

Passiflora caerulea 추출물의 화장품 소재 활용 가능성

이재남[†]

건국대학교 산업대학원 화장품학과 조교수
(2022년 10월 4일 접수: 2022년 10월 29일 수정: 2022년 10월 29일 채택)

The Possibility of *Passiflora Caerulea* Extract as Cosmetic Material

Jae-Nam Lee[†]

Department of Cosmetology, Graduate School of Engineering, Konkuk University,
120, Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, 05029, Korea
(Received October 4, 2022; Revised October 29, 2022; Accepted October 29, 2022)

요약 : 본 연구는 *Passiflora caerulea* 추출물의 항산화 활성 및 멜라닌 생합성 억제 효과 측정을 통해 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다. *Passiflora caerulea* 추출물은 70% 에탄올로 추출하였고, TEAC assay를 이용한 ABTS radical 소거능을 측정하였다. 또한 Neutral red assay를 이용한 세포 생존율, DCF-DA를 통한 세포 내 ROS 생성 억제, 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정하였다. 연구결과, *Passiflora caerulea* 추출물의 ABTS radical 소거능은 농도 의존적 소거활성이 확인되었으며, positive control(양성대조군)로 이용한 trolox와 0.1 mg/mL 농도에서는 유사한 radical 소거 활성을 확인하였다. CFDA를 통한 세포 내 활성산소종(ROS) 생성은 농도 의존적으로 억제되었고, B16F10 melanoma 세포에 대한 세포 독성은 나타나지 않았다. 또한 α -MSH로 유도된 멜라닌 생합성 억제 효과를 확인하였다. 따라서 본 연구를 통해 *Passiflora caerulea* 추출물은 화장품 소재로서의 활용 가능성이 있는 것으로 판단된다.

주제어 : 시계꽃, 세포 독성, 활성산소종, 항산화, 화장품

Abstract : This study attempted to investigate the possibility of *Passiflora caerulea* extract as a cosmetic material by measuring its antioxidant activities and melanin biosynthesis-inhibiting effects. For this, the substance was extracted with 70% ethanol, and ABTS radical scavenging activities were measured, using the TEAC assay. In addition, cell viability through the neutral red assay, ROS inhibition and inhibition of melanin biosynthesis were analyzed, and the results found the followings: In terms of ABTS radical scavenging activities of the extract, dose-dependent scavenging activities were observed. In trolox used as a positive control group and 0.1 mg/mL, similar radical scavenging activities were found. The production of ROS through CFDA was inhibited in a dose-dependent fashion. Furthermore, inhibition of melanin biosynthesis induced by α -MSH was confirmed. Therefore, it is reasonable to conclude that *Passiflora caerulea* extract has a potential as a cosmetic ingredient.

Keywords : *Passiflora Caerulea*, Cytotoxicity, reactive oxygen species, antioxidant, cosmetic

[†]Corresponding author
(E-mail: jn386@konkuk.ac.kr)

1. 서론

생체 내에는 활성산소에 대한 방어체계로 superoxide dismutase(SOD), catalase (CAT), glutathione (GPX) 등의 항산화 효소와 α -tocopherol, ascorbic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, carotenoid, phenol성 화합물류[1, 2], flavone류 등의 비효소적 항산화 물질들이 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성과 제거 사이에 균형을 갖추어 세포기능을 유지하고 있다. 그러나 자외선에 의한 과도한 활성산소의 발생은 피부의 효소적 및 비효소적 항산화 방어망을 위태롭게 하여[3] 산화적 스트레스를 유발하고, 이때 발생하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)과 interleukin-1 α (IL-1 α), TNF- α , interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) 등과 같은 염증성 사이토카인은 염증성 질병의 매개체로 작용하면서[4, 5] 피부노화, 아토피성 피부염, 건선 등과 같은 피부질환을 유발한다. 특히, 활성산소종 중 Superoxide(O₂⁻), Hydroxyl radical (OH), Hydrogen peroxide(H₂O₂)는 피부 광손상에 있어서 중요한 영향을 미친다. 이들은 피부 항산화제 파괴, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬 절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정 등에[6] 관여한다. 따라서 생체 내 뿐 아니라 피부에서 과잉의 활성산소종 생성을 억제하고 제거하는 항산화제 개발이 필요하다.

멜라닌(melanin)은 피부가 자외선 등과 같은 외부 자극에 노출 되었을 때 방어기작으로[7] 작용하여 멜라닌 합성 과정(melanogenesis)을 촉진한다. 멜라닌생성세포 세포질은 멜라닌 생성을 조절하는 tyrosinase 효소에 의해 tyrosine을 L-DOPA로 변화시키며, L-DOPA는 tyrosinase related protein 1(Trp-1), tyrosinase related protein 2에 의하여 멜라닌으로 전환되어 합성된다[8]. 과도한 멜라닌의 합성은 노화촉진, 기미 및 주근깨 등의 색소침착 유발, 멜라닌 전구물질의 독성으로 인해 세포의 사멸 및 피부암 생성을 [9-11] 촉진한다. 따라서 tyrosinase 활성억제 즉, 멜라닌 합성 억제를 통해 미백 효과를 기대할 수 있다. 이에 화장품 업계에서는 산화적 스트레스 발생을 억제하거나 생성된 활성산소종을 제거할 수 있는 항산화 및 멜라닌 합성 억제 효능을 가진 천연물질에 대한 관심 증가로 건강한 아름다

움을 위한 화장품 성분에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

시계꽃(*Passiflora caerulea*)은 대부분 열대와 아열대 지역에서 발견되는 다년생 덩굴식물로 전세계적으로 500여 종이 분포하며, 꽃과 열매는 식용이나 약제로 사용하고 있다. 꽃잎의 모양은 시계처럼 생겼고, 꽃에서는 메론 향취가 나며, 맛은 쓰면서 따뜻한 성질로 신경통과 생리통, 불안 증상 및 불면증 개선에 도움을 준다[12]. 일반적으로, *Passiflora* 종은 페놀, 알칼로이드, 글리코실 플라보노이드 및 시안화 화합물과 같은 여러 가지 화합물을 함유하고[13] 있으며, *Passiflora caerulea*의 주성분인 5,7-dihydroxyflavone은 시계꽃 외에도 프로폴리스, 꿀 등에 존재하는 천연 플라보노이드로 항산화, 항염, 항노화, 항암 등 다양한 효능을 지니고 있는 것으로 알려져 있다[14]. 또한 시계꽃은 대장염에 대한 항염증 및 항산화 효과[15] 등이 보고되었다. 시계꽃 추출물의 선행연구를 살펴보면 *Passiflora caerulea* 유래 dihydroxyflavone의 투여와 항염증 및 진통효과의 평가[16], 시계꽃 추출물의 수면유도 기전에 대한 관찰과 뇌가소성 향상 효능 검증[[17], 이너뷰티 소재로서의 시계꽃 추출물의 활용 가능성 [12] 등의 다양한 연구들이 진행되고 있다. 그러나 국내에서 시계꽃의 재배면적이 증가하고 있음에도 시계꽃 추출물의 화장품 소재로서의 활용 가능성과 산업적 활용가치에 대한 연구가 미비하고, 천연원료로 제조한 화장품의 사용과 소비가 높아짐에 따라 본 연구에서는 시계꽃 추출물을 선정하여 연구하고자 하였다.

따라서 본 연구에서는 70% 에탄올 시계꽃 추출물을 추출하여 TEAC assay를 통한 ABTS radical 소거능, Neutral red assay를 이용한 세포 생존율, DCF-DA를 통한 세포 내 ROS 생성 억제, 멜라닌 생합성 억제 효과를 확인하고자 하였으며, 이의 결과를 토대로 시계꽃 추출물의 화장품 소재로서의 활용 가능성을 제시하고자 한다.

2. 실험

2.1. 시료 준비

시계꽃은 전라도 함양에서 채취하여 건조시킨 것을 본 연구의 실험재료로 구입하였다. 시료추출은 시계꽃 100 g에 70% 에탄올(ethanol)을 중량

의 10배 양을 가한 후 실온에서 3일간 방치하여 추출하였으며, 추출액만 분리하기 위해 20분간 8000 rpm에서 원심분리를 시행하였다. 이후 여과지(whatman No.2)를 이용하여 상층액을 여과하였고, 감압농축기(EYELA, Japan)로 추출 용매인 에탄올을 제거하였다. 그리고 감압 농축 후 동결건조를 실시하여 추출물을 분말형태로 얻어 시료로 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. TEAC assay 측정

항산화 활성을 측정하기 위해 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) 측정은 Re et al. [18]의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료는 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL의 농도로 희석 하였으며, potassium persulfate 2.45 mM에 용해시킨 ABTS 용액 7.4 mM을 파장 734 nm에서 0.700 ± 0.02 되도록 만들었다. 그 다음 96 well plate에 180 μ L의 ABTS 용액과 시료 20 μ L를 혼합하였고, 암실에서 30분간 반응 후에 microplate reader를 이용하여 파장 734 nm에서 흡광도를 측정하였으며, trolox (St. Louis, Mo, USA)를 표준물질로 이용하였다.

$$\begin{aligned} & \text{ABTS radical scavenging activity(\%)} \\ & = 100 - \left\{ \frac{\text{첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right\} \\ & \quad \times 100 \end{aligned}$$

2.2.2. 세포 배양

본 실험에서 사용된 B16F10 melanoma 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Korea)에서 구입하여 사용하였다. High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, USA)배지에 1% streptomycin (50 μ g/mL, GE Healthcare Life Sciences), 1% penicillin (100 IU/mL, GE Healthcare Life Sciences, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA)[19]를 첨가하여 습윤 인큐베이터(37°C, 5% CO₂, 상대습도 100%)에서 배양하였고, 세포주기는 36~48 시간으로 유지하면서 계대배양을 진행하였다.

2.2.3. Neutral red assay를 이용한 세포

생존율 측정

시계꽃 추출물의 세포독성 평가를 통해 neutral red (NR) assay를 이용하여 세포 생존율을 확인하고자 Repetto et al.[20]의 방법에 따라 측정하였다. 세포는 B16F10 melanoma 세포를 96 well plate에 well 당 3×10^4 cells/well의 농도로 분주하고, 배양기에서 24시간 부착시켰다. 세포 부착 확인 후 시계꽃 추출물을 농도별로 처리하여 37°C의 CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 그 다음 1%의 NR solution (Sigma-Aldrich, USA)이 포함된 무혈청 배지로 교환하여 3시간 동안 배양한 후 NR의 결정화 유무를 현미경하에서 확인하였고, phosphate buffered saline (PBS)에 세포 고정액 10% formaldehyde 용액을 첨가하여 각 well에 100 μ L로 20분간 처리하였다. 1% glacial acetic acid, 49% ethanol, 50% distilled water로 이루어진 NR desorb solution 용액을 각 well에 100 μ L로 분주 처리하여 세포 내의 NR을 추출한 다음 microplate reader (Synergy HT; BioTek Instruments, USA)의 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 3회 반복 동일한 조건으로 실험하여 평균값을 측정하였고, 세포 생존율은 다음의 식에 따라 산출하였다.

$$\begin{aligned} & \text{세포 생존율(100\%)} = \\ & \quad \frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100 \end{aligned}$$

2.2.4. DCF-DA를 통한 세포내 ROS 측정

시계꽃 추출물에 대한 세포 내 Reactive oxygen species (ROS) 생성량 측정은 Eruslanov et al. [21]의 Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 방법을 이용하여 측정하였다. 96-well black plate에 2×10^5 cells/well 농도로 B16F10 melanoma 세포를 분주하여 24시간 배양하였다. 세포에 DCF-DA 최종농도가 10 μ M이 될 수 있도록 배지에 희석시키고, 대조군을 제외한 처리군에는 tert-butyl hydroperoxide (TBHP)를 첨가, 세포 내 ROS 생성을 유도한 후 추가적으로 시계꽃 추출물을 5, 10, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하고 24시간 배양하였다.

이후 PBS를 처리하여 fluorescence plate reader (Synergy HT; BioTek Instruments, St. Winooski, VT, USA)의 485 nm excitation / 530 nm emission의 파장에서 ROS의 변화량을 측정하였다.

$$\text{ROS 생성량}(\%) = \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.2.5. B16F10 세포에서의 멜라닌 생성 억제 효과 측정

본 연구에서는 시계꽃 추출물이 B16F10 melanoma 세포에서의 멜라닌 생성 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Hosoi et al.[22]의 방법을 변형하여 측정하였다. 96-well plate에 2×10^3 cells/well의 농도로 B16F10 melanoma 세포를 분주한 후 24시간 배양하였다. 이후 대조군을 제외한 처리군에 α -MSH를 첨가, 최종 농도가 100 nM이 되도록 5% FBS 배양액으로 처리하고, 시계꽃 추출물을 농도별(0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL 농도)로 처리한 다음 3일간 추가 배양하였다. 1 N NaOH용액(10% DMSO가 첨가)을 처리 후 1시간 동안 50°C에서 용해하였고, Microplate reader의 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2.3. 통계 처리

본 실험 결과는 3회 이상 모두 동일한 조건에서 측정 후 평균 \pm 표준편차(Mean \pm SD)로 표기하였다. SPSS Window (SPSS Inc., st. Chicago, Illinois, USA) Version 20.0 을 이용하여 분석하였고, Student t-test로 유의성 검증을 실시하였으며, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 표기하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. TEAC assay

TEAC assay를 이용한 ABTS 라디칼 소거능은 친수성과 소수성 물질의 항산화력을 측정하는 것으로 potassium persulfate와의 반응으로 생성된 ABTS 양이온 라디칼이 항산화 물질에 의해 제거되어 청록색이[23] 탈색되는 원리를 이용한 방법이다. 본 실험은 시계꽃 추출물의 ABTS radical

소거 활성을 통한 항산화 활성 측정 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 시계꽃 추출물을 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL의 농도별로 처리하였을 때 ABTS radical 소거능은 26.1%, 38.5%, 49.9%, 69.5%, 89.3%로 농도 의존적 증가 양상을 나타냈다. 그리고 trolox를 positive control로 이용하여 시계꽃 추출물의 항산화 활성을 비교하였을 때 0.1 mg/mL 농도에서 trolox는 93.0%, 시계꽃 추출물은 10 mg/mL 농도에서 89.3%로 trolox와 유사한 radical 소거 활성을 확인하였다. Choi et al.의 연구[24]에서는 페놀류 화합물들의 함량이 높아질수록 항산화 활성이 높다고 보고되었다. 일반적으로 총 폴리페놀 함량은 DPPH 라디칼 소거능 및 ABTS 라디칼 소거능과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으며, Oh et al.[25]의 연구에서 보라색 등나무꽃 에탄올 추출물은 농도가 높을수록 ABTS 라디칼 소거 활성이 증가하여 본 연구와 유사한 결과를 나타냈다. 또한 Lee & Kim[26]의 선행연구에서는 시계꽃 추출물의 총 플라보노이드 함량과 총 폴리페놀 함량이 높아질수록 항산화 활성이 높게 나타났고, DPPH radical 소거 활성은 SOD 유사 활성이 낮은 농도에서도 활성이 강하게 나타난 것으로 보고하였다. 이는 시계꽃 추출물에 다량 함유되어 있는 플라보노이드(flavonoid)와 탄닌(tannin)계의 페놀성 화합물들로 인해 항산화 활성이 나타난 것으로 ABTS 라디칼 소거능의 결과를 지지하는 것으로 판단된다. 따라서 시계꽃 추출물은 항산화제로의 응용이 가능하여 화장품 소재로서의 활용 가능성이 있는 것으로 사료된다.

3.2. Neutral red assay를 이용한 세포 생존율

B16F10 melanoma 세포에 대한 시계꽃 추출물의 세포 생존율을 통한 세포 독성을 확인하고자 neutral red assay를 이용하여 측정하였다. 시계꽃 추출물을 5, 10, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도별로 처리하여 세포 독성 측정 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 세포 생존율은 대조군을 100%로 보았을 때, 100 μ g/mL이하의 농도에서 96.3% 이상의 생존율을 보여 세포 독성이 나타나지 않음을 확인하였다. Park[27]의 메리골드와 금잔화꽃 추출물의 연구에서도 100 μ g/mL 농도에서 본 연구와 유사한 세포생존율을 보여 세포독성이 없음을 보고하였다. 이와 같은 결과를 통해 다음 실험은 100 μ g/mL 농도 이하에서 진행하였다.

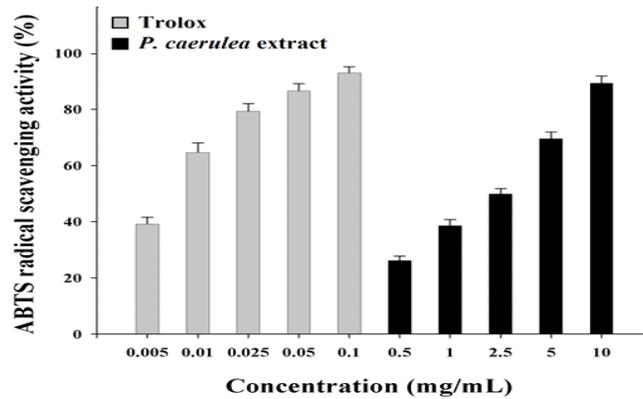


Fig. 1. ABTS radical scavenging activity of *Passiflora caerulea* extract using TEAC assay. Three independent experiments were performed, and the results were expressed as mean \pm SD deviation.

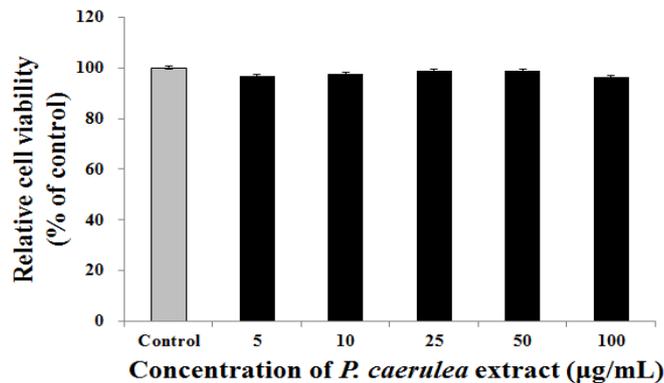


Fig. 2. Cell viability using Neutral red assay. In B16F10 melanoma cells, cytotoxicity was measured through cell viability of *Passiflora caerulea* extract. Results are presented as mean \pm SD, of three independent experiments.

3.3. DCF-DA를 통한 세포내 ROS 생성 억제

활성산소종(ROS)은 정상적인 세포 내에서도 미토콘드리아(Mitochondria)와 마이크로솜(Microsome) 등의 세포 소기관의 대사 작용과 프로스타글란딘(prostaglandin) 생합성 등의 염증 반응에 의해서도 생성되며, 세포막 지질에 대한 연쇄적 손상, DNA 손상, 결합조직 성분인 히아루론산과 콜라겐 등의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정 등에 관여한다[6]. 본 실험에서는 시계꽃 추출물의 세포내 ROS 생성 억제 효과를 확인하고자 B16F10 melanoma 세포에 TBHP 물질로 ROS 생성을 유도하고, 시계꽃 추출물을 처리하여 측정

한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 시계꽃 추출물을 5, 10, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적으로 ROS 생성 수치가 감소하는 것으로 나타났으며, 특히 25, 50, 100 μ g/mL 농도에서 89.5%, 79.9%, 70.7%로 나타나 ROS의 생성을 유의하게 억제하는 것을 확인하였다($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). Kwak & Yang [28]의 연구에서는 복숭아꽃 에탄올 추출물 100 μ g/mL 농도에서 UVB에 의한 ROS 생성을 24.4% 감소시키는 것으로 나타났으며, Lee[29]의 *Paeonia Lactiflora Pallas Flower Extract*(적작약 꽃 추출물) 연구에서도 25, 50 μ g/mL 농도에서 85.87, 77.02%로 시계꽃 추출물 보다는 조금 높

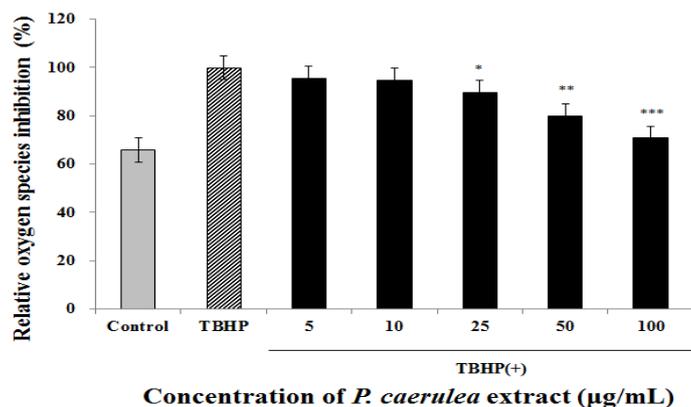


Fig. 3. Intracellular Reactive Oxidant Species (ROS) using DCF-DA. The inhibition effect on Reactive Oxidative Species (ROS) production of the *Passiflora caerulea* extract in B16F10 melanoma cells was measured. Three independent trials of experiment were performed, and the results were stated in mean \pm SD deviation. (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. TBHP).

았지만 B16F10 melanoma 세포 내 활성산소종이 농도 의존적으로 유의하게 억제됨을 보고하였다. 따라서 체내 과도한 ROS의 생성 환경에서 시계꽃 추출물은 ROS로 인한 산화적 스트레스 감소에 도움이 될 수 있을 것이다. 아울러 ABTS 라디칼 소거능의 결과와도 부합되어 피부노화 및 기미, 주근깨 등의 색소침착 같은 각종 피부 질환을 유발하는 ROS 생성 억제에 도움이 되는 화장품 소재로 활용될 수 있을 것이다.

3.4. B16F10 melanoma cell에서의 멜라닌 생합성 억제 효과

α -MSH는 생체 내에서 다양한 생리적 기능에 관여하고 있으며, 특히 염증이나 자외선에 의해 국소적으로 분비되는 호르몬으로서[30] α -MSH가 세포막에 존재하는 수용체와 결합하면 adenylate cyclase가 활성화되어 세포내 cAMP를 증가시키고, cAMP-dependent protein kinase (PKA)가 활성화, 그 후 일련의 과정을 거쳐 tyrosinase의 활성화로 멜라닌화가[31, 32] 진행된다. 그러므로 tyrosinase의 합성을 억제하거나, 그 활성을 저해하면 멜라닌의 생성을 감소시켜 미백효과를 유도할 수 있다[33, 34]. 본 실험은

α -MSH에 의해 유도된 B16F10 melanoma 세포에 시계꽃 추출물을 농도별로 처리하여 멜라닌 함량을 측정된 결과를 Fig. 4에 나타냈다. α -MSH를 처리한 군에 비해 시계꽃 추출물은 25 μ g/mL의 농도에서 82.9%, 50 μ g/mL의 농도에서 79.5%, 100 μ g/mL의 농도에서 78.6%로 농도가 증가할수록 멜라닌 생성 함량이 유의하게 감소하는 현상이 나타났으며(p <0.001), 양성 대조군 arbutin은 100 μ g/mL의 농도에서 멜라닌 생성이 72.8%로 유의하게 감소하였다(p <0.001). 이와 같은 결과는 시계꽃 추출물이 알부틴보다는 낮은 melanin 합성 저해 효과를 보이지만 천연 추출물로서 피부 자극이 없고 안전성 있는 melanin 합성 억제제로서의 활용 가능성을 시사한다. 또한 You & Moon[35]의 연구에서는 구절초 꽃 추출물 2 μ g/mL, 50 μ g/mL 농도에서 86.8%, 84.6%의 멜라닌 생성 감소를 보였고, Ryn 등[36]의 싸리꽃 추출물 연구에서는 25 μ g/mL 농도에서 83.8%의 멜라닌 생성 감소를 보여 본 연구의 시계꽃 추출물과 유사한 tyrosinase의 활성 감소를 나타냈다. 따라서 본 연구의 시계꽃 추출물이 멜라닌 생합성을 억제하는 화장품 소재로서의 활용 가능성이 있음을 확인하였다.

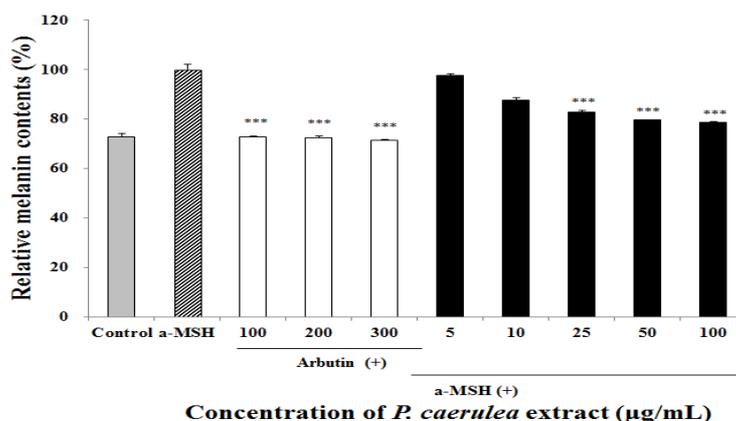


Fig. 4. Inhibition of melanin synthesis in B16F10 melanoma cell treated with *Passiflora caerulea* extract. Three independent trials of experiment were performed, and the results were stated in mean \pm SD deviation, (***) $p < 0.001$ vs. α -MSH)

4. 결론

본 연구는 시계꽃 추출물을 70% 에탄올로 추출하여 TEAC assay를 이용한 ABTS radical 소거능을 확인하고, Neutral red assay를 이용한 세포 생존율 측정, DCF-DA를 통한 B16F10 melanoma 세포 내 ROS 생성 억제 측정, 멜라닌 생합성 억제 효과를 측정하여 화장품 소재로서의 활용 가능성을 평가하고자 하였다.

본 실험 결과, ABTS radical 소거능은 시계꽃 추출물을 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적 증가 양상이 나타났으며, positive control로 이용한 trolox와 0.1 mg/mL 농도에서는 유사한 radical 소거 활성을 확인하였다. Neutral red assay를 이용한 세포 생존율은 100 µg/mL 이하의 농도에서 96.3% 이상의 생존율을 나타냄으로써 B16F10 melanoma 세포에 대한 세포 독성은 없는 것으로 확인되었다. CFDA를 통한 B16F10 melanoma 세포 내 활성산소종(ROS) 측정은 시계꽃 추출물을 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적으로 증가 양상이 나타났으며, ROS의 생성을 유의하게 억제하는 것을 확인하였다($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). 또한 B16F10 melanoma cell에서의 멜라닌 생합성 억제 효과 측정은 α -MSH를 처리한 군에 비해 시계꽃 추출물은 농도가 증가할수록 멜라닌 생성 함량이 유의하게 감소하였으며($p < 0.001$), 100 µg/mL의 농도에서는 78.6%로 나타났다. 한편, 양성 대조군으로 사

용된 arbutin은 100 µg/mL의 농도에서 멜라닌 생성이 72.8%로 유의하게 감소하여($p < 0.001$), 알부틴보다는 낮은 melanin 합성 저해 효과를 보였지만 안전성 있는 melanin 합성 억제제로서의 효과를 확인하였다.

위 실험 결과를 통해 시계꽃 추출물의 항산화 활성과 활성산소 억제 효과, 멜라닌 생성 억제 효과가 확인됨에 따라 천연 추출물로 독성이 없는 안전성 있는 화장품소재의 활용 가능성을 확인하였다. 향후, 보다 효과적인 화장품 소재의 천연 원료로서 사용하기 위해서는 제품 개발 및 임상 연구를 통한 지속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

References

1. M. C. Polidori, W. Stahl, O. Eichler, "Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Radic Biol Med*", Vol.30, No.5 pp. 456-462, (2001).
2. M. J. Kim, J. N. Lee, "A Study on Peucedanum Japonicum Thunberg Extract on Anti-oxidation and Cell Activities as Cosmetic Additive", *Journal of the Korean Society of Cosmetology*, Vol.22, No.6 pp. 135-1143, (2016).
3. S. N. Park, "Skin aging and Antioxidants",

- J. Soc. Cosmet. Sci.*, Vol.29, No.1 pp. 75-77, (2003).
4. E. K. Chung, E. H. Seo, J. H. Park, H. R. Shim, K. H. Kim, B. R. Lee, "Anti-inflammatory and anti-allergic effect of extracts from organic soybean", *Korean J Org Agric.*, Vol.19, pp. 245-253, (2011).
 5. S. H. Seo, H. Lee, M. O. Choi, "The Anti-inflammatory Actions and Dermal Bioactive Effects of *Coreopsis lanceolata* extracts", *Journal of the Korean Society of Cosmetology*, Vol.24, No.3 pp. 472-481, (2018).
 6. M. J. Lee, Y. H. Lee, A. J. Kim, "Measuring of Anti-oxidant Activity and Skin Improvement Effect using *Adenophora remotiflora* leaf", *Journal of the Korea Academia Industrial cooperation Society*, Vol.14, No.1 pp. 239-246, (2013).
 7. G. Hunt, S. Kyne, S. Ito, K. Wakamatsu, C. Todd, A. J. Thody, "Eumelanin and pheomelanin contents of human epidermis and cultured melanocytes", *Pigment Cell & Melanoma Research*, Vol.8, No.4 pp. 202-208, (1995).
 8. Y. M. Yoon, S. H. Bae, S. K. An, Y. B. Choe, K. J. Ahn, I. S. An, "Effects of Ultraviolet Radiation on the Skin and Skin Cell Signaling Pathways", *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, Vol.11, No.34 pp. 17-426, (2013).
 9. K. Urabe, P. Aroca, K. Tsukamoto, D. Mascagna, A. Palumbo, G. Prota, V. J. Hearing, "The inherent cytotoxicity of melanin precursors: a revision", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1221, No.3 pp. 272-278, (1994).
 10. S. J. Orlow, B. K. Zhou, A. K. Chakraborty, M. Drucker, H. S. Pifko, J. M. Pawelek, "High-molecular-weight forms of tyrosinase and the tyrosinase-related proteins: evidence for a melanogenic complex", *Journal of Investigative Dermatology*, Vol.103, No.2 pp. 196-201. (1994).
 11. A. Y. Lee, Inhibitory Effects of *Chlamydomonas reinhardtii* Extracts on Melanogenesis, Doctoral dissertation, Konkuk University, (2018).
 12. J. N. Lee, Y. S. Kim, "Availability of *Passiflora Caerulea* Extract as Inner Beauty Material", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.37, No.5 pp. 1180-1189, (2020).
 13. K. Dhawan, S. Dhawan, A. Sharma, "Passiflora: a review update", *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.94, No.1 pp. 1-23, (2004).
 14. K. J. Woo, Y. J. Jeong, J. W. Park, T. K. Kwon, "Chrysin induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells", *Biochem Biophys Res Commun*, Vol.325, pp. 1215-1222, (2004).
 15. M. L. Anzoise, C. Marrassini, H. Bach, S. Gorzalczy, "Beneficial properties of *Passiflora caerulea* on experimental colitis", *J Ethnopharmacol*, Vol.194 No.24 pp. 137-145, (2016).
 16. H. D. Je, "Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Passiflora caerulea* derived-dihydroxyflavone in rodents", *The Journal of the Natural Science*, Vol.14, No.1 pp. 79-84, (2016).
 17. G. H. Kim, Increased neuroplasticity in the brain according to sleep inducing effect following oral administration of *Passiflora incarnata* L. extract, Master's thesis, Soonchunhyang University, (2019).
 18. Re R. Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, R. E. Catherine, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol.26, pp. 1231-1237, (1999).
 19. J. S. Moon, J. H. Lee, S. H. You, Antioxidant Activity and Cytotoxicity on cell of *Arctium lappa* L. root extract, *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol. 34, No. 1 pp. 41-49, (2017).

20. G. D. Repetto, A. Del, J. L. Zurita, A. Zurita, "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity", *Nature protocols*, Vol.3, No.7, p. 1125, (2008).
21. E. Eruslanov, S. Kusmartsev, "Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry", *Methods Mol Biol*, Vol.594, pp. 57-72, (2010).
22. J. Hosoi, E. Abe, T. Suda, T. Kuroki, "Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid", *Cancer Res*, Vol.45, No.4 pp. 1474-1478, (1985).
23. J. M. Lee, "Physicochemical characteristics and antioxidant effects of red mustard (*Brassica juncea* L.) leaf using different drying methods", *The Korean Journal of Community Living Science*, Vol.28, No.4 pp. 515-524, (2017).
24. S. Y. Choi, S. H. Lim, J. S. Kim, T. Y. Ha, S. R. Kim, K. S. Kang, I. K. Hwang, "Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plants", *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.37, pp. 549-556, (2005).
25. Won-Gyeong Oh, In-Cheol Jang, Gyeong-Im Jeon, Eunju Park, Hae-Ryong Park, Seung-Cheol Lee, "Antioxidative Activity of Extracts from *Wisteria floribunda* Flowers", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.37, No.6, pp. 677-683, (2008).
26. N Lee, Y. Sam Kim, "Availability of *Passiflora Caerulea* Extract as Inner Beauty Material", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.37, No.5 p. 1184, (2020).
27. E, S. Park, "Comparison of anti-oxidative and anti-inflammatory activities of African marigold (*Tagetes erecta* L.) and Keumjanhwa (*Calendula officinalis* L.) extracts", Doctoral dissertation, Konkuk University, (2018).
28. Chung Shil Kwak, Ji won Yang, "Prevention Effect of *Prunus persica* Flos Extract from Reactive Oxygen Species Generation and Matrix Metalloproteinases Production Induced by UVB Irradiation in Human Skin Cells", *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, Vol.14, No.2 pp. 179-190, (2016).
29. J. N. Lee, "Inhibition of Antioxidant Activity and Melanin Biosynthesis of *Paeonia Lactiflora* Pallas Flower Extract", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol.23, No.7 pp. 85-92, (2022).
30. Y. Yamaguchi, V. J. Hearing, "Physiological factors that regulate skin pigmentation", *Biofactors*, Vol.35, No 2 pp. 193-199, (2009).
31. E. Y. Choi, Y. A. Jang, "The Analysis of Whitening Effects on Extracts from *Ginkgo* (*Ginkgo biloba* L.) Seeds", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.38, No.5 pp. 1229-1240, (2021).
32. Jung YC, "Development and industrialization of processed food using useful physiological activity of sweet potato", pp. 1-223, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, (2008).
33. S. H. Jung, M. J. Ku, H. J. Moon, B. C. Yu, M. J. Jeon, Y. H. Lee, "Inhibitory effects of fucoidan on melanin synthesis and tyrosinase activity", *Journal of Life Science*, Vol.19, No.1 pp. 75-80, (2009).
34. C. J. Oh, H. O. Kim, E. S. Jung, S. H. Lee, G. Y. Jeon, Y. C. Kim, "Anti-wrinkle and Skin-whitening Efficacy of *Rhododendron micranthum* Methanol Extract", *Journal of Investigative Cosmetology*, Vol.14, No.4 pp. 405-411, (2018).
35. S. H. You, J. S. Moon, "A Study on Anti-oxidative, Anti-inflammatory, and Melanin Inhibitory Effects of *Chrysanthemum Sibiricum* Extract", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.33, No.4 pp. 762-770 (2016).

36. I. S. Ryu, S. J. Park, Y. J. Mun, J. S. Ko, K. D. Shin, J. C. Lee, W. H. Woo, K. S. Lim. "Inhibitory effects of Flowers of *Lespedeza bicolor* on Tyrosinase Activity and Melanin Synthesis", *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, Vol.21, No.5 pp. 1142-1147, (2007).