



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2021년 2월
석사학위논문

동백 유래 추출물의
구강보건효능 및 생체안전성 분석

조선대학교 대학원

치의생명공학과

황 유 희

동백 유래 추출물의 구강보건효능 및 생체안전성 분석

Analysis of Oral Health Efficacy and Biosafety of Camellia
(*Camellia japonica* L) Extracts

2021년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

황 유 희

동백 유래 추출물의 구강보건효능 및 생체안전성 분석

지도교수 문 성 용

이 논문을 치의생명공학 석사학위신청 논문으로
제출함.

2020년 10월

조선대학교 대학원

치의생명공학

황 유 희

황유희의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이 속 영 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 재 성 (인)

위 원 조선대학교 교수 문 성 용 (인)

2020 년 11월

조선대학교 대학원

목 차

List of tables	ii
List of figures	iii
Abstract	iv
제 1장. 서론	1
제 2장. 실험재료 및 방법	3
1. 연구 재료 및 동백 추출물의 제조	3
2. 동백 추출물의 항산화활성 분석	3
가. ABTS radical 소거활성 분석	3
나. DPPH radical 소거활성 분석	4
다. SOD 유사활성 분석	4
라. 총 폴리페놀 화합물의 함량 분석	4
마. 총 플라보노이드 화합물의 함량 분석	5
3. 동백 추출물의 RAW 264.7 세포에서의 항염증활성 분석	5
가. 세포배양	6
나. 세포생존율 측정	6
다. NO 생성 저해활성 측정	6
4. 동백잎 추출물의 단회 경구투여 독성실험을 통한 생체안전성 분석	7
가. 실험동물 및 사양관리	8
나. 군 분리 및 투여	8
다. 시험방법 및 항목	10
라. 자료의 평가 및 통계학적 검정	10
5. 동백 추출물이 함유된 구강케어 조성물의 최적배합 조건 분석	10
가. 동백 추출물 함유 세치제 및 구강 청결제 제조	11
나. 조성물의 최적배합 확립을 위한 분석	13
6. 통계처리	13

제 3장. 연구결과	14
1. 추출물의 항산화활성	14
가. 추출물의 ABTS radical 소거활성	14
나. DPPH radical 소거활성 분석	16
다. SOD 유사활성 분석	18
라. 동백 추출물 내 항산화 화합물 함량	20
2. 동백 추출물의 RAW 264.7 대식세포에서의 항염증 효과	22
가. 세포생존율	22
나. NO 저해 효과	24
3. 동백 추출물의 생체내에서의 무독성 및 안전성 검증	26
4. 추출물함유 구강케어 조성물의 최적배합 조건 분석	38
제 4장. 결론 및 고찰	40
제 5장. 참고문헌	45
국문초록	51

List of tables

Table 1. Composition of test group	9
Table 2. Composition of toothpaste	12
Table 3. Composition of liquid oral cleaner	12
Table 4. Contents of total phenol and flavonoid in the extracts of camellia leaves and flower	21
Table 5. Mortalities and clinical signs of rats after oral administration of camellia extract	27
Table 6-1. Results of individual test animal for mortalities and clinical signs of male rats	28
Table 6-2. Results of individual test animal for mortalities and clinical signs of female rats	29
Table 7. Body weight changes of rats after oral administration of camellia extract	30
Table 8-1. Results of individual test animal for body weight changes of male rats	33
Table 8-2. Results of individual test animal for body weight changes of female rats	34
Table 9. Gross findings of rats after oral administration of camellia extract	35
Table 10-1. Individual data of gross findings for male rats	36
Table 10-2. Individual data of gross findings for female rats	37
Table 11. Optimal condition of toothpaste composition	39
Table 12. Optimal condition liquid oral cleaner composition	39

List of figures

Figure1. ABTS free radical scavenging activity of 70% ethanol extracts from camellia	15
Figure2. DPPH free radical scavenging activity of 70% ethanol extracts from camellia	17
Figure3. SOD-like activity of 70% ethanol extracts from camellia	19
Figure4. Effects of camellia extracts on cell viability in RAW 264.7 cells	23
Figure5. Inhibitory effects of camellia extracts on NO production in LPS stimulated RAW 264.7 cells	25
Figure6. Change of body weight in rats during 14 days after oral administration of camellia	31
Figure7. Weight gain in rats for 14 days after oral administration of camellia extract	32

Abstract

Analysis of Oral Health Efficacy and Biosafety of Camellia (*Camellia japonica L*) Extracts

Hwang Yu Hee

Advisor: Seong-Yong Moon, Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

This study evaluates the antioxidant and anti-inflammatory effects of camellia leaf and flower extracts. The safety evaluation was conducted through oral administration to rats, and the potentiality of the extracts as oral health products was analyzed.

The antioxidant activity of 70% ethanol extracts of camellia leaves and flowers was analyzed by four methods. As a result of confirming the ABTS radical inhibitory effect of the camellia leaf and flower extracts, the inhibitory effects of $96.66 \pm 0.84\%$ and 97.17% were confirmed in the camellia leaf and flower extracts at a concentration of 1 mg/ml respectively. In addition, as a result of analyzing DPPH radical scavenging activity, it was confirmed that the inhibitory effect was 93.71% in the camellia leaf extract and 63.50% in the camellia flower extract at a concentration of 1 mg/ml. As a result of confirming the SOD-like activity, the activity was 44.27% in the camellia leaf sample at 5 mg/ml concentration and 23.69% in the camellia flower sample at 5 mg/ml concentration. As a result of analyzing the total polyphenol content and the total flavonoid content in order to determine how much of the above antioxidant-related compounds are contained in the camellia extract, the total polyphenol content in the camellia flower sample at a concentration of 1 mg/ml is tannic acid standard. As a result of measuring as a curve, the

flavonoid content of $139.96 \pm 0.75 \mu\text{g}/\text{ml}$ and naringin as a standard curve was measured as $53.70 \pm 2.57 \mu\text{g}/\text{ml}$. In addition, mouse macrophage RAW 264.7 cells were used to determine the anti-inflammatory activity of camellia extract. As a result of treatment with 1, 5, 10, 20, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of camellia leaf extract on cells induced by LPS, NO production up to 3.37, 2.71, 2.66, 2.54, 2.10 and 1.41 μM , respectively, by concentration In the camellia flower extract, it was confirmed that NO generation was suppressed to 4.63, 4.25, 3.77, 3.49, 2.03, and 1.51 μM , respectively,

In addition, in this experiment, in order to verify the biosafety of the camellia extract, rats were used as experimental animals, and the non-toxicity of the extract was confirmed by oral administration. No dead animals were observed in all test groups during the experiment. Also, no specific general symptoms were observed in all test animals during the experiment. As a result of body weight measurement, in one case of the female 1,000 mg/kg administration group (G3-31), the body weight on the 14th day after administration of the test substance decreased slightly compared to the 7th day after administration. In other test animals, normal weight gain was observed. As a result of statistical analysis, no significant difference in weight was observed between the groups in both male and female test groups. As a result of autopsy at the end of the experiment, no peculiar macroscopic findings were observed.

The experimental results, verified that natural products derived from camellia leaves and flowers are valuable as natural oral care materials and can be safely administered in vivo. Camellia extract is expected to be available as a plant-derived natural material for various oral health products, which will be increasingly used in future. Therefore, camellia, which is a special plant in the Honam Korea region, will provide added value to the natural products industry.

제 1장. 서론

최근 생명공학기술의 급속한 발전에 따라 식물 유전자원에 대한 관심이 높아지면서 자생식물을 활용한 고부가가치의 천연물의약품, 기능성 식품 및 원예작물 개발에 대한 연구가 활발하다. 구강용품 분야에서도 천연물에 대한 관심이 점차 높아지고 있으며 시장이 활성화되면서 천연물로부터 구강건강에 미치는 새로운 기능성 물질을 찾으려는 연구와 노력이 활발하게 진행되고 있다. 구강질환 및 치과관련 질환치료에 이용되고 있는 의약품의 대부분은 합성약제로 부작용이 증가하는 추세이며 타 인체질환 치료제의 경우 천연물의 소재로 한 신약 및 의약품이 출시되어 임상치료에 적용되고 있는 반면 치의학 분야에서는 이에 대한 연구가 미미한 실정이다¹⁾.

구강건강은 전신 건강의 일부로서 치아우식증과 치주병 및 구강암 등 구강 질병들에 의하여 손상을 받는다. 치주질환은 성인병의 하나로서 연령이 증가함에 따라 중요한 사회문제로 인식되고 있으며 인류의 가장 보편적인 질환으로 어린이에서 성인에 이르기까지 광범위하게 발생한다. 치아우식증과 치주질환은 우리나라 사람들에게 빈번하게 발생하는 구강질환임에도 불구하고 관련된 요인들을 구명해내려는 보건학적 연구는 상대적으로 부족하다²⁾. 구강질환은 우리나라 성인의 80%가 앓고 있으며, 60대 이상 노령 인구의 약 90%가 앓고 있는 만성질환이다. 잇몸질환의 경우 외래 다빈도 질환 중에서 3위를 차지하고 있을 만큼 발병률이 높고 매년 증가추세로 보고되고 있다. 치의학 분야 관련 건강보조식품과 위생용품 개발에 있어 친환경 및 인체 친화적 천연소재의 중요성은 날로 증대되고 있으며, 특히 전신만성질환 발생과 밀접한 관련이 있는 치주질환 예방과 개선을 위한 구강보건용품 소재에서 phyto-material 연구의 필요성이 대두되고 있는 추세이다. 또한 현재 판매중인 기능성 세치제의 경우 프라그 저해, 구강내 유해균 억제, 구취개선, 미백효과 등의 기능성은 부가되어 있으나 연령별, 개인의 구강 체질별 특성을 감안하지 않은 제품들이 대부분으로 사용함에 있어 잇몸질환과 구내염 증을 오히려 악화시키는 경우가 빈번하게 발생하고 있어 이를 대체할 제품개발 기술이 절실히 요구되고 있다.

본 연구에서 사용된 동백나무(*Camellia japonica*)는 동백나무과(Theaceae), 동백속(Camelliae)에 속하는 상록교목으로 주로 남해안과 도서지역 등 일정한 지역에 군락을 이루고 있으며, 특히 국내 동백의 분포는 온대 남부 해안 도서지방인 전남지역이 전국

식재 면적의 67%를 차지하고 있다³⁾. 동백나무의 원예 품종은 대략 600여 가지에 달하며, 겹꽃, 홑꽃 등 꽃의 모양과 색깔이 다양하다. 우리나라 자생 동백나무의 외형적 특성은 상록수이며 넓고 보통 5 - 7 미터까지 자라는데 최고 18 미터까지 자란 나무도 있다. 질푸르고 두터운 잎새는 작은 가지에 어긋나게 붙으며, 꽃의 개화 시기는 자라는 곳에 따라 조금씩 다르나 주로 11월에 꽃망울을 맺기 시작하여 다음해 4월까지 핀다. 꽃은 가지 끝 또는 잎겨드랑이에 1개씩 달리는데 꽃대가 없으며 붉은색으로 반개하여 옆으로 향한다. 꽃잎은 주로 다섯 장이나 간혹 일곱 장까지 나기도 하며 서로 조금씩 포개져 아랫부분이 붙어있다⁴⁾. 성분연구는 주로 일본에서 이루어지고 있는데 동백나무의 약효 성분들은 잎, 종자 및 꽃으로부터 camellin, pipercolic acid, eugenol, camelliagenin A, B, tubakisaponin, triterpene, tannin, benzenoid, steroid, flavonoid, phenyl propanoid 등의 많은 화합물이 존재함이 보고되었다. 일본에서는 건조시킨 동백 꽃봉오리(山茶花: 본초명)를 민간에서 토혈증(吐血症), 장풍하혈(腸風下血)의 지혈제로서 붉은 꽃을 분말로 해서 동뇨(童尿), 생강의 즙 및 술과 함께 복용하였으며, 항원충작용 및 진경작용, 치석형성 억제효과, 알코올 흡수억제, 피부 미백 작용 등의 생리활성이 보고되고 있다³⁾. 동백나무 잎의 약리학적 효과는 건선, 인후 통증, 화상, 항균, 진경 및 알코올 흡수 억제 등이 알려져 있으며 다양한 생리활성 성분을 함유하고 있어 천연 기능성 식의약품 소재로서 이용가치가 높은 식물로 보고되고 있다⁵⁾. 동백나무와 동일속인 녹차는 수많은 연구개발의 결과로 국내외적으로 산업화가 대중화되었으나 동백나무는 주로 관상용 원예자원으로 이용되어 왔고 부위별로는 고품질 지방이 함유되어 있는 종실이 전통적으로 식용유와 화장유 자원으로 이용되어 왔으며 줄기는 고급 숯의 원료로 활용되어 왔다. 본초명이 산다화인 동백꽃은 토혈, 비출혈, 혈붕, 화상 등을 치료하는데 사용되었으며, 동백엽과 과피 등도 항원충작용 및 진경작용, 치석형성 억제효과, 알코올 흡수 억제, 미백작용, 소염작용등과 같은 약리활성이 있다고 보고되어 있으나 이와 같은 효능을 이용한 치의학분야의 연구는 매우 미미한 실정이다.

본 연구에서는 동백나무 잎과 꽃의 에탄올 추출물을 제조한 후 잇몸의 조기노화 억제와 관련 있는 항산화활성을 분석, 구강 내에 상재하는 대표적인 구강유해균에 대한 항미생물 활성과 항염증활성을 분석, 생체 내에서의 추출물 안전성을 동물실험을 통하여 검증하고자 하며 구강보건용품의 천연소재로서 동백나무 유래 추출물의 실험적 유효성을 검증하는 것을 목적으로 한다.

제 2장. 실험재료 및 방법

1. 연구 재료 및 동백 추출물의 제조

본 연구에 사용된 시료인 동백나무 잎과 꽃은 우리나라 완도군 군외면 삼두리의 동백나무 군락지에서 전량 채취하였다. 채취한 동백나무 잎을 증류수로 세척하여 10일간 그늘에서 건조하여 분쇄한 후 실험에 사용하였다. 동백나무 잎과 꽃의 추출물은 분말 시료 200 g에 70% 에탄올 2ℓ를 가하여 상온에서 72시간 동안 진탕 추출하였다. 추출물을 filter paper (Whatman No. 2, Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과하여 40°C에서 감압농축(Rotary evaporator R-24, Büchi, Flawil, Switzerland)하여 동결건조(PVTFD 100R, Ilsin Biobase Co., Kora)하여 사용 전까지 냉장 보관하였다.

2. 동백 추출물의 항산화활성 분석

가. ABTS radical 소거활성 분석

에탄올(70%)을 용매로 추출한 동백잎 및 꽃 추출물의 ABTS radical을 이용한 항산화력 측정에는 Re 등의 방법인 ABTS⁺ cation decolorization assay법을 약간 변형하여 다음과 같이 측정하였다⁶⁾. 7.0 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate 용액을 1 : 1 비율로 혼합하여 상온의 암실 상태에서 12시간 이상 반응하여 ABTS 양이온을 생성시켜 안정화한 후 반응된 용액이 730 nm에서 흡광도 0.7 ± 0.02 가 되도록 PBS (potassium phosphate buffered saline, pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 ABTS 라디칼 용액 180 μ l에 농도별 시료 20 μ l를 첨가하여 상온의 암실 상태에서 15분간 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거 활성 비율(ABTS radical scavenging activity)은 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 비로 다음 식을 이용하여 계산하였다.

ABTS radical scavenging activity (%)

$$= [1 - (\text{value of absorbance sample} / \text{value of absorbance control})] \times 100$$

나. DPPH radical 소거활성 분석

동백잎 및 꽃 추출물의 DPPH radical 소거능에 의한 항산화력을 확인하기 위하여 Blois의 방법을 약간 변형하여 측정하였다⁷⁾. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 absolute ethanol (99.9%)에 1 mM의 농도로 용해한 다음 DPPH와 동백 추출물 시료를 1 : 1의 비율로 각각 100 μ l씩 첨가하여 실온에서 15분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도 비로 DPPH radical 소거 활성(DPPH radical scavenging activity)은 다음과 같은 식에 의하여 계산하였다.

DPPH radical scavenging activity (%)

$$= [1 - (\text{value of absorbance sample} / \text{value of absorbance control})] \times 100$$

다. SOD 유사활성 분석

동백잎 및 꽃 추출물의 SOD(superoxide dismutase) 유사활성은 Marklund 등의 방법에 따라 과산화수로 전환 시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다⁸⁾. 동백잎 및 꽃 추출시료 2 ml에 Tris-HCl의 완충용액 (50 mM Tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 3 ml과 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 1N HCl 0.1 ml를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 백분율(%)로 하여 다음식에 의하여 SOD 유사활성을 나타내었다.

SOD-like activity (%)

$$= [1 - (\text{value of absorbance sample} / \text{value of absorbance control})] \times 100$$

라. 총 폴리페놀 화합물의 함량 분석

동백잎 및 꽃 추출물에 함유되어 있는 항산화 화합물인 폴리페놀(polyphenol) 함량은 Folin-Ciocalteu's 시약이 페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴의 청색으로 발

현되는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법을 응용하여 측정하였다⁹⁾. 1 mg/ml의 동백잎 및 꽃의 70% 에탄올 추출물 시료 50 μl 에 정제수 650 μl , Folin-denis reagent 100 μl 을 첨가하여 잘 혼합한 후 실온에서 3분간 반응시켰다. 이후 무수 10% sodium carbonate (Na_2CO_3) 포화용액 100 μl , 정제수 150 μl 을 첨가하여 혼합한 다음 37°C의 항온수조에서 1시간 반응시킨 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 바탕시료(blank)는 초순수를 사용하고, 표준물질로 사용한 tannic acid를 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 제조한 다음 연속적으로 2배씩 단계 희석하여 얻어진 0, 12.5, 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 tannic acid 용액을 위와 동일한 방법으로 분석하여 얻어진 표준곡선을 이용하여 동백잎 및 꽃 추출물에 함유되어 있는 총 페놀 화합물의 함량을 산출하였다. 측정단위는 mg tannic acid equivalents (TAE)/g을 사용하였다.

마. 총 플라보노이드 화합물의 함량 분석

동백잎 및 꽃 추출물에 함유되어 있는 항산화 화합물의 일종인 플라보노이드(flavonoid) 함량은 Davies의 방법을 약간 변형하여 측정하였다¹⁰⁾. 1 mg/ml의 동백잎 및 꽃의 70% 에탄올 추출물 시료 10 μl 에 1 ml의 diethylene glycol, 1N sodium hydroxide (NaOH) 100 μl 를 첨가하여 잘 혼합한 후 37°C의 항온수조에서 1시간 반응시킨 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 바탕시료(blank)는 초순수를 사용하고, 표준물질로 사용한 naringin을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 제조한 다음 연속적으로 2배씩 단계 희석하여 얻어진 0, 12.5, 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 용액을 위와 동일한 방법으로 분석하여 얻어진 naringin 표준곡선을 작성하여 동백잎 및 꽃 추출물에 함유되어 있는 총 플라보노이드 화합물의 함량을 산출하였다. 측정단위는 mg naringin equivalents (NE)/g을 사용하였다.

3. 동백 추출물의 RAW 264.7 세포에서의 항염증활성 분석

활성산소가 체내에서 과도하게 발생하면 염증, 암, 노화 등을 유발하게 된다. 최근 경향은 우수한 항염증의 효능을 보유하면서 부작용이 없는 추출물의 필요성이 대두되고 있다¹¹⁾. 이에 따라 본 연구에서는 동백추출물의 항염증 효과를 확인하기 위하여 RAW 264.7 대식세포를 이용하였다.

가. 세포배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB: Korean Cell Line Bank)에서 분양 받아 사용하였으며 RAW 264.7 대식세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% antibiotic-antimycotic (10 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml)을 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)에 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다. 배양배지는 세포가 80% 이상 자란 시점에서 2-3일마다 교체하였다.

나. 세포생존율 측정

RAW 264.7 마우스 대식세포의 생존율 측정은 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 이용하여 측정하였다¹²⁾. 96 well plate의 각 well에 1×10⁵ cells/well의 농도가 되도록 조절하여 200 µl씩 분주하고 24시간 동안 배양하여 부착화 및 안정화를 시행하였다. 배양이 끝난 후 시료의 최종 농도가 1 - 500 µg/ml이 되도록 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포에 공급하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 각각의 well에 MTT 용액 (1 mg/ml in PBS)을 10 µl씩 첨가하고, 다시 37°C, 5% CO₂의 습윤 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후 배양액을 제거하였다. 배양액이 제거된 각각의 well에 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 150 µl 첨가하여 생존 세포의 MTT가 환원되어 생성된 보라색 formazan 결정을 완전히 용해시킨 다음 발색 정도를 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 다음 식과 같이 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율(%)로 나타내었다.

Cell viability (%)

$$= (\text{value of absorbance sample} / \text{value of absorbance control}) \times 100$$

다. NO 생성 저해활성 측정

LPS(Lipopolysaccharide)로 염증이 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 NO(nitric

oxide) 생성에 대한 동백잎 및 꽃 추출물의 저해활성은 다음과 같이 측정하였다¹³⁾. 96 well plate의 각 well에 1×10^5 cells/well의 농도가 되도록 조절하여 200 μ l씩 분주하고 24시간 동안 배양하여 부착 및 안정화시킨 다음 NO 생성을 유도하기 위해 LPS 200 ng/ml을 단독 혹은 다양한 농도(1, 5, 10, 20, 50 및 100 μ g/ml)의 시료와 함께 RAW 264.7 대식세포가 배양되고 있는 각 well에 처리하고 37°C, 5% CO₂ incubator(Forma series II, Water Jacketed M311, Thermo Electron Co., USA)에서 24시간 동안 배양하여 염증을 유발시켰다. 그 후 세포배양액에 존재하는 NO₂⁻의 양을 측정하기 위하여 세포배양 상등액 100 μ l를 채취하고 여기에 동량의 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid, 1 : 1)을 혼합하여 15분 동안 반응시킨 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성을 비교하였다. 대조구는 Griess 시약 대신 증류수 100 μ l를 첨가하여 위와 동일한 방법으로 측정하고 NO 생성 저해활성은 다음과 같은 식에 의하여 시료첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

Nitric oxide scavenging activity (%)

$$= [1 - (\text{value of absorbance sample} / \text{value of absorbance control})] \times 100$$

4. 동백잎 추출물의 단회 경구투여 독성실험을 통한 생체안전성 분석

시험물질 동백 잎 추출물의 Sprague-Dawley(SD) 랫드(rat)에 단회 경구투여하였을 때 독성증상과 개략의 치사량 (approximate lethal dose(LD))을 조사하기 위하여 시험기관(한국건설생활환경시험연구원바이오융합연구소)에 의뢰하여 실시하였다. SD 계통 암·수 랫드를 이용하여 500 (저용량군, n = 10), 1,000 (중용량군, n = 10) 및 2,000 (고용량군, n = 10) mg/kg의 용량으로 시험군을 설정하고 부형제 대조군과 비교하였으며, 실험기간 동안 사망동물의 발생유무, 일반증상, 체중변화 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다¹²⁻¹³⁾.

가. 실험동물 및 사양관리

랫트는 독성시험에 널리 사용되고 있으며 풍부한 시험 기초자료가 축적되어 있어 이를 실험결과의 해석 및 평가에 용이하게 활용할 수 있기에 시험에 사용하였다. 암컷은 과거에 새끼를 낳은 적이 없고 현재 임신 중이지 않은 것을 사용하였고 입수동물의 성별은 암·수 각 2 마리, 총 4 마리며 7주령으로 수컷체중은 190.5 - 207.49 g 암컷체중은 169.84 - 194.5 g을 사용하였다. 시험은 입수 후 6 일간 순화기간을 두었으며, 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 사료 (Teklad Certified Irradiated Global 18 % Protein Rodent Diet, Harlan Co.Ltd., USA)는 급이기에 넣고 자유섭취 시켰다. 물은 음용 상수도수를 정수시킨 후 폴리카보네이트제 물병에 넣고 자유섭취 시켰다. 오염물질의 검사는 사료 생산자로부터 공급된 자료 및 국가공인 검사기관에서 검사한 자료를 참고하였다. 해당 시험은 시험기관 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호 : IA16-0094)을 거쳐 수행되었다.

나. 군 분리 및 투여

투여 전일에 체중을 측정하고 엑셀 프로그램을 이용하여 순위화한 체중으로 군 분리를 실시하였다. 평균체중의 $\pm 20\%$ 범위 내에 속하는 동물만을 시험에 사용하였다. 개체식별은 미부 표시법 및 사육 상자별 개체식별카드 표시법을 이용하였다. 동물실의 입구에는 시험번호, 시험제목, 동물실 사용기간, 시험책임자명, 시험자명을 기재한 동물실 사용기록지를 부착하였다. 투여 전 하루 밤 동안 절식시켜 위 내용물을 비운 후 경구투여용 존데를 이용하여 강제 경구투여 하였고, 약 3-4시간 후 사료를 재공급하였으며 절식중이라도 음수는 공급하였다. 투여당일 14 시 이전에 단회 투여하였으며 투여당일 측정된 체중을 기준으로 10 ml/kg의 투여액량을 계산하였다. 투여용량은 식품의약품안전처 고시 제 2015-82호 (2015년 1월 1일) '의약품등의 독성시험기준'에 의거하였다. 단회투여 독성시험에서 일반적으로 사용되는 한계용량인 2,000 mg/kg을 고용량군으로 설정하고 공비를 2로 두어 중용량군 및 저용량군을 설정하였다. 또한 부형제만을 투여하는 부형제 대조군을 두었으며 시험군의 구성은 표 1에 나타내었다.

Table 1. Composition of test group.

Group	Sex	No. of animals	Animal ID.	Dosage	
				Volume (ml/kg)	Capacity (mg/kg)
G1	M	5	G1-1 ~ G1-5	10	0
	F	5	G1-21 ~ G1-25		
G2	M	5	G2-6 ~ G2-10	10	500
	F	5	G2-26 ~ G2-30		
G3	M	5	G3-11 ~ G3-15	10	1,000
	F	5	G3-31 ~ G3-35		
G4	M	5	G4-16 ~ G4-20	10	2,000
	F	5	G4-36 ~ G4-40		

G1: Excipient control group, G2 ~ G4: Test substance administration group. Abbreviations as follows: M; Male, F; Female, No; Number, ID; identification.

다. 시험방법 및 항목

(1) 일반증상관찰

모든 동물에 대하여 매일 1회 일반증상관찰을 실시하였으며, 투여 당일에는 투여 30분 후 및 이후 4시간까지 매 시간 마다 관찰하였다. 일반증상관찰은 투여 후 14일까지 실시하였다.

(2) 체중측정

모든 시험동물에 대하여 입수 시, 군 분리 시, 투여일(투여 전), 투여 후 1, 7 및 14일째(부검 전)에 측정하였다.

(3) 부검

투여 후 14일째에 모든 생존동물을 CO₂ 가스를 이용하여 마취시킨 후 개복하여 복대동맥과 후대정맥을 절단하는 방법으로 방혈 치사시켜 육안 적으로 모든 장기를 검사하였다.

라. 자료의 평가 및 통계학적 검정

각 시험단계별 시험동물의 체중을 평균 및 표준편차로 정리하고 표와 그림을 이용하여 경향을 분석하였다. 부형제 대조군과 시험물질 투여군 간의 체중변화는 일원배치 분산분석 (One-way ANOVA test)을 통하여 유의성을 확인하고 등분산을 검정하였다. $p < 0.05$ 인 경우에 통계학적으로 유의하다고 판정하였다. 통계학적인 분석은 본 시험기관의 통계처리에 관한 표준작업지침서에 따랐으며 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 12.0 K 프로그램 (SPSS, Chicago, IL, USA)을 이용하였다.

5. 동백 추출물이 함유된 구강케어 조성물의 최적배합 조건 분석

구강케어 제품으로 추출물이 함유된 세치제와 구강청결제를 제조하였다. 0.05% (w/w), 0.1% (w/w)의 동백 추출물을 함유하는 제형을 개발하고 평가하였다.

가. 동백 추출물 함유 세치제 및 구강 청결제 제조

세치제의 조성비를 확립하기 위하여 이산화규소, 글리세린, 자일리톨, 솔비톨, 기포제, 카르복시메틸셀룰로오스, 동백 추출물을 조성물로 하는 세치제를 표 2와 같은 조성으로 제조하여 물성을 비교하고 최적조성비 확립하였다. 또한, 천연 위주의 구강청결제의 조성비를 확립하기 위하여 천연색소 (카카오), 감미제 (글리세린), pH 조절제 (시트르산), 동백 추출물, 정제수의 조성물로 하는 구강청결제를 표 3과 같은 조성으로 제조하여 물성을 비교하고 최적조성비 확립하였으며 최적의 조성비로 동백 추출물을 함유한 구강케어용 시제품을 제작하여 제형의 물성을 평가하였다.

Table 2. Composition of toothpaste.

Component	Control	Sample 1	Sample 2
Silicon dioxide	17	17	17
Glycerin	8	8	8
Xylitol	1	1	1
Sorbitol	69	68.95	68.90
Foaming agent	3	3	3
Carboxymethyl cellulose	2	2	2
Camellia extract (Leaf)	-	0.05	0.1
Total volume	100	100	100

Table 3. Composition of liquid oral cleaner.

Component	Control	Sample 1	Sample 2
Natural pigment (Cacao)	0.1	0.1	0.1
Sweetner (Glycerin)	5	5	5
pH adjuster (Citric acid)	0.3	0.35	0.4
Camellia extract (Leaf)	-	0.05	0.1
Purified water	TO 100	TO 100	TO 100
Total volume	100	100	100

나. 조성물의 최적배합 확립을 위한 분석

각 제조된 조성물을 제조 후 상온에서 7일간 숙성 한 다음 pH 미터(Mettler Toledo, USA)를 이용하여 pH를 측정하였다. 조성물의 제형 안정성을 위하여 원심분리기 (MF 300, Hanil Scientific Inc. Korea)를 이용하여 제형의 상 분리를 측정하였으며 점도계 (DV2T, Brookfield, USA)를 이용하여 점도 측정하였다.

6. 통계처리

본 연구의 모든 실험은 3회 반복 측정 후 얻어진 실험결과를 평균(mean) \pm 표준편차(standard deviation, SD)로 표기하였으며, 대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 사후검정으로 Duncan's multiple range test에 의하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

제 3장. 연구결과

1. 추출물의 항산화활성

가. 추출물의 ABTS radical 소거활성

임의로 ABTS 라디칼을 형성시킨 다음 동백잎과 동백꽃 추출물의 ABTS 라디칼 소거 효과를 확인한 결과 그림 1에서 보는 바와 같이 동백꽃 추출물에서는 0.977, 1.953, 3.906, 7.813, 15.625, 31.25 및 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 $12.3 \pm 2.48\%$, $26.51 \pm 1.50\%$, $44.2 \pm 0.58\%$, $79.54 \pm 0.95\%$, $92.38 \pm 0.53\%$, $96.64 \pm 0.67\%$ 및 $97.17 \pm 0.90\%$ 로 농도 의존적인 소거활성의 증가를 보였으나 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 각각 $96.07 \pm 0.79\%$, $94.11 \pm 0.77\%$ 및 $90.20 \pm 1.06\%$ 로 ABT 라디칼 소거활성이 농도 의존적으로 약간씩 감소하는 경향을 나타냈다. 결과적으로 동백꽃의 70% 에탄올 추출물은 15.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 90% 이상의 높은 소거활성을 나타내었으며 1 mg/ml 농도에서도 $96.66 \pm 0.84\%$ 로 우수한 억제활성을 나타내었다. 동백잎 추출물의 경우에서도 0.977, 1.953, 3.906, 7.813, 15.625 및 31.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 $16.84 \pm 2.43\%$, $37.55 \pm 0.20\%$, $61.22 \pm 0.43\%$, $94.59 \pm 0.31\%$, $97.47 \pm 0.49\%$ 및 $97.67 \pm 0.52\%$ 로 농도 의존적인 ABTS 라디칼 소거활성이 증가하였으나 62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 각각 $97.57 \pm 0.56\%$, $97.45 \pm 0.43\%$, $97.10 \pm 0.37\%$ 및 $96.59 \pm 0.15\%$ 동백꽃 추출물과 동일하게 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 결과적으로 동백잎의 70% 에탄올 추출물은 7.813 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 이상의 농도에서 90% 이상의 높은 소거활성을 나타내었으며 1 mg/ml 농도에서도 $96.43 \pm 0.04\%$ 의 강력한 억제 효과를 확인하였다. 이상의 결과로 볼 때 ABTS 라디칼 소거능에 의한 항산화활성은 동백잎 추출물이 동백꽃 추출물보다 약간 높게 나타났으며 동백꽃과 잎 추출물의 경우 각각 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 $97.17 \pm 0.90\%$, 31.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 $97.67 \pm 0.52\%$ 로 가장 높은 ABTS 라디칼 소거활성을 보여 동백 추출물의 항산화력이 매우 우수함을 확인할 수 있었다.

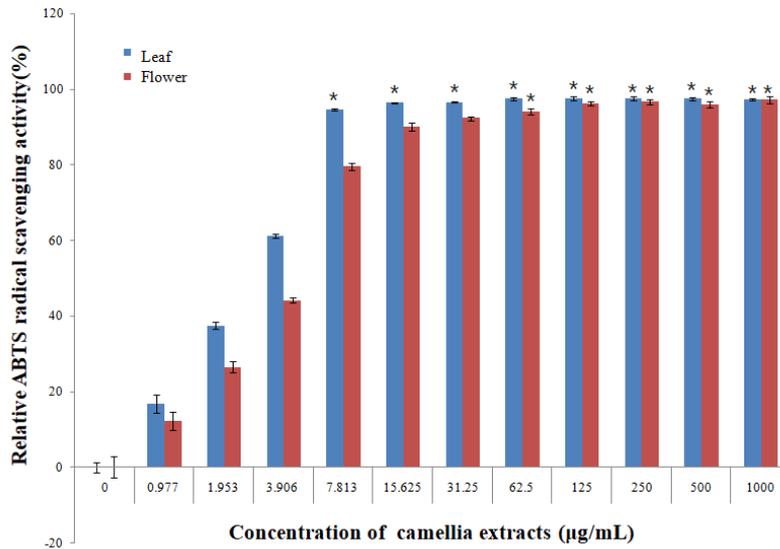


Figure 1. ABTS free radical scavenging activity of 70% ethanolic extracts from *Camellia japonica* L. 20 μl of samples for each concentration were added to 180 μl of the diluted ABTS radical solution and reacted for 15 minutes in a dark at room temperature. Values are mean \pm SD of triplicate determinations. Means in the same column are significantly different each other as determined by ANOVA and Turkey's multiple range test ($*p < 0.05$).

나. DPPH radical 소거활성 분석

동백 추출물의 항산화 활성을 분석하기 위해 DPPH 라디칼 소거능을 알아 본 결과 그림 2에서와 같이 동백잎과 동백꽃의 70% 에탄올 추출물에서 동일하게 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거활성이 증가하는 경향을 나타냈으며 이러한 결과는 ABTS 라디칼 소거능 결과와는 차이를 보였고 소거활성에 있어서도 동백꽃 추출물의 경우 상대적으로 낮은 활성을 나타냈다. 동백꽃 추출물의 경우 0.977, 1.953, 3.906, 7.813, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 $1.57 \pm 4.13\%$, $9.23 \pm 3.54\%$, $16.31 \pm 5.30\%$, $25.34 \pm 6.25\%$, $43.81 \pm 4.50\%$, $57.37 \pm 5.08\%$, $70.73 \pm 4.76\%$, $76.42 \pm 4.45\%$, $80.75 \pm 4.76\%$ 및 $85.46 \pm 5.35\%$ 로 추출물의 농도 증가에 따라 억제활성도 유의적으로 증가하는 경향을 나타냈다. 동백잎 추출물 31.25 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 50% 이상의 억제활성을 보였고 1 mg/ml 농도에서는 $93.71 \pm 4.73\%$ 의 매우 우수한 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다. 동백꽃 추출물의 경우 0.977, 1.953, 3.906, 7.813, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 $5.69 \pm 0.47\%$, $10.43 \pm 0.82\%$, $19.59 \pm 0.27\%$, $32.07 \pm 0.99\%$, $43.6 \pm 0.47\%$, $48.34 \pm 0.47\%$, $50.55 \pm 0.27\%$, $53.4 \pm 0.27\%$, $55.77 \pm 0.55\%$ 및 $59.87 \pm 0.27\%$ 로 추출물의 농도가 증가함에 따라 억제활성도 증가하였지만 상대적으로 동백잎 추출물보다 억제활성이 낮은 것으로 나타났다. 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 동백꽃 추출물 농도에서 50% 이상의 DPPH 라디칼 억제활성을 보였고 1 mg/ml 농도의 동백 꽃 추출물에서 $63.51 \pm 1.42\%$ 의 가장 높은 억제효과를 확인하였지만 동백잎 추출물의 활성과 비교하여 상대적으로 낮은 억제효과를 보였다.

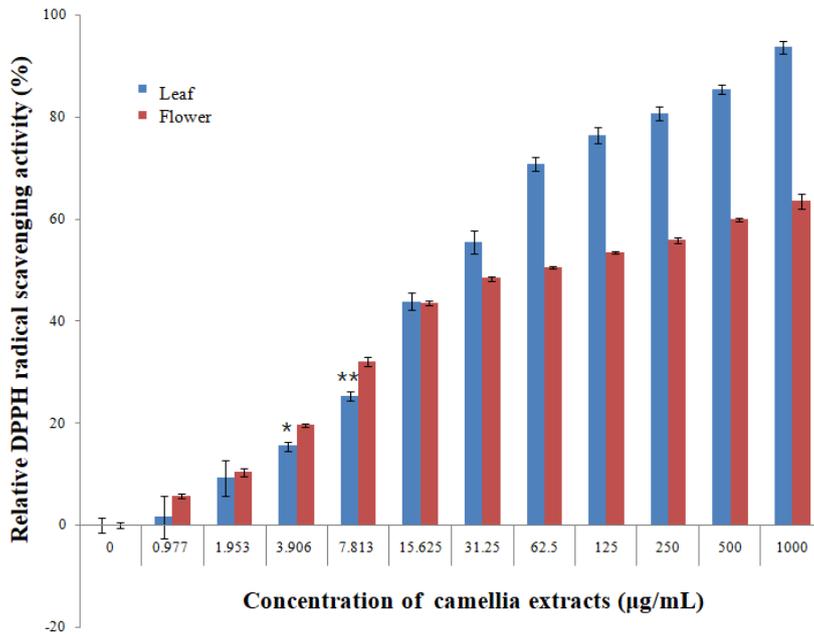


Figure 2. DPPH free radical scavenging activity of 70% ethanolic extracts from *Camellia japonica* L. 1 mM DPPH and camellia extract samples were added at a ratio of 1:1 to react at room temperature for 15 minutes. Values are mean \pm SD of triplicate determinations. Means in the same column are significantly different each other as determined by ANOVA and Turkey's multiple range test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$).

다. SOD 유사활성 분석

SOD는 생체 내에서 O^{2-} 의 소거에 관여하는 효소이며, 생체 내에서 생성된 활성 산소는 체내에서 산화적 장애를 초래하게 되므로 이런 현상을 억제하기 위해 SOD 유사활성 실험을 진행하였다. 그림 3에서 보는 바와 같이 동백 잎과 동백 추출물에서 활성 산소를 제거하는 SOD 항산화 효소와 같은 물질의 활성도를 확인한 결과, 동백잎 및 꽃 추출물에서 동일하게 두드러진 활성을 나타내지는 않았지만 농도 의존적으로 SOD 유사활성이 유의적인 증가경향을 나타냈다. 동백잎의 추출물의 경우 125, 250, 500, 1,000, 1,250 및 2,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 $7.87 \pm 1.06\%$, $6.02 \pm 2.23\%$, $8.10 \pm 1.60\%$, $9.03 \pm 1.20\%$, $25.52 \pm 2.39\%$ 및 $43.62 \pm 4.51\%$ 로 1,250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 동백잎 추출물 농도에서 25% 이상의 SOD 유사활성을 나타냈으며 5 mg/ml 농도의 동백 잎 추출물에서 $44.27 \pm 0.90\%$ 로 가장 높은 SOD 유사활성을 나타냈다. 동백꽃 추출물의 경우 역시 125, 250, 500, 1,000, 1,250 및 2,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 $5.09 \pm 1.45\%$, $6.71 \pm 2.12\%$, $9.03 \pm 3.67\%$, $9.49 \pm 3.82\%$, $18.36 \pm 1.35\%$ 및 $21.22 \pm 3.25\%$ 로 전 농도에서 25% 이하의 활성도를 보여 동백잎 추출물과 비교하여 상대적으로 낮은 SOD 유사활성을 나타내었다. 5 mg/ml 농도의 동백꽃 추출물에서 $23.70 \pm 2.51\%$ 의 가장 높은 SOD 유사활성을 확인하였다.

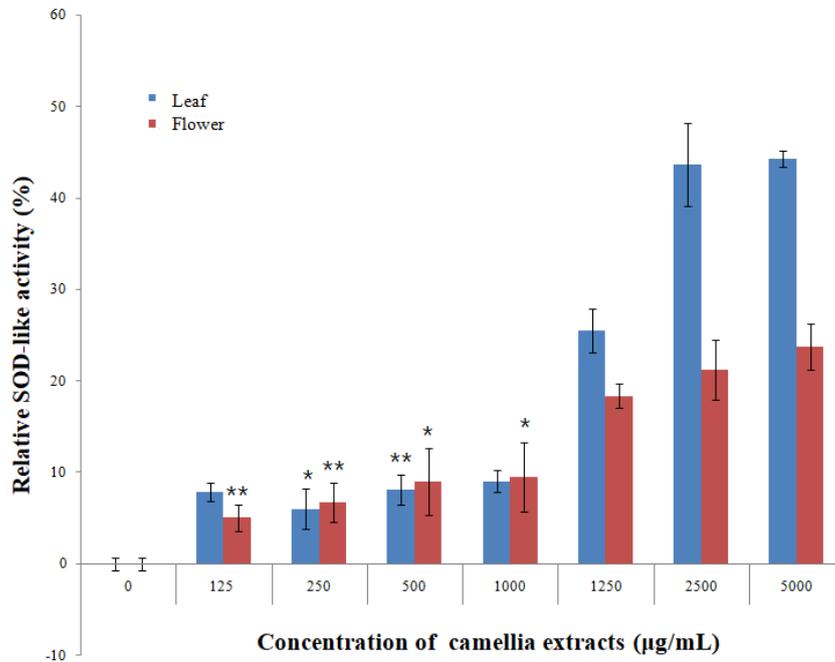


Figure 3. SOD-like activity of 70% ethanolic extracts from *Camellia japonica* L. To 2 ml of camellia extract, 3 ml of Tris-HCl buffer solution (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.5) and 0.2 ml of 7.2 mM pyrogallol were added, reacted at room temperature for 10 minutes. Values are mean \pm SD of triplicate determinations. Means in the same column are significantly different each other as determined by ANOVA and Turkey's multiple range test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$).

라. 동백 추출물 내 항산화 화합물 함량

본 실험에서는 동백 잎, 동백 꽃 시료에 존재하는 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 각각 tannic acid, naringin을 기준 물질로 하여 측정하였다. 1 mg/ml 농도의 동백 잎 시료에서 총 폴리페놀 함량은 tannic acid 표준 곡선으로 하여 측정한 결과 $186.42 \pm 2.17 \mu\text{g/ml}$, naringin을 표준 곡선으로 플라보노이드 함량을 측정한 결과 $116.06 \pm 1.29 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 1 mg/ml 농도의 동백 꽃 시료에서 총 폴리페놀 함량은 tannic acid 표준 곡선으로 하여 측정한 결과 tannic acid 표준 곡선으로 하여 측정한 결과 $139.96 \pm 0.75 \mu\text{g/ml}$, naringin을 표준곡선으로 플라보노이드 함량을 측정한 결과 $53.70 \pm 2.57 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 폴리페놀은 식물의 대표적인 2차 대사산물로 식물계에 널리 분포되어 있으며, phenolic hydroxyl기가 효소 단백질 등 거대분자와 결합하는 성질을 가지고 있어 항산화, 항균, 항암, 충치예방 등의 생리기능을 가지는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 부위별 동백나무 추출물에 대한 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 표 4와 같다. 총 폴리페놀 함량은 tannic acid를 표준용액으로 하여 작성한 검정 곡선으로부터 에탄올 추출물의 1 mg/ml속의 총 페놀 함량의 경우 동백잎과 동백꽃 추출물의 경우 각각 $186.42 \pm 2.17 \text{ mg TAE/g}$, $139.96 \pm 0.75 \text{ mg TAE/g}$ 으로 동백잎 추출물이 더 높게 나타난 것을 알 수 있었다. 총 플라보노이드 함량은 naringin를 표준용액으로 하여 작성한 검정 곡선으로부터 에탄올 추출물의 1 mg/ml 속의 총 플라보노이드 함량의 경우 동백잎 추출물과 동백꽃 추출물의 경우 각각 $116.06 \pm 1.29 \text{ mg NE/g}$, $53.70 \pm 2.57 \text{ mg NE/g}$ 으로 나타났다. 일반적으로 총 플라보노이드 함량은 총 폴리페놀 함량과 밀접한 상관관계가 있다고 보고와 같이 본 실험에서도 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량 모두에서 동백꽃 보다 동백잎 추출물이 더 높게 나타난 것을 알 수 있었다.

Table 4. Contents of total phenol and flavonoid in the extracts of *Camellia japonica* L. leaves and flower.

<i>Camellia japonica</i> L.		Compounds ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
		Total polyphenol	Total flavonoid
Extract	Leaves	186.42 \pm 2.17	116.06 \pm 1.29
	Flower	139.96 \pm 0.75	53.70 \pm 2.57

Values represent means \pm SD (n=3). Means are significantly different each other as determined by ANOVA and Turkey's multiple range test ($p < 0.05$).

2. 동백 추출물의 RAW 264.7 대식세포에서의 항염증 효과

가. 세포생존율

동백잎과 꽃의 70% 에탄올 추출물이 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 1 - 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 까지 다양한 농도로 처리하여 세포 생존율을 확인한 결과 그림 4에서 보는 바와 같이 추출물의 처리 농도가 증가 할수록 농도 의존적으로 세포 독성이 증가하는 것을 관찰하였다. 동백잎 추출물의 경우 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 및 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 동백잎 추출물의 농도에서 각각 $100.00 \pm 2.59\%$, $100.82 \pm 0.52\%$, $101.77 \pm 0.63\%$, $101.72 \pm 0.88\%$, $100.89 \pm 0.02\%$, $91.46 \pm 4.34\%$, $94.19 \pm 0.68\%$, $81.92 \pm 2.35\%$, $66.77 \pm 0.52\%$ 및 $50.62 \pm 5.12\%$ 의 RAW 264.7 대식세포의 생존율을 나타나 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 동백잎 추출물 농도에서 부터는 농도 의존적으로 약한 세포독성이 있는 것으로 확인되었다. 동백꽃 추출물에서는 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 및 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 동백꽃 추출물의 농도에서 각각 $100.00 \pm 1.24\%$, $99.47 \pm 0.78\%$, $98.87 \pm 1.48\%$, $98.08 \pm 0.78\%$, $95.90 \pm 0.12\%$, $89.05 \pm 6.40\%$, $88.53 \pm 1.52\%$, $88.18 \pm 0.49\%$, $78.24 \pm 3.90\%$ 및 $50.60 \pm 4.24\%$ 로 나타나 추출물의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 세포생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 동백잎과 꽃의 70% 에탄올 추출물의 경우 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이상의 고농도에서는 세포독성이 있어 90% 이하의 세포 생존율이 확인됨으로 이에 다음 실험에 적용할 동백잎 및 꽃 추출물 시료의 농도는 생존율이 88% 이상이 되는 1, 5, 10, 20, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 적용하였다.

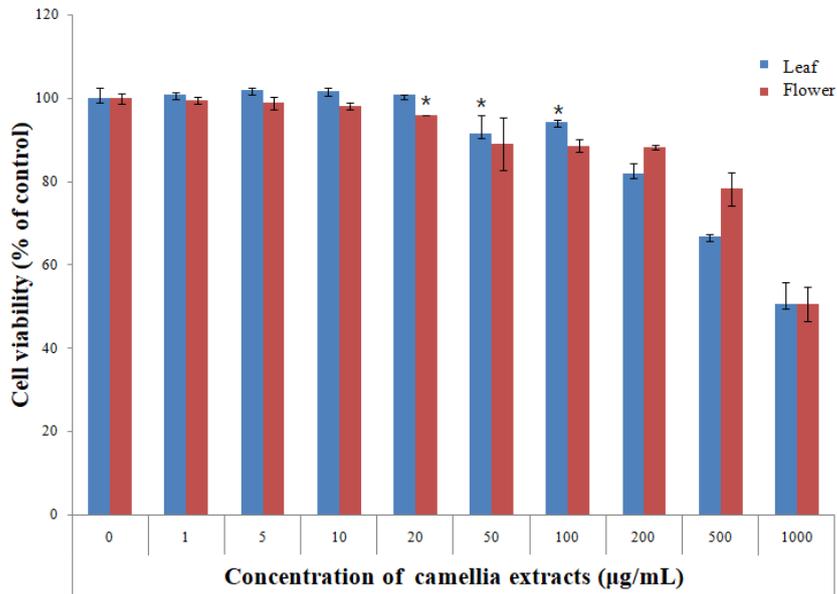


Fig 4. Effects of camellia extracts on cell viability in RAW 264.7 cells. The cells were treated with the indicated concentrations 0 to 1000 ug/mL extracts for 24h. Cell viability was evaluated using a colorimetric assay based on MTT assay. Values represent means \pm SD (n=3). Means in the same column are significantly different each other as determined by ANOVA and Turkey's multiple range test (* $p < 0.05$).

나. NO 저해 효과

최근 자외선과 같은 외부 환경요인에 의해 과다 생성되어 과색소 생성 및 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO생성에 대한 동백 시료의 효과를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고 세포 독성이 없는 농도의 동백잎과 꽃 추출물 시료를 각각 처리하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO 생성량을 확인하였다. 추출물 시료는 1 - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였으며 대조군으로는 동백잎과 꽃 추출물 대신 PBS를 사용하여 LPS를 처리한 control과 추출물 시료 및 LPS를 처리하지 않은 blank를 사용하였다. 그림 5에서 보는 바와 같이 LPS를 처리한 control은 NO 생성량은 동백잎과 꽃 추출물에서 각각 5.02 ± 0.02 , $5.34 \pm 0.09\mu\text{M}$ 로 나타났으며 LPS를 처리하지 않은 blank는 NO의 생성량이 각각 0.08 ± 0.03 , $0.04 \pm 0.01\mu\text{M}$ 로 상대적으로 매우 낮게 나타났다. LPS에 의해 염증 반응이 유도된 마우스 대식세포에 동백잎 추출물 시료를 농도별로 1, 5, 10, 20, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 결과 각각 5.02 ± 0.02 , 3.37 ± 0.12 , 2.72 ± 0.14 , 2.66 ± 0.17 , 2.55 ± 0.15 , 2.09 ± 0.14 , $1.42 \pm 0.12\mu\text{M}$ 로 NO 생성량이 농도 의존적으로 감소하였으며 동백꽃 추출물 시료에서는 동일한 농도별로 처리한 결과 각각 5.34 ± 0.09 , 4.64 ± 0.14 , 4.25 ± 0.09 , 3.77 ± 0.06 , 3.49 ± 0.09 , 2.04 ± 0.19 , $1.51 \pm 0.05\mu\text{M}$ 까지 NO 생성량이 감소하였다. 동백잎과 꽃 추출물 70% 에탄올 추출물을 처리한 경우 NO 생성량은 LPS를 처리한 경우와 비교하여 두 추출물 모두 농도 의존적으로 유의적인 감소 경향을 확인할 수 있었다. 특히, 동백잎 추출물에서는 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 이후부터 LPS를 단독처리한 경우와 비교 33% 이상 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 이상에서는 59% 이상의 NO 생성량 감소를 확인할 수 있었으며 동백꽃 추출물에서는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지는 35%, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 62% 이상의 NO 생성량 감소를 확인할 수 있었다. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 동백잎과 꽃 추출물에서 동일하게 72%의 매우 우수한 NO 생성량 감소를 확인할 수 있었다.

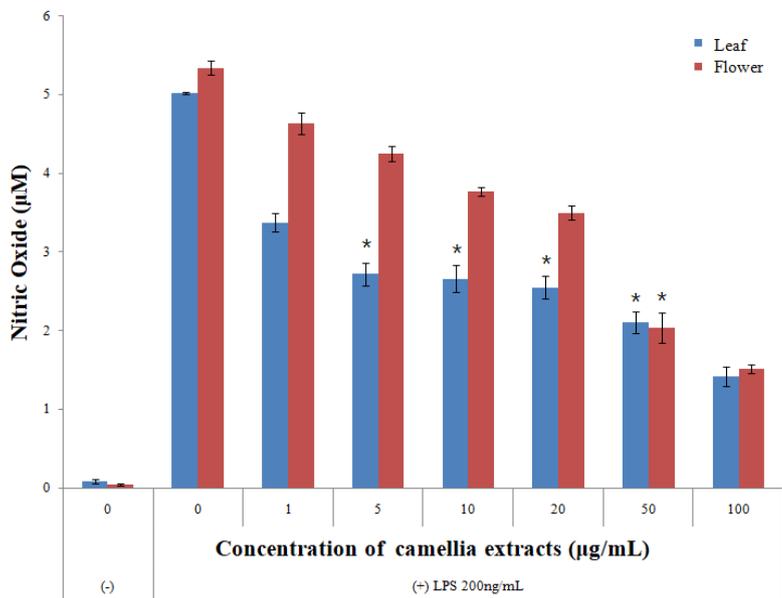


Figure 5. Inhibitory effects of *Camellia japonica* L ethanolic extracts on NO production in LPS stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with or without LPS (200 ng/mL) and then with extract and incubated for 24 h. The culture media of the treated cells were used to measure NO level. Values are mean \pm SD of triplicate determinations. Means in the same column are significantly different each other as determined by ANOVA and Turkey's multiple range test (* $p < 0.05$).

3. 동백 추출물의 생체 내에서의 무독성 및 안전성 검증

본 시험은 동백잎의 70% 에탄올 추출물의 단회 경구투여에 의한 독성증상과 개략의 치사량을 조사하기 위하여 실시하였다. Spraque-Dawley (SD) 계통의 암, 수 rat를 이용하여 저용량군 (500 mg/kg), 중용량군 (1,000 mg/kg), 고용량군 (2,000 mg/kg)의 용량으로 시험군을 설정하고 부형제 대조군과 비교하였으며 실험기간 동안 사망동물의 발생유무, 일반증상, 체중변화 및 실험종료 시 생존동물의 부검 소견을 관찰하였다 그 결과 표 5, 표 6-1 및 표 6-2에서 보는 바와 같이 동백잎 추출물을 경구 투여한 후 각 시험군에서 부형제 대조군과 동일하게 실험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물이 관찰되지 않았다. 또한 실험기간 동안 모든 시험동물에서 특이한 일반증상이 관찰되지 않았다. 또한, 동백잎 추출물을 경구 투여한 후 14일까지 시험동물의 체중변화를 측정결과 그림 7, 8-1, 8-2, 그림 6 및 그림 7에서 보는 바와 같이 각 시험군마다 날짜의 경과에 따라 정상적인 체중의 증가를 확인할 수 있었고 14일 경과 후 수컷의 경우 87 mg/kg 이상, 암컷의 경우 39 mg/kg 이상의 체중증가를 보였다. G1(0), G2(500), G3(1,000), G4(2,000)의 시험군에서 수컷의 경우 각각 97.11 ± 16.92 , 93.63 ± 14.67 , 87.25 ± 7.56 및 89.17 ± 6.26 mg/kg의 체중 증가를 나타내었고 암컷의 경우 각각 45.46 ± 4.05 , 39.85 ± 5.40 , 41.39 ± 13.88 , 39.62 ± 10.76 mg/kg의 체중이 증가한 것으로 확인되었다. 암컷 1,000 mg/kg 투여군의 1례 (G3-31번)에서 7일째 192.40g에서 14일째 191.98g으로 동백잎 추출물 투여 후 14일째 체중이 투여 후 7일째 체중에 비하여 감소하였다. 그 외 시험동물에서는 정상적인 체중증가가 관찰되었다. 통계학적 검정결과, 암·수 모든 시험군에서 군간 유의한 체중차이는 관찰되지 않았다. 부검소견은 표 9, 표 10-1 및 표 10-2에 나타난 바와 같이 실험종료 시 부검결과 모든 기관에서 특이한 육안소견이 관찰되지 않았다.

Table 5. Mortalities and clinical signs of rats after oral administration of camellia extract.

Male		Group (mg/kg)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
Mortalities	No. of dead animal	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	%	0	0	0	0
Clinical signs	No abnormalities detect	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Female				
		Group (mg/kg)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
Mortalities	No. of dead animal	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	%	0	0	0	0
Clinical signs	No abnormalities detect	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the signs / Number of animals examined

Table 6-1. Results of individual test animal for mortalities and clinical signs of male rats.

Group (mg/kg)	Animal ID	Clinical observations	Time of signs occurrence	
			Hour Day 0.5 - 4	Day 1 - 14
G1 (0)	G1-1		.	.
	G1-2		.	.
	G1-3		.	.
	G1-4		.	.
	G1-5		.	.
G2 (500)	G2-6		.	.
	G2-7		.	.
	G2-8		.	.
	G2-9		.	.
	G2-10		.	.
G3 (1,000)	G3-11		.	.
	G3-12		.	.
	G3-13		.	.
	G3-14		.	.
	G3-15		.	.
G4 (2,000)	G4-16		.	.
	G4-17		.	.
	G4-18		.	.
	G4-19		.	.
	G4-20		.	.

. : No abnormalities detected

Table 6-2. Results of individual test animal for mortalities and clinical signs of female rats.

Group (mg/kg)	Animal ID	Clinical observations	Time of signs occurrence	
			Hour Day 0.5 - 4	Day 1 - 14
G1 (0)	G1-21		.	.
	G1-22		.	.
	G1-23		.	.
	G1-24		.	.
	G1-25		.	.
G2 (500)	G2-26		.	.
	G2-27		.	.
	G2-28		.	.
	G2-29		.	.
G3 (1,000)	G2-30		.	.
	G3-31		.	.
	G3-32		.	.
	G3-33		.	.
	G3-34		.	.
G4 (2,000)	G3-35		.	.
	G4-36		.	.
	G4-37		.	.
	G4-38		.	.
	G4-39		.	.
	G4-40		.	.

· : No abnormalities detected

Table 7. Body weight changes of rats after oral administration of camellia extract.

Body weight changes (g)				
Day	Male group (mg/kg)			
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
0	200.08 ± 3.38 (5)	221.06 ± 4.29 (5)	222.25 ± 6.61 (5)	221.93 ± 7.67 (5)
1	242.25 ± 6.62 (5)	241.58 ± 8.02 (5)	244.51 ± 4.87 (5)	239.79 ± 7.52 (5)
7	281.25 ± 12.30 (5)	280.50 ± 10.56 (5)	278.60 ± 10.51 (5)	281.36 ± 5.49 (5)
14	317.19 ± 19.47 (5)	314.69 ± 16.32 (5)	309.51 ± 13.09 (5)	311.10 ± 5.32 (5)
Gai	97.11 ± 16.92 (5)	93.63 ± 14.67 (5)	87.25 ± 7.56 (5)	89.17 ± 6.26 (5)
Day	Female group (mg/kg)			
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
0	181.25 ± 4.37 (5)	179.30 ± 4.81 (5)	180.18 ± 4.52 (5)	181.87 ± 7.74 (5)
1	196.98 ± 5.18 (5)	194.66 ± 5.31 (5)	194.91 ± 8.75 (5)	190.98 ± 1.12 (5)
7	213.23 ± 4.56 (5)	211.70 ± 8.43 (5)	213.45 ± 12.05 (5)	212.88 ± 13.77 (5)
14	226.72 ± 6.92 (5)	219.15 ± 9.97 (5)	221.57 ± 17.71 (5)	221.48 ± 17.62 (5)
Gai	45.46 ± 4.05 (5)	39.85 ± 5.40 (5)	41.39 ± 13.88 (5)	39.62 ± 10.76 (5)

Mean ± S.D (Number of animals), a : Body weight gains between day 0 and 14

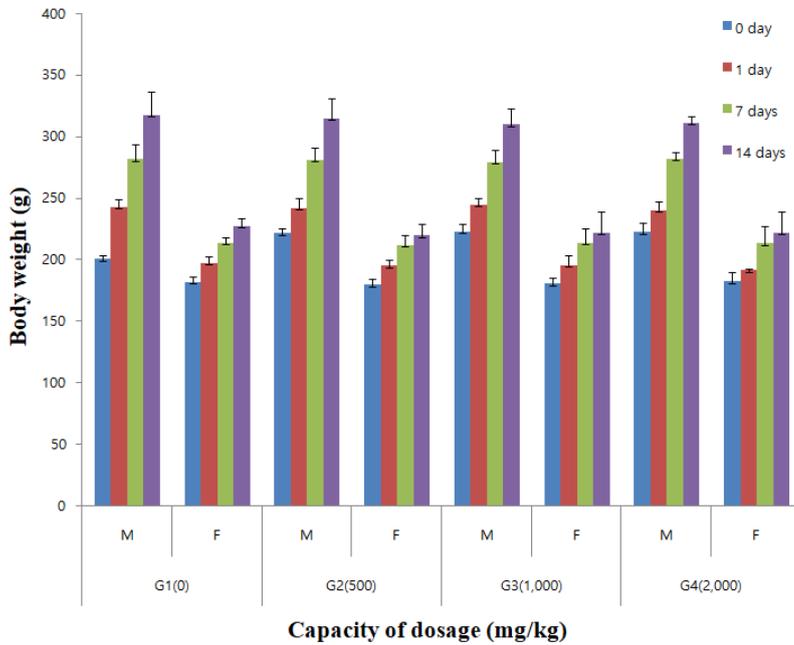


Figure 6. Change of body weight in rats during 14 days after oral administration of camellia extracts. Values are mean \pm SD of triplicate determinations. Means in the same column are significantly different each other as determined by ANOVA and Turkey's multiple range test ($*p < 0.05$). M : Male; F : Female; G1 - G4 : Units of test group.

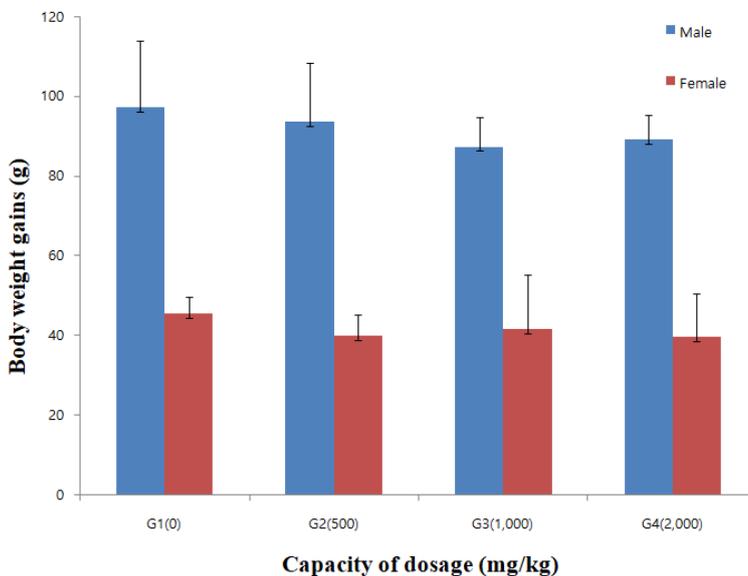


Figure 7. Weight gain in rats for 14 days after oral administration of camellia extract. Values are mean \pm SD of triplicate determinations. Means in the same column are significantly different each other as determined by ANOVA and Turkey's multiple range test ($*p < 0.05$). G1 - G4 : Units of test group.

Table 8-1. Results of individual test animal for body weight changes of male rats.

		Body weight changes (g)				
Group (mg/kg)	Animal ID	Day 0	Day 1	Day 7	Day 14	Gain ^a
G1 (0)	G1-1	216.48	233.21	264.49	293.89	77.41
	G1-2	220.10	240.32	279.54	324.36	104.26
	G1-3	217.40	240.87	276.31	300.33	82.93
	G1-4	224.93	246.03	289.62	326.80	101.87
	G1-5	221.48	250.84	296.32	340.56	119.08
	Mean	220.08	242.25	281.25	317.19	97.11
	S.D.	3.38	6.62	12.30	19.47	16.92
G2 (500)	G2-6	215.10	232.11	263.71	294.67	79.57
	G2-7	218.70	241.84	282.66	329.98	111.28
	G2-8	221.51	235.49	281.72	310.61	89.10
	G2-9	224.17	246.69	281.36	305.40	81.23
	G2-10	225.82	251.78	293.0	332.78	106.96
	Mean	221.06	241.58	280.50	314.69	93.63
	S.D.	4.29	8.02	10.56	16.32	14.67
G3 (1,000)	G3-11	212.45	237.13	264.34	291.54	79.09
	G3-12	218.39	241.90	272.75	301.52	83.13
	G3-13	226.55	247.50	285.48	322.89	96.36
	G3-14	227.78	248.10	279.33	311.27	83.49
	G3-15	226.09	247.92	291.11	320.31	94.22
	Mean	222.25	244.51	278.60	309.51	87.25
	S.D.	6.61	4.87	10.51	13.09	7.56
G4 (2,000)	G4-16	212.15	233.29	276.78	303.51	91.36
	G4-17	215.33	234.91	281.02	313.97	98.64
	G4-18	225.25	243.26	281.56	308.08	82.83
	G4-19	228.33	236.08	277.06	312.83	84.50
	G4-20	228.58	251.39	290.36	317.09	88.51
	Mean	221.93	239.79	281.36	311.10	89.17
	S.D.	7.67	7.52	5.49	5.33	6.26

a : Body weight gains between day 0 and 14

Table 8-2. Results of individual test animal for body weight changes of female rats.

		Body weight changes (g)				
Group (mg/kg)	Animal ID	Day 0	Day 1	Day 7	Day 14	Gain ^a
G1 (0)	G1-21	174.85	188.68	207.59	218.93	44.08
	G1-22	178.91	196.14	209.99	220.52	41.61
	G1-23	182.85	201.65	216.99	235.12	52.27
	G1-24	185.81	197.52	213.18	231.30	45.49
	G1-25	183.85	200.91	218.41	227.71	43.86
	Mean	181.25	196.98	213.23	226.72	45.46
	S.D.	4.37	5.18	4.56	6.92	4.05
G2 (500)	G2-26	172.70	186.87	199.58	206.57	33.87
	G2-27	177.35	199.47	207.53	211.69	34.34
	G2-28	178.66	191.51	212.58	220.65	41.99
	G2-29	182.70	197.51	218.76	226.14	43.44
	G2-30	185.07	197.95	220.04	230.68	45.61
	Mean	179.30	194.66	211.70	219.15	39.85
	S.D.	4.81	5.31	8.43	9.97	5.40
G3 (1,000)	G3-31	172.29	181.48	192.40	191.98	19.69
	G3-32	180.44	192.22	215.99	231.69	51.25
	G3-33	182.45	199.89	222.15	234.58	52.13
	G3-34	182.87	196.51	216.36	218.23	35.36
	G3-35	182.86	204.46	220.33	231.36	48.50
	Mean	180.18	194.91	213.45	221.57	41.39
	S.D.	4.52	8.75	12.05	17.71	13.88
G4 (2,000)	G4-36	172.70	180.84	198.65	202.32	29.62
	G4-37	178.49	179.78	199.70	206.44	27.95
	G4-38	182.14	195.18	216.94	231.74	49.60
	G4-39	182.14	192.40	217.73	222.14	40.00
	G4-40	193.86	206.68	231.39	244.77	50.91
	Mean	181.87	190.98	212.88	221.48	39.62
	S.D.	7.74	11.12	13.77	17.62	10.76

a : Body weight gains between day 0 and 14

Table 9. Gross findings of rats after oral administration of camellia extract.

Organs	Signs	Male group (mg/kg)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
All organ	No gross finding detect	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Organs	Signs	Female group (mg/kg)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
All organ	No gross finding detect	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

Number of animals with the signs / Number of animals examined

Table 10-1. Individual data of gross findings for male rats.

Group (mg/kg)	Animal ID	Fate (day)	Organs	Observations
G1 (0)	G1-1	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-2	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-3	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-4	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-5	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
G2 (500)	G2-6	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-7	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-8	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-9	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-10	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
G3 (1,000)	G3-11	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G3-12	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G3-13	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G3-14	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G3-15	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
G4 (2,000)	G4-16	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G4-17	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G4-18	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G4-19	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G4-20	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected

Table 10-2. Individual data of gross findings for female rats.

Group (mg/kg)	Animal ID	Fate (day)	Organs	Observations
G1 (0)	G1-21	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-22	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-23	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-24	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G1-25	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
G2 (50)	G2-26	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-27	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-28	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-29	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G2-30	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
G3 (1,000)	G3-31	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G3-32	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G3-33	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G3-34	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G3-35	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
G4 (2,000)	G4-36	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G4-37	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G4-38	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G4-39	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected
	G4-40	Terminal sacrifice(14)		No gross findings detected

4. 추출물 함유 구강케어 조성물의 최적배합 조건 분석

표 2와 3과 같은 조성으로 조제하여 상온에서 7일간 보관하고 숙성한 추출물 함유 구강케어 조성물의 pH를 측정된 결과를 표 8과 9에 나타내었다. 세치제는 대조군에서는 pH 8.0로 측정되는데 반하여 Sample 1에서는 pH 8.4, Sample 2에서는 pH 9.0로 약간 높은 값이 측정되었다. 구강청결제는 대조군이 $\text{pH } 3.5 \pm 0.12$, Sample 1에서는 $\text{pH } 3.8 \pm 0.07$, Sample 2에서는 $\text{pH } 4.0 \pm 0.05$ 가 측정되었으며 추출물의 함유량이 높아짐에 따라 pH가 조금씩 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 세치제는 추출물의 함유량이 높아질수록 CPS가 낮아지는 것을 확인하였으나 구강청결제는 함유량이 높아질수록 CPS가 미세하게 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 조성물 모두 일반적인 치약 및 세치제의 점도 범주를 보였다. 동백추출물이 함유된 구강케어제품에서는 500 mg/ml 함유 시 안정화된 물성이 관찰되는 것을 확인하였다.

Table 11. Optimal condition of toothpaste composition.

	pH	Phase separation	Viscosity (CPS)
Control	8.0 ± 0.03	X	72,000
Sample 1	8.4 ± 0.07	X	79,000
Sample 2	9.0 ± 0.05	0	68,000

Mean ± S.D (N = 3), CPS : Cycle per second

Table 12. Optimal condition liquid oral cleaner composition.

	pH	Phase separation	Viscosity (CPS)
Control	3.5 ± 0.12	x	15
Sample 1	3.8 ± 0.07	x	18
Sample 2	4.0 ± 0.05	x	20

Mean ± S.D (n = 3), CPS : Cycle per second

제 4장. 결론 및 고찰

본 연구는 동백나무(*Camellia japonica* L.) 잎과 꽃의 70% 에탄올 추출물을 재료로 하여 항산화와 항염증의 효과를 평가하고 rats를 실험동물로 사용하여 경구투여에 의한 안전성 평가를 통하여 구강보건용품으로 활용 가능성을 확인하고자 하였다. 동백 잎과 꽃에서 분리한 추출물의 항산화 활성은 4가지 방법으로 분석하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 추출물의 항산화력에 의해 청록색의 ABTS 라디칼이 탈색되는 정도를 측정하는 방법으로 추출물로부터 항산화 활성물질 개발을 위한 연구에 광범위하게 이용되고 있다⁶⁾. ABTS 시약은 free radical을 이용한 항산화능 측정은 potassium persulfate와의 반응으로 생성되는 ABTS free radical이 시료 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 투명하게 탈색되는 것을 이용한 방법이다⁷⁾. 동백꽃의 70% 에탄올 추출물은 15.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 90% 이상의 높은 ABTS 라디칼 소거활성을 나타내었으며 1 mg/ml 농도에서도 $96.66 \pm 0.84\%$ 로 우수한 억제활성을 나타내었다. 동백잎 추출물의 경우에서도 저농도에서 농도 의존적인 ABTS 라디칼 소거활성이 증가하였으나 고농도에서는 동백꽃 추출물과 유사하게 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 결과적으로 동백잎의 70% 에탄올 추출물은 7.813 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 이상의 농도에서 90% 이상의 높은 소거활성을 나타내었으며 1 mg/ml 농도에서도 $96.43 \pm 0.04\%$ 의 강력한 억제 효과를 확인하였다. 이상의 결과로 볼 때 ABTS 라디칼 소거능에 의한 항산화활성은 동백잎 추출물이 동백꽃 추출물보다 약간 높게 나타났으며 동백꽃과 잎 추출물의 경우 각각 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 $97.17 \pm 0.90\%$, 31.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 $97.67 \pm 0.52\%$ 로 가장 높은 ABTS 라디칼 소거활성을 보여 동백 추출물의 항산화력이 매우 우수함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 누리장나무 에탄올 추출물에서 $97.26 \pm 0.017\%$ (1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)¹⁴⁾, 오미자 에탄올 추출물에서 97.0%¹⁵⁾, 바질 에탄올 추출물에서 94.7%¹⁶⁾과 유사한 활성을 나타내었으며 태광콩 청국장 분말의 에탄올 추출물(1,000 ppm)이 각각 71.1%, 85.1%¹⁷⁾, 흑대두와 황대두 추출물(600 ppm)에서 각각 11.6%, 6.4%¹⁸⁾ 보다 우수한 항산화력을 나타냈다 따라서 동백잎 및 꽃의 70% 에탄올 추출물은 천연 화장품 소재 및 천연 항산화제로서의 가능성이 매우 높다는 것을 확인할 수 있었다. DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. DPPH는 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며 특히 여러 가지 항산화 기작 중 proton-radical scavenger

에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다⁸⁾. 동백 추출물의 항산화 활성을 분석하기 위해 DPPH 라디칼 소거능을 알아 본 결과 동백잎과 동백꽃의 70% 에탄올 추출물에서 동일하게 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거활성이 증가하는 경향을 나타냈으며 이러한 결과는 ABTS 라디칼 소거능 결과와는 차이를 보였고 소거활성에 있어서도 동백꽃 추출물의 경우 상대적으로 낮은 활성을 나타냈다. 동백꽃 추출물의 경우 추출물의 농도 증가에 따라 억제활성도 유의적으로 증가하는 경향을 나타냈다. 동백잎 추출물 31.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 50% 이상의 억제활성을 보였고 1 mg/ml 농도에서는 $93.71 \pm 4.73\%$ 의 매우 우수한 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다. 동백꽃 추출물의 경우 추출물의 농도가 증가함에 따라 억제활성도 증가하였지만 상대적으로 동백잎 추출물보다 억제활성이 낮은 것으로 나타났다. 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 동백꽃 추출물 농도에서 50% 이상의 DPPH 라디칼 억제활성을 보였고 1 mg/ml 농도의 동백 꽃 추출물에서 $63.51 \pm 1.42\%$ 의 가장 높은 억제효과를 확인하였지만 동백잎 추출물의 활성과 비교하여 상대적으로 낮은 억제효과를 보였다. 동백나무 잎과 꽃 추출물의 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. DPPH radical 을 50% 소거하는 농도(IC₅₀) 값에서도 제주산 동백나무 어린잎의 에탄올 추출물(1,174 $\mu\text{g}/\text{ml}$)²⁰⁾, 전라남도에서 자생한 동백나무 잎 추출물(197.65 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 동백오일(500,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 으로 결과²¹⁻²²⁾보다는 상대적으로 매우 높은 소거활성을 나타냈으며, 버섯류인 차가버섯 69.29% (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)²³⁾, 상황버섯 78.59% (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)²⁴⁾과 조금 높거나 유사한 소거활성을 보였으며 1,000 ppm의 백복령과 숙지황 물 추출물의 50% 이하의 DPPH 라디칼 소거활성²⁵⁾과 짚신나물 물 추출물 500 ppm 이상의 농도에서 85% 이상의 소거활성²⁶⁾보다는 상대적으로 높은 소거활성을 보여 동백잎의 항산화 활성이 매우 우수한 것으로 생각된다. SOD는 생체 내에서 O²⁻의 소거에 관여하는 효소이며, 생체 내에서 생성된 활성 산소는 체내에서 산화적 장애를 초래하게 되므로 이런 현상을 억제하기 위해 SOD 유사활성 실험을 진행하였다. 동백잎 및 꽃 추출물에서 동일하게 두드러진 활성을 나타내지는 않았지만 농도 의존적으로 SOD 유사활성이 유의적인 증가경향을 나타냈다. 동백잎의 추출물의 경우 1,250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 동백잎 추출물 농도에서 25% 이상의 SOD 유사활성을 나타냈으며 5 mg/ml 농도의 동백 잎 추출물에서 $44.27 \pm 0.90\%$ 로 가장 높은 SOD 유사활성을 나타냈다. 동백꽃 추출물의 경우 전 농도에서 25% 이하의 활성도를 보여 동백잎 추출물과 비교하여 상대적으로 낮은 SOD 유사활성을 나타내었다. 5 mg/ml 농도의 동백꽃 추출물에서 $23.70 \pm 2.51\%$ 의 가장 높은 SOD 유사활성을 확인하였다. 이는 태광콩과 청국장 분말의 에탄올 추출물(1,000 ppm)

에서 각각 19.3%와 20.2%¹⁷⁾, 팥이밥의 에탄올 추출물(1 mg/ml)에서 34.53%²⁷⁾, 금은화 21.60%, 애엽 22.9%, 박하 15.99%, 홍화 13.43% 치자 10.93%, 목단피 9.10%, 작약 6.27%, 하수오 5.57%, 소엽 3.67%²⁸⁾, 연교 23.05%²⁹⁾와 비교하여 유사하거나 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 SOD 유사활성이 식품의 산화와 비만과도 밀접한 관계가 있으며 pyrogallol과 SOD 유사 활성물질은 수퍼옥사이드를 정상적인 산소로 전환시키지는 못하지만 반응성을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있어 동백잎과 꽃의 70% 에탄올 추출물이 산화적 장애를 방어하여 항산화 효과를 나타내는 것으로 사료된다. 폴리페놀 화합물은 flavonoids, anthocyanins, tannins, catechins, isoflavones, lignans, resveratrols 등으로 식물계에 널리 분포되어 있으며 여러 화합물과 쉽게 결합하는 특성에 의해 항산화, 항암 및 항염 효과가 뛰어나다고 알려져 있다³⁰⁾. 폴리페놀은 식물의 대표적인 2차 대사산물로 식물계에 널리 분포되어 있으며, phenolic hydroxyl기가 효소, 단백질 등 거대분자와 결합하는 성질을 가지고 있다. 폴리페놀계 물질들은 다양한 구조와 분자량을 가지며, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl (OH)기를 가진 benzene 화합물을 가리키는데 이는 색소 화합물인 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 항산화, 항균, 항암, 충치예방 등의 생리기능을 가지는 것으로 알려져 있다²⁷⁾. 본 연구에서 추출물의 1 mg/ml속의 총 페놀 함량의 경우 동백잎과 동백꽃 추출물의 경우 각각 186.42 ± 2.17 mg TAE/g, 139.96 ± 0.75 mg TAE/g으로 동백잎 추출물이 더 높게 나타난 것을 알 수 있었다. 총 플라보노이드 함량은 에탄올 추출물 1 mg/ml 속의 총 플라보노이드 함량의 경우 동백잎 추출물과 동백꽃 추출물의 경우 각각 116.06 ± 1.29 mg NE/g, 53.70 ± 2.57 mg NE/g으로 나타났다. 일반적으로 총 플라보노이드 함량은 총 폴리페놀 함량과 밀접한 상관관계가 있다고 보고³⁰⁾와 같이 본 실험에서도 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량 모두에서 동백꽃보다 잎추출물이 더 높게 나타난 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Seo 등 (2015)³¹⁾은 동백나무 성엽(61.18 mg/g), 꽃(56.47 mg/100g)의 폴리페놀을 함량과 동백나무 성엽(168.29 mg/g), 꽃(159.00 mg/g) 플라보노이드 함량 결과와 폴리페놀은 유사하게 나타났지만 플라보노이드 함량은 낮은 결과를 보였다. 또한 페놀 화합물의 hydroxyl group은 유지 산패의 초기 단계에 생성된 유리기들이 안정된 화합물을 형성할 수 있도록 산화억제 작용을 한다. 즉 페놀 함량이 높은 것은 산화 억제 작용이 높은 것을 의미한다. 이를 통해 동백꽃보다 동백잎 추출물에서 더 높은 항산화 활성을 기대할 수 있다³²⁻³⁴⁾. 동백나무 잎은 tannin계열인 camelliatannins와 camellianoside, okicamelliaside 등의 성분이 알려졌고, 항산화, 항미생물, 항암, 항균활성 등에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다³⁵⁻⁴¹⁾.

구강보건용품 조성물에서 천연소재의 항염활성의 중요성은 치은염과 구내염의 예방 차원에서 매우 중요하며, 특히 항염활성 천연물을 세치제나 구강청결제에 첨가할 경우, 혀와 구강조직에 자극적이지 않고 합성소재에서 발생하는 부작용 등이 유발되지 않아 매우 큰 의미가 있다. 최근 자외선과 같은 외부 환경요인에 의해 과다 생성되어 과색소 생성 및 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO생성에 대한 동백 추출물의 효과를 확인하기 위하여 마우스 대식세포로 알려진 RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고 세포 독성이 없는 농도의 동백잎과 꽃 추출물 시료를 각각 처리하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO 생성량을 확인하였다. 그 결과 LPS를 처리한 control의 NO 생성량은 동백잎과 꽃 추출물에서 각각 5.02 ± 0.02 , $5.34 \pm 0.09 \mu\text{M}$ 로 나타났으며 LPS를 처리하지 않은 blank는 NO의 생성량이 각각 0.08 ± 0.03 , $0.04 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 로 상대적으로 매우 낮게 나타났다. LPS에 의해 염증 반응이 유도된 마우스 대식세포에 동백잎과 꽃 추출물 시료를 농도별로 처리한 결과 NO 생성량이 농도 의존적으로 감소하였다. 동백잎과 꽃 추출물 70% 에탄올 추출물을 처리한 경우 NO 생성량은 LPS를 처리한 경우와 비교하여 두 추출물 모두 농도 의존적으로 유의적인 감소 경향을 확인할 수 있었다. 특히, 동백잎 추출물에서는 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 이후부터 LPS를 단독 처리한 경우와 비교 33% 이상 $50 \mu\text{g/ml}$ 의 농도 이상에서는 59% 이상의 NO 생성량 감소를 확인할 수 있었으며 동백꽃 추출물에서는 $20 \mu\text{g/ml}$ 의 농도까지는 35%, $50 \mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 62% 이상의 NO 생성량 감소를 확인할 수 있었다. $100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 동백잎과 꽃 추출물에서 동일하게 72%의 매우 우수한 NO 생성량 감소를 확인할 수 있었다. 갈조류인 구멍갈파래의 에탄올 추출물 NO 생성 억제 효과의 경우 $50 \mu\text{g/ml}$ 농도 이상에서 34% 이상의 억제 활성을 보였다는 결과⁴²⁾나 갈조류 다시마 뿌리의 에탄올 추출물의 경우 $100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 28%의 No 생성 억제 효과를 보였다는 결과⁴³⁾ 보다는 더 높은 저해활성을 보였다. 동백나무 수피의 경우 triterpene saponin 계열인 camellioside A, B, E, F, G, H 화합물이 분리·동정되었으며, 이들 화합물이 RAW264.7 대식세포에서 NO 생성(IC_{50} : $4.96 - 18.25 \mu\text{M}$)을 억제하였다는 보고가 있다⁴⁴⁾. 또한 동백나무 종자 추출물이 RAW 264.7 대식세포에서 NF-kB와 AP-1의 활성을 억제하여 NO, PGE2, TNF- α 의 생성을 억제하는 것으로 나타났다⁴⁵⁾. 동백나무 잎·가지 추출물도 NO ($\text{IC}_{50} = 45.68 \mu\text{g/ml}$) 및 PGE2 ($\text{C}_{50} = 43.90 \mu\text{g/ml}$) 생성량을 유의적으로 억제하여 항염 효과가 있는 것으로 보고되었다⁴⁶⁾는 결과보다는 낮은 저해활성을 보였다. NO는 인체 내에서 방어기능, 신호 전달 기능, 신경 독성, 혈관 확장 등의

여러 가지 생리적 기능을 가지고 있으며 세균의 침입이나 외부 자극에 대하여 이를 제거하고 방어하기 위해 NO를 분비한다. 하지만 분비가 과다하여 정상범위를 넘어서게 되면 조직의 손상이나 염증이 유발되는 것으로 알려져 있다⁴⁷⁾.

본 실험에서는 동백 추출물의 생체안전성을 실험적으로 검증하기 위하여 랫트를 실험동물로 사용하여 경구주입 방식으로 추출물의 무독성 여부를 확인하였다. 실험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물이 관찰되지 않았다. 또한 실험기간 동안 모든 시험동물에서 특이한 일반증상이 관찰되지 않았다. 체중측정 결과, 암컷 1,000 mg/kg 투여군의 1례(G3-31번)에서 시험물질 투여 후 14 일째 체중이 투여 후 7 일째에 비하여 감소하였다. 그 외 시험동물에서는 정상적인 체중증가가 관찰되었으나 매우 경미하고 다른 항목에서 이를 지지할만한 결과가 없어 동백잎 추출물에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다. 통계학적 검정결과, 암·수 모든 시험군에서 군간 유의한 체중차이는 관찰되지 않았다. 부검소견으로는 실험종료 시 부검결과, 특이한 육안소견이 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 보아 동백잎 추출물에 의한 독성증상은 관찰되지 않았으며 개략의 치사량 (approximate LD)은 > 2,000 mg/kg b.w으로 사료된다. 따라서 동백잎 추출물은 2,000 mg/kg 이하의 농도에서는 무해하고 매우 안전한 천연물임을 확인할 수 있었다. 한편 동백 추출물 함유한 세치제, 구강청결제와 같은 구강케어 조성물의 조제하여 상온에서 7일간 보관하고 숙성한 다음 최적 조건을 확인한 결과 세치제와 구강청결제 모두 추출물의 함유량이 높아짐에 따라 pH가 조금씩 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 세치제는 추출물의 함유량이 높아질수록 CPS가 낮아지는 것을 확인하였으나 구강청결제는 함유량이 높아질수록 CPS가 미세하게 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 동백 추출물이 함유된 구강케어 제품에서는 500 mg/ml 함유시 안정화된 물성이 관찰되는 것을 확인하였다.

이상의 실험결과를 토대로 동백나무 잎과 꽃 유래 추출물은 매우 우수한 항산화 효과와 항염증 효과를 가지고 있어 기능성 천연물질로서 매우 가치가 높고 특히, 천연 구강 케어소재로서 충분한 가치가 있을 것으로 생각되며 경구독성시험에 결과로 생체내에서도 안전하다는 것을 검증하였다. 이와 같은 실험결과를 토대로 향후 다양한 구강보건용품 개발에 필요한 식물유래 천연소재로서 동백나무 유래 추출물의 활용가치가 매우 높아질 것으로 사료되며, 천연물산업에서 호남지역 특산식물인 동백나무의 산업적 부가가치가 향상될 것으로 사료된다.

제 5장. 참고문헌

1. Lee SY, Park SH, Kang JY, Byeon JH, Jang ES, Son JS, Kim SG. The establishment of natural materials library for the oral disease. *Oral Biology Research* 2011; 35(1): 47-54.
2. Park HJ, Cha ES, Kong KA, Lee WJ. Prevalence of oral diseases, socioeconomic factors and health behaviors in korean adults. *대한치과기공학회지*. 2008; 30(2): 121-133.
3. 김영례, 한진섭. 동백나무 잎 추출물의 피부질환균에 대한 항균효과 및 항산화 활성. *대한미용학회지*. 2014; 10(1): 13-19.
4. 허인도, 서효진, 김종덕. 동백꽃 추출물의 신생혈관생성 및 세포부착 억제효과. *Journal of Life Science*. 2007; 17(8): 1152-1156.
5. 정동원, 김민영. 제주 동백나무 어린 잎의 페놀류 함량과 항산화 효능. *J Appl Biol Chem*. 2017; 60(4): 307-311.
6. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTs radical cation decolorization assay electron-transfer reactions with organic compounds in solutions containing nitrite or nitrate. *Free Radical Biol. Med.* 1999; 26(9-10): 1231-1237.
7. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958; 181: 1199-1200.
8. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 1974; 47: 469-474.
9. Folin AD, Denis W. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenos derivatives) in urine. *Journal of Biological Chemistry*. 1915; 22: 305-308.
10. AOAC. Official methods of analysis (12th). Association of official analytical chemists, Washington D.C., 1995; 127-130.
11. Park MH, Kim CJ, Lee JY, Keum CY, Kim IS, Jin CH, Ji JG, Kim SK. Anti-arthritic effect of radiation mutant *Perilla frutescens* var. *crispa* and *Atractylodes macrophala* koidz. *Journal of the Korean Applied Science and*

- Technology*. 2020; 37: 102-113.
12. Han HY, Kim SN, Yang YS, Han SC, Seok JH, Roh HS, Lee JK, Jeong J, Jeong YW, Kim JA, Min BS. Toxicity assessment of *Polygalae radix* aqueous extract orally administered to rats for 2 consecutive weeks. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 2015; 46: 44-51.
 13. Han SR, Han HY, Park HJ, Min BS, Chung MK, Moon KS, Jeong JY, Roh HS, Seok JH, Kim SK. Toxicity assessment of *Cyperi rhizoma* aqueous extract orally administered to rats for 13 consecutive weeks. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 2013; 4: 258-264.
 14. Jeon HS, Choi JY, Lee IC. Physiological activity of *Clerodendrum trichotomum* ethanol extracts for the development of materials for cosmetics. *J Invest Cosmometol*. 2017;13(3):209-214.
 15. Cho YJ, Ju IS, Kim BC, Lee WS, Kim MJ. Biological activity of omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extracts. *Appl Biol Chem*. 2007;50:198-203.
 16. Kim JH, Yoon SJ, Lee KH, Kwon HJ, Chun SS, Kim TW, Cho YJ. Screening of biological activities of the extracts from basil (*Ocimum basilicum* L.). *Appl Biol Chem*. 2005;48:173-177.
 17. Joo EY, Park CS. Antioxidant and fibrinolytic activities of extracts from soybean and chungkukjang (fermented soybean paste). *Korean J. Food Preserv*. 2011;18(6):930-937.
 18. Shon MY, Lee SW, Nam SH. Antioxidant and anticancer activities of glycine semen germinatum fermented with germinated black soybean and some bacteria. *Korean J. Food Preserv*. 2007;14:538-544.
 19. Lee SY, Hwang EJ, Kim GH, Choi YB, Lim CY, Kim SM. Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L. *Korean J. Med. Crop Sci*. 2005; 13: 93-100.
 20. Jeong DW, Kim MY. Phenolic contents and antioxidant activities of extracts from young leaves of *Camellia japonica* L. in Jeju. *J Appl Biol Chem*. 2017; 60(4): 307-311.
 21. Kim YR, Han JS. Antimicrobial effects of *Camellia japonica* leaf extract on

- skin disease-related microorganisms and its antioxidative activity. *J Invest Cosmetol.* 2014; 10(1): 13-19.
22. Choi MH, Min MJ, Oh DS, Shin HJ. Antimicrobial and antioxidant activity of *Camellia japonica* extracts for cosmetic applications. *KSBB J.* 2013; 28: 99-105.
 23. Guk MH, Kim DH, Lee C, Jeong ES, Choi EJ, Lee JS, Lee TS. Antioxidant and skin whitening effects of *Inonotus obliquus* methanol extract. *J. Mushroom Sci. Prod.* 2013;11(2):99-106.
 24. Kim JO, Jung MJ, Choi HJ, Lee JT, Lim AK, Hong JH, Kim DI. Antioxidative and biological activity of hot water and ethanol extracts from *Phellinus linteus*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 2008;37:684-690.
 25. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 1993; 84: 407-412.
 26. Kim TH, Kim JM, Baek JM, Kim TW, Kim DJ, Park JH, Choe M. Antioxidant and whitening effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb water extract. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2011;19(3):177-184.
 27. Kim JH, Seo SJ, Kim NW, Lee YS. Comparison of anti-aging and antioxidant activities of *Oxalis corniculata* ultrasonic extracts. *J. Invest. Cosmetol.* 2018;14(1):19-28.
 28. Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM. Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. *Kor. J. Food Preserv.* 2004;12:191-202.
 29. Lee YS. Anti-aging, antioxidant and anti-inflammation activities of *Lonicerae flos*, *Dictamni radiceis* Cotex and *Forsythiae fructus* extracts. *J. Invest. Cosmetol.* 2020;16(1):1-10.
 30. Kim SB, Jung ES, Shin SW, Kim MH, Kim YS, Lee JS, Park DH. Anti-inflammatory activity of *Camellia japonica* oil. *BMB reports.* 2012; 45: 177-182.
 31. Seo Y, Kim C. Fusion-complex activity of *Camellia* extract. *J Digital Conv.* 2015; 13: 431-436.
 32. Cho JH, Lee SH, Park YH, Lee SG, Jung TE, Lee IS, Park JH, Kim HJ.

- Antioixdant and alcohol degradation activities of extracts from *Acertegmentosum maxim*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 2013; 42: 378-383.
24. Gu YR, Kim SW, Son YW, Hong JH. Antioxidant activities of solvent extracts from different *Glehnia radix* parts and their inhibitory effect against nitric oxide production in Raw 264.7 cell. *Korean J Food Preserv.* 2017; 24: 116-124.
 25. Han L, Hatano T, Yoshida T, Okuda T. Tannins of theaceous plants V. camellia tannins F, G and H, three new tannins from *Camellia japonica* L. *Chem. Pharm. Bull.* 1994; 42: 1399-1409.
 26. Hatano T, Han L, Taniguchi S, Okuda T, Kiso Y, Tanake T, Yoshida T. Camellia tannin D, a new inhibitor of bone resorption, from *Camellia japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* 1995; 43: 2033-2035.
 27. Onodera K, Hanashiro K, Yasumoto T. Camellianoside, a novel antioxidant glycoside from the leaves of *Camellia japonica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2006; 70: 1995-1998.
 28. Onodera K, Tsuha K, Yasumoto-Hirose M, Tsuha K, Hanashiro K, Naoki H, Yasumoto T. Okicamelliaside, an extraordinarily potent anti-degranulation glucoside isolated from the leaves of *Camellia japonica* degranulation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010; 74: 2532-2534.
 29. Han YS. Antimicrobial effects of *Camellia japonica* L. leaves extract on food-orne phathogenic microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.* 2005; 37: 113-121.
 30. Lee SY, Hwang EJ, Kim GH, Choi YB, Lim CY, Kim SM. Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L. *Korean J. Med. Crop Sci.* 2005; 13: 93-100.
 31. Kim JH, Jeong CH, Shim KH. Antioxidative and anticancer activities of various solvent fractions from the leaf of *Camellia japonica* L. *Korean J. Food Preserv.* 2010; 17: 267-274.
 32. Thao NTP, Hung TM, Cuong TD, Kim JC, Kim EH, Jin SE, Na M, Lee YM, Choi JS, Min BS. 28-Nor-oleanane-type triterpene saponins from *Camellia japonica* and their inhibitory activity on LPS-induced NO production in macrophage RAW 264.7 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010; 20: 7435-7439.

33. Kang DY, Shin MO, Shon JH, Bae SJ. 2009. The antioxidative and antimicrobial effects of *Celastrus orbiculatus*. *J Life Sci.* 2009;19: 52-57.
34. Kim HJ, Lee DJ, Ku JJ, Choi K, Park KW, Kang SH, Moon C, Lee PJ. Anti-inflammatory effect of extracts from folk plants in Ulleung island. *Korean J. Plant Res.* 2013; 26(2): 169-177.
35. Park EJ, Kim SH, Kim KS, Oh HJ. Effect of administration method on blood *Garcinia cambogia* concentration and antioxidative activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2013; 42: 856-860.
36. Park EJ, Kim SH, Kim KS, Oh HJ. Effect of administration method on blood *Garcinia cambogia* concentration and antioxidative activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2013; 42: 856-860.
37. Choe M, Kim DJ, Lee HJ, You JK, Seo DJ, Lee JH, Chung MJ. A study on the glucose-regulating enzymes and antioxidant activities of water extracts from medicinal herbs. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2008;37:542-547.
38. Lim JD, Yu CY, Kim MJ, Yun SJ, Lee SJ, Kim NY, Chung IM. Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. *Kor. J. Food Preserv.* 2004;12:191-202.
39. Lee YS. Anti-aging, antioxidant and anti-inflammation activities of *Lonicerae flos*, *Dictamni radiceis* Cotex and *Forsythiae fructus* extracts. *J. Invest. Cosmetol.* 2020;16(1):1-10.
40. Jung YT, Lee IS, Whang K, Yu MH. Antioxidant effects of *Picrasma quassioides* and *Chamaecyparis obtusa* (S. et Z.) ENDL extracts. *J Life Sci.* 2012; 22: 354-359.
41. Byeon SE, Chung JY, Lee YG, Kim BH. In vitro and in vivo anti-inflammatory effect of taheebo, a water extract from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. *Journal of Ethnopharmacology.* 2008;119:145-152.
42. Kwak HY, Lee SJ, Lee DY, Jung L, Bae NH, Hong SY, Kim GW, Baek NI. Cytotoxic and anti-inflammatory activities of lipids from the Nuruk (*Rhizopus oryze* KSD-815). *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry.* 2008;51:142-147.
43. Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Bark SW, Pak WM, Kim BR.

- Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Laminaria japonica* root on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. Korean J. Food Sci. Technol. 2014;46:729-733.
44. Kim OK. Antidiabetic effect of ethanol extract on *Codonopsis lanceolata* root in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Oil and Applied Science*. 2016; 33:271-277.
 45. Kim MJ, Kim MJ, Kim KBWR, Park SH, Choi HD, Park SY, Jang MR, Im MH, Ahn DH. Anti-inflammatory effects of ethanol extracts from *Ulva pertusa* Kjellman on LPS-induced RAW264.7 cells and mouse model. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 2016;44(4):479-487.
 46. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW: Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2 : 787-795, 2002.
 47. Miwa K, Kambara H, Kawai C. Effect of aspirin large dose on attacks of variant angina. *Am. Heart J.* 1983;105:351-355.

국문초록

동백 유래 추출물의 구강보건효능 및 생체안전성 분석

황 유 희

지도교수 : 문 성 용

조선대학교 치의생명공학

실험 배경 및 목적: 동백나무(*Camellia japonica* L.)의 잎과 꽃 추출물의 항산화 및 항염증 활성은 많이 알려져 있다. 또한, 병원성 미생물에 대한 항균 활성을 가지고 있다. 특히, 구강 내에 서식하는 구취균과 충치균에 대한 항균활성을 가지고 있어 본 연구에서는 동백나무 잎과 꽃 추출물의 항산화와 항염증의 효과를 평가하고 랫드 경구투여를 통해 안전성 평가를 진행하였으며 구강보건용품으로 활용 가능성을 분석하였다.

방법: 본 실험에서 동백나무 잎과 꽃에 항산화합물의 함량은 Folin & Denis방법으로 분석하였고 총 페놀(Polyphenol) 과 플라보노이드(Flavonoid)의 함량을 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 표기하였다. 항산화능은 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), superoxide dismutase (SOD)활성을 평가하였으며, RAW 264.7 대식세포에 Lipopolysaccharides (LPS) 처리한 후 염증 유도인자인 nitric oxide (NO)의 저해활성을 평가하였다. 추출물의 인체안전성을 확인하기 위해 Sprague-Dawley (SD) rat를 이용하여 경구독성시험을 수행하였다. 추출물을 적용한 세치제 및 구강청결제를 제조하여 물성을 평가하였다.

결과: 본 실험에서 동백 잎과 꽃 추출물에 존재하는 항산화 화합물인 폴리페놀화합물은 tannic acid을 표준물질로 측정하였으며 동백 잎과 꽃 추출물에서 각각 $186.42 \pm 2.17 \mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $139.96 \pm 0.75 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 함유하는 것으로 나타났다. Naringin을 표준물질로 측정한 플라보노이드의 경우 동백 잎과 꽃의 추출물은 각각 $116.06 \pm 1.29 \mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $53.70 \pm 2.57 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 분석되었다. ABTS radica 소거능은 $1 \text{ mg}/\text{ml}$ 의 농도에서 동

백잎은 $96.66 \pm 0.84\%$, 동백꽃은 $96.43 \pm 0.04\%$ 의 소거율을 나타내었다. DPPH radical 소거능의 경우 1 mg/ml 의 농도에서 동백잎은 $93.71 \pm 4.73\%$, 동백꽃은 $63.50 \pm 1.42\%$ 의 억제 효과를 확인하였다. SOD의 소거능을 측정한 결과 5 mg/ml 의 농도에서 동백잎은 $44.27 \pm 0.90\%$, 동백꽃은 $23.70 \pm 2.51\%$ 의 활성도를 확인하였다. 대체적으로 동백꽃보다는 동백잎에서 높은 활성을 나타냈었다. RAW 264.7 세포에서 LPS를 처리한 후 NO생성량을 측정한 결과 대조군은 $5.34\mu\text{M}$ 로 분석된 반면, 동백잎 시료를 $1, 5, 10, 20, 50$ 및 $100 \mu\text{g/ml}$ 로 처리한 결과 농도별로 각각 $3.37, 2.71, 2.66, 2.54, 2.10$ 및 $1.41\mu\text{M}$ 까지 NO 생성량이 감소하였고, 동백꽃 추출물에서는 농도별로 각각 $4.63, 4.25, 3.77, 3.49, 2.03$ 및 $1.51\mu\text{M}$ 까지 NO 생성량이 감소하였다. 추출물을 경구 투여한 rat에서 실험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물이 관찰되지 않았다. 또한 실험기간 동안 모든 시험동물에서 특이한 일반증상이 관찰되지 않았다.

이상의 실험결과를 토대로 동백나무 잎과 꽃 유래 천연물이 천연 구강케어소재로서 충분한 가치가 있고, 생체 내에서도 안전하다는 것을 검증하였다. 이와 같은 실험결과를 토대로 향후 다양한 구강보건용품 개발에 필요한 식물유래 천연소재로서 동백나무 유래 천연물의 활용가치가 높아질 것으로 사료되며, 천연물산업에서 호남지역 특산식품인 동백나무의 산업적 부가가치가 향상될 것으로 사료된다