

레몬밤 추출물과 분획물의 항산화, 항염 및 티로시나제 저해활성 연구

정용운·이 환·박하늬·김경민*·김수영*·박영진[†]

건국대학교 의료생명대학 바이오융합과학부

*주식회사 아미코스메틱 제주연구소

(2018년 12월 3일 접수, 2018년 12월 20일 수정, 2018년 12월 26일 채택)

Studies on Antioxidant, Anti-inflammation and Tyrosinase Inhibitory Activities of *Melissa officinalis* Extracts and Their Fractions

Yong Un Jeong, Hwan Lee, Haney Park, Kyungmin Kim*, Suyeong Kim*, and Young Jin Park[†]

Department of Integrated Biosciences, College of Biomedical and Health Science, Konkuk University, 268 Chungwon-daero, Chungju-si 27478, Korea

*Jeju R&D Center, AMI Cosmetics Co., Ltd., Jeju-si 63409, Korea

(Received December 3, 2018; Revised December 20, 2018; Accepted December 26; 2018)

요약: 본 연구는 레몬밤 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성, 항염활성 및 미백 활성을 평가하기 위해 수행하였다. 레몬밤의 용매별 추출물의 총 폴리페놀 함량은 33.02–302.76 mg GAE/g, 총 플라보노이드 함량은 9.98–325.07 mg CE/g으로 확인되었다. 레몬밤 추출물 및 용매 분획물의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼소거활성을 평가한 결과 전반적으로 레몬밤 용매별 추출물 및 물 분획물들이 대조구인 ascorbic acid (30 μ M)와 유사한 DPPH 라디칼소거능이 확인되었다. 또한 레몬밤 추출물 및 용매 분획물 중 클로로폼 분획물이 상대적으로 가장 우수한 RAW 264.7 세포의 NO생성 억제효과가 확인되었다. Tyrosinase 억제 활성은 100% 에탄올 환류 추출물의 200 μ g/mL 농도가 통계적으로 유의한 수준에서 arbutin 처리구 보다 우수한 억제 활성을 나타내었다. 이러한 결과들은 레몬밤이 항산화, 항염 및 미백활성을 가지는 효과적인 화장품 소재로 활용 가능하다는 것을 시사한다.

Abstract: This study was carried out to evaluate the antioxidant, anti-inflammation, and tyrosinase inhibitory activity of *Melissa officinalis* extracts and their fractions. The total polyphenol contents of the extracts were 33.02–302.76 mg GAE/g and total flavonoid contents were 9.98–325.07 mg CE/g. In 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, DPPH radical scavenging activity was observed in the extracts and water fractions of *M. officinalis* and similar to that of ascorbic acid (30 μ M). In addition, the treatment of chloroform fraction significantly inhibited the production of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cells, indicating that they have anti-inflammatory activity. Tyrosinase inhibitory activity of 200 μ g/mL of 100% ethanol reflux extract showed better inhibitory activity than arbutin treatment at statistically significant level. As a result, it is considered that *M. officinalis* can be used as an effective cosmetic ingredient having antioxidant, anti-inflammation, and whitening activity.

Keywords: antioxidant, anti-inflammation, tyrosinase, *M. officinalis*, whitening activity

[†] 주 저자 (e-mail: yjpark@kku.ac.kr)
call: 043)840-3601

1. 서 론

다양한 식물의 활성 성분은 인체에 효과적인 생리활성을 가지고 있어 기능성 소재로 오래전부터 주목을 받고 있으며, 이에 따라 천연소재로부터 유용성분을 발굴하고자 하는 연구가 활발히 수행되고 있다. 최근 생활수준 향상에 따른 삶의 질에 대한 욕구 및 의료기술 발달로 인간의 평균 기대 수명이 지속적으로 증가하고 있다. 이로 인해 단순한 수명연장이 아닌 삶의 질이 보장되는 건강한 노후에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다. 이러한 사회적 요구에 따라 기존의 합성소재 보다 부작용이 적은 천연 유래 소재에 대한 관심이 높아지고 있다. 따라서 천연소재로부터 분리된 다양한 활성성분에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 질병의 예방과 치료를 목적으로 하는 다양한 의약품 및 삶의 질을 높이기 위한 기능성 화장품 등의 개발이 활발히 진행되고 있다[1,2].

다양한 요인에 의한 인체 내에 불안정하고 반응성이 높은 자유라디칼과 같은 산화촉진물질의 과생성은 산화적 스트레스를 유발하고 이로 인한 돌연변이 및 세포 독성 등은 결국 세포 손상으로 이어지게 된다[3]. 현재까지 산화적 스트레스에 의해 유발되는 다양한 질병과 관련된 연구 및 산화적 스트레스를 저감하기 위한 다양한 소재의 발굴도 광범위하게 이루어졌다[4]. 또한 산화적 스트레스는 인체 노화뿐 아니라 피부세포 및 조직의 손상을 유발하여 피부 노화를 촉진한다는 연구결과가 다수 보고되어 산화적 스트레스를 저감하여 피부의 노화를 방지하고자 하는 연구도 주목 받고 있다[5,6].

염증은 감염 혹은 조직의 상처에 의해 발생되며 이로 인해 통증, 부종, 발작, 발열 등의 다양한 질환을 유발한다. 조직의 손상 혹은 감염으로 면역세포의 일종인 호중구(neutrophil)는 활성 산소 종(reactive oxygen species, ROS) 또는 활성 질소 종(reactive nitrogen species, RNS)을 분비하며, 또한 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생성되는 nitric oxide (NO)는 대표적인 염증 유발 매개체로 알려졌다[7]. 최근 자외선에 의한 melanin 생성과다로 인한 피부 색소 침착 및 피부 노화가 활성 산소 종(ROS)과 NO를 포함한 활성 질소 종(RNS)의 생성으로도 촉진된다고 보고되었다[8,9].

멜라닌은 인간의 피부, 모발 및 눈동자 등의 색을 결

정하는 색소성분으로 피오멜라닌(pheomelanin)과 유멜라닌(eumelanin)으로 구분되며, 인체 표피층의 멜라닌 세포(melanocyte)에서 생성되어 자외선으로부터 피부 세포를 보호하는 역할을 한다[10,11]. 멜라닌세포의 melanosome에서 합성되는 멜라닌은 tyrosinase가 tyrosine을 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)로, 또는 L-DOPA를 L-DOPA quinone으로 전환하는 산화 및 중합 반응에 의해 합성이 유도된다[12,13]. 이러한 멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할을 하지만 과도한 멜라닌의 생성은 기미, 주근깨, 검버섯과 같은 피부의 색소 침착을 일으키고 과도하게 생성된 피오멜라닌은 피부암을 유발할 가능성이 있다고 보고되었다[14]. 따라서 건강한 피부와 미용적인 측면에서 피부 미백에 관한 관심이 증대되고 있는 실정이며, tyrosinase 및 멜라닌 생합성 억제 활성을 가지는 새로운 소재를 발굴하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다 [15-18].

레몬밤(Labiata, *Melissa officinalis*)은 레몬 향과 맛을 지닌 향긋하고 다소 매운 맛을 지닌 식물이며, geraniol (citral a), neral (citral b), citronellal, linalool, geraniol 및 β -caryophyllene oxide 등의 에센셜 오일과 rosmarinic acid, 페놀산, 테르펜 및 caffeic acid 등의 플라보노이드가 많은 것으로 보고되었다[19]. 최근의 연구 결과에 따르면 레몬밤은 항불안, 항우울, 인지 기능 향상, 알츠하이머 완화 및 면역 증진 효과도 보고되었다 [19-23].

본 연구에서는 레몬밤 용매별 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 분석과 DPPH radical 소거능 분석을 통한 항산화 효과 및 tyrosinase 억제활성에 의한 미백 효과를 확인하고자 하였다. 또한 nitric oxide 생성 억제를 통한 항염효과를 확인하여 향후 아토피 완화 등의 피부개선을 위한 소재로서의 활용가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 레몬밤 추출물 및 분획물 제조

본 연구에 사용된 레몬밤(*M. officinalis*)은 괴산 유기농산물협동조합에서 구입하여 사용하였다. 추출 용매는 100% 에탄올, 50% 에탄올, 50% 메탄올 및 물을 사용하였으며, 분쇄된 20 g의 레몬밤을 용매 400 mL와

혼합하고 80 °C에서 2 h 동안 2회 환류 및 상온에서 3일간 정치하여 각각 추출하였다. 추가적으로 물을 이용하여 121 °C에서 20 min 동안 추출하였다. 각 용매별 추출물을 여과지(Whatman No.2, GE Health care, UK)를 이용하여 여과 후 감압농축하여 각 용매별 추출 농축물 확보하였다. 또한 100% 에탄올, 50% 에탄올, 50% 메탄올 및 물을 이용한 환류 추출 농축물과 100% 에탄올, 50% 에탄올 및 50% 메탄올 이용한 정치 추출 농축물을 각각 100 mL의 증류수로 현탁시키고 핵산, 클로로포름 및 물 분획물을 추가적으로 확보하였다.

2.2. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 평가

각 용매별 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 함량은 Dewanto et al.[24]에 의해 기술된 Folin-Ciocalteu (FC) 방법을 이용하여 분석하였다. 각 용매별 추출물 및 분획물 40 μ L (1 mg/mL)를 20% 탄산나트륨(Na_2CO_3 , Sigma, USA) 수용액 60 μ L와 FC 시약(Sigma, USA) 20 μ L와 혼합하여 10 min간 반응하였다. 반응 후 microplate reader (TECAN, Switzerland)로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 건조 추출물 무게(g)에 대한 Gallic acid equivalents (GAE)의 무게(mg)로 표현하였다. 총 플라보노이드 함량은 Dewanto et al.[24]에 의해 기술된 방법을 변형하여 분석하였으며, 각 용매별 추출물 및 분획물 25 μ L (1 mg/mL)를 5% NaNO_2 용액 8 μ L와 125 μ L의 멸균증류수를 혼합하여 5 min간 반응하였다. 반응 후 10% AlCl_3 15 μ L (Sigma, USA)를 첨가하고, 6 min간 추가 반응 하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 건조 추출물 무게(g)에 대한 catechin equivalents (CE)의 무게(mg)로 표현하였다.

2.3. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 평가

각 용매별 추출물 및 분획물의 항산화 활성은 DPPH 라디칼소거활성을 평가하였다. 100 μ L의 DPPH 용액 (0.2 mM in methanol, Santa cruz Biotechnology, USA)과 메탄올에 희석된 각 용매별 추출물 및 분획물 100 μ L (100 μ g/mL)를 혼합 후, 실온에서 10 min간 반응시킨 뒤 microplate reader (TECAN, Switzerland)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군을 기준으로 free radical 소거 정도를 백분율로 나타내고, 양성 대조군으로 ascorbic acid (Sigma, USA)

를 사용하여 비교 분석하였다.

2.4. RAW 264.7 세포 생존율 및 NO 생성 억제능 평가

항염증 활성 분석에 사용되는 대표적인 cell model system의 하나인 RAW 264.7 murine macrophage는 American type culture collection (ATCC, USA)로부터 분양받아 사용하였다. 분양받은 세포는 DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)배지에 10% FBS 및 1% 항생제(페니실린 및 스트렙토마이신, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)를 첨가하고 37 °C (5% CO_2)에서 배양하여 사용하였다. 세포 생존율 분석은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, USA) assay를 시행하였다. 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM으로 24-well plate에 3×10^3 cells/well로 37 °C, 5% CO_2 조건하에서 24 h 동안 부착시킨 후 시료를 농도별로 처리하여 72 h 배양하였다. 배양 후 배지에 MTT를 첨가하고 암조건에서 3 h 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA) 100 μ L를 첨가하여 570 nm 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다. 레몬밤 용매별 추출물 및 분획물의 RAW 264.7에 대한 NO 생성 억제 평가는 RAW 264.7를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 24-well plate에 3×10^3 cells/well로 분주하고 37 °C (5% CO_2)에서 24 h 배양하여 부착시킨 후 배양 후 배지를 제거하고 다양한 농도의 시료를 처리하여 37 °C 에서 30 min 반응하였다. 반응 후 1 μ g/mL의 Lipopolysaccharides (LPS) (Sigma, USA)를 처리하고 37 °C 에서 24 h 추가 배양하여 NO 생성을 유도하였다. NO 생성량은 microplate reader (TECAN, Switzerland)로 530 nm에서 흡광도를 측정하여 nitrite 표준 검량 곡선과 비교하여 평가하였다.

2.5. IL-6 및 TNF- α 생성 억제능 평가

RAW 264.7의 IL-6 및 TNF- α 사이토카인 농도 분석은 ELISA kit (BD Pharmingen, USA)를 이용하여 제공된 실험방법에 따라 진행하였다. RAW 264.7 세포를 24-well plate에 3×10^3 cells/well로 전배양 후 시료와 LPS (1 μ g/mL)를 동시 처리하여 24 h 배양하였다. 배양 후 회수한 배양 배지의 사이토카인 함량을 microplate reader (TECAN, Switzerland)로 흡광도(405 nm)를 측정하고 표준 검량 곡선과 비교하여 평가하였다.

Table 1. Total Polyphenol and Flavonoid Contents of *M. officinalis* Extracts and Their Fractions

Extraction methods	Solvents	Fractions	Total polyphenol concentrations (mgGAE/gExt.)*	Total flavonoid concentrations (mgCE/gExt.)**
Reflux extraction	100% EtOH	Total	135.24 ± 3.65	107.35 ± 2.65
		Hexane	33.02 ± 0.39	36.65 ± 16.72
		Chloroform	59.17 ± 1.50	78.23 ± 6.17
		Water-soluble	80.20 ± 0.65	75.95 ± 8.85
	50% EtOH	Total	186.35 ± 4.95	221.21 ± 24.98
		Hexane	85.67 ± 0.44	112.61 ± 5.06
		Chloroform	123.36 ± 1.28	191.74 ± 8.17
		Water-soluble	130.45 ± 2.07	185.07 ± 1.10
	50% MeOH	Total	200.71 ± 19.93	190.33 ± 12.01
		Hexane	69.17 ± 0.74	97.00 ± 3.16
		Chloroform	56.95 ± 0.51	54.54 ± 0.80
		Water-soluble	155.84 ± 0.65	162.44 ± 0.80
	DW	Total	147.12 ± 5.53	158.93 ± 2.70
		Hexane	33.02 ± 0.65	27.00 ± 1.39
		Chloroform	80.20 ± 1.04	85.60 ± 1.69
		Water-soluble	121.82 ± 2.10	171.91 ± 8.91
Static extraction	100% EtOH	Total	229.17 ± 2.44	62.61 ± 2.60
		Hexane	232.16 ± 4.81	33.84 ± 1.39
		Chloroform	241.82 ± 2.45	9.98 ± 1.10
		Water-soluble	302.76 ± 8.98	119.63 ± 3.68
	50% EtOH	Total	135.32 ± 3.60	154.02 ± 3.17
		Hexane	57.89 ± 0.97	52.44 ± 3.08
		Chloroform	44.04 ± 0.97	41.04 ± 0.30
		Water-soluble	111.99 ± 1.32	131.56 ± 2.37
	50% MeOH	Total	217.29 ± 0.74	284.19 ± 4.86
		Hexane	82.50 ± 2.18	127.88 ± 4.22
		Chloroform	213.10 ± 5.55	325.07 ± 2.60
		Water-soluble	118.66 ± 0.82	167.88 ± 2.90

*Expressed as milligram gallic acid equivalents (GAE) per gram extract.

**Expressed as milligram catechin equivalents (CE) per gram extract.

2.6. *In Vitro* Tyrosinase 활성 저해능 평가

Tyrosinase 활성 측정은 mushroom tyrosinase (Sigma,

USA)와 기질인 L-tyrosine (Sigma, USA)을 사용하였다.

2 mM L-tyrosine 35 μ L과 0.1 M sodium phosphate buf-

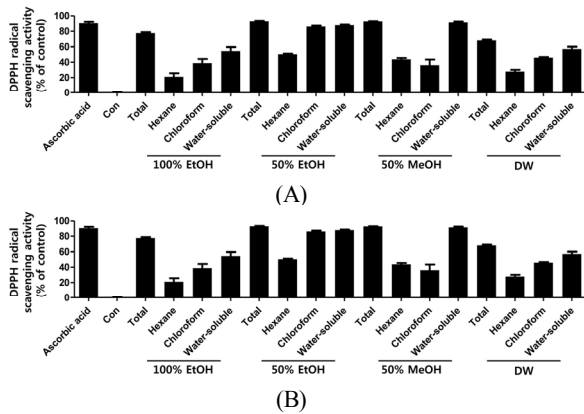


Figure 1. DPPH radical scavenging activities of *M. officinalis* extracts and their fractions. (A) Reflux extraction. (B) Static extraction. Ascorbic acid (30 μ M). Con: non-treated sample.

fer (pH 6.8) 40 μ L를 다양한 농도의 시료와 혼합하고 250 U/mL의 mushroom tyrosinase 5 μ L를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10 min간 반응하였다. Microplate reader (TECAN, Switzerland)로 475 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosinase 저해활성을 평가하였으며, 상대적 tyrosinase 저해활성을 양성대조군(arbutin)과 비교하였으며, 다음의 공식에 의해 나타내었다.

$$\text{Tyrosinase 저해율 (\%)} = \left[1 - \left(\frac{C-D}{A-B} \right) \right] \times 100 \dots (\text{식})$$

- A: 티로시나아제를 처리하여 반응한 시료 무처리군의 흡광도
- B: 티로시나아제를 처리하지 않은 시료 무처리군의 흡광도
- C: 티로시나아제를 처리하여 반응한 시료 처리군의 흡광도
- D: 티로시나아제를 처리하지 않은 시료 처리군의 흡광도

2.7. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하고 평균값 \pm 표준편차로 결과를 나타내었으며, 통계분석은 Prism (GraphPad Software Inc., USA) 프로그램을 사용하였다. 처리구간 간의 유의성 검증은 분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA) 및 Tukey's test에 의한 사후검정을 통해 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 레몬밤 용매별 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

용매에 따른 레몬밤 추출물 및 분획물의 총 폴리페

놀 및 총 플라보노이드 함량을 Table 1에 나타내었다. 우선 FC 시약을 사용하여 분석한 레몬밤의 100% 에탄올, 50% 에탄올, 50% 메탄올 및 물 환류 추출물의 총 폴리페놀 함량은 순서대로 135.24, 186.35, 200.71 및 147.12 mg GAE/g로 분석되었다. 100% 에탄올, 50% 에탄올, 50% 메탄올 정지 추출물의 총 폴리페놀 함량은 순서대로 229.17, 135.32 및 217.29 mg GAE/g로 분석되었다. 추출방법 및 용매를 달리하여 추출한 추출물로부터 분획된 분획물의 총 폴리페놀 함량을 비교한 결과 100% 에탄올 정지 추출물과 헥산, 클로로포름 및 수용부의 총 폴리페놀 함량이 각 229.17, 232.16, 241.82 및 302.76 mg GAE/g로 다른 용매 추출물보다 가장 많은 것이 확인되었다. 또한 총 플라보노이드 분석에서 100% 에탄올, 50% 에탄올, 50% 메탄올 및 물 환류 추출물의 총 플라보노이드 함량은 순서대로 107.35, 221.21, 190.33 및 158.93 mg CE/g로 분석되었다. 100% 에탄올, 50% 에탄올, 50% 메탄올 정지 추출물의 총 플라보노이드 함량은 순서대로 62.61, 154.02 및 284.19 mg CE/g로 분석되었다. 추출방법 및 용매를 달리하여 추출한 추출물로부터 분획된 분획물의 총 플라보노이드 함량을 비교한 결과 50% 메탄올 정지 추출물과 클로로포름 분획물의 총 플라보노이드 함량이 각 274.19 및 325.07 mg CE/g로 다른 용매 추출물보다 가장 많은 것이 확인되었다. 다양한 용매를 사용한 레몬밤의 정지 및 환류 추출물과 이들의 분획물에는 Stankovic et al. [25]에 의해 보고된 녹차에서의 총 폴리페놀 함량 (16.02-233.68 mg GAE/g)과 유사하거나 더 많은 함량이 확인되었고, Tsai et al.[26]에 의해 보고된 녹차 열수 추출물의 총 플라보노이드 함량(44.9 mg CE/g)보다 약 7배 많은 함량이 레몬밤의 50% 메탄올 정지 추출물의 클로로포름 분획물에서 확인되었다.

3.2. 레몬밤 용매별 추출물 및 분획물의 DPPH Radical 소거활성

레몬밤의 용매별 추출물 및 분획물의 항산화 활성을 DPPH 라디칼소거능을 통하여 분석하였다(Figure 1). 레몬밤의 100% 에탄올, 50% 에탄올, 50% 메탄올, 물 환류 추출물 및 정지 추출물과 이들의 헥산, 클로로포름, 물 분획물을 분석한 결과, 우선 용매별 환류 추출물 및 이들의 분획물 중 100% 에탄올 정지 추출물을 제외하고 각 용매의 추출물이 분획물보다 우수한 DPPH 라디

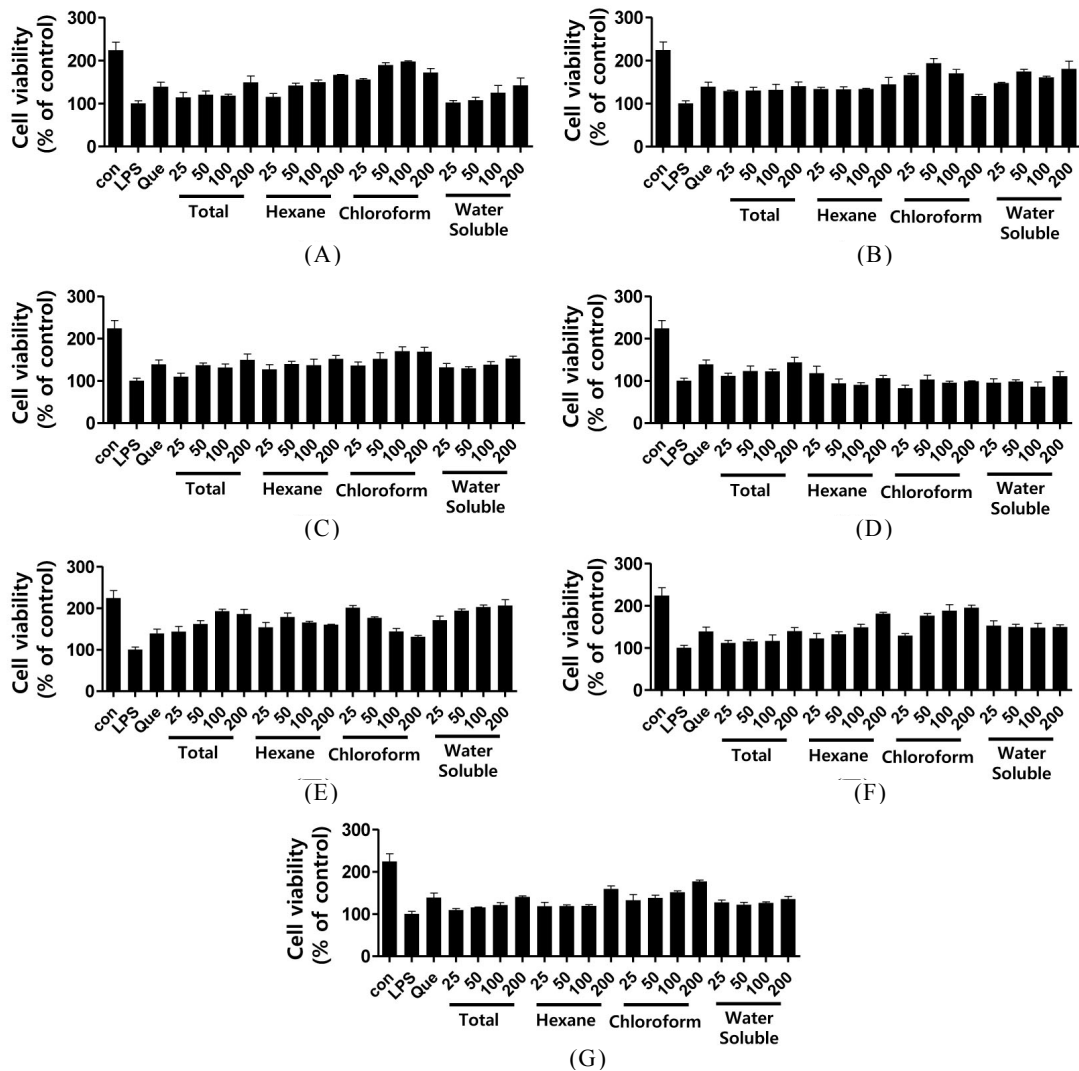


Figure 2. Effects of *M. officinalis* extracts and their fractions on RAW 264.7 cell viability. LPS induced RAW 264.7 cells were treated with various concentration of samples (25, 50, 100 and 200 µg/mL). (A) 100% EtOH reflux extraction. (B) 50% EtOH reflux extraction. (C) 50% MeOH reflux extraction. (D) Distilled water reflux extraction. (E) 100% EtOH static extraction. (F) 50% EtOH static extraction. (G) 50% MeOH static extraction. con: non-treated control, LPS: lipopolysaccharide treated control, Que: quercetin (5 µM) treated control.

칼소거능이 확인되었다. 50% 에탄올 환류 추출의 경우 hexan 분획물을 제외하고 모두 우수한 DPPH 라디칼소거능이 확인되었다(Figure 1A). 일반적으로 항산화능은 항산화제의 DPPH에 대한 라디칼소거능 또는 수소공여능을 확인하여 평가하는데, 천연 소재 중 식물이 함유하고 있는 다양한 플라보노이드 및 폴리페놀 화합물은 효과적인 항산화제로 알려졌다[27,28]. 이들 소재로부터 유래한 다양한 폴리페놀과 플라보노이드는 활성

산소 및 free radical을 효과적으로 제거하여 질병을 예방하거나 개선할 수 있다고 보고되었다[29,30]. 본 연구에서는 일반적으로 항산화능이 우수하다고 알려진 ascorbic acid을 대조구로 사용하여 비교 평가하였다 [31]. 전반적으로 레몬밤 용매별 추출물 및 물 분획물들이 대조구인 ascorbic acid (30 µM)와 유사한 DPPH 라디칼소거능이 확인되어 레몬밤의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 평가에서와 같이 항산화능이 우수한

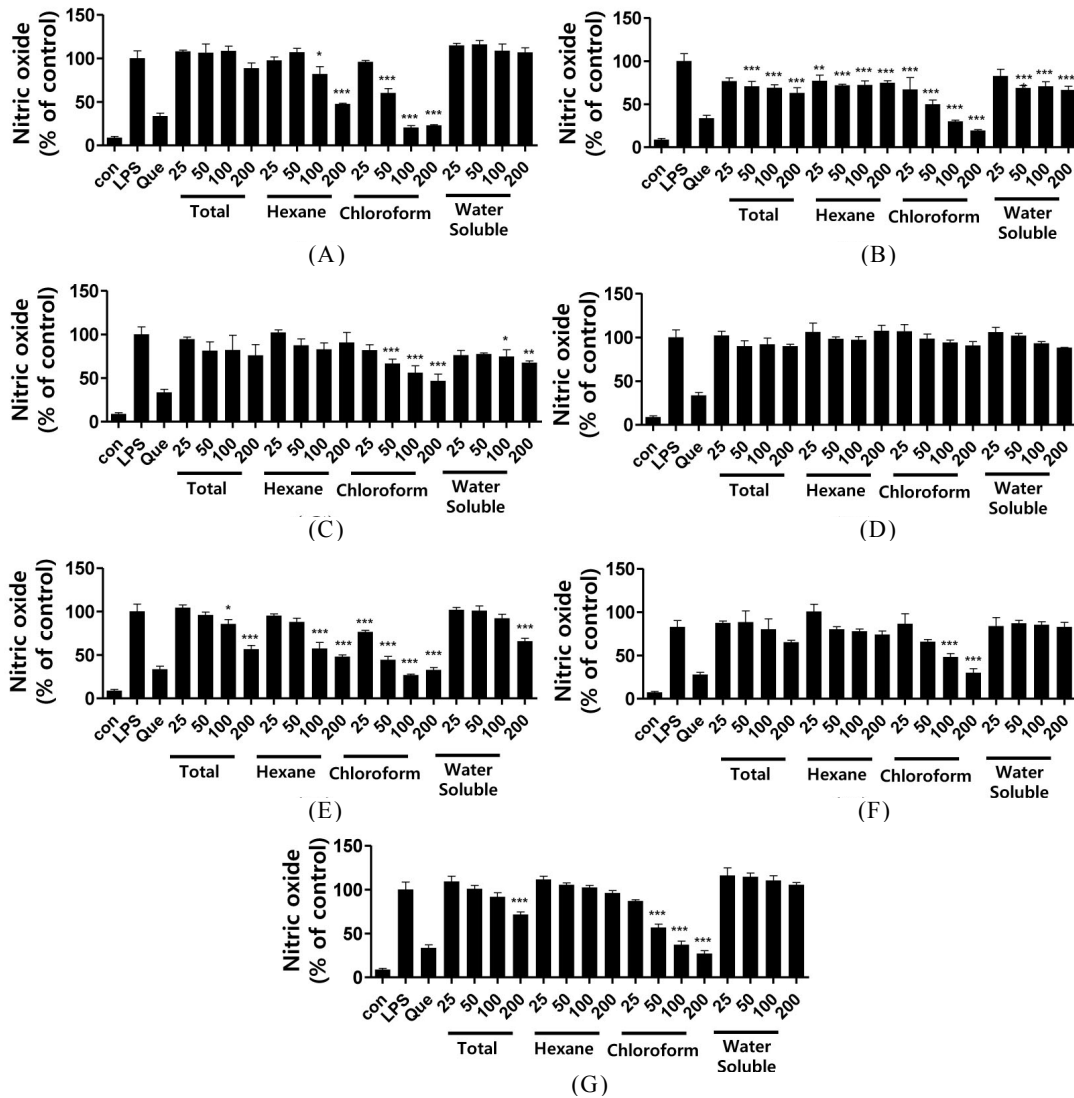


Figure 3. Effects of *M. officinalis* extracts and their fractions on nitric oxide production of RAW 264.7 cells. LPS induced RAW 264.7 cells were treated with various concentration of samples (25, 50, 100 and 200 µg/mL). (A) 100% EtOH reflux extraction. (B) 50% EtOH reflux extraction. (C) 50% MeOH reflux extraction. (D) Distilled water reflux extraction. (E) 100% EtOH static extraction. (F) 50% EtOH static extraction. (G) 50% MeOH static extraction. con: non-treated control, LPS: lipopolysaccharide treated control, Que: quercetin (5 µM) treated control. Statistical significance of differences was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, and * $p < 0.05$ versus LPS treated control sample.

물질이 수용성일 가능성이 크다고 사료된다. 따라서 레몬밤의 높은 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 효과적인 DPPH radical 소거능에 관여할 것으로 사료된다.

3.3. 레몬밤 용매별 추출물 및 분획물의 세포 생존율 및 NO 생성에 미치는 영향

레몬밤의 용매별 추출물 및 분획물의 항염활성 평가

에 앞서 이들이 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 평가했다(Figure 2). 레몬밤의 용매별 정치 및 환류 추출물과 이들의 용매별 분획물을 농도별(25, 50, 100, 200 µg/mL)로 처리하여 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향을 평가한 결과, 모든 처리에서 LPS 단독 처리구보다 높거나 유사한 세포 생존율을 확인하였다. 레몬밤 용매별 정치 및 환류 추출물과 이들의 용매

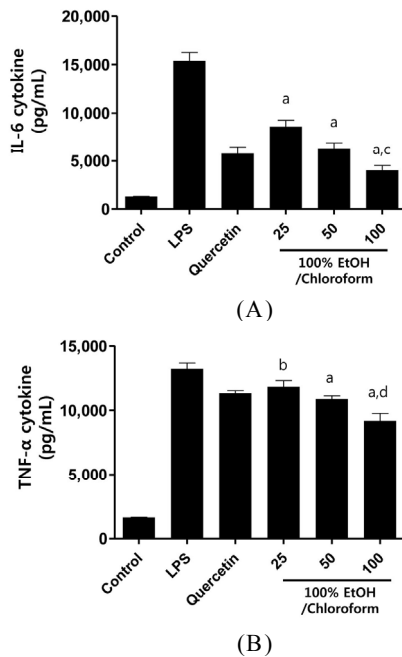


Figure 4. Effect of chloroform fraction of *M. officinalis* 100% EtOH extract on the production of IL-6 (A) and TNF- α (B) cytokine in RAW 264.7 cells. LPS induced RAW 264.7 cells were treated with various concentration of samples (25, 50 and 100 μ g/mL). Control: non-treated control. Quercetin (0.5 mM). Statistical significance of differences was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. a, $p < 0.001$ versus LPS treated control sample. b, $p < 0.01$ versus LPS treated control sample. c, $p < 0.05$ versus quercetin treated control sample. d, $p < 0.001$ versus quercetin treated control sample.

별 분획물 처리는 RAW 264.7 세포의 생존율에 큰 영향을 미치지 않는 것이 확인되어 이들의 NO 생성 억제 활성을 동일한 농도를 처리하여 확인하였다(Figure 3). 레몬밤의 100% 에탄올, 50% 에탄올, 50% 메탄올, 물 환류 추출물 및 정지 추출물과 이들의 헥산, 클로로폼, 물 분획물을 분석한 결과, 물 환류 추출물 및 분획물은 모든 처리농도에서 LPS 단독 처리구보다 유의적인 수준의 NO 소거능이 확인되지 않았으나(Figure 3D), 나머지 용매 추출에서의 특정 분획물은 LPS 단독 처리구보다 유의적인 수준에서 RAW 264.7 세포의 NO 생성을 억제하는 것이 확인되었다. 또한 100% 에탄올 환류/정지, 50% 에탄올 환류/정지, 50% 메탄올 환류/정지 추출물의 클로로폼 분획물은 통계적으로 유의한 수준은 아니나 일반적으로 NO 생성 억제활성이 우수하

다고 알려진 양성대조구인 quercetin[32] 처리구와 유사한 수준에서 RAW 264.7 세포의 NO생성을 억제하는 것이 확인되었다(Figure 3A, 3B, 3C, 3E, 3F, 3G). 결과적으로 레몬밤 클로로폼 분획물이 상대적으로 가장 효과적으로 RAW 264.7 세포의 NO생성을 억제하는 것이 확인되었다.

3.4. 레몬밤 분획물의 IL-6 및 TNF- α 생성 억제 활성

레몬밤 용매별 추출물 및 분획물이 RAW 264.7 세포의 IL-6 및 TNF- α 생성에 미치는 영향 평가는 NO생성 억제능이 가장 우수한 레몬밤 100% 에탄올 정지추출물의 클로로폼 분획물을 사용하여 평가하였다(Figure 4). 염증반응을 촉진하는 매개체 중 IL-6 및 TNF- α 등은 면역세포의 염증반응 조절 및 선천 면역반응과 만성염증반응에 관여하는 중요한 인자로 알려져 있다[33]. 우선 LPS 처리에 의해 RAW 264.7 세포의 IL-6 및 TNF- α 는 LPS를 처리하지 않은 대조군에 비해 증가하였으나, 레몬밤 100% 에탄올 정지추출물의 클로로폼 분획물 모든 처리농도는 LPS 단독 처리구보다 유의적인 수준에서 IL-6 및 TNF- α 생성을 감소시켰다. 또한 레몬밤 100% 에탄올 정지추출물의 클로로폼 분획물 100 μ g/mL 처리는 quercetin 처리 보다 IL-6 및 TNF- α 생성을 유의적으로 감소시켰음을 RAW 264.7 세포에서 확인하였다. 본 연구에서 사용된 레몬밤의 용매별 추출물 및 분획물의 항염증 활성의 정확한 기작은 불분명하지만 Bounihi et al.[34]의 보고에 의하면 레몬밤에는 Nerol, Citral, Caryophyllene 및 Citronella 등의 에센셜 오일이 풍부하다고 보고되었고, 이들 에센셜 오일들은 LPS로 유도된 대식세포의 IL-1 β 및 IL-6를 억제할 수 있는 것으로 밝혀졌기에[35,36], 충분히 가능성을 내포하고 있다고 판단된다. 또 다른 연구에 의해 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포에서 Citral이 TNF- α 를 저해한다는 것을 보고되었다[37]. 본 연구결과에서 확인된 용매별 추출물 및 분획물의 항염증 활성도 이들 성분에 의한 영향일 가능성이 크다고 사료되며, 추가적인 연구를 통하여 실제 이러한 활성을 가지는 활성 성분의 규명 등이 필요하겠다.

3.5. 레몬밤 용매별 추출물 및 분획물의 Tyrosinase 억제 활성

레몬밤의 용매별 추출물 및 분획물의 tyrosinase 억

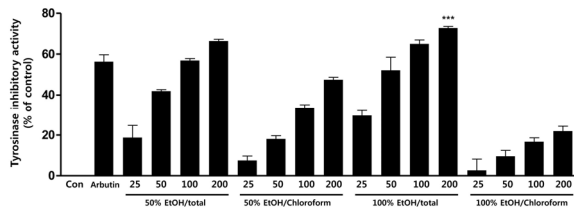


Figure 5. Tyrosinase inhibitory activities of *M. officinalis* extracts and their fractions. Con: non-treated control. Arbutin (0.5 mM). Statistical significance of differences was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. *** $p < 0.001$ versus arbutin treated control sample.

제 활성 평가는 항염활성에서 우수한 효과가 확인된 50%, 100% 에탄올 환류 추출물 및 클로로폼 분획물을 대상으로 수행하였다(Figure 5). 레몬밤의 50% 및 100% 에탄올 환류 추출물의 클로로폼 분획물은 모든 처리 농도에서 양성대조구인 0.5 mM의 arbutin 처리구 보다 상대적으로 낮은 tyrosinase 억제 활성을 나타내었다. 그러나, 레몬밤의 50% 에탄올 환류 추출물은 200 µg/mL의 농도에서 100% 에탄올 환류 추출물은 100 µg/mL 및 200 µg/mL 처리 농도에서 양성대조구인 arbutin 처리구 보다 상대적으로 높은 tyrosinase 억제 활성을 나타내었고, 특히 100% 에탄올 환류 추출물의 200 µg/mL 농도는 통계적으로 유의한 수준에서 arbutin 처리구 보다 우수한 tyrosinase 억제 활성을 나타냈다. Tyrosinase는 멜라닌 세포의 멜라닌 생합성에 중요한 역할을 하는 효소이므로 tyrosinase 활성 억제능을 평가함으로써 다양한 잠재적 미백소재의 발굴이 가능하다 [38]. 현재까지 tyrosinase 활성억제 및 미백활성을 가지는 소재가 많이 보고되었으며, 그중 가장 잘 알려진 알부틴은 안정성이 떨어져 사용이 제한되어 있기 때문에 이러한 단점을 극복할 수 있는 미백 소재 개발 연구가 필요한 상황이다[39]. 본 연구를 통하여 레몬밤의 용매별 추출물 및 분획물에도 tyrosinase의 활성을 효과적으로 억제하는 활성 성분이 존재한다고 판단되며, 향후 추가적인 분석을 통하여 미백 활성이 있는 신규 물질의 발굴이 가능할 것으로 사료된다.

4. 결 론

본 연구에서는 레몬밤(*M. officinalis*)의 용매별 추출

물 및 분획물의 기능성 화장품 소재로서의 이용가능성을 확인하고 향후 추가적인 연구를 통하여 새로운 기능성 화장품 개발을 모색하고자 수행하였다. 현재까지 다양한 연구결과에 의해 많은 식물유래 소재에는 비타민 C, 비타민 E 및 카로티노이드 및 페놀계 산화 방지제 등의 다양한 항산화 성분이 있다고 보고되었다 [40-42]. 레몬밤에도 rosmarinic acid 페놀산, 테르펜 및 caffeic acid 등의 플라보노이드가 많은 것으로 보고되어 [19] 본 연구에서는 레몬밤을 대상으로 다양한 용매 추출물 및 이들의 분획물을 대상으로 항산화, 항염 및 미백 효과를 규명하고자 하였고, 또한 추출 방법을 달리하여 효과가 더욱 우수한 추출 방법을 모색하고자 하였다. 레몬밤의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 정지 추출에서 가장 높게 분석되었으며, 그중 100% 에탄올 및 50% 메탄올 추출물이 가장 많은 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 확인되었다. DPPH 소거능에 따른 항산화능도 전반적으로 양성대조구인 ascorbic acid와 유사한 수준으로 분석되었으며, 항염활성은 클로로폼 분획물에서 가장 우수한 효과가 확인되었다. 마지막으로 50% 및 100% 에탄올 추출물에서 우수한 tyrosinase 저해 활성이 확인되었으며, 그중 200 µg/mL 농도의 100% 에탄올 추출물은 양성 대조구인 arbutin 보다 유의적으로 우수한 저해 활성이 확인되었다. 하였다. 이러한 결과로 레몬밤은 항산화 및 미백활성을 갖는 기능성 화장품 소재로 활용 가능성이 높다고 사료된다. 또한 레몬밤의 효과적인 항염활성과 관련된 유효 성분 및 기작 규명 등의 추가적인 연구를 통하여 향후 아토피 개선을 위한 새로운 소재의 발굴을 모색하고자 한다.

Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 경제협력권산업 육성사업으로 수행된 연구 결과입니다(P0002201).

Reference

1. T. Xie, S. Song, S. Li, L. Ouyang, L. Xia, and J. Huang, Review of natural product databases, *Cell Prolif.*, **48**, 398 (2015).

2. E. C. Milam and A. R. Evan, An approach to cosmetics, *J. Drugs Dermatol.*, **15**, 452 (2016).
3. H. Sies, Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine, *Redox biology*, **4**, 180 (2015).
4. G. Bjørklund and S. Chirumbolo, Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health, *Nutrition*, **33**, 311 (2017).
5. E. D. Lephart, Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms, *Ageing Res. Rev.*, **31**, 36 (2016).
6. K. Kandola, A. Bowman, and M. A. Birch-Machin, Oxidative stress-a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **37**, 1 (2015).
7. R. Medzhitov, Origin and physiological roles of inflammation, *Nature*, **454**, 428 (2008).
8. S. Pillai, C. Oresajo, and J. Hayward, Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation-a review, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **27**, 17 (2005).
9. U. Panich, T. Onkoksoong, K. Kongtaphan, K. Kasetsinsombat, P. Akarasereenont, and A. Wongkajornsilp, Inhibition of UVA-mediated melanogenesis by ascorbic acid through modulation of antioxidant defense and nitric oxide system, *Arch. Pharm. Res.*, **34**, 811 (2011).
10. S. Ito and K. Wakamatsu, Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review, *Pigment cell res.*, **16**, 523 (2003).
11. Y. M. Yoon, S. H. Bae, S. K. An, Y. B. Choe, K. J. Ahn, and I. S. An, Effects of ultraviolet radiation on the skin and skin cell signaling pathways, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **11**, 417 (2013).
12. J. W. Kim, H. I. Kim, J. H. Kim, O. C. Kwon, E. S. Son, C. S. Lee, and Y. J. Park, Effects of ganodermanondiol, a new melanogenesis inhibitor from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1798 (2016).
13. Y. U. Jeong and Y. J. Park, Studies on antioxidant and whitening activities of *Salix gracilistyla* extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **44**, 317 (2018).
14. M. Brenner and V. J. Hearing, The protective role of melanin against UV damage in human skin, *Photochem. Photobiol.*, **84**, 539 (2008).
15. S. Parvez, M. Kang, H. S. Chung, C. Cho, M. C. Hong, M. K. Shin, and H. Bae, Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents, *Phytother. Res.*, **20**, 921 (2006).
16. N. Baurin, E. Arnoult, T. Scior, Q. T. Do, and P. Bernard, Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity, *J. Ethnopharm.*, **82**, 155 (2002).
17. V. J. Hearing and K. Tsukamoto, Enzymatic control of pigmentation in mammals, *FASEB J.*, **5**, 2902 (1991).
18. G. Prota, The chemistry of melanins and melanogenesis, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **64**, 93 (1995).
19. P. N. Ravindran, M. Divakaran, and G. S. Pillai, Other herbs and spices: achiote to Szechuan pepper, ed. K. V. Peter, Handbook of herbs and spices, 583, Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge (2012).
20. D. O. Kennedy, W. Little, C. F. Haskell, and A. B. Scholey, Anxiolytic effects of a combination of *Melissa officinalis* and *Valeriana officinalis* during laboratory induced stress, *Phytother. Res.*, **20**, 96 (2006).
21. M. Emamghoreishi and M. S. Talebianpour, Antidepressant effect of *Melissa officinalis* in the forced swimming test, *DARU J. Pharm. Sci.*, **17**, 42 (2009).
22. C. Ulbricht, T. Brendler, J. Gruenwald, B. Kligler, D. Keifer, T. Abrams, J. Woods, H. Boon, C. Kirkwood, and D. Hackman, Lemon balm (*Melissa officinalis* L.): an evidence-based systematic review by the natural standard research collaboration, *J. Herb. Pharmacother.*, **5**, 71 (2004).
23. D. O. Kennedy, G. Wake, S. Savelev, N. Tildesley, E. K. Perry, K. A. Wesnes, and A. B. Scholey, Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of single doses of

- Melissa officinalis* (Lemon balm) with human CNS nicotinic and muscarinic receptorbinding properties, *Neuropsychopharmacology*, **28**, 1871 (2003).
24. V. Dewanto, X. Wu, K. K. Adom, and R. H. Liu, Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3010 (2002).
 25. M. S. Stankovic, N. Niciforovic, M. Topuzovic, and S. Solujic, Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium montanum* L. var. *montanum*, f. *supinum* (L.) Reichenb, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **25**, 2222 (2011).
 26. P. J. Tsai, T. H. Tsai, C. H. Yu, and S. C. Ho, Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea, *Food Chem.*, **103**, 181 (2007).
 27. C. C. Wei, C. W. Yu, P. L. Yen, H. Y. Lin, S. T. Chang F. L. Hsu, and V. H. Liao, Antioxidant activity, delayed aging, and reduced amyloid- β toxicity of methanol extracts of tea seed pomace from *Camellia tenuifolia*, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 10701 (2014).
 28. Y. S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao, and B. D. Oomah, Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4113 (1998).
 29. N. Nakatani, Recent advances in the study on natural antioxidants, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **37**, 569 (1990).
 30. K. Nozaki, Current aspect and future condition of phytogetic antioxidants, *Fragrance Journal*, **6**, 99 (1986).
 31. O. Arrigoni and M. C. De Tullio, Ascorbic acid: much more than just an antioxidant, *Biochim. Biophys. Acta*, **1569**, 1 (2002).
 32. F. Perez-Vizcaino and J. Duarte, Flavonols and cardiovascular disease, *Mol. Aspects Med.*, **31**, 478 (2010).
 33. K. Ishihara and T. Hirano, IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **13**, 357 (2002).
 34. A. Bounihi, G. Hajjaj, Y. Cherrah, and A. Zellou, Chemical components and neurobehavioral effects of essential oil of *Melissa officinalis* L. from Morocco, *World J. Pharm. Sci.*, **2**, 1206 (2013).
 35. J. M. Sforcin, J. T. Amaral, A. Fernandes Jr, J. P. B. Sousa, and J. K. Bastos, Lemongrass effects on IL-1 β and IL-6 production by macrophages, *Nat. Prod. Res.*, **23**, 1151 (2009).
 36. S. Abe, N. Maruyama, K. Hayama, H. Ishibashi, S. Inoue, H. Oshima, and H. Yamaguchi, Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils, *Mediators Inflamm.*, **12**, 323 (2003).
 37. C. T. Lin, C. J. Chen, T. Y. Lin, J. C. Tung, and S. Y. Wang, Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata, *Bioresour. Technol.*, **99**, 8783 (2008).
 38. A. Slominski, D. J. Tobin, S. Shibahara, and J. Wortsman, Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation, *Physiol. Rev.*, **84**, 1155 (2004).
 39. K. Maeda and M. Fukuda, Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 765 (1995).
 40. Y. H. Cao and R. H. Cao, Angiogenesis inhibited by drinking tea, *Nature*, **398**, 381 (1999).
 41. H. L. Madsen and G. Bertelsen, Spices as antioxidants, *Trends Food Sci. Technol.*, **6**, 271 (1995).
 42. F. Shahidi, P. K. Janitha, and P. D. Wanasundara, Phenolic antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **32**, 67 (1992).