

돌나물(*Sedum sarmentosum*) 에탄올 추출물의 항균, 항산화, 항노화 효과와 수중유적형 크림의 제조

김 영 대 · 김 영 민 · 모 은 경*†

대전대신고등학교, *(주)대덕바이오 기업부설연구소
(2017년 7월 24일 접수, 2017년 9월 13일 수정, 2017년 9월 25일 채택)

Antibacterial, Antioxidant, and Antiaging Effects of the Ethanol Extract of *Dolnamul* (*Sedum sarmentosum*) and the Production of the Oil in Water Cream

Young Dae Kim, Young Min Kim, and Eun Kyoung Mo*†

Daejeon Daeshin High School, 98 Orang 1-gil, Boksu-dong, Seo-gu, Daejeon 35405, Korea

*Research and Development Center, DBIO Incorporation, Korea

(Received July 24, 2017; Revised September 13, 2017; Accepted September 25, 2017)

요약: 돌나물(*Sedum sarmentosum*)의 기능성과 화장품 소재로서의 특성을 파악하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 돌나물을 동결건조하고 분쇄하여 에탄올로 추출한 후 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 저장하면서 실험에 사용하였다. 돌나물의 에탄올 추출물(SE) 내에 포함된 총폴리페놀화합물(TPC)의 함량은 $27.98 \pm 0.34\text{ g/kg}$ (건조중량)이었고, epicatechin ($162.14 \pm 5.07\text{ mg/kg}$), epigallocatechin ($55.99 \pm 2.49\text{ mg/kg}$) 및 kaempferol ($47.96 \pm 3.02\text{ mg/kg}$) 순으로 많이 함유되어 있는 것으로 분석되었다. SE는 organic radical 소거효과($78.43 \pm 1.08\%$)와 금속이온환원능(FRAP value 2.54 ± 0.12)을 나타내었다. 또한 SE는 지질과산화 반응의 초기 단계(FTC assay $62.03 \pm 0.38\%$)와 최종단계(TBARS assay $55.36 \pm 2.05\%$)를 저해하였다. SE (5 mg/mL 건조중량)는 *Propionibacterium acne*에 대해 항균효과를 나타내었다. SE의 elastase 저해율은 $38.94 \pm 7.09\%$ 이었고, collagenase 저해율은 $78.94 \pm 2.49\%$ 이었다. SE 처리구는 *Col3A1* 발현양이 증가하였고 collagen 생성율은 대조구보다 $58.11 \pm 1.07\%$ 높았다. 0.5% SE가 함유된 수중유적형 크림은 pH 6.88, 밀도 1.47 g/mL이었고, 다양한 온도($-20 - 45\text{ }^{\circ}\text{C}$)에 4주간 저장하는 동안 크림은 안정한 유화상태를 유지하였다. 따라서 SE는 항균, 항산화, 항노화 활성을 지닌 것으로 사료되었다.

Abstract: This study was performed to investigate the functional properties and characteristics of *Dolnamul* (*Sedum sarmentosum*) as a cosmetic ingredient. Lyophilized sedum powder was extracted with ethanol and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for the following experiments. Total polyphenol compounds of the ethanol extract of sedum (SE) was $27.98 \pm 0.34\text{ g/kg}$ (dry weight): epicatechin ($162.14 \pm 5.07\text{ mg/kg}$), epigallocatechin ($55.99 \pm 2.49\text{ mg/kg}$), and kaempferol ($47.96 \pm 3.02\text{ mg/kg}$) were contained in the SE. The SE had organic radical scavenging capacity ($78.43 \pm 1.08\%$) and metal reducing power (FRAP value 2.54 ± 0.12). FTC and TBARS assays confirmed that the SE inhibited the early stage of lipid peroxidation ($62.03 \pm 0.38\%$) as well as the final stage of lipid peroxidation ($55.36 \pm 2.05\%$), respectively. The SE (5 mg/mL, dry weight) was proved to have antibacterial effect on the growth of *Propionibacterium acnes*. The inhibitory percentages of the SE on elastase and collagenase activities were $38.94 \pm 7.09\%$ and $78.94 \pm 2.49\%$, respectively. Compare to the control group, the SE treated group induced an increase of *Col3A1* expression and collagen production ($58.11 \pm 1.07\%$). The oil in water emulsion (0.5% SE adding group) showed pH 6.88 and 1.47 g/mL of density. The hardness changes of the SE adding emulsions were not detected during the stored periods at various temperatures ($-20 - 45\text{ }^{\circ}\text{C}$) for four weeks. It is considered that the SE has antibacterial, antioxidant, and antiaging activities.

† 주 저자 (e-mail: ekymo@hanmail.net)
call: 042)821-8854

Keywords: *Sedum sarmentosum*, *Propionibacterium acne*, Col3A1, epicatechin, antiaging

1. 서 론

청소년기는 androgen의 분비가 활발해지면서 피지선을 자극하여 피지가 과잉분비된다[1]. 분비된 피지가 모공 밖으로 배출되지 못하면 모공 내로 역류되거나 모공을 막아 염증을 유발하거나 피부를 과각질화시킨다[1]. 이와 같이 모공이 각질화되어 피지와 함께 배출되지 못하면 피부 질환을 유발하는 세균의 번식을 초래한다[1,2]. 즉, 여드름을 유발하는 세균인 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)는 피부에 상재하는데 모낭에서 성장하며 superoxide anion (O_2^-)을 형성하고 linoleic acid를 분해하여 피부의 방어기능을 약화시킨다[3,4]. 이러한 작용은 염증 반응을 가속화하고 여드름을 악화시킨다[4]. 여드름은 청소년기에 발생하는 피부질환 중 가장 많은 빈도를 나타내고 있는데, 환부가 외부로 노출되어 있어 대인관계에 악영향을 주고 심리적인 위축을 유발하는 요인이 되고 있다[5]. 여드름과 같은 피부질환의 발생을 억제하기 위해 항균제를 사용하고 있으나 이들의 대부분은 합성물질로 피부에 allergy 등의 부작용을 유발하고 있다[5]. 따라서 *P. acnes*와 같은 피부 상재균에 대해 항균효과를 지닌 천연 소재를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다[2,3,6,7].

자외선 및 공해에 의해 유발되는 산화적 스트레스에 의해서도 피부질환이 발생할 수 있다[3]. 자외선에 의해 생성된 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 산화력이 매우 높기 때문에 세포막을 구성하는 지질의 과산화를 유발하고, 콜라겐 및 엘라스틴 섬유의 절단 등을 일으켜 피부 노화를 가속시킬 수 있다[8,9]. 인체에는 superoxide dismutase 및 glutathione과 같은 항산화 효소 및 항산화물질이 존재하여 ROS의 공격으로부터 신체를 보호하는 기전이 존재한다[10]. 그러나 과량의 ROS가 생성될 경우 인체의 항산화방어체계만으로는 산화제의 공격을 효과적으로 차단할 수 없기 때문에 항산화제의 보충이 필요하게 된다. 즉, 항산화제를 섭취하거나 피부에 도포하는 것이 필요하므로 화장품 산업에서는 오래전부터 항산화제에 대한 연구가 진행되어 오고 있다[3]. 특히, 합성항산화제보다 천연물을 이용한 항산화제에 대해 많이 연구하고 있는 상황이다[7,11].

피부가 노화되는 원인은 노화 현상에 의한 내인성 노화(intrinsic aging)와 광노화로 나눌 수 있는데, 자외선에 의해 콜라겐 합성이 감소되고, 콜라겐을 비롯한 세포외 기질단백질의 분해효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현이 증가되어, MMPs에 의해 콜라겐을 비롯한 기질단백질이 분해되어 주름이 생긴다[12]. 피부노화에 영향을 주는 활성산소는 피부에 대한 자외선의 작용으로 생성된다. 활성산소는 지질과산화, 기질단백질 분해효소(MMPs)의 활성화, 콜라겐과 엘라스틴의 절단 및 비정상적인 교차결합, hyaluronic acid의 절단, 멜라닌 생성반응촉진, DNA 산화와 같은 손상을 야기시키고, 그 결과 피부 탄력감소, 주름살, 기미 및 주근깨 등으로 특징 지워지는 피부노화가 가속화된다고 한다[13].

돌나물은 돈나물, 석상채, 석지갑 등의 다른 이름을 지니고 있는 다년생식물로 우리나라에서는 줄기와 잎을 생식하거나 김치로 담아 먹는 식품으로 사용되고 있고, 북미에서는 정원용 소재로 활용되고 있다. 돌나물이 지닌 건강기능성 효과로는 숙취해소 및 간보호효과[14], 항산화효과[15], 혈압강하효과[16], 미백효과[17], 보습효과[18] 등이 알려져 있다. 그러나 항균 효과 및 피부노화를 억제하는 효과에 대해서는 보고된 바 없다.

따라서 돌나물이 *P. acnes*에 대한 항균효과와 항노화효과를 지니고 있는지를 알아보고자 본 연구를 수행하였다. 즉, 피부 주름 생성에 주요 역할을 하는 효소인 elastase와 collagenase 저해활성을 측정하였고, fibroblast에서의 콜라겐 생성을 알아보았다.

2. 재료 및 방법

2.1. 돌나물 추출물의 제조 및 특성

경기도 남양주에서 2017년 2월에 생산된 돌나물을 구입하여 물로 2회 세척한 후 동결건조하고 직경 500 μm 이하의 크기로 분쇄하였다. 돌나물 분말에 3배(v/v)의 에탄올을 가하여 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12 h 동안 초음파 추출하고(Ultrasonic bath 5800, Branson, USA), Whatman No. 4 여과지로 여과한 후 여액은 회전감압농축기(N-1110V-W, Eyela, Japan)로 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 농축하였다. 돌나물 추출물을 화장품 제조에 사용하기 위하여 농축액에 3배(w/v)의 에탄올(Fluka Chemie, Switzerland)을 넣고

Table 1. Primers Used in This Study

| Gene | Primer sequence (5' → 3') | No ¹⁾ |
|----------------|-------------------------------|------------------|
| <i>Col3A1</i> | F-5'-CCGIGTTTTCAACCCTCAGTT-3' | NM_205380.2 |
| | R-5'-TAGGCTGTGGTGTGTCTGC-3' | |
| <i>β-actin</i> | F-5'-TGCGTGACATCAAGGAGAAG-3' | L08165 |
| | R-5'-TGCCAGGGTACATTGTGGTA-3' | |

¹⁾ Genebank accession number

재용해한 후 멸균된 여과지(Whatman No. 3)로 여과하고 에탄올은 nitrogen evaporator (N-EVAP, Organomation Associates, USA)로 증발시켰다.

가용성고형분의 농도는 당도계(PAL-1, Atago, Japan)로, pH는 pH meter (Orion 2-STAR, Thermo, UK)로, 색도는 색차계(Color reader CR10, Konica Minolta, Japan)로 측정하였으며 이때 표준백판의 보정치는 $L = 98.46$, $a = -0.23$, $b = 1.02$ 이었고, 색상(h°)과 채도(C^*)는 다음의 식에 의해 각각을 산출하였다.

$$h^\circ = \arctan \frac{b^*}{a^*} (\text{deg})$$

$$C^* = [(a^{*2} + b^{*2})^{\frac{1}{2}}]$$

2.2. 돌나물의 에탄올 추출물(SE)의 항균활성

P. acnes (KCTC 3314)는 생명공학연구원 미생물자원센터로부터 분양받아, Brain-heart infusion (Difco, USA) 배지에 접종하여 anaerobic jar (Kisan Bio, Korea)에 넣어 37 °C 배양기(HLDI-42, Hanil Lab Tech., Korea)에서 72 h 동안 배양하여 사용하였다.

*P. acnes*에 대한 항균활성은 paper disc diffusion assay로 측정하였다. 즉, 대수기의 균주현탁액(1×10^6 CFU/mL)을 제조하여 고체배치에 100 μL씩 분주한 후 도말하였다. 8 mm paper disk (Adventec, Japan)에 돌나물 추출물 50 μL (5 mg/mL, 건조중량)를 올려 72 h 동안 배양한 후 paper disk 주위에 생성된 성장저지환(clear zone)의 크기를 측정하였다. 대조구로는 tetracycline, resveratrol 및 gallic acid (Sigma, USA)를 사용하였다.

2.3. SE의 피부 노화 억제 효과

2.3.1. 효소 저해 효과

Elastase와 collagenase 저해 효과는 assay kits을 활용

하여 이전의 보고[19]에 준하여 측정하였다. 즉, SE가 elastase (Sigma, USA)와 collagenase (Biovision, USA) 활성도를 저해하는 정도는 제조사의 실험방법에 준하여 각각 측정하였다.

2.3.2. 콜라겐 합성

SE가 콜라겐 합성 및 유전자 발현에 미치는 효과는 섬유아세포(murine fibroblast, NIH3T3 cell lines; KCLB No. 21658)를 이용하여 측정하였다. 섬유아세포를 10% fetal bovine serum (FBS), 25 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, 1% penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지(Gibco BRL, USA)에 배양(37 °C, 5% CO₂)하였고, 이전의 보고[20]에 준하여 MTT assay를 수행하였다.

SE를 처리한 섬유아세포에서 생성되는 콜라겐 함량은 Greet et al.,[21]의 보고를 일부 수정하여 측정하였다. 즉, 세포(1×10^4 cells/well)를 24 h 동안 배양하고, SE가 함유된 배지로 교환하여 24 h 동안 배양한 후, 5% FBS가 함유된 배지로 교체하여 다시 24 h 동안 배양하였다. 배양상등액에 함유된 콜라겐 양은 total collagen assay kit (BioVision, USA)로 측정하였고, 대조구에서의 콜라겐 함량을 기준으로 시료 처리에 의해 변화된 콜라겐 함량을 상대적인 비율로 나타내었다.

세포의 total RNA는 Trizol reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 제조사의 protocol에 맞추어 추출하였고, cDNA 합성은 one-step PCR kit (Takara, China)을 이용하였다. *Col3A1*의 발현양 측정에 사용된 primers는 Table 1과 같고, 94 °C에서 3 min, 94 °C에서 10 s (40 cycle), 60 °C에서 30 s간 PCR을 진행하였다.

배양이 완료된 세포를 냉각한 potassium buffered saline (PBS)로 2회 세척하고 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)에 분산시킨 후 얼음 위에서 sonication하였고, lysate는 100,000 × g (4 °C)에서 40 min간 원심분리하였다. 단백질(40 μg)을 5% SDS-PAGE로 분리한 후, nitrocellulose

Table 2. Formulations of the Oil in Water Cream Supplemented with the Ethanol Extract of *S. sarmentosum*

| Components | | Experimental groups ¹⁾ | | | |
|------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------|-------|------------------------|
| | | CO | SD1 | SD2 | |
| Surfactant | Cetyl stearyl alcohol | 1.5 | 1.5 | 1.5 | HLB ²⁾ 15.5 |
| | Glyceryl monostearate | 0.5 | 0.5 | 0.5 | HLB 4.5 |
| | Glyceryl stearate | 1.0 | 1.0 | 1.0 | HLB 11.0 |
| | Cetearyl olivate | 2.0 | 2.0 | 2.0 | HLB 9.0 |
| Oil phase | Bee wax | 1.5 | 1.5 | 1.5 | |
| | Squalene | 7.0 | 7.0 | 7.0 | |
| | Stearic acid | 1.0 | 1.0 | 1.0 | |
| | Cyclopentasiloxane | 2.5 | 2.5 | 2.5 | |
| | Silicone 200/100CS | 0.3 | 0.3 | 0.3 | |
| Water phase | Deionized water | 63.0 | 62.5 | 62.0 | |
| | Trisodium EDTA | 0.2 | 0.2 | 0.2 | |
| | Glycerine | 5.0 | 5.0 | 5.0 | |
| | 1,2-hexanediol | 1.0 | 1.0 | 1.0 | |
| | Carbopol 980 (1% soln.) | 10.0 | 10.0 | 10.0 | |
| | Xanthan gum (2% soln.) | 2.4 | 2.4 | 2.4 | |
| pH adjustment | Tromethamine | 0.9 | 0.9 | 0.9 | |
| Fragrance flavor | Phenylethyl alcohol | 0.2 | 0.2 | 0.2 | |
| Sedum extract | Soluble solid 32 °Bx | - | 0.5 | 1.0 | |
| Total | | 100.0 | 100.0 | 100.0 | |

¹⁾ CO: not contained sedum extract (control group), SD1: 0.5% of sedum extract (10 mg/mL) containing group, SD2: 1% of sedum extract (10 mg/mL) containing group.

²⁾ HLB: hydrophile-lipophile balance

membrane에 transfer하였고, enhanced chemiluminescence 용액에 담긴 후 X-ray film에 노출시켰다.

2.4. 항산화활성

Total polyphenol compound (TPC) 함량은 Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 이용하여 전보[15,22]와 같은 방법으로 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 사용하였고($y = 0.017x + 0.0271$, $R^2 = 0.9985$), TPC 함량은 gallic acid mg/100 g (건조중량)으로 나타내었다. TPC에 함유된 폴리페놀화합물의 함량은 photodiode array detector와 C18 column (30 °C)이 장착된 HPLC (Waters, USA)로 분석하였고, 그 조건은 이전의 보고[23]와 같았다. Ascorbic acid 농도는 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP) tetmetric redox reaction method로 측정하였다[24].

Organic radical scavenging activity는 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay로, metal reducing pow-

er는 ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay로, 지질과산화 저해도는 ferric thiocyanate (FTC) assay와 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method를 이용하여 전보[15]에서와 같이 측정하였고, 시료의 농도는 10 µg/mL이었다.

2.5. SE가 첨가된 수증유적형 크림의 제조 및 특성

2.5.1. SE를 함유한 수증유적형 크림의 제조

SE를 에탄올에 재용해한 후(SEE) 이전의 보고 [25-27]를 참고하여 Table 2와 같이 제조하였다. 즉, 수상 원료를 계량한 후 수상에 점증제를 투입하여 2,000 rpm에서 1 min간 혼합하였다(Homogenizing mixer mark II 2.5; Youngjin Corp., Korea). 점증제를 수상에 분산시키기 위해 2,000 rpm으로 2 min간 더 혼합하였다. 분산이 완료된 수상 원료와 유상 원료를 각각 80 °C로 가열하였다. 수상에 pH 조절제를 투입하였다. 3,500 rpm에

Table 3. Antibacterial Effect of the Ethanol Extract of *S. sarmentosum* on the Growth of *P. acnes*

| | Diameter (mm) ³⁾ |
|--|-----------------------------|
| Ethanol extract of sedum ¹⁾ | 2.79 ± 0.42 |
| Tetracycline ²⁾ | 5.06 ± 0.83 |
| Resveratrol | 2.57 ± 0.43 |
| Gallic acid | 0.94 ± 0.28 |
| BHT | 1.05 ± 0.57 |

¹⁾ Concentration of the ethanol extract of sedum: 5 mg/mL (dry weight)

²⁾ Tetracycline 10 µM, resveratrol 50 µg/mL, gallic acid 50 µg/mL, BHT (butylated hydroxytoluene) 50 µg/mL

³⁾ Diameter of clear zone when performed of paper disk diffusion assay. The number of *P. acnes* was 1 × 10⁶ CFU/mL

서 5 min간 혼합하여 유상 원료를 분산시키고, 수상 원료에 유상 원료를 80 °C에서 5 min간 혼합하여 유회시켰다(4,500 rpm). 50 °C까지 냉각한 후 SEE와 향료를 첨가하고 5 min간 분산시켰다(4,500 rpm). 25 °C까지 냉각한 후 용기에 담아 다음 실험에 사용하였다.

2.5.2. SE를 함유한 크림(SEC)의 특성

SEC 1 g에 증류수 9 mL를 넣고 vortexing하여 시료가 물에 잘 분산되도록 한 후 pH meter를 이용하여 SEC의 pH와 색도를 측정하였다. SEC을 4.5 mL 용기에 빈공간이 없게 담아 중량을 측정하여 비중을 산출하였다. 또한 동일한 용기에 담은 SEC의 경도를 texture profile analysis (TA-XT2, Stable Micro Systems, UK)를 이용하여 분석하였고, 분석조건은 pretest speed, 5.0 mm/s; test speed, 5.0 mm/s; posttest speed 5.0 mm/sec; sample area, 1.0 mm²; distance, 20 mm; force threshold, 20.0 g; contact force, 5.0 g; probe, P10 (10 mm DIA cylinder aluminium)이었다. 제조된 크림의 유회안정성을 평가하기 위하여 SEC를 용기에 담아 -20 °C, 20 °C, 45 °C에 1달간 각각 저장하면서 7일마다 경도를 측정하였다.

2.6. 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복측정하여 ‘평균 ± 표준편차’로 표시하였다. 대조구와 실험구 사이의 유의적인 차이는 일원배치분산분석법으로 분석하였고, 분석 후의 유의성 검정은 Duncan’s multiple range test로 하였다. 통계분석에는 SPSS (Statistical Package for Social Sciences, ver. 14.0, SPSS Inc., USA) 프로그램을 사용하

였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. SE의 항균활성

SE를 *P. acnes*의 배양접시에 올려 형성된 성장저지 환(clear zone)의 크기를 측정한 것은 Table 3과 같았다. Table 3에서와 같이, SE는 *P. acnes*의 성장을 저해하는 것으로 나타났으며, 이는 항산화물질로 알려진 resveratrol이 *P. acnes* 성장을 저해하는 정도와 유사하였다. 그러나 양성대조물질인 tetracycline 처리구보다는 항균 효과가 낮았다. 돌나물에는 다량의 항산화물질이 함유되어 있고[15], resveratrol이 항산화 효능을 지니고 있는 물질임을 고려하여, 폴리페놀화합물인 gallic acid와 합성항산화제인 BHT의 항균활성을 측정하였다. *P. acnes*에 대한 BHT의 항균활성은 SE 또는 resveratrol보다 매우 낮았고, gallic acid는 *P. acnes*에 대해 항균활성을 거의 나타내지 않았다. 따라서 SE가 *P. acnes*에 대해 항균 활성을 나타내는 것은 항산화효과와는 관련이 없는 것으로 사료되었다.

3.2. SE의 항산화활성

피부세포를 보호하고 결합조직의 손상을 억제하여 피부노화를 지연 및 예방하기 위해서는 활성산소의 과잉 생성을 억제하고 생성된 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 항산화방어시스템 구축이 필요하다. 비색정량법으로 항산화활성을 측정할 때는 시료 자체 또는 시료 내에 존재하는 간섭(흡광)물질에 의해 영향을 받을 수 있으므로 한두 가지 방법만으로 항산화활성을

Table 4. Antioxidant Capacities of the Ethanol Extract of *S. sarmentosum* (10 mg/mL)

| Antioxidant assays ¹⁾ | Antioxidant activity |
|--|-----------------------------|
| Organic radical scavenging activity (DPPH assay) | 78.43 ± 1.08% ²⁾ |
| Metal reducing power (FRAP assay) | 2.54 ± 0.12 ³⁾ |
| Inhibition of lipid peroxidation (FTC assay) | 62.03 ± 0.38% ⁴⁾ |
| Inhibition of lipid peroxidation (TBARS assay) | 55.36 ± 2.05% ⁴⁾ |

¹⁾ DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, FRAP: ferric reducing ability of plasma, FTC: ferric thiocyanate, TBARS: thiobarbituric acid reactive substances.

$$^2) \text{ Scavenging activity}(\%) = \frac{A_{517} \text{ of blank} - A_{517} \text{ of sample}}{A_{517}} \times 100$$

$$^3) \text{ FRAP value} = \frac{A_{593} \text{ of sample (0-4 min)}}{A_{593} \text{ of standard (0-4 min)}} \times \text{FRAP value of standard (1 mM ascorbic acid)}$$

⁴⁾ Standard: alpha-tocopherol (100-1,000 µg/mL), $y = 0.017x + 39.877$, $R^2 = 0.9984$

평가하는 것은 바람직하지 않다[28,29]. 돌나물의 에탄올 추출물이 지닌 항산화효능을 측정할 이전의 보고 [17]가 organic radical과 superoxide radical 소거활성만을 측정하는 것에 비하여 본 연구는 organic radical 소거능, 금속이온환원능, 지질과산화저해정도를 측정하여 항산화효과를 검토하고 돌나물 추출물에 함유된 항산화물질을 정량하였다. SE의 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 4와 같다. SE (10 µg/mL)의 organic radical scavenging activity는 78.43 ± 1.08%로, 돌나물을 70% 에탄올로 환류추출하여 항산화효과를 측정하였을 때 [마]보다 항산화활성이 높았다. 이는 다른 추출방법을 사용하였기 때문인 것으로 사료되었다. *In vitro*에서 항산화활성을 측정할 때는 다양한 방법을 활용하여 시료의 항산화능을 평가해야 하므로[15], 금속이온을 환원시키는 정도를 FRAP assay를 이용하여 측정하였다. 표준물질인 1,000 µM ascorbic acid의 FRAP value가 2.0인 것을 고려할 때, SE의 금속이온환원능(FRAP value 2.54 ± 0.12)은 매우 우수한 것으로 사료되었다. 지질과산화 반응 초기 단계를 저해하는 정도는 FTC assay로, 최종 단계를 저해하는 정도는 TBARS assay로 측정할 결과, SE는 지질과산화 반응의 초기단계를 62.03 ± 0.38% 저해하였고, 최종단계를 55.36 ± 2.05% 저해하였다. 따라서 SE는 지질의 과산화반응 전 단계를 저해할 수 있는 것으로 사료되었다.

SE가 항산화 효과를 나타내었기 때문에 SE에 함유되어 있는 항산화 물질의 함량을 측정하였다. 즉, 모든 고등 식물에 포함되어 있는 것으로 알려진 총폴리페놀 화합물(TPC)과 ascorbic acid (ASA) 함량을 측정하였다.

SE에는 TPC가 27.98 ± 0.34 g/kg (건조중량), ASA가 215.93 ± 9.26 mg/kg (건조중량) 함유되어 있다. TPC 함량과 DPPH 라디칼 소거능 및 FTC assay 사이에는 양의 상관관계($r=0.979$ 및 $r=0.607$)가 있으므로[15], 본 연구(DPPH 및 FTC assays)에서 SE의 항산화활성이 높았던 것은 TPC 때문인 것으로 사료되었다. SE에 함유된 폴리페놀화합물의 종류를 분석한 것은 Table 5와 같다. Table 5에서와 같이, SE에는 epicatechin이 162.14 ± 32.427 mg/kg으로 가장 많이 포함되어 있었고, epigallocatechin, kaempferol, chlorogenic acid, apigenin, quercetin 순으로 들어있었다. Epicatechin과 FRAP value 사이에는 강한 양의 상관관계($r=0.733$)가 있는 것으로 보고되어 있다[30]. 따라서 SE의 FRAP value가 높은 것은 TPC 및 epicatechin의 함량이 많기 때문인 것으로 사료되었다.

3.3. SE의 피부노화억제 효과

SE가 elastase와 collagenase를 저해하는 정도를 측정할 결과, elastase 저해율은 38.94 ± 7.09%이었고, collagenase 저해율은 78.94 ± 2.49%이었다. 따라서 SE는 elastase보다는 collagenase를 저해하는 효과가 더 높은 것으로 사료되었다. SE가 콜라겐 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 SE를 100-1,000 µg/mL로 섬유아세포(murine fibroblast, NIH3T3 cell lines)에 처리하였을 때, 세포가 90% 생존하는 농도는 493.01 ± 5.76 µg/L ($y = -0.0358x + 107.65$, $R^2 = 0.9699$)이었으므로, SE 처리 농도를 500 µg/mL로 설정하였다. SE 처리구에서의 콜라겐 생성은 대조구에 비하여 58.11 ± 1.07% 더 증가

Table 5. Composition of Polyphenol Compounds in the Ethanol Extract of *S. sarmentosum*

| Compounds | Concentration (mg/kg) |
|------------------|-----------------------|
| Epicatechin | 162.14 ± 32.427 |
| Epigallocatechin | 55.99 ± 11.199 |
| Kaempferol | 47.96 ± 9.592 |
| Chlorogenic acid | 38.91 ± 7.782 |
| Apigenin | 28.52 ± 5.704 |
| Quercetin | 23.72 ± 4.743 |
| Vanillic acid | 21.07 ± 4.214 |
| Gallic acid | 16.23 ± 3.246 |
| Diagenin | 5.57 ± 1.114 |
| Caffeic acid | 4.73 ± 0.945 |
| p-Coumaric acid | 2.57 ± 0.513 |
| Ferulic acid | 1.57 ± 0.313 |

Analysis was performed on HPLC equipped with a binary pump, a photodiode array, and a reversed phase column. The mobile phase composed of A (1% acetic acid in acetonitrile) and B (1% acetic acid in water) with gradient. Peaks were detected at 270 nm and 320 nm.

하였다. 콜라겐은 피부 구조를 유지하는데 필수적이고 피부 중량의 약 70% 정도를 차지하는 단백질로, 건강하고 매끄러운 피부를 갖기 위해서는 새로운 콜라겐 섬유의 합성이 필수적이며, 총 콜라겐 중에서 type I 콜라겐이 약 80%, type III 콜라겐이 약 10-15% 정도를 차지하고 있다[31]. 노화가 진행되면서 피부에서는 충분한 양의 콜라겐이 생성되지 않으며, 특히 노화된 피부에서는 type III 콜라겐의 양이 젊은 피부에 비해 유의적으로 낮다[32]. 또한, 피부노화가 진행될수록 type III 콜라겐/type I 콜라겐의 비율이 감소하는 것으로 보고되고 있다[33]. 따라서 SE 처리가 type III 콜라겐 생성에 미치는 효과를 측정하였다(Figure 1). SE 처리에 의해 *Col3A1*의 발현양이 증가하였고(Figure 1A), type III 콜라겐의 양도 대조구에 비해 증가하였다(Figure 1B). *Col3A1* 유전자는 콜라겐 [alpha-1(III) chain]을 coding하는 유전자로, 노화에 의해 발현양이 감소하는 것으로 보고되고 있다[34,35]. 따라서 SE 처리에 의해 *Col3A1*의 발현양이 증가하여 콜라겐 생성율이 증가한 것으로 판단되었고, SE는 피부 노화를 억제할 수 있는 효과적인 소재로 사료되었다. 돌나물로부터 건강기능성을 나타내는 유효 성분을 분석하려는 연구[20]가 진행되고 있으나, 피부노화 기전과 관련하여 유효성분을 분리·동정한 보고는 찾아볼 수 없었으므로 이에 대한 후속연구가 필요한 것으로 사료되었다.

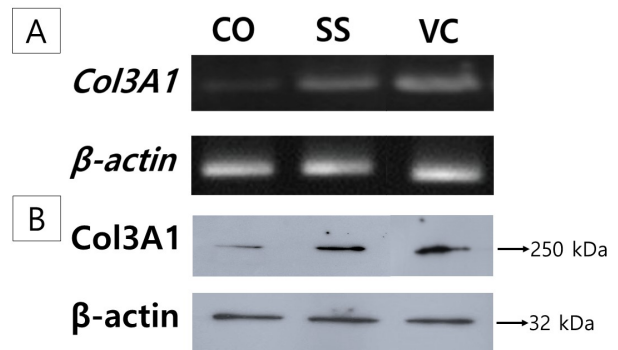


Figure 1. Effects of the ethanol extract of *S. sarmentosum* on the type III collagen. (A) RT-PCR analysis of the *Col3A1* mRNA expression (B) Western blot analysis of the type III collagen (*Col3A1*). CO: control, SS: *S. sarmentosum* (10 mg/mL), VC: ascorbic acid (10 mg/mL). Inhibitory effect of the *S. sarmentosum* on collagenase activity was $78.94 \pm 2.49\%$. The increase of $58.11 \pm 9.45\%$ was determined in collagen production.

3.4. SE를 함유한 수중유적형 크림(SEC)

돌나물을 에탄올로 추출하였을 때의 추출수율은 $23.17 \pm 7.16\%$ 이었고 pH는 6.80 ± 0.05 로 중성의 pH를 나타내었다(Table 6). 일반적으로 피부 표면은 pH 4.5-6.5인데 피부가 알칼리성이 되면 저항력이 약해지고 세균이 번식하는 등의 피부 질환이 발생하기 쉽기

Table 6. Physicochemical Properties of the Ethanol Extract of Sedum (10 mg/mL)

| Soluble solid (°Brix) | pH | Chromaticity | | | | |
|--------------------------|-------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| | | Lightness (L) | Greenness (-a) | Yellowness (b) | Hue value (h°) | Chroma (C*) |
| 32.35 ± 0.73 | 6.80 ± 0.05 | 24.01 ± 0.05 | -4.3 ± 0.04 | 3.61 ± 0.03 | 140.11 ± 2.04 | 5.61 ± 0.08 |

Table 7. Physicochemical Properties of the Oil in Water Emulsion Supplemented with the Extract of *S. sarmentosum*

| | | CO | SD1 | SD2 ¹⁾ | p value |
|----------------|-------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------|
| pH | | 6.88 ± 0.03 | 6.89 ± 0.02 | 6.87 ± 0.02 | 0.853 |
| Density (g/mL) | | 1.45 ± 1.11 | 1.47 ± 0.98 | 1.47 ± 1.12 | 0.793 |
| Chromaticity | Lightness (L) | 74.80 ± 0.44 ^{a,2)} | 63.57 ± 0.25 ^b | 59.53 ± 0.42 ^c | 0.001 |
| | Greenness (-a) | 0.63 ± 0.15 ^a | -8.53 ± 0.15 ^b | -8.1 ± 0.20 ^c | 0.001 |
| | Yellowness (b) | 4.93 ± 0.25 ^a | 14.83 ± 0.15 ^b | 14.80 ± 0.30 ^c | 0.001 |
| | Hue angle (h°) | 4.97 ± 0.27 ^a | 17.11 ± 0.12 ^b | 16.87 ± 0.32 ^c | 0.001 |
| | Chroma (C*) | 89.31 ± 0.01 ^a | 119.91 ± 0.61 ^b | 118.69 ± 0.55 ^c | 0.001 |
| Texture | Hardness (g) | 15.09 ± 0.67 ^a | 14.76 ± 0.94 ^a | 10.93 ± 0.11 ^b | 0.001 |
| | Adhesiveness | -39.33 ± 2.30 ^a | -36.41 ± 2.32 ^a | -22.94 ± 3.42 ^b | 0.001 |
| | Springiness | 0.984 ± 0.025 | 0.991 ± 0.007 | 0.981 ± 0.018 | 0.776 |
| | Cohesiveness | 15.05 ± 1.11 | 12.50 ± 1.24 | 10.26 ± 0.43 | 0.503 |

¹⁾ CO: not contained sedum extract (control group), SD1: 0.5% of sedum extract (10 mg/mL) containing group, SD2: 1% of sedum extract (10 mg/mL) containing group.

²⁾ Different letters in a row denote values that were significantly different ($p < 0.05$).

때문에 화장품의 pH는 중성 또는 약산성이다[36]. SE는 중성 pH이므로 화장품 제조 시에 pH 조절제없이 사용할 수 있을 것으로 사료되었다. SE를 수중유적형 크림(화장품) 제조에 사용하기 위하여 SE를 30% 농도가 되도록 에탄올에 재용해하였다. SE에 포함된 가용성고형분의 농도는 32.35 ± 0.73 °Bx이었다(Table 6). SE의 색도는 명도(L value) 24.01 ± 0.05로 어두운 편이었다. 색상(h° angle)의 범위는 0-360까지이며 150이면 녹색, 120이면 연두색이다. SE의 색상은 140.11로 녹색이었고, 채도(chroma)는 5.61로 생생하지 않은 색감을 나타내었다(Table 6).

SEC의 이화학적 특성을 측정된 결과는 Table 7과 같다. Table 7에서와 같이 본 연구에 사용된 계면활성제

는 4종이며 이들의 HLB 값은 각각 다르다. 안정한 유화상태를 장기간 유지하기 위해서는 HLB 차이가 큰 계면활성제를 혼합하여 최종 제품에 적합한 HLB 값을 지니도록 해야 한다[37]. 수중유적형 크림의 제조에 사용하는 유화제의 HLB는 8-16이 적절하다[27]. 본 연구에 사용된 4종의 계면활성제의 HLB 값은 11.58로 수중유적형 크림의 제조에 적합한 HLB 값을 나타내었다. SE의 pH가 pH 6.80이었으므로, SE의 첨가량이 증가하여도 SEC의 pH는 대조구와 차이가 없었으며, 비중도 대조구와 돌나물 크림 첨가구 사이에 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 색도를 나타내는 모든 항목이 대조구와 돌나물 첨가구 사이에 유의적인 차이를 나타내었다(Table 7). 대조구는 수상과 유상이 유화되

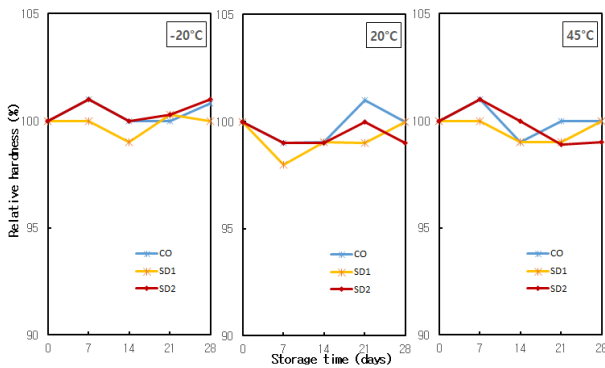


Figure 2. Changes of hardness of the oil in water emulsion supplemented with the ethanol extract of *S. sarmentosum* stored at various temperatures during 4 weeks. CO: not contained sedum extract (control group), SD1: 0.5% of sedum extract (10 mg/mL) containing group, SD2: 1% of sedum extract (10 mg/mL) containing group.

면서 불투명한 백색을 나타낸 반면에 SE를 첨가한 실험구에서는 녹색을 나타내었다. SE 첨가구의 색상값은 모두 120 부근으로 ‘연두색(yellow green)’인 것으로 산출되었다.

수중유적형 크림은 서로 섞이지 않는 물질에 에너지를 가하여 혼합시킨 것으로 온도 변화에 의해 유화특성이 변화될 수 있으므로, 유화제품은 다양한 온도에서의 유화안정성을 관측해야 한다. 흐름성이 적은 크림은 유화가 깨어지면 수상과 유상이 분리되면서 경도가 감소하므로, 제조한 SEC를 다양한 온도(-20 - 45 °C)에서 저장하면서 경시적으로 크림의 경도를 측정하였다. Figure 2에서와 같이 SEC는 저장 온도에 관계없이 초기의 경도를 유지하였다. 따라서 크림 제조시에 SE를 1%까지 첨가하여도 수중유적형 크림의 유화는 안정한 상태를 유지하는 것으로 나타났다.

4. 결 론

돌나물 추출물(SE)이 여드름 발생의 원인균인 *P. acnes*의 성장을 저해하는 것을 확인하였다. SE의 organic radical 소거능(DPPH assay)은 $78.43 \pm 1.08\%$, 금속이온환원능은 2.54 ± 1.02 (FRAP value), 초기 단계의 지질과산화반응을 저해하는 효과(FTC assay)는 $62.03 \pm 0.38\%$, 최종단계의 지질과산화반응을 저해하는 정도(TBARS assay)는 $55.36 \pm 2.05\%$ 로 강한 항산화력을 나

타내었다. 이러한 효과는 SE에 함유된 TPC (27.98 ± 0.34 g/kg dry weight) 및 ASA (15.93 ± 9.26 mg/kg dry weight)에서 기인한 것으로 사료되었다. TPC 중에서는 epicatechin이 162.14 ± 32.427 mg/kg으로 가장 많이 함유되어 있었고, epigallocatechin, kaempferol, chlorogenic acid 순으로 존재하는 것을 확인하였다. SE는 피부노화를 촉진하는 효소인 elastase와 collagenase 활성도를 각각 $38.94 \pm 7.09\%$ 와 $78.94 \pm 2.49\%$ 저해하였다. 또한 SE를 처리한 섬유아세포에서의 콜라겐 합성은 대조구보다 $58.11 \pm 1.07\%$ 더 증가하였으며 이는 SE에 의해 *Col3A1* 유전자의 발현양이 증가되었기 때문임을 확인하였다. 생리기능성을 지닌 SE의 실용화 가능성을 확인하기 위하여 돌나물 추출물을 에탄올에 재용해한 후, 0.5-1%까지 첨가하여 수중유적형 크림(화장품)을 제조하였다. 돌나물 크림(SEC)의 제조에 사용된 계면활성제의 HBL 값은 11.58이었고, SEC의 pH는 6.88, 비중은 1.47 g/mL이었다. SE의 첨가량이 많을수록 명도(L value)가 감소하였고, 연두색(h^*)을 나타내었다. 또한 SE를 첨가할수록 크림의 경도가 감소하였고 부착성은 증가하였다. 그러나 0.5% SE 첨가구의 경도와 부착성은 대조구와 비교시 유의적인 차이를 나타내지 않았다. SEC를 -20 - 45 °C의 온도에서 4주간 저장하면서 경시적으로 경도 변화를 측정된 결과, 대조구와 SE 첨가구 모두 안정한 유화상태를 유지하였다. 본 연구를 통해 SE가 항균, 항산화 및 항노화 기능이 있는 것을 확인하였다.

Reference

1. S. M. Jang and J. D. Kim, A study on the use realities and purchasing behaviors of cosmetics in adolescents, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **40**(1), 55 (2014).
2. S. Y. Kim, D. H. Won, and S. N. Park, Antibacterial activity and component analysis of *Persicaria perfoliata* extracts, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **38**(3), 278 (2010).
3. D. H. Won, H. A. Gu, H. J. Kim, S. B. Han, J. Park, and S. N. Park, Antibacterial and antioxidative activities of *Epimedium koreanum* Nakai extracts, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **41**(3), 284 (2013).

4. M. E. Portillo, S. Corvec, O. Borens, and A. Trampus, *Propionibacterium acnes*: An understanding pathogen in implant-associated infections, *BioMed Res. Int.*, **2013**, 1 (2013).
5. J. Kwon, H. Jo, Y. Kim, K. Park, H. Chung, and J. Park, Review of psychiatric adolescent inpatient with dermatologic consultations, *Korean J. Psychosomatic Med.*, **23**(1), 20 (2015).
6. K. S. Lee, J. C. Lee, K. H. Han, and M. J. Oh, Antimicrobial activities of extract of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo on food spoilage or foodborne disease microorganism, *Korean Soc. Food Preserv.*, **6**(2), 239 (1999).
7. H. S. Kim and Y. J. Lee, Studies on the anti-bacterial, anti-inflammatory and anti-oxidant effect of BPH, *Korean J. Herbol.*, **29**(5), 45 (2014).
8. L. C. Magdalena and Y. A. Tak, Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free Rad. Biol. Med.*, **48**(5), 749 (2010).
9. H. Masaki, Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects, *J. Dermatol. Sci.*, **58**(2), 85 (2010).
10. J. H. Michael and E. D. Frederick, An epigenetic perspective on the free radical theory of development, *Free Rad. Biol. Med.*, **43**(7), 1023 (2007).
11. S. Y. Kim, D. H. Won, M. S. Lim, and S. N. Park, Cellular protective effect and component analysis of *Euphorbia humifusa* extracts, *Korean J. of Pharmacog.*, **41**(4), 264 (2010).
12. T. Quan, Z. Qin, W. Xia, Y. Shao, J. J. Voorhees, and G. J. Fisher, Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging, *J. Inves. Dermatol. Symp. Proceedings*, **14**, 20 (2009).
13. C. K. Phillai and K. S. Phillai, Antioxidants in health, *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, **46**, 1 (2002).
14. C. K. Sung, S. M. Kim, C. J. Oh, S. A. Yang, B. H. Han, and E. K. Mo, Taraxerone enhances alcohol oxidation via increases of alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) activities and gene expressions, *Food Chem. Toxicol.*, **50**(7), 2508 (2012).
15. E. K. Mo, S. M. Kim, S. A. Yang, C. J. Oh, and C. K. Sung, Assessment of antioxidant capacity of sedum (*Sedum sarmentosum*) as a valuable natural antioxidant source, *Food Sci. Biotechnol.*, **20**(4), 1061 (2011).
16. H. C. Oh, D. G. Kang, J. W. Kwon, T. O. Kwon, S. Y. Lee, D. B. Lee, and H. S. Lee, Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**(12), 2035 (2004).
17. G. S. Sim, J. H. Kim, B. C. Lee, D. H. Lee, G. S. Lee, and H. B. Pyo, Inhibitory Effects on Melanin Production in B16 Melanoma Cells of *Sedum sarmentosum*, *Yakhak Hoeji*, **52**(3), 165 (2008).
18. G. S. Sim, J. H. Kim, D. H. Lee, Y. Na, G. S. Lee, and H. B. Pyo, *Sedum sarmentosum* enhances hyaluronan synthesis in transformed human keratinocytes and increases water content in human skin, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **33**(1), 17 (2007).
19. T. S. A. Thring, P. Hili, and D. P. Naughton, Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plant, *BMC Complement. Altern. Med.*, **9**, 27 (2009).
20. E. K. Mo, B. H. Han, S. M. Kim, S. A. Yang, S. K. Kang, C. J. Oh, R. Kim, C. G. Kim, H. J. Kang, and C. K. Sung, Identification of D-Friedoolean-13-en-3-one (Taraxerone) as an antioxidant compound from sedum (*Sedum sarmentosum*), *Food Sci. Biotechnol.*, **21**(2), 485 (2012).
21. A. Greets, R. Vrijnsen, J. Rauterberg, A. Burt, P. Schellinck, and E. Wisse, In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion, *J. Hepatol.*, **9**(1), 59 (1989).
22. G. S. Spanos and R. E. Wrolstad, Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice, *J. Agric. Food Chem.*, **38**(7), 1565 (1990).
23. I. K. Bae, H. M. Ham, M. H. Jeong, D. H. Kim, and H. J. Kim, Simultaneous determination of 15 phenolic compounds and caffeine in teas and mate using RP-HPLC/UV detection: Method development and optimization of extraction process, *Food Chem.*, **172**,

- 469 (2015).
24. E. K. Mo, H. H. Kim, S. M. Kim, H. H. Cho, and C. K. Sung, Production of sedum extract adding jelly and assessment of its physicochemical properties, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **39**(6), 619 (2007).
 25. H. J. Kim, H. N. Jang, J. Y. Bae, and S. N. Park, A study on the stability of the cream containing *Glycyrrhiza uralensis* extract, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **39**(2), 117 (2013).
 26. J. Y. Kim and S. N. Park, A study on the stability and moisturizing effect for the cream containing *Castanea crenata* leaf extract, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **35**(4), 301 (2009).
 27. K. T. Seo, Y. C. No, and H. C. Kim, Cosmetic manufacturing, 88, Hakyehonsa, Seoul (2013).
 28. J. Tabart, C. Keverx, J. Pincemail, J. O. Defraigne, and J. Dommès, Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests, *Food Chem.*, **113**(4), 1226 (2009).
 29. E. Niki, Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo, *Free Radic. Biol. Med.*, **49**(4), 503 (2010).
 30. L. S. Lee, S. J. Kim, Y. B. Kim, and Y. C. Kim, Quantitative analysis of major constituents in green tea with different plucking periods and their antioxidant activity, *Molecules*, **19**, 9173 (2014).
 31. A. Oikarinen, Connective tissue and aging, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **26**(2), 107 (2004).
 32. P. K. Mays, J. E. Bishop, and G. J. Laurent, Age-related changes in the proportion of types I and III collagen, *Mech. Ageing Dev.*, **45**(3), 203 (1988).
 33. Y. Murakami, H. Adachi, T. Sakaida, H. Tanaka, Y. Yashior, and S. Nakata, The reduction mechanism of the type III/I collagen ratio with aging: Age-related change in meprin, a type III collagen propeptide cleavage enzyme, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **47**(4), 278 (2013).
 34. D. Glass, A. Vinuela, M. N. Davies, A. Ramasamy, and T. D. Spector, Gene expression changes with age in skin, adipose tissue, blood and brain, *Genome Biol.*, **14**, R75 (2013).
 35. Y. Baohua and L. Li, Effects of SIRT6 silencing on collagen metabolism in human dermal fibroblasts, *Cell Biol. Int.*, **36**(1), 105 (2012).
 36. S. J. Choi, S. Kim, Y. Jeong, C. S. Ku, B. Ha, and H. J. Chae, Stability evaluation of the cosmetics containing lotus leaf extract, *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.*, **26**, 83 (2011).
 37. H. W. Kim, Manufacturing and application of natural surfactants for cosmetics, *J. Adhesion Interface*, **14**(4), 197 (2013).