배초향 추출 분획물의 항산화 활성, 피부미백 및 주름개선 효과

김지완 · 홍주헌

대구가톨릭대학교 식품공학전공

Antioxidant Activity, Skin Whitening, and Anti-Wrinkle Effects of Various *Agastache rugosa* Fractions

Ji Wan Kim and Joo-Heon Hong

Department of Food Science and Technology, Daegu Catholic University

ABSTRACT In this study, the antioxidant, skin whitening, and anti-wrinkle effects of fractions from *Agastache rugosa* were evaluated. The 70% ethanol extract of *Agastache rugosa* was fractionated to get *n*-hexane (HF), chloroform (CF), ethyl acetate (EF), *n*-butanol (BF), and water (WF) fractions, depending on the polarity of the solvent. Total polyphenol and flavonoid contents of the EF were the highest among 5 different fractions at 27.79 g/100 g and 39.00 g/100 g, respectively. The DPPH, ABTS radical scavenging activity, and FRAP activity of the EF at 500 µg/mL were 89.89%, 85.31%, and 2.05 µM, respectively. The ORAC value of the EF at 1,000 µg/mL was 129.33 µM TE/g. Tyrosinase, elastase, and collagenase inhibitory activity were highest in the EF at 33.16%, 27.33%, and 32.94%, respectively. The EF was better than the other fractions with respect to regeneration and protective effects against oxidative stress in L-132 cells. The protective effect in UV-irradiated human dermal fibroblasts, inhibitory effect on tyrosinase activity, and melanin production in B16F10 cells was confirmed with the EF. Thus, the obtained results suggest that *Agastache rugosa* fractions have potential applications as functional materials in the food industry.

Key words: *Agastache rugosa*, fractions, antioxidant activity, skin whitening, anti-wrinkle effect

서 론

피부는 피하조직, 진피, 표피의 3층 구조로 이루어져 있는 신체의 가장 바깥 부분으로 복합적인 구조와 물리화학적 특징으로 인해 외부요인에 대항하여 신체의 항상성 유지를 돕는다(Kim, 2017). 현대 사회에서 성별 및 나이와 상관없이 피부에 대한 관심이 증가하였으며, 그중 피부미백 및 주름개선 등 피부 항노화 활성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Yang 등, 2017). 피부 노화란 신체의 노화와 더불어 피부에 나타나는 현상을 의미하며, 노화에 미치는 요인에 따라 내적 또는 외적 요인으로 나누어진다(Kim 등, 2010b). 자외선은 가장 주된 외적 요인으로서, 피부와 반응 시 표피의 기저층 및 진피의 상부까지 도달하며 다량 노출 될 경우 활성산소를 생성하여 산화적 스트레스를 유발함으로써 피부 노화를 가속화 시키고 염증 유발인자의 생성 및 세포사멸 등을 초래한다(Kim 등, 2019b). 활성산소(ROS)는 matrix

metalloproteinases(MMPs)의 발현을 촉진시켜 콜라겐 및 엘라스틴 섬유의 절단을 유발하여 피부 노화를 가속시키고(Xuan 등, 2016), 피부의 자외선 노출 시 멜라닌 생성 반응을 촉진시켜 피부 노화가 발생하며(Ryu 등, 2007) 피부손상을 야기하는 것으로 보고되었다(Kim 등, 2015; Lee 등, 2015). 현재 항산화, 피부미백 및 주름개선 효과를 나타내는 것으로 알려진 기능성 물질로는 arbutin, ascorbic acid, hydroquinone 및 linoleic acid 등이 있으며 식품산업, 화장품 및 의약 분야에 상업적으로 널리 이용되고 있으나, 피부 자극 및 백반증과 같은 체내 부작용을 나타내는 것으로 보고되어 있어 안전하고 효과적인 천연 기능성 물질의 개발이 요구되고 있다(Kim, 2017).

배초향(*Agastache rugosa* O. Kuntze)은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본으로 줄기는 네모지며, 잎의 모양은 난상 심장형으로 뒷면에만 약간 털이 있고 자주색의 꽃이 피며(Hong 등, 2020), 어린잎은 식용으로 이용되어 한방과 민간

Received 21 December 2020; Revised 3 June 2021; Accepted 14 June 2021

Corresponding author: Joo-Heon Hong, Department of Food Science and Technology, Daegu Catholic University, 13-13, Hayang-ro, Hayang-eup, Gyeongsan-si, Gyeongbuk 38430, Korea, E-mail: jhhong@cu.ac.kr

Author information: Ji Wan Kim (Graduate student), Joo-Heon Hong (Professor)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

에서 감기, 종독, 풍습 등에 대한 약재로 사용해 왔다(Park 등, 2000). 주로 diterpene류, 페닐프로파노이드 화합물, 폴리페놀 화합물(rosmarinic acid) 및 플라보노이드계 화합물(tilianin, acacetin, agastachin)들이 다량 함유되어 있으며(Han 등, 1987; Kim 등, 2015), 이들은 항산화, 항암, 항염, 항바이러스 및 항균 등의 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다(Chen과 Ho, 1997; Cuvelier 등, 1996). 최근 배초향의 피부 항노화 활성 및 미백 효과 등이 보고되어 이와 관련된 연구 및 소재 개발에 관한 관심이 증가하고 있다(Yun 등, 2019; Park 등, 2019). 이처럼 배초향과 관련된 많은 연구들이 진행되고 있음에도 불구하고 배초향 분획물의 항산화 활성, 피부미백 및 주름개선 효과와 관련된 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 배초향 에탄올 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획한 분획물의 이화학적 품질 특성 및 항산화 활성, 피부미백과 주름개선 효과에 대한 생리활성을 조사하여 기능성 식품 및 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 건조 배초향은 두손에약초(주)(Yeongcheon, Korea)에서 구입 후 상온 보관하였으며, 수분함량 5% 미만으로 건조하고 분쇄한 다음 40 mesh 표준망체를 통과한 분말을 -70°C 이하의 암소에 보관하며 추출용 시료로 사용하였다.

분획물 제조

배초향 분말 30 g에 70% 에탄올 300 mL를 첨가하여 80°C 에서 4시간 동안 환류냉각추출기(CA-1112, EYELA Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 추출하였다. 추출 후 불순물 제거를 위해 여과지(No. 4, Whatman International Ltd., Leicestershire, UK)를 사용하여 여과한 다음 감압농축기(N-1N, EYELA Co.)로 농축한 다음 분획물 제조에 사용하였다. 배초향 70% 에탄올 추출농축액과 증류수를 1:5 비율로 희석 후, 용매 극성에 따라 순차적으로 동량의 *n*-hexane(HF, *n*-hexane fraction of *Agastache rugosa*)을 분액여두에 넣어 혼합하였다. 230 rpm으로 조정된 진탕기(SR-2DW, Taitec, Koshigaya, Japan)로 6시간 동안 진탕 및 12시간 방치 후 회수하였다. 이후 chloroform(CF, chloroform fraction of *Agastache rugosa*), ethyl acetate(EF, ethyl acetate fraction of *Agastache rugosa*), *n*-butanol(BF, *n*-butanol fraction of *Agastache rugosa*) 및 water(WF, water fraction of *Agastache rugosa*)에 3회 반복하여 분획하고 각각의 층은 다시 농축하여 분획물을 제조하였다. 제조된 분획물은 동결건조(Free Zone 2.5, Labconco Co., Kansas, MO, USA)한 다음 -70°C 이하의 암소에서

보관하며 분석용 시료로 사용하였다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(Singleton과 Rossi, 1965)에 따라 시료 1 mL에 1 N Folin Ciocalteu reagent 1 mL를 첨가하고 충분히 혼합한 다음 20% Na_2CO_3 1 mL를 첨가하여 실온의 암소에서 30분간 반응시킨 후 분광광도계(Ultrospec 2100 pro, Biochrom Ltd., Cambridge, UK)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 tannic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등(1999)의 방법을 이용하여 측정하였다. 시료 1 mL에 5% NaNO_2 0.15 mL를 혼합하여 실온에서 6분간 반응시킨 후 10% AlCl_3 0.3 mL와 혼합하여 다시 실온에서 5분간 반응시키고, 1 N NaOH 1 mL와 혼합한 다음 분광광도계(Ultrospec 2100 pro, Biochrom Ltd.)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 rutin(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

페놀 화합물 함량

페놀 화합물 함량을 측정하기 위해 HPLC(high performance liquid chromatography, Waters 2695, Waters Co., Milford, MA, USA)를 이용하여 분석하였으며, 시료는 증류수에 희석하여 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 제조하여 0.45 μm syringe filter로 여과 후 분석용 시료로 사용하였다. 컬럼은 Kintex[®] C18 100 Å 컬럼(5 μm , 4.6 mm $\times$ 100 mm, Phenomenex Co., Torrance, CA, USA)을 사용하여 온도를 30°C 로 조절하였다. 검출기는 photodiode array detector(Water 2996, Waters Co.)를 사용하였으며 330 nm에서 측정하였다. 유속은 1 mL/min로 설정하여 10 μL 시료를 주입하며 분석하였다. 분석용 용매는 water:formic acid (99.5:0.5, v/v)(A)와 100% acetonitrile(B)을 사용하였으며, (B)를 기준으로 0~30 min, gradient 18~30%; 30~40 min, isocratic 30%; 41~60 min, isocratic 18% 조건으로 분석하였다. 페놀 화합물의 표준물질은 rosmarinic acid(Sigma-Aldrich Co.), acacetin(Sigma-Aldrich Co.), tilianin(Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd., Chengdu, China)으로 농도별로 표준정량곡선을 작성하여 분석하였다.

ORAC(oxygen radical absorbance capacity) 측정

ORAC는 Ou 등(2001)의 방법을 참고하여 측정하였다. 배초향 분획물 동결건조 분말 및 Trolox를 농도별로 희석하였으며, 실험용 시료의 제조에는 중성 phosphate buffer (61.6:38.9, v/v, 75 mM NaH_2PO_4)를 사용하였다. 검량곡선 작성을 위해 Trolox(water soluble analogue of vitamin E, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carbox-

ylic acid, Sigma-Aldrich Co.) 10 μ L를 50 mL phosphate buffer에 용해하여 제조하였으며, 측정기기는 fluorescent micro plate reader(Infinite M200 PRO, Tecan Co., Salzburg, Austria)를 사용하여 485 nm에서 전자가 여기 excitation되고 538 nm에서 emission되게 조절한 다음(Kim과 Kim, 2007) 37°C에서 90분간 3분마다 fluorescence의 감소율을 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성

DPPH 라디칼 소거 활성은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)의 환원력을 이용하여 측정하였다(Blois, 1958). 즉, DPPH reagent는 DPPH(Sigma-Aldrich Co.) 12 mg을 99.9% 에탄올 100 mL에 용해한 후 증류수 100 mL를 첨가하여 흡광도 517 nm에서 약 1.5로 조정하여 제조하였다. 시료 0.5 mL에 DPPH reagent 5 mL를 혼합하여 실온에서 15분간 반응시킨 후 분광광도계(Ultrospec 2100 pro, Biochrom Ltd.)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 시료의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

DPPH radical scavenging activity (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{Sample}_{\text{absorbance } 517 \text{ nm}}}{\text{Control}_{\text{absorbance } 517 \text{ nm}}}\right) \times 100$$

ABTS 라디칼 소거 활성

ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) 라디칼 소거 활성은 양이온(ABTS⁺)에 대한 항산화 물질의 소거능을 이용하여 측정하였다(Re 등, 1999). ABTS reaction mixture는 7.4 mM ABTS(Sigma-Aldrich Co.)와 2.6 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺를 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.03이 되게 증류수를 사용하여 희석하였다. 시료 50 μ L에 ABTS reaction mixture 950 μ L를 첨가하여 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시킨 다음 분광광도계(Infinite 200 PRO, Tecan Co.)를 이용하여 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거 활성은 시료의 첨가 전과 후의 차이를 아래와 같이 백분율로 나타내었다.

ABTS radical scavenging activity (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{Sample}_{\text{absorbance } 732 \text{ nm}}}{\text{Control}_{\text{absorbance } 732 \text{ nm}}}\right) \times 100$$

FRAP(ferric reducing antioxidant power) 활성

FRAP는 Benzie와 Strain(1996)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. FRAP reagent는 25 mL acetate buffer(300 mM, pH 3.6)를 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ, Sigma-Aldrich Co.) 2.5 mL와 20 mM ferric chloride(FeCl₃·6H₂O) 2.5 mL를 첨가하여 제조하였으며, 37°C에서 10분 이상 반응시

켜 사용하였다. 시료 25 μ L에 제조된 FRAP reagent 175 μ L를 넣고 37°C 암소에서 30분간 반응시킨 후 분광광도계(Infinite 200 PRO, Tecan Co.)를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP는 FeSO₄·7H₂O(Sigma-Aldrich Co.)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 저해 활성은 Kameyama 등(1993)의 방법을 참고하여 측정하였다. 96 well plate에 시료 100 μ L, 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 40 μ L, 5 mM L-DOPA 40 μ L 및 mushroom tyrosinase(2,000 U/mL, Sigma-Aldrich Co.) 20 μ L를 첨가한 후 37°C에서 10분간 배양하여 생성된 DOPA chrome를 multi microplate reader(Infinite M200 PRO, Tecan Co.)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 시료 무첨가군과 비교하여 아래의 식과 같이 계산하였다.

Tyrosinase inhibitory activity (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{Sample}_{\text{absorbance } 490 \text{ nm}}}{\text{Control}_{\text{absorbance } 490 \text{ nm}}}\right) \times 100$$

Elastase 저해 활성

Elastase 저해 활성은 Kraunsoe 등(1996)의 방법을 참고하여 측정하였다. 96 well plate에 시료 20 μ L와 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 200 μ L 및 1 mM N-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide(Sigma-Aldrich Co.) 20 μ L를 순차적으로 첨가한 후 25°C에서 10분간 반응시킨 다음 elastase from porcine pancreas(1 U/mL, Sigma-Aldrich Co.) 20 μ L를 첨가하여 25°C에서 20분간 반응시켰다. 그 후 multi microplate reader(Infinite M200 PRO, Tecan Co.)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 저해 활성은 시료 무첨가군과 비교하여 아래의 식과 같이 계산하였다.

Elastase inhibitory activity (%) =

$$\left(1 - \frac{\text{Sample}_{\text{absorbance } 405 \text{ nm}}}{\text{Control}_{\text{absorbance } 405 \text{ nm}}}\right) \times 100$$

Collagenase 저해 활성

Collagenase 저해 활성은 Wunsch와 Heidrich(1963)의 방법을 이용하여 측정하였다. 4 mM CaCl₂를 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 첨가하여 buffer를 제조하였으며 collagenase chromophore-substrate(0.3 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.)를 용해한 기질액 0.25 mL 및 시료 0.1 mL를 첨가 후, collagenase(0.2 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.)를 0.15 mL 첨가하여 상온에서 20분간 반응시켰다. 반응 후 6% citric acid 0.5 mL를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 ethyl acetate 1.5 mL를 첨가하고 상등액을 회수하여 분광광도계(Ultrospec 2100 pro, Biochrom Ltd.)를 사용하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해 활성

은 시료 무첨가군과 비교하여 아래의 식과 같이 계산하였다.

$$\text{Collagenase inhibitory activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Sample}_{\text{absorbance } 320 \text{ nm}}}{\text{Control}_{\text{absorbance } 320 \text{ nm}}}\right) \times 100$$

세포주 배양

인간 폐 상피세포(L-132) 및 멜라노마 세포주인 B16F10은 한국세포주은행(KTCC, Seoul, Korea)에서, 진피섬유아 세포주인 HS68은 ATCC(American type culture collection)에서 분양받아 DMEM 배지(Welgene Co., Daegu, Korea)에 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA) 및 2% penicillin-streptomycin(Gibco BRL Co.)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂로 조절된 incubator(MCO-18AIC, Sanyo Electric Biomedical Co., Osaka, Japan)에서 배양하였다.

세포 독성

L-132, B16F10 및 HS68 세포의 세포 독성은 MTT assay(van Merrlo 등, 2011)로 측정하였으며, 배양된 세포를 각각 1×10⁴ cells/well의 농도로 조정하여 96 well plate에 100 µL씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 24시간 배양하고 이후 새로운 배지에 시료를 농도별로 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 PBS 완충용액에 녹인 5 mg/mL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT; Sigma-Aldrich Co.) 용액을 각 well에 10 µL씩 첨가하고 다시 4시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 이후 상등액을 완전히 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO; Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan) 100 µL를 각 well에 첨가하여 10분간 반응시켜 formazan 결정을 완전히 용해한 다음 multi microplate reader(Infinite M200 PRO, Tecan Co.)를 이용하여 흡광도 540 nm에서 측정하였다.

산화적 손상에 대한 세포재생 및 보호 효과

L-132 세포를 이용한 산화적 손상에 대한 세포재생 및 세포보호 효과는 Hwang(2003)의 방법에 따라 측정하였다. 배양된 세포주를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 100 µL 첨가하여 24시간 배양한 다음 세포재생의 경우 새로운 배지로 교환 및 H₂O₂를 10 µL 처리하여 12시간 배양 후 시료를 10 µL 처리하였고, 세포보호의 경우 새로운 배지로 교환 후 12시간 배양하여 H₂O₂와 시료를 각각 10 µL 처리하여 12시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 PBS 완충용액에 녹인 MTT 용액(5 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.)을 각 well에 10 µL 첨가하고 4시간 동안 배양하여 MTT가 환원되게 하였다. 이후 상등액을 모두 제거하고 DMSO(Junsei Chemical Co.) 100 µL를 각 well에 첨가한 다음 10분간 반응시켜 완전히 용해된 formazan 결정을 multi microplate reader(Infinite M200 PRO, Tecan Co.)를 이용하여

540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

UVB 조사에 대한 세포보호 효과

UVB 조사에 대한 HS68 세포의 세포보호 효과는 Quan 등(2001)의 방법에 따라 측정하였다. 24 well plate에 3×10⁵ cells/well의 농도로 1 mL 첨가하여 24시간 배양 후 배지 제거 및 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 3회 세척하였다. 세척 및 PBS 제거 후 0.2 mL PBS를 첨가하여 UVImeterTM(VLX-3W, UVITEC, Gwangmyeong, Korea)를 사용해 80 mJ/cm²로 조사하고 시료 0.1 mL 첨가 후 48시간 동안 배양하였다. 그 후 PBS 완충용액에 녹인 MTT 용액(5 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.)을 0.1 mL 첨가하여 MTT가 환원되도록 4시간 배양 후 상등액 제거 및 0.4 mL DMSO(Junsei Chemical Co.)를 첨가하여 완전히 용해된 formazan 결정을 multi microplate reader(Infinite M200 PRO, Tecan Co.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

α-MSH 유도에 의한 tyrosinase 활성 및 melanin 함량

B16F10 세포 내 tyrosinase 활성 및 melanin 함량은 Martinez-Esparsa 등(1998)의 방법을 이용하여 측정하였다. 배양한 B16F10 세포를 24 well plate에 3×10⁵ cells/well의 농도로 1 mL 첨가하여 24시간 배양 후 배지교환 및 α-MSH와 시료를 각각 0.1 mL 처리하여 5일간 배양하였다. 배양 후 배지 제거 및 0.2 mL PBS(pH 7.4)로 3회 세척 후 lysis buffer(1% Triton X-100 in PBS)를 0.2 mL 첨가하여 세포 용해 후 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. Tyrosinase 활성은 상등액 60 µL에 0.05% L-DOPA 40 µL를 첨가하여 37°C, 5% CO₂로 조절된 incubator(MCO-18AIC, Sanyo Electric Biomedical Co.)에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 multi microplate reader(Infinite M200 PRO, Tecan Co.)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Melanin 함량은 원심분리하여 상등액을 제거한 세포 pellet에 10% DMSO(Junsei Chemical Co.)를 함유한 1 N NaOH를 0.35 mL 첨가하여 60°C에서 1시간 동안 반응시켜 세포 내 melanin을 용해시켰다. 용해된 melanin을 multi microplate reader(Infinite M200 PRO, Tecan Co.)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험결과는 IBM SPSS Statistics(19.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용한 일원배치 분산분석(One-way ANOVA test)을 실시하였고 각 측정 평균값의 유의성(*P*<0.05)은 Duncan's multiple range test를 실시하여 검

Table 1. Total polyphenol, total flavonoid contents, and ORAC value of various fractions from *Agastache rugosa*

Sample ¹⁾	Total polyphenol (TA ²⁾ , g/100 g)	Total flavonoid content (Rutin, g/100 g)	ORAC value ³⁾ (Trolox, µM TE/g FW)
HF	2.32±0.13 ^{d4)}	16.52±1.34 ^c	115.43±4.94 ^{bc}
CF	3.90±0.09 ^c	11.62±0.58 ^d	117.43±6.58 ^{bc}
EF	27.79±0.31 ^a	39.00±2.33 ^a	129.33±6.77 ^a
BF	9.38±0.18 ^b	21.95±1.34 ^b	124.05±4.58 ^{ab}
WF	2.58±0.13 ^d	11.59±0.95 ^d	111.51±3.96 ^c

¹⁾HF, *n*-hexane fraction of *Agastache rugosa*; CF, chloroform fraction of *Agastache rugosa*; EF, ethyl acetate fraction of *Agastache rugosa*; BF, *n*-butanol fraction of *Agastache rugosa*; WF, water fraction of *Agastache rugosa*.

²⁾TA, tannic acid.

³⁾ORAC, oxygen radical absorbance capacity.

⁴⁾Means±SD (n=3) with different letters (a-d) within a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

정하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

배초향 분획물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정 결과는 Table 1에 나타내었다. 총 폴리페놀 함량의 경우 *n*-hexane 분획물에서 2.32±0.13 g/100 g으로 가장 낮은 함량을 나타내었으나, ethyl acetate 분획물에서 27.79±0.31 g/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 water 분획물에서 11.59±0.95 g/100 g으로 가장 낮은 함량을 나타낸 반면, ethyl acetate 분획물에서 39.00±2.33 g/100 g으로 유의적으로 높은 함량을 나타내었다($P<0.05$). Kim 등(2017)은 배초향 ethyl acetate 분획물에서 185.50±10.90 mgGAE/g으로 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다고 보고하였다. 총 폴리페놀 함량은 산화방지 능력을 기반으로 측정하는 방법으로 함량이 높을수록 항산화능이 우수하다는 것을 의미한다(Bray와 Thorpe, 1954). 또한 플라보노이드는 그 구조에 따라 항산화 및 항균성 등 다양한 생리활성을 갖는 것으로 보고되었으며(Middleton과 Kandaswami, 1994), 본 연구에서는 총 플라보노이드 함량이 총 폴리페놀 함량보다 높게 나타났는데 이는 배초향 지상부에 함유된 플라보노이드 성분이 용매 분획 시 용매 친화성에 따라 폴리페놀 성분보다 잘 용출되어 나타난 결과로 사료된다(Kim 등, 2012a).

식물유래 페놀성 화합물은 식물체에 널리 분포되어 있으며 다양한 구조와 분자량을 가지고 페놀성 화합물의 phenolic hydroxyl기가 단백질과 같은 거대분자와의 결합을 통해 항산화, 항암 및 항균 등의 다양한 생리활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있다(Rice-Evans 등, 1997). 폴리페놀계 화합물들은 자유라디칼을 안정화시킬 수 있는 페놀 고리를 가지고 있어 우수한 항산화력을 가지며 저극성 용매인 ethyl acetate로 분획 시 플라보노이드와 알칼로이드가 분리되며 페놀성 화합물의 경우 중간 극성을 가지고 있어 ethyl acetate 분획물에서 용출이 용이하다고 알려져 있다(Kim 등, 2012a; Kim 등, 2019a).

페놀 화합물 함량

배초향에 함유되어 있는 페놀계 생리활성 물질인 tilianin, acacetin 및 rosmarinic acid에 대한 분획물 내 페놀 화합물 함량은 Table 2와 같으며 ethyl acetate 분획물에서 가장 높은 함량을 나타내었다. Tilianin의 경우 ethyl acetate 및 *n*-hexane 분획물에서 각각 0.87±0.09 및 0.61±0.18 g/100 g으로 높은 함량을 나타냈으며($P<0.05$) water 분획물에서는 검출되지 않았다. Acacetin은 ethyl acetate 분획물에서 0.37±0.05 g/100 g으로 가장 높게 분석되었고($P<0.05$), chloroform 및 *n*-butanol 분획물에서는 미량 분석되었으며 water 분획물에서는 검출되지 않았다. 배초향의 대표적인 생리활성을 나타내는 물질인 rosmarinic acid는 폴리페놀 화합물로서 총 폴리페놀 함량이 가장 높게 분석된

Table 2. Phenolic compounds of various fractions from *Agastache rugosa*

Sample ¹⁾	Phenolic compounds (g/100 g)			
	Tilianin	Acacetin	Rosmarinic acid	Total
HF	0.61±0.18 ^{b2)}	0.10±0.00 ^b	0.42±0.04 ^c	1.13±0.22 ^c
CF	0.18±0.01 ^d	0.01±0.00 ^c	ND ³⁾	0.19±0.01 ^d
EF	0.87±0.09 ^a	0.37±0.05 ^a	4.38±0.03 ^a	5.62±0.17 ^a
BF	0.44±0.07 ^c	0.01±0.00 ^c	1.08±0.04 ^b	1.53±0.11 ^b
WF	ND	ND	0.28±0.02 ^d	0.28±0.02 ^d

¹⁾HF, *n*-hexane fraction of *Agastache rugosa*; CF, chloroform fraction of *Agastache rugosa*; EF, ethyl acetate fraction of *Agastache rugosa*; BF, *n*-butanol fraction of *Agastache rugosa*; WF, water fraction of *Agastache rugosa*.

²⁾Means±SD (n=3) with different letters (a-d) within a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

³⁾Not detected.

ethyl acetate 분획물에서 높은 함량(4.38 ± 0.03 g/100 g)을 나타내었다($P < 0.05$). Kim 등(2017)은 배초향 70% 에탄올 추출물을 사용하여 *n*-hexane, ethyl acetate 및 *n*-butanol 분획물 제조 후, ethyl acetate 분획물을 HPLC를 통해 분석한 결과, rosmarinic acid가 검출되었으며 배초향 ethyl acetate 분획의 강력한 산화방지를 나타내는 주요 활성 성분 중의 하나로 제시하여 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 페놀 화합물 함량이 높게 나타난 ethyl acetate 분획물의 항산화 활성 및 생리활성이 우수할 것으로 사료된다.

항산화 활성

ORAC 값은 AAPH에 의해 생성된 라디칼의 소멸에 따른 fluorescent의 감소율을 측정하는 원리를 사용하며, 식품에 존재하는 소수성 성분과 친수성 성분에 모두 반응하여 항산화능 분석에 응용할 수 있는 범위가 넓다는 장점을 가지고 있다(Kim과 Kim, 2007). 배초향 분획물의 ORAC 측정 결과는 Table 1에 나타내었으며, ethyl acetate 및 *n*-butanol 분획물(1,000 µg/mL)에서 각각 129.33 ± 6.77 및 124.05 ± 4.58 µM TE/g로 우수한 활성을 나타내었는데($P < 0.05$), 이는 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정 결과와 유사한 경향을 보였다. 본 연구에서 배초향 분획물의 ORAC 측정 결과는 Kim 등(2018)의 약용식물로 사용되는 소리쟁이 뿌리 분획물의 ORAC 값 측정 결과 ethyl acetate 분획물에서 높은 항산화 활성을 나타냈다는 보고와 유사한 경향을 보였다.

배초향 분획물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성 및 FRAP 활성은 Fig. 1과 같다. 항산화 활성은 모든 시료 처리구에서 농도 의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 다른 군에 비해 ethyl acetate 분획물 500 µg/mL 농도에서 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성 및 FRAP 활성은 각각 $89.89 \pm 1.03\%$, $85.31 \pm 0.61\%$ 및 2.05 ± 0.06 µM로($P < 0.05$) 가장 우수함을 확인하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 음이온 라디칼을, ABTS 라디칼 소거 활성은 양이온 라디칼을 생성하며, FRAP 활성은 화합물의 환원력을 측정하는 방법으로 식품의 항산화 활성 측정에 많이 사용되고 있다(Kwak과 Choi, 2015). Park 등(2010)은 울금 분획물의 항산화 활성에서 ethyl acetate 분획물이 IC₅₀ 8.01 µg/mL(ascorbic acid의 IC₅₀ 10.76 µg/mL)로 가장 우수한 활성을 나타내었다고 보고하였으며, Kim 등(2012b)은 약용식물인 곤달비 잎 분획물의 항산화 활성 측정 결과 ethyl acetate 분획물의 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성 및 FRAP 활성이 0.28 ± 0.01 mg/mL, $96.67 \pm 0.15\%$ 및 2.70 ± 0.03 mM로 가장 높게 측정되었다고 보고하였는데, 이는 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

항산화 활성 측정 결과 총 폴리페놀 함량과 유사한 경향을 나타내었으며, Seo 등(1999)과 Lee 등(2004)은 각 분획물의 총 폴리페놀 함량 증가에 따라 항산화 활성도 증가한다고 보고하였다. 식물의 항산화 활성은 식물체 내에 존재하는

페놀성 화합물의 함량에 영향을 받으며(Li 등, 2008), 전자공여능은 phenolics acid, 플라보노이드 및 페놀성 물질에 대한 항산화 작용의 지표로서 환원력이 클수록 전자공여능이 높다고 보고되었다(Kang 등, 1996). 식물 내에 존재하는 생리활성 물질인 페놀 화합물 및 플라보노이드 함량에 따라 항산화 활성과 생리활성이 증가하며(Jin 등, 2016), 우수한 항산화 활성을 나타낸 ethyl acetate 분획물에서 생리활성 또한 높게 나타난 것으로 사료된다.

효소 저해 활성

배초향 분획물의 피부미백 활성에 대한 tyrosinase 저해능을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Tyrosinase는 멜라닌 합성효소로서 melanosome 내에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase이며, DOPA를 산화시켜 DOPA quinone을 만드는 DOPA oxidase로 작용하여 멜라닌 중합체를 합성하는 데 중요한 효소이다(Hearing과 Jimenez, 1987). 따라서 이 효소의 활성 억제 정도를 측정함으로써 미백 성분의 함유 정도 및 효능을 검증할 수 있다. Tyrosinase 저해 활성 측정 결과 $2.80 \pm 2.39 \sim 33.16 \pm 1.54\%$ 로 모든 시료에서 농도 의존적으로 활성이 증가하였으며, 특히 ethyl acetate 분획물(1,000 µg/mL)에서 $33.16 \pm 1.54\%$ 로 가장 높은 저해 활성을 나타냈다(Fig. 2A, $P < 0.05$). 여러 가지 식물체 내에 존재하는 페놀성 화합물은 tyrosinase의 기질인 티로신과 구조적으로 유사하여 기질 유사체의 역할을 함으로써 tyrosinase 활성을 저해하며(Boissy와 Manga, 2004; Sugumaran, 2002), 페놀성 화합물과 tyrosinase 저해 활성 사이의 높은 상관관계가 보고되었다(Han 등, 2008). 따라서 다양한 종류의 식물로부터 tyrosinase 활성 억제작용을 나타내는 물질을 분리하여 이용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Jung 등, 1995).

Elastin은 피부조직에 탄력을 유지하는 역할을 하며, 피부의 진피 속에 콜라겐과 그물망 구조로 형성되어 있다. Elastase는 elastin을 분해하는 효소로 활성이 높으면 콜라겐을 비특이적으로 분해하여 피부의 그물망 구조 결함을 줌으로써 주름생성의 원인이 되고, 이러한 elastase 저해제는 피부 주름개선 작용을 나타낸다. 또한 collagenase는 콜라겐을 분해하는 효소로 피부탄력을 저하시켜 노화를 촉진한다고 알려져 있다. 배초향 분획물의 elastase 저해 활성 및 collagenase 저해 활성은 Fig. 2의 B와 C에 나타내었다. 배초향 분획물 100~1,000 µg/mL 농도로 처리한 결과 모든 시료 처리구에서 농도 의존적으로 활성이 증가하였으며, ethyl acetate 분획물 1,000 µg/mL 농도에서 각각 $27.33 \pm 1.82\%$, $32.94 \pm 1.52\%$ 로 가장 높은 저해 활성을 나타내었다($P < 0.05$). 본 연구는 Ahn 등(2009)이 꿀꿀과인 라벤더 분획물의 elastase 저해 활성 측정에서 ethyl acetate 분획물에서 가장 높은 저해능을 나타내었다는 결과와 유사한 경향이었다. 또한 Kim 등(2010a)은 한방에서 사용되어온 섬쑥부쟁이 분획물의 주름개선 효과를 측정한 결과 ethyl ace-

Fig. 1. DPPH radical scavenging activity (A), ABTS radical scavenging activity (B), and FRAP activity (C) of fractions from *Agastache rugosa*. HF, *n*-hexane fraction of *Agastache rugosa*; CF, chloroform fraction of *Agastache rugosa*; EF, ethyl acetate fraction of *Agastache rugosa*; BF, *n*-butanol fraction of *Agastache rugosa*; WF, water fraction of *Agastache rugosa*. Means±SD (n=3) with different letters (a-m) above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

tate 분획물에서 가장 높은 저해 활성을 나타내어 본 연구와 유사한 경향을 보여주었으며 water 분획물에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다고 보고하였다.

MMP-2 및 MMP-9은 gelatinase로서 피부세포에서 UVB에 의해 과도하게 발현되고 피부 노화의 가속화 및 피부암 발병에 기여하며, Oh 등(2016)은 배초향 열수추출물 처리군 (200 µg/mL)이 UVB로 유도된 proMMP-2 및 proMMP-9의 활성을 비처리군 대비 각각 69.80% 및 24.00% 감소시켜 배초향의 주름개선 효과를 보고하여 본 연구와 유사한 경향을 나타내었다.

산화적 손상에 대한 세포재생 및 세포보호 효과

과산화수소(H_2O_2)는 세포 내에서 원형질막의 통과가 용이하여 산화적 손상을 주는 독성물질로 사용되며 세포 소기관의 과산화 및 DNA 돌연변이 등을 유발하여 세포사멸을 야기시킨다. 따라서 인간 폐 상피세포주인 L-132세포를 이용하여 배초향 분획물(50~250 µg/mL 농도) 및 5 mM H_2O_2 를 처리하여 산화적 손상에 대한 세포재생 및 세포보호 효과를 확인하였으며 Fig. 3에 나타내었다. 분획물은 세포 독성을 나타내지 않는 50~250 µg/mL 농도에서 실험을 진행하였다(Fig. 3A). 세포재생 효과(Fig. 3B)는 $48.10\pm3.44\sim76.64\pm0.88\%$ 로 5 mM H_2O_2 처리군(48.34%) 대비 유의적

Fig. 2. Tyrosinase inhibitory (A), elastase inhibitory (B), and collagenase inhibitory activity (C) of fractions from *Agastache rugosa*. HF, *n*-hexane fraction of *Agastache rugosa*; CF, chloroform fraction of *Agastache rugosa*; EF, ethyl acetate fraction of *Agastache rugosa*; BF, *n*-butanol fraction of *Agastache rugosa*; WF, water fraction of *Agastache rugosa*. EGCG means Epigallocatechin gallate. Means±SD (n=3) with different letters (a-k) above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

인 활성 증가를 나타내었다($P<0.05$). 세포보호 효과(Fig. 3C)는 $62.81\pm1.94\sim74.13\pm2.16\%$ 로 5 mM H_2O_2 처리구 (55.06%) 대비 활성이 유의적으로 증가하였다($P<0.05$). 특히 ethyl acetate 분획물에서 가장 높은 생존율을 나타내었고, water 분획물에서는 세포보호 효과에 대해 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 배초향 분획물에 함유된 폴리페놀 화합물 및 항산화 성분이 세포 내 산화적 스트레스에 대한 효과를 보인 것으로 사료되며, 따라서 높은 폴리페놀 함량 및 항산화 활성을 나타낸 ethyl acetate 분획물에서 높은 세포재생 및 세포보호 효과를 나타낸 것으로 사료된다. 본 연구는 Song 등(2018)과 Yun 등(2018)의 연구에

서 제시한 식물유래 분획물의 항산화 활성 및 산화적 손상에 대한 세포보호 효과 측정 결과 ethyl acetate 분획물에서 높은 활성을 나타내었다는 보고와 유사한 경향을 보였다.

피부미백 및 주름개선 효과

B16F10세포를 이용하여 배초향 분획물의 α -MSH 유도에 의한 tyrosinase 활성 및 melanin 함량을 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. α -MSH는 표피세포의 성장과 증식 및 면역 조절 등 다양한 생리적 기능에 관여하는 호르몬으로 세포막 수용체와 결합하여 tyrosinase 활성 등을 통해 melanin 생성을 증가시켜 tyrosinase 유전자의 발현을 촉진시키는 물

Fig. 3. Cell viability (A), regeneration effects (B) and protective effects (C) against H₂O₂ (5 mM) induced oxidative damage in L-132 cell line of fractions from *Agastache rugosa*. HF, *n*-hexane fraction of *Agastache rugosa*; CF, chloroform fraction of *Agastache rugosa*; EF, ethyl acetate fraction of *Agastache rugosa*; BF, *n*-butanol fraction of *Agastache rugosa*; WF, water fraction of *Agastache rugosa*. Means $\pm$ SD (n=3) with different letters (a-k) above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

질로 보고되었다(Ryu 등, 2007; Hunt 등, 1994; Busca 등, 1998). 용매별 분획물 50~250 µg/mL 농도에서 세포 독성을 나타내지 않음을 확인 후 실험을 진행하였다(Fig. 4A). 모든 시료 처리구에서 농도 의존적으로 tyrosinase 활성 및 melanin 함량이 감소하였으며, *n*-butanol 분획물 250 µg/mL에서 각각 $83.04 \pm 7.13\%$ 및 $90.00 \pm 1.85\%$ 로 가장 높은 함량을 나타낸 반면, ethyl acetate 분획물 250 µg/mL에서 각각 $73.73 \pm 1.23\%$ 및 $81.69 \pm 2.37\%$ 로 가장 낮은 함량을 나타내었다(Fig. 4B, 4C) ($P < 0.05$). Kim(2017)은 약콩 ethyl acetate 분획물의 melanin 함량 측정 결과 가장 낮은 함량을 나타냈다고 보고하였으며, tyrosinase의 단백질 발현

억제 효과는 ethyl acetate 분획물에서 melanin 합성 관련 단백질의 발현을 감소시킨다고 보고하였다. Lee 등(2016)은 배초향 메탄올 추출물을 이용하여 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate 및 water 분획물을 제조하였으며, Melan-a 세포에서 멜라닌 합성을 저해시킨 ethyl acetate 분획물을 통해 demethyleugenol β -glucopyranoside 화합물을 분리하여 이들의 mRNA 수준의 tyrosinase, TRP-1, DCT, MITF 및 SOX9에 대한 RT-PCR 결과, 분리된 화합물 10 µM 농도에서 Melan-a 세포의 SOX9를 포함한 멜라닌생성 유전자를 유의적으로 억제시켰다고 보고하였다. 식물체 유래 폴리페놀 화합물은 천연 항산화 물질로 알려져 있으며,

Fig. 4. Cell viability (A), tyrosinase activities (B) and melanin contents (C) in B16F10 cell line of fractions from *Agastache rugosa*. HF, *n*-hexane fraction of *Agastache rugosa*; CF, chloroform fraction of *Agastache rugosa*; EF, ethyl acetate fraction of *Agastache rugosa*; BF, *n*-butanol fraction of *Agastache rugosa*; WF, water fraction of *Agastache rugosa*. Means $\pm$ SD ($n=3$) with different letters (a-i) above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

치환 가능한 수산기와 카르복실기를 함유한 방향족 고리구조를 가지고 있어 항산화 작용 및 그에 따른 피부미백 효과가 알려져 있다(Hirota 등, 2000). 배초향의 대표적인 생리활성 물질로 알려진 rosmarinic acid는 폴리페놀 화합물로 최근 tyrosinase 억제 활성 및 피부미백 효과가 보고되었으며(Kang과 Yoo, 2009), 본 연구에서 높은 함량을 나타낸 ethyl acetate 분획물의 피부미백 효과 또한 높게 나타난 것으로 사료된다.

배초향 분획물의 피부 주름개선 효과 측정을 위해 HS68 세포의 세포 독성 및 UVB 조사에 대한 세포보호 효과를 Fig. 5에 나타내었다. 배초향 분획물 50~250 µg/mL 농도

로 처리한 결과 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다. 모든 시료 처리구간에서 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하였으며, ethyl acetate 분획물 250 µg/mL 농도에서 UVB를 조사한 대조군(61.23%)에 비해 $72.26 \pm 1.74\%$ 로 높은 세포보호 효과를 나타내었다($P<0.05$). Seo 등(2019)은 UVB 처리한 HS68 세포에서 배초향 추출물의 광노화저해 활성을 평가하였으며, 배초향 추출물은 UVB로 인한 산화적 스트레스를 감소시켜 콜라겐 유전자 발현 및 생산을 증가시키고 type-I procollagen을 활성화하여 피부 광노화를 저해시키는 효과가 있다고 보고하였다. Tilianin은 플라보노이드 계통 화합물인 acacetin의 배당체이며, 플라보

Fig. 5. Cell viability (A) and protective effects on the UVB-induced cytotoxicity (B) in HS68 cell line of fractions from *Agastache rugosa*. HF, *n*-hexane fraction of *Agastache rugosa*; CF, chloroform fraction of *Agastache rugosa*; EF, ethyl acetate fraction of *Agastache rugosa*; BF, *n*-butanol fraction of *Agastache rugosa*; WF, water fraction of *Agastache rugosa*. Means±SD (n=3) with different letters (a-k) above bars are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

노이드 화합물은 항산화 효과 및 피부 주름개선 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Lee 등, 2013). Jeong(2015)은 acacetin이 자외선에 의해 유도된 MMP-1 단백질과 mRNA의 발현을 억제하여 피부 주름을 억제한다고 보고하였다.

요 약

본 연구에서는 배초향 70% 에탄올 추출물을 분획하여 용매의 극성에 따라 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol 및 water 분획물을 제조하여 항산화, 피부미백 및 주름개선 효과를 조사하였다. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 ethyl acetate 분획물에서 각각 27.79 g/100 g 및 39.00 g/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 페놀 화합물 측정 결과 ethyl acetate 분획물에서 rosmarinic acid 함량이 4.38 g/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. Ethyl acetate 분획물의 DPPH 라디칼 소거 활성, ABTS 라디칼 소거 활성 및 FRAP 활성은 500 µg/mL에서 각각 89.89%, 85.31% 및 2.05 mM이며, ethyl acetate 분획물의 ORAC 값은 1,000 µg/mL에서 129.33 µM TE/g으로 가장 높은 활성을 나타내었다. Tyrosinase, elastase 및 collagenase 저해 활성은 ethyl acetate 분획물이 1,000 µg/mL에서 각각 33.16%, 27.33% 및 32.94%로 가장 높았다. L-132세포를 이용하여 산화적 손상에 대한 세포재생

및 세포보호 효과를 확인하였으며 ethyl acetate 분획물에서 가장 높은 세포 재생 및 세포보호 효과를 나타내었다. 분획물의 피부미백 효과는 B16F10 세포를 이용하여 tyrosinase 활성 및 melanin 함량 측정 결과 ethyl acetate 분획물에서 가장 낮은 함량을 나타내었으며, HS68 세포를 이용하여 UVB 조사에 대한 세포보호 효과는 ethyl acetate 분획물에서 가장 우수하였다. 본 연구 결과를 종합해볼 때, 배초향 분획물의 다양한 세포 내 기전을 통해 항산화 활성, 피부미백 및 주름개선 효과가 있음을 확인하였으며, 또한 ethyl acetate 분획물에 다량 함유된 rosmarinic acid는 다양한 생리활성을 나타내는 폴리페놀 화합물로서 향후 기능성 식품 소재로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Ahn YJ, Won BR, Kang MK, Kim JH, Park SN. Antioxidant activity and component analysis of fermented *Lavandula angustifolia* extracts. J Soc Cosmet Scientists Korea. 2009. 2: 125-134.
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FARP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem. 1996. 239:70-76.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1958. 181:1199-1200.
- Boissy RE, Manga P. On the etiology of contact/occupational vitiligo. Pigment Cell Res. 2004. 17:208-214.

- Bray HG, Thorpe WV. Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. *Method Biochem Anal.* 1954. 1:27-52.
- Busca R, Bertolotto C, Abbe P, Englaro W, Ishizaki T, Narumiya S, et al. Inhibition of Rho is required for cAMP-induced melanoma cell differentiation. *Mol Biol Cell.* 1998. 9:1367-1378.
- Chen JH, Ho CT. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J Agric Food Chem.* 1997. 45:2374-2378.
- Cuvelier ME, Richard H, Berset C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J Am Oil Chem Soc.* 1996. 73:645-652.
- Han DS, Kim YC, Kim SE, Ju HS, Byun SJ. Studies on the diterpene constituent of the root of *Agastache rugosa* O. Kuntze. *Kor J Pharmacogn.* 1987. 18:99-102.
- Han J, Sung J, Kim DJ, Jeong HS, Lee J. Inhibitory effect of methanol extract and its fractions from grape seeds on mushroom tyrosinase. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2008. 37:1679-1683.
- Hearing VJ, Jimenez M. Mammalian tyrosinase—The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int J Biochem.* 1987. 19:1141-1147.
- Hirota A, Taki S, Kawaii S, Yano M, Abe N. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean miso and antiproliferative activity of isoflavone from soybean miso toward the cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000. 64:1038-1040.
- Hong MJ, Kim JH, Kim HY, Kim MJ, Kim SM. Chemical composition and biological activity of essential oil of *Agastache rugosa* (Fisch. & C. A. Mey.) O. Kuntze. *Korean J Med Crop Sci.* 2020. 28:95-110.
- Hunt G, Todd C, Cresswell JE, Thody AJ. Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle⁴D-Phe⁷ alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J Cell Sci.* 1994. 107:205-211.
- Hwang EG. Protective effects of α -tocopherol and captopril against hydrogen peroxide-induced apoptosis on human lung epithelial cell line L-132. Dissertation. Kyung Hee University, Seoul, Korea. 2003.
- Jeong EH. Safflower seed oil and its active compound acacetin protect against UVB-induced skin photoaging *in vitro*. Master's thesis. Seoul National University, Seoul, Korea. 2015.
- Jin DH, Lee YG, Seong JH, Kim HS. Comparison of bioactivities and antioxidant activities of acai berry (*Euterpe oleracea* Mart.) by different extraction solvents. *J Korean Oil Chemists Soc.* 2016. 33:741-750.
- Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han DS. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J Food Sci Technol.* 1995. 27: 891-896.
- Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishiyama S, et al. Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPACHrome tautomerase (TRP2), and a melanogenic inhibitor. *J Invest Dermatol.* 1993. 100:126-131.
- Kang JR, Yoo SM. Tyrosinase inhibitory activity of rosmarinic acid on human skin melanoma cells treated with hydrogen peroxide. *Lab Anim Res.* 2009. 25:95-100.
- Kang YH, Park YK, Lee GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol.* 1996. 28:232-239.
- Kim B, Han YE, Lee HJ. Antioxidant and anti-inflammatory effects of the ethyl acetate fraction of the *Agastache rugosa* extract. *Korean J Food Sci Technol.* 2017. 49:331-337.
- Kim BA. Inhibitory effects of fractions from *Glycine soja* Siebold et Zucc. on melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *J Soc Cosmet Sci Korea.* 2017. 43:231-237.
- Kim HH, Park G, Park KS, Lee JY, Kim TH, An BJ. The effect of *Aster glehni* Fr. Schm. extracts on whitening and anti-wrinkle. *J Life Sci.* 2010a. 7:1034-1040.
- Kim HY, Ko JY, Song SB, Kim JI, Seo HI, Lee JS, et al. Antioxidant and α -glucosidase inhibition activities of solvent fractions from methanolic extract of *Sericea Lespedeza* (*Lespedeza cuneata* G. Don). *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012a. 41:1508-1514.
- Kim I, Lee J, Jeong Y. Antioxidant activities of *Rumex crispus* L. root extracts and fractions. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2018. 47:1234-1241.
- Kim KC, Eom TK, Kim JS. Polyphenol contents and antioxidant activity of fruit extracts from *Daphniphyllum macropodum*. *J Adv Eng Technol.* 2019a. 12:149-155.
- Kim KH, Kim NY, Kim SH, Han IA, Yook HS. Study on antioxidant effects of fractional extracts from *Ligularia stenocephala* leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012b. 41:1220-1225.
- Kim MJ, Han EJ, Kim HS, Lee K, Ahn G. Protective effect of *Sargassum horneri* chloroform fraction on oxidative stress in ultraviolet B-irradiated keratinocytes. *J Chitin Chitosan.* 2019b. 24:192-198.
- Kim NY, Park DS, Lee HY. Effect of anti-skin wrinkle and antioxidant of *Agastache rugosa* Kentz through fermentation process of the lactic acid. *Korean J Med Crop Sci.* 2015. 23:37-42.
- Kim SH, Kim YM. Determination of the antioxidant capacity of Korean ginseng using an ORAC assay. *J East Asian Soc Diet Life.* 2007. 17:393-401.
- Kim SY, Kim CR, Kim HM, Kong M, Lee JH, Lee HJ, et al. Antioxidant activity and whitening effect of *Cedrela sinensis* A. juss shoots extracts. *J Soc Cosmet Scientists Korea.* 2010b. 36:175-182.
- Kraunsoe JAE, Timothy DW, Lowe G. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry.* 1996. 35:9090-9096.
- Kwak CS, Choi HI. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extract and sequential fractions of flowers of *Prunus persica* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2015. 44:1439-1449.
- Lee CW, Chon HJ, Yoo YJ. A clinical study of flavonoid quercetin-containing cosmetics on the skin improvement. *Kor J Aesthet Cosmetol.* 2013. 11:811-818.
- Lee DH, Kim DI, Hong JH. Whitening and anti-wrinkle effects of polysaccharides from Ascidian tunic. *J Chitin Chitosan.* 2015. 20:1-9.
- Lee SE, Kim YS, Kim JE, Bang JK, Seong NS. Antioxidant activity of *Ulmus davidiana* var. *japonica* N. and *Hemiptelea davidii* P.. *J Korean Med Crop Sci.* 2004. 12:321-327.
- Lee TH, Park SJ, Yoo G, Jang C, Kim M, Kim SH, et al. Demethyleugenol β -glucopyranoside isolated from *Agastache rugosa* decreases melanin synthesis via down-regulation of MITF and SOX9. *J Agric Food Chem.* 2016. 64:7733-7742.
- Li HB, Wong CC, Cheng KW, Chen F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT—Food Sci Technol.* 2008. 41:385-390.
- Martinez-Esparsa M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, García-Borrón JC. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem.* 1998. 255:139-146.
- Middleton E, Kandaswami C. Potential health-promoting prop-

- erties of citrus flavonoids. Food Technol. 1994. 48:115-119.
- Oh Y, Lim HW, Huang YH, Kwon HS, Jin CD, Kim K, et al. Attenuating properties of *Agastache rugosa* leaf extract against ultraviolet-B-induced photoaging via up-regulating glutathione and superoxide dismutase in a human keratinocyte cell line. J Photochem Photobiol B. 2016. 163:170-176.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. J Agric Food Chem. 2001. 49:4619-4626.
- Park EY, Hur SJ, Kim KY, Whang WK, Yang KS. Anti-oxidant and whitening effect of *Curcuma longa* L.. Korean J Aesthet Soc. 2010. 1:111-120.
- Park HJ, Kwon SH, Lee MS, Kim GT, Choi MY, Jung WT. Antimicrobial activity of the essential oil of the herbs of *Agastache rugosa* and its composition. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2000. 29:1123-1126.
- Park K, Jung D, Jin Y, Kim JH, Geum JH, Lee J. Establishment and validation of an analytical method for quality control of health functional foods derived from *Agastache rugosa*. Anal Sci Technol. 2019. 32:96-104.
- Quan T, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation blocks cellular responses to transforming growth factor- β by down-regulating its type- II receptor and inducing Smad7. J Biol Chem. 2001. 276:26349-26356.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999. 26:1231-1237.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci. 1997. 2:152-159.
- Ryu IS, Park SJ, Mun YJ, Ko JS, Shin KD, Lee JC, et al. Inhibitory effects of flowers of *Lespedeza bicolor* on tyrosinase activity and melanin synthesis. Korean J Orient Physiol Pathol. 2007. 21:1142-1147.
- Seo H, Kim C, Kim MB, Hwang JK. Anti-photoaging effect of Korean mint (*Agastache rugosa* Kuntze) extract on UVB-irradiated human dermal fibroblasts. Prev Nutr Food Sci. 2019. 4:442-448.
- Seo YH, Kim IJ, Yie AS, Min HK. Electron donating ability and contents of phenolic compounds, tocopherols and carotenoids in waxy corn (*Zea mays* L.). Korean J Food Sci Technol. 1999. 31:581-585.
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 1965. 16:144-158.
- Song BR, Lee SL, Lee YJ, Shin HS, Park SN. Antioxidant, antimicrobial and cytoprotective effects of the extract and its fraction obtained from rhizomes of *Belamcanda chinensis* (L.) DC. Appl Chem Eng. 2018. 6:772-781.
- Sugumaran M. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. Pigment Cell Res. 2002. 15:2-9.
- van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assay: the MTT assay. Methods Mol Biol. 2011. 731:237-245.
- Wunsch E, Heidrich HG. Zur quantitativen bestimmung der collagenase. Hoppe Seylers Z physiol Chem. 1963. 333:149-151.
- Xuan SH, Kim GY, Yu JY, Kim JW, Yang YR, Jeon YH, et al. Antioxidant and cellular protective effects against oxidative stress of *Calendula officinalis* flowers extracts in human skin cells. Appl Chem Eng. 2016. 27:620-626.
- Yang SA, Seo GE, Pyo BS, Kim SM, Choi CH. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of extract *Rumex japonicus* HOUTT root and its fractions. Korean J Med Crop Sci. 2017. 25:10-15.
- Yun ME, Lee YS, Lee YJ, Park YM, Park SN. Antimicrobial, antioxidant and cellular protective effects of *Houttuynia cordata* extract and fraction. Appl Chem Eng. 2018. 29:452-460.
- Yun MS, Kim C, Hwang JK. *Agastache rugosa* Kuntze attenuates UVB-induced photoaging in hairless mice through the regulation of MAPK/AP-1 and TGF- β / smad pathways. J Microbiol Biotechnol. 2019. 29:1349-1360.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effect on superoxide radicals. Food Chem. 1999. 64:555-559.