



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사학위논문

전위차 기술을 응용한 기능성 화장품 개발

Application of Electric Potential Difference to
Functional Cosmetics



조 현 대

2021 년 2 월

약학박사학위논문

전위차 기술을 응용한 기능성 화장품 개발

Application of Electric Potential Difference to
Functional Cosmetics

지도교수 한 상 배

약학부 제약산업전공

조 현 대

이 논문을 약학박사학위 논문으로 제출함.

2021 년 2 월

본 논문을 조현대의 약학박사학위 논문으로 청구함.

심 사 위 원 장 황 방 연 ⑩

심사부위원장 정 재 경 ⑩

심 사 위 원 이 강 태 ⑩

심 사 위 원 표 형 배 ⑩

심 사 위 원 한 상 배 ⑩

충 북 대 학 교 대 학 원

2021 년 2 월

차 례

Abstract	v
표 차례	vii
그림 차례	ix
ABBREVIATIONS	xii
I. 서 론	1
1. 미세먼지와 피부	1
2. 피부장벽과 경피전달 시스템	6
3. 화장품 제형과 제타포텐셜	14
4. 연구개발 방향	17
II. 실험재료 및 방법	20
1. 기기 및 시약	20
2. 미세먼지의 염증반응	20
2.1 세포 배양	20
2.2 역전사 증합효소 연쇄반응법 (RT-PCR)	21
2.3 ELISA	21
2.4 Western Blot	25
3. 제주 천연 자원의 활성 평가	25
3.1 추출 과정	25
3.2 DPPH Assay	26
3.3 ABTS Assay	26

3.4 미백활성 평가	27
3.5 세포독성과 항염	27
4. 영어자 미네랄 전이 추출법 및 그 활성 평가	28
4.1 미네랄 전이 추출 공법 정립	28
4.2 영어자의 추출방법	29
4.3 영어자 추출물의 세포활성 평가	30
4.4 영어자 추출물의 자극평가	31
4.5 영어자 추출물을 포함하는 리포솜 개발	32
4.6 영어자 추출물을 포함하는 니오솜(Niosome) 개발	33
5. 파운데이션 제조 실험	35
6. Franz Diffusuion Cell	37
7. 화장품 밀착력 평가 시험	37
8. Glabridin 함량 분석	38
9. 미세먼지 평가 시험	38
 III. 결 과	 39
1. 미세먼지에 의한 피부염 유발 기전	39
1.1 미세먼지가 melanocyte에 미치는 영향	39
1.2 미세먼지가 macrophage에 미치는 영향	41
(1) 미세먼지의 염증성 사이토카인 유발	41
(2) Raw264.7cell을 자극하는 미세먼지의 최소 농도	43
(3) Raw264.7cell에서 미세먼지에 의한 MAPK 인산화 증가	45
(4) Raw264.7cell에서 미세먼지에 의해 활성화된 MAPK의 기능 ..	47
(5) Raw 264.7cell에서 미세먼지에 의해 의한 NF- κ B 활성화	49
1.3 미세먼지가 keratinocyte에 미치는 영향과 그 최소 농도	50
(1) 미세먼지의 염증성 사이토카인 유발	50
(2) 미세먼지가 keratinocyte 세포를 자극하는 최소 농도	50

(3) HaCaT 세포에서 미세먼지에 의한 MAPK 인산화 증가	53
2. 제주 천연소재 개발	55
2.1 제주 천연소재 선정 및 추출	55
2.2 제주 천연소재 39종의 항산화 활성 평가	58
2.3 제주 천연 소재 39종의 피부 미백 및 주름개선 활성 평가	69
2.4 제주 천연 소재 39종의 세포독성 평가 및 항염 효과	72
3. 영여자를 이용한 추출법 확인과 그 활성 평가	82
3.1 미네랄 전이 추출 공법 정립	82
(1) 미네랄 전이 추출	82
(2) 영여자 전이 추출물들의 세포 활성 평가	86
(3) 영여자 숙성 추출물의 기간별 효능 확인	89
3.2 영여자 전이 추출물의 생리활성 평가	92
(1) 영여자 전이 추출물의 주름 개선 평가를 위한 배경	92
(2) 추출 조건별 영여자 추출물의 콜라겐 생합성 효과	94
(3) 추출 조건별 영여자 추출물의 MMP-1 생성억제 효과	97
(4) 미네랄/슈크로오즈 추출물의 MMP-1 메커니즘 분석	99
(5) 미네랄/슈크로오즈 추출물의 면역 과민반응 확인	104
(6) 영여자 추출물의 지표 물질 확인	106
(7) 영여자 추출물의 안전성 평가	106
3.3 영여자 숙성 추출물의 나노캡슐화를 통한 상승효과	109
(1) 영여자 추출물을 이용하여 리포솜 및 캡슐 제조	109
(2) 영여자 추출물을 담지한 리포솜의 포집률 확인	116
(3) 나노캡슐 (NIOSOME)의 처방 구성과 함량 설정	118
(4) 영여자 전이 추출물을 함유한 NIOSOME의 안정성 평가	121
4. 전위차 기술을 이용한 화장품 개발	123
4.1 전기역학적 균질화를 위한 시그널 장치 구성	123

4.2 TLC 및 제타전위 확인을 통한 시그널 선정	126
4.3 제타포텐셜과 입경에 따른 피부 밀착력 비교	131
4.4 제타포텐셜과 입경에 따른 자외선에 의한 손상 감소 확인	142
4.5 시그널 처리에 따른 경피흡수 평가	148
4.6 시그널 처리에 따른 화장품 제형의 물성 평가	154
5. DPF 기술의 개발	158
5.1 미세먼지 실험장치 구축	158
5.2 DPF의 미세먼지 차단효과에 대한 인체 적용 시험	161
 IV. 고찰	 172
 V. 참고문헌	 175
 <국문 초록>	 183
 감사의 글	 185

Application of Electric Potential Difference to Functional Cosmetics*

Cho, Hyun Dae

*School of Pharmacy, Graduate School,
Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, 28160 Korea
Supervised by Professor Han, Sang Bae*

Abstract

In this study, Particulate matter are particles that are smaller than $2.5\mu\text{m}$, and they contain harmful substances such as heavy metals. They can penetrate the respiratory tract, blood vessels, and skin, causing adverse effects in the body. In particular, when skin comes directly in contact with the external environment, it's vulnerable to particulate matter because it penetrates through skin pores. Particulate matter penetrates sebaceous glands in hair follicles and mixes with bodily secretions to block pores, causing skin inflammation. In addition, free radicals produced by particulate matter reduce oxidative damage to skin cells and synthesize collagen in the skin to promote aging. Damage to the skin barrier causes various problems such as sensitive and rough skin. For this reason, cosmetics applied to the skin have a direct relationship with particulate matter. This study confirms that cosmetics can be applied to alleviate skin trouble caused by particulate

* A thesis for the degree of Doctor in February 2021.

matter, and then applying that to the cosmetics industry. First, the increase in cytokine caused by particulate matter and skin inflammation were confirmed using natural aerial bulbil extract. As a result, the path to wrinkle improvement was identified by evaluating MMP-1, type-1 procollagen, pro MMP-1 production, and AP-1 activity inhibition, which derives from skin damage. The stability and penetration effects were improved by applying the dioscorea bulbifera extract to the transdermal delivery system. Next, electric potential difference technology was applied to cosmetic formulations to form positive emulsion particles that improve adhesion and persistence in the skin. Accordingly, certain frequencies were investigated in cosmetic formulations that formed emulsion particles smaller and more homogenous, and improved the absolute value of the Zeta potential. As a result, it was confirmed that the dioscorea bulbifera extract suppresses skin aging by mitigating wrinkles caused by particulate matter, and inhibiting the production of collagen degrading enzymes by stimulating collagen production. In addition, applying a Zeta potential through frequency irradiation increased the affinity and absorption rate in the skin. Stability was also improved through the homogenization of emulsion particles. Through these results, I would like to present various approaches of protecting the skin from particulate matter.

Keywords: particulate matter, dioscorea bulbifera extract, ξ -zeta potential, cosmetics materials, electric potential difference

표 차례

표 1. 인공대기환경 조성장치 구성	4
표 2. 물리적인 경피흡수시스템	9
표 3. 제형학적인 경피흡수시스템	10
표 4. 니오솜(Niosome)의 제조 처방	34
표 5. 파운데이션의 제조 처방	36
표 6. 제주도내 자생/재배 식물 추출물 목록	56
표 7. 39종의 제주 소재에 대한 70% EtOH 추출 수율	57
표 8. 39종의 제주 소재에 대한 항산화 활성	68
표 9. 39종의 제주 식물종 소재에 대한 tyrosinase, elastase 효소 억제 활성	71
표 10. 39종의 제주 소재에 대한 세포독성과 NO 생성 억제능	78
표 11. 제주 천연소재 추출물의 사용부위 및 기능성 평가	80
표 12. 영여자 추출물을 담지한 리포솜 제조 처방	111
표 13. 영여자 추출물을 담지한 리포솜의 포집률 계산	117
표 14. 리포솜 원료의 최적 조건 설정	120
표 15. 영여자 전이 추출물을 함유한 니오솜의 농도별 입자 사이즈 및 제타포텐셜 측정 결과	122
표 16. 주파수 영역에 따른 화장품 수상부의 제타포텐셜값과 TLC/Rf 값	129

표 17. 선정된 3개 시그널 처리에 따른 비비크림 수상부의 입자크기 분포	130
표 18. 피험자 기본 정보	132
표 19. 밀착력 측정 결과	134
표 20. 시그널처리에 따른 자외선에 의한 손상효과	143
표 21. 시그널처리에 따른 자외선에 의한 진정효과	145
표 22. COS-50의 피부침투량 및 투과량 분석	149
표 23. COS-100의 피부침투량 및 투과량 분석	150
표 24. COS-100R의 피부침투량 및 투과량 분석	151
표 25. 대조군의 피부침투량 및 투과량 분석	152
표 26. 피 시험자 기본 정보	163
표 27. 잔여 미세먼지 분석 결과	165
표 28. 잔여 미세먼지 변화량	166

그림 차례

그림 1. 인공대기환경 조성장치 도면	5
그림 2. 제형적인 경피흡수 전달과 물리적 전달	8
그림 3. 다양한 나노 캡슐의 모식도	11
그림 4. 인지질(Phospholipid)을 활용한 리포솜 기술	12
그림 5. 미국에서의 경피흡수를 통한 약물전달 체계의 성장	13
그림 6. Diffuse electrical double-layer model	16
그림 7. 미세먼지가 B16F10 세포에 미치는 영향	40
그림 8. 미세먼지가 Raw 264.7 세포에 미치는 영향	42
그림 9. Raw 264.7 세포에 영향을 주는 미세먼지의 최소농도	44
그림 10. Raw 264.7 cell에서 미세먼지에 의한 MAPKs 활성화	46
그림 11. MAPKs 저해제에 의한 MAPKs 신호전달 억제와 염증성 사이토카인 발현 억제.	48
그림 12. 미세먼지에 의한 NF- κ B의 활성화	51
그림 13. HaCaT 세포에 영향을 주는 미세먼지의 최소농도	52
그림 14. HaCaT cell에서 미세먼지에 의한 MAPKs 활성화	54
그림 15. 제주 천연 소재 39종의 DPPH활성 평가	63
그림 16. 제주 천연 소재 39종의 ABTS활성 평가	67
그림 17. 제주 천연 소재 39종의 세포독성 및 항염 평가	77
그림 18. 영여자 숙성 추출물의 제조 공정도	84

그림 19. 이화학 평가를 위한 영여자 추출물	85
그림 20. 각 영여자 숙성 추출물의 세포활성 및 성장 효과 테스트	87
그림 21. 영여자 추출물 0.1% 적용 시 세포 성장 효과	88
그림 22. MTT Assay를 통한 숙성 기간별 영여자 전이 추출물의 세포활성 변화 결과	91
그림 23. 미네랄/슈크로오즈 추출법을 통해 추출한 영여자 추출물의 콜라겐 생합성 효과	96
그림 24. 미네랄/슈크로오즈 추출법을 통해 추출한 영여자 추출물의 MMP-1 억제 효과	98
그림 25. IFN- γ 처리 세포 내, 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영여자 추출물의 type-1 procollagen 생성 억제 효과	101
그림 26. IFN- γ 처리 세포 내, 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영여자 추출물의 proMMP-1 생성 억제 효과	102
그림 27. IFN- γ 처리 세포 내, 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영여자 추출물의 AP-1 활성 억제 효과	103
그림 28. 영여자 추출물의 항히스타민 효과	105
그림 29. 유정란을 이용한 CAM Assay	108
그림 30. 영여자-LDH 캡슐의 입자 분포 측정 결과	112
그림 31. 영여자-LDH 캡슐의 제타포텐셜 측정 결과	113
그림 32. 영여자-LDH 캡슐의 전자현미경 촬영 결과	114
그림 33. 영여자-LDH 캡슐의 분말 X선 회절시험 결과	115

그림 34. 전기역학적 균질화를 위한 시그널 장치 구성 모식도	124
그림 35. 시그널 개발 프로세스	125
그림 36. 시그널 파장종류에 따른 TLC결과	127
그림 37. 시그널 파장종류에 따른 제타전위 측정 결과	128
그림 38. 피부 상태에 따른 자기 평가	133
그림 39. 시그널 처리에 따른 밀착력 비교	135
그림 40. COS-50의 밀착력 비교 실험 결과 데이터	137
그림 41. COS-100의 밀착력 비교 실험 결과 데이터	139
그림 42. COS-100R의 밀착력 비교 실험 결과 데이터	141
그림 43. 시그널 처리에 따른 자외선에 의한 데미지 감소 효과	147
그림 44. 시그널 처리에 따른 경피흡수 평가	153
그림 45. 샘플 A (파운데이션)의 RFP 처리 시 제타포텐셜 측정결과	155
그림 46. 샘플 B (파운데이션)의 RFP 처리 시 제타포텐셜 측정결과	156
그림 47. 샘플 C (파운데이션)의 RFP 처리 시 제타포텐셜 측정결과	157
그림 48. 미세먼지 발생장치의 구성	160
그림 49. 피부 상태에 대한 자가 설문 평가	164
그림 50. 잔여 미세먼지 변화 분석 결과	167
그림 51. DPF 계산식을 통한 미세먼지 지수의 정량화	168
그림 52. 시험 제품의 잔여 미세먼지 촬영 결과	171

ABBREVIATIONS

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid

AP-1: Activator protein 1

BSA: *bovine serum albumin*

CAM: Chick Chorioallantoic Membrane

CC 50: Cyto-toxic Concentration

DPF: Dust Protection Factor

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ECL: Enhanced Chemiluminescence

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ERK: extracellular signal-regulated kinase

HDFN: Human Dermal Fibroblast

HPLC: High Performanc Liquid Chromatography

IC 50: inhibitory concentration

IFN γ : Interferon gamma

IL: Interleukin

IRAK: Interleukin-1 receptor associated kinase

JNK: c-Jun N-terminal kinase

MAPKs: mitogen-activated protein kinase

MMP-1: Matrix metalloproteinase-1

MSA: Mineral/Sucrose Aging

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide

NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NO: Nitric Oxide

PA: Protection of UVA

PBS: Phosphate buffered saline

PM: Particular Matter

RFP TM: Resonar Formulated Process

ROS: Reactive Oxygen Species

RPM: Revolutions per minute

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

SPF: Sun Protection Factor

TAK-1: Transforming growth factor beta-activated kinase 1

TGF- β 1: Transforming growth factor beta 1

TLC: Thin Layer Chromatography

TNF- α : tumor necrosis factor- α , TNF- α

TRAF-6: TNF receptor associated factor-6

TTBS: Tris-buffered saline

I. 서론

1. 미세먼지와 피부

황사는 중국이나 몽골 등 아시아 대륙의 중심부에 있는 사막과 황토 지대에서 작은 모래나 먼지가 하늘에 떠다니다가 떨어지는 현상을 말한다. 황사에는 마그네슘, 규소, 알루미늄, 철, 칼륨, 칼슘 같은 산화물이 포함되어 있다. 이러한 황사보다 작은 입자를 형성하여 오는 공해를 미세먼지라고 한다(Dong *et al.*, 2015).

미세먼지는 우리 눈에 보이지 않는 아주 작은 물질로 대기 중에 오랫동안 떠다니거나 흩날려 내려오는 10 μm 이하의 물질을 통칭하는 것으로, 코에서 걸러지기도 하지만 초미세먼지는 기관지를 거쳐 폐에 흡착되거나 피부의 모공 속에 침투하기도 한다(Wheeler *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2017). 미세먼지는 면역력 저하를 통해 감기, 천식, 기관지염 등의 호흡기 질환이나 피부질환을 일으키고 있다(Li *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2011; Wallace *et al.*, 2011).

미세먼지는 입자크기에 따라 분류되는데, 지름이 50 μm 이하는 총 먼지(TSP, Total Suspended Particles)라 하며, 지름이 10 μm 보다 작은 미세먼지는 PM₁₀ (Particulate Matter 10), 2.5 μm 보다 작은 미세먼지는 PM_{2.5}라 한다.

이처럼 미세먼지는 매우 작기 때문에 대기 중에 머물러 있다가 호흡기를 거쳐 폐에 침투하거나 혈관을 따라 체내에 이동하여 들어가면서 건강에 악영향을 끼친다. 이를 증명하듯이 황사에 의해 기관지염, 피부염, 폐암 등의 질병 발병률이 증가하며 PM₁₀이 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 증가할 때마다 피부염의 증상이 평균 0.4% 증가하고 PM_{2.5}의 농도가 19 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 증가할 때마다 알러지성 비염, 천식

이 8 %, 피부염은 10 % 증가하는 것으로 보고된다. 특히 피부는 미세먼지에 취약한데 그 이유는 피부가 외부환경과 직접 맞닿는 신체의 가장 바깥 조직이며 모공의 지름이 20 ~ 50 μm 인데 반해 미세먼지는 이보다 작은 크기이기 때문에 모공을 통해 피부에 침투해 염증을 유발시키기 때문이다(Vierkotter *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019). 미세먼지가 피부의 유분과 엉겨 붙을 경우, 모공을 막으면서 피부의 노폐물 배출을 방해하기도 하고 비소, 카드뮴, 납 등 중금속 유해물질이 모낭 속 피지선에 염증을 유발해 피부트러블을 자극하기도 한다(Yoon *et al.*, 2012). 또한 미세먼지에 의해 생성된 활성산소는 콜라겐의 합성을 감소시키고 분해를 증가시켜 노화가 촉진되며, 증가된 활성산소에 의해 지질, 단백질 및 핵산에 산화적 손상을 가져오게 된다(Liu *et al.*, 2013). 단백질 산화에 의해 유발되는 세포의 비정상적인 기능은 색소 침착, 주름을 유발하여 피부 노화를 촉진한다(Ahn *et al.*, 2007). 염증과 단백질 산화 외에도 미세먼지에 의해 피부장벽이 손상되면서 피부가 민감해지고 피부 결이 거칠어지면서 이 역시 피부 노화를 촉진시키게 된다(Zhao *et al.*, 2016).

이러한 문제에 대처하기 위해 미세먼지 차단 효능을 갖는 다양한 화장품이 연구·개발되고 있으나 화장품이 어느 정도의 미세먼지 차단효능을 갖는지 여부를 측정하고 분석하는 시스템이 없는 실정이다. 따라서 미세먼지를 함유한 인공대기환경 조성장치를 이용하여 화장품의 미세먼지 차단능을 분석하기 위해 DPF 시스템을 구축하고자 한다.

DPF 시험법을 구축하기 위해 미세먼지 농도조건, 바람의 풍속조건 등 미세먼지로 오염된 대기 조건을 구현하였고, 미세물질 대상을 선정하였다. 선정된 미세물질들은 입자의 크기에 따른 피부 부착능을 비교하여 미세물질로 사

용할 후보물질을 최종 선정하였다. 위 내용을 바탕으로 미세먼지 농도별, 미세먼지 크기 별 외 환경변수에 대한 종합결과를 도출하여 이를 구현할 수 있는 인공대기 환경 시스템을 제작하였고, 시험장치의 구성은 아래와 같다(표 1).

인공대기환경 조성장치의 작동 원리는 크게 풍향발생장치와 먼지 공급 부, 역류방지 필터, 흡입구로 구성된다. 풍향발생장치는 여러 개의 팬이 다양한 각도로 설치되어 미세물질 주입 시 대기 환경과 같이 고르게 분포될 수 있도록 순환시켜 준다. 장치를 가동시키고, 먼지공급부로 미세물질을 넣어주게 되면 장치에서는 미세물질이 고르게 분포된다. 장치 내부에 공기의 순환을 위해 외부로의 공기 흐름은 방지하고 외부에서 내부로의 공기 흐름은 허용하는 역류방지 필터를 설치하였으며, 피험자가 팔을 삽입하여 시험할 수 있도록 흡입구를 만들어 장치를 구성하였다(그림 1).

표 1. 인공대기환경 조성장치 구성

구분	역할
풍향발생장치	다수의 팬을 활용하여 공급된 먼지를 실제 대기환경과 동일하거나 유사하게 분포
먼지공급부	미세먼지를 장치 내로 공급
역류방지필터	외부로의 공기흐름은 방지하고, 외부에서 내부로의 공기 흐름은 허용
삽입구	피험자의 팔을 삽입

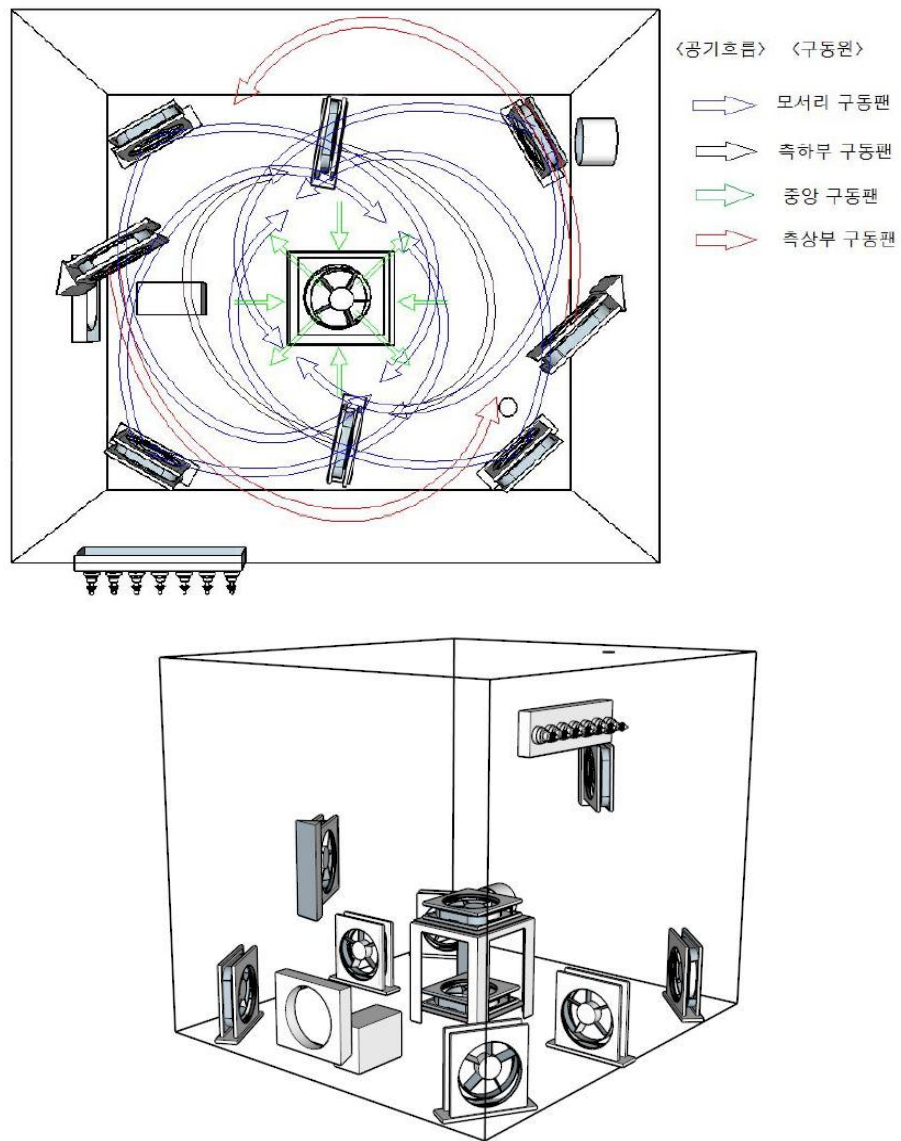


그림 1. 인공대기환경 조성장치 도면.

2 피부 장벽과 경피전달 시스템

피부는 표피, 진피로 구성되어 있다. 이 중 표피의 가장 바깥쪽 부분은 각질층이라는 죽은 세포층으로 이루어져 있다. 이러한 각질층은 외부의 다양한 자극요인을 막아주는 방어막 역할을 하며 이를 피부 장벽이라고 말한다. 피부 장벽은 외부로부터 미생물 등에 의한 감염을 막을 뿐 아니라, 화학물질 및 물리적인 자극 수단까지 막아주며 더 나아가 수분 손실을 최소화 시켜주는 역할을 한다.

따라서 화장품 및 피부로 도포되는 다양한 의약품에 사용되는 활성물질들은 경피전달시스템(Transdermal delivery system)을 통해 이러한 물질들을 전달한다(그림 2). 이러한 경피전달 시스템은 물리적인 흡수를 통한 방법과 제형학적인 흡수를 통한 방법이 있다(Gianeti *et al.*, 2011; Forough *et al.*, 2020). 물리적인 경피흡수시스템은 주로 피부에 직접 영향을 준 후 물질을 주입하는 방법들이 주를 이룬다(표 2). 피부에 전위차를 직접 주어 물질을 이동시키는 Iontophoresis, 초음파를 활용한 Sonophoresis, 고전압을 이용한 Electroporation, 각질층을 물리적으로 제거하는 Tape stripping, 마이크로 니들 등을 이용하여 피부에 구멍을 만들어 침투시키는 방법들이 있다.

반면, 제형학적인 경피흡수시스템은 나노의 크기로 콜로이드 등의 입자를 형성하여 미세한 크기로 피부로 전달가능하도록 하는 방법을 말한다(표 3). 그림 3에서처럼 이러한 방식들은 최근 다양한 형태로 개발되어 지고 있다(Nasr *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2019; Rezvani *et al.*, 2019).

화장품에서는 하이드로겔이라고 불리는 온도 및 pH에 따라 약물을 방출하는 고분자 수화겔을 이용한 방식, 비이온성계면활성제를 통해 이중층의 셀을

갖는 나노입자를 통해 전달하는 니오솜, 세포막 혹은 각질층을 구성하는 인지질로 세포막 구조와 유사한 라멜라 구조를 형성하여 나노 입자를 통해 전달하는 리포솜(그림 4), 리포솜에 탄성 등을 부여하여 각질층을 보다 투과하기 쉽게 하는 탄성 리포솜 등을 이용하여 활성물질을 전달한다(Gupta *et al.*, 2005; Tamaddon *et al.*, 2007; Okore *et al.*, 2011; Wichayapreechar *et al.*, 2020). 이러한 경피흡수 전달체계에 대한 관심은 꾸준히 증가하고 있으며, 시장에서도 지속적인 수요가 증가하는 추세이다(그림 5).

표 2. 물리적인 경피흡수시스템

방식	원리
Iontophoresis	피부에 전위차를 주어 피부의 전기적 환경을 변화시켜 이온성 유효성분의 피부투과를 증가시키는 방법
Sonophoresis	초음파를 이용하여 유효성분이 생체막을 통과하여 피부에 침투하게 만드는 방법
Electroporation	고전압을 이용하여 피부에 유효성분의 침투율을 높이는 방법
Tape Stripping	물리적인 방법으로 각질층을 제거하여 유효성분의 침투를 돕는 방법
Micro Niddle	피부에 미세한 바늘을 이용하여 구멍을 만들어 유효성분이 효과적으로 흡수될 수 있도록 하는 방법

표 3. 제형학적인 경피흡수시스템

방식	원리
Hydro Gel	온도 및 pH 감응성을 갖는 고분자 수화젤을 이용하여 외부 환경에 불안정한 유효성분을 안정적으로 보존하고 피부에 도포 시 빠른 방출을 통해 침투시키는 방법
Niosome	비이온성 계면활성제를 이용하여 계면활성제 이중층 구조의 나노 캡슐을 제조하여 유효성분을 전달하는 방법
Nano emulsion	500nm 미만의 입자 크기를 갖는 에멀전으로 작은 입자 크기를 통해 유효성분을 전달하는 방법
Liposome	세포막과 같은 구조의 인지질 이중층으로 구성된 캡슐로 세포막과 융합하여 유효성분을 효과적으로 전달하는 방법
Elastic Liposome	리포솜에 탄성을 부여하여 각질층을 더 잘 투과할 수 있도록 만든 리포솜

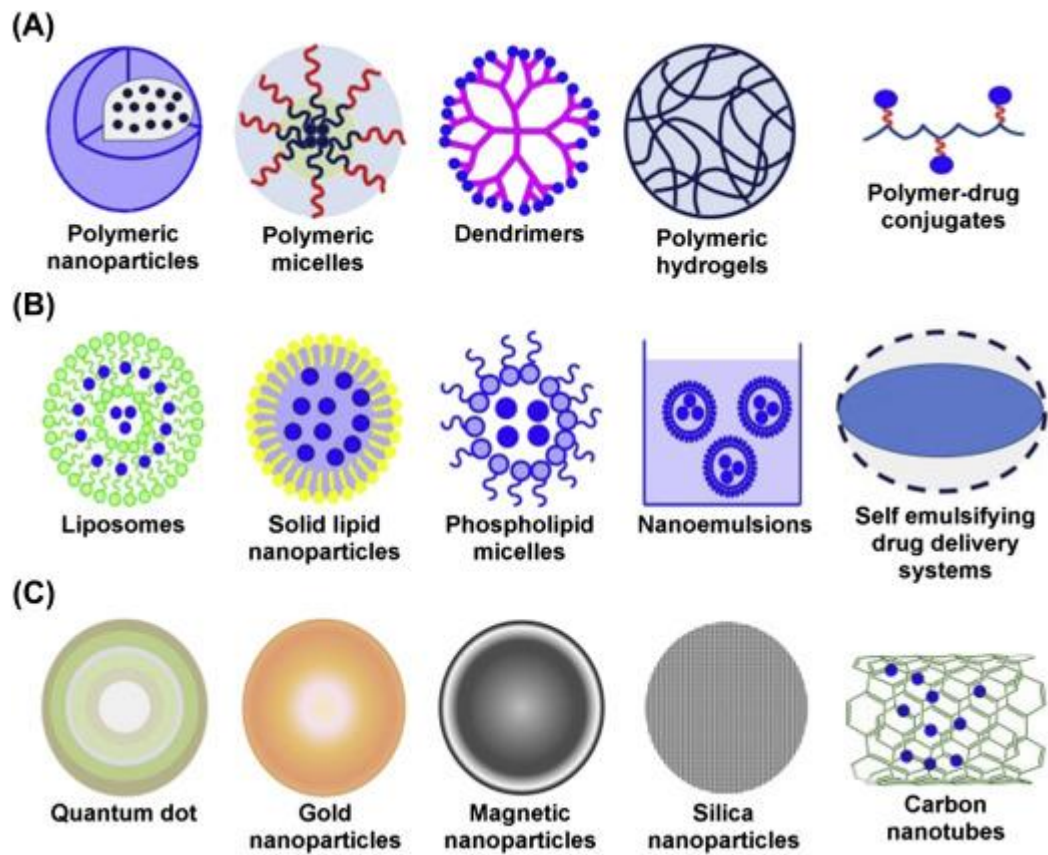


그림 3. 다양한 나노 캡슐의 모식도. 화장품에서는 주로 liposome, nano emulsion, Niosome 등이 최근 많이 활용되고 있는 추세다(Amit *et al.*, 2019).

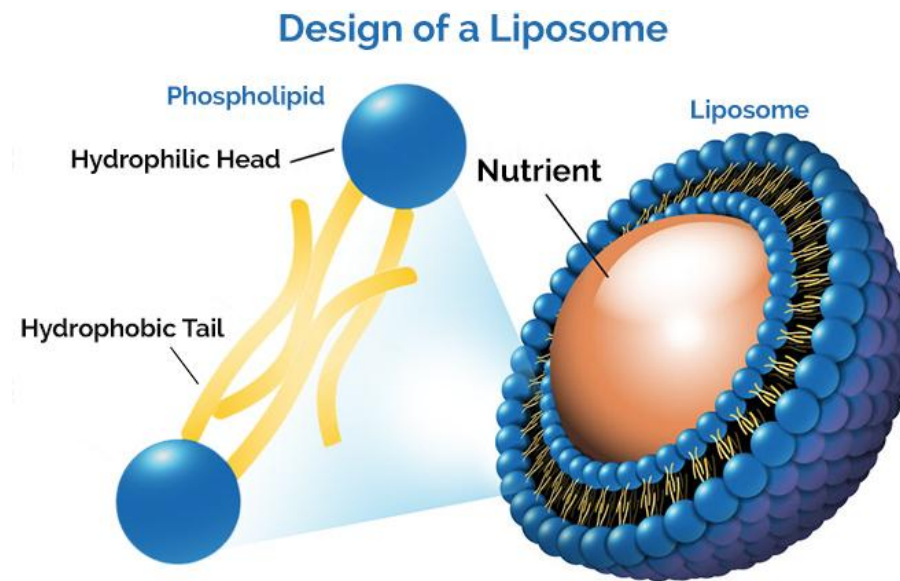


그림 4. 인지질(Phospholipid)을 활용한 리포솜 기술. 인지질은 체내 세포막의 구성원으로 이의 자기회합 능력을 이용하면 생체와 유사한 구조를 갖는 나노 캡슐을 제조할 수 있다(Hank *et al.*, 2016).

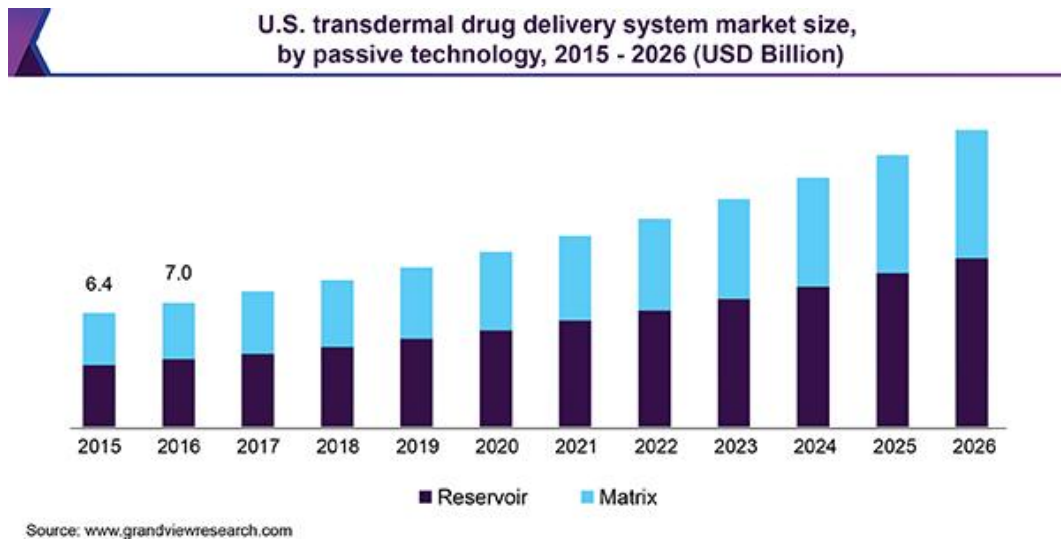


그림 5. 미국에서의 경피흡수를 통한 약물전달 체계의 성장 추세. 경피흡수를 통한 약물전달체의 개발은 앞으로도 지속적으로 주목받을 것으로 예상된다 (Brian *et al.*, 2019).

3 화장품 제형 기술과 제타포텐셜

화장품 제형(Cosmetic formula) 기술의 발달은 더 과학적인 피부 화장을 갈구하는 소비자들의 욕구를 만족시키기 위한 하나의 산물이다(Breuer *et al.*, 1985). 이런 관점에서 Cosmetic formula에 대한 다양한 연구가 진행 중이며, 본 연구에서는 제타포텐셜(Zeta Potential)의 전위차를 이용하여 Cosmetic formula를 완성하는 연구로써 음전하(Negative potential)의 전위를 지니고 있는 피부의 최외각인 각질층에 Positive/Negative potential 전위를 띄는 화장품을 피부에 도포함으로써 밀착력을 증가시켜 화장 지속력을 향상시키는 내용이다(Pinnagoda *et al.*, 1989; Morris *et al.*, 2019; Aboul-Einien *et al.*, 2020). 더 나아가 본 연구를 바탕으로 보습효과 증진 및 피부 영양에 도움을 주는 성분들의 지속시간을 증가시켜 피부를 장시간 촉촉하고, 건강하게 유지시킬 수 있을 것으로 예상된다. 제타포텐셜이란 그 정의는 다음과 같다(그림 6).

우선 liquid system에 분산되어 있거나 부유되어 있는 미세하게 구분되는 파티클을 colloid라고 부른다. 이런 콜로이드는 수용액내의 매질에 존재 시 전기적인 Charge를 띄게된다(Piorkowski *et al.*, 2013). 이러한 Charge의 대부분은 수용액으로부터 선택적인 이온흡착에서의 결과이다(de Clermont-Gallerande *et al.*, 2001; Al-Amoudi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2015).

용액 중에 분산된 입자는 입자표면의 표면극성기의 해리와 이온의 흡착에 의하여 전기적으로 음극 또는 양극으로 대전하고 있다. 따라서 입자 주변에는 계면전하를 중화하기 위하여 과잉으로 존재하는 반대부호를 갖는 이온과 소량의 동부호를 갖는 이온이 확산적으로 분포하고 있으며, 계면으로부터 전기적 포텐셜을 보이며 완만한 포텐셜 구배를 가지고 서서히 감소하게 된다.

따라서 전하를 띤 파티클에는 상대이온이 흡착되어 상대적으로 움직이지 않는 층(stern layer)이 형성되고, 상대이온과 극성 액체 분자들이 이온확산층(diffused layer)에서 steady-state configuration을 가지며 농도 구배를 보인다. 이러한 모델을 diffuse electrical double-layer model 이라고 부른다.

콜로이드(colloid) 용액에서 전하를 띤 파티클은 외부에서 가해진 전기장에 반응하여 일정한 속도를 가지고 파티클이 움직이게 되는데 이 속도를 전기영동속도(electrophoretic velocity)라고 부른다. 이러한 전기장에 의하여 입자가 전기 영동하는 동안 이중층(double layer)에서 슬립이 일어나는 유체역학적 면이 나타나게 되는데, 즉 다시 말해 입자가 이동할 때 압축된 고정층(stern layer)은 파티클과 같이 움직이게 되지만, 이온 확산층은 액상과 같이 움직인다(Fuziwara *et al.*, 2004; Sudo *et al.*, 2013).

좀 더 자세히 보면 shear plane에서 미끄러지는 면이 생기고 이 경계면에서의 전기적인 포텐셜을 제타포텐셜(zeta potential; ζ)이라 부르고 전기운동역학의 성질로부터 계산 할 수 있다. Liquid의 한 부분에 전기장을 가해줌에 따라 그 결과 colloid의 drift velocity를 측정함으로써, colloid의 이동도와 제타포텐셜이 측정될 수 있다. 현재 제타포텐셜에 대한 활용은 산업 전 분야에 널리 이용되고 있다. 특히 의약 및 식품분야에서 활발히 이용되고 있는데 전위차를 이용하여 인체 내에 유효성분의 흡수율을 높여 효과를 극대화하는데 많이 사용되고 있다. 화장품 분야에서도 제타포텐셜을 이용하여 피부와의 친화력 및 흡수율을 증가시켜 피부를 보다 더 건강하고 아름답게 유지 시키는데 활용하려는 움직임이 빠르게 일어나고 있는 실정이다(Elias *et al.*, 1991; Motta *et al.*, 1994).

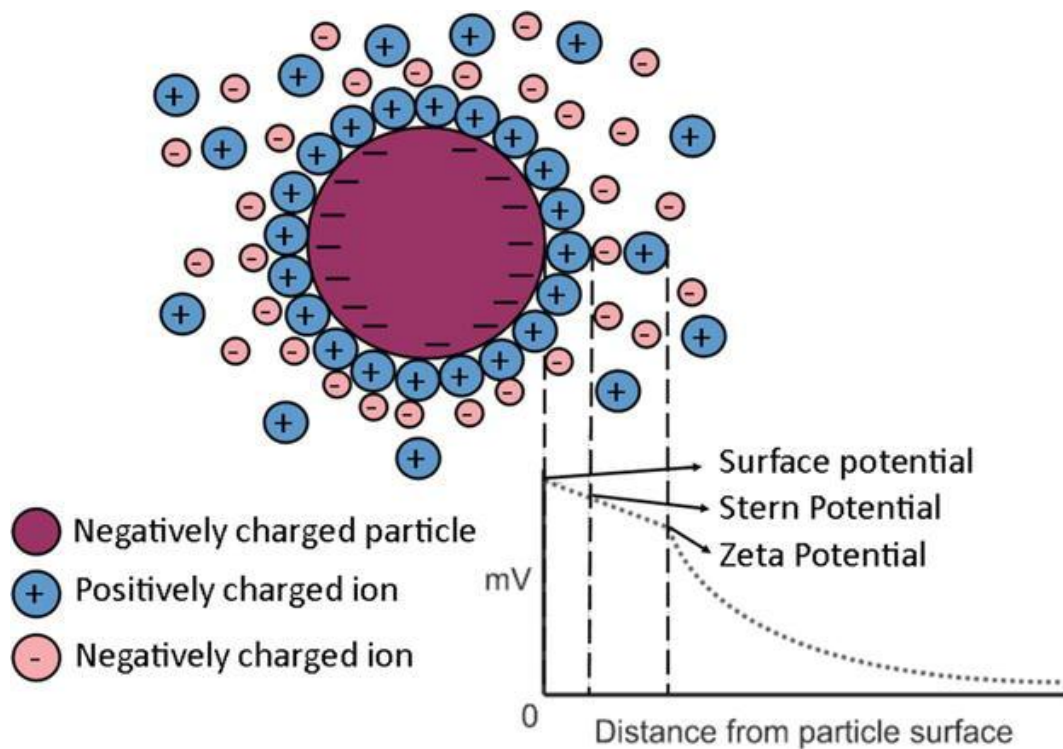


그림 6. Diffuse electrical double-layer model. 입자의 전위는 표면전위, Stern전위, 제타전위로 구분할 수 있다. 이 중 제타전위는 제타포텐셜로도 불리며, 표면의 전하와 같은 전하를 띄는 전위로 입자의 표면의 전하를 간접적으로 확인할 수 있는 방법 중 하나다(Syed Taqvi, Ghada Bassioni (2019), "Understanding Wettability through Zeta Potential Measurements", Wettability and Interfacial Phenomena - Implications for Material Processing, 84185).

4. 연구 개발 방향

본 연구에서는 유효물질의 선정에 앞서 미세먼지가 피부 내 세포에 미치는 영향을 살펴보았다. 선행 보고에 미세먼지는 피부 내에서 염증과 같은 자극반응과 관련이 깊다는 것을 확인하였기에 미세먼지에 의해서 Cytokine이 증가하고 이로 인해 피부 염증이 유발된다는 것을 검증하였다. 이를 통해 미세먼지 중에 따른 피부 내 염증 반응과 그에 대한 메커니즘을 확인하고자 하였다.

그 후 제주 소재 천연물들의 화장품 원료 및 미세먼지 제어 소재로서의 활성을 평가하기 위해 제주 천연 식물 추출물 39종을 선별하여 항산화, 미백, 주름 개선, 항염 등의 활성을 평가하여 제주 내에서 자생 혹은 재배되는 식물들의 활용 가능성을 평가하고자 하였다.

다음으로 영여자를 선정하여 1차적으로 개발된 영여자추출물이 콜라겐 생성을 촉진하는 작용으로 주름을 개선 시킬 수 있는 물질이 될 수 있음을 확인하였고, 또한 동시에 콜라겐 분해효소인 MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)의 생성을 억제함으로써 이중적으로 주름개선에 기여하고 있음을 확인하였다. 콜라겐 생성의 촉진과 MMP-1 생성 억제의 두 가지 기능을 동시에 나타내는 현상은 이미 보고되어 있는 AP-1의 활성화 억제 효과와 유사하므로 본 과제 의 개발 신물질인 영여자추출물의 작용 메커니즘을 분석하기 위해 노화 현상의 보다 근본적 원인인 IFN- γ 신호에 의한 AP-1 활성화에 미치는 영향을 조사해 보고자 하였다. 각각의 추출법으로 만들어진 추출물을 통해 콜라겐 생성 촉진효과는 세포실험을 통해 확인하였으며, 사용된 세포는 피부에서의 현상을 가장 잘 모방할 수 있도록 초대 배양된 인간 섬유아세포(HDFN)를 이용하였다. 또한 세포배양 배지는 혈청에 의한 영향을 최소화하기 위해 세포 배양에

서 사용하는 통상적인 혈청농도인 10% 대신 0.2%를 적용하였다.

최근 들어 피부 미용뿐만 아니라 피부 질환 치료에 대한 소비자들의 관심이 급증하면서 이를 동시에 만족시킬 수 있는 기능성 화장품 개발 요구가 커지고 있으며, 특히, 천연활성물질을 이용한 기능성 제품이 화장품 산업의 새로운 성장 모멘텀으로 자리를 잡게 될 것이며 본 연구에서도 천연자원이 미세먼지 차단 및 피부 보호에 도움을 줄 수 있는 새로운 접근 기술을 연구하여 한 차원 진보된 유효성분 침투 기술을 확보하고자 한다.

다음으로 Resonar Formulated Process (RFP™)를 통해 주파수 시그널을 개발하고 선정된 시그널 적용에 따른 물성 변화를 통해 수용성 화장품 조성물에 조사하여 혼합 시 균질화를 극대화하여 피부 부착력을 증가시키고, 궁극적으로 미백, 주름개선, 자외선 차단의 기능성이 우수한 화장품을 개발하고자 하였다. RFP™ 조사 대상의 물성에 따라 최적의 시그널이 개발되며 이는 다양한 주파수에 의한 클럭(Clock)에 따라 단시간 고효율의 물성변화를 가져올 수 있다. 화장품 조성물 및 혼합물 대상으로 만들어진 RFP™는 소정의 주파수 특성을 갖는 전기 신호를 생성하는 신호발생부, 물질의 공진을 유도하는 광물질의 클러스터 또는 파우더에 전극을 연결시킨 공진유도장치부, 이를 모듈레이션 시켜 조사할 수 있는 레이저 장치부를 구비하여 이에 따른 물성 변화 장치 및 물성 변화 방법을 제공한다.

본 연구에서는 현재 화장품분야에서 제타포텐셜을 활용하여 효과를 극대화시키려는 것이 무엇이며, 그것을 적용한 제형에 미치는 영향 등을 실험 및 관찰하여 살펴보았다.

마지막으로 위에서 개발된 화장품을 직접 피부에 도포하고 미세먼지 환경

을 조성하여 미세먼지에 대한 방어지수를 확인하였다.

이를 통해 추후 미세먼지 화장품에 있어서 다양한 확인법을 제시하고자 하였고 더 나아가 미세먼지 방어에 대한 지표를 정립하여 미세먼지에 대한 방어를 정량적으로 표현하는 방법을 찾고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 기기 및 시약

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), BHT, phosphate buffered saline (PBS), glabridin, lecithin, DPPH tyrosinase, elastase 등의 시약은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 파운데이션 제조 시 사용된, PEG-10 Dimethicone, Phenyl Trimethicone, Cyclopenta siloxane, Lauryl PEG-9 Polydimethylsiloxylethyl Dimethicone 등의 물질들은 Shietsu에서 구입하여 사용하였다. 화장품 콜로이드 및 리포솜, 니오솜의 입도 분석 및 제타포텐셜 측정은 Otsuka 전자의 ELS-1000Z를 통하여 실험을 진행하였다. 물질 분석은 Waters사의 HPLC (high performance liquid chromatography)을 이용하였다.

2. 미세먼지의 염증반응

2.1 세포 배양

본 연구에서는 Murine macrophage cell line인 Raw 264.7 세포를 사용하였으며, murine melanocyte cell line인 B16F10 세포를 사용하였다. Human keratinocyte cell line인 HaCaT cell은 Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology (Korea)에서 분양받았으며, 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin 그리고 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 0.5% CO₂가 공급되는 37 °C 배양기에서 배양하였다.

2.2 역전사 중합효소 연쇄반응법 (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

미세먼지를 통한 세포의 유전자 발현을 확인하기 위하여 세포를 수확하여 PBS로 한번 세척한 후, TRIZOL™ Reagent (Invitrogen, MD, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. cDNA는 RT kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 total RNA 300 ng의 농도로 42℃에서 60 분, 95℃에서 5 분간 합성을 진행하였다. 합성된 cDNA 45 ng와 primer 10 pM을 이용하여 중합효소 연쇄 반응을 수행하였다. 이 반응의 기본과정은 pre-denaturing phase (94℃, 5분), denaturing phase (94℃, 30초), annealing phase (30초, 35 cycle), elongation phase (75℃, 1분)의 조건으로 실험하였다. Annealing 온도는 각 primer 마다 58 ~ 64℃사이로 조건이 다르다. PCR 생성물은 1% agarose gel (Qbiogene, Quebec, Canada)에서 전기영동을 통하여 실험을 진행하였다.

2.3 ELISA

6 well plate에 Raw 264.7 세포를 2×10^5 cells/well씩 분주하여 24시간 안정화 시킨 후, LPS 1 µg/ml과 carbon black (10, 30, 100 µg/ml), ERM-CZ100, ERM-CZ120 (10, 30, 100, 300 µg/ml)을 처리하였다. 24시간 후에 상층액을 얻은 뒤, mouse IL-1β ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 IL-1β의 양을 측정하였다. ELISA 용 96 well plate에 assay buffer 50 µl와 sample 50 µl를 넣은 후, 실온에서 2시간 반응시켰다. 그 후 wash solution 400 µl를 이용하여 5회 세척하고, 각 well에 IL-1β conjugate를 100 µl씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 그 후 wash solution

400 μl 를 이용하여 5회 세척하고, substrate solution 100 μl 를 각 well에 넣고 반응을 진행하였다. stop solution 100 μl 를 넣어 반응을 종결하였다. 흡광도 리더기를 이용하여 450 nm - 570 nm에서 값을 측정하였다.

Mouse TNF- α ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 TNF- α 의 양을 측정하였다. ELISA 용 96 well plate에 capture antibody와 coating buffer를 1:120 비율로 희석하여 4°C에서 24시간 코팅하였다. wash solution 400 μl 를 이용하여 2회 세척하고, blocking buffer 250 μl 를 well에 넣은 후, 실온에서 2시간 반응시켰다. 그 후 wash solution 400 μl 를 이용하여 2회 세척하고, sample 100 μl 를 넣은 후, 실온에서 2시간 반응시켰다. 그 후 wash solution 400 μl 를 이용하여 2회 세척하고, 각 well에 detection-antibody 100 μl 씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 그 후 wash solution 400 μl 를 이용하여 2회 세척하고, Streptavidin-HRP 100 μl 를 각 well에 넣고 20분 반응시켰다. 그 후 wash solution 400 μl 를 이용하여 2회 세척하고, substrate solution 100 μl 를 각 well에 넣고 20분 반응시키고, stop solution 100 μl 를 넣어 반응을 중지시켰다. 흡광도 리더기를 이용하여 450 nm - 570 nm에서 값을 측정하였다.

Mouse IL-6 ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 IL-6의 양을 측정하였다. ELISA 용 96 well plate에 capture antibody와 coating buffer를 1:125 비율로 희석하여 4°C에서 24시간 코팅을 시켰다. wash solution 400 μl 를 이용하여 2회 세척하고, blocking buffer 250 μl 를 well에 넣은 후, 실온에서 2시간 반응시켰다. 그 후 wash solution 400 μl 를 이용하여 2회 세척하고, sample 100 μl 를 넣은 후, 실온에서 2시간 반응시켰다. 그 후

wash solution 400 μ l를 이용하여 2회 세척하고, 각 well에 detection-antibody 100 μ l씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 그 후 wash solution 400 μ l를 이용하여 2회 세척하고, Streptavidin-HRP 100 μ l를 각 well에 넣고 20분 반응시켰다. 그 후 wash solution 400 μ l를 이용하여 2회 세척하고, substrate solution 100 μ l를 각 well에 넣고 20분 반응시키고, stop solution 100 μ l를 넣어 반응을 중지시켰다. 흡광도 리더기를 이용하여 450 nm - 570 nm에서 값을 측정하였다.

6 well plate에 HaCaT 세포를 5×10^5 cells/well씩 분주한 후 24시간 안정화를 시킨 후, TNF- α 100 ng/ml, carbon black 10, 30, 100 μ g/ml와 ERM-CZ100, ERM-CZ120 10, 30, 100, 300 μ g/ml을 48시간 동안 처리하여 상층액을 얻은 후 human IL-1 β ELISA kit (R&D system, minneapolis, MN, USA)를 이용하여 IL-1 β 의 양을 측정함. ELISA용 96 well plate에 PBS로 1 : 120 비율로 희석한 capture antibody를 분주 후 상온에서 24시간 동안 코팅하였다. Wash buffer 400 μ l를 이용하여 3회 세척 후, reagent diluent 300 μ l로 plate를 block함. 3회 세척 후, sample 100 μ l를 분주 후, 실온에서 2시간 반응시켰다. 3회 세척 후, detection antibody를 100 μ l씩 분주 후, 상온에서 2시간 반응시켰다. 그 후, 3회 세척을 진행한 후, Streptavidin-HRP를 100 μ l씩 분주한 후, 빛을 차단한 다음 상온에서 20분간 반응시켰다. 3회 세척 후, substrate solution을 100 μ l씩 분주 후, 상온에서 20분가량 반응시킨 후, stop solution을 50 μ l씩 분주하여 반응을 중지시켰다. 흡광도 리더기를 이용하여 450nm - 570nm에서 값을 측정하였다.

Human IL-6 ELISA kit (R&D system, minneapolis, MN, USA)를 이용하

여 IL-6의 양을 측정하였다. ELISA용 96 well plate에 PBS로 1 : 120 비율로 희석한 capture antibody를 분주 후 상온에서 24시간동안 코팅하였다. Wash buffer 400 μl 를 이용하여 3회 세척 후, reagent diluent 300 μl 로 plate를 block함. 3회 세척 후, sample 100 μl 를 분주 후, 실온에서 2시간 반응시켰다. 3회 세척 후, detection antibody를 100 μl 씩 분주 후, 상온에서 2시간 반응시켰다. 그 후, 3회 세척을 진행한 후, Streptavidin-HRP를 100 μl 씩 분주한 후, 빛을 차단한 다음 상온에서 20분간 반응함. 3회 세척 후, substrate solution을 100 μl 씩 분주 후, 상온에서 20분가량 반응시킨 후, stop solution을 50 μl 씩 분주하여 반응을 중지시켰다. 흡광도 리더기를 이용하여 450nm - 570nm에서 값을 측정하였다.

Human IL-8 ELISA kit (R&D system, minneapolis, MN, USA)를 이용하여 IL-8의 양을 측정하였다. ELISA용 96 well plate에 PBS로 1 : 120 비율로 희석한 capture antibody를 분주 후 상온에서 24시간동안 코팅하였다. Wash buffer 400 μl 를 이용하여 3회 세척 후, reagent diluent 300 μl 로 plate를 block 시켰다. 3회 세척 후, sample 100 μl 를 분주 후, 실온에서 2시간 반응시켰다. 3회 세척 후, detection antibody를 100 μl 씩 분주 후, 상온에서 2시간 반응시켰다. 그 후, 3회 세척을 진행한 후, Streptavidin-HRP를 100 μl 씩 분주한 후, 빛을 차단한 다음 상온에서 20분간 반응시켰다. 3회 세척 후, substrate solution을 100 μl 씩 분주 후, 상온에서 20분가량 반응시킨 후, stop solution을 50 μl 씩 분주하여 반응을 중지시켰다. 흡광도 리더기를 이용하여 450nm - 570nm에서 값을 측정하였다.

2.4 Western Blot

세포를 cell lysis buffer (Cell Signaling technology, Danvers, MA, USA)를 이용하여 ice에서 30분 간 용해하고, 4℃에서 12000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하여 단백질을 분리하였다. 단백질 정량은 Bradford법으로 측정하였고 동일한 양의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 75 V에서 120분간 전기영동을 실시하였다. SDS-polyacrylamide gel에서 분리된 단백질을 95V에서 100분간 PVDF membrane으로 옮긴 후, 5% nonfat dry milk가 첨가된 TTBS 완충액(0.1% Tween 20이 포함된 Tris-buffered saline)으로 1시간 동안 blocking하였다. Blocking 후, membrane은 5% BSA가 포함된 TTBS 완충액에 적절한 농도로 희석된 1차 항체를 넣고 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 반응시킨 membrane은 TTBS 완충액으로 10분간 3회 세척한 후, 5% BSA가 포함된 TTBS 완충액에 적절한 농도로 희석된 2차 항체를 넣고 상온에서 90분 동안 반응시켰다. 반응시킨 membrane은 TTBS 완충액으로 10분간 3회 세척한 후, ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)용액으로 반응시켜 Chemi Doc™ XRS+ machine (Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

3. 제주 천연 자원의 활성 평가

3.1 추출 과정

추출물은 다음과 같은 과정으로 제조하였다. 건조물 50 g에 70% 에탄올(발효 주정) 1,000 ml를 가하여 상온에서 24시간 동안 추출한 후 상층액을 회수한다. 이 과정을 3회 반복한 후 상층액을 감압농축하고 동결 건조하여 추출

물을 얻었다.

분석용 시료는 에탄올과 PBS 혼합용액 (1:1)에 녹인 후 0.45 μm syringe filter (Millipore Co., Billerica, MA, USA)로 여과하여 사용하였다.

3.2 DPPH Assay

DPPH 라디칼 소거 활성은 시료 100 μl 과 DPPH를 메탄올에 100 μM 의 농도로 녹인 DPPH 용액 900 μl 를 넣고 혼합하여 실온(암실)에서 30 분간 방치하였다. 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군으로는 butylated hydroxy anisole (BHA)를 사용하였다. DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 산출식은 아래와 같다.

$$\% \text{ DPPH} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A : Absorbance of the control

B : Absorbance of the sample

3.3 ABTS Assay

ABTS 라디칼 소거 활성은 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 섞고, 상온에서 16 시간 배양한 후 ABTS 양이온(ABTS⁺)을 생성하였다. 700 nm에서 흡광도의 값이 0.7 이하가 되도록 희석하여 시험용액으로 제조하였다. ABTS⁺ 용액 100 μl 에 시료 100 μl 를 가하여 흡광도 값을 3 분 후에 측정하였다. 항산화능은 증류수를 대조군으로 하였다. ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 산출식은 아래와 같다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity} = (1 - A_{\text{Test}} / A_{\text{Control}}) \times 100$$

3.4 미백활성 평가

추출물 39종에 대해 미백 혹은 주름개선에 대한 효능을 확인하기 위해 tyrosinase와 elastase 효소 억제 활성을 측정하였다. Tyrosinase 효소 억제 활성은 여러 농도의 시료 20 μl 와 1 mM의 L-tyrosine (100 mM Potassium phosphate buffer pH 6.8) 130 μl 을 혼합하였다. 혼합한 시료에 250 unit/ml의 tyrosinase를 혼합하여 35°C 드라이오븐에서 10분간 반응하였다. 반응이 완료되면 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군과 비교하여 여러 농도 시료에서 tyrosinase에 대한 효소 억제 활성을 평가하였다. Elastase 효소 억제 활성은 여러 농도의 시료 20 μl 와 45 mM N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (200 mM Tris-HCl pH 8.0) 130 μl 을 혼합하였다. 혼합한 시료에 25 ug/ml Elastase를 혼합하여 25°C 상온에서 15분간 반응하였다. 반응이 완료되면 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군과 비교하여 여러 농도 시료에서 Elastase에 대한 효소 억제 활성을 평가하였다.

3.5 세포독성과 항염

추출물 39종에 대하여 RAW 264.7 mouse 대식세포에서의 세포독성과 in vitro 항염 활성 측정을 위해 NO 생성 억제능을 측정하였다. 세포독성평가는 RAW 264.7 세포에 여러 농도의 시료를 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. Ez-cyto를 각각 10 μl 씩 첨가한 후 1시간 동안 반응하였다. 반응이 완료되면

340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군과 비교하여 RAW 264.7 세포에 대한 시료의 세포독성을 평가하였다. In vitro 항염활성 평가는 RAW 264.7 세포에 LPS(100 ng/ml)와 여러 농도의 시료를 동시에 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 nitrite의 형태로 측정하였다.

NO의 생성은 NO의 대사물인 아질산염의 양을 측정하는 Griess assay (주석)를 이용하였다. RAW 264.7 세포를 5×10^5 cells/ml로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 시료와 LPS (1 μ g/ml)를 함유한 새로운 배지를 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 각 세포배양 상등액 100 μ L을 취하여 96 well plate로 옮긴 후 Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in distilled water, sigma) 100 μ L를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 곡선은 sodium nitrite (NaNO_2)를 단계적으로 희석하여 얻었다.

4. 영여자 미네랄 전이 추출법 및 그 활성 평가

4.1 미네랄 전이 추출 공법 정립

먼저 추출물을 제조하기 위해 활용되는 대부분의 천연물은 자연 상태 그대로 채취되어 아직 그 활성을 잃지 않은 상태에서 활용하게 된다. 그렇기에 이러한 원물에는 미생물, 농약 등의 다양한 오염원이나 중금속 등으로부터 안전하지 못하다. 그렇기에 모든 원물은 세척과정을 철저하게 진행해야 한다.

다음으로 숙성과정을 보다 원활하게 하기위해, 덩어리 상태를 적당한 크기

로 분쇄 혹은 파쇄시켜 공정상 처리하기 용이한 크기의 플레이크로 가공하는 전처리 과정을 거친다. 이렇게 분쇄된 영여자 원물은 3번째 단계에서 본격적인 숙성과정인 미네랄이 다량 함유된 당과 만나 일정 조건 하에서 영여자가 갖고 있는 효소의 활성을 상승시켜 피부활성이 우수한 숙성액이 만들어지게 된다.

4번째 단계는 보다 높은 활성 영여자 숙성액을 얻기 위해, 영여자와 함께 숙성과정에서 시너지 효과를 나타낼 수 있고, 특히 마라는 작물에서 많이 나타나는 인체 자극 성분과 같이, 천연물 자체가 갖고있는 우리 인체에는 좋지 않을 수 있는 성분의 기능을 중화시키거나 상쇄시킬 수 있는 일정 조건의 2차 숙성과정을 거쳐 만들어진다.

이렇게 4단계 과정을 거쳐 얻어진 영여자 숙성액은 위의 공정도에서와 같이 여러 차례의 필터링과 용해도에 따른 혼합 희석 과정을 거쳐 화장품에 응용될 수 있는 마무리 원료화 과정을 거치게 된다.

4.2 영여자의 추출방법

열수 추출은 건조 시킨 영여자 50 g을 정제수 1 L에 침지시킨 후 약탕기로 90분 간 가열시켜준다. 추출물 냉각 후, 1차로 25 μ l pore의 필터로 여과시킨 뒤 2차로 5 μ l 크기의 필터로 한 번 더 여과를 진행한다. 그 다음, 55℃, 90 rpm에서 농축시켜준 뒤 만들어진 샘플은 냉장에 보관하는 방법이다.

에탄올 추출은 건조 시킨 영여자 50 g을 에탄올 1 L에 침지 시킨 후 Overhead stirrer로 상온, 300 rpm에서 3시간 동안 추출한다. 추출물 냉각 후, 1차로 25 μ l 크기의 필터로 여과시킨 뒤, 5 uL 크기의 필터로 한 번 더 여과

를 진행한다. 그 다음 55℃, 90 rpm에서 농축시켜준 뒤 만들어진 추출물은 냉장에 보관하는 방법이다.

미네랄 전이 추출물제조방법은 영여자를 먼저 건조 시켜 준 후 건조 시킨 영여자 50 g을 미네랄, 당류 1 L에 침지 시킨다. 1달 동안 1차 숙성을 시켜준 후, 2차 숙성 또한 1개월 이상 진행 시켜준다. 숙성된 추출물 냉각 후, 1차로 25 uL 크기의 필터로 여과시켜준다. 2차로 5 uL pore의 필터로 한 번 더 여과를 진행한다. 그 다음, 55℃, 90 rpm에서 농축시켜준다. 만들어진 추출물은 냉장에 보관한다.

대량생산 제조를 위해 세척된 영여자를 분쇄하여 전처리를 진행한다. 분쇄된 영여자에 미네랄 혼합물 및 당을 첨가하여 숙성시키는 1차 숙성단계를 거친다. 1차 숙성된 영여자에 녹두 및 감초 중 하나 이상을 포함하는 숙성 보조제를 첨가하여 2차 숙성 단계를 거친다. 2차 숙성된 영여자는 여과 후 숙성액에 butylene glycol, glycerin, 1,2-hexanediol, water 등을 첨가하여 원료화 시켜준다.

4.3 영여자추출물의 세포활성 평가

콜라겐 생성 촉진 효과는 세포실험을 통해 확인하였으며, 사용된 세포는 피부에서의 현상을 가장 잘 모방할 수 있도록 초대 배양된 인간 섬유아세포(HDFN)를 이용하였다. 또한 세포배양 배지는 혈청에 의한 영향을 최소화하기 위해 세포배양에서 사용하는 통상적인 혈청농도인 10% 대신 0.2%를 적용하였다.

간단히 설명하면, 0.2% FBS, 0.1% BSA를 함유한 DMEM 배지에 2.0 ×

10^4 cells/ml가 되도록 HDFN을 조절한 후, 이 세포액 135 uL를 96 microplate에 분주한 다음, incubator에서 overnight pre-culture하고, 동일한 media로 교체한 후, 각 농도로 희석된 영여자 추출물을 첨가하여 3일간 추가 배양하였다. 세포배양액을 이용하여 ELISA법으로 type-1 procollagen의 농도를 측정하였다.

영여자 MMP-1 저해 실험은 0.2% FBS, 0.1% BSA를 함유한 DMEM 배지에 2.0×10^4 cells/ml가 되도록 HDFN을 조절한 후 이 세포액 135 uL를 96 microplate에 분주한 후, incubator에서 overnight pre-culture하고, 동일한 배지로 교체한 후 각 농도로 희석된 영여자 추출물을 첨가한 후 3일간 추가 배양하였다. 세포배양액을 이용하여 ELISA법으로 pro-MMP-1의 농도를 측정하였다.

실험방법은 0.2% FBS, 0.1% BSA를 함유한 DMEM 배지에 1.0×10^4 cells/ml가 되도록 HDFN을 조절한 후 이 세포액 135 uL를 96 microplate에 분주한 후, incubator에서 overnight pre-culture하고, 동일한 배지로 교체한 다음, 각 농도로 희석된 IFN- γ 를 첨가한 후 3일간 추가 배양하였다. 세포배양액을 이용하여 ELISA법으로 type-1 procollagen의 농도를 측정하였다.

4.4 영여자 추출물의 자극 평가

부화가 되기 전의 유정란을 취하여 상단에 둥글게 껍질을 따낸 후, 얇은 투명 pellet 위 개발된 영여자추출물을 각각 $1\mu\text{g}$ 씩 로딩하여 건조된 상태의 pellet을 유정란의 내부 막 위에 부착시킨 후, 따낸 껍질 부위를 투명한 테이프를 사용하여 차단한다. 그런 후, Incubator에서 부화시킨 유정란이 부화하면

서 나타나는 혈관의 생성을 통하여 독성의 유무가 확인할 수 있다.

4.5 영여자 추출물을 포함하는 리포솜 개발

카보네이트(carbonate) 이온을 함유하는 ZnAl-LDH를 다음과 같이 공침법(coprecipitation)으로 합성하였다. 0.2 M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 와 0.1 M의 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 의 혼합용액에 최종 pH가 7.0 정도가 될 때까지 1 M의 Na_2CO_3 용액을 서서히 첨가하였다. 혼합용액을 약 70°C의 오븐에 하루 정도 보관 후, 필터한 다음 증류수와 에탄올로 세척하고 나서 진공펌프를 이용하여 건조하였다. 합성된 c-LDH의 가능한 구조식은 다음과 같다: $[\text{Zn}_4\text{Al}_2(\text{OH})_{12}]\text{CO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. 영여자 추출물 함유 리포솜과 c-LDH의 캡슐 제조는 합성된 c-LDH를 100 g에서 제조된 영여자 추출물 함유 리포솜에 분산 후 볼 밀러(ball miller)를 이용하여 48시간 이상 밀링하고, 진공펌프로 건조하여 영여자 추출물 함유 리포솜과 c-LDH의 캡슐(이하에서 “영여자-LDH 캡슐”이라고 한다)을 얻었다.

제조한 리포솜 내 영여자의 포집률을 알아보기 위한 시험을 진행하였다. 영여자가 담지된 용액을 centrifugation을 이용하여 13,000 rpm 조건에서 10분간 침전시켜 상층액을 제거하고 따로 보관하였다. 상층액을 제거 후 침전된 리포솜에 triton-x-100이 10% 녹아있는 용액을 첨가하여 리포솜을 붕괴시킨 후 centrifugation을 이용하여 13,000 rpm 조건에서 10분간 붕괴된 리포솜을 침전시켰다. 처음 리포솜 침전시키고 회수한 상층액과 리포솜 붕괴 후 회수한 상층액을 회수하여 HPLC를 이용하여 측정하였다.

4.6 영여자 추출물을 포함하는 니오솜(Niosome)개발

영여자 전이 추출물이 함유된 NIOSOME 제조를 위해 아래 처방(표)에 표기된 A상, B상, C상을 각각 적절한 비커에 칭량한다. 각 상을 70℃에서 완전히 용해 시켜준다. 용해된 A상에 B상과 C상을 순차적으로 투입한 후 50℃에서 균일하게 혼합한다. 혼합용액을 고압 미세유화기로 1,000bar에 연속으로 2회 처리하여 제조한다.

표 4. 니오솜(Niosome)의 제조 처방

상	CAS No.	원료명	Sample 1	Sample 2
A	90989-79-0	Rapeseed Sterols	1.5	1.5
	68441-03-2	PEG-5 Rapeseed Sterol	3.0	3.0
	57-88-5	Choesterol	1.5	1.5
	3539-43-3	Cetyl Phosphate	0.5	0.5
B	56-81-5	Glycerin	7.0	7.0
	6381-92-6	Disodium EDTA	0.01	0.01
	4028-10-8	Sodium Palmitiyl Sarcosinate	0.7	0.7
	7732-18-5	Water	To. 100	To. 100
	-	영여자 전이 추출물	1.0	2.0
C	128497-20-1	Macadamia Ternifolia Seed Oil	10.0	10.0

5. 파운데이션 제조 실험

경피 흡수, 밀착력 실험, 미세먼지 차단 시험 등에 사용된 파운데이션의 제조는 아래와 같은 방식으로 제조되었다(표 5). 먼저, 각 상을 각각의 비커에 칭량하여 준비한다. 그 다음 유상부를 70℃ ~ 75℃ 까지 가온하여 완전히 용해한다. 그 후 용해된 유상부에 색소를 투입하여 분산시킨다. 색소가 분산된 용액을 Homogenizer를 통하여 약 2500 rpm으로 교반한다. 교반 중인 유상부에 계량된 수상부를 서서히 투입하여 3500 rpm, homogenizer를 통해 유화를 진행한다. 유화 진행 후 40℃ 미만으로 온도가 되면 방부제를 투입한다. 탈포 후 30℃ 까지 냉각한다.

표 5. 파운데이션의 제조 처방

상	CAS No.	물 질 명	함 량 (%)
유상부	8012-89-3	Beeswax	1.2
	63148-62-9	Lauryl PEG-9 Polydimethylsiloxylethyl Dimethicone	2
	1136947-78-8	PEG-10 Dimethicone	3
	2116-84-9	Phenyl Trimethicone	12
	541-02-6	Cyclopentasiloxane	12
수상부	6381-92-6	Disodium EDTA	0.1
	7487-88-9	Magnesium Sulfate	1.5
	107-88-0	Butylene Glycol	6
	7732-18-5	Water (영역자 전이 추출물 포함)	To 100
방부제	122-99-6	preservative	0.5
색소	13463-67-7	Titanium Dioxide (CI 77891)	5
	51274-00-1	Iron Oxides (CI 77492)	q.s.
	1309-37-1	Iron Oxides (CI 77491)	
	12227-89-3	Iron Oxides (CI 77499)	

6. Franz Diffusion Cell

경피를 통한 화장품의 흡수력 시험은 Franz diffusion cell을 이용하여 진행하였다. Receptor chamber에는 증류수와 에탄올을 1:1 비율로 혼합하여 8 ml를 넣어 receptor phase를 준비하였다. donor chamber에는 직경 5 mm 시약스폰을 이용하여 피부조직(인공피부조직, Tego science, KOR) (20 mm×20 mm)에 시료를 고르게 도포하여, 8시간 동안 흡수 평가를 진행하였다. Receptor chamber는 70 rpm 이상의 속도로 magnetic stirrer를 이용하여 교반하고, 순환 수조를 이용하여 내부의 온도를 37 °C로 유지하였다.

피부투과도 시험이 완료된 후 피부조직은 Franz cell에서 분리하여 에탄올 4 ml를 이용하여 3 회씩 세척한다. 조직은 유효성분 침투량을 분석하기 위하여 N₂(액화질소)로 파쇄하고 2 ml 에탄올로 4 시간 동안 상온에서 용출한 뒤 4 °C에서 보관한다. 12 시간 뒤 시약스폰 세척액 2 ml, 조직 세척액 4 ml, 조직 용출액 2 ml, receptor chamber에서 회수한 수용액 8 ml를 HPLC를 통하여 분석하여 흡수력을 평가하였다.

7. 화장품 밀착력 평가 시험

부착력은 인체적용시험 시 밀착력 항목으로 측정하며, 밀착력은 9 cm² (3 cm × 3 cm)의 면적으로 2곳에 표시를 한 후 시험제품과 대조제품을 고루 도포한다. 도포 후 시간대 별로 applicator 와 cotton puff를 사용하여 채취한다. 채취한 시험제품과 대조제품은 Image pro-Plus ver.4.0 프로그램을 이용하여 Count 한다. 측정 값이 크면 puff에 묻어나온 제품의 양이 많음을 의미한다. 측정계수는 arbitrary unit (A.U.)이다.

8. Glabridin 함량 분석

적용한 시료의 glabridin의 총 함량을 측정하기 위해 glabridin이 5% 함유된 COS-50, COS-100, COS-100R, CONTROL 각각 10 μl 를 MeOH 10 ml에 희석하여 HPLC로 분석하였다.

9. 미세먼지 평가 시험

시험은 촬영대상인 화장료가 도포된 도포부위와 화장료가 도포되지 않은 무도포부위로 구획하여 피험자의 팔을 미세먼지에 노출전과 노출 후 2 차례에 걸쳐 각각 동일한 조건하에서 촬영한다. 이때, 촬영대상의 화장료 도포부위와 무도포부위의 크기는 각각 3 cm $\times$ 3 cm로 하였으며, 도포부위의 화장료 도포량은 도포부위면적 $\times$ 2 μg 을 사용하였다. 또한 촬영 전후 이미지 분석 시 오차를 최소화하도록 미세먼지 노출 전에는 화장료 도포 후 15분 경과한 다음 촬영하였고, 미세먼지 노출 후에도 15분 이상 일정 밝기의 조명이 설치된 항온·항습의 청정 공간 내에서 안정화 시킨 후 촬영하였다. 측정결과는 강도범위(intensity range)를 설정하여 도출하며, 미세먼지 노출 전과 노출 후의 동일한 부분을 중첩하여 같은 값의 강도 범위로 분석한다. 여기서, 수치 분석에 대해서는 화장료 도포 부위와 무도포 부위의 잔여 미세먼지 변화량에 대한 측정결과를 독립검정(independent t-test)법으로 분석하여 유의차 5% ($p < 0.05$) 일 때 통계적 유의성이 있다고 간주하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 미세먼지에 의한 피부염 유발 기전

1.1 미세먼지가 melanocyte에 미치는 영향

미세먼지가 피부 구성 세포인 melanocyte에 미치는 영향을 확인하기 위하여 murine melanoma인 B16F10 세포에 미세먼지를 처리하였다. 미세먼지는 미세먼지 표준물질인 ERM-CZ100, ERM-CZ120, carbon black을 선정하였으며, 각 미세먼지 표준물질의 농도는 선행 독성 연구결과를 참고하여 설정하였다. 미세먼지는 B16F10 세포에서 IL-1 β , TNF- α , IL-6 등 염증성 사이토카인의 발현을 증가시키지 않았다 (그림 7).

이상의 결과로 미세먼지 ERM-CZ100, ERM-CZ120, carbon black은 피부 구성 세포인 melanocyte에서 염증성 반응에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다.

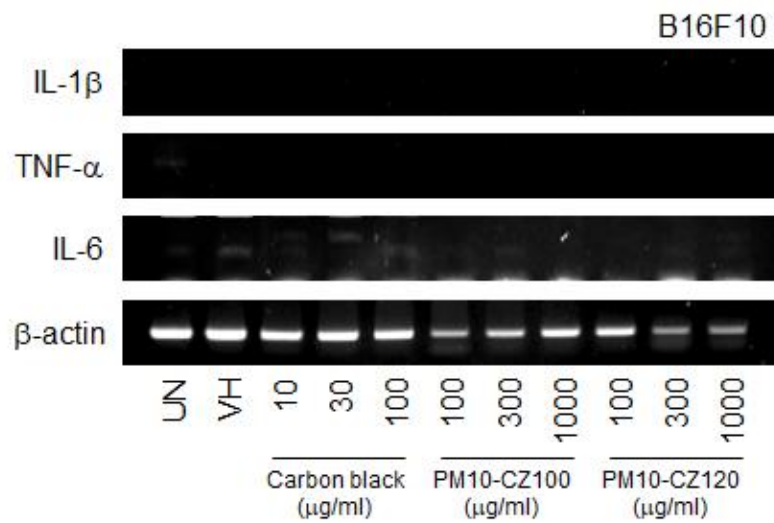


그림 7. 미세먼지가 B16F10 세포에 미치는 영향. B16F10 세포에 미세먼지를 농도별로 6시간 처리한 후, 염증성 사이토카인 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 발현량을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.

1.2 미세먼지가 macrophage에 미치는 영향

(1) 미세먼지의 염증성 사이토카인 유발

미세먼지가 피부 구성 세포인 macrophage에 미치는 영향을 검증하기 위하여 Raw264.7 세포에 미세먼지 표준물질 ERM-CZ100, ERM-CZ120 그리고 carbon black을 처리하였다. 미세먼지 중 ERM-CZ100과 ERM-CZ120은 Raw264.7 세포에서 IL-1 β , TNF- α , IL-6 등 염증성 사이토카인의 발현을 증가시켰으나, carbon black은 영향이 없었다(그림 8).

이상의 결과로 미세먼지 중 ERM-CZ100과 ERM-CZ120은 피부 내에서 대식세포(macrophage)에서 IL-1 β , TNF- α , IL-6 등과 같은 염증성 사이토카인을 분비하여 피부 염증을 유발할 수 있음을 확인하였다.

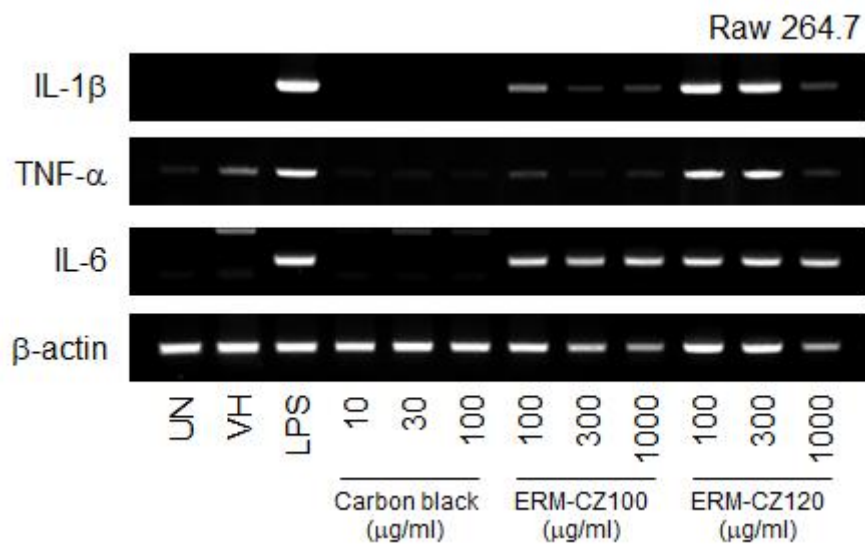


그림 8. 미세먼지가 Raw 264.7 세포에 미치는 영향. Raw 264.7 세포에 미세먼지를 농도별로 6시간 처리한 후, 염증성 사이토카인 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 발현량을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.

(2) Raw 264.7 cell을 자극하는 미세먼지의 최소 농도

대식세포에서 염증을 유발하는 미세먼지의 최소농도를 확인하기 위해, Raw 264.7 세포에 미세먼지 중 ERM-CZ100, ERM-CZ120 그리고 carbon을 농도별로 처리하여 염증성 사이토카인 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 발현 정도를 확인하였다. 확인 결과, carbon black은 염증성 사이토카인 IL-1 β , TNF- α , IL-6 등의 발현에 영향을 주지 않았지만 (그림 9A), ERM-CZ100과 ERM-CZ120은 농도 의존적으로 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 발현을 증가시키는 것으로 확인되었다(그림 9B). 이 결과를 β -actin 대비 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 발현량을 정량적으로 분석하기 위해 Image J 프로그램을 이용하여 정량화 하였다. 정량 분석 결과, 미세먼지 중 ERM-CZ100과 ERM-CZ120은 30 μ g/ml부터 염증성 사이토카인 IL-1 β 및 TNF- α 의 발현을 유의미하게 증가시켰으며, 100 μ g/ml부터 IL-6의 발현을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(그림 9C-E).

추가적으로 ELISA를 이용하여 사이토카인 단백질양을 분석한 결과 ERM-CZ100과 ERM-CZ120은 농도 의존적으로 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 분비를 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(그림 9F-H).

이상의 결과로 ERM-CZ100과 ERM-CZ120은 30~100 μ g/ml에서 Raw 264.7 cell의 염증반응을 유도한다는 것을 확인하였다.

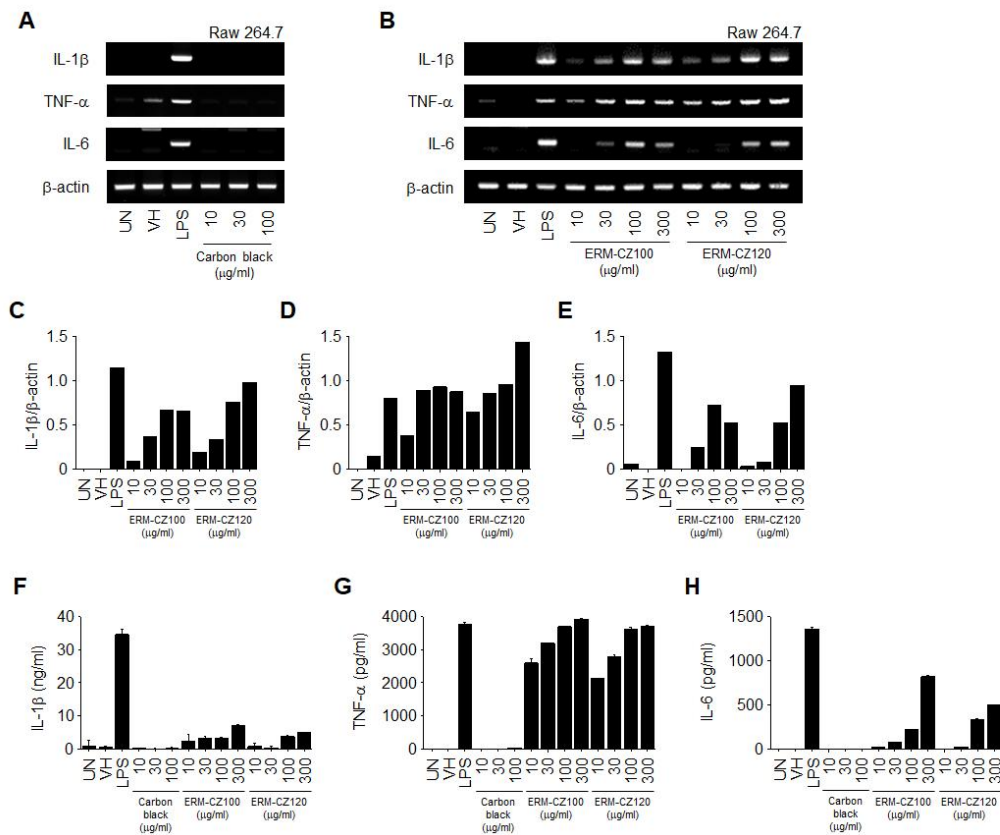


그림 9. Raw 264.7 세포에 영향을 주는 미세먼지의 최소농도. Raw 264.7 세포에서 미세먼지를 농도별로 6시간 처리한 후, 염증성 사이토카인 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 발현량을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다(A and B). ImageJ를 이용하여 정량화 하였다(C, D and E). 사이토카인 분비량을 확인하기 위하여 IL-1 β , TNF- α , IL-6 ELISA를 수행하였다(F, G, H).

(3) Raw 264.7 cell에서 미세먼지에 의한 MAPK 인산화 증가

다음으로 대식세포를 통한 미세먼지의 염증유발 작용기전을 확인하기 위해 Raw 264.7세포에 염증성 사이토카인 분비량에 영향을 미친 미세먼지 ERM-CZ100과 ERM-CZ120을 처리한 이 후 MAPKs (ERK, p38, JNK) 인산화를 측정하였다. 일반적으로 LPS와 같은 외부 자극에 의해 My D88, IRAK, TRAF6가 활성화되고 이에 따라 TAK1도 활성화되어 최종적으로 MAPKs가 활성화되면 염증성 사이토카인이 발현된다.

Raw 264.7 세포에 ERM-CZ100과 ERM-CZ120 100 µg/ml를 15, 30, 60, 120, 240 분 동안 처리하고 ERK, p38, JNK의 인산화를 western blot을 이용하여 확인하였다. 그 결과 ERM-CZ100과 ERM-CZ120을 처리하고 15 분 내지 30 분 경 후에는 ERK, p38, JNK의 인산화가 증가하지만, 60 분 이 후에는 인산화가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(그림 10A and B). 이와 같은 반응은 대식세포가 염증반응을 나타낼 때 관측되는 전형적인 MAPK 인산화 반응이다.

이 결과로부터 미세먼지 중 ERM-CZ100과 ERM-CZ120은 Raw 264.7 세포에서 MAPK 활성화를 통해 염증성 사이토카인 발현을 증가시키고 있음을 알 수 있었다.

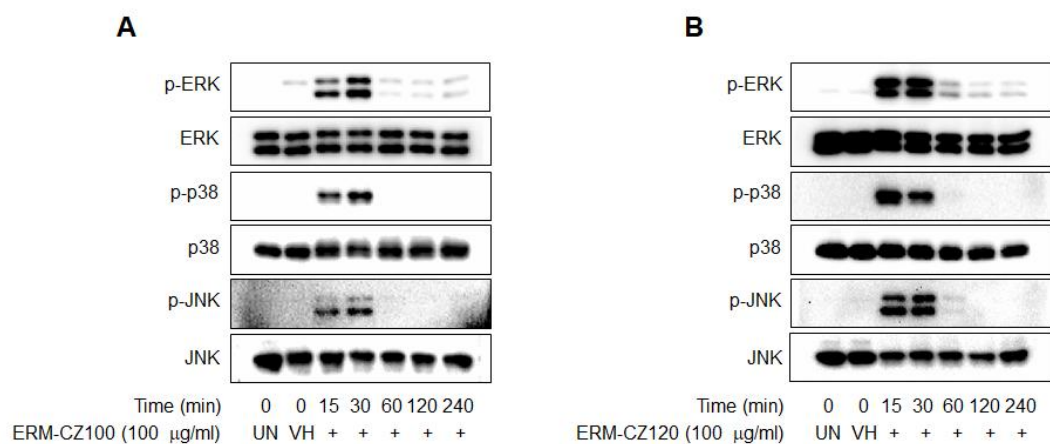


그림 10. Raw 264.7 cell에서 미세먼지에 의한 MAPKs 활성화. Raw 264.7 세포에 ERM-CZ100, ERM-CZ120을 100 μ g/ml의 농도로 시간별 (15, 30, 60, 120, 240분)로 처리한 후, MAPKs (ERK, p38, JNK)의 인산화를 western blot으로 확인하였다(A, B).

(4) Raw 264.7 cell에서 미세먼지에 의해 활성화된 MAPK의 기능

위 실험에서 미세먼지 중 ERM-CZ100과 ERM-CZ120에 의해 ERK, p38, JNK 인산화가 증가함을 확인할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 이 들 MAPK 중 어느 것이 염증성 사이토카인 발현에서 많은 기여를 하는 지 확인하고자 하였다. 이를 위해 미세먼지와 MAPK 저해제를 처리하여 염증성 사이토카인의 발현도를 분석하였다.

Raw 264.7 cell에 ERM-CZ100과 ERM-CZ120을 처리할 경우 ERK 인산화가 증가하였으며, ERK 인산화 억제제인 PD98059는 ERK 인산화를 억제하였다(그림 11A) 그러나 PD98059는 ERM-CZ100과 ERM-120에 의한 염증성 사이토카인 발현은 억제하지 않았다(그림 11D and E).

Raw 264.7 cell에 ERM-CZ100과 ERM-CZ120을 처리할 경우 p38 인산화가 증가하였으며, p38 인산화 억제제인 SB20219는 p38 인산화를 억제하였다(그림 11B). 게다가 SB20219는 ERM-CZ100과 ERM-120에 의한 염증성 사이토카인 발현은 억제하였다(그림 11D and E).

Raw 264.7 cell에 ERM-CZ100과 ERM-CZ120을 처리할 경우 JNK 인산화가 증가하였으며, JNK 인산화 억제제인 SP600125는 JNK 인산화를 억제하였으며(그림 11C), SP600125는 ERM-CZ100과 ERM-120에 의한 염증성 사이토카인 발현은 억제하였다(그림 11D and E).

위의 결과들을 종합하여, ERM-CZ100과 ERM-CZ120은 p38, JNK 인산화를 통해 염증성 사이토카인의 발현을 증가시키고 있음을 확인할 수 있었다.

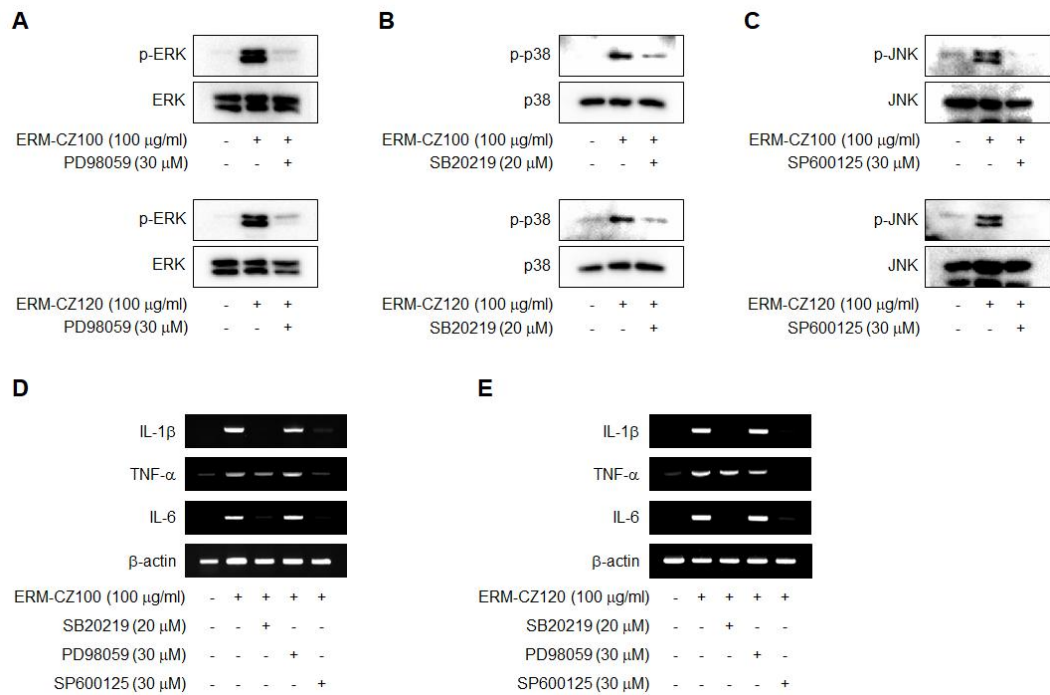


그림 11. MAPKs 저해제에 의한 MAPKs 신호전달 억제와 염증성 사이토카인 발현 억제. Raw 264.7 세포에 ERK, p38, JNK 저해제를 2시간 동안 전 처리하고, ERM-CZ100, ERM-CZ120 100 µg/ml를 30분간 처리하였다. MAPKs 활성화는 western blot을 수행함 (A, B, C). MAPKs 활성화를 억제 시킨 후, ERM-CZ100과 ERM-CZ120 100 µg/ml를 6시간 처리하여 염증성 사이토카인 IL-1β, TNF-α, IL-6의 발현을 RT-PCR로 측정하였다(D, E).

(5) Raw 264.7 cell에서 미세먼지에 의해 의한 NF- κ B 활성화

대식세포의 염증성 사이토카인 발현은 MAPK와 더불어 NF- κ B 신호전달에 의존한다고 알려져 있다. 세포 내에서 NF- κ B는 I κ B α /I κ B β 와 결합하고 있어, 핵으로 이동하지 못한다. 세포에 염증자극이 오면 I κ B는 인산화 되고, 유비퀴틴(ubiquitin)으로 이동하고, 염증성 사이토카인 등 유전자의 발현을 증가시킨다.

Raw 264.7 세포에 ERM-CZ100과 ERM-CZ120을 각각 100 μ g/ml 씩을 4 시간 동안 처리하고 핵으로 이동한 NF- κ B의 양을 western blot을 통해 확인하였다. 두 미세먼지 중 ERM-CZ100과 ERM-CZ120을 처리하면 NF- κ B (p50, p65)의 핵으로의 이동이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 12A). 동시에 ERM-CZ100 (그림 12B)와 ERM-CZ120 (그림 12C)를 처리할 때 세포질 내 I κ B α 의 농도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. I κ B α 의 양은 미세먼지 처리 후 15 ~ 30 분경에 감소하고 60 분 이후에는 다시 증가하는 전형적인 NF- κ B 활성화 기전을 보여주었다.

위의 결과들로부터 미세먼지 ERM-CZ100과 ERM-CZ120는 NF- κ B 활성화를 통해 염증성 사이토카인 발현을 증가시키고 있는 다는 것을 확인할 수 있었다.

1.3 미세먼지가 keratinocyte에 미치는 영향과 그 최소 농도

(1) 미세먼지의 염증성 사이토카인 유발

미세먼지가 피부 구성 세포인 macrophage에 미치는 영향을 검증하기 위하여 Raw264.7 세포에 미세먼지 표준물질 ERM-CZ100, ERM-CZ120 그리고 carbon black을 처리하였다. 미세먼지 중 ERM-CZ100과 ERM-CZ120은 Raw264.7 세포에서 IL-1 β , TNF- α , IL-6 등 염증성 사이토카인의 발현을 증가시켰으나, carbon black은 영향이 없었다(그림 12).

이상의 결과로 미세먼지 중 ERM-CZ100과 ERM-CZ120은 피부 내에서 대식세포(macrophage)에서 IL-1 β , TNF- α , IL-6 등과 같은 염증성 사이토카인을 분비하여 피부 염증을 유발할 수 있음을 확인하였다.

(2) 미세먼지가 keratinocyte 세포를 자극하는 최소 농도

미세먼지가 피부구성세포인 keratinocyte에 미치는 영향을 확인하기 위하여 분석한 결과(그림 13)에 Image J 프로그램을 이용하여 농도에 대한 염증성 사이토카인의 발현량을 정량적으로 분석하였다. 그 결과, ERM-CZ100과 ERM-CZ120을 농도별로 처리한 경우 염증성 사이토카인 IL-1 β 와 IL-8의 발현은 최소농도 30 $\mu\text{g/ml}$ 부터 유의미한 증가를 보여주었으며, IL-6의 발현은 최소농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의미한 증가를 보여주었다. 하지만 TNF- α 의 농도 의존적 발현 증가는 확인되지 않았다(그림 13C-E).

이상의 결과로 ERM-CZ100과 ERM-CZ120은 10 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 HaCaT 세포의 IL-1 β , IL-6, IL-8의 분비를 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

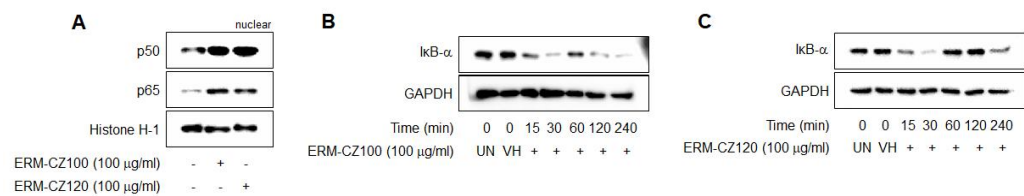


그림 12. 미세먼지에 의한 NF- κ B의 활성화. Raw 264.7 세포에서 ERM-CZ100, ERM-CZ120 100 μ g/ml의 농도로 4시간 처리한 후, NF- κ B 활성화를 확인하기 위하여 western blot을 수행하였다(A). I κ B degradation을 확인하기 위하여 ERM-CZ100, ERM-CZ120 100 μ g/ml을 시간별(15, 30, 60, 120, 240분)로 처리한 후, western blot을 수행하였다.

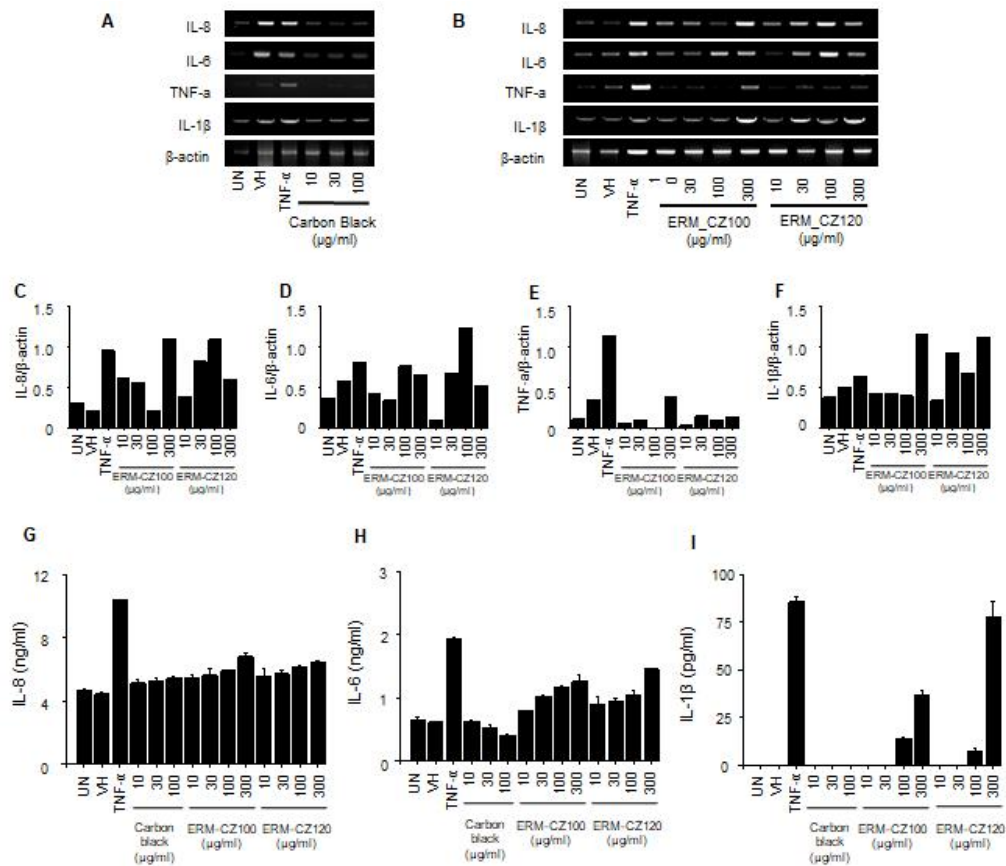


그림 13. HaCaT 세포에 영향을 주는 미세먼지의 최소농도. HaCaT 세포에서 미세먼지를 농도별로 24시간 처리한 후, 염증성 사이토카인 IL-8, IL-6, TNF-α, IL-1β의 발현량을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다(A and B). ImageJ를 이용하여 정량화하였다(C, D, E and F). 사이토카인 분비량을 확인하기 위하여 IL-8, IL-6, IL-1β ELISA를 수행하였다(G, H and I).

(3) HaCaT 세포에서 미세먼지에 의한 MAPK 인산화 증가

다음으로 피부 세포 내에서 미세먼지의 염증유발 작용기전을 확인하기 위해 HaCaT 세포에서 염증성 사이토카인 발현을 유발시킨 미세먼지 중 ERM-CZ100과 ERM-CZ120을 처리하여 MAPKs (ERK, P38, JNK)의 활성화를 확인하고자 하였다. 일반적으로 TNF- α 와 같은 외부 자극에 의해 My D88, IRAK, TRAF6가 활성화되고 이에 따라 TAK1도 활성화되어 최종적으로 MAPKs가 활성화되면 염증성 사이토카인이 발현된다. 먼저 HaCaT 세포에 ERM-CZ100과 ERM-CZ120을 각 100 $\mu\text{g/ml}$ 씩 15, 30, 60, 120, 240 분 동안 처리하고 ERK, p38, JNK의 인산화를 western blot을 이용하여 확인하였다. ERM-CZ100과 ERM-CZ120을 처리하고 30 분 내지 60 분경 후에는 ERK, p38의 인산화가 증가하지만, 120 분 이 후에는 인산화가 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 14A and B). 이와 같은 반응은 염증 반응을 나타낼 때 관측되는 전형적인 MAPK 인산화 반응이다. 위 결과로, 미세먼지 중 ERM-CZ100과 ERM-CZ120은 HaCaT 세포에서 MAPK 활성화를 통해 염증성 사이토카인 발현을 증가시키고 있는 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로 미세먼지는 피부에서 대식세포와 keratinocyte를 통하여 염증반응을 유발할 수 있다는 것을 확인하였다. 이 후 MAPK 억제제를 처리할 경우 염증성 사이토카인 발현이 감소하는 지에 대한 확인과 NF- κB 활성화와 염증성 사이토카인 발현과의 연관성 또한 규명할 필요가 있을 것으로 사료된다.

위와 같은 결과로부터 미세먼지는 피부 내에서 30~100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도만으로도 염증반응을 일으킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었으며, 더 나아가 미세먼지에 의해 유도된 피부염증을 완화할 수 있는 소재를 탐색하고자 한다.

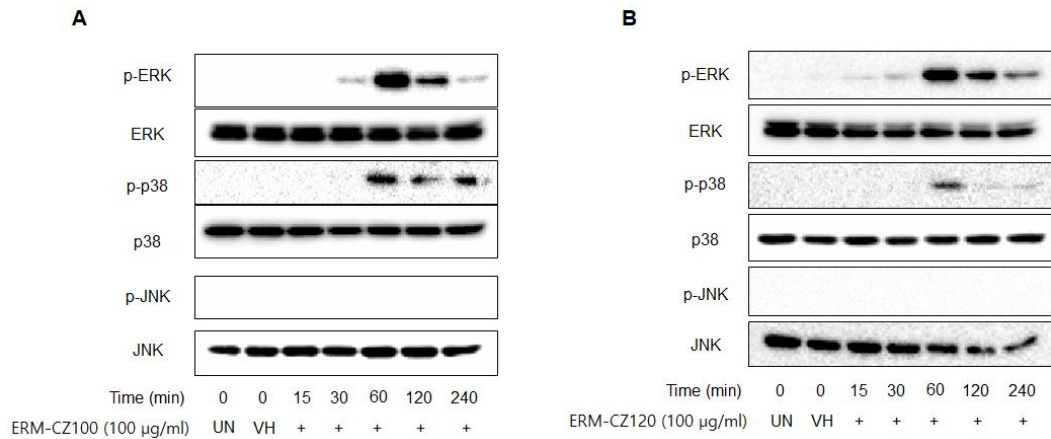


그림 14. HaCaT cell에서 미세먼지에 의한 MAPKs 활성화. HaCaT 세포에서 ERM-CZ100, ERM-CZ120을 100 μ g/ml의 농도로 시간별 (15, 30, 60, 120, 240분)로 처리한 후, MAPKs (ERK, p38, JNK)의 인산화를 western blot으로 확인하였다(A, B).

2. 제주 천연소재 개발

2.1 제주 천연소재 선정 및 추출

미세먼지에 의한 피부 내 염증 작용을 완화할 수 있는 소재의 탐색을 위해 제주도 내 자생 식물 혹은 재배 식물 39종을 선별하여 제주 천연 소재 개발하고자 하였다. 선정된 식물 중 백년초와 같은 식물은 부위별로 분류(표 6)하였으며, 총 39가지로 분류된 식물 중의 추출을 진행하였다.

추출은 70% Ethanol로 진행하였으며, 추출물의 수율 결과는 아래 표에 추가적으로 나타내었다(표 7). 여기서 동백꽃의 추출 수율이 53.5%로 가장 높은 수율을 보여주었으며, 대부분 10% 이상의 수율 수율을 보여주었다.

본 추출물 39종을 이용하여 피부 내 활성과 관련 있는 항산화활성, 미백 기능성 평가, 주름 개선 기능성 평가, 항염 평가 등을 진행하였다.

이러한 평가들을 통해 제주 천연 소재 들의 화장품 원료 및 미세먼지 개선 원료로서의 가능성을 살펴보고자 하였다.

표 6. 제주도내 자생/재배 식물 추출물 목록

국 명	학 명	부위	국 명	학 명	부위
백년초	<i>Opuntia ficus indica</i> var.saboten	열매	감귤	<i>Citrus unshiu</i>	열매
백년초	<i>Opuntia ficus indica</i> var.saboten	열매 (씨 제외)	백합	<i>Lilium longiflorum</i>	줄기
백년초	<i>Opuntia ficus indica</i> var.saboten	줄기	병풀	<i>Centella asiatica</i>	전초
백년초	<i>Opuntia ficus indica</i> var.saboten	씨	달맞이꽃	<i>Oenothera odorata</i>	씨
합박꽃나 무(산목 련)	<i>Magnolia sieboldii</i>	꽃	갯질경이	<i>Plantago major</i>	전초
감귤	<i>Citrus unshiu</i>	꽃	갯질경	<i>Limonium tetragonum</i>	전초
황매화	<i>Kerria japonica</i>	꽃	갯방풍	<i>Glehnia littoralis</i>	전초
수선화	<i>Narcissus tazetta</i> var. <i>chinensis</i>	꽃	큰비쭈	<i>Artemisia fukudo</i>	전초
수국	<i>Hydrangea macrophylla</i>	꽃	민들레	<i>Taraxacum</i> <i>platycarpum</i>	전초
동백꽃	<i>Camellia japonica</i>	꽃	여우구슬	<i>Phyllanthus urinaria</i>	전초
꽃향유	<i>Elsholtzia splendens</i>	꽃	신선초	<i>Angelica keiskei</i>	잎
백합	<i>Lilium longiflorum</i>	꽃	비수리	<i>Lespedeza cuneata</i>	전초
장미	<i>Rosa banksiae</i> Aiton	꽃	송악	<i>Hedera rhombea</i>	전초
목련	<i>Magnolia kobus</i>	꽃	좁은잎천 선과	<i>Ficus erecta</i> var. <i>sieboldii</i>	열매
조릿대	<i>Sasa borealis</i> Makino	줄기	녹차	<i>Camellia sinensis</i>	씨
더덕	<i>Codonopsis lanceolata</i>	뿌리	피망	<i>Capsicum annuum</i>	줄기
마치현(쇠비름)	<i>Portulaca oleracea</i>	전초	돌외	<i>Gynostemma</i> <i>pentaphyllum</i>	전초
신선초	<i>Angelica keiskei</i>	줄기	감귤	<i>Citrus unshiu</i>	잎
브로콜리	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	잎	익모초	<i>Leonurus japonicus</i>	전초
민트	<i>Mentha piperascens</i>	전초			

표 7. 39종의 제주 소재에 대한 70% EtOH 추출 수율

국명	부위	수율	국명	부위	수율
백년초	열매	26.9	감굴	열매	39.3
백년초	열매 (씨 제외)	28.2	백합	줄기	21.3
백년초	줄기	22.0	병풀	전초	20.7
백년초	씨	10.8	달맞이꽃	씨	9.7
함박꽃나무(산목련)	꽃	30.2	갯질경이	전초	23.7
감굴	꽃	30.5	갯질경	전초	25.8
황매화	꽃	30.7	갯방풍	전초	27.0
수선화	꽃	42.5	큰비쭈	전초	26.2
수국	꽃	41.7	민들레	전초	7.0
동백꽃	꽃	53.5	여우구슬	전초	12.4
꽃향유	꽃	28.1	신선초	잎	26.4
백합	꽃	50.5	비수리	전초	13.0
장미	꽃	43.3	송악	전초	44.8
목련	꽃	31.2	좁은잎천선과	열매	32.4
조릿대	줄기	13.7	녹차	씨	17.0
더덕	뿌리	21.7	피망	줄기	11.4
마치현(쇠비름)	전초	16.3	돌외	전초	16.4
신선초	줄기	29.0	감굴	잎	30.0
브로콜리	잎	30.7	익모초	전초	9.8
민트	전초	11.0			

2.2 제주 천연소재 39종의 항산화 활성 평가

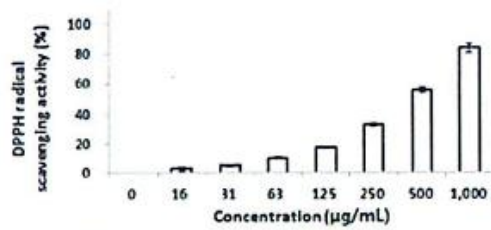
미세먼지와 자외선과 같은 외부 스트레스에 의해 피부에서 생성되는 과잉의 ROS는 세포 및 조직 손상과 더불어 노화를 가속화시킨다. 이러한 ROS에는 super oxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical ($\cdot OH$) 등이 있으며 이들과 생체분자와의 반응으로 생성된 유기 라디칼 ($\cdot OR$ 또는 $\cdot OOR$)과 같은 라디칼 종이 포함된다. 라디칼은 원자가 전자 오비탈에 쌍을 이루지 않은 홀전자가 존재하는 상태로 이 상태는 에너지 준위가 높고 반응성이 매우 커서 생체 내에서 세포들과 반응을 하게 된다. 특히, 세포막에서 지질 과산화반응을 개시하여 자동 산화 반응을 일으키는데 이는 연쇄 반응 과정으로 세포를 연쇄적으로 파괴시켜 체내에서 큰 손상을 입힐 수 있다. 즉, 이와 같은 반응은 체내에서 노화 반응과 밀접히 연관되어 있으며, 피부에서 라디칼에 의한 산화 반응은 피부 노화, 염증, 미백과 같은 다양한 현상들과 밀접한 관련을 갖고 있다.

위와 같은 이유로 추출한 39종의 소재에 대한 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. 이 두 실험은 대표적인 라디칼 소거 활성 평가 방법으로 시약 내 존재하는 자유라디칼을 환원시켜 간편하게 실험군의 라디칼 소거능을 확인할 수 있다. 즉, 라디칼에 의한 산화에 대한 환원력 평가를 통해 항산화 활성을 확인할 수 있다.

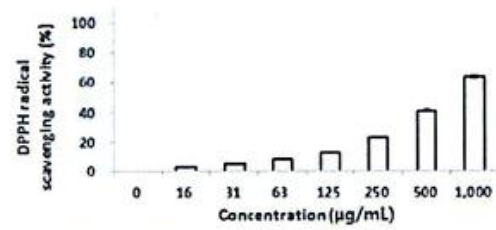
DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 이용한 항산화 활성 측정 결과 농도 별로 처리 시 다음과 같이 그래프로 나타내었으며(그림 15 and 16), 라디칼의 절반이 소거되는 농도인 IC50 [$\mu g/ml$]값 (Inhibitory concentration 50)은 다음과 같이 표로 나타내었다(표 8).

아래 표에서 보는 것과 같이 수국, 동백, 꽃향유, 장미, 목련, 병꽃, 갯질경이, 갯질경, 큰비쭈, 민들레, 비수리가 높은 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 나타났다.

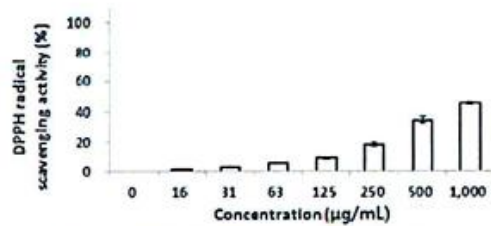
위와 같은 결과를 통해 자유라디칼 소거 활성을 갖는 제주천연 소재를 확인하였으며, 이는 추후 항산화 활성이 요구되는 기능성 화장품, 건강식품 등에 응용될 수 있음을 확인하였다.



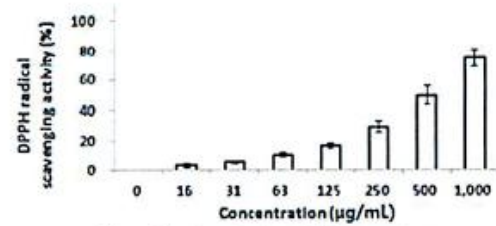
백년초 씨 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



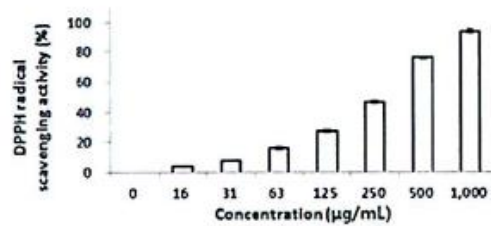
백년초 열매 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



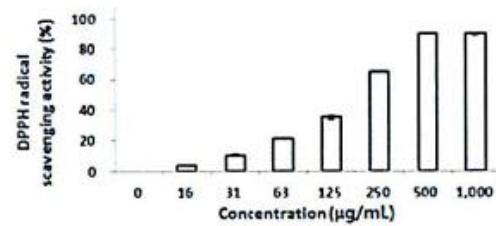
백년초 줄기 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



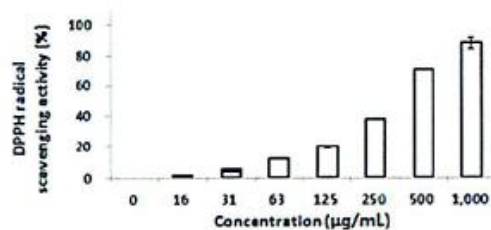
백년초 환 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



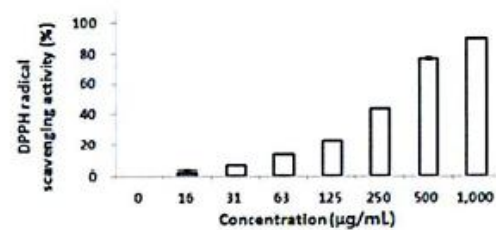
백년초 씨 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



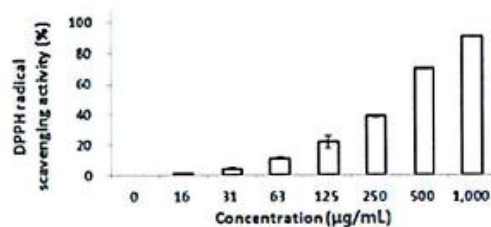
산목련



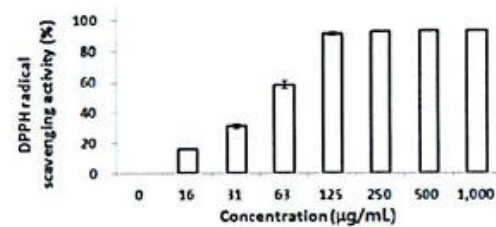
감귤꽃 *Citrus unshiu* S. Marcov.



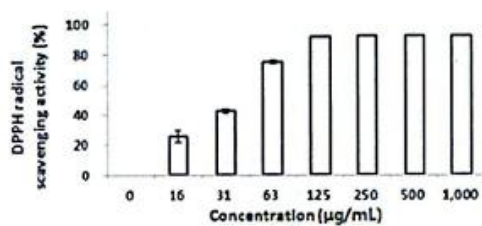
황매화 *Kerria japonica* (L.) DC.



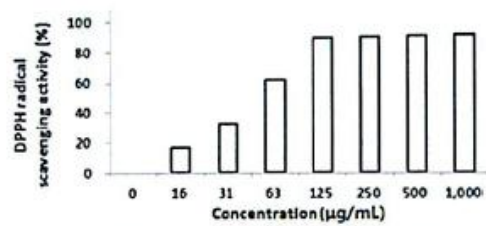
수선화 *Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roem.



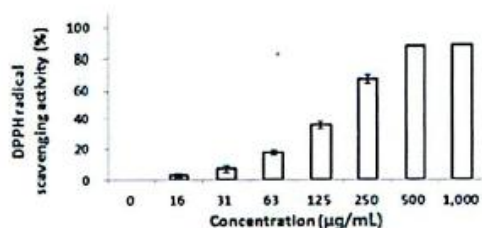
수국 꽃 *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.



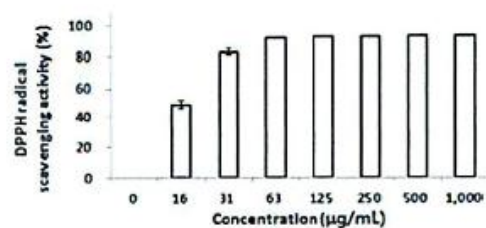
동백꽃 *Camellia japonica* L.



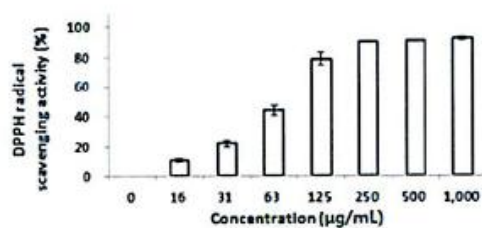
꽃향유 *Elsholtzia splendens* Nakai ex F.Maek.



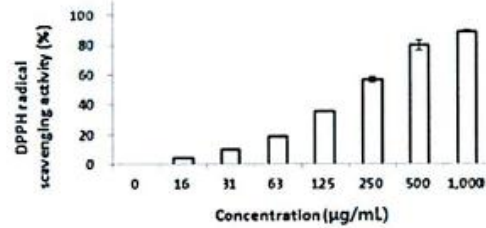
백합 *Lilium longiflorum* Thunb.



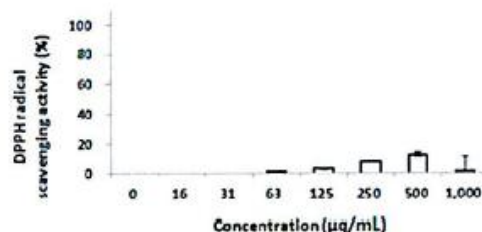
장미 *Rosa banksiae* Aiton



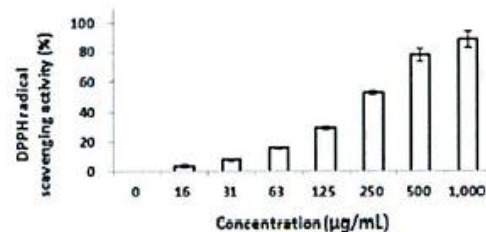
목련 *Magnolia kobus* DC.



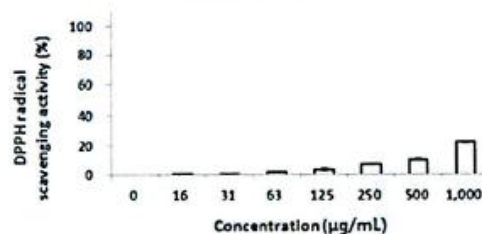
조릿대 *Sasa borealis* (Hack.) Makino



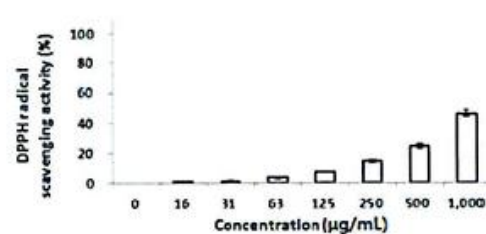
더덕 *Codonopsis lanceolata* (Siebold & Zucc.) Benth. & Hook.f. ex Trautv.



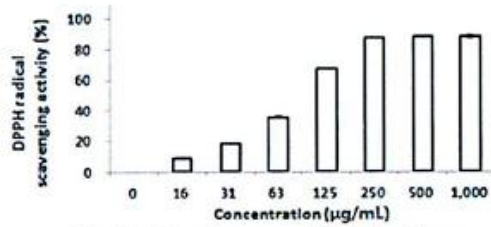
마치현 *Portulaca oleracea* L.



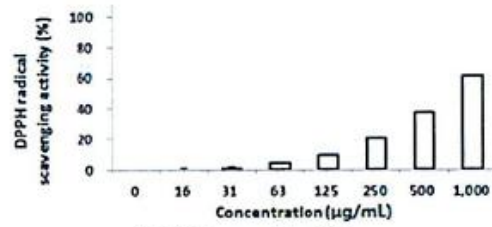
선선초 줄기 *Angelica keiskei*



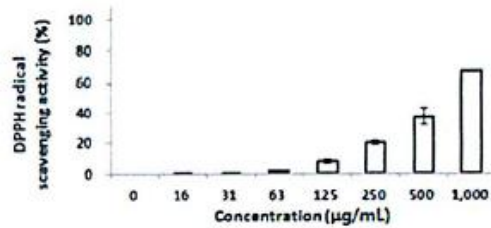
브로콜리 *Brassica oleracea* var. *italica*



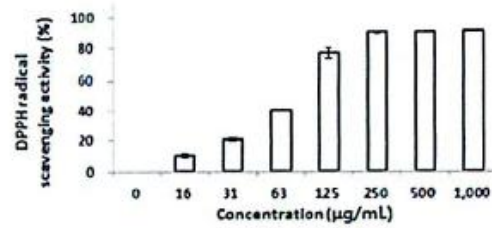
민트 *Mentha piperascens* (Malinv.) Holmes



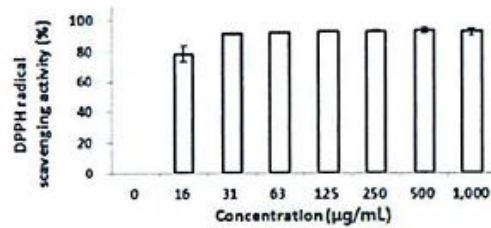
감귤 *Citrus unshiu* S.Marcov.



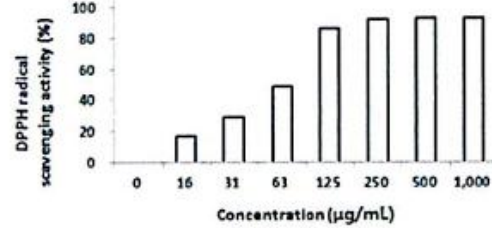
백합 줄기 *Lilium longiflorum* Thunb.



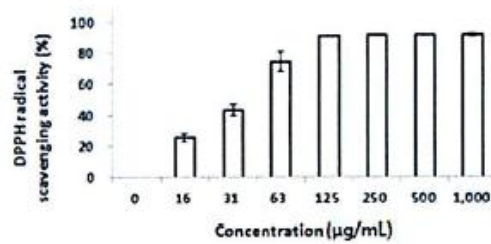
병풍 *Centella asiatica* (L.) Urb



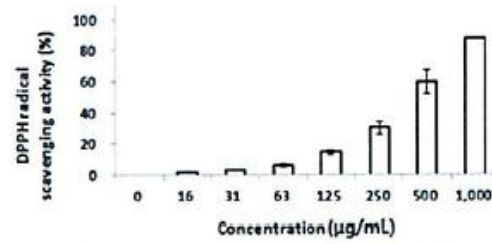
단맛이 씨



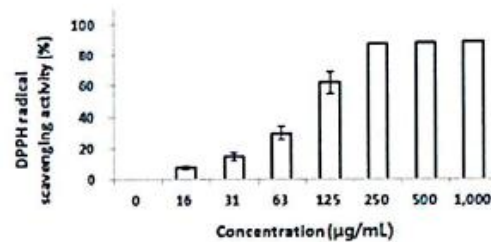
갯질경이 *Plantago major* f. *yezomaritima* (Koidz.) Oh



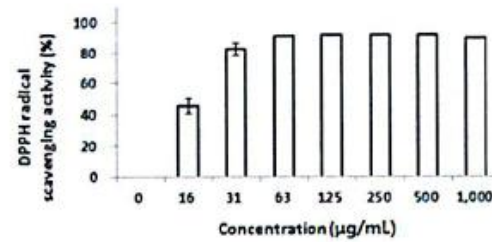
갯질경 *Limonium tetragonum* (Thunb.) Bullock



갯방풍 *Glehnia littoralis* F.Schmidt ex Miq.



큰비쭉 *Artemisia fukudo* Makino



민들레 *Taraxacum platycarpum* Dahlst.

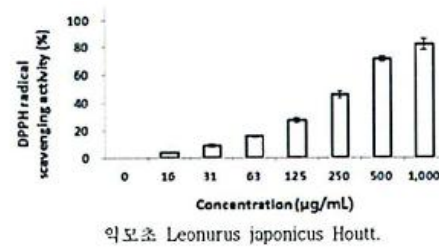
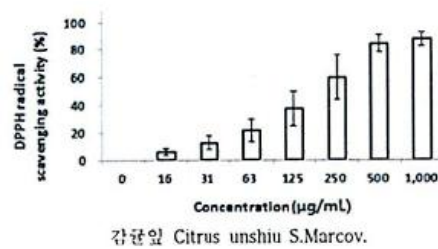
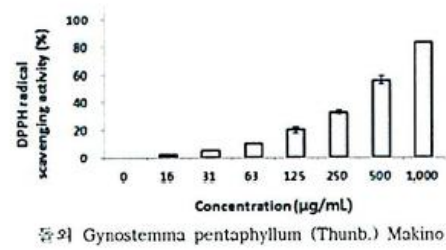
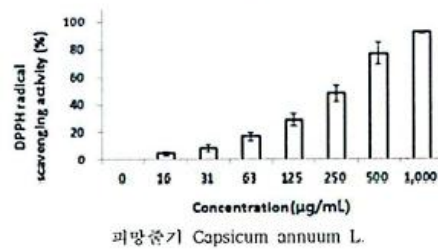
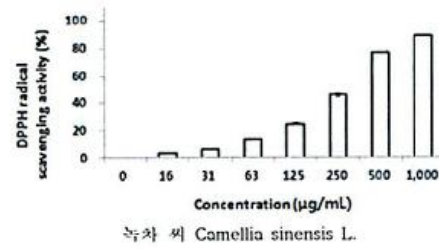
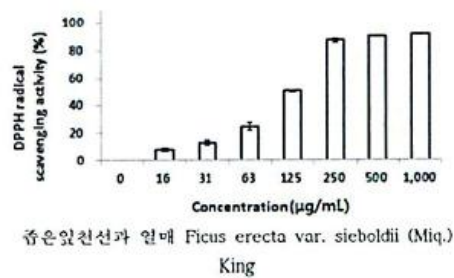
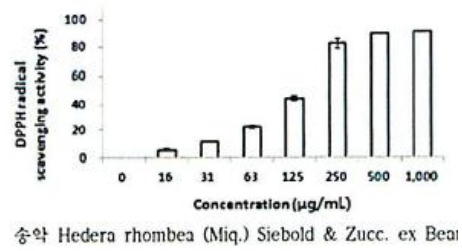
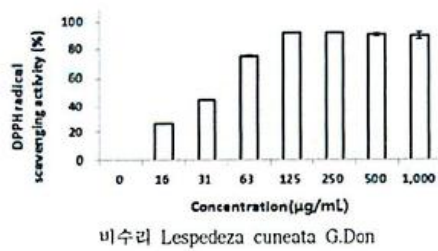
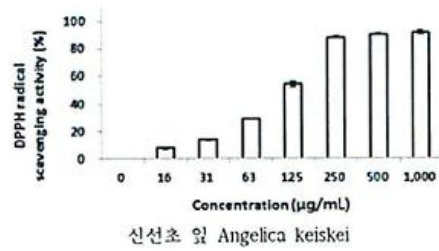
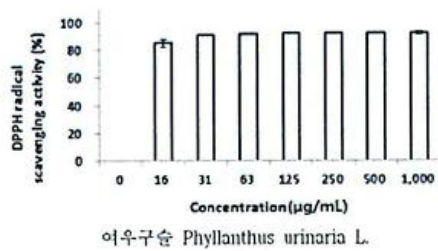
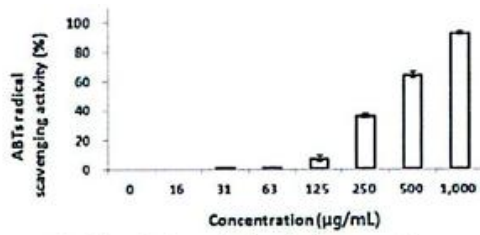
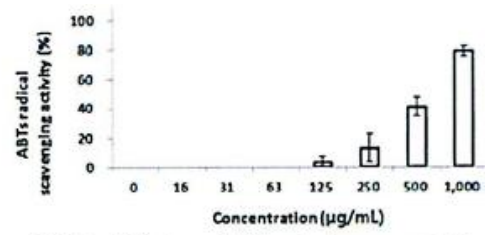


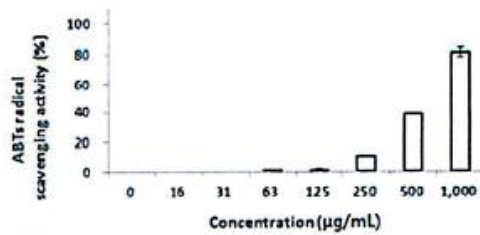
그림 15. 제주 천연 소재 39종의 DPPH활성 평가. 제주 식물소재 39종의 항산화능 평가를 하기 위해 DPPH법을 통해 확인하였다.



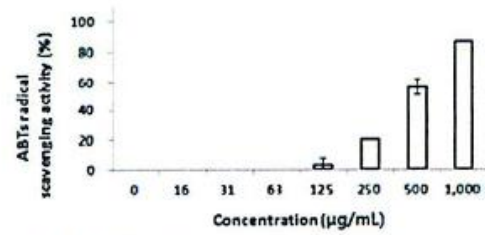
백년초 씨 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



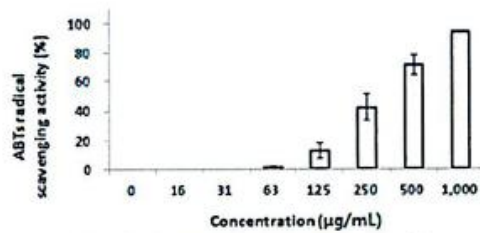
백년초 열매 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



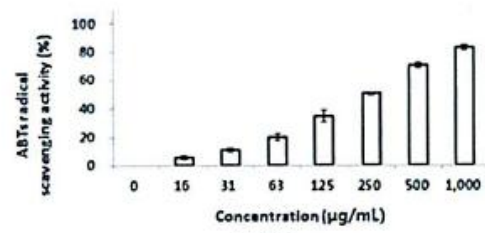
백년초 줄기 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



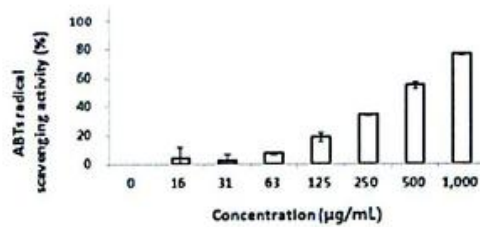
백년초 환 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



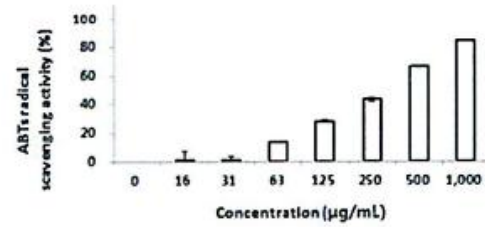
백년초 씨 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



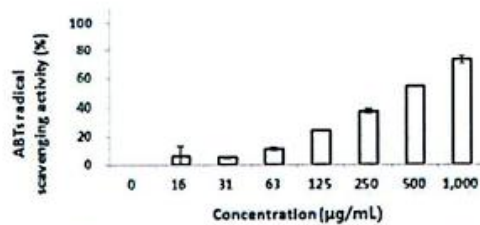
산목련



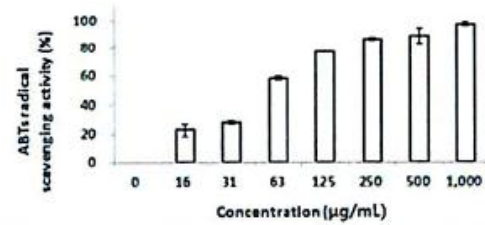
감귤꽃 *Citrus unshiu* S. Marcov.



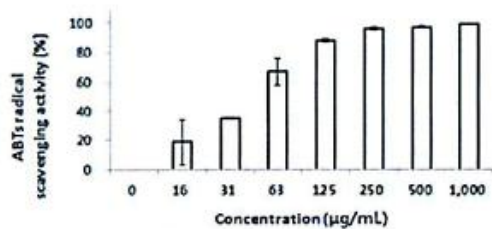
향매화 *Kerria japonica* (L.) DC.



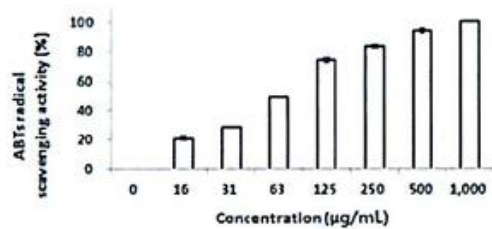
수선화 *Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roem.



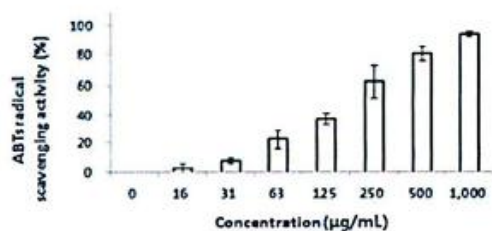
수국 꽃 *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.



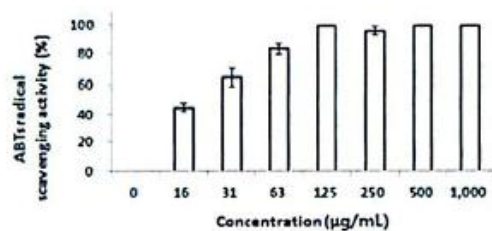
동백꽃 *Camellia japonica* L.



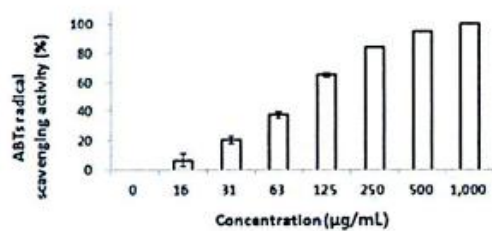
장미 *Elsholtzia splendens* Nakai ex F. Maek



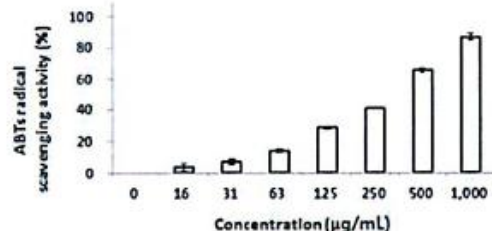
백합 *Lilium longiflorum* Thunb.



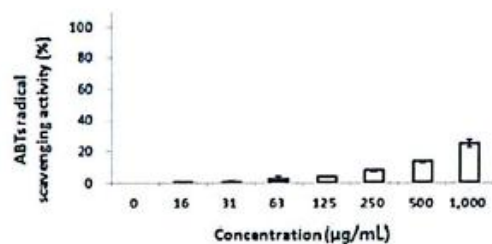
장미 *Rosa banksiae* Aiton



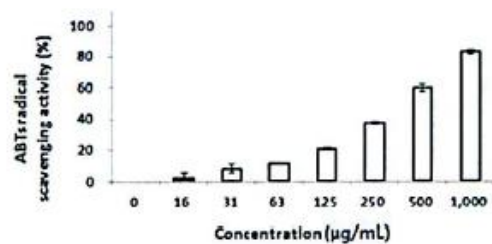
목련 *Magnolia kobus* DC.



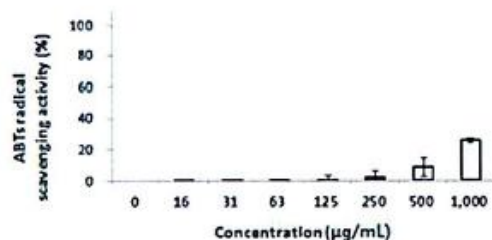
조릿대 *Sasa borealis* (Hack.) Makino



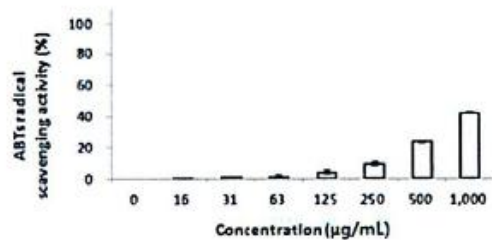
덕덕 *Codonopsis lanceolata* (Siebold & Zucc.)
Benth. & Hook.f. ex Trautv.



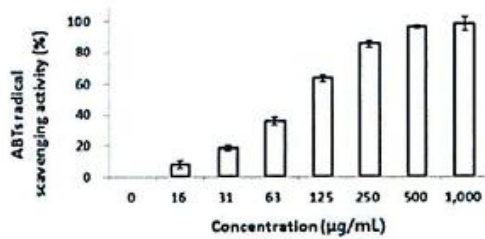
마치현 *Portulaca oleracea* L.



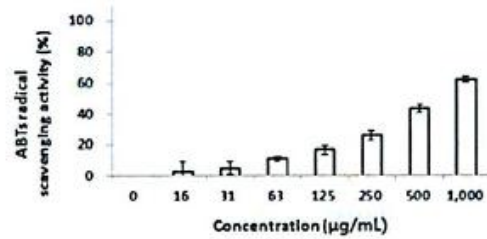
신선초 줄기 *Angelica keiskei*



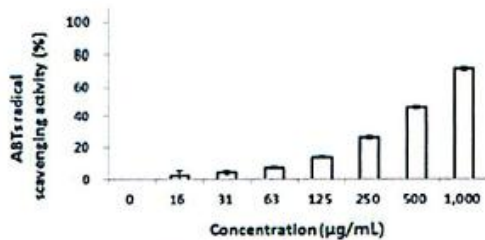
브로콜리 *Brassica oleracea* var. *italica*



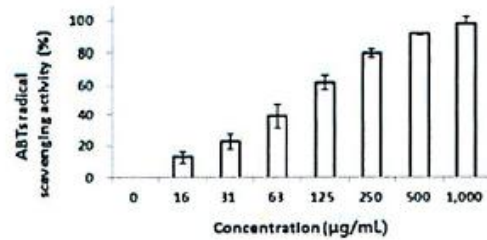
민트 *Mentha piperascens* (Malinv.) Holmes



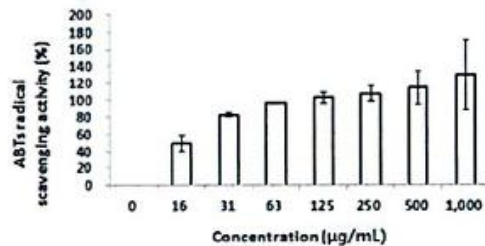
감귤 *Citrus unshiu* S.Marcov.



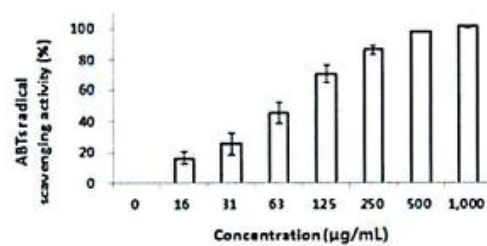
백합 줄기 *Lilium longiflorum* Thunb.



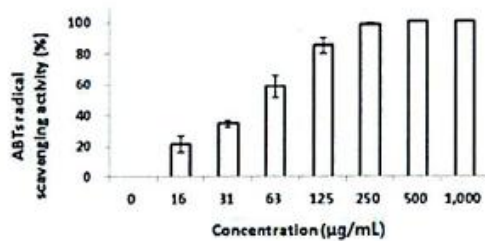
병풀 *Centella asiatica* (L.) Urb



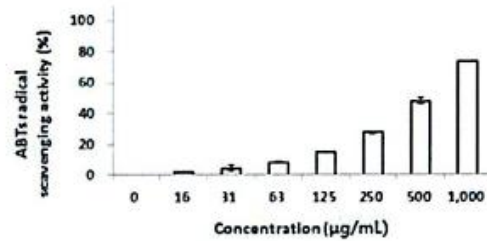
달맞이 씨



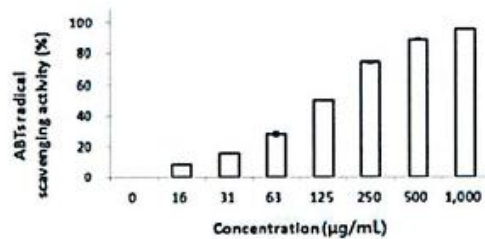
갯질경이 *Plantago major* f. *yezomaritima* (Koidz.) Ohwi



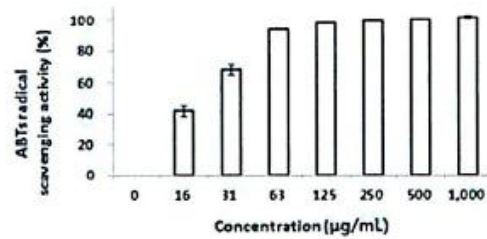
갯질경 *Limonium tetragonum* (Thunb.) Bullock



갯방풍 *Glehnia littoralis* F.Schmidt ex Miq.



큰비쑥 *Artemisia fukudo* Makino



민들레 *Taraxacum platycarpum* Dahlst.

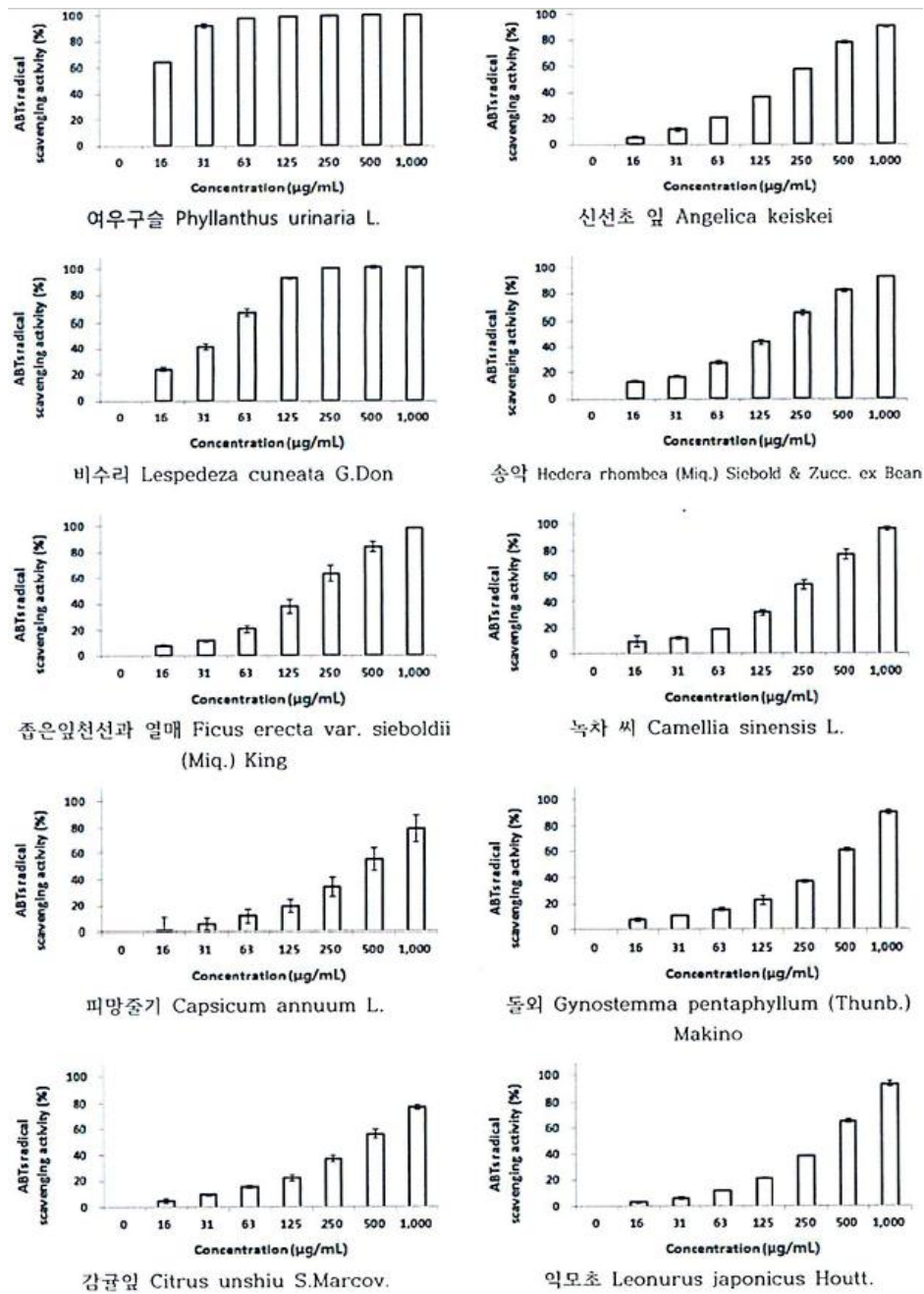


그림 16. 제주 천연 소재 39종의 ABTS활성 평가. 제주 식물소재 39종의 항산화능 평가를 하기 위해 ABTS법을 통해 확인하였다.

표 8. 39종의 제주 소재에 대한 항산화 활성

국명	부위	DPPH (IC50 [μg/ml])	ABTS (IC50 [μg/ml])	국명	부위	DPPH (IC50 [μg/ml])	ABTS (IC50 [μg/ml])
백년초	열매	429.0	357.3	감귤	열매	727.2	340.5
백년초	열매 (씨 제외)	671.0	594.1	백합	줄기	682.2	563.6
백년초	줄기	>1000	619.7	병풀	전초	72.7	88.0
백년초	씨	259.7	302.2	달맞이 꽃	씨	>1000	7.1
함박꽃 나무(산목련)	꽃	167.5	234.5	갯질경 이	전초	60.8	72.1
감귤	꽃	322.0	426.0	갯질경	전초	36.7	50.6
황매화	꽃	271.5	300.0	갯방풍	전초	408.8	541.7
수선화	꽃	313.5	413.0	큰비쭉	전초	69.1	123.3
수국	꽃	51.0	54.0	민들레	전초	17.9	21.0
동백꽃	꽃	45.5	44.5	여우구 슬	전초	>1000	>1000
꽃향유	꽃	47.5	64.0	신선초	잎	105.8	195.4
백합	꽃	166.0	179.5	비수리	전초	35.3	40.0
장미	꽃	8.5	20.0	송악	전초	131.1	151.3
목련	꽃	67.5	84.0	좁은잎 천선과	열매	117.2	177.6
조릿대	줄기	196.0	158.5	녹차	씨	264.0	230.4
더덕	뿌리	>1000	>1000	피망	줄기	251.5	450.4
마치현 (쇠비 름)	전초	228.7	377.3	돌외	전초	426.9	376.1
신선초	줄기	>1000	>1000	감귤	잎	185.5	415.0
브로콜 리	잎	571.3	>1000	익모초	전초	267.1	343.3
민트	전초	83.1	88.2				

2.3 제주 천연 소재 39종의 피부 미백 및 주름개선 활성 평가

다음으로 제주 천연 소재 39종의 미백 및 주름 개선에 대한 활성을 평가하기 위해 tyrosinase와 elastase 효소 억제 활성을 측정하였다.

먼저 피부의 톤을 검거나 불균일하게 만드는 멜라닌 색소의 생성과정은 tyrosine의 분해와 관련이 깊은데, 여기서 이를 분해하는 tyrosinase가 핵심 효소로 작용한다. 자세히 살펴보면 멜라닌의 생성과정에서 tyrosinase는 L-tyrosine에서 3,4- dihydroxy - L- phenylalanine (DOPA)를 거쳐 DOPA quinone으로 산화되는 과정의 전체 반응 속도를 결정하는 핵심 효소로 작용한다. 즉 tyrosinase의 저해활성은 미백활성을 측정하는데 매우 유용하며 멜라닌 생성에 있어 핵심적인 효소이다. 따라서 Tyrosinase 저해 활성을 통하여 미백 효능을 측정할 수 있다.

피부 진피층은 세포외 기질(ECM, Extracellular matrix)의 일종인 콜라겐, 엘라스틴과 같은 단백질로 구성되어 있다. 이러한 단백질들은 피부를 지탱하며 그 외관을 유지시켜 준다. 하지만 이들을 분해하는 효소인 MMPs (matrix metalloproteinases)가 자외선 및 활성산소 등에 의해 유발되면, 피부의 외관을 구성하는 단백질의 붕괴가 일어나며 외관적으로 주름이 발생하게 된다. 알려진 바에 의하면 미세먼지는 피부 내에서 활성산소를 유발하는 것으로 알려져 있다. 피부 진피층에서 collagenase, elastase와 같은 MMPs가 생성되면 피부노화, 특히 주름생성과 피부 탄력감소와 밀접한 관계가 있다. 따라서 탄력감소 및 주름생성 평가에 있어 elastase의 활성 저해 평가는 매우 중요하다.

제주 천연 소재 39종의 농도별 tyrosinase 및 elastase 효소 억제농도

(IC₅₀ [μg/ml])는 표로 나타내었다(표 8).

Tyrosinase와 elastase 효소 억제 활성을 통한 미백 및 주름개선 효과를 확인하기 위한 분석결과 수국, 장미, 조릿대, 달맞이, 갯질경, 여우구슬, 좁은잎천선과는 tyrosinase 효소 억제활성이 있는 것으로 보아 미백 효능이 있을 것으로 예상되며, 장미, 달맞이, 좁은잎천선과, 피망은 elastase 효소 억제활성이 있는 것으로 보아 주름 개선 효과가 있을 것으로 예상된다.

표 9. 39종의 제주 식물종 소재에 대한 tyrosinase, elastase 효소 억제 활성

국명	부위	Tyrosinase 저해 활성 (IC50 [μg/ml])	Elastase 저해 활성 (IC50 [μg/ml])	국명	부위	Tyrosinase 저해 활성 (IC50 [μg/ml])	Elastase 저해 활성 (IC50 [μg/ml])
백년초	열매	>1000	>1000	감굴	열매	>1000	>1000
백년초	열매 (씨 제외)	>1000	>1000	백합	줄기	>1000	>1000
백년초	줄기	>1000	>1000	병풀	전초	>1000	>1000
백년초	씨	>1000	>1000	달맞 이꽃	씨	122.4	31.2
함박꽃 나무(산목련)	꽃	>1000	>1000	갯질 경이	전초	>1000	>1000
감굴	꽃	>1000	>1000	갯질 경	전초	525.5	>1000
황매화	꽃	>1000	>1000	갯방 풍	전초	>1000	>1000
수선화	꽃	>1000	>1000	큰비 쭉	전초	>1000	>1000
수국	꽃	901.1	>1000	민들 레	전초	>1000	>1000
동백꽃	꽃	>1000	>1000	여우 구슬	전초	302.3	>1000
꽃향유	꽃	>1000	>1000	신선 초	잎	>1000	>1000
백합	꽃	>1000	>1000	비수 리	전초	266.9	>1000
장미	꽃	300.5	310.0	송악	전초	>1000	>1000
목련	꽃	>1000	>1000	좁은 잎천 선과	열매	863.1	876.2
조릿대	줄기	930.8	>1000	녹차	씨	>1000	>1000
더덕	뿌리	>1000	>1000	피망	줄기	>1000	627.1
마치현 (쇠비 름)	전초	>1000	>1000	돌외	전초	>1000	>1000
신선초	줄기	>1000	>1000	감굴	잎	>1000	>1000
브로콜 리	잎	>1000	>1000	익모 초	전초	>1000	>1000
민트	전초	>1000	>1000				

2.4 제주 천연 소재 39종의 세포독성 평가 및 항염 효과

제주 추출물 39종의 RAW 264.7 mouse 대식세포에서의 세포독성과 in vitro 항염 활성 평가하기 위해 NO 생성 억제능을 측정하였다. 본 연구에서는 앞선 연구 결과를 통해 미세먼지와 항염작용이 피부 내에서 매우 밀접하게 연관이 있다는 사실을 확인하였다. 또한 피부의 염증반응은 자외선, 미생물의 침입 등 외부로부터의 다양한 자극에 반응하여 유발되므로 폭넓은 가능성을 제시해 줄 수 있다.

이에 제주 천연소재 39종의 항염평가를 진행하였다. 활성평가의 목적은 미세먼지뿐 아니라 다양한 자극에 의해 활성화 되는 피부에서 일어난 염증반응을 억제시키는 제주 천연소재의 가능성을 확인하고자 하였다.

평가 방법은 RAW 264.7 mouse 대식세포에 각 제주 추출물을 1000, 500, 250, 125, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 씩 처리하여 RAW 264.7 세포의 생존률과 NO저해를 평가하였다(그림 17).

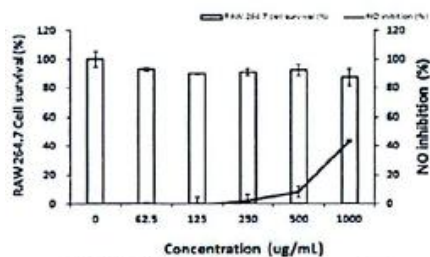
NO 생성 저해능(항염 억제 활성)과 세포독성을 고려할 때 효과가 있는 것으로 나타나는 것은 SI 지수 2으로 꽃향유, 목련, 조릿대, 민트, 병풀, 갯질경이, 민들레 송악으로 나타났다(표 10).

이 결과를 통해 위와 같은 제주 천연 소재는 추후 미세먼지로 인한 염증발생을 억제시키는 소재로서 이용 가치가 있음을 확인하였다.

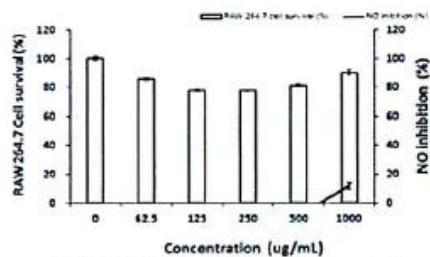
앞선 결과들을 모두 정리하여 각 추출물들의 항산화, 미백, 주름개선, 항염 활성에 대한 부분들을 표로 정리하였다(표 11). 표에는 효과가 매우 우수한 추출물 (●로 표기)와 우수한 추출물 (○로 표기)를 각각의 기호로 표기하였다.

결과를 살펴보면, 모든 활성을 보여주는 추출물은 없었으나, 대부분의 추출

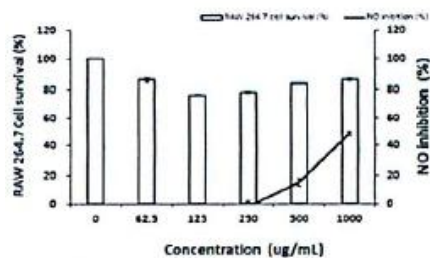
물이 한 가지 이상의 활성을 보여주었는데, 이는 제주 천연 자원이 피부 내 활성을 충분히 갖고 있음을 보여주었으며, 이와 같이 제주 천연 소재를 이용하면 다양한 활성을 갖는 기능성 소재로서 화장품과 같은 피부와 연관된 산업 분야에서 충분히 이용가치가 있는 것으로 판단하였다.



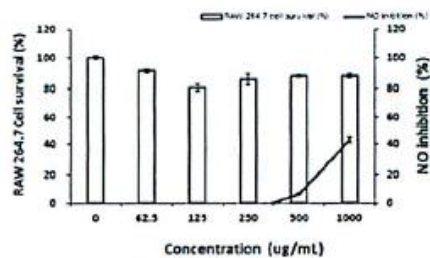
백년초 씨 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



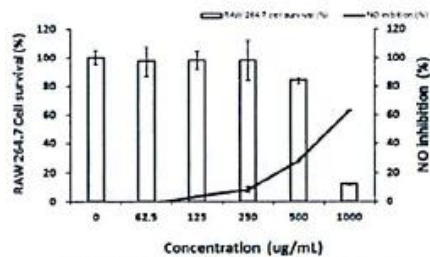
백년초 잎맥 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



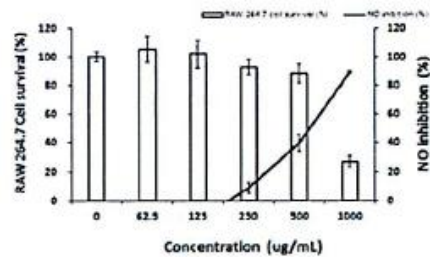
백년초 줄기 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



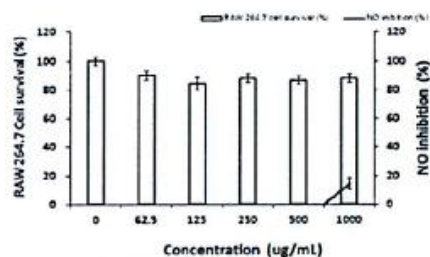
백년초 환 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



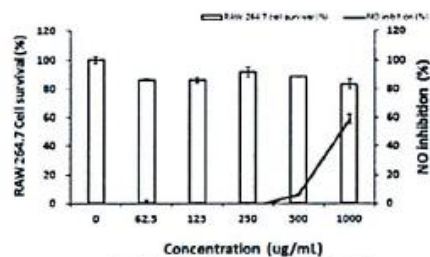
백년초 씨 *Opuntia ficus-indica* var. saboten



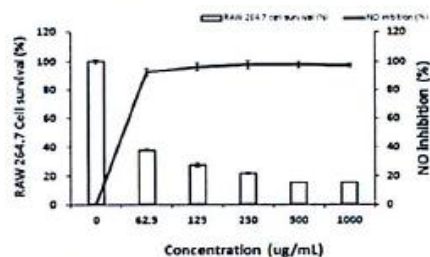
산목련



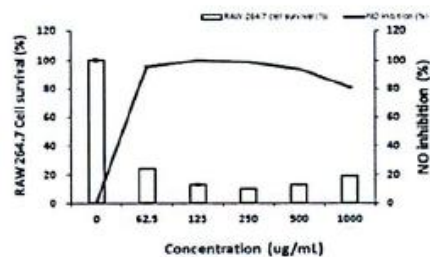
감귤꽃 *Citrus unshiu* S. Marcov.



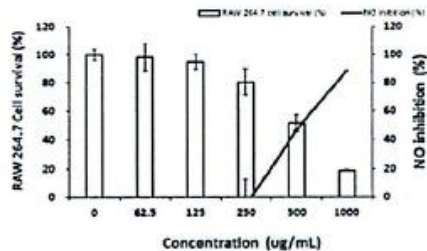
황매화 *Kerria japonica* (L.) DC.



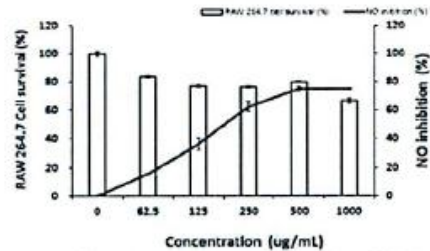
수선화 *Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roem.



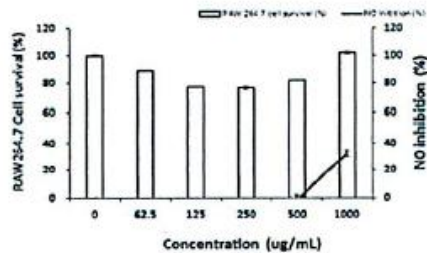
수국 꽃 *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.



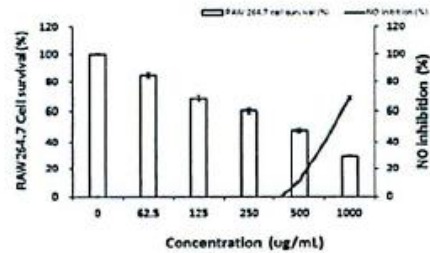
동백꽃 *Camellia japonica* L.



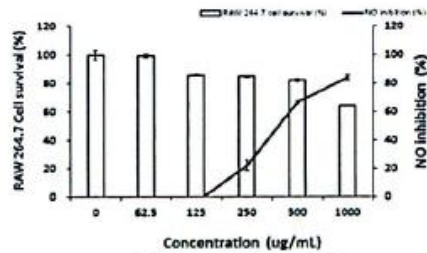
꽃향유 *Elsholtzia splendens* Nakai ex F.Mack.



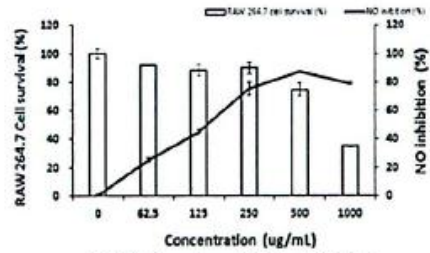
백합 *Lilium longiflorum* Thunb.



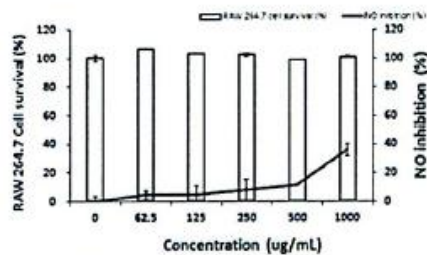
장미 *Rosa banksiae* Aiton



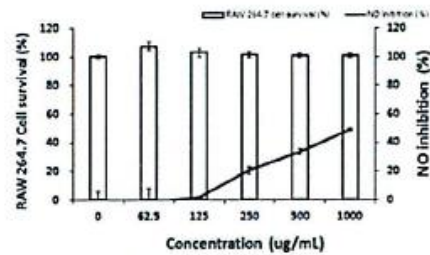
목련 *Magnolia kobus* DC.



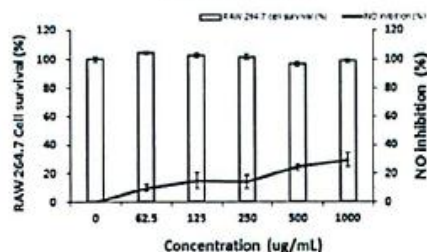
조릿대 *Sasa borealis* (Hack.) Makino



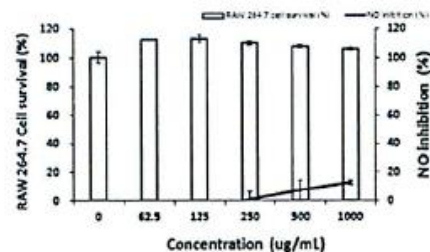
너떡 *Codonopsis lanceolata* (Siebold & Zucc.) Benth. & Hook.f. ex Trautv.



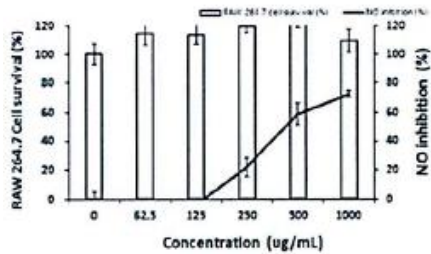
마치현 *Portulaca oleracea* L.



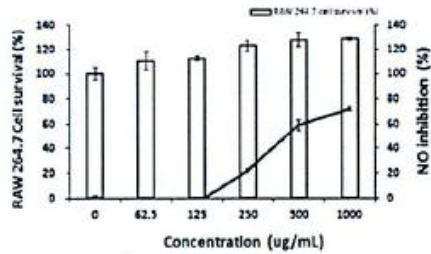
신선초 줄기 *Angelica keiskei*



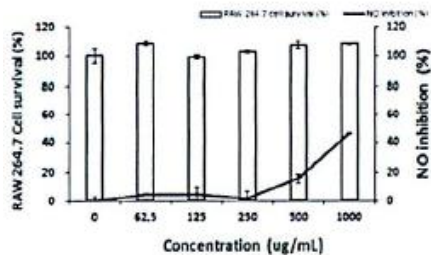
브로콜리 *Brassica oleracea* var. *italica*



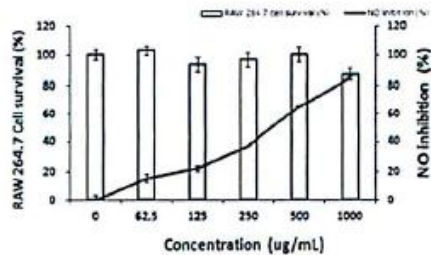
민트 *Mentha piperascens* (Malinv.) Holmes



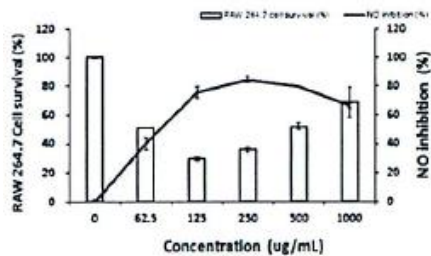
감귤 *Citrus unshiu* S.Marcov.



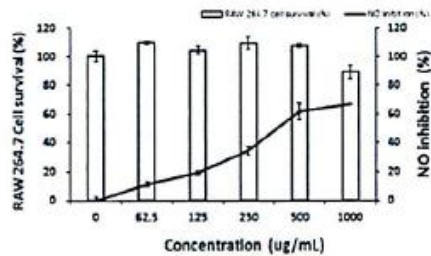
백합 줄기 *Lilium longiflorum* Thunb.



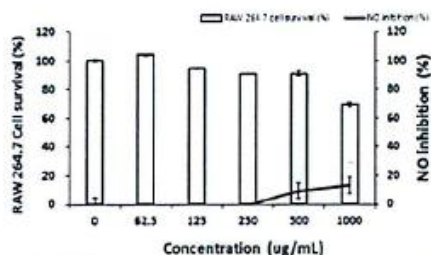
병풍 *Centella asiatica* (L.) Urb



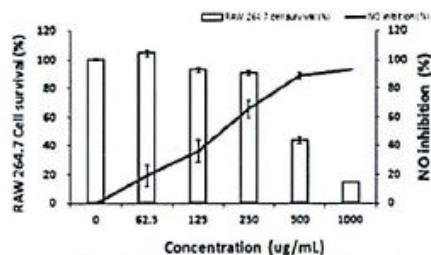
단맛이 씨



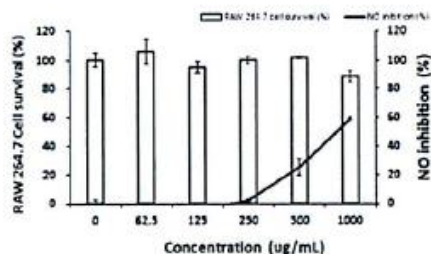
갯질경이 *Plantago major* f. *yezomaritima* (Koidz.) C



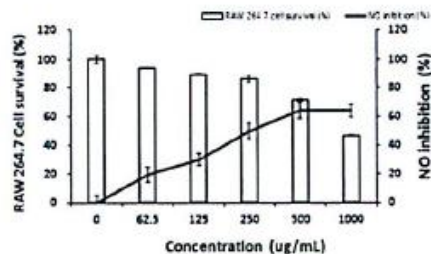
갯질경 *Limonium tetragonum* (Thunb.) Bullock



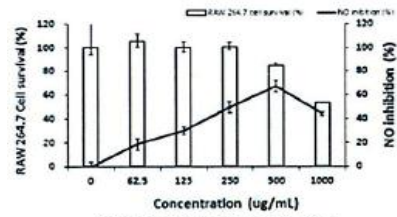
갯방풍 *Glehnia littoralis* F.Schmidt ex Miq.



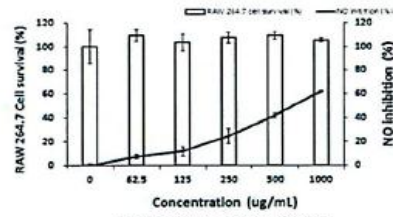
큰비쑥 *Artemisia fukudo* Makino



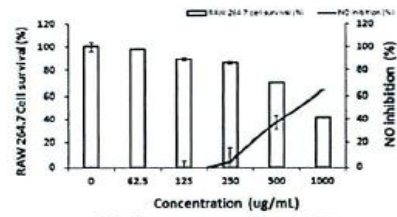
민들레 *Taraxacum platycarpum* Dahlst.



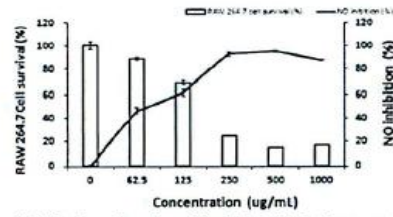
여우구슬 *Phyllanthus urinaria* L.



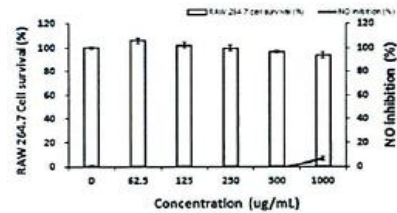
신선초 잎 *Angelica keiskei*



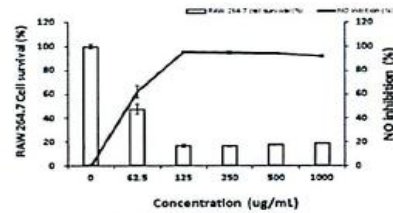
비수리 *Lespedeza cuneata* G.Don



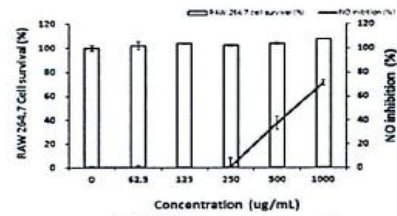
송악 *Hedera rhombea* (Miq.) Siebold & Zucc. ex B



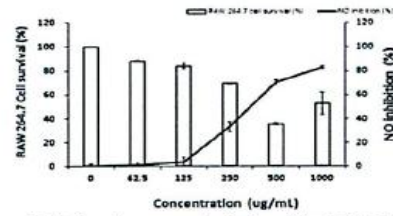
좁은잎천산과 열매 *Ficus erecta* var. *sieboldii* (Miq.) King



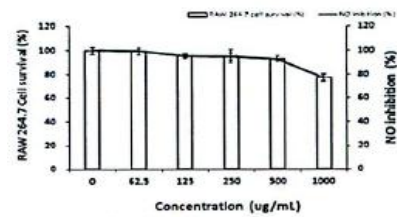
녹차 씨 *Camellia sinensis* L.



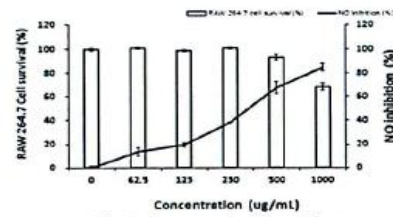
피망줄기 *Capsicum annuum* L.



준외 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino



감귤잎 *Citrus unshiu* S.Marcov.



익모초 *Leonurus japonicus* Houtt.

그림 17. 제주 천연 소재 39종의 세포독성 및 항염 평가. 제주 식물소재 39종의 항산화능 평가를 하기 위해 세포독성(그래프 왼쪽 축)과 NO 저해효과(그래프 오른쪽 축)를 통해 확인하였다.

표 10. 39종의 제주 소재에 대한 세포독성과 NO 생성 억제능

번호	국명	부위	세포독성 (CC50 [μg/ml])	NO 저해활성 (IC50 [μg/ml])	S. I.
1	백년초	열매	>1000	>1000	1.00
2	백년초	열매 (씨 제외)	>1000	>1000	1.00
3	백년초	줄기	>1000	>1000	1.00
4	백년초	씨	770.9	796.2	0.97
5	함박꽃나무(산목련)	꽃	847.5	576.9	1.47
6	감귤	꽃	>1000	>1000	1.00
7	황매화	꽃	>1000	906.0	1.10
8	수선화	꽃	21.6	11.4	1.89
9	수국	꽃	13.6	6.9	2.03
10	동백꽃	꽃	287.9	307.7	0.94
11	꽃향유	꽃	>1000	139.4	7.17
12	백합	꽃	>1000	>1000	1.00
13	장미	꽃	509	652.7	0.78
14	목련	꽃	>1000	338.6	2.95
15	조릿대	줄기	811.6	126.2	6.43
16	더덕	뿌리	>1000	>1000	1.00
17	마치현(쇠비름)	전초	>1000	>1000	1.00
18	신선초	줄기	>1000	>1000	1.00
19	브로콜리	잎	>1000	>1000	1.00
20	민트	전초	>1000	402.3	2.48

21	감귤	열매	>1000	>1000	1.00
22	백합	줄기	>1000	>1000	1.00
23	병풀	전초	>1000	347.8	2.87
24	달맞이꽃	씨	84.1	72.9	1.15
25	갯질경이	전초	>1000	381.1	2.62
26	갯질경	전초	>1000	>1000	1.00
27	갯방풍	전초	464.9	166.9	2.78
28	큰비쭉	전초	>1000	734.8	1.36
29	민들레	전초	>1000	>1000	3.57
30	여우구슬	전초	302.3	>1000	1.00
31	신선초	잎	>1000	658.4	1.51
32	비수리	전초	852.1	557.5	1.52
33	송악	전초	159.3	73.4	2.17
34	좁은잎천선과	열매	>1000	>1000	1.00
35	녹차	씨	<62.5	<62.5	1.00
36	피망	줄기	>1000	623.8	1.60
37	돌외	전초	377.1	325.3	1.16
38	감귤	잎	>1000	497.6	2.00
39	익모초	전초	>1000	332.1	3.01

표 11. 제주 천연소재 추출물의 사용부위 및 기능성 평가

번호	국명	부위	항산화	미백	주름개선	항염
1	백년초	열매	○			
2	백년초	열매 (씨 제외)				
3	백년초	줄기	○			
4	백년초	씨	○			
5	함박꽃나무 (산목련)	꽃	○			
6	감골	꽃	○			
7	황매화	꽃	○			
8	수선화	꽃	○			
9	수국	꽃	○	○		○
10	동백꽃	꽃	○			
11	꽃향유	꽃	○			●
12	백합	꽃	○			
13	장미	꽃	●	○	○	
14	목련	꽃	○			○
15	조릿대	줄기	○	○		●
16	더덕	뿌리				
17	마치현(쇠비름)	전초	○			
18	신선초	줄기				
19	브로콜리	잎				
20	민트	전초	○			○

21	감굴	열매				
22	백합	줄기				
23	병풀	전초	○			○
24	달맞이꽃	씨		●	●	
25	갯질경이	전초	○			○
26	갯질경	전초	○	○		
27	갯방풍	전초	○			○
28	큰비쭈	전초	○			
29	민들레	전초	●			○
30	여우구슬	전초		○		
31	신선초	잎	○			
32	비수리	전초	○	○		
33	송악	전초	○			○
34	좁은잎천선과	열매	○	○	○	
35	녹차	씨	○			
36	피망	줄기	○		○	○
37	돌외	전초	○			
38	감굴	잎	○			
39	익모초	전초	○			○

○: 효과적 ●: 매우 효과적

3. 영여자를 이용한 추출법 확인과 그 활성 평가

3.1 미네랄 전이 추출 공법 정립

(1) 미네랄 전이 추출

일반적인 열수 및 용매를 이용한 추출방법에 비해 숙성을 활용한 추출은 추출물 내의 효소의 활성화로 인해 높은 활성을 기대할 수 있다.

먼저 전처리된 영여자(*Dioscorea Opposite* Thunb.)를 미네랄 당류 (Mineral Sucrose)를 이용하여 1차 숙성 공정을 1 개월 간 진행한다. 이후 1차 숙성 공정을 마친 숙성물에 한방 천연물을 이용하여 2차 숙성을 진행하였다.

구체적으로 설명하면, 영여자 숙성액의 제조 방법은 수성 용매, 유기 용매 또는 발효균을 사용하지 않고, 그리고 물리적으로는 온도와 압력 등과 같이 어떠한 인위적인 조작을 하지 않고 영여자를 숙성시키기 위한 방법으로, 바이오컨버전 원리를 이용해 천연물 자체가 갖고 있는 고유의 자가 효소를 활성화시키기 위한 다량의 미네랄이 함유된 미네랄당을 이용하여 영여자에 적용시킴으로써 마의 내재적 독성은 감소시키는 반면, 영여자 자체의 바람직한 효능 및 활성을 상승시킬 수 있다.

영여자 숙성액은 일반적인 수성 용매 또는 알코올과 같은 유기 용매를 이용한 단순 영여자 추출물에 비해 높은 세포 안전성 및 세포활성 효과를 지니며 피부 자극 시험에서도 일반 영여자 추출물과는 달리 낮은 독성을 나타냄을 확인하였다. 또한, 본 발명의 영여자 숙성액을 함유한 화장품 조성물에서도 우수한 항노화 기능, 주름 개선능 및 피부 재생능이 있음을 확인하였다.

또한, 아래 그림18에 나타낸 것과 같은 공정도를 통한 숙성을 거치게 되면

일반 발효공학에서 활용되고 있는 발효조보다는 단순한 시스템에서도 효율적으로 보다 효능 및 물성면에서 우수한 천연물 가공 원료를 제공할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

또한, 본 연구에서 실시한 미네랄/슈크로오즈 추출은 종래에 산업적으로 거의 응용되지 않은 영여자의 활용도를 높이기 위해 미네랄 혼합물 및 당을 이용해 숙성시킴으로써 영여자의 내재적인 자극 성분 (예를 들어, 뮤신 등)을 감소시키는 동시에 건강 및 미용상의 효능은 보다 우수한 새로운 영여자 숙성액을 제조할 수 있다(그림 18).

추출 및 숙성 과정에 응용될 다양한 용매에 대한 이화학 평가를 위해 아래와 같이 2차 추출물 여부와 2차 숙성 공정에서 사용된 한방천연물의 종류에 따라 세 가지(MSA 영여자-A, MSA 영여자-B, MSA 영여자)로 추출물을 분류하였다(그림 19).

영여자 숙성 액의 제조 공정도

Aging Solution Process Chart of Dioscorea Opposite Thunb.



그림 18. 영여자 숙성 추출물의 제조 공정도. 영여자를 절단 및 분쇄를 통한 전처리 후 미네랄/슈크로오스 숙성과 2차 숙성을 통해 숙성추출물을 제조하였다.

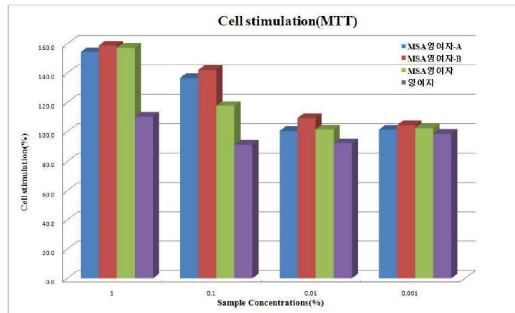
	MSA 영여자 - A	1차 미네랄 공법 및 2차 한방천연물 녹두 사용
	MSA 영여자 - B	1차 미네랄공법 및 2차 한방천연물 감초 사용
	MSA 영여자	1차 미네랄공법만 사용

그림 19. 이화학 평가를 위한 영여자 추출물. 영여자 추출물은 미네랄/슈크로오스 공법만 적용시킨 MSA 영여자, 2차에서 녹두와 감초를 각각 적용시킨 MSA 영여자 A와 B로 명칭을 정하여 준비하였다.

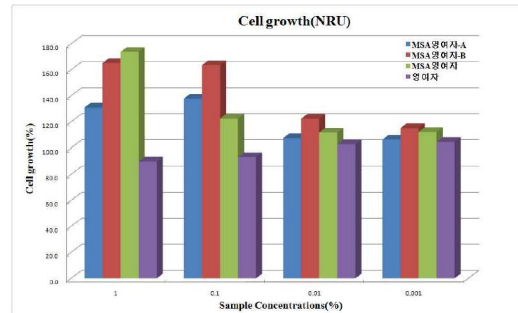
(2) 영여자 전이 추출물들의 세포 활성 평가

추출용액에 따른 세포 활성효과를 보기 위해 MTT 시험법을 이용하여 세포활성 여부를 확인하였다. 세포 활성(MTT)의 억제를 보이는 일반 영여자 추출물과는 달리 MTT 시험법을 통한 영여자 전이 추출물들의 세포 활성에 모두 높은 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 특히 녹색의 미네랄 공법만이 영여자 전이 추출물보다 2차 추출 용액으로 한방 혹은 천연물 유래의 특정 용액을 사용한 영여자 전이 추출물들의 세포 활성이 보다 넓은 농도 구간에서 우수한 효과를 나타내는 경향을 확인할 수 있었다(그림 20).

MTT 시험법을 통한 세포 활성 효과 결과와 마찬가지로, 세포 성장의 억제를 보이는 일반 영여자 추출물과는 달리, 미네랄 공법을 통한 전이 추출물들은 매우 높은 세포 성장 효과를 나타내었으며 앞서와 같이 2차 추출 용액으로 한방 혹은 천연물 유래의 특정 용액을 사용한 영여자 전이 추출물들의 세포 성장이 보다 넓은 농도 구간에서 우수한 효과를 나타내는 경향을 확인할 수 있었다(그림 21).



MIT법을 통한 영여자 전이 추출물의 세포 활성 효과



NR법을 통한 영여자 전이 추출물의 세포 성장 효과

그림 20. 각 영여자 숙성 추출물의 세포활성 및 성장 효과 테스트. 각각의 영여자 숙성 추출물은 일반 영여자 추출물 대비 세포활성 및 성장효과에서 우수한 효과를 보여주었다.

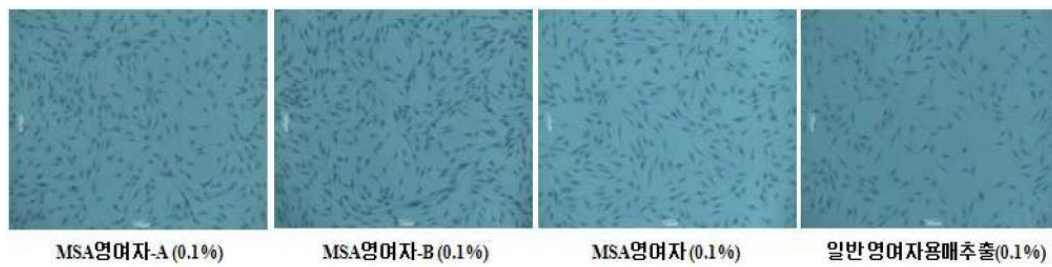


그림 21. 영여자 추출물 0.1% 적용 시 세포 성장 효과. 영여자 추출물 0.1% 적용 시 일반 영여자 용매추출법을 따른 결과보다 세포의 성장이 촉진되는 것을 확인하였다.

(3) 영여자 숙성 추출물의 기간별 효능 확인

MTT 시험법을 통해 영여자의 숙성 기간별 효능이 나타나는 경향을 확인하였다(그림 22). 이러한 실험은 특정 천연물의 숙성과정을 통해 천연물이 함유하고 있는 다양한 성분들의 생성 및 변화가 얼마만큼 일어나며 또한 효능적인 측면에서 일반 추출이나 발효와는 달리, 또 다른 기능적인 변화의 다양성이 나타날 수 있는지 확인할 수 있다. 따라서 이를 확인하기 위해 2차 추출 및 숙성 과정에 따른 이화학적 평가를 수행하였다.

1주 부터 14주 동안 기간에 따른 영여자 숙성액의 세포 내 미토콘드리아 생성 변화를 통해 세포활성을 측정한 결과, 위의 차트와 같이, 숙성 후 약간씩 효능 증가의 변화를 보이다가 약 6주 정도부터 14주 정도까지 두드러진 세포 내 미토콘드리아의 증가를 나타내었다. 이러한 결과를 통하여, 미네랄/ 슈크로오스와 같은 특정 당류를 이용하여 숙성 시킨 영여자 숙성추출물은 숙성 기간에 따라 효과가 증가하며, 이는 세포 활성을 일으키는 효능 성분들의 변화가 일어나는 것으로 짐작할 수 있다. 또한 숙성 기간별 효능 변화를 확인함으로써 최적의 숙성 추출물의 숙성 기간을 확인할 수 있었다. 위의 결과에서 6주 이후 활성이 증가하기 시작하여 12주차에 최고의 활성을 보여주었으므로, 영여자 숙성액은 약 12~14주 정도의 숙성이 최적의 숙성 추출 조건으로 확인되었다.

위와 같은 방식으로 개발된 고효능 영여자 전이 추출물은 기존의 추출 공법과는 차별화된 특수 공법으로서, 기존 추출물의 경우 단순히 유효성분을 용출 하였지만, 본연구에서는 특정 전이를 통한 추출 및 삼투압을 이용한 변이 추출 개념까지 도입하여 진행하였다. 뿐만 아니라 피부 자극을 가지고 있

다고 이미 알려져 있는 일반 마 추출물과는 달리, 자극이 적으며, 우수한 생체 활성과 세포 수준에서부터의 분화과정에서도 활성을 보이는 고기능성 소재로 볼 수 있다. 이러한 추출에 대한 차별성으로 추출물이 다양하게 쓰이는 식품, 의약품 및 화장품 분야로의 응용이 가능한 소재다.

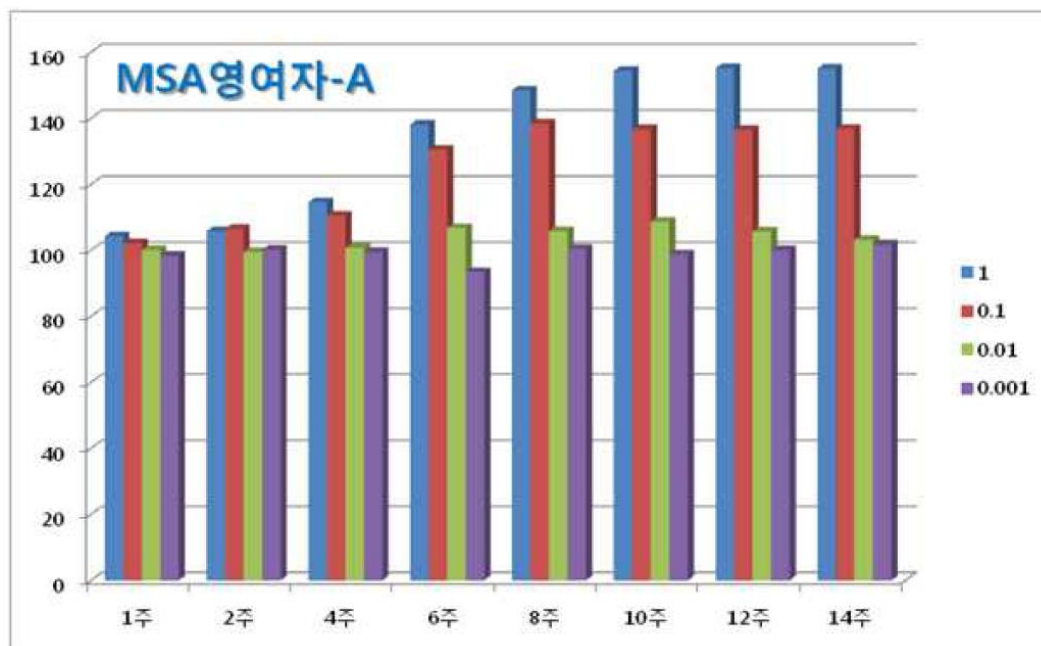


그림 22. MTT Assay를 통한 숙성 기간별 영여자 전이 추출물의 세포활성 변화 결과. MSA 영여자-A를 이용하여 1주~14주 동안 숙성 기간 별 세포활성의 변화를 확인하였다. 최소 6 주의 숙성기간을 거치면서 활성이 급격히 증가하였다.

3.2 영여자 전이 추출물의 생리활성 평가

(1) 영여자 전이 추출물의 주름 개선 평가를 위한 배경

본 연구에서 개발된 영여자추출물은 피부 내 활성 효과를 나타내는 고효능 원료를 개발하는 것을 목적으로 하고 있다. 이러한 목적을 수행하기 위해, 우선 합성된 영여자 추출물들의 다양한 생체활성이 연구되어야 하며, 특히 주름 개선과 관련된 고 기능성 원료화를 위해서는 세포 활성과 관련하여 콜라겐 생합성 촉진 및 MMP-1에 대한 기작을 비롯하여 AP-1, STAT 1과 같은 그와 관련된 메카니즘적인 효과가 연구되어야 한다.

본 사업 과제에서는 영여자추출물의 주름 개선 기능성 효과를 확인하고 세포 및 피부에 대한 안전성을 연구하는 것을 목표로 하였다. 영여자추출물의 추출 조건 정립과 더불어 개발된 신소재들의 기능성 효능 연구가 매우 활발히 진행되어 왔으며 그 결과, 주름 개선 효과의 단순 확인뿐만 아니라 어떻게 그러한 효과가 발휘되는지를 연구하기 위한 메카니즘 연구에 대한 결과도 확인되어졌다.

연구에서 개발한 영여자 추출물은 무궁무진한 생체 활성을 나타내는 기능성 소재로써 연구되고 있다. 특히, 주름 개선 효과 면에서 콜라겐의 생합성을 촉진하고 이를 생체 내에서 분해시키는 효소인 MMP-1 (Matrix metalloproteinase-1)의 생성을 억제하는 기능을 갖고 있다. 콜라겐과 분해효소인 MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)의 생성은 TGF- β 1 (transforming growth factor)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 활성화된 TGF- β 1이 세포막의 receptor에 결합하게 되면 전사조절인자인 SMAD가 인산화되어 핵 내로 이동하게 되고 활성화된 SMAD가 유전자의 binding site에 결합함으로써

유전자의 전사가 조절되는데, 콜라겐의 경우 활성화된 SMAD에 의해 생성이 촉진되며, 그와 반대로 MMP-1은 생성이 억제된다. 이때 SMAD이외에 co-activator가 필요하며 대표적인 것이 p300/CBP이다.

콜라겐과 MMP-1의 생성조절에는 TGF- β 1 이외에 면역과 관련된 cytokine도 중요한 역할을 하게 되며, 기질적으로 면역의 과활성화 상태나 자외선 등에 의한 염증 발생 이후 콜라겐 분해가 일어나는 것은 이 cytokine 들에 의한 조절이 주요한 영향이라고 볼 수 있다. 영여자추출물의 콜라겐 생성 및 MMP-1 억제와 관련한 주름 기능성 원료의 개발 방향이다.

최근 주름과 관련된 연구는 콜라겐의 생성 촉진이나 collagenase 의 생성 억제 등의 현상에 대한 연구를 넘어, 이러한 현상이 일어나는 근본 원인이 무엇인지에 대한 연구로 확대되고 있으며, 그 중 하나가 cytokine과 관련된 노화 현상에 의한 주름 생성에 대한 연구이다. 이에 따라 우리는 콜라겐 또는 collagenase 생성 조절과 관련된 대표적 cytokine인 IFN- γ 의 pathway에 대한 영여자 추출물의 영향에 관하여 메커니즘 분석의 주 타겟으로 설정하였다.

자외선을 받은 피부 또는 염증이 발생한 피부의 진피층에서는 콜라겐의 생성이 감소하고 콜라겐 분해효소가 활성화되는데 그로 인하여 장기적으로 지속되면 주름진 노화피부로 변하게 된다. 이러한 현상을 야기 시키는 주요한 매개 cytokine 중에 하나가 interferon gamma(IFN- γ)로 알려져 있다. 자외선 또는 각종 염증 매개 cytokine들에 의해 interferon gamma(IFN- γ)의 생성이 촉진되면 생성된 IFN- γ 가 주변 세포의 receptor에 결합하게 되고 세포는 이 신호에 따라 각종 세포 내 신호전달인자를 조절하게 된다. 이때 활성화된 신호전달인자들이 핵 내부의 유전자 발현에 영향을 미침으로써 세포의 기능이 조

절된다.

주름과 관련된 세포내 신호전달자 중 주요한 인자가 activating protein (AP-1)으로 알려져 있는데, 이 신호전달인자는 인산화에 의해 활성화되면 핵 내로 이동하여 특정 유전자의 활성을 조절하게 된다. 특히 주름과 관련된 주요한 유전자인 콜라겐의 생성을 억제하는 역할을 하며 콜라겐 분해효소의 활성은 증진시키는 역할을 한다. 바로 이 AP-1을 활성화 시키는 cytokine 중 하나가 IFN- γ 로 보고되어 있다. 따라서 자외선 등 외부환경과 염증 등 내적요인에 의한 노화를 억제하는 데에 IFN- γ 의 신호전달을 조절하는 것은 매우 중요하다.

본 연구에서는 개발된 영여자 추출물이 콜라겐 생성을 촉진하는 작용으로 주름을 개선시킬 수 있는 물질이 될 수 있음을 확인하였고, 또한 동시에 콜라겐 분해효소인 MMP-1(matrix metalloproteinase-1)의 생성을 억제함으로써 이중적으로 주름개선에 기여하고 있음을 확인하였다. 콜라겐 생성의 촉진과 MMP-1 생성 억제의 두 가지 기능을 동시에 나타내는 현상은 이미 보고되어 있는 AP-1의 활성화 억제 효과와 유사하므로 본 과제의 개발 신물질인 영여자 추출물의 작용 메커니즘을 분석하기 위해 노화 현상의 보다 근본적 원인인 IFN- γ 신호에 의한 AP-1 활성화에 미치는 영향을 조사해 보고자 하였다.

(2) 추출 조건별 영여자 추출물의 콜라겐 생합성 효과

연구 수행을 위해 영여자 용매별 추출 및 분리, 농축을 이용한 제조기술 개발을 하였으며, 그 추출방법으로는 열수 추출, 에탄올 추출, 미네랄/슈크로오즈 추출을 사용하였다.

각각의 추출법으로 만들어진 추출물을 통해 콜라겐 생성촉진효과는 세포실험을 통해 확인하였으며, 사용된 세포는 피부에서의 현상을 가장 잘 모방할 수 있도록 초대 배양된 인간 섬유아세포(HDFN)를 이용하였다. 또한 세포배양 배지는 혈청에 의한 영향을 최소화하기 위해 세포배양에서 사용하는 통상적인 혈청농도인 10% 대신 0.2%를 적용하였다.

그 결과 영여자 추출물들을 첨가한 세포에서의 콜라겐 생성이 영여자 추출물의 농도에 비례하여 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이 증가율은 대조군으로 이용한 TGF- β 1의 효과보다도 높은 것으로 매우 의미 있는 수준이라고 판단된다. 또한 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만들어진 영여자 추출물이 다른 추출법에 의해 만들어진 추출물보다 콜라겐 생합성 촉진 효과가 우수함을 확인할 수 있었고, 효능을 나타내는 유효 농도 구간도 매우 넓게 분포되어 있다는 결과로부터 주름 개선 효과를 갖는 기능성 소재로의 높은 응용 가치를 나타내고 있다(그림 23).

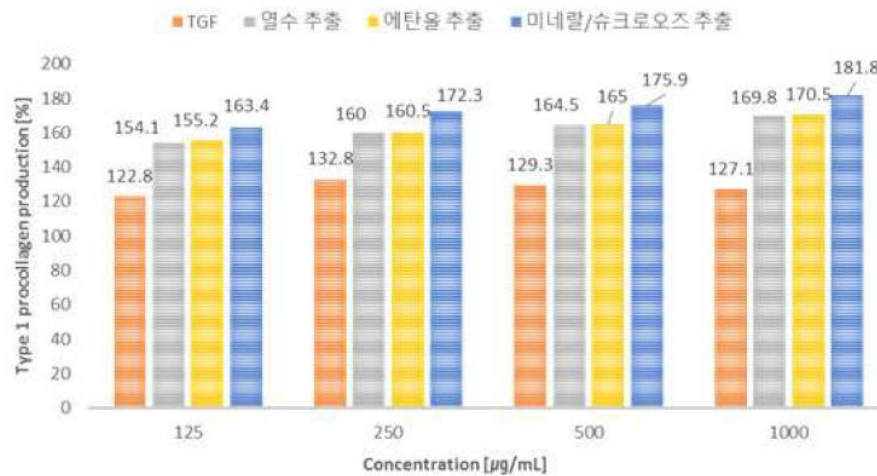


그림 23. 미네랄/슈크로오즈 추출법을 통해 추출한 영여자 추출물의 콜라겐 생합성 효과. 미네랄/슈크로오즈 추출법을 통하여 추출한 영여자는 열수 추출법, 용매추출법(에탄올 이용)을 통하여 추출한 영여자 추출물 대비 우수한 콜라겐 생합성 효과를 나타내었다.

(3) 추출 조건별 영여자 추출물의 MMP-1 생성억제 효과

MMP-1 생성 억제효과는 세포실험을 통해 확인하였으며, 사용된 세포는 피부에서의 현상을 가장 잘 모방할 수 있도록 초대 배양된 인간 섬유아세포 (HDFN)를 이용하였다. 또한 세포배양 배지는 혈청에 의한 영향을 최소화하기 위해 세포배양에서 사용하는 통상적인 혈청농도인 10% 대신 0.2%를 적용하였다.

그 결과 영여자 추출물의 농도에 의존하여 pro-MMP-1의 생성이 현저히 감소됨을 알 수 있었다(그림 24). 특히 앞에서 소개한 콜라겐 생합성 효과와 마찬가지로 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영여자 추출물이 열수, 에탄올 추출법으로 만들어진 추출물보다 더 높은 MMP-1 억제 효과를 나타내고 있다는 점에서 추출법에 따라 효능 경향도 확인할 수 있을 것으로 예상된다. 콜라겐과 MMP-1에 대한 영여자 추출물이 주름개선에 대한 우수한 원료가 될 수 있음을 추정할 수 있었으며, 이러한 결과를 토대로 보다 정밀한 메커니즘을 알아보기 위하여 주름개선과 관련된 메커니즘에 대한 문헌연구를 수행하였다. 그 결과 상기 IFN- γ 와 같은 염증 매개 cytokine과 관련된 전사인자들이 콜라겐 및 MMP의 생성에 중요한 조절자로서의 역할을 한다는 것을 확인하였다.

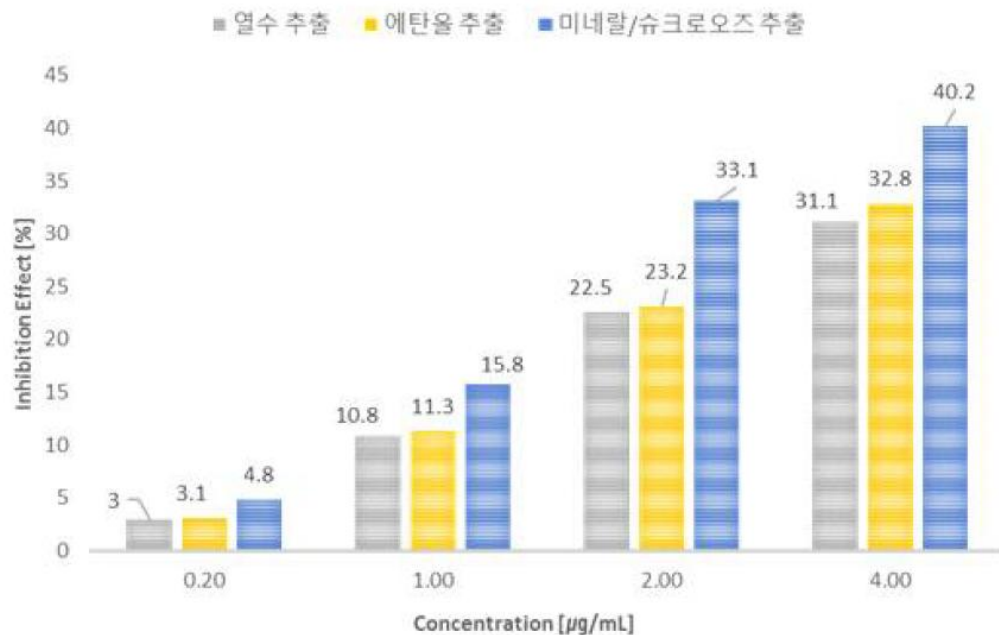


그림 24. 미네랄/슈크로오즈 추출법을 통해 추출한 영여자 추출물의 MMP-1 억제 효과. 미네랄/슈크로오즈 추출법을 통하여 추출한 영여자는 열수 추출법, 용매추출법 (에탄올 이용)을 통하여 추출한 영여자 추출물 대비 우수한 MMP-1 억제효과를 보여주었다. 이는 MMP로 인한 세포외기질의 분해를 보다 우수하게 저해할 수 있음을 나타낸다.

(4) 미네랄/슈크로오즈 추출물의 MMP-1 생성억제 매커니즘 분석

앞선 결과들을 통해 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만들어진 영여자 추출물과 염증 매개 인자들 간의 역학적인 관계를 조사함으로써 영여자 추출물의 콜라겐 생성촉진 및 MMP-1 생성억제에 대한 매커니즘을 분석하고자 하였으며, 이를 위해 IFN- γ 에 의한 콜라겐 생성 억제효과 또한 확인하였다.

일부 연구보고에서 나타난 IFN- γ 의 콜라겐 생성억제효과를 검증하고 추가적인 매커니즘을 확인하기 위해 본 실험방법을 확립하였다. IFN- γ 의 콜라겐 생성억제효과는 세포실험을 통해 확인하였으며, 사용된 세포는 피부에서의 현상을 가장 잘 모방할 수 있도록 초대 배양된 인간 섬유아세포(HDFN)를 이용하였다. 또한 세포배양 배지는 혈청에 의한 영향을 최소화하기 위해 세포배양에서 사용하는 통상적인 혈청농도인 10% 대신 0.2%를 적용하였다.

실험 결과, IFN- γ 단독 처리군은 비처리군에 비해 type-1 procollagen 생성이 약 35% 감소하였으나, 영여자 추출물 처리군은 IFN- γ 에 의한 type-1 procollagen 생성 감소가 현저히 억제되었고, 심지어는 IFN- γ 비 처리군 보다도 높은 생성 촉진효과가 나타날 정도로 매우 우수한 효능을 보였다(그림 25). 특히 실험에 사용한 영여자 추출물의 최저 적용농도보다 낮은 0.1%의 매우 낮은 농도에서도 우수한 효과가 나타났으며, 1.0% 이상에서는 IFN- γ 를 처리하지 않은 대조군보다도 높은 콜라겐 생성 촉진효과가 확인됨으로써 실질적인 유용성을 기대할 수 있었다.

proMMP-1의 생성에 대한 실험결과 IFN- γ 처리군은 비처리군에 비해 proMMP-1의 생성이 증가되는 것으로 나타났으며 이는 알려진 결과들과 일치하였다. 그런데 IFN- γ 와 영여자 추출물을 동시에 첨가한 실험 군에서는 IFN-

γ 단독 처리 군에 비해 proMMP-1의 생성이 현저히 감소하였으며, 특히 본 과제에서 개발된 영여자 추출물 1.0% 이상의 농도에서는 IFN- γ 에 의한 proMMP-1 생성 유도가 완전히 억제되었을 뿐 아니라, IFN- γ 비 처리군보다도 낮은 수준으로 나타났다(그림 26).

위의 두 실험결과에서 개발된 영여자 추출물은 collagen의 생성 촉진과 MMP의 생성억제 효과를 동시에 나타내는 것으로 관찰되었고, IFN- γ 가 AP-1을 활성화시킨다는 보고가 있으므로 영여자 추출물의 작용 메커니즘이 AP-1과 연관되어 있을 것으로 예상하였다.

AP-1은 외부 신호에 의해 인산화됨으로써 활성화되면 세포핵내로 이동하여 특정 유전자의 발현을 조절하게 된다. 따라서 세포핵내의 인산화된 AP-1을 측정함으로써 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영여자 추출물의 작용 메커니즘을 분석하고자 하였다.

IFN- γ 는 현저하게 AP-1을 활성화하였으며 이미 예상했던 바와 같이 영여자 추출물은 0.1%의 매우 저농도에서도 AP-1의 활성화를 억제하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 1.0% 이상의 농도에서는 IFN- γ 비처리군 보다도 낮은 AP-1 활성이 나타남으로써 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영여자 추출물의 효능이 매우 우수함을 확인할 수 있었다(그림 27). 따라서, 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영여자 추출물은 AP-1의 활성화를 억제하는 메커니즘을 갖는 우수한 주름개선 신원료라 할 수 있다.

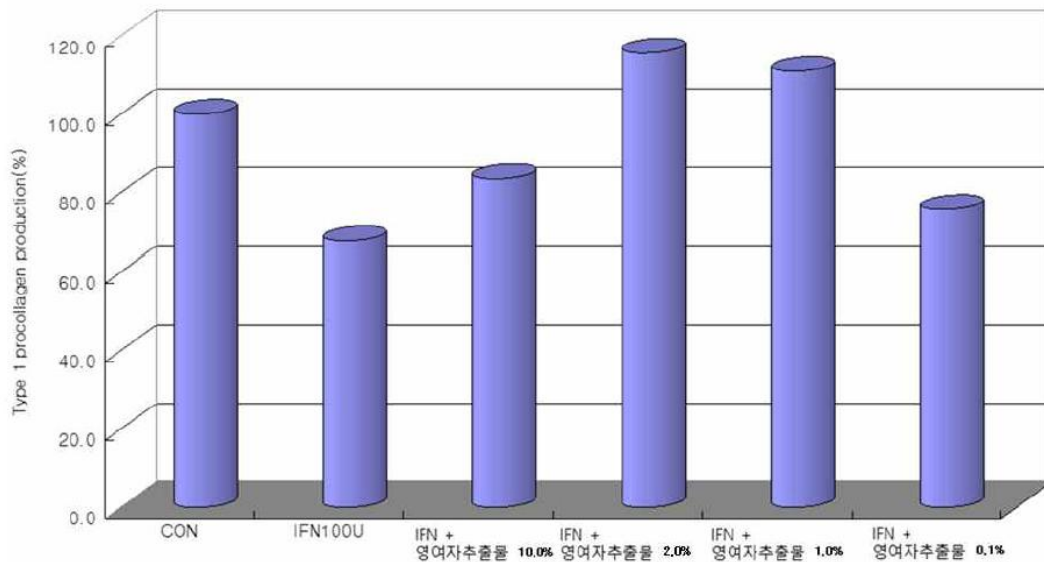


그림 25. IFN- γ 처리 세포 내, 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영여자 추출물의 type-1 procollagen 생성 억제 효과. 미네랄/슈크로오즈 추출법을 통한 영여자 추출물을 0.1% ~ 10.0%까지 농도 별로 처리하여 type-1 procollagen 생성 억제효과를 확인하였다. 그 결과, 10.0%의 영여자 추출물 처리 시 가장 우수한 억제효과를 보여주었다.

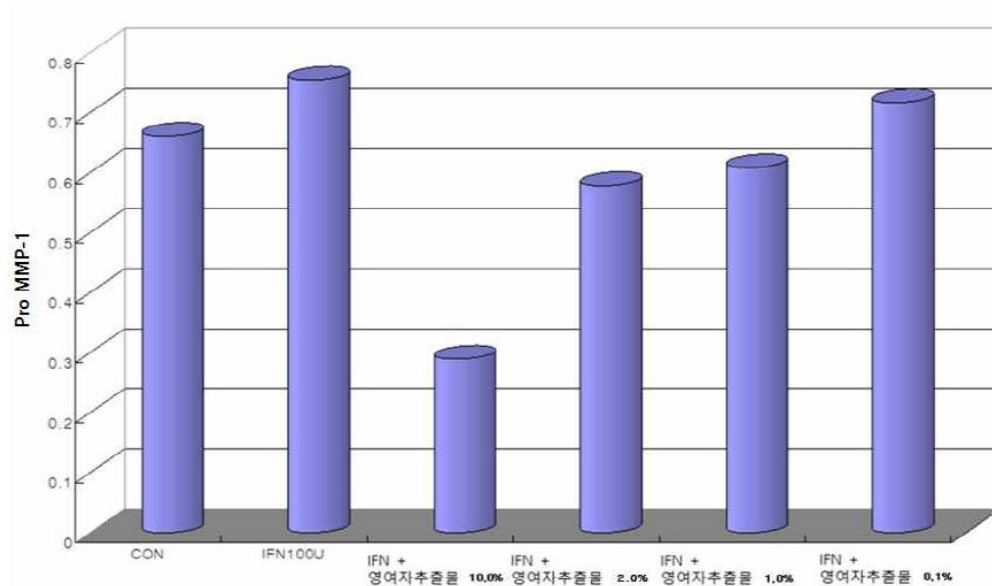


그림 26. IFN- γ 처리 세포 내, 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영어자 추출물의 proMMP-1 생성 억제 효과. 미네랄/슈크로오즈 추출법을 통한 영어자 추출물을 0.1% ~ 10.0%까지 농도 별로 처리하여 proMMP-1 생성 억제 효과를 확인하였다. 그 결과, 10.0%의 영어자 추출물 처리 시 가장 우수한 억제효과를 보여주었다.

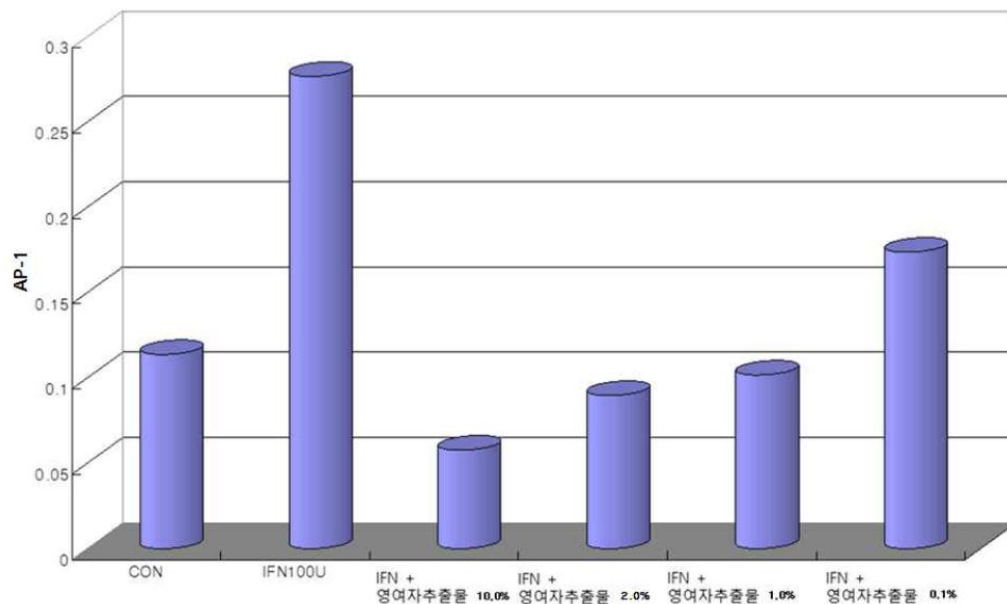


그림 27. IFN- γ 처리 세포 내, 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영여자 추출물의 AP-1 활성 억제 효과. 미네랄/슈크로오즈 추출법을 통한 영여자 추출물을 0.1% ~ 10.0%까지 농도 별로 처리하여 AP-1 활성 억제효과를 확인 하였다. 그 결과, 10.0%의 영여자 추출물 처리 시 가장 우수한 활성 억제 효과를 보여주었다.

(5) 미네랄/슈크로오즈 추출물의 면역 과민반응 확인

피부는 감염, 상처, 자외선 등 외적 요인과 면역계 이상, 호르몬 불균형, 신경계 이상 등에 의한 내적요인에 의하여 피부에 면역과민반응이 나타나게 되고 이 중 가려움, 통증 등은 히스타민에 의해 주로 유발되게 된다. 소양증은 그 자체로 피부질환자에 고통을 주기도 하지만, 긁음에 의해 2차적으로 피부 손상과 감염을 유발시킴으로써 증상을 더욱 악화시키게 된다. 따라서 피부 질환에 대한 치료뿐만 아니라 염증과 관련된 노화의 개선을 위해서는 히스타민에 대한 영향을 조사하는 것이 필요하다. 이에 따라 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영여자 추출물들이 mast cell(비만세포)의 히스타민 과립 방출에 대해 미치는 영향을 조사하였다. 히스타민 과립의 방출유도원(자극제)는 c48/80을 이용하였다.

실험결과, 아래 그림에서와 같이 비처리군에 비해 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영여자 추출물을 처리한 군에서 degranulation이 현저히 억제되었음을 확인할 수 있었다(그림). 이 결과는 negative charge를 갖는 물질이 히스타민의 방출을 억제할 수 있다는 기존의 보고와 일치하는 것으로서 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영여자 추출물에서는 다수의 negative charge를 갖는 작용기가 있기 때문인 것으로 해석된다.



그림 28. 영여자 추출물의 항히스타민 효과. 영여자 추출물의 면역과민반응을 살펴보기 위해 항히스타민 효과를 평가하였다. 자극제를 투여해 비교해본 결과 영여자 추출물은 히스타민의 분비를 억제하며, 자극을 완화할 수 있다는 것을 확인하였다.

(6) 영여자 추출물의 지표 물질 확인

열수, 에탄올, 미네랄/슈크로오즈 추출법을 이용하여 영여자 추출물을 제조한 후, 지표물질을 분석하고 효능 효과에 대해 연구하였다. 지표물질인 gallic acid는 미네랄/슈크로오즈 추출법에 의해 만들어진 영여자 추출물에서 가장 많이 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었고, 이에 따른 영여자 추출물 속 gallic acid 농도 범위는 1~10 ppm으로 나타났다. 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영여자 추출물의 효능 효과는 콜라겐 생성 촉진효과, MMP-1 생성 억제효과, IFN- γ 의 콜라겐 생성억제효과(AP-1활성)의 분석에서 모두 높은 효율을 보였고, 항히스타민효과 또한 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 미네랄/슈크로오즈 추출법으로 만든 영여자 추출물은 향후 주름개선 물질로 촉망받는 신원료가 될 것임을 예상할 수 있었다.

(7) 영여자 추출물의 안전성 평가

본 연구에서 개발된 영여자 추출물은 이미 세포 실험을 통한 세포 독성을 확인한 바 있다. 결과적으로 합성된 영여자 추출물은 세포에 대한 독성과 자극이 없으며, 이를 토대로 하여 앞에서 연구된 세포 활성화에 대한 효능을 발견할 수 있었다. 따라서 개발된 영여자 추출물의 물질 독성 및 안전성을 평가하기 하기 위한 차원에서 유정란을 이용한 CAM 실험을 통해 안전성을 확인하였다(그림 29).

아래 그림의 실험 결과와 같이, 개발된 영여자 추출물은 유정란에 로딩되어도 계란의 부화로 인해 생성되는 혈관의 생성 억제 또는 생성 과촉진에 전혀 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었고 이를 통해 물질 자체의

독성 및 자극으로부터의 안전성을 증명할 수 있었다.

이는 세포 실험과 더불어 영어자 추출물은 생체 내에서 사용 시 세포 반응과 혈관 자극 반응과 관련이 적으며 안전성에 대한 뒷받침이 될 수 있는 결과임을 시사한다.

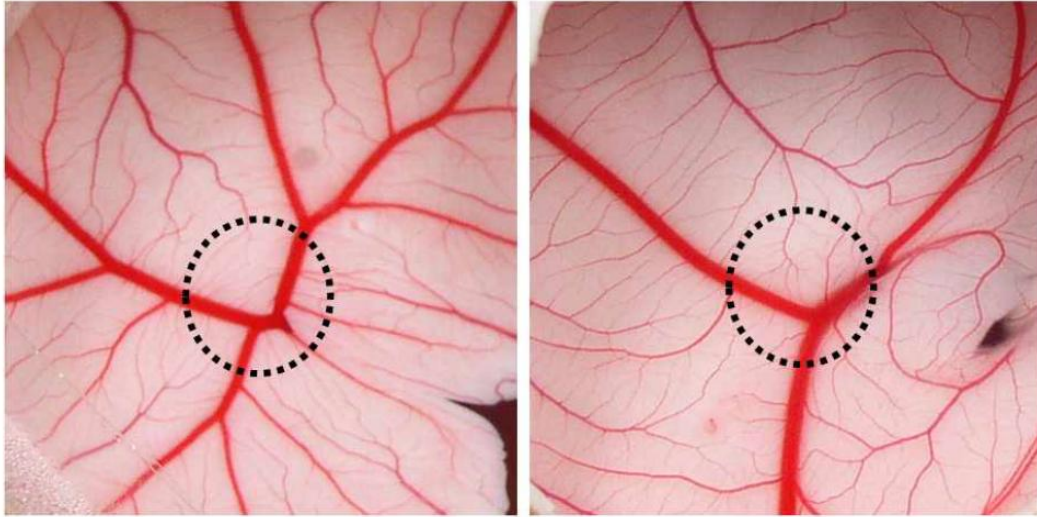


그림 29 유정란을 이용한 CAM assay. 영여자 추출물의 안전성 평가를 확인하기 위해 유정란을 이용하여 혈관생성을 살펴보았다. 그 결과 영여자 추출물의 안전성을 확인하였다.

3.3 영여자 숙성 추출물의 나노캡슐화를 통한 상승효과

(1) 영여자 추출물을 이용하여 리포솜 및 캡슐 제조

아래 표의 조성으로 성분들을 용기에 도입하여 80°C의 온도에서 용해시킨 다음, 호모 믹서를 이용하여 5분 동안 혼합한 후에 고압 균질기에서 1,000바(bar)로 연속 5회 통과시키고 나서 냉각, 탈포하여 영여자 추출물을 함유하는 리포솜을 얻었다(표 12).

카보네이트(carbonate) 이온을 함유하는 ZnAl-LDH를 다음과 같이 공침법(coprecipitation)으로 합성하였으며, 리포솜과 c-LDH의 캡슐(이하에서 “영여자-LDH 캡슐”이라고 한다)을 얻었다.

제조된 리포솜의 입자 분포는 Photal ELS-Z를 사용하여 측정하였으며, 그 결과는 아래 그림에 나타내었다. 측정 결과 영여자 추출물 함유 리포솜의 평균 입자 크기가 52.1 nm 임을 알 수 있었다(그림 30).

추가적으로 제조된 리포솜의 제타포텐셜을 측정하였다. 제타포텐셜값은 절대값을 비교하며, 양전하 혹은 음전하를 강하게 나타낼 경우 콜로이드 입자 사이에서 반발력을 발생시켜 응집, 합일과 같은 현상들을 막아주어 콜로이드의 안정성을 확인하는 지표로 활용된다. 이번 실험에서 측정된 제타포텐셜 값은 -70 mV 정도로 이는 리포솜 입자가 음전하를 나타내며, 안정한 리포솜 입자를 형성하였음을 알 수 있었다(그림 31).

제조된 영여자-LDH 캡슐은 입자 크기가 너무 미세하여 촬영을 위해 전자현미경(JEM 1010, JEOL사, 일본)을 이용하여 촬영하였으며(그림 32), 분말 X선 회절시험을 통해 관상의 간격이 7.6Å 임을 알 수 있었다(그림 33).

위와 같은 세 가지 실험들의 결과로 영여자-LDH 캡슐은 작고 균일하며

안정한 리포좀을 형성하였음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 영여자를 담지한 나노캡슐의 상승효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

표 12. 영여자 추출물을 담지한 리포솜 제조 처방

성분명	함량 (wt.%)
영여자 추출물	20.00
하이드로제네이티드 레시틴	1.00
소듐 스테아로일 글루타메이트	0.50
소듐 아스코빌 포스페이트	0.03
옥틸 팔미테이트	3.00
에탄올	2.00
글리세린	5.00
정제수	68.47
Total	100.00

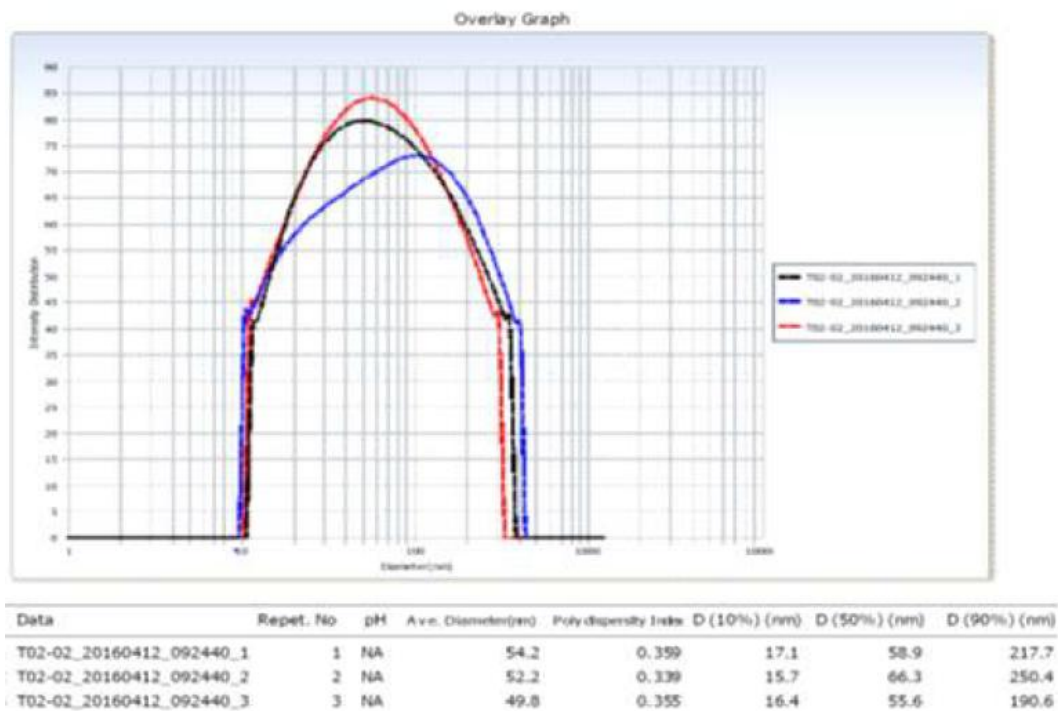


그림 30. 영여자-LDH 캡슐의 입자 분포 측정 결과. 영여자 추출물을 담지한 리포솜의 입자 분포 측정 결과 약 200nm 전 후의 크기로 리포솜이 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 이 크기는 일반적인 리포솜의 크기로서 영여자를 담지한 리포솜이 작고 균일하게 형성되었음을 확인할 수 있다.



그림 31. 영여자-LDH 캡슐의 제타포텐셜 측정 결과. 영여자 추출물을 담지한 리포솜의 제타포텐셜 값을 측정한 결과 약 -70 mV 전 후의 크기로 리포솜의 표면에 전하가 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 이 제타포텐셜의 절대값을 살펴보아 반발력으로 인해 안정한 리포솜이 형성된 것을 확인하였다.

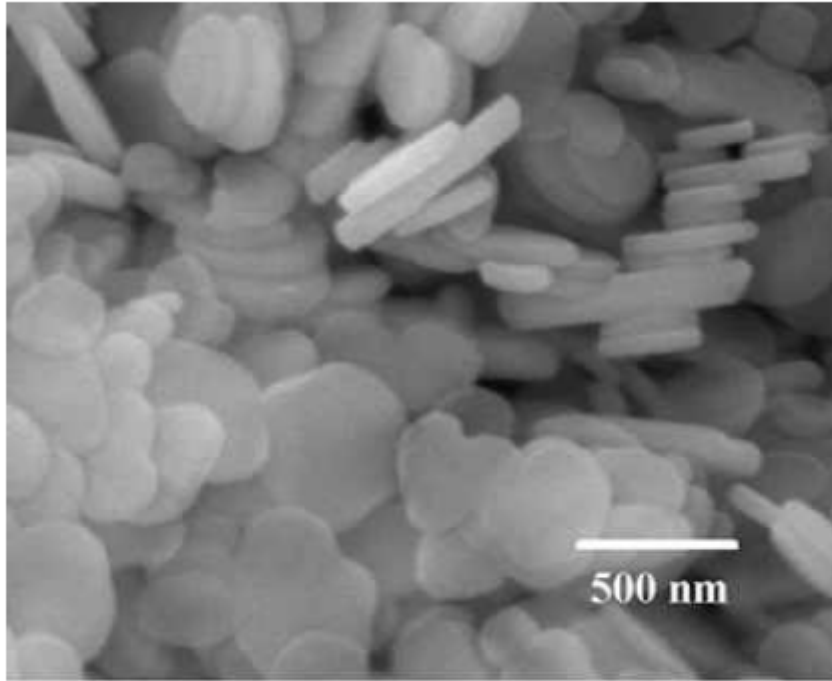


그림 32. 영여자-LDH 캡슐의 전자현미경 촬영 결과. 제조된 영여자-LDH 캡슐의 입자 크기가 너무 미세하여 촬영을 위해 전자현미경을 통해 촬영하였다.

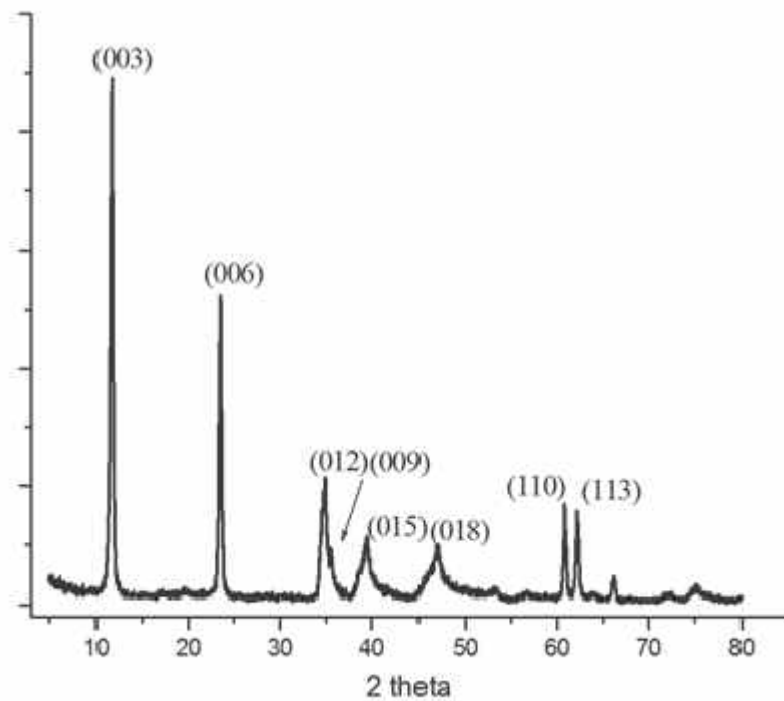


그림 33. 영여자-LDH 캡슐의 분말 X선 회절시험 결과. 제조된 영여자-LDH 캡슐은 분말 X선 회절시험을 통해 판상의 간격이 7.6Å임을 알 수 있었다.

(2) 영여자 추출물을 담지한 리포솜의 포집률 확인

제조한 리포솜 내 영여자의 포집률을 알아보기 위한 시험을 진행하였다. 리포솜 내 활성물질의 포집률은 활성과 그 효율과 직접적인 관련이 있는 지표로 약물전달에 있어 중요한 요소이다.

정량적인 분석은 HPLC를 통해 분석하였으며, 그 결과 제조한 리포솜 용액에 있는 영여자는 3.105 ± 0.102 ug/ml로 나타났으며, 리포솜에 포집되어 있는 영여자는 약 1.91 ug/ml이고 포집되지 않은 영여자는 1.04 ± 0.047 ug/ml로 나타났다(표 13).

따라서 포집률은 64.7 %인 것으로 확인되었다. 위와 같은 포집률을 통해 총 20.0%의 영여자 추출물 중 리포솜 내에는 약 12.94%의 영여자 추출물이 담지되어 있다는 점을 확인 할 수 있었다.

표 13. 영여자 추출물을 담지한 리포솜의 포집률 계산

구분	흡광도	영여자 농도 (ug/ml)	포집률 (%)
영여자 Sample	2.48 ± 0.077	3.065 ± 0.102	-
포집되지 않은 영여자	0.285 ± 0.007	1.04 ± 0.047	-
포집된 영여자	-	1.91	64.7

(3) 나노캡슐 (NIOSOME)의 처방 구성과 함량 설정

영여자 숙성 추출물의 상승 효과를 위해 니오솜을 이용한 나노캡슐화를 통해 추출물의 피부 투과율 증진 및 안정성 확보를 위한 기술을 도입하였다. 적절한 나노캡슐화 조건을 찾기 위해 다음과 같이 Nonionic surfactant vesicle, 계면활성제, 오일 등을 각각의 함량 별로 실험하여 다음과 같이 그 결과를 확인하였다(표 14).

가장 먼저 니오솜을 구성하는 핵심 성분인 비이온성 베지클로 NSV (Bressica Campestris (Rapeseed) Sterols, PEG-5 Rapeseed Sterol, Cholesterol, Cetyl Phosphate)을 선정하였다. NSV의 최적 농도를 확인하기 위해 5.5%, 6.5%, 7.5%에서 니오솜 확인 결과 6.5 %의 농도에서 가장 안정한 니오솜을 형성하였다.

다음으로 니오솜의 shell을 더 안정하게 형성시켜주기 위한 계면활성제의 선정하였다. 먼저 계면활성제의 농도를 결정하기 위해 Sodium Palmitoyl Sarcosinate를 각각 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%를 적용하여 니오솜을 제조하였다. 그 결과 0.7%의 Sodium Palmitoyl Sarcosinate를 적용하였을 때 가장 안정한 니오솜을 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

다음으로 계면활성제 종류를 선정하였다. 먼저 앞서 결정된 농도인 0.7 %로 각각의 계면활성제 농도를 결정하였으며, 계면활성제는 Sodium Palmitoyl Sarcosinate, Polysorbate 80, Sodium Stearoyl Glutamate, Potassium Cetyl Phosphate를 이용하였다. 그 결과 0.7%의 Sodium Palmitoyl Sarcosinate를 적용하였을 때 가장 안정한 니오솜을 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

다음으로 니오솜을 구성하는 오일상을 결정하기 위해 먼저 Macadamia

Integrifolia Seed Oil을 5.0%, 10.0% 15.0% 씩 적용하였다. 그 결과 10.0%의 오일을 적용하였을 때 가장 안정한 니오솜을 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

마지막으로 니오솜을 구성하는 오일의 종류를 선별하였다. 오일은 에스테르계 오일인 Cetyl Ethylhexanoate, 천연오일 Macadamia Integrifolia Seed Oil, 트리글리세라이드인 Caprylic/Capric Triglyceride, 비실리콘 Demethicone, 휘발성 실리콘인 Cyclomethicone로 구성하여 각각 10.0 % 씩 적용하였다.

그 결과 천연오일인 Macadamia Integrifolia Seed Oil 10.0%를 적용하여 실험한 결과 안정한 니오솜을 형성하였다.

최종적으로 NSV 6.5%, Sodium Palmitoyl Sarcosinate 0.7%, Macadamia Integrifolia Seed Oil 10%를 적용하여 리포솜 처방에 구성하였다.

표 14. 니오솜 원료의 최적 조건 설정

Non-ionic surfactant vesicle	원료 및 함량	-원료명: NSV (Bressica Campestris (Papeseed) Sterols, PEG-5 Rapeseed Sterol, Cholesterol, Cetyl Phosphate) - 함량: 5.5%, 6.5% , 7.5%
	결과	-6.5%에서 가장 안정한 니오솜 형성
계면활성제 농도 설정	원료 및 함량	-원료명: Sodium Palmitoyl Sarcosinate - 함량: 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7% , 0.8%
	결과	0.7%에서 가장 안정한 니오솜 형성
계면활성제 종류 설정	원료 및 함량	- Polysorbate 80 - Sodium Palmitoyl Sarcosinate - Sodium Stearoyl Glutamate - Potassium Cetyl Phosphate 함량: 0.7%
	결과	Sodium Palmitoyl Sarcosinate를 사용한 니 오솜이 가장 안정.
오일 함량 설정	원료 및 함량	- 원료명 : Macadamia Integrifolia Seed Oil - 함량 : 5.0%, 10% , 15%
	결과	10.0%에서 가장 안정한 니오솜 형성.
오일 종류 설정	원료 및 함량	- Cetyl Ethylhexanoate - Macadamia Integrifolia Seed Oil - Caprylic/Capric Triglyceride - Demethicone - Cyclomethicone 함량: 10.0%
	결과	Macadamia Integrifolia Seed Oil에서 가장 안정한 니오솜 형성.

(4) 영여자 전이 추출물을 함유한 NIOSOME의 안정성 평가

위 실험을 토대로 선정된 원료와 함량을 결정하여 영여자 숙성 추출물을 각각 1% (Sample 1)과 2% (Sample 2) 적용하여 NIOSOME을 제조하였다. 제조된 고효능 영여자 전이 추출물의 나노 캡슐 안정성 평가를 위해 제타전위 분석을 수행하였다. 제타전위 분석은 입자의 표면 전위 측정 및 분산안정도를 예측할 수 있는 분석 방법으로 일반적으로 -40 이하 혹은 $+40$ 이상의 전위를 가질 때 분산이 안정적으로 되어 있다고 판단한다. 제타전위 및 입자사이즈 측정결과는 아래 표와 같다 (표 15). 제타전위 분석 결과, 미네랄 공법을 통한 고효능 영여자 전이 추출물이 나노캡슐화 제형에서 안정한 것으로 판단된다. 입자사이즈 측정을 통해 나노캡슐 입자들이 $150\text{--}230\text{nm}$ 내외의 사이즈를 가지고 있음을 확인하였다.

결과를 더욱 자세히 살펴보면 1 %의 영여자 추출물을 함유한 Sample 1의 경우 158.9 nm 영여자 추출물 2 %를 함유한 Sample 2의 경우는 222.5 nm 의 니오솜 입자 크기를 보여주었다. 제타전위의 경우 Sample 1과 Sample 2 모두 -40 값보다 작은 값으로 우수한 분산안정성을 보여주는 것으로 확인 되었다.

이를 통해 1 %의 영여자 추출물을 함유하는 니오솜이 작은 크기와 우수한 분산성으로 인해 안정하고 침투력이 더 높은 가능성을 갖고 있음을 확인하였다.

표 15. 영여자 전이 추출물을 함유한 니오솜의 농도별 입자 사이즈 및 제타포텐셜 측정 결과

구분	입자 사이즈	제타포텐셜
영여자 전이 추출물 1.0 % 함유한 니오솜	158.9 nm	-47.89 mV
영여자 전이 추출물 2.0 % 함유한 니오솜	222.5 nm	-55.66 mV

4. 전위차 기술을 이용한 화장품 개발

4.1 전기역학적 균질화를 위한 시그널 장치 구성

본 연구에서 전위차 기술은 Resonar Formulated Process (RFPTM)을 적용한 시그널 개발을 통한 것이다. 이러한 기술을 적용 시, 물성 변화를 통해 수용성 화장품 조성물에 조사하여 혼합 시 균질화를 극대화하여 피부 부착력을 증가시키고, 궁극적으로 미백, 주름개선, 자외선 차단 기능성이 우수한 화장품을 개발하는 것이다. RFPTM 조사 대상의 물성에 따라 최적의 시그널이 개발되며 이는 다양한 주파수에 의한 클럭(Clock)에 따라 단시간 고효율의 물성변화를 가져올 수 있다. 화장품 조성물 및 혼합물 대상으로 만들어진 RFPTM는 소정의 주파수 특성을 갖는 전기 신호를 생성하는 신호발생부, 물질의 공진을 유도하는 광물질의 클러스터 또는 파우더에 전극을 연결시킨 공진유도장치부, 이를 모듈레이션시켜 조사할 수 있는 레이저장치 부를 구비하여 이에 따른 물성 변화 장치 및 물성 변화 방법을 제공한다(그림 34).

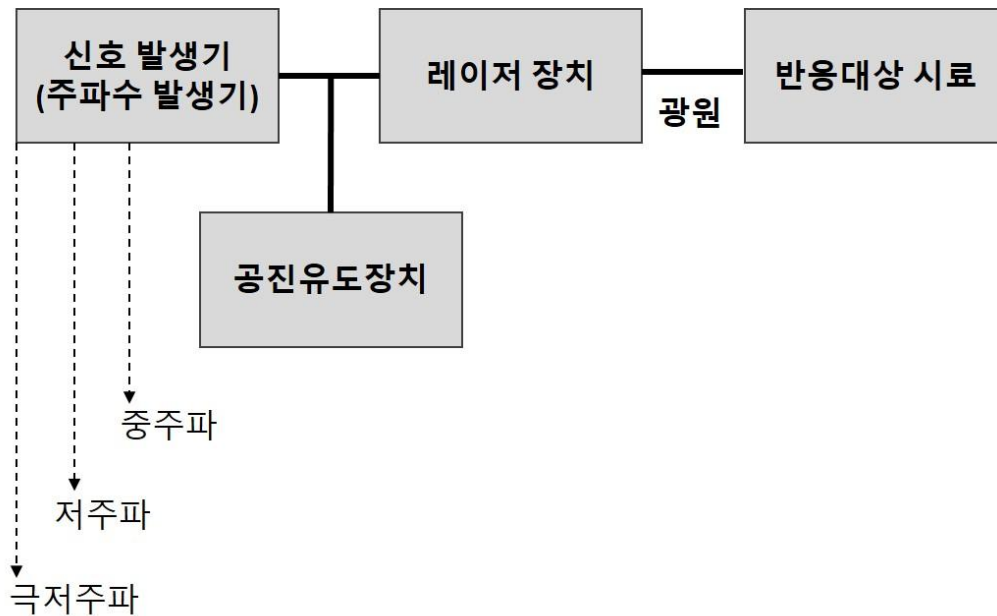


그림 34. 전기역학적 균질화를 위한 시그널 장치 구성 모식도. 시그널 장치는 신호 발생기, 공진유도장치, 레이저 장치 등으로 구성되어 있으며, 반응대상 시료는 신호발생기에서 발생하는 파장에 따른 주파수를 설정하여 시그널을 처리하였다.

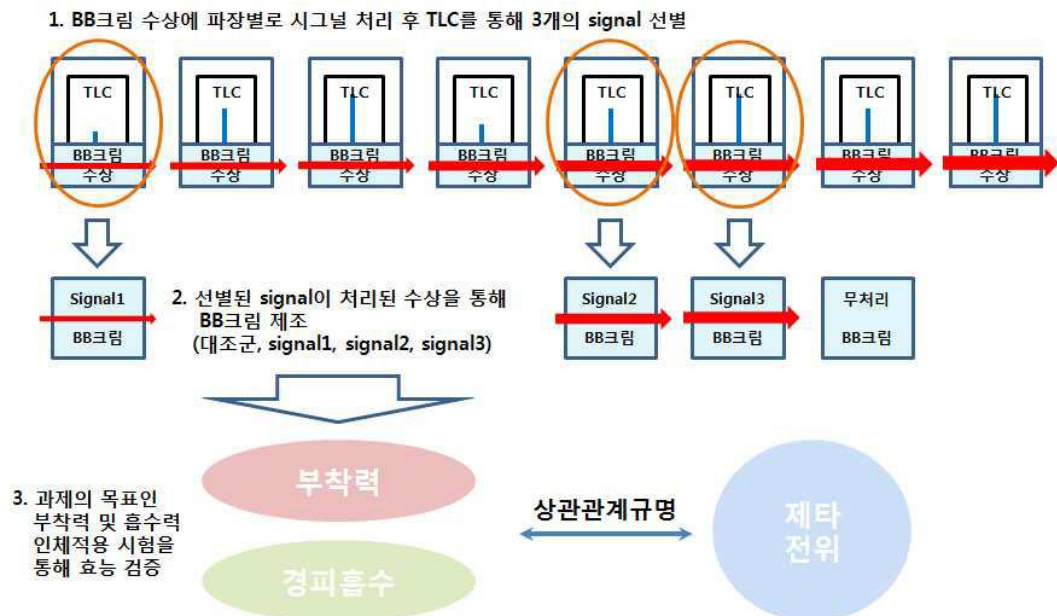


그림 35. 시그널 개발 프로세스. BB크림 수상 부에 파장별로 시그널을 처리하여 TLC 및 제타전위값을 측정하였다.

4.2 TLC 및 제타전위 확인을 통한 시그널 선정

시그널 개발을 위해 총 9개의 시그널은 선별하였으며, 비비크림 수상에 9개의 시그널을 처리한 뒤 대조군과의 제타포텐셜 및 TLC를 통한 Rf 값을 비교 분석하였다(그림 35). TLC는 RFPTM이 조사된 화장품 수용액을 전개 물질로 Ethanol과 Methanol에 혼합하여 30분간 chamber에서 전개이동하고, 이에 따른 Rf value 값을 측정하였으며, 그 결과 값은 다음과 같다(그림 36).

제타포텐셜 측정은 Otsuka Electronics ELS-1000z 장비를 사용하여 3번 반복 실험하여 평균값 및 평균 오차를 구하였다(그림 37). 마지막으로 TLC값과 제타포텐셜 값을 각각 수치화 하여 표로 나타내었다(표 16).

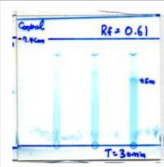
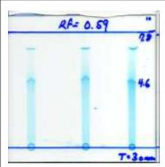
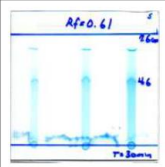
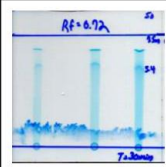
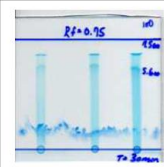
관찰된 제타포텐셜과 Rf 값 사이에는 상관관계가 있는 것으로 관찰되며 선별된 RFPTM 시그널이 제타포텐셜을 증가시켜 수용성이 높아지는 물성변화를 유도하는 것으로 관찰되었다.

결과값을 살펴보면, 저주파-1, 중주파-1 중주파-4에서 가장 큰 제타포텐셜의 절대값을 가졌으며, TLC의 Rf 값은 모두 큰 결과를 보여주었다.

이를 통해 저주파-1, 중주파-1, 중주파-4가 화장품 수용액에서 가장 적절한 주파수임을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 위와 같은 주파수의 명칭을 각각 COS-50 (저주파-1), COS-100 (중주파-1), COS-100R(중주파-4)로 정하였다.

추가적으로 선별된 3개의 시그널을 처리한 샘플에 대해 입자 크기를 측정하였다(표 17).

미처리	극저주파-1	극저주파-2	극저주파-3	저주파-1
				
0.61	0.59	0.61	0.72	0.75

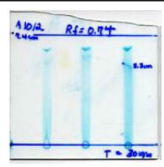
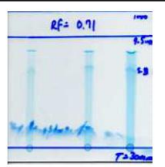
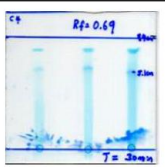
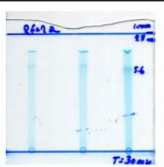
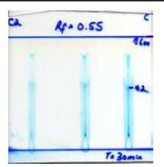
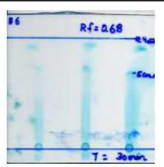
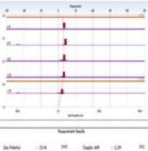
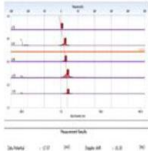
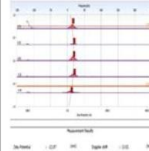
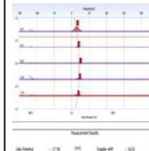
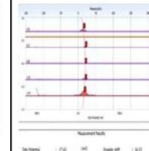
중주파-1	중주파-2	중주파-3	중주파-4	고주파-1	고주파-2
					
0.74	0.71	0.69	0.72	0.55	0.68

그림 36. 시그널 파장종류에 따른 TLC결과. 저주파-1, 중주파-1, 중주파-4에서 가장 큰 Rf 값을 보여주었다.

미처리	극저주파-1	극저주파-2	극저주파-3	저주파-1
				
-20.05±1.29	-16.80±2.20	-22.98±0.37	-27.88±0.92	-27.80±1.59

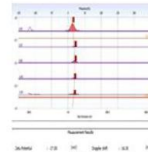
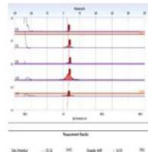
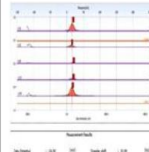
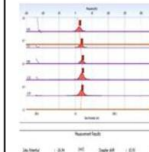
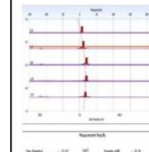
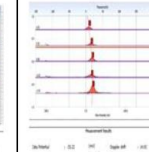
중주파-1	중주파-2	중주파-3	중주파-4	고주파-1	고주파-2
					
-27.63±0.09	-25.76±1.60	-26.53±0.61	-26.24±1.12	-18.32±1.72	-25.10±0.29

그림 37. 시그널 파장종류에 따른 제타전위 측정 결과. 모든 주파수에서 음전하를 보여주었으며, 특히 극저주파-3, 저주파-1, 중주파-1, 중주파-3, 중주파-4에서 가장 큰 절대값의 제타전위 값을 보여주었다.

표 16. 주파수 영역에 따른 화장품 수상부의 제타포텐셜값과 TLC/Rf 값

주파수 영역	Z-potential	TLC / Rf값
미처리	-20.05±1.29	0.61
극저주파-1	-16.80±2.20	0.59
극저주파-2	-22.98±0.37	0.61
극저주파-3	-27.88±0.92	0.72
저주파-1	-27.80±1.59	0.75
중주파-1	-27.63±0.09	0.74
중주파-2	-25.76±1.60	0.71
중주파-3	-26.53±0.61	0.69
중주파-4	-26.24±1.12	0.72
고주파-1	-18.32±1.72	0.55
고주파-2	-25.10±0.29	0.68

표 17. 선정된 3개 시그널 처리에 따른 비비크림 수상부의 입자크기 분포

입자 크기 분포 (nm)				
용 매	D. I Water base			
Repeat.	Control	COS-50	COS-100	COS-100R
1	40.8	37.3	27.1	50.8
2	43.3	39.9	25.8	45.8
3	44.8	38.8	27.5	44.5
Avr	43.0	38.7	26.8	47.0
ST.Dev	2.0	1.3	0.9	3.3

4.3 제타포텐셜과 입경에 따른 피부 밀착력 비교

앞선 결과를 바탕으로 제타포텐셜 값과 입자 크기 분포 차이에 따른 피부 부착력 및 외부 자극에 의한 피부 진정에 어떠한 효과가 알아보기 위한 시험을 진행하였다(표 18, 그림 38).

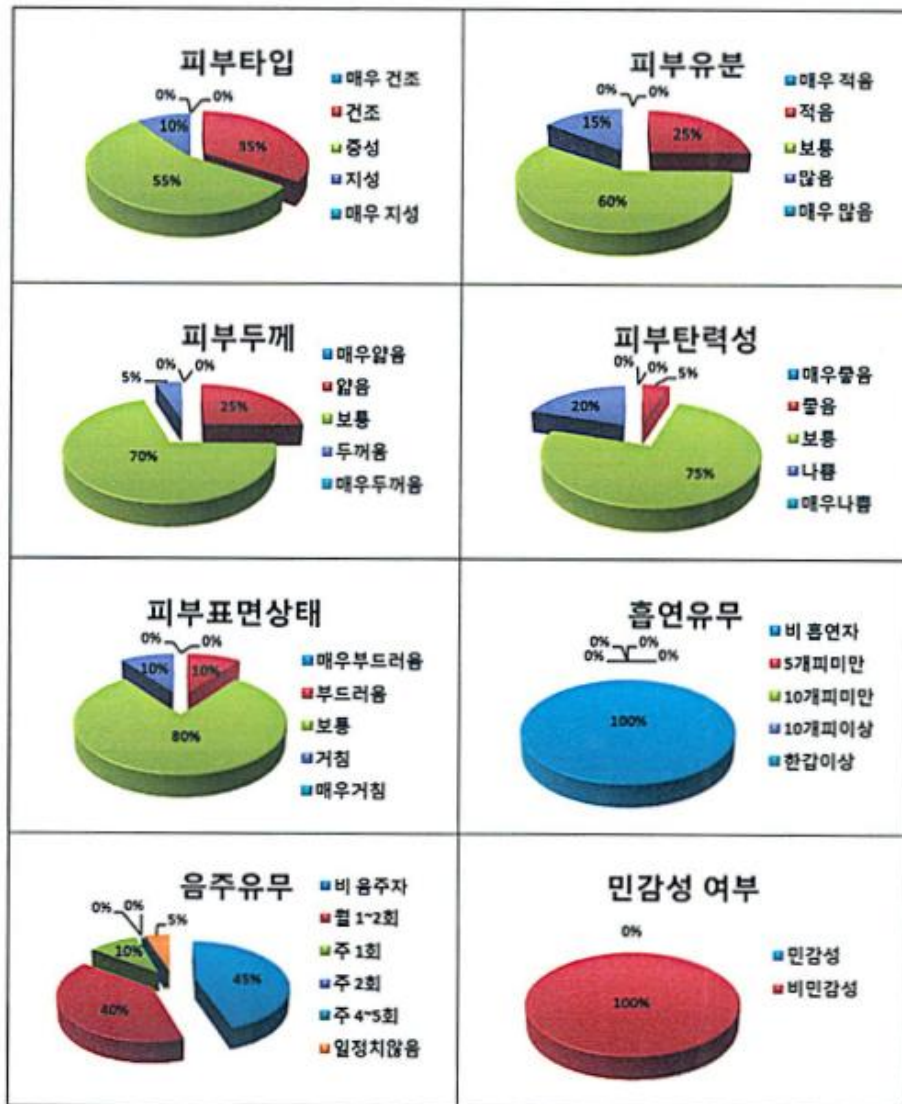
부착력은 인체적용시험 시 밀착력 항목으로 측정하며, 측정 값이 크면 화장품용 퍼프(puff)에 묻어나온 제품의 양이 많음을 의미한다(그림 40,41,42).

피부 밀착력 시험을 진행한 결과 제타포텐셜 값과 입경값과 유의성을 보이는 것을 확인할 수 있었다(표 19, 그림 39). 이 결과는 연구전 가설처럼 균질화가 되었을 때 피부에 고르게 분포되고, 변경된 전하값으로 인해 밀착력에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

이는 균질화로 인해 콜로이드 입자의 피부와 닿는 면적의 증가와 제타전위 값이 낮아짐에 따라 밀착력이 증가한다는 것으로 유추해볼 수 있다.

표 18. 피험자 기본 정보

No.	Subject Initial	Age	Sex
1	KSM	43	F
2	KHJ-1	47	F
3	HSS	36	F
4	JYR	36	F
5	KEH	41	F
6	KKN	35	F
7	KHJ-2	37	F
8	KRA	40	F
9	CJN	35	F
10	LMY	34	F
11	KSM	49	F
12	KJY	38	F
13	UKH	40	F
14	CDJ	45	F
15	KHY	41	F
16	LEJ	37	F
17	KEJ	40	F
18	KHJ-3	35	F
19	JSH	37	F
20	AIK	40	F
평 균		39.3	여성: 20명
표준편차		4.2	남성: 0명



15

한방바이오산업 임상지원센터
The Clinical Trial Center for Skin Industry at Samsung University

그림 38. 피부 상태에 따른 자기 평가 피험자들의 피부 자기 평가

표 19. 밀착력 측정 결과

No	Subject Initial	대조군	COS-50	COS-100	COS-100R
		제품 도포 30분 후	제품 도포 30분 후	제품 도포 30분 후	제품 도포 30분 후
1	KSM	4028	2583	3156	3677
2	KHJ-1	2521	3993	3116	4664
3	HSS	3280	4166	3099	3294
4	JYR	3013	3811	2734	3772
5	KEH	3397	3390	3227	2788
6	KKN	4915	4822	5517	5230
7	KHJ-2	4518	5116	3792	5331
8	KRA	3709	3259	3685	3718
9	CJN	4141	4080	3696	4641
10	LMY	3615	4270	4404	3566
11	KSM	3593	3137	3185	3518
12	KJY	3772	2408	3678	3732
13	UKH	3359	2957	3495	3484
14	CDJ	3138	2774	3362	3116
15	KHY	3691	3349	4049	4123
16	LEJ	3962	4105	3672	3731
17	KEJ	3153	3884	3395	2911
18	KHJ-3	1282	2128	2148	1542
19	JSH	3251	2927	3031	2752
20	AIK	3057	3133	3427	4227
평 균		3469.8	3514.6	3493.4	3690.9
표준편차		754.0	794.9	675.7	885.3

제품간 밀착력 비교

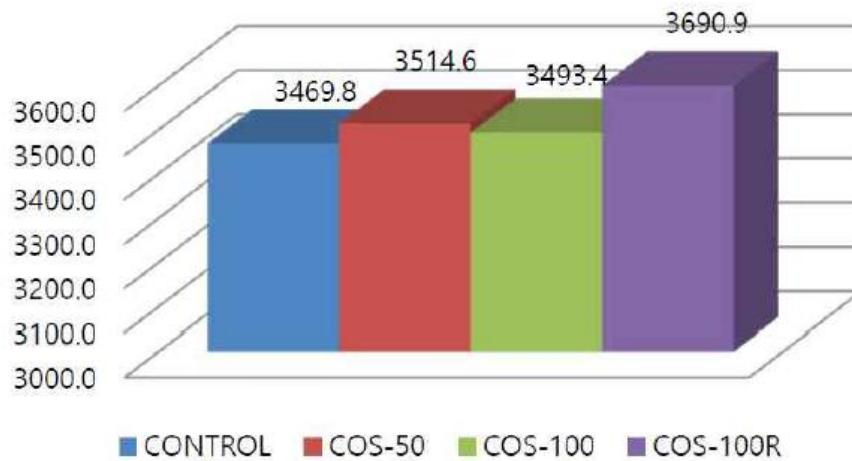
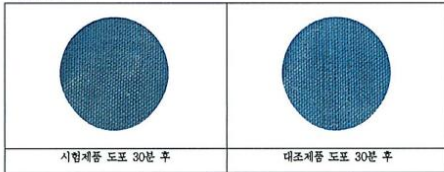
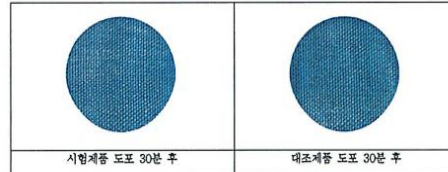


그림 39. 시그널 처리에 따른 밀착력 비교. 대조군과 비교하여 시험군 (COS-50, COS-100, COS-100R)은 도포 30분 후 밀착력에 변화가 있음을 확인할 수 있었다. 시험군 (COS-50, COS-100, COS-100R) 모두에서 대조군과 비교하여 높은 수치를 나타내었다.

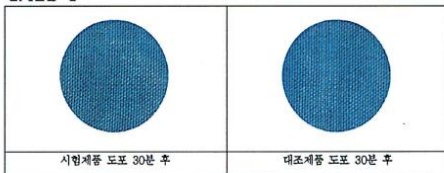
1. KSM-1



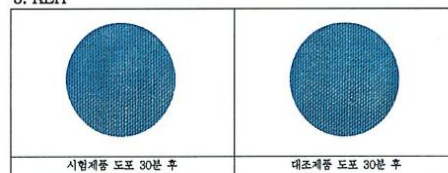
4. JYR



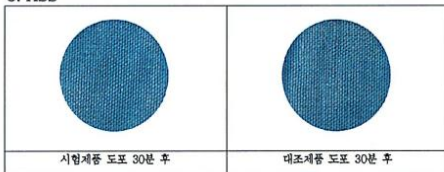
2. KHJ-1



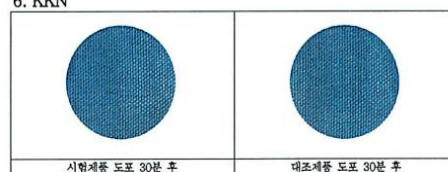
5. KEH



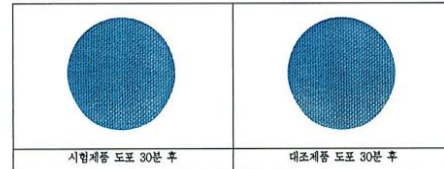
3. HSS



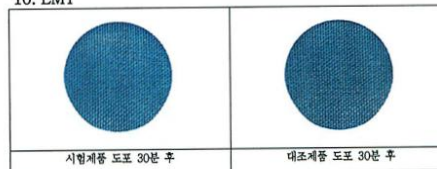
6. KKN



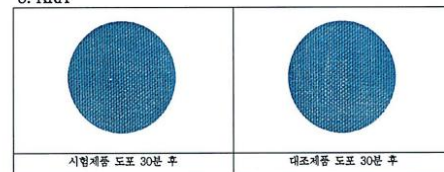
7. KHJ-2



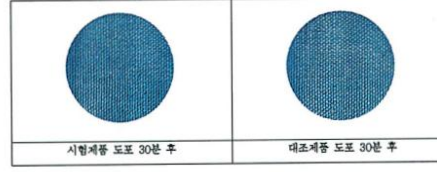
10. LMY



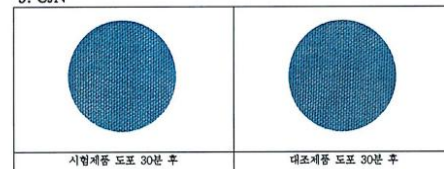
8. KRA



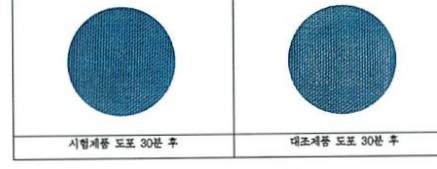
11. KSM-2



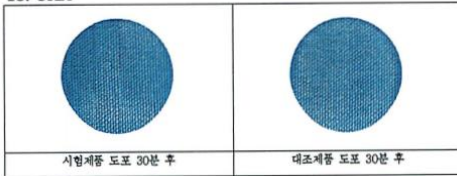
9. CJN



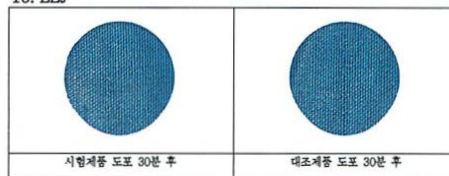
12. KJY



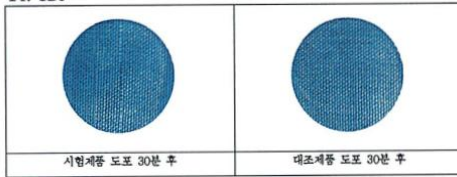
13. UKH



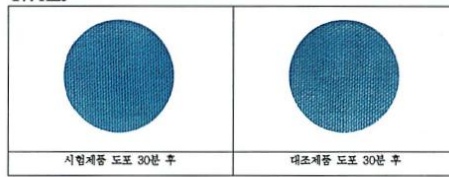
16. LEJ



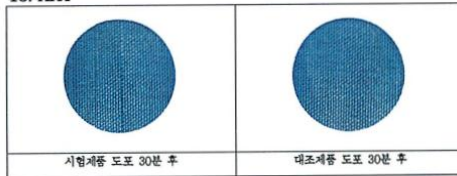
14. CDJ



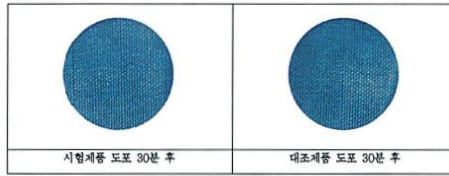
17. KEJ



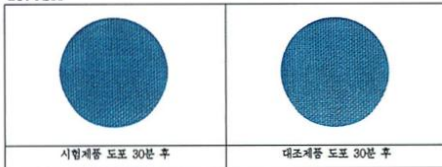
15. KHY



18. KHJ-3



19. JSH



20. AIK

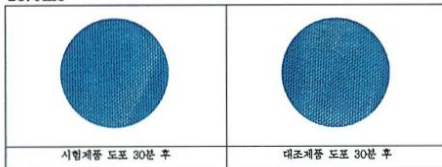
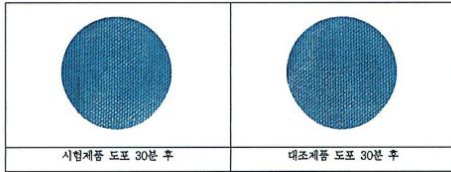
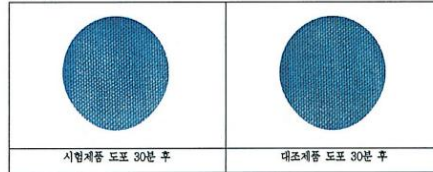


그림 40. COS-50의 밀착력 비교 실험 결과 데이터

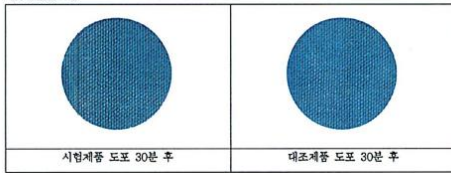
1. KSM-1



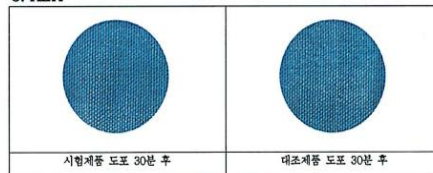
4. JYR



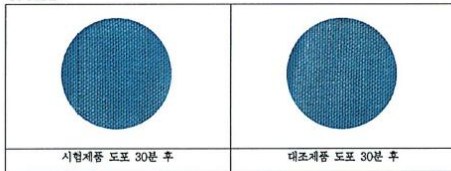
2. KHJ-1



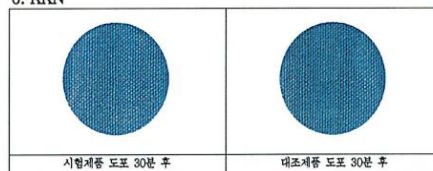
5. KEH



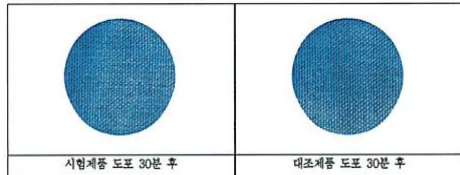
3. HSS



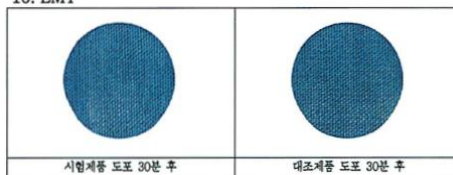
6. KKN



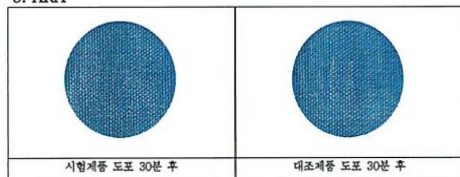
7. KHJ-2



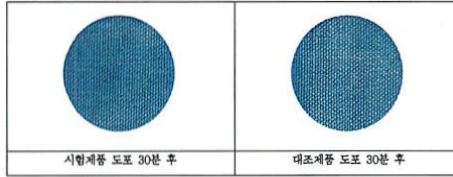
10. LMY



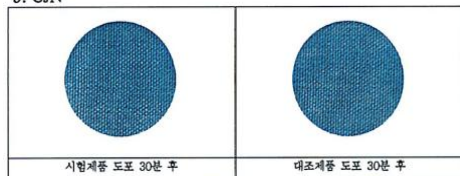
8. KRA



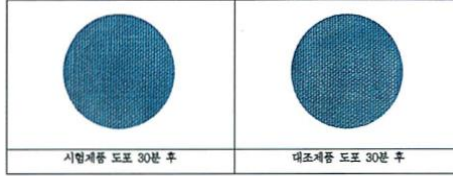
11. KSM-2



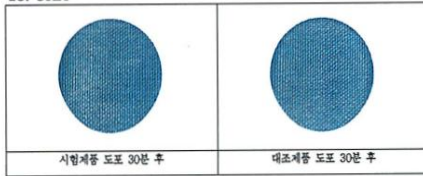
9. CJN



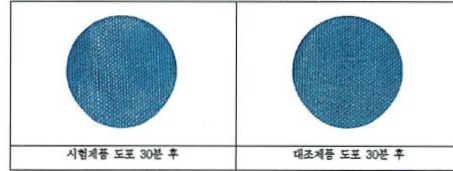
12. KJY



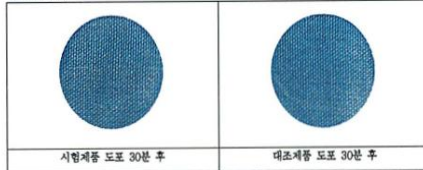
13. UKH



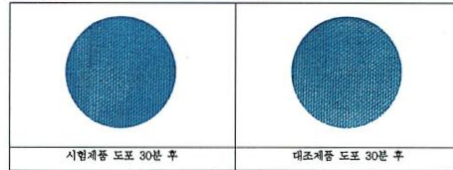
16. LEJ



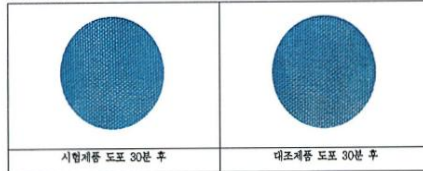
14. CDJ



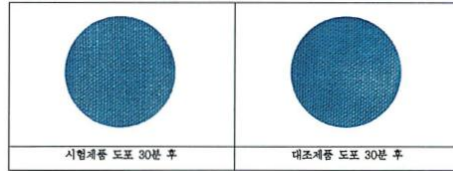
17. KEJ



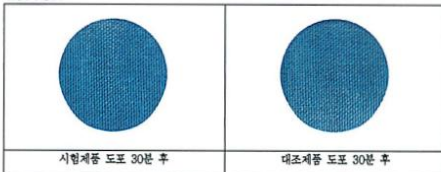
15. KHY



18. KHJ-3



19. JSH



20. AIK

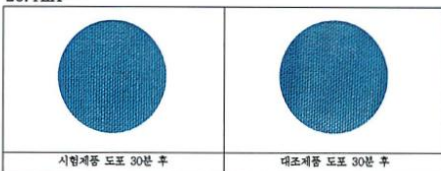
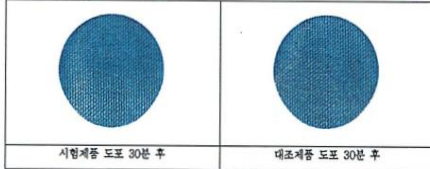
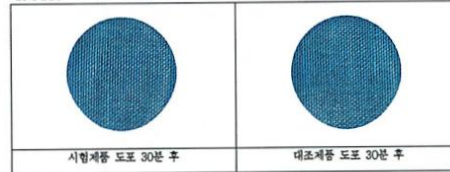


그림 41. COS-100의 밀착력 비교 실험 결과 데이터

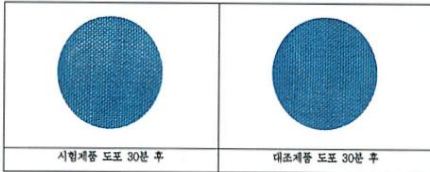
1. KSM-1



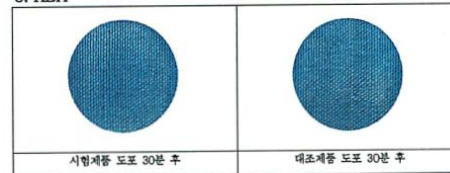
4. JYR



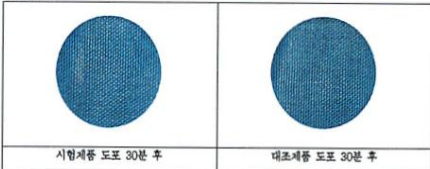
2. KHJ-1



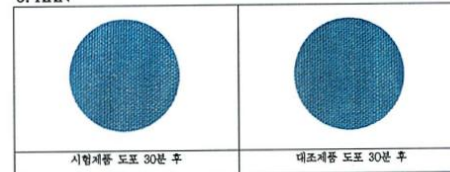
5. KEH



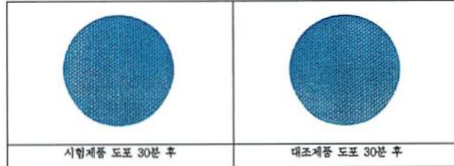
3. HSS



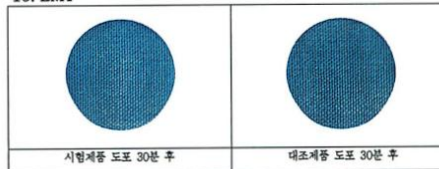
6. KKN



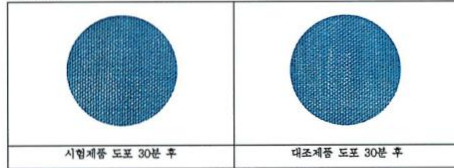
7. KHJ-2



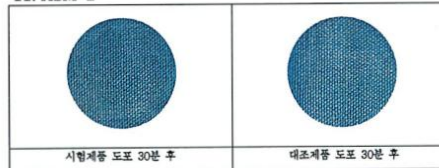
10. LMY



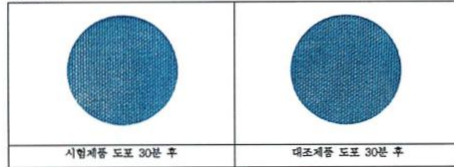
8. KRA



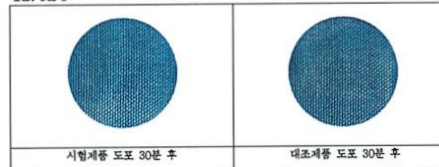
11. KSM-2



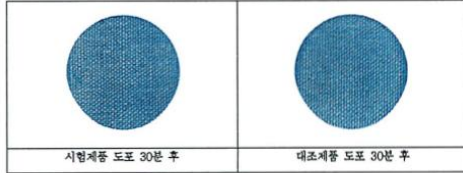
9. CJN



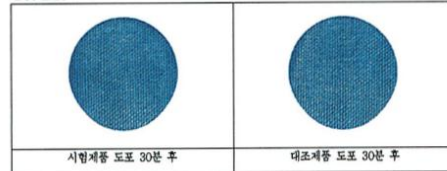
12. KJY



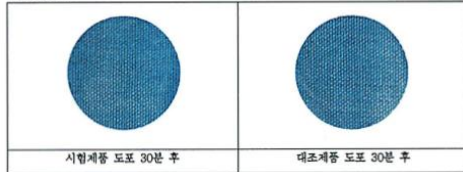
13. UKH



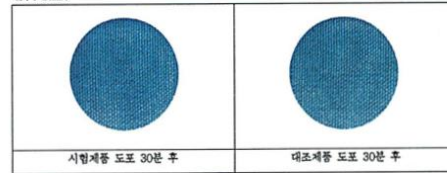
16. LEJ



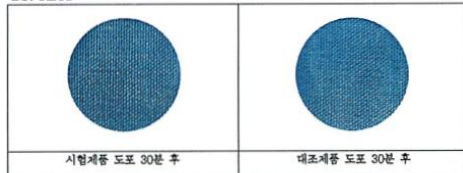
14. CDJ



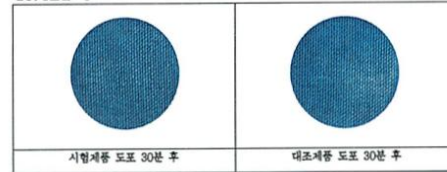
17. KEJ



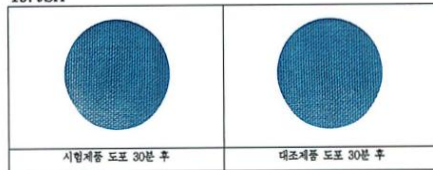
15. KHY



18. KHJ-3



19. JSH



20. AIK

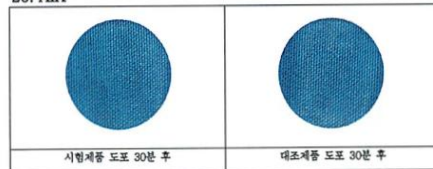


그림 42. COS-100R의 밀착력 비교 실험 결과 데이터

4.4 제타포텐셜과 입경에 따른 자외선에 의한 손상 감소 확인

다음은 자외선에 의한 데미지 감소 효과를 보고자 하였다(표 20, 21). 자외선에 의한 데미지 감소 효과는 외부자극에 의한 피부진정 효능평가를 통해 측정이 가능하다. 측정은 색차계를 사용하여 기기적 측정값을 적용하고, 제품 사용 부위(시험군)와 제품 미사용 부위(대조군)를 무작위 배정하여 비교 시험하도록 하며, 측정은 제품을 사용 전, 제품 사용 24시간 후, 제품 사용 48시간 후에 측정한다.

그 결과 시그널을 처리한 샘플이 무처리한 샘플에 비해 보다 진정 효과가 좋게 나오는 것을 확인할 수 있었다(그림 43). 이를 통해 시그널을 처리할 시 자외선과 같은 외부 환경요인에 대한 피부 자극 완화가 이루어질 수 있음을 확인하였다.

표 20. 시그널처리에 따른 자외선에 의한 손상효과

No.	Subject Initial	시험군(A)				대조군(B)			
		사용전	사용 24시간 후	사용 48시간 후	사용 72시간 후	사용전	사용 24시간 후	사용 48시간 후	사용 72시간 후
1	KNG	9.67	8.07	7.36	6.75	9.24	8.86	8.54	6.66
		10.08	9.18	8.19	7.81	10.37	9.21	8.88	6.16
2	LSH	10.65	9.45	8.88	7.08	10.17	9.76	9.47	8.23
		9.38	8.75	8.13	6.32	10.16	9.66	9.30	7.66
3	CJN	10.99	9.60	8.82	7.44	10.35	9.13	8.43	8.21
		11.56	10.22	9.68	8.47	11.62	10.70	9.35	8.50
4	NJS	13.27	11.53	10.44	9.21	13.20	11.76	11.25	10.54
		11.94	10.77	10.24	9.68	12.65	11.20	10.35	9.95
5	KOG	8.66	7.63	7.22	6.76	7.78	7.24	6.97	6.66
		8.27	8.02	7.66	6.28	7.31	7.16	7.13	6.19
6	KJI	9.43	8.68	7.08	6.27	9.39	8.75	8.51	7.89
		9.47	8.86	7.40	6.68	9.74	8.95	8.40	7.60
7	JMY	13.51	11.82	10.02	9.44	15.96	13.86	12.42	11.20
		16.04	14.48	13.78	12.04	17.56	15.85	13.61	11.67
8	KYK	11.56	10.77	10.03	9.16	11.85	10.69	10.70	9.30
		12.36	11.19	10.82	9.27	12.11	11.57	11.25	10.13
9	AES	13.17	12.49	11.50	10.21	12.25	11.20	10.33	9.66
		13.40	11.30	10.72	9.86	12.57	11.30	10.06	9.48
10	LSO	11.54	11.05	10.73	9.90	11.24	10.93	11.04	10.04
		11.14	10.72	10.09	8.95	12.19	11.73	11.10	9.90
11	PYO	11.18	10.86	9.71	8.09	10.92	10.29	9.53	8.24
		12.10	11.72	10.59	8.76	11.17	10.66	10.41	8.61

12	KGJ	12.09	11.20	10.39	8.19	13.20	12.85	12.47	10.06
		12.35	11.04	10.28	8.38	12.96	12.43	11.66	10.11
13	LSJ	12.70	11.05	10.85	9.48	11.67	10.12	10.23	9.39
		11.22	10.36	9.90	8.42	12.19	10.83	9.87	9.09
14	JYG	10.83	10.20	9.80	8.29	10.58	10.26	9.95	8.65
		10.80	10.20	9.20	8.86	10.62	10.37	9.16	8.50
15	BMH	12.02	10.38	9.86	8.19	11.43	10.49	9.77	8.29
		11.95	9.98	9.10	7.78	12.35	10.46	9.89	7.66
16	BEH	11.48	10.32	10.01	8.83	11.97	11.37	11.26	9.10
		12.33	10.59	10.53	8.55	11.07	10.71	10.38	8.83
17	KYJ	12.45	11.52	10.32	9.48	12.69	11.11	10.30	10.36
		13.21	12.34	11.44	10.62	13.18	12.56	11.51	11.29
18	MGJ	10.99	10.49	10.25	10.15	12.12	11.90	11.57	10.54
		11.76	11.05	10.63	9.67	12.19	11.97	11.24	10.45
19	WIN	14.63	12.63	12.16	10.45	14.18	12.50	11.36	10.91
		14.57	12.79	12.29	11.25	13.76	13.02	12.12	11.89
20	GHJ	13.97	13.46	12.44	10.52	13.66	12.76	12.17	10.97
		13.14	12.79	11.47	10.28	13.49	12.88	12.18	10.96

평가 시기		사용전	사용 24시간 후	사용 48시간 후	사용 72시간 후
시험군 (A)	평균	11.80	10.74	10.00	8.79
	표준편차	1.65	1.49	1.50	1.41
대조군 (B)	평균	11.83	10.98	10.35	9.24
	표준편차	1.92	1.70	1.46	1.50

표 21. 시그널처리에 따른 자외선에 의한 진정효과

No.	Subject Initial	시험군(A)			대조군(B)		
		사용 24시간 후- 사용전	사용 48시간 후- 사용전	사용 72시간 후- 사용전	사용 24시간 후- 사용전	사용 48시간 후- 사용전	사용 72시간 후- 사용전
1	KNG	-1.59	-2.31	-2.91	-0.38	-0.71	-2.58
		-0.90	-1.89	-2.27	-1.16	-1.49	-4.21
2	LSH	-1.20	-1.77	-3.58	-0.41	-0.70	-1.94
		-0.63	-1.26	-3.07	-0.49	-0.86	-2.50
3	CJN	-1.38	-2.17	-3.55	-1.22	-1.92	-2.14
		-1.34	-1.87	-3.09	-0.92	-2.27	-3.11
4	NJS	-1.74	-2.83	-4.05	-1.44	-1.95	-2.66
		-1.16	-1.69	-2.26	-1.46	-2.30	-2.71
5	KOG	-1.03	-1.44	-1.91	-0.54	-0.81	-1.13
		-0.26	-0.61	-1.99	-0.15	-0.18	-1.12
6	KJI	-0.75	-2.35	-3.15	-0.64	-0.88	-1.50
		-0.61	-2.07	-2.79	-0.79	-1.34	-2.14
7	JMY	-1.68	-3.48	-4.07	-2.10	-3.54	-4.76
		-1.56	-2.26	-4.01	-1.70	-3.94	-5.89
8	KYK	-0.79	-1.53	-2.40	-1.16	-1.15	-2.55
		-1.17	-1.53	-3.09	-0.54	-0.86	-1.98
9	AES	-0.68	-1.67	-2.96	-1.05	-1.92	-2.59
		-2.11	-2.68	-3.54	-1.27	-2.51	-3.09
10	LSO	-0.49	-0.81	-1.64	-0.31	-0.20	-1.20
		-0.42	-1.05	-2.19	-0.47	-1.09	-2.30
11	PYO	-0.33	-1.48	-3.10	-0.63	-1.39	-2.68
		-0.38	-1.51	-3.34	-0.51	-0.76	-2.56

12	KGJ	-0.89	-1.70	-3.90	-0.34	-0.73	-3.14
		-1.31	-2.07	-3.97	-0.53	-1.30	-2.85
13	LSJ	-1.65	-1.85	-3.22	-1.54	-1.43	-2.28
		-0.86	-1.33	-2.81	-1.36	-2.32	-3.10
14	JYG	-0.63	-1.02	-2.54	-0.31	-0.62	-1.93
		-0.60	-1.60	-1.94	-0.25	-1.46	-2.12
15	BMH	-1.64	-2.16	-3.83	-0.94	-1.65	-3.14
		-1.98	-2.86	-4.18	-1.89	-2.46	-4.69
16	BEH	-1.17	-1.48	-2.65	-0.60	-0.72	-2.87
		-1.74	-1.80	-3.77	-0.36	-0.69	-2.24
17	KYJ	-0.93	-2.13	-2.98	-1.58	-2.39	-2.33
		-0.87	-1.77	-2.59	-0.62	-1.67	-1.89
18	MGJ	-0.49	-0.74	-0.84	-0.22	-0.55	-1.58
		-0.71	-1.13	-2.10	-0.21	-0.95	-1.74
19	WIN	-2.00	-2.47	-4.18	-1.68	-2.82	-3.27
		-1.78	-2.28	-3.33	-0.74	-1.64	-1.87
20	GHJ	-0.51	-1.53	-3.45	-0.90	-1.49	-2.69
		-0.35	-1.67	-2.85	-0.61	-1.31	-2.53

도포 제품	시험군(A)			대조군(B)		
평가 시기	사용 24시간 후- 사용전	사용 48시간 후- 사용전	사용 72시간 후- 사용전	사용 24시간 후- 사용전	사용 48시간 후- 사용전	사용 72시간 후- 사용전
평균	-1.06	-1.80	-3.00	-0.85	-1.47	-2.59
표준편차	0.53	0.60	0.78	0.52	0.85	0.98

	사용 24시간 후	사용 48시간 후	사용 72시간 후
<i>p</i> -value	0.083 (<i>p</i> >0.05)	0.052 (<i>p</i> >0.05)	0.040 (<i>p</i> <0.05)

군간비교

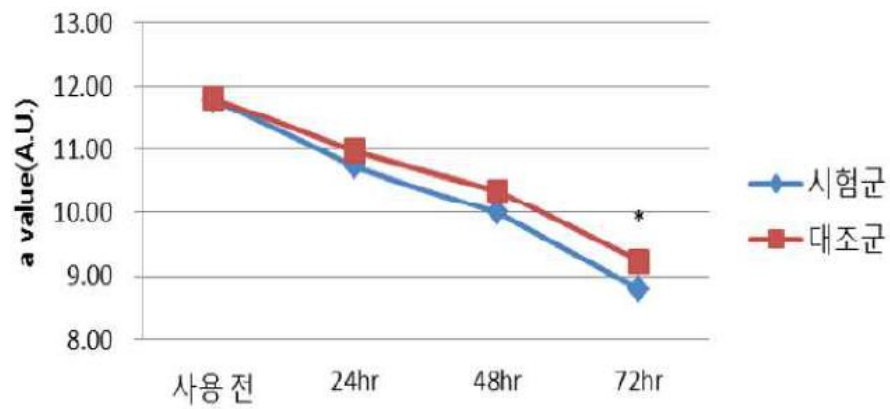


그림 43. 시그널 처리에 따른 자외선에 의한 데미지 감소 효과. 시그널을 처리한 군은 대조군 대비 자외선에 의한 데미지 감소효과를 보여주었다.

4.5 시그널 처리에 따른 경피흡수 평가

시그널 처리에 의한 균질화가 되었을 때 유효물질의 흡수력 증가 효과를 보고자 시험을 수행하였다. 흡수력 증가효과는 Franz diffusion cell을 이용하여 측정하며, Franz diffusion cell을 이용할 경우 유용성 물질로 실험을 하였을 때, 보다 정확한 결과를 얻을 수 있어 glabridin을 메탄올에 8%씩 녹인 후 선별된 3가지 시그널을 처리하여 샘플을 준비하였다.

그 결과 무처리군에서는 57.72% 정도 투과되는 것으로 나타났으며, 그 중 피부에 남아있는 양이 13.18% 정도로 관찰되었다. 하지만 시그널처리를 통해 균질화가 된 샘플의 경우 79%~88%까지 흡수력이 매우 좋아지는 것을 확인할 수 있었고, 피부에 남아있는 양도 2% 미만으로 피부에 남지 않고 대부분 통과하는 결과를 얻을 수 있었다(표 22-25, 그림 44).

위 결과를 보았을 때, 처음에 세웠던 가설처럼 어떠한 화학적 첨가 없이 보다 기능적으로 우수한 제품을 만들 수 있을 것이라 생각되어, 제품에 적용하여 보다 안정화된 제품을 만들기 위한 시험을 진행하였다. 본 실험은 현재 까지 선별한 시그널 중 제타전위차를 가장 크게 변이시켜 제형의 유화도를 높이고, 경피흡수도가 높은 COS-100R을 선정하여 시험을 진행하였다.

표 22. COS-50의 피부침투량 및 투과량 분석

COS-50	Area			Mean	SD	Glabridin 함유량(μg)
	1	2	3			
Tool	858.2	858.4	858.9	858.52	0.35	37.89
Wash	105.0	104.6	104.6	104.71	0.22	9.48
Skin	105.3	105.1	104.9	105.11	0.20	4.76
Receptor	1485.7	1486.0	1485.2	1485.63	0.39	261.89

Area; value of HPLC, Mean; average of areas, SD; standard deviation

Tool	: Micro tip에 남아있는 시험 물질의 양
Wash	: 피부에 적용 후 피부에서 세척된 양
Skin	: 피부에 침투하여 조직에 남아있는 양
Receptor	: 피부를 투과하여 수용액에 녹아있는 양

표 23. COS-100의 피부침투량 및 투과량 분석

COS-100	Area			Mean	SD	Glabridin 함유량(μ g)
	1	2	3			
Tool	495.9	496.0	495.7	495.87	0.12	21.94
Wash	8.3	8.0	8.0	8.13	0.16	0.99
Skin	25.1	25.3	25.2	25.20	0.11	1.24
Receptor	1492.9	1492.5	1492.3	1492.59	0.32	263.12

Area; value of HPLC, Mean; average of areas, SD; standard deviation

Tool	: Micro tip에 남아있는 시험 물질의 양
Wash	: 피부에 적용 후 피부에서 세척된 양
Skin	: 피부에 침투하여 조직에 남아있는 양
Receptor	: 피부를 투과하여 수용액에 녹아있는 양

표 24. COS-100R의 피부침투량 및 투과량 분석

COS-100R	Area			Mean	SD	Glabridin 함유량(μg)
	1	2	3			
Tool	637.0	636.8	637.1	636.95	0.16	28.15
Wash	88.2	88.3	88.1	88.19	0.09	8.03
Skin	117.2	117.2	116.6	117.02	0.34	5.28
Receptor	1666.4	1665.9	1665.4	1665.89	0.52	293.60

Area; value of HPLC, Mean; average of areas, SD; standard deviation

Tool	: Micro tip에 남아있는 시험 물질의 양
Wash	: 피부에 적용 후 피부에서 세척된 양
Skin	: 피부에 침투하여 조직에 남아있는 양
Receptor	: 피부를 투과하여 수용액에 녹아있는 양

표 25. 대조군의 피부침투량 및 투과량 분석

CONTROL	Area			Mean	SD	Glabridin 함유량(μ g)
	1	2	3			
Tool	924.4	924.1	923.3	923.95	0.61	40.77
Wash	989.5	989.3	988.2	989.01	0.71	87.26
Skin	987.8	987.3	987.4	987.50	0.24	43.57
Receptor	834.3	833.6	833.6	833.83	0.39	147.23

Area; value of HPLC, Mean; average of areas, SD; standard deviation

Tool	: Micro tip에 남아있는 시험 물질의 양
Wash	: 피부에 적용 후 피부에서 세척된 양
Skin	: 피부에 침투하여 조직에 남아있는 양
Receptor	: 피부를 투과하여 수용액에 녹아있는 양

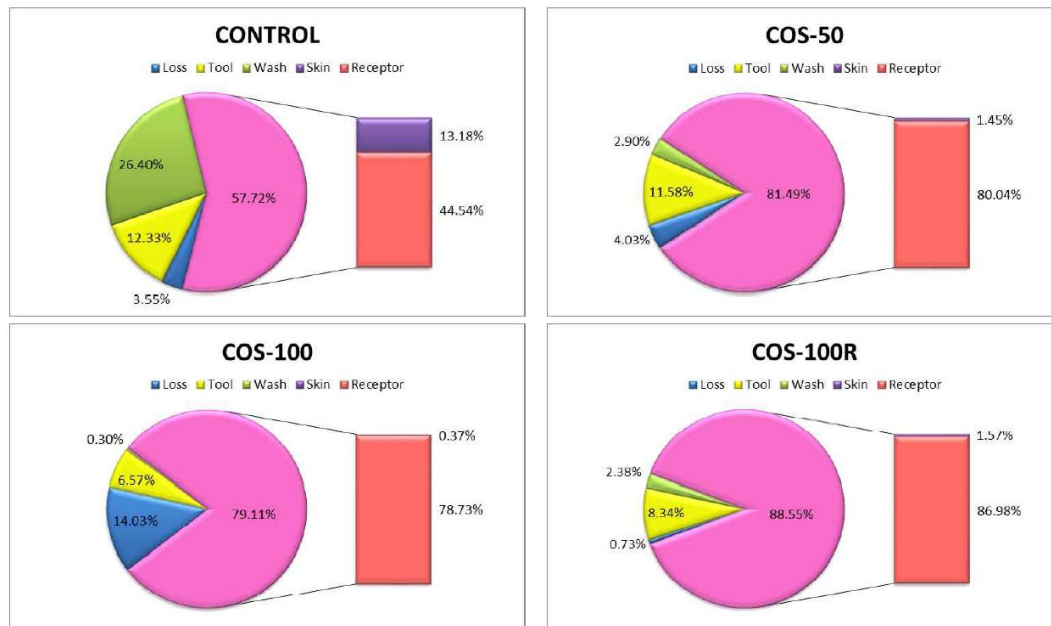


그림 44. 시그널 처리에 따른 경피흡수 평가. 각 시그널 (COS-50, COS-100, COS-100R)을 처리한 후 Franz diffusion cell을 이용하여 각 시료의 경피흡수 평가를 진행하였다. 실험결과, 미처리 군 대비 시그널 처리 군은 경피흡수 효과가 증가하는 것을 확인하였다.

4.6 시그널 처리에 따른 화장품 제형의 물성 평가

시험을 위해 COS-100R 시그널을 3개의 파운데이션을 랜덤으로 선정하여, 100g 시료 기준으로 1분 30초씩 총 2회 처리하였다.

RFPTM 시그널이 적용된 화장품의 제형은 전기역학적 변이를 통해 반영구적 물성변화를 나타내며, 처리에 따른 처리에 따른 물성변화는 입경분포도 및 제타 전위차를 통해 관찰이 될 수 있다. 이는 어떠한 화학적인 첨가물 없이 화장품의 기본이 되는 분체-오일-물의 3가지 성분을 보다 효율적으로 혼합시킬 수 있으며 이들의 입경과 전위차를 안정적으로 증대시킬 수 있다. 본 연구에서는 수용성 제형의 최적화된 COS-100R RFPTM 시그널을 사용하여 완제품 파운데이션에 적용하여 이에 따른 물성 변화를 관찰하였다. 처리된 파운데이션은 총 3가지이며, A샘플 같은 경우 제타포텐셜의 차이는 오차범위 안에 포함되어 있어 그 유의성은 없었으며(그림 45), B샘플 그리고 C샘플 파운데이션의 경우 제타포텐셜은 최소 25.53% 증가하였다(그림 46,47). 이는 COS-100R RFPTM 시그널 처리 후 분산도의 증가로 에멀전의 안정화가 개선되었다고 볼 수 있다. 또한 모든 파운데이션의 입경은 감소하였으며 원본 대비 최대 20.03%까지 감소하는 것으로 관찰되었다. 이 같은 결과는 에멀전의 안정화가 제타포텐셜의 증가와 입경의 감소로 나타났음을 알 수 있다. 이 같은 결과는 비공식적인 관능테스트에서 제형의 발림성이 개선되었다는 것으로도 나타나고 있다.

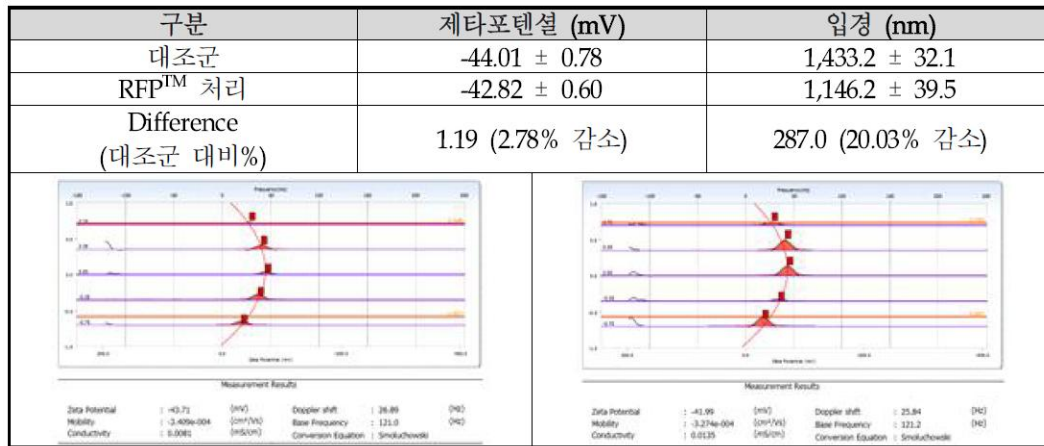


그림 45. 샘플 A (파운데이션)의 RFP 처리 시 제타포텐셜 측정결과. RFP 처리 시 입자의 크기는 20 %, 제타포텐셜은 약간 감소하였다. 이를 통해 RFP 처리는 콜로이드의 안정화 시키는데 기여함을 확인하였다.

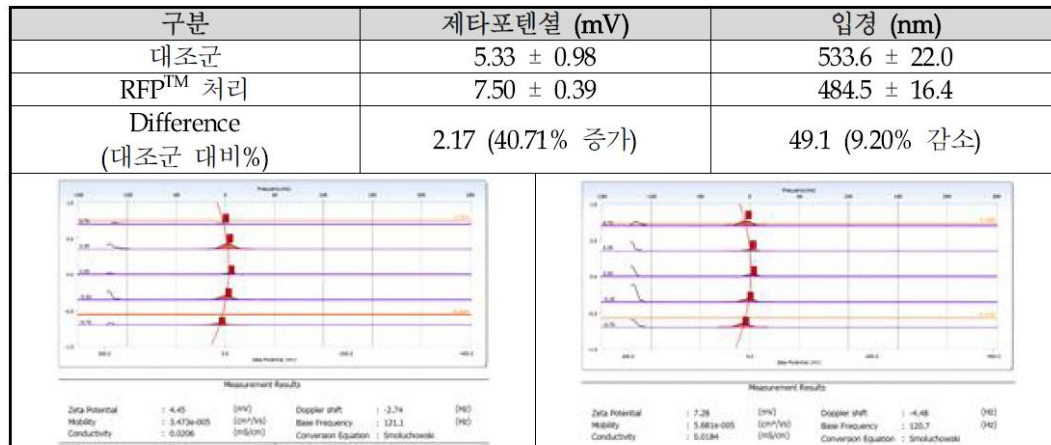


그림 46. 샘플 B (파운데이션)의 RFP 처리 시 제타포텐셜 측정결과. RFP 처리 시 입자의 크기는 9%, 제타포텐셜은 약 40% 증가하였다. 이를 통해 RFP 처리는 콜로이드의 안정화 시키는데 기여함을 확인하였다.

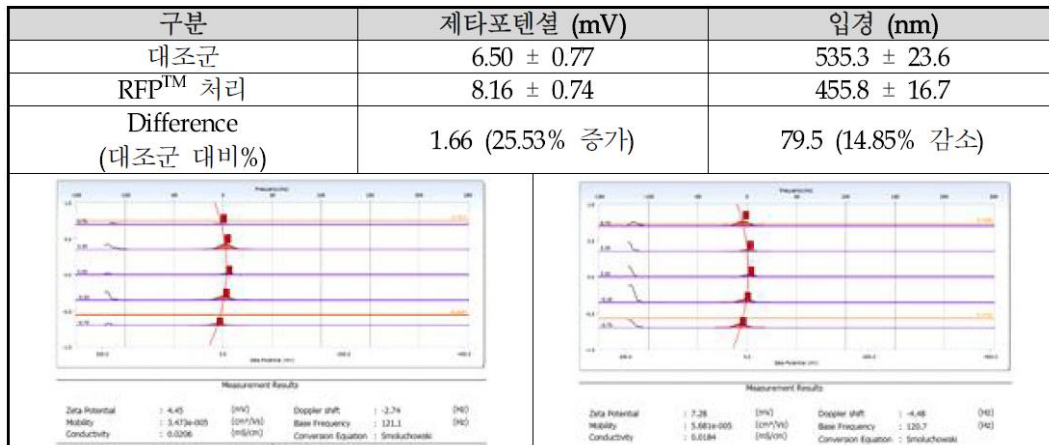


그림 47. 샘플 C (파운데이션)의 RFP 처리 시 제타포텐셜 측정결과. RFP 처리 시 입자의 크기는 약 15%, 제타포텐셜은 약 25% 증가하였다. 이를 통해 RFP 처리는 콜로이드의 안정화 시키는데 기여함을 확인하였다.

5. DPF 기술의 개발

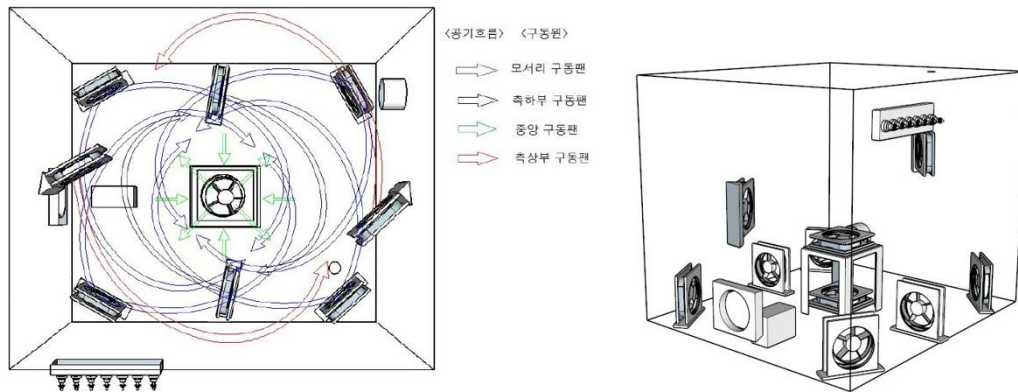
5.1 미세먼지 실험장치 구축

미세먼지는 우리 눈에 보이지 않는 아주 작은 물질로 대기 중에 오랫동안 떠다니거나 흩날려 내려오는 10 μm 이하의 물질을 통칭하는 것으로, 코에서 걸러지기도 하지만 초미세먼지는 기관지를 거쳐 폐에 흡착되거나 피부의 모공 속에 침투하기도 한다. 미세먼지는 면역력 저하를 통해 감기, 천식, 기관지염 등의 호흡기 질환이나 피부질환을 일으키고 있다. 이러한 문제에 대처하기 위해 미세먼지 차단효능을 갖는 다양한 화장품이 연구·개발되고 있으나 화장품이 어느 정도의 미세먼지 차단효능을 갖는지 여부를 측정하고 분석하는 시스템이 없는 실정이다. 따라서 미세먼지를 함유한 인공 대기환경 조성장치를 이용하여 화장품의 미세먼지 차단능을 분석하기 위해 DPF 시스템을 구축하고자 한다.

DPF 시험법을 구축하기 위해 미세먼지 농도조건, 바람의 풍속조건 등 미세먼지로 오염된 대기 조건을 구현하였고, 미세물질 대상을 선정하였다. 선정된 미세물질들은 입자의 크기에 따른 피부 부착능을 비교하여 미세물질로 사용할 후보물질을 최종 선정하였다. 위 내용을 바탕으로 미세먼지 농도별, 미세먼지 크기별 외 환경변수에 대한 종합결과를 도출하여 이를 구현할 수 있는 인공대기 환경 시스템을 제작하였고, 시험장치의 구성은 아래와 같다(그림 48).

인공대기환경 조성장치의 작동 원리는 크게 풍향발생장치와 먼지공급부, 역류방지 필터, 삼입구로 구성된다. 풍향발생장치는 여러 개의 팬이 다양한 각

도로 설치되어 미세물질 주입시 대기 환경과 같이 고르게 분포될 수 있도록
순환시켜 준다. 장치를 가동시키고, 먼지공급부로 미세물질을 넣어주게 되면
장치에서는 미세물질이 고르게 분포된다. 장치 내부에 공기의 순환을 위해 외
부로의 공기 흐름은 방지하고 외부에서 내부로의 공기 흐름은 허용하는 역류
방지 필터를 설치하였으며, 피험자가 팔을 삽입하여 시험할 수 있도록 삽입구
를 만들어 장치를 구성하였다.



구분	역할
풍향발생장치	다수의 팬을 활용하여 공급된 먼지를 실제 대기환경과 동일하거나 유사하게 분포
먼지공급부	미세먼지를 장치내로 공급
역류방지필터	외부로의 공기흐름은 방지하고, 외부에서 내부로의 공기 흐름은 허용
삼입구	피험자의 팔을 삽입

그림 48. 미세먼지 발생장치의 구성. 풍향발생장치를 통하여 대기환경과 유사하게 조성해 주어 미세먼지 환경을 조성할 수 있다.

5.2 DPF 파운데이션의 미세먼지 차단 효과에 대한 인체 적용 시험

파운데이션의 미세먼지 차단 효과를 확인하기 위해 인체에 적용을 하여 그 효과를 확인하였다.

시험은 촬영대상인 화장료가 도포된 도포부위와 화장료가 도포되지 않은 무도포부위로 구획 하여 피험자의 팔을 미세먼지에 노출전과 노출 후 2차례에 걸쳐 각각 동일한 조건 하에서 촬영하였다. 미세먼지의 피부 부착 정도는 사진촬영을 통한 이미지분석으로 진행하였으며, 피험자는 총 20명의 여성으로 구성하였다(표 26). 시험하기에 앞서 피험자들의 피부에 대한 자기 평가가 이루어 졌으며(그림 49), 그 결과 대부분 피험자들은 비 민감성 피부로 미세먼지에 의한 자극으로 인하여 실험 값에 대한 오차가 적게 나타날 수 있음을 확인하였다.

분석결과 파운데이션 도포를 한 피부에서 미세먼지가 적게 부착된 것을 확인할 수 있었으며(표 26), 이러한 결과 값은 잔여 미세먼지 변화량까지 측정하였다(표 27, 그림 50). 그리고 이러한 이미지들은 촬영을 통해 분석되었다(그림 52).

이를 통해 개발된 파운데이션이 미세먼지 흡착 방지의 역할을 수행할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

상기의 기술을 바탕으로 화장품 유형중에 유중수형태의 W/O 에멀전 제형인 파운데이션 처방을 개발하여 미세먼지로 인한 피부 보호 천연물질과 RFP 신호처리 방법을 이용하여 미세먼지 차단 기능과 피부 보호 처방을 개발하여 임상시험을 통해서 미세먼지 차단 효과가 있음을 확인하였다.

이 결과는 종래의 평가 방법보다 진보된 형식으로 단순히 미세먼지의 부착

여부만이 아닌 양을 특정식(그림 51)을 통해 산출하게 되면서 미세먼지 흡착량에 대한 지표로 삼을 수 있을 것이라고 판단된다.

이러한 점은 지금까지 세정력, 피부에 대한 자극 완화와 같은 2차적인 미세먼지에 대한 대응보다 더욱 직접적인 연관이 있다. 또한 이러한 평가법은 미세먼지 뿐 아니라 최근 들어가는 다양한 공해로부터의 피부에 대한 자극을 보호하는 평가에 대한 지표로 활용될 수 있다는 것을 암시한다.

표 26. 피 시험자 기본 정보

No.	Subject Initial	Age	Sex
1	KGH	40	F
2	KHJ	46	F
3	KMY	47	F
4	JYS	50	F
5	CHJ	45	F
6	PHS	37	F
7	CGH	43	F
8	KMJ-1	50	F
9	CEH	35	F
10	KMS	43	F
11	KSM	42	F
12	HHJ	36	F
13	LSL	43	F
14	PMJ	40	F
15	LSJ	40	F
16	KMJ-2	33	F
17	YHH	40	F
18	BBM	41	F
19	CEY	37	F
20	CSJ	30	F
평 균		41.0	여성: 20 명
표준편차		5.2	남성: 0 명

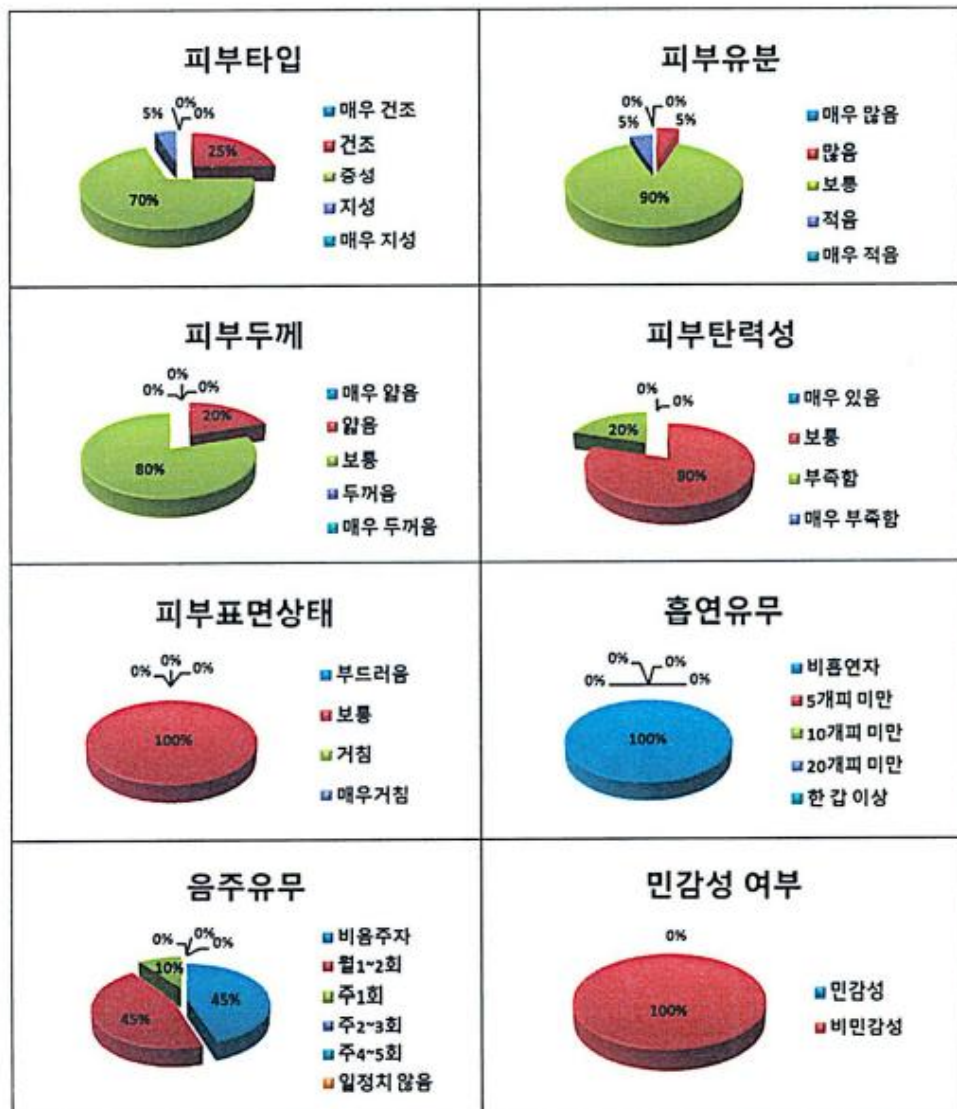


그림 49. 피부 상태에 대한 자가 설문 평가. 미세먼지 차단 실험에 들어가기에 앞서 피험자들의 피부 상태에 대한 설문 평가를 진행하였다.

표 27. 잔여 미세먼지 분석 결과

No.	Subject Initial	도포 부위		무도포 부위	
		노출 전	노출 후	노출 전	노출 후
1	KGH	15	102	1	136
2	KHJ	15	67	8	127
3	KMY	8	79	8	222
4	JYS	1	49	2	85
5	CHJ	22	89	5	137
6	PHS	17	107	4	121
7	CGH	21	91	5	252
8	KMJ-1	10	55	4	154
9	CEH	16	86	22	133
10	KMS	16	82	5	149
11	KSM	7	48	16	108
12	HHJ	24	70	26	184
13	LSL	15	72	4	171
14	PMJ	23	85	19	102
15	LSJ	10	77	24	156
16	KMJ-2	20	70	16	227
17	YHH	20	74	7	108
18	BBM	4	33	7	134
19	CEY	24	123	18	145
20	CSJ	6	30	20	118
평 균		14.7	74.5	11.1	148.5
표준편차		7.0	23.5	8.1	43.8

표 28. 잔여 미세먼지 변화량

No.	Subject Initial	도포	무도포
		노출 후 - 노출 전	노출 후 - 노출 전
1	KGH	87	135
2	KHJ	52	119
3	KMY	71	214
4	JYS	48	83
5	CHJ	67	132
6	PHS	90	117
7	CGH	70	247
8	KMJ-1	45	150
9	CEH	70	111
10	KMS	66	144
11	KSM	41	92
12	HHJ	46	158
13	LSL	57	167
14	PMJ	62	83
15	LSJ	67	132
16	KMJ-2	50	211
17	YHH	54	101
18	BBM	29	127
19	CEY	99	127
20	CSJ	24	98
평 균		59.8	137.4
표준편차		19.2	44.4



그림 50. 잔여 미세먼지 변화 분석 결과. 시험 제품 도포 부위와 무도포 부위의 잔여 미세먼지 차이를 확인할 수 있었으며, 도포 부위는 무도포 부위와 비교하여 통계적으로 유의한 수준의 미세먼지 차단 효과가 있음을 알 수 있었다($p < 0.05$).

DPF 계산식

$$\begin{aligned}
 \text{Protection 효과} &= 100 - \left(\frac{\text{도포(노출 후-노출전)}}{\text{무도포(노출 후-노출전)}} \times 100 \right) \\
 &= 100 - \left(\frac{\text{도포(잔여미세 먼지 변화량)}}{\text{무도포(잔여미세 먼지 변화량)}} \times 100 \right) \\
 &= \left(\frac{\text{무도포(잔여미세 먼지 변화량)} - \text{도포(잔여미세 먼지 변화량)}}{\text{무도포(잔여미세 먼지 변화량)}} \times 100 \right)
 \end{aligned}$$

Protection (%)	30 이하	30~40	40~50	50~60	60~70	70~80	80~90	90~100
DPF 지수	고객사 판단에 따라 사용 여부 결정	DPF30	DPF40	DPF50	DPF60	DPF70	DPF80	DPF90+

EX)

Protection 효과 = 56.5%

→ DPF 50

그림 51. DPF 계산식을 통한 미세먼지 지수의 정량화. DPF 계산식을 이용하면 미세먼지 지수를 정량화 할 수 있다. 이는 미세먼지 차단율에 대한 지표로 활용될 수 있을 것으로 전망된다.

1. RGB

	이제까지 노출 전	이제까지 노출 후
노출		
노출 후		

16

2. RRG

	이제까지 노출 전	이제까지 노출 후
노출		
노출 후		

17

3. RMY

	이제까지 노출 전	이제까지 노출 후
노출		
노출 후		

18

4. RRG

	이제까지 노출 전	이제까지 노출 후
노출		
노출 후		

19

5. CRG

	이제까지 노출 전	이제까지 노출 후
노출		
노출 후		

20

6. PRG

	이제까지 노출 전	이제까지 노출 후
노출		
노출 후		

21

7. CGH

	이재민씨 노출 전	이재민씨 노출 후
노출		
노출로		

22

8. KMP-1

	이재민씨 노출 전	이재민씨 노출 후
노출		
노출로		

23

9. CSH

	이재민씨 노출 전	이재민씨 노출 후
노출		
노출로		

24

10. KMG

	이재민씨 노출 전	이재민씨 노출 후
노출		
노출로		

25

11. KSM

	이재민씨 노출 전	이재민씨 노출 후
노출		
노출로		

26

12. BHI

	이재민씨 노출 전	이재민씨 노출 후
노출		
노출로		

27

13. K20

	이재민씨 노출 전	이재민씨 노출 후
노출		
노출로		

28

14. BMD

	이재민씨 노출 전	이재민씨 노출 후
노출		
노출로		

29

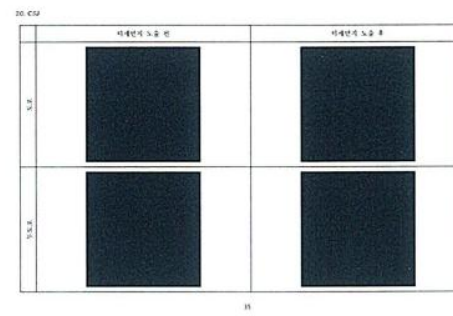
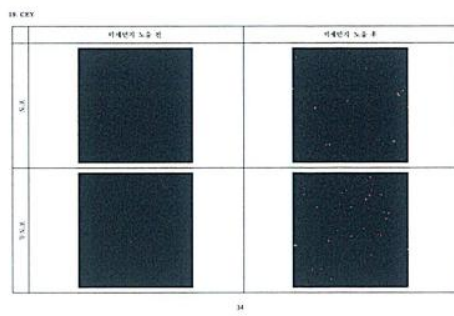
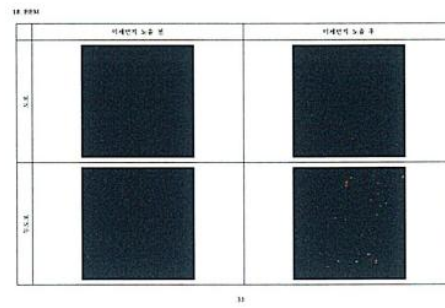
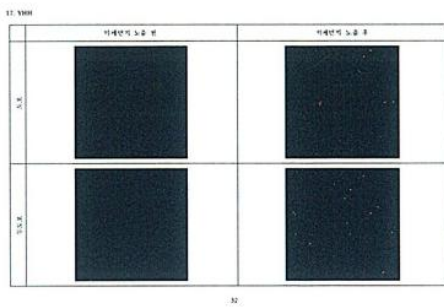
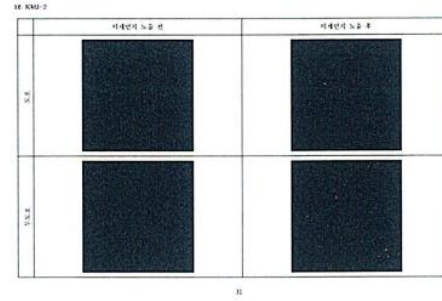
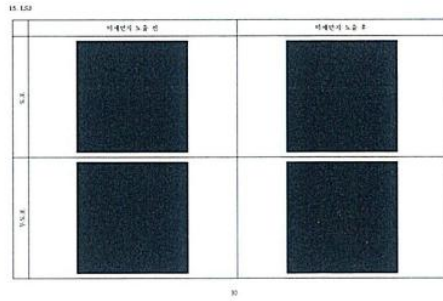


그림 52. 시험 제품의 잔여 미세먼지 촬영 결과. 미세먼지 촬영결과는 이미 지 분석을 통해 부착량을 확인하였다.

IV. 고 찰

피부 트러블을 유발하는 요인중의 하나인 대기오염은 나날이 증가하여 피부의 노화를 촉진시키는데 주목을 받고 있다. 미세먼지를 유발하는 환경은 다양한데 소비자들은 대기먼지, 공장의 매연, 자동차의 증가, 가정에서의 가스 사용 등에 의한 피부 유해 환경에 충분히 노출되어 있고 자신도 모르는 사이에 미세먼지들이 피부에 트러블을 유발시키고 있다. 천연물 내 미세먼지로 인해서 유발되는 사이토카인과의 연관성을 연구하고 이를 바탕으로 미세먼지와 상관계수를 규명했으며 특히 제주 청정지역의 자원 중 54종을 연구하여 각각의 Keratinocyte macrophage에서의 염증반응, 각 세포 내에서의 MAPK 활성화를 통해 염증성 사이토카인의 발현, HaCaT에서는 ERK p38 JNK인산화를 통해 사이토카인의 발생, Raw 264.7세포에서의 NF- κ B의 활성화를 통해 염증성 사이토카인의 증가를 평가하여 새로운 피부 트러블 완화에 적합성을 평가하였다. 그 중에서 특히 영여자 추출물은 새로운 미네랄/슈크로오스 숙성 추출법을 이용하여 활성 성분 추출을 극대화 하였고 MMP-1 억제 효과, type-1 procollagen 생성억제 효과, AP-1 활성 억제 효과를 규명하였다. 영여자 추출물이 피부 트러블 완화와 사이토카인에 대한 피부 보호 물질로 검증하여 새로운 미세먼지 보호 물질로 확인했다. 피부 구조에서 유효 성분을 지질층을 통과시키는 것은 상당히 어려운 문제이다. 피부 유효성분의 안정화는 종래에 리포솜, 에토솜, 니오솜, 캡슐레이션, 세라믹 파우더 담지 기술을 이용하여 안정화 및 서방성 기술을 지속적으로 연구해 오고 있는데 본 연구에서는 콜로이드 수용액 상에서의 전위차 형성을 이용하여 제타 전위차 값을 화학적 변환 없이 시그널 조사 기술을 개발하여 피부 유효성의 피부 침투 증가를 확

인했으며 이 시그널 기술은 제형의 안정성을 증가시키며 피부 밀착력 및 발림성 미세먼지 차단 부가 기능을 부여함을 확인하였다.

RFP™ 시그널이 적용된 화장품의 제형은 전기역학적 변이를 통해 반영구적 물성변화를 나타내며, 처리에 따른 처리에 따른 물성변화는 입도분포도 및 제타 전위차를 통해 관찰될 수 있다. 이는 어떠한 화학적인 첨가물 없이 화장품의 기본이 되는 분체-오일-물의 3가지 성분을 보다 효율적으로 혼합시킬 수 있으며 이들의 입경과 전위차를 안정적으로 증대시킬 수 있다. 시그널 개발을 위해 총 9개의 시그널은 선별하였으며, 비비크림 수상에 9개의 시그널을 처리한 뒤 대조군과의 제타포텐셜 및 TLC를 통한 Rf 값을 비교 분석하였다. 본 연구에서는 수용성 제형의 최적화된 COS-100R, RFP™ 시그널을 사용하여 완제품 파운데이션에 적용하여 이에 따른 물성 변화를 관찰하였다. 처리된 파운데이션은 총 3가지이며, A샘플 같은 경우 제타포텐셜의 차이는 오차범위 안에 포함되어 있어 그 유의성은 없었으며, B샘플 그리고 C 샘플 파운데이션의 경우 제타포텐셜은 최소 25.53% 증가하였다. 이는 COS-100R RFP™ 시그널 처리 후 분산도의 증가로 에멀전의 안정화가 개선되었다고 볼 수 있다. 또한 모든 파운데이션의 입경은 감소하였으며 원본 대비 최대 20.03%까지 감소하는 것으로 관찰되었다. 이 같은 결과는 에멀전의 안정화가 제타포텐셜의 증가와 입경의 감소로 나타났음을 알 수 있다. 이 같은 결과는 비공식적인 관능 테스트에서 제형의 발림성이 개선되었다는 것으로도 나타나고 있다. 미세먼지는 우리 눈에 보이지 않는 아주 작은 물질로 대기 중에 오랫동안 떠다니거나 흩날려 내려오는 10 μm 이하의 물질을 통칭하는 것으로, 코에서 걸러지기도 하지만 초미세먼지는 기관지를 거쳐 폐에 흡착되거나 피부의 모공 속에 침투

하기도 한다. 미세먼지는 면역력 저하를 통해 감기, 천식, 기관지염 등의 호흡기 질환이나 피부질환을 일으키고 있다. 이러한 문제에 대처하기 위해 미세먼지 차단효능을 갖는 다양한 화장품이 연구·개발되고 있으나 화장품이 어느 정도의 미세먼지 차단효능을 갖는지 여부를 측정하고 분석하는 시스템이 없는 실정이다. 따라서 미세먼지를 함유한 인공대기환경 조성장치를 이용하여 화장품의 미세먼지 차단능을 분석하기 위해 DPF 시스템을 구축하였다. DPF 시험법을 구축하기 위해 미세먼지 농도조건, 바람의 풍속조건 등 미세먼지로 오염된 대기 조건을 구현하였고, 미세물질 대상을 선정하였다. 선정된 미세물질들은 입자의 크기에 따른 피부 부착능을 비교하여 미세물질로 사용할 후보물질을 최종 선정하였다. 위 내용을 바탕으로 미세먼지 농도별, 미세먼지크기 별의 환경변수에 대한 종합결과를 도출하여 이를 구현할 수 있는 인공대기 환경 시스템을 제작하였다.

미세먼지 차단 효과를 볼 수 있는 장치와 함께 자외선 차단 지수인 SPF나 PA와 같이 수치화하여 미세먼지 차단 제품을 만들고자 DPF를 수치화 할 수 있는 계산식을 만들었으며, 계산식은 미세먼지 노출 전후에 따른 차단 정도에 근거하여 작성되었다.

이 수치 평가 방법은 미세먼지로 인한 피부 보호의 차단 효과를 나타낼 수 있는 지표로 개발된다면 미세먼지 차단 화장품 제형의 국가 경쟁력을 확보할 수 있다고 본다.

V. 참 고 문 헌

- Aboul-Einien Mona H, Kandil Soha M, Abdou Ebtsam M, Zaki Marwa S.E(2020), “Ascorbic acid derivative-loaded modified aspasomes:formulation, in vitro, ex vivo and clinical evaluation for melasma treatment”, *Journal of Liposome Research*, 30, 54-67.
- Ahn SM, Hwang JS, Lee SH(2007), “Fructose 1,6-Diphosphate Alleviates UV-Induced Oxidative Skin Damage in Hairless Mice”, *Biol Pharm.Bull.* 30(4), 692-697.
- Al-Amoudi Ahmed, Williams Paul,Mandale Steve,Lovitt Robert W(2007), “Cleaning results of new and fouled nanofiltration membrane characterized by zeta potential and permeability”, *Separation & Purification Technology*, 54, 234-240.
- Amit K.Goyal, Gautam Rath, Chetna Faujdar, Basant Malik(2019), “Application and Perspective of pH-Responsive Nano Drug Delivery Systems”, *Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*, 15-33
- Andrea Vierkotter, Tamara Schikowski, Ulrich Ranft, Dorothea Sugiri ,Mary Matsui, Ursula Kramer and Jean Krutmann(2010), “Airborne Particle Exposure and Extrinsic Skin Aging”, *Journal of investigative Dermatology*, 13, 2719-2726.
- Billet Sylvain, Landkocz Yann, Martin Perrine J, Verdin Anthony, Ledoux Frederic, Lepers Capucine, Andre Veronique, Cazier Fabrice, Sichel Francois, Gosset Pierre, Courcot Dominique(2018), “Chemical characterization of fine and ultrafine PM,derect and indirect genotoxicity of PM and therir organic

- extracts on pulmonary cells”, *Journal of Environmental Sciences(Elsevier)* , 71, 168–178.
- Breuer M M(1985), “Cosmetic emulsions”, *Encyclopedis of Emulsions Technology*, 2, 385–424.
- Brian Moore(2019), “U.S. Transdermal Drug Delivery System Market Size, Share & Trends Analysis Report By Technology (Active, Passive), By Application (Hormone, Cardiovascular, Neurodegenerative, CNS, Pain Management), And Segment Forecasts, 2019 – 2026”, *Grand View Research*, 75.
- Chen Yong, Hu Ke, Bu Haoran, Si Zhihua, Sun Haihui, Chen Liming, Liu Hang, Xie Hao, Zhao Peng, Yang Le, Sun Qinghua, Liu Zhenguo, Cui Lianqun, Cui Yuqi(2018), “Probucol protects circulating endothelial progenitor cells from ambient PM_{2.5} damage via inhibition of reactive oxygen species and inflammatory cytokine production in vivo”, *Experimental&Therapeutic Medicine* , 16, 4322–4328.
- Chungsik Yoon, Kyongnam Ryu, Junghyun Lee and Donguk Park(2012), “New approach for particulate exposure monitoring :determination of inhaled particulate mass by 24h real-time personal exposure monitoring”, *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 22, 344–351.
- CS Liu, TG Nam, MW Han, AM Ahn, HA Choi, TY Kim, OK Chun, SI Koo, DO Kim,(2013), “Protective effect of detoxified Rhus verniciflua stokes on human keratinocytes and dermal fibroblasts against oxidative stress and identification of the bioactive phenolic”, *Biosce. Biotechnol. Biochem* , 77, 1688–1698.
- de Clermont-Gallerande H,Doucet O,Marsande E,Fouchard D,Orcet A.M,Zastrow L(2001) “Formulation and interest of a decorative emulsifier-free O/W emulsion with a positive zeta potential”, *International Journal of Cosmetic*

Science, 23, 15-24.

de Moraes Jacqueline, Moraes, dos Santos Orlando, David Henrique, Delicato Tatiani, da Rocha-Filho Pedro, Alves(2006), "Characterization and Evaluation of Electrolyte Influence on Canola Oil/Water Nano-Emulsion", *Journal of Dispersion Science & Technology*, 27, 1009-1014.

Dinache Andra, Tozar Tatiana, Smarandache Adriana, Andrei Ionut Relu, Nistorescu Simona, Nastasa Viorel, Staicu Angela, Pascu Mihail-Lucian, Romanitan Mihaela Oana, Achim Cristina, Bercu Mioara, Bratu Ana(2020), "Spectroscopic Characterization of Emulsions Generated with a New Laser-Assisted Device", *Article*, 25, 1729.

Elias PM, Menon GK(1991), "Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier", *Advance in Lipid Research*, San Diego, 1-26.

Fa-Qin Dong, Wu Chen, Qun-Wei Dai, Yue-Quan Deng, Ping He, Xiao-Chun He, Jun Tang, Li-Zhu Liu, Hua He(2015), "Characterization of mineralogy and surface zeta potential of atmospheric dust fall in northwest China", *Miner Petrol*, 109, 387-395.

Fuziwara S, Ogawa K, Aso D(2004), "Barium sulphate with a negative zeta potential accelerates skin permeability barrier recovery and prevents epidermal hyperplasia induced by barrier disruption", *Br J Dermatol*, 15, 557-564.

Ge Xuemei, Wei Minyan, He Suna, Yuan Wei-En(2019), "Advances of Non-Ionic Surfactant Vesicles(Niosomes) and Their Application in Drug Delivery", *Pharmaceutics*, 11, 55.

Gianeti M D, Wagemaker T.A.L, Seixas V.C, Maia Campos P.M.B.G(2011), "The use of nanotechnology in cosmetic formulations: The influence of vehicle in the vitamin A skin penetration", *Curr.Nanosci* 8, 526-534.

- Guan Haining, Diao Xiaoqin, Liu Danyi, Han Jianchun, Kong Baohua, Liu Dengyong, Geo Chenzhe, Zhang Lili(2020), "Effect of high-pressure processing enzymatic hydrolysates of soy protein isolate on the emulsifying and oxidative stability of myofibrillar protein-prepared oil-in-water emulsions", *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 100, 3910-3919.
- Gupta Prem N, Mishra Vivek, Rawat Amit, Dubey Praveen, Mahor Sunil, Jain Sanyog, Chatterji D.P, Vyas Suresh P(2005), "Non-invasive vaccine delivery in transfersomes, niosomes and liposomes: a comparative study", *International Journal of Pharmaceutics*, 293, Issue1/2, 73-82.
- Hank Liers(2016), "Benefits of Liposomal Nutrients (Liposomes)", *Inetergratedhealthblog*.
- Hasani Bijarbooneh Fargo, Zhao Yue, Kim Jung Ho, Sun Ziq, Malgras Victor, Aboutalebi Seyed Hamed, Heo Yoon Uk, Ikegami Masashi, Dou Shi Xue, Franks G(2013), "Aqueous Colloidal Stability Evaluated by Zeta Potential Measurement and Resultant TiO_2 for Superior Photovoltaic Performance", *Journal of the American Ceramic*, 96, 2636-2643.
- Hasibi Forough, Nasirpour Ali, Varshosaz Pablo, Blanco-Lopez Maria Carmen, Gutierrez Gemma, Matos Maria(2020), "Formulation and Charaterization of Taxifolin Loaded Lipid Nanovesicles(Liposome,Niosomes, and Transfersomes) for Beverage Foritification" , *Article*, 122, Issue 2, pN.PAG-N.PAG.
- Hyun Cheol Kim, Soontae Kim, Byeong-UK Kim,Chun-Sil Jin, Songyou Hong, Rokjin Park, Seok -Woo Son, Changhan Bae, MinAh Bae, Chang-keun Song,&Areel Stein,(2017), "Recent increase of surface particulate matter concentrations in the Seoul Metropolitan Area, Korea", *Scientific Reports*, 7, 4710.

- Li Fei, Dong Yongpin, Ni Chunya, Kan Haidong, Yan Shuxian(2020), "Fine Particulate matter(PM_{2.5}) is a risk factor for dermatitis by promoting the expression of thymic stromal lymphopoietin(TSLP) in keratinocytes", *Indian Journal of Dermatology*, 65, 92-96.
- Li Youjin, Zhou Ji, Rui Xiaoqing, Zhou Lin, Mo Xi(2019), "PM_{2.5} exposure exacerbates allergic rhinitis in mice by increasing DNA methylation in the IFN- γ gene promoter in CD4⁺T cells via the ERK-DNMT pathway", *Toxicology Letters*, 301, 98-107.
- Liu Zhen, Shen Luming, Yan Chengyu, Du Jinashuang, Li Yang, Li Yang, Zhao Hui(2020), "Analysis of the Influence of Precipitation and Wind on PM_{2.5} and PM₁₀ in the Atmosphere", *Advances in Meteorology*, 8/3, 1-13.
- Lu Debin, Yang Dongyang(2020), "Spatiotemporal Patterns of Urban PM_{2.5} Pollution in China" *Journal of Landscape Research*, 12, 34-41.
- Ma Qin-Yun, Huang Da-Yu, Zhang Hui-Jun, Wang Shaohua, Chen Xiao-Feng(2017), "Exposure to particulate matter 2.5(PM_{2.5}) induced macrophage-dependent inflammation, characterized by increased Th1/Th17 cytokine secretion and cytotoxicity", *International Immunopharmacology*, 50, 139-145.
- Mazziotti Tangliani Simona, Carnevale Monica, Armiento Giovanna, Montereali Maria Rita, Nardi Elisa, Inglessis Marco, Sacco Fabrizio, Palleschi Simonetta, Rossi Barbara, Silvestroni Leopoldo, Gianfagna Antonio(2017), "Content, mineral allocation and leaching behavior of heavy metals in urban PM_{2.5}", *Atmospheric Environment*, 153, 47-60.
- Morris Stephanie A.V, Ananthapadmanabhan Kavssery P, Kasting Gerald B(2019), "Anionic Surfactant-Induced Changes in Skin Permeability", *Journal of*

- Pharmaceutical Sciences*, 108, 3640–3648.
- Motta S, Monti M, Sesana S et al (1994), “Abnormality of water barrier function in psoriasis”, *Role of ceramide fractions Arc Dermatol*, 130, 452–456.
- Nasr Maha, Mansour Samar, Mortada Nahed D, Elshamy A A (2008), “Vesicular aceclofenac systems: A comparative study between liposomes and niosomes”, *Journal of Microencapsulation*, 25, 499–512.
- Ning Li, Constantinos Sioutas, Arthur Cho, Debra Schmitz, Chandan Misra, Joan Sempf, Meiyang Wang, Terry Oberley, John Froines, and Andre Nel (2003), “Ultrafine Particulate Pollutants Induce Oxidative Stress and Mitochondrial Damage”, *Environmental Health Perspectives*, 111, 455–460.
- Okore V.C, Attama A A, Ofokansi K.C, Esimone C.O, Onigbo E.B (2011), “Formulation and Evaluation of Niosomes”, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 73, Issue 3, 323–328.
- Pinnagoda J, Tupker RA, Coenraad PJ, Natar JP (1989), “Prediction of susceptibility to irritant response by transepidermal water loss”, *Contact Dermatitis*, 20, 341–346.
- Piorkowski D, McClements D J (2013), “Recent developments in formulation, production, and applications”, *Food Hydrocoll*, 42, 5–41.
- Rezvani Maryam, Hesari Javad, Peighamvardoust Seyed Hadi, Manconi Maria, Hamishekar Hamed, Escibano-Ferrer Elvira (2019), “Potential application of nanovesicles (niosomes and liposomes) for fortification of functional beverages with Isoleucine-Proline-Proline: A comparative study with central composite design approach”, *Food Chemistry*, 293, 368–377.
- Sudo S, Ohtomo T, Otsuka K (2013), “Easy measurement and analysis method of zeta potential and electrophoretic mobility of water-dispersed colloidal

- particles by using a self-mixing solid-state laser”, *Journal of Applied Physics*, 114, Issue 6, 063106.
- Suo Danfeng, Zeng Sanwu, Zhang Junling, Meng Linghe, Weng Lishuo(2020), “PM2.5 induces apoptosis,oxidative strss inuury and melanin metabolic disorder in human melanocytes”, *Experimental&Therapeutic Medicine* , 19, 3227-3238.
- Syed Taqvi, Ghada Bassioni(2019), "Understanding Wettability through Zeta Potential Measurements", *Wettability and Interfacial Phenomena – Implications for Material Processing*, 84185
- Tamaddon Ali M, Shirazi Farshad H, Moghimi Hamid R(2007), “Modeling cytoplasmic release of encapsulated oligonucleotides from cationic liposomes”, *International Journal of Phamaceutics*, 336, 174-182.
- Tianyue Jiang, Guo Xu, Guojun Chen, Yu Zheng, Bingfang He, Zhen Gu(2020), “Progress in transdermal drug delivery systems for cancer therapy“, *Nano Research*, 13, 1810 - 1824"
- Tucker I M, Corbett J C W, Fatkin J, Jack R O, Kaszuba M, MacCreath B, McNeil Watson F(2015), “Laser Doppler Electrophoresis applied to colloids and surfaces”, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* , 20, 215-226.
- Wallace L.A., Wheeler A.J., Kearney J., Ryswyk K.V., You H., and Kulk RH., et al.(2011), “Vallidation of continuous particle monitors for personal,indoor,and outdoor exposures”, *J Expo Sci and Environ Epidemiol*, 21, 49-64.
- Walters Matthew, Al Aani Saif, Esteban Peter P, Williams Paul M, Oatley-Radcliffe Darren L(2020), “Laser Doppler electorphoresis and electro osmotic flow mapping for the zeta potential measurement of positively charged membrane surfaces”, *Chemical Engineering Research & Design* ,

159, 468-476.

Wheeler A.J, Xu X, Kulka R, Yoo H, Wallace L, and Mallach G(2011), “Windsor Ontario exposure assessment study: design and methods validation of personal, indoor, outdoor air pollution monitoring”, *J Air Waste Manage Assoc*, 61, 324-338.

Wichayapreechar Panikchar, Anuchapreeda Songyot, Phongpradist Rungsinee, Rungseevijitprapa Wandee, Ampasabate Chadarat(2020), “Dermal targeting of Centella asiatica extract using hyaluronic acid surface modified niosomes”, *Journal of Liposome Research*, 30 Issue2, 197-207.

Yang Jie, Chen Yi, Yu Zhi, Ding Hui, Ma Zhongfu(2019), “The influence of PM_{2.5} on lung injury and cytokines in mice”, *Experimental & Therapeutic Medicine*, 18, 2503-2511.

Yang W, Lee K, Yoon C, Yu S, Park K, and Choi W(2011), “Determinants of residential indoor and transportation activity times in Korea”, *J Expo Sci and Environ Epidemiol*, 21, 310-316.

Zhang Jianbo, Li Huiquan, Li Shaopeng, Hou Xinjuan(2015), “Effects of metal ions with different valences on colloidal aggregation in low-concentration silica colloidal systems characterized by continuous online zeta potential analysis”, *Colloids & Surfaces A*, 481, 1-6.

Zhao Qingjie, Chen Hui, Yang Tao, Rui Wei, Liu Fang, Zang Fang, Zhao Yong, Ding Wenjun(2016), “Direct effects of airborne PM_{2.5} exposure on macrophage polarizations”, *BBA-General Subjects*, 1860, 2835-2843.

전위차 기술을 응용한 기능성 화장품 개발

조 현 대

미세먼지는 중금속과 같은 유해물질을 포함하는 입자로, $2.5\mu\text{m}$ 보다 작은 입자를 포함하여, 호흡기, 혈관, 피부 등으로 침투하여 체내에서 악영향을 끼친다. 특히 피부는 외부환경과 직접 맞닿아 있으며 모공을 통한 미세먼지의 침투가 가능하여 미세먼지에 취약하다. 미세먼지는 모낭 속 피지선에 침투하여 분비물과 섞여 모공을 막는 등의 작용으로 피부 내 염증을 유발하며, 이는 피부 트러블의 원인이 된다. 또한, 미세먼지에 의해 생성된 활성산소는 피부 세포의 산화적 손상과 피부 내 콜라겐의 합성을 감소시켜 노화를 촉진한다. 더불어 피부장벽이 손상되면서 피부가 민감해지고 거칠어지는 등 다양한 문제를 야기한다. 이러한 이유로 피부에 적용하는 화장품은 미세먼지와 매우 밀접한 관계를 가질 수 있다. 이에, 본 연구에서는 미세먼지로 인한 피부 트러블 완화와 이를 화장품에 적용하여 화장품 산업에서의 응용가능성을 확인하였다. 먼저, 천연물인 영여자 추출물을 이용하여 미세먼지에 의한 cytokine 증가와 이로 인한 피부 염증을 확인하였다. 그 결과, 피부 손상을 유래하는 MMP-1, type-1 procollagen, pro MMP-1 생성, AP-1활성의 억제 등을 평가하여 주름 개선에 대한 경로를 확인하였으며, 영여자 추출물을 경피 전달 시스템에 적용하여 안정성 및 침투 효과를 향상시켰다. 그 다음으로, 전위차 기술을 화장품

제형에 적용하여 양전하를 띠는 에멀전 입자를 형성하여 피부에서의 밀착력과 지속력을 향상시키고자 하였다. 이에 특정 주파수를 화장품 제형에 조사하여 에멀전 입자를 더욱 작고 균질하게 형성시켰으며, 제타 전위의 절대값을 향상시켰다. 결과적으로 영여자 추출물은 콜라겐 생성을 촉진하는 작용으로 미세먼지로 유발되는 주름을 완화하며, 콜라겐 분해효소의 생성을 억제함으로써 피부노화를 억제하는 기능이 있음을 확인하였다. 또한, 주파수 조사를 통한 제타 전위를 부여하여 피부와의 친화력 및 흡수율을 증가시켰으며, 에멀전 입자의 균질화를 통해 안정성을 향상시켰다. 이러한 결과들을 통해 미세먼지로부터 피부를 보호하는 다양한 접근법을 제시하고자 한다.

【감사의 글】

논문이 완성되기까지 많은 지도와 조언 격려를 해 주신 지도 교수 한상배 교수님께 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

산업체에서 일을 하면서 화장품 제형 연구와 제약 산업 분야의 융 복합 연구를 적용하기 위해서 시작했던 학업을 통해서 화장품 산업 발전에 조금이나마 일익을 담당할 수 있도록 최선을 다하겠습니다.

부족함이 많은 저에게 항상 연구하는 자세를 심어 주셨고, 항상 열정을 다해서 지도해 주셔서 다시 한 번 감사드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 논문을 심사해 주시고 많은 조언을 해 주신 황방연 교수님, 정재경 교수님, 이강태 박사님, 표형배 박사님께도 감사의 마음을 전합니다.

학업 때문에 기술 연구원 연구원들에게 더 많은 관심을 갖지 못해서 미안한 마음이 들고, 밤늦게 까지 연구와 실험, 회사 사업계획을 도완 준 모든 연구원들에게도 감사드립니다.

늦은 나이에 배움의 학문에 열중 할 수 있도록 언제나 사랑과 관심으로 아낌 없이 지지해 준 가족에게 고마운 마음을 전합니다.