

편백 오일의 항주름, 피부 장벽 및 보습능 평가

강은정^{1,*} · 장영아² · 이진태³ · 김성희⁴ · 김소현⁵ · 박지아^{6,†} · 최윤식^{7,†}

¹경성대학교 약학과, 석사과정

²경성대학교 스마트헬스케어융합연구센터, 교수

³경성대학교 화장품학과, 교수

⁴경성대학교 화장품학과, 석사과정

⁵경성대학교 화장품학과, 학생

⁶경성대학교 제약공학과, 강사

⁷경성대학교 약학과, 교수

(2023년 4월 12일 접수: 2023년 4월 23일 수정: 2023년 4월 24일 채택)

The effects of *Chamaecyparis obtusa* oil on anti-wrinkle, skin-barrier and moisturizing

Eun Jeong Kang^{1,*} · Young-Ah Jang² · Jin-Tae Lee³ · Sung Hee Kim⁴
Sohyun Kim⁵ · Jia Bak^{6,†} · Yun-Sik Choi^{7,†}

^{1,7}Department of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan 48434, Republic of Korea

²Convergence Research Center for Smart Healthcare of KS R&DB Foundation, Kyungsoong university, Busan 48434, Republic of Korea

^{3,4,5}Department of Cosmetic science, Kyungsoong University, Busan 48434, Republic of Korea

⁶Department of Pharmaceutical Science and Technology, Kyungsoong University, Busan 48434, Republic of Korea

(Received April 12, 2023; Revised April 23, 2023; Accepted April 24, 2023)

요 약 : 편백나무(*Chamaecyparis obtusa*)는 측백나무과에 속하며 우리나라 남쪽 지역에서 주로 잘 자생한다. 편백나무의 목재는 재질이 우수하여 가구로서의 활용이 높으며 남은 목재, 가지, 잎은 정유 추출에 사용되고 있다. 편백 정유는 항염, 항균, 탈취, 진정 효능이 탁월한 것으로 알려져 있다. 본 연구는 이러한 편백나무의 잎에서 추출한 오일이 주름 개선, 피부 장벽 및 보습능에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 먼저, DPPH assay와 ABTS assay를 통해 항산화 활성을 평가한 결과, 편백 오일은 두 가지 라디칼을 농도 의존적으로 유의하게 소거하였다. 그리고 주름 생성 억제 효능 평가를 위해 elastase 활성을 측정된 결과, 편백 오일은 elastase 활성을 직접적으로 억제시킴을 확인하였다. 다음으로는 real-time PCR을 통해 유전자 발현을 확인한 결과, 편백 오일은 인간섬유아세포에서 MMP-1 유전자 발현을 유의하게 감소시켰다. 또한, 편백 오일에 의해 각질형성세포에서 filaggrin과 HAS-2 유전자 발현이 유의하게 증가함을 확인하였다.

†Corresponding author

(E-mail: jia3780@ks.ac.kr, tiana@ks.ac.kr)

이러한 결과를 종합해보면, 편백 오일은 주름 개선과 피부 장벽 및 보습능 강화에 도움을 주어 항노화 화장품의 기능성 원료로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

주제어 : 편백 오일, 향주름, 피부 장벽, 피부 보습, 항노화

Abstract : *Chamaecyparis obtusa* (*C. obtusa*) belongs to *Cupressaceae* and grows wild in southern area of Korea. *C. obtusa* has been used for furnitures because of the superior quality of the lumber and remaining branches and leaves were used for extraction of essential oil (*C. obtusa* oil). *C. obtusa* oil has numerous health effects, including anti-inflammation, antibacterial, deodorization, sedative effect. This study was performed to evaluate the effects of *C. obtusa* oil on anti-wrinkles, skin-barrier and moisturizing. First, DPPH and ABTS assay were conducted to evaluate antioxidant effect and *C. obtusa* oil showed significance scavenging activity on both radicals. And elastase activity was examined for anti-wrinkle effect. At the result, elastase activity was significantly reduced by *C. obtusa* oil. Next, real-time PCR was performed to evaluate gene expression. At the results, MMP-1 mRNA expression was significantly reduced by *C. obtusa* oil in HDF cells. In addition, filaggrin and HAS-2 mRNA expression significantly increased by *C. obtusa* oil in HaCaT cells. Taken together, these results indicate that *C. obtusa* oil has potential as a cosmetic material for anti-aging by enhancing anti-wrinkle, skin-barrier and moisturizing effects.

Keywords : *Chamaecyparis obtusa* oil, anti-wrinkle, skin-barrier, moisturizing, anti-aging

1. 서론

피부는 신체 가장 외부에서 신체 내부를 방어하는 중요한 기관이다[1]. 이러한 피부는 시간이 흐름에 따라 주름, 탄력 저하, 건조함, 색소 침착 등이 나타나며 주요 요인으로는 자연 노화(내인성 노화)와 자외선, 미세먼지 등에 의한 유해 작용으로 나타나는 외인성 노화가 있다[2].

피부는 표피, 진피, 피하조직으로 구분되며 가장 바깥층인 표피는 각질세포로 구성되어 있어 피부장벽 기능을 담당한다[1,3]. 각질형성세포(keratinocyte)는 표피의 기저층에서 생성되어 과립층으로 이동하면서 분열과 분화하며, 분화 촉진인자로 필라그린(filaggrin)이 중요하게 작용한다[4]. 필라그린은 각질형성세포의 최종 분화과정 단계에서 프로필라그린(profilaggrin)으로부터 분해되어 생성되며 케라틴을 서로 응집시켜 단단한 피부장벽을 구성하게 한다[1,5]. 이러한 피부장벽은 내인성 노화, 광노화, 스트레스 등에 의해 손상될 수 있으며 이로 인해 피부 염증, 수분 손실, 피부 거칠어짐 등이 나타날 수 있다[6]. 피부 장벽을 유지하기 위해서는 피부 수분 함량을 유지하는 것이 중요하다[5]. 히알루론산(hyaluronic

acid, HA)은 피부 내 존재하는 보습인자로서 각질층으로 부터 수분 증발을 억제하여 피부 장벽 유지뿐만 아니라 탄력성 유지에도 관여한다[3]. 히알루론산은 각질형성세포 및 섬유아세포(fibroblast)에서 hyaluronic synthase (HAS)에 의해 생성되며, HAS-1, HAS-2, HAS-3 세 가지 형태로 알려져 있다[7,8].

노화에 의해 피부 장벽 손상, 수분 손실 등이 일어나면 진피 층 섬유 탄력이 감소하며 주름이 생성된다[5]. 진피는 콜라겐(collagen)과 엘라스틴(elastin)등의 섬유성 단백질로 이루어져 있으며, 이들이 피부 공간을 채우며 외부 충격으로부터 피부를 보호하는 역할을 한다[9,10]. 진피의 대부분을 차지하고 있는 콜라겐은 matrix metalloproteinases (MMPs)에 의해 분해되는데, 노화에 의해 MMPs의 발현이 촉진되어 주름 생성이 증가하는 것으로 보고되고 있다[9-11].

편백나무(*Chamaecyparis obtusa*)는 측백나무과(Cupressaceae)과에 속하며 일본이 원산지이나 우리나라 남쪽 지역에서 주로 잘 자생한다[12]. 편백나무의 목재는 재질의 우수함과 특유 향으로 인해 가구로서 활용도가 높으며 남은 목재, 가지 및 잎은 정유(essential oil) 추출에 사용되고 있다

[13]. 편백나무 잎에서 얻은 정유에는 공기 증으로 발산하는 피톤치드로 인해 항염, 살균, 탈취, 살충, 진정 효능이 있으며 주성분으로는 sabiene, pinene, limonene 등의 monoterpene류와 elemol, cedrol, widdrene 등의 sequiterpene류로 알려져 있다[13-17]. 식물에서 정유 성분 추출은 고체상 미세추출법(solid phase microextraction, SPME)과 수증기 증류 추출법(steam dilution extraction, SDE)이 대부분 사용되고 있다. 그러나 이러한 추출법은 온도를 가하기 위해 열을 이용하기 때문에 추출 성분의 변성이 일어나거나 손실이 되는 경우가 있으며, 수용성 성분은 물에 용해되어 제거되지만 수용성과 지용성의 성질을 가지는 성분의 경우에는 오일층에 잔류하여 수율이 낮아질 수 있다[15,18]. 반면 초임계유체 추출법(supercritical fluid extraction, SFE)은 열에 의한 손실의 단점을 보완할 수 있는 추출법으로, 이산화탄소를 초임계유체 상태로 만들어 기체의 빠른 침투력, 유동성과 확산성을 이용하여 식물에 포함된 향, 색소, 유지류 등의 성분을 변성 없이 분리할 수 있는 기법이다[18,19]. 편백 잎의 정유 성분은 추출기법에 따라 함량 차이가 있으며 수증기 증류 추출법으로 얻은 정유에는 monoterpene류 82.05%, sesquiterpene류 10.72%, diterpene류 4.81%, 기타 2.42%로 나타났으며, 초임계유체 추출법을 통해 얻은 정유에는 monoterpene류 65.33%, sesquiterpene류 25.53%, diterpene류 5.84%, micellaneous 3.3%로 나타났다[17].

편백나무를 활용한 연구 결과로는 편백 잎 정유 성분을 이용한 아토피 피부염 개선[15], 편백 잎 추출수를 이용한 실내공기질 개선[20]과 편백 목재의 항균 효능[21] 등이 있으며 피부 미용과 관련해서는 항염 및 항알레르기 효능[22]와 편백 수피를 이용한 미백 효능[13]으로 주름 개선과 피부 장벽 및 보습과 관련한 연구는 미미하다.

현대사회에서 피부 미용에 관한 관심 증가에 따라 항노화와 관련된 기능성 제품의 수요는 꾸준히 증가하고 있으며 부작용이 적고 친환경적인 천연 소재를 이용한 제품 개발이 활발하게 이루어지고 있다[23]. 따라서 본 연구에서는 초임계유체 추출법을 통해 얻은 편백 오일의 주름 개선, 피부 장벽 및 보습 강화 효능을 평가하고 항노화 화장품 원료로서의 활용 가능성을 제시하고자 한다.

2. 실험

2.1. 시약

실험에 사용된 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), elastase와 N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 ABTS single solution은 Invitrogen (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM)과 fetal Bovine Serum (FBS)는 Gene DEPOT (Barker, TX, USA)에서 구입하였으며 penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. TRI-agent는 Bio science technology (Deagu, South Korea)에서 구입하였으며 RT master mix와 TB Green® Premix Ex Taq™ II는 Takara (Kyoto, Japan)에서 구입하였다. 지표성분 분석을 위한 sabinene 표준품은 Adooq® bioscience (Irvine, CA, USA)에서 구입하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 추출물 제조

본 실험에서는 경남 사천지역에 자생하는 편백나무의 잎을 경상남도 사천시 축동면 내축로의 사천 편백림에서 구매하였으며 건조된 원료를 믹서기로 분쇄한 후 450 g을 초임계 유체 추출에 사용하였다. 초임계 유체 추출은 전남 나노 바이오 연구센터에 의뢰하였으며 300 bar, 40 °C, 180분 조건으로 진행하였다. 수증기 증류 추출법을 통한 편백 오일은 사천 편백림에서 구매하였다. 각각의 오일은 dimethylsulfoxide (DMSO)에 용해 후 -20°C에 보관하여 실험에 필요한 농도로 사용하였다.

2.2.2. 세포 배양

실험에 사용된 각질형성세포주인 HaCaT cell은 대구한의대학교 피부면역약리실험실로부터 제공 받아 사용하였으며 사람섬유아세포주인 HDF는 Thermo fisher scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. 세포 배양은 10% FBS와 100 U/ml penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM에서 37 °C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하

였으며 세포의 밀도가 약 80%가 되었을 때 계대 배양을 하였다.

2.2.3. 지표성분 분석

편백 잎에서 추출한 오일의 지표성분은 Kwak et al., 2019 의 논문을 참고하여 sabinene으로 설정하였으며 기체 크로마토그래피 질량분석법 (GC-MS)을 이용하여 다음과 같이 분석하였다 [19]. 분석 컬럼은 길이 30 m, 내경 250 μm , 두께 0.25 μm 를 사용하였으며 초기 오븐 온도는 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4분간 유지한 후에 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 상승시켜 230 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분간 유지하였다. 이동 기체는 헬륨(유속 1ml/min)을 사용하였으며 시료 1 μl 를 split mode로 주입하였다.

2.2.4. DPPH radical 소거 활성 측정 실험

편백 오일의 항산화 효능을 평가하기 위해 Bak et al., 2022의 방법에 따라 DPPH radical 소거능을 측정하였다[24]. 초임계 유체 추출 오일 (100, 500, 1000, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 50 μl 을 methanol에 용해시킨 0.1 mM DPPH 용액 100 μl 와 혼합하여 30분간 실온에서 차광 하여 반응시킨 후, microplate reader (INNO, South Korea)를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.5. ABTS⁺ radical 소거 활성 측정 실험

편백 오일의 항산화 효능을 평가하기 위해 ABTS⁺ radical 소거능을 Bak et al., 2022의 방법에 따라 측정하였다[24]. ABTS single solution과 5 mM potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)를 2:1로 혼합하고 실온에서 차광 상태로 12 시간 동안 반응시켜 ABTS⁺ radical 형성시켰다. 반응액은 microplate reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도 측정값이 0.7 ± 0.003 이 나오도록 희석하여 사용하였다. 초임계 유체 추출 오일(100, 500, 1000, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 10 μl 와 ABTS⁺ 반응액 50 μl 를 혼합한 후 차광하여 5분간 실온에서 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.6. Elastase 활성 억제 실험

편백 오일의 주름개선 효능평가를 위해 elastase 활성 억제 실험을 Jang and Lee 2015의 방법을 참고하여 다음과 같이 진행하였다[25]. 초임계 유체 추출 오일(0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 50 μl ,

0.4 M Tris-HCl buffer (pH 8.6) 25 μl , 50 mM Tris-HCl (pH 8.6)에 0.6 Units/ml이 되도록 희석한 elastase 25 μl 를 혼합하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시켰다. 이후 1 mg/ml N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide 50 μl 를 넣고 추가로 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.7. 세포생존율 측정

세포 생존율을 측정하기 위해 MTT assay를 진행하였다. 먼저 HDF 세포와 HaCaT 세포를 각각 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건 하에서 24시간 배양한 후 초임계 유체 추출 오일(0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 배지에 희석하여 배양된 세포에 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 처리하고 24 시간 추가 배양하였다. 수증기 증류 추출 편백 오일이 혼합된 복합물 처리를 위해서는 수증기 증류 추출 편백 오일 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 추가로 첨가하여 배양하였다. 배양 후 MTT 시약(5 mg/ml)을 모든 well에 10 μl 씩 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시켰다. 이 후 현미경 하에서 생성된 formazan 결정을 확인한 후 상층액을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 첨가하여 실온에서 30분간 완전히 용해시켰다. 흡광도는 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

2.2.8. Real-time PCR

편백 오일이 주름, 피부장벽과 보습과 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)을 진행하였다. 먼저 24 well plate에 HDF 세포와 HaCaT 세포를 각각 1×10^5 cells/well로 분주한 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건 하에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 초임계 유체 추출 편백 오일 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 수증기 증류 추출 편백 오일 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 초임계 및 수증기 추출 편백 오일 복합물을 처리하여 24 시간 동안 추가 배양하였다. RNA 추출을 위해 배양액을 제거하고 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)로 세포를 세척 후, TRI-solution을 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 첨가하여 세포벽을 용해시킨 후 1.5 ml tube에 회수하였다. 추가로 chloroform을 넣어 수용액 층과 유기용매 층으로 분리하여 수용액 층만 회수하여 새로운 1.5 ml tube로 옮긴 후 차가운 isopropanol을 넣고 원심분리하여 RNA

를 침전시켰다. 이후 75% 에탄올로 RNA 침전물을 세척하고 건조시킨 후 RNase-free water를 넣어 pellet을 녹여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 Nano drop (microdigital, Seongnam, South Korea)으로 정량한 후 RT master mix를 이용하여 역전사 반응을 시켜 cDNA로 합성하였다. 이후 TB Green® Premix Ex Taq™ II를 이용하여 유전자를 증폭하였으며 PCR 조건은 95 °C에서 30초 (denaturation), 55 °C에서 30초 (annealing), 72 °C에서 30초 (extension)과정을 35회 반복하였다. 유전자 증폭에 사용한 primer는 다음과 같다.

2.2.9. 통계분석

실험 결과에 대한 통계는 GraphPad Prism (Version 3.0)을 이용하여 One-way analysis of variance (ANOVA)를 통해 유의성을 확인한 후 Dunnett's multiple comparison 사후 검정을 진행하여 통계적 유의수준을 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 지표성분 분석

편백 잎에서 추출한 오일 성분 중 대표적인 정유 성분은 monoterpene류에 속하는 sabinene으로, 향균, 항염증, 항산화 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다[19, 26-28]. GC-MS를 통해 피크 머무름 시간을 비교하여 확인한 결과, sabinene 표준품은 9.62분에 검출되었으며 초임계 유체 추출법으로 얻은 편백 오일(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 수증기 증류 추출법으로 얻은 편백 오일(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 복합물 내 sabinene 함량은 14.98 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 임을 확인하였다.

로 알려져 있다[19, 26-28]. GC-MS를 통해 피크 머무름 시간을 비교하여 확인한 결과, sabinene 표준품은 9.62분에 검출되었으며 초임계 유체 추출법으로 얻은 편백 오일(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 수증기 증류 추출법으로 얻은 편백 오일(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 복합물 내 sabinene 함량은 14.98 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 임을 확인하였다.

3.2. DPPH radical 소거능

자유 라디칼은 홀전자를 가진 분자로, 불안정한 상태로 존재하여 세포 내 단백질, 지질 및 DNA의 구조를 변형시켜 노화와 질병에 주요 원인으로 알려져 있으며 대표적인 자유 라디칼로는 활성산소종(reactive species oxygen, ROS)이 있다[29]. DPPH는 짙은 자색을 띠는 자유 라디칼로 전자공여능이 높은 항산화 물질과 반응하여 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 평가하는 방법이다[30]. 실험 결과, 초임계 유체 추출 편백 오일은 DPPH radical을 농도 의존적으로 유의하게 제거하였으며 특히 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 ascorbic acid보다 효능이 약 2.1배 더 높은 것으로 나타났다(Fig. 1). 따라서 이러한 결과는 편백 오일은 활성산소종 제거 능력이 우수하여 산화적 스트레스로 인한 세포 구조 변형 및 피부 손상으로부터 보호할 수 있으며 피부뿐만 아니라 산화적 스트레스와 관련된 질병, 노화 기전 등에도 적용하여 항산화 소재로서의 사용 가능성을 시사한다.

Table 1. Primer sequence

Gene	Primer	Sequence (5' to 3')
MMP-1	Forward	5'-AGCGTGTGACAGTAAGCTAA-3'
	Reverse	5'-GTTTTCTCAGAAAGAGCAGCAT-3'
Filaggrin	Forward	5'-AAGCTTCATGGTGATGCGAC-3'
	Reverse	5'-TCAAGCAGAAGAGGAAGGCA-3'
HAS-2	Forward	5'-CAGAATCCAAACAGACAGTTC-3'
	Reverse	5'-TAAGGTGTTGTGTGTGACTG-3'
β -actin	Forward	5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'
	Reverse	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

Table 2. Analysis of GC-MS

Components	Analysis of sabinene ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Mixture Oil extract of <i>C. obtusa</i>	14.98

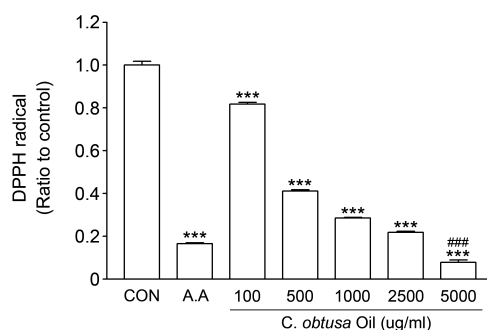


Fig. 1. DPPH radical scavenging effect of *C. obtusa* oil. DPPH radical significantly decreased by *C. obtusa* oil dose-dependently. Data are presented as mean \pm SEM. *** p < 0.001 compared to control, ### p <0.001 compared to A.A. A.A; ascorbic acid.

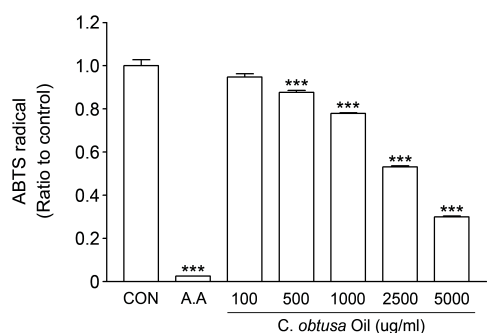


Fig. 2. ABTS radical scavenging effect of *C. obtusa* oil. ABTS⁺ radical significantly decreased by *C. obtusa* oil dose-dependently. Data are expressed as mean \pm SEM. *** p < 0.001 compared to control. A.A; ascorbic acid.

3.3. ABTS⁺ radical 소거능

ABTS⁺ radical은 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)와 potassium persulfate와의 반응 반응에 의해 형성되어 짙은 청록색을 띠며 항산화 물질과 반응하여 라디칼이 소거되어 옅은 녹색 또는 투명한 색을 나타낸다[29,30]. 본 실험 결과, ABTS⁺ radical이 초임계 유체 추출 편백 오일에 의해 농도 의존적으로 유의하게 소거되는 것으로 나타나 항산화 효능이 우수함을 확인하였다(Fig. 2). 그러나 DPPH radical 소거능에 비해 비교적 약하게 나타났는데, 이는 DPPH assay가 DPPH radical을 유기용매에 녹인 후 소수성(hydrophobic) 물질을 감지해내는데 사용되는 반면, ABTS assay는 친수성(hydrophilic) 및 지용성(lipophilic) 물질에 감지에 사용되는 실험법의 차

이가 있어, 정유의 경우 DPPH assay에 의해 더욱 정밀하게 감지된 결과로 유추할 수 있다[31].

3.4. Elastase 활성 억제능

Elastase는 진피에서 피부 탄력과 관련된 단백질인 elastin을 분해하는 효소로, 주름 생성의 원인으로 알려져 있다[25]. 실험 결과, elastase의 활성이 초임계 유체 추출 편백 오일에 의해 유의하게 감소하였으며 100 μ g/ml에서는 EGCG 효능 대비 약 1.24배 높은 것으로 나타났다(Fig. 3). 편백 잎을 이용한 elastase 활성 평가와 관련하여 보고된 논문에서는 열수 또는 에탄올 추출을 통해 편백 잎 추출물을 얻었으며 100 μ g/ml 농도에서 elastase 활성 억제 효능은 약 20%로 나타났다[32]. 이러한 결과와 비교해 볼 때, 본 연구에서는 초임계 유체 추출을 통해 얻은 편백 오일을

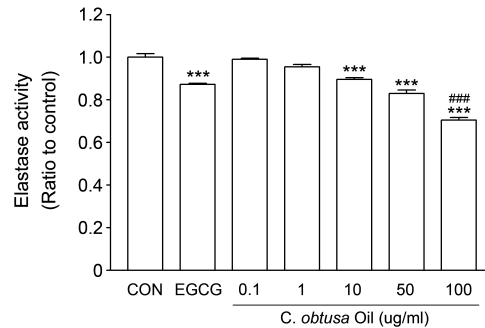


Fig. 3. Effects of *C. obtusa* oil on elastase activity. Elastase activity dose-dependently decreased by *C. obtusa* oil. Data are presented as mean \pm SEM. *** p < 0.001 compared to control, ### p <0.001 compared to EGCG. EGCG; (-)-Epigallocatechin Gallate.

이용하여 평가하였으며 동일한 농도인 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 elastase의 활성은 대조군에 비해 약 0.7배로, 약 30%의 억제율을 나타내어 효능이 더욱 좋은 것을 확인하였다. 따라서 본 실험 결과를 통해 편백 잎 추출물보다 오일에서의 항주름 효능이 우수함을 처음으로 밝혔으며 항주름 소재로서의 적용 가능성을 보여준다.

3.5. 세포생존율

편백 오일의 세포 내 유효성 평가를 하기 앞서 독성이 없는 안전 농도를 설정하기 위해 세포생존율을 측정하였다. MTT assay 실험법은 살아 있는 세포 내 미토콘드리아 내 효소에 의해 MTT 시약이 불용성 물질인 formazan을 형성하여 보라색 결정을 띄며 이를 유기용매로 녹여 흡광도를 측정함으로써 세포생존율을 평가한다. 초임계 유체 추출 편백 오일이 세포생존율에 미치는 영향을 평가한 결과, HDF 세포에서는 0.5, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 세포생존율이 대조군 대비 각각 약 0.94, 0.82배로 나타났으며(Fig. 4A) HaCaT 세포에서는 0.5, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 세포생존율이 대조군 대비 각각 약 0.84, 0.45배로 나타났다(Fig. 4B). 반면 수증기 증류 추출 편백 오일을 혼합하여 세포생존율을 측정한 결과, HDF와 HaCaT 세포에서 나타났던 독성이 완화되는 것으로 나타났다(Fig. 4C, D). 이러한 결과에 따라 세포 생존율이 대조군 대비 약 0.8배 이상의 세포생존율을 나타내는 초임계 유체 추출 편백 오일(0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 수증기 증류 추출 편백 오일(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 혼합하여 유효성 평가에 사용하였다.

3.6. Real-time PCR

3.6.1. 주름 관련 인자 발현

피부 진피 층의 대부분을 이루고 있는 콜라겐은 MMPs 중에서도 특히 MMP-1에 의해 분해되어 주름 생성 원인이 된다[33]. 따라서 편백 오일의 주름 생성 억제 효능 평가를 확인하기 위해 MMP-1 mRNA 발현율을 real time PCR을 이용하여 확인하였다. 실험 결과, 초임계 유체 추출 편백 오일 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 수증기 증류 추출 편백 오일 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 MMP-1 mRNA 발현율이 대조군에 비해 각각 0.76, 0.74배로 유의하게 감소하였으며 복합물의 경우 대조군에 비해 0.82배로 나타났다(Fig. 5). 주름 개선 효능과 관련된 논문들에 의하면 세포에 인위적인 자극을 주어 세포 손상을 유도한 후 MMP-1 유전자 발현이 정상 수준으로 회복되는 지를 평가하였으며 [5,10], Jang et al., 2023의 연구 결과에 따르면 인간섬유아세포에 UVA를 조사한 후 에탄올 추출을 통해 얻은 편백 잎 추출물의 주름 개선 효능을 평가한 결과, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 UVA 자극군에 비해 39.2%의 회복율을 나타내었다[32]. 이와 같은 결과와 비교하였을 때, 본 연구에서는 정상 상태의 세포에 편백 잎에서 추출한 오일을 처리하여 MMP-1 유전자 발현을 평가한 점에서 차별성이 있으며 편백 오일 추출물은 주름 개선 뿐만 아니라 주름 생성 예방 목적으로도 사용할 수 있음을 제시하는 결과이다.

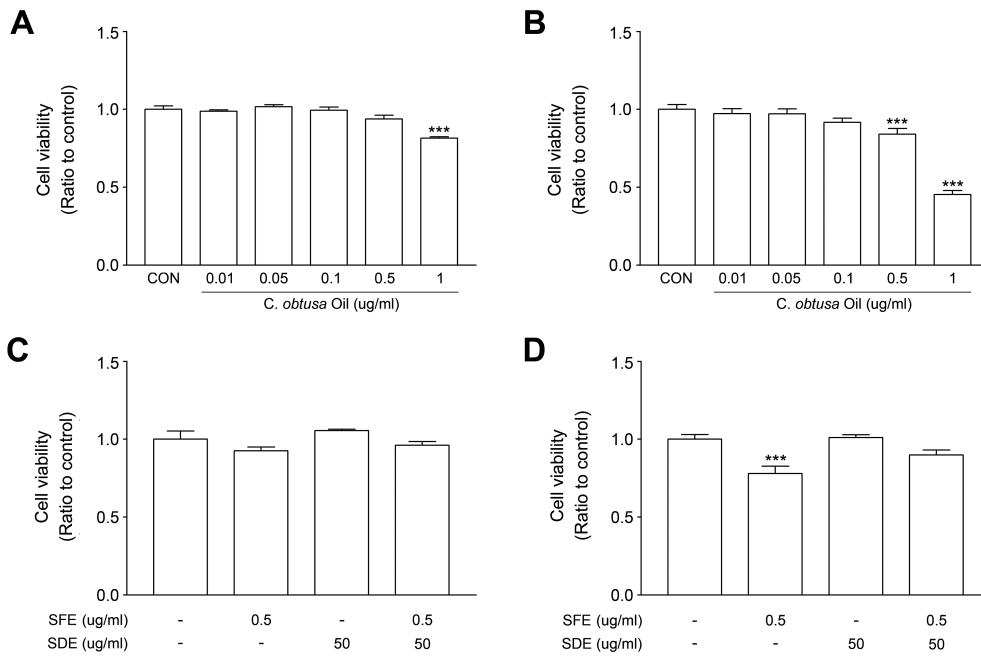


Fig. 4. Cell viability of *C. obtusa* oil. Cell viability decreased by SFE *C. obtusa* oil in HDF cell (A) and HaCaT cell (B). Cell viability was recovered by mixture (SFE+SDE) of *C. obtusa* oil in HDF cell (C) and HaCaT cell (D). Data are expressed as mean \pm SEM. *** p < 0.001 compared to control. SFE; supercritical fluid extraction, SDE; steam dilution extraction.

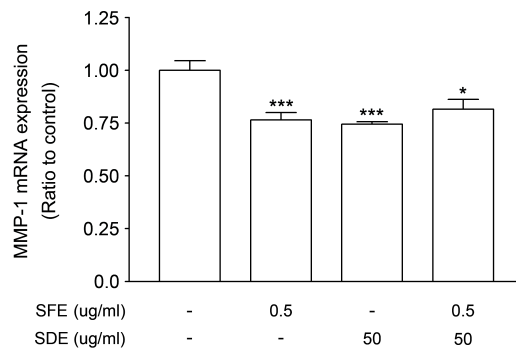


Fig. 5. Anti-wrinkle effect of *C. obtusa* oil. The expression of MMP-1 mRNA decreased by SFE, SDE and mixture of *C. obtusa* oil (SFE+SDE). Data are presented as mean \pm SEM. * p < 0.05, *** p < 0.001 compared to control.

3.6.2. 피부 장벽 관련 인자 발현

피부 장벽 강화 효능은 피부 각질층 내에 존재하는 각질형성세포의 분화와 관련된 인자인

filaggrin의 mRNA 발현율을 비교함으로써 평가하였다. 실험 결과, 초임계 유체 추출 편백 오일 0.5 μ g/ml에서 filaggrin mRNA 발현율이 대조군

대비 1.62배로 유의하게 증가하였으며 편백 오일 복합물에서는 1.72배로 유의하게 증가하는 것으로 나타나 효능이 더욱 증가한 것을 확인하였다. 그러나 수증기 증류 추출 편백 오일 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 대조군과 유사하게 나타났다(Fig. 6). 피부 장벽 개선과 관련된 대부분의 논문들에 의하면 세포에 자외선 조사, TNF- α 등의 자극을 이용하여 세포 손상을 유도한 후 시료를 4~72시간 동안 처리하여 시료에 의한 filaggrin mRNA 발현 회복을 평가한다[34-36]. 본 연구에서는 정상 상태의 세포에 편백 오일을 처리하여 유전자 발현을 비교한 점에서 피부 장벽 개선과 관련하여 발표된 논문들과는 차별성이 있으며, 초임계 유체 추출 편백 오일은 정상 상태의 각질형성세포에서 filaggrin 유전자 발현을 증가시키며 수증기 증류 추출 편백 오일과 혼합하여 사용하였을 때는 그 효능이 더욱 강화되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 추출법에 따른 편백 오일의 피부 장벽 강화 효능을 처음으로 밝혔으며, 초임계 유체 추출 편백 오일은 피부 장벽을 강화하여 건강한 피부 형성 및 유지에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

3.6.3. 피부 보습 관련 인자 발현

Hyaluronic acid synthase-2 (HAS-2)는 히알루론산 합성에 관여하여 피부 보습에 도움을 주는 것으로 알려져 있으며 피부 손상이나 노화에 의해 HAS-2 유전자 발현이 감소되어 피부 건조증, 탄력 저하를 야기한다[1,8]. 따라서 편백 오일

의 피부 보습 강화 효능을 평가하기 위해 각질형성세포에 편백 오일을 24시간 처리한 후 HAS-2 mRNA 발현율을 비교하였다. 실험 결과, 초임계 유체 추출 편백 오일 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 의해 HAS-2 mRNA 발현율이 대조군 대비 2.45배로 유의하게 증가하였으나 수증기 증류 추출 편백 오일 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 대조군과 유사하게 나타났다. 그러나 복합물로 처리했을 경우 HAS-2 mRNA 발현율이 대조군 대비 3.46배 유의하게 증가하는 것으로 나타나 효과가 더욱 증진되는 것을 확인하였다(Fig. 7).

초임계 유체 추출 편백 오일과 편백 오일의 복합물은 filaggrin과 더불어 HAS-2 유전자 발현을 증가시키며 피부 각질형성세포에서 피부 장벽을 강화하는 효능을 가지는 것으로 밝혀졌다. 이는 GC-MS를 통해 본 소재의 지표 성분으로 밝혀진 sabinene이 유효성분으로 작용한 것에 기인한다고 볼 수 있다. 또한 향후 sabinene을 포함한 moterpene류 화합물의 피부 장벽 강화능의 연구도 필요하다고 사료된다. 본 결과와 유사한 예로 Lim et al., 2013의 연구결과에 따르면, 편백 정유를 혼합하여 제조한 화장품은 아토피 환우들에게 가장 큰 고통인 가려움증 개선 및 피부 보습력을 증진시키는 등의 효과를 나타내었다고 하였으며 이를 통해 본 연구 결과와 유사한 결과적 맥락을 가진다[15]. 편백 정유는 안정적인 피부 장벽 개선 물질 및 기능성화장품의 원료로서 적용 가능성이 있음을 확인할 수 있다.

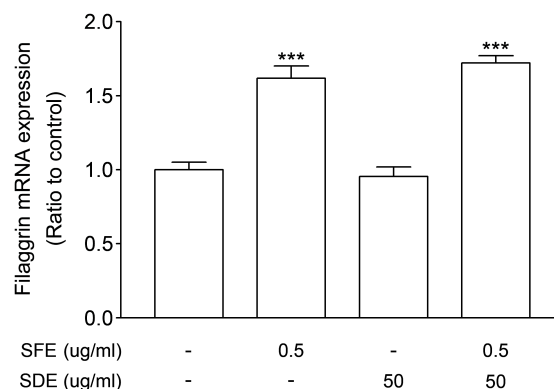


Fig. 6. Effect of *C. obtusa* oil on Skin-barrier protection. The expression of filaggrin mRNA significantly increased by SFE and mixture of *C. obtusa* oil (SFE+SDE). Data are presented as mean \pm SEM. *** p < 0.001 compared to control.

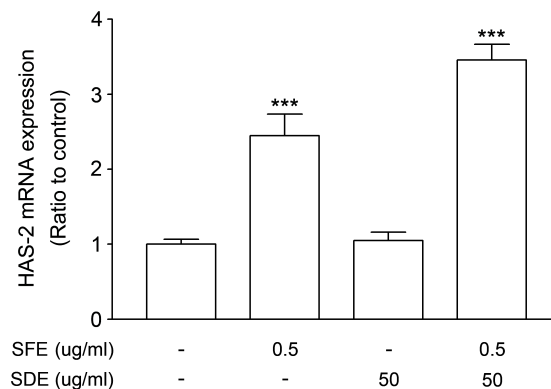


Fig. 7. Effect of *C. obtusa* oil on skin moisturizing. The expression of HAS-2 mRNA significantly increased by SFE and mixture of *C. obtusa* oil (SFE+SDE). Data are expressed as mean \pm SEM. *** p < 0.001 compared to control.

4. 결론

본 연구는 편백 잎에서 추출한 오일의 항산화 화장품 원료로서의 효능을 검증하고자 하였다. 본 연구에서 사용한 편백 오일은 유효 성분의 변성 없이 추출 할 수 있는 초임계 유체 추출법을 이용하여 편백 잎에서 추출하였다. 먼저, 세포를 이용한 유효성 평가에 앞서 시료의 항산화와 elastase 활성 억제 효능을 평가하였다. 편백 오일의 항산화 효능을 평가한 결과, 농도에 따른 편백 오일이 다른 종류의 라디칼인 DPPH radical 과 ABTS⁺ radical에 대한 소거 활성의 차이는 있었으나 두 라디칼을 농도 의존적으로 유의하게 제거하는 것으로 나타났다. 또한 편백 오일이 elastase 활성을 농도 의존적으로 억제하였으며, 특히 100 μ g/ml 농도에서는 EGCG 대비 효능이 1.24배 뛰어난 것으로 나타남에 따라 시료의 주름 개선 효능을 확인하였다.

이러한 결과를 바탕으로 세포에서의 유효성 평가를 위해 먼저 HDF와 HaCaT 세포를 이용하여 안전한 농도 설정을 위한 세포생존율을 측정하였다. 그 결과, 초임계 유체 추출로 얻은 편백 오일에 의해 세포 독성이 있는 것으로 나타나 이를 보완하기 위해 수증기 증류 추출로 얻은 편백 오일을 혼합하였으며 초임계 유체 추출 편백 오일 0.5 μ g/ml과 수증기 증류 추출 편백 오일 50 μ g/ml를 혼합한 복합물에서 무독성을 확인하고 이를 유효성 평가에 사용하였다. 편백 오일 복합물의

주름 개선 효능을 평가한 결과, HDF에서 MMP-1 mRNA 발현이 초임계 유체 추출 편백 오일에 의해 0.76배, 수증기 증류 추출 편백 오일에 의해 0.74배, 2가지 편백 오일 복합물에 의해 0.82배로 유의하게 감소함을 확인하였다. 다음으로는 피부 장벽 강화 효능을 확인하기 위해 HaCaT 세포에서 filaggrin mRNA 발현을 비교한 결과, 초임계 유체 추출 편백 오일에 의해 1.62배로 유의하게 증가하였으며 복합물에 의해서는 1.72배로 추출법에 따른 편백 오일 단일로 사용했을 때 보다 효능이 더욱 강화되는 것을 확인하였다. 마지막으로 피부 보습 강화 효능을 평가하기 위해 HaCaT 세포에서 히알루론산 합성에 관여하는 HAS-2 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과, filaggrin mRNA 발현과 같은 패턴을 확인하였으며 2가지 편백 오일을 혼합하여 사용하였을 경우 HAS-2 mRNA 발현이 대조군이 배해 3.46배 증가하는 것으로 나타났다.

종합하면, 초임계 유체 추출로 얻은 편백 오일은 우수한 항산화 효능을 가지고 있어 산화적 스트레스로부터 피부를 보호할 수 있으며 elastase 효소와 기질의 작용을 직접적으로 억제하여 피부 탄력 유지 효능이 우수하다. 또한 초임계 유체 추출로 얻은 편백 오일은 콜라겐 분해 효소인 MMP-1 유전자 발현 억제 효능이 있으며, 특히 초임계 유체 추출 편백 오일에 의한 filaggrin 유전자와 HAS-2 유전자 발현 증가 효능은 수증기 증류 추출로 얻은 편백 오일 보다 효능이 우수하

며 두 가지 오일을 복합물로 사용했을 때는 단독으로 사용했을 때 보다 효능이 더욱 강화되는 것을 확인하였다. 따라서, 편백 오일 추출물은 항주름, 피부 장벽 및 보습능을 강화하여 항노화 기능성화장품의 천연 소재로서 활용이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 중소기업기술정보진흥원의 “지역특화산업육성+(R&D, S3266431)” 사업의 지원을 받아 수행된 연구결과이다.

References

1. H. B. Kang, Y. Choi, J. Bak, Y. Jang, “Effect of *Lysimachia christinae* Hance extract on moisturizing function and protection of skin barrier”, *The Korean Society of Culture and Convergence*, Vol.42, No.12 pp. 941-958, (2020).
2. S. K. Choi, K. D. Park, D. A. Kim, D. W. Lee, Y. J. Kim, “Preparation of Camel Milk Liposome and Its Anti-Aging Effects”, *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.40, No.2 pp. 155-162, (2014).
3. H. Y. Yu, I. J. Yang, V. Lincha, I. S. Park, D. Lee, H. M. Shin, “The Effects of the fruits of *Foeniculum vulgare* no Skin Barrier Function and Hyaluronic Acid Production in HaCaT Keratinocytes”, *Journal of Life Science*, Vol.25, No.8 pp. 880-888, (2015).
4. H. Wang, K. Lee, Y. Kang, “Skin Barrier Improvement Effect of Exosomal Nanovesicles Derived from Lactic acid Bacteria”, *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.47, No.2 pp. 171-178, (2021).
5. S. Park, M. Beak, J. Yang, “Skin Anti-aging Moisturizing, and Barrier Protective Effects of *Plectranthus Tomentosa*: A Comparative Study of Water and Ethanol Extracts”, *Journal of the Korean Society of Cosmetology*, Vol.25, No.5 pp. 1061-1067, (2019).
6. S. Hyung, K. Min, Y. Kim, “Alleviating Effect of *Gardeniae fructus* Water Extract on Inflammation and Skin-Barrier Damage”, *The Journal of Cosmetological Science*, Vol.6, No.1 pp.63-72, (2010).
7. J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, J. Kolar, “Hyaluronic acid(hyaluronan): a review”, *Veterinarni Medicina*, Vol.53, No.5 pp. 397-411, (2008).
8. E. Papakonstantinou, M. Roth, G. Karakiulakis, “Hyaluronic acid A key molecule in skin aging”, *Dermato-Endocrinology* Vol.4, No.3 pp. 253-258, (2012).
9. Y. Kim, Y. Yoon, “Regulation of *Col1A1* and *MMP1* Expression by Taurine, Major Component of Oyster, in Human Dermal Fibroblasts”, *Korea Journal of Aesthetics and Cosmetology* Vol.11, No.2 pp. 393-397, (2013).
10. I. H. Joo, H. J. Choi, B. Y. Sim, G. Y. Min, D. H. Kim, “Effects of *Cuscuta Chinensis* Lamark Ethanol Extract on Wrinkle Improvement Bio-markers by UVB-induced CCD-986Sk Cell”, *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine* Vol.35, No.5 pp.321-327, (2018).
11. J. Lee, D. Kim, E. Kim, H. J. Kwon, B. W. Kim, J. Cho, H. Kim, T. H. Kim, “Matrix metalloproteinase-1 suppression and type-1 procollagen synthesis promoting effects of *Uncaria gambir*”, *The Korean Society of Food Preservation* Vol.24, No.1 pp. 93-99, (2017).
12. B. K. Kim, J. H. Kang, G. H. Oh, J. Hwang, S. O. Jang, M. Kim, “Antibacterial and Antioxidant Activity of *Chamaecyparis obsuta* Extracts”, *Journal of Life Science* Vol.29, No.7 pp.785-791, (2019).
13. Y. Joung, Y. Kim, Y. Jang, “Studies on the Antioxidant and Whitening Effects of

- Chamaecyparis obtusa* Extract”, *Journal of the Korean Applied Science and Technology* Vol.37, No.6 pp. 1496–1506, (2020).
14. J. K. Yang, B. K. Kang, T. H. Kim, S. C. Hong, W. T. Seo, M. S. Choi, “Efficient Extraction Methods and Analysis of Essential Oil from Softwood Leaves”, *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* Vol.14, No.4 pp. 357–364, (2002).
 15. G. Lim, R. Kim, H. Cho, Y. Moon, C. Choi, “Comparison of Volatile Compounds of *Chamaecyparis obtusa* Essential Oil and its Application on the Improvement of Atopic Dermatitis”, *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* Vol.28, No.2 pp. 115–122, (2013).
 16. H. S. Kim, S. K. Han, J. Y. Mang, “Evaluations on the Deodorization Effect and Antibacterial Activity of *Chamaecyparis obtusa* Essential Oil”, *Korean Journal of Odor Research and Engineering* Vol.8, No.3 pp. 101–107, (2009).
 17. Y. Jo, “Optimization of supercritical fluid extraction of phytoncide from *Chamaecyparis obtusa* leaf”, master’s thesis Department of Industrial Engineering, Chonnam National University, (2014).
 18. J. Kim, W. Choi, S. Lee, M. Park, “Comparative Study on The Composition of Essential Oil by Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Hydro-distillation from *Chamaecyparis obtusa* Leaves”, *Journal of The Korean Wood Science and Technology* Vol.43, No.4 pp. 494–503, (2015).
 19. B. M. Kwak, E. Kim, Y. Kim, H. Kim, “Component analysis of four-part extracts from *Chamaecyparis obtusa* Endl. by supercritical fluid extraction and anti-inflammatory effect on RAW 264.7cells”, *Journal of Exercise Rehabilitation* Vol.15, No.5 pp. 723–730, (2019).
 20. M. Lee, S. Park, S. Lee, H. Lee, D. Kil, “Emission Characteristics of Volatile Organic Compounds by Humidifier with Using Hinoki Cypress Extracts”, *Journal of The Korean Wood Science and Technology* Vol.42, No.6 pp. 747–757, (2014).
 21. J. Choi, J. Park, Y. Cho, “Development of Functional Products Using *Chamaecyparis obtusa* Heartwood Essential Oil”, *Journal of Convergence for Information Technology* Vol.11, No.2 pp. 211–218, (2021).
 22. J. H. Kim, S. Lee, K. B. Do, W. D. Ji, S. G. Kim, Y. D. Back, K. Kim, “Analysis of the Component and Immunological Efficacy of *Chamaecyparis obtusa* Leaf Extract”, *The Korean Journal of Clinical Laboratory Science* Vol.50, No.1 pp. 37–43, (2018).
 23. M. A. Jang, J. M. Lee, “Research on domestic and international industrial trends of functional cosmetics”, *Journal of the Korean Applied Science and Technology* Vol.38, No.2 pp. 618–627, (2021).
 24. J. Bak, S. J. Lee, T. W. Kim, S. Hwang, M. J. Park, R. Aruanchalam, E. Yoo, M. H. Park, Y. Choi, H. K. Kim, “Schisandrol A and gomisins N from *Schisandra chinensis* extract improve hypogonadism via anti-oxidative stress in TM3 Leydig cells”, *Nutrition Research and Practice* Vol.17, No.1 pp. 1–12, (2022).
 25. Y. Jang, J. Lee, “The Evaluation of Antioxidant, Anti-inflammatory, and Anti-aging of Extract Solvent and *Poria cocos* by Parts”, *Korea Journal of Aesthetics and Cosmetology* Vol.13, No.3 pp. 373–383, (2015).
 26. A. Vimal, D. Pal, T. Tripathi, A. Kumar, “Eucalyptol, sabinene and cinnamaldehyde: potent inhibitors of salmonella target protein L-asparaginase”, *Springer-Verlag GmbH Germany 3 Biotech* Vol.7, No.4 pp. 258, (2017).
 27. P. R. Quiroga, C. M. Asensio, V. Nepote, “Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds”, *Society of Chemical*

- Industry* Vol.95, pp. 471-479, (2013).
28. J. Valente, M. Zuzarte, M. J. Goncalves, M. C. Lopes, C. Cavaleiro, L. Salgueiro, M. T. Ctuz, "Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil", *Food and Chemical Toxicology* Vol.62, pp. 349-354, (2013).
 29. M. J. Kim, J. H. Kim, S. Lee, E. J. Cho, H. Y. Kim, "Determination of Radical Scavenging Activity of *Aster yomena* (Kitam.) Honda", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society* Vol.19, No.9 pp. 402-407, (2018).
 30. Y. Jang, S. Park, B. Kim, J. Park, Y. Jeong, J. Lee, "Effect of ethanol extract of *Lotus Rhizome* and node of *Lotus Rhizome*", *Journal of Oil & Applied Science* Vol.34, No.3 pp. 657-665, (2017).
 31. A. Floegel, D. Kim, S. Chung, S. I. Koo, O. K. Chun, "Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods", *Journal of Food Composition and Analysis* Vol.24, pp. 1043-1048, (2011).
 32. Y. Jang, S. Kim, H. Kim, J. Lee, "Biological Activity and Component Analyses of *Chamaecyparis obtusa* Leaf Extract: Evaluation of Antiwrinkle and Cell Protection Effects in UVA-Irradiated Cells", *Medicina* Vol.59, No.4 pp. 755, (2023).
 33. H. Koo, C. Ha, S. Kim, S. Jang, H. Lim, Y. Kim, E. Sohn, "Evaluation of Whitening, Anti-wrinkle, and Moisturizing Effects of *Phragmites rhizoma*", *Journal of the Korea Academia-Industrial* Vol.22, No.11 pp. 277-286, (2021).
 34. J. Lee, S. Hwang, T. Shen, J. H. Kim, L. You, W. Hu, J. Y. Cho, "Enhancement of skin barrier and hydration-related molecules by protopanaxatriol in human keratinocytes", *Journal of Ginseng Research* Vol.45, pp. 354-360, (2021).
 35. M. Han, J. Bae, J. Ban, H. S. Shin, D. H. Lee, J. H. Chung, "Black rice (*Oryza sativa* L.) extract modulates ultraviolet-induced expression of matrix metalloproteinases and procollagen in a skin cell model", *International Journal of Molecular Medicine* Vol.41, pp. 3073-3070, (2018).
 36. S. Yang, C. Lee, S. Y. Cha, J. Choi, S. Lee, "Skin Barrier Enhancement of Ferment using Lava Seawater and *Lactobasillus plantarum* HDB1234 as a Novel Cosmetic Ingredient", *Journal of the Korean Society of Cosmetology* Vol.27, No.2 pp. 356-363, (2021).