J. of Korean Oil Chemists' Soc.,
Vol. 33, No. 2. June, 2016. 361~373
ISSN 1225-9098 (Print)
ISSN 2288-1069 (Online)
http://dx.doi.org/10.12925/jkocs.2016.33.2.361



# 와송 추출물의 항산화 활성 및 항노화 효과

정다정† · 최태부

건국대학교 일반대학원 생물공학과

(2016년 5월 13일 접수; 2016년 6월 17일 수정; 2016년 6월 23일 채택)

# Antioxidant Activities and Anti-aging Effects of *Orostachys japonicus* A. Berger Extracts

Da-Jung Jung† · Tae-Boo Choe

*Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea*
*(Received May 13, 2016; Revised June 17, 2016; Accepted June 23, 2016)*

**요 약** : 본 연구는 오래전부터 민간요법으로 암의 치료제로 사용된 약초인 와송 추출물의 항산화 활성과 항노화 효능을 검증하였다. 와송 추출물의 항산화 활성을 측정한 결과, 총 폴리페놀 함량은 100 g의 와송 추출물 건조중량 당 12 g의 높은 caffeic acid 당량이 함유되어 있는 것을 확인하였고, 총 플라보노이드 함량은 100 g의 와송 추출물 건조중량 당 1.7 g의 quercetin 당량이 함유되어 있는 것을 확인하였다. DPPH free radical 소거능은 와송 추출물 1%의 농도에서 79.7%의 높은 소거능을 확인하였다. 또한 와송 추출물의 항노화 효능 측정 결과 25 μg/mL, 50 μg/mL 농도에서 control과 유사한 MMP-1 발현 억제능을 확인하였다. 와송 추출물의 임상실험결과 와송 추출물 함유 화장품 사용군의 수분함량은 오른쪽 볼과 코, 턱의 부위에서 통계적으로 유의하게 증가하였고, 정상적인 피부의 유분 함량과 pH를 유지하는 결과를 확인하였다. 이상의 결과에 따라 와송 추출물은 항산화와 항노화 효능을 가진 천연 화장품 소재로서의 활용 가능성이 있다고 사료된다.

*주제어 : 와송, 피부개선, 항노화, 항산화, 화장품*

**Abstract** : This study tested the antioxidant activities and anti-aging effects of an extract of *Orostachys japonicus*, a herb used as a folk remedy for cancer for a long time. To assess the antioxidant activities of the *Orostachys japonicus* extract (OJE), the total polyphenol content was confirmed to have a high caffeic acid equivalent weight of 12 g by dry weight of 100g OJE and the total flavonoid content was confirmed that the quercetin equivalent of 1.7 g by dry weight of 100g OJE. DPPH free radical scavenging activity was confirmed a high scavenging activity of 79.7% at a concentration of 1%. To confirm the anti-aging effect of OJE, MMP-1 expression was decreased in 25 μL/mL and 50 μL/mL similar to control. In a clinical experiment, a group of subjects who used a cosmetic product containing OJE showed a significant increase in the amount

†Corresponding author
(E-mail: da-jung@hanmail.net)

of skin moisture from the forehead, left cheek, and chin. The experimental group showed a significant increase in the amount of skin sebum from the chin and maintaining pH balance of normal skin, As a result, the OJE demonstrates the efficacy of natural cosmetic material as antioxidant and anti-aging.

*Keywords* : Antioxidant, Anti-aging, Cosmetics, *Orostachys japonicus*

## 1. 서 론

천연물에는 다양한 생리활성 성분들이 포함되어 있고 이들 성분에 대한 항산화, 항균, 항염 등의 효능이 알려져 있으며, 화장품 및 피부미용 재료로도 다양하게 이용된다[1,2]. 천연물 유래 항산화제에 대한 연구 중 약용식물은 예로부터 일상적으로 이용되어 안정성이 입증되어 있고, 비타민, 무기질, 폴리페놀류 등 광합성 대사산물이 포함되어 있어 발암 및 노화를 예방한다고 보고되고 있다[3,4,5]. 최근에는 다양한 생리활성에 대한 관심이 증가됨과 동시에 근래에는 약용식물로부터 기능성 화장품 소재 개발 연구가 활발히 진행되고 있다[6,7,8].

다양한 약용식물 중에서도 와송(*Orostachys japonicus* A. Berger)은 돌나물과(*Crassulaceae*)의 다년생 초본식물로서 오래된 기와지붕이나 산 위의 바위에서 자생하는 일명 바위솔이라고도 불리며, 오래전부터 암치료제로 사용되어왔고 약리적으로는 혈관수축작용과 호흡흥분작용, 장의 긴장도 증강작용 등이 알려져 있다[9]. 지금까지 보고된 와송의 성분으로는 friedelin, *epi*-friedianol, glutinone, glutinol과 같은 triterpenoid류와 $\beta$-sitosterol, campesterol 등의 sterol 계열물질이 있으며 kaempferol, quercetin과 같은 flavonoid, 4-hydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, gallic acid 등의 aromatic acid와 fatty acid ester류 등의 다양한 생리활성 성분들을 포함하고 있다[10,11]. 또한 와송은 항산화 효과[12], 항균 효과[13], 세포자살 유도 효과[14], 항염증 효과[15], 항암 효과[16] 등의 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되었다.

이와 같이 와송의 성분조성이나 항암작용 등에 관한 연구는 보고되고 있으나, 항산화와 항노화에 대한 연구와 이를 바탕으로 와송 추출물 함유 화장품을 제조하여 임상적 효능을 입증한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 본 연구는 천연 약용식물로 알려진 와송 추출물의 항산화 활성과 항노화 효능에 대해 분석하고 임상실험을 통해 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다.

## 2. 실 험

### 2.1. 재료 및 추출

본 연구에 사용된 와송은 경상북도 김천에서 재배한 와송을 구매하여 시료로 사용하였다. 와송 20 g에 70% ethanol을 10배 양을 가하여 72시간 방치하여 추출하였다. 와송을 원심분리하여 여과한 다음 감압농축기를 사용하여 감압 농축한 후 동결 건조하였다. 동결 건조 후 분말로 채취하여 본 실험에 사용하였다. 와송 에탄올 추출물의 수율은(yield)은 32.5% 였다.

### 2.2. 사용시약

실험에 사용된 시약은 caffeic acid, quercetin, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), butylated hydroxy toluene (BHT), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 Sigma chemical (USA)로부터 구입하여 사용하였고, 그 외의 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

### 2.3. 사용기기

실험에 사용된 기기는 흡광도 측정을 위하여 microplate reader (Synergy-HT, BIO-TEK Instruments, USA)를 사용하였고, 세포 배양을 위하여 $CO_2$ 습윤 배양기(MCO 175, Sanyo Electric Co., Japan), 그 외 감압기(EYELA, Japan), 동결건조기(Ilshin lab co., Japan), Optizen Pop UV-Vispectrophotometer (Meccasys Instrument, Korea), Shaking incubator (Lab companion, SIF6u00R, Korea), 원심 분리기

(Hanil science industrial co., SUPRA25K, Korea)를 사용하였다.

임상실험을 위해 사용된 기기는 피부 수분을 측정하는 기기인 Corneometer CM 825 (Courage and Khazaka, Ger-many)와 피부 유분도 측정을 위하여 Sebumeter® SM 815 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Germany)를 이용하였다. 피부의 pH는 Skin-pH-meter® PH 905 (C. K electronic, Germany)을 이용하여 측정하였으며, 본 실험의 통계 처리는 SPSS Window Version 18.0 (SPSS Inc., Illinois, USA)을 이용하여 분석하였다.

### 2.4. 세포주 및 세포배양

실험에 사용한 세포로는 human dermal fibroblast (HDF)로 한국세포주은행(KCLB)에서 분양하여 사용하였으며, HDF의 세포배양은 High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma, USA)과 1% penicillin/streptomycin (Sigma, USA)을 100 IU/50 μg/mL 첨가하여 37℃로 유지되는 5% $CO_2$, 습윤 배양기에서 배양하였다.

### 2.5. 와송 추출물의 항산화 활성

#### 2.5.1. 총 폴리페놀 함량

와송 추출물의 총 폴리페놀 함량측정은 AOAC의 Folin-Denis 방법[17]을 수정하여 Folin-Ciocalteau's phenol reagent가 추출물의 페놀성 화합물에 의해 환원되어, 몰리브덴 청색으로 발색되는 원리를 이용하여 정량하였다[18]. 추출물을 0.01%, 0.025%, 0.5%, 0.1%의 농도로 희석한 후 추출물 400 μL와 Folin-Denis reagent 시약 400 μL을 혼합하여 실온에 3분간 방치한 후 10% $Na_2CO_3$를 400 μL에 혼합하여 3분간 반응시켰다. 그 다음 10% $Na_2CO_3$를 400 μL에 혼합하여 암실에서 60분간 반응시킨 후 96-well plate에 상등액 200 μL를 분주하고 microplate reader를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 caffeic acid (Sigma)를 사용하였다. 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준검량선으로부터 와송 추출물의 총 폴리페놀 함량을 caffeic acid equivalent (mg/100 g)으로 계산하였다(Fig. 1).

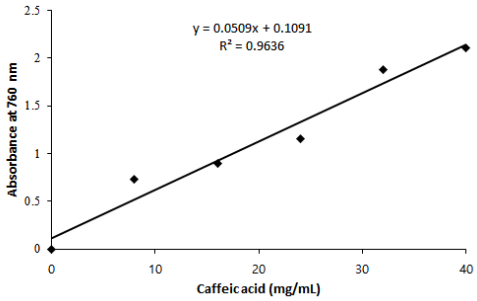


Fig. 1. Standard curve of total polyphenol content to caffeic acid.

#### 2.5.2. 총 플라보노이드 함량

와송 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Moreno 방법을 이용하여 측정하였다[19]. 추출물을 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%가 되도록 희석한 후 추출물 100 μL와 10% aluminium nitrate 20 μL, 1M potassium acetate 20 μL 및 ethanol 860 μL를 차례로 혼합하여 실온에서 40분간 방치하고, 원심분리기로 부유물을 가라앉힌 후 96-well plate 에 200 μL씩 분주하여 microplate reade를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. quercetin (Sigma)을 표준물질로 사용하였다. 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준검량선으로부터 와송 추출물의 총 플라보노이드 함량을 quercetin equivalent (mg/100 g)로 표시하였다 (Fig. 2).

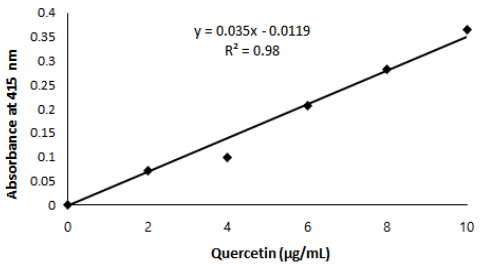


Fig. 2. Standard curve of total flavonoid content to quercetin.

#### 2.5.3. DPPH free radical 소거능

와송 추출물의 라디칼 소거활성은 Blois[20]을 이용하여 DPPH에 대한 수소공여능을 측정하였다. 시료를 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%가 되도록 희석한 후 96-well plate에 에탄올에 용해시킨 10 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-

hydrazyl, Sigma, USA)용액 180 μL와 시료액 20 μL씩 혼합하여 37℃ 인큐베이터 안에서 30분간 반응시켰다. 반응이 완료되면 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 ascorbic acid (Sigma)를 사용하였고, DPPH free radical 소거활성을 산출하였다.

DPPH radical 소거활성(%) =
[100-(첨가군 흡광도/무첨가군 흡광도)] × 100

### 2.6. MMP-1 발현 억제능 측정

와송 추출물이 MMP-1 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HDF 세포를 96-well plate에 well당 3 × $10^4$씩 부착시켜 12시간 후 상등액을 버리고 DMEM에 녹인 추출물을 농도별로 처리한 후 UVB를 100 mJ/$cm^2$로 20분간 조사하고 24시간 배양하였다. 배양 상층액 100 μL를 새로운 96-well plate에 옮긴 후 coating buffer 100 μL를 첨가하여 overnight 시켰다. 배양 상층액을 제거한 후 PBS-T (PBS, 0.05% Tween-20 함유) 200 μL로 3회 washing하고 blocking buffer (PBS, 0.1% BSA 함유) 100 μL씩 처리한 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. Blocking 후 PBS-T 200 μL로 3회 washing하고 blocking solution으로 1,000배 희석한 primary antibody (anti-MMP-1 mouse antibody)를 50 μL씩 처리 후 37℃에서 1시간 방치하였다. PBS-T 200 μL로 3회 washing 후 blocking solution으로 사용한 alkaline phosphatase가 접합된 secondary antibody (anti-mouse IgG antibody)를 4,000배 희석한 후 각 well에 50 μL씩 처리 후 37℃에서 1시간 방치하였다. PBS-T 200 μL로 3회 washing한 후 substrate인 p-nitrophenyl phosphate (9.7% diethanolamine buffer, 0.5mM $MgCl_2$, pH 9.8)를 200 μL씩 각 well에 첨가한 plate를 aluminium foil로 감싼 뒤 37℃에서 1시간 방치한다. 그 후 microplate reader를 이용하여 405 nm로 흡광도를 측정하였다.

### 2.7. 와송 추출물 화장품 제조

실험에 사용된 크림은 Table 1의 처방에 따라 제조하였다. (A)상과 (B)상을 각각 80℃까지 가온하여 완전 용해한 다음 (B)상을 (A)상에 혼합하여 호모믹서 4,000 rpm에서 15분간 교반하여

Table 1. The experimental formulation of the cosmetic product cream samples

| | Ingredients | control group | experimental group |
|---|---|---|---|
| A | D.W | up to 100 mL | up to 100 mL |
| | Hyaluronic acid | 5 | 5 |
| | Beta-glucan | 5 | 5 |
| | Glycerine | 5 | 5 |
| | EDTA-2Na | 0.01 | 0.01 |
| B | Cyclomethicone(DC345) | 2 | 2 |
| | Grape seed oil | 1 | 1 |
| | Cetearyl glucoside | 1 | 1 |
| | 1,2 Hexane diol | 3 | 3 |
| | Montanov 202 | 1 | 1 |
| | Panthenol | 1 | 1 |
| | Glyceryl stearate/PEG-300 stearate | 1 | 1 |
| | Cetearyl alcohol | 0.5 | 0.5 |
| | Dimethicone | 0.2 | 0.2 |
| | BHT | 0.03 | 0.03 |
| C | *Orostachys japonicus* Extracts | - | 1 |
| | Buthylene Glycol Dicaprylate/Dicaprate | 2 | 2 |
| | Total | 100.0 | 100.0 |

유화시켰다. 유화시킨 (C)상을 (A)상 + (B)상에 혼합하여 호모믹서 4,000 rpm에서 10분간 교반 후 점도 있는 크림 제형을 얻어 본 실험에 사용하였다. 와송 추출물 1%가 함유된 크림제형을 제조하여 임상 실험을 위한 실험군에 사용하였고, 와송 추출물이 함유되지 않은 동일 성분의 크림 제형을 제조하여 대조군에 사용하였다.

### 2.8. 임상 연구방법

임상 실험기간은 IRB 심의 통과 후(심의번호: 7001355-201510-HR-091, 승인일: 2015.11. 18.) 총 4주간 진행하였다. 임상연구 대상은 피부질환 및 과민반응이 없는 30 - 50대 여성 24명을 선정하였다. 임상 집단의 결과에 대한 변이를 최소화하고자 무선배정으로 대조군(와송 추출물을 함유하지 않은 화장품 사용 그룹)과 실험군(와송 추출물 1%를 함유한 화장품 사용 그룹) 각 12명씩 두 그룹으로 나누었다. 실험기간에는 기존에 사용하던 기초 화장품의 사용을 중지하고 동일한 세안제와 기초화장품을 제공하여 본 연구와 관련되는 제품만을 사용하도록 하였다. 연구 대상자들은 아침, 저녁으로 크림을 1일 2회 사용하였고, 정상 피부의 각화주기인 28일을 기준으로 총 4주간 사용하여 전과 사용 후의 피부 변화를 측정하여 비교하였다. 피부 측정을 위해서 동일한 세안제((주)O사, 클렌저)를 사용한 후 실내온도 20 - 22℃, 실내습도 40 - 60%를 일정하게 유지하여 세안 후 1시간이 경과된 후에 측정하였다. 측정 시에는 부위를 얼굴의 이마(미간 위 3 cm 지점), 오른쪽 볼(코 옆에서 3c m 지점), 왼쪽 볼(코 옆에서 3 cm 지점), 코(콧망울 오른쪽 중앙), 턱(아랫입술 중앙 아래 2 cm 지점)으로 나누어 측정하였으며 정확도를 높이고자 측정 시 항상 일정한 부위를 3회 반복하여 측정하여 평균값을 사용하였다.

### 2.9. 피부자극도 시험

피부에 대한 안정성 평가는 30 - 50대 여성 24명을 대상으로 제조된 크림에 대하여 피부 자극도 시험을 실시하였다. 실험군의 상완의 안쪽에 0.5 mL의 와송 추출물을 함유한 크림을 사용하고 대조군은 상완의 안쪽에 0.5 mL의 와송 추출물을 함유하지 않은 크림을 사용하여 30분 후 가량 경과한 후에 이상 증상을 살펴보았다.

### 2.10. 피부 수분함량과 유분함량 및 pH 측정

피부의 수분은 전기용량(capacitance)을 측정하여 피부 수분을 측정하는 기기인 Corneometer CM 825를 이용하여 측정하였고, 피부 유분도 측정을 위하여 Sebumeter® SM 815를 이용하여 유분 함량을 측정하였다. 피부의 pH는 Skin-pH-meter® PH 905을 이용하여 측정하였다.

측정 시에는 정확도를 높이고자 일정한 부위를 3회 반복 측정하여 평균값을 기록하였고, 동일인이 처음부터 끝까지 피부의 수분함량과 유분함량 및 pH를 사용 전과 사용 4주 후에 측정하였다.

### 2.11. 통계처리

와송 추출물의 항산화 활성 및 항노화 실험 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 표기 하였으며, 통계 처리는 SPSS Window Version 18.0을 이용하여 분석하였다. 군 간의 유의성 검증은 Student's $t$-test로 실시하였고 $p$ 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다. 와송 추출물에 대한 임상적 효능을 검증하기 위해 실험군과 대조군에게 동일한 조건하에 3회 반복 측정하여 평균값을 기록하였고, 실험과정에 표기된 모든 자료는 평균±표준편차(mean±SD)로 표기하였다. 자료 분석에 앞서 두 집단에 대한 동질성 검사를 실시하였으며, 와송 추출물에 대한 효과 검정을 위해 사전과 사후에 대한 집단 간(대조군 vs 실험군) 차이는 paired $t$-test로 실시하였고, $p < 0.05$를 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 항산화 활성

#### 3.1.1. 총 폴리페놀 함량

폴리페놀에는 페놀산(phenolic acid)과 같은 간단한 분자로부터 탄닌과 같은 고분자화합물들이 포함된다. 이들 중 특히 플라본 계열의 화합물들은 항산화작용[21,22], 항암작용[23] 및 혈전용해작용[24] 등 다양한 생리활성 기능을 가진 것으로 알려져 있다.

와송 추출물의 총 폴리페놀 함량은 caffeic acid를 표준물질로 측정하였다. 그 결과 100 g의 와송 추출물 건조중량 당 12 g의 높은

caffeic acid 당량이 함유되어 있는 것을 확인하였다(Fig. 3).

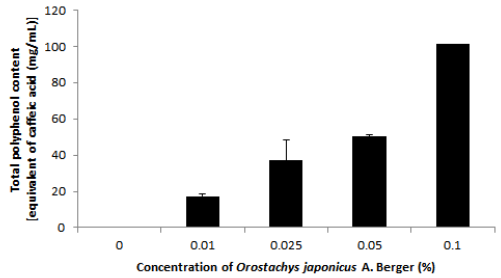


Fig. 3. The total polyphenol concentration of Orostachys japonicus A. Berger extract. Values represent the mean±SD.

와송의 잎, 줄기 및 뿌리 추출물의 항산화 활성을 측정한 Lee et al.[25]의 연구에서 와송의 잎에서 14.6 mg/g 로 폴리페놀 함량이 높았다고 보고하였고, 20 여종의 약용식물류의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량과의 항산화 활성의 상관관계에 대한 연구에서 폴리페놀의 함량이 플라보노이드보다 많을수록 항산화 활성이 높고, 폴리페놀의 함량이 높을수록 항산화 활성이 높아지는 농도의존성 상관관계를 보여[26], 폴리페놀의 양과 추출물의 항산화 활성과는 관련성이 있다고 본다.

본 실험에서도 총 폴리페놀과 총 플라보노이드의 함량이 기존의 연구와 유사한 결과를 나타내었고, 와송 추출물의 높은 폴리페놀 함량은 생리활성을 증가시키고, 항산화 효과에 영향을 미칠 것이라고 사료된다.

### 3.1.2. 총 플라보노이드 함량

플라보노이드는 2차 대사산물로 산화적 스트레스, 활성산소종과 NO 생성 억제능, 지방질의 산화를 막는 역할을 한다[27]. 또한 암과 심장질환, 노화방지 등을 예방하는 효과가 있어 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등 많은 분야에서 활용되고 있다[23, 28].

와송 추출물의 총 플라보노이드 함량은 quercetin 을 표준물질로 하여 측정하였다. 그 결과 100 g 의 와송 추출물 건조중량 당 1.7 g 의 quercetin 당량이 함유되어 있는 것을 확인하였다(Fig. 4).

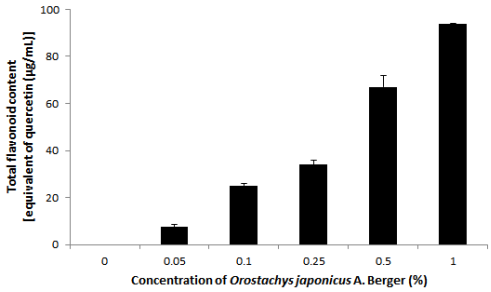


Fig. 4. The total flavonoid concentration of Orostachys japonicus A. Berger extract. Values represent the mean±SD.

Ahn et al.[29]의 연구에서 와송의 에탄올과 메탄올 추출 결과 에탄올 추출물에서는 84.03 mg/100g, 메탄올 추출물은 73.44 mg/100g 의 플라보노이드의 함량을 나타내었다. Choi[30]의 9 월-11 월에 채취한 와송의 메탄올 추출물로 플라보노이드를 측정한 연구에서는 1,012 mg/100g-1,324 mg/100g 의 높은 플라보노이드 함량을 나타내었다.

본 실험에서 총 폴리페놀 함량이 총 플라보노이드 함량보다 높았으며, 연구에 따라 총 플라보노이드의 함량이 상이한 결과는 추출 용매와 채취 시기, 건조방법 등에 따라 차이가 있을 것이라고 사료된다.

### 3.1.3. DPPH radical 소거능

DPPH free radical 소거 활성법은 식물추출물의 항산화 활성을 쉽게 측정할 수 있으며, 실제로 항산화 활성과 연관성이 매우 높다고 알려져 있다[31].

와송 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하여 전자공여능으로 나타내었다(Fig. 5). 와송 추출물은 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%의 농도로 사용하였으며, DPPH radical 소거능을 측정한 결과 43.0%, 49.7%, 52.2%, 62.4%, 79.7%로 와송 추출물의 농도가 증가함에 따라 DPPH 소거능이 상승하는 것을 확인하였다. 특히 1%의 농도에서 79.7%의 높은 소거능을 확인하였다.

Kim[9]의 연구에서 약용식물을 통한 DPPH radical 소거작용을 측정한 결과 대조군으로 BHT 의 항산화 활성이 61.1%에 비하여 와송 추출물 88.75%, 황백 추출물 88.75%, 양제근 추출

물 87.2%로 와송 추출물의 높은 항산화 활성을 나타내었다. Kang et al.[32]의 연구결과에 의하면 DPPH radical 소거 활성은 페놀산, 플라보노이드 및 기타 페놀성 물질에 의한 항산화 작용이며, 이러한 물질의 환원력이 클수록 DPPH radical 의 소거활성이 크다는 보고가 있다.

본 연구에서도 기존연구와 유사한 DPPH radical 소거능을 나타내어 와송 추출물의 항산화 활성 효능을 입증하였다.

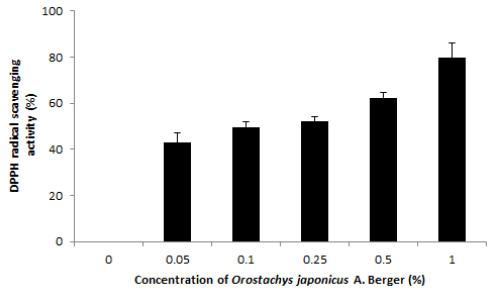


Fig. 5. The DPPH radical scavenging activity of Orostachys japonicus A. Berger extract.

### 3.2. 항노화 효과

피부노화의 원인 중 한 요소인 MMP-1 은 정상적인 콜라겐을 분해시키는 주요 효소로 노화된 세포에서 주로 발견되며[33], MMP-1 의 과도한 활성은 이를 억제하는 효소 tissue inhibitor of MMPs (TIMP)에 의해 상호 조절 작용이 이루어져 항상성이 유지된다[34].

와송 추출물이 HDF 세포에서 MMP-1 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, HDF 세포에 UVB 100 mJ/cm$^2$ 를 조사하여 시료 무 처리 군을 control 로 설정하고 와송 추출물을 농도별로 처리하였다(Fig. 6). UVB (100 mJ/cm$^2$)가 조사된 HDF 세포에서 와송 추출물이 MMP-1 발현에 미치는 영향을 나타낸 결과 HDF 세포에 자외선을 조사 했을 때, 와송 추출물 농도 6.25 μg/mL, 12.5 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL 에서 69.82%, 54.15%, 47.99%, 46.91%로 MMP-1 발현이 감소하였다. 특히 25 μg/mL 와 50 μg/mL 에서는 control 과 유사한 MMP-1 발현 억제를 확인하였다.

인체의 주름 생성은 MMP-1 효소가 매우 중요한 인자로 작용하며 MMP-1 의 발현을 저해하는 화합물은 주름개선 기능성 화장품으로 효과가 있다고 보고되고 있다[35,36]. 본 연구에서도 낮은 농도의 와송 추출물에서 MMP-1 발현 억제율과 농도가 증가함에 따라 대조군과 유사한 수치를 나타낸 결과에 따라 와송 추출물은 노화와 관련된 기능성 화장품 소재로서 활용이 가능할 것이라고 사료된다.

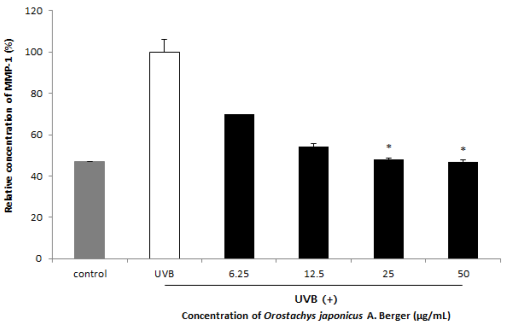


Fig. 6. Inhibitory effect of *Orostachys japonicus* A. Berger extract on the MMP-1 of UV-B irradiated HDF cells.

### 3.3. 화장품 임상 효능 평가

#### 3.3.1 대조군과 실험군 동질성 검증

제품 사용 전 대조군과 실험군의 동질성 검증을 시행한 결과 Table 2 와 같다. 두 그룹 간 피부 부위별 수분함량과 유분함량 및 pH 값 총 15 가지 항목을 분석하였고, 각 군의 실험 전 피부상태 분석 결과를 토대로 두 군의 동질성을 산출한 결과 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

#### 3.3.2. 피부 수분

와송 추출물이 얼굴 피부의 수분함량에 미치는 효과를 평가하기 위하여 와송 추출물이 함유되지 않은 크림을 사용한 대조군과 와송 추출물이 함유된 크림을 사용한 실험군의 실험전과 4 주간 제품을 사용한 후의 수분함량의 변화를 측정하였다. 사용 전과 사용 후의 수분함량 변화는 이마, 오른쪽 볼, 왼쪽 볼, 코, 턱 부위를 측정하였고 종합적인 변화량을 평균값으로 분석한 결과는 Table 3 과 같다.

Table 2. Homogeneity of Characteristics between Control Groups and Experimental Groups

| Variables | Body parts | Groups | | t | *p* |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Control | Experimental | | |
| | | Mean ± SD | Mean ± SD | | |
| Moisture | Forehead | 55.69 ± 6.17 | 56.16 ± 8.12 | −0.164 | 0.873 |
| | Cheek(R) | 55.23 ± 8.84 | 54.18 ± 6.89 | 0.373 | 0.716 |
| | Cheek(L) | 53.61 ± 9.68 | 51.67 ± 10.71 | 0.645 | 0.532 |
| | Nose | 38.04 ± 10.86 | 33.42 ± 7.67 | 1.062 | 0.311 |
| | Chin | 59.20 ± 9.27 | 56.36 ± 6.27 | 0.910 | 0.382 |
| Sebum | Forehead | 70.42 ± 5.44 | 78.00 ± 6.76 | −0.410 | 0.689 |
| | Cheek(R) | 43.33 ± 3.74 | 46.50 ± 4.67 | −0.251 | 0.806 |
| | Cheek(L) | 38.67 ± 3.39 | 45.50 ± 5.64 | −0.391 | 0.703 |
| | Nose | 106.92 ± 7.96 | 75.50 ± 5.43 | 1.111 | 0.290 |
| | Chin | 73.25 ± 4.03 | 67.25 ± 5.66 | 0.297 | 0.772 |
| pH | Forehead | 5.08 ± 0.46 | 5.23 ± 0.49 | −0.879 | 0.398 |
| | Cheek(R) | 5.40 ± 0.32 | 5.41 ± 0.42 | −0.070 | 0.945 |
| | Cheek(L) | 5.36 ± 0.34 | 5.39 ± 0.38 | −0.229 | 0.823 |
| | Nose | 5.02 ± 0.37 | 5.06 ± 0.52 | −0.236 | 0.818 |
| | Chin | 5.27 ± 0.42 | 5.34 ± 0.44 | −0.526 | 0.609 |

Table 3. Changes in face skin moisture of control groups and experimental groups

| Groups | Face parts | Pre-test | Post-test | t | *p* |
|---|---|---|---|---|---|
| Control | Forehead | 55.69 ± 6.17 | 55.60 ± 9.18 | 0.047 | 0.963 |
| | Cheek(R) | 55.23 ± 8.84 | 57.84 ± 8.80 | −1.829 | 0.095 |
| | Cheek(L) | 53.61 ± 9.68 | 56.45 ± 15.23 | −0.590 | 0.567 |
| | Nose | 38.04 ± 10.86 | 40.15 ± 12.30 | −0.538 | 0.602 |
| | Chin | 59.20 ± 9.27 | 61.28 ± 6.06 | −1.148 | 0.275 |
| Experimental | Forehead | 56.16 ± 8.12 | 57.74 ± 8.25 | −0.529 | 0.607 |
| | Cheek(R) | 54.18 ± 6.89 | 59.27 ± 7.67 | −2.240 | 0.047* |
| | Cheek(L) | 51.67 ± 10.71 | 54.40 ± 7.81 | −0.749 | 0.470 |
| | Nose | 33.42 ± 7.67 | 42.37 ± 13.20 | −3.137 | 0.009** |
| | Chin | 56.36 ± 6.27 | 63.43 ± 8.30 | −2.493 | 0.030* |

Values are mean±SD (n=12). *$p$<0.05, **$p$<0.01, compared between before and after 4-weeks treatment.

얼굴 피부의 수분함량은 대조군의 경우 제품 사용 후 모든 부위에서 통계적으로 유의한 변화가 없었던 반면, 실험군의 경우는 오른쪽 볼($p<0.05$)과 코($p<0.01$) 및 턱($p<0.05$)에서 통계적으로 유의하게 증가하였다(Table 2).

피부의 수분은 각질세포의 주성분인 케라틴(keratin, 58%)과 각질 세포간 지질(lipid, 11%), 천연보습인자(natural moisturizing factor; NMF, 31%) 등에 의해 피부의 수분이 유지된다[37]. 일반적으로 노화된 피부는 건조하고 거친 비늘 모양의 외관으로 이는 손상된 피부장벽으로 인한 각질층의 수분 감소에 기인한 것으로서[38], 본 연구 결과 와송 추출물을 함유한 크림은 정상적인 수분함량을 유지시켜 피부 보습과 피부장벽의 기능에 도움을 주는 것으로 사료된다.

### 3.3.3. 피부 유분

와송 추출물이 얼굴 피부의 유분함량에 미치는 효과를 평가하기 위하여 와송 추출물이 함유되지 않은 크림을 사용한 대조군과 와송 추출물이 함유된 크림을 사용한 실험군의 실험전과 4주간 사용한 후의 유분함량의 변화를 측정하였다. 사용 전과 사용 후의 유분함량의 변화는 이마, 오른쪽 볼, 왼쪽 볼, 코, 턱에서 측정하였고 종합적인 변화량을 평균값으로 분석한 결과는 Table 4와 같다.

얼굴 피부의 유분함량은 대조군의 경우는 제품 사용전과 후에 모든 부위에서 유의한 차이를 나타내지 않았던 반면, 실험군의 경우 턱($p<0.05$) 부위 에서 통계적으로 유의하게 증가하였으며 전체적인 부위에서 정상적인 피부의 유분함량 수치에 해당하는 결과를 확인하였다.

피부의 각질층은 산성 지방막으로 이루어져 있으며 피지선을 통해 분비되는 피지 및 땀으로 구성되어 유화작용 및 피부를 윤택하게 한다. 피지의 감소는 피부의 건조, 주름, 탄력 저하, 노화 등의 문제를 유발하며 지나치게 증가되면 문제성 피부가 된다. 그러므로 피지 분비의 정도는 피부 상태 평가지표에 있어서 매우 중요한 요소가 된다[39].

본 연구에서 와송 추출물을 함유한 크림은 정상적인 피부의 유분 함량 유지에 효과적임과 동시에 피부의 표면의 수분함량 유지와 pH에도 연관이 있을 것이라고 사료된다.

### 3.3.4. 피부 pH

와송 추출물이 얼굴 피부의 pH에 미치는 효과를 평가하기 위하여 와송 추출물이 함유되지 않은 크림을 사용한 대조군과 와송 추출물이 함유된 크림을 사용한 실험군의 실험전과 4주간 사용한 후의 pH의 변화를 측정하였다. 사용 전과 사용 후의 pH의 변화는 이마, 오른쪽 볼, 왼쪽

Table 4. Changes in face skin sebum of control groups and experimental groups

($\mu g/cm^2$)

| Groups | Face parts | Pre-test | Post-test | t | $p$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Control | Forehead | 70.42 ± 5.44 | 86.58 ± 7.97 | -1.528 | 0.155 |
| | Cheek(R) | 43.33 ± 4.74 | 34.08 ± 8.83 | 1.413 | 0.185 |
| | Cheek(L) | 38.67 ± 3.39 | 38.00 ± 6.40 | 0.140 | 0.891 |
| | Nose | 106.92 ± 7.96 | 99.17 ± 8.72 | 0.583 | 0.572 |
| | Chin | 73.25 ± 4.03 | 93.33 ± 7.87 | -2.003 | 0.070 |
| Experimental | Forehead | 78.00 ± 6.76 | 87.83 ± 6.17 | -1.011 | 0.334 |
| | Cheek(R) | 46.50 ± 4.67 | 69.42 ± 2.83 | -1.823 | 0.095 |
| | Cheek(L) | 45.50 ± 5.64 | 60.58 ± 3.06 | -1.596 | 0.139 |
| | Nose | 75.50 ± 5.43 | 86.92 ± 6.13 | -1.158 | 0.271 |
| | Chin | 67.17 ± 5.66 | 88.08 ± 5.24 | -2.615 | 0.024* |

Values are mean±SD (n=12). *$p<0.05$, compared between before and after 4-weeks treatment.

볼, 코, 턱 부위에서 측정하였고 종합적인 변화량을 평균값으로 분석한 결과는 Table 4 와 같다.

얼굴 피부의 pH 는 대조군의 경우는 제품 사용 후 모두 유의하게 감소하였으며, 실험군의 경우 코($p$<0.05)의 부위에서 통계적으로 유의하게 감소하였다(Table 6).

피부의 pH 는 피부 미생물의 대사산물, 피지의 지방산, 한선에서 분비되는 산성 분비물에 의해 생성되는 피부 표면의 산도로서[40], 피부표면의 pH 는 피부 각질층의 얇은 산성막에 의해서 조절되며 피부 수분 보유력과도 관련이 있다[41].

대조군의 경우 실험 전과 후에 pH 수치가 유의적인 감소를 나타냈으나 정상피부의 수치는 pH 4.5 - pH 5.5 의 범위로 대조군과 실험군의 경우 정상피부의 pH 의 수치 범위에 해당하므로 각 군에서의 화장품 사용은 피부에 유해하지 않으며, 정상피부의 pH 의 유지에 효과가 있다고 본다. 또한 와송 추출물을 함유한 크림은 정상적인 피부의 pH 를 유지시켜 피부 수분함량의 증가에 도움을 주어 피부 보호에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

## 4. 결 론

본 연구는 천연 약용식물인 와송 추출물의 생리활성 분석을 통해 화장품 소재로서의 가능성에 대해 검증하고자 항산화 활성과 항노화 효능을 확인하였다. 와송 추출물의 항산화 활성을 측정한 결과, 총 폴리페놀 함량은 100 g의 와송 추출물 건조중량 당 12 g의 높은 caffeic acid 당량이 함유되어 있는 것을 확인하였다. 총 플라보노이드 함량은 100 g의 와송 추출물 건조중량 당 1.7 g의 quercetin 당량이 함유되어 있는 것을 확인하였다. DPPH radical 소거능은 농도 의존적으로 증가하는 결과를 보였으며, 특히 1%의 농도에서 79.7%의 높은 소거능을 확인하였다. 와송 추출물의 항노화 효능을 확인하기 위하여 UVB (100 mJ/cm$^2$)가 조사된 HDF 세포에 와송 추출물의 MMP-1 발현에 미치는 영향을 나타낸 결과 와송 추출물의 농도가 증가함에 따라 MMP-1 발현이 감소하였으며, 특히 25 $\mu$g/mL과 50 $\mu$g/mL에서는 control과 유사하게 MMP-1 발현이 감소하였음을 확인하였다.

와송 추출물의 임상적 효능에 대해 입증하기 위해 와송 추출물을 1% 함유한 화장품을 제조한 후 30 - 50대 여성 24명을 대상으로 실험군과 대조군으로 각각 12명씩 구분하여 피부의 수분함량, 유분함량, pH를 측정하여 피부 부위별 개선효과를 확인하였다. 와송 추출물 함유 화장품 사용군의 피부 수분함량이 실험전에 비해 오른쪽 볼과 코 및 턱의 부위에서 통계적으로 유의한 증가를 보였으며, 유분함량의 경우 실험군의 모든 부위에서 정상적인 피부의 유분함량 수치를 확인

Table 6. Changes in face skin pH of control groups and experimental groups

| Groups | Face parts | Pre-test | Post-test | t | $p$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Control | Forehead | 5.08 ± 0.13 | 4.59 ± 0.14 | 3.946 | 0.002** |
| | Cheek(R) | 5.40 ± 0.09 | 4.90 ± 0.11 | 5.078 | 0.000*** |
| | Cheek(L) | 5.36 ± 0.10 | 4.93 ± 0.12 | 3.305 | 0.007** |
| | Nose | 5.02 ± 0.11 | 4.44 ± 0.13 | 4.894 | 0.000*** |
| | Chin | 5.27 ± 0.12 | 4.67 ± 0.13 | 3.664 | 0.004** |
| Experimental | Forehead | 5.23 ± 0.14 | 4.97 ± 0.14 | 1.962 | 0.076 |
| | Cheek(R) | 5.41 ± 0.12 | 5.21 ± 0.09 | 1.773 | 0.104 |
| | Cheek(L) | 5.39 ± 0.11 | 5.23 ± 0.10 | 1.433 | 0.180 |
| | Nose | 5.06 ± 0.15 | 4.68 ± 0.10 | 3.075 | 0.011* |
| | Chin | 5.34 ± 0.13 | 5.03 ± 0.12 | 1.980 | 0.073 |

Values are mean±SD (n=12). *$p$<0.05, **$p$<0.01, ***$p$<0.001, compared between before and after 4-weeks treatment.

하였다. 또한 실험군의 pH는 실험전과 실험후 모두 정상 수치의 범위에서 변화가 크지 않았다.

와송 추출물을 통한 실험 결과에 따라 와송 추출물의 페놀화합물은 항산화 작용을 통해 천연 항산화제 기능을 가지며, 이는 항노화 효과에도 연관성이 있다고 사료된다. 또한 피부의 정상적인 수분함량과 유분함량, pH의 수치는 피부보호와 노화 예방에도 영향을 미칠 것이라고 본다. 이상의 결과에 따라 와송 추출물은 항산화와 항노화 효능을 가진 화장품 소재로서의 개발 가능성이 있다고 사료된다.

## References


1. G. M. Ahn, T. W. Kang, J. H. Jeong, B. K. Jo, Clinical studies on the anti-irritation effects of Mung Bean (*Phaseolus aureus*) extract in cosmetics. *J Soc Cosmet Scientists Kor* **30(1)**, 23-28 (2004).
2. M. H. Song, J. T. Bae, G. S. Lee, Y. H. Zhang, H. B. Pyo, A study on the *Azolla imbricata* using as a cosmetic active ingredient. *J Soc Cosmet Scient* **36(1)**, 71-77 (2010).
3. S. E. Kim, S. R. Kang, M. S. Park, Y. C. Kim, Alleviating effects of *Cnidium officinale* water extract on skin barrier and inflammation in hairless mouse. *J Invest Cosmetol* **7(2)**, 137-145 (2011).
4. I. S. Bae, M. J. Shim, J. Y. Lee, Y. C. Kim, Application tests of *Phellodendrin cortex* water extract as functional cosmetic raw materials. *J Invest Cosmetol* **8(1)**, 1-8 (2012).
5. S. E. Kim, Y. C. Kim, Inhibitory effect of *Cnidium officinale* water extract on the skin wrinkle formation in hairless mouse. *J Invest Cosmetol* **9(3)**, 203-211 (2013).
6. S. J. Yang, T. B. Choe, Antioxidant Activity and Whitening Effect of *Forsythiae Fructus* Extracts. *J Medicinal Crop Sci.* **19(6)**, 472-477 (2011).
7. G. N. Lim, M. A. Park, S. N. Park, Antioxidative and Antiaging Effects of *Sorbus commixta* Twig Extracts. *J Medicinal Crop Sci.* **28(4)**, 482-490 (2011).
8. M. H. Kim, T. B. Choe, Anti-oxidant Activity of *Akebia quinata* fruit extract and the Effects of Skin. *J Medicinal Crop Sci.* **32(3)**, 439-450 (2015).
9. D. A. Kim, Anti-microbial and antioxidative activities of extracts from herbal medicine for cosmetics. Master's thesis, Department of Chemistry and Engineering, Konkuk University, Seoul, Republic of Korea, pp. 1-83 (2010).
10. H. J. Park, S. C. Lim, M. S. Lee, H. S. Young, Triterpene and steroids from *Orostachys japonicus*. *Kor J Pharmacogn* **25(1)**, 20-23 (1994)
11. S. Y. Choi, J. G. Kim, N. J. Sung, Studies on the physicochemical characteristics and NDMA formation of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Korean J Food & Nutr* **21(20**, 148-156 (2008).
12. S. J. Lee, J. K. Seo, J. H. Shin, H. J. Lee, N. J. Sung, Antioxidant activity of Wa-song (*Orostachys japonicus* A. Berger) according to drying methods. *J Kor Soc Food Sci Nutr* **37(5)**, 605-611 (2008).
13. S. Y. Yoon, S. Y. Lee, K. B. W. R. Kim, E. J. Song, S. J. Kim, S. J. Lee, C. H. Lee, D. H. Ahn, Antimicrobial activity of the solvent extract from different parts of *Orostachys japonicus*. *J Kor Soc Food Sci Nutr* **38(1)**, 14-18 (2009).
14. H. Kwon, K. S. Han, Effects of *Orostachys japonicus* A. Berger on the immune system. *Kor J Medicinal Corp Sci* **12(4)**, 315-320 (2004).
15. H. S. Lee, D. S. Ryu, G. S. Lee, D. S. Lee, Anti-inflammatory effects of dichloromethane fraction from *Orostachys japonicus* in RAW 264.7 cells: suppression of NF-kB activation and MAPK signaling. *J Ethnopharmacol* **140(2)**, 271-276 (2012).
16. Y. S. Won, J. H. Lee, S. J. Kwon, D. U. Ahn, D. Y. Shin, K. I. Seo, Anticancer effects of cultivated *Orostachys japonicus* on human prostate cancer cells. *J Kor Soc*

*Food Sci Nutr* **43(1)**, 67-73 (2014).
17. O. Folin, W. Denis, On phosphotungstic-phosphomoiybdic compounds ascolorregents. *J Biochem*, **12(2)**, 239-249 (1912).
18. T. Gutfinger, Polyphenols in olive oils. *J American. Oil Chem Soc*, **58(11)**, 966-968 (1981).
19. M. I. Moreno, M. I. Isla, A. R. Sampietro, M. A. Vattuone, Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several region of argentina. *J Ethnophamacol*, **71(1)**, 109-114 (2000).
20. M. S. Blois, Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **181(4617)**, 1199-1200 (1958).
21. E. N. Frankel, J. B. German, J. E. Kinsella, E. Parks, J. Kanner, Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine, *J Lancet*, **341(8843)**, 454-457 (1993).
22. C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radic bio med*, **20(7)**, 933-956 (1996).
23. J. B. Harborne, C. A. Williams, Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*. **55(6)**, 481-504 (2000).
24. R. J. Gryglewski, R. Korbut, J. Robak, J. Swies, On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem pharmacol*, **36(3)**, 317-322 (1987).
25. S. J. Lee, E. J. Song, S. Y. Lee, K. B. W. R. Kim, S. J. Kim, S. Y. Yoon, C. J. Lee, D. H. Ahn, Antioxidant Activity of Leaf, Stem and Root Extracts from *Orostachys japonicus* and Their Heat and pH Stabilities, *J Korean Soc Food Sci Nutr,* **38(11)**, 1571-1579 (2009).
26. E. Y. Kim, I. H. Baik, J. H. Kim, S. R. Kim, M. R. Rhyu, Screening of the Antioxidant Activity of Some Medicinal Plants ,*Kor J Food Sci. Technol,* **36(2)**, 333-338 (2004).
27. I. H. Baek, Antioxidant activity and skin improvement effects of Smilacis glabrae Rhizoma extracts. Major of Esthetics, Department of Beauty Art, The Graduate School of Seokyeong University (2012).
28. S. K. Kim, Study on the anti-atherosclerosis functional materization of natural antioxidant from the aerial part of Saururus chinensis Baill. Department of Food Science and Technology Graduate School, Kyungpook National University (2009).
29. H. Y. Ahn, D. J. Choe, Y. S. Cho, Antioxidant Activity and Chemical Characteristics of Orostachys malaco-phyllus and Fermented. *J Life Science,* **25(5)**, 577-584 (2015).
30. S. Y. Choi, Effect of Orostachys japonicus extracts on antioxidative activity and N-nitrosodimethylamine formation. Department of Food Science and Nutrition, College of Natural Science, Gyeongsang National University, Master's thesis (2006).
31. Y. H. Jeon, M. H. Kim, M. R. Kim, Antioxidative, Antimutagenic, and Cytotoxic Activities of Ethanol Extracts from Cornus officianalis. *J Korean Soc Food Sci Nutr,* **37(1)**, 1-7 (2008).
32. H. S. Kang, J. S. Kang, W. S. Jeong, Cytotoxic and Apoptotic Effects of Saponins from Akebia quinata on HepG2 Hepatocarcinoma Cells. *Kor J. Food Preserv*. **17(3)**, 311-319 (2010).
33. S. K. Park, Studies on the proteome profiling for anti-aging efficacy of polypeptides from Astragalus membranaceus Bunge. Aju University, D. Thesis (2015).
34. Y. A. Choi, Signaling pathway of MMP-2 in fibroblast migration and chondrogenic differentiation. Department of Biology, major in Zoology, The Graduate School (2007).
35. Farwick M, Watson RE, Rawlings AV, Wollenweber U, Lersch P, Bowden JJ, Salicyloyl-phytosphingosine: a novel agent

for the repair of photoaged skin. *Int J. Cosmet Sci*, **29(4)**: 319-329, 2007.
36. Maity N, Nema NK, Abedy MK, Sarkar BK, Mukherjee pK. Exploring Tagetes erecta Linn flower for the elastase, hyaluronidase and MMP-1 inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.,* **137(3)**: 1300-1305, 2011.
37. Y. K. Muramatsu, K. Shita, Water and skin and NMF. *Frag J*, **13**, 518 (1993).
38. R. Ghadially, B. E. Brown, S. M. Sequeira-Martin, K. R. Feingold, P. M. Elias, The aged epidermal permeability barrier: Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J Clinical Investigation*, **95(5)**, 2281-2290 (1995).
39. R. Blanken, M. I. van Vilsteren, R. A. Tupker, P. J. Coenraads, Effect of mineral oil and linoleic-acid-containing emulsions on the skin vapour loss of sodium-lauryl-sulphate-induced irritant skin reactions. *Contact dermatitis*, **20(2)**, 93-97 (1989).
40. J. W. Fluhr, M. J. Behne, B. E. Brown, D. G. Moskowitz, C. Selden, M. Mao-Qiang, T. M. Mauro, P. M. Elias, K. R. Feingold, Stratum corneum acidification in neonatal skin: Secretory phospholipase A2 and the sodium/ hydrogen antiporter -1 acidify neonatal rat stratum corneum. *J Invesitigative dermatology*, **122(2)**, 320-329 (2004).
41. A. K. Han, J. S. Won, O. S. Kim, Skin Hydration Status and Skin Surface pH According to the Body Parts of the Aged with Immobilization. *J Kor Acad Fundam Nurs*, **17(3)**, 314-323 (2010).