

편백나무(*Chamaecyparis obtusa*) 추출물의 항산화, 미백효과에 관한 연구

정여원^{1,*} · 김유미² · 장영아^{3†}

¹대구한의대학교 화장품약리학과, 연구원

²(주)바이노텍, 대표

³경성대학교 스마트헬스케어융합연구센터, 조교수

(2020년 11월 5일 접수: 2020년 12월 21일 수정: 2020년 12월 22일 채택)

Studies on the Antioxidant and Whitening Effects of *Chamaecyparis obtusa* Extract

Yeo-Won Joung¹ · Yu-mi Kim² · Young-Ah Jang^{3†}

¹Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University,
Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, Korea

²Binotec Co., Ltd., Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, Korea

³Convergence Research Center for Smart Healthcare of KS R&DB Foundation,
Kyungsoong University, Busan 48434, Republic of Korea

(Received November 5, 2020; Revised December 21, 2020; Accepted December 22, 2020)

요 약 : 본 연구는 화장품 소재로서 편백나무(*Chamaecyparis obtusa*)의 부위별 이용 가능성을 알아 보기 위하여 잎·가지(Leaf), 수피(Bark), 목재(Wood), 뿌리(Root)로 분리하여 99.9 % 에탄올에 추출한 시료로 항산화, 미백효능을 확인하였다. 이를 위해 다음과 같은 연구를 진행하였다. 항산화 평가는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS⁺) 라디칼 소거능으로 확인하였다. 미백 효과를 평가하기 위해 mushroom tyrosinase 저해 활성 평가, MTT assay를 통한 편백나무 추출물의 세포독성평가를 진행하였으며 cellular tyrosinase 저해율 측정과 melanin 생합성량을 확인하였다. 항산화 활성 결과 편백나무 부위 중 수피(Bark) 추출물이 가장 효능이 우수하였으며 B16F10 melanoma cell내 편백나무 수피(Bark)는 tyrosinase 활성 억제 및 멜라닌 생합성 억제 효과를 나타내었다. 따라서 편백나무 수피 에탄올 추출물의 안전하고 우수한 미백 기능성 화장품의 천연물질 소재로서의 개발 가능성을 확인하였다.

주제어 : 편백나무, 항산화, 미백, 화장품 소재, 기능성, B16F10

†Corresponding author
(E-mail: yaviol@ks.ac.kr)

Abstract : This study was conducted as follows in order to find out the possibility of using (*Chamaecyparis obtusa*) by part as a cosmetic material. *Chamaecyparis obtusa* was separated leaves, bark, wood, and root, and extracted with 99.9% ethanol, and the antioxidant and whitening effects of the sample were confirmed. For this, the following studies were conducted. Antioxidant evaluation was confirmed by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS⁺) radical scavenging activity. To evaluate the whitening effect, mushroom tyrosinase inhibitory activity evaluation and cytotoxicity evaluation of *Chamaecyparis obtusa* extract through MTT assay were conducted, and cellular tyrosinase inhibition rate was measured and melanin contents was confirmed. As a result of antioxidant activity, Bark extract among *Chamaecyparis obtusa* parts showed the best efficacy, and bark in B16F10 melanoma cell showed tyrosinase activity inhibition and melanin contents inhibitory effects. Therefore, it was confirmed that the ethanol extract of *Chamaecyparis obtusa* was developed as a natural material for safe and excellent whitening functional cosmetics.

Keywords : *Chamaecyparis obtusa*, antioxidant, whitening, cosmetic material, B16F10

1. 서론

표피의 기저층에 존재하는 멜라닌(melanin)은 검은 색소와 단백질의 복합체 형태를 갖는 페놀계의 고분자 물질로서, 생체의 필터와 같은 역할을 하며 자외선을 흡수하거나 산란시켜 피부조직이 자외선에 의해 손상되는 것을 막아준다[1,2]. 하지만 멜라닌이 필요 이상으로 많이 생성되면 기미(melasma), 주근깨(freckle), 점(spot) 등과 같은 형태로 표피에 남게되고 미용상의 문제점을 갖게한다[3]. 멜라닌은 자외선 및 멜라닌세포 자극 호르몬(melanocyte stimulating hormone; MSH) 등에 의해 생성이 촉진되며 그 기전을 살펴보면 tyrosine이 tyrosinase의 촉매반응에 의해 3, 4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환되고 DOPA는 다시 tyrosinase에 의해 DOPA quinone으로 전환되며 그 후 DOPA quinone을 거쳐 중간체인 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid 로 산화되어 흑갈색의 eumelanin이 된다[4]. 여기서 tyrosinase는 멜라닌 생합성 효소 역할로서 피부 색소침착 완화를 위한 미백제의 일반적인 억제 목표가 된다[5]. 현재까지 알려진 tyrosinase를 억제하는 미백 성분으로는 vitamin E, kojic acid, arbutin, hydroquinone, azelaic acid, licorice extract 등이 있으며 이들 중 가장 많이 사용되는 미백 성분 중 하나인 hydroquinone의 경우 멜라닌세포의 변성 또는 치사를 유발하는 등 세포독성으로 인

한 피부 자극이나 피부염증을 유발하므로 이용이 제한적이다[6]. 이러한 물질들을 대체하기 위해 최근에는 독성이 적고, 다양한 생리활성 효능을 가진 천연물질에 대한 관심이 증가하고 있어 관련 연구가 지속적으로 진행되고 있다.

편백나무(*Chamaecyparis obtuse*)는 구과목 측백나무과(*cupressaceae*)에 속하며 노송나무라고도 불리는 열대나뭇목으로 일본이 원산지이며, 수종은 상록 교목으로 높이는 40m, 지름은 2m까지 자란다[7]. 1970년대 이후 산림녹화정책으로 주로 남부 지방 및 제주도에 식재되어 많이 분포하고 나무로부터 발생한 피톤치드의 유용성이 알려지면서 휴양림 조성 등으로 인해 비교적 주위에서 쉽게 접할 수 있으며 한국 사람들에게 긍정적인 이미지를 갖는 수목자원이 되었다[8]. 그러나 편백나무의 식재면적이 증가되면서 목재 자원화 과정에서 발생하는 잎, 줄기, 수피, 열매 등의 부산물이 많이 생산되고 있고, 이러한 부산물들은 제대로 활용되지 못하고 버려지고 있는 실정이다[9]. 편백나무의 목재는 재질이 우수하고 독특한 향기를 지니고 있어 건축자재 및 고급가구재로 사용되고 있으며 잎, 목재, 가지, 뿌리 등에서 얻어진 정유(essential oil)는 방향제, 입욕제 등 다양한 용도로 사용되고 있다. 편백나무 잎에 함유된 피톤치드는 사람의 심리적 안정이나 심폐 기능을 강화 시켜주는데 도움이 되는 것으로 알려져 있다[10]. 편백나무 정유에는 많은 종류의 terpenoid 성분을 함유하고 있는데 주요 구성성

분은 약 66%의 monoterpene류와 25%의 sesquiterpene류로 구성되어 있으며, 편백나무 잎에서 분리한 정유의 주요 구성성분은 휘발성 오일로 sabinene, limonene, bornyl, acetate, borneol, α -terpineol, elemol 등이 있으며 이들의 효능은 살충, 살균, 방향, 향균 효과로 알려져 있다[11]. 목재(Wood)에서 얻어지는 주요물질은 hinokitiol, β -thujaplicin 화합물이 있으며 향균, 항산화, 식물의 발아 억제, 식물의 신선도 유지 등 다양한 생리 활성을 지니고 있다[12,13]. 편백나무에 관한 선행연구로는 편백나무 잎 추출물의 성분분석과 면역효능에 관한 연구, 편백나무 추출물의 항진균 및 항산화효능에 대한 연구결과가 있다[14]. 또한 편백나무 추출물이 아토피 유아의 피부 개선에 효과적임을 확인하여 피부염증 개선제로서 실용 가능성이 있음을 시사하였고, 편백 정유를 함유한 샴푸와 편백워터가 향균 및 비듬성 두피 개선에 효과가 있다는 보고가 있다[15,16]. 편백에 대한 연구는 주로 정유의 성분분석 및 활성 연구가 주를 이루고 있으며 향균작용과 관련된 연구가 가장 많았다. 편백을 이용한 화장품소재 활성 평가에 대한 연구는 미흡하며 특히 미백효과에 대한 연구는 많이 진행되지 않음을 확인하였다. 본 연구에서는 편백을 부위별로 에탄올 추출하여 항산화 활성을 알아보고 부위별 가장 효능이 좋은 편백의 목재부위를 이용하여 마우스 유래 흑색종 세포 murine melanoma cell lines (B16F10)내 MTT assay를 통한 시료의 안전성을 검토하였다. 피부 미백에 도움을 주는 기능성화장품유효성평가 가이드라인에 해당하는 cellular tyrosinase 저해율, melanin 생합성량 실험법을 통해 편백 목재추출물의 미백 기능성화장품 소재로의 활용가능성에 대하여 연구하였다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

2.1.1. 실험 재료

본 연구에서 사용한 편백나무(*Chamaecyparis obtusa*)는 2020년 3월 전남 광양시 광양읍 일원에서 채취한 것을 시험재료로 사용하였다. 편백나무(*Chamaecyparis obtusa*)는 잎·가지(Leaf) 부분과 수피(Bark), 목재(Wood), 뿌리(Root) 부분을 분리하여 통풍이 잘되는 그늘에서 건조 하였다.

건조 후, 분쇄하여 얻은 파우더에 시료 중량의 10배양의 99.9% 에탄올을 넣어 실온에서 24 h마다 2번에 걸쳐 추출물을 얻었다. 이를 거름종이(Whatman No. 2, GE healthcare, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 여과한 뒤, 여과액을 용기에 넣어 40°C의 수온에서 rotary vacuum evaporator (HS-10SP; Hahnshin S&T, Korea)를 사용하여 감압농축 후 동결기(FD5525; Ilshin BioBase, Korea)로 건조하고 얻어진 분말을 4°C에 보관하여 실험에 사용하였으며 시료의 수율은 Table 1과 같다.

Table 1. The yield of *Chamaecyparis obtusa* according to various extraction methods.

Extraction	Part	Yield(%)
99% Ethanol	Leaf	14.18%
	Bark	14.34%
	Wood	0.07%
	Root	0.68%

2.1.2. 실험 세포 및 시약

항산화 실험에 사용된 시약인 DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)와 ABTS⁺ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), Trizma base, Pyroalloy은 Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MO, USA)에서, B16F10 세포(murine melanoma cell lines)는 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. B16F10 세포의 배양은 10% fetal bovine serum (FBS; Introgen Therapeutics, USA)과 1% penicillin/streptomycin (Hyclone™, GE Healthcare Life Sciences, USA) 100 U/mL을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA) 배지를 사용하였으며 37°C, 5% CO₂ incubator (Forma™, Thermo Fisher Scientific, USA)에 적응시켜 계대 배양하였다. 미백 실험을 위한 시약 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 와 0.4% trypan blue stain, mushroom tyrosinase, tyrosine, L-DOPA, griess reagent는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 또한 실험측정기기는 ELISA reader

(Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 분석하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. DPPH radical scavenging activity 측정

전자공여능(EDA; electron donating ability)은 DPPH free radical 소거법으로 다음과 같이 측정되었다. 각 시료 용액 100 μ L에 0.2 mM의 DPPH 용액을 50 μ L를 넣고 교반한 후 차광하여 30 min 방치한 다음 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능 효과는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.2.2. ABTS⁺ radical cation scavenging activity 측정

ABTS⁺ radical을 이용한 항산화력 측정은 다음과 같이 측정하였다. ABTS⁺ radical cation은 7.4 mM ABTS⁺ [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]와 2.6 mM potassium persulfate ($K_2S_2O_8$)을 1:1로 혼합하여 암실에서 실온으로 24 h 동안 반응하였다. 사용전에 ABTS⁺ 용액을 에탄올에 희석하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.706 ± 0.001 이 되게 하여 사용하였다. 라디칼 소거활성 효과는 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.2.3. Mushroom tyrosinase 저해활성 측정

Mushroom tyrosinase 저해활성은 다음과 같이 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM의 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA)를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 0.2 mL를 첨가하여 37°C에서 2 min 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Mushroom tyrosinase 저해활성 측정은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.2.4. MTT assay

B16F10 melanoma cell을 96 well plate에 cell counting을 하여 1×10^4 cells/well이 되도록 180 μ L 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 배양 후 농도별로 조제한 시료를 20 μ L 첨가 한 후 48 h 배양하였다. 대조군은

시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 배양 후 각 well에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 20 μ L를 첨가하여 4 h 반응시킨 후 상등액을 제거하고, 형성된 formazan에 dimethyl sulfoxide와 에탄올을 1:1로 섞은 용액을 각 well당 200 μ L를 가하여 실온에서 30 min 동안 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존을 측정하는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.2.5. Cellular tyrosinase 저해율 측정

Cellular tyrosinase 저해율 측정은 다음과 같이 측정하였다. B16F10 melanoma cell을 6 well plate에 cell counting을 하여 5×10^4 cells/well이 되도록 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 배양 후 농도별로 조제한 시료를 48 h 처리하고 phosphate buffered saline (PBS; Gibco, NY, USA)로 3회 washing 한 후, 각 well에 lysis buffer (1% triton X-100, 0.1 M sodium phosphate buffer, 50 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 6.8)를 가하였다. 얼음 위에서 세포를 용출시키고 12,000 rpm, 4°C, 30 min 원심 분리한 후 상층액만 따로 모아 효소 용액으로 사용하였다. L-DOPA를 2 mg/mL 농도로 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 기질을 준비하고 기질 160 μ L에 효소 용액 40 μ L를 가하고 37°C에서 1 h 가온하고 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정 후 억제율을 계산하였다.

2.2.6. Melanin contents 측정

Melanin contents 측정은 다음과 같이 측정하였다. B16F10 melanoma cell을 6 well plate에 cell counting을 하여 5×10^4 cells/well이 되도록 분주하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 배양 후 농도별로 조제한 시료와 함께 멜라닌 자극제인 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)을 200 nM이 되도록 처리하였다. 48 h 배양한 후 phosphate buffered saline (PBS; Gibco, NY, USA)로 3회 세척 후 12,000 rpm, 4°C, 30 min 원심 분리하여 상층액을 버리고 침전물에 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Duksan, Korea)가 첨가된 1N NaOH 용액을 200 μ L 첨가하고 60°C에서 1 h 용해하였으며 405 nm에서 흡광도를 측정 후 실험군

의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하여 나타내었다.

2.2.7. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software package (Version 22.0; IBM, USA)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance)를 이용하여 유의성을 확인한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test를 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH radical scavenging activity 측정

DPPH는 자주색을 띠며 비교적 안정한 자유라디칼을 갖는 실온에서 고형의 화합물로서, polyphenol과 같은 hydroxyl기를 갖는 고분자 화합물 등에 의해 환원되어 탈색되므로 체내에 활성산소와 같은 라디칼의 소거작용으로 노화를 억제하는 효과를 나타내며 여러 소재에서 항산화 물질을 확인 하는데 많이 사용되고 있다[17]. 편백나무(*Chamaecyparis obtusa*)에서 분리한 잎가지(Leaf) 부분과 수피(Bark), 목재(Wood), 뿌리(Root)에 대한 DPPH radical scavenging activity

측정결과 Fig. 1과 같이 나타내었다. 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 잎가지(Leaf) (93.2%), 수피(Bark) (95.7%), 뿌리(Root) (94.7%)는 90% 이상이 넘는 DPPH radical 소거능력을 보였으며, 수피(Bark)는 저농도 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 79.8%의 매우 높은 DPPH radical 소거능력을 나타내어 다른 부위와 비교하여 가장 효능이 높았으며 동일 농도에서 대조군인 BHA 72.8%의 효능과 비교하여 더 높은 활성을 나타내어 DPPH radical 소거능이 가장 우수함을 확인하였다.

3.2. ABTS⁺ radical cation scavenging activity 측정

ABTS radical 소거능은 DPPH 방법과 함께 항산화 활성을 스크리닝 하는데 가장 기초가 되는 실험으로 peroxidase, H₂O₂와의 반응에 의해 생성된 활성 양이온인 ABTS⁺가 시료 중의 항산화성 물질을 만나면 고유의 청록색이 탈색이 되는데 그 흡광도 값으로 추출물의 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성을 측정 할 수 있다[18]. 편백나무에서 분리한 잎가지(Leaf) 부분과 수피(Bark), 목재(Wood), 뿌리(Root)에 대한 ABTS⁺ radical cation scavenging activity 측정결과 Fig. 2와 같이 나타내었다. 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 잎가지(Leaf)는 98.4%, 수피(Bark)는 99.8%, 뿌리(Root)는 99.4%로 목재 부위를 제외한 부위에서 90% 이상의 ABTS⁺ radical 소거능력을 보였으며, 수피

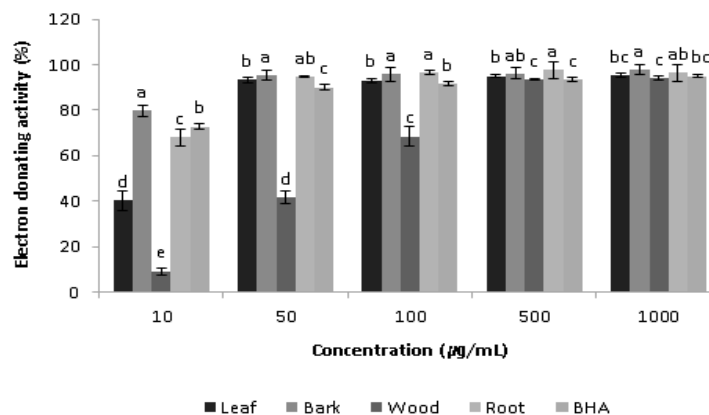


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity(%) of dependent on concentration from extracts of *Chamaecyparis obtusa* var. BHA : Butylated hydroxyanisole. Data are expressed as mean \pm standard deviation (n=3). Statistical analysis was performed using Duncan's multiple range test with a significance level of $P < 0.05$.

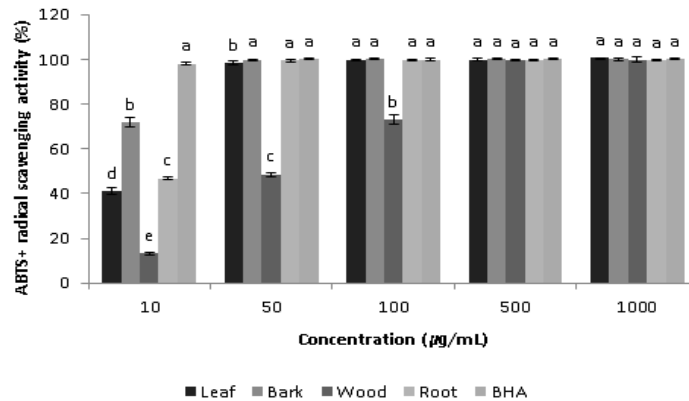


Fig. 2. ABTS⁺ radical cation scavenging activity(%) of dependent on concentration from extracts of *Chamaecyparis obtusa* var. BHA: Butylated hydroxyanisole. Data are expressed as mean \pm standard deviation (n=3). Statistical analysis was performed using Duncan's multiple range test with a significance level of $P < 0.05$.

(Bark)는 낮은 농도인 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 71.6% ABTS⁺ radical 소거능을 나타내 항산화 활성이 우수함을 확인하였다. 편백나무 엑기스를 모아 녹인 편백나무 추출액의 ABTS⁺ radical 소거능 결과에서 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 62.0%의 활성을 가지는 것과 비교할 때[19] 편백 수피 99.9% 에탄올 추출물의 효능이 더 우수함을 확인할 수 있었다.

3.3. Mushroom tyrosinase 저해활성 측정

피부의 색을 결정하는 인자에는 멜라닌(melanin), 카로틴(carotin), 헤모글로빈(hemoglobin)등이 있으며 그 중 melanin에 의한 영향이 가장 크다고 밝혀졌다[20]. 멜라닌 생합성에 있어서 중요한 핵심 효소인 tyrosinase는 구리를 함유한 monooxygenase 효소로 이 효소는 tyrosine을 DOPA(3,4-dihydroxyphenylalanine), DOPA quinone, melanin으로 변형시킨다[21]. 따라서 tyrosinase의 활성을 저해시킨다면 피부에 melanin이 생성되는 것을 억제시킬 수 있으므로 편백의 부위별 tyrosinase 저해활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 나타내었다. 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 수피(Bark) (42.0%) > 잎(Leaf) (40.9%) > 뿌리(Root) (32.0%) > 목재(Wood) (27.4%) 순으로 mushroom tyrosinase 활성을 저해하였다. 편백 수피는 DPPH radical 및 ABTS⁺ radical 소거능이 우수하고 미백 효능도 4가지 부

위 중 가장 높아 수피(Bark) 추출물의 B16F10 melanoma 세포 내 미백활성을 평가하기로 하였다.

3.4. 세포 생존율 측정

MTT assay는 세포내의 전자 전달계에 존재하는 탈수효소가 yellow tetrazolium salt(담황색 기질)로서 살아있는 세포를 분해하여 미토콘드리아내의 reductase에 의해 환원되어 formazan을 생성하는데 죽어있는 세포에서는 형성되지 않고 살아있는 세포의 수가 많을수록 formazan의 생성도 많아지고 세포의 성장을 측정할 수 있다[22]. 본 연구에서는 편백나무(*Chamaecyparis obtusa*)에서 분리한 수피(Bark)가 B16F10 melanoma 세포 독성에 미치는 농도를 조사하고, 실험에 사용 가능한 농도 범위 설정을 위해 MTT assay를 시행하였으며, 수피(Bark)를 5, 10, 20, 40, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 후 세포 독성 측정 결과 Fig. 4와 같이 나타내었다. 수피(Bark)는 5 ~ 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 80% 이상의 세포 생존율을 보였다. 40~100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 세포 독성을 나타낸 결과를 토대로 이후 진행한 실험은 세포 생존율 구간을 참고하여 다음실험을 진행 하였다.

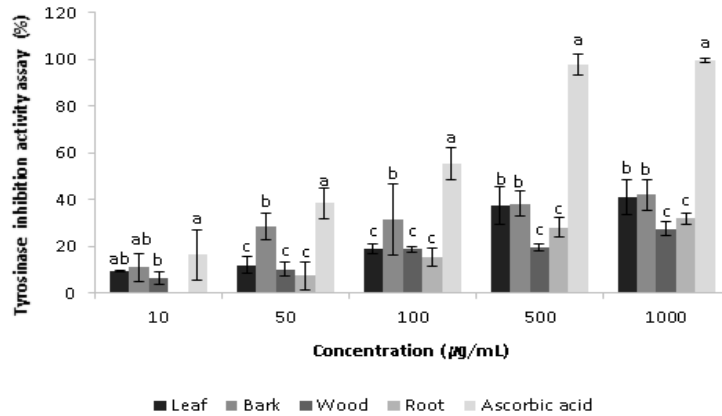


Fig. 3. Tyrosinase inhibition activity(%) of dependent on concentration from extracts of *Chamaecyparis obtusa* var. Data are expressed as mean \pm standard deviation (n=3). Statistical analysis was performed using Duncan's multiple range test with a significance level of $P < 0.05$.

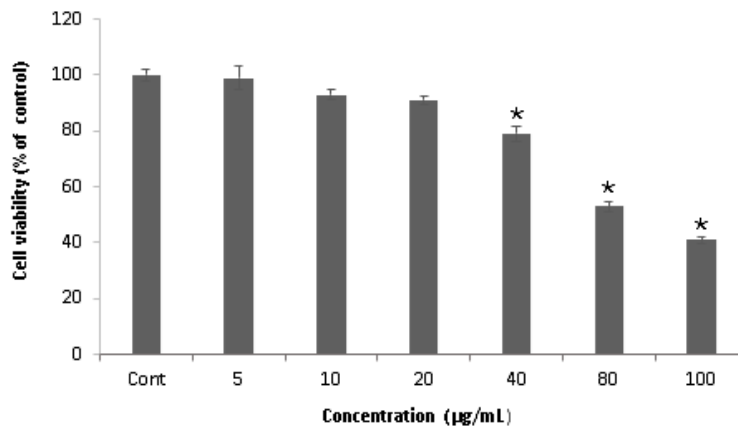


Fig. 4. Cell viability of dependent on concentration from extracts of *Chamaecyparis obtusa* var (Bark) extracts in B16F10 melanoma cells. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The values the mean \pm S.D. from three independent experiments * $p < 0.05$ vs control group.

3.5. B16F10 cell의 cellular tyrosinase 및 melanin 생합성 저해율

멜라닌형성세포 자극 호르몬(α -melanin stimulating hormone; α -MSH)은 뇌하수체 및 피부를 포함한 여러 조직에서 분비되며, 멜라닌 합성에 있어서 tyrosinase 활성을 촉진시켜 eumelanin을 형성하는 단계에서 반응속도를 증가시킨다[23]. B16F10 melanoma 세포 내 편백나

무(*Chamaecyparis obtusa*)에서 분리한 수피(Bark)의 미백활성에 대해 cellular tyrosinase 저해활성 측정 결과는 α -MSH를 200nM 자극군(control)을 100%로 계산하여 대비하여 각 시료를 농도별 (5, 10, 20) μ g/mL로 처리하였을 때 각 94.8%, 91.6%, 83.5%의 tyrosinase 활성이 나타내어 농도의존적으로 미백활성을 나타내었다 (Fig. 5). 멜라닌은 tyrosinase의 작용에

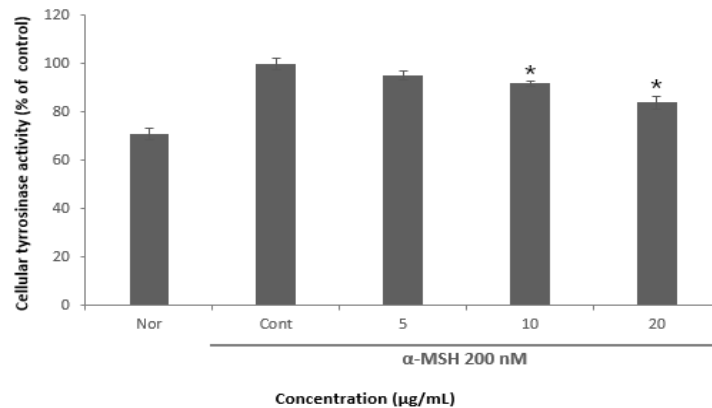


Fig. 5. Effect of dependent on concentration from extracts of *Chamaecyparis obtusa* var (Bark) extracts on inhibition of intracellular tyrosinase inhibition rate. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. * $p < 0.05$, compared with control. Nor, normal group (α -MSH untreated group); Cont, control group (α -MSH treated group).

의해 여러 가지 물질로 대사되는 과정 중에 최종적으로 합성된 물질이기 때문에 멜라닌의 생성 효소인 tyrosinase는 멜라닌 생합성의 속도결정 단계를 촉매하는 것으로 알려져 있다[24]. 현재까지 천연물 유래의 tyrosinase 활성억제 물질로서는 누룩곰팡이의 2차대사산물인 kojic acid와 우바우르시 잎으로부터 분리된 arbutin, 상백피의 oxyresveratrol 등이 있으며, 그 외에도 stilbene계 화합물 및 flavonoid계 화합물 등이 있다[25]. 이들 중 kojic acid 및 arbutin은 미백 기능성 물질로서 상업화되어 있으나 단점은 자극성피부염, 색소침착 등의 부작용을 일으킬 수 있기 때문에 최근화장품 업계에서는 부작용이 없는 천연물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다. Cellular tyrosinase 활성실험과 함께 미백활성 평가에 이용되는 melanin 생합성 저해율의 실험결과는 다음과 같다. B16F10 melanoma 세포에 멜라닌 자극제인 α -MSH를 처리하여 멜라닌 합성을 유도한 후 편백나무수피(Bark) 추출물을 처리하고 melanin 세포의 pellet을 NaOH를 처리하여 흡광도로 분석하였다. melanin 생합성율은 농도별 (5, 10, 20) $\mu\text{g/mL}$ 에 따라 82.7%, 78.7%, 74.3%의 합성율을 나타내어 cellular tyrosinase 억제능과 유사한 활성을 보였다(Fig. 6).

4. 결론

본 연구에서는 화장품 천연물질 소재로서의 편백나무(*Chamaecyparis obtusa*)의 부위별 이용 가능성을 알아보기 위하여, 잎·가지(Leaf), 수피(Bark), 목재(Wood), 뿌리(Root)로 분리하여 99.9% 에탄올 추출물을 이용하여 항산화 및 미백효능 실험을 진행하여 화장품 기능성소재로서의 가능성에 대해 평가 하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다. DPPH radical scavenging activity 측정 결과, 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 수피(Bark) (79.8%) > 뿌리(Root) (72.7%) > 잎·가지(Leaf) (40.4%) > 목재(Wood) (9.1%)순으로 DPPH radical 소거능력을 보여주었다. ABTS⁺ radical cation scavenging activity 측정 결과, 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 수피(Bark) (71.6%) > 목재(Wood) (48.6%) > 뿌리(Root) (46.8%) > 잎·가지(Leaf) (41.1%) 순으로 ABTS⁺ radical소거능을 나타내었다. 항산화 실험에서 편백나무 부위별 4종의 에탄올 추출물 시료 중, 수피(Bark)가 가장 항산화 활성이 높음을 나타내었다. 미백활성 평가인 mushroom tyrosinase 저해활성 측정 결과, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 수피(Bark) (42.0%) > 잎·가지 (Leaf) (40.9%) > 뿌리(Root) (32.0%) > 목재(Wood)

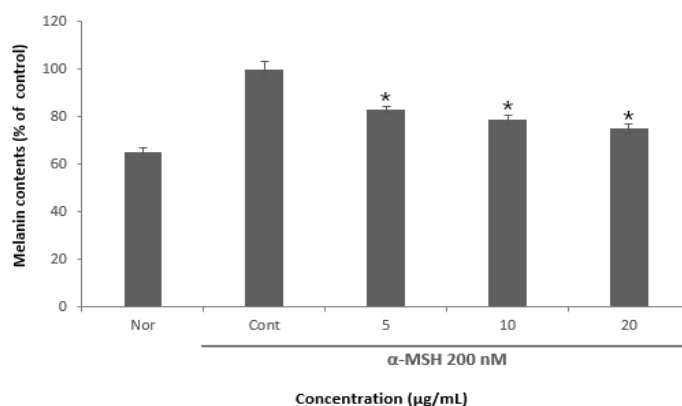


Fig 6. Effect of dependent on concent ration from extracts of *Chamaecyparis obtusa* var (Bark) extracts on melanin synthesis rate. The results are presented as mean±standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. * $p < 0.05$, compared with control. Nor, normal group (α -MSH untreated group); Cont, control group (α -MSH treated group).

(27.4%) 순으로 tyrosinase 활성을 저해하였다. 부위별 활성 중 가장 효능이 우수한 수피(Bark) 추출물의 B16F10 melanoma 세포 내 미백활성을 측정하기 위한 시료의 세포독성 측정결과, 20 μ g/mL 의 농도까지 80% 이상의 세포 생존을 나타내어 안전한 시료의 농도를 검증하였다. 수피 추출물의 cellular tyrosinase 저해활성에서 α -MSH 자극군에 대비 수피추출물을 농도별 (5, 10, 20) μ g/mL로 처리하였을 때 농도 의존적으로 tyrosinase 활성이 저해되는 것을 확인하였으며 melanin 생합성에 미치는 영향을 측정한 결과 20 μ g/mL 농도에서 멜라닌의 합성을 25.7% 저해하여 시료의 미백활성효능을 확인하였다. 결과적으로 편백나무 수피(Bark) 에탄올 추출물은 잎, 가지, 뿌리, 목재 추출물 중 가장 우수한 항산화 활성과 미백활성이 확인 되었으며 향후 미백관련 유전자 발현의 검증 및 melanin 생성 기전연구를 통해 그 가능성을 확인하여 기능성화장품의 원료로써 활용이 가능함을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 산림청이 지원하는 산림생명자원 소재 발굴연구(R&D) 사업(2020195A00-2022-BA01)로 수행된 연구결과입니다.

References

1. H. Ando, Y. Niki, M. Ito, K. Akiyama, M. S. Matsui, D. B. Yarosh, M. Ichihashi, "Melanosomes Are Transferred from Melanocytes to Keratinocytes through the Processes of Packaging, Release, Uptake, and Dispersion", *Journal of Investigative Dermatology*, Vol.132, No.4, pp. 1222-1229, (2012).
2. S. Y. Choi, Y. C. Kim, B. S. Chang, "Inhibitory Efficacy of Black Tea Water Extract on Melanogenesis in Melan-a Cells and Its Action Mechanisms", *Korean Journal of Microscopy*, Vol.41, No.3, pp. 169-177, (2011).
3. S. Del bino, C. Duval, F. Bernerd, "Clinical and Biological Characterization of Skin Pigmentation Diversity and Its Consequences on UV Impact", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.19, No.9, pp. 2668-2712, (2018).
4. S. Parvez, M. Kang, H. S. Chung, C. W Cho, M. C. Hong, M. K. Shin, H. S Bae, "Survey and mechanism of skin

- depigmenting and lightening agents”, *Phytotherapy Research*, Vol.20, No.11, pp. 921–934, (2006).
5. H. Ando, H. Kondoh, M. Ichihashi, V. Hearing, “Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase”, *Journal of Investigative Dermatology*, Vol.127, No.4, pp. 751–761, (2007).
 6. J. P. Ebanks, R. R. Wickett, R. E. Boissy, “Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration”, *International Journal of Molecular Sciences*. Vol.10, No.9, pp. 4066–4087, (2009).
 7. Y. T. Jung, I. S. Lee, K. Whang, M. H. Yu, “Antioxidant effects of *Picrasma quassioides* and *Chamaecyparis obtusa* (S. et Z.) ENDL extracts”, *Korean Journal of Life Science*, Vol.22, No.3, pp. 354–9, (2012).
 8. S. H. Kim, S. Y. Lee, C. Y. Hong, K. S. Gwak, H. M. Yeo, J. J. Lee, I. G. Choi, “Whitening and Antioxidant Activities of Essential Oils from *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtusa*”, *Journal of the Korean Wood Science and Technology*, Vol.39, No.4, pp. 291–302, (2011).
 9. M. J. Park, W. S. Cheoi, B. C. Min, H. Y. Kim, H. Y. Kang, I. G. Choi, “Antioxidant Activities of Essential Oils from *Chamaecyparis obtusa*”, *Journal of the Korean Wood Science and Technology*, Vol.36, No.6, pp. 159–167, (2008).
 10. J. W. Kim, W. S. Choi, S. S. Lee, M. J. Park, “Comparative Study on The Composition of Essential Oil by Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Hydrodistillation from *Chamaecyparis obtusa* Leaves”, *Journal of the Korean Wood Science and Technology*, Vol.43, No.4, pp. 494–503, (2015).
 11. C. U. Hong, C. S. Kim, N. G. Kim, Y. H. Kim, “Composition of Essential Oils from the Leaves and the Fruits of *Chamaecyparis obtusa* and *Chamaecyparis pisifera*”, *Applied Biological Chemistry*, Vol.44, No.2, pp. 116–121, (2001).
 12. T. Hieda, M. Tazaki, Y. Morishita, T. Aoki, S. Nagahama, “Sesquiterpene alcohols from *Chamaecyparis obtusa* leaf oil”, *Phytochemistry*, Vol.42, No.1, pp. 159–162, (1996).
 13. K. Fujimori, A. Kaneko, Y. Kitamori, M. Aoki, M. Makita, N. Masuda, K. Ho kari, “Hinokitiol (β -Thujaplicin) from the Essential Oil of Hinoki [*Chamaecyparis obtusa* (Sieb. et Zucc.) Endl.]”, *Journal of Essential Oil Research*, Vol.10, No.6, pp. 711–712, (1998).
 14. J. H. Kim, S. O. Lee, K. B. Do, W. D. Ji, S. G. Kim, Y. D. Back, K. J. Kim, “Analysis of the component and immunological efficacy of *Chamaecyparis obtusa* leaf extract”, *Korean Society for Clinical Laboratory Science*, Vol.50, No.1, pp. 37–43, (2018).
 15. Y. L. Cha, I. H. Lee, M. H. Jang, “The improving effects in skin of atopic infant by *Chamaecyparis obtusa* Endlicher”, *The Korean Society Of Beauty And Art*, Vol.13, No.3, pp. 75–87, (2012).
 16. K. A. Seo, S. H. Li, “A Study on the Anti-bacterial Effect and Dandruff Scalp Emprovement of *Malassezia furfur* of *Chamaecyparis obtusa*”, *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, Vol.13, No.3, pp. 285–293, (2015).
 17. G. D. Lee, H. G. Chang, H. K. Kim, “Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms”, *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.29, No.3, pp. 432–436, (1997).
 18. S. J. Jeong, K. H. Kim, H. S. Yook, “Whitening and antioxidant activities of solvent extracts from hot-air dried *Allium hookeri*”, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.44, No.6, pp. 832–839, (2015).
 19. K. Jimbow, H. Chen, J. S. Park, P. D.

- Thomas, "Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo", *British Journal of Dermatology*, Vol.144, No.1 pp. 55-65 (2001).
20. J. G. Park, B. S. Karmar, S. M. Steinberg, J. Carmichael, J. M. Collins, J. D. Minna, A. F. Gazdar, "Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay", *Cancer research*, Vol.47, No.22, pp. 5875-5879, (1987).
21. B. K. Kim, J. H. Kang, G. H. Oh, J. Y. Hwang, S. O. Jang, M. H. Kim, "Antibacterial and Antioxidant Activity of *Chamaecyparis obtusa* Extracts", *Korean Journal of Life Science*, Vol.29, No.7 pp. 785-791 (2019).
22. L. Z. Piao, H. R. Park, Y. K. Park, S. K. Lee, J. H. Park, M. K. Park. "Mushroom tyrosinase inhibition activity of some chromones", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol.50, No.3 pp. 309-311 (2002).
23. A. Korner, J. Pawelek, "Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the bio synthesis of melanin", *Science*, Vol.217, No.4565, pp. 1163-1165, (1982).
24. K. Maeda, T. Naitou, K. Umishio, T. Fukuhara, A. Motoyama, "A novel melanin inhibitor: hydroperoxy traxastane-type triterpene from flowers of *Arnica montana*", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Vol.30, No.5 pp. 873-879 (2007).
25. F. A. Badria, M. A. elGayyar, "A new type of tyrosinase inhibitors from natural products as potential treatments for hyperpigmentation", *Bollettino Chimico Farmaceutico*, Vol.140, No.4 pp. 267-271 (2007).