

라벤더(*Lavandula angustifolia*) 추출물 및 분획물의 세포보호효과와 활성 성분 분석

김아영 · 하지훈 · 김아랑 · 정효진 · 김경미 · 박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소
(2017년 5월 25일 접수, 2017년 6월 13일 심사, 2017년 7월 5일 채택)

Cellular Protective Effect and Active Component Analysis of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Extracts and Fractions

A Young Kim, Ji Hoon Ha, A Rang Kim, Hyo Jin Jeong, Kyoung Mi Kim, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology,
232 Gongneungro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

(Received May 25, 2017; Revised June 13, 2017; Accepted July 5, 2017)

초 록

본 연구에서는 라벤더 70% 에탄올 추출물 및 분획물의 항산화 활성과 세포보호효과를 조사하였다. 자유라디칼(1,1-phenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거 활성(FSC₅₀)은 라벤더 추출물, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획에서 각각 46.6, 45.5 및 477.5 µg/mL를 나타냈다. Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서의 총항산화능(OSC₅₀)은 라벤더 추출물, 에틸아세테이트 및 아글리콘분획에서 각각 8.1, 3.3 및 17.6 µg/mL이었으며, L-ascorbic acid의 OSC₅₀ (1.5 µg/mL)보다 낮은 활성을 나타냈다. ¹O₂으로 유도된 적혈구 광용혈 실험에서 아글리콘 분획은 매우 큰 세포보호활성을 나타냈다. 50 µM 농도에서 라벤더 추출물, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획의 세포보호효과(τ₅₀)가 70.6, 87.2 및 165.2 min으로 나타났다. 특히, 라벤더 아글리콘 분획은(+)-α-tocopherol 보다 3.8배 높은 세포보호효과를 나타냈다. TLC 및 LC-MS를 이용하여 라벤더 분획의 성분(luteolin 7-O-glucuronide, vitexin, rosmarinic acid, luteolin, apigenin)을 확인하였으며, 아글리콘 분획은 에틸아세테이트 분획에 비해 주요 플라보노이드(luteolin, apigenin)는 크게 증가하지 않았다. 결론적으로 라벤더가 화장품의 항산화 소재로써 응용 가능성을 시사한다.

Abstract

In this study, antioxidative activities and cellular protective effects of 70% ethanol extracts and fractions from lavender were evaluated. The scavenging activity (FSC₅₀) of free radical (1,1-phenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) was 46.6, 45.5 and 477.5 µg/mL in the 70% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction, respectively. The reactive oxygen species scavenging activities (OSC₅₀) of 70% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction were 8.1, 3.3 and 17.6 µg/mL, respectively, and they showed lower antioxidative activity than that of using L-ascorbic acid (1.5 µg/mL). However, the aglycone fraction showed higher photohemolysis protective effect than that of using the 70% ethanol extract and ethyl acetate fraction. At 50 µM concentration, the cellular protective effect (τ₅₀) of 70% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction from lavender was 70.6, 87.2 and 165.2 min, respectively. In particular, the lavender aglycone fraction showed 3.8 times higher cellular protective effect than that of (+)-α-tocopherol. The lavender fractional components including luteolin 7-O-glucuronide, vitexin, rosmarinic acid, luteolin, and apigenin were identified using TLC and LC-MS. However, the lavender aglycone fraction did not show any significant increase in flavonoids (luteolin and apigenin) compared to that of the ethyl acetate fraction. In conclusion, it is suggested that lavender may be applied as an antioxidant material in cosmetic industries.

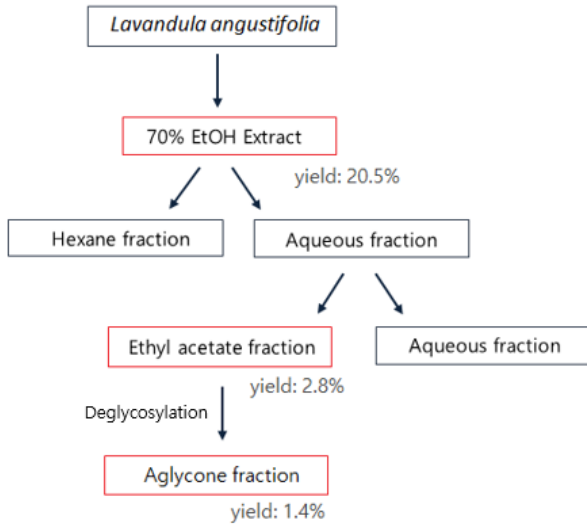
Keywords: *Lavandula angustifolia*, antioxidant activity, component, natural material

1. 서 론

노화는 정상적인 대사과정에 의한 내인성 노화와 스트레스, 흡연,

공해 및 자외선 등에 의한 외인성 노화로 나눌 수 있다. 특히 자외선에 기인된 광노화는 라디칼 또는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)에 의한 피부에서의 광화학 및 광생물학적 반응의 결과로 나타난다[1-3]. ROS의 종류는 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼(O₂⁻)과 히드록실 라디칼(·OH)과 같은 산소 중심의 라디칼종과 과산화수소(H₂O₂)나 싱글렛 옥시젠(¹O₂)과 같은 비라디칼종들, 그리고 ROS와 생체 성분과의 반응으로부터 생성된 과산화 라디칼(ROO·), 알콕실 라디칼(RO·) 및 하이드로과산화물(ROOH) 등이 있다. 이들 ROS는 생체

[†] Corresponding Author: Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneungro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea
Tel: +82-2-970-6451 e-mail: snpark@seoultech.ac.kr



Scheme 1. Preparation of 70% ethanol extract, ethyl acetate and aglycone fractions from *L. angustifolia* flower.

대사과정 중에 세포 및 조직에서 생성될 수도 있다. 피부가 자외선에 지속적으로 노출되면 과잉의 ROS가 생성되어 피부는 산화적 스트레스에 놓이게 된다. 이들 ROS는 지질 과산화반응을 일으키고 단백질 및 DNA 등의 생체 고분자의 산화적 손상을 일으킨다. 뿐만 아니라 피부에서 세포의 기질 단백질 분해효소인 matrix metalloproteinase (MMP)의 발현을 증가시켜 결합조직인 콜라겐과 엘라스틴 섬유의 비정상적인 교차결합이나 사슬절단을 일으켜서 주름 등을 생성시키는 피부노화를 촉진시킬 수 있다. 뿐만 아니라 이러한 피부의 산화적 스트레스는 멜라닌 생성을 촉진시키고 기미나 주근깨를 수반한 피부 광노화도 함께 진행된다[4-10].

피부에는 이러한 과잉의 활성산소들로부터 보호하기 위한 항산화 방어망이 구축되어있다. 그 종류에는 수퍼옥사이드 디스뮤테이스 (superoxide dismutase, SOD), 카탈레이즈(catalase) 및 글루타치온 퍼옥시다이스(glutathione peroxidase/reductase)와 같은 효소적 항산화제 그리고 비타민 E (α -tocopherol), 비타민 C (L-ascorbic acid), 유비퀴놀(ubiquinol), 카로티노이드(carotenoid) 및 플라보노이드(flavonoid)와 같은 비효소적 항산화 성분들이 존재하여 과잉으로 생성된 유해한 활성산소를 소거하는 역할을 한다[11,12]. 하지만 자외선 등에 의한 노출로 과잉의 활성산소가 지속적으로 생성되는 경우 항산화 방어망은 쉽게 붕괴될 수 있다. 이로 인해 피부의 세포 및 조직 그리고 구성성분들은 산화적 손상에 기인되어 피부 노화가 가속화될 수 있다. 따라서 자외선 및 활성산소로부터 피부 노화를 지연시키고 억제하기 위한 전략은 명확하다. 피부에 안전하면서 항산화 효능이 큰 항산화제를 탐색 발굴하고, 이를 화장품에 응용하여 피부 항산화 방어망 구축에 도움을 줌으로써 피부노화를 억제할 수 있는 소재 개발 및 응용 연구들이 최근 관심의 대상이 되고 있다[13,14].

라벤더(*Lavandula angustifolia*)는 원산지가 지중해인 쌍떡잎식물 꿀풀과의 한 종류로, 일반적으로 서양 라벤더로 알려져 있다. 주요 성분으로는 linalool, ladanin, apigenin, apigenin-7-O- β -glucoside, luteolin-7-O- β -glucoside 및 5,4'-dihydroxy flavonoid-7-O- β -pyranoglycuronate buthyl ester 등이 함유된 것으로 보고되고 있다[15-18]. 그 외 라벤더 오일은 전통적으로 위장, 류마티스 질병 등에서 항균활성 및 진정에 유효한 민간요법으로 사용되어 왔다[19,20]. 라벤더 추출물에 관한 연

구에서 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼을 대상으로 하는 라디칼 소거활성 등 일부 항산화 활성 평가가 보고되고 있으나 각종 ROS에 대한 총항산화능이나 ROS로 유도된 세포손상에서 보호 효과에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 라벤더 꽃잎의 70% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획 및 그 아글리콘 분획을 제조하였고, 다양한 항산화 활성평가 방법들(free radical 소거활성과 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 다양한 ROS에 대한 총항산화능 및 1O_2 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성)을 이용하여 항산화 활성을 평가하고 활성 성분에 대한 분석을 진행하였다.

2. 실험

2.1. 기기 및 시약

자유 라디칼 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical과 화학발광 실험에 사용한 luminol 및 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), H_2O_2 그리고 비교물질로 사용된 (+)- α -Tocopherol과 L-ascorbic acid는 Sigma-Aldrich (Korea)에서 구입하였다. 또한 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan)에서 구입하였으며 에탄올, 에틸아세테이트 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. UV-VIS spectrophotometer는 Varian (Australia), 화학발광 실험에 사용된 6-channel LB9505 LT는 Berthold (Germany)사의 제품을 사용하였다.

2.2. 라벤더의 추출 및 분획

라벤더의 건조된 꽃잎을 이용한 70% 에탄올 추출물을 (주)지에프씨로부터 제공받았으며 이것의 일부를 이용하여 분획물을 제조하였다. 먼저 hexan을 이용하여 지질과 엽록소 등의 비극성 성분을 제거하였다. 이후 에틸아세테이트를 3회 반복 처리하여 얻은 분획을 감압·농축하여 유기용매를 완전히 제거해 에틸아세이트 분획(수율 2.8%)을 얻었다. 플라보노이드 배당체의 당을 제거하기 위한 아글리콘 분획을 제조하기 위해, H_2SO_4 와 아세톤을 혼합한 용액에 에틸아세테이트 분획의 일정량을 첨가한 후 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨 후, 환류시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정 후 증류수로 세척하여 산, 염기 및 당 등을 모두 제거하였다. 그리고 다시 에틸아세테이트로 분획하여 얻어낸 분획물을 감압·농축하여 아글리콘 분획(수율 1.4%)을 제조하였다(Scheme 1).

2.3. 라벤더 추출물 및 분획물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH 시험법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성

자유 라디칼은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 라벤더 추출물의 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH 시험법을 이용하여 측정하였다. 0.2 mM의 DPPH 시약, 에탄올 그리고 특정 농도의 추출물 또는 분획물을 1 : 1 : 1의 비율로 혼합하여 10 min 동안 방치 후, UV/Vis 분광광도계를 이용하여 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 라벤더 추출물 및 분획물의 자유라디칼 소거 활성 정도는 DPPH 시약을 넣지 않은 것을 blank, 시료를 넣지 않은 것을 대조군(control)으로 하여 계산하였다.

$$\text{Radical Scavenging}(\%) = \left\{ 1 - \frac{(A_{\text{experiment}} - A_{\text{sample blank}})}{A_{\text{control}}} \right\} \times 100$$

$A_{\text{experiment}}$ 는 실험군의 흡광도(absorbance), A_{blank} 는 blank의 흡광도, A_{control} 는 control의 흡광도를 의미한다. 농도에 따라 각각 세 번씩 측정하였으며, 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging concentration, FSC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)를 구하여 비교하였다.

2.3.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계는 $\text{O}_2^{\cdot -}$, $\cdot\text{OH}$ 그리고 H_2O_2 와 같은 활성산소종을 생성시키며 철이나 구리 같은 전이금속은 특히 반응성이 큰 $\cdot\text{OH}$ 를 생성시키는데 중요한 역할을 한다. 이 실험에서는 활성산소에 의해 루미놀이 발광하는 현상을 이용하여 활성산소 저해 활성을 측정하였다. 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 특정 농도의 라벤더 추출물 또는 분획물을 50 μL 첨가한 후, 2.5 mM EDTA 40 μL , 5 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 μL , 35 mM 루미놀 80 μL 를 넣고 혼합시킨 뒤 5 min 동안 항온시켰다. 그 후 Fenton 반응을 통한 활성산소종 생성을 위해 150 mM H_2O_2 40 μL 를 첨가하였으며, 25 min 동안 화학발광 정도를 측정하였다. 대조군(control)은 추출물 대신 증류수를 첨가하였고, 공시험(blank)은 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 와 H_2O_2 대신 증류수를 첨가하였다. 화학발광으로 측정된 값은 다음 식을 통해 저해율을 계산하였으며, 활성산소 소거 활성의 크기는 저해율이 50%가 되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)로 표기하였다.

$$ROS\ scavenging(\%) = \left\{ \frac{(CPM_{\text{control}} - CPM_{\text{experiment}})}{(CPM_{\text{control}} - CPM_{\text{blank}})} \right\} \times 100$$

2.4. $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 산화적 세포 손상에 대한 보호 활성

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

실험에 사용된 토끼 적혈구는 삼육축산농원(경기도 화성군)에서 구입한 생후 6개월 된 건강한 토끼로부터 얻어 채혈 후 heparin이 첨가된 시험관에 넣어 4 $^{\circ}\text{C}$ 의 냉장고에 보관하고 12 h 이내에 실험에 이용하였다. 이를 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리 하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 혈장을 제거한 뒤 남은 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.6 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.6 mM)로 3회 반복하여 세척하였다. 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D. 값이 0.6이 되도록 제조하였으며, 이때 적혈구 수는 약 1.5×10^7 cells로 계산된다.

2.4.2. 라벤더 추출물 및 분획의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 추출물과 분획물 용액을 농도별로 각각 50 μL 씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation시킨 후, 광증감제인 rose bengal (13 μM) 0.5 mL를 가하고 파라필름으로 입구를 봉한 후 13 min 30 s 동안 광조사 하였다. 광조사는 50 cm \times 20 cm \times 25 cm 크기의 내부를 검게 칠한 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 일렬로 배열한 후 조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 시간 간격으로 700 nm에서의 투광도(transmittance, %)를 통해 평가하였다. 적혈구 현탁액 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 라벤더 추출물 및 분

Table 1. Radical Scavenging Activities of *L. angustifolia* Extract/Fractions

Extract and Fraction	FSC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
70% EtOH	46.6 \pm 1.7
EtOAc	45.5 \pm 1.8
Aglycone	477.5 \pm 0.5
(+)- α -Tocopherol	9.0 \pm 0.4

Data is indicated as the concentration required for 50% scavenging of free radical. (70% EtOH : 70% ethanol extract, EtOAc : ethyl acetate fraction, aglycone : aglycone fraction.)

획물이 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다. 대조군은 τ_{50} 이 30.1 min으로 오차 범위 \pm 0.1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. 광 증감제로 사용된 rose bengal을 첨가하고 광조사를 하지 않은 경우와 rose bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우, 모두 암반응 120 min까지 거의 용혈이 일어나지 않았다. 모든 실험은 상온에서 진행하였으며 3회 반복하여 평균하였다.

$$Protective\ effect(\%) = \frac{Sample\ \tau_{50}}{Control\ \tau_{50}} \times 100$$

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH 시험법을 이용한 자유라디칼 소거 활성

자유라디칼은 홀수 전자를 가지고 있어 에너지가 높으며 불안정하다. 또한 반응성이 높아 생체 구성성분들을 산화시킬 수 있으며, 특히 세포막에서는 지질과산화 연쇄반응을 일으킨다. 이러한 세포 손상은 피부노화가 가속화 시킬 수 있다. 자유라디칼은 항산화 물질로부터 전자를 받아 환원됨으로써 소멸될 수 있다. 따라서 라디칼을 환원시키는 항산화제의 능력은 상대적으로 안정한 라디칼 구조를 갖는 DPPH를 이용하였으며, 라디칼 소거활성은 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 시료의 농도(FSC_{50} , $\mu\text{g/mL}$)로 나타내었다(Table 1).

라벤더 추출물 및 분획물의 자유라디칼 소거활성 결과는 지용성 항산화제로 알려진 (+)- α -Tocopherol과 비교하였다. 라벤더 꽃 70% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 자유라디칼 소거활성은 각각 46.6, 45.5 및 477.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, (+)- α -Tocopherol은 9.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 라벤더 꽃 추출물 및 분획들보다 5배 이상 높은 자유라디칼 소거활성을 나타냈다. 라벤더 꽃 70% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획의 라디칼 소거활성 활성은 유사하였으며, 이들은 아글리콘 분획보다 10배 높은 자유라디칼 소거활성을 나타내었다. 라디칼 소거활성만으로 항산화 활성이 높다고 정의 내릴 순 없다. 따라서 더욱 폭넓게 항산화 활성 평가하기 위해, 라디칼을 포함하여 다양한 활성산소를 생성 시스템을 추가적으로 이용하였다.

3.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

자외선에 의해 생성된 활성산소 중 하나인 과산화수소(H_2O_2)는 생체 내에 존재하는 철(Fe)과 구리(Cu)와 같은 전이금속 이온의 촉매작용에 의한 Fenton 반응을 통해 하이드록실 라디칼($\cdot\text{OH}$), 슈퍼옥사이드 라디칼($\text{O}_2^{\cdot -}$) 등 다양한 활성산소를 생성시킬 수 있다. 루미놀은 활성산소에 의해 산화되어 높은 에너지의 들뜬 상태의 아미노프탈산이

Table 2. ROS Scavenging Activities of *L. angustifolia* Extract/Fractions (Total Antioxidant Capacity)

Extract and Fraction	OSC ₅₀ (μg/mL)
70% EtOH extract	8.1 ± 0.2
EtOAc fraction	3.3 ± 0.1
Aglycone fraction	17.6 ± 1.8
L-Ascorbic acid	1.5 ± 0.9

Data is indicated as the concentration required for 70% scavenging of ROS.
(70% EtOH: 70% ethanol extract, EtOAc: ethyl acetate fraction, aglycone: aglycone fraction.)

Table 3. Relative Cellular Protective Effects of *L. angustifolia* Extracts and (+)- α -Tocopherol on Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Rabbit Erythrocytes

Concentration (μg/mL)	τ_{50} (half time of hemolysis ¹⁾)			
	5	10	25	50
70% EtOH extract	50.0 ± 0.2	63.4 ± 0.9	66.7 ± 1.7	70.6 ± 1.1
EtOAc fraction	70.3 ± 1.5	73.9 ± 0.1	76.8 ± 0.3	87.2 ± 3.0
Aglycone fraction	88.6 ± 1.8	116.7 ± 3.7	150.5 ± 1.6	165.2 ± 1.1
(+)- α -Tocopherol	36.1 ± 0.4	37.7 ± 0.3	40.2 ± 0.5	43.6 ± 0.9

¹⁾ Control, τ_{50} = 30.1 ± 0.1 min

된 후 바닥상태로 떨어지게 되면서 발광(420-450 nm)한다. 본 연구에서는 라벤더 추출물 및 분획의 농도에 따른 발광정도를 측정함으로써 활성산소를 얼마나 소거하는지 확인하였으며, 총항산화능은 활성산소를 50% 소거하는 시료의 농도(OSC₅₀)로 비교하였다(Table 2).

라벤더 추출물 및 분획들의 자유라디칼 소거활성 결과는 수용성 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid와 비교하였다. 라벤더 꽃 70% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 총항산화능(OSC₅₀) 각각 8.1, 3.3 및 17.6 μg/mL로 나타났으며, L-ascorbic acid는 1.5 μg/mL로 매우 높은 항산화 활성을 나타냈다. 라벤더 꽃 에틸아세테이트 분획은 70% 에탄올 추출물 및 아글리콘 분획 보다 각각 2.5 및 5.5배 높은 총항산화능을 나타냈다. 이러한 결과는 라디칼 소거활성 평가와 다르게 나타났으며, 에틸아세테이트 분획이 70% 에탄올 추출물보다 라디칼뿐 아니라 다른 활성산소들에 대한 소거활성 및 Fenton 반응을 유도하는 전이금속에 대한 킬레이팅 효과가 높은 활성물질들을 다량 함유한 것으로 사료된다. 그러나 활성산소는 세포에 직접적으로 손상을 주기 때문에 세포가 아닌 화학 물질로만 형성된 *in vitro* 활성산소 발생 시스템은 항산화 활성 평가하는데 있어서 한계가 있다. 따라서 우리는 활성산소가 직접적으로 세포 손상을 유발하는 계를 통해 라벤더 꽃 추출물 및 분획들의 항산화 활성을 평가하고자 하였다.

3.3. ¹O₂으로 유도된 세포 손상에 대한 보호 활성

생체 내에 존재하는 광증감제는 특정파장을 흡수하여 주로 ¹O₂를 생성하며, 지질 과산화, 단백질 산화 등 세포 손상을 야기한다. 우리는 광증감제인 rosebengal 및 적혈구 세포를 이용한 ¹O₂으로 유도된 산화적 세포 손상(광용혈) 시스템을 구축하였다. 활성산소로 인해 적혈구 세포가 50% 감소하는데 걸리는 시간(τ_{50})으로 세포보호효과를 비교하였다(Table 3). 저자들은 활성산소로 유도된 광용혈 시스템에서, 라벤더 꽃 추출물 및 분획들은 각각 5, 10, 25 및 50 μg/mL의 농도로 처리하고 그 보호효과를 확인했다. 라벤더 꽃 70% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 농도-의존적인 세포보호효과

를 나타냈으며, 50 μg/mL에서 70.6, 87.2 및 165.2 min으로 나타내었다. 이들은 대조군으로 사용된 α -Tocopherol (43.6 min)보다 약 2배 이상 높은 세포보호효과를 나타냈다. 흥미로운 점은 *in vitro* 항산화 활성에서 70% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획보다 낮은 활성을 나타낸 아글리콘 분획이 세포보호효과에서는 가장 높게 나타났다는 점이다(Table 1, 2). 특히, 아글리콘 분획이 α -Tocopherol보다 자유라디칼 소거활성이 약 53배 낮은 활성을 보였음에도 불구하고, 세포보호효과에서 3.8배 높게 나타났다. 이러한 결과는 아글리콘 분획의 항산화 활성 성분들이 세포와 친화적인 성질(지용성)을 가지고 있다고 사료된다. 지질과산화가 일어나는 세포막은 인지질이다. 따라서 소수성 지질층에 배당체로부터 친수성인 당이 제거된 아글리콘 분획은 70% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획보다 소수성 상호작용에 의한 세포 이입이 용이하여 세포막에 존재하는 아글리콘 분획물이 활성산소에 의한 세포막에서의 자동산화 반응을 효율적으로 차단함으로써 세포가 손상되고 파괴되는 것을 억제했을 것으로 판단된다.

3.4. 라벤더 추출물 및 분획들의 성분분석

라벤더 추출물 및 분획물에 포함된 성분들을 분석하기 위해, 순상 TLC 및 LC-MS를 이용하였다. 분리된 에틸아세테이트 및 아글리콘 성분들 중 눈에 띄는 변화를 보이는 5개의 띠(A1-5)를 긁어 수확하고, 100% 에탄올로 추출하고 농축하였다(Figure 1). 농축된 5개의 분획들에 포함된 성분들은 LC-MS를 이용하여 λ max (nm)와 [M-H]⁻(m/z), [M+H]⁺(m/z)을 측정했으며, 라벤더 관련 참고논문들과 비교하고 최종적으로 각 스탠다드 성분들과 TLC, LC 위치 및 UV흡광스펙트럼을 비교하여 확인하였다(Table 4, Figure 2). 각각의 띠는 A1 (luteolin-7-O-glucuronide), A2 (vitexin), A3 (rosmarinic acid), A4 (luteolin), A5 (apigenin)로 확인되었다. 에틸아세테이트 분획이 아글리콘화 되면서 rosmarinic acid 및 luteolin-7-O-glucuronide가 감소하였고(Figure 1a), luteolin이 소폭 증가하였다(Figure 1b). Vitexin은 apigenine과 glucose가 결합된 배당체이지만, 탄소-탄소 결합으로 연결되어 있어 가수분해가 되지 않아 apigenin이 증가하지 않았다. 결론적으로

Table 4. LC-MS of Ethyl Acetate Fraction from *L. angustifolia* and References

Identification	Molar mass (g/mol)	Measurement				Ref.
		λ max (nm)	Negative ions (m/z)		Positive ions (m/z)	
			[M-H] ⁻	[M+H] ⁺		
A1 Luteolin 7-O-glucuronide	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	462	266, 349	-	463.9	①
A2 Vitexin	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	432	267, 338	431.3	433.1	②
A3 Rosmarinic acid	C ₁₈ H ₁₅ O ₈	360	291, 332	359.1	-	③
A4 Luteolin	C ₁₅ H ₉ O ₆	286	255, 348	285.3	287.3	③
A5 Apigenin	C ₁₅ H ₉ O ₅	270	269, 334	269.3	271.3	③

① Flavone and flavonol glycosides from the leaves of *Triumfetta procumbens* in Ryukyu Islands, *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B*, 38(2), 63 (2012).

② Identification of flavone aglycones and glycosides in soybean pods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromat. A*, 991, 61 (2003).

③ Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (19), 10576 (2010).

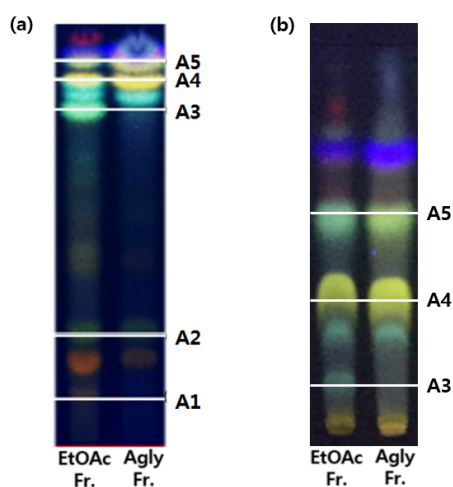


Figure 1. TLC chromatogram of ethyl acetate, aglycone fraction from *L. angustifolia*. Eluent system : (a) Ethyl acetate : chloroform : formic acid : DW = 10 : 1 : 0.5 : 0.4 (v/v), (b) Hex : EA : AA = 21 : 14 : 5 (v/v).

라벤더의 주요 플라보노이드인 luteolin 및 apigenin은 아글리코화 과정에서 큰 변화를 보이지 않았으며, 기타 성분들의 전환이 항산화 및 세포보호효과에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다.

4. 결 론

본 연구에서는 라벤더의 ROS에 의한 피부 노화를 방지하는데 효과가 있는 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 검토하기 위해 몇 가지 추출물을 제조하고 이에 대한 항산화 활성을 측정하고 성분 분석을 진행하였다.

1) DPPH 시험법을 이용한 자유 라디칼 소거활성(FSC₅₀)은 70% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물, 아글리콘 분획물이 각각 46.6, 45.5 및 477.5 $\mu\text{g/mL}$ 를 나타냈다. 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획의 자유라디칼 소거활성은 유의한 수준을 나타내었으며 아글리콘 분획은 그에 비해 낮은 소거활성을 나타내었다. 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획은 비교 물질로 사용된 지용성 항산화제인 (+)- α -Tocopherol (9.0 $\mu\text{g/mL}$)보다 낮은 라디칼 소거활성을 보였다.

2) Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서의 활성산소 소거 활성(총 항산화능,

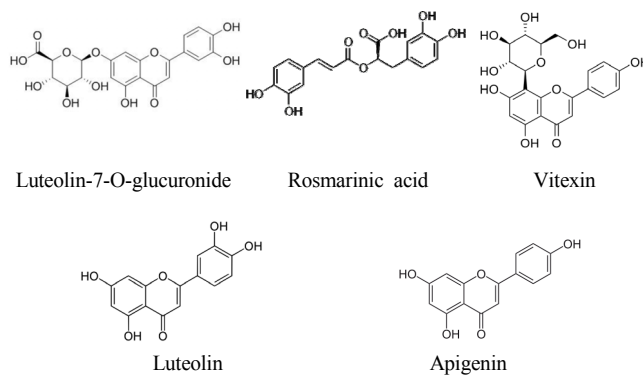


Figure 2. Main ingredients of ethyl acetate fraction obtained from *L. angustifolia*.

OSC₅₀)은 70% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 아글리콘 분획물이 각각 8.1, 3.3 및 17.6 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며 에틸아세테이트 분획이 가장 큰 항산화능을 나타냈다. 라벤더 추출물 및 에틸아세테이트 분획은 아글리콘보다 높은 활성산소 소거활성을 나타내었으며 강력한 수용성 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid과 유의한 활성산소 소거활성을 보였다.

3) ¹O₂로 유도된 적혈구 세포 파괴에 대한 세포보호효과(적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간, τ_{50})를 확인한 결과, 70% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획은 모든 농도에서 비교군으로 사용한 지용성 항산화제인 (+)- α -Tocopherol 보다 높은 세포보호 효과를 나타내었다. 특히 아글리콘 분획은 25 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 150.5 min, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 165.2 min으로 매우 높은 세포보호효과를 나타내었으며 (+)- α -Tocopherol 보다 약 3.8배 높은 세포보호효과를 나타내었다.

4) 라벤더 에틸아세테이트 및 아글리콘 분획의 성분들을 TLC 및 LC-MS를 통해 분석하고, 라벤더 관련 문헌을 참고하였으며 스탠다드 물질을 이용하여 성분들을 최종적으로 확인하였다(luteolin 7-O-glucuronide, vitexin, rosmarinic acid, luteolin 및 apigenin). 라벤더 에틸아세테이트 분획의 아글리코화 과정에서 주요 플라보노이드인 luteolin 및 apigenin의 함량이 두드러지게 증가하지 않았다.

결과적으로, 라벤더 에틸아세테이트 분획의 아글리코화를 통한 세포보호효과의 증진은 주요 플라보노이드의 증가가 아닌 다른 성분들의 전환이 크게 기여한 것으로 사료된다. 추후 연구를 통해 이러한 효과에 대한 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : HN15C0104).

References

1. V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. I. Collin, and A. Lomri, Reactive oxygen species and superoxide dismutases : Role in joint diseases, *Joint Bone Spine*, **74**(4), 324-329 (2007).
2. M. Yaar and B. A. Gilchrist, Photoageing: mechanism, prevention and therapy, *Br. J. Dermatol.*, **157**(5), 874-887 (2007).
3. S. N. Park, *Effects of Flavonoids and Other Phenolic Compounds on Reactive Oxygen Mediated Biochemical Reactions*, PhD Dissertation, Seoul National University, Seoul, Korea (1989).
4. D. S. Lee, M. S. Lim, S. S. Kwan, S. Y. Kim, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of *Chamaecyparis obtusa* leaf extract, *Appl. Chem. Eng.*, **23**, 93-99 (2012).
5. M. J. Davies, Reactive oxygen species, metalloproteinases, and plaque stability, *Am. Heart J.*, **23**, 2382-2383 (1998).
6. D. Bagchi, M. Bagchi, E. A. Hassoun, and S. J. Stohs, *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides, *Toxicology*, **104**(1-3), 129-140 (1995).
7. S. B. Berman and T. G. Hastings, Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species, *J. Neurochem.*, **69**(3), 1185-1195 (1997).
8. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**, 657-665 (2003).
9. J. Yamakoshi, F. Otsuka, A. Sano, S. Tokutake, M. Saito, M. Kikuchi, and Y. Kubota, Lightening effect on ultravioletinduced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds, *Pigment Cell Res.*, **16**, 629-638 (2003).
10. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**, 510-518 (2003).
11. S. A. Kyrtopoulos, N-nitroso compound formation in human gastric juice, *Cancer Surv.*, **8**(2), 423-442 (1988).
12. R. S. Sohal and W. C. Orrb, The redox stress hypothesis of aging, *Free Radic. Biol. Med.*, **52**(3), 539-555 (2012).
13. R. Kahl and H. Kappus, Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **196**, 329-338 (1993).
14. L. C. Magdalena and Y. A. Tak, Reactive oxygen species, cellular redox system, and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.*, **48**(6), 749-762 (2010).
15. I. Spiridon, S. Colceru, N. Anghel, C. A. Teaca, R. Bodirlau, and A. Armatu, Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania, *Nat. Prod. Res.*, **25**(17), 1657-1661 (2011).
16. Y. J. Ahn, B. R. Won, M. K. Kang, J. H. Kim, and S. N. Park, Antioxidant Activity and Component Analysis of Fermented *Lavandula angustifolia* Extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **35**(2), 125-134 (2009).
17. S. C. Duda, L. Al. Marghitas, D. Dezmireana, M. Dudab, R. Margaoana, and O. Bobis, Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria*: Effect of harvest time and plant species, *Ind. Crops Prod.*, **77**, 499-507 (2015).
18. M. G. Evandri, L. Battinelli, C. Daniele, S. Mastrangelo, P. Bolle, and G. Mazzanti, The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay, *Food Chem. Toxicol.*, **43**(9), 1381-1387 (2005).
19. V. Hajhashemi, A. Ghannadi, and B. Sharif, Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill., *J. Ethnopharmacol.*, **89**(1), 67-71 (2003).
20. R. Baptista, A. Madureira, R. Jorge, R. Ado, A. Duarte, N. Duarte, M. M. Lopes, and G. Teixeira, Antioxidant and antimycotic activities of two native *Lavandula* Species from Portugal, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2015**, 1-10 (2015).