



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

제주 자생 뱀딸기 추출물의  
기능성 화장품 소재화 연구

濟州大學校 大學院

化 學 科

姜 宗 奭

2017年 2月



# 제주 자생 뱀딸기 추출물의 기능성 화장품 소재화 연구

指導教授 玄昌久

姜宗奭

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2016年 12月

姜宗奭의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

委員

委員

李南昊  
姜昌禧  
玄昌久



濟州大學校 大學院

2016年 12月

A Study on Biological Activities of *Duchesnea indica*  
Extract as Cosmeceutical Ingredients

Jong-Seok Kang  
(Supervised by Professor Chang-Gu Hyun)

A thesis submitted in partial fulfillment of the  
requirement for the degree of Master of Science

2016. 12.

This thesis has been examined and approved.

Nam Ho Lee

Chang Hee Bang

CHANG GU HYUN

.....  
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## 목차

I. 서론 .....	2
1) 향산화 .....	4
2) 주름 생성 및 개선 .....	5
3) 기능성 화장품의 생산 동향 .....	7
4) 뱀딸기( <i>Duchesnea indica</i> ) .....	8
II. 재료 및 방법 .....	10
1. 제주 뱀딸기의 추출 및 용매 분획 .....	10
2. 제주 뱀딸기 추출물과 분획물의 지표 성분 분석 .....	11
1) HPLC 지표 성분 분석 .....	11
3. 제주 뱀딸기 추출물과 분획물의 활성 .....	13
1) 향산화 활성 .....	13
(1) 총 페놀 함량 측정 .....	13
(2) 총 플라보노이드 함량 .....	14
(3) DPPH radical 소거 활성 .....	15
(4) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	16
(5) Reducing power 활성 .....	17
(6) Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 활성 .....	18
(7) Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성 .....	19
2) 주름 개선 효과 .....	20
(1) Elastase 저해 활성 .....	20
(2) Collagenase 저해 활성 .....	21
3) 멜라닌 합성 .....	22
(1) Tyrosinase 저해 활성 .....	22
(2) B16F10 melanoma 세포 활용 멜라닌 합성 .....	22

4) 인체피부 일차자극 시험 .....	23
(1) 시험 대상자 .....	23
(2) 시험 재료 .....	23
(3) 시험 방법 .....	23
(4) 판정 기준 .....	24
(5) 결과 계산 방법 .....	25
5) 항균 활성 .....	26
(1) 균주 배양 .....	26
(2) Paper disc 확산법 .....	26
(3) MIC (minimum inhibitory concentration) .....	27
(4) MBC (minimum bactericidal concentration) .....	28
Ⅲ. 결과 및 고찰 .....	29
1. HPLC를 이용한 지표 성분 함량 분석 .....	29
2. 제주 뱀딸기 추출물 및 분획물 생리활성 .....	32
1) 항산화 활성 .....	32
(1) 총 페놀 및 플라보노이드 함량 .....	32
(2) DPPH radical 소거 활성 .....	34
(3) ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	36
(4) Reducing power 활성 .....	38
(5) Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 활성 .....	39
(6) Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성 측정 .....	40
2) 주름 개선 효과 .....	41
(1) Elastase 저해 활성 .....	41
(2) Collagenase 저해 활성 .....	43
3) 멜라닌 합성 능력 측정 .....	44
(1) Tyrosinase 저해 활성 .....	44
(2) B16F10 melanoma 세포를 이용한 멜라닌 합성 .....	45
① 세포 생존율(cell viability) .....	45

② B16F10 melanoma 세포 활용 멜라닌 합성 .....	45
4) 인체피부 일차자극 시험 결과 .....	47
(1) 시험 대상자 .....	47
(2) 결과 .....	49
5) 항균 활성 .....	50
(1) Paper disc diffusion method .....	50
(2) MIC (minimum inhibitory concentration) .....	54
(3) MBC (minimum bactericidal concentration) .....	55
IV. 종합 결론 및 고찰 .....	57
V. 참고문헌 .....	59

## LIST OF TABLES

Table 1. Ingredients that improve anti-wrinkle .....	6
Table 2. Production performance of cosmeceutical by type .....	8
Table 3. HPLC chromatographic conditions of the control factors .....	11
Table 4. Gradient elution conditions for the separation of flavonoids .....	12
Table 5. Clinical standard photographs of visual assessment for human patch test .....	24
Table 6. Human primary irritation index for cosmetic products .....	25
Table 7. Gallic acid content of DIW and fractions .....	31
Table 8. SC <sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activity .....	35
Table 9. SC <sub>50</sub> values of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activity .....	37
Table 10. Antioxidative activity of the DIW and fractions by reducing power assay .....	38
Table 11. SC <sub>50</sub> values of SOD-like activity .....	40
Table 12. IC <sub>50</sub> values of elastase inhibition activity .....	42
Table 13. IC <sub>50</sub> values of collagenase inhibition activity .....	43
Table 14. Skin characteristics of subjects .....	47
Table 15. Results of human skin primary irritation test .....	49
Table 16. Results of paper disc diffusion method of DIW and solvent fractions on skin pathogens .....	53
Table 17. Results of MIC of EtOAc fraction on <i>S. aureus</i> and <i>P. acnes</i> ..	54
Table 18. Results of MBC of EtOAc fraction on <i>S. aureus</i> and <i>P. acnes</i> ..	56



## LIST OF FIGURES

Figure 1. Purpose of use of cosmeceutical .....	3
Figure 2. Role of antioxidant enzymes in the inactivation process of superoxide ion .....	4
Figure 3. Structure of ingredients that improve anti-wrinkle .....	6
Figure 4. Production performance of cosmetics (2011~2015) .....	7
Figure 5. Habitate of <i>D. indica</i> in Jeju island .....	8
Figure 6. Picture of <i>D. indica</i> .....	9
Figure 7. Extraction and solvent fractionation of <i>D. indica</i> .....	10
Figure 8. HPLC chromatogram of gallic acid standard .....	12
Figure 9. Calibration curve of gallic acid standard .....	12
Figure 10. Calibration curve for quantification of total phenolic compound content .....	13
Figure 11. Calibration curve for quantification of total flavonoid content	14
Figure 12. Principle of the DPPH radical scavenging by an anti-oxidant	15
Figure 13. Principle of ABTS <sup>+</sup> radical scavenging by an anti-oxidant .....	16
Figure 14. Principle of reducing power assay .....	17
Figure 15. Calibration curve for quantification of FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O content .....	18
Figure 16. Change of [Fe(III)(TPTZ) <sub>2</sub> ] <sup>3+</sup> by a redox reaction .....	18
Figure 17. Principle of the SOD-like activity assay .....	19
Figure 18. Structure and breakdown of N-succ(Ala) <sub>3</sub> -p-nitroanilide .....	20
Figure 19. Structure and breakdown of 4-phenylazobenzoylox .....	21
Figure 20. Picture of human primary irritation test .....	24
Figure 21. Paper disc diffusion test .....	27

Figure 22. MIC (minimum inhibitory concentration) and MBC (minimum bactericidal concentration) test .....	28
Figure 23. Structure of gallic acid .....	29
Figure 24. Gallic acid chromatogram of DIW and solvent fractions .....	30
Figure 25. Total phenolic and Total flavonoid contents of DIW and solvent fractions .....	33
Figure 26. DPPH radical scavenging activities .....	35
Figure 27. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of solvent fractions .....	36
Figure 28. ABTS <sup>+</sup> radical scavenging activities of DIW and EtOAc fraction (low concentration) .....	37
Figure 29. Antioxidative activity of DIW and solvent fractions determined by reducing power assay .....	38
Figure 30. Antioxidative activity of the DIW and solvent fractions determined by FRAP assay .....	39
Figure 31. Superoxide anion radical scavenging activity of DIW and solvent fractions .....	40
Figure 32. Elastase inhibition effects of DIW .....	41
Figure 33. Elastase inhibition effects of solvent fractions .....	42
Figure 34. Collagenase inhibition effects of DIW and solvent fractions .....	43
Figure 35. Tyrosinase inhibition effects of DIW .....	44
Figure 36. Cell viability and melanin synthesis effect of DIW .....	46
Figure 37. Photomicrograph of <i>P. acnes</i> , <i>S. epidermidis</i> and <i>S. aureus</i> .....	50
Figure 38. Results of paper disc diffusion method of DIW and solvent fractions on <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> and <i>P. acnes</i> .....	52
Figure 39. Results of MBC of EtOAc fraction on <i>S. aureus</i> and <i>P. acnes</i> .....	56

## Abstract

The purpose of this study was to investigate the anti-aging, anti-bacterial and melanin synthesis effects of *Duchesnea indica* extracting with hot water (DIW) and its solvent fractions (*n*-Hexane, EtOAc, *n*-BuOH and water). The anti-aging properties of them were assessed as anti-wrinkle (anti-elastase and anti-collagenase), antioxidative (DPPH radical scavenging activity, ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity, FRAP, etc.) and hypopigmentation activities.

The results showed that DIW has both high elastase, collagenase inhibitory and strong antioxidative activity. Because EtOAc and *n*-BuOH fractions also have strong activities about them, assume that they have plenty of ingredients that affect anti-aging. Also, DIW significantly stimulated melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells in a concentration-dependent manner.

Anti-bacterial activities of DIW and its four fractions against skin pathogens using the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were showed good against *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*, which are acne-causing bacteria. Especially, it is comparatively excellent that the MIC and MBC of EtOAc fraction against *S. aureus* (CCARM 0027) are 500 and 1000 µg/mL, separately.

To evaluate the safety of DIW on the human skin, human skin primary irritation tests were performed on the normal skin (upper back) of 31 volunteers to determine if any constituent of DIW presented an irritation or sensitization potential. DIW did not induce any adverse reactions in 200 µg/mL concentration. Taken together, our results suggest that DIW may be considered as an anti-aging candidate for cosmeceutical application.

## List of Abbreviations

<i>D. indica</i>	<i>Duchesnea indica</i>
ABTS	2,2-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
ACN	Acetonitrile
BuOH	<i>n</i> -Butanol
DMEM	Dulbecco modified eagle medium
DIW	Water extract of <i>Duchesnea indica</i>
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
EGCG	Epigallocatechin gallate
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
Fr.	Fraction
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
Hex	<i>n</i> -hexane
HPLC	High-performance liquid chromatography
MBC	Minimum bactericidal concentration
MeOH	Methanol
MIC	Minimum inhibitory concentration
SOD	Superoxide dismutase

## I. 서론

예로부터 여성을 대표하는 상품이라고 알려져 있던 화장품은 경제 성장과 더불어 외모에 대한 관심이 늘어나면서 사용량이 점점 늘어나고, 사용계층도 남녀노소 불문한 전 계층을 아우르고 있어 현대에는 단순한 아름다움의 표현도구만이 아닌 생활용품으로 가까이 자리 잡고 있다.

화장품은 피부와 신체의 생리적 기능 장애나 구조적 변화를 초래하지 않고 피부의 청결, 아름다움 및 보호를 위해 바르거나 도포하는 물질로 정의되며, 여러 가지 화학물질의 복합체로 그 원료만 해도 수천 가지에 이르고 있다. 이러한 화장품은 의약품과는 다르게 피부에 반복적으로 장기간 사용하는 제품이기 때문에 안전성 확보가 무엇보다 중요하다<sup>1</sup>.

화장품의 주성분은 물과 기름으로 되어있고, 글리세린, 솔비톨과 같은 탄소원과 아미노산 유도체, 단백질과 같은 질소원으로 구성되어있다. 이렇게 배합된 성분들은 곰팡이나 세균이 성장하기 좋은 기본 조건이 될 뿐 아니라, 식품보다 장기간에 걸쳐서 사용한다는 점이 미생물에 의한 변성을 초래하기도 한다<sup>2</sup>. 그렇기 때문에 사용 중 손가락이나 사용도구 등으로부터 발생하는 미생물 오염을 장기간 보호하기 위해서 방부제의 사용이 필수적이다. 그러나 최근 유방암 조직에서 검출된 합성 방부제인 파라벤류가 이슈가 되었고 합성 방부제에 대한 부작용 사례가 계속해서 보고<sup>3</sup>되고 성분표시제에 따른 화학 성분이 대부분인 화장품이 신뢰도가 떨어져 웰빙 트렌드에 따라 천연재료가 지속적으로 소비자들에게 어필되고 있다<sup>4</sup>.

화장품의 장기 보존에 관한 연구뿐만 아니라, 기존에 피부 보습 및 보호 차원에 있는 기초화장품에서 피부의 문제점들을 적극적으로 해결하는데 도움을 주는 기능성 화장품의 연구와 관심이 증가하였다. 기능성 화장품(Cosmeceutical)은 피부질환이 없는 건강한 사람이 피부의 상태를 건강하게 유지시켜 피부의 이상 및 노화를 지연하고 개선할 목적을 갖는 화장품(Cosmetic)과 유효성을 중시한 의약품(Pharmaceutical)을 결합한 새로운 분야이다. 2000년 7월에 국내 화장품 산업

의 발전과 외국 화장품에 대한 경쟁력 배양을 위해 약사법 중 화장품과 관련된 법규를 분리하여 별도의 화장품법이 제정되었고, 일반 화장품과 달리 식품의약품 안전처로부터 심사를 받아 허가를 얻어 제조와 판매가 가능하게끔 하였다. 기능성 화장품은 미백에 도움을 주는 제품, 피부의 주름개선에 도움을 주는 제품 및 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품으로 정했으며, 이외에도 여드름용 화장품, 아토피용 화장품, 각질제거용 화장품 등이 있다.

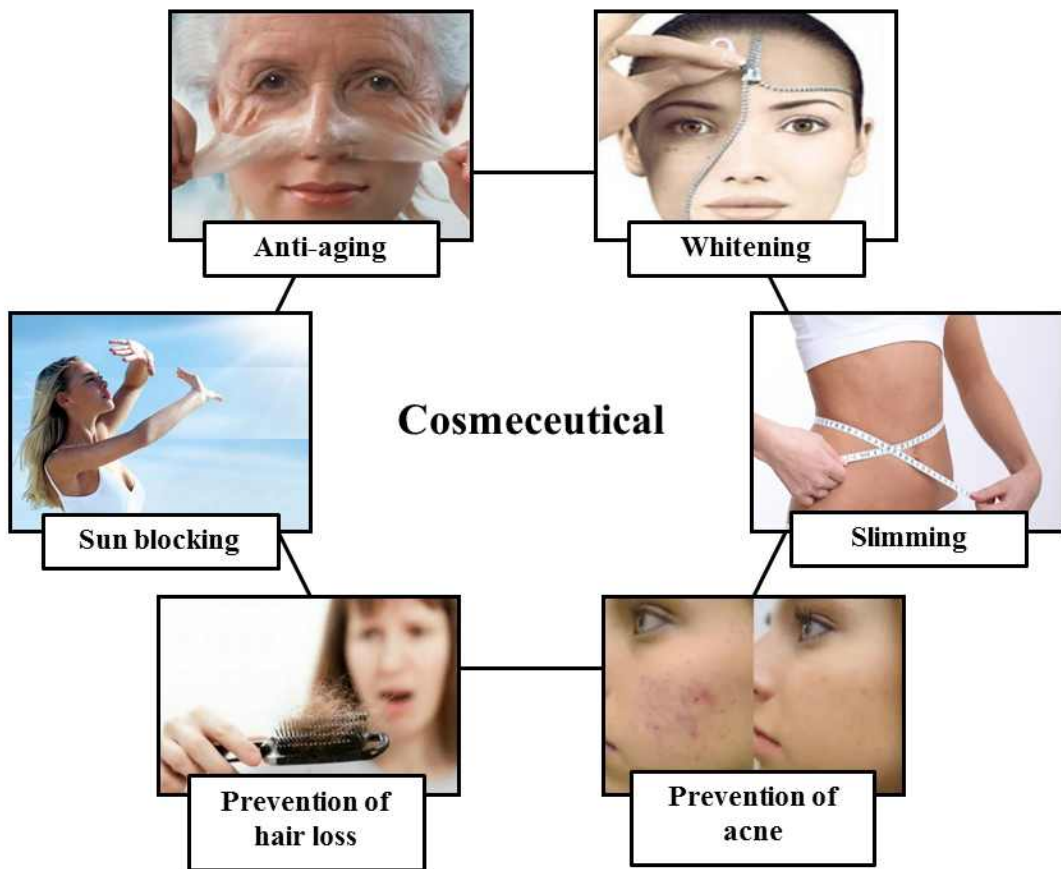


Figure 1. Purpose of use of cosmeceutical.

## 1) 항산화

피부는 인체 노화의 진행과 그 징후가 겉으로 가장 잘 나타나는 기관이다. 피부 노화는 시간의 흐름에 의해 자연적으로 발생하는 내인성 노화와 외부의 환경요인에 의해 발생하는 외인성 노화, 주로 광 노화로 분류하고 있다. 피부의 노화는 기본적으로 활성산소종(ROS: reactive oxygen species) 및 건조함이 가장 큰 원인으로 알려져있다. 활성산소는 콜라겐을 산화시켜 노화를 촉진하며, 수분이 부족한 건조피부는 피부의 생리기능을 감소시켜 쉽게 주름이 증가하여 피부노화를 가속화시킨다<sup>5</sup>.

이러한 활성산소를 억제하기 위해 인체 내에서는 생성되는 항산화 효소 물질 중 하나인 superoxide dismutase (SOD)는 가장 강력한 항산화 능력을 가졌다. SOD 효소의 항산화작용은 활성산소의 유해성을 억제하여 세포 내 DNA의 손상을 막아주기 때문에 노화방지나 암과 같은 유전자적 변이에 의한 각종 질병을 예방하고 개선시켜주는 탁월한 방어 메카니즘이다. SOD의 중요한 기능은 강력한 활성산소인 superoxide anion radical ( $O_2^-$ )을 보다 덜 해로운 활성산소인 과산화수소( $H_2O_2$ )로 치환시키는 것이다(Figure 2).

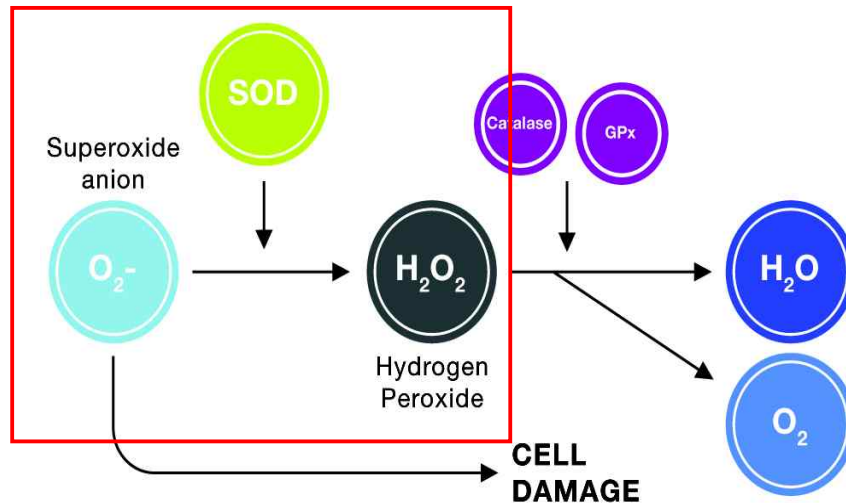


Figure 2. Role of antioxidant enzymes in the inactivation process of superoxide ion.

하지만, 인체 내에서 생성되는 항산화 효소의 양은 제한적이기 때문에 화장품 제조업체들은 피부노화를 예방 및 지연 시키는 제품을 개발하기 위해 활성유해 산소를 차단하는 항산화제 개발에 많은 관심을 가지고 있으며, 다양한 항산화제들이 개발되어 현재 노화완화용 화장품의 주요 성분으로 사용되고 있다.

## 2) 주름 생성 및 개선

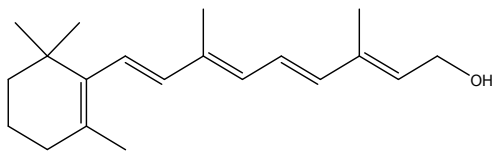
피부는 나이가 들면 피부의 구조와 생리적 기능이 감퇴되면서 노화현상을 보인다. 피부노화현상은 피부 세포 내 생체결합수의 손실, 피부 각질층의 구조 변화, 표피세포의 분화감소, 진피 내 섬유아세포에 의한 단백질 및 세포간물질의 합성 능력 저해 등 다양한 원인이 있다. 노화된 피부는 주름살과 상관없이 전체적으로 콜라겐 섬유와 탄력섬유들이 감소하고 변형되어 있고, 노화 정도에 따라 피부의 형태를 유지하는 힘이 약해져, 그 결과 중력에 의해 쉽게 접히거나 처짐, 그리고 근육의 움직임에 의해 쉽게 접히게 된다. 피부노화로 나타나는 주름을 제거하기 위해서 직접적으로는 피부 진피층 세포외기질에 존재하는 콜라겐의 합성을 통한 양의 증가에 따른 항상성을 유지하고 탄력섬유의 변성을 막는 것이 중요하다<sup>6</sup>. 현재, 국내에서 기능성 주름개선제로써 식품의약품안전처에서 유효성과 안정성을 입증 받은 성분과 함량은 Table 1, Figure 3과 같다.



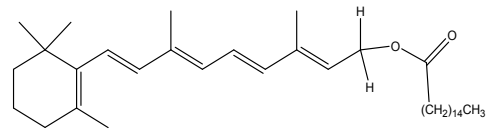
Table 1. Ingredients that improve anti-wrinkle

성분명	특성	함량
레티놀	세포분화 촉진 단백질합성 촉진	2,500 IU/g
레티닐팔미테이트	섬유아세포 활성화 엘라스틴 합성 촉진	10,000 IU/g
아데노신	섬유아세포 DNA 촉진 단백질 합성 증가 세포기능 향상	0.04%
폴리에톡실레이티드레틴아마이드	세포분화 촉진 단백질합성 촉진	0.05~0.2%

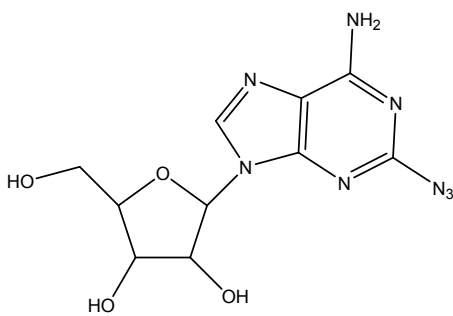
\*참조: 기능성 화장품 심사에 관한 규정 (식품의약품안전처 고시 제2016-98호, 2016. 9.7.)



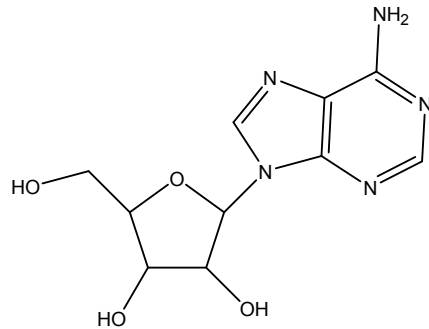
레티놀



레티닐팔미테이트



아데노신



폴리에톡실레이티드레틴아마이드

Figure 3. Structure of ingredients that improve anti-wrinkle.

### 3) 기능성 화장품의 생산 동향

기능성 화장품에 대한 관심이 커져가는 것에 비례하여 화장품의 생산량 또한 증가하고 있다. 2015년 국내 화장품 생산실적<sup>7</sup>이 10조 7,328억 원으로 2014년 (8조 9,704억 원)에 비해 19.8%가 증가하였고, 최근 5년간(2011년~2015년) 평균 성장률도 13.9%로 성장세가 두드러졌다(Figure 4).



Figure 4. Production performance of cosmetics (2011~2015).

\*출처: 대한화장품협회

기능성화장품의 생산실적<sup>8</sup>도 2015년 3조 8,559억 원으로 전체 생산실적의 35.9%를 차지하여 전년대비 29.6%의 성장률 증가를 보였다. 기능성화장품 중에서도 가장 높은 점유율(54.4%)을 차지하는 복합기능성의 생산실적은 2조 980억 원으로 연평균 37.1%의 성장률을 나타냈다. 주름개선 화장품의 생산실적은 1조 86억 원으로 전년대비 34.2% 증가하였고, 연평균 32.9%의 성장률을 보였다 (Table 2). 이외에도 자외선차단 화장품과 미백화장품의 생산실적은 각각 3,934억 원, 3,558억 원이고 전년대비 각각 15.4%, 49.5% 증가하였다.

Table 2. Production performance of cosmeceutical by type (2011~2015)

(단위: 백만 원)

세부 유형	2011년	2012년	2013년	2014년	2015년	'11~ '15년 연평균 성장률(%)
	생산 실적	생산 실적	생산 실적	생산 실적	생산 실적	
복합기능성	593,529	780,449	1,225,919	1,643,836	2,098,023	37.1
주름개선	323,088	666,454	690,273	751,779	1,008,659	32.9
자외선차단	413,834	402,682	380,909	340,811	393,415	-1.3
미백	311,308	298,739	266,746	237,944	355,779	3.4
소 계	1,641,759	2,148,324	2,563,847	2,974,370	3,855,876	23.8

\*출처: 대한화장품협회

#### 4) 뱀딸기(*Duchesnea indica*)

뱀딸기는 장미목 장미과의 여러해살이풀로서 사매, 배암딸기, 홍실뱀딸기, 가락지나물, 지매, 땅딸기, 야양매 등으로 불린다. 중국, 한국, 일본, 인도, 유럽, 북미에서 자생하고 전국 저지대 풀밭에서 흔하게 자란다.



Figure 5. Habitate of *D. indica* in Jeju island.

줄기는 옆으로 자라며 마디마다 뿌리를 내린다. 잎은 달걀형의 원모양으로 어긋나 있으며 3장씩 달려 앞면에는 털이 없고 뒷면에는 맥위에 털이 있다. 꽃은 4~5월에 노란색으로 잎 가장자리의 긴 꽃자루에 달려있으며, 열매는 수과로써 6월에 붉은 색으로 익는다. 뱀딸기의 전초는 여름부터 가을 사이에 채취하여 햇볕에 바싹 말려 차로 복용한다. 종자유 중의 지방산의 주요 성분인 linoleic acid가 53.1%가 들어있고, 불감화성물질에는 탄화수소, alcohol sterol이 있고 sterol 중의 주요성분인  $\beta$ -sitosterol은 총량의 89.5%이고, 그밖에 tannin이 함유되어 있다.

뱀딸기의 맛은 달고 시며, 차가운 성질을 가진다. 간경, 위경, 폐경에 작용하고 약리 실험에서 항암작용, 면역부활작용, 항균 작용이 있음이 밝혀졌다. 동의학사전(東醫學辭典)에 따르면 기침, 백일해, 부정자궁출혈, 위암, 자궁경부암, 코암, 인두암 인후종통, 디프테리아, 옹종, 창양, 화상, 습진 등에 쓴다고 하였고, 생초약성비요(生草藥性備要)에서는 종기를 삭이고, 통증을 그치게 하며, 어혈을 흘리고, 새 살을 돋게 한다고 명시되어있다. 그리고 명의별록(名醫別錄)에서는 찬 성질을 갖는 뱀딸기는 가슴과 배에 열이 계속되는 사람에게 좋고, 새살을 돋게 해주며, 면역증강(열매)에 좋은 효과가 있다고 전해지고 있다.



Figure 6. Picture of *D. indica*.

## I. 재료 및 방법

### 1. 제주 뱀딸기의 추출 및 용매 분획

제주 뱀딸기(*Duchesnea indica*) 전초는 2015년 7월 (주)탐나모(제주도 소재)에서 건조로 공급받아 사용하였다. 실온에서 건조된 제주 뱀딸기 전초를 분쇄하고 400 g을 칭량하여 증류수 10 L에 넣고 70°C에서 4시간 교반하였다. 침출시킨 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2회 더 반복 실시하였다. 이렇게 여과하여 얻어진 여액은 37°C의 수욕상에서 진공농축기(rotary vacuum evaporator)로 농축하여 열수 추출물 92.4 g(수율 23.1%)를 얻었다.

추출물 3.1 g를 증류수 200 mL에 현탁시키고, 분별 깔때기를 이용해 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, water 분획물을 얻었다(Figure 7).

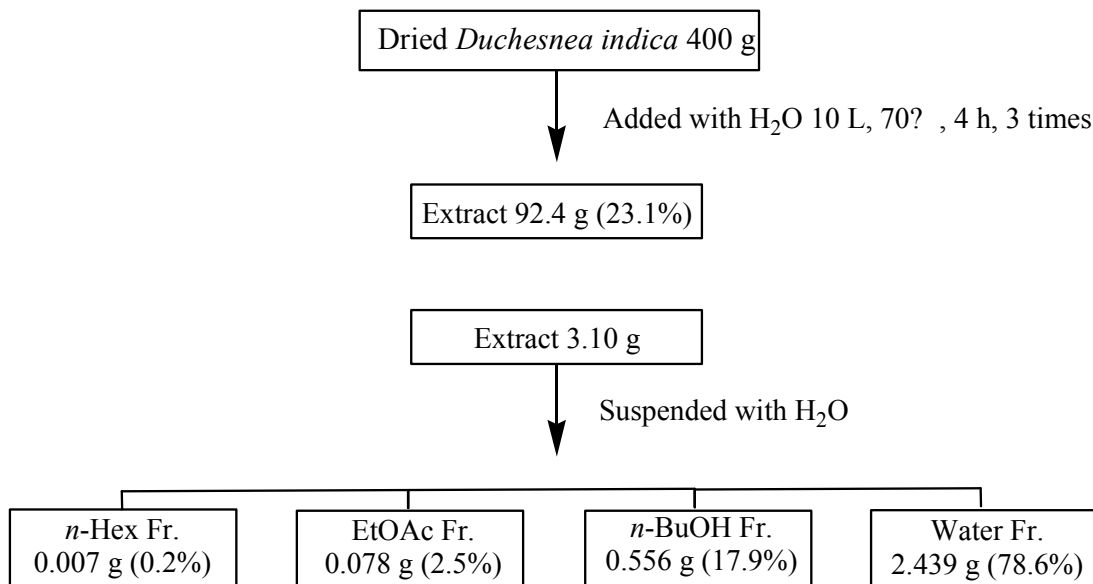


Figure 7. Extraction and solvent fractionation of *D. indica*.

## 2. 제주 뱀딸기 추출물과 분획물의 지표 성분 분석

### 1) HPLC 지표 성분 분석

분석에 사용된 high performance liquid chromatography (HPLC)는 2695 Separations module (Waters, USA)을 사용하였으며, 분석 및 용리 조건은 Table 3, Table 4 와 같고, 데이터 분석 S/W는 Waters의 Empower system 을 이용하였다. 대표적인 폴리페놀 성분인 gallic acid를 대상으로 분석하였고, Sigma사의 표준시약(HPLC grade)을 MeOH에 녹여 사용하였다. Gallic acid는 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL 농도로 희석하여 표준검정곡선을 작성하였으며, 분석 시료인 뱀딸기 추출물과 각각의 분획물 농도는 10 mg/mL가 되도록 하였다.

Table 3. HPLC chromatographic conditions of the control factors

Control factor	Conditions
Injection volume	10 µL
Column	shiseido CAPCELL PAK C18 (4.6 × 250 mm) pore size: 5 µm
Mobile phase	A: 0.05% acetic acid, B: acetonitrile
Flow rate	1 mL/min
Column temperature	40°C
Wavelength	270 nm
Detector	photodiode array (Waters)
Separation Module	Waters 2695

Table 4. Gradient elution conditions for the separation of flavonoids

Time (min)	Flow (mL/min)	A (%)	B (%)
0	1	98	2
20	1	90	10

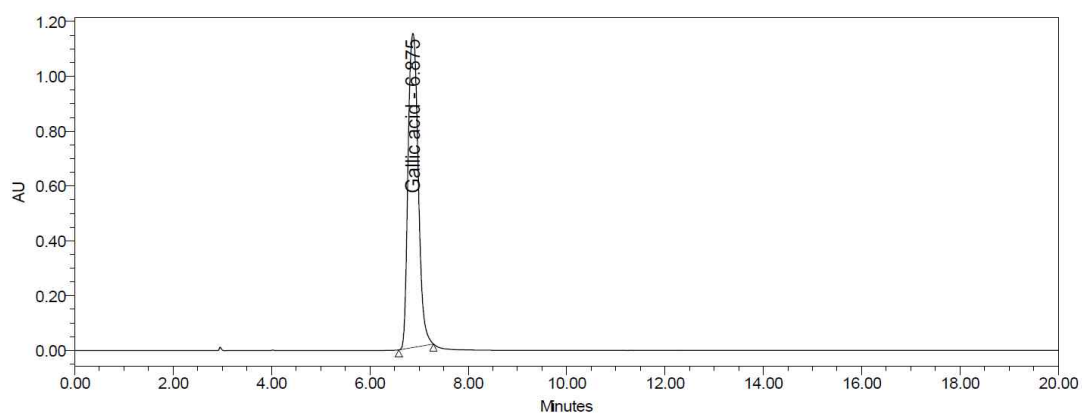


Figure 8. HPLC chromatogram of gallic acid standard (500 µg/mL).

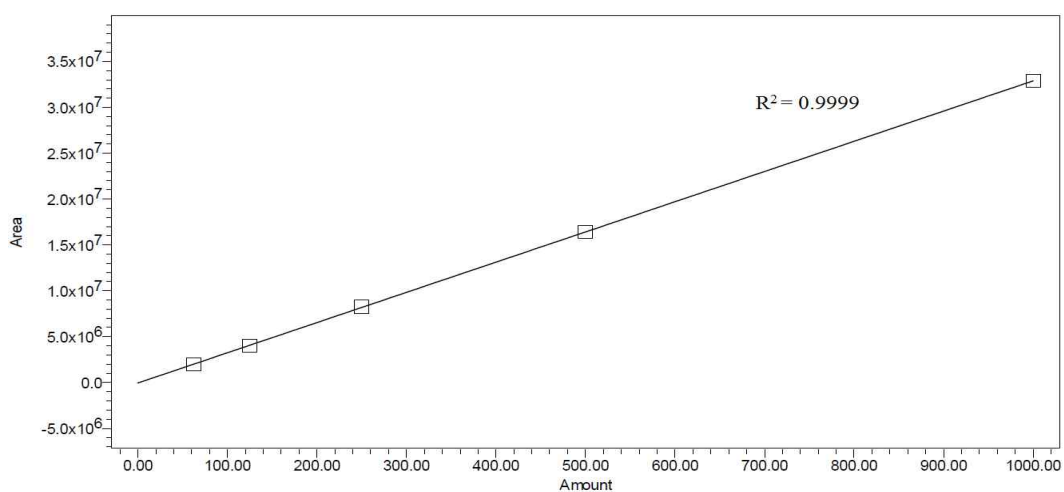


Figure 9. Calibration curve of gallic acid standard ( $R^2 = 0.9999$ ).

### 3. 제주 뱀딸기 추출물과 분획물의 활성

#### 1) 항산화 활성

##### (1) 총 페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis 법<sup>9</sup>을 이용하여 비색 정량 하였다. 시료 용액 100  $\mu\text{L}$ 에 증류수 900  $\mu\text{L}$ 를 넣어 total volume이 1 mL가 되도록 희석하였다. 여기에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 실온에서 약 3분간 반응시키고,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 (7%, w/v) 200  $\mu\text{L}$ 를 가하여 혼합한 후 증류수 700  $\mu\text{L}$ 를 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준 물질로 하여 작성한 표준검정곡선을 통해 정량하였다( $R^2 = 0.999$ ).

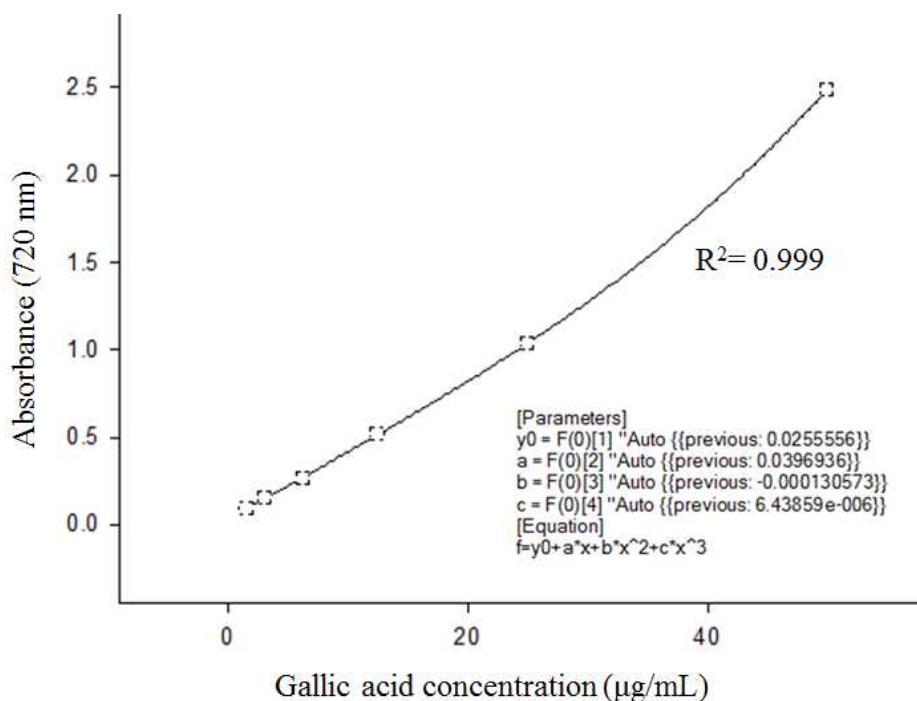


Figure 10. Calibration curve for quantification of total phenolic compound content.



## (2) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등의 방법<sup>10</sup>을 이용하여 비색 정량 하였다. 시료 용액 15  $\mu\text{L}$ 에 diethylene glycol 150  $\mu\text{L}$ , 1 N NaOH 15  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 혼합한 후 상온에서 1시간 반응시키고 microplate reader를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 표준물질로 하여 작성한 표준검정곡선을 통해 정량하였다( $R^2 = 0.999$ ).

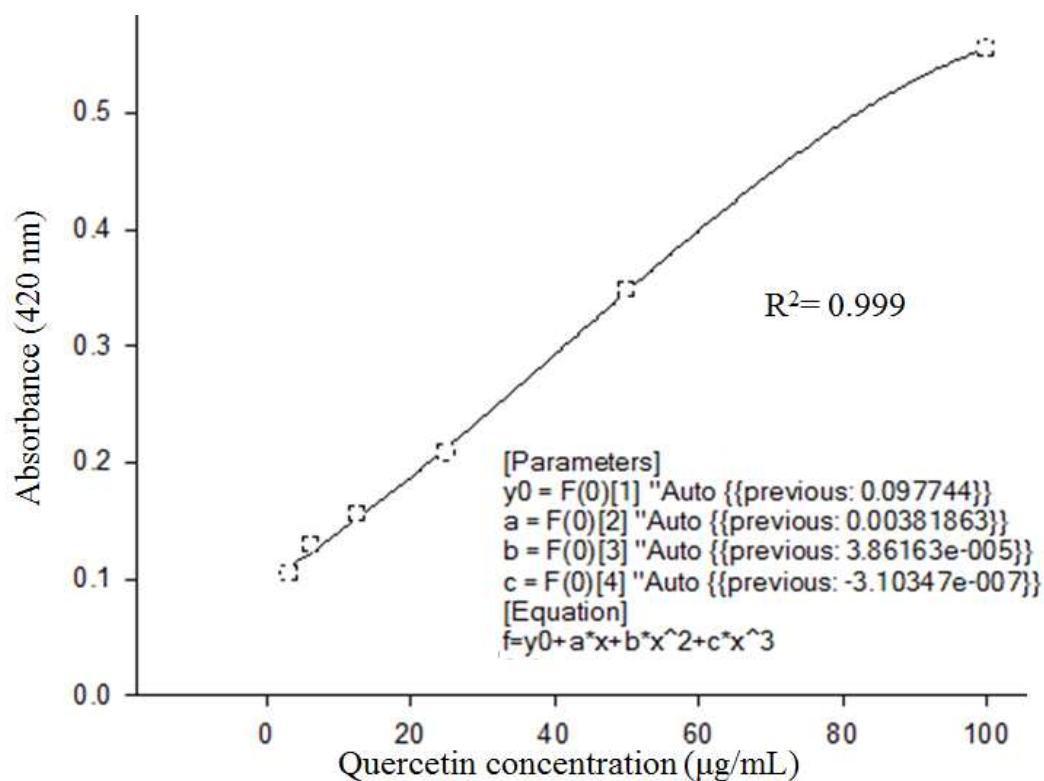


Figure 11. Calibration curve for quantification of total flavonoid content.

### (3) DPPH radical 소거 활성

항산화 활성은 변형된 Blois 등의 방법<sup>11</sup>을 이용하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical에 대한 전자공여능(electron donating ability, EDA)을 측정하였다. 추출물의 전자공여능 측정을 위해, 시료 20  $\mu$ L에 0.2 mM DPPH 용액 180  $\mu$ L를 넣고 상온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 사용하여 잔존하는 DPPH free radical을 517 nm에서 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = [ 1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}} ] \times 100$$

$A_{\text{control}}$  : 517 nm에서 DPPH의 흡광도

$A_{\text{sample}}$  : 517 nm에서 sample과 DPPH 반응액의 흡광도

$A_{\text{blank}}$  : 517 nm에서 sample 자체의 흡광도

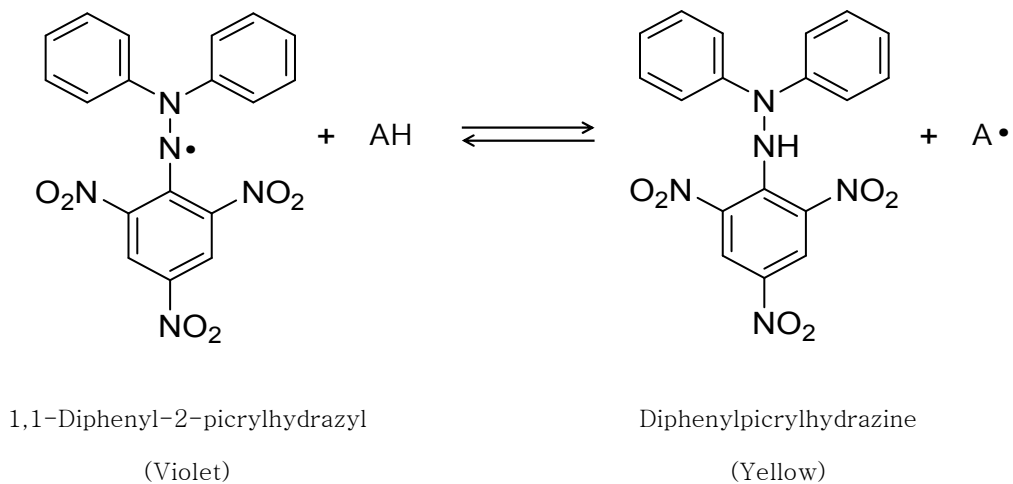


Figure 12. Principle of the DPPH radical scavenging by an anti-oxidant.

#### (4) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성

ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성은 Re 등의 방법<sup>12</sup>을 이용하여 측정하였다. ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성은 7.4 mM ABTS와 potassium persulfate를 혼합 후 실온 및 암소에서 16시간 동안 방치하여 radical을 형성시킨 후 이 용액을 700 nm에서 흡광도 값이  $0.78 \pm 0.02$ 가 되도록 EtOH로 희석하였다. 희석된 ABTS<sup>+</sup> 용액 180  $\mu$ L에 추출물 20  $\mu$ L를 가하여 실온에서 15분 동안 방치한 다음 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = [ 1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}} ] \times 100$$

$A_{\text{control}}$  : 700 nm에서 ABTS<sup>+</sup>의 흡광도

$A_{\text{sample}}$  : 700 nm에서 sample과 ABTS<sup>+</sup> 반응액의 흡광도

$A_{\text{blank}}$  : 700 nm에서 sample 자체의 흡광도

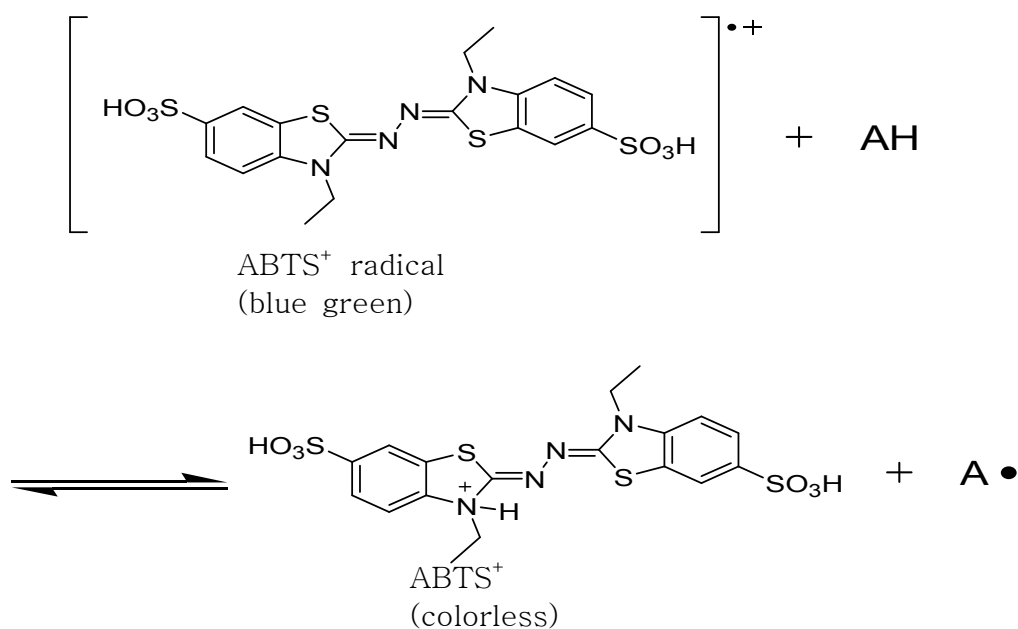


Figure 13. Principle of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging by an anti-oxidant.

(5) Reducing power 활성

Reducing power는 Oyaizu의 방법<sup>13</sup>을 변형하여 측정하였다. 이 실험은 700 nm에서 ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ )혼합물이 수소를 공여하여 유리라디칼을 안정화 시켜 ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ )로 전환하는 환원력을 흡광도 값으로 나타내는 방법이다. 시료 0.5 mL, 0.2 M sodium phosphate buffer 2.5 mL와 1% potassium ferricyanide 2.5 mL를 혼합하여 50°C에서 20분간 반응시켰다. 반응시킨 혼합 용액에 10% trichloroacetic acid 2.5 mL을 넣고 10분 동안 원심분리(5,000 rpm) 한 후 상층액 2.5 mL와 3차 증류수 2.5 mL, 0.1% Iron(III) chloride 0.5 mL을 가하여 혼합한 뒤 microplate reader를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

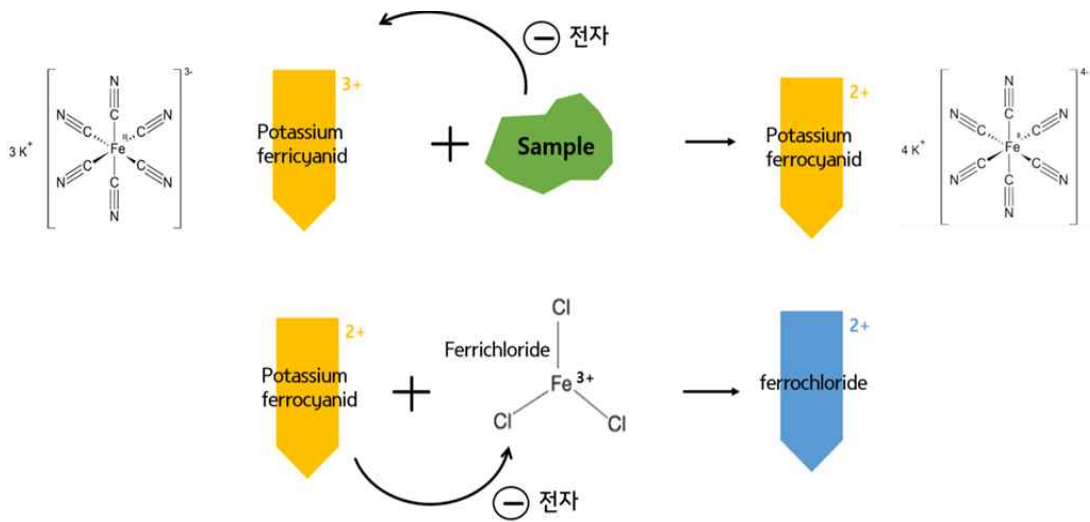


Figure 14. Principle of reducing power assay.

(6) Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 활성

환원력을 이용한 방법으로 Benzie와 Strain에 의한 방법<sup>14</sup>을 이용하여 측정하였다. 실험에 쓰이는 FRAP reagent는 300 mM C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> buffer (pH 3.6)와 40 mM HCl에 용해시킨 10 mM의 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine), 20 mM의 FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 10:1:1의 비율로 사용하였다. 시료 용액 20 μL와 FRAP reagent 180 μL를 혼합하여 10분간 방치한 후 microplate reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였고, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O를 표준물질로 사용하여 정량하였다(R<sup>2</sup> = 0.9995).

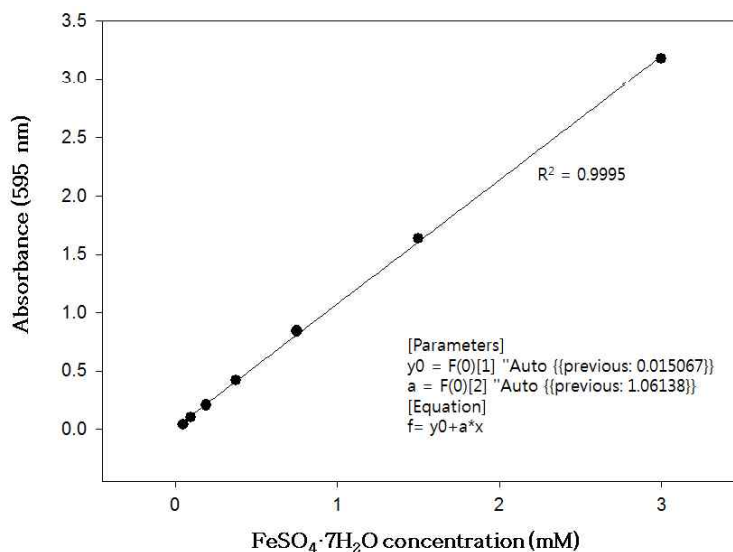


Figure 15. Calibration curve for quantification of FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O content.

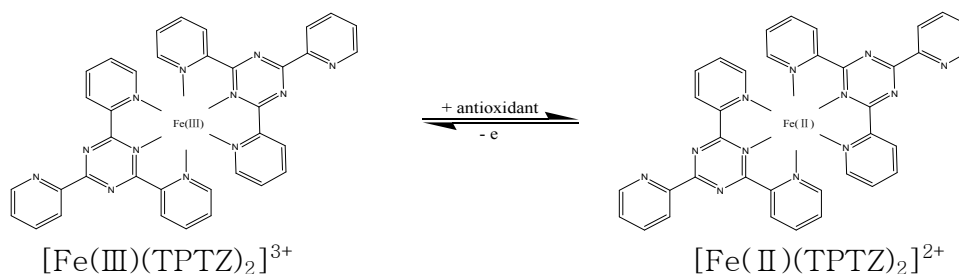


Figure 16. Change of [Fe(III)(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> by a redox reaction.

(7) Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성

추출물 내 SOD 유사 활성을 측정하기 위해 SOD determination kit (Sigma-Aldrich Inc., USA)를 사용하였고, SOD 활성측정은 96 well plate에 각 시료 20  $\mu\text{L}$ 를 넣고 buffer로 희석한 WST working solution을 200  $\mu\text{L}$  넣은 후 20  $\mu\text{L}$ 의 enzyme working solution을 혼합하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 반응시킨 후, microplate reader를 사용하여 450 nm에서 측정하였다. Superoxide 소거 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

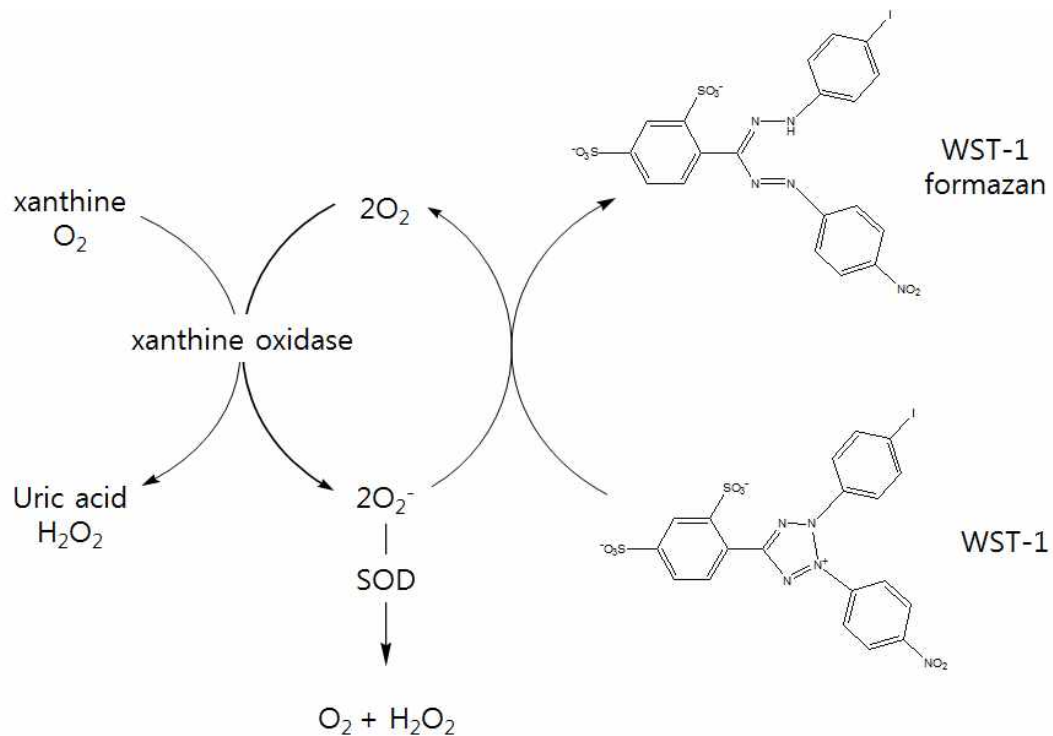


Figure 17. Principle of the SOD-like activity assay.

## 2) 주름 개선 효과

### (1) Elastase 저해 활성

Elastase 저해 활성은 James의 방법<sup>15</sup>을 응용하여 사용하였다. 돼지췌장 elastase (Porcine pancreatic elastase, PPE)를 효소로 사용하였고, N-succ(Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitroanilide (SANA)를 기질로 사용하여 분광광도법을 이용한 방법으로 실시하였다. 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0.1 mg/mL elastase, 6.25 mM SANA, 그리고 각 시료들을 농도별로 준비하고, 96 well plate에 buffer 157  $\mu$ L, SANA 10  $\mu$ L, elastase 13  $\mu$ L, 시료용액 20  $\mu$ L를 넣어 25 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해율은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었고, 이를 바탕으로 elastase의 활성을 50% 저해시키는데 필요한 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)를 계산하였다. 대조군으로는 oleanolic acid를 사용하였다.

$$\text{Elastase inhibition activity (\%)} = [ 1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}} ] \times 100$$

$A_{\text{sample}}$  : 시료 반응용액의 흡광도

$A_{\text{blank}}$  : 시료만의 흡광도

$A_{\text{control}}$  : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

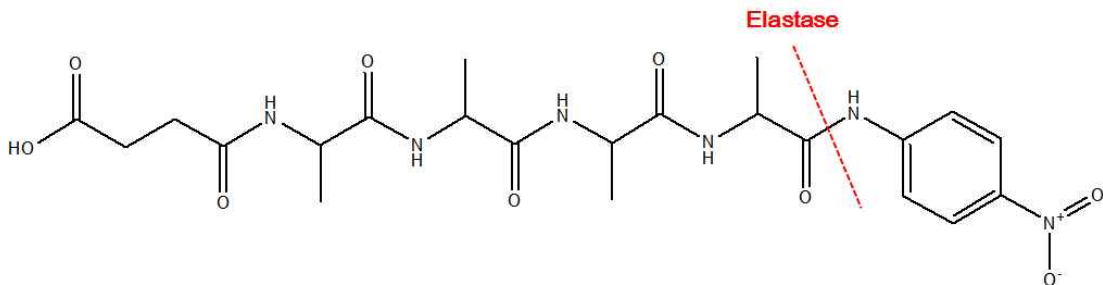


Figure 18. Structure and breakdown of N-succ(Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitroanilide.

## (2) Collagenase 저해 활성

Collagenase 저해 활성 측정을 Wunsch E의 방법<sup>16</sup>으로 측정하였다. 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여, 0.3 mg/mL의 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-Arg를 녹인 기질액 0.25 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 0.2 mg/mL의 collagenase 0.15 mL를 첨가한다. 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5 mL를 넣어 반응을 정지시킨 후, ethylacetate 1.5 mL를 첨가하여 상등액을 320 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Collagenase inhibition activity (\%)} = [ 1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}} ] \times 100$$

$A_{\text{sample}}$  : 시료 반응용액의 흡광도

$A_{\text{blank}}$  : 시료만의 흡광도

$A_{\text{control}}$  : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

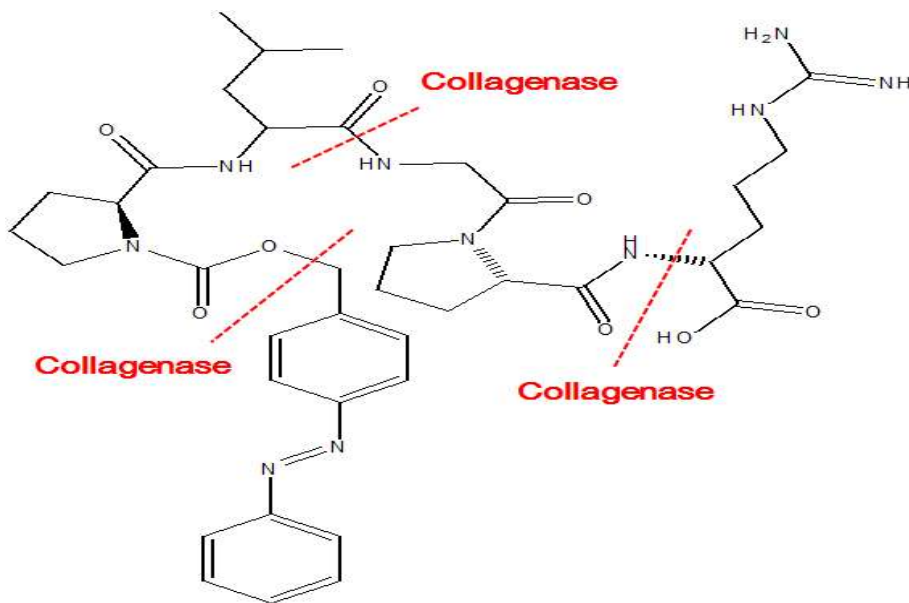


Figure 19. Structure and breakdown of 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-Arg.



### 3) 멜라닌 합성

#### (1) Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 저해 활성은 DOPA chrome법<sup>17</sup>을 응용하여 사용하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8), 2 mM L-tyrosine, 2500 unit의 tyrosinase, 그리고 각 시료들을 농도별로 준비한다. 96 well plate에 buffer 105  $\mu$ L, L-tyrosine 70  $\mu$ L, tyrosinase 5  $\mu$ L, 그리고 시료용액 20  $\mu$ L를 넣고 37°C에서 10분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해율은 다음과 같은 식에 의해 %로 계산되었다.

$$\text{Tyrosinase inhibition activity (\%)} = [ 1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}} ] \times 100$$

$A_{\text{sample}}$  : 시료 반응용액의 흡광도

$A_{\text{blank}}$  : 시료만의 흡광도

$A_{\text{control}}$  : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 흡광도

#### (2) B16F10 melanoma 세포 활용 멜라닌 합성

시료의 멜라닌 합성 능력을 측정하기 위하여 B16F10 murine melanoma 세포를 이용하여 melanogenesis 활성 효과를 측정하였다. 6 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well이 되도록 세포를 분주하고, 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. Phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하고 500 nM  $\alpha$ -MSH를 포함한 배지로 교환 후 sample을 농도별로 각각 첨가하여 3일간 배양하였다. 3일 동안 배양 후 배지를 제거하고 PBS buffer로 세척한 후 트립신으로 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 1 M NaOH를 첨가하여 55°C에서 2시간 방치 후 세포내의 melanin을 얻었다. Microplate reader로 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4) 인체피부 일차자극 시험

화장품, 의약품 등을 포함한 피부 외용제는 대개 건강한 정상인들이 일상적으로 장기간 연용하는 제품으로, 특정 질환의 치료를 위하여 일정기간 사용되는 의약품과는 다르다. 의약품의 경우 치료라는 유효성과 이에 따르는 부작용을 동시에 고려하여 가치가 결정되는 반면 이러한 피부 외용제는 절대적인 안전성이 확보된 이후에 유효성이 검토되어야 한다. 원료 및 제품의 안전성을 확보하기 위하여 인체 피부를 이용한 시험 및 동물을 이용한 시험이 보편적으로 이루어져 왔으나 그 중 가장 많이 사용되는 방법이 인체접포시험이다. 따라서 인체접포시험이 피부 외용제의 안전성을 평가하는데 가장 필수적인 방법으로 이용되고 있다.<sup>18</sup> 이에 따른 제주 뱀딸기 추출물의 인체피부에 대한 일차자극 유무를 확인하였다.

##### (1) 시험 대상자

피험자 선정기준 및 제외기준에 부합되는 18세 ~ 60세의 남성 또는 여성 30명 이상을 대상으로 실시하였다.

##### (2) 시험 재료

- Finn Chambers: SmartPractice, Dendark
- Micropore tape: 3M / Medical-Surgical Division, USA
- Microman (M250): Gilson, France
- Skin Marker: Chemotechnique Diagnostics AB, Sweden

##### (3) 시험 방법

- 시험 부위는 70% ethanol로 세척한 뒤 건조시켰다.
- 시험 물질은 각각 100 µg/mL, 200 µg/mL 농도를 액상 상태로 적용하였다.

- 시험 물질 16  $\mu$ L를 Finn chamber 내에 적하시킨 후 시험부위인 등 부위에 얹고, micropore tape로 고정시켰다.
- 첩포는 48시간 동안하며, 첩포를 제거한 후에는 skin marker로 시험 부위를 표시하고 30분, 24시간 후에 각 시험 부위를 관찰하였다.

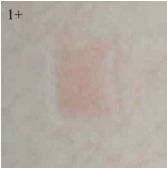
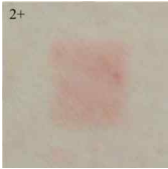


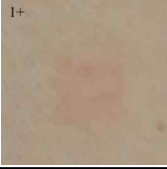


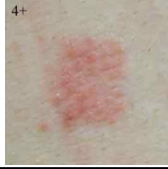


Figure 20. Picture of human primary irritation test.

#### (4) 판정 기준

관찰은 첩포 제거 후 30분, 24시간 경과 시 이루어지며 피부 반응은 Frosch & Kligman 법을 반영한 다음의 기준에 따라 평가하였다.

Table 5. Clinical standard photographs of visual assessment for human patch test

Description	Slight erythema, either spotty or diffuse	Moderate uniform erythema	Intense erythema with edema	Intense erythema with edema & vesicle
After 30 min	1+ 	2+ 	3+ 	4+ 
After 24 h	1+ 	2+ 	3+ 	4+ 

(5) 결과 계산 방법

48시간 및 72시간의 평균 반응도를 아래의 식을 이용하여 계산하였으며, 각 물질에 대한 평균 반응도는 Table 6의 기준에 따라 그 결과를 판정하였다.

$$\text{Response} = \frac{\sum (\text{Grade} \times \text{No. of Responders})}{4 (\text{Maximum grade}) \times n (\text{Total Subjects})} \times 100 \times 1/2$$

Table 6. Human primary irritation index for cosmetic products

Range of Response	Criteria
$0.00 \leq R < 0.87$	Slight
$0.87 \leq R < 2.42$	Mild
$2.42 \leq R < 3.44$	Moderate
$3.44 \leq R$	Severe

## 5) 항균 활성

### (1) 균주 배양

황색포도상구균인 *Staphylococcus aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708), *Staphylococcus epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)와 여드름균인 *Propionibacterium acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)를 항생제내성 균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양받아 사용하였다. *S. aureus*는 LB (Luria bertani) 배지로 배양하였고, *S. epidermidis*인 경우, 배양배지를 TSB (tryptic soy broth)로 하여 37°C에서 배양하였으며, 하루에 한 번씩 계대 배양하였다. *P. acnes*인 경우, 배양배지를 GAM broth로 하여 37°C, 혐기성 조건에서 배양하였으며, 2일에 한 번씩 계대 배양하였다.

### (2) Paper disc 확산법

시료의 항균활성을 측정하기 위해 paper disc diffusion method로 생육 저지환을 확인하였다. *S. aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708)와 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)는 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL로 맞춰준 후, 0.8% agar를 포함하는 TSB 배지에 넣어 하드배지(1.5% agar) 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올리고 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다<sup>19</sup>.

*P. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010, 9089)는 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여  $1.5 \times 10^6$  CFU/mL로 맞춰준 후, 0.8% agar를 포함하는 GAM 배지에 넣어 하드배지(1.5% agar) 위에 붓는다. 배지가 굳으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올리고 37°C에서 48시간 동안 혐기 배양한 후 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다. 대조군으로는 erythromycin을 사용하였다<sup>19</sup>.

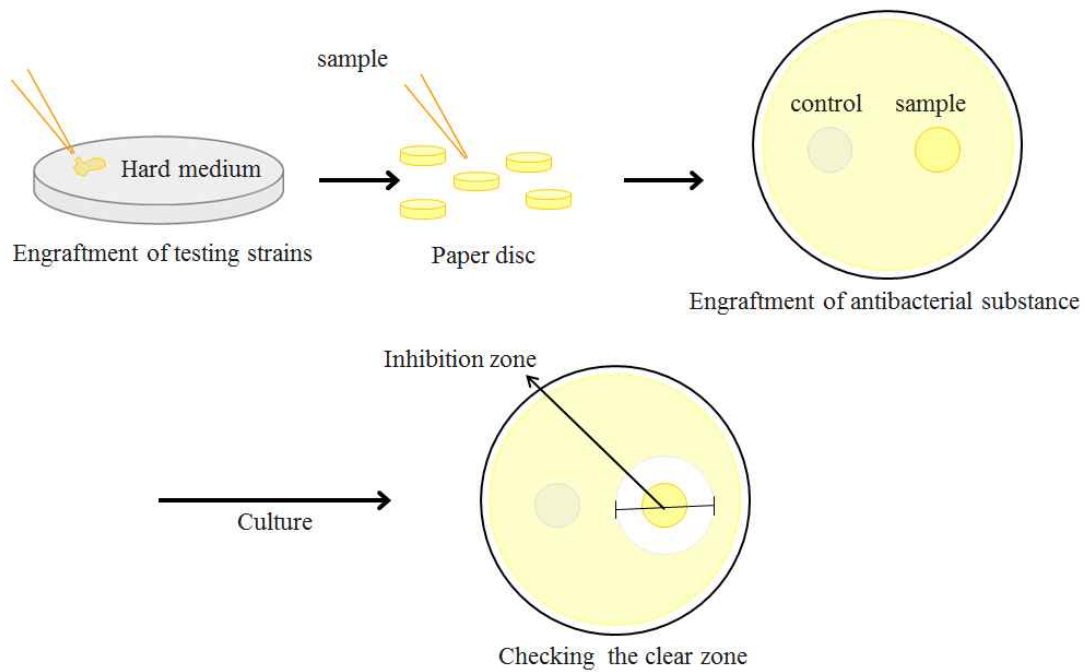


Figure 21. Paper disc diffusion test.

### (3) MIC (minimum inhibitory concentration)

최소억제농도(MIC, minimum inhibitory concentration)는 미생물의 성장을 막는 항생물질의 최소농도로, 미생물에 대한 MIC 값이 낮으면 낮을수록 시료물질은 그 미생물에 대한 감수성이 높다고 할 수 있다. MIC 측정은 액체배지희석법(broth dilution method)을 변형하여 사용하였다. 96 well plate에 희석한 시료(2 ~ 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 용매(negative control)를 각 20  $\mu\text{L}$  넣고 배지를 80  $\mu\text{L}$  넣어준 후, 균의 최종 농도가 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)에 맞도록 균 현탁액의 농도를  $1 \times 10^6$  CFU/mL로 조절하여 각 100  $\mu\text{L}$ 씩 넣었다. *S. aureus* 와 *S. epidermidis* 는 37°C에서 24시간 배양하였으며, *P. acnes* 는 37°C, 혐기성 조건에서 48시간 배양하였다. 이후 균의 증식이 나타나지 않는 최소농도를 확인하였다.

(4) MBC (minimum bactericidal concentration)

MIC 값에서 균의 억제 활성을 확인하였지만, 시료 영향에 따른 균의 성장 방해가 균의 사멸처럼 보일 수 있기 때문에 균의 확실한 사멸을 확인하기 위해 최소 사멸농도(MBC, minimum bactericidal concentration)를 확인하였다. MBC는 MIC 값이 나타난 그 이상의 농도의 시료 배양액들을 하드배지(1.5% agar)에 배양하여 colony를 형성하는지 확인하는 방법이다.

먼저 하드배지(1.5% agar) plate를 준비하고 MIC를 진행한 96 well plate에서 loop를 이용하여 시료 배양액을 찍어 plate에 streaking을 하였다. *S. aureus* 와 *S. epidermidis* 는 37°C에서 24시간 배양하였으며, *P. acnes*는 37°C, 혐기성 조건에서 48시간 배양하여, colony가 형성되지 않는 최소농도를 확인하였다.

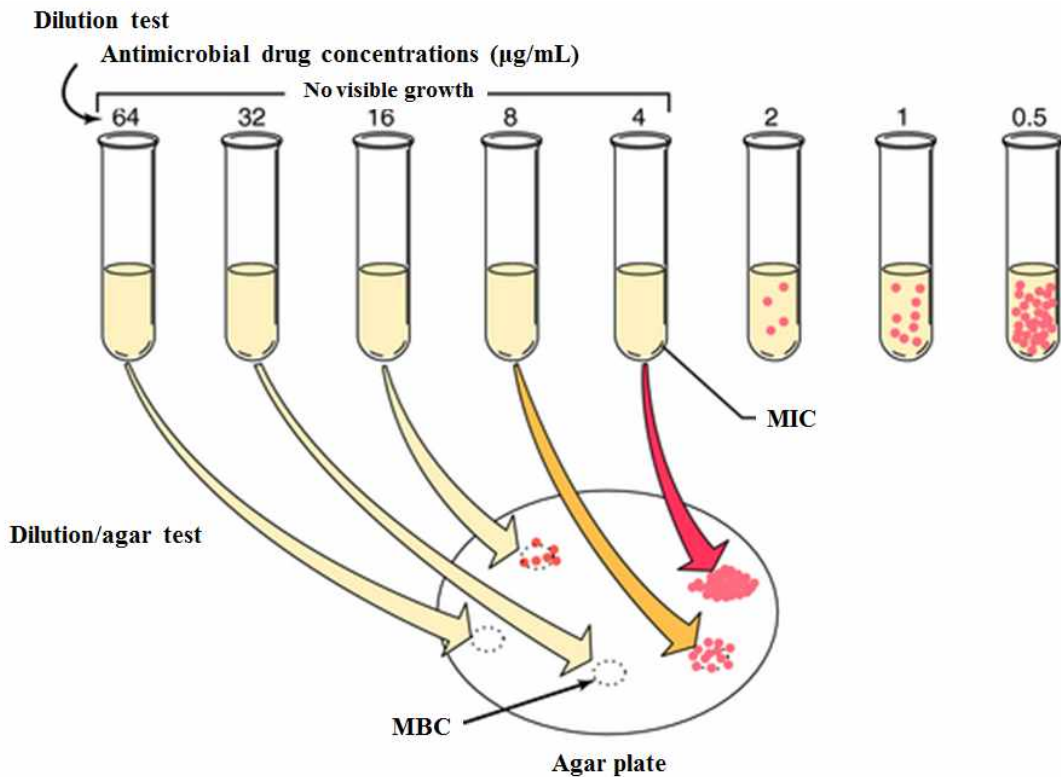


Figure 22. MIC (minimum inhibitory concentration) and MBC (minimum bactericidal concentration) test.

## I. 결과 및 고찰

### 1. HPLC를 이용한 지표 성분 함량 분석

제주 뱀딸기의 지표 성분인 gallic acid는 폴리페놀의 기본 구조로써 항산화, 항암, 당뇨병 예방 효과가 뛰어난 것으로 잘 알려져 있다<sup>20</sup>. Gallic acid를 표준물질로 사용하여 분석한 결과, EtOAc 분획물에서 5.22%로 가장 높은 함량을 보여 항산화 활성이 우수할 것이라 예상하였다(Figure 24, Table 7).

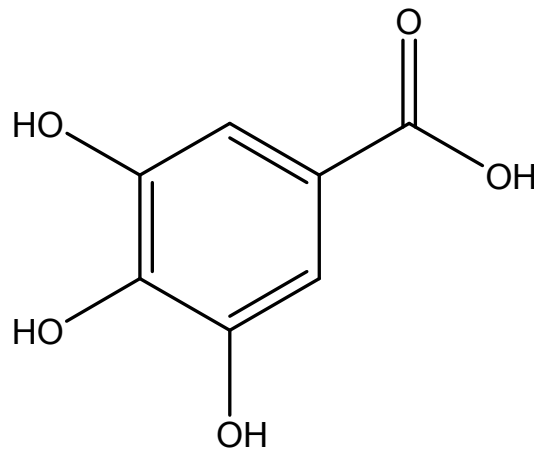


Figure 23. Structure of gallic acid.



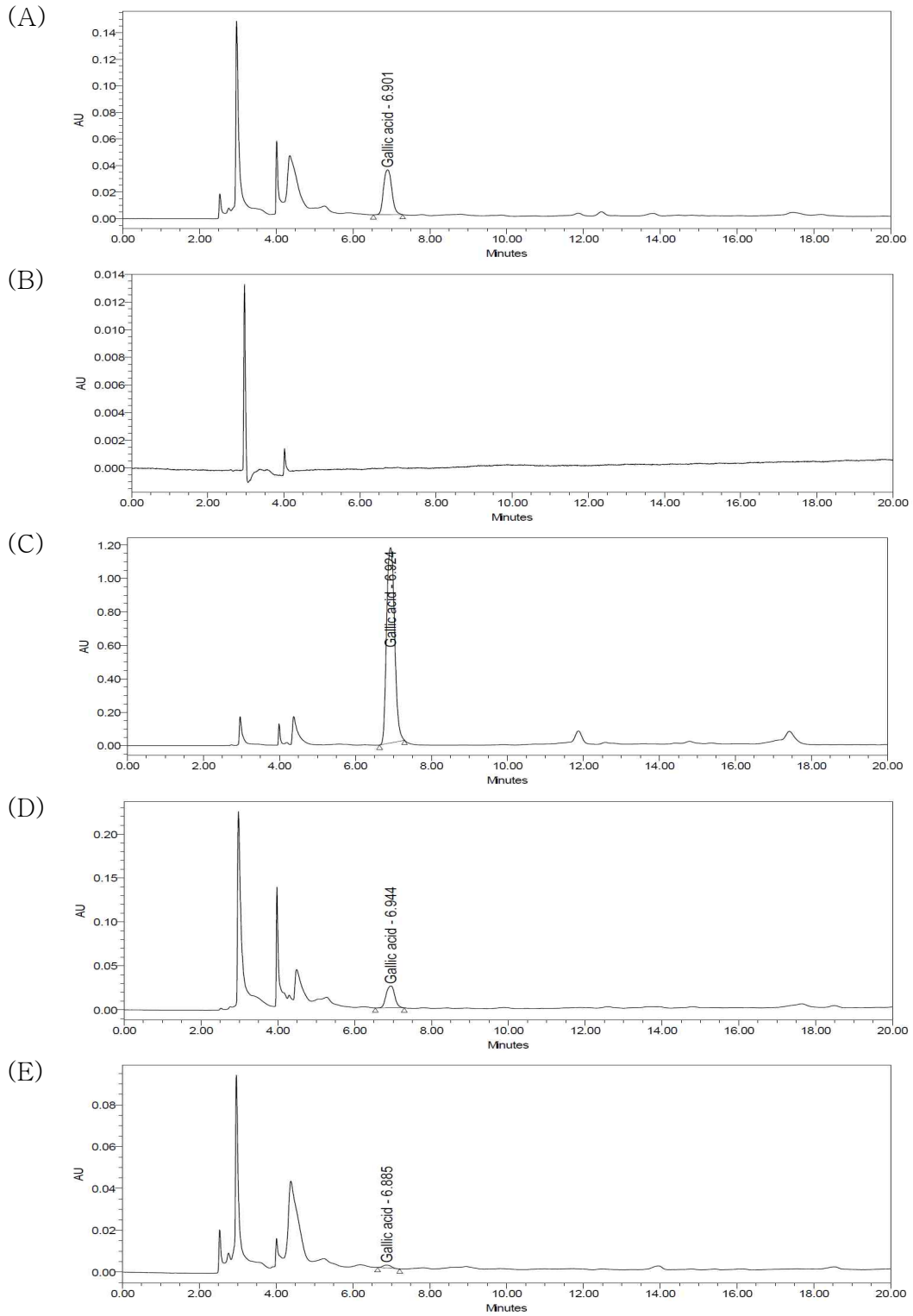


Figure 24. HPLC chromatogram of gallic acid (A; extract of *D. Indica*, B; hexane fraction, C; EtOAc fraction, D; BuOH fraction, E; water fraction).

Table 7. Gallic acid content of DIW and fractions

	Contents of gallic acid	
	mg/g	%
DIW	1.673	0.16
Hex Fr.	not detected	not detected
EtOAc Fr.	52.273	5.22
BuOH Fr.	1.327	0.13
Water Fr.	0.206	0.02

## 2. 제주 뱀딸기 추출물 및 분획물 생리활성

### 1) 항산화 활성

#### (1) 총 페놀 및 플라보노이드 함량

페놀계 물질들은 식물체에 특수한 색깔을 부여하고, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl (OH)기를 가진 방향족 화합물들을 가리키며, 플라보노이드와 타닌이 주성분으로 총치예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다<sup>21</sup>.

시료를 추출하여 얻어진 추출물을 극성이 유사한 물질군(物質群)으로 나누는 작업을 분획(fractionation)이라 한다. 분획 방법으로는 주로 유기 용매를 이용하며, 이러한 용매 분획법은 서로 섞이지 않는 물과 유기 용매를 이용하여 순차적으로 분배하는 방법이다. 이 때 *n*-hexane 층에는 극성이 거의 없는 지질, 색소 등이 분리되어 나오고, ethyl acetate 층에서는 flavonoid, alkaloid 등의 적당한 극성 물질이 얻어진다<sup>22</sup>. *n*-BuOH 층에서는 더욱 극성이 큰 물질인 배당체 등이 추출되어 나오고, 남아있는 물 층(잔사, residue)에서는 극성이 매우 큰 당, 아미노산 등이 용해되어 있게 된다<sup>23</sup>.

Gallic acid와 quercetin을 표준용액으로 사용한 검정곡선을 작성하여 시료에 함유된 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Figure 13 과 같다. 추출물 및 분획물의 중량 g 당 함유하고 있는 gallic acid와 quercetin의 양으로 환산하여 나타내었다. 그 결과, EtOAc 분획물에서 가장 많은 폴리페놀(140.0 mg/gGAE) 및 플라보노이드(24.4 mg/gQE)를 함유하고 있었으며, 이는 항산화, 항염 등의 생리 활성 실험 결과와도 관련이 있을 것이라 예상하였다.

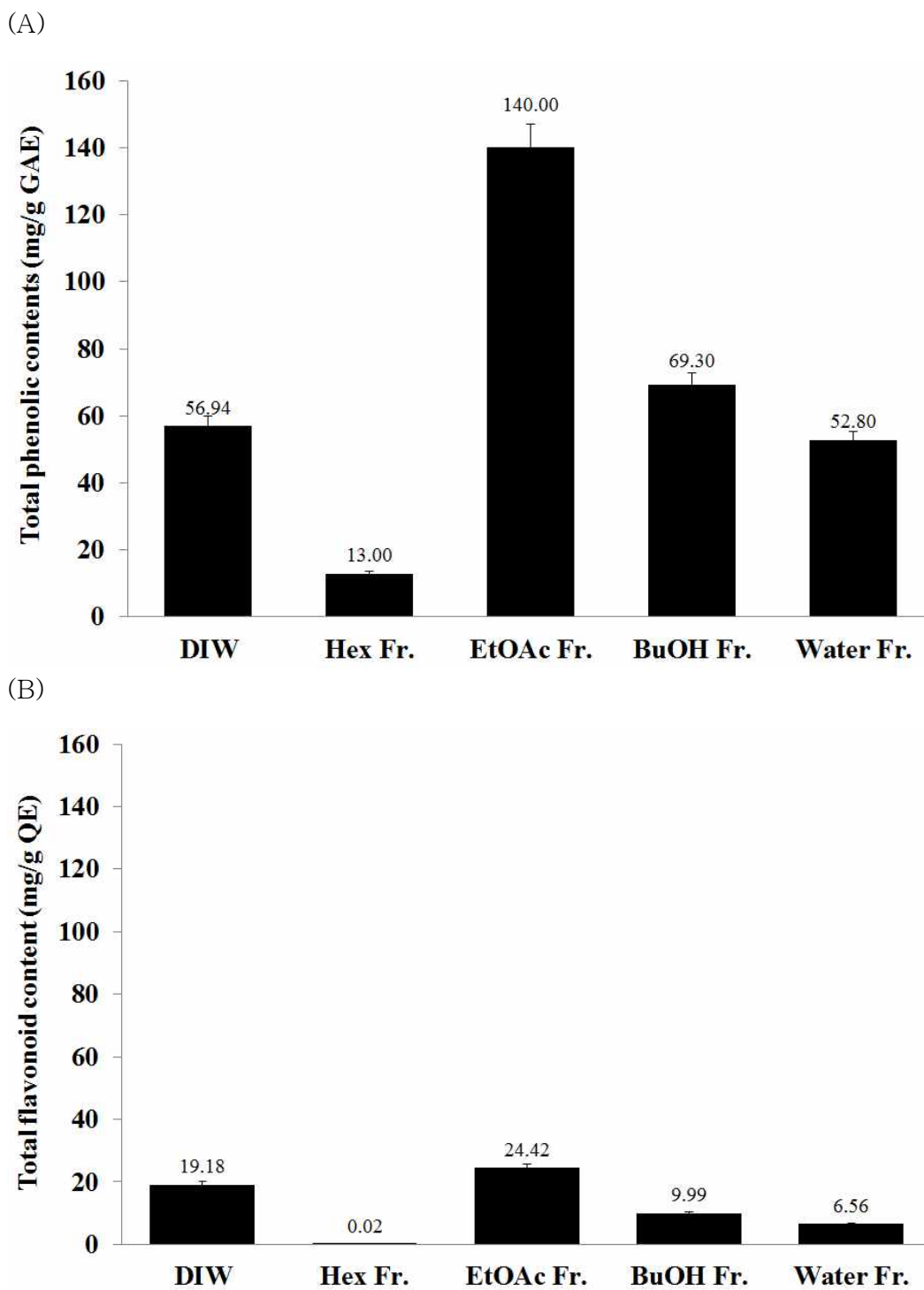


Figure 25. Total phenolic contents (A) and Total flavonoid contents (B) of DIW and solvent fractions.

## (2) DPPH radical 소거 활성

항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 DPPH radical 소거활성은 비교적 간단하면서 대량으로 측정이 가능한 항산화 측정법이다. DPPH는 radical 중 비교적 안정한 화합물로 황 함유 아미노산, ascorbic acid, 페놀성 화합물 등의 항산화 물질로부터 전자나 수소를 제공받아 DPPH-H로 환원되면서 보라색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 간단히 측정할 수 있는 동시에 식물체의 항산화 활성과도 연관성이 매우 높기 때문에 많이 이용되고 있는 방법이다.<sup>24</sup> 제주 뱀딸기 열수 추출물(DIW) 및 용매 분획물에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과 열수 추출물( $SC_{50} = 35.09 \mu\text{g/mL}$ ), EtOAc 분획물( $SC_{50} = 24.81 \mu\text{g/mL}$ ), BuOH 분획물( $SC_{50} = 46.58 \mu\text{g/mL}$ ) 및 water 분획물( $SC_{50} = 101.22 \mu\text{g/mL}$ )에서 농도의존적으로 DPPH radical 소거 활성을 보였다. 특히, EtOAc 분획물에서 높은 활성을 보이는데, 농도가  $50.0 \mu\text{g/mL}$ 에서는 대조군인 ascorbic acid와 비슷한 효과를 보였다.

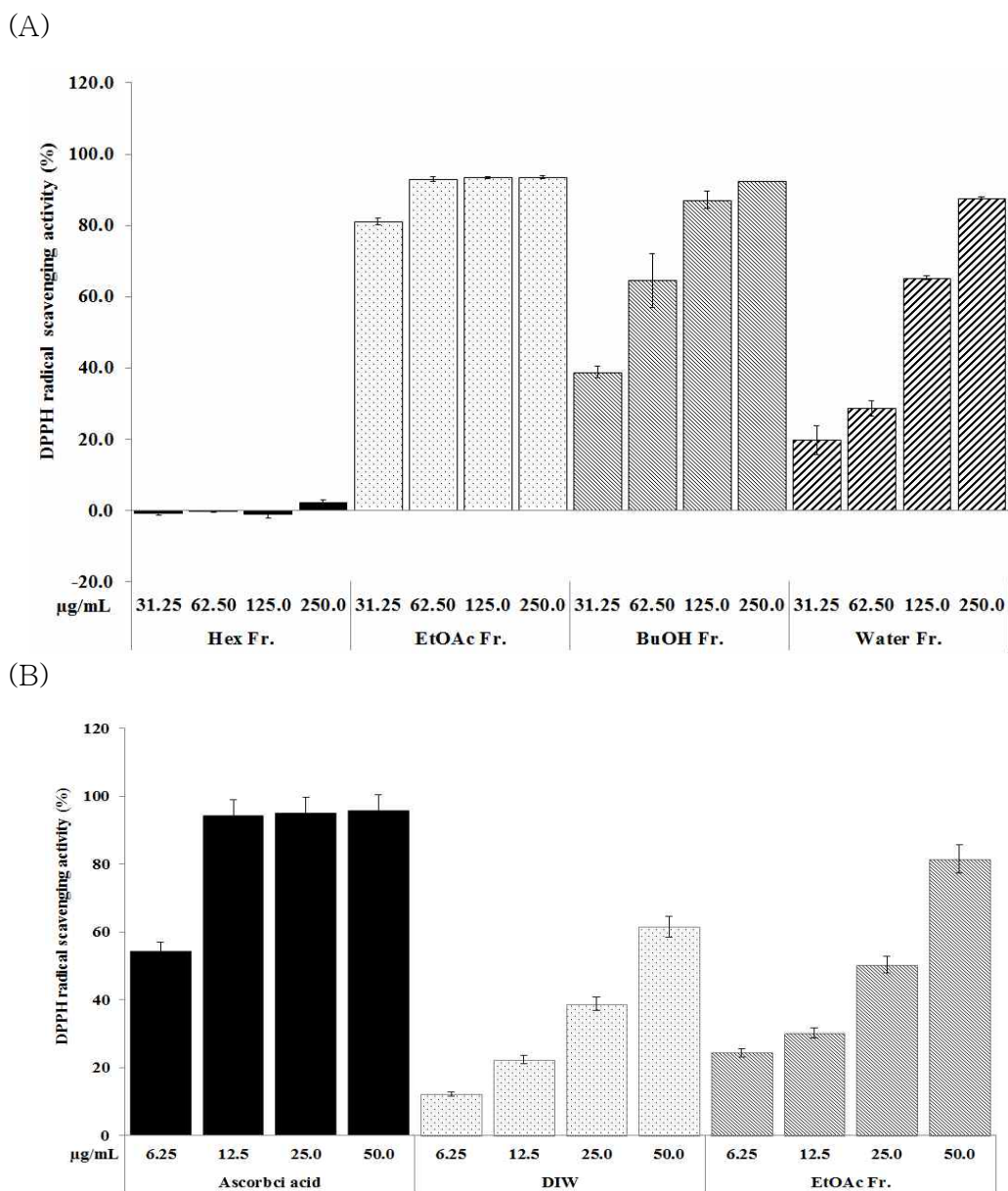


Figure 26. DPPH radical scavenging activities (A; solvent fractions, B; DIW and EtOAc Fr.).

Table 8. SC<sub>50</sub> values of DPPH radical scavenging activity

	DIW	Hex Fr.	EtOAc Fr.	BuOH Fr.	Water Fr.	Ascorbic acid
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	35.09	>1000	24.81	46.58	101.22	5.70

### (3) ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성

제주 뱀딸기 열수 추출물(DIW) 및 용매 분획물에 대하여 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 항산화 활성을 측정하는 대표적인 방법 중 하나인 ABTS 방법은 전체적인 free radical을 소거하는 DPPH 방법과 달리 cation radical을 제거하는 능력을 확인하는 방식이다. ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성 측정결과, 제주 뱀딸기 열수 추출물(SC<sub>50</sub> = 19.20 µg/mL)과 Hex 분획물(SC<sub>50</sub> = 913.63 µg/mL), EtOAc 분획물(SC<sub>50</sub> = 6.20 µg/mL), BuOH 분획물(SC<sub>50</sub> = 20.09 µg/mL) 및 water 분획물(SC<sub>50</sub> = 30.00 µg/mL) 모두 농도 의존적인 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 보였다. 특히, EtOAc 분획물의 활성은 positive control인 ascorbic acid (SC<sub>50</sub> = 4.83 µg/mL)의 활성과 유사한 효과를 보였다.

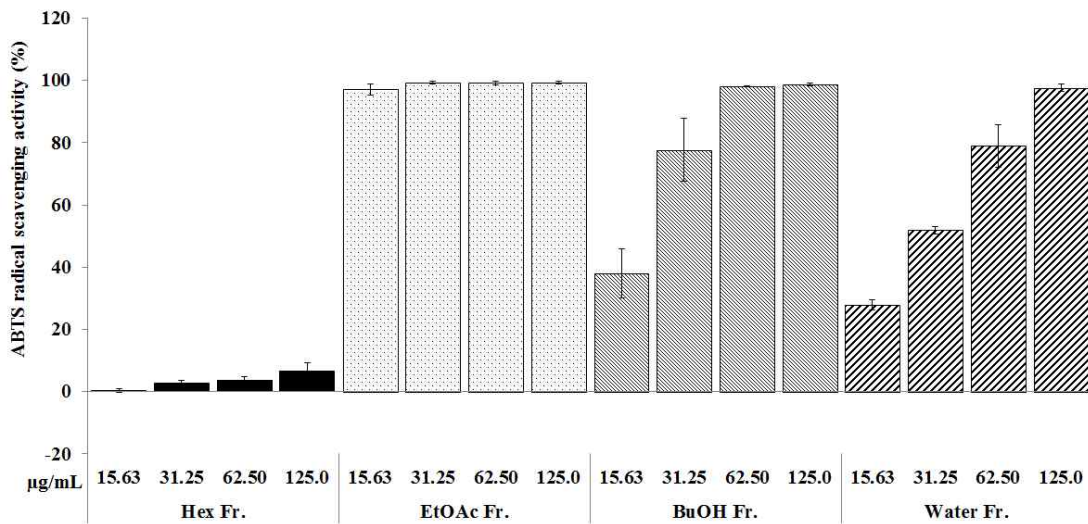


Figure 27. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of solvent fractions.

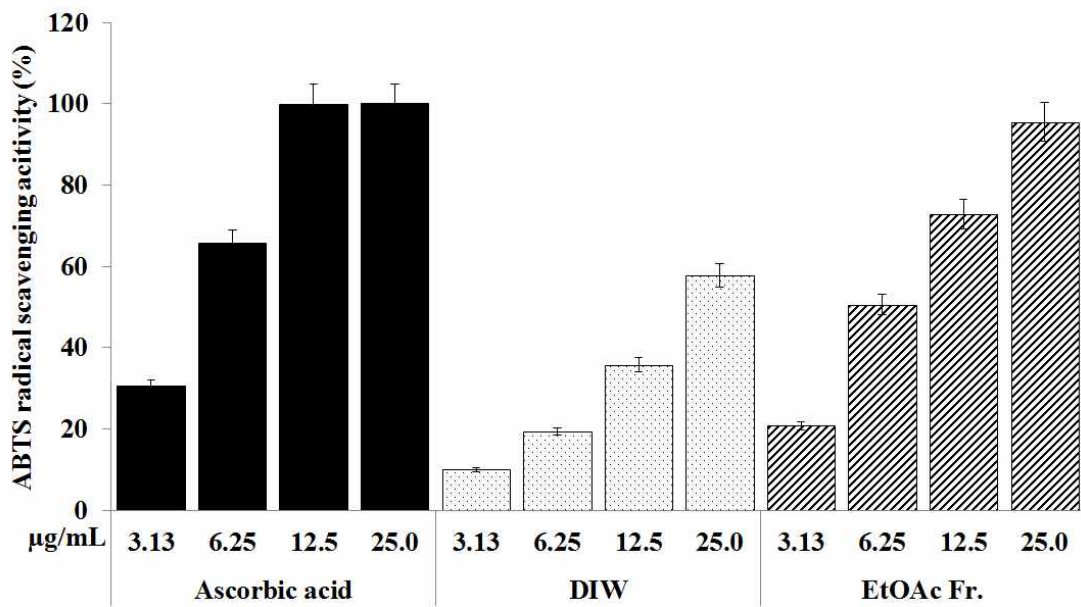


Figure 28. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities of DIW and EtOAc fraction.

Table 9. SC<sub>50</sub> values of ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity

	DIW	Hex Fr.	EtOAc Fr.	BuOH Fr.	Water Fr.	Ascorbic acid
SC <sub>50</sub> (µg/mL)	19.20	913.63	6.20	20.09	30.00	4.83



(4) Reducing power 활성

Reducing power 측정은 700 nm에서 ferric ( $Fe^{3+}$ ) 혼합물이 수소를 공여하여 ferrous ( $Fe^{2+}$ )로 전환하는 환원력을 흡광도 값으로 나타낸 것으로, 항산화 활성과 밀접한 관련이 있으며, 항산화 활성을 측정하는데 중요한 지표로 사용되고 있다. 즉, 반응 혼합물의 흡광도 값이 증가할수록 reducing power도 증가했음을 나타낸다. 결과는 Figure. 29와 같이 제주 뱀딸기 열수 추출물(DIW)와 모든 분획물에서 환원력이 농도에 의존으로 증가하는 것으로 나타났다.

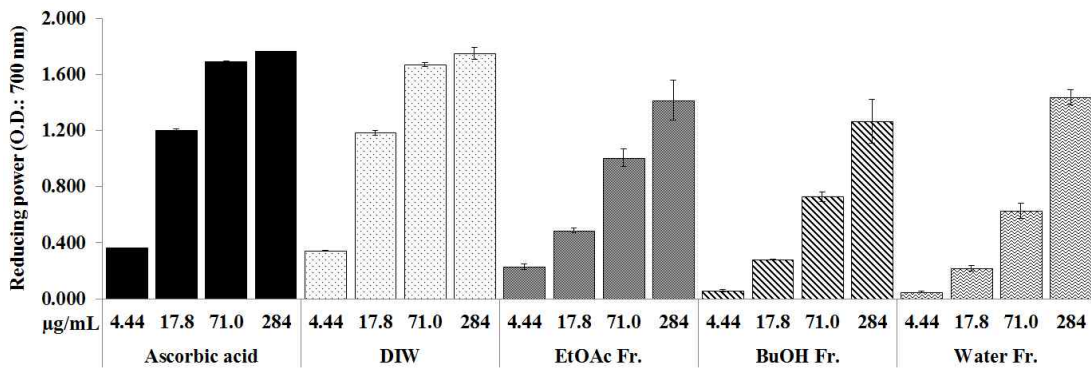


Figure 29. Antioxidative activity of *D. indica* extract and solvent fractions determined by reducing power assay.

Table 10. Antioxidative activity of the DIW and fractions by reducing power assay

Concentration (µg/mL)	Reducing power (O.D.: 700 nm)				
	Ascorbic acid	DIW	EtOAc Fr.	BuOH Fr.	Water Fr.
4.44	0.361 ± 0.001	0.341 ± 0.001	0.227 ± 0.019	0.059 ± 0.007	0.048 ± 0.005
17.8	1.203 ± 0.007	1.183 ± 0.019	0.487 ± 0.015	0.282 ± 0.001	0.218 ± 0.019
71.0	1.689 ± 0.005	1.669 ± 0.015	1.006 ± 0.063	0.728 ± 0.034	0.629 ± 0.054
284	1.765 ± 0.001	1.751 ± 0.043	1.416 ± 0.143	1.265 ± 0.156	1.438 ± 0.053

(5) Ferric reducing antioxidant power (FRAP) 활성

산성 pH 영역에서 ferric tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) 복합체가 환원성 물질에 의해 청색의 ferrous tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ)으로 환원되는 능력을 통해 산화 활성을 검증하는 방법으로써, 전자공여 산화제로 작용하는  $\text{Fe}^{3+}$ 와 항산화제와의 반응을 통해 생성된  $\text{Fe}^{2+}$ 을 흡광도를 통해 정량할 수 있는 방법이다. 표준물질인  $\text{FeSO}_4$ 와 비교하여 측정된 결과, EtOAc 분획물(18.6  $\text{FeSO}_4$  eq mol/g)이 가장 강한 환원력을 나타냈고. 열수추출물(17.8  $\text{FeSO}_4$  eq mol/g), *n*-BuOH 분획물(8.2  $\text{FeSO}_4$  eq mol/g), water 분획물(5.6  $\text{FeSO}_4$  eq mol/g) 순서로 나타났다(Figure 30).

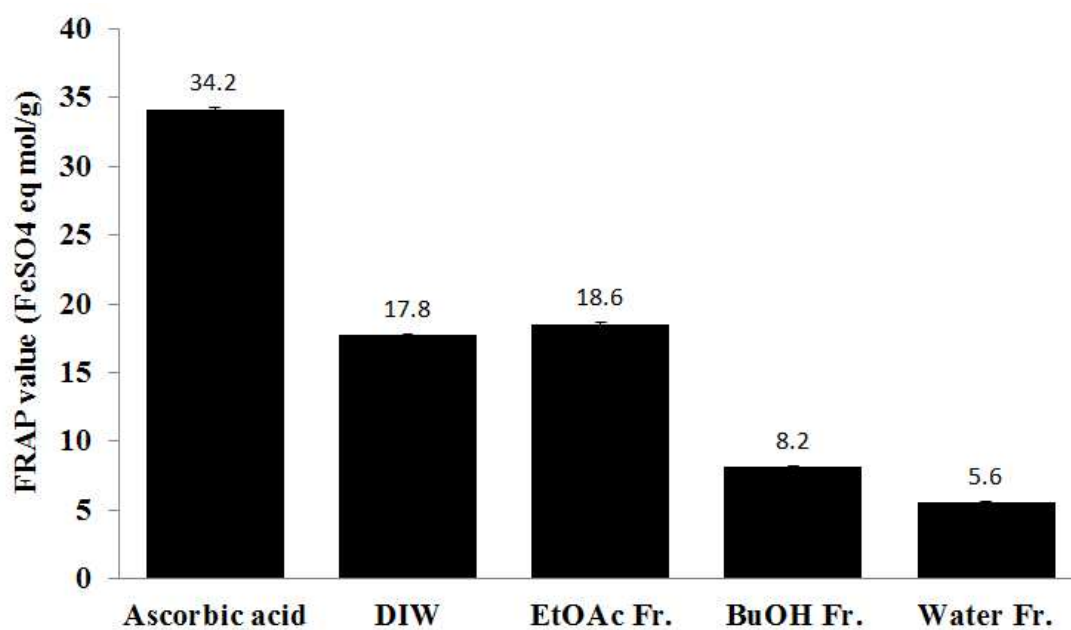


Figure 30. Antioxidative activity of the DIW and solvent fractions determined by FRAP assay.

(6) Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성 측정

Superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ )은 안정한 상태를 되찾기 위해서 3개의 전자를 필요로 하기 때문에 활성산소 중에서 가장 강력하면서도 위험하다. 제주 뱀딸기 열수 추출물(DIW) 및 분획물에 대한 superoxide anion radical 소거 능력은 Figure 31과 같다. 추출물과 모든 분획물이 대조군인 ascorbic acid보다 높은 활성을 나타내었으며,  $SC_{50}$  값은 제주 뱀딸기 열수추출물(DIW)과 분획물 모두 < 7.80  $\mu\text{g/mL}$ 이고, 그 중에서 EtOAc 분획물이 가장 높은 활성을 보일 것이라 예상된다.

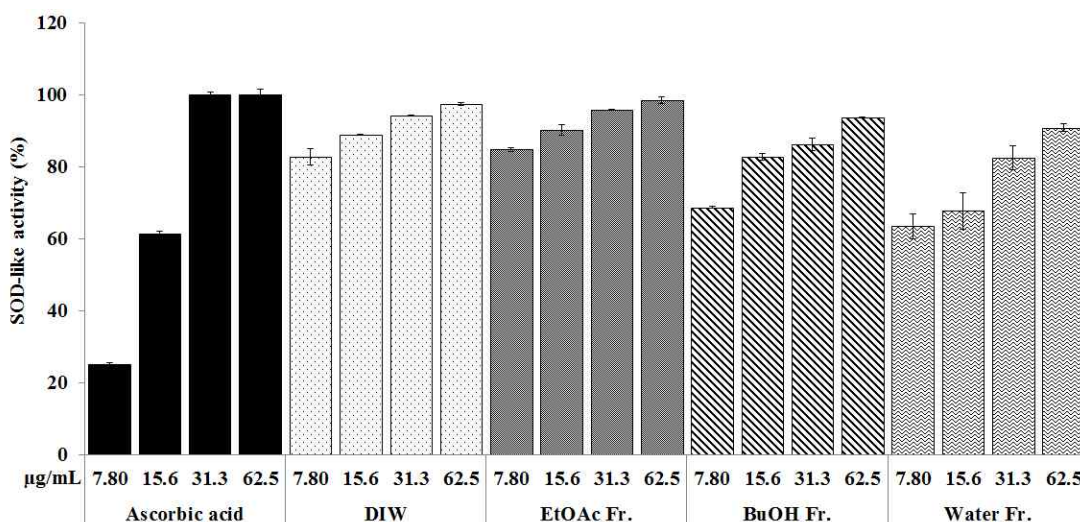


Figure 31. Superoxide anion radical scavenging activity of DIW and solvent fractions. Results are means  $\pm$  SD of triplicate data.

Table 11.  $SC_{50}$  values of SOD-like activity

	DIW	EtOAc Fr.	BuOH Fr.	Water Fr.	Ascorbic acid
$SC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	< 7.80	< 7.80	< 7.80	< 7.80	12.9

## 2) 주름 개선 효과

### (1) Elastase 저해 활성

자외선 및 활성산소 등에 의해 자극받는 피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases (MMPs)는 피부노화 중에 특히 주름생성과 밀접한 관계가 있다<sup>25</sup>. MMPs를 이루는 주요성분 중 하나인 elastase는 동물 결합 조직의 불용성 탄성 섬유 성분인 엘라스틴을 분해할 수 있는 유일한 효소이며, 콜라겐과 엘라스틴 같은 결합조직을 지지하고 구성하는 모든 단백질들을 가수분해<sup>26</sup>하기 때문에 elastase를 저해하는 것이 피부 주름을 개선하는 방법 중 하나이다.

제주 뱀딸기 열수 추출물(DIW)과 각각의 용매 분획물에 대한 elastase 저해 실험 결과, DIW는 IC<sub>50</sub> 값 84.04 µg/mL을 보여, 대조군으로 사용한 oleanolic acid의 값(IC<sub>50</sub> = 32.94 µg/mL)과 유사한 활성을 보였다. 용매 분획물에서는 *n*-BuOH 분획물(IC<sub>50</sub> = 528.26 µg/mL)과 water 분획물에서만 농도 의존적으로 활성이 있었다(Table 12).

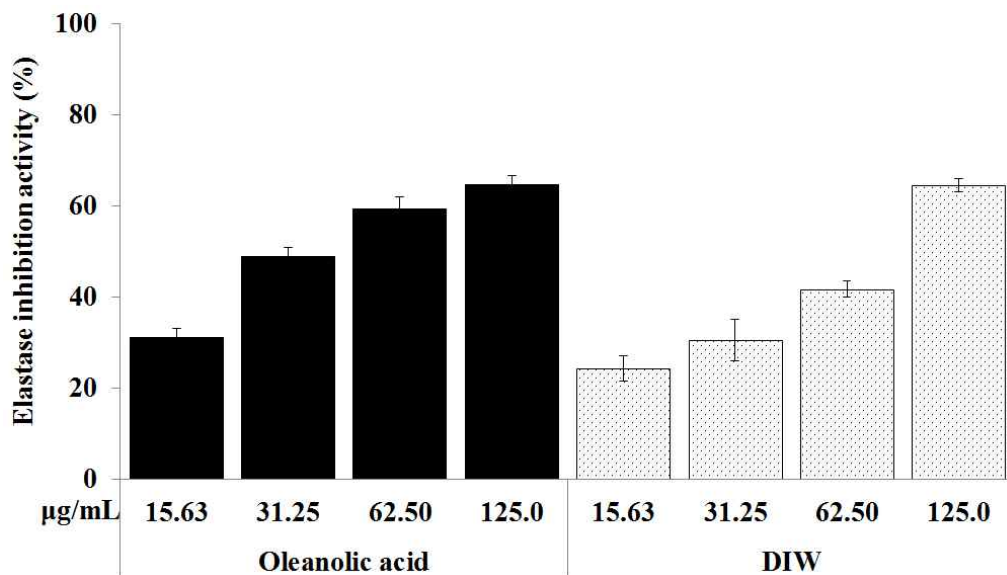


Figure 32. Elastase inhibition effects of DIW.

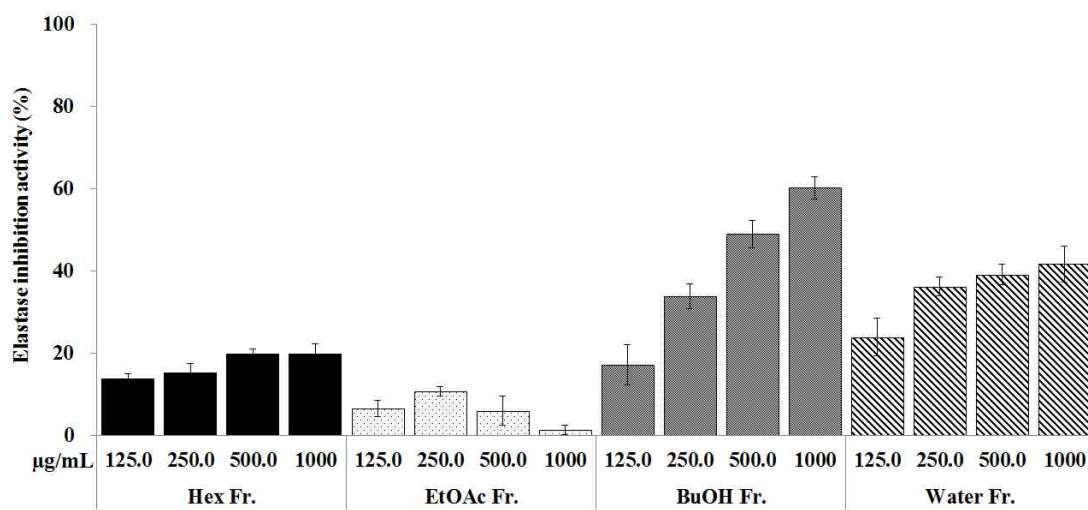


Figure 33. Elastase inhibition effects of solvent fractions.

Table 12. IC<sub>50</sub> values of elastase inhibition activity

	DIW	Hex Fr.	EtOAc Fr.	BuOH Fr.	Water Fr.	Oleanolic acid
IC <sub>50</sub> (µg/mL)	84.04	N.A.	N.A.	528.3	>1000	32.94

N.A.: No Activity

(2) Collagenase 저해 활성

Collagen을 분해하는 효소는 그 종류가 다양하며 가장 많이 알려져 있는 것이 Collagen type I을 분해하는 matrix metalloproteinase I (MMP-1, collagenase)으로 피부노화에 있어 MMP-1의 저해는 중요한 요인으로 평가되고 있다<sup>27</sup>. Collagenase 저해 활성 결과는 Figure 34, Table 13과 같다. 제주 뱀딸기 열수 추출물(DIW)의 collagenase 저해 활성의 IC<sub>50</sub> 값은 89.34 µg/mL로 대조군으로 사용한 EGCG (epigallocatechin gallate)의 IC<sub>50</sub> 값(186.86 µg/mL)보다 우수하였다. water 분획물을 제외한 나머지 분획물에서는 활성이 나타나지 않았다.

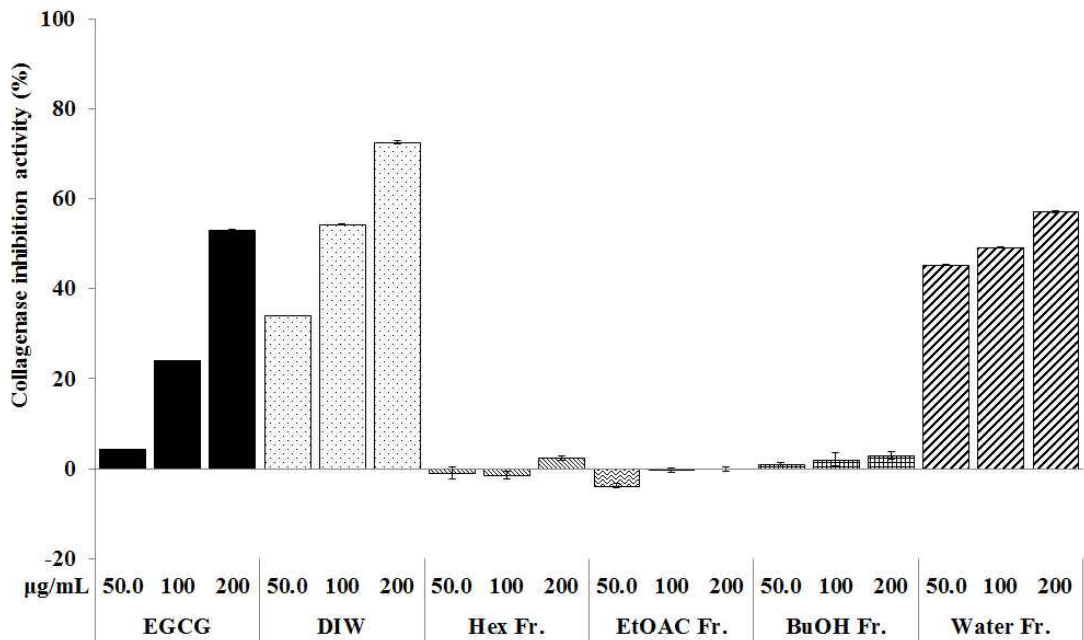


Figure 34. Collagenase inhibition effects of DIW and solvent fractions.

Table 13. IC<sub>50</sub> values of collagenase inhibition activity

	DIW	Hex Fr.	EtOAc Fr.	BuOH Fr.	Water Fr.	EGCG
IC <sub>50</sub> (µg/mL)	89.34	N.A.	N.A.	N.A.	109.20	186.86

N.A.: No Activity

### 3) 멜라닌 합성 능력 측정

#### (1) Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase는 melanosome에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 만들고, DOPA를 산화시켜 DOPA chrome을 만드는 효소로서 멜라닌 polymer를 합성한다. 그러므로 tyrosinase 활성 억제제는 피부 내에서 멜라닌 polymer 합성을 효과적으로 저해할 수 있기 때문에 중간 생성단계에서 tyrosinase에 의해 생성되는 반응 산물인 DOPA chrome의 저해 정도를 확인하는 L-DOPA oxidase 방법을 채택하였다<sup>28</sup>. 제주 뱀딸기 열수 추출물(DIW)에 대한 tyrosinase 저해 실험결과, 대조군인 arbutin ( $IC_{50} = 77.09 \mu\text{g/mL}$ )이 tyrosinase의 활성을 저해하는 반면에 DIW는 tyrosinase의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 시료의 농도가  $1000 \mu\text{g/mL}$ 일 때 약 30.5% 증가하였고 최종 멜라닌의 증가를 여부를 확인하기 위하여 B16F10 melanoma 세포를 활용한 실험을 진행하였다.

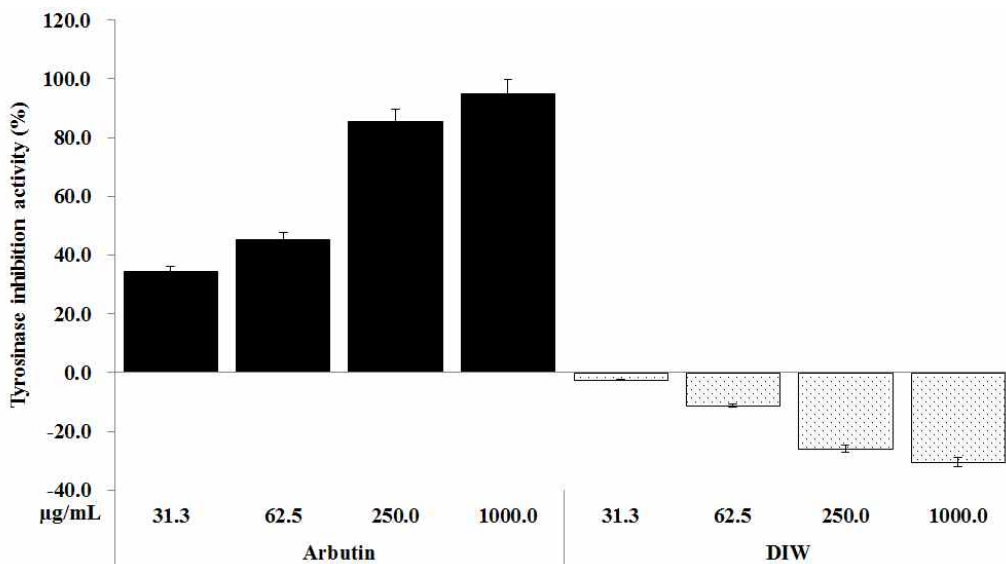


Figure 35. Tyrosinase inhibition effects of DIW.

## (2) B16F10 melanoma 세포를 이용한 멜라닌 합성

### ① 세포 생존율(cell viability)

제주 뱀딸기 열수 추출물(DIW)이 B16F10 melanoma 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT 방법을 이용하여 생존율을 측정하였다. 제주 뱀딸기 열수 추출물을 50, 100 및 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 후 48시간동안 배양한 결과 대조군과 비교할 때 DIW의 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서는 94% 로서 높은 생존율을 보였으며, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서는 90% 생존율을 나타냈다. 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  고 농도에서는 생존율이 약 70%를 나타냈다.

### ① B16F10 melanoma 세포 활용 멜라닌 합성

멜라닌 생성 유도 물질인  $\alpha$ -MSH는 뇌하수체 및 피부를 포함한 여러 가지 말초조직에서 분비되는 pleiotropic molecule로써 표피세포의 성장과 증식, 국소조직의 면역 조절, 멜라닌 색소 생성 등 다양한 생리적 기능에 관여한다<sup>29</sup>. 이는 세포막 수용체(melanocortin receptor 1, MC1R)와 결합하여 Gs 단백질을 활성화시키고, 이차적으로 adenylate cyclase 활성화에 의해 cAMP가 증가되고 연속적으로 protein kinase A (PKA, tyrosinase) 활성화 등을 통하여 멜라닌 생성을 촉진시키며 microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 단백질의 발현을 증가시켜 tyrosinase 유전자의 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>30</sup>. 이에 본 연구에서 B16F10 melanoma 세포에  $\alpha$ -MSH를 투여함으로써 멜라닌 합성에 tyrosinase 활성화에 제주 뱀딸기 열수 추출물(DIW)이 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. DIW가 멜라닌을 생성하는 세포 수준에서 어떻게 합성을 하는지 확인하기 위하여  $\alpha$ -MSH로 자극한 B16F10 melanoma 세포를 관찰하였다.

B16F10 melanoma 세포에서 500  $\mu\text{M}$ 의  $\alpha$ -MSH로 유도된 대조군에 비교하여 제주 뱀딸기 열수 추출물(DIW)을 처리한 군에서 농도 의존적으로 멜라닌이 증가하는 것으로 나타났다. DIW의 농도가 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 멜라닌이 130% 증가하였



고, 100  $\mu\text{g/mL}$ 에서 152.5% 증가효과가 나타났다. 그러나 200  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 267.5% 멜라닌이 증가하는 것으로 확인하였으나(Figure 36), 세포 독성이 있는 것으로 확인되어 이 농도에 적용 유무는 인체 첩포 시험에서 확인하였다.

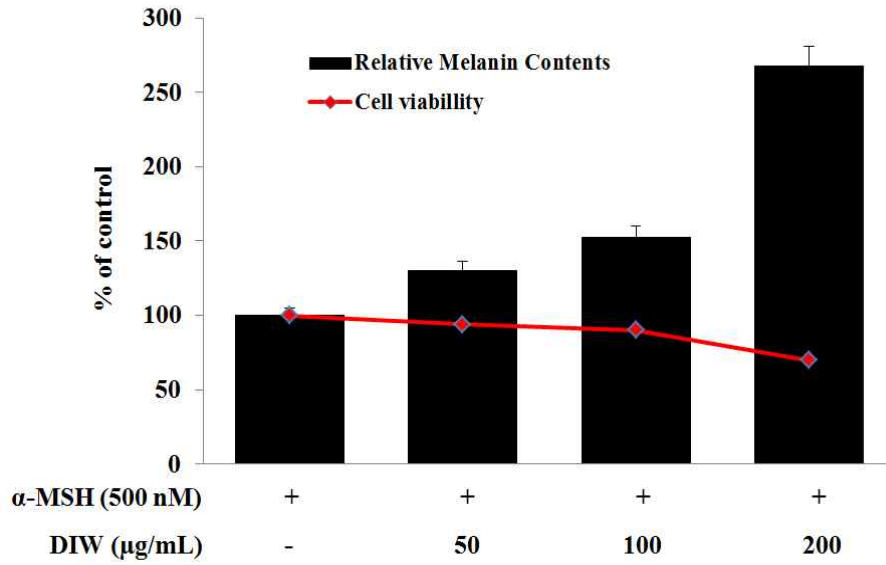


Figure 36. Cell viability and melanin synthesis effect of DIW.

#### 4) 인체피부 일차자극 시험 결과

##### (1) 시험 대상자

총 31명이 본 시험의 전 과정에 참여하였다. 피험자들의 평균 연령은 43.8 ± 4.3세였으며, 최고 연령자는 50세, 최저 연령자는 36세였다. 시험 대상자들의 피부 특성은 설문에 의해 조사되었으며, 그 결과는 다음과 같다(Table 14).

Table 14. Skin characteristics of subjects

(n=31)			
Item	Classification	Frequency (n)	Percentage (%)
Skin type (피부 타입)	Dry skin (건성)	8	25.81
	Normal skin (중성)	10	32.26
	Oily skin (지성)	1	3.23
	Dry to oily skin (건지성)	12	38.71
	Problem skin (문제성)	0	0.00
Irritability (자극 감수성)	Yes (예)	0	0.00
	No (아니오)	31	100.00
Stinging (따가움 감수성)	Yes (예)	0	0.00
	No (아니오)	31	100.00
Side effects by cosmetics (화장품부작용; 1년)	Yes (예)	0	0.00
	No (아니오)	31	100.00
Allergy (알러지)	Food allergy (음식 알러지)	0	0.00
	Metal allergy (금속 알러지)	3	9.68
	Photoallergy (광 알러지)	0	0.00
	Oter allergy (기타 알러지)	0	0.00
	No (없음)	28	90.32

Skin diseases (피부 질환)	Acne (여드름)	0	0.00
	Atopy (아토피)	0	0.00
	Hair loss (탈모)	0	0.00
	Extra skin diseases (기타 피부 질환)	0	0.00
	No (없음)	31	100.00
Tight feeling (당기는 느낌)	Yes (예)	0	0.00
	No (아니오)	31	100.00
Taking supplements (건강보조식품 복용 유무)	Taking oriental herb medicines (한약 복용)	0	0.00
	Taking nutrients (영양제 복용)	6	19.35
	Taking extra supplements (영양제 복용)	0	0.00
	No (없음)	25	80.65
Smoking (흡연 유무)	No (안피움)	31	100.00
	Less than 10 pieces (10개피 이내)	0	0.00
	More than 10 pieces (10개피 이상)	0	0.00
Menstrual cycle (생리주기)	Within 1 week before menstruation (생리 전 1주 이내)	9	29.03
	During menstruation (생리중)	5	16.13
	Within 1 week after menstruation (생리 후 1주 이내)	6	19.35
	The others (기타)	11	35.48

(2) 결과

시험기간 동안, 본 시험물질 중 농도가 200 µg/mL인 뱀딸기 열수 추출물에서 2명의 피험자가 1+ grade의 피부반응을 보였으나, 희석 용매(50% butylene glycol)에 의해서 나타나는 것으로 확인되어, 농도가 200 µg/mL 까지 피부반응이 관찰되지 않았다(Table 15).

Table 15. Results of human skin primary irritation test

Test material	No. of responder	48 h				72 h				Reaction grade		
		1+	2+	3+	4+	1+	2+	3+	4+	48 h	72 h	Mean
50% butylene glycol (vehicle control)	2	1	-	-	-	2	-	-	-	0.8	1.6	1.2
Negative control	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
뱀딸기(열수추출물) 100 µg/mL	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
뱀딸기(열수추출물) 200 µg/mL	2	-	-	-	-	2	-	-	-	0.0	1.6	0.8

## 5) 항균 활성

여드름 발생의 중요한 원인은 여드름 유발균인 *Propionibacterium acnes*의 증식이다. *P. acnes*는 혐기성 상재균으로서 모낭 내에서 성장하는 지방 친화성 미생물이다. *Staphylococcus aureus*와 *Staphylococcus epidermidis*는 피부 내에 정상적으로 분포하는 호기성 피부 상재균으로 염증의 일차적 원인은 아니지만, 염증 발생부위를 더욱 확장시켜 결국 여드름을 악화시킨다<sup>31</sup>. *P. acnes*는 염증 유발과 면역반응을 유도하고 각질형성세포를 자극하여 다량의 superoxide anion ( $O_2^-$ )을 생성한다. 이렇게 생성된  $O_2^-$ 는 피부노화에 관여할 뿐만 아니라 nitric oxide (NO)와 함께 peroxynitrites 형태로 각질형성세포의 용해에 관여<sup>32</sup>하여 여드름 생성을 증가시키기 때문에 *P. acnes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*의 활성 억제제가 여드름 치료 및 예방에 중요하다.

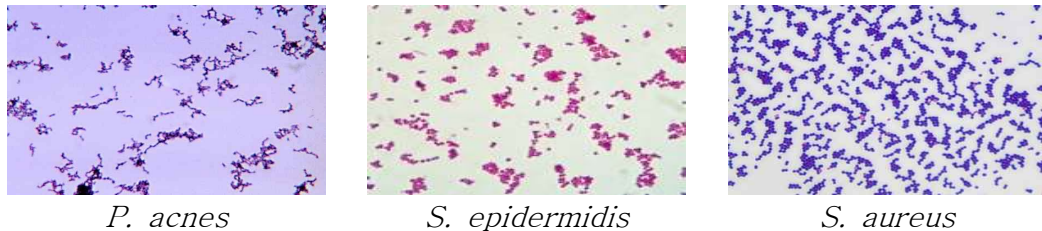
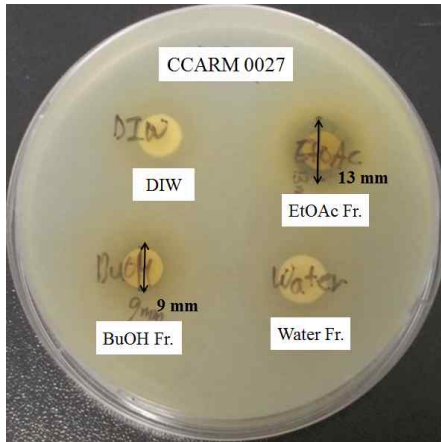


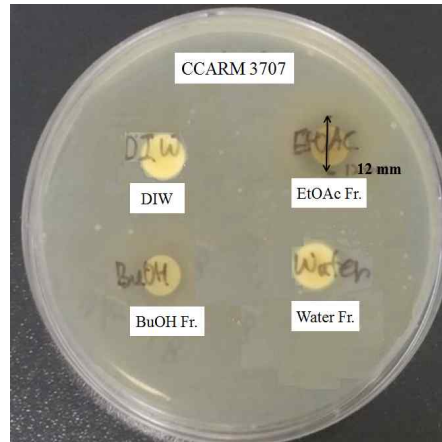
Figure 37. Photomicrograph of *P. acnes*, *S. epidermidis* and *S. aureus*.

### (1) Paper disc diffusion method

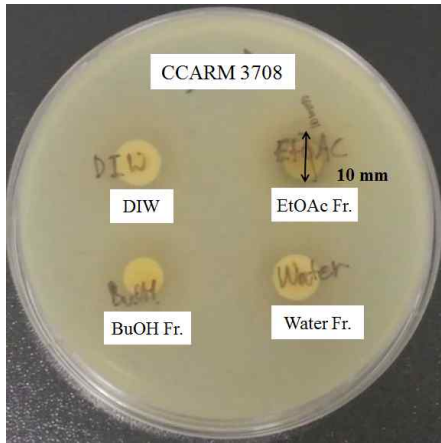
제주 뱀딸기 열수 추출물(DIW)과 각 분획물을 100 mg/mL 농도로 20  $\mu$ L 점적하여 측정된 결과, DIW 과 water 분획물에서는 항균 활성을 보이지 않았지만, EtOAC 분획물은 *S. aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708)와 *P. acnes* (CCARM 9009, 9010)에서 항균활성을 나타냈고, *n*-BuOH 분획물은 *S. aureus* (CCARM 0027)에서 약간의 항균활성을 보였다. 실험 결과와 저지환의 크기는 Table 16 과 같고 paper disc diffusion에서 항균 활성 여부를 확인한 결과를 바탕으로 농도에 따른 항균 활성을 알아보기 위해 MIC (minimum inhibitory concentration)를 진행하였다.



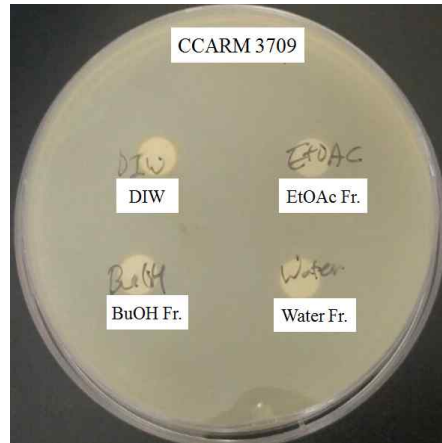
CCARM 0027



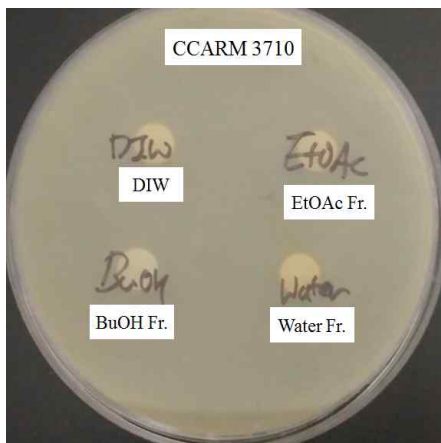
CCARM 3707



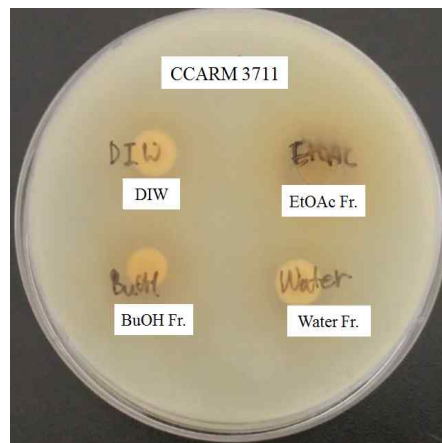
CCARM 3708



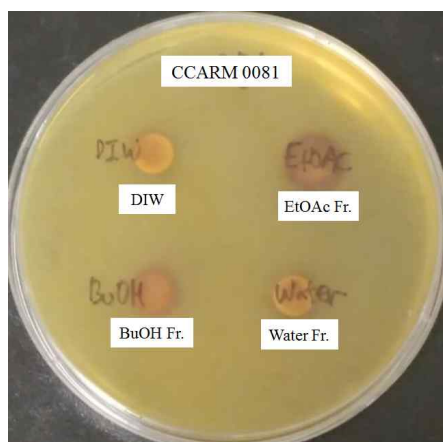
CCARM 3709



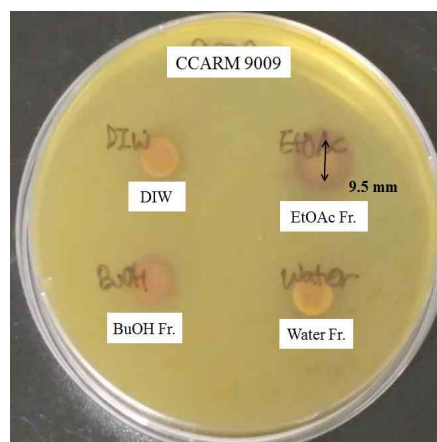
CCARM 3710



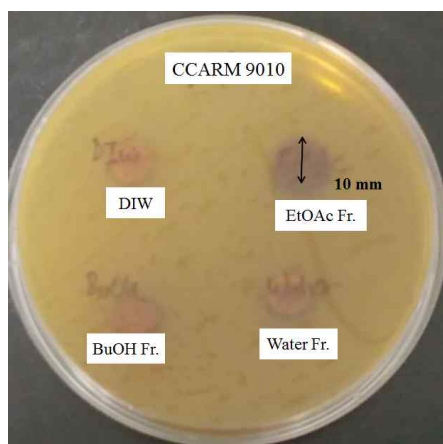
CCARM 3711



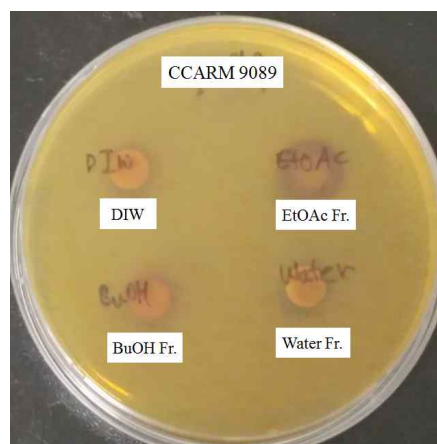
CCARM 0081



CCARM 9009



CCARM 9010



CCARM 9089

Figure 38. Results of paper disc diffusion method of DIW and solvent fractions on *S. epidermidis*, *S. aureus* and *P. acnes*.

Table 16. Results of paper disc diffusion method of DIW and solvent fractions on skin pathogens

Unit: mm, disc size: 8 mm

	<i>S. aureus</i>			<i>S. epidermidis</i>			<i>P. acnes</i>			
	CCARM 0027	CCARM 3707	CCARM 3708	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010	CCARM 9089
DIW	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
EtOAc Fr.	13	12	10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	9.5	10
BuOH Fr.	9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Water Fr.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Erythromycin (+)	22	34	11	30	N.D.	28	28	32	32	33
EtOH	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Sample solvent	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: Not Detected



(2) MIC (minimum inhibitory concentration)

항균 활성이 나타난 EtOAc 분획물의 MIC 결과는 Table 17과 같다. EtOAc 분획물에서 *S. aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708)의 MIC 값이 각각 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL로 나타났다. *P. acne* (CCARM 9010)에서는 125 µg/mL로 높은 균 성장 억제를 보였으나 *P. acne* (CCARM 9089)에서는 활성을 확인 할 수 없었다. *S. aureus* (CCARM 0027)와 *P. acnes* (CCARM 9010)의 활성이 억제 되는 것으로 확인하였으나, 고농도에서는 시료 색에 의해서 방해되는 것으로 예상되어 MBC (minimum bactericidal concentration)를 진행하였다.

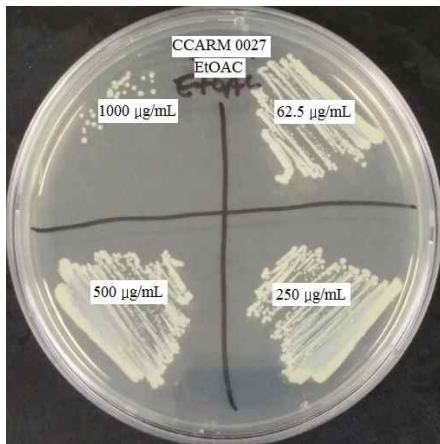
Table 17. Results of MIC of EtOAc fraction on *S. aureus* and *P. acnes*

	Unit: µg/mL				
	CCARM 0027	CCARM 3707	CCARM 3708	CCARM 9010	CCARM 9089
EtOAc Fr.	1000	500	1000	125	N.D.

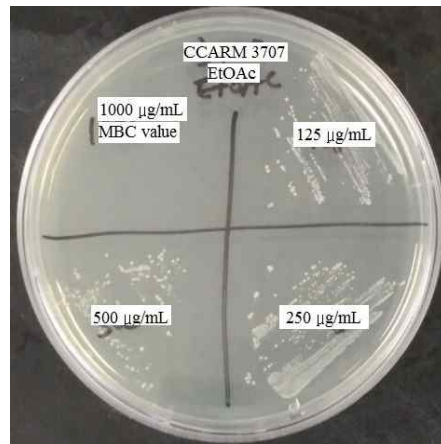
N.D.: Not Detected

(3) MBC (minimum bactericidal concentration)

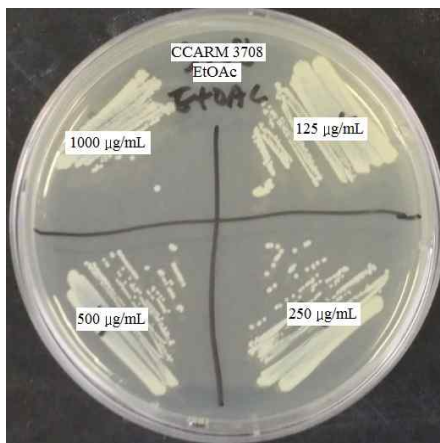
MIC 결과를 바탕으로 EtOAc 분획물의 *S. aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708)와 *P. acnes* (CCARM 9010, 9089)에 대한 MBC를 진행한 결과(Figure 39, Table 18), EtOAc 분획물이 *S. aureus* (CCARM 0027)에서 상대적으로 강한 항균 활성이 나타났고, MBC 값은 1000 µg/mL 이었다. 그러나, 그 외 *S. aureus* (CCARM 0027, 3708), *P. acnes* (CCARM 9010, 9089)에서는 모두 >1000 µg/mL 으로 정확한 MBC 값을 알기 위해서는 고농도에 추가 실험이 필요할 것으로 사료된다.



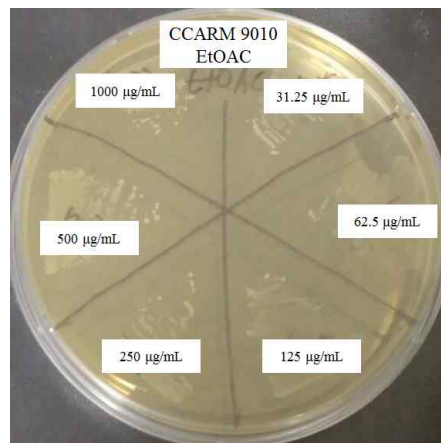
CCARM 0027\_EtOAc Fr.



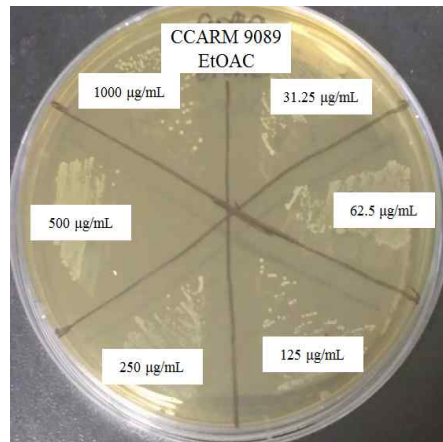
CCARM 3707\_EtOAc Fr.



CCARM 3708\_EtOAc Fr.



CCARM 9010\_EtOAc Fr.



CCARM 9089\_EtOAc Fr.

Figure 39. Results of MBC of EtOAc and BuOH fractions on *S. aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708) and *P. acnes* (CCARM 9010, 9089).

Table 18. Results of MBC of EtOAc fraction on *S. aureus* and *P. acnes*

	CCARM 0027	CCARM 3707	CCARM 3708	CCARM 9010	CCARM 9089
EtOAc Fr.	>1000	1000	>1000	>1000	>1000

#### IV. 종합 결론 및 고찰

본 연구는 제주에서 자생하는 뱀딸기(*Duchesnea indica*) 열수 추출물 및 분획물의 항산화, 주름개선, 항균 등과 같은 다양한 피부 관련 활성을 확인하여 천연 기능성 화장품 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 진행하였다.

뱀딸기 열수 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 용매 분획물을 얻었으며, HPLC를 이용하여 뱀딸기의 지표 성분인 gallic acid의 함량을 측정할 결과, EtOAc 분획물에서 가장 많이 함유되어 있었고, 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정 결과 또한 다른 분획물에 비해 많이 함유되어 있어 활성 실험에서 효과가 우수할 것이라 예상하였다.

뱀딸기 열수 추출물의 항산화 활성은 대조군(ascorbic acid)과 비교하여 유사한 활성을 보였다. 특히, SOD (superoxide dismutase) 유사활성에서는 대조군(ascorbic acid)보다 우수하여 강력한 항산화제가 될 수 있음을 확인하였다. EtOAc 분획물에서 뱀딸기 열수 추출물과 유사한 저해 활성을 보임으로써 뱀딸기 열수 추출물 중 항산화에 영향을 미치는 성분이 들어있을 것이라 예상하였다.

주름 개선 활성을 알아보기 위해 진행한 elastase 저해 활성 실험과 collagenase 저해 활성 실험 결과, 뱀딸기 열수 추출물이 대조군(epigallocatechin gallate, EGCG)보다 우수한 활성이 있음을 확인하였고, elastase 저해 활성은 EtOAc 분획물이 관여하고, collagenase 저해 활성은 water 분획물이 관여함을 알 수 있었다.

멜라닌 합성 능력을 측정하기 위해 tyrosinase 저해 활성 실험과 B16F10 melanoma 세포를 활용한 melanin 저해 활성 실험을 진행하였으나, 대조군(arbutin)과 비교하여 반대로 melanin을 증가시키는 것으로 확인하여 미백보다는 흰머리 방지 화장품과 같은 melanin 합성을 필요로 하는 소재로 사용할 수 있을

것으로 사료된다. 이와 더불어, 세포독성 시험과 인체 첩포 시험을 통하여 농도가 200 µg/mL까지 안전함을 확인하였다.

뱀딸기 열수 추출물의 항균 활성은 보이지 않았으나, EtOAc 분획물에서는 *S. aureus* (CCARM 0027, 3707, 3708) 와 *P. acnes* (CCARM 9010, 9089) 에서 다소 항균 활성을 나타냈고, 특히 *S. aureus* (CCARM 3707)에서는 균의 사멸효과까지 입증하여 피부 상재균에 대한 항균 능력이 있음을 확인하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 제주 뱀딸기 열수 추출물을 이용한 항산화, 항균 및 주름 개선 효과를 갖는 천연 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

## V. 참고문헌

1. 이경희. 인체 인공피부 모델을 이용한 화장품 천연 방부제와 합성 방부제의 피부 독성 비교, *중앙대학교 석사학위논문* 2010, 26, 1-2.
2. 김상철. 천연방부제 개발, *지역전문가 활용건강 뷰티소재개발* 2015, 22-23.
3. 폴리비가운; 브라이언 배런. 나 없이 화장품 사라가지 마라, *서울:중앙북스* 2008, 22-30.
4. Carolyn. DIY Pure Plant Skin Care. *virginia:ICHA* 2000, 7-19.
5. 이선영; 최은진; 배동혁; 이동욱; 김선오. 미백, 보습 및 탈모방지에 대한 황칠나무 (*Dendropanax modifera* Lev.)에서 분리한 1-tetradecanol,  $\beta$ -sisterol의 효과, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* 2015, 41, 73-83.
6. 이근수. 향산화용 건강소재 탐색 및 연구, *지역전문가 활용건강 뷰티소재개발* 2015, 55-72.
7. 식품의약품안전처. 화장품 생산실적 현황 2015, 1.
8. 식품의약품안전처. 화장품 생산실적 현황 2015, 2.
9. Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils, *J Am Oil Chem Soc* 1981, 58, 966-968.
10. Moreno, MIN.; Isla, MI.; Sampietro, AR.; Vattuone, MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina, *J Ethnopharmacology* 2000, 71, 109-114.

11. Blois, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical  
*Nature* **1958**, *181*, 1199-1200.
12. 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.
13. Oyaizu, M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities  
of products of browning reaction prepared from glucosamine, *Japanese Journal  
of Nutrition* **1986**, *44*, 307-315.
14. Benzie; Strain. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of  
“Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry* **1996**, *239*,  
70-76.
15. James, A. E. K.; Timothy, D. W.; Gordon, L. *Biochemistry* **1996**, *35*, 9090.
16. Wünsch E; Heindrich HG. Zur quantitativen bestimmung der collagenase,  
*HoppeSeyler's Physiol Chem* **1963**, *333*, 149-151.
17. Gutfinger, T. J. *Am. Oil Chem. Soc.*, **1981**, *58*, 966.
18. ㈜더마프로. 인체적용시험보고서, *DSA-HSPIT001(9)-16015/4* **2016**, 7.
19. 김정은. 섬오가피 열매, 참꽃나무 잎, 당근 지상부 및 구멍갈파래 추출물의 항염, 항  
균 활성 성분 연구, *제주대학교 박사학위논문* **2016**, 12.
20. Ihn Rhan Lee; Mi Young Yang. Phenolic Compounds from *Duchesnea  
chrysantha* and their Cytotoxic Activities in Human Cancer Cell, *Arch. Pharm.  
Res.* **1994**, *17*, 476-479.

21. Kawaguchi, K.; Mizuno, T.; Aida, K.; Uchino, K.. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*, *Biosci Biotechnol Biochem* **1997**, *61*, 102-104.
22. 현주미. 제주 재래귤, ‘부지화’ 미숙과 추출물 및 감귤 정유 성분의 기능성 화장품 소재화 연구 *제주대학교 박사학위논문* **2016**, 33.
23. 이남호. 천연물화학, *신일서적(주)* **2014**.
24. Kim, H. H.; Park, G. H.; Park, K. S.; Lee, J. Y.; An, B. J.. Anti-oxidant and anti-inflammatory activity of fractions from *Aster glehni* Fr. Schm, *Kor J Microbiol Biotechnol* **2010**, *38*, 434-441.
25. 김정은; 김아름; 김민지; 박수남. 양과껍질 추출물의 항균, 항산화 및 항노화 효과에 관한 연구, *Appl. Chem. Eng.*, **2011**, *22*, 178-184.
26. Balo J.; Banga I.. The elastolytic activity of pancreatic extracts. *J Biochem* **1950**, *46*, 380-387.
27. Chung JH; Kang S; Varani J; Lin J; Fisher GJ; Voorhees JJ.. Decreased extracellular-signal-regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol* **2000**, *115*, 117-182.
28. Laskin, J.D.; L. A. Piccinini.. Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma. *J. Biol. Chem* **1986**, *261*, 16626-16635.
29. 김건희; 정미숙. 식물자원의 정유성분을 활용한 천연고품질유지제 개발 및 식품 유통 과정에서의 품질 유지기술 확립. *덕성여자대학교 식물자원연구소* **2011**.
30. Friedmann, P. S.; F. Wren; J. Buffey; S. Macneil.. Alpha-MSH cause a small



rise in cAMP but has no effect on basal or ultraviolet-simulated melanogenesis in human melanocytes. *Br. J. Dermatol* **1990**, *123*, 145-151.

31. 이선숙; 임지영; 한영숙. 연잎 추출물의 여드름 피부 개선 효과. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol* **2012**, *10*, 405-413.

32. Bowe WP; Shalite AR.. Effective over the counter acne treatments. *Semin. Cutan. Med. Surg* **2008**, *27*, 170-176.