

Essential Oils의 항산화 활성 및 미백작용

임혜원[†] · 김주연

서경대학교 미용예술학과
(2005년 5월 31일 접수, 2005년 6월 29일 채택)

Antioxidant and Whitening Activity of Essential Oils

Hye-won Lim[†] and Ju-yeon kim

Department of Beauty Arts, Seokyeong University 660-21, Yeoksam-Dong, Gangnam-Ku, Seoul 135-913, Korea
(Received May 31, 2005; Accepted June 29, 2005)

요약: Citrus essential oil (bergamot, grapefruit, lemon, mandarin, petigrain)이 B16 melanoma 세포에서 melanin 생성에 미치는 영향과 RBL 2H3 비만세포에서 ROS 생성에 미치는 영향을 관찰하였다. 5 종류의 citrus essential oil은 DPPH 라디칼 소거와 세포 증식 및 독성에서 대조군에 비해 유의한 변화를 일으키지 않았다. 정제한 tyrosinase 활성에 있어서 mandarin과 petigrain essential oil은 유의하게 tyrosinase 활성을 억제하였으나 bergamot은 전혀 억제하지 않았다. 이러한 결과는 mandarin과 petigrain essential oil이 tyrosinase 효소 억제 기전은 설명하지 못하지만 tyrosinase 효소에 직접적으로 작용하여 억제하는 것으로 보인다. B16 melanoma 세포에서 MSH에 의한 melanin 생성이 5 종류의 citrus essential oil에 의해 모두 농도 의존적으로 억제되었다. Bergamot essential oil은 tyrosinase 효소 활성을 직접적으로 억제하지는 못했지만 melanoma 세포에서 MSH에 의한 melanin 생성은 억제하는 것으로 나타났다. 다른 4종류의 citrus essential oil도 모두 tyrosinase 효소 활성을 억제하였으며, MSH에 의한 melanin 생성도 억제하였다. 한편 DCF-DA를 이용한 ROS 생성에 있어서는 madarin essential oil은 ROS 생성에 이렇다 할 영향을 주지 않았지만 다른 4개의 essential oil (Bergamot, Grapefruit, Lemon, Petigrain)은 농도 의존적으로 ROS 생성을 증가시켰다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 citrus essential oil은 MSH에 의한 melanin 생성을 억제하는 것으로 보아 미백제로서의 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다.

Abstract: This study is performed to investigate the effects of citrus essential oils on melanin production in B16 melanoma cells and reactive oxygen species (ROS) generation in RBL 2H3 cells. Five kinds of citrus essential oil (bergamot, grapefruit, lemon, mandarin, petigrain) did not have any influence on DPPH radical scavenger activity, cell growth and cytotoxicity in B16 melanoma cells. In purified tyrosinase assay, both mandarin and petigrain essential oils dose-dependently inhibited its activity, but bergamot did not. In 1 μ M α -MSH-stimulated B16 melanoma cells, all of 5 citrus essential oils inhibited melanin production in a dose dependent manner. On the other hand, four kinds of citrus essential oil dose-dependently increased ROS generation in RBL 2H3 mast cells, but mandarin did not. From the above results, it is possible that citrus essential oils may be developed to be anti-melanogenic agent on the basis of their inhibitory effect on MSH-induced melanin production. But we can not rule out the possibility of the induction of allergy and inflammation since citrus essential oils caused ROS generation in RBL 2H3 mast cells.

Keywords: melanin, tyrosinase, ROS, citrus essential oils

1. 서 론

최근 경제성장에 따라 미에 대한 관심이 높아지고 있으며 노령인구의 증가와 자외선노출의 증가로 인해 피부 노화, 특히 광노화에 의한 피부색소침착 등의 피부질환에 대한 사회적 관심이 높아지고 있다. 따라서 미백 및 항피

부노화 관련시장은 지속적인 성장을 거듭하고 있으며, 보다 효과적이고 안정적인 미백소재를 찾고자 하는 연구가 활발히 진행 중이다[1-4]. 최근 천연물질을 이용한 미백 물질탐색이 활발히 진행되고 있고 다양한 생리활성을 가지고 있는 essential oil에 대한 관심이 증대되고 있다. 정유는 '식물체가 가지고 있는 방향성 기름성분'으로 외부유해환경에 대한 자체방어기제로 합성되는 생리활성물질로서 항균, 살균 등 방부 효과가 뛰어나고, 향이 후각을 통

[†] 주 저자 (e-mail: ente5200@hotmail.com)

해 대뇌 변연계(기억, 감정들을 관장하는 부분)에 자극을 주기 때문에 스트레스나 긴장을 완화시키고 기억력과 면역력을 증가시킨다[5]. 또한 essential oil은 radical scavenger[6] 및 항산화제로서 작용한다는 보고도 있다[7,8]. 식물에서 유래된 hydroquinone 배당체는 melanin 생성에 의한 색소 침착에 대한 외용 치료제로서 ascorbate와 복합체를 이루며 이는 melanin 생성 억제 및 생성된 melanin 파립의 분해를 촉진하는 것으로 알려져 있다[9]. essential oil 중 citrus essential oil이 가장 많은 분야에서 이용되는데 귤, 유자, 레몬과 같은 감귤류계 향료가 스트레스로 인한 우울증 치료에 효과가 있다는 보고가 있다[10]. citrus fruit 속에는 비타민 A, B, C와 여러 flavonoid류, limonene류들과 구연산을 비롯한 유기산들과 β -carotene, α -carotene 등의 carotenoid류 그리고 기타 다량의 무기질이 함유되어 있다. 비타민류와 carotenoid류 등은 radical scavenger로써 항암작용[11-15]을 비롯한 여러 생리적 효과를 가지는 것으로 보고되고 있다[16,17]. limonene류는 antifeedant 활성, 항암활성을 가지고 있다고 보고되고 있지만[18,19] 피부미용분야에서 미백제로서의 효능이 입증되고 있는[20] citrus essential oil의 작용기전에 대한 연구는 전혀 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 식물로부터 추출한 citrus essential oil이 피부 생리 작용 중 melanin 생성에 미치는 영향을 관찰함으로써 기능성화장품의 천연미백제로서의 이용 가능성을 규명하고자 하였다.

2. 실험방법 및 재료

2.1. 재 료

Citrus essential oil (bergamot, grapefruit, lemon, mandarin, petigrain)은 Eve Taylor Co. (London, UK)로부터 구입하였으며, α -melanocyte stimulating hormone, tyrosinase, L-DOPA, melanin들은 Sigma chemical Co.로부터 구입하였다. B16 melanoma 세포와 RBL 2H3 (rat basophilic leukemia) 세포는 서울대학교 세포주 은행으로부터 구입하였다.

2.2. 세포 배양

B16 melanoma 세포와 RBL 2H3 (rat basophilic leukemia) 세포는 10% fetal bovine serum과 penicillin/streptomycin (100 IU/50 μ g/mL)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 용액으로 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. B16 세포를 이용한 melanin 측정시 phenol red가 없는 DMEM을 사용하였다. 24 well plate에 5×10^4 cells/mL로 분주하고 12 h이 지난 뒤 세포가 plate에 완전히 부착된 것을 확인한 후 citrus essential

oil을 10 min간 전처리하였다. Melanin 생성을 촉진하기 위하여 1 μ M α -MSH를 처리하고 48 h 지난 뒤에 melanin을 정량하였다. Histamine을 유리하는 비만 세포인 RBL 2H3 세포를 이용하여 reactive oxygen species (ROS) 생성과 histamine 유리를 측정하였다.

2.3. Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase는 DOPA를 DOPA quinone을 통해 DOPA chrome으로 전환시키는 효소이다. 정제된 tyrosinase를 여러 농도의 essential oil과 혼합하여 실온에서 30 min간 배양한 후 96 well plate에 각각의 tyrosinase (2 unit/40 μ L)를 분주하였다. 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2)에 녹인 2 mg/mL L-DOPA 200 μ L를 가하여 37°C에서 1 h 동안 배양하고 tyrosinase에 의해 생성된 DOPA chrome은 475 nm에서 흡광도를 측정하였다[21].

2.4. Melanin 정량

Melanin 정량을 위해 10% FBS이 함유된 phenol red-free DMEM 용액에서 배양한 B16 melanoma 세포를 24 well plate에 5×10^4 cells/mL로 분주하고 12 h 경과 후 essential oil을 전처리하고 α -MSH 1 μ M를 처리하여 48 h 배양하였다. 배양이 끝나면 1% (w/v) Triton X-100을 함유한 10 mM phosphate buffer (pH 6.8)를 100 μ L를 가하고 5 min간 shaking 한 후에 eppendorf tube로 옮기고 원심분리하여 얻은 cell pellet에 1 N NaOH 100 μ L와 증류수 200 μ L를 가하고 60°C에서 1 h 배양하여 melanin을 완전히 녹인 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. melanin 표준품으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 melanin 양을 산출하였다. melanin 생성량은 각 well에서 측정된 단백질 농도를 기준으로 μ g/mg protein으로 표기하였으며 각각의 약물 효과는 대조군과 비교하여 % inhibition으로 나타내었다.

2.5. 항산화 활성 측정

96 well plate에 에탄올에 녹인 0.1 mM DPPH 용액 180 μ L와 각 농도별로 조제한 citrus essential oil 20 μ L를 가하고 37°C에서 30 min간 배양한 후 FL 600 spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 약물로서는 ascorbic acid를 사용하였으며 결과는 대조군에 대한 % change로 표기하였다.

2.6. Reactive Oxygen Species (ROS) 정량

RBL 2H3 세포 내에서 생성되는 산소라디칼 (ROS)을 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하였다. DCF-DA는 세포내로 들어가며 산소라디칼에 의해 산화되어 deacetylation되면서 생성되는

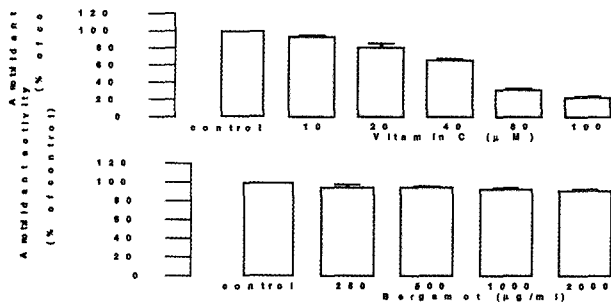


Figure 1. Anti-oxidant effects of vitamin C and bergamot essential oils in the DPPH assay. A solution of 180 μL of 100 μM DPPH solution in ethanol was gently mixed with 20 μL of test agent. After 30 min the absorbance at 517 nm was compared of ethanol using FL 600 spectrofluorometer. Results are means \pm SD from 4 separate experiments.

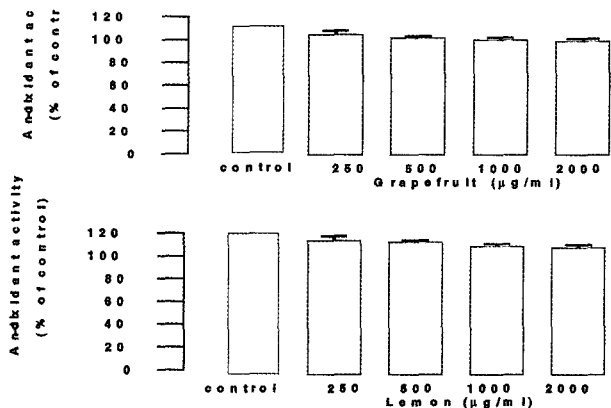


Figure 2. Anti-oxidant effects of grapefruit and lemon essential oils in the DPPH assay. A solution of 180 μL of 100 μM DPPH solution in ethanol was gently mixed with 20 μL of test agent. After 30 min the absorbance at 517 nm was compared of ethanol using FL 600 spectrofluorometer. Results are means \pm SD from 4 separate experiments.

DCF는 형광을 내는 물질로 전환된다. RBL 2H3 세포를 15 mL의 Krebs buffer 용액(mM: NaCl 137, KCl 2.7, Na_2HPO_4 0.4, MgCl_2 0.5, HEPES [pH 7.4] 10, CaCl_2 1.8, glucose 5)에 suspend시킨 후 20 μM DCF-DA를 가하고 1 h 빛을 차단한 곳에서 배양하였다. DCF-DA가 없는 Krebs 용액으로 한번 세척한 후 10^5 cells/mL로 분주하고 citrus essential oil을 처리한 후 1 h 배양하였다. 원심분리후 cell pellet을 200 μL 의 Krebs 용액에 분산시킨 후 형광(Ex: 485 nm; Em: 535 nm)을 측정하였다.

2.7. 자료분석 및 통계적 검정

실험 결과는 평균 \pm 표준오차로 표기하였으며, 실험 성적은 non-paired Student's t test로 검정하였고 P 값이

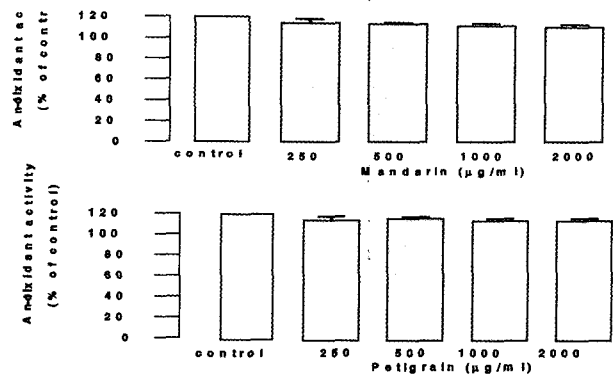


Figure 3. Anti-oxidant effects of mandarin and petigrain essential oils in the DPPH assay. A solution of 180 μL of 100 μM DPPH solution in ethanol was gently mixed with 20 μL of test agent. After 30 min the absorbance at 517 nm was compared of ethanol using FL 600 spectrofluorometer. Results are means \pm SD from 4 separate experiments.

5% 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

3. 결 과

3.1. Citrus Essential Oil의 항산화 효과

Citrus essential oil (Bergamot, Grapefruit, Lemon, Mandarin, Petigrain)이 항산화 작용을 확인하기 위하여 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 vitamin C를 이용하여 citrus essential oil의 항산화 효과를 비교하였다. Vitamin C는 10 μM 에서 100 μM 까지 농도 의존적으로 DPPH 유리기를 소거하였다(Figure 1). Citrus essential oil (Bergamot, Grapefruit, Lemmon, Mandarin, Petigrain)은 2 mg/mL까지 농도를 증가시켰으나 DPPH 라디칼 소거에 있어서 약 10% 정도 제거하는 효과를 나타내었다(Figure 1 ~ 3). 이러한 결과로 미루어 볼 때 citrus essential oil 자체는 항산화 작용이 미약한 것으로 사료된다.

3.2. Tyrosinase 활성과 Melanin 생성에 미치는 영향

Tyrosinase 활성과 melanin 생성을 억제하는 것으로 잘 알려진 vitamin C, arbutin kojic acid는 정제된 tyrosinase의 활성을 농도 의존적으로 억제하였으며, 또한 B16 melanoma 세포에서 1 μM α -MSH에 의한 melanin 생성도 농도 의존적으로 억제하였다(Figure 4 ~ 6).

Citrus essential oil 중 Bergamot은 정제된 tyrosinase 효소 활성에는 별 다른 영향을 미치지 않았지만 B16 melanoma 세포에서 1 μM α -MSH에 의한 melanin 생성은 약 20% 정도 억제하였다(Figure 7).

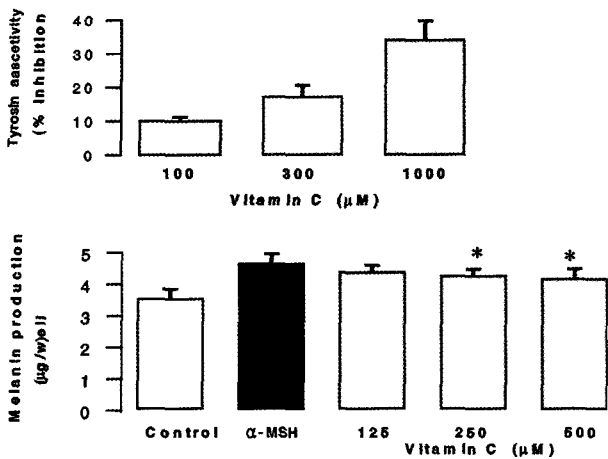


Figure 4. Effect of vitamin C on purified tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells stimulated by 1 μM α-MSH. Results are means ± SD from 4 separate experiments.

*Significantly different from α-MSH alone (p < 0.05).

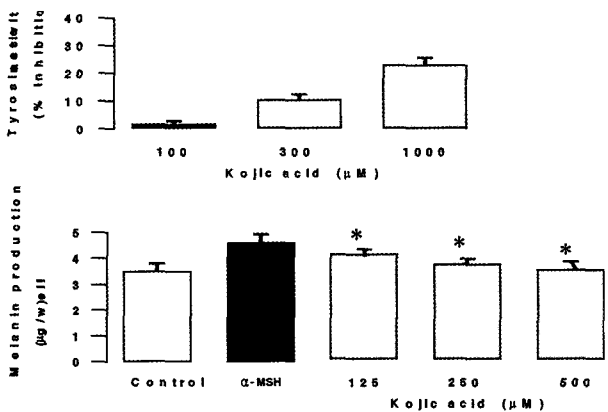


Figure 5. Effect of kojic acid on purified tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells stimulated by 1 μM α-MSH. Results are means ± SD from 4 separate experiments.

*Significantly different from α-MSH alone (p < 0.05).

Grapefruit와 Lemon essential oil은 tyrosinase 효소 활성을 약 6% 정도 억제하였으며, melanin 생성도 농도 의존적으로 억제하였다(Figure 8, 9).

한편 mandarin과 petigrain essential oil은 tyrosinase 효소 활성을 17% 억제하였는데 이는 arbutin이나 kojic acid의 억제 효과와 유사한 정도로 억제하는 것으로 보인다. 또한 B16 melanoma 세포에서 1 μM α-MSH에 의한 melanin 생성도 농도 의존적으로 억제하였다(Figure 10, 11).

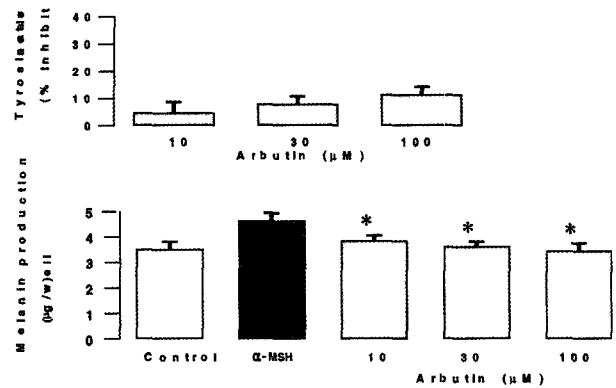


Figure 6. Effect of arbutin on purified tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells stimulated by 1 μM α-MSH. Results are means ± SD from 4 separate experiments.

*Significantly different from α-MSH alone (p < 0.05).

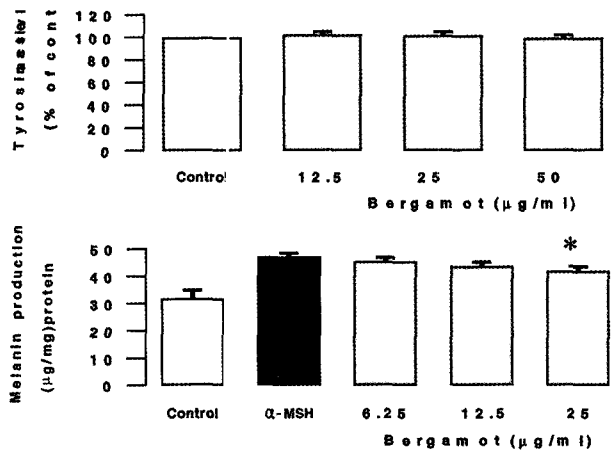


Figure 7. Effect of bergamot essential oils on purified tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells stimulated by 1 μM α-MSH. Results are means ± SD from 4 separate experiments.

*Significantly different from α-MSH alone (p < 0.05).

3.3. RBL 2H3 비만세포에서 Reactive Oxygen Species (ROS) 생성에 미치는 영향

Essential oil이 radical scavenger 및 항산화 작용이 있다는 것이 보고되었다. 이 실험에서 citrus essential oil이 항산화 작용이 있는지를 확인하기 위하여 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정된 결과 citrus essential oil 자체는 라디칼 소거 활성이 없는 것으로 나타났다. ROS를 많이 생성하는 RBL 2H3 세포에서 citrus essential oil이 ROS 생성에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하였다. Mandarin essential oil은 RBL 2H3 세포에서 ROS 생성에 이렇다 할 영향을 주지 않았지만 다른 4개의 essential oil (Bergamot,

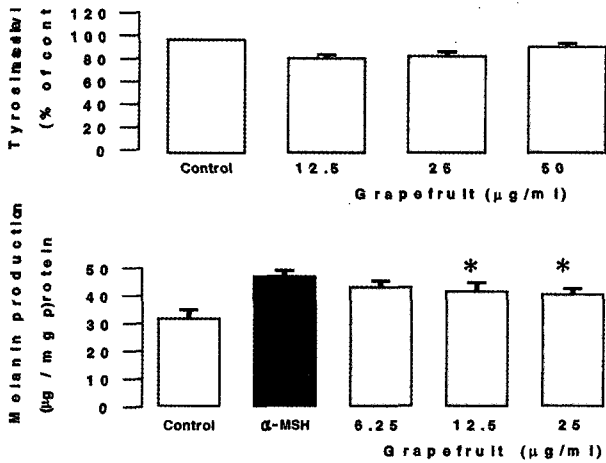


Figure 8. Effect of grapefruit essential oils on purified tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells stimulated by 1 µM α-MSH. Results are means ± SD from 4 separate experiments.

*Significantly different from α-MSH alone (p < 0.05).

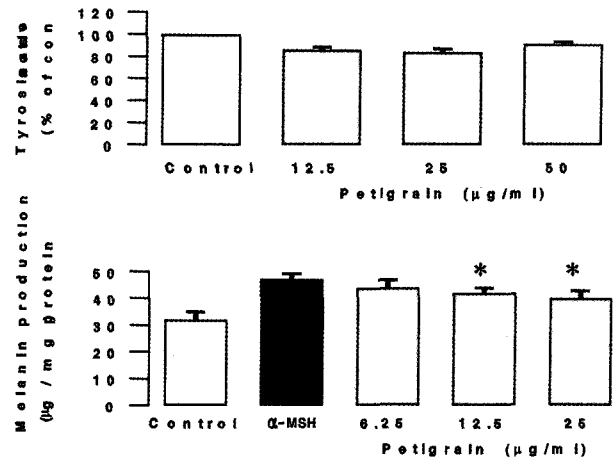


Figure 10. Effect of mandarin essential oils on purified tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells stimulated by 1 µM α-MSH. Results are means ± SD from 4 separate experiments.

*Significantly different from α-MSH alone (p < 0.05).

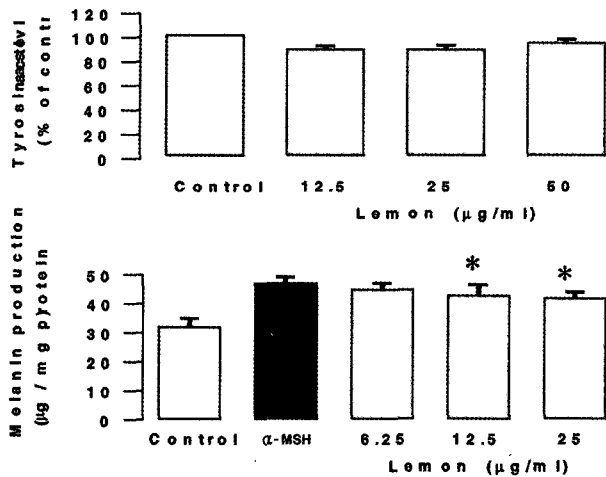


Figure 9. Effect of lemon essential oils on purified tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells stimulated by 1 µM α-MSH. Results are means ± SD from 4 separate experiments.

*Significantly different from α-MSH alone (p < 0.05).

Grapefruit, Lemmon, Petigrain)은 농도 의존적으로 ROS 생성을 증가시켰다(Figure 12).

4. 결 론

Citrus essential oil (bergamot, grapefruit, lemon, mandarin, petigrain)이 B16 melanoma 세포에서 melanin 생성에 미치는 영향과 RBL 2H3 비만세포에서 ROS 생성에

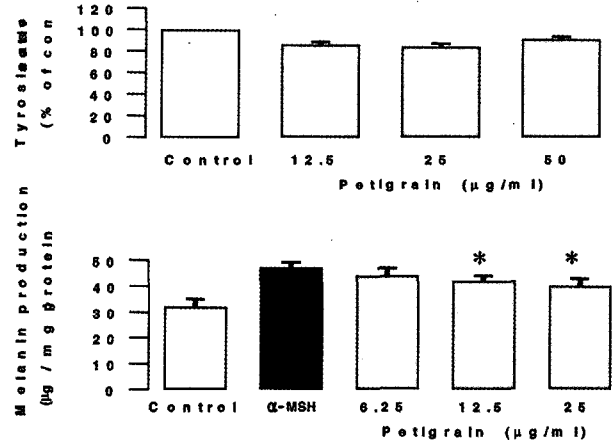


Figure 11. Effect of petigrain essential oils on purified tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells stimulated by 1 µM α-MSH. Results are means ± SD from 4 separate experiments.

*Significantly different from α-MSH alone (p < 0.05).

미치는 영향을 관찰하였다. 5 종류의 citrus essential oil은 DPPH 라디칼 소거와 세포 증식 및 독성에서 대조군에 비해 유의한 변화를 일으키지 않았다. 정제한 tyrosinase 활성에 있어서 mandarin과 petigrain essential oil은 유의하게 tyrosinase 활성을 억제하였으나 bergamot은 전혀 억제하지 않았다. 이러한 결과는 mandarin과 petigrain essential oil이 tyrosinase 효소 억제 기전은 설명하지 못하지만 tyrosinase 효소에 직접적으로 작용하여 억제하는 것으로 보인다. B16 melanoma 세포에서 α-MSH

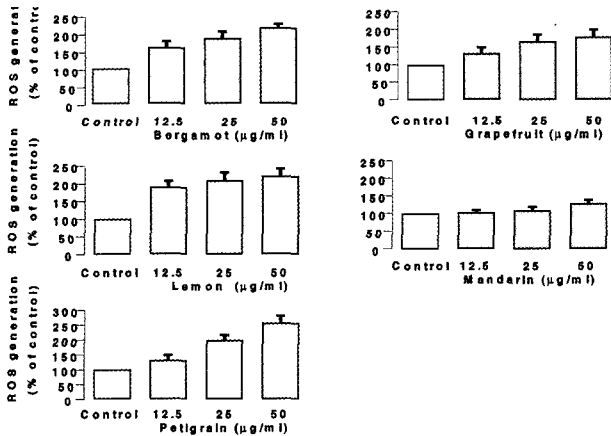


Figure 12. Effects of citrus essential oils on ROS generation in RBL 2H3 mast cells. DCF-loaded RBL 2H3 mast cells were incubated with citrus essential oils (50 µg/mL), such as bergamot, grapefruit, lemon, mandarin and petigrain for 30 min in 5% CO₂ incubator at 37°C. Results are means ± SD from 4 separate experiments.

에 의한 melanin 생성이 5 종류의 citrus essential oil에 의해 모두 농도 의존적으로 억제되었다. Bergamot essential oil은 tyrosinase 효소 활성을 직접적으로 억제하지는 못했지만 melanoma 세포에서 α -MSH에 의한 melanin 생성은 억제하는 것으로 나타났다. 다른 4종류의 citrus essential oil도 모두 tyrosinase 효소 활성을 억제하였으며, α -MSH에 의한 melanin 생성도 억제하였다. 한편 DCF-DA를 이용한 ROS 생성에 있어서는 mandarin essential oil은 ROS 생성에 이렇다 할 영향을 주지 않았지만 다른 4개의 essential oil (bergamot, grapefruit, lemon, petigrain)은 농도 의존적으로 ROS 생성을 증가시켰다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 citrus essential oil은 α -MSH에 의한 melanin 생성을 억제하는 것으로 보아 미백제로서의 개발 가능성이 있으나 비만 세포에서 ROS를 생성하는 것으로 보아 알러지나 염증을 유발할 가능성은 배제 할 수 없는 것으로 사료된다.

참고 문헌

- M. Higuchi, Y. Miura, J. Boohana, Y. Kinoshita, Y. Yamamoto, I. Yushimura, and Y. Yamaha, Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts, *Planta Med.*, **59**, 253 (1993).
- K. Y. Ryu, W. S. Kang, Y. H. Kim, H. D. Jang, J. T. Hong, H. S. Yoo, and Y. P. Yun, Antioxidative effects of the rhizome of *Rhodiola sachalinensis*, *Yakhak Hoeji*, **42**(3), 312 (1998).
- J. H. Park, Y. G. Shin, U. K. Shin, S. K. Baek, S. K. Lee, M. H. Chung, and Y. I. Park, Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs, *Yakhak Hoeji*, **41**(4), 518 (1997).
- S. H. Lee, J. S. Park, S. Y. Kim, J. J. Kim, and S. R. Chung, Isolation of inhibitory components on tyrosinase activity from the bark of *paeonia moutan*, *Yakhak Hoeji*, **42**(4), 353 (1998).
- Tisserand R. *The art of aromatherapy*, Daniel Co Ltd, Saffron United Kingdom (1988)
- H. S. Choi, H. S. Song, H. Ukedo, and M. Sawamura, Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhy drazyl, *J. Agric. Food. Chem.*, **48**(9), 4156 (2000).
- M. Burits and F. Bucar Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil, *Phytother Res.*, **14**(5), 323 (2000).
- J. Grassmann, S. Hippeli, K. Dornisch, U. Rohnert, N. Beuscher, and E. F. Elstner, Antioxidant properties of essential oils, Possible explanations for their anti-inflammatory effects, *Arzneimittelforschung*, **50** (2), 135 (2000).
- P. Clarys and A. Barel, Efficacy of topical treatment of pigmentation skin disorders with plant hydroquinone glucosides as assessed by quantitative color analysis, *J Dermatol.*, **25**(6), 412 (1998).
- H. S. Song, Studies on aroma and functional properties of citrus essential oils 칸킥트精油의芳香機能特性に関する研究, Ehime university (2000).
- K. A. Steinmetz, Vegetables, fruits and cancer, I. Epidemiology, *Cancer Cause Control.*, **2**, 325 (1991).
- G. Block, Fruits, vegetables, and cancer prevention: a review of epidemiological evidence, *Nutr. Cancer*, **18**, 1 (1992).
- Cao. Guohua, Antioxidant capacity of tea and common vegetable, *J. Agric. Food. Chem.*, **44**, 3426 (1996).
- S. A. Bingham, Mechanisms and experimental and epidemiological evidence relating dietary fibre and starch to protection against large bowel cancer, *Proc Nutr. Soc.*, **49**, 153 (1990).
- L. Wattenberg, Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone carcinogenesis in mice by K-limonene and citrus fruit oils, *Carcinogenesis*, **12**, 115 (1991).

16. A. J. Verlangieri, Fruit and vegetable consumption and cardiovascular mortality, *Med. Hypoth.*, **16**, 7 (1985).
17. A. Aschero, A prospective study of nutritional factor and hypertension among US men, *Circulation*, **86**, 1475 (1991).
18. K. D. Murray, E. Gorden, F. A. Drummond, A. R. Alford, R. H. Storch, and M. D. Bentley, Citrus limonoids effect on colorado potato beetle larval survival and development, *Entomol. Exp.*, **80**, 503 (1996).
19. A. Sawabe, I. Matsubara, C. R. Yang, and O. Tanaka, *Advances in plant glycosides, chemistry and biology*, Elsevier, Amsterdam, 261 (1999).
20. Salvatore Battaglia, *Complete guide to aromatherapy*, The perfect (AUST) potion ptyltd (1995).
21. T. Ohkura, K. Yamashita, Y. Mishima, and A. Kobata, Purification of hamster melanoma tyrosinases and structural studies of their asparagine-linked sugar chains, *Arch Biochem Biophys.*, **235**(1), 63 (1984).