키틴 및 키토산 미립자의 제조 및 자외선 차단 특성

조석형[1*], 김영준[2]

Preparation and UV-Protective Properties of Chitin and Chitosan Particles

Kim, Young Jun[1*], Cho, suk Hyung[2]

요 약

자외선을 막아주고 피부에 안정한 자외선 차단성을 갖는 고분자 미립자를 키틴 및 키토산 미립자에 *p*-amino benzoic acid(PABA), parsol MCX, parsol 1789를 공유결합시키거나 캡슐화시켜 제조하였다. 자외선 차단성을 갖는 고분자 미립자의 자외선 차단성은 우수하였다. 그리고 피부에 대한 안정성과 독성을 in vivo로 평가한 결과 기존의 화학 자외선 흡수제 보다 안정하였다

1. 서 론

자외선에 오랫동안 노출된 피부 (광노화된 피부)에서의 심한 교원질 감소가 주름살의 주원인이라면, 자외선이 교원질 합성을 감소시키는데 중요한 역할을 하여야 한다. 최근 연구결과에 따르면 자외선을 사람 피부에 조사하면, 복잡한 신호전달 경로를 거쳐 교원질의 합성이 감소되고, 교원질을 비롯한 세포 외 기질단백질의 분해 효소인 matrix etalloproteinases(MMPs)의 발현이 증가된다고 알려졌다.

미국 FDA는 1993년에 OTC의약품 중 자외선차단제에 대한 최종 모노그라프안을 제안하였는데 여기에는 사용이 가능한 자외선 흡수제 및 배합상한선이 게재되어 있다. 그리고 일본에서도 자외선 차단제에 배합이 가능한 자외선 흡수제는 종별허가기준에 기재되어 있는데 배합량이 10%를 초과하는 경우는 각각 안전성 데이터를 첨부하여 신청하도록 되어 있고 실제로 자외선 흡수제를 개발하기 위해서는 안전성 및 기능성뿐만 아니라 화장품 기제내의 용해성이나 안정성 등도 중요한 요소로 작용한다. 현재 자외선 차단제로 등록되어 있는 것은 대부분 자외선 흡수제인데 벤조페논계, 계피산계, 살리실산계, PABA(Para-aminobenzoic acid)계 등과 같은 유기화합물 계통이다. 최근 들어 무기화합물계통의 산화티탄과 산화아연이 자외선 흡수·산란제로 등재되었는데 이들은 입경이나 형상의 변화에 따라 산란시키는 파장의 영역이 달라지고 화장품 기제 내에서 물이나 기름에도 잘 녹지 않기 매문에 안정되게 분산시키는 기술이 중요하다.

따라서 본 연구에서는 피부의 자외선 차단제가 포함된 기능성 나노입자를 개발하고 이를 기능성 화장품에 적용하고자한다. 즉, 벤조페논계, 계피산계, 살리실산계, PABA 등 유기계 자외선 흡수제가 가지고 있는 부작용을 불식시키기 위하여 키토산 및 키틴 나노입자에 자외선 흡수제를 결합시킴으로써 적은 양으로 자외선 흡수능을 향상시킬 뿐만 아니라, 피부작극, 피부박리, 분자의 불안정성 등 부작용이 없는 기능성 나노입자를 개발하고 이를 화장품에 적용하여T다.

2. 실 험

2.1 재료 및 기구

사용된 키토산 및 키틴은 인도네시아의 PT. 노블바이오텍에서 구입하여 사용하였으고 에탄올은 대한주정판매의 주정을 사용하였으며 아세톤은 일반약품을 사용하였다. 또한 UV흡수제인 p-aminobenzoic acid, parsol MCX, parsol 1789 등은 시판품을 그대로사용하였으며 HPLC 등 분석시약은 특급시약을 사용하였다. 기타 염산, 황산, 초산 등의 시약은 1급 시약을 그대로 사용하였다. HPLC와 GPC는 Waters사의 것을 사용하였다. 기타 시약 및 기구는 구입한 그대로 사용하였다.

2.2 키틴 및 키토산 미입자의 제조

키토산(평균분자량(Mw) 120000)을 염산 등의 용액에 용해시킨 후 5L 용액을 제조한 다음 500 rpm으로 교반하면서 2%인 dodecylbenzensulfonate sodium salt(SDS)용액 1 L를 서서히 가하여 미립자 용액을 제조하였다. 이 미립자 용액을 10분간 교반하면서 방치한 다음 pH 7이 될 때까지 5% NaOH 용액을 가하여 키토산 미립자를 고화시킨 후 원심분리를 5회 반복하면서 세척하고 건조하여 키토산 미립자 분말을 제조하였다.

키틴 나노입자는 키틴100g을 60%황산용액 250㎖에 겔화시킨 후 교반하면서 황산용액의 10배되는 물을 가하여 키틴입자를 에멀젼화하고 이를 필터하여 중화하였다. 중화된 키틴 에멀젼을 다시 여과하여 동결건조함으로써 키틴 미립자를 제조하였다.

2.3 키틴 및 키토산 미립자에 UV 흡수제 결합

500ml 3구플라스크에 DMSO 100㎖와 MDI 0.25-1mole을 넣고 질소를 유입시켜 주면서, PABA(p-aminobenzoic acid) 를 0.25-1mole을 천천히 첨가시킨 다음 50-60℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 한편, 1000ml 3구플라스크를 50-60℃의 항온수조 내에 장치하고, 질소를 유입시켜 주면서 DMSO 300㎖에 키틴 또는 키토산 미립자 80g(0.5 unit mole)을 넣고 3시간 동안 충분히 팽윤시켰다. 그리고 앞서 합성한 반응물을 키틴 또는 키토산 이 팽윤된 3구플라스크에 가한 후 50-60℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 얻어진 생성물들을 증류수에 침전시키고, 여과시킨 후 미반응물을 제거하기 위하여 THF로 여러번 세척한 후 50℃로 조절된 진공오븐에서 건조시켜 키틴 또는 키토산 미립자에 자외선 흡수제가 결합된 자외선 흡수 고분자 미립자를 얻었다.

2.4 동물자극성 실험

합성한 자외선 흡수제가 결합된 키틴 및 키토산 미립자의 안전성을 확인하기 위하여 합성한 자외선 흡수제가 결합된 키틴 및 키토산 미립자가 3%함유한 크림을 제조하여 동물자극실험을 실시하였다. 즉, UVC-1를 3% 첨가한 크림 I, UVC-2를 3% 첨가한 크림 II, UVC-3을 3% 첨가한 크림 III 및 PABA를 3% 첨가한 크림 IV를 이용하여 동물자극성 실험을 실시하였다. 350-450g 내외의 수컷 Hartley종의 Guinea pigs를 구입하여 약 일주일간 온도 20±3℃, 상대습도 50±5%, 환기 10-15hr, 조명시간 14hr/day (07:00-19:00), 조도 150-300lux로 설정된 소동물 실험실에서 1주간 순화시키고, 순화기간중 외관상 건강하고 정상적인 피부를 가진 7마리의 수컷 Hartley Guina pigs를 선택하여, 국소 자극성 검정을 위한 자극성 실험을 국립보건안전연구원의 지침서[19]에 준하여 실시하고 결과를 판정하였다.

2.5 세포독성 실험

세포독성 시험은 MTT method에 의하여 실시하였다. 즉, 각 well에 10 ㎕ MTT solution (5mg/ml)을 넣어서 37℃에서 4시간 반응하였다. 반응 후 배양액을 버리고 100㎕ DMSO(100%)을 넣어서 soluble debris가 완전히 녹을 때까지 microplate reader에서 5분간 shaking한 후 540nm에서 O.D.(optical density)값을 측정하였다.

2.6 자외선(UV) 차단성 측정

1) UV 흡수스펙트라

합성한 기능성 미립자의 자외선 흡수도를 확인하기 위하여 물에 분산시키고 UV 분광광도계(일본 분광 V-550)를 사용하여 900-190㎚의 파장영역에서 UV 흡수스펙트라를 측정하였다.

2) SPF 지수측정

합성한 기능성미립자를 다음의 조성비로 제조하여 기능성 미립자의 함유량을 3-5%로 제조한 크림형의 화장품을 제조하고 제조한 화장품 sample을 셀에 도포시키고 Optometrics SPF-290S Analyzer로 SPF 및 PA를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

1. 다기능성 키틴, 키토산 나노입자 제조

키토산(평균분자량(Mw) 120000)을 염산 등의 용액에 용해시킨 후 5L 용액을 제조한 다음 500 rpm으로 교반하면서 2%인 dodecylbenzensulfonate sodium salt(SDS)용액 1 L를 서서히 가하여 미립자 용액을 제조하였다. 이 미립자 용액을 10분간 교반하면서 방치한 다음 pH 7이 될 때까지 5% NaOH 용액을 가하여 키토산 미립자를 고화시킨 후 원심분리를 5회 반복하면서 세척하고 건조하여 키토산 미립자 분말을 제조하였다.

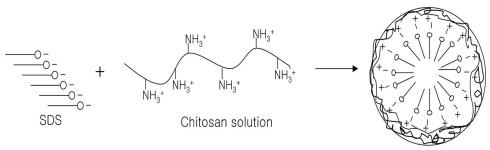
키틴 미립자는 키틴을 황산용액에 팽윤시킨 후 물을 첨가하는 방법으로 제조하였다.

[표 1] 키토산 미립자의 제조 조성

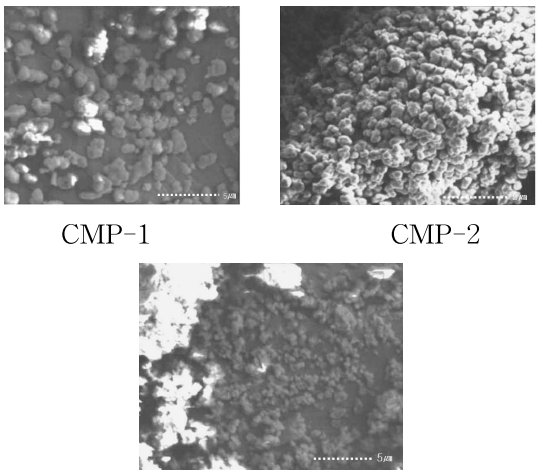
samle	Conc. of chitosan(%)	Conc. of DSD(%)	RPM
CMP-1	5	3	500
CMP-2	3		
CMP-3	1		

제조 방법은 아래 그림 1과 같이 키토산을 용해시킨 용액에 SDS를 용해시킨 용액을 서서히 적가하면서 교반하면 키토산의 농도, SDS의 농도에 따라 0.1-10㎛의 키토산 입자를 만들 수 있다.

그림 2는 앞의 표 1의 조성에 따라 제조한 키토산 미립자의 SEM 사진으로 표 1의 조성에 따라 제조하면 그림 2와 같이 다분산성인 0.5 - 5㎛의 키토산 미립자를 얻을 수 있다.



[그림 1] 키토산 나노입자의 제조 방법



[그림 2] 키토산 나노입자의 SEM 사진

2. 키틴 및 키토산 미립자에 UV 흡수제 결합

500ml 3구플라스크에 DMSO 100㎖와 MDI 0.25-1mole을 넣고 질소를 유입시켜 주면서, PABA(p-aminobenzoic acid) 를 0.25-1mole을 천천히 첨가시킨 다음 50-60℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 한편, 1000ml 3구플라스크를 50-60℃의 항온수조 내에 장치하고, 질소를 유입시켜 주면서 DMSO 300㎖에 키틴 또는 키토산 미립자 80g(0.5 unit mole)을 넣고 3시간 동안 충분히 팽윤시켰다. 그리고 앞서 합성한 반응물을 키틴 또는 키토산 이 팽윤된 3구플라스크에 가한 후 50-60℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 얻어진 생성물들을 증류수에 침전시키고, 여과시킨 후 미반응물을 제거하기 위하여 THF로 여러번 세척한 후 50℃로 조절된 진공오븐에서 건조시켜 키틴 또는 키토산 미립자에 자외선 흡수제가 결합된 자외선 흡수 고분자 미립자를 얻었다.

[표 2] 키틴 및 키토산 미립자에 UV 흡수제 결합의 조성

Sample No.	chitosan particle (g/Unit mole)	chitin particle (g/Unit mole)	PABA (mole)	HMDI (mole)	λ Max (nm)
UVC-1	80/0.5		0.25	0.25	281
UVC-2			0.50	0.50	282
UVC-3			1.00	1.00	284
UVCH-1		102/0.5	0.25	0.25	281
UVCH-2			0.50	0.50	282
UVCH-3			1.00	1.00	284

[표 3] UV흡수제 내포 키틴 키토산 미립자 제조

Sample No.	chitosan particle(g)	chitin particle(g)	Parsol MCX(g)	Parsol 1789(g)
UVC-4	100		500	250
UVC-5			200	100
UVCH-4		100	500	250
UVCH-5			200	100

그림 3에서 보는 바와 같이, UVC-1, 2, 3은 2270cm^{-1}에서 이소시아네이트의 강한 흡수가 사라지고, 1500-16800cm^{-1}에 걸쳐 -NHCONH-의 특징적인 파장이 나타나며, 페닐기 흡수파장이 750cm^{-1}과 850cm^{-1}에서 나타났고 PABA의 특성 흡수 파장인 1700cm^{-1}부근에서 carboxyl기에 의한 shoulder가 나타난 것으로 보아 UV 흡수제인 PABA가 결합되었음을 알 수 있다.

또한 그림 4에서도 2270cm^{-1}에서 이소시아네이트의 강한 흡수가 사라지고, 1670cm^{-1}과 1550cm^{-1}에서 -NHCO-에 의한 특징적인 흡수가 일어나고, PABA의 특성 흡수 파장인 1700cm^{-1}부근에서 carboxyl기에 의한 shoulder가 나타난 것으로 보아 UV 흡수제인 PABA가 결합되었음을 알 수 있다.

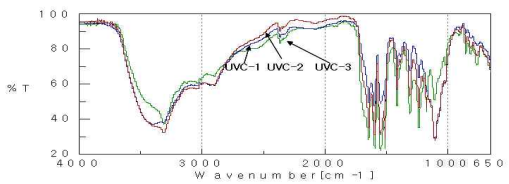


그림 3. UV 흡수제 결합 키토산 미립자의 IR spectra

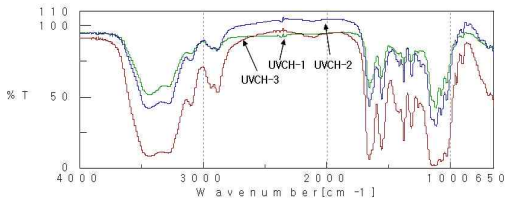


그림 4. UV 흡수제 결합 키틴 미립자의 IR spectra

3. 동물자극성 실험.

합성한 자외선 흡수제가 결합된 키틴 및 키토산 미립자의 안전성을 확인하기 위하여 합성한 자외선 흡수제가 결합된 키틴 및 키토산 미립자가 3%함유한 크림을 제조하여 동물자극실험을 실시하였다. 즉, UVC-1를 3% 첨가한 크림 I, UVC-2를 3% 첨가한 크림 II, UVC-3을 3% 첨가한 크림 III 및 PABA를 3% 첨가한 크림 IV를 이용하여 동물자극성 실험을 실시하였다. 350-450g 내외의 수컷 Hartley종의 Guinea pigs를 구입하여 약 일주일간 온도 20±3℃, 상대습도 50±5%, 환기 10-15hr, 조명시간 14hr/day (07:00-19:00), 조도 150-300lux로 설정된 소동물 실험실에서 1주간 순화시키고, 순화기간중 외관상 건강하고 정상적인 피부를 가진 7마리의 수컷 Hartley Guina pigs를 선택하여, 국소 자극성 검정을 위한 자극성 실험을 국립보건안전연구원의 지침서[19]에 준하여 실시하고 결과를 판정하였다. 그 결과는 표 4에 나타내었다.

[표 4] 피부자극 시험

Site		Cream I		Cream II		Cream III		Cream IV	
Change		Erythema & Eschar	Edema	Erythema & Eschar	Edema	Erythema & Eschar	Edema	Erythema & Eschar	Edema
Phases (hrs.)		Intact 24 72	Intact 24 72	Intact 24 72	Intact 24 72	Intact 24 72	Intact 24 72	Intact 24 72	Intact 24 72
Animal	sex								
1	♂	1 1	0 0	1 0	0 0	0 0	0 0	1 1	0 0
2	♂	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	2 1	1 0
3	♂	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0	0 0
4	♂	1 0	0 0	0 1	0 0	1 1	0 0	2 1	0 1
5	♂	0 0	0 0	0 0	0 0	1 1	0 0	1 1	0 0
6	♂	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 1	0 0
7	♂	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	2 1	0 0
Mean Score		0.29 0.14	0 0	0.14 0.14	0 0	0.29 0.29	0 0	1.43 0.86	0.14 0.14
Σ Mean Score		0.43	0	0.28	0	0.58	0	2.29	0.28
Total		0.43		0.28		0.58		2.57	
P.I.I		0.22		0.14		0.29		1.29	

a) : Time after topical application
b) : P.I.I (Primary irritation index) = Total/2

표 4에서 보는 바와 같이 cream I, cream II 및 cream III은 자극도가 0.14-0.29로 cream IV의 1.29에 비하여 매우 낮았다. 즉 이로 미루어 보아 자외선 흡수제가 결합된 키틴 및 키토산 미립자들의 피부안전성이 PABA에 비하여 매우 우수함을 알 수 있었다.

4. 세포독성 실험

세포독성 시험은 MTT method에 의하여 실시하였다. 즉, 각 well에 10 ㎕ MTT solution(5mg/ml)을 넣어서 37℃에서 4시간 반응하였다. 반응 후 배양액을 버리고 100㎕ DMSO(100%)을 넣어서 soluble debris가 완전히 녹을 때까지 microplate reader에서 5분간 shaking한 후 540nm에서 O.D.(optical density)값을 측정하였다.

실험 결과 세포독성은 없는 것으로 판명되었다.

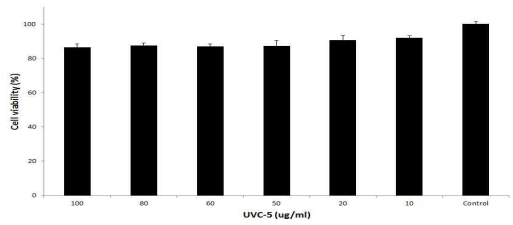
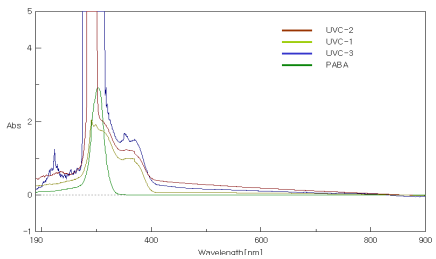


그림 5. UVC 및 UVCH의 세포독성 측정. Control; H_2O_2 and UVCH-9 무처리군.

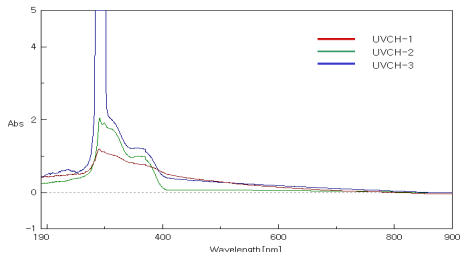
5. 자외선(UV) 차단성 측정

1) UV 흡수스펙트라

그림 6에서 보는 바와 같이 키토산 PABA를 0.5배mole - 2배mole까지 합성한 기능섬 미립자를 0.1%로 분산시켜 측정하였을 때 매우 우수한 UV흡수 특성을 나타내었으며 UV흡수도를 비교해보면 키토산과 동 mole이상이 경합되었을 때는 PABA보다도 더 높은 흡광도를 나타내었다. 또한 UVB영역 뿐 아니라 UVA영역에서도 좋은 흡광도를 나타내었다.



[그림 6] UV 흡수제 결합 키토산 미립자의 UV/Vis spectra



[그림 7] UV 흡수제 결합 키틴 미립자의 UV/Vis spectra

2) SPF 지수측정

합성한 기능성미립자를 다음의 조성비로 제조하여 기능성 미립자의 함유량을 3-5%로 제조한 크림형의 화장품을 제조하고 제조한 화장품 sample을 셀에 도포시키고 Optometrics SPF-290S Analyzer로 SPF 및 PA를 측정하였다.

[표 5] UV 차단 화장품의 조성과 SPF지수 및 PA지수

samle	Nano particle	계면활성제 (%)	글리세린 디올레이트 (%)	콜라겐 (%)	TW-20 (%)	SPF	PA
Cream Ⅰ	UVC-1 (5%)	2	2	1	3	38.8	19.22 (+++)
Cream Ⅱ	UVC-2 (5%)					42.84	21.86 (+++)
Cream Ⅲ	UVC-3 (5%)					43.57	23.06 (+++)
Cream Ⅳ	UVCH-1 (5%)					15.86	7.17 (++)
Cream Ⅴ	UVCH-2 (5%)					25.36	12.38 (+++)
Cream Ⅵ	UVCH-3 (5%)					33.1	13.68 (+++)

기능성 미립자의 함유량을 5%로 제조한 크림형의 화장품을 제조하였을 때 Cream Ⅰ-Ⅵ은 UVCH-1을 젲외하고 SPF지수가 25-45의 범위를 나타내므로 매우 우수한 자외선 차단성을 나타내었으며 또한 PA지수도 PA+++로 매우 우수한 자외선 차단성을 나타내었다.