

UVB 자외선 차단제의 항균력 및 피부자극에 관한 연구

최종완, 허윤석, 손근욱
(한국화장품(주) 기술개발연구소)

A Study on the Antimicrobial Activity and *in vitro* Cytotoxicity of UVB Sunscreen Chemicals in Cosmetic Products

Jong-oan Choi, Yun-seuk Hur, Geun-ug Son
(Hankook cosmetics R & D Center)

Abstract

To investigate the effect on the antimicrobial activity against *S.aureus* ATCC 6538, *E.coli* KCTC 1039 and cell toxic level against transformed mouse fibroblast L929 in formula added with various concentrations of UVB blockers commonly used in cosmetic products, these experiments were carried out by preservative efficacy testing methods and *in vitro* cytotoxicity methods. The results obtained were as follow ;

1) Octyl Dimethyl PABA had a broad antibacterial spectrum against the Gram (+) and the Gram(-) bacteria at 5.84 % concentration, but not Octyl Methoxycinnamate.

2) Antibacterial activity was decreased in a combined UVB blocker system of squalane base. Especially, Octyl Dimethyl PABA was inactivated by Octyl Methoxycinnamate at 5.84% concentration to a large extents <more than 33-202 hrs.>, but not 4-Methylbenzylidene Camphor.

3) Within *in vitro* cytotoxicity by use of mouse fibroblast L929 on UV-B blockers, NR assay was more excellent than MTT assay on quantitative analysis.

4) It is impossible to determine concentration of preservatives which would be effective for all cosmetic formulas with out studying each formulation individually.

I. 서 론

화장품의 변질요인은 크게 분류하면 물리적 또는 화학적 변화에 의한 요인과 미생물 오염으로 인한 각종 문제점으로 대별될 수 있다(1-3). 이중에서 미생물 오염문제는 제품자체의 변질로 인한 상품가치의 저하는 물론 피부 등 사용부위에 대한 위생학적인 측면때문에 그 중요성에 대한 인식이 높아지고 있다(4-5).

화장품은 천연물 기원의 영양성분과 미생물에 의해 분해되기 쉬운 원료가 많이 사용되고 있는 관계로 인하여 시장에서 유통중 또는 소비자가 사용중에 곰팡이, 효모, 세균등의 미생물에 의해 오염 또는 증식되기 쉬우므로 이와 같은 미생물의 성장을 억제하기 위하여 방부제가 첨가되며 첨가되는 방부제의 종류와 농도는 방부력 실험에 의하여 결정되어지고, 방부제는 가능한한 최소량으로 최대의 항균력을 나타내도록 하여야 한다(6-7).

따라서, 화장품 처방중의 영양성분의 배합, pH, 유화형태, 방부제의 combination 및 그 안정성을 고려하여야함은 물론이고 처방중의 모든 원료 개개에 대한 항균 활성능 및 피부자극 여부를 사전에 파악하여 각 제품별로 적당한 방부체계를 선택하는 것은 매우 중요한 일이다(8). 화장품의 방부력을 측정하는 방법으로는 USP법, CTFa법, Linear regression법 등이 사용되어지고 있고(9), 피부자극 측정방법으로는 *in vivo*와 *in vitro* 시험방법이 있으나(10-11) 근래 동물 애호운동에 즈음하여 동물세포 배양기술을 기본기술로 하는 *in vitro* cytotoxicity가 집중 연구되고 있으며 현재 무혈청 배지를 이용한 독성실험용 kit가 일부 회사에서 시판되고 있다(12-14). 화학물질의 안전성 평가를 위해 행하는 동물실험은 비용이 많이들고, 시간이 많이 소요되고 판정자에 의해 주관적인 문제점이 있으며 동물 애호의 관점에서도 비난이 높다. 새롭게 개발된 배양세포를 이용한 독성시험법에는 해결해야할 문제점이 많이 남아 있지만, 또한 많은 잇점이 기대되고 있다. 현재, neutral red, MTT, [³H]-thymidine, glucose utilization, LDH, PGE₂, NAGS, IL-6, IL- α , [³H]-arachidonic acid 등을 이용한 assay가 소개되어 있으며, 그중 neutral red assay와 MTT assay가 흔히 사용되고 있는 편이다(15-16). Linear regression method(Orth)는 D-values (Decimal reduction time)를 이용하여 방부능을 비교적 짧은 시간내에 정량적으로 측정할수 있는 방법이다. (6-7) 아울러 MTT assay(Mosmann, 1983)는 중성 pH에서 그 수용액이 황색인 MTT가 대사활성을 가진 생세포의 mitochondria에 의해 대사되어 청색의 formazan 유도체로 환원된

다. 생성된 formazan의 양은 생세포수에 비례함을 원리로하는 이 방법은 약물의 급성 초기 피부자극성에 대해 *in vitro* 독성비교에 사용되고 있다 (17). NR assay (Borenfreund와 Puerner, 1984)는 수용성의 적색인 neutral red가 정상인 plasma membrane을 통해서 생세포의 lysosome에 축적된다. 축적된 neutral red의 양은 생세포수에 비례함을 원리로 하는 이 방법은 Draize의 안점막 자극시험과 좋은 상관관계가 증명되고 있다 (18). 전술한 내용과 관련된 실험보고로는 Orth등의 (19-21) 특정세균을 사용하여 여러 종류의 화장품에 방부제를 단일 또는 혼합사용시 이상적인 배합비율등에 관한 논문과 DeNavarre등은 (22-25) polysorbate 80에 의한 방부제의 불활성화에 대하여 다수 논문, Rieger등은 (26) Emulsion내에서 phenolic 방부제의 불활성화에 대해서 보고했다. 또한, Triglia등은 (27) 3-dimensional nylon mesh에서 배양한 human fibroblast를 이용하여 15종의 독성물질에 대하여 *in vitro* 시험방법 2종(NR, MTT)간의 민감성 및 상관성에 대하여 보고하였다. Watanabe등은 (28) 52종의 화장품 원료에 대하여 *in vivo* 인 Draize 안점막 자극 시험법과 *in vitro*인 NR 및 MTT assay와의 상관성을 보고하고 있다.

본 논문에서는 UVB 자외선을 차단할 목적으로 화장품에 사용하고 있는 UVB 자외선 차단제중 많이 사용되고 있는 Octyl Methoxycinnamate, 4-Methylbenzylidene Camphor 및 Octyl Dimethyl PABA 이상 3종을 각 농도별로 단일 및 혼합사용시의 3종의 방부력 실험방법에 의한 항균력 비교 및 2종의 *in vitro* cytotoxicity방법에 의한 상대적 세포독성을 조사하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시험균주, 시약 및 배지, 자외선 차단제

1-1. 시험균주

- Bacteria : *S. aureus* ATCC 6538
E. coli KCTC 1039
- Animal cell : Mouse fibroblast L929

1-2. 시약 및 배지

- Trypticase Soy Agar With Lecithin, Tween 80 and Triton X-100 (DIFCO)

- Dulbecco's minimum essential medium with 10% FBS (GIBCO)
- Mixture of 100U/ML penicillin, 100 μ g/ML streptomycin (SIGMA)
- Neutral red (3-amino-7-dimethylphenazine hydrochloride) (SIGMA)
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide) (SIGMA)

1-3. 자외선 차단제

- Octyl Methoxycinnamate (Parsol MCX : Givaudan)
- 4-Methylbenzylidene Camphor (Eusolex 6300 : Merck)
- Octyl Dimethyl PABA (Escalol 507 : Van Dyk)

2. 시험균주의 최적 배양조건 측정

전술한 시험균주 2종을 준비된 멸균한 TSA사면배지에 접종하여 37℃, 24시간 배양한후 이것으로부터 1백금이 균을 취하여 TSB배지 30ml를 함유한 250ml-Erlenmeyer flask에 재접종하여 37℃에서 24시간 전배양하였다. 시험균주의 최적배양조건 측정실험에서는 TSB 배지 100ml를 함유한 500ml-Erlenmeyer flask에 2%의 전 배양액을 접종한후 37℃에서 40rpm으로 진탕배양하면서 6시간 간격으로 1ml씩 sampling하여 일정배을 희석한후 TSALT plate 상에 도말, 배양한후 평판위에 생성된 colony 수를 측정 하였다

TSB medium 100ml in 500ml-Erlenmeyer flask

← inoculation 2%-seed culture

Incubation at each time

← 40 RPM, 37℃ Shaking incubator

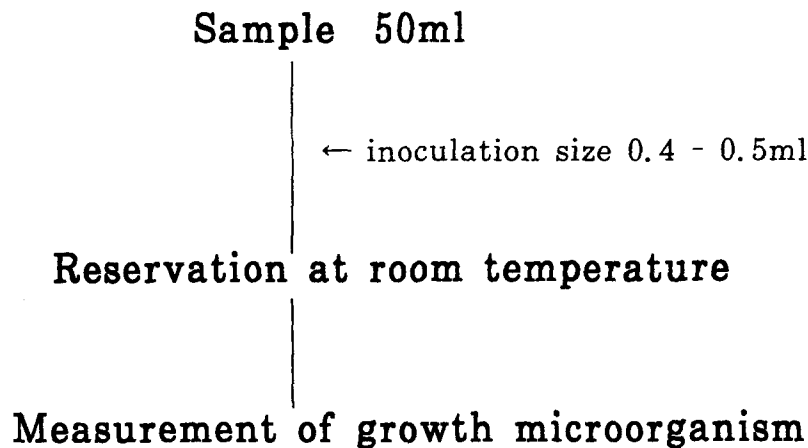
Viable Counting on TSALT plate

Scheme.1 Cultural condition of using microorganisms.

3. 항균력 측정방법

5℃에 보관중인 TSA사면 배지상의 균주를 1백금이 취하여 멸균된 TSB 배지 10ml에 접종하고 37℃, 24시간 계대배양(3회)한후, 10,000rpm, 15분간 원심분리한후, 상등액을 제거하고 D.W를 이용 2회 균체를 세척한후 D.W를 가해 10ml를 만들어 접종액으로 사용 하였다. 미리 준비한 50ml의 시험물질에 상기 기술한 접종액을 1×10^6 cells/ml 정도로 접종될 수 있도록 첨가하였다. 이와 같은 배양조건에서 E. coli는 0.4ml, S. aureus의 경우에는 0.5ml를 접종한후 USP법, CTFA법, Linear regression 법에 따라 0, 2, 4, 24hr, 2, 7, 14 day 간격으로 경시적으로 1ml씩 sampling하여 TSALT plate상에 발생하는 colony수를 측정하여 경과시간에 따른 접종균의 D-value를 계산하여 항균력을 조사하였다.

전술한 3종의 방부력 시험 방법의 개요는 Table.1과 같고, 세 방법의 D-values에 의한 acceptance criteria는 Fig.1과 같다.



Scheme.2 Preservative efficacy test of product.

Method 내용	U S P	C T F A	Linear Regression
접 종 량	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
내 용 물	20 ml	20ml(g) 이상	50 ml
실접종량	105 - 106/ml	106이상/ml	106/ml
배양온도	20 - 25	상온(또는 적온)	상온(또는 적온)
A P C	7, 14, 21, 28 day	0, 1, 2, 7, 14, 28 day	0, 2, 4, 24 hr. : 세균 0, 4, 8, 24 hr. : 곰팡이
시험균주	<i>C. albicans</i> ATCC 10231 <i>A. niger</i> ATCC 16404 <i>E. coli</i> ATCC 8739 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9097 <i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>C. albicans</i> <i>A. niger</i> ATCC9642 <i>E. coli</i> ATCC 13388 <i>P. aeruginosa</i> 15442 <i>S. aureus</i> ATCC 6538 <i>P. luteum</i> ATCC 9644	· 병원성균 <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> · 비병원성균 특별히 지정되어 있지 않음. 필요에 따라 가장 큰 활성화율을 가지고 있는 균주 사용.
판정기준	· 생균수가 14일동안에 처음농도의 0.1%로 감소 · 효모, 곰팡이는 14일 동안에 처음수준 또는 그 이하. · 28일동안 이 수준이 거나 수준이하	· 생균수가 7일 동안에 처음농도의 99.9%가 감소. · 효모, 곰팡이는 7일 동안에 90% 이상감소 · 포자에 대한 정균작용 이 전실험중에 이행 되어야 한다.	· 병원성균 D ≤ 4hr. · 비 병원성균 D ≤ 28hr. · 즉, 일반 비병원성균 은 7일 이내 사멸되 어야 하며, 병원성균 은 1일 이내 사멸되 어야한다.

Table.1 The comparison of preservative efficacy methods.

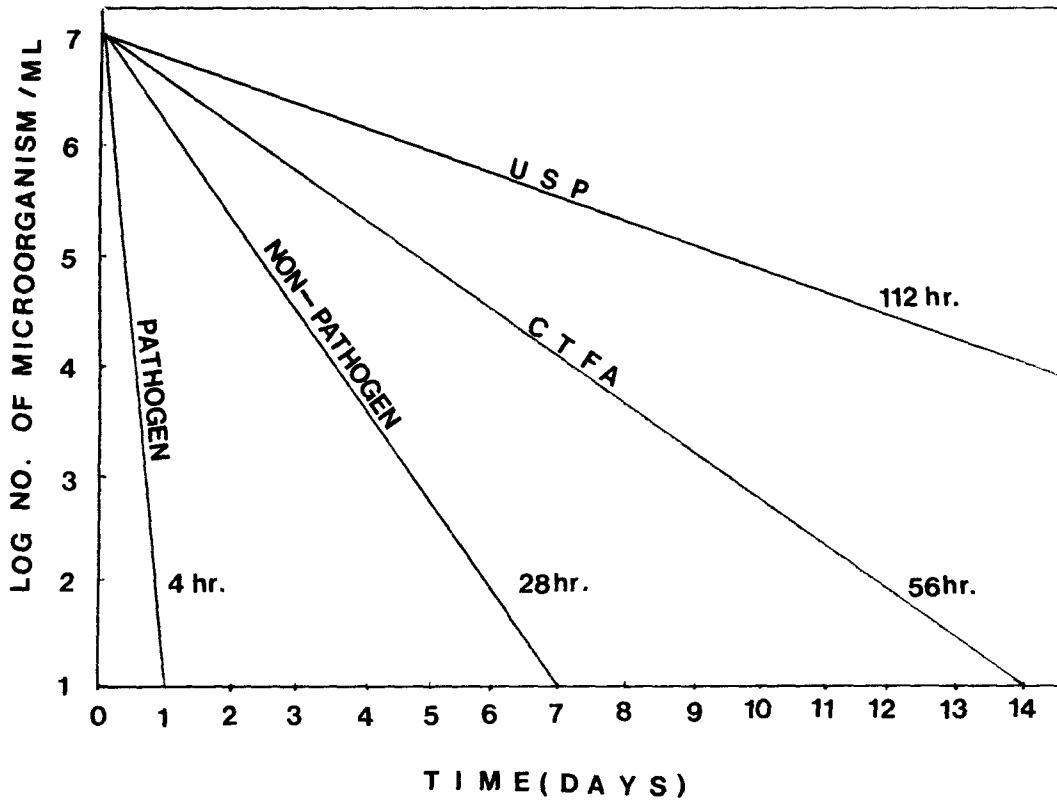


Fig.1 Acceptance criteria by survival curves using the USP method, the CTFA method and the Linear regression method

4. 세포 자극 측정방법

본 실험에서는 MTT assay와 NR assay를 사용하여 시험물질에 대한 mouse fibroblast L929의 세포 자극 정도를 측정하였다. 시험 물질의 조제는 시험물질과 Tween 20을 1:1로 혼합한후 그 10 μ l를 취하여 DMEM 10ML에 가해 균일하게 vortexing한 다음 각 농도별로 희석하였다.

4-1. *In vitro* cytotoxicity의 조건측정

96-well microplate 각 well에 cell을 각 농도별로 0.1 \times 10⁴, 0.25 \times 10⁴, 0.5 \times 10⁴, 1 \times 10⁴, 2 \times 10⁴, 3 \times 10⁴, 4 \times 10⁴ seeding 하여 24시간동안 37 $^{\circ}$ C로 5% CO₂ incubator에서 배양한후 전술한 MTT assay와

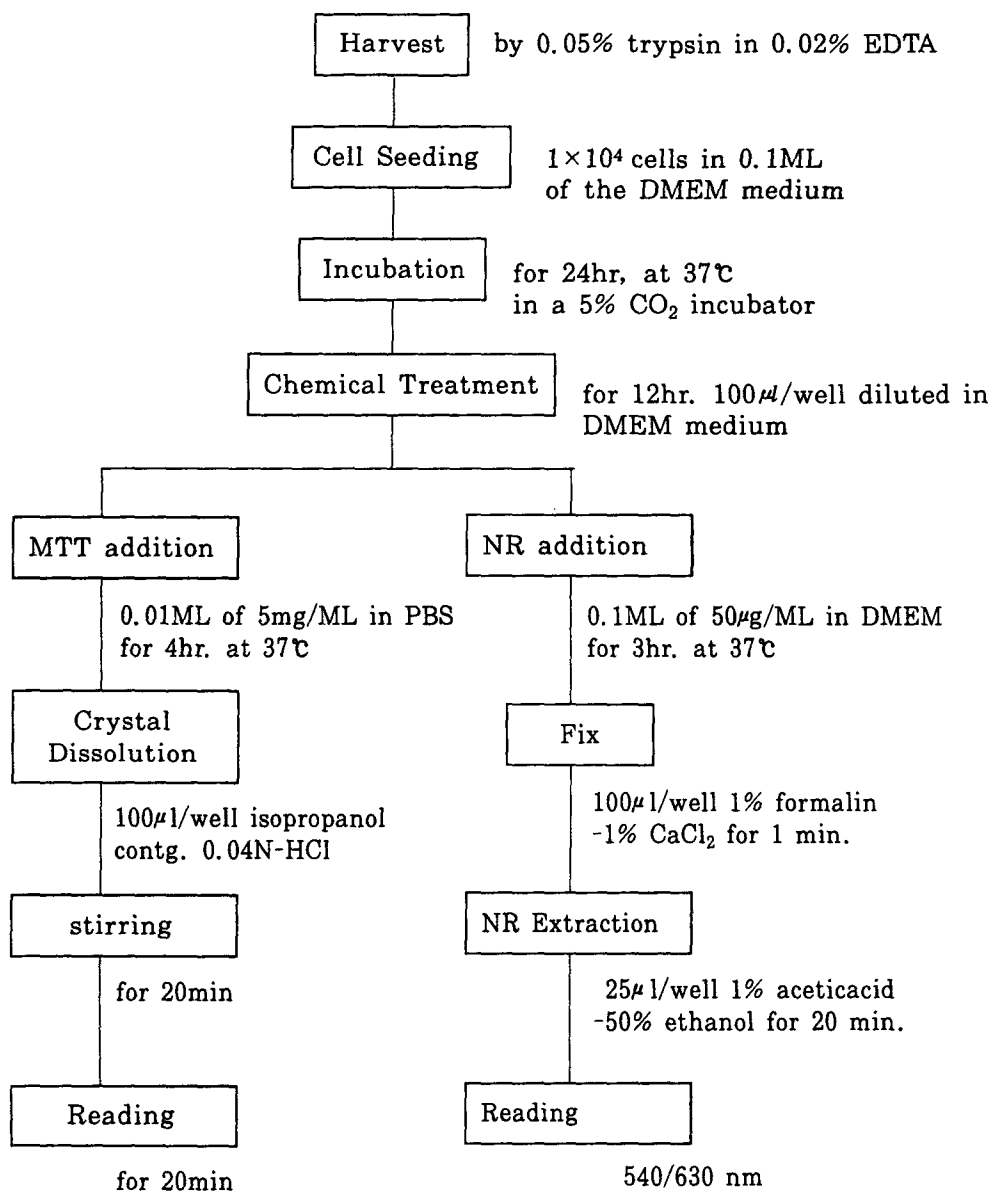
NR assay를 시행하여 두 방법에 있어서의 well당 cell의 density를 측정하여 standard curve를 작성하였다.

4-2. NR assay

Trypsinization (trypsin 0.05%)에 의해 harvest된 cell을 1×10^5 cells/ML 이 되도록 희석하여 96-well microplate에 100μ 씩 접종한 다음, 5% CO₂ incubator 에서 37℃로 24시간 배양한다. 시험물질을 멸균된 0.22 μ m membrane filter로 제균한후 DMEM배지로 4개 농도별로 희석하여 각 well에 100μ 씩 첨가하여 12hr. 동안 5% CO₂ incubator에서 37℃로 유지시킨 다음 DMEM 으로 50 μ g/ML의 농도로 조제한 neutral red 0.1ML을 각 well에 투여하여 3시간 작용시킨후 배지를 각 well로 부터 제거한다. microplate 내에 cell의 부착력을 촉진시키기 위하여 1% formalin-1% CaCl₂ 로 고정시킨후 생세포에 축적되어 있는 neutral red를 1% acetic acid - 50% ethanol 로 추출한 다음 ELISA reader(Bio-Tek instruments EL311)를 사용하여 540nm 와 630nm의 dual range로 reading한다. 각 농도에 대한 값은 처리하지 않은 control 값에 대한 백분율을 계산하여 plot한다.

4-3. MTT assay

NR assay와 동일한 과정으로 시험물질을 첨가하여 12시간 동안 5% CO₂ incubator에서 37℃로 유지시킨 다음 PBS로 5mg/ML의 농도로 조제한 MTT 0.01ML을 각 well에 투여하여 4시간 작용시킨 후 뒤집어서 내용물을 제거한다. microplate내에 생성된 formazan 결정을 용해시키기 위하여 0.04N-HCl을 함유하는 isopropanol을 가한후 microplate stirrer(Wallac Delfia plate shake 1296-002)로 20min. 동안 stirring하여 준다음 ELISA reader를 사용하여 570nm 와 630nm의 dual range로 reading한다. 각 농도에 대한 결과치는 처리하지 않은 control에 대한 백분율을 계산하여 plot한다.



Scheme.3 Bioassay procedure of NR & MTT.

Ⅲ. 실험결과 및 고찰

1. 시험균주의 증식도

방부력 실험에 사용할 시험균주의 활성이 가장 좋은 상태의 배양시간을 조사하기 위한 실험결과, growth curve는 Fig. 2와 같다.

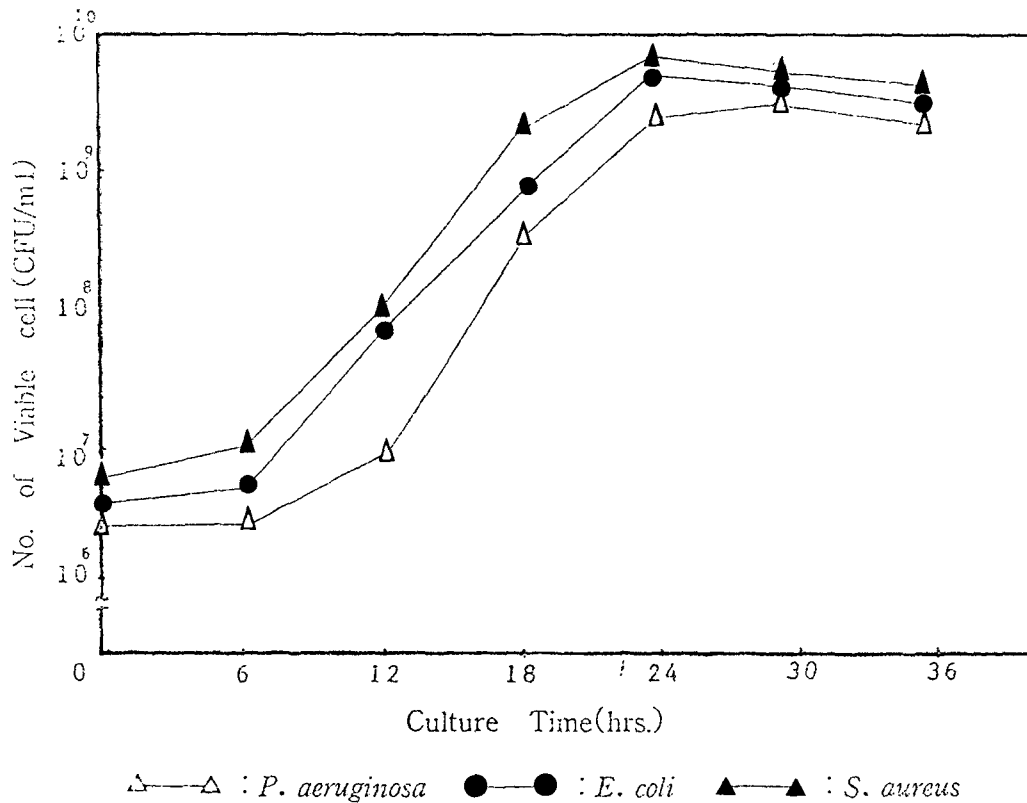


Fig. 2 Growth curves of test organisms.

Fig. 2 에서와 같이 *S. aureus* ATCC 6538은 유도기가 거의 없이 정상기에 도달하는데 소요되는 시간은 24hr. 이였고, *E. coli* KCTC 1039는 유도기가 매우 짧았고 이어 대수 증식기 및 정상기에 도달하는 시간은 24hr. 이 소요되었다.

따라서, 본실험에서는 생육 활성이 가장 강한 상태인 대수기 중간부분 즉, *S. aureus* ATCC 6538과 *E. coli* KCTC 1039는 공히 16hr. 배양한 균을 접종균으로 하였다.

2. 시험균주에 대한 UVB 자외선 차단제의 항균력 변화

본 실험에서는 전술한 UVB 자외선 차단제 3종의 단독 및 혼합사용시의 항균력 변화를 조사하여 USP법, CTFA법, Linear regression method 이상 3종의 측면에서 비교 검토하였다.

본 실험에 사용한 *S. aureus*, *E. coli* 2종의 시험균주는 화장품 및 제약의 방부력 실험에 있어서 대표적인 균주 일뿐만 아니라 보사부고시 제88-9호 (1988. 1. 21.)에 의거 규제대상 병원성 균주로 지정된 균주이다.

자외선 차단제의 본 실험에서의 사용 최고 농도는 Octyl Methoxycinnamate 7.5%, 4-Methylbenzylidene Camphor 5%, Octyl Dimethyl PABA 8% 로 안정성을 고려하여 화장품에 첨가할 수 있는 최고 농도까지로 했다.

시험물질의 UVB 자외선 차단제 함량 내역은 Table. 2 와 같다.

No	Sunscreen chemical (%)			Remark
	A	B	C	
1	2.17			A:Octyl Methoxy cinnamate
2	4.34			
3	6.52			
4		1.95		B:Octyl Dimethyl PABA
5		3.90		
6		5.84		
7			1.91	C:4-Methylbenzylidene Camphor
8			3.82	
9			5.73	
10	3.26	2.92		
11	4.34	3.90		
12	6.52	5.84		
13		2.92	2.87	
14		3.90	3.82	
15		5.84	5.73	
16	3.26		2.87	
17	4.34		3.82	
18	6.52		5.73	

(* base는 squalane임)

Table. 2 UVB sunscreen chemical content(%) of test materials.

2-1. *S. aureus* 에 대한 UV-B 자외선 차단제의 항균력 변화

UVB 자외선 차단제를 단독 또는 혼합한 18종 시험물질의 *S. aureus* ATCC 6538에 대한 항균력 실험결과 Fig. 3과 같다. 방부력 실험방법중 적합기준 spectrum이 가장 넓은 USP법의 acceptance criteria내에 들어오는 시험물질은 Octyl Dimethyl PABA(5.84%), Octyl Dimethyl PABA(5.84%) + Octyl Methoxycinnamate(6.52%), Octyl Dimethyl PABA(5.84%) + 4-Methylbenzylidene Camphor(5.73%)

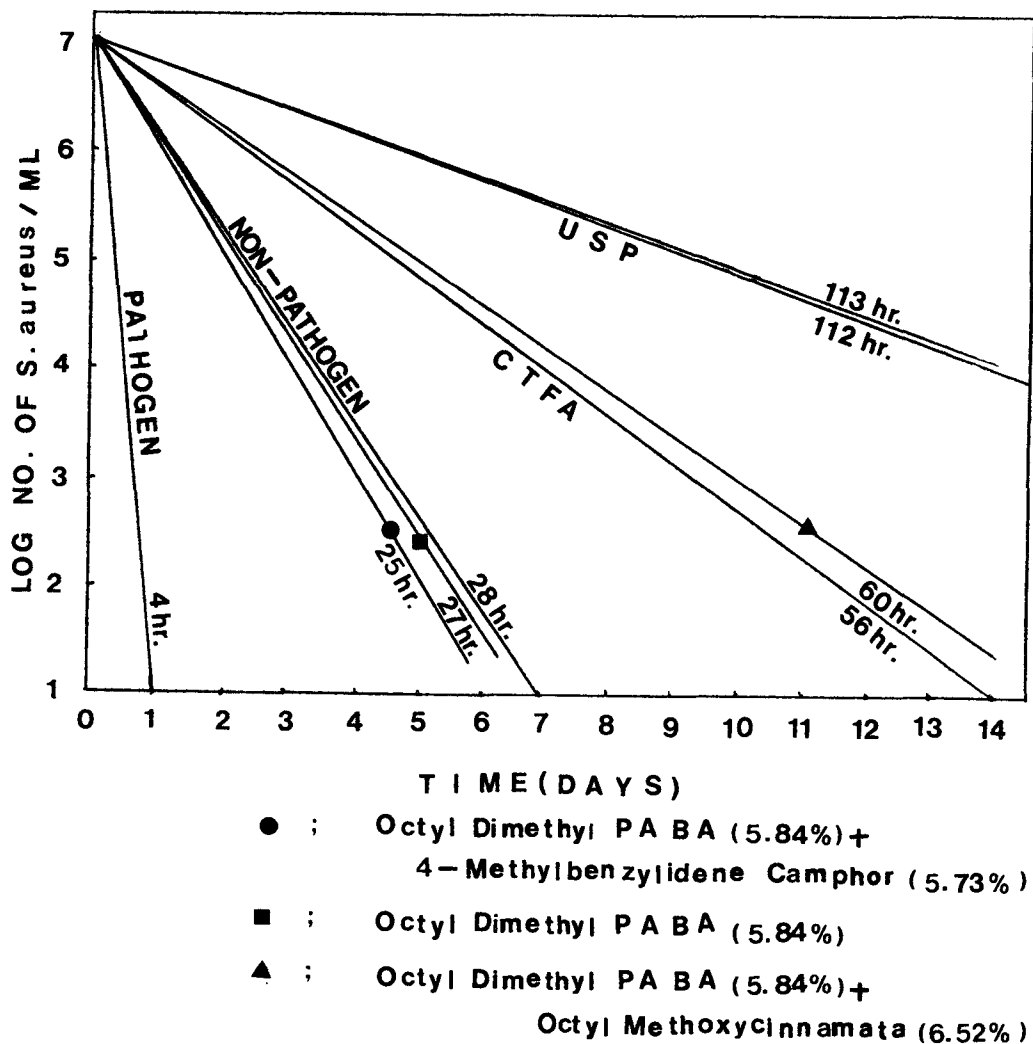


Fig. 3 Survival curves for *S. aureus* to test materials.

이상 3종 이었으며 이중 Octyl Dimethyl PABA(5.84%), Octyl Dimethyl PABA(5.84%) + 4-Methylbenzylidene Camphor(5.73%)는 CTFA법 및 Linear regression법 비병원성 균주에 대한 적합기준내에 들어오고 있다.

전술한 18종의 시험물질에 대한 항균력 실험결과, Octyl Methoxycinnamate 와 4-Methylbenzylidene Camphor은 각각 6.52%, 5.73% 에서 항균력이 거의 없는 반면에 Octyl Dimethyl PABA은 5.84%에서 넓은 항균 spectrum을 갖고 있었으며, 또한 혼합사용으로 인하여 그 항균력에 상승 또는 불활성화의 변화를 알수 있었다. Octyl Dimethyl PABA 3.9%에서는 항균력을 갖지 않았다.

항균력은 Octyl Dimethyl PABA + 4-Methylbenzylidene Camphor Octyl Dimethyl PABA Octyl Dimethyl PABA + Octyl Methoxycinnamate 순으로, D-value는 25hr., 27hr., 60hr. 으로 커지고 있다. 이로 미루어보아 Gram(+)균인 *S. aureus* ATCC 6538에 대한 Octyl Dimethyl PABA의 항균 활성은 4-Methyl-benzylidene Camphor 와 함께 사용시 약간의 synergistic 효과가 있었으나, Octyl Methoxycinnamate 와 함께 처방에 사용시는 불활성화 되고 있음을 인지할 수 있었다 (2배 이상).

2-2. *E. coli*에 대한 UVB 자외선 차단제의 항균력 변화

UVB 자외선 차단제를 단독 또는 혼합한 18종 시험물질의 *E. coli* KC TC 1039에 대한 항균력 실험결과, Fig. 4와 같다. 방부력 실험방법중 적합기준 spectrum이 가장 넓은 USP법의 acceptance criteria 내에 들어오는 시험물질은 Octyl Dimethyl PABA(5.84%), Octyl Dimethyl PABA(5.84%) + 4-Methylbenzylidene Camphor (5.73%) 이상 2종 이었으며, 이는 또한 CTFA법 및 Linear regression법 비병원성 균주에 대한 적합기준내에 포함되고 있다.

Octyl Dimethyl PABA은 Gram(+) 균에 비해 Gram(-) 균에 보다 강한 항균력을 나타내며 Octyl Dimethyl PABA + 4-Methylbenzylidene Camphor은 Gram(+) 균, Gram(-) 균에 동일한 항균력을 나타내었다. 또한 Octyl Methoxycinnamate와 4-Methylbenzylidene Camphor은 각각 6.52%, 5.73%에서 항균력이 거의 없었다.

항균력은 Octyl Dimethyl PABA Octyl Dimethyl PABA + 4-Methylbenzylidene Camphor Octyl Dimethyl PABA + Octyl

Methoxycinnamate 순으로, D-values치는 22hr., 27hr., 224hr. 으로 커지고 있다. Gram(-)균에 대한 Octyl Dimethyl PABA의 항균력은 Gram(+)균과는 달리 Octyl Methoxycinnamate 및 4-Methylbenzylidene Camphor 모두에 의하여 불활성화되고 있으며, 특히 Octyl Methoxycinnamate 와의 혼합 사용시 큰 불활성화율을 나타냈다 (단독사용시에 비해 약 10배).

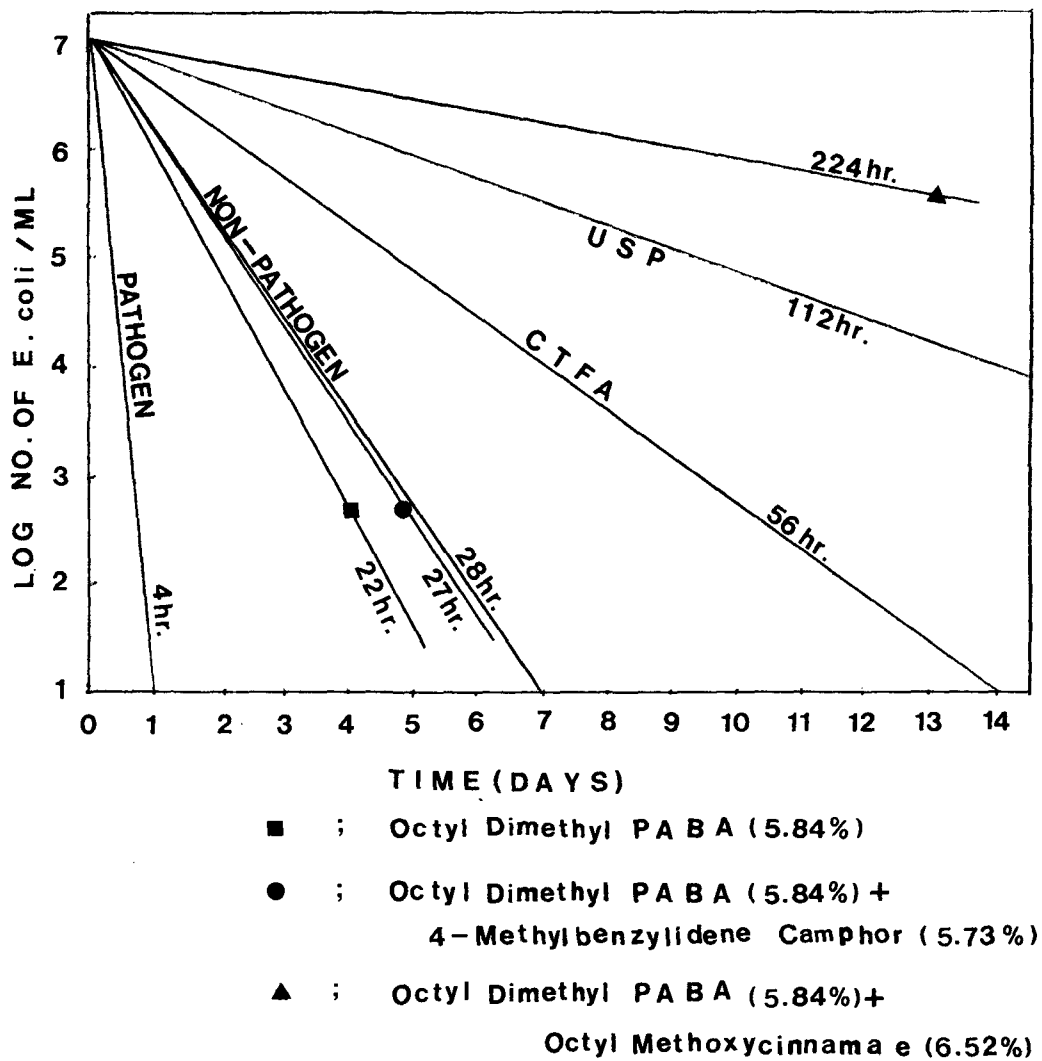
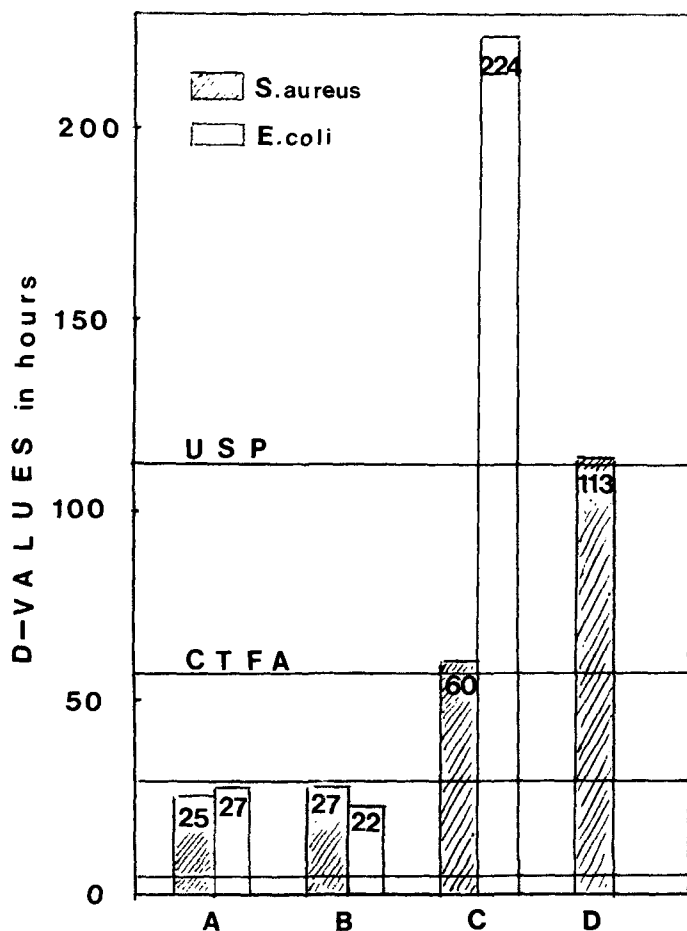


Fig. 4. Survival curve for *E. coli* to test materials.



**A: Octyl Dimethyl P A B A (5.84%) +
4 - Methyl benzylidene Camphor (5.73%)**

B: Octyl Dimethyl P A B A (5.84%)

**C: Octyl Dimethyl P A B A (5.84%) +
Octyl Methoxycinnamate (6.52%)**

**D: Octyl Dimethyl P A B A (3.90%) +
4 - Methyl benzylidene Camphor (3.82%)**

Fig. 5 The antimicrobial activity results of test materials by D-values.

2-3. 2종의 시험균주에 대한 UVB 자외선 차단제의 D-values에 의한
항균력 비교

*S. aureus*와 *E. coli* 이상 2종의 시험균주를 사용하여 UVB 자외선 차단제를 함유하는 시험물질에 대한 항균력 실험결과 비교는 Fig. 5와 같다.

Octyl Dimethyl PABA은 5.84%에서 Gram(+), Gram(-)균에 대하여 상당한 항균력을 가지고 있는바, 방부체계에 보강효과를 줄 수 있으리라 사료되며 또한 혼합 사용시는 4-Methylbenzylidene Camphor와의 사용이 항균력면에서 바람직하다고 생각된다. Octyl Methoxycinnamate와의 병행사용은 항균력이 매우 불활성화 되고 있다. 이는 cell wall에 대한 affinity에 의한 경쟁적 저해로 인해 항균력이 감소되는 것으로 사료된다.

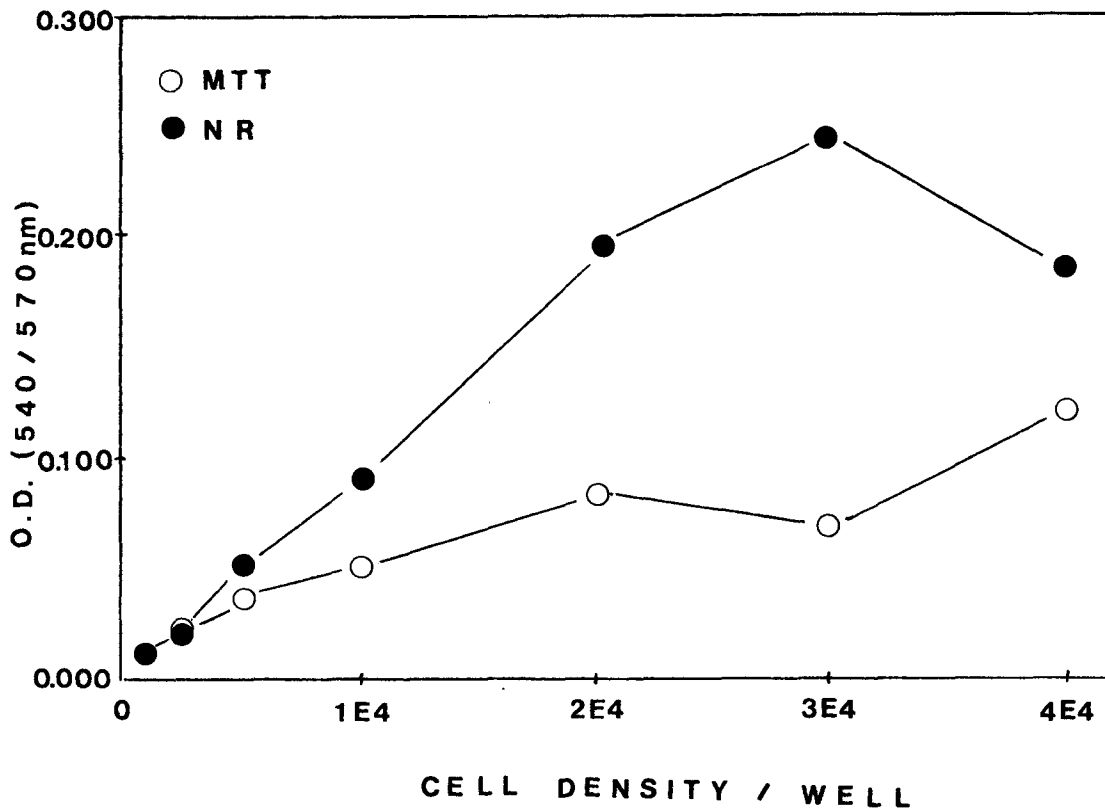


Fig. 6 Cell density standard curve by MTT, NR assay.

3. *In vitro* assay의 cell density curve

MTT assay와 NR assay에 사용할 mouse fibroblast cell의 96-well microplate 각 well 에의 접종시 최적의 density를 조사하기 위한 실험결과 Fig. 6과 같다.

mouse fibroblast L929 cell을 각 농도별 100 μ 씩 접종하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 MTT assay 와 NR assay를 실험한 결과 MTT assay의 경우 cell의 density가 570nm 에서 2 \times 10⁴ cells/well 까지 MTT에 의해서 변화되는 흡광도가 비례하였고 NR assay의 경우는 cell의 density가 540nm 에서 3 \times 10⁴ cells/well까지 흡광도가 비례하였다.

4. UVB 자외선 차단제의 자극측정

Oil base (squalane)에 UVB 자외선 차단제 3종의 단독 및 혼합사용시

No	Sunscreen chemical content(%)			Remark
	A	B	C	
A	6.52			A: Octyl Methoxycinnamate B: Octyl Dimethyl PABA C: 4-Methylbenzylidene Camphor
B		5.84		
C			5.73	
D	3.26		2.87	
E	3.26	2.92		
F		2.92	2.87	
G	2.17	1.95	1.91	

(* base 는 squalane 임)

Table. 3 UV-B sunscreen chemical content(%) of *in vitro* cytotoxicity test materials.

의 상대적 세포자극 정도를 MTT assay 와 NR assay 이상 2종의 방법으로 상대적 세포자극 정도를 비교 검토하였다. 시험물질의 UVB 자외선 차단제 함량 내역은 Table. 3과 같다.

4-1. MTT assay 에 의한 자극 비교

Table. 3에 표기한 7종의 시험물질 즉, UVB 자외선 차단제를 단독 및 2종 이상 혼합한 시험물질에 대하여 MTT assay를 시행한 결과는 Fig. 7과 같다. 7종의 시험물질은 0.05% 에서 급격한 독성을 나타내기 시작했으며, UVB 자외선 차단제를 단독 첨가한 시험물질에 비해 2종 이상 혼합한 시험물질 이 독성이 높게 나타났다.

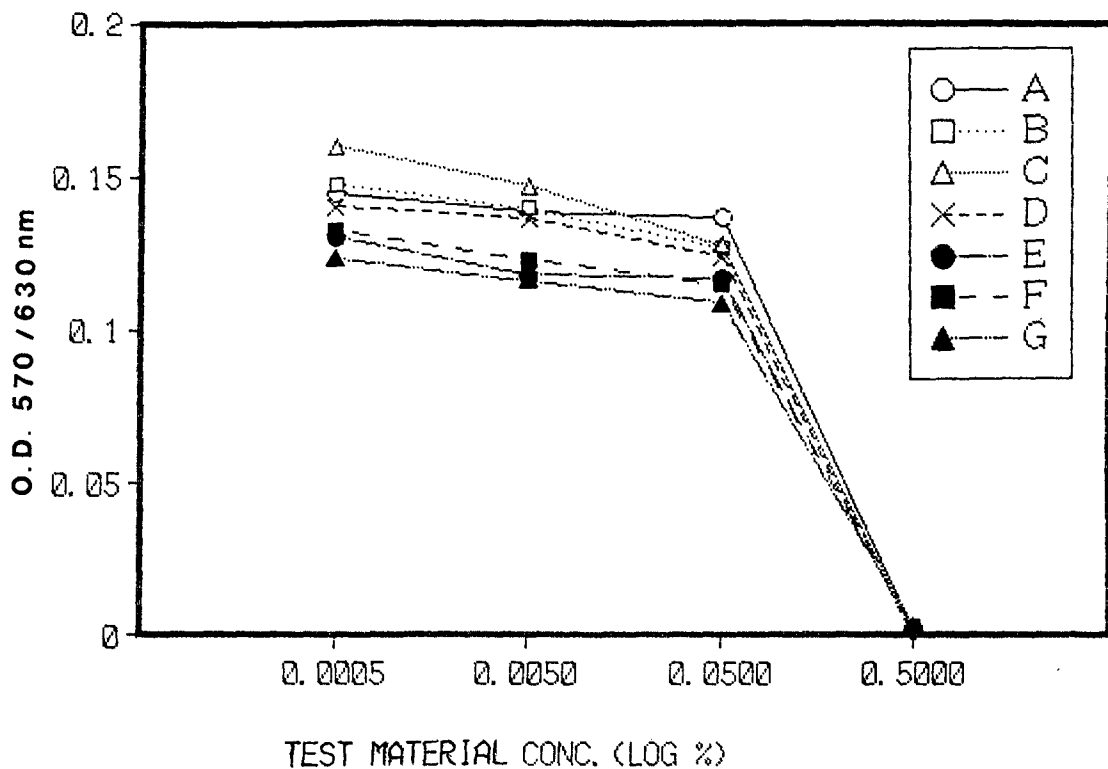


Fig 7. Dose-response curve by MTT assay.

4-2. NR assay에 의한 자극 비교

MTT assay와 동일한 시험물질 7종에 대하여 NR assay를 시행한 결과는 Fig. 8 과 같다. UVB 자외선 차단제 3종을 혼합한 시험물질인 G 즉, Octyl Methoxycinnamate(2.17%) + Octyl Dimethyl PABA(1.95%) + 4-Methylbenzylidene Camphor (1.91%)만이 0.005% 에서부터 급격한 독성을 보이기 시작했고 그외 시험물질은 대체로 0.05% 에서 강한 독성을 보이기 시작했다.

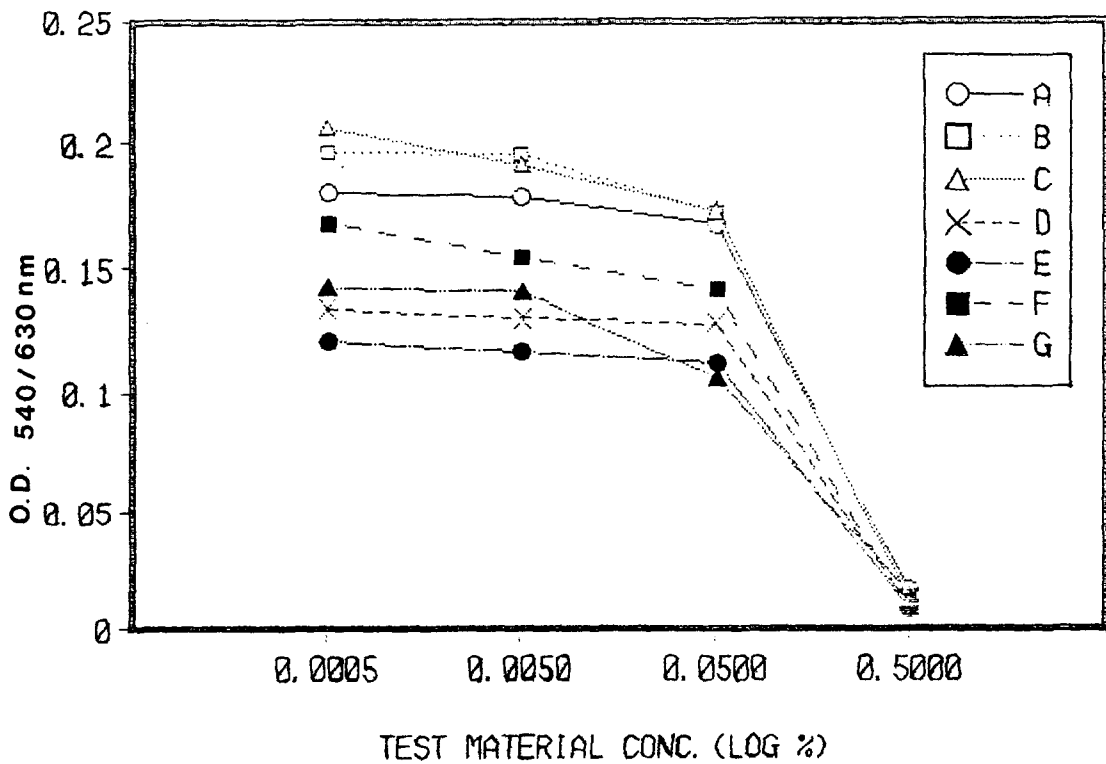


Fig. 8 Dose-response curve assessed by NR assay.

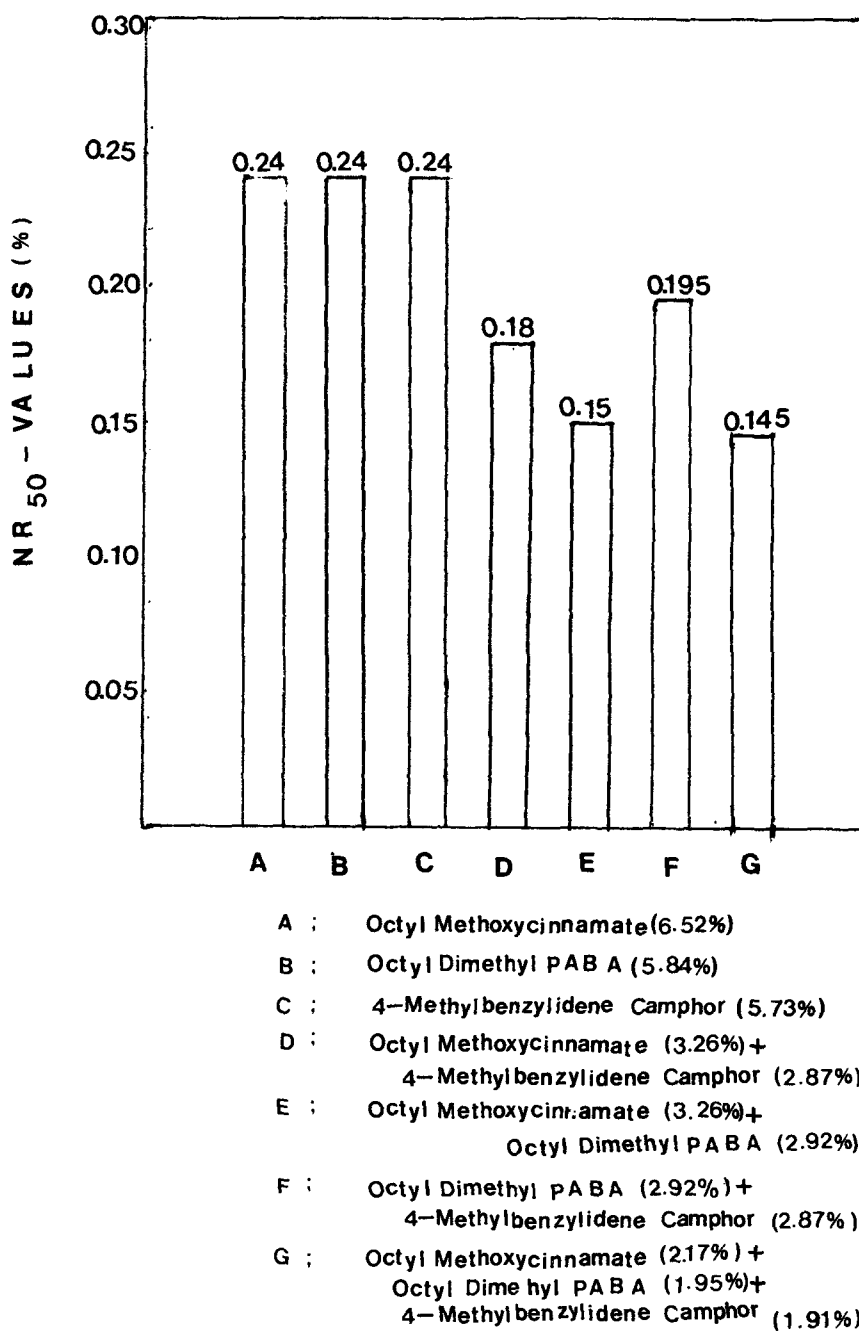


Fig. 9 The comparison of dose-response by NR50.

4-3. NR50에 의한 세포자극 비교

전술한 시험물질의 NR assay에 의한 세포자극 실험 비교치를 NR50 값으로 나타내면 Fig. 9와 같다.

UVB 자외선 차단제를 1종 사용한 시험물질에 비해 2종 혼합 사용한 시험물질의 독성이 대체로 높은 편으로 0.05% 에서 급격한 독성을 나타내기 시작했으며, 3종을 혼합한 시험물질은 0.005% 에서부터 독성을 보이기 시작했다. 본 실험의 조건에서는 단독 사용시보다 혼합해서 사용하는 것이 독성이 높게 나타났다. 또한 MTT assay 와 NR assay의 방법적 측면에서 볼때, 시험물질에 대한 실험결과 거의 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 다만, NR assay의 값이 NR50의 차가 크고 정량성에서 우수했다. MTT assay 는 mouse fibroblast L929 cell 에서 MTT 의 발색이 낮고 동일 세포수에서 NR assay에 비해 2/3 정도(MTT50= 0.12-0.16%, NR50= 0.15-0.24%)의 흡광도 밖에 나타내지 못하고 있다. 따라서, L929 cell을 이용한 *in vitro* cytotoxicity 에서는 MTT assay 보다 NR assay가 적절했다.

본 실험결과는 UVB blockers 3종의 fibroblast에 대한 단독 및 혼합 사용시의 상대적 세포독성을 조사하기 위해 UVB blocker를 배지에 혼합하여 fibroblast에 직접적으로 contact 시킨 결과이나 화장품 처방내에 첨가되어 유화제품으로써 피부에 사용될 경우 이의 독성효과는 피부에의 흡수율 등을 감안할때 훨씬 감소될 것으로 사료된다. 이외에도 *in vitro* 실험시 cell에 대한 UVB blockers의 노출시간, medium내의 영양조건 등 요소가 결과치에 영향을 많이 주었을 것으로 생각된다. *in vitro* 독성실험은 일정 cell의 대사관계 및 상대적 독성비교에는 응용이 충분하지만, 일부의 세포나 조직에 대한 반응을 동물 전체의 반응으로 보는것은 *in vivo*에 상당할만한 data가 충분하게 표준화되어 있지 않은 현시점에서는 곤란한 문제로 더욱 많은 연구가 되어야 할 것으로 생각된다.

IV. 요약

UVB 자외선 차단제의 단일 및 혼합사용시 각 농도별 *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* KCTC 1039 에 대한 항균력 및 mouse fibroblast L929 에 대한 상대적 세포 자극 정도를 조사하였다.

1. Octyl Dimethyl PABA은 5.84% 에서 Gram(+)균, Gram(-)균에

- 넓은 항균 spectrum을 나타냈다.
2. Octyl Dimethyl PABA의 항균력은 4-Methylbenzylidene Camphor 에 의해 큰 영향을 받지 않으나, Octyl Methoxycinnamate 에 의해 불활성화가 큰폭으로 나타났다.
 3. UVB 자외선 차단제의 mouse fibroblast L929를 이용한 세포독성 실험에서는 MTT assay 보다 NR assay의 정량성이 우수했다.
 4. UVB 자외선 차단제의 혼합사용시 UVB 자외선 차단 측면에서는 synergistic 효과가 있다고 하나(29), Octyl Dimethyl PABA와 Octyl Methoxycinnamate의 혼합 사용시 항균력은 대체로 불활성화되고, 세포독성은 증가되었다.
 5. 대체로 항균력과 세포독성간에는 상관성이 없는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Phillip A. Berke, William E. Rossen, Cos. & Toi., 97(6), 49, (1982)
2. M. J. Forter, L.L. Nisonger, Ann. New York Acad. Sci., 53, 112, (1950)
3. H. J. Baker, J. Soc. Cosmet. Chem., 10, 3, (1959)
4. CTFA, "CTFA Technical guidelines" (Determination of adequacy of preservation of cosmetic and toiletry formulation ; p.1-3), CTFA Inc., (1973)
5. Phillip A. Berke and William E. Rosen, J. Soc. Cosmet. Chem., 31(1), 37, (1980)
6. D. S. Orth et al, Rational development of preservative systems for cosmetic products, Cos. & Toi., 104(10), 91-103, (1983)
7. D. S. Orth and L. R. Brueggen, Preservative Efficacy Testing of cosmetic products, Cos. & Toi., 97(5), 61-65, (1982)
8. D. S. Orth, J. Soc. Cosmet. Chem., 31, 165-172, (1980)
9. D. S. Orth, Cos. & Toi., 106(3), 45-51, (1991)
10. Draize, J. H., Woodward, G., and Calvery, H. O., J. Pharmacol. Exp. Ther. 82, 377-390(1944)

11. Paul M. Silber, Cos. & Toi., 106(4), 55-62, (1991)
12. Clonetics Corp., 9620 Chesapeake Dr., Suite 206, San Diego, CA 92123-1324 USA
13. Marrow-Tech., 10933 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037 USA