

피부 흡수 증진을 위한 담쟁이덩굴 줄기 추출물 함유 나노에멀전의 항균활성 연구

조나래, 박민아, 전소하, 박수남*

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소

Received : February 1, 2013 / Revised : June 5, 2013 / Accepted : July 12, 2013

Nano-emulsion Containing *Parthenocissus tricuspidata* Stem Extracts for Enhanced Skin Permeation and the Antibacterial Activity of the Extracts. Jo, Na Rae, Min A Park, So Ha Jeon, and Soo Nam Park*. *Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea*

In a previous study, we investigated the antioxidative and cellular protective effects of *Parthenocissus tricuspidata* stem extracts. In this study, we prepared nano-emulsion containing *P. tricuspidata* stem extract to improve skin permeation. The particle size of the nano-emulsion using the microfluidizer was 302 nm. Its loading efficiency was over 86%. The size distribution of the nano-emulsion took a monodispersed form and the nano-emulsion was more stable than typical emulsion without using microfluidizer during a 2 week period. *In vitro* skin permeation study of nano-emulsion containing *P. tricuspidata* stem extracts was carried out using Franz diffusion cell. The 1,3-butylene glycol used as a control group had 32.59% skin permeation efficiency. The skin permeation efficiency of the nano-emulsion was 42.47%. Also, we observed the antibacterial activity of the ethyl acetate fraction on skin flora for prospective applications as a natural antimicrobial. The ethyl acetate fraction had antibacterial activities higher than methyl paraben on *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis*. These results indicate that nano-emulsion containing *P. tricuspidata* stem extracts could possess valued applications in cosmetic formulations for improving skin permeation. Also, based on the antibacterial activities on skin flora, antioxidative and cellular protective effects shown in our previous study, we suggest that *P. tricuspidata* stem extracts could be used as functional cosmetic materials.

Keywords: *Parthenocissus tricuspidata* stem extracts, antibacterial activity, nano-emulsion, skin permeation

서론

피부는 인체의 최외각층에 존재하는 기관으로 자외선에 노출이 쉽고 항상 산소에 노출되어 있기 때문에 활성산소종의 생성 위험이 높으며, 이로 인해 피부노화가 진행될 수 있다. 따라서 피부노화의 예방을 위해서는 적절한 항산화제의 공급이 필요하다. 그러나 피부의 최각층에는 표피층이 존재하며 이의 가장 바깥쪽에는 각질층으로 알려진 피부장벽이 존재한다. 이는 외부의 자극으로부터 피부 및 신체를 보호하는 중요한 역할을 하는 반면 활성 성분의 피부흡수에 있어 장애요인으로 작용한다. 따라서 피부노화의 지연 및 방지를 위한 효율적인 방안으로써 항산화제를 효과적으로 피부에 침

투시키기 위한 방안이 필요하다[7].

에멀전이란 미세한 액체 방울이 연속상인 액체 매질에 부산되어 있는 계를 뜻한다. 에멀전은 열역학적으로 불안정하기 때문에 안정성을 증가시키기 위한 기술에 관심이 증가되고 있다[26]. 나노에멀전은 일반적으로 입자가 100~500 nm의 크기를 갖는 에멀전의 한 종류로 miniemulsions [18], ultrafine emulsions, emulsoids [4], submicron emulsions [28]으로 불리기도 한다. 나노에멀전은 일반적인 에멀전과 달리 입자들 사이의 응집 현상이나 합일현상이 없기 때문에 낮은 점도 조건에서도 장기간 안정하다[5, 24]. 또한 나노에멀전은 입자 크기의 특성으로 투명 또는 반투명으로 보이며 일반 에멀전에 비해 활성성분의 높은 경피 흡수를 나타내어 화장품 분야에서 다양하게 연구되고 있다[1, 2, 13, 16, 20, 21].

나노에멀전은 비 평형 상태에 존재하기 때문에 자발적으로 형성되지 않는다. 따라서 에너지가 필요하게 되며, 제조법은 저에너지법(low-energy methods)과 고에너지법(highenergy

*Corresponding author

Tel: +82-2-970-6451, Fax: +82-2-972-9585

E-mail: snpark@seoultech.ac.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

methods)로 나눌 수 있다[20]. 저에너지법은 상전이를 이용하는 방법으로 구성성분은 일정하게 유지시키고 온도를 변화시키는 phase inversion temperature (PIT)법과[17] 온도는 일정하게 유지시키면서 구성성분을 변화시키는 emulsion inversion point (EIP)법이 있다[19]. 고에너지법은 high-shear stirring, high-pressure homogenizers와 ultrasound generator 등을 사용한다[22]. 이 방법은 nm~ μ m의 다양한 크기의 에멀전을 얻을 수 있고 단시간에 효과적인 에너지를 가함으로써 나노에멀전을 제조할 수 있기 때문에 산업적으로 널리 이용되어 왔다.

저자들은 이전 연구에서 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 에틸아세테이트 분획의 우수한 항산화능 및 세포보호 효과를 확인하였다[8]. 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 에틸아세테이트 분획은 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 각종 활성산소 ($O_2^{\cdot-}$, OH, H_2O_2)을 매우 효과적으로 소거하였다. 또한 피부노화를 유발하는 활성산소종인 H_2O_2 및 1O_2 으로 유도된 HaCaT 세포의 손상과 1O_2 으로 유도된 사람 적혈구 세포의 용혈현상에 대해 우수한 세포보호 효과를 나타내었다. 따라서 본 논문에서는 피부노화의 예방을 위한 천연 항산화제로써 담쟁이덩굴(*Parthenocissus tricuspidata* (sieb.et Zucc.) Planch.)의 줄기 추출물을 선택하고 이를 담지한 나노에멀전을 제조하였다.

피부는 인체의 최외각층에 존재하며 외부로부터 인체를 보호하는 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 다양한 피부 상재균에 의해 많은 피부질환들이 발생할 수 있다[6]. 피부 상재균으로는 대표적으로 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes* 및 *Pityrosporum ovale* 등이 있다. *P. acnes*는 호기성 피부상재균으로서 염증의 일차적인 원인은 아니지만, 피지를 분해하고 유리 지방산을 형성하여 염증을 진전시키며 염증 발생 부위를 확장시켜 여드름이 악화되는데 영향을 주는 것으로 알려져 있다[15, 27, 11]. *P. ovale*은 두피에 존재하는 정상균총의 한 종류로 환경적, 생리적 요인에 의해 과다 증식하면 지방산과 과산화지질이 생성되며 이것이 두피를 자극하고 표피세포를 증가시켜 비듬, 지루성 피부염 등의 피부 질환을 유발한다. *S. aureus*는 식중독 유발균이며 그람양성의 통성혐기성 세균으로 사람의 피부와 비강 표면에 일반적으로 존재한다. 또한 급성 습진 병변이 있는 환자의 100%, 만성 병변이 있는 환자의 90%에서 발견되었으며, 아토피 피부염 환자의 65%는 병변이 없는 정상 피부부위에서도 *S. aureus*가 발견되었다고 보고되어 있다[10, 23]. 이 외에도 잘 알려진 피부 상재균으로 그람 양성세균인 *B. subtilis* 등이 있으며, 그람 음성 세균으로는 *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*가 있다. 이와 같은 피부상재균 및 기타 세균에 의한 피부질환의 유발을 막고, 피부를 보호하기 위하여 화장품에 이용되는 향균제는 필수적이다. 그러나 기

존에 사용되고 있는 합성물질들은 피부 자극 및 안정성에 대한 문제가 대두되고 있어 인체에 자극이 적은 천연 향균제에 대한 관심이 증가되고 있다[9, 15].

본 연구에서는 우수한 항산화 활성 및 세포보호 효과를 갖는 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 에틸아세테이트 분획을 효과적으로 피부로 흡수시키기 위하여 이를 함유한 나노에멀전을 제조하고 이의 물리적 특성 및 피부흡수능을 평가하였다. 또한 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 천연 향균제로서의 응용가능성을 평가하고자 피부 상재균에 대한 항균활성을 조사하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약

피부 투과 실험에 9 mm Franz diffusion cell (receptor volume 5 ml)과 V6A Stirrer 모델(PermeGear Inc., USA)을 사용하였다. 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 정량 분석에 사용한 UV-visible spectrophotometer (Varian, Australia)는 Cary 50 모델을 사용하였고 에멀전의 나노화를 위한 microfluidizer는 microfluidizer (Microfluidics, USA)는 Microfluidizer Processor M110EH-30을 사용하였다.

나노에멀전은 스테아르산(stearic acid, SA, USA), 세틸알코올(cetyl alcohol, CA, USA), 미네랄 오일(mineral oil, MO, USA), 카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드(caprylic/capric triglyceride, CCT)를 사용하여 제조하였고 (Sigma, USA), polyoxyethylene hydrogenated castor oil (HCO-60) 또한 구입하여 사용하였다(Nikkol, Japan). 실험에서 사용된 물은 Millipore Q (Millipore Co., USA)를 이용한 3차 증류수(DW)를 사용하였다. 에탄올(EtOH), 핵산, 에틸아세테이트(EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 본 실험에 사용한 담쟁이덩굴은 2011년 10월 경 강원도 홍천군 서석면 생곡리에서 채취하여 양건 후 세절하여 사용하였다.

담쟁이덩굴 줄기의 분획 및 추출

건조된 담쟁이덩굴 줄기 100 g을 잘게 자른 후 50% 에탄올 1 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50% 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 물과 핵산을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 에틸아세테이트 분획을 감압농축하여 파우더를 얻었다.

담쟁이덩굴 줄기 추출물을 함유한 나노에멀전 제조

0.1 (w/w) % 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 에틸아세테이트 분획을 함유한 나노에멀전은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 오일상, 에탄올상 그리고 수상의 구성 성분과 조성을

Table 1에 나타내었다. 오일상은 stearic acid, cetyl alcohol, caprylic capric triglyceride, mineral oil, polyoxyethylene hydrogenated castor oil (HCO-60)로 구성되며 이들을 비이커에 넣은 후 75°C에서 균일하게 용해시킨다. 에탄올상인 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 에틸아세테이트 분획과 에탄올은 비이커에 넣고 완전히 용해시킨다. 에탄올 상을 75°C로 유지한 후 이를 오일상에 넣고 빠르게 섞어서 분산상을 제조한다. 분산상을 연속상인 증류수에 넣고 균질기(X1030D, Germany)을 이용하여 3000 rpm으로 3 min 동안 교반하였다. 제조한 O/W 에멀전을 60°C까지 냉각한 후 고압유화 장치인 microfluidizer를 이용하여 나노화하였다. Microfluidizer의 reservoir에 에멀전 250 ml를 넣은 후 700 bar의 압력 조건과 5 cycle의 순환 조건으로 0.1% 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 에틸아세테이트 분획 함유 나노에멀전을 제조하였다. 제조된 나노에멀전은 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 보관하였다.

담쟁이덩굴 줄기 추출물을 함유한 나노에멀전의 물리적 성질

나노에멀전의 입자 크기 및 입도 분포: 나노에멀전의 입자 크기 및 입도 분포는 빛의 산란을 이용하여 입자 크기를 분석하는 Otsuka ELS-Z series (Otsuka Electronics, Japan)를 이용하여 측정하였다. 시료는 전처리 과정 없이 에멀전 원상태로 측정하였다. 측정 산란각은 165° 이며 Ar 레이저를 광원으로 사용하였다. 평균 입자 및 입도 분포는 70 번씩 2회 측정한 후 누적분석법과 Contin법으로 해석하여 나타내었다.

나노에멀전의 포집효율 측정: 0.1% 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 에틸아세테이트 분획을 함유한 나노에멀전의 포집효율은 다음과 같이 평가하였다. 에탄올에 용해한 담쟁이덩굴 줄기 추출물은 280 nm에서 최대 흡수를 나타낸다. 담쟁이덩굴 줄기 추출물 함유 나노에멀전 1 g을 취하여 에탄올로 추출하여 여과하고 그 여액의 흡광도를 280 nm에서 UV-visible spectrophotometer로 측정한 후 동일 농도의 담쟁이덩굴 줄기 추출물을 녹인 에탄올 용액과 비교하였다.

Franz Diffusion Cell을 이용한 나노에멀전의 경표피 투과 실험

Franz diffusion cell을 이용하여 피부 투과 실험을 진행하였다. 피부 투과 실험에 사용한 쥐의 피부는 경추탈골로 치사시킨 ICR outbred albino mice (8주령, 암컷)의 등에서 적출하여 사용하였다. 적출한 피부는 피하지방과 조직을 제거한 후 사용하였다. Receptor chamber에 receptor phase (HCO-60: Ethanol: PBS=2:20:78 (w/w/w %)) 5 ml를 채운 후 각질층이 위로 향하도록 donor와 receptor phase 사이에 피부를 고정시켰다. 실험이 진행되는 동안 항온수조를 이용해 온도를 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하였다. 각 시료 0.2 ml를 donor

를 통하여 피부 표면에 가한 후 시간에 따라 매 회 0.5 ml의 receptor phase를 sampling port를 통하여 채취하였다. 채취 직후 동량의 receptor phase를 receptor chamber에 보충하였다. 채취한 시료 속 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 양은 최대 흡수 파장(280 nm)에서의 흡광도를 이용하여 정량하였다. 24 h 후 각질층과 피부에 남아있는 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 양을 측정하기 위해 쥐의 피부를 PBS로 3회에 걸쳐 세척하였다. 세척 후 receptor phase와 닿지 않은 부분을 잘라내고 남은 부분에 대해 tape stripping 법을 이용해 각질층에 남아있는 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 양을 따로 측정하였다. 각질층에 남아있는 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 양을 측정하기 위해 테이프를 이용하여 피부의 각질층 부분을 3회 벗겨내었으며 이렇게 얻어진 테이프에 10 ml의 에탄올을 넣고 1 h 동안 초음파 세척기를 이용하여 담쟁이덩굴 줄기 추출물을 추출하였다. 그 후 회전 증발기를 이용하여 에탄올을 증발시키고 추출된 담쟁이덩굴 줄기 추출물을 0.5 ml의 receptor phase에 녹여내었다. Tape stripping법을 거친 후 각질층이 제거된 피부는 수술용 가위를 이용해 세척하였고 세척한 피부의 처리는 Tape와 동일하게 진행하였다. 이렇게 얻어진 시료 속 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 양은 흡광도를 이용하여 측정하였다.

담쟁이덩굴 줄기 추출물의 항균활성 측정

사용균주: 본 실험에 사용된 균주는 피부상재균으로서 여드름의 원인균인 *P. acnes* ATCC6919와 비듬균인 *P. ovale* ATCC12078, 호기성 Gram (+) 균주인 *S. aureus* ATCC6538, *B. subtilis* ATCC19659, 호기성 Gram (-) 균주인 *E. coli* ATCC23736를 한국 미생물 보존센터(KCCM)에서 분양받아 사용하였다.

배지 및 배양조건: *P. acnes*의 배양 배지는 Reinforced clostridial (RC) 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 *P. acnes*는 4°C 에서 보관하면서 실험 72시간 전에 활성화 시켰으며, 균을 배양 배지에 접종한 후 anaerobic jar에서 Gaspak system (Merck Anaerocult® Gaspak system, Germany)을 사용하여 밀봉하여 37°C 에서 72시간 동안 혐기성 배양하였다. 호기성 Gram (+) 균주인 *S. aureus*, *B. subtilis*와 Gram (-) 균주인 *E. coli*는 Mueller-Hinton 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 균을 접종한 후 37°C incubator에서 24시간 배양하였다. 또한 비듬균인 *P. ovale*는 Pityrosporum 배지(Malt extract agar 6%, ox-bile 2%, tween 40 1%, glycerol mono-oleate 0.25%)를 사용하였으며 균을 접종한 뒤 30°C 에서 24시간 동안 배양하여 사용하였다.

Disc Diffusion Assay에 의한 항균활성 측정: 각 추출물의 항균활성은 각 균주를 대상으로 disc diffusion assay로 측정하였다. 배양된 균주는 1×10^7 CFU/ml로 조절된 후

본 실험에 사용하였다. 평판배지에 배양된 각 균주를 멸균 면봉을 이용하여 100 L씩 도말하여 준비하였고, 시료를 disc 당 0.5, 2.5 mg이 되도록 paper disc (diameter 8 mm, Roshi kaisha. Ltd., Tokyo, Japan)에 천천히 흡수시킨 뒤, 건조과정을 거쳐 용매를 휘발시켰다. 각각의 시료가 흡수된 paper disc를 도말한 평판배지 위에 밀착시킨 상태로 배양한 후 disc 주변에 생성된 저해환(clear zone, mm)을 측정하여 항균활성을 비교하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5% 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

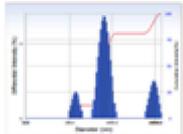
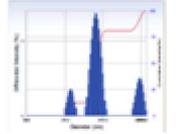
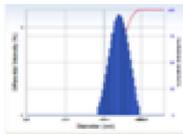
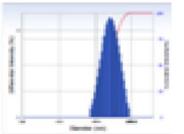
Table 1. Composition of *P. tricuspidata* stem extracts containing formulation for emulsion and/or Nano-emulsion.

	Component	w/w %
Oil phase	Stearic acid (SA)	1.5
	Cetyl alcohol (CA)	1.0
	Caprylic/capric triglyceride (CCT)	2.0
	Mineral oil (MO)	5.0
	HCO- 60	3.0
Ethanol phase	Ethanol (EtOH)	1.0
	PT ethyl acetate fraction (PT)	0.1
Water phase	Distilled water (DW)	Up to 100

Table 2. Droplet size and loading efficiency of emulsion and nano-emulsion containing *P. tricuspidata* stem extracts.

	Emulsion	Nano-emulsion
Droplet size (nm)	-	302.0 ± 160.3 nm
Loading efficiency (%)	86.90 ± 1.40%	86.43 ± 2.3%

Table 3. Size distribution of emulsion and nano-emulsion containing *P. tricuspidata* stem extracts during 2 weeks.

Time(week)	0 week	1 week	2 weeks
Microfluidizer 0 cycle (Emulsion)			
	146.5 ± 25.1 nm 686.6 ± 180.0 nm 9547.7 ± 1843.5 nm	156.5 ± 25.8 nm 692.6 ± 185.0 nm 9677.7 ± 1843.5 nm	821.1 ± 665.4 nm 8940.6 ± 3955.3 nm
	Microfluidizer 5 cycle (Nano-emulsion)		
302.0 ± 160.3 nm		320.0 ± 153.4 nm	301.4 ± 188.3

결과 및 고찰

담쟁이덩굴 줄기 추출물 함유 나노에멀전의 물리적 특성

고압유화 장치인 microfluidizer는 분산이나 리포솜 및 나노에멀전 제조에 많이 이용되는 장비이다. 이는 에멀전이나 콜로이드 용액에 높은 압력을 가한 후 interaction chamber (IXC)를 통과시켜 입자의 크기를 일정하게 분쇄하는 방식으로 입자를 나노화하는 특징이 있다[3]. Microfluidizer로 제조된 나노입자는 높은 압력에 의한 전단력의 증가로 입자크기가 작아지며, 통과횟수에 따라 입자 크기의 평균 직경은 일정한 크기로 감소하는 것으로 알려져 있다[12].

0.1% 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 에틸아세테이트 분획을 함유한 O/W 에멀전을 Table 1의 처방으로 균질기를 이용하여 제조하였다. 제조된 에멀전을 고압유화 장치인 microfluidizer를 5회 반복 통과시켜서 나노에멀전을 제조하였다. 0.1% 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 에틸아세테이트 분획을 함유한 에멀전과 나노에멀전의 제조 직후 입자 크기와 포집효율을 Table 2에 나타냈다. 제조 직후 일반 에멀전은 다분산 형태로 불균일한 입도분포를 나타내었으나, 나노에멀전은 302 nm로 단분산 형태의 일정한 입도분포를 보여 주었다(Table 3, 0 week). 흡광도법으로 측정한 추출물의 포집 효율은 일반 에멀전과 나노에멀전 모두 86% 이상으로 나타났다.

앞서 제조한 일반 O/W 에멀전과 나노에멀전 제형의 안정성을 2주간 비교하였다(Table 3). 일반 에멀전은 제조 직후 및 2주 동안 다분산의 불균일한 입도 분포를 나타낸 반면, 나노에멀전은 시간이 지날수록 입자 크기가 다소 증가하였으나 측정 기간 동안 단분산 형태의 균일한 입도 분포를 나타내었다. 이러한 결과는 같은 일정한 기간에서 일반 에멀전에서 볼 수 있는 침전이나 크리밍과 같은 에멀전의 분리 현

상이 나노 에멀전에서는 나타나지 않으며 입자 크기가 일정한 안정한 단분산 형태의 나노에멀전을 유지함을 나타낸다.

담쟁이덩굴 줄기 추출물 함유 나노에멀전의 경표피 투과능

Franz diffusion cell을 이용하여, 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 에틸아세테이트 분획을 함유한 나노에멀전의 피부 투과능력을 평가하였다. 대조군으로는 우수한 보습 효과를 갖으

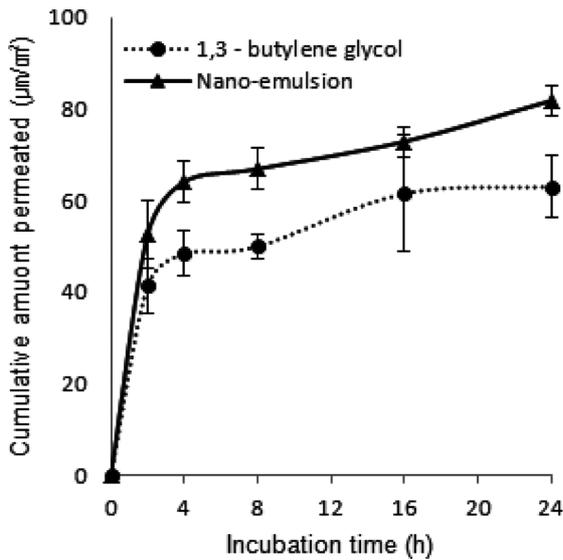


Fig. 1. *In vitro* skin permeation profiles of 1,3-butylene glycol solution and nano-emulsion containing *P. tricuspidata* stem extract through ICR albino mouse skin.

며 피부 자극이 거의 없고 피부전달에는 영향을 주지 않는 1,3-butylene glycol을 사용하였다. 피부 일정 면적에 대한 시간별 담쟁이덩굴 줄기추출물의 투과량을 Fig. 1에 나타내었다. 나노에멀전과 1,3-butylene glycol 모두 시간 의존적으로 함유한 추출물의 피부 투과량이 증가하였다. 24 h 후 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 누적 투과량(Transdermal)은 1,3-butylene glycol 용액의 경우 63.08 µg이었고, 나노에멀전은 81.86 µg으로 나타났다. 이를 초기 적하량 314.37 µg에 대하여 환산하면 20.1% 및 26.0%로 나노에멀전이 대조군에 비해 높은 피부 투과능을 보였다.

Fig. 2(a)는 24 h 후, 각질층에 존재하는 담쟁이덩굴 줄기 추출물(Tape), 표피에서 각질층을 제외한 표피와 진피에 존재하는 담쟁이덩굴 줄기 추출물(Skin), 그리고 피부를 통과하여 receptor phase에 존재하는 담쟁이덩굴 추출물(Transdermal)의 함량을 나타낸 것이며 Fig. 2(b)는 각 피부 부위에 존재하는 담쟁이덩굴 줄기 추출물 함량을 비율을 초기 적하량에 대비하여 나타낸 것이다. 각질층에 존재하는 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 함량(Tape)은 1,3-butylene glycol 용액의 경우는 12.56 µg였고, 나노 에멀전이 24.64 µg로 초기 적하량 대비 각각 4.00% 및 7.84%로 나타났다. 각질층을 제외한 피부에 존재하는 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 함량(Skin)은, 1,3-butylene glycol과 나노에멀전에서 각각 26.82 µg, 27.03 µg으로 초기 적하량에 대한 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 침투율로 환산할 경우 각각 8.53% 및 8.60%로 나타났다. 피부에 침투된 담쟁이 덩굴 줄기 추출물 에틸아세테이트 분획의 총 함량은 1,3-butylene glycol에서 102.46 µg, 나노에멀전에서

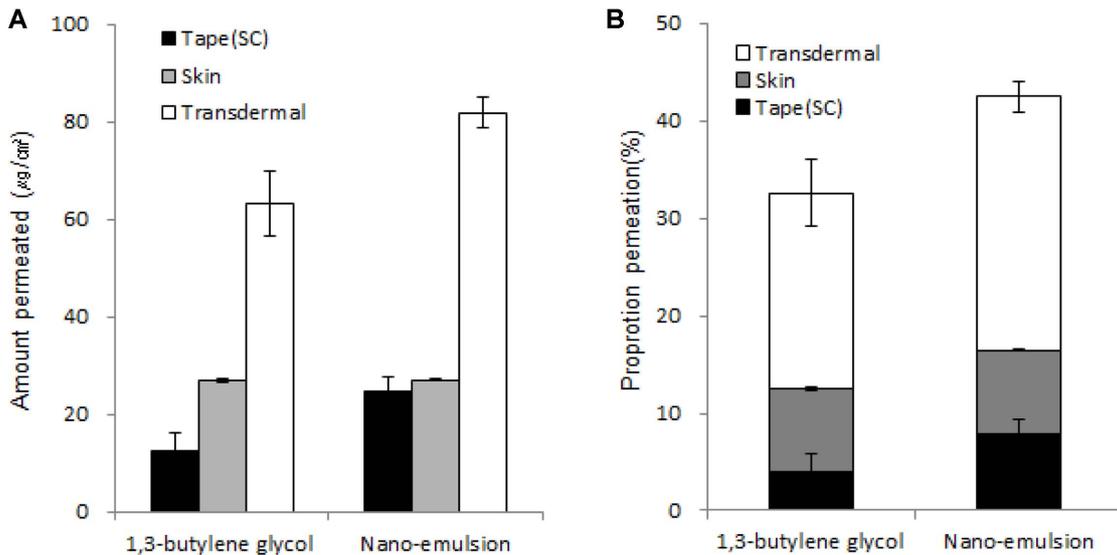


Fig. 2. Proportions of permeated amount of 1,3-butylene glycol solution and nano-emulsion containing *P. tricuspidata* stem extract through ICR albino mouse skin after 24 h incubation (Tape: stratum corneum, Skin : epidermis without stratum corneum plus dermis, Transdermal : receptor chamber).

Table 4. Antibacterial activities of *P. tricuspidata* stem extracts ethyl acetate fraction against microorganism.

Bacterial strains	Size of clear zone (diameter, mm)					
	DMSO	Control conc. (mg/disc)		Sample conc. (mg/disc)		
		Methyl paraben		Ethyl acetate fraction		
		0.5	2.5	0.5	2.5	
<i>P. ovale</i>	- ^a	18	24	-	-	
<i>P. acnes</i>	-	-	14	-	-	
Gram positive bacteria						
<i>S. aureus</i>	-	-	12	-	16	
<i>B. Subtilis</i>	-	-	11	10	12	
Gram bacteria negative						
<i>E.coli</i>	-	10	18	-	-	

^aNo inhibition.

133.54 µg으로 측정되었다. 따라서 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 초기 적하량 대비 총 피부투과율 1,3-butylene glycol이 32.59%, 나노에멀전이 42.47%로 나노에멀전이 약 1.30배 더 우수한 피부투과율을 나타냈다.

나노에멀전의 종류와 에멀전의 크기에 따라 피부흡수능이 변할 수 있지만 본 연구에서는 microfluidizer를 이용한 고에너지법으로 담쟁이덩굴 줄기 추출물을 함유한 나노에멀전을 제조하여 그 특성과 피부흡수능을 보고자 하였으며 약 300 nm의 단분산 형태의 에멀전 입자 사이즈는 다른 연구를 통해서도 일반 에멀전에 비하여 피부흡수능이 우수하다고 알려져있다[14].

피부상재균의 항균 활성(Disc Diffusion Assay)

담쟁이덩굴 줄기 에틸아세테이트 분획의 피부상재균에 대한 항균활성은 *S. aureus*, *B. subtilis*과 같은 2종의 Gram (+) 세균과 *E. coli*와 같은 1종의 Gram (-) 세균으로 구성된 3종의 세균, 피부질환을 일으키는 대표적인 피부상재균인 *P. ovale*, *P. acnes*를 포함한 총 5종의 미생물을 disc 확산법으로 실시하였다. 이에 따른 결과를 Table 4에 나타내었다. 담쟁이덩굴 줄기 에틸아세테이트 분획은 Gram (+) 세균인 *S. aureus*, *B. subtilis*에서 항균 활성이 나타났으며, 이는 화장품에 주로 사용되는 항균제인 methyl paraben과 비교하였을 때 더 큰 항균 활성이 나타남을 확인하였다. 반면에 Gram (-) 세균과 *P. ovale*, *P. acnes*에서는 methyl paraben에서만 항균 활성을 보였고, 담쟁이덩굴 줄기 에틸아세테이트 분획에서는 항균 활성이 나타나지 않았다. 이로써 담쟁이덩굴 줄기 에틸아세테이트 분획은 Gram (+) 세균에서만 높은 항균 활성을 나타내는 것으로 확인되었으며, 피부염의 핵심 증상인 습진의 주원인으로 작용하는 Gram (+) 균주 *S. aureus*에 대하여 높은 항균 활성을 보이기 때문에 항균제로서의 역할

을 기대해 볼 수 있다.

요 약

이전 연구에서 저자들은 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 항산화 및 세포 보호 효과를 연구하였다. 본 연구에서는 우수한 활성을 갖는 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 피부흡수를 증진시키고자 이를 함유한 나노에멀전을 제조하고 물리적 특성 및 피부흡수능을 평가하였다. 고압유화기(microfluidizer)를 이용하여 제조한 나노에멀전은 평균 입자 크기가 302 nm를 나타내었으며 포집 효율은 86% 이상으로 나타났다. 나노에멀전은 단분산의 입도 분포를 나타내었고 고압유화과정을 거치지 않은 일반 에멀전보다 2주간 높은 안정성을 나타내었다. Franz diffusion cell을 이용하여 제조된 담쟁이덩굴 추출물 함유 나노에멀전의 피부흡수능을 평가하였다. 그 결과 대조군으로 사용된 1,3-butylene glycol 용액이 32.59%의 피부흡수율을 나타내었고, 나노에멀전은 42.47%의 피부 흡수능을 나타내었다. 또한 담쟁이덩굴 줄기 추출물의 화장품에 있어 천연 항균제로서의 응용 가능성을 연구하고자 에틸아세테이트 분획의 피부 상재균에 대한 항균작용을 측정하였다. 항균활성 측정결과 담쟁이덩굴 줄기 추출물은 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*에 대해 항균활성을 나타내었으며, 화장품에 주로 사용되는 항균제인 methyl paraben 보다 높은 항균활성을 가지고 있음을 확인하였다. 이상의 결과들은 담쟁이덩굴 줄기 추출물을 함유한 나노에멀전이 피부흡수능 증진을 통해 향후 화장품 제형으로서 이용가능성이 큼을 시사한다. 또한 담쟁이덩굴 줄기 에틸아세테이트 분획의 Gram (+) 세균에 대한 항균활성을 바탕으로 이전 연구에서 밝혀진 항산화 활성 및 세포보호효과와 더불어 기능성원료로서 응용 가능성이 큼을 시사한다.

Acknowledgments

This study was supported by Seoul National University of Science and Technology.

References

- Alam MD, Shrestha LK, Aramaki K. 2009. Glycerol effects on the foamation and rheology of cubic phase and related gel emulsion. *J. Colloid Interface Sci.* **329**: 366-371.
- Asua JM. 2002. Miniemulsion polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **27**: 1283-1346.
- Baik SS. 1993. Preparation of emulsion by microfluidizer. *J. Soc. Cosmet. Scientist Korea* **19**: 127-138.
- Cajkovic M, Oremovic L, Cajkovic V. 1992. Oremovic, and V. Cajkovic, Influence of emulsoid vehicle on the release and activity of allantoin. *Pharmazie.* **47**: 39-43.
- Gutierrez JM, Gonzalez C, Maestro A, Sole I, Pey CM, Nolla J. 2008. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **13**: 245-251.
- Ha YM, Lee BB, Bae HJ, Je KM, Kim SR, Choi JS, et al. 2009. Anti-microbial activity of grapefruit seed extract and processed sulfur solution against human skin pathogens. *J. Life Sci.* **19**: 94-100.
- Jo NR, Gu HA, Park SA, Han SB, Park SN. 2012. Cellular protective effect and liposome formulation for enhanced transdermal delivery of isoquercitrin. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **38**: 103-118.
- Jo NR, Park MA, Chae KY, Park SA, Jeon SH, Han JH, et al. 2012. Cellular protective and antioxidative activities of *Parthenocissus tricuspidata* stem extracts. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **38**: 225-236.
- Jun S, Goto K, Nanjo F, Kawai S, Murata K. 2000. Antifungal activity of plant extract against *Arthriniium sacchari* and *Chaetomium funicola*. *J. Biosci. Bioeng.* **90**: 442-446.
- Kim MR, Woo SE, Shin SO, Hong SM, Yang SY. 2006. A study on the distribution of staphylococcus aureus in atopic dermatitis. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **32**: 93-97.
- Kim SY, Lee MH, Jo NR, Park SN. 2010. Antibacterial activity and skin moisturizing effect of *Cedrela sinensis* A. Juss Shoots Extracts. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **36**: 315-321.
- Kyung KY, Jee UK, Cho WG. 2007. Preparation and evaluation of cubic liquid crystalline phase gel and cubosome containing polyethoxylated retinamide. *J. Korean Pharm. Sci.* **37**: 85-94.
- Landfester KM Willert, Antonietti M. 2000. Preparation of polymer particles in nonaqueous direct and inverse miniemulsions. *Macromolecules* **33**: 2370-2376.
- Lim MS, Park MA, Park SN. 2012. Preparation of Nano-emulsion containing *Polygonum aviculare* extract for enhanced transdermal delivery. *Appl. Chem. Eng.* **23**: 222-227.
- Lim YS, Myung KB, Chung NE, Chung WS. 1995. A study on the MIC of antibiotics for propionibacterium acnes in patients with acne. *Korean J. Dermatol.* **33**: 437-444.
- Marples RR. 1974. The microflora of the face and acne lesions. *J. Invest. Dermatol.* **62**: 326-331.
- Marszall L. 1987. Nonionic surfactants, pp. 493. In Shick MJ (ed), *Surfactant science series*, vol. 23. Marcel Dekker, New York.
- Musyanovych A, Mailander V, Landfester K. 2005. Miniemulsion droplets as single molecule nanoreactors for polymerase chain reaction. *Biomacromolecules* **6**: 1824-1828.
- Shinoda K, Saito HJ. 1968. The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant. *Colloid Interface Sci.* **26**: 70-74.
- Solans C, Esquena J, Forgiarini A, Morales D, Uson N, Izquierdo P. 2002. Surfactants in solution: fundamentals and applications, pp. 525-554. In Shah D, Moudgil B, Mittal KL (ed), *Surfactant Science Series*, Marcel Dekker, New York.
- Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **10**: 102-110.
- Sudol ED, El-Aasser MS. 1997. Miniemulsion polymerization, pp. 700-722. In Lovell PA, El-Aasser MS (ed), *Emulsion polymerization and emulsion polymers*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom.
- Sung HC, Jung HD, Park KD, Lee WJ, Lee SJ, Kim DW. 2007. A quantitative culture study of *Staphylococcus aureus* in adolescent and adult patients with atopic dermatitis using the contact-plate sampling technique. *Korean J. Dermatol.* **45**: 673-679.
- Ugelstadt J, El-Aassar MS, Vanderhoff JW. 1973. Emulsion polymerization: initiation of polymerization in monomer droplet. *J. Polym. Sci.* **11**: 503-513.
- Uson N, Garcia MJ, Solans C. 2004. Formation of water-in-oil (W/O) nanoemulsions in a water/mixed non-ionic surfactant/oil systems prepared by a low-energy emulsification method. *Colloids Surf. A.* **250**: 415-421.
- Won BR, Kang MK, Ahn YJ, Park SN. 2009. The effects of ethanol on nano-emulsions containing quercetin prepared by emulsion inversion point method. *J. Soc. Cosmet. Scientist Korea* **35**: 79-89.
- Yu JY, Park SH, Jo SJ, Heo CH, Yun SU, Park GC. 2003. A clinical study on the effect of a cream containing ramulus mori extract and tea tree oil on acne vulgaris and aerobic skin flora. *Korean J. Dermatol.* **41**: 1136-1141.
- Yue PF, Yuan HL, Zhu WF, Cong LB, Xie H, Liu ZG, et al. 2008. The study to reduce the hemolysis side effect of puerarin by a submicron emulsion delivery system. *Biol. Pharm. Bull.* **31**: 45-50.