

저분자량 히알루론산의 제조 및 화장품에의 응용

김 경 태 · 김 영 희 · 김 진 국 · 한 창 성 · 박 선 희 · 이 방 용 · 김 기 호[†]

(주)바이올랜드 생명공학연구소
(2007년 7월 23일 접수, 2007년 8월 22일 채택)

Preparation of Oligo Hyaluronic Acid by Hydrolysis and Its Application as a Cosmetic Ingredient

Kyoung Tae Kim, Young Heui Kim, Jin Guk Kim, Chang Sung Han, Sun Hee Park, Bang Yong Lee, and Ki Ho Kim[†]

R&D center, Bioland Ltd., 39-4, Songjung-ri, Byongchon-myon, Chonan-si, Chungnam 330-860, Korea

(Received July 23, 2007; Accepted August 22, 2007)

요약: 이온교환수지를 이용하여 말단기에 이중결합 생성이나 고리열림반응 없이 저분자 히알루론산(oligo HA)을 제조하였다. 제조된 oligo HA의 화장품소재로서의 활용 가능성 및 그 효능을 평가하기 위하여 fibroblast, keratinocyte 및 SIRC cell을 이용하여 독성을 평가하였고, Caco-2 cell과 인공피부를 이용하여 피부 투과도를 평가하였다. Oligo HA는 fibroblast와 keratinocyte cell에서 각각 300 µg/mL 및 1,000 µg/mL까지의 농도에서 독성이 없었으며 *in vitro* ocular test에서도 2,000 µg/mL의 높은 농도에 서까지 자극에 의한 세포독성이 관찰되지 않았다. Caco-2 cell을 이용한 세포 투과실험에서는 HA는 거의 투과되지 않는 것에 비해 oligo HA는 16.0 %까지 투과되었고, 인공피부를 이용한 세포투과 실험에서도 약 90 %의 상당히 높은 투과도를 보였다. 사람 피부에서 보습효과를 확인하기 위하여 oligo HA를 함유한 제형을 피부에 도포한 후 피부 수분량과 경피수분 손실량을 측정한 결과 HA와 비슷하게 우수한 보습 효과를 확인할 수 있었다. 인체 피부 누적 침포 실험 결과, 특별한 피부 자극이 확인되지 않았다. Oligo HA는 HA의 우수한 보습력을 유지하면서 높은 피부 투과도를 갖는 보습소재로써 화장품에 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였다.

Abstract: In order to investigate the potential of very low molecular weight hyaluronic acid (oligo HA) as a cosmetic ingredient, we first measured its cytotoxicity in fibroblast, keratinocyte, and SIRC cell lines. For efficacy test, its moisturizing effect and penetration rate were evaluated in an artificial skin system and Caco-2 cells. Oligo HA did not show any cytotoxicity at a concentration of 300 µg/mL in fibroblasts and 1,000 µg/mL in keratinocytes but it showed weak proliferation. *In vitro* ocular test, oligo HA showed negligible cytotoxicity at the maximum concentrations used (2,000 µg/mL) in SIRC cells. In the test of the single and repeated cutaneous applications, oligo HA under occlusive patch did not provoke any cumulative irritation and sensitization. Oligo HA at a concentration of 0.01 % exhibited a more potent moisturizing effect than hyaluronic acid at a concentration of 0.01 %. In the permeability test using artificial skin and Caco-2 cell lines, hyaluronic acid (M.W. 1.1×10^6) was hardly observed in the down medium of the inserts. On the other hand, oligo HA (M.W. 5,000) was detected in the down medium up to 16.0 % at 6 h in Caco-2 cell culture and up to 90 % at 6 h in an artificial skin system. These results suggest that oligo HA could be useful as an active ingredient for cosmetics.

Keywords: hyaluronic acid, oligo HA, ion-exchange resin, moisturizing effect, penetration

[†] 주 저자 (e-mail: biolandrnd@biolandrnltd.com)

1. 서 론

히알루론산(hyaluronic acid, HA)은 고점도성, 보습성, 생체 적합성 등의 특징을 지닌 수용성 다당류의 생체 고분자 물질로서 콜라겐 및 엘라스틴과 함께 피부 3대 요소 중의 하나이다. 체내에 존재하는 HA는 고분자량의 다당류로 관절액의 주성분이고 조직의 세포의 기질에 널리 분포하며[1], 세포의 분화와 증식에 중요한 역할을 한다. 세포의 활발한 이동과 증식이 보이는 재생 및 재형성(remodeling) 과정의 조직에 풍부하게 존재하는 것은 HA가 초기 조직 치유반응에 관여하는 것을 시사한다[1]. HA의 치료기전에 대해서는 여러 가지 설명이 있고[2,3] 몇몇 저자들은 실험실 조건에서 HA가 간엽세포(mesenchymal cell)의 분화를 촉진함으로써 골 모세포 증식을 증가시키는 것으로 보고하기도 했다[4,5]. HA는 세포 간 간격 유지, 세포의 분열과 분화, 이동, 면역 조절 등에 관여하는 것으로 보고된 바 있다[6-8]. 인체 피부에서의 HA의 양은 노화와 함께 감소되는 것으로 보고되었는데, 피부 탄력 저하 및 수분 함유량 감소의 직접적인 원인 중 하나로 여겨지고 있다[9-11].

HA는 β -D-glucuronic acid와 β -D-N-acetylglucosamine이 상호베타 결합으로 이뤄진 직쇄상의 긴 고분자 물질로서, 그 분자량은 기원, 제조 및 정제방법에 따라 $0.1 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ Dalton으로 매우 다양하다. 수용액 상에서 점성, 탄성 및 보습성을 가지며, 이러한 성질은 HA의 분자량과 농도에 좌우된다. HA의 저분자화 방법으로는 다양한 연구가 진행되어져 왔으며 산 또는 염기 촉매에 의한 방법과 고온가열 및 초음파를 이용하는 방법[12,13], 히알루로니다아제 효소를 사용한 방법[14] 등이 보고된 바 있다. 그러나 상기의 무기산 또는 유기산을 사용한 산성조건에서의 가수분해는 단당이 많이 생성되어 분자량 분포가 넓고, 변환효율이 낮으며, 중화과정에서 수반되는 염의 생성으로 인하여, 투석 또는 한외여과 등의 탈염 공정이 추가적으로 필요한 단점이 있다. 더욱이 이러한 강한 무기산에 의한 가수분해의 경우 당의 고리열림 반응이 진행되어 부생성물이 생성되기 때문에[15] 온전한 oligo HA가 생성된다고 볼 수 없다. 한편, 효소를 이용한 분해의 경우에는 사용되는 효소의 활성 및 반응시간을 선택함으로써 분자량분포가 좁은 oligo HA를 얻을 수 있다. 그러나 효소의 가격이 비싸서 제조단가가 높으며, 생성물로부터 분해효소를 제거하는 조각이 어렵고 투석 등을 통한 분리공정이 추가되므로 제조원가가 더욱 높아져 대량생산에 제약이 따른다. 게다가 효소 분해법에 의해 수득한 oligo HA는 말단기에 이중결합의 형태를 하고 있음이 보고되어 있어[16] 이 또한 엄밀한 의미에서 HA와는 구조적 차이가 있다.

본 연구에서는 HA를 양이온 교환수지로 가수분해 함으로써 HA와 동일한 구조를 갖는 저분자화된 oligo HA를 제조하였다. Human fibroblasts와 keratinocytes에서 독성을 평가하고, SIRC cell을 이용하여 ocular test를 실시함으로써 자극에 대해 평가하였다. HA에 비해 oligo HA는 세포 내에서 투과도가 매우 높고, 우수한 피부 보습력을 가지고 있어 화장품 조성물로서의 이용 가능성이 높음을 확인하였다.

2. 실험 방법

2.1. 시 약

HA (중량평균분자량 $M_n 1.1 \times 10^6$ Dalton)는 Bioland (Chungnam, Korea)의 제품을 사용하였고, NMR 용매는 Sigma-Aldrich (MO, USA)의 DMSO- d_6 , CDCl₃, D₂O 등을 사용하였으며 내부기준물질로는 tetra methyl silane (TMS, Sigma-Aldrich, MO, USA)를 사용하였다. 그 활성실험에 사용된 시약들은 Sigma-Aldrich (MO, USA)의 것을 구입하였으며 배지는 GIBCO (MD, USA)의 것을 사용하였다.

2.2. 측정기기

NMR 측정은 Varian Mercury plus 400 spectrometer (CA, USA)를 사용하였고 chemical shift는 TMS를 기준 물질로 하여 δ 값(ppm)으로 나타내었다. UV 흡광도는 Hewlett Packard HP-8453 (CA, USA)을 사용하여 측정하였다.

2.3. Oligo HA의 제조

HA 10 g을 1,000 g의 정제수에 용해시킨 후, 강산성양이온교환수지(Amberlite IR120, Aldrich, MO, USA) 80 g을 가하고 90 ~ 95 °C에서 48 h 동안 교반하였다. 반응 종결 후 강산성양이온교환수지를 여과하여 제거하고 1 N NaHCO₃를 사용하여 중화시켰다. 반응액을 농결 건조하여 oligo HA를 얻었다.

2.4. Gel Permeation Chromatography (GPC)에 의한 분자량 측정

Oligo HA의 평균분자량은 GPC를 이용하여 분석하였다. 사용한 컬럼은 TOSOH G3000PWXL (Ultrahydrogel™, Japan)이다. 표준물질로는 99 % 이상의 순도를 가진 polyethylene glycol (M.W. 975, 2200, 5250, 10225, 20800, American Polymer Standards Corp., USA)을 사용하였고, 전개용매는 0.1 M NaNO₃와 200 mM NaCl 수용액을 사용하였으며 유속은 0.8 mL/min으로 하였다.

2.5. Fibroblasts와 Keratinocytes에서의 세포 독성 평가

Human fibroblasts (CRL-2076, ATCC)와 keratinocytes (CRL-2310, ATCC)를 각각 1×10^5 cells/well의 밀도로 24-well plate에 seeding한 후 10 % fetal bovine serum, (FBS, GIBCO)가 첨가된 Isocove's modified Dulbecco's medium (IMDM, GIBCO, MD, USA) 배지를 첨가하여 가습화된 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 하루 동안 배양하였다. Serum-free IMDM으로 배지를 교체하고 시료를 처리하여 24 h 동안 배양하였다. MTT solution (2.5 mg/mL) 100 µL를 첨가하여 37 °C에서 4 h 동안 배양한 후 MTT solution이 처리된 세포 배양액을 제거하고 DMSO 1 mL을 세포에 처리하여 MTT formazan을 녹여 낸 후 570 nm (reference OD 650 nm)에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 아래 수식에 의해 계산하였다.

$$Cell\ viability\ (\%) = \frac{OD\ 570\ (sample)}{OD\ 570\ (control)} \times 100$$

OD 570 (sample) : the absorbance at 570 nm of the treated cells

OD 570 (control) : the absorbance at 570 nm of the negative control (non-treated cells)

2.6. SIRC Cells에서의 세포 독성 평가(Ocular Test)

Rabbit cornea cell line인 SIRC (ATCC, CCL-60)를 1×10^5 cells/mL의 밀도로 24-well plate에 seeding하고 배지는 Eagle's BSS와 2 mM L-glutamine, 1.0 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 1.5 g/L sodium bicarbonate, FBS 10 %가 첨가된 Eagle's minimum essential medium (EMEM, GIBCO, MD, USA)을 사용하였다. 24 h 동안 배양한 후 FBS를 함유하지 않은 EMEM으로 교체하고, 시험 시료를 농도별로 첨가한 후 3 days 동안 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 상등액을 제거하고 phosphate buffered saline (PBS) 200 µL로 세척한 후 MTT (0.33 mg/mL, Sigma)용액을 well당 1.0 mL씩 가하였다. 4 h 후에 MTT를 제거하고 DMSO를 well당 1.0 mL씩 가하고 실온에서 30 min 동안 방치 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7. Caco-2 Cells을 이용한 피부투과 평가

Caco-2 세포를 1×10^5 cells/well의 밀도로 Transwell™ insert (12 mm diameter, 0.4 mm pore size, 24-well)에 seeding한다. 매일 새로운 배지로 교환해주고 trans epithelial electric resistance (TEER, Millicell-ERS.

Millipore)을 측정하여 실험 가능한 300 Ωcm² (blank 수치를 빼줌)의 well만 선택한다. 배지를 HBSS-HEPES (pH 7.4)로 교체한 후 hyaluronic acid (HA, Bioland, M.W 1.1 × 10⁶)와 oligo-HA (M.W 5,000)를 각각 2.5 mg/mL의 농도로 insert에 첨가한다. 2, 4, 6 h 동안 배양 후 inner well과 outer well의 HBSS-HEPES (pH 7.4) solution을 수거하여 gel permeation chromatography (GPC)로 정량하였다[17-19].

2.8. 인공피부를 이용한 투과도 평가

Type I collagen, 5 × IMDM, raft buffer (2.2 % Na₂HCO₃, 200 mM HEPES, 0.05 N NaOH)와 human fibroblasts (1×10^4 cells/mL)를 혼합한 후 insert에 넣어서 진피(dermal equivalents)를 제조하고, 10 % FBS, 50 µg/mL ascorbic acid가 첨가된 IMDM 배지 1 mL을 insert에 넣어서 7 days 동안 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 배양하면서 2 days 마다 배지를 교환하였다. 7 days 후 2×10^5 normal keratinocytes를 insert에 넣어서 인공피부를 제조하였다. 제조된 인공피부에 HA (M.W 1.1 × 10⁶)와 oligo-HA (M.W 5,000)를 각각 2.5 µg/mL의 농도로 insert에 첨가한다. 2, 4, 6 h 동안 배양 후 inner well과 outer well의 배지를 수거하여 hyaluronic acid ELISA kit (K-1200, Echelon, USA)으로 정량하였다.

2.9. 인체피부누적접촉포(Human Cumulated Patch test)에 의한 안전성 측정

본 인체피부누적접촉포시험을 실시 전에 연구수행자는 피험자에게 인체적용시험의 목적 및 방법, 예상되는 효과 및 부작용, 피해 발생 시 보상 및 치료대책, 신분의 비밀 보장에 대한 내용, 기타 피험자의 인권보호에 관한 필요한 사항 등을 충분히 설명하고, 자유의지에 의한 인체적용시험 참여 동의서를 문서로 얻었다. 피험자 50명(평균 연령 35세, 연령분포 21 ~ 51세)을 대상으로 12 mm Finn Chamber 및 테이프를 이용하여 등 및 팔에 인체피부누적접촉포시험(repeated insult patch test)을 실시하였다. 단, 건선(psoriasis), 습진(eczema), 기타 피부병변 보유자나 임신, 수유부 또는 피임제, 항히스타민제 등을 복용하고 있는 사람은 본 실험에서 제외하였다. 시험부위를 정밀검사용 multi-use magnifier lamp (Seki optical, Korea)로 정밀관찰하고 평가하였다[20,21]. 피부반응은 Table 1에 있는 국제접촉피부염연구회(International Contact Dermatitis Research Group: ICDRG)의 판정기준에 따라 자극 정도를 분류하였다. 평균자극도 계산공식에 따라 Mean Irritation Index (M.I.I.)를 산정한 후 인체 피부누적 접촉포시험 결과 판정표에 따라 자극유무를 판정하였다(Table 2).

Table 1. Clinical Evaluation Criteria of International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG)

Response	Score	Interpretation creatia
-	0	Negative ^{a)}
±	1	Incomplete or irregular erythema ^{b)}
+	2	Regular well defined erythema + induration ^{c)}
++	3	Significant erythema + induration + vesicle ^{d)}
+++	4	Erythema purplish + induration + bullae ^{e)}

a) non-irritant, b) slightly irritant, c) mean irritant, d) very irritant, e) very severely irritant

M.I.I. (Mean Irritation Index) =

$$\frac{\sum \text{quotations of the 8 readings (all volunteers)}}{\text{Number of volunteers} \times 8 (\text{readings})}$$

2.10. 피부 보습 지속효과 측정

피부 보습지속효과는 12명의 피험자를 대상으로 진행되었다. 시험부위(전완부)는 실험 대상자의 손목으로부터 5 cm 거리의 전박 굴측부 부위로 하였으며, 우측 전완부 또는 좌측 전완부에 3개씩 random하게 선정하여 지름 2 cm의 정사각형을 1.5 cm 간격으로 총 3개를 그렸다. 항온항습에서 30 min 동안 대기시킨 후, 시험부위를 Corneometer (CM825 Courage & Khazaka, Germany)로 5회 측정하고, 최대 최소를 제외한 3개 측정치의 평균을 구하였다. 시험부위에 각각의 시료를 2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 의 양으로 도포하고, 시료 도포 뒤 9 min 30 s 경과 시점에 정제수를 도포하였다. 정제수 도포 30 s 후 수분을 제거하고 다시 1 min 간격으로 Corneometer로 시험부위를 5회 측정하

Table 2. Mean Irritation Index (M.I.I.) of Allergic Reaction

Mean irritation index	Grade
0.00 ~ 0.24	Non-irritant (1)
0.25 ~ 0.99	Slightly irritant (2)
1.00 ~ 1.99	Mean irritant (3)
2.00 ~ 2.99	Very irritant (4)
3.00 ~ 4.00	Very severely irritant (5)

고, 최대 최소를 제외한 3개의 측정치의 평균을 구하였다.

시료도포 전(baseline)과 시료도포 후 1 min 간격으로 Corneometer로 측정하고 각 측정시간에서의 측정결과와 시료도포 전의 측정결과와의 차를 구하였다. 시간 경과에 따라 시료도포 전과 비교하여 보습 개선율(%)을 산출하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Oligo HA의 제조 및 GPC를 이용한 분자량 분석

강산성양이온교환수지를 이용한 oligo HA의 제조 과정에서 용매조성, 반응시간, 양이온교환수지의 양의 변화에 따른 oligo HA의 분자량 분포를 조사하였다(실험법에 이미 기술했으므로 생략). 반응 용매로 알코올과 물의 혼합 용매를 이용했을 때보다 물을 단독으로 사용하였을 때 더욱 낮은 분자량의 HA가 생성되는 경향을 보였다. 중량 평균분자량이 1,500에서 30,000까지의 다양한 분자량을 갖는 oligo HA를 제조 할 수 있었으며, 양이온 교환 수지와 반응시간을 변화시킴으로써 분자량 5,000 이하의 oligo HA 생성이 증가되도록 조절할 수 있었다(Table 3).

Table 3. Molecular Weight of Oligo HA Obtained in the Different Reaction Conditions

Ion exchange (g)	Reaction time (h)	Solvent	Mw ^{a)}	Mn ^{b)}	PDI ^{c)}
80	48	H ₂ O	5,710	3,270	1.746
160	48	H ₂ O	5,123	3,582	1.430
80	72	H ₂ O	4,234	2,948	1.436
160	72	H ₂ O	3,823	2,623	1.457
160	96	H ₂ O	2,062	1,246	1.654
160	120	H ₂ O	1,409	924	1.525
160	72	5 % EtOH	18,599	9,865	1.885
160	72	5 % MeOH	20,032	12,252	1.635
160	72	20 % EtOH	29,133	17,476	1.667
160	72	40 % EtOH	30,409	19,720	1.542

a) Mw : weight average molecular weight

Mw was measured by GPC

b) Mn : number average molecular weight

c) PDI : poly dispersity index

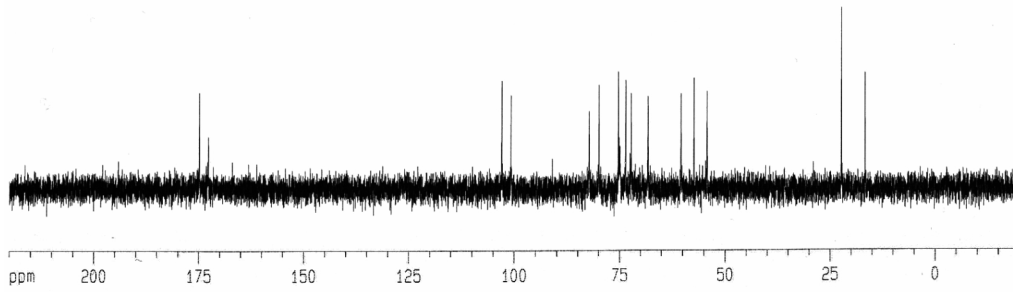


Figure 1. ¹³C-NMR spectrum of oligo HA in D₂O.

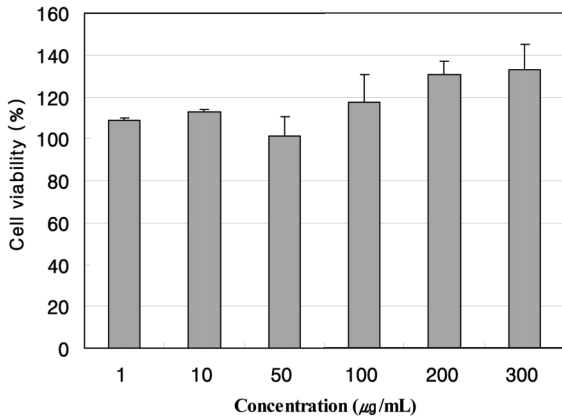


Figure 2. Effect of oligo HA on the viability and cytotoxicity of human fibroblasts. Human fibroblasts were treated with the indicated concentration of oligo HA for 24 h. The results were expressed as mean values of triplicate samples with S.D.

Oligo HA의 구조를 확인하기 위해 NMR 분석을 수행한 결과, 효소분해에 의한 저분자화에서 관찰되는 HA 구성당의 고리열림 현상이나, 당고리 C-5와 C-6사이의 이중결합이 생성되는 부반응이 일어나지 않았음을 확인할 수 있었다(Figure 1). 본 연구에서 제조된 oligo HA는 HA와 동일한 구조를 유지하면서 분자량만 초저분자화된 것으로 확인되었다.

3.2. Fibroblasts와 Keratinocytes에서의 세포 독성 평가

Oligo HA의 세포독성 측정과 더불어 실험에 사용할 농도 범위를 결정하기 위해서 MTT assay를 시행하였다. Fibroblasts와 keratinocytes에 대한 oligo HA의 세포독성을 측정할 결과, fibroblasts에서는 300 µg/mL까지 독성이 없는 것으로 확인되었고, keratinocytes에서는 1,000 µg/mL까지 독성이 없는 것으로 확인되었다(Figure 2, 3).

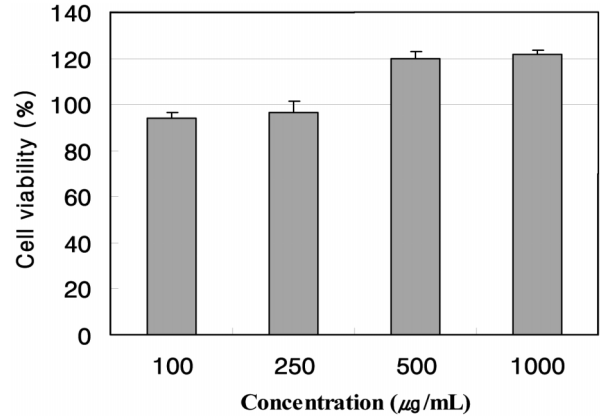


Figure 3. Effect of oligo HA on the viability and cytotoxicity of human keratinocytes. Human keratinocytes were treated with the indicated concentration of oligo HA. The results were expressed as mean values of triplicate samples with S.D.

3.3. SIRC Cells을 이용한 세포독성 평가(Ocular Test)

화장품 소재로서의 안전성을 평가하기 위해 rabbit cornea cell line인 SIRC cell에서 oligo HA의 독성을 평가하였다. 농도 증가에 따른 세포 독성을 평가한 결과 5 ~ 2,000 µg/mL의 농도 범위 내에서 세포 생존율이 90% 이상임을 확인하였다. 이로써 oligo HA 시료 내에 세포 독성이 강한 물질이 존재하지 않음을 확인할 수 있었다. 이후 실험에서는 독성이 없는 범위 내에서 효능 평가를 실시하였다(Figure 4).

3.4. Caco-2 Cells을 이용한 피부투과도 평가

Oligo HA의 피부 투과도를 알아보기가 Caco-2 cells을 이용하여 *in vitro* skin penetration test를 수행하였다. Oligo HA (M.W. 5,000)와 HA (M.W. 1,100,000)를 각각 2.5 mg/mL 처리한 후 2, 4, 6 h 경과 시점에 Caco-2 cells을 통과하지 못한 상부배지의 HA 양과 cells을 통과한 하부 배지의 HA 양을 GPC를 통해서 정량하였다. 6 h 후 HA는 하부배지에서 거의 검출 되지 않은 반면, oligo

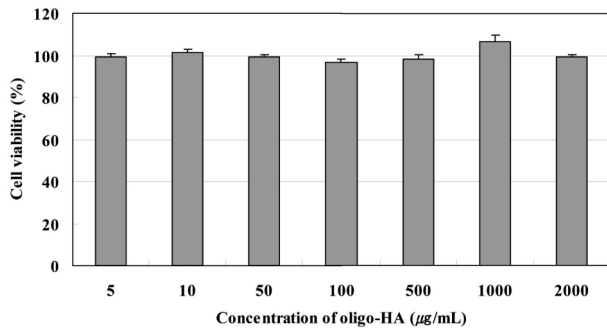


Figure 4. Effect of oligo HA on the viability and cytotoxicity of SIRC cells (*in vitro* ocular test). The cell viability was measured using the MTT method. The results were expressed as mean values of triplicate samples with S.D.

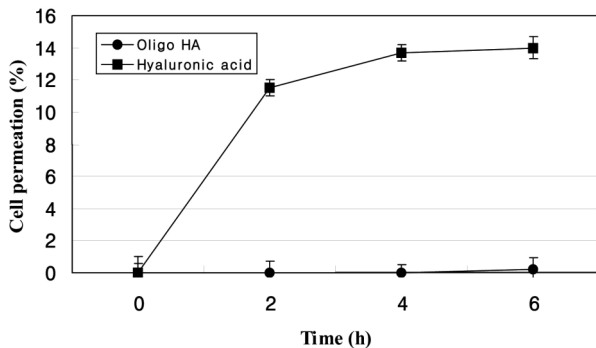


Figure 5. Comparison of cell penetration ability of oligo HIA and HA in Caco-2 cell lines. The contents of HA and oligo HA in up and down media were measured by GPC analysis. The results were expressed as the percentage of the control and values represented the mean ± S.D.

HA는 처리 시료량의 16.0 %까지 투과되어 하부배지에서 검출되었다(Figure 5). Oligo HA는 HA에 비해 높은 피부 투과력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

3.5. 인공피부를 이용한 세포투과도 평가

Oligo HA의 피부 투과도를 측정하기 위하여 인공피부 (artificial skin)을 이용하여 *in vitro* skin permeability test를 수행하였다. 인공피부를 제조하여 oligo HA 및 HA를 처리한 후 2, 4, 6 h 경과 시점에 상부와 하부 배지에 있는 HA의 양을 hyaluronic acid ELISA kit로 정량하였다. Caco-2 cell을 이용한 투과 시험에 비해 높은 투과도를 보였다. 4 h 후 HA는 1.2 % 투과한 반면, oligo HA는 56.73 %의 투과율을 보였다. 6 h 후 oligo HA의 투과는 크게 증가하여, HA에 비해 상당히 높은 90.52 %의 투과율을 나타내었다(Figure 6).

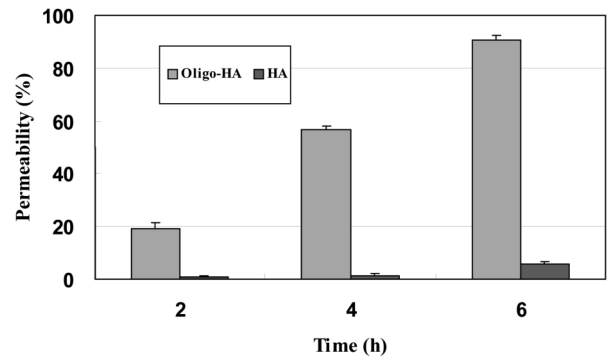


Figure 6. Comparison of percutaneous penetration of oligo HA and HA through a constructed artificial skin. The contents of HA and oligo HA in up and down media were measured by hyaluronic acid ELISA kit. The results were expressed as the percentage of the control and values represented the mean ± S.D.

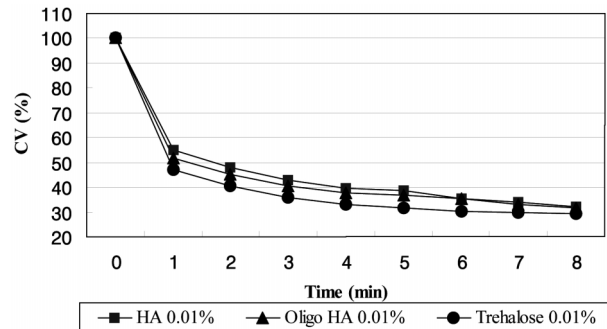


Figure 7. The comparison of the water content (%) after the application of HA, oligo HA, or trehalose on the human skin. Water content was measured using Corneometer (CM825 Courage & Khazaka, Germany).

3.6. 인체 피부누적침포 시험에 의한 안전성 평가

인체피부누적침포 시험에 참가한 피험자는 남성 27명과 여성 23명으로 평균 연령은 35세였다. 총 피험자 50명을 대상으로 감작유발 침포를 48 h 동안 진행하고 제거한 뒤 30 min, 24 h, 48 h 경과 시점에 이상반응을 관찰한 결과, oligo HA 0.2 % solution의 경우 1명의 피험자에서 경미한 자극이 관찰되었다(data not shown). 그러나 이후 24 h 및 48 h에서는 더 이상의 반응이 진행 또는 확대되지 않고 소멸하였으므로 알레르기성 접촉피부염 (allergic contact dermatitis)를 유발할 가능성이 없다고 판단되었다.

3.7. 피부 보습 지속효과의 평가

보습실험에 참가한 피험자는 총 12명의 여성으로 평균 연령은 39세였다. 시료도포 전(baseline)과 시료도포 후 0

min에서 8 min 경과시점까지 1 min 간격으로 수분량을 측정하였다. Corneometer 측정치를 이용하여 측정시간에서의 측정결과와 시료도포 전의 측정결과의 차를 구하고, 보습 개선율(%)을 산출하였다. Oligo HA 0.01 %, HA 0.01 %, trehalose 0.01 % 처리군의 측정치 평균을 구하여 변화추세를 관찰하였고, 시간의 흐름에 따른 보습량의 변화를 Figure 7에 나타내었다. 도포 8 min 경과 시점을 기준으로 보습 개선율이 가장 높은 것은 oligo HA 0.01 %, HA 0.01 %, Trehalose 0.01 % 순이었다. 도포 후 8 min 경과 시점을 기준으로 HA가 oligo HA와 비슷하거나 다소 높은 보습 유지력을 갖고 있는 것으로 확인되었다(Figure 7).

일반적으로 화장품에 사용되는 고분자량의 HA는 피부의 바깥쪽에 친수성의 얇은 고분자 피막을 형성하여 수분의 손실을 막고, HA 자체의 친수력에 의해 수분을 지니므로써, 보습제로 작용한다고 알려져 있다. 반면에 피부 내에 존재하는 HA는 표피(epidermis)의 세포 증식 및 분화에도 관련이 있는 것으로 보고되어 있다[22], 또한 노화에 따라서 피부 내에 존재하는 HA 함량이 점점 감소하고, 이러한 HA의 감소가 피부 건조증이나 주름과 같은 선천적인 피부 노화증상과 관련이 있다는 것이 보고되어 있다[9-11]. 따라서 노화방지를 위하여 피부 내의 HA 함량을 증가시키기 위한 시도로는, 인삼으로부터 분리된 compound K를 처리함으로써 HaCaT cells에서 HAS2 (hyaluronan synthase 2)의 양을 증가시키고, 나아가서 표피와 유두층(papillary dermis)에서의 HA 함량 증가에 관하여 보고되어 있다[23]. 본 연구에 의하여 제조된 oligo HA는 상기 Caco-2 세포막을 이용한 실험과 3차원 인공피부를 이용한 투과실험에서 알 수 있듯이, 피부 장벽을 통과하여 기저층을 지나서 진피까지 도달되는 것으로 사료되어진다. 따라서 HA의 낮은 피부투과도를 해결함으로써, 직접적으로 피부 내에 HA를 공급함으로써 상기 본문에서 언급한 바와 같이 노화와 함께 감소되는 HA 함량을 세포외기질에 보충함으로써 피부 탄력 저하를 막고 수분 함유량을 증가시켜, 피부 건조증이나 주름 개선 등의 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구에 oligo HA는 피부 안쪽으로 흡수됨에도 불구하고 HA와 비슷한 보습효력을 보이는 것은 피부 안쪽으로 투과되어 흡수된 oligo HA 자체의 친수성기에 의하여 수분을 흡착하고 있어 보습 효과를 나타내는 것으로 사료된다. 따라서 고분자량의 HA와 oligo HA를 동시에 사용하면, 피부의 안쪽과 바깥쪽에서 동시에 보습효능을 줄 수가 있어 좀 더 지속적인 효능을 기대할 수 있으리라 사료된다.

4. 결 론

강산성 양이온 교환수지를 이용하여 oligo HA를 제조하는 과정에서, 용매의 조성, 반응시간, 양이온교환수지의 양의 변화를 주며 1,500에서 30,000까지의 다양한 분자량을 갖는 oligo HA를 제조 할 수 있었다. 강산성 양이온 교환수지를 이용하여 제조된 oligo HA에는, 유기 및 무기산에 의한 가분해의 경우 흔히 발생하는 고리열림반응이 없었고, 효소 분해법에 의한 경우 흔히 생성되는 말단기의 이중 결합도 관찰되지 않았다. Human fibroblasts와 keratinocytes에서 각각 300 $\mu\text{g/mL}$ 및 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 까지의 농도에서 독성이 없었으며 *in vitro* ocular test에서도 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 높은 농도에서 자극에 의한 세포독성이 관찰되지 않았다. Caco-2 cells을 이용한 세포 투과실험에서 HA는 거의 투과되지 않는 것에 비해 oligo HA는 16.0 %까지 투과되었고, 인공피부를 이용한 세포투과 실험에서도 약 90 % 정도의 상당히 높은 투과도를 보였다. 사람 피부에서의 보습효과를 확인하기 위하여 oligo HA를 함유한 제형을 피부에 도포한 후 피부 수분량과 경피 수분손실량을 측정한 결과 HA와 비슷한 우수한 보습 효과를 확인할 수 있었고, 인체피부누적침포 실험에서는 특별한 자극이 확인되지 않았다. 상기의 결과를 종합해 보면, oligo HA는 피부 투과도가 뛰어나며, 그 보습효능성에 있어서도 고분자량 HA와 견주는 효능을 지니고 있음을 알 수 있다. 따라서 화장품 제형에 oligo HA를 단독, 또는 고분자량 HA와 병행 사용 시에 우수한 보습 효과를 보일 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 보건복지부의 지원 하에 보건 의료기술진흥사업(특정센터연구지원) “기능성화장품 신소재 개발센터” 사업(A050432)의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. P. Ghosh, The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid, *Clin. Exp. Rheumatol.*, **12**, 75 (1994).
2. R. D. Altman and R. Moskowitz, Intraarticular sodium hyaluronate (hyalgan) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial, *J. Rheumatol.*, **25**, 2203 (1988).
3. D. Presti and J. E. Scott, Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by

- enzymatically produced hydroxyl radicals is dependent on hyaluronan molecular mass, *Cell Biochem Funct.*, **12**, 281(1994).
4. L. R. Michael, B. A. Thomas, D. S. Larry, C. F. William, C. Robert, and W. P. James, Novel formulation of fibroblast growth factor-2 in a hyaluronan gel accelerates fracture healing in nonhuman primates, *J. Orthop. Res.*, **17**, 607 (1999).
 5. M. L. Radomsky, A. Merck, M. Gonsalves, G. Anudokem, and J. Poser, Basic fibroblast growth factor in a hyaluronic acid gel stimulates intramembranous bone formation, *Trans. Orthop. Res. Soc.*, **22**, 510 (1997).
 6. E. A. Turley, P. Bowman, and M. A. Kytryk, Effects of hyaluronate and hyaluronate binding proteins on cell motile and contact behaviour, *J. Cell. Sci.*, **78**, 133 (1985).
 7. A. M. Alho and C. B. Underhill, The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells, *J. Cell Sci.*, **108**, 1557 (1989).
 8. B. P. Toole, G. Jackson, and J. Gross, Hyaluronate in morphogenesis: inhibition of chondrogenesis *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 1348 (1972).
 9. R. Fleischmajer, J. S. Perlish, and R. I. Bashey, Human dermal glycosaminoglycans and aging, *Biochim Biophys Acta*, **279**, 265 (1972).
 10. M. O. Longas, C. S. Russell, and X. Y. He, Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging, *Carbohydr. Res.*, **159**, 127 (1987).
 11. I. Ghersetich, T. Lotti, G. Campanile, C. Grappone, and G. Dini, Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging, *Int. J. Dermatol.*, **33**, 119 (1994).
 12. N. Motohashi, Y. Nakamichi, and I. Mori, Analysis by high-performance gel permeation chromatography of hyaluronic acid in animal skins and rabbit synovial fluid, *J. Chromatography*, **435**, 335 (1988).
 13. H. Bothner and T. Waaler, Limiting viscosity number and weight average molecular weight of hyaluronate samples produced by heat degradation, *Int. J. Biol. Macromol.*, **10**, 287 (1998).
 14. A. Sattar, P. Rooney, S. Kumar, D. Pye, D. C. West, I. Scott, and P. Ledger, Application of antigenic oligosaccharides of hyaluronan increases blood vessel numbers in rat skin, *J. Invest. Dermatol.*, **103**, 576 (1994).
 15. Y. Tokita and A. Okamoto, Hydrolytic degradation of hyaluronic acid, *Polymer Degradation and Stability*, **48**, 269 (1995).
 16. A. A. Jamal, M. Yahya, S. Dieter, W. Siegfried, and N. Reinhard, Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies, *J. Pharm. Biome. Anal.*, **31**, 545 (2003).
 17. S. L. Lim and L. Y. Lim, Effects of citrus fruit juices on cytotoxicity and drug transport pathways of Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.*, **307**(1), 42 (2006).
 18. K. Ishida, M. Takaai, and Y. Hashimoto, Pharmacokinetic analysis of transcellular transport of quinidine across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**(3), 522 (2006).
 19. N. Zerrouk, G. Corti, S. Ancillotti, F. Maestrelli, M. Cirri, and P. Mura, Influence of cyclodextrins and chitosan, separately or in combination, on glyburide solubility and permeability, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **62**(3), 241 (2006).
 20. A. S. Heman and V. S. Morris, A new technique of human patch tests, proceedings of scientific section, 46 (1952).
 21. M. K. Albert, The identification of contact allergens by human, *J. Invest. Dermatol.*, **47**, 369 (1966).
 22. S. Pasonen-Seppanen, S. Karvinen, K. Torronen, J. M. Hyttinen, T. Jokela, M. J. Lammin, M. I. Tammi, and R. Tammi, EGF upregulates, whereas TGF-beta downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation, *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 1038 (2003).
 23. S. Kim, B. Y. Kang, S. Y. Cho, D. S. Sung, H. K. Chang, M. H. Yeom, D. H. Kim, Y. C. Sim, and Y. S. Lee, Compound K induces expression of hyaluronan synthase 2 gene in transformed human keratinocytes and increases hyaluronan in hairless mouse skin, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **316**, 348 (2004).