

## 라벤더 발효추출물의 항산화 활성과 성분 분석

안 유 진 · 원 보 령 · 강 명 규 · 김 재 현 · 박 수 남<sup>†</sup>

서울산업대학교 자연생명과학대학 정밀화학과  
(2009년 5월 11일 접수, 2009년 5월 26일 수정, 2009년 5월 30일 채택)

### Antioxidant Activity and Component Analysis of Fermented *Lavandula angustifolia* Extracts

You Jin Ahn, Bo Ryoung Won, Myung Kyu Kang, Jai Hyun 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 May 11, 2009; Revised May 26, 2009; Accepted May 30, 2009)

**요 약:** 본 연구에서는 라벤더 추출물과 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(5.95 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 라벤더 추출물의 총항산화능은 발효추출물의 ethyl acetate 분획(1.45 µg/mL)에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 라벤더 추출물과 발효추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였고, 농도 의존적(1 ~ 50 µg/mL)으로 세포보호 효과를 나타내었다. Tyrosinase의 활성 저해 효과(IC<sub>50</sub>)는 라벤더 추출물의 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획이 각각 144.80 µg/mL, 122.40 µg/mL로 나타났다. 라벤더 추출물 중 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획은 TLC에서 공통으로 3개의 띠로 분리되었으며, HPLC (340 nm)에서도 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획이 각각 3, 2개로 나타났다. 각각의 크로마토그래피로부터 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획에서 공통적으로 rosmarinic acid가 확인되었다. 이상의 결과들은 라벤더 추출물 및 발효추출물들이 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 혹은 다른 ROS를 소광시키거나 소거하고, ROS에 대하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 시사한다. 그리고 또한 라벤더 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 of non-fermented and fermented *Lavandula angustifolia* extracts were investigated. The ethyl acetate fraction of fermented extract (5.95 µg/mL) showed the most prominent the free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC<sub>50</sub>). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC<sub>50</sub>) of *L. angustifolia* 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 (1.45 µg/mL) showed the most prominent ROS scavenging activity. The protective effects of extract/fractions of *L. angustifolia* on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *L. angustifolia* extracts suppressed photohemolysis in a concentration dependent manner (1 ~ 50 µg/mL). The inhibitory effect of *L. angustifolia* extracts on tyrosinase was investigated to assess their whitening efficacy. Inhibitory effects (IC<sub>50</sub>) on tyrosinase were determined with ethyl acetate fraction of *L. angustifolia* extract (144.80 µg/mL) and ethyl acetate fraction of fermented extract (122.40 µg/mL). Fractions of ethyl acetate and fermented extracts showed both 3 band in TLC and 3 peaks, 2 peaks in HPLC (340 nm), respectively. In each chromatography, fractions of ethyl acetate both from non-fermented and fermented *L. angustifolia*

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

have rosmarinic acid in common. These results indicate that the component and content of non-fermented and fermented extracts of *L. angustifolia* are different. Both of the extract of *L. angustifolia* can be used as an antioxidant.

**Keywords:** *Lavandula angustifolia*, antioxidative activity, fermented, rosmarinic acid, cosmetics

## 1. 서 론

피부는 다양한 환경적 요인과 항상 접촉하고 있기 때문에, 산화적 스트레스 요인의 공격에 직접적으로 노출되어 있다. 이러한 산화적 스트레스의 주 요인은 태양 자외선(UVA 및 UVB)에의 노출이며, 공해, 화학 산화제 및 미생물, 호흡이나 염증반응[1] 등도 포함한다. 특히, 피부의 복잡한 항산화 방어망이 계속된 자외선의 노출로 인한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 유도된 광산화적 손상을 받게 되면 피부의 효소적 및 비효소적 항산화 방어망이 위태롭게 된다[2]. 활성산소종이란 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[3,4]. 이들은 고에너지 복사선, 광증감반응 및 몇 가지 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성될 수 있다[5]. 이 중에서  $^1O_2$  및  $\cdot OH$ 은 피부 광손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들 ROS는 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화반응의 개시, 단백질의 산화, DNA의 산화, 결합조직 성분인 콜라젠, 히아루론산 등의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하는 등 피부노화를 가속시킨다[6-9].

사람 피부세포에 있어서 지질, 단백질 및 DNA 등 생체 구성 성분의 산화 손상뿐만 아니라 UVA (320 ~ 380 nm) 의존성 세포사멸이나 유전자 활성화에도 활성산소종이 포함되는 것으로 기술되고 있다. 콜라젠은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라젠의 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 있다는 보고도 있다[10-14]. 또한, 사람 피부 표면을 코팅하고 있는 피부 표면 지질, 특히 squalene은 자외선(특히 UVA)의 첫 번째 공격 표적이며, UVA 조사에 의해 squalene monohydroperoxide (SqOOH)가 생성됨이 보고되고 있다. Squalene은  $^1O_2$ 의 좋은 소광제로 피부 각질층의 항산화

방어의 최전선을 형성하는 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각되고 있다[15,16]. 이와 같은 사실은 광노화를 방어하고 자외선으로부터 보호제를 개발하는데 있어서  $^1O_2$ 을 비롯한 ROS의 중요한 역할을 시사한다.  $^1O_2$ 을 비롯한 ROS가 광노화에 포함되기 때문에 항산화제에 의한 자외선 노출 후 ROS의 감소[17-20]는 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 촉망되는 전략임은 분명하다[21-25].

라벤더(*Lavandula angustifolia*)는 원산지가 지중해인 쌍떡잎식물 꿀풀과의 한 종류로, 일반적으로 서양 라벤더로 알려져 있다. 라벤더 오일은 전통적으로 위장 및 신경, 류마티스 질병과 항박테리아 및 항균, 근육이완 및 진정에 민간요법으로 사용되어 왔다[26,27]. 라벤더 물 추출물은 mushroom tyrosinase에 대한 저해 활성을 가지고[28], 에탄올 추출물은 피지 생성을 억제하는 효과가 있다고 보고되어 있다[29]. 주요 성분으로는 linalool, linalyl acetate, ladanin, apigenin, apigenin-7-O- $\beta$ -glucoside, luteolin, luteolin-7-O- $\beta$ -glucoside, 5,4'-dihydroxy flavonoid-7-O- $\beta$ -pyranglycuronate buthyl ester 가 함유되어 있다고 알려져 있다[29-31]. 이 중 rosmarinic acid, hydroxycinnamic acid, 1,8-cineole 등은 *L. angustifolia*의 항산화 효과에 기여한다고 보고되어 있다[32].

그러나 라벤더 추출물과 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 계에서의 이들 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 그리고 또한 라벤더추출물에서 발효가 미치는 영향, 즉 성분이나 함량 변화에 대해서도 아직 연구된 바가 없다. 따라서 화장품 원료로서 사용하고 있는 라벤더를 구입하여 라벤더 추출물, 발효추출물(혹은 분획)을 제조하고 이들 추출물(혹은 분획)의  $^1O_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성과 free radical 소거활성,  $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$  계에서 생성된 활성산소에 대한 총항산화능, tyrosinase 활성 저해 효과, 피부 주름 생성에서 중요한 역할을 하는 elastase 활성 저해 효과를 측정하였다. 이와 함께 라벤더 추출물과 발효추출물의 성분분석을 통하여 rosmarinic acid를 포함한 페놀성 화합물을 확인하여 라

벤더의 항산화능과 성분의 변화를 비교 평가하고, ROS에 의한 피부 노화를 방지하는데 효과가 있는 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 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 Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea) 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 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, trizma base, HCl 그리고 ethanol (EtOH), methanol (MeOH), ethyl acetate (EtOAc), octanol 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 L-tyrosine과 N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide, 효소로 사용된 tyrosinase (12.7 mg solid, 3,960 units/mg solid), elastase (0.35 mg protein/mL, 7.8 units/mg protein)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 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 apigenin, luteolin, rosmarinic acid, caffeic acid는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 라벤더 재료는 2008년 8월 가락시장에서 구입하여 사용하였다.

### 2.2. 라벤더의 분획 및 추출

건조된 라벤더 200 g을 잘게 자른 후 50 % 에탄올 5 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50 % 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 물과 hexane을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 ethylacetate 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다.

Ethyl acetate 분획으로부터 aglycone 제조: ethyl

acetate 분획에서 얻은 파우더 일부는 산 가수분해 반응을 이용하여 당을 제거시킨 후 얻은 aglycone 파우더를 실험에 사용하였다. 실험 방법은 ethyl acetate 가용분 일정량에  $\text{H}_2\text{SO}_4$  및 acetone 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5 % KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 ethyl acetate 층을 분획하고 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다.

### 2.3. 라벤더 자연 발효추출물의 제조

라벤더 발효추출물은 (주)풀무원홀딩스로부터 얻었다. 건조되지 않은 라벤더 30 g을 정제수 2 L를 이용하여 세척하고, 세척된 라벤더를 분쇄기를 이용하여 5 min 동안 조분쇄하여 발효조에 투입하였다. 액상과당 100 g을 라벤더 조분쇄물의 당도를 감안하여 정제수 200 g과 혼합하여 발효조에 투입하고 발효조의 발효물 최종 당도를 20 ~ 25 Brix로 조정하였다. 최적 발효 조건(37 °C, 10 ~ 15일)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 라벤더 발효추출물을 얻었다. 발효를 통해 얻은 라벤더 발효추출물은 n-hexane을 이용하여 비극성 성분을 제거하고, 이 후 ethyl acetate 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다.

### 2.4. 라벤더 추출물의 항산화 효과 측정

#### 2.4.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

피부노화의 원인 물질로 특히 간주되고 있는 것은 free radical이다. 라벤더 추출물에 대한 이러한 free radical 소거활성 측정은 DPPH를 이용하였다. 실험방법은 methanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL을 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>,  $\mu\text{g/mL}$ )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 $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$ 에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

$Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$  계는 각종 ROS ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$  그리고  $H_2O_2$ )를 생성시키고, 철은 이 반응을 촉매한다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총항산화능을 측정할 수 있다. 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS 사이의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 알 수 있다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 라벤더 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40  $\mu$ L 및 5 mM  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  10  $\mu$ L를 가한 후 35 mM luminol 80  $\mu$ L를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온 시킨 후 150 mM  $H_2O_2$  40  $\mu$ L를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나  $H_2O_2$ 와  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity,  $OSC_{50}$ ,  $\mu$ g/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. 무엇보다 태양 자외선에 의한 피부노화를 방어할 수 있는 자외선으로부터의 피부 보호물질을 검색하는데 있어서 유용하다. 따라서 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 buffer (pH 7.4,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  9.6 mM,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  1.6 mM)로 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 이 때 적혈구 수는  $1.5 \times 10^7$  cells/mL이었다.

##### 2.5.2. 라벤더 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50  $\mu$ L씩 첨가하고 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. 라벤더 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. 모든 실험은 4회 반복하여 평균하였다.

#### 2.6. Tyrosinase 저해활성 측정

L-Tyrosine으로부터 멜라닌 생성과정에서 tyrosinase는 전체 반응 속도를 결정하는 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) 1.85 mL, 시료 0.05 mL를 혼합한 후 37 °C에서 10 min 동안 항온 배양한 다음, 반응혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 0.1 mL tyrosinase의 활성을 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration,  $IC_{50}$ ,  $\mu$ g/mL)로 표기하였다.

**Table 1.** HPLC Conditions for Separation of Ethyl Acetate Fractions from Non-fermented and Fermented *L. angustifolia* Extracts

Column	Luna 5 $\mu$ C18 (L: 250 mm, LD: 4.6 mm)
Detector	UVD 170S 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

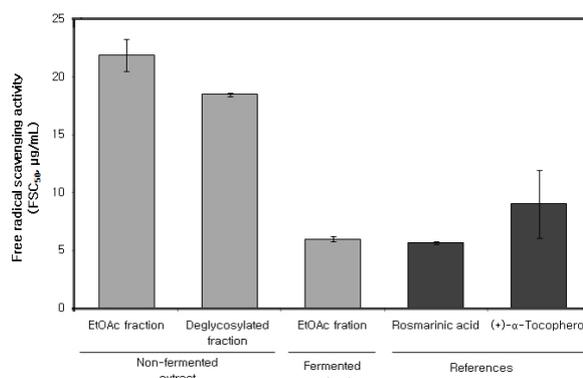
## 2.7. Elastase 저해활성 측정

피부노화, 특히 주름 생성에는 활성산소에 의한 작용과 matrix metalloproteinases (MMPs: collagenase, elastase 등)에 의한 세포외 매트릭스의 파괴가 주원인으로 간주되고 있다. 따라서 MMPs의 저해활성 측정은 피부노화 억제 평가에 대단히 중요하다.

Tris-Cl (pH 8.0) 0.13 M에 elastase 기질인 *N*-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitroanilide 1.0 mM이 용해된 buffer 1,300  $\mu$ L에 측정시료용액 7.5  $\mu$ L와 buffer 92.5  $\mu$ L를 첨가하여 25  $^{\circ}$ C 수욕상에서 10 min 동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 elastase 용액을 100  $\mu$ L 첨가(최종농도 0.0025 U/mL)하여 25  $^{\circ}$ C 수욕상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료 대신 시료용액으로 사용된 용매를 100  $\mu$ L 첨가하였다. Blank는 *N*-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.13 M Tris-Cl buffer 1,300  $\mu$ L를 첨가하였으며, 농도는 실험군과 동일하였다.

## 2.8. TLC 및 HPLC를 이용한 라벤더 추출물의 플라보노이드 분석

라벤더 추출물 중 ethyl acetate 분획과 발효 후 ethyl acetate 분획을 100 % 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milopore 0.45  $\mu$ m)를 이용하여 여과하고 이 여액을 TLC 및 HPLC 분석을 위한 시료로 이용하였다. TLC 분석에서 전개용매는 ethyl acetate : chloroform : formic acid : water = 8 : 1 : 1 : 1 (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.

**Figure 1.** Free radical scavenging activity of extracts and fraction of *L. angustifolia* and references.

## 2.9. 통계처리

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

## 3. 결과 및 고찰

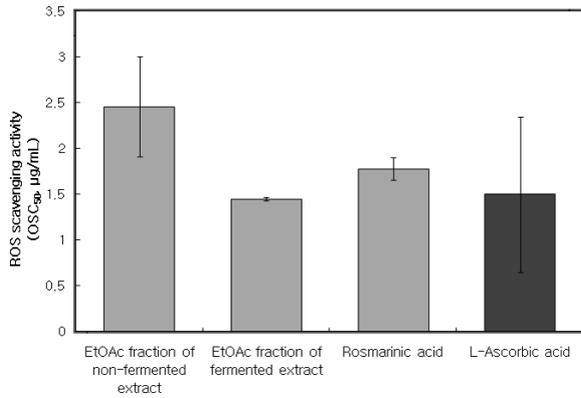
### 3.1. 라벤더 추출물의 항산화 활성

#### 3.1.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

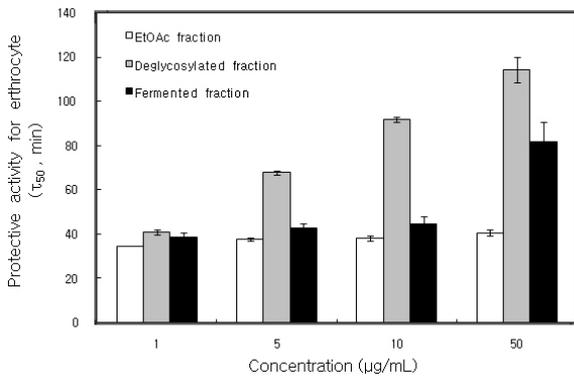
생체막에 있어 활성산소 또는 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 반응은 자동산화 과정을 경유한 연쇄반응이다. (+)- $\alpha$ -Tocopherol 등의 항산화제는 연쇄반응에서 지질 과산화라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 이 때 수소 주개로 작용하는 항산화제의 능력은 안정한 free radical인 DPPH와의 반응을 통하여 알아볼 수 있다.

라벤더(*Lavandula angustifolia*) 추출물과 비교물질인 rosmarinic acid 및 (+)- $\alpha$ -tocopherol의 free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>) 측정 결과는 Figure 1에 나타내었다. 라벤더 추출물의 ethyl acetate 분획인 경우 FSC<sub>50</sub>가 21.90  $\mu$ g/mL, aglycone 분획은 18.47  $\mu$ g/mL, 발효추출물의 ethyl acetate 분획은 5.95  $\mu$ g/mL로 나타났다. 따라서 발효추출물의 ethyl acetate 분획이 라디칼 소거 활성이 더 크다는 것을 알 수 있다.

그 외에 비교 물질로 사용한 rosmarinic acid는 free radical 소거활성이 5.63  $\mu$ g/mL, (+)- $\alpha$ -tocopherol은 8.98  $\mu$ g/mL로 나타났다.



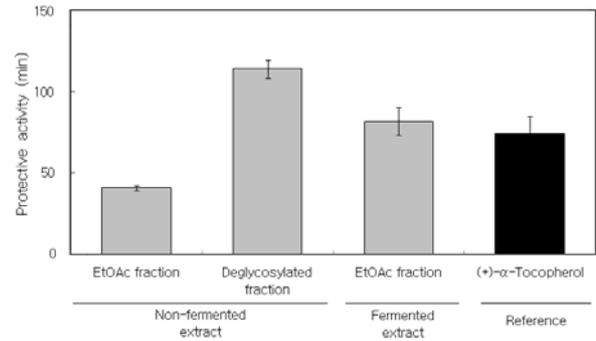
**Figure 2.** Reactive oxygen species scavenging activity of *L. angustifolia* extracts and reference in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by luminol-dependent chemiluminescence assay.



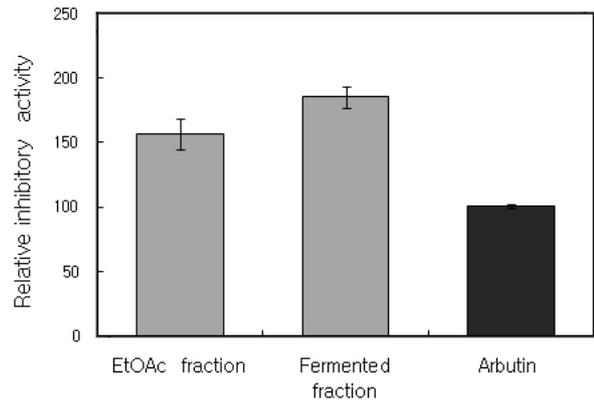
**Figure 3.** Cell protective effects of *L. angustifolia* extracts against <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-induced photohemolysis of human erythrocytes (control = 31.0 ± 1.0 min).

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 1.48 µg/mL이었고, Figure 2에서와 같이 라벤더 추출물의 ethyl acetate 분획은 2.46 µg/mL으로 나타났다. 따라서 총항산화능은 발효추출물의 ethyl acetate 분획이 추출물의 ethyl acetate 분획보다 활성산소 소거활성이 보다 뛰어났다. 발효추출물은 비교물질로 사용한 rosmarinic acid (1.78 µg/mL) 및 L-ascorbic acid (1.50 µg/mL)과 소거활성이 비슷하거나 보다 큼을 알 수 있다.



**Figure 4.** The effect of extracts and fractions form *L. angustifolia* and references at 50 µg/mL on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.



**Figure 5.** The effect of extracts and fractions from *L. angustifolia* and reference on tyrosinase.

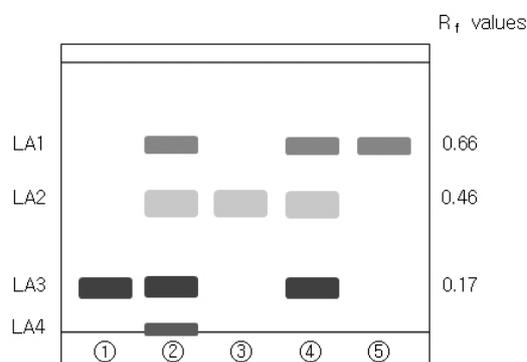
3.2. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

라벤더 추출물을 비롯한 몇 가지 항산화제들의 활성산소에 의한 세포 손상에 대한 보호 효과를 Figure 3과 Figure 4에 나타내었다.

적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간(τ<sub>50</sub>)은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 라벤더 추출물의 ethyl acetate 분획의 경우 34.72, 37.83, 38.30, 40.64 추출물 min, aglycone 분획의 경우는 40.97, 67.78, 91.70, 114.24 min, 발효추출물의 ethyl acetate 분획의 경우 38.8, 43.0, 44.8, 81.9 min으로 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 나타내었다. 따라서 세포보호 효과는 50 µg/mL에서 ethyl acetate 분획(40.64 min) < 발효추출물의 ethyl acetate 분획(81.93 min) < aglycone 추출물(114.24 min) 순으로 증가하였다.

**Table 2.** Inhibitory Activity of Extracts from *L. angustifolia* and References Compound on Elastase

Compounds	Inhibition (IC <sub>50</sub> , µg/mL)
<i>L. angustifolia</i> extract (EtOAc fraction)	> 200
Fermented <i>L. angustifolia</i> extract (EtOAc fraction)	50.34 ± 0.99
Oleanolic acid	13.70 ± 1.03



**Figure 6.** TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *L. angustifolia* and references. Eluent system: hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v). ①: Rosmarinic acid, ②: ethyl acetate fraction, ③: luteolin, ④: fermented extract, ⑤: caffeic acid.

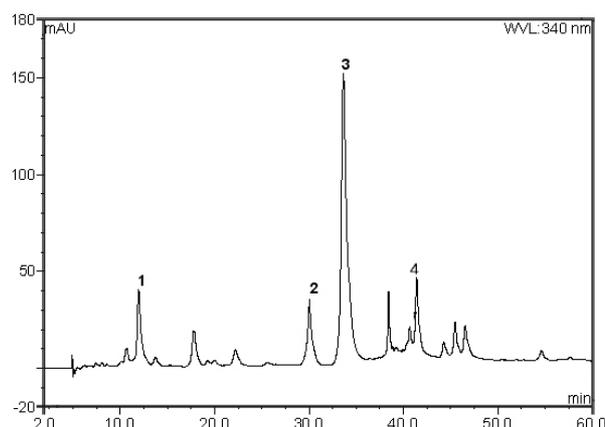
### 3.3. Tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성에 있어서 핵심효소는 tyrosinase이다. 이 효소는 tyrosine으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정 중, tyrosine에서 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA), DOPA에서 DOPAquinone, 그리고 dihydroxyindole (DHI)로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매하는데 관여한다.

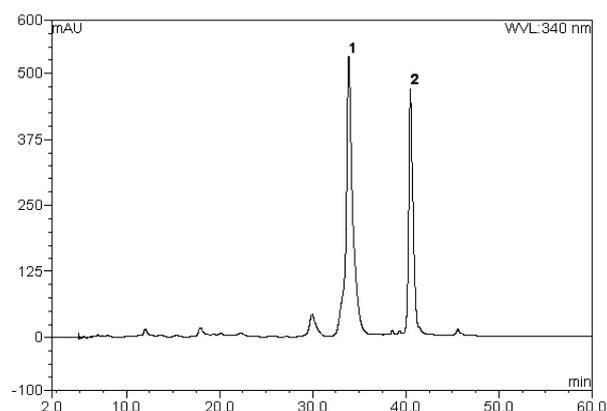
라벤더 추출물 중 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획의 경우에 tyrosinase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 각각 144.80 µg/mL, 122.40 µg/mL으로 비교 물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin의 저해 활성 226.88 µg/mL에 비해서도 큰 tyrosinase 저해 활성을 보였다. 따라서 ethyl acetate 분획 및 발효추출물을 화장품에 응용할 경우 미백효과가 클 것으로 사료된다(Figure 5).

### 3.4. Elastase 저해 활성

자외선 및 활성산소 등에 의해 유발되어 피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases (MMPs)는 피부



**Figure 7.** HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *L. angustifolia* at λ = 340 nm, 1: caffeic acid, 2: apigenin-7-*O*-glucoside, 3: rosmarinic acid, 4: apigenin-7-*O*-glucoside, luteolin-7-*O*-glucoside.



**Figure 8.** HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from fermented *L. angustifolia* at λ = 340 nm, 1: rosmarinic acid, 2: unknown compound

노화, 특히 주름생성과 밀접한 관계가 있다. MMPs를 이루는 주요성분으로는 collagenase, gelatinase 및 elastase 등이 있으며, 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 elastase의 활성 감소는 매우 중요하다.

라벤더 추출물은 ethyl acetate 분획이 200 µg/mL 이상에서 elastase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 나타났으며, 발효추출물의 경우 50.34 µg/mL을 나타내었다(Table 2).

### 3.5. 라벤더 추출물의 TLC 및 HPLC 성분 분석

#### 3.5.1. 라벤더 추출물의 TLC 성분 분석

라벤더 추출물의 TLC 크로마토그램은 Figure 6에 나

타내었다. Figure 6은 50 % 에탄올로 추출한 라벤더 추출물로부터 얻은 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획의 TLC 크로마토그램이며, ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획은 모두 3개의 띠로 분리되었다. 공통적으로 확인된 3개의 띠들은 자외선 및 발색법, 황산발색으로 확인한 결과,  $R_f$  값이 0.66인 LA 1은 caffeic acid로 나타났고,  $R_f$  값이 0.46인 LA 2는 luteolin으로, 0.17인 LA 3은 rosmarinic acid로 나타났으며, 이 중에서도 LA 3의 농도가 가장 진한 것으로 나타났다. 라벤더 추출물의 ethyl acetate 분획은 추가적으로 1개의 띠가 더 생성되었는데, 이를 LA 4로 나타내었고 자외선 및 발색법, UV-Vis 흡수 스펙트럼 등에 따라 apigenin-7-*O*-glucoside, luteolin-7-*O*-glucoside로 나타났다(data not shown).

### 3.5.2. 라벤더 추출물의 HPLC 성분분석 비교

라벤더 추출물 중 ethyl acetate 분획의 HPLC 크로마토그램은 Figure 7과 같다. 크로마토그램은 3개의 peak로 나타났다. 각각의 peak를 동정하기 위하여, Figure 6에 있는 TLC 크로마토그램에서 분리된 띠를 끊어서 추출·여과하고 용매를 감압·건조시킨 후 얻은 파우더를 에탄올 용액으로 하여 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다. 그 결과 라벤더 추출물 중 ethyl acetate 분획에 대한 Figure 6의 TLC (normal phase) 크로마토그램에서  $R_f$  값이 가장 큰 띠인 LA 1 ( $R_f$  0.66)은 Figure 7의 HPLC (reverse phase) peak 1으로, LA 2는 peak 4로, LA 3은 peak 3과 일치함을 확인하였다. 또한 Figure 6과 함께 표준물질을 사용하여 peak 1 (8.11 %)은 caffeic acid, peak 2 (10.61 %)는 apigenin-7-*O*-glucoside, peak 3 (50.84 %)는 rosmarinic acid를 확인하였다.

라벤더 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 (59.09 %)은 rosmarinic acid로 확인되었고 peak 2 (33.41 %)는 323 nm 부근에서 최대 흡수파장을 갖는 페놀성 화합물로 간주되며 현재 구조 확인 중에 있다.

HPLC를 이용하여 라벤더 추출물 중 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획에 함유되어 있는 caffeic acid와 luteolin, rosmarinic acid의 비율을 확인하였다. 그 결과 라벤더를 발효시킨 ethyl acetate 분획에 rosmarinic acid가 주성분임을 확인할 수 있었다(Figure 8).

## 4. 결 론

1) 라벤더 추출물의 free radical 소거능력(FSC<sub>50</sub>)은 ethylacetate 분획 21.90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ethylacetate 분획에서 당 제거시킨 aglycone 추출물 18.47  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 발효추출물의 ethyl acetate 분획은 5.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다.

2) 라벤더 추출물의 활성산소 소거활성(OSC<sub>50</sub>)은 ethyl acetate 분획 2.46  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 발효추출물의 ethyl acetate 분획은 1.45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 큰 활성을 나타냈다.

3) <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 적혈구의 광용혈 현상에 있어서, 라벤더 추출물과 발효추출물은 농도 범위(1 ~ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에서 농도-의존적으로 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 용혈을 억제하였다.

4) 라벤더 추출물 중 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획은 tyrosinase 저해활성(IC<sub>50</sub>)이 각각 144.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 122.40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 또한 elastase 저해활성(IC<sub>50</sub>)은 발효추출물의 경우 50.34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 우수한 저해활성을 나타냈다.

5) 라벤더 추출물 중 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획의 TLC는 3개의 띠(LA 1, LA 2, LA 3)로 분리되었고, 그 중에서  $R_f$  0.17인 LA3의 농도가 가장 진한 것으로 나타났다.

6) HPLC를 통한 라벤더 추출물 중 ethyl acetate 분획과 발효추출물의 ethyl acetate 분획 중 함유되어 있는 caffeic acid, luteolin, rosmarinic acid의 비율 확인 결과, 두 추출물의 ethyl acetate 분획에서 모두 rosmarinic acid가 주성분으로 확인되었다.

7) 라벤더 추출물 중 ethyl acetate 분획의 HPLC 크로마토그램은 검출 파장 340 nm에서 3개의 peak를 나타내었고, peak 1 (8.11 %)은 caffeic acid, peak 2 (10.61 %)는 apigenin-7-*O*-glucoside, peak 3 (50.84 %)는 rosmarinic acid임을 확인하였다.

8) 발효추출물의 ethyl acetate 분획은 HPLC 크로마토그램의 검출 파장 340 nm에서 2개의 peak를 나타내었고, peak 1 (59.09 %)은 rosmarinic acid임을 확인하였다.

라벤더 추출물과 그 발효추출물의 ethyl acetate 분획의 항산화능에 있어서, 발효추출물이 보다 큰 항산화 활성을 나타냈고, 미백 및 주름과 관련된 tyrosinase와 elastase 효소 활성을 저해함으로써 라벤더 발효추출물의 화장품 응용 가능성이 더 큼을 시사한다.

## 참 고 문 헌

1. S. A. Rahimuddin, S. M. Khoja, M. M. Zuhair, N. K. Howell, and J. E. Brown, Inhibition of lipid peroxidation in UVA-treated skin fibroblasts by luteolin and its glucosides, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **109**, 647 (2007).
2. S. N. Park, Skin aging and antioxidants, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **29**(1), 75 (2003).
3. J. C. Fantone and P. A. Ward, Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction, *Ann. J. Path.*, **107**, 397 (1982).
4. K. J. A. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radical, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
5. C. S. Foote, Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems, ed. W. A. Pryor, **2**, 85, Academic press, New York (1976).
6. S. N. Park, Ph. D. Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1989).
7. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**, 75 (1997).
8. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
9. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
10. 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).
11. R. M. Tyrrell and M. Pidoux, Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblast by UVA and near visible radiations, *Photochem. Photobiol.*, **49**, 407 (1989).
12. 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).
13. K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts, *FEBS Lett.*, **331**, 304 (1993).
14. M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A in induced synthesis of interstitial collagenase, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).
15. Y. Kohno, Y. Egawa, S. Itoh, S. Nagaoka, M. Takahashi, and K. Mukai, Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in *n*-butanol, *Biochimica Biophysica Acta.*, **1256**(1), 52 (1995).
16. S. E. Mudiyansele, M. Hamburger, P. Elsner, and J. J. Thiele, Ultraviolet A induces generation of squalene monohydroperoxide isomers in human sebum and skin surface lipids *in vitro* and *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **120**(6), 915 (2003).
17. 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).
18. A. Oikarinen and M. Kallioinen, A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin, *Photodermatology*, **6**, 24 (1989).
19. 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).
20. J. W. Choi, S. I. Kim, J. Y. Kim, H. J. Yang, and K. H. Lee, Effects of Jeju native plant extracts against reactive oxygen species (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
21. 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).
22. 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).
23. 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).
24. 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).
25. J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Le, S. M. Jeon, Y. J. Ahn, B. R. Won, and S. N. Park, Antioxidative and antiaging effect of Jeju native plant extracts (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**(3), 181 (2006).
26. S. Abuhamdah and P. L. Chazot, Lemon balm and lavender herbal essential oils: old and new ways to treat emotional disorders?, *Current Anaesthesia & Critical Care*, **19**, 221 (2008).
27. H. M. A. Cavanagh and J. M. Wilkinson, Biologicla activities of lavender essential oil, *Phytother. Res.* **16**, 301 (2002).
28. C. K. Hsu, C. T. Chang, H. Y. Lu, and Y. C. Chung, Inhibitory effects of the water extracts of *Lavandula* sp. on mushroom tyrosinase activity, *Food Chemistry*, **105**, 1099 (2007).
29. S. J. Park, H. M. Kim, K. S. Han, G. S. Seong, M. R. Shin, Y. J. Mun, and W. H. Woo, Inhibitory effects of the ethanol extract of *Lavandula vera* on sebum synthesis, *J. Traditional Korean Medicine*, **15**(1), 77 (2006).
30. X. Wu, J. Liu, Z. B. Yu, Y. H. Ye, and Y. W. Zhou, Studies on flavones in of *Lavandula angustifolia*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **32**(9), 821 (2007).
31. T. M. Upson, R. J. Grayer, J. R. Greenham, C. A. Williams, F. Al-Ghamdi, and F. H. Chen, Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*, *Biochemical Systematics and Ecology*, **28**, 991 (2000).
32. C. J. Chu and K. J. Kemper, Lavender (*Lavandula* spp.), Longwood Herbal Task Force, 1 (2001).