

고분자 미셀과 경피투과 펩티드를 이용한 파슬리 추출물의 피부흡수 효과

안 규민·박수인·김민기·허수현·신문삼[†]

을지대학교 대학원 시니어헬스케어학과 화장품약리학 전공
(2019년 7월 11일 접수, 2019년 9월 15일 수정, 2019년 9월 23일 채택)

Skin Permeability of *Petroselinum Crispum* Extract Using Polymer Micelles and Epidermal Penetration Peptide

Gyu Min An, Su In Park, Min Gi Kim, Soo Hyeon Heo, and Moon Sam Shin[†]

Department of Senior Healthcare, majored in Cosmetic Pharmacology, Eulji University, Seongnam, Gyeonggi 13135, Korea
(Received July 11, 2019; Revised September 15, 2019; Accepted September 23, 2019)

요약: 본 연구의 목적은 파슬리의 생리활성을 확인하고 고분자 미셀과 세포투과 펩티드를 이용하여 파슬리 추출물에 대한 피부흡수 효능을 검토하는 것이다. 항산화 측정방법인 총 폴리페놀 함량은 파슬리 에탄올 추출물의 경우에는 121.68 ± 2.49 mg/g이며 파슬리 열수 추출물의 경우에는 72.42 ± 1.52 mg/g이었다. 농도 2,000 mg/L에서 DPPH radical 소거능은 에탄올 추출물의 경우 $90.48 \pm 0.46\%$ 이고 열수 추출물의 경우 $83.92 \pm 0.13\%$ 로 나타났다. 농도 800 mg/L에서 파슬리 에탄올 추출물의 ABTS radical 소거능은 $91.08 \pm 0.14\%$ 로 열수 추출물의 값($69.63 \pm 0.55\%$)보다 더 우수한 결과를 보였다. SOD 실험에서는 농도 의존적인 결과를 보였고, 모든 농도에서 파슬리 에탄올 추출물의 SOD 활성능이 파슬리 열수 추출물의 값보다 높았다. 16,000 mg/L의 농도에서, 파슬리 에탄올 추출물이 $128.45 \pm 0.70\%$ 의 가장 높은 SOD 활성능을 나타내었다. Elastase 저해능 실험 결과에서도 농도 의존적인 결과를 보였으며 파슬리 에탄올 추출물 2,000 mg/L에서 가장 높은 $99.99 \pm 1.54\%$ 의 elastase 저해능이 나타났다. 난용성 문제와 피부 흡수율을 증진시키기 위하여, 파슬리 에탄올 추출물과 1% 세포투과 펩티드(6개 알르기닌, R6)를 함유한 40.01 nm의 입자크기를 갖는 PCL-PEG 고분자 미셀이 성공적으로 제조되었다. 24시간 동안 피부흡수 실험 결과에서, 총 축적된 beta-carotene의 투과량은 파슬리 추출물만 적용한 경우 $37.99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 을 나타내었지만, 고분자 미셀과 세포투과 펩티드를 함께 적용한 경우의 파슬리 추출물의 투과량은 $68.38 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 1.8배의 경피투과 증가효과를 나타내었다.

Abstract: This study was conducted to investigate physiological activity and its skin permeability of *Petroselinum crispum* extract using polymer micelles and cell penetrating peptide. In the antioxidant test, the total concentrations of polyphenol compounds were determined to be 121.68 ± 2.49 mg/g (for ethanol extract and), 72.42 ± 1.52 mg/g (for hydrothermal extract.). The DPPH radical scavenging ability was $90.48 \pm 0.46\%$ (for ethanol extract) and $83.92 \pm 0.13\%$ (for hydrothermal extract) at 2000 mg/L. ABTS radical scavenging ability was $91.08 \pm 0.14\%$ for ethanol extract ethanol extract, which is higher than that of hydrothermal extract at 800 mg/L ($69.63 \pm 0.55\%$). In the SOD experiments, the *P. crispum* ethanol extract showed higher SOD activity than that of the *P. crispum* hydrothermal extract at all concentrations.. At a concentration of 16,000 mg/L, *P. crispum* ethanol extract showed the highest SOD activity of $128.45 \pm 0.70\%$. The elastase inhibitory assay also showed concentration dependence and elastase inhibition of

[†] 주 저자 (e-mail: msshin@eulji.ac.kr
call: 031-740-7423

P. crispum ethanol extract was $99.99 \pm 1.54\%$, which was the highest at 2,000 mg/L. To solve the problem of insolubility and to improve skin permeability of the extract, PCL-PEG polymer micelle containing *P. crispum* ethanol extracts and 1% cell permeable peptide, hexa-D-arginine (R6) were successfully prepared with a particle size of 40.10 nm. In the results of 24 hours of skin permeation experiment, total accumulated beta-carotene amounts showed $37.99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in *Petroselinum crispum* extracts and $68.38 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (1.8 times) in *P. crispum* extract of the particles..

Keywords: antioxidant, ethanol extract, *Petroselinum crispum*, polymer micelle, skin permeability

1. 서 론

최근 화장품에 대한 트렌드의 변화는 피부를 아름답게 가꾸고자 하는 사람들의 관심과 비례하게 증가하는 경향을 보이며 최근에는 현대인들의 주요 관심사인 건강과 자연에 맞추어 화장품 시장도 변화하는 추세이다[1]. 그중 자연주의 화장품의 가치가 높아지면서 천연추출물을 함유한 화장품의 소비가 증가하고 있다. 더불어 후세에도 깨끗한 지구를 물려줄 지속가능성에 초점을 둔 천연물 소재에 대한 관심이 높아지고 있다. 천연물 소재중 하나인 파슬리(*Petroselinum crispum*)는 식용으로 사용될 뿐만 아니라 파슬리의 비타민 A, B군은 신진대사를 촉진하고 면역체계를 강화해주며 파슬리에 다량 함유되어 있는 beta-carotene의 경우 항산화 효능이 매우 뛰어난 성질을 가지고 있어 피부 노화를 막을 수 있는 유효성분으로 사용 가능하다[2]. 이와 같은 특성상 파슬리는 천연추출물의 한 종류로서 화장품 원료로서의 활용 가능성이 높고 지속적인 연구개발을 진행한다면 화장품의 천연 신소재로써 이용될 수 있는 가능성이 충분할 것으로 사료된다. 하지만 파슬리는 화장품 유효성분으로 사용 시 화장품 제형으로 완전히 가용화 되지 않는 문제가 있으며 완전히 가용화 되지 않은 화장품 제형의 사용은 피부의 구조적인 특성에 따라 유효성분의 투과적 측면에서 한계를 보인다[3].

이 한계를 극복하기 위해 제형화가 어려운 소수성 추출물이 수용액상에서 잘 분산될 수 있는 가용화 시스템에 대한 개발연구가 진행되고 있으며 대표적으로 고분자 미셀 시스템이 난용성 성분의 가용화를 위한 제형으로서 사용되고 있는 추세이다[4]. 고분자 미셀은 유전자 및 분자 표적 약물 등의 전달을 위해 상이한 조성을 갖는 다수의 블록 공중합체의 성질을 지니며 수용액 상에서 소수성인 성질과 친수성인 성질을 가지는 블록을 함께 가지고 있는 양친매성 고분자의 특징을 가지고 있다[5].

고분자 미셀을 이용할 경우, 난용성 성분을 효과적으로 녹일 수 있다는 장점이 있다. 고분자 미셀로 사용되는

polycaprolactone (PCL)은 저렴한 생분해성 폴리에스테르이며 양친매성 합성 복합체의 소수성 블록으로 사용된다. Polyethylene glycol (PEG)는 고분자 미셀의 친수성 잔기로 널리 사용되고 생체적합성이 뛰어나며 세포독성이 거의 없는 특징을 가지고 있다[6]. 이는 PCL과 PEG의 배합 비율을 다양하게 변형시켜 가용화 되지 않는 성분을 가용화 시켜 화장품 제형에 효과적으로 적용할 수 있을 뿐만 아니라 입도의 감소에 도움을 주어 경피투과도 또한 증진될 것으로 사료된다[7].

한편 피부의 가장 바깥쪽에 위치한 표피의 각질층은 라멜라 구조를 형성하여 피부 장벽 기능으로 작용하므로 경피 약물 전달시 외부 물질의 투과를 방해할 수 있어 기능성 물질의 경피투과가 제한된다. 이러한 문제를 해결하기 위해 펩티드 화장품이 기능성 화장품 원료중 하나로 주목받고 있으며 그 중 세포 투과 펩티드(cell penetrating peptide)를 피부에 적용하는 연구 또한 증가하고 있다[8]. 펩티드는 신체 내에서 화학적 전달자 역할을 하며 이 중 단백질 투과 도메인(protein transduction domain, PTD)로부터 유래된 세포 투과 펩티드는 양이온성 아미노산인 arginine으로 인하여 세포막으로의 통과가 쉽다고 알려져 있다. 이는 세포막 및 각질층의 세포간 지질과 유사적인 구조를 가지고 있어 피부침투 시 화장품 제형의 한 요소로 사용될 수 있다. 따라서 세포 침투성 펩티드의 핵심 아미노산 서열인 arginine oligomer를 추가한다면 유효성분의 피부 흡수를 증가시키고 그 효과를 극대화 할 수 있을 것이라고 판단된다[9].

본 연구에서는 파슬리 추출물의 열수 추출물 및 에탄올 추출물에 대하여 총 polyphenol 함량, DPPH radical 소거능, SOD 유사 활성능, elastase 활성 저해능을 측정하였고, 피부흡수 증진 및 가용화를 위해 파슬리 에탄올 추출물을 함유한 PCL-PEG 고분자 미셀을 제조하고자 하였으며, 파슬리 에탄올 추출물의 피부 흡수를 증진시키기 위해 세포 투과 펩티드중 하나인 R6 (hexa-D-arginine)를 함께 적용하여 경피 투과도 증가를 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 기기 및 시약

유럽산 파슬리(*Petroselinum crispum*)는 (주)건화약품(Korea)에서 구매하였으며, 이를 세척 및 건조 과정 후에 밀봉하여 -20°C 에서 보관하며 사용하였다. 실험별 사용된 기기 및 시약은 다음과 같다. 항산화 실험과 항균시험에 사용된 polyphenol, DPPH, ABTS 등 각 실험 제조에 사용된 용액은 Sigma aldrich (USA)의 제품을 사용하였고 실험에 사용한 기기는 흡수 분광광도계(SYNERGY HTX, Korea), 원심분리기(Supra-25K, Hanil Scientific Inc., Korea), 항온기(C-WBE-L, ChangShin Science, Korea), 입도 분석기(Nanotracs Flex, Microtrac, USA), Franz Diffusion Cells Systems (CWB-11 PermeGear, USA) 등이고, PCL-PEG copolymer (Mn = 2,500, Mw = 2,500, ratio of PCL to PEG = 1 : 1)는 Sigma aldrich (USA)에서 구매하였고, R6 (hexa-D-arginine)는 (주)더마팜(Korea)에서 구입하였다.

2.2. 시료추출

파슬리 분말을 70% 에탄올, 정제수(물)를 이용해 각각 추출하였다. 에탄올 추출물은 파슬리 분말에 10배의 70% 에탄올을 가하여 3 일 동안 추출하여 필터를 통해 여과한 후 농축과정을 거쳐 동결건조 시켰다. 열수 추출물은 파슬리 분말에 10배의 정제수를 가하여 80°C 의 항온조에서 4 h 동안 추출하고 여과한 후 동결건조시켜 냉동 보관 하였다.

2.3. 항산화 실험 측정

2.3.1. 총 Polyphenol 함량 측정

Polyphenol의 정량은 Folin-denis의 방법을 응용하여 측정하였다[10]. Folin-Ciocalteu phenol reagent $100\ \mu\text{L}$ 에 농도 별로 희석한 시료용액 $100\ \mu\text{L}$ 를 넣고 실온에서 3 min 동안 반응시킨 후 Na_2CO_3 용액 $100\ \mu\text{L}$ 을 넣고 ELISA reader로 $760\ \text{nm}$ 에서 흡광도를 측정한 후 폴리페놀 함량을 산출하였다. 실험 시 사용한 검량곡선은 표준물질로 garlic acid를 사용하였다.

2.3.2. DPPH Radical 소거능 측정

DPPH radical scavenging을 이용한 항산화 효과의 측정은 Blois의 방법을 변형하여 실험하였다[11]. 추출물 용액 $100\ \mu\text{L}$ 에 $0.45\ \text{mM}$ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 용액 $120\ \mu\text{L}$ 을 넣고 암실에서 30 min 반응 후 ELISA reader로 $530\ \text{nm}$

에서 흡광도를 측정 후 양성대조군인 ascorbic acid와 비교하여 결과를 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity}(\%) = (\text{Ac}^b - \text{At}^a) / \text{Ac} \times 100$$

^a At is the absorbance of samples

^b Ac is the absorbance of DPPH solution

2.3.3. ABTS Radical 소거능 측정

ABTS radical scavenging을 이용한 항산화 효과의 측정은 Van den Berg의 실험방법을 변형하여 시행하였다[12]. $7\ \text{mM}$ 2,2-azinobis (3-ethylbenzothianoline-6-sulfonic acid)와 $2.4\ \text{mM}$ potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24 h 동안 방치하여 ABTS를 만든 후 phosphate buffered saline에 희석하여 사용하였다. 각 추출물 용액 $20\ \mu\text{L}$ 에 ABTS 용액 $180\ \mu\text{L}$ 를 넣고 암실에서 7 min 동안 반응 시킨 후 ELISA reader로 $734\ \text{nm}$ 에서 흡광도를 측정 후 양성대조군인 ascorbic acid와 비교하여 결과를 계산하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity}(\%) = (\text{Ac}^b - \text{At}^a) / \text{Ac} \times 100$$

^a At is the absorbance of samples

^b Ac is the absorbance of ABTS solution

2.3.4. Superoxide Dismutase (SOD) 측정

SOD 유사활성은 Marklund의 방법을 변형하여 실시하였다[13]. 실험은 SOD assay kit (BCBV5418, Sigma, Korea)을 이용하여 진행하였다. 각 추출물 시료용액 $20\ \mu\text{L}$ 에 Reagent working solution을 $200\ \mu\text{L}$ 씩 넣고 buffer solution를 $20\ \mu\text{L}$, Enzyme working solution을 $20\ \mu\text{L}$ 을 넣은 후 37°C incubation에서 20 min 반응 후 ELISA reader로 $420\ \text{nm}$ 에서 흡광도를 측정 후 양성대조군인 ascorbic acid와 비교하여 결과를 계산하였다.

$$\text{SOD similar activity}(\%) = [1 - (\text{absorbance in the sample addition group} / \text{absorbance in the no additives})] \times 100$$

2.4. Elastase 저해활성 측정

Elastase 저해활성 측정은 Cannell의 방법을 변형하여 측정하였다[14]. 실험은 EnzCheck[®] Elastase Assay Kit (E-12056)을 이용하여 실시하였다. 1x Reaction buffer를 이용하여 파슬리 추출물을 희석한 후 $100\ \text{mg/mL}$ DQ elastin solution 과 $0.2\ \text{U/mL}$ elastase를 이용하여 96-well black plate

에 실험 후 실온에서 30 min incubation 시킨 후 ELISA reader로 480 nm excitation, 535 nm emission 의 형광조건에서 측정 후 양성대조군인 N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide 를 사용하여 결과를 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate of elastase(\%)} = [1 - (\text{absorbance in the sample addition group} / \text{absorbance in the no additives})] \times 100$$

2.5. Polymer Micelle 제조 및 입자크기 측정

PCL-PEG (polycaprolactone-polyethyleneglycol)을 사용한 polymer micelle의 제조 과정은 다음과 같다. 99.9% 에탄올에 파슬리 에탄올 추출물을 총 량의 1% 넣어서 섞은 후 교반기로 65 °C로 온도를 유지해 주면서 함량비가 50 : 50 인 PCL-PEG를 총 량의 5% 투입한 후 에탄올을 모두 휘발 시키고 정제수를 소량씩 투여 하여 최종 무게를 맞추었다. 총 량은 100 mL를 기준으로 제조 하였고 세포 투과 펩티드(R6)를 혼합한 PCL-PEG 고분자 미셀은 10 mL 기준 R6를 1% 첨가한 후 증류수로 최종 무게를 맞췄다. PCL-PEG를 함유한 각 제조 조건은 Table 1과 같다.

화장품 제형의 안정도 및 피부흡수에 영향을 주는 물리

화학적 특성인 입자크기와 입도 분포는 dynamic light scattering system (Microtrac, USA)를 이용하여 3회 측정하였다.

2.6. 피부 투과 실험

2.6.1. HPLC를 통한 *P. crispum*의 지표성분 측정

파슬리의 성분으로는 apigenin과 beta-carotene 등이 있다 [15,16]. 향후 피부침투 실험에서는 함량이 비교적 높고 물에 잘 녹지 않지만 항산화 효능을 많이 가지고 있어 화장품 제제로 사용될 가능성이 높은 beta-carotene을 지표 성분으로 선정하여 제형별로 피부 투과량을 분석하였다. 지표 성분으로 정한 베타카로틴의 HPLC 분석 조건은 Table 2에 제시하였고, 본 연구에서 사용되는 파슬리 에탄올 추출물에서 beta-carotene은 $4,954 \pm 318 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ 함량을 나타내었다.

2.6.2. 피부 투과 실험을 위한 제형 제조

Table 3에서 보는 바와 같이, 피부 투과 실험을 위해 3가지로 제형을 제조하였고, 파슬리 추출물만을 함유한 Formulation 0, 파슬리 추출물의 polymer micelle을 함유한 Formulation 1, 이 polymer micelle에 세포투과펩티드(R6)를 첨가한 Formulation 2로 구분하였다.

Table 1. Composition of *P. crispum* Extraction Formulation for PCL-PEG

Classification	Phase	Component	w/w %
Formulation 1	Ethanol	99.9 ethanol	25.0
	Active	<i>P. crispum</i> ethanol extract	1.0
	Polymer micelle	PCL-PEG ^a	5.0
	Water	Distilled water	up to 100
Formulation 2	Protein	R6 ^b (cell permeable peptide)	1.0 of total polymer micelle.

PCL-PEG^a : Ratio of PCL to PEG = 50 : 50

R6^b : cell permeable peptide, hexa-D-arginine

Table 2. Ingredients of *P. crispum* with HPLC Analysis

HPLC system	Agilent 1200
Detector	PDA
Column	Shiseido C18 (3.9×200 mm, 10μM)
Column temperature	30 °C
Mobile phase	A : Methanol 90% B : Acetonitrile 10% + TEA 9μM
Wave length of detection	UV 475 nm
Flow rate	0.9 ml/min
Sample volume	10 μL
Run time	8 min

Table 3. Conditions of Formulation

Formulation	Composition
Formulation 0 (<i>P. crispum</i> ethanol extract)	10 mg/L <i>P. crispum</i> ethanol extract was dissolved in 99.9% ethanol and purified water at a ratio of 7 : 3
Formulation 1 (Polymer micelle)	1.0% active (<i>P. crispum</i> ethanol extract) in water
Formulation 2 (Polymer micelle + R6)	0.1% R6 in Formulation 1 (Polymer micelle)

All formulations were prepared on the basis of 10 ml.

2.6.3. 경피투과 실험

Franz cell diffusion 진행방법은 다음과 같다. Franz cell diffusion에 인공피부 Neoderm®-E (Tegoscience, Korea)를 장착하고 receptor chamber 위에 각질층이 위를 향하도록 놓았다. 이후 donor chamber를 각질층 위에 올려 고정시킨 후 receptor chamber에 receptor medium인 PBS (Sigma aldrich, USA)를 8.5 mL 채워주었다. 온도는 항온수조(LabHouse, Korea)로 37 °C를 유지하였고, 30 min 동안 안정화시킨 뒤 실험제형 500 µL를 1.326665 cm² 면적의 피부에 도포하였다. 투과된 시료가 균일하게 혼합되도록 stirbar는 500 rpm을 유지하면서 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 후에 각각 sampling port를 통해 시료가 용해되어있는 receptor medium을 500 µL 채취하고, 동량의 receptor medium을 보충하였다. 채취한 receptor medium은 HPLC (Agilent, USA)를 이용하여 정량하였다. 자세한 실험조건은 Table 4에 제시하였다.

Table 4. Conditions of Skin Penetration Experiment

Skin	Neoderm®-E
Receptor medium	PBS 8.5ml (add 5.0% Tween 80)
Sampling aliquot	500 µL
Donor chamber area	1.326665 cm ²
Stirbar speed	500 rpm
Sampling time	4, 8, 12, 16, 20, 24 (h)
Temperature	37 °C

Table 5. Total Polyphenol of Extracts from *P. crispum*

Samples	Extraction method	Total polyphenol (mg/g)
PCE ^a	Ethanol extraction	121.68 ± 2.49
PCH ^b	Hydrothermal extraction	72.42 ± 1.52

Values represent the mean ± SD of three independent experiments.

^a PCE: *P. crispum* ethanol extract

^b PCH: *P. crispum* hydrothermal extract

2.7. 통계측정

모든 실험은 3회 반복하였고 모든 값을 평균과 표준 편차로 표시하였다. 통계 분석은 t-test, 일원 분산 분석 (ANOVA)을 사용하였으며 일원 분산 분석(ANOVA)의 사후분석으로 LDS를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 파슬리 추출물의 수율

파슬리 추출물을 70% 에탄올, 열수에서 추출한 결과 에탄올로 추출한 PCE (PCE: *P. crispum* ethanol extract)에서 25.1%, 열수 추출인 PCH (PCH: *P. crispum* hydrothermal extract)에서 15.9%로 파슬리 에탄올 추출물에서 높은 수율을 확인하였다.

3.2. 파슬리 추출물의 항산화 효과

3.2.1. 총 Polyphenol 함량

총 polyphenol의 함량을 측정결과는 추출물 방법에 따라 다음과 같이 나타났다(Table 5). 파슬리 에탄올 추출물에서 121.68 ± 2.49 mg/g 파슬리 열수 추출물에서 72.42 ± 1.52 mg/g의 polyphenol이 각각 확인되어 파슬리 에탄올 추출물에서의 총 polyphenol 함량이 더 많은 것을 확인하였다.

3.2.2. DPPH Radical 소거능 측정

DPPH radical은 수소 공여체의 활성을 측정하는 방법 방법의 하나이다. DPPH radical은 페놀성 화합물, 방향족 아민류 등에 의해 수소 및 전자를 받으면 보라색 빛을 띠는 라디칼로서 항산화 물질과 반응하면 노란빛으로 변하는 특징을 가지고 있다[17]. 파슬리 추출물을 250 ~ 2,000 mg/L에 따라 측정한 결과 파슬리 에탄올, 열수 추출물에서 농도

의존적인 결과를 보였으며 파슬리 에탄올 추출물 2,000 mg/L에서 90.49%의 가장 높은 라디칼 소거능이 나타났다 (Table 6).

3.2.3. ABTS Radical 소거능 측정

ABTS radical cation은 짙은 녹색을 띠는 라디칼로 항산화 물질과 반응함에 따라 연한 녹색으로 탈색되는 특징이 있다. ABTS는 potassium persulfate의 반응에 의해 생성된 ABTS free radical이 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 연한 초록색으로 탈색되는 정도의 측정으로 시행된다[18]. 그 결과 파슬리 추출물을 농도(200 ~ 800 mg/L)에 따라 측정한 결과 파슬리 에탄올, 열수 추출물 각각 농도 의존적인 결과를 보였으며 파슬리 에탄올 추출물 800 mg/L에서 $91.08 \pm 0.14\%$ 의 가장 높은 라디칼 소거능이 나타났다(Table 7).

Table 6. Scavenging Effect of *P. crispum* DPPH Assay

Concentration	Extraction	M	SD	<i>p</i>
250 ppm	PCE ^a	13.94	± 4.24	0.192
	PCH ^b	8.98	± 3.48	
500 ppm	PCE	35.32	± 6.10	0.030**
	PCH	21.69	± 3.72	
1,000 ppm	PCE	69.78	± 1.48	0.000***
	PCH	43.99	± 1.75	
2,000 ppm	PCE	90.48	± 0.46	0.000**
	PCH	83.92	± 0.13	

Values represent the mean ± SD of three independent experiments.

Positive control : Ascorbic acid 200 µg/mL to 97.47%, ***p* < 0.05, ****p* < 0.01.

^a PCE: *Petroselinum crispum* ethanol extract

^b PCH: *Petroselinum crispum* hydrothermal extract

Table 7. Scavenging Effect of *P. crispum* Extract on ABTS Assay

Concentration	Extraction	M	SD	<i>p</i>
200 ppm	PCE ^a	35.11	± 0.83	-
	PCH ^b	- ^c	- ^c	
400 ppm	PCE	81.75	± 0.36	0.000***
	PCH	19.93	± 1.35	
800 ppm	PCE	91.08	± 0.14	0.000**
	PCH	69.63	± 0.55	

Values represent the mean ± SD of three independent experiments.

Positive control : Ascorbic acid 500 µg/mL to 100.27%, ***p* < 0.05, ****p* < 0.01.

^a PCE: *P. crispum* ethanol extract

^b PCH: *P. crispum* hydrothermal 1 extract

^c It showed negative value

3.2.4. Superoxide Dismutase (SOD)

SOD 유사활성 측정 실험은 자동산화에 의한 발색을 이용하는 항산화능 측정 방법이다. 실험에 사용하는 시료에 superoxide를 저해 시키는 물질은 SOD 혹은 SOD 유사활성 물질이 존재하는 경우 산화에 의한 발색을 억제할 수 있으며, 발색이 억제되는 정도를 비교하여 시료의 항산화 효과를 측정할 수 있다. 파슬리 추출물은 에탄올, 열수 추출물에서 모두 농도 의존적인 SOD 유사활성 효과를 보였다. 그 중 파슬리 에탄올 추출물에서 $128.45 \pm 0.70\%$ 의 SOD 유사 활성능이 나타났다(Table 8).

3.3. Elastase 활성 저해능

피부의 진피에 존재하는 elastase는 진피 내 피부의 탄력을 유지하는 fibroectin, collagen, elastin을 포함해 다양한 단백질을 분해 할 수 있는 효소이다[19]. 이는 활성이 높아 피부조직 파괴 시 직접적인 영향이 되어 주름의 정도를 측정하는 효능평가에서 다루어 져야 하는 부분이다. 피부의 주름개선에 효과가 있는 정도의 확인을 위해 농도(250 ~ 2,000 mg/L)에 따라 elastase 저해능을 측정한 결과 파슬리 에탄올, 열수 추출물 각각 농도 의존적인 결과를 보였으며 파슬리 에탄올 추출물 2,000 mg/L에서 가장 높은 $99.99 \pm 1.54\%$ 의 elastase 저해능이 나타났다(Table 9).

Table 8. Scavenging Effect of *P. crispum* Extract on SOD Assay

Concentration	Extraction	M	SD	<i>p</i>
1,000 ppm	PCE ^a	37.03	± 5.08	0.453***
	PCH ^b	34.30	± 1.18	
2,000 ppm	PCE	57.26	± 1.47	0.132***
	PCH	57.23	± 5.26	
4,000 ppm	PCE	74.47	± 5.30	0.121***
	PCH	70.17	± 1.69	
8,000 ppm	PCE	89.86	± 1.35	0.056***
	PCH	86.99	± 1.27	
16,000 ppm	PCE	128.45	± 0.70	0.000***
	PCH	99.86	± 1.00	

Values represent the mean ± SD of three independent experiments.

Positive control : Ascorbic acid 500 µg/mL to 97.46%, *** *p* < 0.01.

^a PCE: *P. crispum* ethanol extract

^b PCH: *P. crispum* hydrothermal extract

Table 9. Scavenging Effect of *P. crispum* on Elastase Assay

Concentration	Extraction	M	SD	<i>p</i>
500ppm	PCE ^a	61.90	± 1.64	0.003***
	PCH ^b	4.85	± 6.43	
1,000ppm	PCE	72.37	± 1.65	0.000***
	PCH	26.66	± 4.36	
2,000ppm	PCE	99.99	± 1.54	0.088*
	PCH	79.99	± 2.85	

Inhibitory effect of PCE, PCH against elastase. Results are expressed as mean ± SD of data obtained from three independent experiments. Positive control : N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide 10 µg/mL to 20.00% (inhibition activity), * *p* < 0.1, **** *p* < 0.01.

^a PCE: *P. crispum* ethanol extract

^b PCH: *P. crispum* hydrothermal extract

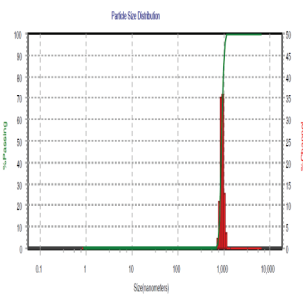
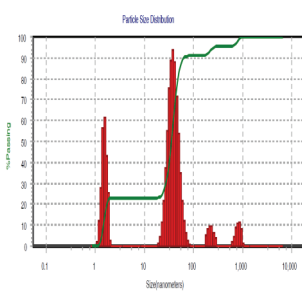
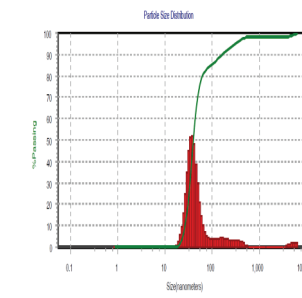
3.4. 고분자 미셀 제조 및 입자크기

위의 실험결과로부터 파슬리는 항산화 및 주름 개선을 가지며 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 효과가 좋은 것을 확인하였다. 하지만 파슬리 에탄올 추출물은 물에 난용성이라는 문제가 있었고, 이에 PCL-PEG 고분자를 이용하여 가용화시키고자 하였다. PCL-PEG는 소수성의 PCL과 친수성의 PEG의 공중합체로 양친성을 가지므로 수용액 상에서 미셀을 형성하여 소수성의 물질을 포집할 수 있다. 이는 PCL과 PEG의 배합비를 다양하게 조절하여 다양한 난용성 물질을 가용화시킬 수 있고, 생체적합성 고분자라는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 파슬리 에탄올 추출물만 함유한 것(Formulation 0), 파슬리 에탄올 추출물의 고분자 미셀(Formulation 1), 파슬리 에탄올 추출물의 고분자 미셀과 세포투과펩티드(R6)가 혼합된 것(Formulation 2)을 제조하여 난용성인 파슬리 에탄올 추출물을 가용화시키는 데 성공하였고, 입도 분석을 결과를 Table 10에 제시하였다. 파슬리 에탄올 추출물만 함유한 Formulation 0, 이것을 고분자 미셀로 제조한 Formulation 1, 그리고 이것을 고분자 미셀과 R6가 혼합된 Formulation 2의 입자크기는 각각 895.0, 54.3, 40.1 nm로 고분자 미셀을 적용하여 입자크기를 1 / 20배 이상 줄일 수 있었다. 따라서 고분자 미셀을 활용하여 난용성인 파슬리 에탄올 추출물을 가용화시켰을 뿐만 아니라 입도의 감소로 경피 투과도 또한 증진될 것으로 사료된다.

3.5. 피부 투과 시험 결과

Franz cell diffusion의 실험조건(Table 4)과 파슬리 추출물의 지표성분인 beta-carotene의 HPLC 분석조건(Table 2)으로 시간에 따른 누적된 피부 투과 시험 결과를 Table 11과 Figure 1에 나타내었다. 3가지 제형 즉 파슬리 에탄올 추출물만 함유한 것(Formulation 0), 파슬리 에탄올 추출물의 고분자 미셀(Formulation 1), 파슬리 에탄올 추출물의 고분자 미셀과 세포투과펩티드(R6)가 혼합된 것(Formulation 2) 모두 4 h 는 투과량이 급격히 상승한 후에, 24 h 까지 완만한 상승세를 보였다. 4 h에서의 누적 투과량은 각각 16.66 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 26.34 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 35.48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 세포투과펩티드를 함유한 Formulation 2의 누적 투과량이 가장 높았다. 24 h의 누적 피부 투과량은 Formulation 2(68.38 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), Formulation 1(60.58 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), Formulation 0(37.99 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)의 순서로 확인되었다. 이는 단순히 정제수와 에탄올에 파슬리 추출물을 함유한 제형보다 고분자 미셀을 이용한 제형의 형태가 피부침투를 더 증가시킬 수 있음을 나타낸다. 나아가 고분자 미셀에 세포투과 펩티드인 R6를 함께 적용하면 경피 투과도가 상당량 증가하는 것을 알 수 있었고 이를 통해 세포투과 펩티드에 의해 파슬리 에탄올 추출물의 피부 흡수가 증진되어 그 효능이 극대화될 것으로 생각된다.

Table 10. Particle Size of *P. crispum* Ethanol Extract, Polymer Micelle and Polymer Micelle + R6

	Formulation 0 (<i>P. crispum</i> ethanol extract)	Formulation 1 (Polymer micelle)	Formulation 2 (Polymer micelle + R6)
Particle size			
M	895.0 nm	54.3 nm	40.1 nm
SD	± 16.00	± 16.97	± 22.89

The average particle size was repeated three times and a weighted average and standard deviation were presented. The distribution of particle size's percentage was calculated as a weighted average.

Table 11. Epidermal Penetration Experiment's Result using Franz Cell According to Formulation with *P. crispum*

Classification	Formulations			F(p)	
	Formulation 0 (<i>P. crispum</i> ethanol extract)	Formulation 1 (Polymer micelle)	Formulation 2 (Polymer micelle + R6)		
4h	M (SD)	16.66 ^a (1.52)	26.34 ^b (2.01)	35.48 ^c (1.68)	82.837 (0.000) ^{***}
	post hoc	LSD = c > b > a			
8h	M (SD)	26.38 ^a (2.11)	39.45 ^b (2.09)	45.60 ^c (1.73)	73.368 (0.000) ^{***}
	post hoc	LSD = c > b > a			
12h	M (SD)	32.27 ^a (1.73)	46.89 ^b (2.42)	56.10 ^c (1.73)	101.881 (0.000) ^{***}
	post hoc	LSD = c > b > a			
16h	M (SD)	34.29 ^a (2.13)	54.41 ^b (1.85)	61.40 ^c (1.45)	177.519 (0.000) ^{***}
	post hoc	LSD = c > b > a			
20h	M (SD)	36.89 ^a (2.50)	57.91 ^b (1.82)	64.48 ^c (1.66)	151.701 (0.000) ^{***}
	post hoc	LSD = c > b > a			
24h	M (SD)	37.99 ^a (1.65)	60.58 ^b (1.66)	68.38 ^c (1.77)	260.274 (0.000) ^{***}
	post hoc	LSD = c > b > a			

Formulation with *P. crispum* Each value represents the mean and SD Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA, ^{***}*p* < 0.01.

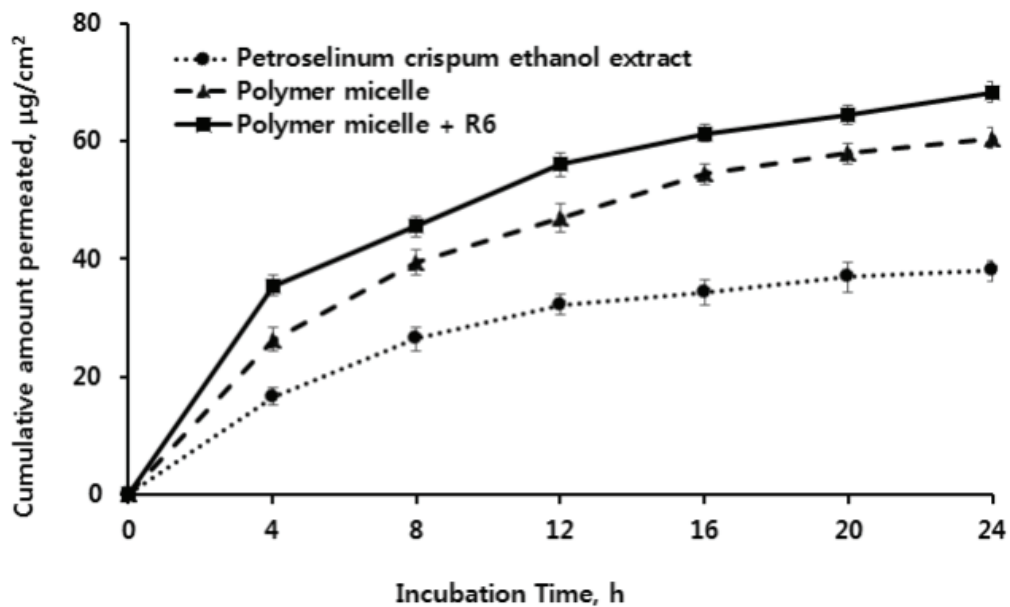


Figure 1. *In vitro* skin penetration profiles of *P. crispum* ethanol extract and polymer micelle polymer micelle + R6 through epidermal skin and penetration cumulative amount.

4. 결 론

본 연구에서는 파슬리에 대한 열수 및 에탄올 추출물의 생리활성을 확인하고, 고분자 미셀과 세포투과 펩티드를 이용하여 난용성 약물의 가용화, 안정화, 나노입자수준으로 입자크기 감소 및 피부흡수의 증가효과를 측정하였다.

파슬리 추출물의 항산화 효과를 측정한 결과를 살펴보면, 총 polyphenol 함량은 파슬리 에탄올 추출물에서 121.68 ± 2.49 mg/g으로 파슬리 열수 추출물(72.42 ± 1.52 mg/g)에 비해 더 많은 것을 확인하였다. DPPH radical 소거능 결과에서는 파슬리에탄올 추출물이 농도 2,000 mg/L에서 $90.48 \pm 0.46\%$ 의 radical 소거능을 보였으며 동일 농도의 파슬리 열수 추출물 보다 높은 radical 소거능이 나타났다. ABTS radical 소거능은 800 mg/L 농도에서 파슬리 에탄올 추출물은 $91.08 \pm 0.14\%$ 이며, 파슬리 열수 추출물이 $69.63 \pm 0.55\%$ 을 나타내었다. SOD 실험결과, 농도 의존적인 결과를 확인하였으며 모든 농도에서 파슬리 에탄올 추출물의 SOD 활성능이 파슬리 열수 추출물보다 높았고 16,000 mg/L의 농도에서 파슬리 에탄올 추출물이 $128.45 \pm 0.70\%$ 의 가장 높은 SOD 활성능을 나타내었다.

주름개선 효과를 나타내는 elastase 저해율 결과를 살펴보면, 2,000 mg/L에서 파슬리 에탄올 추출물의 elastase 저해율은 $99.99 \pm 1.54\%$ 이며, 파슬리 열수 추출물은 $79.99 \pm 2.85\%$ 의 저해율을 나타내었고, 에탄올 추출물이 더 좋은 효과를 나타내었다. 미백효과를 나타내는 tyrosinase 실험과 항균실험에서는 파슬리 추출물의 화장품으로서의 효능을 확인하지 못했다. 모든 항산화 및 주름개선 실험에서, 파슬리 에탄올 추출물이 파슬리 열수 추출물에 비해 대체적으로 높은 효능을 확인하였다.

한편, 파슬리 에탄올 추출물은 물에 난용성 물질을 함유하고 있으며 이는 PCL-PEG고분자 미셀을 적용하여 가용화 제형을 성공적으로 제조하였다. 또한 경피흡수를 증진시키기 위해 세포투과펩티드(R6)를 첨가된 고분자 미셀 제형을 제조하였다. 에탄올 추출물만 함유한 제형(Formulation 0), 파슬리 에탄올 추출물의 고분자 미셀 제형(Formulation 1), 파슬리 에탄올 추출물의 고분자 미셀과 세포투과펩티드(R6)가 혼합된 제형(Formulation 2)의 입도크기는 각각 895.0, 54.3, 40.1 nm로 입자크기를 1 / 20배 이상 줄일 수 있었다. 또한 24 h 동안의 피부침투 실험 결과에서, 총 축적된 beta-carotene의 투과량은 Formulation 2 ($37.99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Formulation 1 ($60.58 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Formulation

0 ($68.38 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)의 순서로 확인되었다.

결론적으로 고분자 미셀과 세포투과펩티드를 활용하여 난용성인 파슬리 에탄올 추출물을 성공적으로 가용화하였고, 입자크기도 나노입자 수준으로 감소시켰으며, 피부흡수 증가를 확인하였다. 이를 통해 고분자 미셀을 이용한 제형의 피부침투로서의 가능성을 확인할 수 있었으며, 나아가 고분자 미셀에 세포투과 펩티드(R6)를 함께 적용하면 피부흡수도가 상당량 증가하는 것을 알 수 있었고 이는 가용화 되지 않는 파슬리 추출물 및 난용성 성분을 함유한 천연추출물의 피부 흡수를 증진시킬 수 있는 하나의 방법으로 제시될 수 있다고 판단된다.

Acknowledgment

본 연구는 2017년도 과기정통부의 재원으로 한국연구재단 바이오·의료기기개발사업의 지원을 받아 수행되었습니다(No. 2017M3A9D8048416).

Reference

1. M. H. Oh, H. J. Park, S. H. Lee, and S. Y. Park, The effect of well-being lifestyle on perceived value and purchase intention of naturalistic cosmetics, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **8**(3), 175 (2010).
2. G. G. Duthie, Parsley, polyphenols and nutritional antioxidants, *Br. J. Nutr.*, **81**(6), 425 (1999).
3. Y. K. Cha, H. D. Cho, W. G. Cho, and S. Y. Byun, Studies on skin whitening efficacy and skin permeation using o/w nanoemulsion system with resorcinol dipentyl ether, *J. of Oil & Applied Science*, **34**(2), 225 (2017).
4. H. G. Yang, H. J. Kim, H. S. Kim, S. N. Park, Ethosome formulation for enhanced transdermal delivery of *Artemisia princeps Pampanini* extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **24**(2), 190 (2013).
5. S. J. Park, Y. J. Yang, S. Y. Shim, and D. H. Seo, Preparation and characterization of poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene glycol) microcapsules containing fragrant oil, *Appl. Chem. Eng.*, **13**(7), 697 (2002).
6. K. Sepideh, and K. Maryam, Preparation of PCL/PEG superporous hydrogel containing drug-loaded nanoparticles: The effect of hydrophobic-hydrophilic interface

- on the physical properties, *Eur. Polym. J.*, **58**, 180 (2014).
7. R. K. Jain, Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from in vivo imaging of gene expression and function, *J Control Release*, **74**(1-3), 7 (2001).
 8. P. Lundberg, and U. Langel, A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J. Mol. Recognit.*, **16**(5), 227 (2003).
 9. P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, and J. B. Rothbard, The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**(24), 13003 (2000).
 10. O. Folin, and W. Denis, On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents, *J. Biol. Chem.*, **12**(2), 239 (1912).
 11. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
 12. G. M. An, S. I. Park, M. G. Kim, and M. S. Shin, Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory effects of *Anemarrhena asphodeloides* extracts using supercritical extraction, *J. Invest. Cosmetol.*, **14**(4), 455 (2018).
 13. S. Marklund, and G. Marklund, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.*, **47**(3), 469 (1974).
 14. R. J. Cannell, S. J. Kellam, A. M. Owsianka, and J. M. Walker, Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors, *Planata Med.*, **54**(1), 10, (1988).
 15. A. Plazonic, F. Bucar, Z. Males, A. Mornar, B. Nigovic, and N. Kujundzic, Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using highperformance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, **14**(7), 2466 (2009).
 16. T. Daly, M. A. Jiwan, N. M. O'Brien, and S. A. Aherne, Carotenoid content of commonly consumed herbs and assessment of their bioaccessibility using an *in vitro* digestion model, *Plant Foods Hum Nutr*, **65**(2), 164 (2010)
 17. K. S. Cho, Inhibitory effect of DPPH radical scavenging activity and hydroxyl radicals (OH) activity of hydrocotyle sibthorpioides lamarck, *J. Life Sci.*, **26**(9), 1022 (2016).
 18. F. Natella, M. Maldini, G. Leoni, and C. Scaccini, Glucosinolates redox activities : can they act as antioxidants?, *Food Chem*, **149**, 226 (2014).
 19. D. Kligman, Cosmeceuticals, *Dermatol Clin*, **18**(4), 609 (2000).