0.85	0.17
CS	500	5	1

AR: *Agastache rugosa* O. Kuntze, PD: *Pinus densiflora* Sieb. et Zuccarini, CC: *Curcuma longa*, *Curcuma domestica*, ZR: *Zingiber officinale* Roscoe, FV: *Foeniculum vulgare* Miller, CS: *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle, Yield (%)= Oils extractable content (g)/ Dry weight of sample(g)×100

Table 2. Chemical composition of the volatile oil constituents of AR determined by GC-MSD analysis

No	Time (min)	Content (%)*	Compound name
1	39.14	1.24	D-Limonene
2	50.5	0.17	Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, trans-
3	52.91	91.93	Estragole
4	56.13	0.24	Pulegone
5	67.24	2.14	trans-Caryophyllene
6	69.65	0.2	GERMACRENE-D
7	70.15	0.13	ς-Elemene
8	-	3.95	unknown
	100		

AR: The volatile oil constituents of *Agastache rugosa* O. Kuntze, \* Content (%)=peak area of each compound/peak area of internal standard×100.

### 3.2.2. 적송 정유 분석

수증기 증류법으로 추출한 적송 정유의 향기 성분은 Table 3와 같다. 적송 휘발성 성분으로는 α-Pinene(52.74%), α-Phellandrene(28.31%), Caryophyllene(3.35%), β-Terpeneol(2.79%) 등이 동정되었으며, 가장 많이 함유된 α-Pinene는 편백나무, 구상나무 정유 등에 많이 함유하고 있으며, 항균성, 항진균성 및 진정 효과를 나타낸다고 보고되었다(Choi *et al.*, 2021).

### 3.2.3. 강황 정유 분석

수증기 증류법으로 추출한 강황 정유의 향기 성분은 Table 4와 같다.

Zingiberene(47.94%), α-Sesquiphellandrene(19.32%), α-TUMERONE(10.44%) 등이 동정되었으며, 가장 많이 함유된 Zingiberene, α-TUMERONE은 강황의 대표적인 휘발성 성분으로 보고되었다(Kim, 2018).

Table 3. Chemical composition of the volatile oil constituents of PD determined by GC-MSD analysis

No	Time (min)	Content (%) <sup>*</sup>	Compound name
1	22.7	41.34	α-Pinene
2	24.89	1.46	Camphene
3	39.19	0.92	D-Limonene
4	39.34	28.31	α-Phellandrene
5	45.05	1.94	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-
6	52.68	2.79	α-Terpineol
7	59.87	1.76	EXOBORNYL ACETATE
8	67.28	3.35	Caryophyllene
9	69.68	4.04	α-copaene
10	70.19	1.04	ζ-Elementene
11	70.87	1.65	ε-Cadinene
12	-	11.4	unknown
	100	58.66	

PD: The volatile oil constituents of *Pinus densiflora* Sieb. et Zuccarini, \* Content (%)=peak area of each compound/peak area of internal standard×100.

Table 4. Chemical composition of the volatile oil constituents of CC determined by GC-MSD analysis

No	Time (min)	Content (%) <sup>*</sup>	Compound name
1	39.5	1.17	Eucalyptol
2	67.28	1.11	Caryophyllene
3	70.02	47.94	Zingiberene
4	70.46	3.65	α-Bisabolene
5	71.02	19.32	α-Sesquiphellandrene
6	75.25	10.44	α-TUMERONE
7	-	16.37	unknown
	100	98.83	

CC: The volatile oil constituents of *Curcuma longa*, *Curcuma domestica*, \* Content (%)=peak area of each compound/peak area of internal standard×100.

## 3.2.4. 생강 정유 분석

수증기 증류법으로 추출한 강향 정유의 향기 성분은 Table 5와 같다.

Zingiberene(37.12%),  $\alpha$ -Sesquiphellandrene (16.12%),  $\alpha$ -Bisabolene(9.05%)등이 동정되었으며, 강향과 유사하게 Zingiberene이 가장 많이 함유한 것으로 나타났다. 또한 한국산 생강 essential oil과 비슷한 조성이 확인되었다(Kim *et al.*, 1991).

## 3.2.5. 산미나리씨 정유 분석

수증기 증류법으로 추출한 산미나리씨 정유의 향기 성분은 Table 6와 같다.

Anethole (48.98%), L-Fenchone(29.36%), Estragole(3.5%)등이 동정되었으며, Anethole은 팔각회향, 펜넬의 주요 효능이며(Kang *et al.*, 2006), 향산화제, 항염증 치료제, 항발암성 치료제, 마취제 등으로 사용되는 성분으로 조사되었다(Lee *et al.*, 2013).

Table 5. Chemical composition of the volatile oil constituents of ZR determined by GC-MSD analysis

No	Time (min)	Content (%) <sup>*</sup>	Compound name
1	69.4	0.57	$\zeta$ -Muurolene
2	69.68	0.98	GERMACRENE-D
3	70.01	37.12	Zingiberene
4	70.25	5.37	$\alpha$ -Farnesene
5	70.34	3.53	$\alpha$ -copaene
6	70.46	9.05	$\alpha$ -Bisabolene
7	71.02	16.12	$\alpha$ -Sesquiphellandrene
8	-	27.26	unknown
	100	100	

ZR: The volatile oil constituents of *Zingiber officinale Roscoe*, \*Content (%)=peak area of each compound/peak area of internal standard $\times$ 100.

Table 6. Chemical composition of the volatile oil constituents of FV determined by GC-MSD analysis

No	Time (min)	Content (%) <sup>*</sup>	Compound name
1	22.72	0.34	1R- $\alpha$ -Pinene
2	39.16	9.72	D-Limonene
3	39.5	0.69	Eucalyptol
4	45.28	29.36	L-Fenchone
5	49.29	0.28	Camphor
6	52.91	3.5	Estragole
7	55.46	0.31	Fenchyl acetate
8	60.11	48.98	Anethole
9	-	6.82	unknown
	100		

FV: The volatile oil constituents of *Foeniculum vulgare Miller*, \*Content (%)=peak area of each compound/peak area of internal standard $\times$ 100.

Table 7. Chemical composition of the volatile oil constituents of CS determined by GC-MSD analysis

No	Time (min)	Content (%) <sup>*</sup>	Compound name
1	21.73	0.79	α-Phellandrene
2	22.61	2.53	1R-α-Pinene
3	29.02	1.91	2-α-PINENE
4	39.1	61.58	D-Limonene
5	41.52	0.69	1R-α-Pinene
6	42.61	22.82	γ-Terpinene
7	-	9.68	unknown
	100	100	

CS: The volatile oil constituents of *Citrus medica L. var. sarcodactylis Swingle*, \*Content (%)=peak area of each compound/peak area of internal standard×100.

### 3.2.5. 불수감 정유 분석

수증기 증류법으로 추출한 산미나리씨 정유의 향기 성분은 Table 7과 같다.

D-Limonene (61.58%), γ-Terpinene(22.82%), 1R-α-Pinene(2.53%)등이 동정되었으며, 가장 많이 동정된 D-Limonene은 중추신경의 흥분을 진정 주는 효능이 있는 것으로 알려져 있다(Oh *et al.*, 2009).

### 3.3. 세포독성

MTS assay를 이용하여 세포독성 효과를 평가할 때 염증 모델로 많이 사용하는 RAW 264.7 대식세포(Park, 2011)에 대한 세포 독성을 측정 한 결과는 Fig. 1과 같다.

6종 블렌딩 정유 농도 100 uL/mL에서 84.93%로 세포독성이 확인되지 않았으며, 50 uL/mL 86.38%, 25 uL/mL 105.96%, 12.5 uL/mL 103.86%, 6.25 uL/mL 109.78%로 오히려 저농도가 될수록 세포 생존율이 증가한 것으로 확인되었다. 이결과 6종 블렌딩 정유는 100 uL/mL까지 RAW 264.7세포에서 독성을 보이지 않는 것을 확인 할 수 있었으며, 배초향 추출물의 선행연구(Kim *et al.*, 2015)에서도 생존률이 83%로 독성이 높지 않은 것으로 판단 되었으며 추후 실험에서 100 uL/mL까지 처리하여 염증반응에 대한 영향과 항산화력을 확인하였다.

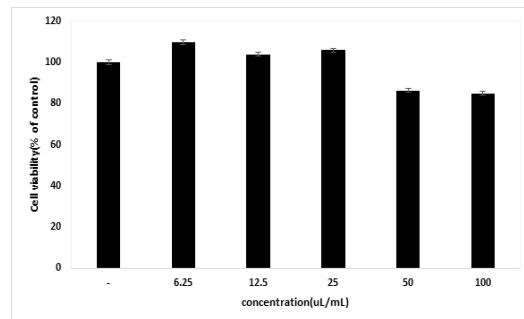


Fig. 1. Effect of viability of cells treated with HE in Raw 264.7 cell. Data are presented as mean±SD.

HE: The volatile oil constituents of Six Natural Herbs Essential oil Mixture. \*p<0.05 compared with the negative control

### 3.4. DPPH 라디칼 소거능

항산화 활성은 항균, 항염증, 피부 미백 등 다양한 활성과 관련성을 가지는 것으로 알려져 있다(Im *et al.*, 2014). 항산화 활성을 측정하는 다양한 방법 중 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능은 ascorbic acid와 같은 대조군을 이용하여 결과의 비교가 용이한 장점을 가지고 있어서 약용이나 기능성 식물 추출물 시료의 항산화 활성 측정에 가장 일반적으로 활용



되고 있다(Cha, 2015). 이를 바탕으로 free radical을 가지고 있는 활성산소의 피부 방지할 가능성의 여부를 판단하여 6종의 블렌딩 정유가 항산화 소재로 이용이 가능한 지를 알아보았다. 실험 결과, 6종 블렌딩 정유는 100 uL/mL (64.03±1.87%), 50 uL/mL(42.94±1.29%), 25 uL/mL(24.62±2.69%), 12.5 uL/mL(16.56±2.38%), 6.25 uL/mL(1.79±1.87%)로 나타났다.

이는 파출리 정유 200 ug/mL 26.7±0.8%, 레몬글라스 정유 200 ug/mL 48.8±2.7%, 미르 정유 200 ug/mL 62.8±1.8%보다 높은 활성도를 나타냈다(Lee *et al.*, 2017).

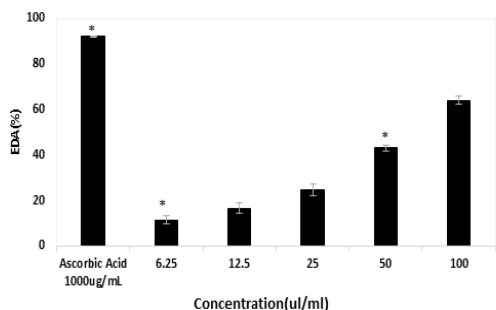


Fig. 2. Effect of anti-oxidant effects of HE by DPPH radical scavenging.

HE: The volatile oil constituents of Six Natural Herbs Essential oil Mixture.

Data are presented as mean±SD.

\*p<0.05 compared with the negative control

### 3.5. ABTS 라디칼 소거능

ABTS radical 소거는 potassium persulfate와의 반응으로 생성되는 양이온 ABTS radical이 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 청록색이 항산화 물질의 radical 저해작용으로 인해 탈색되는 것을 이용한 방법으로 극성, 비극성 시료의 구분 없이 항산화 활성을 측정할 수 있는 유용한 방법이다(Awika *et al.*, 2003).

유기용매에 용해되는 DPPH는 친수성 화합물의 항산화력을 측정함에 어려움이 있으나, 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt(ABTS)는 645, 734, 815 nm의 파장에서 최대의 흡광도를 가지므로 추출물 고유의 색소에 의한 영향이 최소화되어 항산화력을 측정할 수 있다고 보고되었다(kwan *et*

*al.*, 2017). ABTS radical cation 소거 활성은 ABTS와 potassium persulfate와의 반응으로 ABTS radical이 생성되면 특유의 색인 청록색을 띠게 되며 hydrogen donating antioxidant와 chain breaking antioxidant 모두를 측정할 수 있다 (Kim, 2017).

실험 결과, 6종 블렌딩 정유는 100 uL/mL (89.55±2.29%), 50 uL/mL(79.82±1.33%), 25 uL/mL(60.39±2.61%), 12.5 uL/mL(43.22±3.29%), 6.25 uL/mL(32.70±2.88%)로 나타났다. 페퍼민트 정유 200 ug/mL 56.7±1.1%, 버가못 정유 200 ug/mL 45.7±0.1%, 팔마로사 정유 200 ug/mL 58.5±0.9%, 캐모마일 저면 정유 200 ug/mL 65.4±0.1%보다 높은 활성도를 나타냈다(Lee *et al.*, 2017).

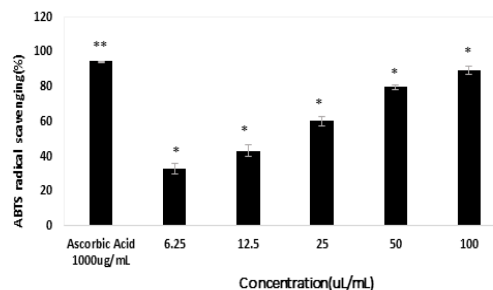


Fig. 3. Effect of anti-oxidant effects of HE by ABTS radical scavenging.

HE: The volatile oil constituents of Six Natural Herbs Essential oil Mixture.

Data are presented as mean±SD.

\*p<0.05 compared with the negative control

### 3.6. NO생성 억제

염증반응은 외부 자극이 염증유발이 가능한 세포에 가해지면서 시작되며 interleukin-1β (IL-1β)과 tumor necrosis factor-α (TNF-α) 등의 전염증성 사이토카인의 발현이 유도되어 호중구가 활성화되고 염증부위로 이동하여 Inducible Nitric Oxide Synthase(iNOS), cyclooxygenase (COX)-2 유전자의 발현을 자극하는 과정을 통해 산화질소(NO, Nitric oxide), Prostaglandin E (PGE)와 같은 물질이 생성되어 염증반응이 일어난다(Park *et al.*, 2005). 특히 iNOS에 의한 NO 형성은 염증반응의 중요한 지표로 사용되며,

Griess reaction을 이용한 발색반응을 통해 NO 생성능을 확인할 수 있다(Katsuyama *et al.*, 1998).

이러한 6종 블렌딩 정유의 항염증 효과를 평가하기 위해 LPS 자극에 의해 활성화된 RAW 264.7세포에서 생성되는 NO 생성 억제 효과를 확인하였다.

LPS로 유도된 NO 생성량을 무처리군과 NO 생성 억제를 확인하였다. 블렌딩 정유는 100 uL/mL(29.37±1.06%), 50 uL/mL(31.63±4.73%), 25 uL/mL(34.65±9.76%), 12.5 uL/mL(60.68±4.99%), 6.25 uL/mL(69.70±2.18%)로 나타났다. 즉, 100 uL/mL에서 70.62% NO 생성 억제가 되었다. 이는 금은화, 연교 포공영 혼합물 400ug/mL NO생성억제 49.75%(Park *et al.*, 2005), 닭발, 오가피 두충 혼합 추출물 2.5 mg/mL NO 생성 억제 61.30%(Baek *et al.*, 2020) 보다 우수한 억제력을 보여주었다.

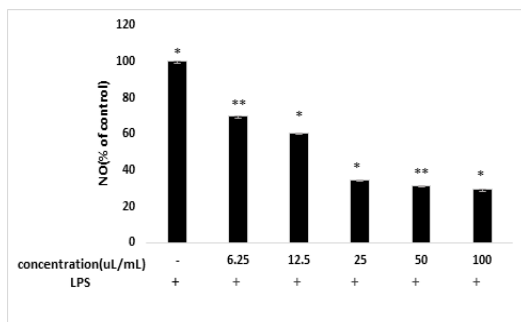


Fig. 4. Effect of inhibition of NO production of HE.

HE: The volatile oil constituents of Six Natural Herbs Essential oil Mixture. Data are presented as mean±SD. \*p<0.05 compared with the negative control

#### 4. 결론

본 연구는 국내산 생약초 6종(배초향, 적송, 강황, 생강, 산미나리씨, 불수감)의 개별 수증기 증류 추출법을 통한 향기 성분 확인과 같은 비율로 블렌딩된 오일의 항산화 및 항염 효능을 확인함으로써, 화장품 및 의약품 소재로서의 활용 가능성을 알아보기 위하여 수행하였다. 수증기증류 추

출법을 통한 추출 수율은 배초향, 적송, 강황, 생강, 산미나리씨, 불수감 각각 0.12%, 0.1%, 0.2%, 0.075%, 0.17%, 1%를 나타내었다.

성분분석 결과 주요 성분으로는 배초향 Estragole 95.88%, 적송  $\alpha$ -Pinene(52.74%), 강황 Zingiberene(47.94%), 생강 Zingiberene(37.12%), 산미나리씨 Anethole (48.98%), 불수감 D-Limonene (61.58%),으로 동정되었다.

블렌딩 정유의 세포독성이 확인되지 않은 6.25, 12.5, 25, 50, 100 uL/mL의 농도로 항염 활성 측정을 위하여 RAW 264.7세포 100 uL/mL에서 70.62%의 억제를 확인하였다. 또한 항산화 활성을 확인한 결과, DPPH 라디칼 소거 활성은 100 uL/mL 농도 일 때 64.03%, ABTS 라디칼 소거능은 89.55% 활성도를 보였다.

이를 통하여 블렌딩 정유는 화장품에서 항산화 및 항염 효능이 있는 원료로서 유용하게 활용 가능할 것으로 사료된다. 또한 블렌딩에 대한 지속적인 연구가 수행된다면 유효성분의 규명과 기전 연구를 통해 식품과 의약품 및 피부 관리 임상분야에 있어서도 염증성 질환의 치료와 예방에 기여하는 효과적인 산업적 소재가 될 것이라 기대된다.

#### 감사의 글

이 학술지는 정부 재원(산림청)으로 한국임업진흥원의 지원을 받아 출판되었음.

#### References

1. Rapper S, Kamatou G, Viljoen A, van Vuuren S. "The in vitro antimicrobial activity of lavandula angustifolia essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils". *Evid Based Complement Alternat Med*. Vol. 2013, pp. 10, (2013).
2. Dunn C, Sleep J, Collett D. "Sensing an improvement: an experimental study to evaluate the use of aromatherapy, massage and periods of rest in an intensive care unit". *Journal of Advanced Nursing*. Vol. 21, No. 1, pp. 34-40, (1995).

3. M. C. Shin, S. H. Jung. "Analysis of Aroma Components by Part of Allium Hookeri and Research on Antioxidant and Anti-inflammatory". *Journal of the Korean Applied Science and Technology*. Vol. 38, No. 1, pp. 263-270, (2021).
4. M. J. Hong, J. H. Kim, H. Y. Kim, M. J. Kim, S. M. Kim. "Chemical composition and biological activity of essential oil of Agastache rugosa (Fisch. & C. A. Mey.) O. Kuntze". *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. Vol. 28, No. 2, pp. 95-110, (2020).
5. D. S. Han, Y. C. Kim, S. E. Kim, H. S. Ju, S. J. Byun. "Studies on the diterpene constituent of the root of Agastache rugosa O. Kuntze". *Korean Journal of Pharmacognosy*. Vol. 18, No. 2, pp. 99-102, (1987).
6. W. K. Im, Natural botany, pp. 59-63, Dosu publishers, (1996).
7. J. K. Jang, Brush leaf medical therapy of miracle, Academi book, (1997).
8. C. R. Kim. "Enhancement of Liver Function by Curcuma Extract on Acute Hepatotoxicity in Rat". *Korean Society for Food Science of Animal Resources*. Vol. 26, No. 3, pp. 386-393, (2006).
9. H. J. Kim, J. W. Lee, Y. D. Kim. "Antimicrobial Activity and Antioxidant Effect of Curcuma longa, Curcuma aromatica and Curcuma zedoaria". *Korean Journal of Food Preservation*. Vol. 18, No. 2, pp. 219-225, (2011).
10. K. C. Sung. "A Study on the Pharmaceutical Characteristics and Analysis of Natural Ginger Extract". *Journal of the Korean Applied Science and Technology*. Vol. 27, No. 3, pp. 266-272, (2010).
11. Y. J. Surh. "Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances". *Mutation Research*. Vol. 428, No. 1-2, pp. 305-327, (1999).
12. B. S. Lee, M. S. Ko, H. J. Kim, I. S. Kwak, D. H. Kim, B. W. Chung. "Separation of 6-Gingerol from Ginger [Zingiber officinale Roscoe] and Antioxidative Activity". *Korean journal of biotechnology and bioengineering*. Vol. 21, No. 6, pp. 484-488, (2006).
13. Josiane Padilha de Paula, Maria Regina Gomes-Carneiro, Francisco J.R Paumgartten. "Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of Ocimum selloi oil". *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 88, No. 2-3, pp. 253-260, (2003).
14. J. C. Park, Tropical Fruits as Medicine, pp. 192-197, Blue Happiness,
15. H. H. Jeong. "A Study on Physicochemical Properties and Biological Activities of Citrus medica leaf Tea Prepared by Different Drying Methods", *doctor's thesis of Sunchon National University*. (2014).
16. Y. M. Seo. "Recovery Effect of Blending Oil on Skin Barrier Damaged by Atopic Dermatitis". *Journal of East-West nursing research*. Vol. 20, No. 1, pp. 57-62, (2014).
17. H. Y. Ji, M. G. Park, S. Y. Joo. "Antioxidant effect of complex extracts from pine needle, green tea, and sea buckthorn leaves". *Korean Journal of Food Science and Technology*. Vol. 53, No. 3, pp. 290-295, (2021).
18. S.G. Park, E. J. Park, S. G. Lee, W. S. Song. "Citrus medica Antibacterial and antioxidant activity of citron extract". *Korean Society of Food and Nutrition Science Conference Presentation*. Vol. 2013, No. 11, pp. 286-286, (2013).
19. Desai, A., Vyas, T. and Amiji, M. "Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J. Pharm. Sci.* 97, 2745 (2008).
20. J. S. Park, S. H. Jung. "Effects of Sandalwood Essential Oil on the iNOS Expression and Proinflammatory Cytokine Production". *Yakhak Hoeji*. Vol. 57, No.

- 1, pp. 70–75, (2013).
21. M. S. Blois. “Antioxidant determination by the use of a stable free radical”. *Nature*. Vol. 181, pp. 1199–1200, 1958.
  22. A. Murakami, M. Nakashima, T. Koshiba, T. Maoka, H. Nishino, M. Yano, T. Sumida, O. K. Kim, K. Koshimizu, H. Ohigashi. “Modifying effects of carotenoids on superoxide and nitric oxide generation from stimulated leukocytes”. *Cancer Letter*. Vol. 149, No. 1–2, pp. 115–123, (2000).
  23. J. C. Lee, Y. H. Choi, Y.H. Kim. “Essential Oils in Aerial Parts of *Agastache rugosa* O. Kuntze”. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. Vol.2 No. 2, pp. 168–173, (1994).
  24. D. J. Charles, J. E. Simon, M. P. Widrechner. “Characterization of the essential oil of *Agastache* species”. *J Agric. Food Chem*. Vol. 39, pp. 1945–1949, (1991).
  25. S. H. Shin, H. K. Kim, H. J. Chi. “Production of Giant Hyssop Oil by Plant Tissue Culture”. *Korean Journal of Pharmacognosy*. Vol. 22, No. 2, pp. 91–94, (1991).
  26. J. Baik. “Analysis, Antibacterial, and Insecticide Effects on Domestic Native Fragrant Plants *Elsholtzia ciliata* and *Agastache rugosa*”. *J. Korean Soc. People Plants Environ*. Vol. 19, No. 2, pp. 79–83, (2016).
  27. J. S. Choi, B. M. Song, H. J. Park, “Gas Chromatographic Analysis and Cholinesterase Activity of the Essential Oil from Korean *Agastache rugosa*”, *Korea Journal of Pharmacognosy*, Vol. 47, No. 2, pp. 192–196, (2016).
  28. J. R. Park, S. H. Park, J. U. Kim, S. W. Kim, S. Y. Lee. “The Effect of Estragole Identified and Extracts from *Agastache rugosa* O. Kuntze on the Fungal Growth and Metabolism”. *Journal of Food Hygiene and Safety*. Vol. 12, No. 1, pp. 63–70, (1997).
  29. J. H. Choi, J. H. Park, Y. J. Cho. “Development of Functional Products Using *Chamaecyparis Obtusa* Heartwood Essential Oil”. *Journal of Convergence for Information Technology*. Vol. 11, No. 2, pp. 211–218, (2021).
  30. K. S. Kim. “Changes in Growth Characteristics and Curcuminoid Contents of Turmeric Cultivated Using Mother and Finger Seed Rhizomes of Different Sizes”. *Korean journal of medicinal crop science*. Vol. 26, No. 5, pp.354–361, (2018).
  31. J. S. Kim, M. S. Koh, Y. H. Kim, M. G. Kim, J. S. Hong. “Volatile Flavor Components of Korean Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)”. *Korean Journal of Food Science and Technology*. Vol. 23, No. 2, pp. 141–149, (1991).
  32. S. H. Kang, M. K. Kim, D. G. Seo, G. H. Kim. “Fumigant Toxicity of Essential Oils against Adults of *Culex pipiens pallens*”. *The Korean Journal of Pesticide Science*. Vol. 10, No. 2, pp. 117–123, (2006).
  33. A. Y. Lee, H. S. Kim, G. Y. Choi, J. M. Chun, B. C. Moon, H. K. Kim. “Comparison of Major Compounds in *Illicium Veri Fructus* by Extraction Solvents”. *The Korea Journal of Herbology*. Vol. 28, No. 6, pp. 47–51, (2013).
  34. E. H. Oh, H. S. Im, C. H. Yoon. “A study on the antibiotic effect using the d-limonene oil extracted to wasted mandarin peels in Cheju”. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*. Vol. 26, No. 3, pp. 350–356, (2009).
  35. J. S. Park. “Cytokine Production Inhibitory Effects of Lavender Essential Oil in RAW 264· 7 Cells”. *Nambu University Papers*. Vol. 11, pp. 55–60, (2011).
  36. N. Y. Kim, D. S. Park, H. Y. Lee. “Effect of Anti-Skin Wrinkle and Antioxidant of *Agastache rugosa* Kentz through Fermentation Process of the lactic acid”, *The Korean Society of Medicinal Crop Science*. Vol. 23, No. 1, pp. 37–42, (2015).

37. D. Y. Im, K. I. Lee. "Antioxidative Activity and Tyrosinase Inhibitory Activity of the Extract and Fractions from *Arctium lappa* Roots and Analysis of Phenolic Compounds". *Korean Journal of Pharmacognosy*. Vol. 45, No. 2, pp. 141-146, (2014).
38. B. C. Cha. "Changes in the Constituents and Antioxidant Activity in Accordance with the Processing Conditions of Citrus unshiu Markovich". *Korean Journal of Pharmacognosy*. Vol. 46, No. 1, pp. 23-30, (2015).
39. M. R. Lee, H. J. Bu. "Antioxidant, Antimicrobial and Melanogenesis Inhibition Effects of 35 species Essential Oil". *Journal of The Korean Society of cosmetology*. Vol. 23, No. 4, pp. 677-687, (2017).
40. Awika, J. M, Rooney. L. W, Wu. X, Prio. R. L, Cisneros-Zevallos. L. "Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum(*Sorghum bicolor*) and sorghum products". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 51, No. 23, pp. 6657-6662, (2003).
41. Y. R. kwan, K. S. Youn. "Antioxidant and physiological activities of *Hijikia fusiforme* by extraction methods". *Korean Journal of Food Preservation*. Vol.24, No.5, pp. 631-637, (2017).
42. S. K. Kim. "Antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Ledum palustre* L.". *Korean Journal of Food Preservation*. Vol. 24, No. 7, pp. 1025-1033, (2017).
43. H. J. Park, J. S. Lee, J. D. Lee, N. J. Kim, J. H. Pyo, J. M. Kang, I. H. Choe, S. Y. Kim, B. S. Shim, J. H. Lee, S. B. N. Lim, "The Anti-inflammatory Effect of *Cinnamomi Ramulus*", *Journal of Korean Oriental Medicine*, Vol. 26, No. 2, pp. 140-151, (2005).
44. Katsuyama. K, M. Shichiri, F. Marumo, Y. Hirata. "NO Inhibits Cytokine-Induced iNOS Expression and NF- $\kappa$ B Activation by Interfering With Phosphorylation and Degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ ". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Vol. 18, No. 11, pp. 1796-1802, (1998).
45. J. Y. Baek, K. S. Kang, A. Y. Lee, H. Y. Kim. "Anti-inflammatory Property of Chicken Feet, *Acanthopanax*, and *Eucommia ulmoides* Oliver Mixture Extract in LPS-stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells". *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*. Vol. 35, No. 4, pp. 330-336, (2020).