

## Evaluation of the Biological Activity Affected by Extracting Solvents of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)

Ke Li, Kyeong Hee Yang, Lu Guo, Zhengwei Cui, Beung Gu Son, Jum Soon Kang, Yong Jae Lee, Young Hoon Park, Beong Il Je and Young Whan Choi\*

Department of Horticultural Bioscience, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Received August 22, 2018 / Revised December 28, 2018 / Accepted January 7, 2019

Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is widely used as a food material. Although various physiological activities of rosemary have been reported, there have been no studies on the physiological activity of solvent extracts with different polarities. Rosemary extracts were obtained by extraction of dried powder using 0%, 25%, 50%, 70%, and 95% ethanol (EtOH) in distilled water, methanol, ethyl acetate, and hexane. As these ratios of EtOH are generally chosen by default and scarcely optimized, we investigated the impact of the composition of EtOH in distilled water on extract-related characteristics, such as DPPH free radical scavenging and  $\alpha$ -glucosidase inhibition, on the differentiation of 3T3-L1 adipocytes and inhibition of tyrosinase. Adipogenesis inhibition was highest at 70% EtOH. DPPH scavenging activity and inhibition of tyrosinase activity were reduced with 50% EtOH in water. However, inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity was higher in 50% EtOH in water. The best solvents in terms of DPPH scavenging activity, inhibition of tyrosinase and  $\alpha$ -glucosidase, and differentiation of adipocytes obtained with different concentrations of EtOH, although a lower similar activities were found with 50% ethanol. Considering the extraction solvents, a ratio of EtOH in water gives different content and constituents of compounds. These differences will give activities inhibition of adipogenesis, tyrosinase,  $\alpha$ -glucosidase activity, and DPPH scavenging activity.

**Key words** : Anti-obesity, anti-oxidant, extracts, *Rosmarinus officinalis* L., solvent selection

### 서론

인간은 주변의 식물을 채취하여 의약품, 식용, 향신료 및 화장품의 소재로 널리 사용하여 왔고, 이러한 식물들이 약초나 향신료로서 사용되고 있으며 통칭하여 허브로서 다양하게 이용되고 있다[19]. 일반적으로 약용식물은 약리학적 활성을 가지고 있기 때문에 오래 전부터 치료를 위한 목적으로 사용되어 왔으며[5], 약용성분으로 알려진 파이토케미컬은 인간의 신진대사와 생리활성을 촉진하고 개선하는 물질로서 최근 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[6]. 허브류는 주로 잎, 줄기, 뿌리 등을 식품이나 음료의 보존용 향신료, 건강증진, 식욕증진, 육류나 생선의 냄새 제거, 향신료, 식품의 착색 및 화장품 등의 소재로서 사용되고 있다[9, 10, 19].

지중해 지역이 원산지인 로즈마리(*Rosmarinus officinalis* L.)는 꿀풀과(Labiatae)의 상록성 다년초로서 식용, 약용, 미용, 향료 및 관상용으로 널리 사용되고 있고, 향기가 오래 지속되

고, 머리를 맑게 하여 기억을 새롭게 해 주는 것으로 알려져 있기 때문에 다양한 분야에서 이용되고 있다[22]. 국내에서는 제주도를 비롯한 남부지역에서 월동이 가능하며 식품의 향신료나 향수의 원료로서 산업적인 이용을 목적으로 생산이 되고 있다. 잎과 줄기 전체에 독특한 향기성분이 함유되어 있는데 주요 성분으로는  $\alpha$ -pinene, apigenin,  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -sitosterol, betulinic acid, borneol, rosmanol, rosmarinic acid, 1-8 cineol, carnosol, carnosic acid, tannin, limonene, camphor, camphene 등이 알려져 있다[2]. 이러한 성분들로 인하여 로즈마리 추출물은 항산화[2, 5, 16, 17, 24, 26], 항암[13, 20], AIDS [5], 항균활성[23, 29] 등의 다양한 효과가 보고되고 있다.

생물소재로부터 생리활성 물질의 추출은 속시렛, 환류, 초음파, 마이크로 웨이브 및 초임계 등의 다양한 방법들이 사용되고 있다[17]. 추출 효율과 생리활성을 증가시키기 위한 용매의 선정은 화합물의 용해도를 고려하여서 결정하여야 하며, 소재에 함유되어 있는 물질의 용해도는 용매와 용질간의 정전기적인 반발과 흡인력인 용질과 용매의 극성에 의해서 결정된다[16, 17]. 일반적으로 많이 이용되고 있는 천연물의 추출용매는 화합물에 대한 선택의 범위가 좁고, 다양한 극성의 조절이 가능한 물과 알코올의 혼합물이 가장 좋은 것으로 보고되고 있다[16]. 그러나 로즈마리의 경우에는 물과 알코올의 혼합물을 이용한 최적 추출방법은 70%와 80%의 높은 에탄올의 농도가 효과적이라고 하였으며[1, 16], 이러한 결과는 로즈마리의 다

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5522, Fax : +82-550-350-5529

E-mail : ywchoi@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

양한 생리활성물질 및 효능을 탐색하는 데에는 한계가 있을 것이라고 하였다[16]. 로즈마리는 천연 항산화제로서의 기능이 알려져 있지만, 추출조건에 영향을 주는 주요인자인 용매의 종류와 농도에 대한 추출 수율, 경제성 검토 등에 필요한 용매의 최적화 조건의 확립이 필요하다.

본 연구에서는 건조분말 로즈마리를 hexane과 ethyl acetate 및 메탄올과 증류수에 에틸알콜의 농도를 95%, 70%, 50%, 25% 및 0%로 혼합한 용매로서 추출한 다음 DPPH 소거능,  $\alpha$ -glucosidase 활성억제, 지방세포 분화억제, tyrosinase 저해 활성을 검증하고, 최적의 추출용매 조건을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 시료로 사용된 로즈마리(*Rosmarinus officinalis* L.)는 ㈜옴니허브(영천시, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 3T3-L1 세포주는 KCLB (Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였고, 세포 배양에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal calf serum (FCS), fetal bovine serum (FBS) penicillin/streptomycin, trypsin-EDTA는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)와 10% fetal bovine serum (FBS) (웰진, 경상시, 한국)로부터 구입하여 사용하였다. DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), DMSO (dimethyl sulfoxide), Folin-ciocalteau reagent, bovine serum albumin (BSA), insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-methyl xanthine (IBMX), oil red-O reagent, MTT (3-[4,5-methylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), potassium persulfate, trizol reagent는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. DPPH, ascorbic acid, mushroom tyrosinase, kojic acid, glucosidase, acarbose, NaHCO<sub>3</sub>, HEPES, insulin, rosiglitazone, dexamethasone, oil red O 등은 Sigma-Aldrich (Sigma, St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 로즈마리의 추출 조건

로즈마리의 건조분말 1 g을 15 ml conical tube에 넣은 다음 hexane, ethyl acetate, 100% methanol, 95% ethanol, 70% ethanol, 50% ethanol, 25% ethanol 및 증류수 10 ml을 넣고 소니케이트(JAC-4020P, KODO, Suwon, Korea)에서 1시간 동안 추출한 다음 3,000 rpm에서 15분 동안 centrifuge하여 상등액을 취하였다. 동일한 방법으로 3회 반복하여 추출한 추출물을 혼합하여 최종 볼륨을 30 ml로 조정하여 다음 필터페이퍼(Advantec 5A, 150 mm)를 이용하여 여과한 추출물을 회전증발기(Heidolph Instruments Co., Ltd., Schwabach, Germany)로 용매를 완전히 제거한 후 각각 추출물의 샘플로 사용하였다.

### DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH radical 소거활성은 Blois [7]의 방법을 변형하여 측정하였다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 0.2 mM의 용액 190  $\mu$ l에 농도별로 희석한 시료 10  $\mu$ l을 첨가하여 암조건에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Negative control은 10  $\mu$ l의 50% DMSO 및 증류수를 넣어 측정하였고, positive control은 ascorbic acid를 사용하여 다음 계산식에 의거하여 소거활성을 측정하였다. DPPH radical 소거능(%) =  $100 \times \{1 - [(Abs \text{ sample} + DPPH) - (Abs \text{ sample blank})] / [(Abs \text{ control}) - (Abs \text{ control blank})]\}$

### $\alpha$ -Glucosidase 활성억제능 측정

로즈마리 용매별 물추출물의  $\alpha$ -glucosidase 활성억제능은 Angelov 등[4]의 방법을 변형하여, 96 well plate에 각 농도별 추출물 2  $\mu$ l, 10  $\mu$ l  $\alpha$ -glucosidase (1 U/ml), 68  $\mu$ l phosphate buffer (pH = 6.8, 100 mM)를 혼합하여 37°C에서 15분간 두었다. 20  $\mu$ l의 p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucospy-ranoside (pNPG, 5 mM)을 첨가하여 실온에서 20분 동안 반응 후 50  $\mu$ l의 탄산나트륨(0.1 M)을 첨가하여 반응을 중단시켜서 substrate인 pNPG로부터 유리되어 나오는 반응 생성물인 p-nitrophenol을 405 nm에서 측정하여  $\alpha$ -glucosidase 활성의 억제정도를 측정하였다. 대조군으로는  $\alpha$ -glucosidase 저해제로 알려진 acarbose (Sigma, St. Louis, Missouri, USA)를 사용하였으며, 다음 계산식에 의거하여 활성을 산출하였다.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition (%) =  $100 \times \{1 - [(Abs \text{ Sample}) - (Abs \text{ Sample Blank})] / [(Abs \text{ control}) - (Abs \text{ Control Blank})]\}$

### 세포독성 측정

지방세포에 대한 로즈마리 추출물의 세포독성은 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 이용하여 측정하였다. 3T3-L1 세포를  $1 \times 10^4$  cells/well의 농도로 96 well culture plate에 100  $\mu$ l의 배지와 함께 24시간 배양한 다음, 로즈마리 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 배양하였다. 각 well에 10  $\mu$ l의 MTT 용액(5 mg/ml)를 첨가한 후 3시간 동안 배양하면서 환원 반응을 유도하였으며, 100  $\mu$ l의 DMSO를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해하였다. 발색 정도는 분광광도계(BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3T3-L1 세포 배양 및 지방분화 유도

지방분화의 억제제는 Zebisch 등[31]의 방법을 변형하여 사용하였다. 3T3-L1 세포배양은 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM 배지에  $2 \times 10^5$  cells/ml 농도로 48-well plates에 부유시켜 48시간 동안 배양하여 confluent 상태가 되도록 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 지방세포분화는 10  $\mu$ M rosiglitazone (ROS, Sigma, St. Louis, MO, USA), 10

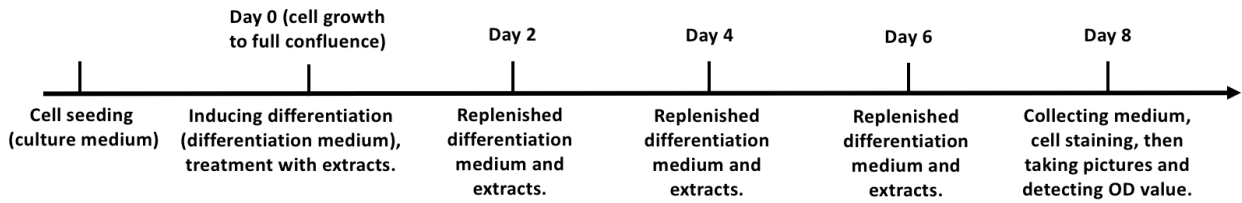


Fig. 1. The process of inducing cell adipogenesis and drug treatment.

µg/ml insulin (In, Sigma, St. Louis, MO, USA) and 1 µM dexamethasone (DEX, Sigma, St. Louis, MO, USA)의 분화배지에서 8일 동안 지방세포를 분화시켰다. 2일간 분화 유도 후 1 µg/ml의 insulin이 함유된 10% FBS-DMEM으로 2일간 배양하였다. 그 후 2일마다 4회 10% FBS-DMEM으로 교체하였다. 시료의 처리는 분화유도 배지 첨가 시점부터 같이 처리하였다 (Fig. 1).

**Oil red-O 염색**

지방전구세포 분화 시에 형성된 지방의 함량은 oil red-O염색법에 의해 측정하였다. 분화 8일 후에 배지를 제거한 뒤 분화된 세포표면을 PBS로 2회 세척한 다음 4% paraformaldehyde (TCl, Tokyo, Japan)로 실온에서 20분 동안 고정하고 PBS로 세척하였다. 각 well에 oil red O (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액 1 ml을 첨가하고 4°C에서 30분간 염색한 다음, 역상현미경(Moitec, Xiamen, China)으로 사진을 찍었다. 사진을 찍은 후, PBS를 제거하고 각각의 well에 150 ml isopropanol (GENEray, Shanghai, China)로서 oil red O를 용해하여 ELISA reader (BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Tyrosinase 억제 활성**

Tyrosinase 저해활성은 Yagi 등[30]의 방법을 변형하여 사용하였다, 96-well의 microplate에 118 µl의 PBS (0.1 M, pH 6.8), 40 µl의 tyrosinase (31 units/ml), 40 µl의 L-DOPA (2.5 mM) 및 로즈마리 각각의 추출물(12.5~200 µg/ml) 2 µl를 첨가한 혼합물을 37°C에서 10분간 반응시킨 후 생성된 DOP Achrome를 분광광도계를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해율은 다음과 같이 계산하였다. Tyrosinase inhibition (%) = 100x {1- [(Abs sample + DPPH) - (Abs sample blank)] / [(Abs control) - (Abs control blank)]}

**통계처리**

모든 실험은 3회 반복으로 실시하였으며 결과는 평균에 대한 표준편차 또는 표준오차로 나타내었다. 유의성 검정은 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 분산분석(ANOVA test)을 실시하고 Duncan의 다중검정 (Duncan’s multiple range test)을 통해 95% 신뢰 수준에서 나타내었다.

**결과 및 고찰**

**로즈마리 용매 추출물의 항산화 효과**

산화성 스트레스에 의해서 생성되는 free radical의 생성을 억제하거나 소거를 촉진할 뿐만 아니라 산화속도를 억제하여 주는 물질들에 관한 연구가 많이 수행되고 있다. 또한 활성산소종(ROS)에 의한 oxidative stress는 에너지 대사과정에서 일어나는 현상으로서 생체는 superoxide dismutase (SOD) 활성화 같은 항산화기 전에 따라 제어된다[25]. 산화적인 스트레스에 의해서 생체가 불균형 상태로 되거나 ROS를 조절하지 못하면 압, 혈관질환, 당뇨를 비롯한 다양한 질병과 합병증을 유발하게 된다[27]. 이러한 산화기전 억제효과를 확인하기 위해 로즈마리 잎과 줄기 혼합분말의 용매추출물에 대한 DPPH 소거능을 조사하였다. 로즈마리 잎과 줄기 분말을 hexane, EtOAc (ethyl acetate), MeOH (methyl alcohol), 95% EtOH (ethyl alcohol), 70% EtOH, 50% EtOH, 25% EtOH 및 물 추출물에 대하여 DPPH 소거능을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 로즈마리 용매 추출물의 DPPH radical 소거능 IC<sub>50</sub> 값은 hexane 추출물이 48.94±1.53 µg/ml로서 활성산소 소거능이 가장 낮았으며, EtOAc 추출물은 31.74±0.51 µg/ml 및 MeOH 추출물은 25.38±0.13 µg/ml이므로 용매의 극성이 증가할수록 효능도 증가하였다. 또한 EtOH의 농도를 95%, 70%.

Table 1. Inhibitory effect of DPPH scavenging in *Rosmarinus officinalis* L. leaf and stem powder extracts

Solvents	Concentration	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Hexane	100%	48.94±1.53 <sup>2)a)3)</sup>
Ethyl acetate	100%	31.74±0.51 <sup>b</sup>
Methanol	100%	25.38±0.13 <sup>c</sup>
Ethanol	95%	29.24±0.36 <sup>b</sup>
	70%	21.53±0.18 <sup>d</sup>
	50%	11.73±0.14 <sup>ef</sup>
	25%	12.40±0.12 <sup>f</sup>
Water	100%	12.19±0.25 <sup>f</sup>
Vitamin C <sup>1)</sup>		17.01±0.80 <sup>e</sup>

<sup>1)</sup>Ascorbic acid is used as positive control.

<sup>2)</sup>Results are presented as mean ± SD of three independent experiments.

<sup>3)</sup>Means with different superscript letters (a-g) within a column are significantly different at p<0.05 by a Duncan’s multiple range tests (n=3).

50%, 25%로 조절한 용매와 물 추출물의 IC<sub>50</sub>값은 각각 29.24±0.36 µg/ml, 21.53±0.18 µg/ml, 11.73±0.14 µg/ml, 12.40±0.12 µg/ml, 12.19±0.25 µg/ml으로서 EtOH의 농도가 50% 이하의 극성용액 추출물의 IC<sub>50</sub>값이 13 µg/ml 이하로서 positive control인 비타민 C의 17.01±0.80 µg/ml 보다 낮아 그 효과가 매우 좋았다. 그러나 EtOH의 농도가 50%에서 95%까지 증가할수록 IC<sub>50</sub>값이 증가하여 DPPH radical 소거능은 감소하는 경향이였다.

로즈마리(*Rosmarinus officinalis*)의 잎은 높은 항산화 활성을 가지고 있고[3], 추출물에 함유되어 있는 페놀화합물과 항산화능의 관계에 관한 연구결과가 많이 보고되었다[3, 23]. Lee 등[17]은 로즈마리의 75% 메탄올 추출물의 IC<sub>50</sub> 값이 열수 추출과 50% 에탄올 추출보다 낮아서 항산화력이 높다고 하였으나, 물 추출물이 에탄올 추출물보다 DPPH radical에 대한 항산화 효과가 높다[9, 12, 26]는 상반된 보고도 있었다. 이러한 결과는 총 폴리페놀 함량[24] 또는 수용성 항산화 물질인 rosmarinic acid, chlorogenic acid, rutin, 및 caffeic acid [3, 21]이 높기 때문이라고 하였다. 본 연구에서는 증류수에 에탄올의 농도가 50% 이하일 때에 IC<sub>50</sub>값이 13 µg/ml 이하로서 positive control인 비타민 C 보다 낮아 DPPH 소거능이 더 높았는데, 이는 에탄올이 50% 이하로 함유된 용매로 추출시에 항산화능이 높은 수용성 성분이 많이 함유되어 있기[3] 때문인 것으로 추측된다. 본 연구결과와 선행의 연구결과를 종합하면 항산화능의 차이는 추출용매, 추출방법, 추출온도 등의 다양한 요인이 관여하고 있으며, 이러한 요인들로 인해서 추출물의 성분함량이 차이로 인해서 소거능의 차이가 있는 것으로 생각된다.

### α-Glucosidase 활성억제 효능

비만 인구는 전 세계적으로 급증하고 있는데, 최근에는 어린이와 청소년도 급격하게 증가하고 있으며[15], 비만은 고혈압, 악성고지혈증, 심혈관질환, type 2 당뇨병 및 이러한 질병들의 복합적인병을 유발하는 위험인자로 알려지고 있다[10, 28]. 로즈마리 용매별 추출물의 α-glucosidase 활성억제 효과를 IC<sub>50</sub>값으로 비교한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. α-Glucosidase 억제제의 positive control인 acarbose 500 µg/ml 을 처리하였을 때의 억제효과는 27.94±1.4%로서 50% 이하의 억제효과를 나타내었다. 그러나 로즈마리 추출물은 200 µg/ml 이하에서 50% 이상의 억제 효과를 나타내어 IC<sub>50</sub>값을 구할 수 있었는데, hexane추출물은 125.02±1.36 µg/ml로서 억제효과가 매우 낮았으며, EtOAc 및 MeOH 등으로 용매의 극성이 높을수록 억제효과가 증가되었다. IC<sub>50</sub> 값은 100% MeOH, 95% EtOH, 70% EtOH 및 50% EtOH 용매 추출물이 10 µg/ml 이하로서 매우 좋았으며, EtOH 25%과 물 추출물은 25 µg/ml 이상으로서 극성이 너무 높아질 경우에는 효과가 감소하는 경향이였다. 용매의 종류 또는 농도에 따른 추출물의 α-glucosidase 활성억제 효과는 100% MeOH 또는 95%~50% EtOH

Table 2. Inhibitory effect of α-glucosidase in *Rosmarinus officinalis* L. leaf and stem powder extracts

Solvents	Concentration	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Hexane	100%	125.02±1.36 <sup>2(a3)</sup>
Ethyl acetate	100%	11.63±0.16 <sup>d</sup>
Methanol	100%	6.09±1.18 <sup>f</sup>
Ethanol	95%	8.78±3.73 <sup>e</sup>
	70%	6.49±0.38 <sup>f</sup>
	50%	6.41±0.08 <sup>f</sup>
	25%	27.63±0.77 <sup>b</sup>
Water	100%	25.33±1.83 <sup>c</sup>
Acarbose at 500 µg/ml (%) <sup>1)</sup>		27.94±1.49

<sup>1)</sup>Acarbose used as positive control is percent at 500 µg/ml.

<sup>2)</sup>Results are presented as mean ± SD of three independent experiments.

<sup>3)</sup>Means with different superscript letters (a-f) within a column are significantly different at  $p < 0.05$  by a Duncan's multiple range tests (n=3).

용매로 추출하였을 때에 가장 좋았다.

### 지방세포 분화억제

비만은 지방선구세포(pre-adipocyte)가 지방세포(adipocyte)로 분화되어 세포 내 지방을 축적하는데, 지방세포의 크기와 수의 증가에 의한 것으로 보고되고 있다[14, 32]. 로즈마리 분말을 95%, 70%, 50%, 25% EtOH 증류수 MeOH, EtOAc 및 hexane추출물 50 µg/ml을 처리하여 지방 분화능을 측정할 결과, 70% EtOH추출물은 DMSO 처리군 대비 35.5%로서 억제율이 가장 높았고, 70% EtOH 추출물을 기준으로 하여 EtOH의 농도가 높아지거나 낮을수록 효과는 감소하였다(Fig. 2). 또한 MeOH 추출물은 효과가 거의 없었고, hexane과 물추출은 약 15%의 억제효과가 있었으며, EtOAc 추출물은 9.4%의 억제율로서 효과가 가장 낮았다. 열수 추출물은 10 µg/ml의 농도에서 대조군 대비 40.1%의 억제율을 나타내었고, 에탄올 추출물의 경우 10 µg/ml의 농도에서 대조군 대비 22.4%의 억제율을 나타내어 에탄올 추출물보다 열수 추출물의 지방분화 억제 효과가 우수하였다(Fig. 2). Lee 등[18]은 마치현 추출물의 경우 10 µg/ml의 농도에서 15.5%의 지방분화 감소를 나타낸 반면 원지의 물 추출물은 더 우수한 지방분화능 억제 효과를 나타낸다고 하였다. 로즈마리는 추출물의 주요 성분인 rosmarinic acid, chlorogenic acid, caffeic acid 및 gallic acid 등의 성분이 pancreatic lipase와 hormone sensitive lipase에 농도 의존적인 억제효과를 나타내며[8]. 이는 지방의 소화를 방해하기 때문인 것으로 추측하였다[8]. 또한 로즈마리의 비만효과를 나타내는 성분은 rosmarinic acid와 carnosic acid이며, 증류수에서 에탄올의 비율이 높을 때에 carnosic acid가 많이 추출되며, 알코올의 비율이 낮을수록 rosmarinic acid가 적게 추출된다

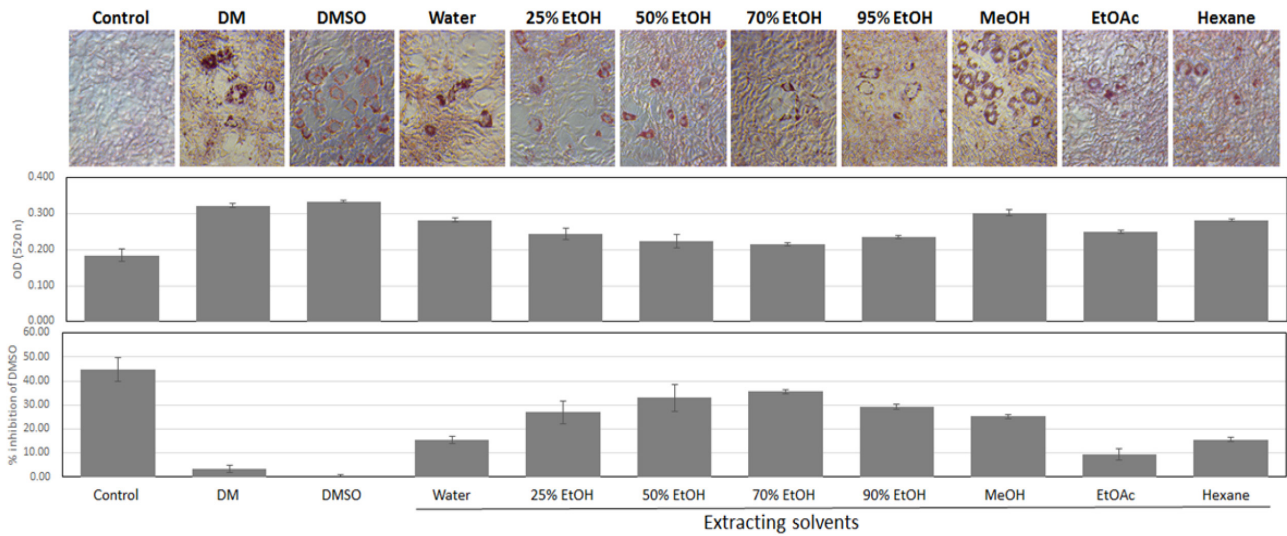


Fig. 2. Rosemary extracts inhibited adipogenesis in the 3T3-L1 cell line. The 3T3-L1 cell line was maintained in DMEM containing 10% FBS, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> and 25 mM HEPES (culture medium) and adipogenesis was induced with culture medium including 10 μM rosiglitazone, 10 μg/ml insulin and 1 μM dexamethasone (differentiation medium). All extracts were treated 50 μg/ml throughout the induction period. Cells were stained with oil red O for photography (A), after which the oil red O was dissolved using iso-propanol and the OD value was determined (B). Pictures were taken at 200× (A). Values are presented as the mean ± SD (n=3).

고 하였다[16]. 본 연구에서도 추출 용매의 극성에 따라서 항비만 효과의 차이가 있었는데 이는 용매의 극성에 따라서 rosmarinic acid와 carnosic acid는 물론 다른 생리활성 성분의 용해도의 차이에 기인한 것으로 생각된다.

**Tyrosinase 저해 활성**

로즈마리 잎과 줄기 분말 추출물의 피부 미백 화장품 소재로서 이용 가능성을 검토하기 위하여 멜라닌 색소의 생합성 과정에서 tyrosinase가 L-dopa를 기질로 하여 초기반응의 주요 과정을 촉진한다는 것을 이용하여 tyrosinase활성의 저해도를 측정된 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 로즈마리 잎과 줄기의 분말을 ethyl acetate, methanol, 95% EtOH, 70%

EtOH, 50%EtOH, 25% EtOH 및 증류수 추출물이 tyrosinase 활성 저해에 미치는 효과를 조사하기 위하여 추출물을 200, 100, 50, 25, 12.5 μg/ml의 농도로 처리한 다음 tyrosinase 활성 저해율을 측정하였다(Fig. 3). Tyrosinase 활성 저해율은 추출 용매의 종류 및 EtOH의 농도에 따라서 달랐으며, 추출물의 처리농도가 증가할수록 tyrosinase 활성 저해율이 증가하는 경향을 보였고, 특히 50%와 25% ethanol 및 물 추출물이 효과가 좋았으며, methanol, 95%와 70% ethanol 추출물은 중간정도, ethyl acetate 추출물은 억제효과가 현저히 낮았다. Tyrosinase는 피부에 침착되는 색소인 melanin 형성에 있어 중요한 단계를 촉진하는 역할을 하는 것으로 알려져 있어서 피부 미백과 관련된 연구에서 활성의 주요 판단 근거로 사용되고 있

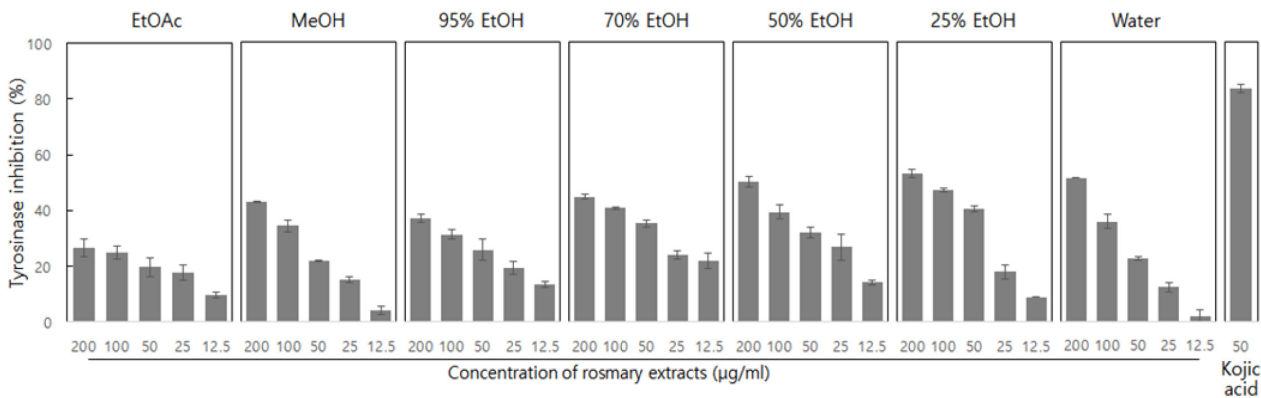


Fig. 3. Inhibitory effect of tyrosinase in *Rosmarinus officinalis* L. leaf and stem powder extracts. Kojic acid used as positive control is percent at 50 μg/ml. Results are presented as mean ± SD of three independent experiments.

다[11]. 본 연구에서는 로즈마리 분말을 다양한 용매로 추출한 다음 tyrosinase 억제 효과를 조사한 결과 50% 이하의 에탄올 추출물이 효과가 좋은 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합하면 로즈마리의 생리활성 성분은 rosmarinic acid, carnosic acid, chlorogenic acid, caffeic acid 및 gallic acid 등이 있으며[8, 16], 생리활성 성분은 추출용매의 극성에 따라서 용해도가 다르기 때문에 함량 차이가 있다고 하였다[16]. 본 연구에서도 추출용매의 극성 차이로 인하여 추출되는 생리활성 성분의 종류 및 함량의 차이가 있었을 것이며[16]. 향산화(50%, 25% EtOH, 물),  $\alpha$ -glucosidase 활성억제(50~95% 에탄올, 메탄올), 지방세포 분화억제(70% 에탄올), tyrosinase 저해(50%, 25% 에탄올, 물) 등에 대한 최적의 용매가 달랐던 원인은 추출용매에 따른 특정 성분의 유무와 함량의 차이에 기인한 것으로 생각된다.

### 감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

### References

- Adham, A. N. 2015. Comparative extraction methods, phytochemical constituents, fluorescence analysis and HPLC validation of rosmarinic acid content in *Mentha piperita*, *Mentha longifolia* and *Osimum basilicum*. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **3**, 130-139.
- Allaf, T., Tomao, V., Ruiz, K., Bachari, K., ElMaataoui, M. and Chemat, F. 2013. Deodorization by instant controlled pressure drop autovaporization of rosemary leaves prior to solvent extraction of antioxidants. *LWT - Food Sci. Technol.* **51**, 111-119.
- Almela, L., Sanchez-Munoz, B., Fernandez-Lopez, J. A., Roca, M. J. and Rabe, V. 2006. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J. Chromatogr. A* **1120**, 221-229.
- Angelov, A., Putyrski, M. and Liebl, W. 2006. Molecular and biochemical characterization of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -mannosidase and their clustered genes from the thermoacidophilic archaeon *Picrophilus Torridus*. *J. Bacteriol.* **188**, 7123-7131.
- Aruoma, O. I., Spencer, J. P., Rossi, R., Aeschbach, R., Khan, A., Mahmood, N., Munoz, A., Murcia, A., Butler, J. and Halliwell, B. 1996. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and Provençal herbs. *Food Chem. Toxicol.* **34**, 449-456.
- Barnes, H. M., Reldman, J. R. and White, W. V. 1950. Isochlorogenic acid. Isolation from coffee and structure studies. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 4178-4183.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Bustanji, Y., Issa, A., Mohammad, M. and Hudaib, M. 2010. Inhibition of hormone sensitive lipase and pancreatic lipase by *Rosmarinus officinalis* extract and selected phenolic constituents. *J. Med. Plant Res.* **4**, 2235-2242.
- Chen, H. Y., Lin, Y. C. and Hsieh, C. L. 2007. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chem.* **104**, 1418-1424.
- de Miguel-Etayo, P., Moreno, L. A., Iglesia, I., Bel-Serrat, S., Mouratidou, T. and Garagorri, J. M. 2013. Body composition changes during interventions to treat overweight and obesity in children and adolescents: a descriptive review. *Nutr. Hosp.* **28**, 52-62.
- del Marmol, V. and Beermann, F. 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* **381**, 165-168.
- Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R. and Tikkanen, M. J. 2003. Characterization of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected lamiaceae herbs. *Food Chem.* **83**, 255-262.
- González-Vallinas, M., Reglero, G. and Ramírez de Molina, A. 2015. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract as a potential complementary agent in anticancer therapy. *Nutr. Cancer* **67**, 1221-1229.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M. and Sui, H. S. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* **78**, 783-809.
- Hruby, A. and Hu, F. B. 2015. The epidemiology of obesity: A big picture. *Pharmacoeconomics* **33**, 673-689.
- Jacotet-Navarro, M., Laguerre, M., Fabiano-Tixier, A. S., Tenon, M., Feuillère, N., Bily, A. and Chemat, F. 2018. What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield, composition, and activity of the extracts. *Electrophoresis* **39**, 1946-1956.
- Lee, C. Y., Kim, K. M. and Son, H. S. 2013. Optimal extraction conditions to produce rosemary extracts with higher phenolic content and antioxidant activity. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **45**, 501-507.
- Lee, M. S., Kim, C. T., Kim, C. J., Cho, Y. J. and Kim, Y. H. 2006. Effects of *Portulaca oleracea* L. extract on lipolysis and hormone sensitive lipase (HSL) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Kor. J. Food Nutr.* **39**, 742-747.
- Marcus, A. W. and Kathryn, H. 2007. The herb and spice companion: A Connoisseur's Guide. Running Press, Philadelphia, PA, USA. pp. 3-10.
- Moore, J., Yousef, M. and Tsiani, E. 2016. Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols. *Nutrients* **8**, E731.
- Mulinacci, N., Innocenti, M., Bellumori, M., Giaccherini, C., Martini, V. and Michelozzi, M. 2011. Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study. *Talanta* **85**, 167-176.
- Özcan, M. M. and Chalchat, J. C. 2008. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **59**, 691-698.
- Özcan, M. M., Erel, Ö. and Herken, E. E. 2009. Antioxidant activity, phenolic content, and peroxide value of essential

- oil and extracts of some medicinal and aromatic plants used as condiments and herbal teas in Turkey. *J. Med. Food* **12**, 198-202.
24. Perez, M. B., Calderon, N. L. and Croci, C. A. 2007. Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Chem.* **104**, 585-592.
25. Pryor, W. A., Houk, K. N., Foote, C. S., Fukuto, J. M., Ignarro, L. J., Squadrito, G. L. and Davies, K. J. 2006. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am. J. Physiol. Regul Integr. Comp. Physiol.* **291**, R491-R511.
26. Rodriguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D. and Cocero, M. J. 2012. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *J. Food Engin.* **109**, 98-103.
27. Sasaki, S. and Inoguchi, T. 2012. The role of oxidative stress in the pathogenesis of diabetic vascular complications. *Diabetes Metab. J.* **36**, 255-261.
28. Singla, P., Bardoloi, A. and Parkash, A. A. 2010. Metabolic effects of obesity: a review. *World J. Diabetes* **1**, 76-88.
29. Song, J. H., Kwon, H. D., Lee, W. K. and Park, I. H. 1998. Antimicrobial activity and composition of extract from *Smilax china* Root. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 574-584.
30. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1986. The effects of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Med.* **3981**, 517-519.
31. Zebisch, K., Voigt, V., Wabitsch, M. and Brandsch, M. 2012. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal. Biochem.* **425**, 88-90.
32. Zhang, J. W., Tang, Q. Q., Vinson, C. and Lane, M. D. 2004. Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 43-47.

### 초록 : 로즈마리(*Rosmarinus officinalis* L.) 극성별 용매 추출물의 생리활성 검증

이커 · 양경희 · 귀루 · 추이정웨이 · 손병구 · 강점순 · 이용재 · 박영훈 · 제병일 · 최영환\*  
(부산대학교 원예생명과학과)

로즈마리(*Rosmarinus officinalis* L.)는 식품소재로서 널리 사용되고 있으며 다양한 생리활성이 보고되어 있다. 그러나 극성이 다른 용매 추출물의 상호작용과 생리활성에 관한 연구는 잘 정립되어서 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 로즈마리 분말을 hexane, EtOAc, MeOH 그리고 95%, 70%, 50% 또는 25% EtOH 및 물로 추출한 다음, 각각의 용매 추출물의 항산화, 항비만, 항  $\alpha$ -glucosidase 활성 및 미백효과 등을 조사하기 위해 수행되었다. 로즈마리 추출물의 항산화 및 tyrosinase 저해 효과는 비교적 극성이 높은 50% EtOH, 25% EtOH 및 증류수 추출물이 가장 효과가 좋았다. 그러나  $\alpha$ -glucosidase 활성억제는 EtOH의 농도가 높은 50~95%와 MeOH 추출물에서 효과가 가장 좋았다. 지방세포의 분화억제는 70% EtOH로 처리시에 가장 효과가 좋았으며, EtOH의 농도가 70% 보다 증가하거나 감소하였을 경우에는 농도에 비례하여 감소하였다. 본 실험의 결과 최적의 추출용매는 항산화, tyrosinase 저해,  $\alpha$ -glucosidase 활성억제 및 지방세포의 분화 억제 등의 질환에 따라서 차이가 있었다. 이러한 추출용매를 고려하면 추출용매에 따라서 최적의 생리활성 성분의 종류와 함량이 차이가 있고 이로 인하여 생리활성 효과도 달라진 것으로 생각된다.