

## 레몬밤 발효추출물의 항산화 활성과 성분 분석

양희정·김은희·박정옥·김정은·박수남<sup>†</sup>

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과  
(2009년 2월 27일 접수, 2009년 3월 4일 수정, 2009년 3월 10일 채택)

### Antioxidative Activity and Component Analysis of Fermented *Melissa officinalis* Extracts

Hee Jung Yang, Eun Hee Kim, Jung Ok Park, Jung Eun Kim, and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of Technology, 172,  
Gongneung 2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

(Received February 27, 2009; Revised March 4, 2009; Accepted March 10, 2009)

**요약:** 본 연구에서는 레몬밤추출물과 발효추출물의 항산화, 성분 분석 및 tyrosinase 저해 효과에 관한 조사를 수행하였다. 추출물의 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC<sub>50</sub>)은 발효추출물의 ethyl acetate 분획(8.38 µg/mL)에서 가장 큰 활성을 나타내었고, 또한 Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 레몬밤추출물의 총 항산화능은 발효추출물의 ethyl acetate 분획(0.63 µg/mL)에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 레몬밤추출물과 발효추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 세포보호 효과를 측정하였다. 레몬밤추출물과 발효추출물의 경우 5 ~ 75 µg/mL의 농도에서 농도 의존적으로 세포보호 효과를 나타내었다. Tyrosinase의 활성 저해 효과(IC<sub>50</sub>)는 50 % ethanol 추출물(365 µg/mL) < 발효추출물의 ethyl acetate 분획(122.43 µg/mL) < ethyl acetate 분획(94.8 µg/mL) 순으로 나타났다. 레몬밤추출물 중 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획은 TLC에서 공통으로 2개의 띠로 분리되었다. 또한 HPLC (330 nm)에서도 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획이 각각 2개 peak로 나타났다. 각각의 크로마토그래피로부터 ethyl acetate 분획의 peak 1 (51.64 %)은 caffeic acid, peak 2 (48.36 %)는 rosmarinic acid임을 확인하였으며, 또한 발효추출물의 ethyl acetate 분획에서도 peak 1 (4.13 %)과 peak 2 (95.87 %)는 각각 caffeic acid와 rosmarinic acid로 확인되었다. 이상의 결과들은 레몬밤의 50 % ethanol 추출물 및 발효추출들이 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 혹은 다른 ROS를 소광시키거나 소거함으로써 그리고 ROS에 대항하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 시사한다. 그리고 또한, 레몬밤 추출물과 발효추출물의 성분 및 함량을 분석함으로써 발효 후에 차이점을 확인, 이를 통한 응용 가능성을 확인하였다.

**Abstract:** In this study, the antioxidative effects, inhibitory effects on tyrosinase, and component analysis of fermented *Melissa officinalis* extracts were investigated. The ethyl acetate fraction of fermented extract (8.38 µg/mL) showed the most prominent free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activities (FSC<sub>50</sub>) of extract/fractions of *M. officinalis*. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC<sub>50</sub>) of some *M. officinalis* extracts on ROS generated in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system were investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The ethyl acetate fraction of fermented extract (0.63 µg/mL) showed the most prominent ROS scavenging activity. The protective effects of extract/fractions of *M. officinalis* on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *M. officinalis* extracts suppressed photohemolysis in a concentration dependent manner (5 ~ 75 µg/mL). The inhibitory effect of *M. officinalis* extracts on tyrosinase was investigated to assess their whitening efficacy. Inhibitory effects (IC<sub>50</sub>) on tyrosinase of some *M. officinalis* extracts was 50 % ethanol extract (365 µg/mL) < ethyl acetate fraction of fermented extract (122.43 µg/mL) < ethylacetate fraction (94.8 µg/mL). Fractions of ethyl acetate both from ordinary and fermented *M. officinalis* extracts showed 2 band in TLC and 2 peak in HPLC (330 nm). In HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction, peak 1 (51.64 %)

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: snpark@snut.ac.kr)

and peak 2 (48.36 %) were identified as caffeic acid and rosmarinic acid in the order of elution time. Also, in HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction of fermented extract, peak 1 (4.13 %) and peak 2 (95.87 %) were identified as caffeic acid and rosmarinic acid in the order of elution time. These results indicate that the component and content of ordinary and fermented extracts of *M. officinalis* are different. And the extract of *M. officinalis* can be used as an antioxidant.

**Keywords:** *Melissa officinalis*, rosmarinic acid, caffeic acid, antioxidative activity, cosmetics

## 1. 서 론

피부는 다양한 환경적 요인(자외선, 공해, 산화제)에 의한 빈번한 접촉에 기인한 산화적 스트레스에 민감하다. 산화적 스트레스는 주 원인이 태양 자외선(UVA 및 UVB)에 의한 노출이며, 자외선에 의해 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 피부의 황산화제를 압도할 때 일어난다. ROS란 반응성이 매우 큰  $^1O_2$  및  $\cdot OH$ 를 비롯하여  $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$ ,  $ROO\cdot$ ,  $RO\cdot$ ,  $ROOH$  및  $HOCl$  등을 포함한다[1,2]. 이들은 포르피린과 같은 광증감제에 의한 광증감반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성될 수 있다[3].  $^1O_2$  및  $\cdot OH$ 을 포함하는 ROS는 피부 광손상을 주도하며, 피부 황산화제 파괴, 지질 과산화의 개시, 단백질의 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하는 등 피부노화를 가속시킨다[4-7].

사람 피부세포에 있어서 지질 및 생체 고분자 물질 등 생체 구성 성분의 산화 손상뿐만 아니라 UVA-의존성 세포사멸이나 유전자 활성화에도 ROS가 포함되는 것으로 알려져 있다. 콜라겐은 피부 진피 층의 매트릭스 성분 중 가장 많은 성분으로 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 사람 피부 섬유아세포에서  $^1O_2$ 을 비롯한 ROS가 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을  $^1O_2$ 이 매개할 수 있다[8-12]. 이는 광노화를 방어하고 자외선으로부터 보호제를 개발하는데 있어서  $^1O_2$ 을 비롯한 ROS의 중요한 역할을 시사하는 것이다.  $^1O_2$ 을 비롯한 ROS가 광노화에 포함되기 때문에 항산화제에 의한 자외선 노출 후 ROS의 감소[13-16]는 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 촉망되는 전략임은 분명하다[17-21].

레몬밤(*Melissa officinalis*)은 중남부 유럽, 아시아 지역에 널리 분포하는 쌍떡잎식물 꿀풀과의 한 종류로 두통, 고창, 소화불량, 빈혈, 천식과 같은 질병의 치료용도

로 이용되어 왔으며[22], 그 이외에도 항균 작용, 항바이러스 작용, 항산화 작용이 있다고 보고된바 있다[23,24]. 레몬밤에는 주로 페놀성 화합물인 eriodictyol-7-O-glucoside, hesperidin, hesperetin, naringenin, naringin와 caffeic acid, m-coumaric acid, rosmarinic acid와 같은 hydroxycinnamic acid 유도체가 함유되어 있다고 알려져 있으며[25], 그 중에서도 rosmarinic acid의 함량이 가장 많은 것으로 보고되었다[26,27].

그러나 레몬밤추출물과 발효추출물을 이용한 피부 노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인  $^1O_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용이나 각종 ROS ( $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot -}$ ,  $\cdot OH$  등)가 생성되는 계( $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$  계)에서의 이들 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 그리고 또한 레몬밤추출물에서 발효가 미치는 영향, 즉 성분이나 함량 변화에 대해서도 아직 연구된 바가 없다. 따라서 화장품 원료로서 사용 가능한 레몬밤을 구입하여 레몬밤추출물, 발효추출물(혹은 분획)을 제조하고 이들 추출물(혹은 분획)의  $^1O_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성,  $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$  계에서의 총 항산화능, 미백과 관련 있는 tyrosinase 활성 저해 효과를 측정하고 레몬밤추출물과 발효추출물의 성분분석을 통하여 rosmarinic acid를 포함한 페놀성 화합물을 확인하여 레몬밤의 항산화능과 성분의 변화를 비교 평가하고 활성산소에 의한 피부 노화를 방지하는데 효과가 있는 기능성 화장품 소재로서 가능성이 있는지를 검토하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학발광기는 Berthold (Germany)의 6-channel LB9505 LT를, pH meter는 Istek (Korea) 제품을 사용하였다.

(+)- $\alpha$ -Tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, EDTA, luminol, heparin, 증감제로 사용된

rose-bengal, free radical 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei (Japan) 제품을,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea) 제품을 사용하였다. 완충용액 제조에 사용된  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , NaCl, 그리고 trizma base, HCl, ethanol (EtOH), methanol (MeOH), ethyl acetate (EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 플라보노이드의 분석에 사용한 thin layer chromatography (TLC)는 aluminum sheet silica gel 60 F<sub>254</sub> (0.2 mm)로 Merck (USA)에서 구입하였다. 비교물질로 사용한 rosmarinic acid, caffeic acid는 Sigma (USA)에서 구입하였다. 실험 재료인 레몬밤은 2008년 8월 가락시장에서 구입하여 사용하였다.

## 2.2. 레몬밤의 분획 및 추출

건조된 레몬밤 200 g을 잘게 자른 후 50 % ethanol 2 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50 % ethanol 추출물은 감압 농축한 후 물과 hexane을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 ethyl acetate 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다.

## 2.3. 레몬밤 자연 발효추출물의 제조

레몬밤 발효추출물은 (주)풀무원홀딩스의 도움으로 얻었다. 건조되지 않은 레몬밤 30 g을 정제수 2 L를 이용하여 세척하고, 세척된 레몬밤을 분쇄기를 이용하여 5 min 동안 조분쇄하여 발효조에 투입하였다. 액상과당 100 g을 레몬밤 조분쇄물의 당도를 감안하여 정제수 200 g과 혼합하여 발효조에 투입하고 발효조의 발효물 최종 당도를 20 ~ 25 Brix로 조정하였다. 최적 발효 조건(37 °C, 10 ~ 15 일)에서 자연 미생물의 힘을 이용하여 자연 발효를 진행시키고 발효조의 발효물 산도가 1.0 ~ 1.2가 되면 발효를 중단하였다. 최종 발효물은 착즙 및 여과(100 mesh)하여 레몬밤 발효추출물을 얻었다. 발효를 통해 얻은 레몬밤 발효추출물은 hexane을 이용하여 비극성 성분을 제거하고, 이후 ethyl acetate 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다.

## 2.4. 레몬밤 추출물의 항산화 효과 측정

### 2.4.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 레몬밤 추출물에 대한 free radical 소거활

성 측정은 DPPH를 이용하였다. 실험방법은 methanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 ethanol 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 DPPH의 활성 저해율을 나타내었다. 소거 활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC<sub>50</sub>,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left\{ 1 - \left[ \frac{(A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}})}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100$$

### 2.4.2. Luminol 발광법을 이용한 $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

철이나 구리 같은 전이금속은 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ )을 생성시키는 촉매로 작용한다. 본 실험에서 사용한  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$  계는 각종 ROS ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$  그리고  $\text{H}_2\text{O}_2$ )를 생성시킨다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있다. 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트작용도 포함될 수 있다.  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$ 계에서 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS 간의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 알 수 있다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40  $\mu\text{L}$  및 5 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10  $\mu\text{L}$ 를 가한 후 35 mM luminol 80  $\mu\text{L}$ 를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  40  $\mu\text{L}$ 를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정한 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC<sub>50</sub>,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의 cpm} - \text{Sample의 cpm})}{(\text{Control의 cpm} - \text{Blank의 cpm})} \times 100$$

## 2.5. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 활성산소에 의한 세포손상 및 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 이 실험법을 이용하여 천연물을 대상으로 활성산소에 대한 세포보호 효과를 측정할 수 있다.

### 2.5.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9 % saline phosphate buffer로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는  $1.5 \times 10^7$  cells/mL이었다.

### 2.5.2. 레몬밤 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50  $\mu$ L씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12  $\mu$ M) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사 하였다. 광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm  $\times$  20 cm  $\times$  25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min 동안 광조사 하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20 °C 항온실에서 행하였다. 레몬밤 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인  $\tau_{50}$ 을 구하여 비교하였다. 대조군(control)은  $\tau_{50}$ 이 31 min으로 오차범위  $\pm 1$  min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안 했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다.

**Table 1.** HPLC Conditions for Separation of Ethyl Acetate Fractions from Ordinary and Fermented *M. officinalis* Extracts

Column	Luna 5 $\mu$ C18 (L: 250 nm, LD: 4.6 mm)
Detector	UVD 170 s DIONEX
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	2 % acetic acid : 0.5 % acetic acid in H <sub>2</sub> O in 50 % acetonitrile solution (70 : 30 ~ 10 : 90, Gradient) for all fractions

## 2.6. Tyrosinase 저해활성 측정

L-Tyrosine로부터 멜라닌 생성과정에는 tyrosinase가 핵심효소로 작용한다. 따라서 tyrosinase의 저해활성은 미백활성을 측정하는데 매우 중요하다. L-Tyrosine (0.3 mg/mL) 1.0 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 1.8 mL, 시료 0.1 mL를 혼합한 후 37 °C에서 10 min 동안 항온 배양한 다음, 반응혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase를 첨가 않은 것을 공시험(blank)으로 하여 효소활성 저해를 계산하였다. 활성의 크기는 0.1 mL tyrosinase의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(IC<sub>50</sub>,  $\mu$ g/mL)로 표기하였다.

## 2.7. TLC 및 HPLC를 이용한 레몬밤 추출물의 플라보노이드 분석

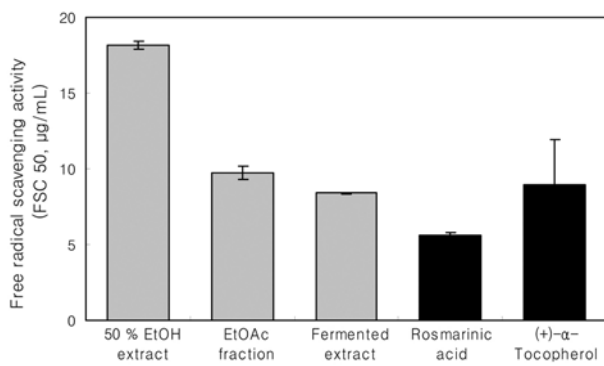
레몬밤 추출물 중 ethyl acetate 분획과 발효 후 ethyl acetate 분획을 100 % ethanol에 녹인 후, syringe filter (Millopore 0.45  $\mu$ m)를 이용하여 여과하고 이 여액을 TLC 및 HPLC 분석을 위한 시료로 이용하였다. TLC 분석에서 전개용매는 chloroform : acetic acid : methanol : water = 60 : 32 : 12 : 8 (v/v)을 사용하여 분석하였다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료, 플라보노이드 표준물질의 R<sub>f</sub> 값과 자외선 및 발색법을 이용한 분리된 띠의 색상 등으로 확인하였다. HPLC 분석은 2 % acetic acid 수용액과 0.5 % acetic acid를 함유한 50 % acetonitrile 수용액을 기울기 용리법으로 분리하였고, 이때 HPLC 분리조건은 Table 1에 나타내었다.

## 2.8. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5 % 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

**Table 2.** Free Radical Scavenging Activities of Extracts from *M. officinalis* and References

Compounds	Scavenging activity (FSC <sub>50</sub> , µg/mL)
<i>M. officinalis</i> extract (50 % EtOH)	474 ± 5.66
<i>M. officinalis</i> extract (EtOAc fraction)	9.77 ± 0.44
Fermented <i>M. officinalis</i> extract (EtOAc fraction)	8.38 ± 0.04
Rosmarinic acid	5.63 ± 0.14
(+)-α-Tocopherol	8.98 ± 2.93



**Figure 1.** Free radical scavenging activity of extracts and fraction of *M. officinalis* and references.

### 3. 결 과

#### 3.1. 레몬밤추출물의 항산화 활성

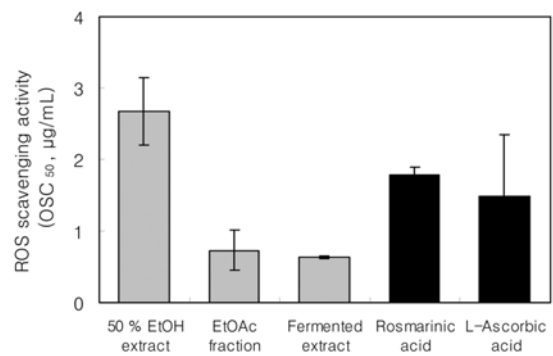
##### 3.1.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

생체막에 있어 활성산소 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 반응은 자동산화 과정을 경유한 연쇄반응이다. (+)-α-Tocopherol 등의 항산화제는 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킴으로써 세포막을 보호한다. 이와 같이 세포막에서 수소주개로 작용하는 항산화제의 능력은 안정한 free radical인 DPPH와의 반응을 통하여 알아 볼 수 있다.

레몬밤 (*Melissa officinalis*) 추출물 그리고 비교물질인 rosmarinic acid, (+)-α-tocopherol의 free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>) 측정 결과는 Table 2 및 Figure 1과 같다. 레몬밤추출물은 50 % ethanol 추출물인 경우 FSC<sub>50</sub>이 474 µg/mL, ethyl acetate 분획은 9.77 µg/mL, 발효추출물은 8.38 µg/mL을 나타냈다. 발효추출물의 free radical 소거

**Table 3.** Reactive Oxygen Species Scavenging Activities of Extracts from *M. officinalis* and References

Compounds	Scavenging activity (OSC <sub>50</sub> , µg/mL)
<i>M. officinalis</i> extract (50 % EtOH)	2.67 ± 0.47
<i>M. officinalis</i> extract (EtOAc fraction)	0.73 ± 0.28
Fermented <i>M. officinalis</i> extract (EtOAc fraction)	0.63 ± 0.02
Rosmarinic acid	1.78 ± 0.12
L-Ascorbic acid	1.50 ± 0.85

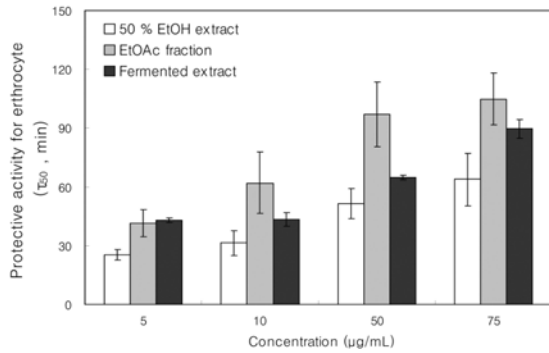


**Figure 2.** Reactive oxygen species scavenging activity of *M. officinalis* extracts and references in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

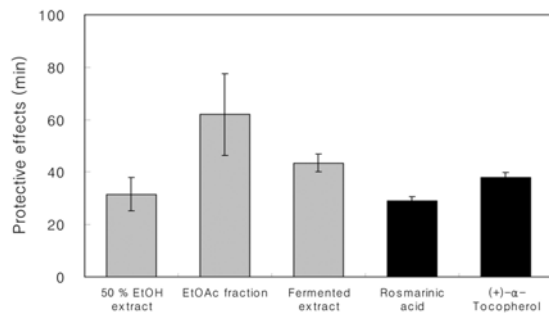
활성은 ethyl acetate 분획보다 효과가 큰 것으로 나타났으며, (+)-α-tocopherol과 비슷한 효과를 나타내었다. 비교 물질로 사용한 rosmarinic acid의 free radical 소거활성은 5.63 µg/mL, (+)-α-tocopherol은 8.98 µg/mL이었다.

##### 3.1.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Luminol은 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. 발효추출물의 활성산소 소거활성(총항산화능, OSC<sub>50</sub>)은 Table 3에서와 같이 0.63 µg/mL이었다. Table 3과 Figure 2에서 레몬밤 50 % ethanol 추출물은 2.67 µg/mL, ethyl acetate 분획 0.73 µg/mL로 나타났다. 따라서 총항산화능은 발효추출물이 50 % ethanol 추출물이나 ethyl acetate 분획보다 활성산소 소거활성이 보다 큼을 보여주었다. 발효추출물은 비교물질로 사용한 rosmarinic acid (1.78 µg/mL), L-ascorbic acid (1.50 µg/mL)보다 훨씬 큰 활성



**Figure 3.** Cellular protective effects of *M. officinalis* extracts against  $^1\text{O}_2$ -induced photohemolysis of human erythrocytes (Control =  $31.0 \pm 1.0$  min).



**Figure 4.** The effect of extracts and fractions from *M. officinalis* and standards at  $10 \mu\text{g/mL}$  on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.

을 나타내었다.

### 3.2. $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

레몬밤 추출물의 활성산소에 의한 세포손상에 있어서 보호 효과를 측정된 결과가 Figure 3, 4 및 Table 4에 나와 있다. 적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간 ( $\tau_{50}$ )은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 레몬밤의 50 % ethanol 추출물의 경우는 25.33, 31.50, 51.60, 63.73 min, ethyl acetate 분획의 경우 41.63, 62.0, 96.90, 104.80 min, 발효 후 ethyl acetate 분획은 경우 43.03, 43.43, 64.6, 89.47 min으로 농도 의존적으로 세포보호 효과를 나타내었다. 따라서 세포보호 효과는  $10 \mu\text{g/mL}$ 에서 50 % ethanol 추출물 ( $\tau_{50}$ , 31.50 min) < 발효추출물의 ethyl acetate 분획(43.43 min) < ethyl acetate 분획(62.0 min) 순으로 증가하였다. 5 ~  $75 \mu\text{g/mL}$  농도에서 레몬밤추출물의 ethyl acetate 분획은 비교물질로 사용한 rosmarinic acid, (+)- $\alpha$ -tocopherol과 비교했을 때 큰

**Table 4.** Effects of Extracts from *M. officinalis* and Reference Compounds on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Concentration, $\mu\text{g/mL}$	$\tau_{50}$ (Half time of hemolysis <sup>1)</sup> )			
	5	10	50	75
<i>M. officinalis</i> extract (50 % EtOH)	25.33 $\pm$ 2.66	31.50 $\pm$ 6.37	51.60 $\pm$ 7.73	63.73 $\pm$ 13.2
<i>M. officinalis</i> extract (EtOAc fraction)	41.63 $\pm$ 6.97	62.00 $\pm$ 15.57	96.90 $\pm$ 16.69	104.80 $\pm$ 13.39
Fermented <i>M. officinalis</i> extract (EtOAc fraction)	43.03 $\pm$ 1.28	43.43 $\pm$ 3.41	64.60 $\pm$ 1.00	89.47 $\pm$ 4.95
Rosmarinic acid	-	28.91 $\pm$ 1.73	-	-
(+)- $\alpha$ -Tocopherol	-	38.00 $\pm$ 1.80	74.33 $\pm$ 6.35	-

<sup>1)</sup>Control,  $\tau_{50} = 31 \pm 1.0$  min

**Table 5.** Inhibitory Activity of Extracts from *M. officinalis* and References Compound on Tyrosinase

Compounds	Inhibition
	(IC <sub>50</sub> , $\mu\text{g/mL}$ )
<i>M. officinalis</i> extract (50 % EtOH)	365 $\pm$ 17.38
<i>M. officinalis</i> extract (EtOAc fraction)	94.80 $\pm$ 8.13
Fermented <i>M. officinalis</i> extract (EtOAc fraction)	122.43 $\pm$ 8.62
Arbutin	226.88 $\pm$ 1.55

세포보호 활성을 나타내었다. 그러나 발효추출물의 ethyl acetate 분획은 레몬밤추출물의 ethyl acetate 분획보다 세포보호 효과가 낮았는데 그 원인은 rosmarinic acid가 주 성분으로 존재하기 때문이라고 사료된다.

### 3.3. Tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성에 있어서 핵심효소는 tyrosinase이다. 이 효소는 tyrosine으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정 중, tyrosine에서 DOPA, DOPA에서 DOPA quinone, 그리고 DHI로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매하는데 관여한다.

레몬밤 추출물 중 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획의 경우에도 tyrosinase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 각각  $94.80 \mu\text{g/mL}$ ,  $122.43 \mu\text{g/mL}$ 으로 비교 물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin의

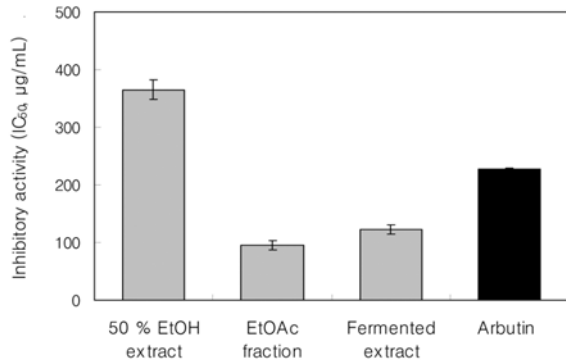


Figure 5. The effect of extracts and fractions from *Melissa officinalis* and reference on tyrosinase.

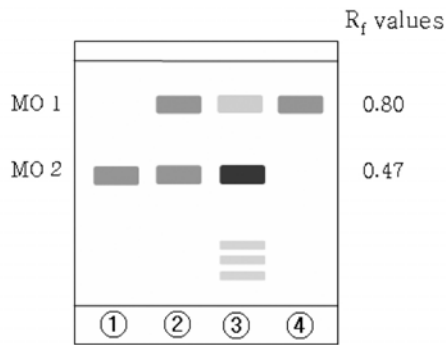


Figure 6. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *M. officinalis* and references. Eluent system: chloroform : acetic acid : methanol : water = 60 : 32 : 12 : 8 (v/v). ①: Rosmarinic acid, ②: ethyl acetate fraction, ③: fermented extract, ④: caffeic acid.

저해 활성 226.88 µg/mL에 비해서도 큰 tyrosinase 저해 활성을 보였다. 따라서 ethyl acetate 분획, 발효추출물을 화장품에 응용할 경우 미백효과가 있을 것으로 사료된다 (Figure 5).

### 3.4. 레몬밤 추출물의 TLC 및 HPLC 성분 분석

#### 3.4.1. 레몬밤 추출물의 TLC 성분 분석

레몬밤추출물의 TLC 크로마토그램은 Figure 6에 나타내었다. Figure 6은 50 % ethanol로 추출한 레몬밤 추출물로부터 얻은 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획의 TLC 크로마토그램이며, hydroxycinnamic acid 유도체들을 분리할 수 있는 조건에서 레몬밤의 ethyl acetate 분획은 2개의 띠(MO 1, MO 2)로 분리되었고, 발효추출물은 2개 띠 이외에 추가적으로 3개의 띠가 생성되었으나 농도는 매우 미비했다. 공통적

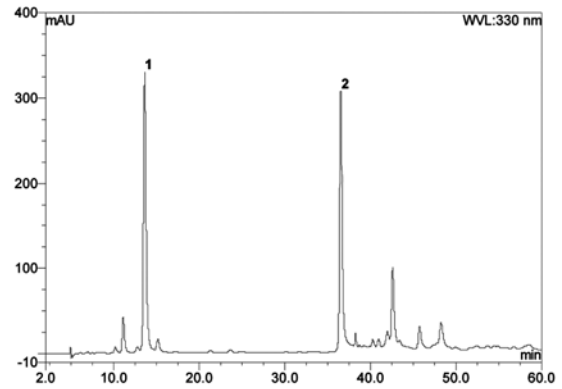


Figure 7. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *M. officinalis* at λ = 330 nm. 1: caffeic acid, 2: rosmarinic acid.

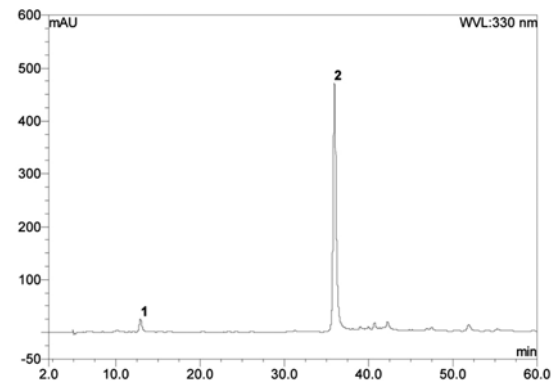


Figure 8. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from fermented *M. officinalis* extract at λ = 330 nm. 1: caffeic acid, 2: rosmarinic acid.

으로 확인된 2개의 띠들이 어떤 성분인지 알아보기 위하여 자외선 및 발색법으로 확인한 결과, R<sub>f</sub> 값이 0.80인 MO 1은 caffeic acid로 나타났고, R<sub>f</sub> 값이 0.47인 MO 2는 rosmarinic acid로 나타났으며, 그 중에서도 MO 2의 농도가 가장 진한 것으로 나타났다.

#### 3.4.2. 레몬밤 추출물의 HPLC 성분 분석

레몬밤 추출물 중 ethyl acetate 분획의 HPLC 크로마토그램은 Figure 7과 같다. 크로마토그램은 2개의 peak를 나타내었다. 각각의 peak를 동정하기 위하여, Figure 6에 있는 TLC 크로마토그램에서 분리된 띠를 끊어서 추출·여과하고 용매를 감압·건조시킨 후 얻은 파우더를 ethanol 용액으로 하여 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다. 그 결과 레몬밤 추출물 중 ethyl acetate 분획에 대한 Figure 6의 TLC (normal phase) 크로마토그램에서 R<sub>f</sub> 값이 가장 큰 띠인 MO 1 (R<sub>f</sub> 0.80)은 Figure 2의

HPLC (reverse phase) peak 1로, MO 2는 peak 2와 일치함을 확인하였다. 또한 Figure 1와 함께 표준물질을 사용하여 peak 1 (51.64 %)는 caffeic acid, peak 2 (48.36 %)는 rosmarinic acid임을 확인하였다.

레몬밤 발효추출물 중 ethyl acetate 분획에 대한 HPLC 크로마토그램은 Figure 8과 같다. 표준물질을 이용하여 확인한 Figure 6의 TLC 크로마토그램에서 확인한 바와 같이 Figure 8의 peak 1 (4.13 %)은 caffeic acid, peak 2 (95.87 %)는 rosmarinic acid임을 확인하였다.

HPLC를 이용하여 레몬밤 추출물 중 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획에 함유되어 있는 caffeic acid와 rosmarinic acid의 비율을 확인하였다. 그 결과 레몬밤을 발효시킨 ethyl acetate 분획에 rosmarinic acid가 주성분으로 존재하는 것으로 확인할 수 있었다(Figure 8).

#### 4. 결 론

1) 레몬밤추출물의 free radical 소거능력(FSC<sub>50</sub>)은 50 % ethanol 추출물 18.15 µg/mL, ethyl acetate 분획 9.77 µg/mL, 발효추출물의 ethyl acetate 분획은 8.38 µg/mL로 나타났다.

2) 레몬밤 추출물의 활성산소 소거활성(OSC<sub>50</sub>)은 레몬밤 50 % ethanol 추출물, 2.67 µg/mL, ethyl acetate 분획 0.73 µg/mL, 발효추출물의 ethyl acetate 분획은 0.63 µg/mL로 가장 큰 활성을 나타냈다.

3) <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 레몬밤추출물과 발효추출물은 µg/mL의 농도 범위(5 ~ 75 µg/mL)에서 농도-의존적으로 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 용혈을 억제하였다.

4) 레몬밤추출물 중 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획은 tyrosinase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 각각 94.80 µg/mL, 122.43 µg/mL로 나타났다.

5) 발효추출물의 ethyl acetate 분획은 HPLC 크로마토그램은 검출 파장 330 nm에서 2개의 peak를 나타내었고, peak 1 (4.13 %)은 caffeic acid, peak 2 (95.87 %)는 rosmarinic acid임을 확인하였다.

6) HPLC를 통한 레몬밤추출물 중 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획 중 함유되어 있는 caffeic acid와 rosmarinic acid의 비율 확인 결과, 추출물 중 ethyl acetate 분획에서는 caffeic acid와 rosmarinic acid는 비슷한 비율로 존재하지만, 발효추출물의 ethyl acetate 분획은 rosmarinic acid가 주성분으로 확인되었다.

7) 레몬밤추출물 중 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획의 TLC는 2개의 띠(MO 1, MO 2)로 분리되었고, 그 중에서 Rf 0.47인 MO 2의 농도가 가장 진한 것으로 나타났다.

8) 레몬밤추출물 중 ethyl acetate 분획의 HPLC 크로마토그램은 검출 파장 330 nm에서 2개의 peak를 나타내었고, peak 1 (51.64 %)은 caffeic acid, peak 2 (48.36 %)는 rosmarinic acid임을 확인하였다.

레몬밤추출물과 그 발효추출물의 ethyl acetate 분획의 항산화능에 있어서, 발효추출물이 보다 큰 항산화 활성을 나타냈고, 이는 레몬밤 발효추출물의 화장품 응용 가능성이 더 큼을 시사한다.

#### 참 고 문 헌

1. E. H. Witt, P. Motchnik, and L. Packer, Evidence for UV light as an oxidative stressor in skin, eds J. Fuchs and L. Packer, *Oxidative Stress in Dermatology*, 29, New York, Dekker (1993).
2. I. Emerit, Free radicals and aging of the skin, eds L. Emerit and B. Chance, *Free radicals and aging*, 328, Basel, Birkhauser (1992).
3. C. S. Foote, Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems, ed. W. A. Pryor, 2, 85, Academic press, New York (1976).
4. S. N. Park, Ph. D. Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1989).
5. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**, 75 (1997).
6. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photo-hemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
7. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalin, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
8. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissue of skin: its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy, ed. H. Sies, **38**, 639 (1997).
9. R. M. Tyrrell and M. Pidoux, Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fi-



- broblast by UVA and near visible radiations, *Photochem. Photobiol.*, **49**, 407 (1989).
10. G. F. Vile and R. M. Tyrrell, UVA radiation-induced oxidative damage to lipid and protein in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen, *Free Radical Biology & Medicine*, **18**, 721 (1995).
  11. K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts, *FEBS Lett.*, **331**, 304 (1993).
  12. M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A induced synthesis of interstitial collagenase, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).
  13. A. Oikarinen, J. Karvonen, J. Uitto, and M. Hannuksela, Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation, *Photodermatology*, **2**, 15 (1985).
  14. A. Oikarinen and M. Kallioinen, A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin, *Photodermatology*, **6**, 24 (1989).
  15. L. H. Kligman, UVA induced biochemical changes in hairless mouse skin collagen: a contrast to UVB effects, ed. F. Urbach, **209**, Valdemar, Overland Park (1992).
  16. J. W. Choi, S. I. Kim, J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, and S. N. Park, Antioxidative and cellular protective effects of Jeju native plant extracts against reactive oxygen species (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
  17. J. W. Choi, S. I. Kim, S. M. Jeon, J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, and S. N. Park, Antioxidative and cellular protective effects of Jeju plant extracts against reactive oxygen species (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
  18. H. J. Yang and S. N. Park, Evaluation of antioxidant potential of extract/fractions of *Equisetum areense* (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(2), 61 (2007).
  19. H. J. Yang and S. N. Park, Component analysis and study on anti-elastase activity of *Equisetum areense* (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 139 (2007).
  20. S. M. Jeon, S. I. Kim, J. Y. Ahn, and S. N. Park, Antioxidative potencies of extract/fractions of *Suaeda asparagoides* and *Salicornia herbacea* extracts (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(3), 145 (2007).
  21. J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, S. M. Jeon, Y. J. Ahn, B. R. Won, and S. N. Park, Antioxidative and antiangiogenic effect of Jeju native plant extracts (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
  22. Anon, Iranian herbal pharmacopoeia, Tehran: Ministry of Health Publication, **1**, 141 (2002).
  23. N. D. Allahverdiyeva, M. Ozguvenc, and S. Koltas, Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2, *Phytomedicine*, **11**, 657 (2004).
  24. M. D. Neda, B. Biljana, S. Marina, and S. Natasa, Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 2485 (2004).
  25. K. Dastmalchi, H. J. Damien Dormana, P. P. Oinonena, Y. Darwisid, I. Laakso, and R. Hiltunena, Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract, K. Dastmalchi et al., *LWT* **41**, 391 (2008).
  26. J. L. Lamaison, C. Petitjean-Freytet, and A. Carnat, Rosmarinic acid, total hydroxycinnamic derivatives and antioxidant activity of *Apiaceae*, *Borraginaseae* and *Lamiceae* medicinals, *Ann. Pharm. Fr.*, **48**, 103 (1990).
  27. J. S. Kim, B. R. Park, E. K. Park, H. S. Lee, J. C. Hahm, K. H. Bae, and M. Y. Kim, Screening of anti-angiogenic activity from plant extracts, *Kor. J. Pharmacogn.*, **37**(4), 253 (2006).