

편백 잎 아임계 수 추출물의 항염, 항균 및 항산화 활성

김정은^{1,*} · 김민정² · 문지영² · 김정미² · 오태현³ · 이남호^{4,†}

¹제주대학교 화학·코스메틱스학과, 연구원

²유씨엘(주)

³대봉엘에스(주)

⁴제주대학교 화학·코스메틱스학과, 교수

(2024년 2월 23일 접수: 2024년 4월 26일 수정: 2024년 5월 2일 채택)

Anti-inflammatory, Anti-bacterial and Anti-oxidant Activities for Subcritical Extract of *Chamaecyparis obtusa*

Jung Eun Kim^{1,*} · Min Jeong Kim² · Ji Young Moon² · Jeong Mi Kim²
Tae Heon Oh³ · Nam Ho Lee^{4,†}

¹Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Korea

²UCL Co., Ltd.

³Daebong LS Co., Ltd.

⁴Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Korea

(Received February 23, 2024; Revised April 26, 2024; Accepted May 2, 2024)

요약 : 본 연구에서는 편백나무(*Chamaecyparis obtusa*) 잎 아임계 수 추출물의 항염, 항균 및 항산화 효능을 열수 추출물과 비교 분석하였다. 아임계 수 추출물 중 165°C 이상의 조건으로 추출한 아임계 수 추출물의 수율이 39.4 ~ 48.5%로 열수 추출물(31.5%) 보다 높게 나타났다. Lipopolysaccharide (LPS)로 자극된 RAW 264.7 대식세포를 이용한 nitric oxide (NO) 생성 억제 활성 실험 결과, 아임계 수 추출물이 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO의 생성을 저해시키는 효과가 우수함을 확인하였다. 또한 *Cutibacterium acnes* 및 *Staphylococcus epidermidis*를 이용한 항균 활성 실험 결과, 아임계 수 추출물이 열수 추출물보다 효능이 우수하게 나타났다. DPPH 및 ABTS 양이온 라디칼 소거 활성 실험 결과, 아임계 수 추출물의 라디칼 소거능이 열수 추출물과 유사하게 나타났으며, 아임계 수 추출물(165°C, 80 bar)은 과산화수소(H₂O₂)로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과를 보였다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 편백나무 잎 아임계 수 추출물은 항염, 항균 및 항산화 효과를 갖는 천연 화장품 소재로써 활용 가능할 것이라 사료된다.

주제어 : 편백, 아임계 수 추출물, 항염, 항균, 항산화

†Corresponding author

(E-mail: namho@jejunu.ac.kr)

Abstract : In this study, the anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-oxidative activities of subcritical water extract from *Chamaecyparis obtusa* leaves was compared with hot water extract. The yield of subcritical water extract (165°C and 180°C, 80 bar) was 39.4 ~ 48.5%, higher than 31.5% of hot water extract. In the anti-inflammatory tests using lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 macrophages, the subcritical water extract concentration-dependently inhibited production of nitric oxide (NO) without causing cell toxicity. Upon the anti-bacterial studies using *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*, subcritical water extract showed the stronger activity than hot water extract. In addition, DPPH and ABTS cation radical scavenging activity experiments showed that the radical scavenging activity of subcritical water extract was similar to that of hot water extract. Moreover, in the study of cell protection effect using HaCaT keratinocytes damaged by hydrogen peroxide (H₂O₂), the subcritical water extract (165°C, 80 bar) indicated protective effect against oxidative stress. These results suggested that the subcritical water extract of *C. obtusa* leaves as natural ingredients could be used as anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-oxidative ingredients in cosmetic formulations.

Keywords : *Chamaecyparis obtusa*, subcritical water extract, anti-inflammation, anti-bacterial activity, anti-oxidation

1. 서론

피부는 외부에서 유입되는 이물질로부터 인체를 보호하고, 피지와 땀의 분비, 약물과 화장품의 흡수, 촉각, 압각, 감각 인지 등의 기능이 있다. 그러나 이러한 피부는 생리적, 환경적 변화에 의해 여드름, 색소침착, 지루성 피부염, 아토피성 피부염, 비듬 등의 피부 이상 또는 질환이 발생한다[1]. 표피가 화학물질이나 자외선 등의 환경적 스트레스에 지속적으로 노출되면 체내 대사 균형이 무너지며, 피부 노화나 염증 반응을 유발한다[2]. 염증반응은 생체 내에 외부 유해 물질이 유입되었을 때 발생하는 조직 손상을 국소화하며 몸을 보호하려는 방어기전이다[3]. 그러나 염증반응이 과도하거나 지속적으로 나타나게 되면 주변 조직의 손상과 더불어 생체기능에 이상을 가져와 질병의 상태를 악화시키거나 새로운 질병이 생기게 된다[4]. 염증반응에 관여하는 세포인 대식세포(macrophage)는 체내에서 선천적으로 면역반응을 담당하는 세포로 알려져 있으며 동물 체내 모든 조직에 분포한다[5]. 박테리아와 같은 세균이 체내로 침투하면 세균 세포막 성분인 lipopolysaccharide (LPS) 등에 의해 대식세포가 자극을 받아 활성화된다. 활성화된 대식세포는 nitric oxide (NO), prostaglandin (PG) E₂, tumor necrosis factor (TNF)- α 등과 같은 염증

매개 물질들을 분비한다[6]. NO는 cytokine의 자극 또는 미생물의 침입으로 인해 세포가 활성화되어 생성되는 것으로 혈관 확장, 세포 내 항상성 유지, 항암 작용 등에 관여하는 신호 전달자이지만 과량으로 존재할 경우 만성염증, 퇴행성 뇌질환, 암의 진행 및 악화 등을 유발하게 된다 [7,8].

여드름 원인균인 *Cutibacterium acnes*는 피부 내에 존재하는 상재균으로 정상상태에서는 피부 면역시스템에 의해 관용된다. 그러나 안드로젠의 과다 분비에 의한 피부지방 조성의 불균형 및 *C. acnes*의 증식으로 인하여 여드름과 같은 피부질환이 발생한다[9]. 호기성균인 *Staphylococcus epidermidis*는 외모낭이나 모낭의 중간에서 성장하며, 원발성 피부질환 및 여드름 증상의 속발성을 악화시키는 원인균이다. 이러한 *C. acnes*와 *S. epidermidis* 등의 균들이 염증 반응을 유발하는데 주된 역할을 하게 되므로 염증성 여드름의 치료에 항생제가 주로 사용되고 있으나 화장품 응용이 부적합한 의료용 항생제나 화학 합성품들이 대부분이며, 이들은 피부자극, 간독성, 내성 발생 등의 부작용이 알려져 있다[10,11].

생체 내에서 정상적인 대사과정을 통해 사용되는 산소 중 일부는 유해한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 변하게 된다. 활성산소는 안정한 형태인 삼중항산소(³O₂)가 환원되어

생성되며 superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) 등이 있다. 이와 같은 유해 활성산소는 대부분 화학적으로 불안정한 free radical이다. 과도한 활성산소 생성은 신체에 악영향을 끼쳐 각종 질병과 노화를 유발하는 주범이 되고 있다[12,13].

아임계 수(subcritical water)는 물의 끓는점 (100°C)과 임계 온도(374°C) 사이에 압력이 가해진 상태($< 22.1 \text{ MPa}$)에서 액체 상태를 유지하는 물로 이를 추출에 이용하는 방법이 아임계 수 추출법이다. 기존의 환류 냉각 추출 등과 비교하여 추출 시간이 짧고 적은 양의 용매가 소모되며 온도와 압력 조절을 통해 용매의 극성을 폭넓게 조절함으로써 생리활성 물질에 대한 선택적 추출을 가능하게 한다[14,15]. 산, 알칼리 등 촉매 없이 물·열·압력으로 처리하므로 아임계 수 추출은 친환경 공법이며, 추출시간도 5~30 min 정도로 짧은 것이 장점이다[16].

편백나무(*Chamaecyparis obtusa*)는 측백과(Cupressaceae)에 속하는 상록 침엽 교목으로 1959년부터 원산지 일본에서 도입 재배해 왔으며 주로 한국 남부지방에 서식하고 있다[17]. 편백나무 잎 추출물에는 주로 테페노이드(terpenoid), 리그난(lignan), 플라보노이드(flavonoid), 스테로이드(steroid), 지방산 등의 성분이 보고되어 있으며, 특히 편백 정유의 주요 성분인 모노테펜(monoterpene), 세스퀴테펜(sesquiterpene)은 강력한 항균 효과를 나타낸다고 알려져 있다[18]. 편백나무 잎 추출물에 대한 생리활성 연구로는 항균, 항염, 항암, 살충 효과 등이 보고되어 있다[19,20]. 그러나 대부분의 효능 연구가 정유 성분 또는 유기 용매나 열수 추출물에 관한 것이므로 본 연구에서는 친환경 추출법인 아임계 수로 편백 잎을 추출하여 항염, 항균 및 항산화 효능을 열수 추출물과 비교 분석하여 화장품 원료 등의 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

본 연구에 사용한 편백 잎은 2021년 9월에 서귀포시 광평리에서 채집한 시료를 제주자원식물연구소(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 건조된 편백 잎은 분쇄하여 냉장 보관하면서 사용하였다.

2.2. 편백 잎 아임계 수 및 열수 추출물 제조

건조 및 분쇄된 편백 잎 0.3 g과 모래 10 g을 40 mL 아임계 추출 셀 4개에 충전한 후, 아임계 추출장치(SpeedExtractor E-916, BUCHI, Switzerland)에 장착하였다. 아임계 추출 조건은 $150 \sim 180^\circ\text{C}$, 80 bar의 조건으로 15 min 동안 추출하였으며, 추출 용매로는 증류수를 이용하였다. 얻어진 아임계 수 추출액은 감압 농축하고 동결 건조시켜 분말 형태의 아임계 수 추출물을 얻었다. 열수 추출물은 건조, 분쇄된 편백 잎 1.2 g을 증류수 160 mL에 넣고 100°C 에서 4 h 동안 추출하였으며, 추출된 용액을 여과하여 걸러진 여액을 감압 농축하고 동결건조시켜 분말 형태의 열수 추출물을 얻었다.

2.3. 항염 활성

2.3.1. 세포 배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell은 American Type Cell Culture (ATCC, USA)로부터 분양 받아 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (GIBCO Inc., USA) 및 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO Inc., USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO Inc., USA) 배지를 사용하여 37°C , 5% CO_2 항온기에서 배양하였으며, 2~3 일에 한 번씩 계대 배양하였다.

2.3.2. NO 생성 억제 활성

48 well plate에 1×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 37°C , 5% CO_2 조건하에서 18 h 배양 후, 배지를 제거하였다. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS (Sigma, USA)를 포함하는 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 24 h 배양하였다. 이후 세포배양 상등액 100 μL 와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 μL 를 혼합하여 96 well plate에서 10 min 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였고, sodium nitrite (NaNO_2)를 standard로 사용하여 정량하였다.

2.3.3. 세포 독성 평가(MTT Assay)

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl

ltetrazolium bromide (MTT, Biosesang, Korea) assay는 RAW 264.7 세포를 48 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 18 h 전배양 후, LPS와 시료를 농도별로 동시에 처리하여 24 h 배양하였다. 이후 500 µg/mL의 농도로 MTT를 첨가하여 37°C에서 3~4 h 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

2.4. 항균 활성

2.4.1. 균주 배양

여드름균인 *C. acnes* (CCARM 0081)와 표피 포도상구균인 *S. epidermidis* (CCARM 3709)를 항생제내성균주는은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양 받아 사용하였다. *C. acnes*는 배양배지를 GAM (Gifu anaerobic medium)으로 하여 37°C, 혐기성 조건에서 배양하였으며, 2일에 한 번씩 계대 배양하였다. *S. epidermidis*는 배양배지를 TSB (tryptic soy broth)로 하여 37°C에서 배양하였으며, 하루에 한 번씩 계대 배양하였다.

2.4.2. 한천확산법

(Paper Disc Diffusion Method)

시료의 항균 활성을 확인하기 위해 한천확산법으로 clear zone의 크기를 측정하였다. *C. acnes*는 1.0×10^8 CFU/mL, *S. epidermidis*는 1.5×10^6 CFU/mL로 맞춰준 후, 0.8% agar를 포함하는 배지에 넣어 하드배지(1.5% agar) 위에 접종하였다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm의 paper disc를 올린 후, *C. acnes*는 37°C에서 48 h 동안 혐기 배양하고, *S. epidermidis*는 37°C에서 24 h 동안 배양한 후, 형성된 원형 발육 저지환(clear zone)의 크기를 측정하였다. 대조군으로는 erythromycin을 사용하였다.

2.5. 항산화 활성

2.5.1. DPPH 라디칼 소거 활성

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA) 라디칼 소거 활성 실험은 Blois 방법[21]을

응용하였고, 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20 µL와 0.2 mM DPPH 라디칼 용액 180 µL를 혼합하여 상온에서 10 min 동안 반응시킨 후, 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 소거 활성(scavenging activity) 백분율(%)을 계산하였으며, 양성 대조군으로는 butylated hydroxytoluene (BHT, Sigma, USA)를 사용하였다.

2.5.2. ABTS 양이온 라디칼 소거 활성

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma, USA) 양이온 라디칼 소거 활성은 Re 등의 방법[22]을 응용하였고, 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate (Sigma, USA)를 혼합하여 실온 및 암소에서 16 h 동안 반응시켜 ABTS 양이온 라디칼을 형성시켰다. 이 용액을 에탄올로 희석하여 700 nm에서 흡광도가 0.78 ± 0.02 가 되도록 하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 농도별로 희석한 시료 용액 20 µL와 ABTS 양이온 라디칼 용액 180 µL를 혼합하여 상온에서 15 min 동안 반응시킨 후, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 소거 활성 백분율(%)을 계산하였으며, 양성 대조군으로는 BHT를 사용하였다.

2.6. 세포보호 효과

2.6.1. 세포 배양

Immortalized human keratinocyte cell line인 HaCaT cell은 ATCC로부터 분양 받아 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin 및 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대 배양하였다.

2.6.2. 세포 독성 평가(MTT assay)

96 well plate에 1×10^4 cells/well로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 전배양 후, 배지를 제거하였다. FBS가 함유되지 않은 배지에 시료를 농도별로 각각 처리하여 24 h 배양 후, 500 µg/mL의 농도로 MTT를 첨가하여 37°C에서 3~4 h 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

2.6.3. 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과

96 well plate에 1×10^4 cells/well로 세포를 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24 h 전배양 후, 배지를 제거하였다. 6 mM 과산화수소를 포함하는 배지 100 μ L로 교환하여 30 min 동안 배양 후, 배지를 제거하고 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)로 2 회 세척하였다. FBS가 함유되지 않은 배지에 시료를 농도별로 각각 처리하고 24 h 배양한 후, MTT assay로 세포 생존율(%)을 계산하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과를 확인하였다.

2.7. 통계 분석

모든 실험은 3 회 반복으로 이루어졌으며, 실험 결과는 평균과 표준편차로 나타내었다. 또한 excel software (version 2022, Microsoft Corp., USA)의 student's *t*-test로 통계학적 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 편백 잎 아임계 수의 추출 수율

편백나무 잎 아임계 수 추출물의 항염, 항균 및 항산화 효능을 확인하여 화장품 원료로의 이용 가능성을 알아보기 위해, 열수 추출물과 수열 및 효능을 비교 분석하였다. 편백 잎의 아임계 수 추출은 온도를 변수로 하여 3 가지 조건(150°C, 165°C 및 185°C, 80 bar)으로 15 min 동안 추출하였으며, 감압 농축 및 동결건조하여 분말 형태의 추출물을 얻어 각 추출물의 수율을 비교하였다. 그 결과 165°C 이상의 조건으로 추출한 아임계 수 추출물의 수율이 열수 추출물보다 높게 나타났으며, 특히 185°C에서 추출한 아임계

수 추출물의 수율은 48.5%로 열수 추출물(31.5%)의 1.5배 이상으로 확인되었다(Table 1).

3.2. 편백 잎 아임계 수 추출물의 항염 활성

편백 아임계 수 추출물의 항염 효과를 확인하기 위해 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포를 이용하여 NO 생성 억제 활성 및 세포 독성을 측정하였다. 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 내독소로 잘 알려진 LPS는 대식세포 또는 단핵구를 자극하여 TNF- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6와 같은 염증 매개성 사이토카인들의 분비를 촉진하며 NO의 대량 생성에 관여하게 되어 숙주에 치명적인 결과를 초래한다고 알려져 있다[23]. 따라서 시료에 대한 항염 효과를 확인하기 위해 대식세포에 LPS 자극을 가하여 NO의 생성량을 확인하는 방법이 널리 이용되고 있다[24]. 각 조건별로 추출한 편백 잎 시료의 농도를 10, 20, 30 μ g/mL로 처리하였을 때, 열수 추출물은 30 μ g/mL에서 세포 독성을 보였지만, 아임계 수 추출물은 세포 독성을 나타내지 않았다. 또한 NO 생성 억제 활성도 아임계 수 추출물이 열수 추출물 보다 우수하게 나타났으며, 특히 150°C, 80 bar 조건에서 추출한 아임계 수 추출물의 NO 생성 저해 활성이 가장 높게 나타남을 확인하였다(Figure 1).

3.3. 편백 잎 아임계 수 추출물의 항균 활성

또한 편백 잎 아임계 수 추출물의 항균 활성을 측정하기 위해 피부 관련 균주인 *C. acnes* 및 *S. epidermidis*를 이용하여 한천확산법으로 clear zone의 크기를 확인하였다. 그 결과, 편백 잎 아임계 수 추출물에서 항균 활성이 나타났으며, 이는 열수 추출물보다 항균 활성이 우수한 것으로 확인되었다(Table 2).

Table 1. Extraction Condition and Yield of *C. obtusa* Leaves Extract by various Extraction Methods

Extraction Method	Time	Sample (g)	Extract (g)	Yield (%)	
Hot Water	4 h	1.2 g	0.378	31.5	
Subcritical Water	150°C, 80 bar	15 min	1.2 g	0.349	29.1
	165°C, 80 bar	15 min	1.2 g	0.473	39.4
	180°C, 80 bar	15 min	1.2 g	0.582	48.5

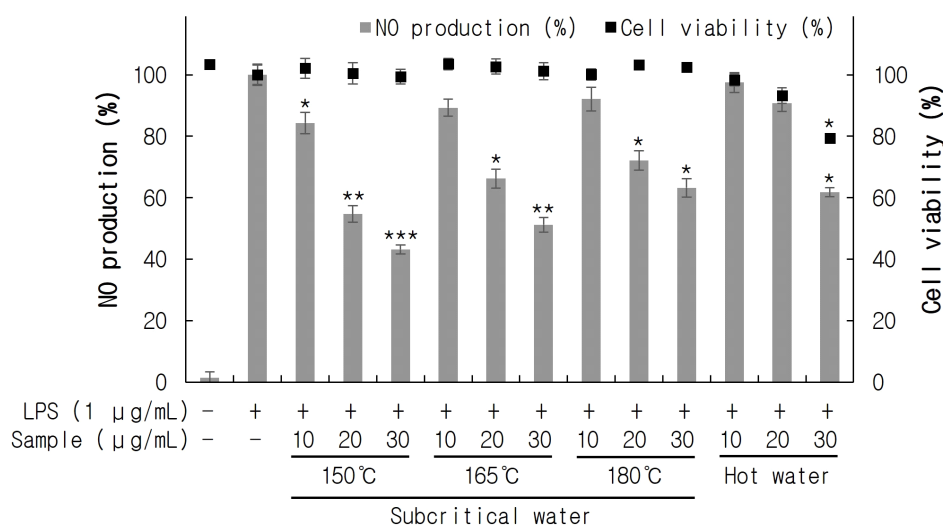


Fig. 1. Effects of subcritical water and hot water extract from *C. obtusa* leaves on NO production and cell viability in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μ g/mL of LPS only, or with LPS plus subcritical water and hot water extract from *C. obtusa* leaves for 24 h. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 compared with LPS treated group)

Table 2. Anti-bacterial Activities of Subcritical Water and Hot Water Extract from *C. obtusa* Leaves

	Clear Zone (mm) ¹⁾	
	<i>C. acnes</i> (CCARM 0081)	<i>S. epidermidis</i> (CCARM 3709)
Hot Water	9.2 \pm 0.3	8.5 \pm 0.5
Subcritical Water	150°C, 80 bar	11.5 \pm 0.5
	165°C, 80 bar	10.7 \pm 0.3
	180°C, 80 bar	10.3 \pm 0.3
Erythromycin	46.9 \pm 1.0	30.5 \pm 0.5

¹⁾Concentration of sample : 5 mg, erythromycin : 20 μ g

3.4. 편백 잎 아임계 수 추출물의 항산화 활성

시료의 항산화 효능은 라디칼 소거능을 이용하였으며, DPPH는 비교적 안정한 hydrazyl 라디칼 화합물로서, 항산화 기질과 반응하여 중성인 hydrazin으로 변환되며 DPPH 용액의 변색이 수반된다. 따라서 식물 추출물의 라디칼 소거 활성 측정법으로서 DPPH 용액의 흡광도 변화를 추적하는 방법이 매우 효과적으로 이용되고 있다. 또

한 ABTS를 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와 반응에 의해 생성된 ABTS 양이온 유리 라디칼이 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법이다. DPPH 라디칼 소거능과 마찬가지로 인위적인 라디칼을 제거하는 작용 기작이 공통적이며, DPPH 라디칼 소거능과 유의적인 상관성을 보이는 것으로 알려져 있다[25]. 이러한 원리를 이용

하여 편백 잎 아임계 수 추출물의 라디칼 소거 활성을 측정한 결과, 아임계 추출로 인한 라디칼 소거능이 감소하지 않고 열수 추출물과 활성이 유사하게 나타남을 확인하였다(Figure 2).

3.5. 편백 잎 아임계 수 추출물의 세포보호 효과

산소의 대사 과정에서 생성되거나 자외선 및 스트레스와 같은 환경적 요인에 의해서 과잉 생성된 과산화수소는 세포막을 통과하여 생체 내 미량으로 존재하는 금속이온과 반응하고 다른 활성산소를 생성시켜 세포 손상을 야기시킨다. 산화적 손상을 유발하는 활성산소인 과산화수소를 인

간 각질형성세포인 HaCaT 세포에 처리하고 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰하였다[26]. 과산화수소 처리 전, MTT assay를 이용하여 실험에 사용될 시료의 농도 범위를 결정하였다. 편백 아임계 수 및 열수 추출물을 2.5, 5 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 HaCaT 세포에 처리하여 독성을 확인한 결과, 아임계 수 추출물은 세포 독성이 나타나지 않았지만, 열수 추출물은 5 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서는 세포에 대한 독성이 있음을 확인하여 열수 추출물의 시료 처리 농도는 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 이하로 농도를 결정하였다(Figure 3).

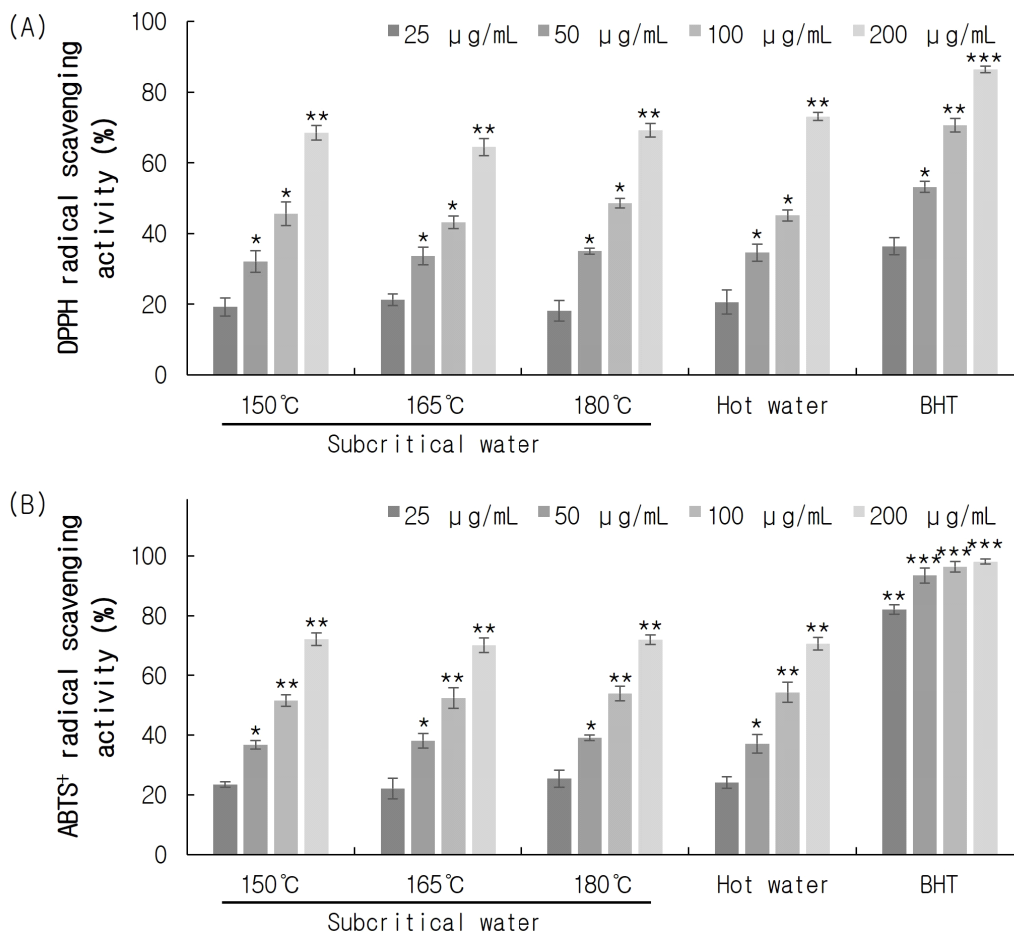


Fig. 2. DPPH (A) and ABTS cation (B) radical scavenging activities of subcritical water and hot water extract from *C. obtusa* leaves. The data are expressed as a percentage of control and represent the mean \pm SD of triplicate experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with untreated control group)

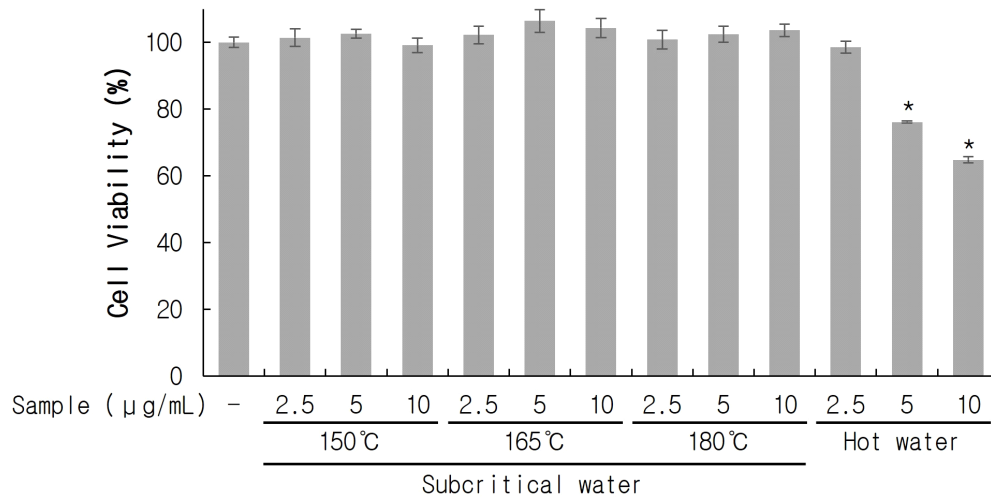


Fig. 3. Cell viability of subcritical water and hot water extract from *C. obtusa* leaves. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and then cell toxicity was determined by MTT assay. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. (* $p < 0.05$ compared with untreated group)

편백 잎 아임계 수 추출물 및 열수 추출물이 인간 각질형성세포에 독성을 미치지 않는 농도 범위를 바탕으로, 과산화수소로 세포 손상이 유도된 HaCaT 세포에서 세포보호 효과를 측정하였다. 그 결과, 편백 잎 열수 추출물의 세포 생존율은 과산화수소 6 mM을 처리한 control (58.4%) 대비 증가하지 않았으나, 아임계 수 추출물 중 165°C, 80 bar 조건의 추출물은 10 µg/mL의 농도에서 세포 생존율이 68.3%, 180°C, 80 bar 조건의 추출물은 66.5%로 세포보호 효과가 있음을 확인하였다(Figure 4). 이를 바탕으로 편백 잎 아임계 수 추출물 중 165°C 및 180°C, 80 bar 조건의 추출물은 세포 독성이 나타나지 않는 농도(30 µg/mL)까지 시료를 처리하여 세포 생존율을 측정하였다(Figure 5). 실험 결과, 165°C, 80 bar 조건의 아임계 수 추출물은 시료의 처리 농도가 높아질수록 농도의존적으로 세포 생존율이 증가하는 경향을 나타내었으며, 시료 처리 농도가 30 µg/mL일 때 19.8%의 세포보호 효과가 있는 것으로 확인되었다(Figure 6). 아임계 수 추출은 비교적 비극성을 나타내는 유효성분을 유기

용매를 대체하여 오직 물 만을 추출 용매로 하여 온도와 압력을 조절함으로써 용매의 극성을 폭넓게 조절하여 활성 물질에 대한 선택적 추출을 가능하게 한다[26]. 아직까지 아임계 수 추출기술을 이용한 천연물의 효능이나 성분에 대한 연구 결과는 미미한 실정이나, 최근 연구된 결과를 보면, 아임계 수 추출을 통해 유효성분의 함량이 증가할 수 있으며, 특히 150°C 이상의 온도에서 추출한 아임계 수 추출물의 폴리페놀 등의 함량이 증가하는 경향이 나타남을 확인할 수 있다[27]. 또한 아임계 수를 이용한 유효성분의 효율적인 추출을 위해서는 화합물 특성에 따라 아임계 수 추출 조건이 달라져야 하며[28], 저자의 이전 연구 결과에서도 동백 꽃에서 유효성분인 gallic acid의 함량이 165°C에서 추출했을 때, 가장 높게 분석됨을 확인하였다[16]. 따라서, 편백 잎 아임계 수 추출물 중 165°C, 80 bar 조건에서의 추출물에서 세포보호 효과를 나타내는 성분들이 효율적으로 추출되어 우수한 효능을 나타내는 것으로 보인다.

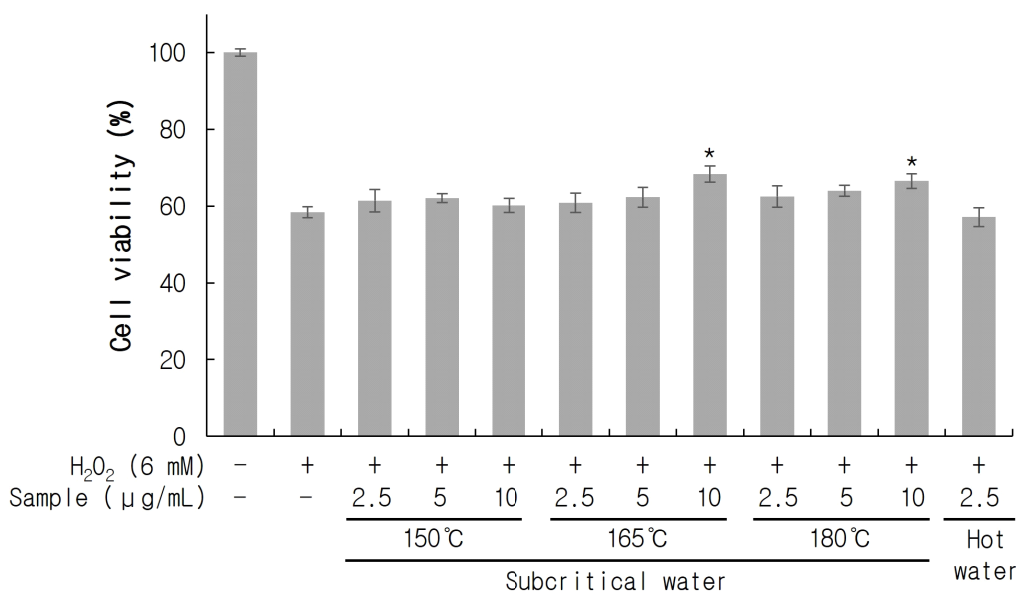


Fig. 4. Cell protective effects of subcritical water and hot water extract from *C. obtusa* leaves on HaCaT cells damaged by H₂O₂. HaCaT cells were treated with different concentration of subcritical water and hot water extract from *C. obtusa* leaves for 24 h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments. (**p* < 0.05 compared with H₂O₂ treated group)

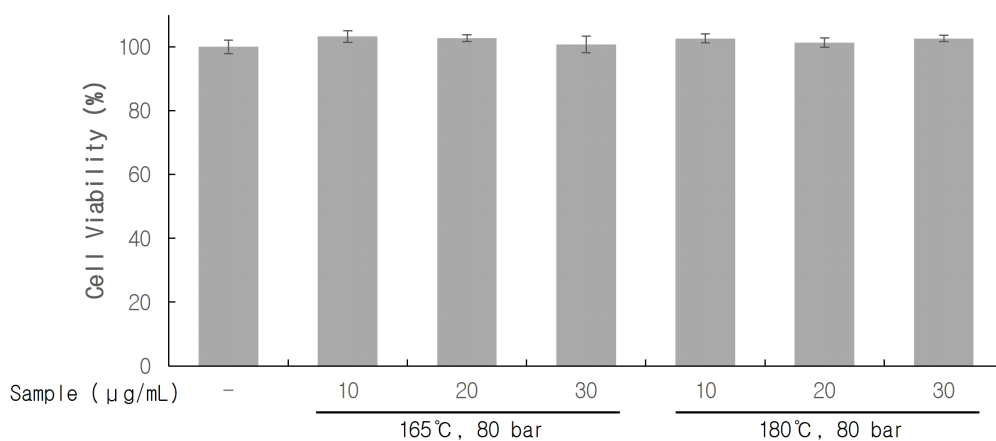


Fig. 5. Cell viability of subcritical water extract from *C. obtusa* leaves. HaCaT cells were treated with different concentration of samples, and then cell toxicity was determined by MTT assay. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments.

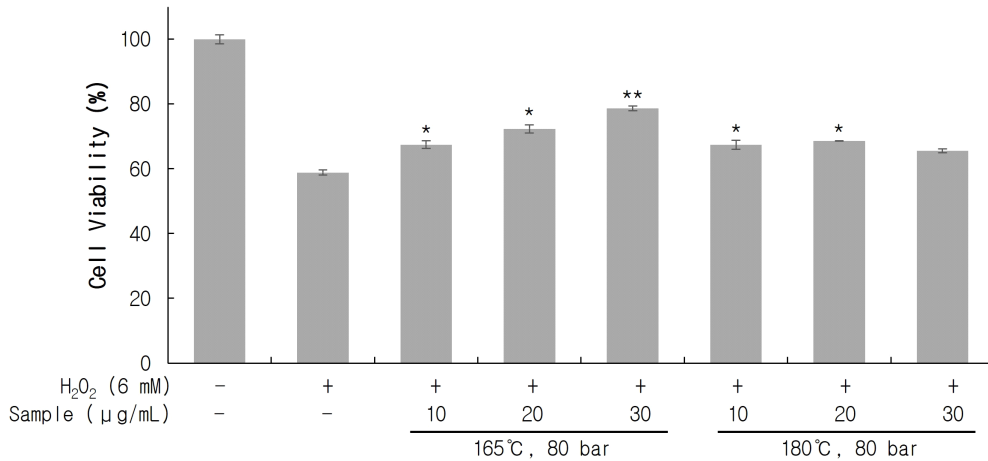


Fig. 6. Cell protective effects of subcritical water extract from *C. obtusa* leaves on HaCaT cells damaged by H₂O₂. HaCaT cells were treated with different concentration of subcritical water extract from *C. obtusa* leaves for 24 h after being exposed to oxidative stress. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with H₂O₂ treated group)

4. 결론

아임계 수 추출은 기존에 천연물 추출에 사용되었던 에탄올 등의 유기용매를 사용하지 않고도 물만으로 열과 압력을 가하여 유용한 성분을 추출함으로써 친환경적으로 화장품 원료를 생산할 수 있는 장점을 지니고 있다. 따라서 본 연구에서는 편백 잎을 아임계 수로 추출하여 항염, 항균 및 항산화 효능을 기존의 보편적인 추출법인 열수 추출물과 비교 분석함으로써 화장품 원료로의 활용 가능성을 알아보려 하였다. 그 결과, 165°C 이상에서 추출한 편백 잎 아임계 수 추출물의 수율이 열수 추출물보다 높게 나타났으며, 특히 180°C, 80 bar 조건에서의 수율이 48.5%로 열수 추출물(31.5%) 보다 1.5배 이상 높게 나타나는 것을 확인하였다. 편백 잎 아임계 수 추출물의 항염 효능 실험 결과, 아임계 수 추출물이 세포 독성 없이 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제시키는 효과가 있음을 확인하였으며, 이는 열수 추출물보다 더 효능이 우수하였다. 또한 피부 관련 균주인 *C. acnes* 및 *S. epidermidis*를 이용한 항균 활성 실험에서는 아임계 수 추출물이 열

수 추출물보다 clear zone의 크기가 크게 나타나 항균 활성이 우수함을 확인하였다. DPPH 및 ABTS 양이온 라디칼을 활용한 항산화 활성 실험 결과, 편백 잎 아임계 수 추출물은 열수 추출물과 유사한 라디칼 소거능을 보였으며, 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 효과 측정에서는 165°C, 80 bar 조건에서 추출한 아임계 수 추출물이 세포보호 효과가 있음을 확인하였다. 향후 연구에서는 아임계 수 추출물과 기타 추출물들과 유효성분을 비교 분석하여 효능 변화와의 연관 관계를 추적하고자 한다. 이상의 연구 결과는 편백 잎 아임계 수 추출물이 항염, 항균, 항산화 및 세포보호 효과를 갖는 친환경 천연 화장품 소재로 활용 가능성을 제시하고 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 중소기업기술정보진흥원의 “지역특화산업육성+(R&D, S3270326)” 사업의 지원을 받아 수행된 연구결과임.

References

1. H. S. Lee and M. S. Shin, "Antimicrobial effects of *Luffa cylindrica* extract against 4 skin microorganisms", *J. Kor. Soc. Cosm.*, Vol.21, No.3 pp. 471-476 (2015).
2. S. H. Kim, J. E. Kim, and N. H. Lee, "Anti-inflammatory and anti-oxidative constituents from the extract of *Cinnamomum yabunikkei* leaves", *J. Kor. Chem. Soc.*, Vo.65, No.1 pp. 15-24 (2021).
3. J. Y. Sung and Y. M. Kim, "Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of *Rumex acetosa* L. in RAW 264.7", *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.48, No.3 pp. 213-223 (2022).
4. A. Rabson, I. M. Roitt, P. J. Delves, "Really Essential Medical Immunology", Blackwell publishing Ltd. (2005).
5. H. N. Ko, Ph. D. Dissertation, Jeju National Univ., Jeju, Korea (2018).
6. H. S. Yeom, Master's Thesis Dissertation, Jeju National Univ., Jeju, Korea (2018).
7. H. M. Yang, S. S. Lim, Y. S. Lee, H. K. Shin, Y. S. Oh, J. K. Kim, "Comparison of the Anti-inflammatory Effects of the Extract from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*", *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol.39, No.3 pp. 342-347 (2007).
8. P. K. Lala and C. Chakraborty, "Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression", *Lancet Oncol.*, Vol.2, No.3 pp 149-156 (2001).
9. A. Koreck, A. Pivarcsi, A. Dobozy, and L. Kemeny, "The role of innate immunity in the pathogenesis of acne", *Dermatology*, Vol.206, No.2 pp. 96-105 (2003).
10. H. S. Kim, Master's Thesis Dissertation, Konkuk Univ., Seoul, Korea (2011).
11. M. S. Kang, H. J. Oh, H. C. Lee, and J. S. Oh, "Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting the proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*", *Journal of Bacteriology and Virology*, Vo.39, No.1 pp. 11-19 (2009).
12. D. S. Hah, C. H. Kim, G. S. Kim, E. G. Kim, and J. S. Kim, "Antioxidative effects of traditional medicinal plants on lipid peroxidation", *Korean J. Vet. Res.*, Vol. 45, No.3 pp. 341-350 (2005).
13. J. E. Seo, E. S. Hwang, and G. H. Kim, "Antioxidative and differentiation effects of *Artemisia capillaris* T. extract on hydrogen peroxide-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast cells", *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol. 40, No.11 pp. 1532-1536 (2011).
14. Y. J. Ra, Y. W. Lee, J. D. Kim, and K. H. Row, "Supercritical fluid extraction of catechin compounds from green tea", *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, Vol.16, No.4 pp. 327-331 (2001).
15. R. M. Smith, "Extractions with superheated water", *J. Chromatogr. A*, Vol.975, No.1 pp. 31-46 (2002).
16. J. E. Kim, Y. R. Ko, S. H. Boo, S. H. Kang, and L. H. Lee, "Anti-inflammatory and anti-oxidative activities for the subcritical water extract of *Camellia japonica* flowers", *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vo.48, No.2 pp. 97-104 (2022).
17. T. L. Kim, K. Lee, W. Cho, D. Park, I. Lee, and H. Lim, "Genetic diversity and physiological response to drought stress of *Chamaecyparis obtusa* from six geographical locations", *Plant Breed. Biotech.*, Vol.9, No.2 pp. 112-123 (2021).
18. M. J. Park, S. M. Lee, K. S. Gwak, E. B. Jeung, J. W. Chang, and I. G. Choi, "Investigation of active antifungal compounds of essential oil from *Chamaecyparis obtusa* against dermatophytes, microsporium canis and trichophyton mentagrophytes", *J. Korean Wood Sci. Technol.*, Vol.33, No.3 pp. 72-78 (2005).
19. J. H. Kim, S. O. Lee, K. B. Do, W. D. Ji, S. G. Kim, Y. D. Back, and K. J. Kim, "Analysis of the component and immunological efficacy of *Chamaecyparis*

- obtusata* leaf extract”, *Korean J. Clin. Lab. Sci.*, Vol.50, No.1 pp. 37-43 (2018).
20. Y. J. Kwon, E. B. Seo, S. K. Kim, K. H. Noh, H. Lee, Y. W. Joung, H. M. Shin, Y. A. Jang, Y. M. Kim, J. T. Lee, and S. K. Ye, “*Chamaecyparis obtusa* (Siebold & Zucc.) Endl. leaf extracts prevent inflammatory responses via inhibition of the JAK/STAT axis in RAW264.7 cells”, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.282, pp. 114493 (2022).
 21. M. S. Blois, “Antioxidant determination by the use of a stable free radical”, *Nature*, Vol. 181, pp. 1199-1200 (1958).
 22. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay”, *Free Radic. Biol. Med.*, Vol.26, No.9-10 pp. 1231-1237 (1999).
 23. A. L. Jeon, J. E. Kim, and N. H. Lee, “Whitening and anti-inflammatory constituents from the extract of *Citrullus lanatus* vines”, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.43, No.1 pp. 53-60 (2017).
 24. S. H. Park, J. E. Kim, and N. H. Lee, “Isolation and evaluation of anti-oxidative constituents from the extract of *Ficus erecta* var. *sieboldii* King leaves”, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.42, No.4 pp. 321-328 (2016).
 25. H. S. Yeom, N. H. Lee, and J. M. Hyun, “Anti-oxidative activities for the flavonoids of the *Syzygium aqueum* Burm.f. Alston branches from Jeju island”, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.44, No.2 pp. 151-159 (2018).
 26. M. J. Ko, H. H. Nam, M. S. Chung, “Optimization of drying conditions for the conversion of 6-gingerol to 6-shogaol under subcritical water extraction from ginger”, *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol.51, No.5 pp. 447-451 (2019).
 27. H. S. Na, J. Y. Kim, J. S. Park, G. C. Choi, S. I. Yang, J. H. Lee, J. Y. Cho, S. J. Ma, “Characteristics of marine algare extracts using subcritical water extract method”, *Korean J. Food. Preserv.*, Vol.21, No.1 pp.62-68 (2014)
 28. C. W. Kim, Master’s Thesis Dessertatio, Pukyong National Univ., Busan, Korea (2019).