

뱀딸기추출물의 항산화 활성 및 항노화에 관한 연구

노언주 · 박시향 · 황수미* · 노현수** · 김병관[†]

국립창원대학교 화공시스템공학과, *마산대학 임상병리과,
**국립경상대학교 미생물학과
(2010년 10월 22일 접수 ; 2010년 12월 17일 채택)

Antioxidative Activity and Antiaging Effects of *Duchesnea indica* (Andr.) Focke extract

Eon-Joo Roh · Si-Hyang Park · Su-Mi Hwang* · Hyeon-Su Ro** · Byung-Kwan Kim[†]

Dept. of Chemical Engineering, Changwon National University
*Clinical Pathology, Masan University
**Dept. of Microbiology, Gyeongsang National University
(Received October 22, 2010 ; Accepted December 17, 2010)

Abstract: In this study, we evaluated the anti-oxidative, anti-wrinkle and whitening effect of *Duchesnea indica* (Andr.) Focke extract. *Duchesnea indica* (Andr.) Focke was extracted by two different solvents which were n-hexane and ethyl acetate. The anti-oxidant activity was measured by free radical scavenging activity using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical). And the inhibitory activities of tyrosinase for whitening effect and collagenase for anti-wrinkle were investigated. For anti-oxidant activity and whitening activity, ethyl acetate fraction of *Duchesnea indica* (Andr.) Focke extract showed more significant activity than n-hexane fraction of *Duchesnea indica* (Andr.) Focke extract. For anti-wrinkle activity, ethyl acetate fraction of *Duchesnea indica* (Andr.) Focke extract exhibited strong inhibition effects compared with reference. Therefore, *Duchesnea indica* (Andr.) Focke extract may be useful as a new antioxidant and anti-aging agent.

Keywords : *Duchesnea indica* (Andr.) Focke, anti-wrinkle, whitening, free radical

1. 서론

뱀딸기(*Duchesnea indica* (Andr.) Focke)는 장미과의 여러해살이풀이며 생약명으로 사매(蛇莓)라고 부른다. 줄기는 땅 위에서 길게 뻗으며 전체에 털이 약간 나 있다. 잎은 어긋나고

작은 잎 3장으로 된 겹잎인데 가끔 5개인 것도 있다. 가장자리는 무딘 톱니 모양인데, 무딘 것과 그렇지 않은 것이 있고 기부는 췌기 모양이며 가장자리가 밋밋하다. 꽃은 4~5월에 잎겨드랑이의 긴 꽃자루에 노란색이 1개씩 피며 열매는 5월에 지름 1센티미터 쯤 되는 크기로 둥글게 익는다. 산비탈, 길가나 잡초 속에서 흔하게 자란다[1-4].

[†]주저자 (E-mail : jennieyon@naver.com)

사매는 장미과의 여러해살이풀 뱀딸기의 지상부이다. 맛은 달고 쓰며 성질은 차다. 청열양혈, 소종해독, 지해지혈의 효능이 있어 청열 작용으로 열로 인한 구내염, 인후염, 종기, 습진, 화상, 유방염, 타박상 및 뱀이나 독충에 물렸을 때 물을 넣고 달여서 복용하고, 신선한 것은 짓뭉쳐 환부에 붙인다. 최근에는 위암, 자궁경부암, 비암, 인후암 등의 여러 암 중에 까마중과 같이 사용하여 유효한 반응을 얻고 있다 [5-6]. 약리 작용에서 일정한 항균 작용과 항암 작용이 인정된다. 임상보고에서 디프테리아 치유율이 높게 나타났고, 세균성 이질에 대해 12그램을 물을 넣고 달여서 복용하였으며 급성중수염, 복막염 등에도 12그램씩 복용하여 치유반응이 향상되었다 [7-8]. 종자에 함유된 지방산에는 linoleic acid가 63.1퍼센트에 달하고, β -시스테롤, 플라보노이드, 사포닌 등이 함유되어 있다.

위와 같이 뱀딸기를 약용식물로 사용하고 있지만 피부의 항노화에 관련된 연구는 보고되고된 바 없다. 그러므로 본 연구에서는 뱀딸기 추출물의 항산화 효과, 미백, 항주름 효능에 대하여 고찰하였다.



Fig. 1. Typical shape of *Duchesnea indica* (Andr.) Focke.

2. 실험

2.1 시약 및 기기

본 실험에서 사용한 뱀딸기(*Duchesnea indica* (Andr.) Focke)는 충남 논산에서 구입하여 사용하였다. 시료 추출을 위해 사용한 유기용매는 Samchun(한국)에서 구입하였고, 물질의

분리 농축에는 Rotary vacuum evaporator (RE121, BUCHI, 스위스), 흡광도 측정에는 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu, UV-1601, Japan)를 사용하였으며, 실험을 위해 사용한 1,1-diphenyl-picrylhydrazine(DPPH), tyrosinase from mushroom, collagenase 그리고 기타 시약은 Sigma의 것을 사용하였다.

2.2 시료의 추출

그늘진 곳에서 건조한 뱀딸기를 잘게 썰어 methanol로 실온에서 일주일동안 3회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지를 사용하여 여과한 후, rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압 농축하였다. 얻어진 농축액에 증류수를 현탁시킨 후 n-hexane을 가하여 잔여층으로부터 분리하였으며, 이 과정을 4회 반복하여 감압 농축하여 n-hexane 분획물을 얻었다. 잔여층에 ethyl acetate를 가하여 분리하였으며 n-hexane층과 동일하게 4회 반복하여 감압 농축하여 잔여층으로부터 ethyl acetate분획물을 획득하였다. 그리하여 뱀딸기추출물로부터 n-Hexane, ethyl acetate 분획으로 나눈 2가지의 분획물을 가지고 실험하였다. 실험은 각각 3회 실시하여 평균 \pm 표준편차로 표시하였다.

2.3 자유라디칼 소거효과 측정

자외선이 피부에 조사되면 과산화수소와 같은 활성산소가 증가하고 항산화 효소가 감소한다. 일차적으로 superoxide anion이 만들어지고 superoxide anion은 superoxide dismutase에 의해 hydrogen peroxide로 전환된다. 형성된 과산화수소는 철, 구리 등의 금속이 있을 때 반응성이 높은 hydroxyl radical로 전환된다. 만들어진 hydroxy radical은 Raf, protein tyrosine phosphatase(PTPs), MEKKI 등을 통한 tyrosine kinase 신호전달과정을 활성화시킨다 [9].

자외선으로부터 생성된 활성산소종은 실질적으로 피부의 효소적, 비효소적 항산화 방어체계의 불균형을 초래하여 피부는 산화상태 쪽으로 유리하게 기울어지고 세포 성분들에 대한 손상을 야기시켜 결과적으로 주름을 생성시키는 원인물질로 알려져 있다 [10].

피부 조직에서 발생한 프리 라디칼을 효과적으로 제거해 준다면, 피부 노화를 예방하고 지연할 수 있다. 프리 라디칼 제거능을 측정하는

방법으로 DPPH 라디칼 제거법이 폭넓게 사용되어지고 있다.

뱀딸기 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH를 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 대부분의 라디칼은 반응성이 커서 매우 불안정하지만, DPPH radical은 안정한 free radical로서 517nm에서 강한 흡수를 가지는 진한 보라색의 화합물이다. 하지만 free radical을 소거할 수 있는 항산화제로부터 전자 혹은 수소를 공여 받아 비라디칼인 1,1-diphenyl-picrylhydrazine이 되면 짙은 보라색이 노란색으로 변화하여 517nm에서 흡광도가 감소하는데, 이를 이용하여 쉽게 항산화효과를 측정할 수 있다[11-12].

시료를 에탄올에 0.01mg/mL, 0.1 mg/mL, 1mg/mL, 10mg/mL의 농도로 녹였다. 시험관에 시료 용액 100 μ L를 넣고, 100 μ L의 ethanol과 50 μ L의 0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH)/ethanol 용액을 첨가하여 25°C의 실온에서 30분 동안 방치한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거능을 다음의 식에 따라 DPPH 탈색의 %로 계산하였다.

$$\text{소거율(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.4. Tyrosinase 활성 저해능 측정

멜라닌 생성에 관여하는 주요효소에는 tyrosinase가 있다. 이 효소는 인체내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 단계인 티로신에서 DOPA 그리고 DOPA에서 DOPAquinone, DHI로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매 하는데 관여한다[13]. 따라서 이 tyrosinase 효소를 저해하거나 그 중간체들의 산화 반응을 억제함으로써 멜라닌 생성을 감소시킬 수 있을 것으로 보여지고 있다.

티로시나아제의 활성을 저해해 미백효과를 확인할 수 있는 방법으로, '기능성 화장품 효력을 측정하기 위한 가이드라인' (식약청)에 따라 측정하였다. 에탄올에 각각의 농도로 녹인 시료를 제조하여 이것을 시료액으로 하였다. 또한 비교 대조군으로 L-ascorbic acid을 0.01mg/mL, 0.1mg/mL, 1mg/mL의 농도로 녹여 시료와 같은 방법으로 측정하였다. 시험관에

0.1 M Na-phosphate buffer solution(pH 6.5) 220ul와 시료액 20ul, tyrosinase (2unit/ μ L) 20ul를 순서대로 취하였다. 이 반응 용액에 1.5 mM tyrosine 40ul 가하고 잘 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시킨 후, ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase의 활성 저해율은 다음 식에 의거하여 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.5. Collagenase 활성 저해능 측정

노화된 피부의 대표적 증상은 잔주름 및 주름의 발생이다. 이는 피부진피조직의 교원질 중 주 단백질인 collagen의 현저한 감소에 의해서라고 할 수 있다[10-11]. Collagen은 진피의 90%이상을 차지하고 있으면서 피부의 장력과 강도를 부여하기 때문에 외부로부터의 자극에 대해 피부를 보호하고 유지시킨다. 때문에 콜라겐의 감소는 피부노화와 매우 깊은 관계를 가지고 있다[12]. 콜라겐은 섬유모세포에서 합성 분비되며, 진피 세포의 기질의 대부분을 차지하고 있어 피부의 질적 변화는 콜라겐의 양과 밀접한 관련성이 있다. 생체내에서 콜라겐의 합성과 분해는 적절하게 조절되나 노화가 진행되면서 그 합성이 감소하며 자외선 조사에 의해 콜라겐의 분해 효소인 collagenase의 발현이 촉진된다.

Collagenase 활성 저해능의 실험은 Sigma사의 kit 시약을 구입하여 사용하였다. 먼저 1mg DG gelatin vial에 1.0ml의 DDW를 가해 DG gelatin stock solution(1mg/mL)을 만든다. 10 x reaction buffer 2ml에 DDW 18ml을 가해 reaction buffer를 희석 제조한다. 다음으로 collagenase 효소 시약을 제조한다. Working solution으로 최종 농도가 0.2unit/mL이 되도록 reaction buffer로 희석한다. 실험에 사용할 시료를 에탄올에 녹여 시료의 농도가 0.01, 0.1, 1, 10mg/mL이 되도록 제조한다. 제조한 시료를 96 well plate에 20ul씩 triple로 준비한다. DQ gellatin 10ul를 시료에 가하고, (-)control에는 reaction buffer 100ul를 (+)control에는 효소시약 100ul를 가한다. 빛을 차단한 상태에서 실온에서 1-2시간 동안 방치한 후 형광 강도

495nm/515nm에서 형광강도를 측정하였다[13].

3. 결과 및 고찰

3.1. 자유라디칼 소거능 비교

자외선이 조사되면 사람의 피부에는 여러 종류의 프리 라디칼의 생성이 증가된다. 이와 같은 프리 라디칼은 피부 노화의 원인이 된다.

Table 1. Free radical scavenging activities of extracts (n-Hexane fraction, ethyl acetate fraction) from *Duchesnea indica* (Andr.) Focke and reference.

sample	0.001	0.01	0.1	1	10 mg/mL
n-Hexane	-	8.4 ±0.09	9.6 ±0.11	18.2 ±1.87	62.3 ±4.98
EtOAc	-	18.6 ±0.80	73.2 ±4.63	85.5 ±5.23	86 ±5.34
L-Ascorbic acid	38.3 ±1.21	66.2 ±2.10	94.2 ±7.01	-	-

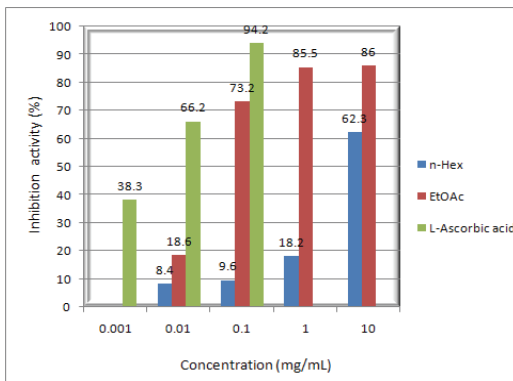


Fig. 2. Free radical scavenging activities of extracts (n-Hexane fraction, ethyl acetate fraction) from *Duchesnea indica* (Andr.) Focke and reference.

비교 대조군으로는 항산화 효과가 알려진 L-ascorbic acid를 이용하여 뱀딸기추출물의 n-hexane 분획물과 ethyl acetate분획물의 항산화 효과를 비교하였다. Table 1과 Fig. 2에서

보는바와 같이 농도증가에 따라 소거효과가 증가함을 확인할 수 있었고 뱀딸기추출물의 ethyl acetate분획물이 활성이 우수했다. 비교 대조군으로 같이 측정한 L-ascorbic acid 0.1mg/mL의 값이 94.2% 소거능을 나타내었고, 뱀딸기추출물의 ethyl acetate분획물 0.1mg/mL의 값이 73.2% 소거능을 보여 주었다. L-ascorbic acid가 단일 성분임을 감안한다면 뱀딸기추출물의 ethyl acetate분획물은 매우 높은 라디칼 소거능을 보여 주는 것이라고 하겠다.

3.2. Tyrosinase 활성 저해능 비교

이 시험은 시험관내에서 tyrosinase 효소의 활성을 저해하는 정도를 평가하는 피부 미백의 활성을 보는데 매우 중요하다. 뱀딸기추출물의 tyrosinase 활성에 대한 저해 능력은 Table 2와 Fig. 3.에서 보는바와 같이 농도증가에 따라 소거효과가 증가함을 확인할 수 있었다. 농도 1mg/mL ethyl acetate분획물의 소거능은 30.6%, 비교대조군으로 같이 측정한 L-ascorbic acid는 동일농도에서 36.6%의 저해능이 있어 약간 높은 저해능을 나타내었다. L-ascorbic acid가 단일 성분임을 감안한다면 L-ascorbic acid와 비교 시 뱀딸기추출물의 ethyl acetate분획물은 높은 tyrosinase 활성 저해능을 인지할 수 있었다.

Table 2. The effect of extracts(n-Hexane fraction, ethyl acetate fraction) from *Duchesnea indica* (Andr.) Focke and reference on tyrosinase.

sample	0.01	0.1	1mg/mL
n-Hexane	6.1±0.09	11.4±0.91	23.5±1.41
EtOAc	19.8±0.21	24.7±1.80	30.6±2.63
L-Ascorbic acid	1.8±0.02	11.9±2.10	36.6±3.01

3.3. Collagenase 활성 저해능 비교

피부의 주름개선 효과를 검정하는 collagenase의 저해능을 실험하였다. 뱀딸기추출물의 n-hexane 분획물과 ethyl acetate분획물을 가지고 collagenase 저해능을 측정된 결과는 Table 3과 Fig. 4.와 같다. n-hexane 분획물

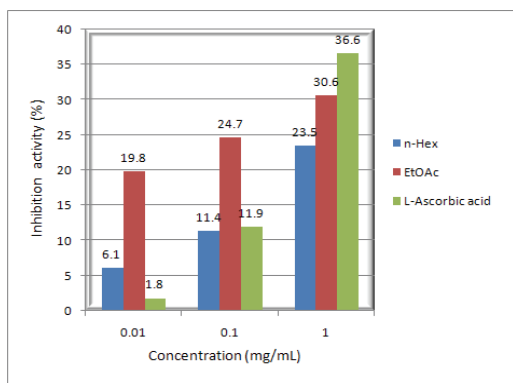


Fig. 3. The effect of extracts(n-Hexane fraction, ethyl acetate fraction) from *Duchesnea indica* (Andr.) Focke and reference on tyrosinase.

Table 3. Inhibitory activity of extracts (n-Hexane fraction, ethyl acetate fraction) from *Duchesnea indica* (Andr.) Focke and reference on collagenase.

sample	0.01	0.1	1	10mg/mL
n-Hexane	1.9 ±0.13	2.8 ±0.19	6.4 ±0.87	9.9 ±1.09
EtOAc	3.1 ±0.27	11.8 ±0.93	25.3 ±2.03	83.2 ±5.34
Retinyl acetate	-	12.4 ±1.01	29.6 ±1.77	42±2.98

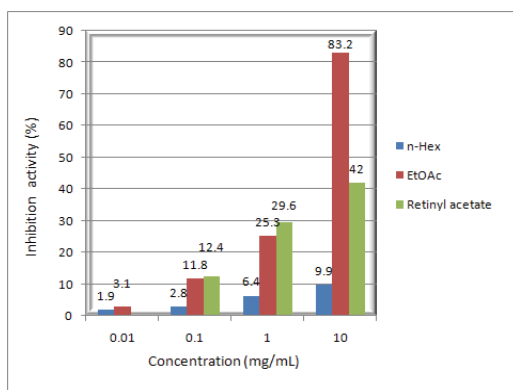


Fig. 4. Inhibitory activity of extracts (n-Hexane fraction, ethyl acetate fraction) from *Duchesnea indica* (Andr.) Focke and reference on collagenase.

은 collagenase저해능이 높지 않았지만, ethyl acetate분획물 10mg/mL의 값이 83.2% 저해능을 보여 비교 대조군으로 측정된 Retinyl acetate가 동일한 농도로 42.0% 소거능을 나타낸 것에 비해 월등히 우수한 활성을 보였다.

4. 결론

본 연구에서는 뱀딸기추출물로부터 n-hexane과 ethyl acetate 분획물로 나누어 항산화효과, 미백, 항주름 효능에 대해 관찰하였다. 항산화 효능 측정에서 뱀딸기추출물의 ethyl acetate 분획물이 n-hexane분획물 보다 높은 활성을 보였고 비교 대조군인 L-ascorbic acid에 비해 조금 낮은 소거능을 보여 주었다. 그렇지만 L-ascorbic acid가 단일 성분임을 감안한다면 뱀딸기추출물의 ethyl acetate분획물은 매우 높은 항산화 효능을 나타내었다.

뱀딸기추출물의 tyrosinase 활성에 대한 저해 능력은 ethyl acetate 분획물이 n-hexane분획물 보다 높은 활성을 보였고 비교 대조군인 L-ascorbic acid보다 조금 낮은 소거능이 나타났지만, L-ascorbic acid가 단일 성분임을 감안한다면 뱀딸기추출물의 ethyl acetate분획물은 tyrosinase 저해능이 양호한 것으로 나타났다.

Collagenase 억제효능은 ethyl acetate 분획물이 n-hexane분획물과 비교 대조군인 Retinyl acetate에 비해 상당히 높은 소거능을 보여 주었다. 뱀딸기 추출물의 ethyl acetate 분획물은 collagenase 억제효능이 매우 뛰어나 주름개선 효과가 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과로 볼 때, 뱀딸기추출물은 항산화 활성과 더불어 미백활성 및 주름개선활성을 갖는 복합 기능성 원료로 응용 가능성이 큼을 시사한다.

참고문헌

1. Ministry of Education & Human Resources Development, An illustrated guide to Korean flora[fauna], Samhwa publishing, 1965.
2. Woo Chul Yang, An illustrated guide to Korean flora, Gyou Hak Sa, 2006.

3. I. R. Lee, E. B. Lee, S. H. Lee and J. Y. Lee, Biologically Active Components of *Duchesnea indica* erba, *Kor. J. Pharmacogn.* **15(2)**, 85~90 (1984).
4. I. R. Lee, S. W. Wee, Y. N. Han, Studies on the Water Soluble Polysaccharides of *Duchesnea indica* Herba, *Kor. J. Pharmacogn.* **20(1)**, 56~57 (1989).
5. Jin Jone In, An illustrated chinese medicine unabridged dictionary(4), Gudamsa, Donggueng, pp. 219-232 (1982).
6. Sun Ju Lee 1970 Korean Folk Medicine Monographs Series 3, 68.
7. Ihn Rhan Lee and Young Hee Kim. Studies on the antitumor activity of *Duchesnea indica* Herba. *Arch. Pharm. Res.* **9**, 1-7 (1986).
8. Ihn Rhan Lee and Young Hee Kim. Studies on pharmacological active constituents of *Duchesnea indica*. Herba. *J. Kor. Research Institute For Better living* **35**, 129.
9. Eon Joo Roh, Anti-aging Effect of *Ligularia Stenocephala* on the skin, Doctor's thesis, Hanyang University, 2009.
10. G. S. Sim, J. H. Kim, N. Young, D. H. Lee, B. C. Lee, H. B. Phoi, Anti-Oxidative and Inhibitory Effect of *Saussurea involucreata* on MMP-1 in UVA-irradiated Human Dermal Fibroblast, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **31(4)**, 330 (2005).
11. M. Veronique and B. Friedrich, Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation, *FEBS Letters*, **381**, 165 (1996).
12. H. S. Yoon and J. K. Kim, The Inhibitory Effects of *Acanthopeltis japonica* on Melanogenesis, *J. Soc. Cosmet. Scientist Korea*, **33(2)**, 88 (2007).
13. G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, and K. J. Voorhees, Molecular mechanisms of photoaging in human skin in vivo and their prevention by alltrans retinoic acid, *Photochem. Photobiol.*, **69**, 154 (1999).
14. M. Yaar and B. A. Gilchrist, Aging versus photo aging: postulated mechanisms and effectors, *J. Investing Dermatol. Symp. Proc.*, **3**, 47 (1998).
15. J. J. Li, Z. Dong, M. I. Dawson and N. H. Colburn, Inhibition of tumor promoter-induced transformation by etinoids the transrepress AP-1 without transactivation retinoic acid response element, *Cancer Research*, **56**, 483 (1996).
16. C. Huang, W. Y. Ma, M. I. Dawson, M. Rincon, R. A. Flavell and Z. Dong, Blocking activator protein 1 activity but not activation retinoic acid response effect of retinoic acid, *Proc. Acad. Sci., USA*, **94**, 5826 (1997).
17. Albert, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Robers, K and Watson, J. (1989). *Molecular Biology of the Cell*. 2nd Edition, *Garland Publishin Inc.* 802-824.