Journal of the Korean Applied Science and Technology
Vol. 36, No. 3. September, 2019. 685~699
ISSN 1225-9098 (Print)
ISSN 2288-1069 (Online)
http://dx.doi.org/10.12925/jkocs.2019.36.3.685

세포투과 펩티드를 함유한 고분자 미셀 및 리포좀을 이용한 배나무 잎 추출물의 피부 흡수 증진

안규민* · 박수인 · 김민기 · 허수현 · 신문삼†

을지대학교 대학원 시니어헬스케어학과 화장품약리학 전공
(2019년 7월 17일 접수: 2019년 9월 14일 수정: 2019년 9월 17일 채택)

Enhancement of Skin Permeation of *Pyrus serotina var* Leaf Extract Using Polymer Micelle and Liposome Containing Cell Penetrating Peptide

Gyu Min An* · Su In Park · Min Gi Kim · Soo Hyeon Heo · Moon Sam Shin†

Department of Senior Healthcare, majored in Cosmetic Pharmacology, Eulji University, Seongnam, Gyeonggi 13135, Korea
(Received July 17, 2019; Revised September 14, 2019; Accepted September 17, 2019)

요 약 : 세포투과 펩티드를 함유한 고분자 미셀 및 리포좀을 이용한 배나무 잎 추출물의 피부 흡수 증진 및 화장품 성분으로의 응용가능성에 대해 알아보기 위해 항산화, 항균 실험 및 제형별 피부 침투 실험을 진행하였다. 총 polyphenol 함량은 배나무 잎 에탄올 추출물에서 118.83 ± 9.39 mg/g, 배나무 잎 열수 추출물에서 106.89 ± 4.45 mg/g로 확인되었다. DPPH radical 소거능 측정 결과, 500 mg/L의 농도에서 배나무 잎 에탄올 추출물이 74.39 ± 7.48%의 가장 높은 라디칼 소거능을 나타냈다. SOD 유사 활성능은 1,000 mg/L의 농도에서 열수 추출물이 91.62 ± 0.43%로 가장 높은 효능을 나타내었다. 이 후 실험으로부터 항산화, 주름 개선, 미백 활성이 확인되어 배나무 잎 추출물이 항산화 및 항균 소재로서의 실현가능성이 높다고 판단했다. 배나무 잎 에탄올 추출물을 함유한 고분자 미셀 피부침투 실험에서는 24시간 동안의 실험 결과, 총 축적된 tannic acid의 투과량은 Formulation 2(55.45 $\mu g/cm^2$), Formulation 1(46.43 $\mu g/cm^2$), Formulation 0(34.36 $\mu g/cm^2$)의 순서로 확인되었다. 배나무 잎 열수 추출물을 함유한 리포좀 피부침투 실험에서는 24시간 동안의 실험 결과, 총 축적된 tannic acid의 투과량이 Formulation 5(75.01 $\mu g/cm^2$), Formulation 4(64.01 $\mu g/cm^2$), Formulation 3(36.60 $\mu g/cm^2$)의 순서로 확인되었다. 이 연구를 통해 배나무 잎 추출물이 가지고 있는 항산화, 주름개선의 효능에 대한 가능성을 확인하였고 고분자 미셀 및 리포좀을 이용한 배나무 잎 추출물의 피부 침투 결과를 통해 향후 화장품 산업에 긍정적으로 이용될 것이라고 사료된다.

주제어 : 항산화, 세포투과 펩티드, 화장품, 배나무 잎, 피부 흡수

---

†Corresponding author
(E-mail: msshin@eulji.ac.kr)

Abstract : Antioxidant, antibacterial, and skin penetration tests were conducted to investigate the skin absorption of *Pyrus serotina var* leaf extracts using polymer micelles and their applicability to cosmetic ingredients. Total polyphenol content was found to be 118.83 ± 9.39 mg/g in *Pyrus serotina var* leaf ethanol extract and 106.89 ± 4.45 mg/g in *Pyrus serotina var* leaf hydrothermal extract. The DPPH radical scavenging activity was found to be the highest radical scavenging activity of 74.39 ± 7.48% of the *Pyrus serotina var* leaf ethanol extract at the concentration of 500 mg/L. The SOD-like activity was 91.62 ± 0.43%, the highest value at the concentration of 1,000 mg/L in the hydrothermal extract. After the experiment, antioxidation, wrinkle improvement and whitening activity were confirmed, and the *Pyrus serotina var* leaf extract was highly likely to be realized as antioxidant and antibacterial material. In the skin penetration experiment with the *Pyrus serotina var* leaf ethanol extract, the permeation amount of total accumulated tannic acid was found to be Formulation 2 (55.45 $\mu g/cm^2$), Formulation 1 (46.43 $\mu g/cm^2$), Formulation 0 (34.36 $\mu g/cm^2$). In the liposome's skin penetration experiment containing pear leaf hydrothemal extract, the total amount of accumulated tannic acid permeation was found to be Formulation 5 (75.01 $\mu g/cm^2$), Formulation 4 (64.01 $\mu g/cm^2$) and Formulation 3 (36.60 $\mu g/cm^2$). Through this study, we confirmed the possibility of antioxidant and wrinkle effects of *Pyrus serotina var* leaf extract. In addition, as a result of skin penetration through the production of polymer micelles and liposome containing *Pyrus serotina var* leaf extract, It will be more usable in cosmetic industry.

Keywords : Antioxidant, Cell penetrating peptide, Cosmetic, Pyrus serotina var leaf, *Skin permeation*

1. 서 론

국내 화장품산업은 지속적으로 발전하고 있으며 화장품 시장의 경쟁력 강화를 위한 정책 및 제도가 중요한 실정이다. 온라인 기반의 급속한 성장으로 인해 매순간 다양한 화장품에 노출될 뿐만 다양한 제품을 경험하고 본인이 원하는, 본인에게 맞는 화장품을 직접 만들어 사용하는 '맞춤형 화장품'의 시대가 도래 하고 있다[1]. 더불어 현대인들의 주요 관심사인 건강과 자연에 맞추어 화장품 시장도 변화하는 추세이다. 특히 자연주의 화장품에 대한 구매가 높아지면서 천연추출물을 함유한 화장품의 소비가 증가하고 있으며 생약을 포함한 식물성 원료에서 해양원료까지 지속가능성에 초점을 둔 천연물 소재에 대한 관심이 높아지고 있다[2]. 이러한 관심은 기업이 합성물질을 이용한 기능성 화장품의 개발을 줄이고, 식물 유래 천연물이 가지는 생리 활성 물질에 대한 연구를 통해 천연 신소재 개발을 하도록 촉구하고 있다. 식물성 천연 소재를 이용한 기능성 화장품에 대한 수요는 앞으로도 증가할 것으로 예상되므로 지속적인 연구개발이 필요할 것으로 판단된다[3].

지금까지 천연물에 관한 연구가 다수 진행되었지만 배나무 잎 (*Pyrus serotina var* Leaf) 추출물에 대한 연구는 부족한 실정이다. 배나무는 장미과 배나무속에 속하며 그 과실은 가래, 기침, 해열 등에 쓰여져 왔다. 또한 배의 세포벽은 셀룰로오즈, 당단백질, 페놀계 등으로 구성되어 있으며 최근 배에 함유되어있는 페놀계 물질에서 다양한 기능성 성분이 함유되어 있음이 밝혀지고 있는 실정이다. 하지만 기능성 성분이 함유되어 있어 화장품 성분으로의 사용이 용이할 수 있음에도 불구하고 우리나라에 자생하는 배나무는 특별한 용도가 없이 방치 혹은 소각되고 있다[4]. 배나무 에 대한 사전 연구 및 상황을 고려해 볼 때 배나무 잎에 관한 연구개발을 진행한다면 화장품의 천연 성분으로써 이용할 수 있는 가능성이 충분할 것으로 사료된다.

하지만 배나무 잎은 화장품 유효성분으로서 화장품 제형에 포함시킬 시 완전히 가용화 되지 않는 문제가 있으며 완전히 가용화 되지 않은 화장품 제형의 사용은 피부의 구조적인 특성에 따라 유효성분의 투과적 측면에서 한계를 가진다[5]. 이러한 한계를 극복하기 위해 제형화가 어려운 소수성 추출물이 수용액상에서 잘 분산될 수 있

는 가용화 시스템에 대한 개발연구가 진행되고 있으며 대표적으로 고분자 미셀이 잘 녹지 않은 성분들의 가용화를 위한 방법으로 많이 사용되고 있다[6].

PCL-PEG은 이러한 고분자 미셀 연구의 일환이다. PCL-PEG는 소수성 PCL(polycaprolactone)과 친수성 PEG(polyethyleneglycol)의 공중합체(copolymer)로 양친매성을 가지므로 수용액 상에서 미셀(micelle)을 형성하여 소수성의 물질을 포집할 수 있으며 생체적합성 고분자라는 장점을 가지고 있다. 이는 PCL과 PEG의 배합비율을 다양하게 조절하여 잘 녹지 않는 물질을 가용화시킬 수 있음을 시사한다[7]. 이를 이용하면 난용성 천연 소재의 유효성분을 가용화시켜 화장품 제형에 적용할 수 있을 뿐만 아니라 입도의 감소로 경피 투과도 또한 증진될 것으로 사료된다.

더불어 활성 성분을 효율적으로 피부에 침투시킬 수 있는 전달체로 사용되는 리포좀의 이용도 상용화 되고 있다. 리포좀은 라멜라 액정을 형성하는 양친매성 지질의 많은 양을 물에 분산시키면 두 분자의 막이 둥글게 된 소포제를 뜻한다[8]. 리포좀은 세포막 또는 각질층의 세포간지질과 구조적으로 유사한 이중층으로 구성되어 있어 리포좀 내부의 활성 성분을 효과적으로 세포 내로 전달 가능하여 경피 투과에 효과적일 것으로 판단된다.

한편 피부의 최외각에 위치한 각질층은 라멜라 구조를 형성하고 있어 피부 장벽 기능으로 작용하므로 경피 약물 전달시 외부 물질의 투과를 방해할 수 있다. 외부물질에 대한 보호기능으로는 적합하나 이는 곧 기능성 물질의 경피 투과의 제한을 가져온다. 이러한 문제를 해결하기 위해 펩티드 화장품이 기능성 화장품 원료중 하나로 주목받고 있으며 그 중 세포 투과성 펩티드(cell penetrating peptide)를 피부에 적용하는 연구 또한 증가하고 있다[9]. 세포 투과성 펩티드란, 약 10-30개 정도의 짧은 세포 투과성 펩티드로 대부분 단백질-투과 도메인(Protein-Transduction Domain)과 막 이동 시퀀스(Membrane-Translocation Sequence)로부터 유래 되었다. 일반적인 외부 물질의 세포 내 경로와는 달리 세포 투과성 펩티드는 세포막에 손상을 주지 않으면서 세포내로 이동이 가능하고 세포내로 투과되지 못하는 분자량이 큰 단백질 까지도 세포내로 전달시킬 수 있는 역할을 한다[10]. 대부분의 펩티드는 신체의 화학적 전달자 역할을 하며 세포 투과 펩티드는 양이온성 아미노산인 arginine으로 인하여 세포막으로의 통과가 쉽다고 알려져 있고 이는 세포막과 피부 각질세포간지질의 유사적인 구조를 가지고 있어 피부침투 시 화장품 제형으로 사용 될 수 있다. 여기에 세포 침투성 펩티드의 핵심 아미노산 서열인 arginine oligomer를 추가하여 화장품의 유효성분으로 사용한다면 천연 추출물의 생리활성 성분의 피부 흡수를 증가 시키고 생리활성 성분의 발현을 극대화 할 수 있을 것이라고 판단된다[11].

본 연구에서는 배나무 잎 추출물의 화장품으로서 효능을 확인하기 위해 배나무 잎 에탄올 추출물 및 열수 추출물의 항산화(총 polyphenol 함량, DPPH radical 소거능, SOD 유사 활성능), 주름개선(elastase 활성 저해능), 미백(tyrosinase 활성 저해능) 활성을 측정하고자 하였고, 화장품 유효성분으로서의 효과를 증진 및 가용화를 위해 배나무 잎 추출물을 함유한 PCL-PEG 고분자 미셀 및 리포좀을 제조하고자 하였으며, 배나무 잎 추출물의 피부 흡수를 증진시키기 위해 세포투과 펩티드 중 하나인 R6(hexa-D-arginine)를 함께 적용하여 경피 투과도 증가를 확인하고자 하였다.

2. 실 험

2.1. 재료

본 연구에 사용된 배나무 잎(*Pyrus serotina var* Leaf)은 강원도 횡성군 강림면 부곡리에서 채취한 것을 세척 및 건조 과정을 거친 후 밀봉하여 -22 ℃에서 보관하며 사용하였다.

2.2. 시약 및 기기

실험별 사용된 기기 및 시약은 다음과 같다. 항산화 실험과 항균시험에 사용된 polyphenol, DPPH, ABTS 등 각 실험 제조에 사용된 용액은 Sigma aldrich(Korea)의 제품을 사용하였고 실험에 사용한 기기는 흡수 분광광도계(SYNERGY HTX, Korea), 원심분리기(Supra-25K, Hanil Scientific Inc., Korea),항온기(CHANGSHIN SCIENCE, Korea), 입도 분석기(Nanoctrac Flex, Korea), Particlemetrix (Stabino® Paticle Charge Mapping, Korea), Franz Diffusion Cells (PermeGear, USA)이다. PCL-PEG 고분자 (Mn=2,500, Mw= 2,500 ; PCL와 PEG 비율 1:1)는 Sigma aldrich (USA)에서 구매하였으며,

R6(hexa-D-arginine)는 Dermafirm Co. (Seongnam, Korea)에서 구입하였다.

2.3. 시료 제조

배나무 잎 분말을 80% 에탄올, 정제수(물)를 이용해 각각 추출하였다. 에탄올 추출물은 배나무 잎 분말에 20배의 80% 에탄올을 가하여 3일 동안 추출하여 필터를 통해 여과한 후 농축과정을 거쳐 동결건조 시켰다. 열수 추출물은 파슬리 분말에 10배의 정제수를 가하여 80 ℃의 항온조에서 4시간 동안 추출하고 여과한 후 동결 건조시켜 냉동 보관하였다.

2.4. 총 polyphenol 함량 측정

총 polyphenol 함량은 Folin-Denis의 방법을 응용하여 측정하였다[12]. 일정 농도로 희석한 시료 100 μL에 Folin-Denis' reagent(Sigma Aldrich, USA)를 100 μL 가하여 3분간 반응시킨 후 10% Na_2CO_3를 100 μL 첨가하였다. 이 반응액을 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, USA)로 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid를 사용하여 검량선을 작성하였다.

2.5. DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 Blois의 방법을 응용하여 측정하였다[13]. 일정 농도로 희석한 시료 100 μL에 0.045 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(Sigma Aldrich, USA)를 100 μL 가하여 암실에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 Multi-Mode Microplate Reader로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 ascorbic acid(Samchun Chemicals, Korea)로 하였고, 소거능은 시료 첨가구와 시료 무 첨가구의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

DPPH radical scavenging activity(%) =
$(Ac^b - At^a) / Ac \times 100$
[a] At is the absorbance of samples
[b] Ac is the absorbance of DPPH solution

2.6. Elastase 활성 저해능 측정

Elastase 활성 저해능은 EnzChek elastase assay kit(ThermoFisher, USA)를 이용하여 측정하였다. 일정 농도로 희석한 시료 50 μL에 100 μg/L DQ elastin을 50 μL 가하고, 0.2 U/mL Elastase를 100 μL 첨가한 후 암실에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 Multi-Mode Microplate Reader로 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 형광도를 측정하였다. 양성대조군은 N-methoxyuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethyl ketone으로 하였고, 저해능은 시료 첨가구와 시료 무첨가구의 형광도 차이를 백분율로 나타내었다.

Inhibition rate of elastase(%) =
[1-(Absorbance in the sample addition group / absorbance in the no additives)] x 100

2.7. Tyrosinase 활성 저해능 측정

Tyrosinase의 활성 저해능은 Kubo 등의 방법을 응용하여 측정하였다[14]. 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 220 μL와 일정 농도로 희석한 시료 20 μL를 혼합한 후 2000U tyrosinase from mushroom(Sigma Aldrich, USA)을 20 μL 가하여 37 ℃에서 6분간 반응시키고, 1.5 mM L-tyrosine(Junsei, Japan)을 40 μL 첨가하였다. 이 반응액을 Multi-Mode Microplate Reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 kojic acid로 하였다.

Inhibition rate of tyrosinase(%) =
$[100-((b-b')/(a-a')) \times 100]$
a: Absorbance after reaction of blank,
b: Absorbance after sample liquid reaction
a',b': Absorbance measured by replacing with buffer solution

2.8. SOD 유사 활성능 측정

SOD 유사활성은 Marklund의 방법을 변형하여 실시하였다[15]. 실험은 SOD Assay Kit(BCBV5418, Sigma, Korea)을 이용하여 진행하였다. 각 추출물 시료용액 20 μL에 Reagent working solution을 200 μL씩 넣고 buffer solution를 20 μL, Enzyme working solution을 20 μL을 넣은 후 37 ℃ incubation에서 20 min 반응 후 ELISA reader로 420nm에서 흡광도를 측정 후 양성대조군인 ascorbic acid와 비교하여 결과를 계산하였다.

SOD similar activity(%) = [1-(absorbance in the sample addition group / absorbance in the

no additives)] x 100

2.9. 항균실험

배나무 잎 추출물의 항균 활성을 측정하기 위해서 disc diffusion test를 진행하였다. *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Propionibacterium acnes*는 한국미생물 보존센터(KCCM)와 생물자원센터(KCTC)에서 각각 분양받아 사용하였다. 실험에 사용된 균주인 Staphylococcus aureus, *Escherichia coli, Bacillus subtilis*는 Muller-Hinton medium을 사용하여 37 ℃에서 24 h 배양 뒤 1회 재 배양 뒤 분광광도계를 사용해 600 nm에서 흡광도를 맞추어 사용하였고 *Propionibacterium acnes*는 Reinforced closridial medium을 사용하였으며 가스팩을 완전하게 밀폐되는 용기에 넣어 혐기성 환경을 만들어 준 후 밀폐용기에서 72 h 배양 후 1회 재 배양 후 분광광도계를 사용해 600 nm에서 흡광도를 맞추어 사용하였다. 양성대조군으로 *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis*는 methyl paraben을, *Propionibacterium acnes*는 salicylic acid를 사용하였다.

2.10. 고분자 미셀 및 리포좀 제조방법

PCL-PEG(polycaprolactone-polyethyleneglycol)을 사용한 polymer micelle의 제조 과정은 다음과 같다. 99.9% 에탄올에 배나무 잎 에탄올 추출물을 총 량의 1% 넣어서 섞은 후 교반기로 60 ℃로 온도를 유지해 주면서 함량비가 50 : 50인 PCL-PEG를 총 량의 5% 투입한 후 에탄올을 모두 휘발 시키고 정제수를 소량씩 투여 하여 최종 무게를 맞추었다. 총 량은 100 mL를 기준으로 제조하였고 세포 투과 펩티드(R6)를 혼합한 PCL-PEG 고분자 미셀은 10 mL 기준 R6를 1% 첨가하였다. PCL-PEG를 함유한 각 제조 조건은 Table 1과 같다. 또한 레시틴(hydrogenated phosphatidyl choline)을 이용한 리포좀 제조처방은 Table 2에 나타내었다.

Table 1. Composition of *Pyrus serotina var* leaf extraction formulation for PCL-PEG

Classification	Phase	Component	w/w %
Formulation 1	Ethanol	99.9 ethanol	25.0
	Active	*Pyrus serotina var* Leaf ethanol extract	1.0
	Polymer micelle	PCL-PEG[a]	5.0
	Water	Distilled water	up to 100

PCL-PEG[a] : Ratio of PCL to PEG = 50 : 50. R6[b] : cell permeable peptide, hexa-D-arginine

Table 2. Composition of liposome formulation including *Pyrus serotina var* leaf extraction

Component	w/w %
Hydrogenated Phosphatidyl Choline	2.00
Potassium Cetyl Phosphate	1.00
Sodium Oleate	0.40
Glycerin	50.00
Ethanol	5.00
1,3 Propanediol	5.00
MCT(Caprylic/Capric triglycerides)	5.00
EDTA 2Na	0.03
Water	30.57
Pyrus serotina var leaf hydrothermal extract	1.00
Total	100

2.11. 경피 투과 실험

2.11.1 HPLC를 활용한 *Pyrus serotina var* Leaf 의 유효성분 분석

배나무 잎의 유효성분을 스크리닝 한 결과, tannic acid가 배나무 잎에 함유되어 있음을 알게 되었고 함량을 분석하기 위해 HPLC 분석조건을 이용하였다. 향후 실시한 피부 침투 실험에서는 폴리페놀의 일종으로 항산화 효과를 확인할 수 있을 것으로 판단된 tannic acid를 지표성분으로 선택하여 실험을 진행하였다. tannic acid의 HPLC 분석조건은 Table 3과 같다.

2.11.2 경피투과실험을 위한 제형 제조

위의 실험을 통해 배나무 잎 추출물의 항산화, 항균 효능에 대해 알게 되었으며, 배나무 잎 열수 추출물은 리포좀 제형으로 제조하였으며, 난용성 생리활성성분을 함유하는 배나무 잎 에탄올 추출물은 고분자 미셀을 제형으로 가용화하였다. 고분자 미셀 제형의 실험은 기존의 배나무 잎 에탄올 추출물과, 배나무 잎 에탄올 추출물을 함유한 고분자 미셀, 이 고분자 미셀에 피부 전달을 증가시시기 위해 세포투과 펩티드를 첨가하여 총 3가지 제형을 제조하였다. 리포좀 제형의 실험은 배나무 잎 열수 추출물과, 배나무 잎 열수 추출물을 함유한 리포좀, 이 리포좀에 피부 전달을 증가시시기 위해 세포투과 펩티드를 첨가하여 총 3가지 제형을 제조하였다. 따라서 총 6가지 제형으로 피부투과실험을 진행하였고 이는 Table 4과 같다.

2.11.3 경피투과실험

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

Table 3. HPLC operation conditions for tannic acid

Column	Shiseido C18 (4.6×250 mm, 5 μm)
Mobile phase	Water and Methanol (1:1)
Detector wavelength	UV 270 nm
Injection volume	20 μL
Flow rate	1 mL/min
Column temperature	25℃
Run time	10 min

Table 4. Conditions of formulation

Formulation	Composition
Formulation 0 (*Pyrus serotina var* Leaf ethanol extract)	10 mg/L *Pyrus serotina var* Leaf ethanol extract was dissolved in 99.9% ethanol and purified water at a ratio of 5 : 5
Formulation 1 (Polymer micelle)	1.0% active (*Pyrus serotina var* Leaf ethanol extract) in Polymer micelle
Formulation 2 (Polymer micelle + R6)	0.1% R6 in Formulation 1(Polymer micelle)
Formulation 3 (*Pyrus serotina var* Leaf hydrothermal extract)	10 mg/L *Pyrus serotina var* Leaf hydrothermal extract was dissolved in 99.9% ethanol and purified water at a ratio of 5 : 5
Formulation 4 (Liposome)	1.0% active (*Pyrus serotina var* Leaf ethanol extract) in Liposome
Formulation 5 (Liposome + R6)	0.1% R6 in Formulation 4(Liposome)

All formulations were prepared on the basis of 10 mL.

PBS (SigmaAldrich, USA)를 8.5 mL 채워주었다. 온도는 항온수조로 37 ℃를 유지하였고, 30분 동안 안정화시킨 뒤 실험제형 500 μL를 1.326665cm² 면적의 피부에 도포하였다. 투과된 시료가 균일하게 혼합되도록 500 rpm을 유지하면서 4, 8, 12, 16, 20, 24 시간 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 조건은 Table 5과 같다.

2.12. 입자크기 측정

화장품 제조 시 고려되어야 할 물리화학적 특성인 입자크기와 입도 분포는 Particle metrix (Stabino® Paticle Charge Mapping, DREAM Co., Suwon, Korea)를 이용하여 3회 측정 하였다.

2.13. 통계처리

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

3. 결과 및 고찰

3.1. 배나무 잎 추출물의 수율

배나무 잎 추출물을 80% 에탄올과 열수에서 추출한 결과, 에탄올 용매로 추출한 PSLE (PSLE: *Pyrus serotina var* leaf ethanol extract)에서 5.34%, 열수 추출인 PSLH (PSLH: *Pyrus serotina var* leaf hydrothermal extract)에서 6.90%로 배나무 잎 열수 추출물에서 높은 수율을 확인 하였다.

3.2. 총 polyphenol 함량 측정

배나무 잎 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위하여, 총 polyphenol의 함량을 측정하였다. 자연계에 널리 분포하는 천연 항산화제인 폴리페놀은 항산화 실험 시 중요한 요소로 적용되며 그 측정결과는 추출물 방법에 따라 다음과 같이 나타났다(Table 6). 배나무 잎 에탄올 추출물에서 118.83 ± 9.39 mg/g 배나무 잎 열수 추출물에서 106.89 ± 4.45 mg/g의 polyphenol이 각각 확인되어 배나무 잎 에탄올 추출물에서의 총 polyphenol 함량이 더 많은 것을 확인하였다.

Table 5. Franz diffusion cells and systems operation conditions

Skin	Neoderm®-E (Tegoscience, Korea)
Receptor medium	PBS (SigmaAldrich, USA) 8.5mL (add 5.0% Tween 80)
Sampling aliquot	500 μL
Donor chamber area	1.326665 cm²
Revolution per minute	500
Sampling time (hour)	4,8,12,16,20,24
Temperature	37°C

Table 6. Total polyphenol of extracts from *Pyrus serotina var* leaf

Samples	Extraction method	Total polyphenol (mg/g)
PSLE[a]	Ethanol extraction	118.83 ± 9.39
PSLH[b]	Hydrothermal extraction	106.89 ± 4.45

Values represent the mean ± SD of three independent experiments.

[a] PSLE: *Pyrus serotina var* leaf ethanol extract,

[b] PSLH: *Pyrus serotina var* leaf hydrothermal extract

3.3. DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical은 수소 공여체의 활성을 측정하는 방법 중 하나이며 식물 혹은 단일 화합물의 항산화능을 측정하기 위해 손쉽게 사용된다. DPPH radical은 페놀성 화합물, 방향족 아민류 등에 의해 수소 및 전자를 받으면 보라색 빛을 띠는 라디칼로서 항산화 물질과 반응하면 매우 빠른 속도로 전자를 받아들이면서 환원되어 노란 빛으로 변하는 특징을 가지고 있다[16]. 배나무 잎 추출물을 62.5-500 mg/L에 따라 측정한 결과, 500 mg/L의 농도에서 배나무 잎 에탄올 추출물이 74.39 ± 7.48%의 가장 높은 라디칼 소거능이 나타났다(Table 7).

3.4. Elastase 활성 저해능 측정

피부의 진피에 존재하는 elastase는 진피 내 피부의 탄력을 유지하는 fibrotectin, collagen, elastin을 포함해 다양한 단백질도 분해 할 수 있는 효소이다[17]. elastase는 활성이 높아 피부조직 파괴 시 직접적인 영향이 되어 주름의 정도를 측정하는 지표가 될 수 있으며 elastase의 활성을 저해하는 것은 피부노화를 예방하기 위해 매우 중요하다. 피부의 주름개선에 효과가 있는 정도의 확인을 위해 농도에 따라 elastase 저해능을 측정한 결과 배나무 잎 에탄올, 열수 추출물 각각 농도 의존적인 결과를 보였으며, 각각 낮은 농도에서도 elastase 활성 저해능을 확인할 수 있었다. 그 결과 배나무 잎 에탄올, 열수 추출물 모두 50-60%에 가까운 저해능이 나타났다(Table 8).

3.5. Tyrosinase 활성 저해능 측정

멜라닌은 세포소기관 중 하나인 멜라노좀에서 생성되는 색소이다. 멜라닌은 멜라노좀 안에 존재하는 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1(TRP1)과 tyrosinase-related(TRP2) 등의 여러 효소로 인해 생성된다. 그 중 tyrosinase는 tyrosine이 DOPA로 히드록시화 된 후 DOPA quinone으로 산화되는 과정에서 작용하는 주요 효소이며 멜라닌과 관련이 깊다. 이 실험을 통해 미백효과를 확인 할 수 있으며 배나무 잎 에탄올 추출물의 경우 20,000 mg/L의 농도에서 47.87 ± 5.80%의 미백효능을 확인하였고 배나무 잎 에탄올, 열수 추출물 모두 농도 의존적인 결과가 나타났다(Table 9).

3.6. SOD 유사 활성능 측정

세포의 호흡 작용에서 발생하는 활성산소인 SOD에 존재하는 free radical anion은 세포독성을 유발할 수 있어 신속히 제거 되어야 한다. 즉 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, 발

Table 7. Scavenging effect of *Pyrus serotina var* leaf DPPH assay

Concentration	Extraction	*M*	*SD*	*p*
62.5ppm	PSLE[a]	19.03	± 0.22	0.000***
	PSLH[b]	25.60	± 0.63	
125ppm	PSLE	27.39	± 0.87	0.000***
	PSLH	34.05	± 0.47	
250ppm	PSLE	37.68	± 3.12	0.016**
	PSLH	45.16	± 0.85	
500ppm	PSLE	74.39	± 7.48	0.292
	PSLH	51.91	± 0.49	

Values represent the mean ± SD of three independent experiments.
Positive control : Ascorbic acid 200 μg/mL to 97.81%. *$p < 0.1$, **$p < 0.05$, ***$p < 0.01$.
[a] PSLE: *Pyrus serotina var* leaf ethanol extract, [b] PSLH: *Pyrus serotina var* leaf hydrothermal extract

Table 8. Scavenging effect of *Pyrus serotina var* leaf on elastase assay

Concentration	Extraction	*M*	*SD*	*p*
4ppm	PSLE[a]	12.26	± 1.45	0.017**
	PSLH[b]	18.75	± 2.47	
8ppm	PSLE	18.24	± 2.30	0.012**
	PSLH	27.01	± 2.53	
16ppm	PSLE	26.88	± 0.74	0.000***
	PSLH	38.83	± 0.27	
32ppm	PSLE	41.83	± 1.23	0.001***
	PSLH	50.86	± 1.48	
64ppm	PSLE	50.02	± 0.56	0.014**
	PSLH	60.03	± 4.11	

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 23.90% (inhibition activity).
*$p < 0.1$, **$p < 0.05$, ***$p < 0.01$.
[a] PSLE: *Pyrus serotina var* leaf ethanol extract, [b] PSLH: *Pyrus serotina var* leaf hydrothermal extract

Table 9. Scavenging Effect of *Pyrus serotina var* leaf on tyrosinase assay

Concentration	Extraction	*M*	*SD*	*p*
5,000ppm	PSLE[a]	23.66	± 1.72	0.001**
	PSLH[b]	3.52	± 3.74	
10,000ppm	PSLE	32.07	± 2.18	0.002***
	PSLH	16.09	± 3.13	
20,000ppm	PSLE	47.87	± 5.80	0.014**
	PSLH	30.78	± 3.98	

Values represent the mean ± SD of three independent experiments. Positive control : Kojic acid 500 μg/mL to 94.75%. *$p < 0.1$, **$p < 0.05$, ***$p < 0.01$.
[a] PSLE: *Pyrus serotina var* leaf ethanol extract, [b] PSLH: *Pyrus serotina var* leaf hydrothermal extract

색이 억제되는 정도를 비교하여 시료의 항산화 효과를 측정할 수 있다. 배나무 잎 에탄올, 열수 추출물에서 모두 농도 의존적인 SOD 유사활성 효과가 나타났다. 그 중 배나무 잎 열수추출물 1,000 mg/L의 농도에서 91.62 ± 0.43%의 높은 SOD유사 활성능이 나타났다(Table 10).

3.7. 항균시험

배나무 잎 에탄올, 열수 추출물에 대해 4개의 균주(*Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Propionibacterium acnes*)로 항균실험을 시행하였다. 항균 실험의 경우 오직 *Propionibacterium acnes* 균주에서 배나무 잎 열수 추출물 10,000 mg/L의 농도가 10.0 ± 0.58 mm의 clear zone을 발현시켰다.

Table 10. Scavenging effect of *Pyrus serotina var* leaf on SOD assay

Concentration	Extraction	*M*	*SD*	*p*
62.5ppm	PSLE[a]	11.24	± 1.81	0.002***
	PSLH[b]	25.15	± 2.83	
125ppm	PSLE	24.57	± 3.96	0.001***
	PSLH	48.42	± 3.27	
250ppm	PSLE	37.22	± 3.58	0.000***
	PSLH	71.26	± 3.97	
500ppm	PSLE	64.65	± 2.20	0.000***
	PSLH	84.49	± 0.84	
1000ppm	PSLE	84.42	± 3.39	0.022**
	PSLH	91.62	± 0.43	

Values represent the mean ± SD of three independent experiments. Positive control : Ascorbic acid 500 μg/mL to 106.27%. $^{*}p < 0.1, ^{**}p < 0.05, ^{***}p < 0.01$.
[a] PSLE: *Pyrus serotina var* leaf ethanol extract, [b] PSLH: *Pyrus serotina var* leaf hydrothermal extract

3.8. 경피 투과 실험

3.8.1 경피 투과 실험 결과

Figure 1은 인공피부에 대한 고분자 미셀 제형의 배나무 잎 에탄올 추출물에 함유된 tannic acid의 시간 경과에 따른 총 함량을 보여준다. Formulation 0,1,2 모두 4시간 까지 투과량이 급격히 상승한 이후 24시간 까지 완만한 상승세를 보였다. 4시간에서의 누적 투과량은 각각 14.53 μg/cm² , 20.87 μg/cm² , 29.95 μg/cm² 으로 세포투과 펩티드를 함유한 Formulation 2의 누적 투과량이 가장 높았다. 24 시간의 피부 침투 실험동안 3가지 제형 모두 비슷한 경향으로 증가했으며 총 투과량은 제형 2(55.45 μg/cm²), 제형 1(46.43 μg/cm²), 제형 0(34.36 μg/cm²)의 순서로 확인되었다. 이는 단순히 정제수와 에탄올에 배나무 잎 에탄올 추출물을 녹인 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 배나무 잎 에탄올 추출물의 피부 흡수가 증진되어 그 효능이 극대화될 것으로 생각된다. 시간별 축적 투과량은 Table 11과 같다.

Figure 2은 인공피부에 대한 리포좀 제형의 배나무 잎 열수 추출물에 함유된 tannic acid의 시간 경과에 따른 총 함량을 보여준다. Formulation 3,4,5 또한 모두 4시간까지 투과량이 급격히 상승한 이후 24시간 까지 완만한 상승세를 보였다. 4시간에서의 누적 투과량은 각각 16.52 μg/cm² , 31.28 μg/cm² , 39.41 μg/cm² 으로 세포투과 펩티드를 함유한 Formulation 5의 누적 투과량이 가장 높았다. 24 시간의 피부 침투 실험동안 3가지 제형 모두 비슷한 경향으로 증가했으며 총 투과량은 Formulation 5(75.01 μg/cm²), Formulation 4(64.01 μg/cm²), Formulation 3(36.60 μg/cm²)의 순서로 확인되었다. 이는 단순히 정제수에 배나무 잎 열수 추출물을 녹인 제형보다 세포막 혹은 각질층의 세포간 지질과 구조적으로 유사한 리포좀을 이용한 제형의 형태가 피부침투를 더 증가시킬 수 있음을 나타낸다. 나아가 앞선 실험 결과와 마찬가지로 리포좀에 R6를 함께 적용하면 경피 투과도가 상당량 증가하는 것을 알 수 있었고 이를 통해 세포투과 펩티드가 제형에 관계없이 피부침투 능력을 향상시킴을 확인했다. 시간별 축적 투과량은 Table 12과 같다.

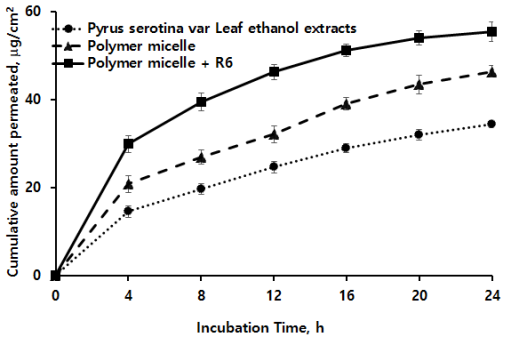


Fig. 1. In *vitro* skin penetration profiles of *Pyrus serotina var* leaf ethanol extract, Polymer micelle Polymer micelle + R6 through epidermal skin and penetration cumulative amount. *Pyrus serotina var* leaf ethanol extract is formulation 0, Polymer micelle is formulation 1, Polymer micelle + R6 is formulation 2.

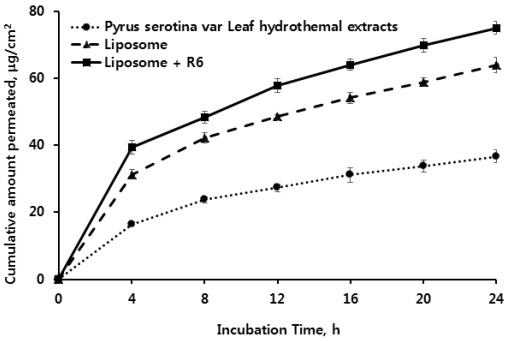


Fig. 2. In *vitro* skin penetration profiles of *Pyrus serotina var* leaf hydrothemal extract, Liposome, Liposome micelle + R6 through epidermal skin and penetration cumulative amount. *Pyrus serotina var* leaf hydrothemal extract is formulation 3, Liposome is formulation 4, Liposome micelle + R6 is formulation 5.

Table 11. Epidermal penetration experiment's result using Franz cell according to polymer micelle with *Pyrus serotina var* leaf

Classification		Formulation			
		Formulation 0 (*Pyrus serotina var* leaf ethanol extract)	Formulation 1 (Polymer micelle)	Formulation 2 (Polymer micelle + R6)	*F*(p)
4h	M *(SD)*	14.53^{a} (1.53)	20.87^{b} (1.93)	29.95^{c} (1.92)	59.386(0.000)***
	post hoc	*LSD = c > b > a*			
8h	M *(SD)*	19.67^{a} (1.29)	26.97^{b} (1.68)	39.54^{c} (1.99)	107.578(0.000)***
	post hoc	LSD = c > b > a			
12h	M *(SD)*	24.66^{a} (1.38)	32.15^{b} (1.89)	46.28^{c} (1.77)	126.174(0.000)***
	post hoc	LSD = c > b > a			
16h	M *(SD)*	28.97^{a} (0.96)	39.05^{b} (1.43)	51.25^{c} (1.40)	228.240(0.000)***
	post hoc	LSD = c > b > a			
20h	M *(SD)*	31.97^{a} (1.26)	43.46^{b} (2.18)	53.97^{c} (1.65)	120.272(0.000)***
	post hoc	LSD = c > b > a			
24h	M *(SD)*	34.36^{a} (0.84)	46.43^{b} (1.33)	55.45^{c} (2.22)	136.199(0.000)***
	post hoc	LSD = c > b > a			

Each value represents the mean and S.D. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA. $^{*}p < 0.1$, $^{**}p < 0.05$, $^{***}p < 0.01$.

Table 12. Epidermal penetration experiment's result using Franz cell according to liposome with *Pyrus serotina var* Leaf

Classification		Formulation			
		Formulation 3 (*Pyrus serotina var* Leaf hydrothemal extract)	Formulation 4 (Liposome)	Formulation 5 (Liposome + R6)	*F*(p)
4h	M *(SD)*	16.52^{a} (1.531)	31.28^{b} (1.93)	39.41^{c} (1.92)	188.370(0.000)***
	post hoc	*LSD = c > b > a*			
8h	M *(SD)*	23.71^{a} (1.29)	42.17^{b} (1.68)	48.42^{c} (1.99)	234.809(0.000)***
	post hoc	LSD = c > b > a			
12h	M *(SD)*	27.35^{a} (1.38)	48.52^{b} (1.89)	57.78^{c} (1.77)	415.715(0.000)***
	post hoc	LSD = c > b > a			
16h	M *(SD)*	31.10^{a} (0.96)	54.12^{b} (1.43)	63.99^{c} (1.40)	238.906(0.000)***
	post hoc	LSD = c > b > a			
20h	M *(SD)*	33.81^{a} (1.26)	58.86^{b} (2.18)	69.79^{c} (1.65)	359.150(0.000)***
	post hoc	LSD = c > b > a			
24h	M *(SD)*	36.60^{a} (0.84)	64.01^{b} (1.33)	75.01^{c} (2.22)	276.904(0.000)***
	post hoc	LSD = c > b > a			

Each value represents the mean and SD. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA. $^{*}p < 0.1$, $^{**}p < 0.05$, $^{***}p < 0.01$.

3.9. 입자크기 측정

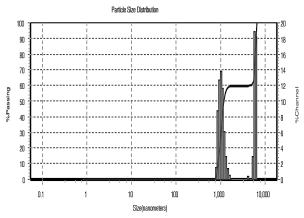
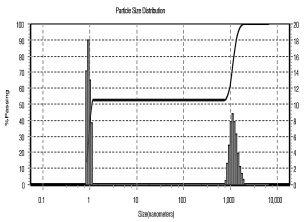
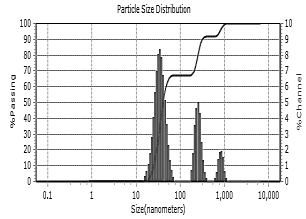
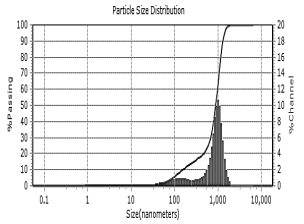
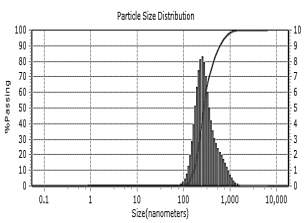
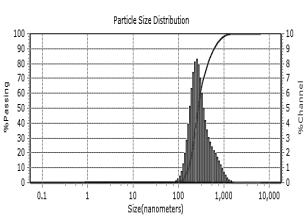
6가지 제형별 입자크기를 측정한 결과 고분자 미셀 제형의 경우 formulation2 〉 formulation1 〉 formulation 0 의 순서로 입자크기가 작음을 확인했다. formulation2 는 formulation 0에 비해 입자크기가 약16배 작았고 formulation1에 비해 입자크기가 약 1.7배 작았다. formulation 2의 입자크기가 가장 작은 이유는 미셀을 이용한 제형에서 배나무 잎 에탄올 추출물의 가용화가 잘 이루어 졌기 때문이라고 사료된다. 리포좀 제형의 경우 formulation 4 〉 formulation5 〉 formulation 3의 순서로 입자크기가 작음을 확인했다. formulation 3의 경우 입자크기는 833.66 nm, formulation 4는 338.9 nm, formulation 5는 656.86 nm의 입자크기로 나타났다. 리포좀 제형의 실험에서는 세포투과 펩티드의 함유로 인해 피부침투는 잘 되었지만 세포투과 펩티드와 리포좀이 만나 발생한 겔화현상 때문에 입자크기가 커진 것으로 사료된다. 자세한 제형별 입자크기는 Table 13에 나타내었다.

4. 결 론

본 연구에서는 식물 유래 천연추출물을 이용한 친환경적이며 지속가능한 화장품의 연구 개발에 맞추어 배나무 잎(*Pyrus serotina var* Leaf)을 이용한 피부 흡수 증진 및 화장품 성분으로서의 응용에 대해 알아보고자 하였다. 따라서 배나무 잎 추출물의 항산화, 주름 개선, 미백 활성을 측정하여 배나무 잎의 생리 활성을 확인하였고, PCL-PEG 고분자 미셀을 제조하여 쉽게 가용화되지 않는 배나무 잎 추출물을 가용화시켰으며, 여기에 세포투과 펩티드인 R6를 사용하여 배나무 잎 추출물의 피부 흡수를 증진시켰다.

배나무 잎 에탄올 추출물 및 열수 추출물의 항산화, 주름 개선, 미백 활성을 측정한 결과 총 polyphenol 함량은 배나무 잎 에탄올 추출물에서

Table 13. Particle size of *Pyrus serotina var* leaf ethanol extract, polymer micelle, polymer micelle + R6 and *Pyrus serotina var* leaf hydrothemal extract, liposome, liposome +R6

	Formulation 0 (*Pyrus serotina var* leaf ethanol extract)	Formulation 1 (Polymer micelle)	Formulation 2 (Polymer micelle + R6)
Particle size			
M	3017.33 nm	322.83 nm	189.93 nm
SD	± 140.29	± 238.94	± 31.83
	Formulation 3 (*Pyrus serotina var* leaf hydrothemal extract)	Formulation 4 (Liposome)	Formulation 5 (Liposome + R6)
Particle size			
M	833.66 nm	338.90 nm	656.86 nm
SD	± 134.97	± 58.21	± 338.99

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.

118.83 ± 9.39 mg/g 배나무 잎 열수 추출물에서 106.89 ± 4.45 mg/g로 확인되었다. DPPH radical 소거능 측정 결과 500 mg/L 의 농도에서 배나무 잎 에탄올 추출물이 74.39 ± 7.48 % 의 가장 높은 라디칼 소거능이 확인되었다. elastase 활성 저해능은 64 mg/L의 매우 낮은 농도에서 각각 50.02 ± 0.56%, 60.03 ± 4.11%를 나타내어 에탄올 추출물과 열수 추출물 모두 주름 개선 활성이 60%에 가까운 것을 확인하였다. tyrosinase 활성 저해능은 20,000 mg/L의 농도에서 각각 47.87 ± 5.80%, 30.78 ± 3.98%를 나타내어 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 미백 활성이 높은 것을 확인하였다. SOD 유사 활성능은 1,000 mg/L의 농도에서 각각 84.42 ± 3.39%, 91.62 ± 0.43%를 나타내어 열수 추출물이 에탄올 추출물보다 항산화 활성이 높은 것을 확인하였다. 항균실험의 결과, 오직 *Propionibacterium acnes* 균주에서 배나무 잎 열수 추출물 10,000 mg/L의 농도가 10 ± 0.58 mm의 clear zone을 발현시켰다.

이로 인해 배나무 잎 추출물로 부터 항산화, 주름 개선, 미백 활성이 확인되어 배나무 잎 추출물이 항산화 및 항균 소재로서의 실현가능성이 높다고 사료된다. 위의 실험을 통해 배나무 잎 추출물의 항산화, 항균 효능에 대해 알게 되었으며 배나무 잎 에탄올 추출물은 고분자 미셀을 제형으로, 배나무 잎 열수 추출물은 리포좀 제형으로 피부투과실험을 진행하였다.

배나무 잎 에탄올 추출물을 함유한 고분자 미셀 제형별 피부침투 실험에서는 24시간동안의 실험 결과, 총 축적된 tannic acid의 투과량은 Formulation 2(55.45 $\mu g/cm^2$), Formulation

1(46.43 $\mu g/cm^2$), Formulation 0(34.36 $\mu g/cm^2$)의 순서로 확인되었다. 이를 통해 고분자 미셀을 이용한 제형의 피부침투로서의 가능성을 확인 할 수 있었으며 고분자 미셀로 사용한 PCL-PEG의 화장품 산업으로의 실현가능성이 높다고 판단되었다. 나아가 고분자 미셀에 세포투과 펩티드인 R6를 함께 적용하면 경피 투과도가 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 생각한다. 피부 침투 실험 이후 진행한 입자 크기 측정결과 또한 Formulation 2 〉 Formulation 1 〉 Formulation 0 의 순서로 입자크기가 작아짐을 확인 하였다. 이와 같은 이유는 고분자 미셀을 이용한 제형에서 배나무 잎 에탄올 추출물의 가용화가 보다 잘 이루어 졌기 때문이라고 사료된다. 배나무 잎 열수 추출물을 함유한 리포좀 제형별 피부침투 실험에서는 24시간동안의 실험 동안 총 축적된 tannic acid의 투과량이 Formulation 5(75.01 $\mu g/cm^2$), Formulation 4(64.01 $\mu g/cm^2$), Formulation 3(36.60 $\mu g/cm^2$)의 순서로 나타났다. 이를 통해 리포좀 제형을 이용한 배나무 잎 열수추출물의 피부침투로서의 가능성을 확인할 수 있었으며 역시 세포투과 펩티드인 R6를 함께 적용하면 경피 투과도가 상당량 증가하는 것을 확인하였다.

이 연구를 통해 배나무 잎 추출물이 가지고 있는 항산화, 주름의 효능에 대한 가능성을 확인하였고 더불어 배나무 잎 추출물을 함유한 고분자 미셀 제조를 통한 피부침투 결과를 통해 천연추출물 성분으로서 향후 화장품 산업에서의 화장품 원료로서의 사용성이 높아질 것이라고 사료된다. 향후 각 제형에 대한 zeta potential과 입자크기의 상관관계에 대한 추가 실험을 통해 화장품 산업에서 배나무 잎 추출물의 원료 사용에 대한 폭넓은 응용을 제안하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 2017년도 과기정통부의 재원으로 한국연구재단 바이오의료기기개발사업의 지원을 받아 수행되었음(No. 2017M3A9D8048416).

References

1. K. S. Yoon, M. J. Kim, M. H. Kim, "*In vitro* screening of Jeju island plants for customerized cosmetics", *Journal of Oil & Applied Science*, Vol. **35**, No. 4 pp. 1487-1495 (2018).
2. G. B. Lee, A. R. Yeom, D. W. Kim, C. M. Park, M. S. Joung, G. Y. Lee, C. S. Jeong, "Evaluation of Alcea rosea L. callus extract as a aatural cosmetic ingredient", *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol. **44**, No. 3 pp. 295-302 (2018).
3. G. M. An, S. I. Park, M. G. Kim, M. S. Shin, "Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory effects of *Anemarrhena asphodeloides* extracts using supercritical extraction", *Journal of Investigative Cosmetology*, Vol. **14**, No. 4 pp. 455-462 (2018).
4. S. J. Lee, D. W. Park, H. G. Jang, C. Y. Kim, Y. S. Park, T. C. Kim, B. G. Heo, "Total phenol content, electron donating ability, and tyrosinase inhibition activity of Pear Cut Branch extract", *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, Vol. **24**, No. 3 pp. 338-341 (2006).
5. K. Sepideh, K. Maryam, "Preparation of PCL/PEG superporous hydrogel containing drug-loaded nanoparticles: The effect of hydrophobic-hydrophilic interface on the physical properties", *European Polymer Journal*, Vol. **58**, pp. 180-190 (2014).
6. R.K. Jain, "Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from *in vivo* imaging of gene expression and function", *Journal of Controlled Release*, Vol. **74**, No. 1-3 pp. 7-25 (2001).
7. S.J. Park, Y.J. Yang, S.Y. Shim, D.H. Seo, "Preparation and characterization of poly(ε-caprolactone)/poly(ethylene glycol) microcapsules containing fragrant oil", *Applied Chemistry for Engineering*, Vol. **13,** No. 7 pp. 697-702 (2002).

8. S. K. Jang, S. K. An, S. H. Jeon, "The moisturizing effect and formulation test of the cosmetics Composed by horse oil liposomes", *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetics Society,* Vol. **12** No. 6 pp. 813-820 (2014).
9. Wender P.A., Mitchell D.J., Pattabiraman K, Pelkey E.T., Steinman L, Rothbard J.B., "The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters", *PNAS,* Vol. 97, No. **24** pp. 13003-13008 (2000)
10. S. H. Lee, "Screening of skin-permeable peptide in thermal stabilizing formulation using phage display", *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. **46** No. 4, pp. 326-333 (2018).
11. Lundberg P, Langel U, "A brief introduction to cell-penetrating peptides", *Journal of Molecular Recognition,* Vol. **16**, No. 5 pp. 227-233 (2003).
12. Folin O, Denis W, "On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. **12,** No. 2 pp. 239-243 (1912).
13. M.S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical", *Nature*, Vol. **181**, pp. 1199-1200 (1958).
14. J. Y. Han, J. H. Sung, D. J. Kim, H. S. Jeong, J. S. Lee, "Inhibitory effect of methanol extract and its fractions from grape seeds on mushroom tyrosinase", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition,* Vol. **37**, No. 12 pp. 1679-1683 (2008).
15. S. Marklund, G. Marklund, "Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase", *European Journal of Biochemistry*, Vol. **47**, No. 3 pp. 469-474 (1974).
16. K. S. Cho, " Inhibitory effect of DPPH radical scavenging activity and hydroxyl radicals (OH) activity of h*ydrocotyle sibthorpioides lamarck*", *Journal of life science*, Vol. **26** No. 9 pp. 1022-1026 (2016).
17. B. K. Lee, H. I. Kang, K. J. Lee, "Screening and identification of actinomycetes producing novel elastase inhibitor", *The Korean journal of microbiology*, Vol. **33**, No. 4 pp. 225-231 (1997).