

항균 효능이 있는 비타민 B1 유도체(Thiamine Dilauryl Sulfate:TDS)의 나노 입자화를 통한 기능성 향장 활성 증진

서용창·노라환**·권희석*·이현용**†

강원대학교 생물의소재공학과, *한국코스모화장품, **서원대학교 식품공학과
(2012년 8월 11일 접수, 2013년 1월 7일 수정, 2013년 8월 27일 채택)

Enhancement of the Cosmeceutical Activity by Nano-encapsulation of Thiamine Di-lauryl Sulfate (TDS) with antimicrobial efficacy

Yong Chang Seo, Ra Hwan No**, Hee-Seok Kwon*, and Hyeon Yong Lee**†

Department of Medical Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

*Hankook Cosmo Cosmetics Co., Bucheon 421-808, Republic of Korea

**Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Cheongju, Chungbuk 361-742, Republic of Korea
(Received August 11, 2012; Revised January 7, 2013; Accepted August 27, 2013)

요약: 본 연구는 레시틴으로 나노입자화 시킨 티아민 디라우릴 설페이트의 향장활성 증진에 관한 것이다. TDS를 포집시킨 나노입자는 150 ~ 200 nm의 크기를 나타내는 구형이며, 또한 제타포텐셜을 측정하여 여러 pH 범위에서 안정한 것을 확인하였다. TDS 나노입자는 인간 섬유아세포(CCD-986sk)에 높은 농도를 처리하여도 85%의 세포생존률을 보였다. 자유라디칼소거활성 실험을 진행한 결과 나노입자화하지 않은 TDS 희석액(1.0 mg/mL)은 81.6%의 활성을 나타내었고, 나노입자화한 TDS 용액은 이보다 더 높은 88.1%의 높은 라디칼 소거 활성을 보였다. TDS 나노입자는 자외선을 조사시킨 CCD-986sk에서 MMP-1의 발현을 41.4% 감소시켰다. TDS 용액과 TDS 나노입자를 가지고 salmonella typhimurium, listeria monocytogenes에 대하여 항균활성을 측정하였다. TDS 나노입자의 경우 양성대조군의 항균활성과 비슷한 결과를 나타내었다. 이러한 결과들로 TDS 나노입자가 항산화, 미백, 주름개선 효능같은 향장 소재로서의 적용이 가능할 것이라 생각된다.

Abstract: This study was to improve cosmeceutical activity of thiamine di-lauryl sulfate (TDS) by encapsulation of nanoparticle with lecithin. Results showed that most of the nanoparticles containing the TDS were well formed in round shape with below 150 ~ 200 nm diameter as well as they were fairly stable in various pH ranges by measuring zeta potentials. The nanoparticles of TDS resulted in 85% cell viability of human normal fibroblast cells (CCD-986sk) when added at the highest concentration (1.0 mg/mL). The nanoparticles of Acer mono sap showed highest free radical scavenging effect as 88.1% in adding sample (1.0 mg/mL), compared to TDS solution of non-encapsulation (81.6%). The nanoparticles of TDS reduced the expression of MMP-1 on UV-irradiated CCD-986sk cells down to as 41.4%. The TDS solution and nanoparticles showed significant anti-microbial activities against the *salmonella typhimurium* and *listeria monocytogenes* at 5 and 6 days as compared with control. Anti-microbial activities of TDS nanoparticles were similar to positive control. These results indicated that TDS nanoparticles may be a source for functional cosmetic agents capable of improving cosmeceutical activity such as antioxidant, whitening, and anti-wrinkling effects and can be further developed as natural preservative in cosmetics.

Keywords: Thiamine Di-lauryl Sulfate, cosmeceutical activity, Nano-encapsulation, anti-microbial activities

† 주 저자 (e-mail: hyeonl@seowon.ac.kr)

1. 서 론

국민 생활 소득의 향상으로 인간의 기본적인 욕구 이외에 보다 편안하고 윤택한 삶을 살기 위한 욕구와 관심이 높아지고 있다. 그중 외적으로 나타나는 요인들이 중요한 조건으로 인식되면서 피부에 대한 관심이 증가하고 있다. 또한 여성의 직장 생활과 야외 활동이 활발해지면서 유해 자외선에 노출되는 시간이 증가하고, 산업화 이후 계속적으로 증가하고 있는 각종 환경오염물질, 흡연, 알콜 및 방사선 물질 등으로 인한 인체에 산화적 스트레스를 가중시키고 있다. 이로 인한 피부 홍반, 색소침착, 피부암 등을 유발하여 피부 건강에 대한 관심이 급속히 증가하고 있다. 피부는 자외선의 영향을 받기 쉬운 기관이다. 자외선의 영향으로 피부에 free radical의 생성이 촉진되며 생성된 free radical은 체내 항산화계 효소와 항산화 물질에 의해 제거가 되지만 이러한 보호망이 점차 손상되면서 잔존하는 free radical에 의하여 피부 조직을 손상시킬 뿐만 아니라 피부에서 색소침착이 증가되는데, 이와 같이 색소침전이 증가하는 것은 자외선 흡수에 의한 피부 세포의 손상을 억제할 목적으로 melanin 생성이 증가된 결과이다[1]. 이로 인하여 피부의 노화와, 색소 탈색, 피부건조, 탄력성 감소 및 색소 침착 등이 나타난다[2,3]. 이에 부응하여 화장품 산업은 기능성을 갖춘 제품들의 개발과 연구가 급속하게 늘어나고 있으며, 기능성 제품들의 효능 증대 및 안정성 증진을 위하여 천연물 또는 천연성분들의 활용 분야의 연구가 활발히 진행되고 있다[4].

또한 이러한 기능성을 갖춘 화장품의 개발과 함께 화장품 업계들의 글로벌화가 진행되면서 기능성뿐만 아니라 화장품의 안정성인 미생물에 의한 오염, 변질, 변패 등의 문제점을 해결하기 위한 제품의 품질 관리 방법으로 품질 위해요소의 중점관리기준 시스템과 우수 화장품 제조 및 품질관리기준 등에 적합한 기능성 소재를 개발하기 위한 연구도 늘어나고 있다[5]. 화장품은 물 또는 기름을 주성분으로 구성되며 부가적인 성분으로 글리세틴, 솔비톨, 아미노산 유도체, 단백질 등을 배합하여 제조하는데[6,7], 이러한 성분들은 미생물의 생육에 있어 용이한 환경으로 미생물에 의하여 화장품의 침전, 변질, 변패 등을 일으킨다[8,9]. 이러한 미생물의 오염을 막기 위하여 방부제를 첨가하

게 된다. 이러한 방부제는 항균효과, 외부환경에 대한 안정성, 제품의 물리적인 성질에 영향이 없으며 자극적이지 않아야 한다[10].

본 연구에서는 현재 사용되고 있는 합성 방부제보다 피부에 자극이 덜하며 자연 친화적인 천연 성분으로 Thiamine Di-lauryl Sulfate (TDS)를 사용하였다. TDS는 식품 첨가물 공전에 등재되어 있는 성분으로 식용이 가능하며 자극이 적은 피부 친화적인 성분이며 항균 활성이 있다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 TDS를 나노입자화 공정을 통해 나노 입자로 제조하여 항균 및 항장 활성 실험을 진행하였으며 기능성 화장품으로써의 적용 가능성을 조사하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. TDS의 나노 입자 제조 및 특성 확인

본 실험에 사용한 TDS 수용액의 제조방법은 분말 상태의 TDS 100 g을 60% 주정 1 L에 완전히 용해 될 때까지 약 10 min 간 교반을 진행한다. 이렇게 주정에 용해된 TDS solution 1 mL를 증류수 499 mL에 넣은 후 60 min 동안 교반을 진행하여 200 ppm의 TDS 수용액을 제조한다. TDS 수용액의 nano-encapsulation을 위해 encapsulant로서 식용이 가능한 레시틴을 이용해 제조하였다. 레시틴 나노 입자를 위해 L- α -phosphatidylcholine (SIGMA, USA)을 둥근바닥플라스크에 넣어 감압상태에서 유기용매를 모두 날려 multi-layer를 형성시켰다. 완전히 건조되어 다층의 layer가 형성된 둥근바닥플라스크에 TDS 수용액을 넣고 초음파 분산기 VCX500 (Sonics & Materials Inc., USA)를 이용하여 상온에서 1 h 동안 균질화시켜 TDS 나노 입자를 제조하였다[11,12]. 제조한 TDS 나노 입자의 균일성 및 크기별 분포 측정을 위해 Dynamic Light Scattering (DLS, Brookhaven Instrument Co)을 이용하여 측정하였다.

2.2. TDS 나노 입자의 제타전위 안정성 측정

제타 전위(ζ -potential)는 음으로 대전된 나노 입자 주위에서 이온 환경과 입자 간의 척력을 측정을 통해 배지의 pH에 따른 나노 입자의 안정성을 확인하는 것으로, 여러 pH 조건(pH 2 ~ 10)에서 그 값을 측정하였다. TDS 나노 입자는 모두 37 °C의 동일한 조건에서 Plus 90 (Brookhaven, USA)으로 측정을 하여 결과를

구하였다[13].

2.3. 세포 독성 측정

TDS 나노 입자 수용액의 세포 독성을 측정하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)를 사용하여 Mosmann 방법을 변형시켜 세포 생존율을 측정하였다. CCD-986sk 세포를 96 well plate에 1.5×10^4 cells/well 농도로 접종한 후, 80% 정도의 배양시점에서 각 well에 시료를 투여하고 CO₂ incubator에서 24 h 동안 배양하였다. 5 µg/mL 농도의 MTT 용액을 각 well에 첨가하고 4 h 후 상층액을 제거하고, 10 µL의 acid-isopropanol (0.04N HCl in isopropanol)을 첨가한 후 microplate reader (Tecan, USA)로 565 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다[14].

2.4. DPPH 소거활성 측정

메탄올 0.5 mL에 농도별로 TDS 나노 입자 수용액을 첨가하여 시료를 조제하였다. 대조군으로는 Retinol을 사용하였다. 조제된 시료에 0.15 mM의 DPPH 용액을 2 mL씩 첨가하고 반응액이 완전하게 섞이게 하기 위하여 약 10 s 동안 vortexing 한다. 30 min 동안 실온에서 반응시킨 후, 잔존하는 DPPH의 함량을 측정하기 위하여 microplate reader를 이용하여 517 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다[15].

$$\text{전자공여능 (\%)} = (1 - A_s / A_c) \times 100$$

A_s는 추출물 첨가구의 흡광도, A_c는 추출물 무첨가구의 흡광도를 나타낸다.

2.5. Tyrosinase 억제 효과 탐색

TDS 나노 입자 수용액의 Tyrosinase 억제 효과는 Dopachrome법을 이용하여 측정하였다[16]. mushroom tyrosinase-150 unit 150 µL와 2.5 mM L-tyrosine 225 µL, 0.4 M hepes buffer (pH 6.8) 225 µL, ethanol 용액 또는 1 mg/mL농도의 시료 300 µL를 혼합한 후 배양 전, 15 min 간 배양 후의 각각의 흡광도를 475 nm의 파장에서 측정하였다.

$$\text{Tyrosinase Inhibition (\%)} = (D - C) - (B - A) / (D - C) \times 100$$

A와 B는 각각 시료가 첨가된 용액의 배양 전과 배양 후의 흡광도이며, C와 D는 각각 시료를 넣지 않은 용액의 배양 전과 배양 후의 흡광도이다. 이들 tyrosinase 억제 효과는 100으로 나타날 때 완전한 억제를 의미하며, 0일 때 전혀 억제를 하지 못하는 것을 의미한다.

2.6. UVA 처리를 이용한 MMP-1 발현 저해 효과 탐색

Human fibroblast CCD-986sk를 2.0×10^4 cells/mL의 농도로 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양하여 실험에 사용하였다. 배지는 UV 조사 전에 제거한 후, LUX meter (D-28, Takemura, Japan)을 사용하여 6.3 J/cm²으로 맞추어 UV를 조사하였다. UVA 조사 후 FBS를 첨가하지 않은 DMEM 배지에 각 시료를 1 mg/mL의 농도로 투여하여 24 h 동안 배양하였다. UVA 조사에 의해 유도되는 MMP-1 발현량 측정은 Dunsmore 등이 사용한 방법[17]을 이용하여 실시하였다. UVA 조사 전과 후의 시료를 각각 처리하여 24 h 배양한 배지를 96 well plate에 분주하고 4 °C에서 24 h 동안 coating하였다. TBS (phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)으로 세척한 후, 3% PBS를 가하여 1 h 동안 37 °C에서 blocking 하였다. 다음으로 1차 항체 (monoclonal anti-MMP-1)를 blocking buffer로 1 : 3,000의 비율로 희석하여 분주하고 90 min 간 37 °C에서 반응시켰다. 반응 후, PBS로 세척시키고 2차 항체 (alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG)를 blocking buffer에 1 : 3,000의 비율로 희석하여 가하고 90 min 간 37 °C에서 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. Alkaline phosphatase 기질용액(1 mg/mL, p-nitrophenyl phosphate in diethanolamine buffer)을 첨가하여 실온에서 30 min 동안 반응시킨 다음 3 N NaOH로 반응을 완전히 중지시킨다. 반응이 중지된 후, microplate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 상기 TDS 나노 입자 수용액을 처리하지 않은 세포 배양액의 반응 흡광도를 대조군으로 하였으며 양성대조군으로 Retinol을 사용하였다.

2.7. Challenge test 통한 항균 효과 탐색

TDS 나노 입자 수용액의 항균 효과를 실험하기 위해서 challenge test를 실행하였다. 항균 효과 유효성 측정에 사용되는 방법 중 미국화장품 협회의 방법, 즉

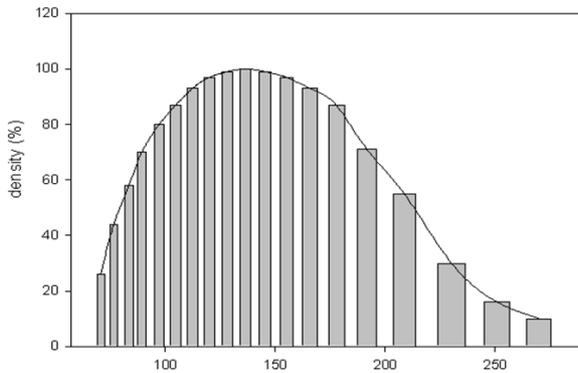


Figure 1. Distribution of TDS nanoparticle solution by dynamic light scattering (DLS).

CTFA법(The cosmetics, Toiletory, and Fragrance Association)을 기준으로 실행하였다. CTFA법은 100 g의 용기에 TDS 나노 입자 수용액 50 g을 넣고 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL의 균을 접종하여 7일 이내에 처음 접종 균수의 99.9%가 사멸되면 방부제로서의 유효성을 입증하는 방법이다. 본 발명에서는 5×10^6 CFU/mL의 균을 TDS 나노 입자 수용액에 접종시켜 35 °C, 100 rpm으로 조정된 shaking incubator에 두고 1 ~ 7일까지 샘플을 취하여 고체배지에서 균일하게 도달한 후 colony 수를 측정하였다. positive control은 paraben이라는 화학방부제를 사용하였다.

2.8. 통계처리

본 연구에서 실험값의 통계는 SPSS package program의 paired *t*-test로 검정하였으며 모든 실험값은 평균 \pm 표준오차 (Mean \pm standard error)로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. TDS의 나노 입자의 특성 확인

Figure 1의 A는 TDS 나노입자를 DLS로 측정한 그림이다. DLS 측정 결과 TDS 나노 입자의 평균적인 입자 지름이 150 ~ 200 nm의 조밀한 분포를 나타냈으며 100 nm 이하의 크기도 미량 분포한 것으로 나타났다. 이처럼 TDS 수용액을 포집 소재 중 하나인 레시틴으로 포집하여 나노 입자로 제조하면 피부 세포에 작용하는 표면적을 증가시키고, 세포벽에 침투하는 침투성을 증가시켜 효능을 증진시키는데 더 효과적으로 적용될 수 있을 것으로 사료된다[18]. 또한, 기존에

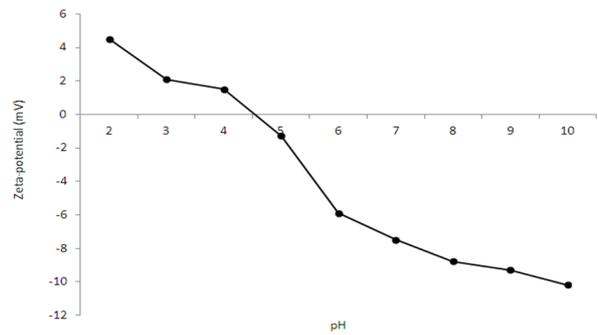


Figure 2. Estimation of Zeta potential (mV) of TDS nanoparticle solution.

연구된 레시틴으로 제조한 나노 입자의 경우 비슷한 크기의 분포를 나타냈으며 세포투과능을 증진시키는 효과가 있었다[19]. 이와 같이 작은 나노 크기로 제조한 TDS 나노 입자 수용액은 화장품 조성물로 첨가될 경우 화장품 상에서 안정적으로 분산되어 있을 것으로 사료된다.

3.2. TDS 나노 입자 수용액의 제타전위 안정성 측정

제조된 TDS 나노 입자 수용액의 보다 자세한 안정성을 측정하기 위해서 pH 환경에 따른 제타 전위(ζ -potential)를 측정하여 Figure 2에 나타내었다. 제타전위는 용액의 pH 환경에 따라 입자의 크기 및 분산 안정성에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있는 것으로 제타 전위가 높으면 입자들 간의 반발력으로 인해 콜로이드가 안정하게 된다. 측정 결과, pH 2의 산성 조건에서 4.5 mV, pH 6.15의 중성 조건에서 -7.5 mV, pH 10의 염기성 조건에서 -10.2 mV의 전위차를 나타내어 pH 6 이상의 조건에서 입자가 안정적으로 존재하는 것으로 나타났다[20]. 이러한 결과는 레시틴을 이용하여 TDS를 나노 입자로 포집함으로써 수용액 상태에서 나노 크기를 유지하며 안정적으로 분산되어 존재하여, 제형으로써의 안정성을 보유할 수 있을 것으로 사료된다[21].

3.3. 세포 독성 측정

인간 섬유아세포인 CCD-986sk 세포에 대한 TDS 나노 입자 수용액의 세포생존율을 측정하여 화장품 소재로서의 안전성 및 적합성을 검토하였다. 측정결과, TDS 나노 입자 수용액의 농도 증가에 대한 세포 생존율은 큰 차이를 보이지 않았다(Figure 3). TDS 수용액

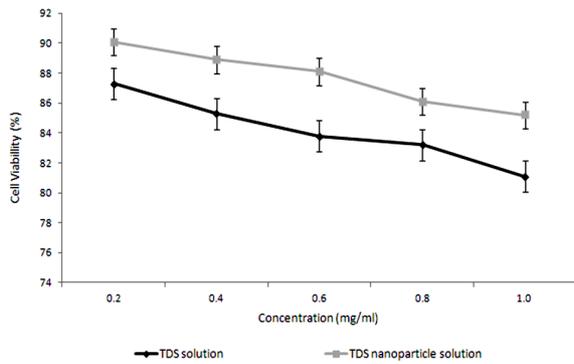


Figure 3. Cell viability of the TDS nanoparticle solution and TDS solution.

과 TDS 나노 입자 수용액의 세포생존율을 살펴보면, TDS 수용액과 TDS 나노 입자 수용액 모두 81.1% 이상의 세포생존율을 나타내었으며, 가장 높은 농도인 1.0 mg/mL의 농도에서 TDS 나노 입자 수용액에 대한 세포 생존율이 85.2%로 TDS 입자 수용액보다 4% 더 높은 수치를 나타냈다. 위와 같은 결과로 보아, 80% 이상의 세포생존율을 가지는 TDS 수용액 자체에 대한 세포 독성은 대략 15% 정도로 미미하게 나타났으며, 이는 천연알칼로이드의 세포 생존율인 60%와 비교하였을 경우 세포 수준에서의 영향을 주지 않으며 매우 경미한 독성을 보이는 것으로 사료된다[22]. 화장품 원료로 널리 사용되고 있는 tea tree oil 추출물이 같은 CCD-986sk에 대하여 1% 추출물이 나타내는 40% 세포생존률과 비교하여도 월등하게 높은 세포생육도를 볼 수 있었다 [23]. 또한 피부에 적용할 경우 피부에 대한 독성의 위험은 없다고 생각되며, 미백이나 항산화 및 주름개선 등의 기능성 효능이 검증된다면 향장 소재로서의 활용이 가능할 것으로 보인다.

3.4. DPPH 소거활성 측정

비교적 안정한 free radical로 알려진 DPPH는 항산화제의 radical 소거능을 평가하기 위해 일반적으로 많이 이용되며, 항산화능에 의하여 멜라닌 색소 형성 억제 및 주름 생성이 억제되는 것으로 알려져 있어 TDS 나노 입자 수용액의 항산화활성을 측정하기 위하여 실험을 시행하였다[24]. 측정 결과, TDS 수용액에 대해서는 모두 80% 이상의 높은 수치를 나타내었으며, TDS 나노 입자 수용액과 TDS 수용액의 전자공여능은 1 mg/mL의 농도에서 각각 81.6, 88.1%로 측정되었다

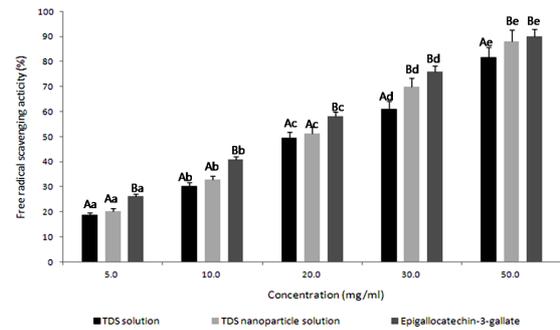


Figure 4. Free radical scavenging activity of the TDS nanoparticle solution and TDS solution. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown.

* Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-B) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-e) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

(Figure 4). 또한 이 결과는 positive control로 사용된 epigallocatechin-3-gallate의 항산화능이 같은 농도에서 90.1%를 나타내는 것을 감안해 본다면 TDS 나노 입자 수용액 역시 뛰어난 항산화 효능을 가지고 있는 것으로 사료된다. 또한 나노 입자화 전, 후의 항산화 효과는 비슷하게 나타나서 나노 입자화에 따른 항산화 효과는 큰 차이가 없음을 알 수 있었으며, 이것은 TDS의 항산화 효과는 특정 농도 이상에서는 항산화 효과에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다. 이는 활성산소의 제거가 멜라닌 색소 형성억제에 효과적이라는 연구보고[25,26]에 근거하여 TDS 나노입자수용액이 피부 내 활성산소를 소거함으로써 이에 연속적인 기작으로 인하여 미백작용을 나타낼 수 있을 것으로 추측된다.

3.5. Tyrosinase 억제 효과 탐색

멜라닌은 피부에서 세포내의 tyrosinase라는 효소의 생합성 과정에서 만들어지며 자외선, 건조, 극한 온도 등에 대한 피부의 저항력을 높여주지만, 과도한 melanin 생성은 인체에 기미, 주근깨, 검버섯 등과 같은 색소 침착을 일으키고, 피부의 손상을 촉진시킨다. 그러므로 화장품 산업에서 피부 미백효과를 측정하는데 매우 중요한 부분이 된다[27]. 본 연구에서는 TDS 나노 입자 수용액과 TDS 수용액의 tyrosinase에 대한 억제 효과를 알아보기 위하여 0.2 ~ 1.0 mg/mL의 농도

Table 1. Inhibitory Effects of the TDS Nanoparticle Solution and TDS Solution against the *In vivo* Melanin Synthesis by Tyrosinase

Samples	Inhibition ratio (%)				
	0.2 mg/mL	0.4 mg/mL	0.6 mg/mL	0.8 mg/mL	1.0 mg/mL
TDS solution	26.8 ± 0.2*	34.8 ± 0.4	40.2 ± 0.3	45.4 ± 0.3	46.9 ± 0.2
TDS nanoparticle solution	30.1 ± 0.2	38.3 ± 0.1	42.5 ± 0.3	48.1 ± 0.2	52.9 ± 0.4
Arbutin**	44.3 ± 0.2	48.2 ± 0.3	52.6 ± 0.2	55.0 ± 0.4	64.7 ± 0.2

*Each value were compared with control at $p < 0.05$ by Student *t*-test.

**Used as a positive control.

로 시료를 첨가했을 때의 저해율을 Table 1에 나타내었다. TDS 나노 입자 수용액과 TDS 수용액 모두 농도의존적으로 저해율이 증가되는 것을 확인할 수 있고, 1.0 mg/mL의 농도에서 TDS 나노 입자 수용액은 TDS 수용액 보다 6% 높은 52.9%의 억제 효과를 나타내었으며 양성대조군으로 사용된 arbutin이 64.7%의 억제 효과보다는 조금 낮은 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 가죽나무 물 추출물의 tyrosinase 저해 연구[28]에서 보고된 2.0 mg/mL의 농도에서 뿌리, 줄기, 잎 각각 7.09%, 5.21%, 16.33%에 비해 더 낮은 농도인 1.0 mg/mL에서도 매우 높은 tyrosinase 저해 활성으로 TDS 나노 입자 수용액이 피부 미백활성에 효과를 갖고 있음을 확인할 수 있었으며 추후 향장소재로서 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

3.6. UVA 처리를 이용한 MMP-1 발현 저해 효과

피부의 광노화에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 발현은 UVA에 의해 세포에서 JNK/p38 활성도가 증가하고 전사인자인 AP-1의 활성도가 증가되는 신호 전달 경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다 [29]. 이러한 UVA에 의하여 발현이 증가되는 MMP-1에 미치는 TDS 나노 입자 수용액의 영향을 알아보고자 실험을 진행하였다. 실험 결과, 농도가 증가할수록 MMP-1 발현량이 농도 의존적으로 감소하는 결과를 나타냈으며 1.0 mg/mL 농도로 처리한 TDS 수용액과 TDS 나노 입자 수용액에서 각각 45.3, 41.4%의 MMP-1 발현량을 나타내었다. 이는 같은 농도로 처리한 epigallocatechin-3-gallate의 MMP-1 발현량인 36.5%와 비슷한 수치로써, TDS 나노 입자 수용액의 주름개선의

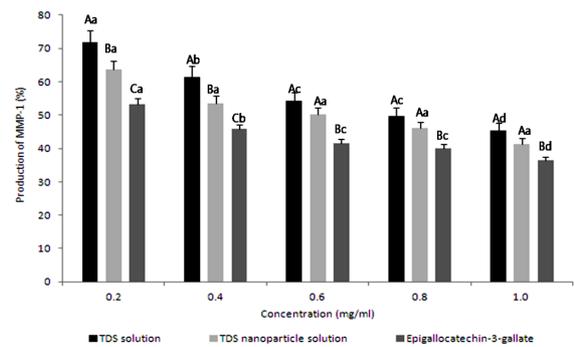


Figure 5. Production of MMP-1 by adding the TDS nanoparticle solution and TDS solution on UVA-irradiated human skin fibroblast (CCD-986sk cell).

* Mean with difference letter (A-C) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-d) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

효과를 높일 수 있는 가능성을 보여주었다(Figure 5). 이러한 결과는 TDS 나노 입자 수용액이 외부 스트레스인 UV에 의해 발생된 교원질 파괴를 담당하는 유해인자를 효과적으로 제거함으로써 MMP-1 발현을 효과적으로 저해한 것이라 사료되며, 향후 피부의 교원질층의 파괴로 인한 주름살을 개선하는 향장소재개발에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다[30].

3.7. Challenge test 통한 항균 효과 탐색

대표적인 Gram 음성균인 *Salmonella typhimurium*와 대표적인 Gram 양성균인 *Listeria monocytogenes*에서의 항균 효과를 특정한 결과, Figure 6에서 볼 수 있듯이 positive control인 paraben의 경우 약 접종 4일 이후에 접종된 균수가 99.9% 이상 감소되어 CTFA법을 기

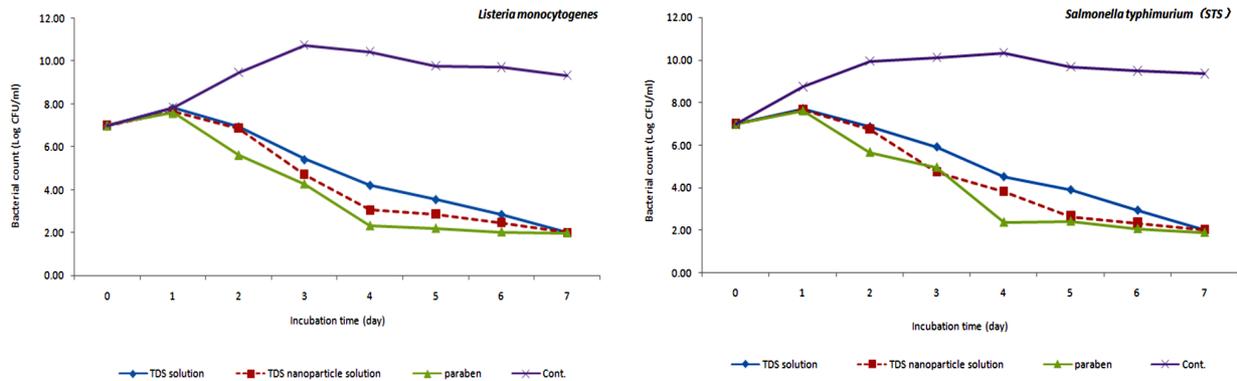


Figure 6. Survivals of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* during the challenge test against the TDS nanoparticle solution and TDS solution.

준한(즉 7일 이내 접종균수의 99.9%가 사멸) 기준에 적합하였고, TDS 수용액과 TDS 나노 입자 수용액의 경우 모두 약 접종 5 ~ 6일째 기준을 통과한 것으로 나타났으며 TDS 나노 입자 수용액이 보다 높은 사멸능을 나타내었다. 이상의 결과로 TDS 나노 입자 수용액은 CTFA법의 기준에 만족하는 항균 효과가 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 일반 TDS 수용액을 사용하는 것보다 레시틴으로 포집된 작은 나노 크기의 TDS 나노입자 수용액을 사용할 경우 균에 작용하는 표면적이 증가하여 효과적으로 균을 사멸한 것으로 사료되며, 나노 입자 제조를 통하여 균의 세포벽에 침착하는 표면적을 증가시키고 세포벽에 침투하는 침투성이 증가하여 균을 사멸시키는 것으로 사료된다 [31]. 더 나아가 TDS 수용액을 레시틴으로 포집하여 나노 입자 수용액으로 제조함으로써 안정성을 증진시키고 동시에 향장 및 항균 활성을 증진시켜 향후 화장품 조성물로서 기능성 향장 소재의 활용 가능성이 높을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : A103017).

Reference

1. K. Maeda and M. Fukuda, In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human

melanocytes, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, **42**, 361 (1991).

2. J. M. Park, J. Y. Lee, T. S. Park, S. J. Hyun, H. H. Kim, Y. J. Cho, O. J. Kwon, A. R. Son, D. S. Kim, and B. J. An, A study on the cosmeceutical activities of *Prunus sargentii* R, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, **51**, 70 (2008).

3. S. W. Lim, H. C. Ryoo, and S. H. Lee, Understanding of skin aging and its prevention and care, *The Journal of Skin Barrier Research*, **4**, 71 (2002).

4. W. G. Cho, Comparison of drug delivery using hairless and pig skin, *Journal of The Korean Oil Chemists Society*, **24**, 410 (2007).

5. M. Flores, M. Morillo, and M. L. Crespo, Deterioration of Raw Materials and Cosmetic Products by Preservative Resistant Microorganisms, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **40**, 157 (1997).

6. T. Benavides, V. Martinez, M. Mitjans, M. R. Infante, C. Moran, P. Clapes, R. Clothier, and P. M. Vinardell, Assessment of the Potential Irritation and Photoirritation of Novel Amino Acid-based Surfactants by *in vitro* Method as Alternative to the Animal Tests, *Toxicology*, **201**, 87 (2004).

7. K. J. Pal, D. Godbole, and K. Sharma, Staining of Proteins on SDS Polyacrylamide Gels and on Nitrocellulose Membranes by Alta, a Colour Used as a Cosmetic, *Journal of Biochemical and Biophysical*

- Methods*, **61**, 339 (2004).
8. J. P. Bryan, M. H. Sjogren, P. Macarthy, E. Cox, L. J. Leters, and P. L. Perine, Persistence of Antibody to Hepatitis B Surface Antigen after Low-dose, *Vaccine*, **10**, 33 (1992).
 9. M. Rosenberg, M. Barki, and S. Portnoy, A Simple Method for Estimating Oral Microbial Levels, *Journal of Microbiological Methods*, **9**, 253 (1989).
 10. H. S. Bean, Preservatives for Pharmaceuticals, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, **23**, 703 (1972).
 11. N. A. Fallouh, L. R. Treupel, H. Fessi, J. Devissaguet, and F. Puisieux, Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules, *International Journal of Pharmaceutics*, **28**, 125 (1986).
 12. S. Y. Kim and Y. M. Lee, Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly(ϵ -caprolactone) as novel anticancer drug carriers, *Biomaterials*, **22**, 1697 (2001).
 13. X. Yang, H. Y. Lee, and J. C. Kim, pH and temperature sensitive nanoparticles prepared using salt bridge, *Journal of Macromolecular Science*, **46**, 959 (2009).
 14. R. Dol and R. Peto, The causes of cancer; quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, *Journal of the National Cancer Institute*, **66**, 1192 (1981).
 15. H. S. Seo, B. H. Chung, and Y. G. Cho, Antioxidant and anticancer effects of agrimony (*Agrimonia pilosa* L.) and Chinese Lizardtail (*Saururus chinensis* Baill), *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, **16**, 139 (2008).
 16. S. H. Pomerantz, Separation, purification and properties of two tyrosinases from hamster melanoma, *The Journal of Biological Chemistry*, **238**, 2351 (1963).
 17. S. E. Dunsmore, J. S. Rubin, S. O. Kovacs, M. Chedid, W. C. Parks, and H. G. Welgus, Mechanisms of hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production, *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 24576 (1996).
 18. Y. C. Seo, J. S. Cho, H. Y. Jeong, T. B. Yim, K. S. Cho, T. W. Lee, M. H. Jeong, G. H. Lee, S. I. Kin, W. B. Yoon, and H. Y. Lee, Enhancement of Antifungal Activity of Anthracnose in Pepper by Nanoparticles of Thiamine Dilauryl Sulfate, *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, **19**, 198 (2011).
 19. H. S. Jeong, J. G. Han, J. H. Ha, Y. Kim, S. H. Oh, S. S. Kim, M. H. Jeong, G. P. Choi, Y. K. Park, and H. Y. Lee, Antioxidant activities and skin-whitening effects of nano-encapsulated water extract from *Rubus coreanus* Miquel, *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, **17**, 83 (2009).
 20. Z. Klaus, B. Carole, B. Julia, W. Gerhard, E. Stefan, H. Gunther, and C. Conrad, Delivery by cationic gelatin nanoparticles strongly increases the immunostimulatory effects of CpG oligonucleotides, *Pharmaceutical Research*, **25**, 551 (2007).
 21. J. G. Han, M. C. Kwon, J. H. Ha, H. S. Jeong, Y. Kim, M. H. Jeong, J. C. Kim, and H. Y. Lee, Enhancement of Immuno Modulatory Activities of *Rubus coreanus* Miquel Extracts by Nano-encapsulation Process, *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, **17**, 54 (2009).
 22. L. L. Ji, Y. Chen, and Z. T. Wang, The toxic effect of pyrrolizidine alkaloid clivorine on the human embryonic kidney 293 cells and its primary mechanism, *Experimental and Toxicologic Pathology*, **60**, 87 (2008).
 23. S. A. Yang, S. K. Jeon, E. J. Lee, N. K. Im, J. Y. Jung, and I. S. Lee, Bioactivity and Chemical Composition of the Essential oil of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*), *Journal of Life Science*, **18**, 1644 (2008).
 24. M. S. Blois, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **26**, 1199 (1958).
 25. D. Tobin and A. J. Thody, The superoxide anion may mediate short but not long term effects of ultraviolet radiation on melanogenesis, *Journal of the American Academy of Dermatology*, **3**, 99 (1994).
 26. E. K. Bernadette, D. Marianne, and P. Bernhard, Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid and α -tocopherol, *Experimental*

- Dermatology*, **38**, 45 (1998).
27. R. Invergar and A. J. McEvily, Studies on biological activity from extract of *Crataegi fructus*, *The Korean Journal of Herbology*, **17**, 29 (1992).
 28. Y. S. Lee, Physiological Activities of Ethanol Extracts from Different Parts of *Ailanthus altissima*, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, **36**, 389 (2007).
 29. J. S. Kim, J. D. Kim, M. J. Kang, H. Y. Ahn, and D. J. Kim, Collagen-induced activation of MMPs (membrane-type matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2) in ovarian cancer cell lines *in vitro*, *Korean Society of Obstetrics and Gynecology*, **43**, 1972 (2000).
 30. M. H. Jeong, S. S. Kim, J. H. Ha, H. J. Lee, G. P. Choi, U. Y. Park, and H. Y. Lee, Skin Whitening and Skin Immune Activities of Different Parts of *Acer mono* and *Acer okamotoanum*, *Journal of Korean Forest Society*, **99**, 470 (2009).
 31. Y. C. Seo, M. H. Jeong, H. S. Jeong, J. S. Kim, Y. Y. Zou, J. H. Ahn, I. S. Shin, and H. Y. Lee, Enhancement of Antimicrobial Activity of Nano-Encapsulated Horseradish Aqueous Extracts Against Food-Borne Pathogens, *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, **18**, 389 (2010).