

Eruca sativa 에칠아세테이트와 부탄올 분획물의 미백 및 항균효과를 이용한 화장품 응용연구

박지혜¹ · 이광호² · 김보라^{3,†}

¹목원대학교 대학원 화학과, 대학원생

²한국폴리텍대학 융합기술연구원 생명의료시스템과, 교수

³목원대학교 화장품뷰티학과, 교수

(2021년 6월 2일 접수: 2021년 6월 22일 수정: 2021년 6월 25일 채택)

Cosmetic Application Using Skin Whitening and Anti-microbial effects of Ethyl Acetate and *n*-Butanol Fractions from *Eruca sativa*

Jihye Park¹ · Kwang-ho Lee² · Bora Kim^{1,3†}

¹Department of Chemistry, The Graduate School of Mokwon University, Daejeon, 35349, Korea

²Department of Biomedical Systems Engineering, Convergence Technology Campus,
Polytechnics University, Seongnam, 13590, Korea

³Department of Cosmetics & Beauty, Mokwon University, Daejeon, 35349, Korea

(Received June 2, 2021; Revised June 22, 2021; Accepted June 25, 2021)

요 약 : *Eruca sativa* (*E. sativa*)는 루꼴라라고 불리우고 이탈리아 요리에 많이 사용되는 식물로 Brassicaceae 속에 속하는 다년생 식물이다. *E. sativa*를 70% 에탄올로 환류추출 및 농축하고 (ES), *n*-hexane (EHex), ethyl acetate (EEA), chloroform (ECHCl₃), *n*-butyl alcohol (EBuOH) 및 water (EDW) 용매 극성별로 분획하여 미백 효능을 규명하고 화장품 소재로서의 응용성을 연구하였다. ES, EHex, EEA, ECHCl₃, EBuOH 및 EDW의 mushroom tyrosinase 활성 저해를 평가한 결과 EEA가 가장 유의하게 저해하였으며, B16F10 멜라노마 세포 내에서의 멜라닌 생성을 확인한 결과 ES, EEA 및 EBuOH를 처리하였을 때 멜라닌 생성이 유의하게 저해되었으며, 특히 EEA 분획물에서 가장 효과가 뛰어났다. 피부염과 여드름을 일으키는 황색포도상구균, 여드름 원인균을 포함한 8종의 세균, 진균에 대해 ES, EHex, EEA, ECHCl₃, EBuOH 및 EDW의 항균력과 방부력 시험을 평가한 결과 EEA는 8종의 균 모두 효과적으로 항균력을 나타냈다. ES를 0.05, 0.1%를 함유하여 제조한 토너와 에멀션은 기존 처방에서 방부력을 증가시켜 천연보존제 역할을 할 수 있을 것으로 판단된다. ES를 토너, 에멀션 제형에 0.05, 0.1%로 첨가하여 일광, -20, 4, 25, 55 °C 조건에서 4 개월동안 안정성을 평가한 결과 pH 및 점도에 대한 영향은 크게 없었으나 대조군 및 ES를 첨가한 에멀션 55 °C에서 분리가 일어나는 것을 확인하였다. 또한, 피부침투시험을 통해 EEA는 6 hr에서 0.058%가 침투되어 임상적인 효능을 예측할 수 있었다. 천연소재 *E. sativa*는 미백 기능성화장품 소재 및 천연 항균 보존제로 활용 가치가 있을 것으로 사료된다.

†Corresponding author
(E-mail: bora0507@mokwon.ac.kr)

주제어 : *Eruca sativa*, tyrosinase, 멜라닌 생성 저해력, 미백 소재, 항균력

Abstract : *Eruca sativa*, called arugula, is a perennial plant in the Brassicaceae family, an edible plant commonly used in Italian cuisine. To study as a cosmetic material application *E. sativa* was extracted with 70% ethanol (ES). Then ES was fractionated using n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butyl alcohol and water (EHex, EEA, ECHCl₃, EBuOH and EDW). EEA showed mushroom tyrosinase inhibitory activity. ES, EEA and EBuOH showed inhibition of tyrosinase activity. As a result, ES is expected to have skin whitening efficacy. ES was applied to 0.05, 0.1% the toner and emulsion formulation to test the stability. The anti-microbial activity of eight bacteria and fungi including *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes* which cause dermatitis and acne was evaluated. EEA showed effects in all of microorganisms. The toner and emulsion containing ES with 0.05, 0.1% were passed in the challenge test. At -20, 4, 25, 55 °C and daylight, there was no significant change on pH, viscosity for 4 months. However, emulsions had phase separation phenomenon at 55 °C, so the base formulation needs improvement. In addition, through the skin penetration test, EEA penetrated 0.058% in 6 hr, predicting the clinical efficacy. This means that *E. sativa* can contribute whitening agent and the synergistic effect of preservatives.

Keywords : *Eruca sativa*, Tyrosinase, Melanin synthesis inhibition, Skin whitening agent, Anti-microbial effect

1. 서론

멜라닌은 피부, 눈, 머리카락 및 뇌와 같은 많은 신체 부위에서 발견되는 색소로 전구체인 페닐알라닌(phenylalanine) 또는 티로신(L-tyrosine)으로부터 생성된다[1]. 멜라닌 합성은 주로 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1, 2 (TYRP-1, 2)에 의해서 합성되며, tyrosinase는 멜라닌 합성 초기 단계에서 멜라닌 생성 효소로서 중요한 역할을 담당한다. Melanosome 내에서 티로신 및 L-3,4-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA)는 tyrosinase에 의해 DOPA quinone으로 산화되며, 자동적 산화 반응을 통해 최종적으로 흑갈색을 갖는 유멜라닌(eumelanin)과 적갈색을 갖는 페오멜라닌(pheomelanin)을 생성한다. 멜라닌은 피부에 유해한 자외선을 침투해서 세포를 보호하는 역할을 하지만 불균일한 과다 생성은 미용적으로 불편함을 초래한다. 그러나 멜라닌 생성을 저해하는 물질로 알려진 페놀 유도체인 하이드로퀴논이나 아스코르빅산 및 코직산, 알부틴, 글루코사민 등은 피부 자극이나 안정성 문제로 용량이 제한적이다[2].

화장품의 주요 성분은 물로 구성되어 균에 의

한 오염이 쉽게 일어난다. 미생물에 오염된 화장품은 색상, 점도, 질감 및 향취 등에 변화를 일으키며, 병원균의 경우 심각한 질환을 일으킬 수 있어 필수적으로 보존제(방부제)를 첨가하여 화장품에 사용되어졌다. 파라벤류의 방부제는 1950년대부터 화장품, 의약품 및 식품에 주로 사용된 보존제로 최근 연구에 의하면 에스트로겐과 유사하게 작용하여 유방암을 유발하는 것으로 밝혀졌으며, 다른 혼합 방부제의 경우 화장품에서 접촉성 피부염을 일으킨다고 보고되었다[3, 4]. 이러한 부작용들이 생기면서 기존 화학보존제를 대체하기 위해 천연보존제 개발이 활발해지고 있다[5].

*Eruca sativa*는 Brassicaceae 속에 속하는 잎이 짙은 녹색의 다년생 식물로서 지중해 연안에 서식하며, 이탈리아 요리에 많이 사용되는 식용식물로 로켓(루꼴라)이라고도 불린다[6]. *E. sativa*에 속한 다양한 flavonoids(queretin, isoqueretin, kaempferol)가 이미 밝혀져 있으며, 70% ethanol 추출물은 미백, 항산화, 항균 활성, 핵수용체 Peroxisome proliferator activated receptor- α (PPAR- α) 활성에 의한 피부장벽 개선효과 및 염증성 사이토카인을 저해하여 항염증 효능이 있

는 것으로 알려져 있다[7-9]. 따라서 본 연구에서의 차별성은 *E. sativa*를 다양한 유기용매의 극성별 분획물로 효능을 밝혀 더 나아가 주요 활성 성분을 밝히는데 기반 연구로 활용하고자 한다. 또한, 화장품 제형에 *E. sativa* 추출물을 첨가하여 제형 안정성 및 방부력 시험과 피부투과시험을 통해 기능성화장품 소재로서 가능성에 대해 알아보하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 재료 준비

*E. sativa*의 잎, 줄기부위(800 g)와 70% 에탄올 5 L를 55 °C에서 24 hr, 2회 환류 추출하였다. 110 mm filter paper (No. 6, Advantec, Japan)로 감압 필터하였으며, 55 °C에서 감압 농축하여 *E. sativa* 추출물(ES, 30.0%)을 실험에 사용하였다. ES를 water에 현탁시켜 용매의 극성에 따라 *n*-hexane (EHex, 4.17%), ethyl acetate (EEA, 1.96%), chloroform (ECHCl₃, 0.17%), *n*-butyl alcohol (EBuOH, 2.61%) 및 water (EDW, 27.0%) 800 mL씩 3회 반복하여 분획하였으며, 55 °C의 조건으로 감압 농축하여 수율을 계산하였다.

2.2. Mushroom tyrosinase 활성 저해능 측정

Mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich, USA)와 L-tyrosine (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여 tyrosinase의 활성 저해능을 평가하였다[10]. 3 mM L-tyrosine, 0.1 M potassium phosphate buffer (PPB, pH 6.8)와 ES, EHex, EEA, ECHCl₃, EBuOH 및 EDW를 농도별로 96-well plate에 혼합하고, 2000 U/mL의 mushroom tyrosinase를 후첨해 37 °C 배양기에서 15 min 간 반응하였다. Microplate reader (BioTek, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정 후 tyrosinase 활성 저해능을 평가하였으며, IC₅₀ (50%를 저해하는 농도)을 구하여 비교하였다. 코직산(kojic acid, Sigma-Aldrich, USA)을 양성대조군으로 사용하였다.

2.3. 세포 배양

B16F10 멜라노마 세포는 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양받아 계대배양 후 실험에 사용하였다. Dulbecco's modified

Eagles medium (DMEM, Welgene, Korea)에 10% fetal bovine serum (FBS) 및 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2.4. 세포 생존율 측정

Water soluble tetrazolium salt (WST, DoGen, Korea) reagent를 이용하여 세포 생존율을 확인하였다. B16F10 멜라노마 세포를 96-well plate에 1.0×10^4 cell/well로 처리한 후 24 hr 동안 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 시료를 96-well plate에 첨가하여 48 hr 동안 처리하였다. 각 well에 WST reagent를 넣고, 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 4 hr 반응시켜 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정 후 세포 생존율을 확인하였다.

2.5. B16F10 멜라노마 세포 멜라닌 합성 저해능 측정

B16F10 멜라노마 세포를 60 mm dish에 5.0×10^5 cell/dish의 농도로 처리한 후 24 hr 배양하였다. 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma-Aldrich, USA) 200 μM와 ES, EEA 및 EBuOH를 함께 처리한 후 72 hr 반응시켰다. 세포를 떼어내 15,000 rpm, 10 min 원심분리하였다. 1 N 수산화나트륨을 넣어 60 °C, 1 hr 정치하여 용해된 용액을 가지고 멜라닌 함량을 microplate reader로 405 nm에서 측정하였으며, 각각의 데이터는 브래드포드 단백질 정량법으로 보정하여 나타내었다. 양성대조군으로는 코직산을 사용하였다.

2.6. 균 배양

Escherichia coli (대장균), *Staphylococcus aureus* (황색포도상구균), *Pseudomonas aeruginosa* (녹농균), *Bacillus subtilis* (고초균), *Malassezia furfur* (비듬균), *Propionibacterium acnes* (여드름균), *Aspergillus niger* (검정곰팡이) 및 *Candida albicans* (칸디다균)는 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받아 계대배양 후 실험에 사용하였다. *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* 및 *B. subtilis*는 nutrient agar (Difco Lab., U.S.A)와 nutrient broth를 사용하였으며, *C. albicans*와 *A. niger*는 potato dextrose agar와 potato dextrose broth를 사용하였고, *M. furfur*는 malt extract에 agar를 첨가한 MA 배지를 제

조하였다. *P. acnes*는 schaedler agar를 사용하여 BD GasPak™ EZ Container Systems (Difco Lab. U.S.A)을 용기에 균을 함께 넣어 혐기성 조건을 맞추어 37 °C 배양기에서 배양하였다. 단일 콜로니를 백금이로 취하여 액체배지에 접종한 후 37 °C, 120 rpm 조건으로 진탕 배양기에서 18 ~ 24 hr 배양하여 UV-spectrophotometer (Jasco-760, Jasco Int., Japan)로 600 nm에서 흡광도를 측정해 콜로니 수를 계산하였으며, *A. niger*는 hemocytometer로 포자 수를 세어 1 mL 당 콜로니 수를 계산하였다.

2.7. 생육저해한 측정

각 균주의 콜로니 수가 5.0×10^5 CFUs/mL 이 되도록 고체배지에 균액을 접종하여 bottom agar 표면에 균일하게 부은 후 멸균된 6 mm paper disc (Advantec, Japan)를 밀착시키고, 각 시료를 200 mg/mL로 처리하였다. 양성대조군으로 30% 메틸파라벤(methyl paraben, M.P)을 사용하였다. 37 °C 배양기에서 *M. furfur*는 96 hr, *P. acnes*는 72 hr, *A. niger*는 48 hr, 나머지 균들은 18 ~ 24 hr 동안 배양하여 결과를 확인하였다. Disc 주위의 생육저해한(mm)을 총 3회 측정하여 평균값으로 나타내어 항균력을 비교하였다.

2.8. *E. sativa* 추출물을 함유한 제형의 안정성 평가

ES가 제형 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 제형에 40% 1,3-butylene glycol (1,3-BG)로 희석하여 ES를 첨가한 토너와 에멀션은 Table. 2와 Table. 3에 따라 homo mixer (T.K Homo Mixer Mark II, Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd. Japan)를 사용하여 제조하였다. 이후 -20, 4, 25, 50 °C와 일광 조건으로 0 ~ 4 개월 동안 pH meter (Orion Star™ A211 pH Benchtop Meter, Thermo Sci Co., USA), Brookfield viscometer (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., U.S.A)를 이용하여 외관상 평가를 통해 안정성을 평가하였다.

2.9. 방부력 시험

ES와 대체 보존제(Caprylyl glycol/Ethylhexyl glycerin/Tropolone)를 함께 처방하여 토너 및 에멀션에서의 방부력을 확인하였다. 화장품 방부력 시험은 Personal Care Products Council (PCPC)

에서 제공하는 시험법을 참고하였다. ES를 함유한 토너와 에멀션을 각각 30 g에 세균은 10^7 CFU/mL, 진균은 10^6 CFU/mL로 접종하였으며, 상온에 보관한 후 실험에 사용하였다. 0, 1, 7, 14, 21, 28일에 0.1 mL 시료를 취하여 콜로니 수를 측정하였다.

2.10. Franz diffusion cell을 이용한 피부침투 시험

피부침투시험은 Franz diffusion cell (DHC-6TD, LOGAN, USA) 아래쪽 receptor 챔버와 위쪽 donor 챔버 사이에 피부조직을 두고, 시험물질을 분주하여 receptor 챔버 밑에 위치한 receptor fluid로 시료가 침투된 정도를 측정하는 원리를 이용하였다. 인공멤브레인(Strat-M® EMD Millipore Co., U.S.A)을 사용하였으며, 용매로 50% 에탄올을 사용하였다. Franz cell에 인공멤브레인을 올린 후 receptor fluid과 밀착이 되도록 올려놓고, 용매 5 mL 채워 시험물질을 인공멤브레인 위에 로딩하였다. 32 °C로 유지하고 자석 교반기를 이용해 용매를 교반하였으며, 1.5, 3, 6 h 동안 용매에 시험물질의 침투량을 알기 위해 Folin-Ciocalteu reagent를 이용하여 총 폴리페놀 함량을 퍼센트로 나타내었다.

2.11. 통계 처리

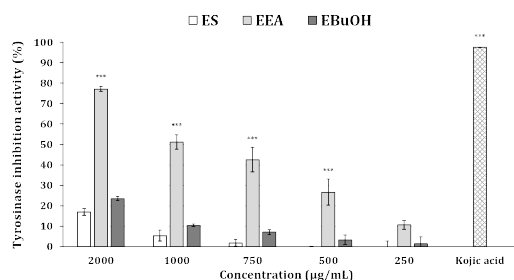
모든 실험은 3회 이상 반복 실험을 통해 평균 ± 표준편차(Standard deviation, SD)로 표시하였다. 통계적 유의성 분석은 GraphPad Prism 5 (Software, Inc, San Diego, CA)를 이용하여 one-way ANOVA repeated measures를 실시하였다. 각 시료 간의 평균 처리에 대해서 $p < 0.05$ 수준에서 사후 검정을 진행하였으며, Bonferroni : Compare all pairs of columns test를 통해 각 결과 간의 통계적 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Mushroom tyrosinase 활성 저해율 측정

ES는 2000, 1000, 500 µg/mL에서 16.9, 5.4, 1.8%의 저해율을 보였으며, EEA는 2000, 1000, 500, 250 µg/mL에서 각각 77.2, 51.2, 42.5, 26.7, 10.6%의 저해율을 보였다(Fig. 1). EBUOH는 같은 농도에서 23.5, 10.4, 7.1, 3.3, 1.4%의 저해율을 나타냈으나 ECHCl₃, EDW, EHex은

저해율이 나타나지 않았다. ES와 EBUOH의 경우 미미한 저해율을 보였으나, EEA의 경우 2000 µg/mL에서 77.2%의 저해율을 보였으며, ES보다 약 4.5배 높게 나타났다. 양성대조군으로 사용한 코직산은 25 µg/mL에서 97.6%를 저해하였다.



Sample	IC ₅₀ (µg/mL)
ES	5088.2
EEA	1131.2
EBuOH	4067.6
ECHCl ₃	-
EDW	-
EHex	-
Kojic acid	11.75

Fig. 1. Inhibition of tyrosinase activity in ES and EEA, EBUOH, ECHCl₃, EDW and EHex. Values are the mean±SD of three experiments. (***) $p < 0.001$, compared to ES)

ES, *Eruca sativa* 70% ethanol extract; EHex, n-hexane fraction; ECHCl₃, chloroform fraction; EEA, ethyl acetate fraction; EBUOH, n-butyl alcohol fraction; EDW, water fraction

3.2. 세포 생존율 측정

ES, EEA 및 EBUOH를 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 B16F10 멜라노마 세포에 처리하였을 때 ES는 103.5, 95.0, 89.2, 64.4%의 생존율을 보였으며, EEA는 91.0, 82.4, 18.8, 12.5%를 나타냈다(Fig. 2). EBUOH의 경우 92.4, 90.4, 80.8, 77.6%의 생존율을 보였으며, EEA는 100 µg/mL에서 약 20%도 생존하지 못하였다. ES, EEA 및 EBUOH는 농도 의존적으로 농도가 높아질수록 세포의 생존율이 낮아지는 것을 확인

하였으며, 80% 이상 생존율을 보이는 50 µg/mL를 최종농도로 정하여 실험을 진행하였다.

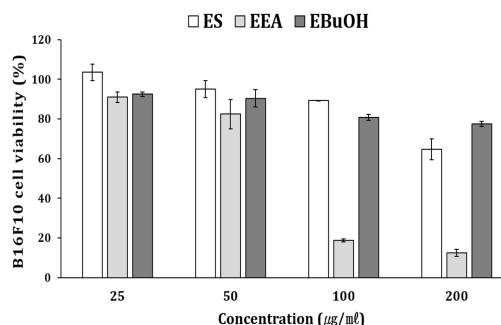


Fig. 2. Cell viability of ES, EEA, EBUOH in B16F10 melanoma cells. Cells were treated with various concentrations of ES, EEA, and EBUOH for 24 hrs using the WST-1 assay. Values are the mean±SD of triplicate experiments.

3.3. B16F10 멜라노마 세포 멜라닌 합성 저해능 측정

IBMX를 단독으로 처리하였을 경우 무처리군에 비해 약 33.3% 멜라닌 생성이 증가하였다. IBMX와 함께 처리한 ES, EEA 및 EBUOH는 25 µg/mL에서는 8.3, 36.7, 11.1%를 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 양성대조군으로 사용된 코직산은 100 µg/mL에서 57.3%의 저해율을 나타냈으며, EEA가 B16F10 멜라노마 세포에서 멜라닌의 생성을 효과적으로 저해하였음을 확인하였다.

3.4. E. sativa 추출물을 함유한 제형의 안정성 평가

ES를 첨가하지 않은 대조군 토너와 에멀션을 비교했을 때 ES를 첨가한 토너와 에멀션에서 pH가 약간 낮게 형성한다는 것을 확인할 수 있으며, ES의 pH를 측정한 결과 pH 4.4로 약산성을 나타냈다. ES에 의해 pH가 약간 낮아지지만 4개월 동안 25, 4, -20, 55 °C와 일광 조건에서 pH 변화를 관찰하였을 때는 큰 변화가 없었다.

ES 0.1%, 0.05%를 첨가한 에멀션 제형에서 1개월에 점도가 증가하였다가 낮아지는 현상이 확인되었으나 약 50 ~ 100 cPs의 차이로 큰 변화는 보이지 않았다.

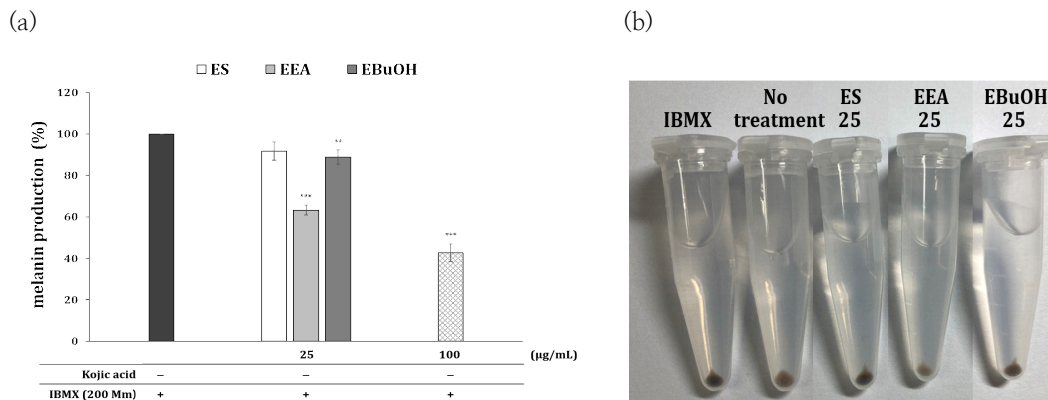


Fig. 3. Inhibition of melanogenesis of *E. sativa*. (a) ES, EEA, EBUOH were treated at 25 µg/mL with IBMX (200 µM). Kojic acid (100 µg/mL) was used as a positive control. (b) the picture of the B16F10 cell pellets. Values expressed the mean ± SD calculated by triplicate experiments. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared to only IBMX treated control)

외관상 평가에서 ES를 첨가한 25 °C와 일광 조건의 토너 색이 제조 직후에 비해 색이 확연히 연해진 것을 확인할 수 있었다. 50 °C에 보관한 토너는 제조 직후와 비교하였을 때 별 차이가 없었지만, 에멀션의 경우는 대조군과 ES를 첨가한 군에서 분리가 일어나 유화의 안정성이 떨어지는 것을 확인하였다. 향취 부분에 대해서는 토너와 로션 모두 25, 4, -20, 55 °C에서 향의 변화는 크게 나타나지 않았다. 이 결과를 통해 ES를 첨가한 토너의 경우 빛에 의해 변색이 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 높은 온도에서 대조군과 ES를 첨가한 에멀션이 분리가 일어났으므로 많은 함량의 추출물을 함유하기는 했으나, 추가적으로 분리가 일어나지 않는 조건과 빛에서도 안정성을 가질 수 있는 제형 연구가 필요하다.

3.5. 생육저해할 측정

모든 시료는 200 mg/mL의 농도로 처리하였으며, DMSO를 음성대조군으로 사용하였다. *E. coli*는 EEA, ECHCl₃에 대해 항균력을 보였으며 (Fig. 4, Table. 1), EEA가 11.3 mm, ECHCl₃는 10.0 mm로 EEA의 항균력이 가장 좋았다. *S. aureus*는 EEA가 13.0 mm, ECHCl₃가 11.0 mm, EHex은 11.0 및 EBUOH가 8.0 mm으로 나타났다. *P. aeruginosa*는 EEA가 10.0 mm, EBUOH는 7.0 mm 및 EDW가 7.0 mm의 항균 효과를 보였으며, *B. subtilis*는 EEA가 16.0 mm, ECHCl₃는 15.0 mm, EHex이 11.0 mm,

EBUOH는 7.0 mm만큼 저해하였다. *M. furfur*는 EEA가 12.3 mm, ECHCl₃는 11.7 mm의 항균효과를 보였으며, *A. niger*는 EEA가 15.3 mm, ECHCl₃는 10.3 mm으로 나타났다. *P. acnes*에서 EEA가 16.3 mm, EHex이 14.7 mm, ECHCl₃는 12.7 mm, EBUOH의 경우 10.0 mm만큼 저해를 보였으며, 또한, *C. albicans*는 EHex이 8.3 mm, EEA가 8.0 mm, ECHCl₃는 7.3 mm의 항균효과를 확인할 수 있었다. ES는 8종 균주에 대한 항균력이 전혀 나타나지 않았으나, 이를 분획한 EEA에서는 8종 균주 모두에게서 항균력이 가장 우수하였다.

3.6. 방부력 시험

E. coli, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *B. subtilis* 및 *A. niger*를 접종한 후 0, 1, 3, 7, 21, 28일에 각 균을 해당하는 agar 배지와 혼합하여 24 hr 후(*A. niger*는 48 h 후) 콜로니 수를 세어 결과를 확인하였다. *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*에서 0 CFU/mL로 균이 사멸된 것을 확인할 수 있으며, *B. subtilis*, *A. niger*는 토너와 에멀션에서 균이 검출됐으나 7일에서 균이 감소하여 테스트를 통과하였으며, 7일 이후에도 점차 콜로니 수가 감소하는 것을 확인할 수 있다. 방부력 시험 결과 ES가 함유된 제형에서 다른 균주들의 방부력 효과는 미미하게 나타났지만, *A. niger*의 감소에 도움을 주는 효과를 나타냈다(data not shown).

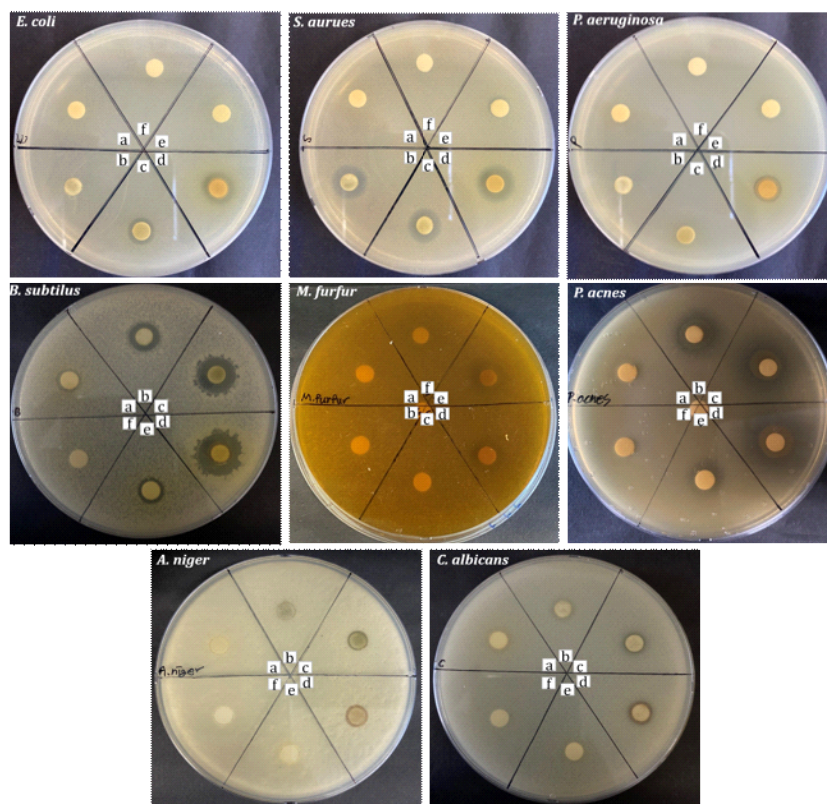


Fig. 4. Anti-microbial activity of ES and EEA, EBUOH, ECHCl₃, EDW and EHex. (a : ES, b : EHex, c : ECHCl₃, d : EEA, e : EBUOH, f : EDW, All samples were treated at a concentration of 200 μ g/mL).

Table 1. Results of anti-microbial activity of *E. sativa* extracts and fractions

Strains	Size of clear zone (paper disc diameter, 6 mm)							DMSO
	ES	EHex	ECHCl ₃	EEA	EBuOH	EDW	M.P 30%	
<i>E. coli</i>	- ¹⁾	-	10.0	11.3	-	-	18.3	-
<i>S. aureus</i>	-	11.0	11.0	13.0	8.0	-	12.0	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	10.0	7.0	7.0	8.3	-
<i>B. subtilis</i>	-	11.0	15.0	16.0	7.0	-	13.3	-
<i>M. furfur</i>	-	-	11.7	12.3	-	-	17.0	-
<i>P. acnes</i>	-	14.7	12.7	16.3	10.0	-	16.3	-
<i>A. niger</i>	-	-	10.3	15.3	-	-	12.3	-
<i>C. albicans</i>	-	8.3	7.3	8.0	-	-	21.0	-

¹⁾ - : No effect

ES, *Eruca sativa* 70% ethanol extract; EHex, n-hexane fraction; ECHCl₃, chloroform fraction; EEA, ethyl acetate fraction; EBUOH, n-butyl alcohol fraction; EDW, water fraction; M.P, methyl paraben; DMSO, dimethyl sulfoxide.

3.7. Franz diffusion cell을 이용한 피부침투 시험

1.5, 3, 6 hr에서 각각 0.022, 0.025, 0.0096%의 폴리페놀이 침투되었으며, 3 hr에서 침투가 대부분 일어나 6 hr에서 침투도가 적게 나타나는 것을 확인하였다. 누적되는 정도를 Fig. 5에 나타냈으며, 3 hr에서 누적된 총 폴리페놀의 침투도는 0.048%이며, 6 hr에서는 0.058%의 총 폴리페놀의 함량이 확인되었다. EEA는 인공멤브레인을 사용했을 때 6 hr에서 0.058% 침투되어 화장품에 적용하여 사용 시 미백효과 등 임상적인 효능이 있을 것으로 예측할 수 있다.

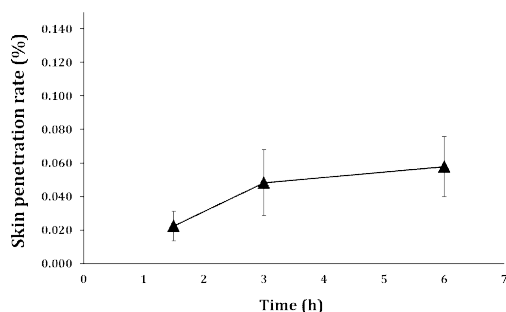


Fig. 5. Skin penetration rate of EEA using Franz cell diffusion. The experiment was conducted under conditions similar to skin temperature (32 °C). The skin penetration rate was calculated by comparing with total polyphenol content onto membrane and receptor media. Values expressed the mean \pm SD calculated by triplicate experiments.

4. 결론

천연물은 약리학적으로 유효성을 가지는 성분을 다수 포함하고 있으며, 여러 가지의 화학물질들이 혼합된 혼합물로서 동식물 등 생물에 포함되는 산물로 정의된다. 2차 대사 성분은 식물 등에 제한적으로 분포하고 있으며, 페놀, 알칼로이드, 테르페노이드 등이 존재한다. 천연물은 이미 약재로서 효능이 검증되어있고, 특히 부작용이 적

기 때문에 선호되는 원료이며, 장점으로서는 다양한 효능을 갖는 유효성분들이 풍부하게 포함되어있어 복합적인 효과를 나타내기 때문에 천연물을 이용한 화장품, 의약품 개발이 활발하게 이루어지고 있다[11,12].

*E. sativa*는 식용식물로 민간요법에서 이뇨제, 연화제, 소화제, 강장제 등의 효과를 나타내고, 유익한 활성 물질(비타민C, 플라보노이드, 카로티노이드 및 글루코시놀레이트 등)을 포함하고 있어 항궤양, 항암 활성, 항균 활성, 항산화, 항염 및 표피 피부장벽 기능 개선과 같은 생물학적 효능이 밝혀져 있다[9,13,14]. 피부 미백 효과 확인을 위해 mushroom tyrosinase를 이용하여 멜라닌 저해력을 평가한 결과 ECHCl₃, EDW, EHex는 2000 μ g/mL에서 tyrosinase 활성을 저해하지 못했으며, ES와 EBuOH은 현저히 낮은 저해력을 나타냈고, EEA는 2000 μ g/mL에서 77.2%의 저해력을 보였다. 이 결과를 바탕으로 세포 내에서의 멜라닌 생성 저해를 평가하기 위해 B16F10 멜라노마 세포에 IBMX 200 μ M을 처리하여 멜라닌 생성을 유도해 ES, EEA 및 EBuOH를 25 μ g/mL로 처리했을 때 EEA에서 약 36.7%의 멜라닌 생성을 저해하였다. 항균력을 평가하기 위해 생육저해환 측정 및 방부력시험을 진행하여 *S. aureus*, *P. acnes* 포함 8종의 미생물에 대한 항균력을 확인한 결과 ES는 8종 균에 대한 항균력이 없었으나 EEA는 모든 8종 미생물을 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 제품 내에서 방부효과 이외에도 피부에서 여드름, 비듬, 피부염 등 피부질환을 유발을 제어할 수 있는 가능성을 나타냈다.

본 연구 결과를 통해 EEA는 tyrosinase 활성 및 B1610 멜라노마 세포에서 멜라닌의 합성 저해력이 효과적으로 나타났으므로 다양한 기전을 통해 미백효과가 있다고 볼 수 있다. 위 결과를 종합해볼 때 EEA와 EBuOH은 B16F10 멜라노마 세포 내에서 멜라닌의 생성을 억제하며, 8종의 균주에 대해 항균력이 뛰어났다. 또한, Franz diffusion cell을 이용한 피부침투시험에서 피부에 유용한 성분인 폴리페놀이 침투되는 것이 확인되었다[15]. 이를 바탕으로 *E. sativa*는 미백 기능성 화장품 소재 및 천연방부제 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 2. Formulation of toner and emulsion containing ES. (a) toner (b) emulsion

(a)

Phase	INCI Name	Control	0.05%	0.1%
Water phase	Trisodium EDTA	0.02	0.02	0.02
	Citric acid	0.02	0.02	0.02
	Sodium citrate	0.04	0.04	0.04
	Glycerin	1.00	1.00	1.00
	Dipropylene glycol	1.00	1.00	1.00
	Water	83.02	78.02	73.02
	1% ES (40% 1,3-BG, w/v)	-	5.00	10.00
Ethanol phase	Caprylyl glycol/Ethylhexyl glycerin/Tropolone	1.50	1.50	1.50
	Octyldodeceth-25	0.10	0.10	0.10
	PEG-40 hydrogenated castor oil	0.30	0.30	0.30
	Alcohol	13.00	13.00	13.00
Total		100.0	100.0	100.0

(b)

Phase	INCI Name	Control	0.05%	0.1%
Water phase	Caprylyl glycol/Ethylhexyl glycerin/Tropolone	1.50	1.50	1.50
	Betaine	1.00	1.00	1.00
	Disodium EDTA	0.60	0.60	0.60
	Dipropylene glycol	4.00	4.00	4.00
	Glycerin	3.00	3.00	3.00
	Carbomer	13.00	13.00	13.00
	Water	64.40	59.40	54.40
	1% ES (40% 1,3-BG, w/v)	-	5.00	10.00
Oil phase	PEG-100 Stearate	0.80	0.80	0.80
	Cetearyl alcohol	0.90	0.90	0.90
	Glyceryl stearate	1.00	1.00	1.00
	Methylglucose distearate	1.50	1.50	1.50
	Dimethicone	0.30	0.30	0.30
	Capric/caprylic triglyceride	2.00	2.00	2.00
	Cetearyl isononanoate	2.00	2.00	2.00
	Hydrogenated polydecene	4.50	4.50	4.50
	After 1 minute of emulsification			
10% Triethanolamine	1.50	1.50	1.50	
Total		100.0	100.0	100.0

Acknowledgement

This work was supported by the National Research Foundation of Korea(NRF) grant funded by the Korea government(MSIT) (No. 2020R1A2C1005993).

References

1. K. N. Yoon, H. S. Jang, G. H. Jin, "Antioxidant, Anti-diabetic, Anti-cholinesterase, and Nitric Oxide Inhibitory Activities of Fruiting Bodies of *Agaricus brasiliensis*", *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*, Vol.47, No.4, pp. 194–202, (2015).
2. H. Y. Park, B. A. Gilchrest, "Signaling pathways mediating melanogenesis", *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, Vol.45, No.7, pp. 919–930, (1999).
3. A. C. De Groot, A. Herxheimer, "Isothiazolinone preservative: cause of a continuing epidemic of cosmetic dermatitis", *The Lancet*, Vol.333, No.8633, pp. 314–316, (1989).
4. J. Boberg, C. Taxvig, S. Christiansen, U. Hass, "Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites", *Reproductive Toxicology*, Vol.30, No.2, pp. 301–312, (2010).
5. J. Y. Lee, J. N. Lee, G. T. Lee, K. K. Lee, "Development of Antimicrobial Plant Extracts and its Application to Cosmetics", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.38, No.2, pp. 171–129, (2012).
6. M. Koubaa, D. Driss, F. Bouaziz, R. E. Ghorbel, S. E. Chaabouni, "Antioxidant and antimicrobial activities of solvent extract obtained from rocket (*Eruca sativa* L.) flowers", *Free Radicals & Antioxidants*, Vol.5, No.1, pp. 29–34, (2015).
7. H. S. Kim, "Anti-melanogenic effect of *Eruca sativa* extract", *Korean Journal of Food Preservation*, Vol.23, No.1, pp. 74–79, (2016).
8. B. Kim, H. S. Kim, "Antimicrobial activities and skin barrier improvement effect of *Eruca sativa* extract", *Korean Journal of Food Preservation*, Vol.24, No.2, pp. 320–324, (2017).
9. B. Kim, Y. E. Choi, H. S. Kim, "*Eruca sativa* and its Flavonoid Components, Quercetin and Isorhamnetin, Improve Skin Barrier Function by Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- α and Suppression of Inflammatory Cytokines", *Phytotherapy Research*, Vol.28, No.9, pp. 1359–1366, (2014).
10. L. Z. Piao, H. R. Park, Y. K. Park, S. K. Lee, J. H. Park, M. K. Park, "Mushroom Tyrosinase Inhibition Activity of Some Chromones", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol.50, No.3, pp. 309–311, (2002).
11. I. Chiocchio, M. Mandrone, P. Tomasi, L. Marincich, F. Poli, "Plant Secondary Metabolites: An Opportunity for Circular Economy", *Molecules*, Vol.26, No.2, pp. 495–525, (2021).
12. D. F. Hernandez, E. L. Cervantes, D. A. Luna-Vital, L. Mojica, "Food-derived bioactive compounds with anti-aging potential for nutricosmetic and cosmeceutical products", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol.10, No.1, pp. 16, (2020).
13. M. Taviano, A. Melchini, A. Filocamo, C. Costa, S. Catania, R. Raciti, S. Saha, P. Needs, G. G. Bisignano, N. Miceli, "Contribution of the Glucosinolate Fraction to the Overall Antioxidant Potential, Cytoprotection against Oxidative Insult and Antimicrobial Activity of *Eruca sativa* Mill. Leaves Extract", *Pharmacognosy Magazine*, Vol.13, No.52, pp. 738–743, (2017).
14. M. Gulfranz, A. Sadiq, H. Tariq, M. Imran, R. Qureshi, A. Zeenat, "Phytochemical

- analysis and antibacterial activity of *Eruca sativa* seed", *Pakistan Journal of Botany*, Vol.43, No.2, pp. 1351-1359, (2011).
15. A. Nowak, K. Cybulska, E. Makuch, Ł. Kucharski, M. Różewicka-Czabańska, P. Prowans, N. Czapla, P. Bargiel, J. Petriczko, A. Klimowicz, "In Vitro Human Skin Penetration, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Ethanol-Water Extract of Fireweed (*Epilobium angustifolium* L.)", Vol.26, No.2. pp. 329-347, (2021)