

화장품 보존제로 응용하기 위한 트로폴론이 담지된 키토산 나노입자의 제조 및 특성

홍용길 · 나재운[†] · 정경원^{*†}

순천대학교 공과대학 고분자공학과, *조선이공대학교 생명환경화공과
(2020년 3월 18일 접수, 2020년 4월 13일 수정, 2020년 4월 24일 채택)

Preparation and Characterization of Tropolone-encapsulated Chitosan Nanoparticle for Application as Cosmetic Preservatives

Woong-Gil Hong, Jae-Woon Nah[†], and Gyeong-Won Jeong^{*†}

Department of Polymer Science and Engineering, Suncheon National University, 255 Jungang-ro, Suncheon, Jeonnam 57922, Korea

*Department of Bioenvironmental & Chemical Engineering, Chosun College of Science and Technology, Gwangju 61453, Korea

(Received March 18, 2020; Revised April 13, 2020; Accepted April 24, 2020)

초록: 산업의 발달로 인해 생활수준이 향상됨에 따라 미용에 대한 관심이 급증하고 있다. 이러한 추세로 수많은 화장품 업계에서는 다기능성을 갖는 화장품을 개발하여 출시하고 있지만 그 중 수많은 제품들이 유통기한 및 제품의 변질과 부패로 인해 폐기 처분되어지고 있다. 현재 이러한 화장품 변성 또는 부패를 막기 위한 방법으로 트로폴론(tropolone) 보존제를 많이 사용하고 있으나 높은 비용과 과다 사용으로 인한 독성 유발로 인해 그 사용이 제한적이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 본 연구에서는 저분자량 수용성 키토산(LMWSC)에 소수성인 stearic acid (SA)를 가교제 EDC를 이용하여 LMWSC-g-SA(LMSA)를 합성하고, 이에 트로폴론을 LMSA에 담지(LMSAT)하여 서방성 약물 방출을 유도할 수 있는 화장품 보존제를 개발하였다. LMSA의 물리화학적 특성은 ¹H NMR, DLS, fluorophotometer 및 TEM을 통해 분석하였고, LMSAT로부터 트로폴론의 담지효율 및 방출 거동은 UV-vis spectrophotometer를 이용하여 확인하였으며, LMSA의 세포독성 여부는 MTT assay를 통해 평가하였다. 이러한 결과를 통해 제조된 LMSAT가 화장품 보존 첨가제로 사용했을 시 트로폴론의 효과를 극대화할 수 있는 매우 우수한 물질임을 제안한다.

Abstract: As the life's level has been improved due to the development of industry, attention to the beauty has been increased. Due to this trend, many cosmetic industries developed and launched multi-functional cosmetics, but many of them are disposed due to the expiration date, deterioration and corruption of the products. Currently, tropolone preservative has been used as a method to prevent the degeneration or corruption of cosmetics, but its utilization is limited due to high cost and toxicity caused by overuse. To solve these problems, LMWSC-g-SA (LMSA) in this study was synthesized by using hydrophobic stearic acid (SA) modified in low molecular weight water-soluble chitosan (LMWSC) with coupling agent EDC, and cosmetic preservative with the sustainable drug release was developed through encapsulation of tropolone in LMSA. Physicochemical properties of LMSA were analyzed by ¹H NMR, DLS, fluorophotometer and TEM. In addition, encapsulation efficiency and release behavior of tropolone were confirmed by UV-vis spectrophotometer. Moreover, cytotoxicity of LMSA was evaluated by MTT assay. Through these results, we suggest that LMSAT is very superb substance because this can induce the maximum effect of tropolone when was used to cosmetic preservative.

Keywords: cosmetic preservative, low molecular weight water-soluble chitosan, tropolone, sustainable drug release, nanoparticle.

서 론

화장품 산업은 정밀화학의 한 분야로 과거부터 현재에 이

르기까지 남녀노소 불문하고 대중적으로 많이 소비하고 있는 고부가 가치 산업으로 분류할 수 있다.¹ 산업의 발달로 인해 생활수준이 향상됨에 따라 미용에 대한 관심이 급증하고 있어 기본적인 보습 기능뿐만 아니라 미백, 주름개선, 자외선 차단 등 다양한 기능이 첨가된 기능성 화장품에 대한 관심이 증가하고 있다.^{1,2} 이러한 추세로 수많은 화장품 업계에서는 다기능성을 갖는 화장품을 개발하여 출시하고 있어 현재

[†]To whom correspondence should be addressed.
jwnah@sunchon.ac.kr, ORCID[®]0000-0002-6621-7857
gwjeong@cst.ac.kr, ORCID[®]0000-0002-7020-6050
©2020 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

화장품 시장이 포화될 정도로 크게 성장하였다. 하지만, 수많은 화장품이 출시되어 지고 있지만 그 중 수많은 제품들이 유통기한 및 제품의 변질과 부패로 인해 폐기 처분되어지고 있는 실정이다. 이는 화장품을 오랜 기간 동안 방치했을 시 수분 및 화장품 성분으로 인해 유익균 또는 미생물이 성장할 수 있으며, 이로 인해 화학작용 및 생분해가 일어나 성분의 변질과 부패를 유발하기 때문이다. 현재 이러한 화장품 변성 또는 부패를 막기 위한 방법으로 트로폴론(tropholone) 보존제를 많이 사용하고 있으나 높은 비용과 과다 사용으로 인한 독성 유발로 인해 그 사용이 제한적이다.³⁴

트로폴론(tropholone)은 7원자 고리계 방향족 화합물 중 하나로 자연에서 직접 얻을 수 없으나 β -thujaplicin, purpurogallin, colchicine, goupionone 등의 유사체로부터 개질을 통해 얻을 수 있으며, 항균, 항곰팡이, 항바이러스, 항생제 등에 효과가 우수한 것으로 알려져 있어 생물학적으로도 많이 응용되어지고 있는 물질이다.³⁸ 트로폴론은 화장품에 첨가되는 대표적인 보존제로서 미생물에 의한 제품 변질 및 부패 등을 방지하는 역할로 많이 사용되어지고 있다. 하지만, 트로폴론은 높은 비용 및 과다 사용으로 인한 독성을 유발할 수 있어 그 사용 양이 제한적이므로 보존제로서 그 기능이 한계가 있다는 단점을 갖고 있다.⁹⁻¹¹ 이러한 문제점을 해결하기 위해 본 연구에서는 트로폴론을 키토산 나노입자 내부에 담지하여 적은 양으로도 오랜 기간 동안 방출할 수 있는 서방성 화장품 보존제를 개발하여 자체 트로폴론의 단점을 개선하고자 한다.

키토산(chitosan)은 자연계에 존재하는 갑각류로부터 키틴을 탈 아세틸화하여 제조한 천연 다당류로써 D-glucosamine과 N-acetyl D-glucosamine 두 단위체로 구성되어 있다.^{12,13} 키토산은 항암, 항균, 콜레스테롤 저하 등 다양한 특성을 갖고 있으며, 낮은 독성, 생체적합성 및 생분해성이 우수하여 약물 및 유전자 전달체로 의학 분야에서 많이 응용되어지고 있는 물질이다.¹⁴ 의학 분야에 키토산을 적용하기 위해서 기존에 많은 연구자들은 키토산을 물에 대한 용해도를 향상시키고자 다양한 유기산을 salt화하여 사용했으나, 이는 유기산으로 인해 다양한 부작용을 유발할 수 있다는 문제점을 갖고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 본 연구에서는 유기산을 사용하지 않고 물에 용해할 수 있는 salt-removal 기법을 이용하여 이전 연구에서 개발된 저분자량 수용성 키토산(low molecular weight water-soluble chitosan, LMWSC)을 사용하였다.¹⁵ LMWSC는 낮은 독성, 생체적합성, 생분해성 및 물에 대한 용해도가 우수하여 화장품에 응용이 가능하다는 이점을 갖고 있다.

본 연구에서는 친수성 LMWSC에 소수성 물질을 화학적으로 개질하여 물에서 core-shell 형태의 자가조립이 가능한 나노입자를 제조하고, 이에 트로폴론을 내부에 담지하여 오랜 기간 동안 약물을 방출할 수 있는 서방성 화장품 보존제로서 사용 가능성을 평가하고자 한다.

실 험

시약 및 재료. 본 연구에서 사용된 저분자량 수용성 키토산(low molecular weight water-soluble chitosan, LMWSC, Mw: 10 kDa)은 (주)키토라이프(KITTOLIFE Co., Korea)에서 구매하여 사용하였으며, 소수성 지방산 stearic acid(SA)는 Yakyri Pure Chemicals Co. Ltd(Kyoto, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 보존제 트로폴론(tropholone, TP) 및 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride(EDC)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포독성에 사용된 human embryonic kidney cells(HEK293) 세포는 American type culture collection(ATCC, Korea)에서 분양받았으며, fetal bovin serum(FBS)은 Gibco(BRL, MD, USA) 및 Dulbecco's modified Eagles medium(DMEM)은 Roswell park memorial institute에서 각각 구매하여 세포배양에 사용하였다. 세포독성 실험에 사용된 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 및 3-3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약 및 용매는 일급 시약을 구입하여 정제하지 않고 사용하였다.

LMWSC-g-Stearic Acid(LMSA)의 합성. 트로폴론 보존제의 서방성 방출을 유도하기 위한 담지체는 가교제를 이용하여 아래와 같이 합성되었다. 저분자량 수용성 키토산(LMWSC) 100 mg을 100 mM MES buffer에 2 mL에 완전히 용해시킨 후 DMSO 18 mL를 첨가한 후 10분간 안정화하였다. DMSO에 완전히 용해된 stearic acid(SA) 수용액에 EDC 가교제를 넣고 30분간 교반하여 carboxyl group(-COOH)을 활성화한 후에 LMWSC 수용액을 천천히 넣어 주고 상온에서 4시간 동안 반응하였다. 반응조건은 SA를 LMWSC 양 대비 mole ratio 15%, 20%로 각각 반응하였다. 반응 종결 후에 미반응물을 제거하기 위해 아세톤을 이용하여 침전 및 3회 세척하였으며, molecular weight cutoff(MWCO) 3500 cellulose membrane을 이용하여 2일 동안 투석하였다. 이후 동결 건조를 통해 최종 물질 LMSA를 얻어 본 연구에 사용하였다.

LMSA의 구조분석. LMSA의 합성 유무는 핵자기 공명장치(¹H NMR, 400 MHz, Bruker, Germany)를 이용하여 분석하였다. SA는 DMSO, LMWSC 및 LMSA는 D₂O/DMSO (1/4, v/v) cosolvent에 각각 용해하여 1~10 ppm 범위에서 chemical shift를 확인하여 분석하였다.

트로폴론이 담지된 LMSA(LMSAT) 제조 및 담지 효율 확인. 트로폴론이 담지된 LMSA(LMSAT)는 evaporation 기법을 이용하여 제조하였으며, 그 실험방법은 다음과 같다. LMSA를 증류수 15 mL에 용해시킨 후에 tetrahydrofuran(THF) 50 mL를 LMSA 수용액에 첨가하여 10분간 교반한다. 트로폴론은 LMSA 양 대비 5% 무게비율로 THF 500 μ L에 용해한 후에 LMSA 수용액에 천천히 점적하여 1시간 교반하였다. 이

용액에서 evaporator를 이용하여 THF를 제거하고 MWCO 3500 cellulose membrane으로 하루 동안 투석한 후 동결 건조하여 최종물질 LMSAT를 얻었다.

LMSAT로부터 트로폴론의 담지 효율은 자외선 분광계(UV-Vis spectrometer, UV-1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 계산하였으며, 그 실험 방법은 다음과 같다. LMSAT를 2 mg를 0.1% Trifluoroacetic acid(TFA) 200 μ L에 완전히 용해 한 후 DMSO 1.8 mL를 첨가하여 24시간 동안 shaking하였다. 이 용액을 ultra filtration membrane를 이용하여 트로폴론 수용액을 얻었으며, 이를 자외선 분광계를 통해 최대 흡수 파장인 320 nm에서 흡광도를 확인하여 담지 효율을 식 (1), (2)에 의해 계산하였다.

$$\text{Drug content(DC)\%} = \frac{\text{Total weight of the tropolone from LMSAT}}{\text{Weight of the feeding LMSA and tropolone}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Encapsulation efficiency(EE)\%} = \frac{\text{Total weight of the tropolone from LMSAT}}{\text{Weight of the feeding tropolone}} \times 100 \quad (2)$$

LMSA 및 LMSAT 나노입자 제조 및 특성 분석. LMSA 및 LMSAT 나노입자는 MWCO 3500 cellulose membrane을 이용한 투석법에 의해 제조하였으며, 제조된 LMSA 또는 LMSAT 나노입자의 입자크기, 임계응집농도(critical aggregation concentration, CAC) 및 형태학적 이미지 특성 분석은 아래와 같이 수행하였다.

LMSA는 SA에 의한 소수성 특성과 LMWSC에 의한 친수성 특성을 갖고 있어 수용액에서 자가 응집에 의한 core-shell 입자를 형성하게 된다. 따라서 입자형성이 가능한 최소 농도 CAC를 다음의 방법으로 측정하였다. Pyrene을 아세톤에 6×10^{-5} M이 되도록 용해시킨 후 증류수를 첨가하여 최종농도가 1.2×10^{-6} M이 되도록 한다. 이 용액을 40 °C에서 2시간 동안 감압 하에서 아세톤을 제거한 후에 pyrene 용액과 다양한 농도의 나노입자의 용액(3.0×10^{-5} ~2 mg/mL)을 혼합하여 pyrene의 최종 농도가 6.0×10^{-7} M이 되도록 하였다. 이 용액을 60 °C에서 3시간 동안 암실에서 교반 후 광학적 거동을 형광광도계(RF-5301PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 파장 350~460 nm 범위에서 발광 특성을 관찰하였다. 농도에 따른 특정 파장(I_1 과 I_3)에서 강도의 비(I_1/I_3)를 이용하여 CAC를 결정하였다.

LMSA 및 LMSAT의 입자크기는 동적광산란(dynamic light scattering, DLS) 장비를 이용해서 측정하였고, DLS는 ELS-8000 electro phoretic LS spectrophotometer(Otsuka Electronics Co., Japan)를 사용했다. 동적광산란장치를 이용하여 입자의 크기 및 분포를 측정하였으며, 이때 제조되어진 LMSA 및 LMSAT를 각각 2 mg/mL의 농도의 수용액으로 제조하였다.

LMSA 및 LMSAT의 형태학적 분석은 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM, Hitachi, H-7500)을 이용하여 다음과 같이 확인하였다. LMSA 및 LMSAT 각각 1 mg을 에탄올 1 mL에 분산시킨 후에 copper carbon grid에 올려놓고 상온에서 완전히 건조하였다. 이를 3% uranyl acetate에 15분간 염색한 후 24시간 동안 건조하여 TEM를 통해 이미지를 관찰하였다.

LMSAT의 방출 거동 확인. LMSAT로부터 트로폴론의 방출 거동은 자외선 분광계(UV-Vis spectrometer, UV-1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 확인하였다. LMSAT 4 mg을 1 mL의 pH5.5 및 7.4 PBS buffer에 각각 용해하여 MWCO 1000 cellulose membrane에 넣은 후 37 °C에서 140 rpm으로 교반하였다. 시간에 따른(0.5~126시간) 방출된 용액 각각 2 mL를 취하여 자외선 분광계를 통해 320 nm에서 흡광도를 측정하여 누적 방출량을 백분율로 계산하였다.

세포 독성 여부 확인. 제조된 LMSA의 독성 여부를 확인하기 위해 HEK293 정상 세포에서 MTT assay를 수행하였다. HEK293 세포는 FBS 10%가 함유된 DMEM 배지 상태에서 CO₂ 농도가 5%이며 온도가 37 °C incubator에서 배양하였다. 세포 seeding은 96 well plate에 5×10^3 cell/well 농도로 하여, 하루 동안 incubator에서 배양하였으며, 배양된 세포에 1, 0.5, 0.25, 0.13, 0.063, 0.031 mg/mL 농도로 제조된 LMSA 용액을 각각 첨가하여 2일 후 MTT를 처리하였다. 최종적으로 MTT를 제거한 후 DMSO 200 μ L를 처리하여 560 nm와 670 nm 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다. 세포생존율은 식 (3), (4)에 의해 계산되었다.

$$\text{(OD value} = \text{OD 560 nm} - \text{OD 670 nm)} \quad (3)$$

$$\text{Cell viability(\%)} = \frac{\text{OD sample} - \text{OD blank}}{\text{OD control} - \text{OD blank}} \times 100 \quad (4)$$

결과 및 토론

LMSA의 합성 및 구조적 특성 분석. 화장품의 변성과 부패를 방지하기 위해 첨가되는 트로폴론은 높은 비용과 과다 사용으로 인한 독성을 유발할 수 있는 문제점을 갖고 있기 때문에 그 사용 양은 매우 제한적이다. 본 연구에서는 이러한 트로폴론의 단점을 개선하기 위해 core-shell 형태의 자가 조립 나노입자를 개발하여 core 내부에 트로폴론을 담지함으로써 적은 양으로 그 효과를 극대화시키고자 하였다. Core-shell 형태의 나노입자를 제조하기 위해 친수성 특성을 갖는 LMWSC에 소수성 물질인 SA를 가교제 EDC를 이용하여 합성하였다. SA의 carboxyl group(-COOH)을 가교제 EDC를 이용하여 활성화시키고, 이를 LMWSC의 amine group(-NH₂)에 도입하여 최종적으로 LMWSC-g-SA(LMSA)를 합성하였다(Figure 1).

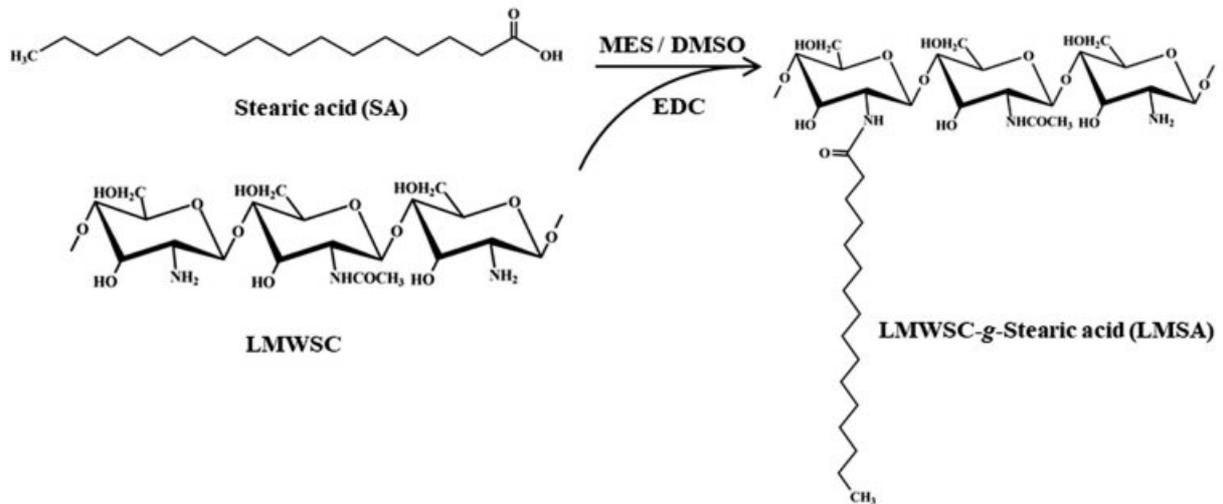


Figure 1. Synthesis scheme of LMSA using coupling agent EDC.

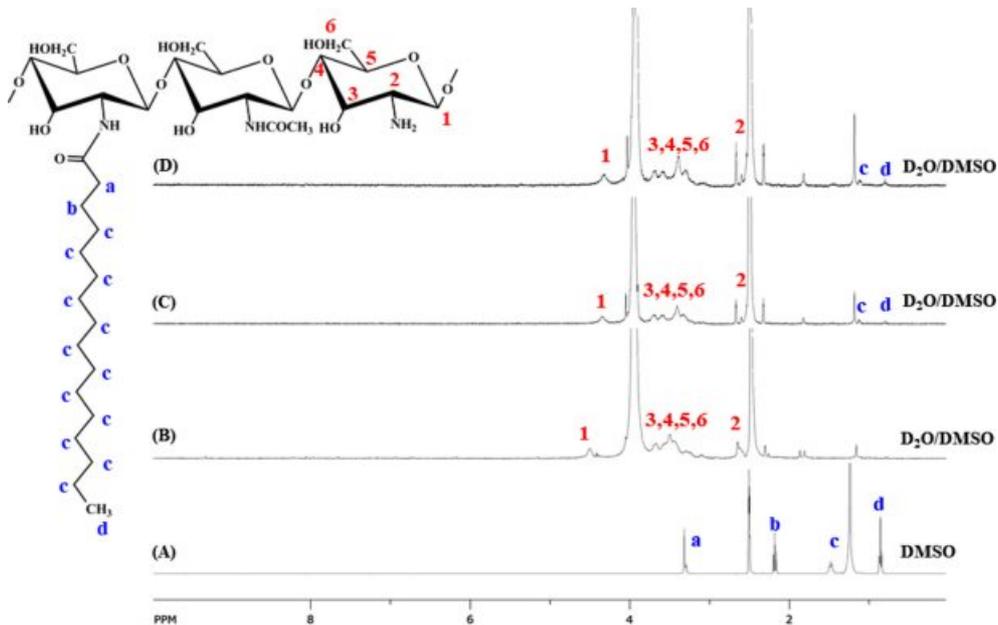


Figure 2. ^1H NMR spectra of LMSA: (A) SA; (B) LMWSC; (C) LMSA 15%; (D) LMSA 20%.

Figure 2는 LMSA의 합성 유무를 확인하기 위해 핵자기 공명 장치(^1H NMR, 400 MHz, Bruker, Germany)를 이용하여 구조적 특성을 분석한 결과이다. SA는 0.8~0.9 ppm에서 $-\text{CH}_3$ 의 수소 피크 및 1.25~2.2 ppm에서 $-\text{CH}_2$ 의 수소 피크들을 각각 확인할 수 있으며, LMWSC는 1번 탄소 위치의 수소 피크는 4.7 ppm, 2번 탄소 위치의 수소 피크는 2.6 ppm, 3번~6번 탄소 위치의 수소 피크는 3.2~3.8 ppm, 그리고 키토산 구조 내의 키틴의 아세틸 그룹에 의한 특성 피크를 1.9 ppm에서 각각 확인할 수 있었다. 최종 합성 물질인 LMSA에서 LMWSC의 특성 피크와 SA의 특성 피크가 모두 관찰됨으로

서 성공적으로 합성되었음을 확인하였다.

LMSA 및 LMSAT 나노입자의 특성 분석. LMSA 및 LMSAT 나노입자는 투석법에 의해 제조되었으며, 다양한 분석 방법으로 그 특성을 조사하였다. LMSA 나노입자는 친수성인 LMWSC에 소수성인 SA가 결합되어 있는 양친매성 구조를 나타낸다. 이는 수용액 상에서 자가 조립에 의한 core-shell 형태의 입자를 형성하게 된다. 본 연구에서는 이러한 SA 결합 비율에 따라서 LMSA 15%, 20% 각각 두 종류의 약물 담지체를 합성하여 입자형성 최소농도를 확인하기 위해 형광 분광계를 통해 분석하였다. 그 결과 LMWSC에 SA의 결합

Table 1. Characteristic Analysis of LMSA and LMSAT Nanoparticle

Sample	Particle size (nm)	CAC (mg/mL)	DC ^a	EE ^b
LMSA 15%	204±41.08	0.0893	-	-
LMSA 20%	178±9.69	0.0657	-	-
LMSAT 15%	246±8.41	-	3.83%	68.8%
LMSAT 20%	369±9.75	-	4.48%	89.6%

^aDC: Drug content. ^bEE: Encapsulation efficiency.

비율이 15%일 경우에는 0.0893 mg/mL, 20%일 경우에는 0.0657 mg/mL의 CAC 값을 나타냈으며, 이는 SA의 결합 비율이 20%의 경우에 더 적은 농도의 CAC 값을 확인할 수 있었다(Table 1, Figure 3). 또한 LMSA 및 LMSAT의 입자형성 시 그 형태와 크기를 확인하기 위해 TEM과 DLS을 수행한

결과 LMSA 및 LMSAT 모두 구형의 나노입자(Figure 4(B))와 unimodal한 입자분포를 확인할 수 있었으며, LMSA 15%의 경우 204±41.08 nm, LMSA 20%의 경우 178±9.69 nm로 SA가 20% 결합되어 있을 경우에 입자크기가 더 작은 것을 확인할 수 있었다(Table 1, Figure 4(A)). 이러한 CAC와 입자크기 결과를 보여주는 이유는 LMSA 20%인 경우에 SA가 더 많이 결합되어 있어 core 내부에 강한 소수성 작용으로 인해 소수성 밀도가 증가했기 때문인 것으로 사료된다. 또한 트로폴론이 담지된 LMSA(LMSAT)의 경우에 LMSA보다 입자크기가 상대적으로 증가하는 것을 확인할 수 있는데(Table 1, Figure 4(A)) 이는 트로폴론 약물이 LMSA의 core 부분에 과다 담지됨에 따라 LMSA 내부 core의 소수성 밀도가 감소했기 때문인 것으로 사료된다. 이러한 LMSA 나노입자의 다양한 특성 분석을 통해 트로폴론 담지체로 활용 가능할 뿐만 아니라 더 나아가 의약학 분야의 약물 전달체로 응용 가능함을 확인하였다.

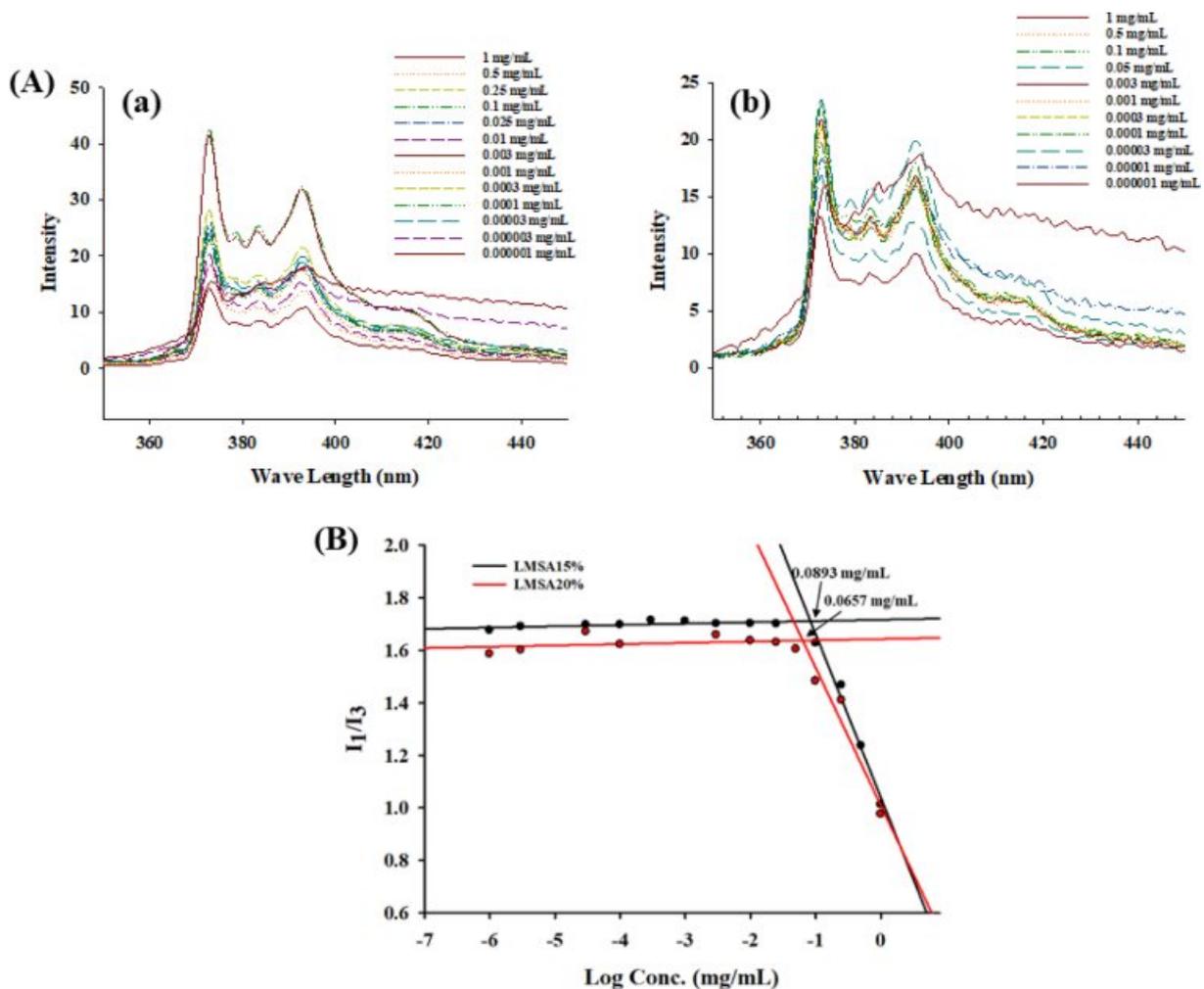


Figure 3. (A) Pyrene emission ([Py] = 6.0×10^{-7} M) spectra in aqueous solutions (excitation wavelength 339 nm) of (a) LMSA 15%; (b) LMSA 20%. (B) Intensity ratio (I_1/I_3) from pyrene emission spectra as a function of LMSA concentration in distilled water (DW).

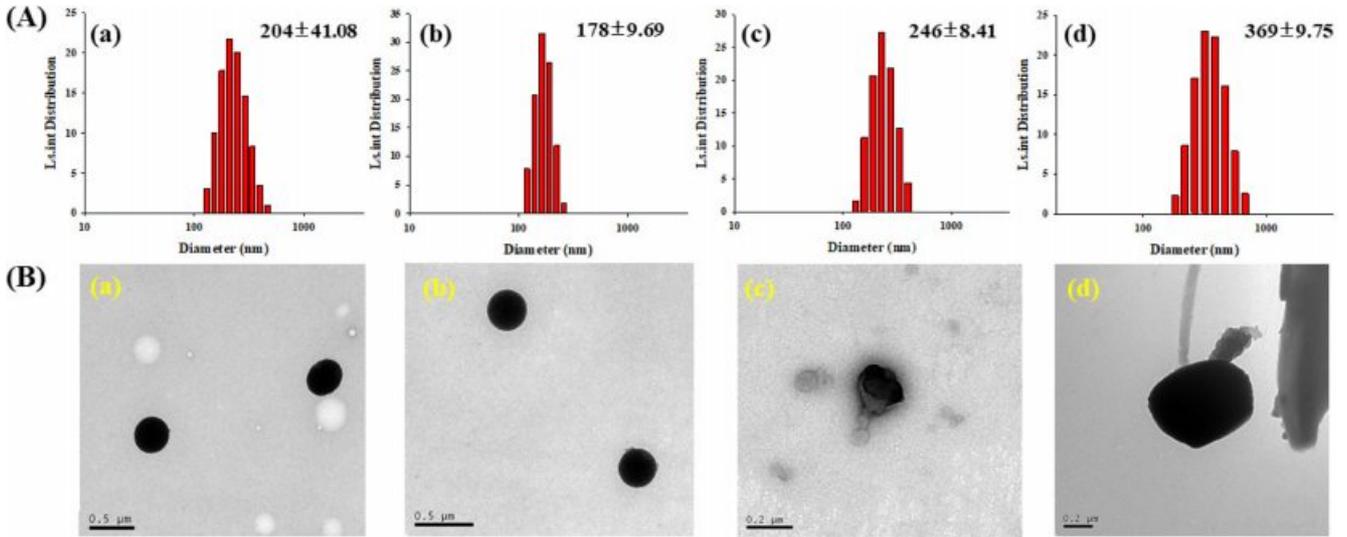


Figure 4. (A) Particle size distribution; (B) morphological image of LMSA and LMSAT. (a) LMSA 15%; (b) LMSA 20%; (c) LMSAT 15%; (d) LMSAT 20%.

LMSAT로부터 트로폴론의 담지효율 및 방출 거동 분석.

화장품 보존 첨가제로 사용되는 트로폴론의 그 기능성을 극대화하기 위해 LMSA 나노입자 core 내부에 트로폴론을 투석법에 의해 담지하였다. 소수성 SA의 결합 비율에 따라 트로폴론 담지효율은 Table 1에 요약하였다. 그 결과 1 mg당 담지효율인 DC는 3.83%(LMSAT 15%)와 4.48%(LMSAT 20%)로 각각 나타났으며, 총 트로폴론 담지효율인 EE는 68.8%(LMSAT 15%), 89.6%(LMSAT 20%)로 높은 담지효율을 확인하였다. 이러한 결과를 보이는 이유는 소수성 SA가 더 많이 결합된 LMSAT 20%의 경우 core 내부에 강한 소수성 작용으로 인한 높은 소수성 밀도가 형성되어 트로폴론 약물을 더 많이 담지한 것으로 사료된다. 또한 LMSAT로부터 트로폴론의 약물 방출 거동을 pH 변화에 따라 확인한 결과 pH 7.4의 경우 LMSAT 15%는 약 130시간 동안 트로폴론 총 누적 방출량이 25.2%, LMSAT 20%는 13.8%의 방출량을 각각 보여줬다. pH 5.5의 경우 LMSAT 15%의 트로폴론 총 누적 방출량은 30.3%, LMSAT 20%는 18.9%의 방출량을 각각 나타냈다(Figure 5). LMSAT 20%의 경우에 LMSAT 15% 보다 방출량이 상대적으로 더 적은 것을 확인할 수 있는데, 이는 소수성 SA가 LMSAT 20%에 더 많이 결합되어 있어 core 내부의 강한 소수성 밀도로 인해 트로폴론 약물이 좀 더 천천히 방출되는 것으로 사료된다. 또한 pH 7.4보다 pH 5.5에서 트로폴론 방출량이 더 많은 것을 확인할 수 있는데, 이는 LMWSC의 pKa가 5.5~6.4로 약산성 환경일 경우 키토산 아민(-NH₂) 그룹이 protonation되어 -NH₃⁺로 전환되면서 전하 반발력이 유도되어 더 많은 양의 트로폴론이 방출된 것으로 사료된다. 이러한 담지효율과 방출 거동 결과를 통해 LMSAT를 화장품 보존제로 사용했을 시 트로폴론을 장기간 방출할

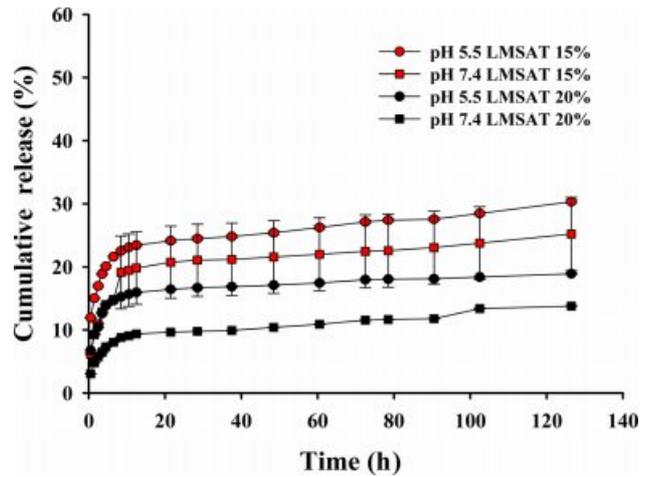


Figure 5. Cumulative release profile of tropolone from LMSAT according to pH at each time point (0.5~130 h).

수 있어 트로폴론 자체의 문제점을 개선하여 보존 기간을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

LMSA의 세포 독성 평가. LMSAT를 화장품 보존 첨가제로 사용하기 위해서는 트로폴론 담지체인 LMSA의 독성 여부가 매우 중요하다. 이러한 이유로 LMSA의 독성 여부는 HEK293 정상 세포를 이용하여 MTT assay를 통해 평가하였다. 그 결과 LMWSC, LMSA 15% 및 LMSA 20% 모두 가장 높은 농도인 1 mg/mL에서 70% 이상의 세포 생존율을 나타냄에 따라 독성이 거의 없음을 확인하였다(Figure 6). 이러한 세포독성 결과를 통해 LMSA는 인체에 무해한 물질임을 확인함과 동시에 LMSAT를 화장품 보존 첨가제로 사용할 시에 트로폴론의 효과를 극대화할 수 있을 것으로 사료된다.

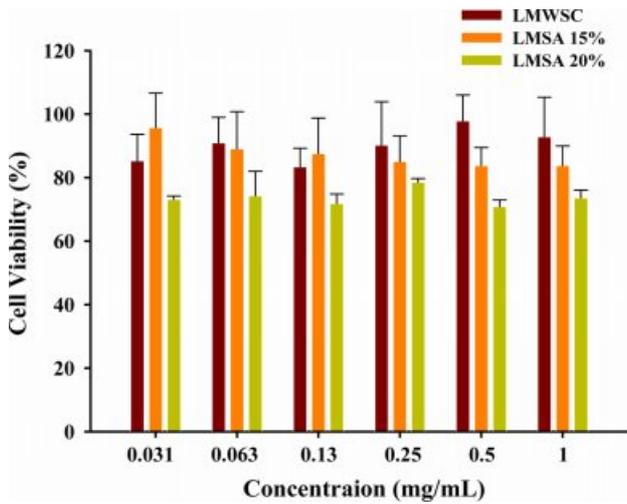


Figure 6. Cytotoxicity evaluation of LMWSC and LMSA using MTT assay at HEK293 cell line.

결론

본 연구는 화장품 보존 첨가제로 사용되는 트로폴론의 문제점을 개선하고자 LMSA를 가교제 EDC를 이용하여 합성하였고, 이에 트로폴론을 내부에 담지하여 서방성 화장품 보존제를 개발하고자 하였다. LMSA의 합성 유무는 ¹H NMR을 통해 성공적으로 합성되었음을 확인하였다. 또한 LMSA 나노입자의 CAC, 입자크기 및 형태학적 이미지 등 물리화학적 특성을 분석함으로써 트로폴론 담지체로 활용 가능성을 입증하였으며, LMSA의 트로폴론 담지효율 및 방출 거동 분석을 통해 서방성 화장품 보존제로 사용가능성을 규명하였다. 더 나아가 MTT assay를 통해 LMSA의 세포독성 평가를 수행한 결과 세포독성이 거의 없는 인체에 무해한 물질임을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 LMSA는 인체에 안전한 물질임과 동시에 트로폴론의 서방성 방출이 가능하여 화장품 보존 첨가제로 사용이 가능한 매우 우수한 물질임을 확인하였다.

참고 문헌

1. S. Z. Mousavi, S. Nafisi, and H. I. Maibach, *Nanomedicine*, **13**, 1071 (2017).
2. F. Casanova and L. Santos, *J Microencapsul.*, **33**, 1 (2016).
3. K.G. Kim, I. S. Kang, J. A. Ryu, D. R. Ha, E. S. Kim, and J. J. Seo, *J. Kor. Soc. Esthe & Cosm.*, **8**, 39 (2013).
4. G. Schmaus, H. Franke, and R. Pillal, *Res. Discl.*, **512**, 1558 (2006).
5. S. Miwa, E. Kihira, A. Yoshioka, K. Nakasone, S. Okamoto, M. Hatano, M. Igarashi, Y. Eguchi, A. Kato, N. Ichikawa, M. Sekine, N. Fujita, Y. Kanesaki, H. Yoshikawa, and R. Utsumi, *J. Bacteriol.*, **198**, 1604 (2016).
6. Y. Morita, E. Matsumura, T. Okabe, M. Shibata, M. Sugiura, T. Ohe, H. Tsujibo, N. Ishida, and Y. Inamori, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1487 (2003).
7. Y. Yan, Y. T. Ma, J. Yang, G. P. Horsman, D. Luo, X. Ji, and S. X. Huang, *Org. Lett.*, **18**, 1254 (2016).
8. M. Koufaki, E. Theodorou, X. Alexi, F. Nikoloudaki, and M. N. Alexis, *Eur. J. Med. Chem.*, **45**, 1107 (2010).
9. T. Kurihara, H. Mine, Y. Satoh, H. Wakabayashi, N. Motohashi, and H. Sakagami, *In Vivo*, **20**, 391 (2006).
10. Y. Kadoma, M. Ishihara, I. Yokoe, and S. Fujisawa, *In Vivo*, **21**, 481 (2007).
11. C. H. Huang, S. H. Lu, C. C. Chang, P. Thomas, J. Thanasekaran, and J. R. Sheu, *Eur. J. Pharmacol.*, **746**, 148 (2015).
12. G. W. Jeong and J. W. Nah, *Carbohydr. Polym.*, **178**, 165 (2015).
13. M. K. Yoo, S. K. Kang, J. H. Choi, I. K. Park, H. S. Na, H. C. Lee, E. B. Kim, N. K. Lee, J. W. Nah, Y. J. Choi, and C. S. Cho, *Biomaterials*, **31**, 7738 (2010).
14. G. W. Jeong, W. G. Hong, J. H. Anh, Y. J. Jeon, S. S. Choi, T. I. Son, S. C. Kim, Y. I. Jeong, and J. W. Nah, *J. Ind. Eng. Chem.*, **70**, 136 (2019).
15. M. K. Jang, Y. I. Jeong, C. S. Cho, S. H. Yang, Y. E. Kang, and J. W. Nah, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **23**, 914 (2002).