

열수추출 *Geranium Maculatum* extract (와일드제라늄추출물)의 항산화, 미백, 항염효과

최인정
meeth 기업부설연구소 연구원

Antioxidant, whitening and Anti-inflammatory Effects of “*Geranium Maculatum* extract” Water Extracts

In-Jeong Choi
Researcher, meeth R&D Institute

요약 본 연구에서는 와일드제라늄 추출물의 기능성화장품 원료로서 활용 가능성을 확인하였다. 라디칼 소거능으로서 DPPH, ABTS, FRAP 실험을 실시하였으며, 항산화 물질 측정으로서 폴리페놀과 플라보노이드 농도 측정을 실시하였다. 또한, 세포실험에서는 B16F10 cell과 RAW 264.7 cell을 사용하여 세포독성 실험과 미백실험, 항염 실험을 실시하였다. 실험 결과 DPPH에서는 265.8 mg ascorbic acid / g의 항산화능을 나타내었으며, ABTS 실험에서는 168.5 mg ascorbic acid / g의 항산화능을 나타내었다. FRAP에서는 와일드제라늄 추출물 1 mg의 환원력과 ascorbic acid 229±9 µg의 환원력이 같음을 확인하였다. 폴리페놀 농도는 32.989±1.610 mg/g이었고, 플라보노이드 농도는 11.098±0.261 mg/g이었다. 세포 실험에서는 실험 농도 범위에서 80% 이상의 세포가 생존하여 와일드제라늄 추출물은 낮은 독성을 가지고 있음을 확인하였다. 미백활성 실험에서는 농도에 따라 멜라닌 생성을 감소시키는 동시에 100 µg/mL에서 40.62±2.07%의 멜라닌 생성 억제능을 보였다. 항염활성 실험에서도 농도에 따라 염증반응을 감소시키는 동시에 100 µg/mL에서 27.86±2.82%의 염증 억제능을 보여 와일드제라늄 추출물의 기능성 화장품 원료로서의 가능성을 확인하였다.

주제어 : 와일드제라늄, 항산화, 미백, 항염, 화장품

Abstract This study attempted to investigate the applicability of *Geranium maculatum* extract as a cosmeceutical ingredient. For this, DPPH, ABTS and FRAP assays were performed to assess radical scavenging activities. To evaluate antioxidant substances, in addition, polyphenol and flavonoid concentrations were measured. Furthermore, cytotoxicity, whitening and anti-inflammatory tests were conducted, using B16F10 and RAW 264.7 cells, and the results found the followings: In the DPPH and ABTS assays, 265.8 mg ascorbic acid/g and 168.5 mg ascorbic acid/g of antioxidant capacities were found respectively. According to the FRAP assay, 1 mg *Geranium maculatum* extract was same with ascorbic acid 229±9 µg in terms of reducing power. In polyphenol and flavonoid concentrations, 32.989±1.610 mg/g and 11.098±0.261 mg/g were observed each. The above results show that cells survived in the test concentrations more than 80 percent, confirming the low toxicity of *Geranium maculatum* extract. According to whitening testing, melanin synthesis was reduced depending on concentration, and at the same time, 40.62±2.07% of melanin production inhibition was found at 100 µg/mL. In anti-inflammatory testing, inflammation was reduced depending on concentration, and 27.86±2.82% of inhibition of inflammation was detected simultaneously, confirming the applicability of *Geranium maculatum* extract as a cosmeceutical ingredient.

Key Words : *Geranium Maculatum*, Antioxidant, Anti-inflammation, Whitening, Cosmetics

*Corresponding Author : In-Jeong Choi(injeong7810@gmail.com)

Received February 11, 2022

Revised March 6, 2022

Accepted March 20, 2022

Published March 28, 2022

1. 서론

최근들어 성별과 나이를 불문하고 건강한 피부에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이러한 사회적 트렌드에 따라 국내 기능성화장품 시장도 크게 성장하고 있다[1]. 식품의약품안전처(2021)에 따르면 화장품 수출액은 8.94조원으로 국내 총 수출의 1.40%를 차지하며, 연평균 성장률(11~20)은 29.19%로 나타났다. 그러나 현재 화장품 원료의 80% 이상이 미국, 일본, 프랑스, 독일 등 수입에 의존하고 있으며, 국내 화장품 시장 성장과 함께 원료 수입액 또한 매년 증가 되고 있어 화장품 시장 성장의 한계로 작용하고 있다. 이러한 화장품 시장의 구조적 문제를 해결하고, 세계 시장에서 경쟁력을 강화하기 위해서는 우리나라 고유의 화장품 소재 개발이 절실히 요구되고 있다[2]. 특히, 친환경적인 천연유래 성분에 대한 소비자들의 관심이 점점 높아지고 있는 시대적 관심에 따라 천연에서 유래한 원료를 기능성 화장품 소재로서 활용하기 위한 많은 연구가 필요한 시점이다[3].

기능성화장품 원료로서 천연물의 사용 가능성을 확인하는 대표적인 실험으로는 자유라디칼 소거능을 통한 항산화능 측정이 있다. 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 자유라디칼의 일종으로 정상적인 세포 내 활성작용 과정에서 생성된다. 즉, ROS의 항산화성을 유지하는 것은 세포 성장 및 생존에 매우 중요한 역할을 하며, 체내 활성산소의 생성 속도가 제거 속도보다 커지면 생체조직을 공격할 뿐 아니라 정상 세포의 손상을 가져오기 때문이다[4]. 사람의 피부 및 세포에 손상을 일으키는 활성산소종은 강한 산화력으로 생체 내 세포를 구성하는 지질, 단백질, DNA 손상뿐만 아니라 진피층의 matrix metalloproteinase (MMP)-1 효소의 발현을 증가시켜 melanin 생성반응을 촉진 시킨다[5]. 이를 통해 활성산소를 소거하는 것이 멜라닌 색소 형성 억제와 관련이 있을 뿐 아니라 항산화 물질이 멜라닌 생성을 막을 수 있는 미백물질로 인식하게 되었다[6].

멜라닌은 피부의 색을 결정하는 주요한 색소로서 표피의 기저층에 존재한다. 멜라닌 합성기전으로는 tyrosinase의 촉매작용에 의한 타이로신이 hydroxyl과 결합되어 DOPA (3,4-dihydroxy phenylalanine)로 합성되는 효소 작용과, microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 및 tyrosinase related protein -1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2)와 같이 단백질을 이용한 세포내 신호전달 기

전을 통한 합성이 있다[7,8]. Arbutin, kojic acid, hydroquinone을 포함하는 많은 tyrosinase 저해제가 피부에 광범위하게 사용되고 있으나, 피부 자극 및 접촉성 피부염과 같은 부작용 사례들이 등장하면서 피부 친화적이고 안전한 천연물에서 이와 관련된 활성을 가진 소재를 찾으려는 각종 연구가 이어지고 있다[9].

MMP-1의 합성을 촉진하는 요소로 자외선, ROS뿐 아니라 염증성 cytokine인 interleukin (IL)-1과 IL-6 등이 있다. 생체 내에서 일어나는 염증 반응의 조절은 매우 복잡하며, 염증 과정 중에는 많은 양의 NO (nitric oxide)와 염증유도 사이토카인류 등이 생성되는 것으로 알려져 있다[10]. NO는 superoxide 음이온 (O_2^-)과 쉽게 반응하여 매우 반응성이 높고 독성이 강한 산화제인 peroxynitrite ($ONOO^-$)를 생성할뿐 아니라, 과량 존재하면 인체에 유해한 영향을 미치게 되어 세포손상 및 염증 반응을 일으킨다[11]. 즉, 염증 반응은 외인적 노화 요소가 피부 노화를 일으킬 수 있게 하는 중요한 반응이며, 합염 효과는 ROS의 생성 조절을 통해 피부 노화를 감소 시킬 수 있다.

결국 여러 노화기전은 ROS의 생성과 연관이 있으며, 식물 유래 추출물에서 항산화 능을 나타내는 성분을 찾고자 많은 연구가 이루어지고 있다. 이에 본 연구에서는 이러한 식물 중 와일드제라늄추출물(*Geranium Maculatum* Extract)이 기능성 화장품의 소재로서 활용 가능성을 연구하였다.

2. 실험 방법

2.1 추출물

본 실험에 사용한 *Geranium Maculatum* extract 추출물은 정제수와 원물은 1%의 비율로 80℃ 열수추출 방식을 통해 추출하여 제조하였다.

항산화능 실험 및 세포 실험을 위해 동결건조를 통해 추출물의 건조중량을 측정하였으며, 이를 증류수로 재용해시킨 뒤, syringe filter (PVDF, 0.2 μ m)를 통해 균 및 불용물을 제거하였다.

2.2 DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH assay 측정은 라디칼 활성에 따라 500-550 nm 파장의 흡광도가 변화하는 인공적 라디칼 분자인 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl을 이용하여 라디칼

의 소거능을 측정하는 방법이다[12].

DPPH 용액은 70% ethanol을 용매로 DPPH를 1%(w/v)가 되도록 녹인 뒤 filter paper를 이용해 불용된 DPPH를 제거하였다. 그 후 이 용액의 520 nm 흡광도가 1.00이 되도록 70% ethanol로 다시 희석하여 사용하였다. 500 µg/mL를 기준으로 2배씩 희석하여 만들어진 다양한 농도의 와일드 제라늄 추출물 1.0 mL와 DPPH 용액 1.0 mL를 혼합 후 30 분간 반응시켰다. 그 후 520 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 추출물 및 환원된 DPPH 용액의 흡광도를 측정하여 실험결과에서 제외했다. 실험결과는 ascorbic acid의 EC₅₀을 측정 후 비교하여 항산화능을 측정하였다.

2.3 ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS assay 측정은 ABTS의 라디칼 활성이 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)의 산화도에 따라 700-750 nm 파장의 흡광도가 변화하는 성질을 이용한다[13].

ABTS 용액은 증류수를 용매로 7 mM ABTS를 녹인 뒤 2.45 mM potassium persulfate를 녹여 12 시간 동안 ABTS의 발색이 일어나도록 하였다. 발색이 끝난 ABTS 용액의 740 nm 흡광도가 0.7이 되도록 희석하여 사용하였다. 500 µg/mL를 기준으로 2배씩 희석하여 만들어진 다양한 농도의 와일드제라늄 추출물 1.0 mL와 ABTS 용액 1.0 mL를 혼합 후 30 분간 반응시켰다. 그 후 740 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 추출물 및 환원된 ABTS 용액의 흡광도를 측정하여 실험결과에서 제외했다. 실험결과는 ascorbic acid의 EC₅₀을 측정 후 비교하여 항산화능을 측정하였다.

2.4 FRAP 측정

추출물의 환원력을 측정하기 위해 산화된 철 이온을 이용하였으며, 철 이온은 산화 정도에 따라 2가 이온과 3가 이온으로 나누어지며 이를 이용해 환원력 측정하였다[14].

실험에는 0.5 mg/mL 농도로 희석한 와일드제라늄 추출물을 사용하였다. 와일드제라늄 추출물 2.5 mL과 0.2 M 인산염 완충용액 (pH 6.6) 2.5 mL를 혼합하여 일정한 pH가 나타나도록 한 뒤, 10% 페리시안화 칼륨 용액 2.5 ml를 주입하여 50°C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 시료는 10% trichloroacetic acid 2.5 ml를 넣은 뒤 원심분리(3000 × G, 15 min)하여

침전물을 제거하였다. 침전물이 제거 된 용액 1 mL와 0.1% ferric chloride 용액 0.2 mL를 혼합 시킨 후 700 nm에서 흡광도를 측정하여 환원력을 평가하였다. FRAP은 ascorbic acid를 기준으로 standard curve를 작성하여 측정하였다.

2.5 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀의 경우 환원력을 가지고 있으며, 환원력 측정에 이용되는 Folin-Ciocalteu reagent를 이용해 기준 물질과 비교하여 그 양을 측정하였다.

폴리페놀 함량 측정은 Folin-Ciocalteu reagent를 이용하여 실시하였다. 와일드제라늄 추출물 1.0 mL와 증류수로 10배 희석된 Folin-Ciocalteu reagent 0.1 mL를 혼합한 뒤 5 분 동안 실온에서 방치하였다. 그 후 CaCO₃ (5%, w/v) 1.0 mL를 주입하였다. 그 후 반응을 위해 30 분 간 방치 후 760 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 폴리페놀 농도는 gallic acid를 이용한 standard curve를 이용해 환산하였다.

2.6 플라보노이드 함량 측정

플라보노이드의 경우 알루미늄 이온과 반응하여 510 nm의 흡광도를 내는 것을 이용하여 그 양을 측정하였다.

플라보노이드 함량 측정은 플라보노이드와 알루미늄 이온의 결합에 따른 발색 차이를 통해 측정하였다. 와일드 제라늄 추출물 1.0 mL에 NaNO₂ (5%, w/v) 0.3 mL를 주입한 뒤 5 분 동안 실온에서 방치하였다. 그 후 AlCl₃ (2%, w/v) 0.5 mL를 주입한 뒤 6 분 간 방치하였다. 1 M NaOH 0.5 mL를 주입하여 중화시킨 뒤 510 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 플라보노이드 농도는 quercetin을 이용한 standard curve를 이용해 환산하였다.

2.7 세포 독성 측정

NADH 등의 세포 내의 환원성 물질에 의해 MTT가 결정화 되는 것을 이용하여 세포의 활성 및 생존율을 측정 하였다.

세포 독성 실험에는 B16F10 cell와 RAW 264.7 cell을 사용하였다. 세포 배양 배지로는 DMEM broth (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GE healthcare, USA)를 사용하였으며 FBS (fetal bovine serum, Sigma, USA)를 각각 5%, 10%를 첨가하여 제

조하였다. 항생물질로 Penicillin-Streptomycin (100X) (Sigma, USA)을 사용하였다. 추출물은 DMSO에 용해시켜 처리하였다.

세포 독성의 측정에는 MTT assay를 실시하였다. 전 배양된 세포를 96 well plate에 well 당 5.0×10^4 cell을 주입하여 24 시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 상층액을 제거한 뒤 와일드제라늄 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 기준으로 2배 다단희석한 농도로 처리한 뒤 72 시간 동안 배양하였다. 2차 배양 후 상층액을 제거하고 MTT 용액(5 mg/mL)를 가해준 뒤 온도 37°C, CO₂ 농도 5%의 환경에서 MTT를 결정화시켰다. 각 well에 생성된 결정이 제거되지 않도록 상층액을 제거한 뒤 결정을 DMSO로 녹여 540 nm 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

2.8 미백 활성

멜라닌 측정은 피부색을 결정하는 요소인 멜라닌 생성을 유도하는 호르몬을 처리한 뒤 와일드제라늄 추출물을 처리하여 멜라닌 감소량을 측정 하였다.

B16F10 cell을 사용하여 멜라닌 생성량 측정 실험을 진행하였다. 세포 배양 배지로는 DMEM broth를 사용하였으며, FBS 5%를 첨가하여 제조하였다. 항생물질로는 Penicillin-Streptomycin (100X)을 사용하였다. 추출물은 DMSO에 용해시켜 처리하였다.

멜라닌 측정을 위해 B16F10을 96 well plate에 각 well 당 5.0×10^4 cell 씩 seeding하여 1일간 37°C, 5% CO₂ 조건에서 세포를 배양하였다. 배양이 끝난 후 상층액을 제거한 뒤 와일드제라늄 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 기준으로 2배 다단희석한 농도로 처리하고 α -MSH의 농도가 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 처리하여 72 시간 동안 배양하였다. 2차 배양 후 10% DMSO가 포함된 1N NaOH 0.1 μL 를 처리 후 1시간동안 방치하여 멜라닌을 용해시킨 후 405nm 흡광도를 측정하였다.

2.9 항염

염증 전달 물질 중 하나인 NO에 대한 농도를 측정하여 염증 억제 효과를 확인하였다.

세포 염증 실험에는 RAW 264.7 cell을 사용하였다. 세포 배양 배지로는 DMEM broth를 사용하였으며 FBS 10%를 첨가하여 제조하였다. 항생물질로는 Penicillin-Streptomycin (100X)을 사용하였다. 추출물은 DMSO에 용해시켜 처리하였다.

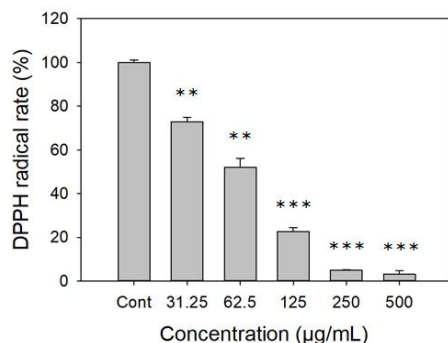
NO 측정을 위해 RAW 264.7을 96 well plate에 각 well 당 5.0×10^4 cell 씩 seeding하여 1일간 37°C, 5% CO₂ 조건에서 세포를 배양하였다. 배양이 끝난 후 상층액을 제거한 뒤 와일드 제라늄 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 기준으로 다양한 농도로 처리하고 LPS (lipopolysaccharide, Sigma, USA)의 농도가 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 처리하여 48 시간 동안 배양하였다. 2차 배양 후 상층액을 회수하여 상층액 100 μL 와 griess reagent 100 μL 를 혼합하여 와일드 제라늄 추출물의 NO 농도를 측정하였다.

3. 실험 결과

3.1 DPPH 라디칼 소거능

Fig. 1는 와일드제라늄 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 계산한 결과이다. 실험에 앞서 비교대상으로 사용된 ascorbic acid의 EC₅₀ 수치를 측정하였다. 각 농도는 3.125-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 범위로 반응시켜 ascorbic acid의 EC₅₀ 수치는 17.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 임을 확인했다.

한편 와일드제라늄 추출물의 경우 31.25-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 희석하여 실험을 진행하였다. 실험 결과 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 27.1 \pm 2.04%, 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 47.94 \pm 1.87%, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 77.42 \pm 1.87%, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 95.01 \pm 0.19%, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 96.91 \pm 1.73%의 DPPH 라디칼 소거능이 나타났다. 이를 바탕으로 EC₅₀을 결과는 65.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 였다.



** p<.01, *** p<.001

Fig. 1. DPPH radical scavenging rate of *Geranium Maculatum* Extract

한편 EC₅₀을 통한 효과는 ascorbic acid는 17.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 본 추출물은 65.59 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타나 ascorbic

acid와 비교 시 약 25.59%의 항산화능을 보였다.

이를 유사한 방법으로 추출한 민들레(*Taraxacum officina*)와 비교하였을 때 500 µg/mL 농도에서 추출 부위에 따라 66.20-87.66%의 DPPH 라디칼 소거능이 나타났다. 와일드 제라늄은 동일 농도에서 96.91±1.73%의 DPPH 라디칼 소거능이 나타나, 와일드 제라늄은 민들레에 비해 약 1.11- 1.46배 강한 항산화능을 나타낸 것으로 보인다[14].

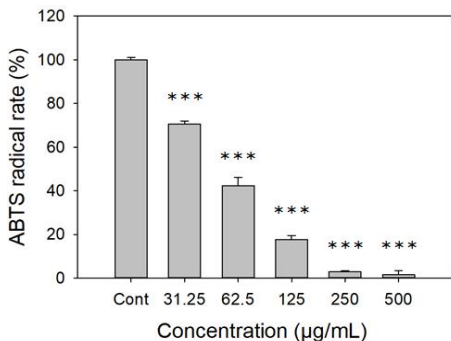
3.2 ABTS 라디칼 소거능

Fig. 2는 와일드제라늄 추출물의 ABTS 라디칼 소거능을 계산한 결과이다. 실험에 앞서 비교대상으로 사용된 ascorbic acid의 EC₅₀ 수치를 측정하였다. 각 농도는 3.125-50 µg/mL 농도 범위로 반응시켜 ascorbic acid의 EC₅₀ 수치는 9.11 µg/mL임을 확인했다.

한편 와일드제라늄 추출물의 경우 31.25-500 µg/mL로 희석하여 실험을 진행하였다. 실험 결과 31.25 µg/mL 에서 29.36±1.35%, 62.5 µg/mL 에서 57.65±3.69%, 125 µg/mL 에서 82.31±1.69%, 250 µg/mL 에서 97.02±2.17%, 0.32 µg/mL 에서 98.48±1.87%의 ABTS 라디칼 소거능이 나타났다. EC₅₀ 계산 결과 54.05 µg/mL란 결과를 얻었다.

한편 EC₅₀을 통한 효과 비교시 ascorbic acid 는 9.11 µg/mL, 본 추출물은 54.05 µg/mL로 나타나 ascorbic acid와 비교 시 약 16.86%의 항산화능을 보였다.

이를 대나무잎 열수추출물과 비교한 결과 품종에 따라 133.30-199.14 µg/mL의 EC₅₀을 나타내었으며, 와일드제라늄의 EC₅₀은 54.05 µg/mL로 대나무잎의 2.47-3.68배 강한 항산화능을 나타내었다[15].



(*** p<.001)

Fig. 2. ABTS radical scavenging rate of *Geranium Maculatum Extract*

3.3 FRAP

와일드제라늄 추출물과 ascorbic acid의 철 이온에 대한 환원력인 FRAP을 측정하여 비교하였다. 와일드제라늄 추출물의 FRAP 측정 결과 0.097±0.004 으로 나타났으며, ascorbic acid의 standard curve를 이용하여 와일드 제라늄 추출물의 1 mg의 FRAP은 ascorbic acid 0.229±0.009 mg의 FRAP과 같음을 알 수 있었다.

3.4 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

Table 1은 와일드제라늄 추출물의 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량을 계산한 결과이다. 폴리페놀의 경우 32.989±1.610 mg/g으로 나타났다. 한편 플라보노이드의 경우 11.098±0.261 mg/g으로 나타났다.

Table 1. Polyphenol and flavonoid content in *Geranium Maculatum Extract*

	Concentration (mg/g)
Polyphenol	32.989±1.610
Flavonoid	11.098±0.261

3.5 세포 독성

와일드제라늄 추출물의 세포에 미치는 독성을 평가하기 위해서 MTT assay를 이용한 세포 생존률을 측정하였다. 와일드 제라늄 추출물은 배지에서의 최종농도가 6.25-100 µg/mL가 되도록 배합하여 배양을 진행하였다.

실험 결과는 Table 2와 같으며 6.25 µg/mL 농도에서 3.35±0.46%, 12.5 µg/mL 농도에서 5.03±0.33%, 25 µg/mL 농도에서 7.42±1.03%, 50 µg/mL 농도에서 11.23±0.93%, 100 µg/mL 농도에서 14.71±0.71%의 세포 생존률이 나타났다.

한편 RAW 264.7를 이용하여 세포의 활성 및 생존율도 측정하였다.

실험 결과는 Table 3와 같으며 6.25 µg/mL 농도에서 1.58±1.32%, 12.5 µg/mL 농도에서 2.03±1.29%, 25 µg/mL 농도에서 3.42±0.91%, 50 µg/mL 농도에서 7.63±0.79%, 100 µg/mL 농도에서 10.25±0.47%의 세포 생존률이 나타났다.

ISO 10993-5 및 식품의약품안전처 고시 제 2014-115호의 기준에서 20% 이상의 세포 독성을 나

타내었을 때 독성이 있는 것으로 간주하며, 이러한 기준으로는 모든 실험 농도에서 세포독성이 나타나지 않은 것으로 나타났다.

Table 2. Cytotoxicity of *Geranium Maculatum* Extract on B16F10

Concentration (μg/mL)	Cell survival rate (%)
Cont.	100.00±1.50
6.25	96.65±0.46*
12.5	94.97±0.33*
25	92.58±1.03**
50	88.77±0.93**
100	85.29±0.71***

* p<.05, ** p<.01, *** p<.001

Table 3. Cytotoxicity of *Geranium Maculatum* Extract on RAW 264.7

Concentration (μg/mL)	Cell survival rate (%)
Cont-	20.54±1.67
Cont+	100.00±3.13
6.25	93.21±3.81
12.5	97.97±1.29
25	96.58±0.91*
50	92.37±0.79**
100	89.75±0.47**

* p<.05, ** p<.01

3.6 미백 활성

와일드제라늄 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 평가하기 위해서 B16F10의 멜라닌 생성량을 측정하였다. 추출물은 배지에서 최종농도가 6.25-100 μg/mL가 되도록 배합하여 배양을 진행하였다.

실험 결과는 Table 4과 같으며 6.25 μg/mL 농도에서 21.71±3.74%, 12.5 μg/mL 농도에서 31.58±3.13%, 25 μg/mL 농도에서 39.31±2.13%, 50 μg/mL 농도에서 39.47±1.01%, 100 μg/mL 농도에서 40.62±2.07%의 미백활성이 나타났다.

상황버섯 추출물과 미백활성을 비교할 경우 열수 추출물에서 양쪽 최대 30% 이상의 미백효과를 내었으나 저농도 조건인 25 μg/mL에서의 결과를 비교했을때, 상황버섯의 경우 21.46%의 미백효과를 보인데 비해 와일드제라늄 추출물의 경우 39.31%의 미백효과를 보여 약 1.8배 더 높은 미백효과를 보였다[16]

Table 4. Melanin production rate of B16F10 with *Geranium Maculatum* Extract

Concentration (μg/mL)	Cell survival rate (%)
Cont.	100.00±4.67
6.25	78.29±3.74**
12.5	68.42±3.13**
25	60.69±2.13**
50	60.53±1.01**
100	59.38±2.07**

** p<.01

3.7 항염

와일드제라늄 추출물이 염증 전달물질에 미치는 영향을 평가하기 위해서 RAW 264.7의 NO 생성량을 측정하였다. 추출물은 배지에서 최종농도가 6.25-100 μg/mL가 되도록 배합하여 배양을 진행하였다.

Table 5는 염증과 관련된 지표인 NO의 생성률을 계산한 결과이다. 12.5 μg/mL 에서 6.79±3.81%, 25 μg/mL 에서 11.07±2.87%, 50 μg/mL 에서 16.07±2.67%, 100 μg/mL 에서 27.86±2.82%의 염증 억제율이 나타났다.

민들레의 열수 추출물의 항염효과와 비교할 경우 250 μg/mL에서 7.5%의 감소를 보인데 비해 본 추출물은 100 μg/mL 에서 27.86±2.82%의 염증 억제율을 나타내 낮은 농도에서도 더 높은 항염활성을 나타내었다[17].

Table 5. NO concentration rate of RAW 264.7 with *Geranium Maculatum* Extract

Concentration (μg/mL)	NO production rate (%)
Cont-	20.54±1.67
Cont+	100.00±1.46
6.25	100.00±1.34
12.5	93.21±3.81
25	88.93±2.87*
50	83.93±2.67**
100	72.14±2.82**

* p<.05, ** p<.01

4. 결론

본 연구에서는 와일드제라늄 추출물이 기능성 화장품 원료로서의 사용 가능성을 확인하기 위하여 항산화능, 미백, 항염능, 세포독성 실험을 실시하였다.

항산화능 실험에는 3 종의 라디칼 소거능 실험과 2

종의 항산화물질 정량 실험을 실시하였다. DPPH 실험에서는 265.8 mg ascorbic acid / g와 같은 항산화능을 보였으며, ABTS 실험에서는 168.5 mg ascorbic acid / g와 같은 항산화능을 보였다. FRAP에서는 와일드 제라늄 추출물 1 mg의 환원력과 ascorbic acid 229±9 µg의 환원력이 같음을 확인하였다. 폴리페놀 농도는 32.989±1.610 mg/g이었고, 플라보노이드 농도는 11.098±0.261 mg/g이었다.

한편 세포실험에서는 세포 독성 실험과 미백, 항염활성을 측정했다. 실험 농도 범위에서 80% 이상의 세포가 생존하여 와일드제라늄 추출물은 낮은 독성을 가지고 있음을 확인하였다. 미백활성 실험에서 농도에 따라 멜라닌 생성을 감소시키는 동시에 100 µg/mL에서 40.62±2.07%의 멜라닌 생성 억제능을 보였다. 항염활성 실험에서도 농도에 따라 염증반응을 감소시키는 동시에 100 µg/mL에서 27.86±2.82%의 염증 억제능을 보여, 천연소재인 와일드제라늄 추출물이 인체에 안전하고 효과적인 기능성 화장품 원료로서 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

- [1] M. S. Kwak. (2017). Analysis of research trends in development of functional cosmetic materials for wrinkle improvement. *The Korea Beauty Art Management Association*, 11(2), 1-19.
DOI : 10.22156/CS4SMB.2021.11.06.181
- [2] N. M. Kyung & T. B. Choe. (2015). Study on Bioactive Characteristics of Ginkgetin and Isoginkgetin as a cosmetic ingredient from Ginkgo biloba leaves. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, 32(2), 248-259.
DOI : 10.12925/jkocs.2015.32.2.248
- [3] S. M. Lee. (2018). Inhibitory Effect of Geranium oil on Melanin Synthesis in B16F10 Mouse Melanoma Cells. *Journal of the Korean society of cosmetics and cosmetology*, 8(3), 407-414.
- [4] V. J. Thannickal & B. L. Fanburg. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, 1005-1029.
DOI : 10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005
- [5] V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. I. Collin & A. Lomri. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74, 324.
DOI : 10.1016/j.jbspin.2007.02.002
- [6] B. Eberlein-Konig, M. Placzek & B. Przybilla. (1998). Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid(vitamin C) and d-α-tocopherol(vitamin E). *J Am Acad Dermatol*, 38, 45-48.
DOI : 10.1016/s0190-9622(98)70537-7
- [7] S. Y. Choi, Y. C. Kim & B. S. Chang. (2011). Inhibitory efficacy of black tea water extract on melanogenesis in melan-a cells and its action mechanisms. *Korean J Microscopy*, 41, 169-77.
- [8] R. Ballotti. (2000). Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res*, 13, 60-69.
DOI : 10.1034/j.1600-0749.2000.130203.x
- [9] S. E. Kim, Y. H. Kim & J. T. Lee. (2014). Antioxidant Activity and Whitening Efficacy of Ethanolic Extract of Herb Complex (*Oenothera laciniata*, *Phellinus linteus* and *Glycyrrhiza uralensis* Fischer). *Journal of Investigative Cosmetology*, 10(1), 27-33.
DOI : 10.15810/jic.2014.10.1.004
- [10] S. H. Byun, C. H. Yang & S. C. Kim. (2005). Inhibitory effect of Scrophulariae Radix extract on TNF-α, IL-1β, IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide activated Raw 264.7 cells. *Korean Journal of Herbology*, 20, 7-16.
- [11] R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush & B. A. Freeman. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls, the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 4244-4250.
DOI : 10.1016/S0021-9258(20)64313-7
- [12] M. S. Blois. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
DOI : 10.1038/1811199a0
- [13] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang & C. Rice-Evans. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
DOI : 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- [14] E. K. Han, J. Y. Lee, E. J. Jung, Y. X. Jin & C. K. Chung. (2010). Antioxidative activities of water extracts from different parts of *Taraxacum officinale*. *Journal of the Korean society of food science and nutrition*, 39(11), 1580-1586.
DOI : 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- [15] D. S. Kim, M. H. Choi & H. J. Shin. (2018). Polyphenol contents and antioxidant activities of

domestic bamboo leaves with different extraction solvents. *Journal of Advanced Engineering and Technology*, 11(1), 7-13.
DOI : 10.35272/jaet.2018.11.1.7

[16] K. H. Im, S. A. Baek, J. Choi & T. S. Lee. (2019). Antioxidant, anti-melanogenic and anti-wrinkle effects of *Phellinus vaninii*. *Mycobiology*, 47(4), 494-505.
DOI : 10.1080/12298093.2019.1673595

[17] Y. J. Koh, Y. K. Park, Y. S. Kim, D. S. Cha, D. S. & H. D. Choi. (2009). Preparation of hot water extracts of dandelion leaves to increase anti-inflammatory activity. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 38(3), 391-395.
DOI : 10.3746/jkfn.2009.38.3.391

최 인 정(In-Jeong Choi)

[정회원]



- 2016년 8월 : 건국대학교 향장학과(석사)
- 2019년 8월: 건국대학교 생물공학과(박사)
- 2020년 7월 24일~현재 : meeth 기업부설연구소 연구원

- 관심분야 : 기능성화장품, 식품공학, 발효, 미생물공학, 화장품
- E-mail : injeong7810@gmail.com