(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0079102
(43) 공개일자 2022년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/84 (2006.01) *A61K 8/27* (2006.01)
A61K 8/29 (2006.01) *A61Q 1/00* (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/84 (2013.01)
A61K 8/27 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0168538
(22) 출원일자 2020년12월04일
심사청구일자 2020년12월04일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
장지욱
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
이재성
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
변우진
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
특허법인더웨이브

전체 청구항 수 : 총 13 항

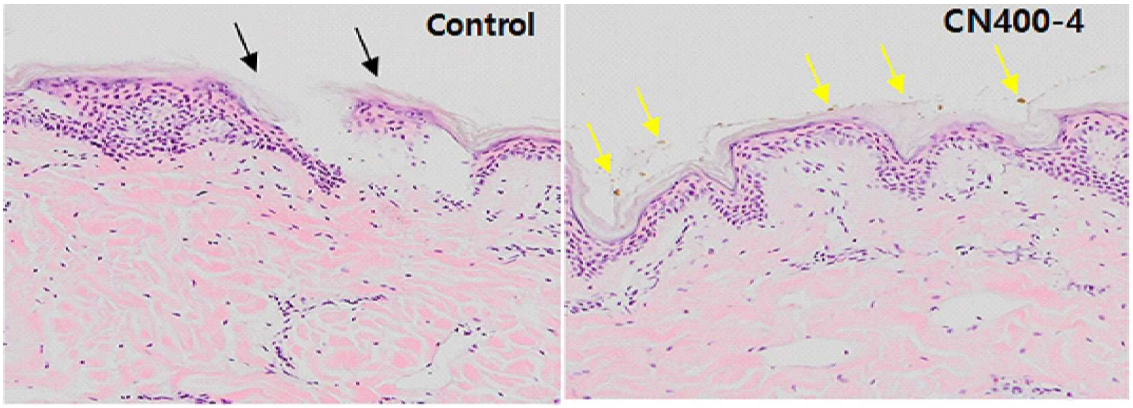
(54) 발명의 명칭 **폴리머 카본 나이트라이드를 포함하는 자외선 차단용 화장료 조성물**

(57) 요 약

폴리머 카본 나이트라이드를 포함하는 자외선 차단용 화장료 조성물 및 폴리머 카본 나이트라이드 및 무기 자외선 차단제를 병용하는 것을 특징으로 하는 자외선 차단용 조성물에 관한 것이다. 일 양상의 폴리머 카본 나이트라이드를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물은 이에 포함된 폴리머 카본 나이트라이드가 UVA 및 UVB를 모두

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도11



흡수할 수 있어, 자외선으로부터 효과적으로 피부를 보호할 수 있음과 동시에 무독성이므로 생체에 적합하며 광활성이 없어 생체에 적용되는 자외선 차단 용도의 화장료 조성물에 활용될 수 있다. 상기 폴리머 카본 나이트라이드와 무기 자외선 차단제를 병용하는 경우 UVA 및 UVB를 흡수하는 상승효과가 현저하게 일어나므로 자외선 차단 용도의 효과를 높이기 위하여 양자를 병용하여 활용이 가능하다. 조성물에 포함된 폴리머 카본 나이트라이드는 제조 방법에 따라 다양한 색상으로의 조절이 가능한 특징을 가지므로, 이를 활용하는 경우 원하는 색상의 화장료 조성물로의 조절이 가능하여 개개인의 피부톤에 따라 적합한 색상으로의 메이크업 효과를 제공할 수 있다.

(52) CPC특허분류
A61K 8/29 (2013.01)
A61Q 1/00 (2013.01)
A61Q 17/04 (2013.01)
A61K 2800/42 (2013.01)

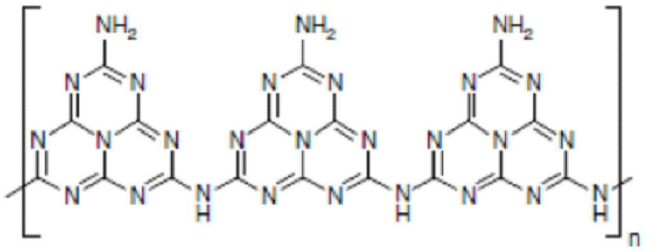
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 폴리머 카본 나이트라이드를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물

[화학식 1]



.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 유효성분은 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 35 중량%로 포함되는 것인 화장료 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 폴리머 카본 나이트라이드는 색상의 조절이 가능하며, 피부톤에 따라 적용가능한 것인 화장료 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 정제수, 점증제, 방부제, 안정화제, 용해화제, 계면활성제, 담제, 향료 또는 이들의 조합을 더 포함하는 것인 화장료 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 자외선 차단용인 것인 화장료 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 유기 자외선 차단제 및 무기 자외선 차단제로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 더 포함하는 것인 화장료 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 280 내지 400㎚의 파장을 가지는 빛 에너지를 흡수하는 것인 화장료 조성물.

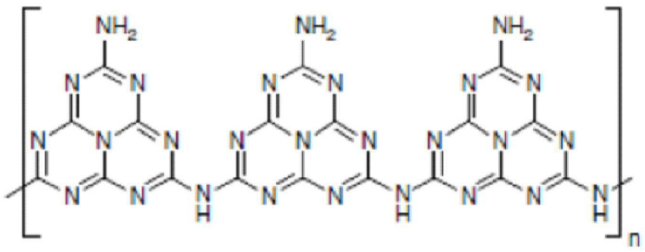
청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 화장수(스킨로션), 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스쳐 로션, 영양 로션, 마사지크림, 크림, 선크림, 영양 크림, 모이스쳐 크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양 에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 현탁액, 겔, 분말, 페이스트, 팩트, 마스크팩 또는 시트 또는 에어로졸로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 제형을 가진 것인 화장료 조성물.

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 폴리머 카본 나이트라이드 및 무기 자외선 차단제를 포함하고, 양자는 병용하는 것인 자외선 차단용 조성물

[화학식 1]



.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 폴리머 카본 나이트라이드는 색상의 조절이 가능하며, 피부톤에 따라 적용가능한 것인 자외선 차단용 조성물.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 무기 자외선 차단제는 티타늄디옥사이드, 또는 징크옥사이드 및 산화아연 중 1종 이상을 포함하는 것인 자외선 차단용 조성물.

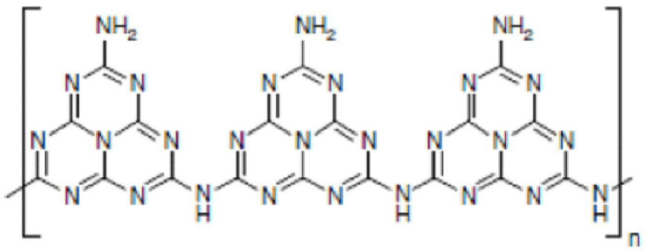
청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 조성물은 280 내지 400㎚의 파장을 가지는 자외선을 흡수하는 것인 자외선 차단용 조성물.

청구항 13

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 폴리머 카본 나이트라이드를 유효성분으로 함유하는 피부 외용제 조성물

[화학식 1]



.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 폴리머 카본 나이트라이드를 포함하는 자외선 차단용 화장료 조성물 및 폴리머 카본 나이트라이드 및 무기 자외선 차단제를 병용하는 것을 특징으로 하는 자외선 차단용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자외선은 280 ~ 400 나노미터 파장 범위의 태양광선으로서, 과량의 자외선에 노출될 경우에는 피부 노화, 화상,

피부암 등의 피부 손상이 유발될 수 있다. 특히, 320 ~ 400 나노미터 파장 범위의 UVA 는 표피의 피부 지질을 손상시키거나, 기저층의 멜라닌 색소를 유발함으로써, 피부 노화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 또한, 280 ~ 320 나노미터 파장 범위의 UVB 는 피부 홍반, 피부 화상 등을 유발하여 피부를 직접적으로 손상시키는 것으로 알려져 있다. 이에 따라, UVA 및 UVB 를 동시에 차단하여, 자외선으로부터 피부를 보호하기 위한 다양한 물질에 대한 개발이 요구되고 있다.

[0003] 특히 자외선(UV) 방사선에 과도하게 노출되면 피부암이 발생할 수 있고, 따라서 생명을 위협하는 질병과 피부 주름을 예방하기 위하여 자외선 차단제의 필요성이 높다. 자주 사용되는 두 가지 무기물 자외선 차단제는 산화아연(ZnO)과 이산화티탄(TiO2)이지만 이러한 무기물 자외선 차단제의 사용은 심각한 건강 문제를 야기한다. 이러한 광활성이 있는 금속 산화물 반도체 선크림은 UV 스펙트럼 차단제지만 이 과정에서 수산화기(·OH)와 과산화기(O2·-)를 생성한다. 이러한 고반응성 산소종(ROS)의 생성은 자외선 차단제의 유기성 첨가물을 분해했을 뿐만 아니라 피부 조직에 산화 스트레스를 유발하여 세포 수준에서 손상을 일으키고 DNA 변형과 염증 반응을 촉진할 수 있어 문제되고 있다.

[0004] 이에 상기와 같은 문제를 해소하면서 전체 UV 스펙트럼에 해당하는 빛 에너지를 모두 흡수하면서도, 동시에 생체 적합성을 가져 독성이 없는 자외선 차단용 조성물에 대한 수요가 높아지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

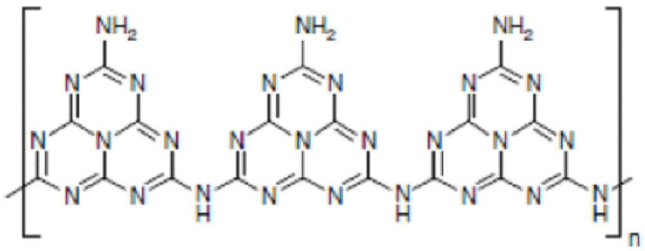
[0006] 일 양상은 폴리머 카본 나이트라이드(Polymeric carbon nitride: PCN)를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물 및 피부 외용제용 조성물을 제공한다.

[0007] 다른 양상은 폴리머 카본 나이트라이드 및 무기 자외선 차단제를 병용하는 것을 특징으로 하는 자외선 차단용 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 폴리머 카본 나이트라이드를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물 및 피부 외용제용 조성물을 제공한다.

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] 상기 화학식에 있어서 n은 정수로서, 예를 들면 1 내지 1,000,000 사이의 정수일 수 있다. 상기 화학식을 가지는 폴리머 카본 나이트라이드의 분자량은 예를 들면 약 200amu 내지 5,000,000 amu, 400 내지 4,000,000 amu, 600 내지 3,000,000 amu, 또는 800 내지 2,000,000 amu의 분자량을 가진 폴리머일 수 있다.

[0013] 상기 일 양상의 폴리머 카본 나이트라이드는 열적 화학적으로 매우 안정한 폴리머로서, 육안으로 흰색을 나타내고, 이는 조성물에 포함되는 경우 쉽게 분산이 가능한 특징을 가진다.

[0014] 일 양상의 폴리머 카본 나이트라이드는 색상의 조절이 가능하며, 피부톤에 따라 적용가능한 것인 화장료 조성물일 수 있다. 상기 폴리머 카본 나이트라이드는 적절한 당업계의 제조방법에 의하여 제조하는 경우 색상의 조절이 가능한 특징을 가지므로, 이를 활용하여 화장료 조성물을 제조하는 경우 원하는 색상으로 조절 및 제조가 가능하다. 상기 폴리머 카본 나이트라이드는 제조 방법에 따라 색상의 조절이 가능한 특징을 가지므로, 이를 활용

하는 경우 원하는 색상의 화장료 조성물로의 조절이 가능하여 개개인의 피부톤에 따라 적합한 색상으로의 화장료 조성물을 제조할 수 있다.

[0015] 용어 "화장료 조성물"은 인체를 청결, 미화하여 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키거나 피부, 모발의 건강을 유지 또는 증진하기 위하여 인체에 사용되는 물품을 의미한다. 상기 화장료 조성물은 자외선 차단용일 수 있다.

[0016] 상기 유효성분인 폴리머 카본 나이트라이드는 조성물 총 중량을 기준으로 약 0.001 내지 35 중량%, 0.1 내지 25 중량%, 0.5 내지 20 중량%, 1 내지 20 중량%, 5 내지 15 중량%, 5 내지 35 중량%, 1 또는 15 중량%의 양으로 포함될 수 있다. 상기 카본 나이트라이드 결정형의 함량이 상기 함량보다 낮으면 화장료 조성물에 자외선을 차단하는 효과가 나타나지 않으며, 상기 함량보다 높으면 조성물에서 제형 안정성이 낮아져 쉽게 화장료 조성물을 제조할 수 없다.

[0017] 상기 화장료 조성물은 상기 기재된 성분들 이외에도 보존제, 안정화제, 계면활성제, 점증제, 용해제, 보습제, 에몰리언트제, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 유화제, 산화 방지제, pH 조정제, 유기 및 무기 안료, 향료, 냉감제 및 제한제로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이상을 더 포함할 수 있으며, 예를 들면 당해 분야에서 통상적으로 이용되는 첨가물을 더 포함할 수 있다. 상기 보존제 등의 추가 성분의 배합량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업자가 용이하게 선정 가능하며, 그 배합량은 조성물 전체 중량을 기준으로 약 0.001 내지 30%(w/w)일 수 있으나, 당업자는 본 명세서에 따른 조성물의 유리한 특성이 예상된 첨가에 의해 악영향을 받지 않거나 실질적으로 받지 않도록, 임의의 추가 성분 및/또는 이의 양을 선택할 수 있다.

[0018] 상기 화장료 조성물은 유기 자외선 차단제 및/또는 무기 자외선 차단제를 추가적으로 더 포함할 수 있으며, 예를 들면, 에칠헥실메톡시신나메이트, 티타늄디옥사이드, 징크옥사이드, 부틸메톡시디벤조일메탄, 이소아밀p-메톡시신나메이트, 에칠헥실살리실레이트, 옥토크릴렌, 호모살레이트, 페닐벤즈이미다졸설포닉애씨드, 디에칠아미노하이드록시벤조일헥실벤조에이트, 폴리실리콘-15, 티타늄디옥사이드, 징크옥사이드 및 산화아연으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상을 함유할 수 있다. 상기 추가적인 자외선 차단제는 화장료 조성물 총 중량 대비 1-50 중량 %, 5-45중량%, 5-40 중량 %, 10-30 중량 %, 또는 15-25 중량 %로 포함되는 것일 수 있다.

[0019] 구체적으로, 상기 화장료 조성물은 무기자외선 차단제를 더 포함할 수 있으며, 조성물 총 중량 대비 그 무기자외선 차단제의 배합량은 조성물 전체 중량을 기준으로 약 0.001 내지 30%(w/w)이상으로 포함할 수 있다. 일 양상의 화장료 조성물은 무기 자외선 차단제를 더 포함 또는 병용하는 경우 상승 자외선 차단에 대한 상승효과가 나타나 효과적인 자외선 차단용 화장료 조성물로 제조할 수 있다.

[0020] 상기 화장료 조성물에 포함된 폴리머 카본 나이트라이드는 태양광선 중에서도 UV를 높은 흡수도로 흡수할 수 있으며, 예를 들면 320-400nm의 파장을 가지는 UVA 및 280-320nm의 파장을 가지는 UVB를 흡수하여 자외선으로 인한 피부 손상을 예방할 수 있다. 따라서, 상기 결정형 A 내지 G의 폴리머 카본 나이트라이드 결정형은 예를 들면 280 내지 400nm, 파장영역의 빛에너지를 강하게 흡수할 수 있다.

[0021] 상기 화장료 조성물은 화장수(스킨로션), 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처로션, 영양 로션, 마사지크림, 크림, 선크림, 영양 크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 현탁액, 겔, 분말, 페이스트, 팩트, 마스크팩 또는 시트 또는 에어로졸 조성물을 포함하는 제형으로 제조될 수 있다. 이러한 제형의 조성물은 당해 분야에서 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0022] 상기 피부외용제는 크림, 겔, 연고, 피부 유화제, 피부 현탁액, 경피전달성 패치, 약물 함유 붕대, 로션, 또는 그 조합일 수 있다. 상기 피부외용제는 통상 화장품이나 의약품 등의 피부외용제에 사용되는 성분, 예를 들면 수성성분, 유성성분, 분말성분, 알코올류, 보습제, 증점제, 자외선흡수제, 미백제, 방부제, 산화방지제, 계면활성제, 향료, 색제, 각종 피부 영양제, 또는 이들의 조합과 필요에 따라서 적절하게 배합될 수 있다. 상기 피부외용제는, 에데트산이나트륨, 에데트산삼나트륨, 시트르산나트륨, 폴리인산나트륨, 메타인산나트륨, 글루콘산 등의 금속봉쇄제, 카페인, 탄닌, 벨라파밀, 감초추출물, 글라블리딘, 칼린의 과실의 열수추출물, 각종생약, 아세트산토코페롤, 글리틸리틴산, 트라넥삼산 및 그 유도체 또는 그 염등의 약제, 비타민 C, 아스코르브산인산마그네슘, 아스코르브산글루코시드, 알부틴, 코지산, 글루코스, 프룩토스, 트레할로스 등의 당류등도 적절하게 배합할 수 있다.

[0023] 상기 피부는 얼굴, 손, 팔, 다리, 발, 가슴, 배, 등, 엉덩이, 및 두피를 포함하는 신체의 모든 피부 부위를 포함한다.

[0024] 일 양상의 조성물은 개체에 적용, 투여 및 도포할 수 있다. 상기 "개체"는 항균 및 소독을 필요로 하는 대상을

의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 모두 포함한다.

[0026] 다른 양상은 폴리머 카본 나이트라이드 및 무기 자외선 차단제를 포함하고, 양자는 병용하는 것인 자외선 차단용 조성물을 제공한다.

[0027] 상기 자외선 차단용 조성물에 포함된 폴리머 카본 나이트라이드는 색상의 조절이 가능하며, 피부톤에 따라 적용 가능한 것일 수 있다. 상기 폴리머 카본 나이트라이드는 제조 방법에 따라 색상의 조절이 가능한 특징을 가지므로, 이를 활용하는 경우 원하는 색상의 자외선 차단용 조성물로의 조절이 가능하다. 일 구체예에 따른 폴리머 카본 나이트라이드를 자외선 차단용 조성물의 제조 시 당업계에서 활용하는 적절한 방법에 의하여 제조하는 경우 색상의 조절이 가능하여 개개인의 피부톤에 따라 적합한 색상으로의 자외선 차단용 조성물을 제조할 수 있다.

[0028] 상기 무지 자외선 차단제는 티타늄디옥사이드, 또는 징크옥사이드 및 산화아연 중 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0029] 또한 상기 폴리머 카본 나이트라이드 및 무기 자외선 차단제를 병용하는 경우에는 중에서도 UVA 및 UVB를 흡수하는 상승효과가 현저하게 일어나므로 UV를 높은 흡수도로 흡수할 수 있는 특징을 가질 수 있다. 본 명세서에서 “병용”의 의미는 조성물 내에 폴리머 카본 나이트라이드 및 무기 자외선 차단제를 동시에 포함하는 것을 의미한다.

[0030] 상기 조성물이 흡수하는 자외선은 280 내지 400nm의 파장을 가지는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0031] 일 양상의 폴리머 카본 나이트라이드를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물은 이에 포함된 폴리머 카본 나이트라이드가 UVA 및 UVB를 모두 흡수할 수 있어, 자외선으로부터 효과적으로 피부를 보호할 수 있음과 동시에 무독성이므로 생체에 적합하며 광활성이 없어 생체에 적용되는 자외선 차단 용도의 화장료 조성물에 활용될 수 있다. 상기 폴리머 카본 나이트라이드와 무기 자외선 차단제를 병용하는 경우 UVA 및 UVB를 흡수하는 상승효과가 현저하게 일어나므로 자외선 차단 용도의 효과를 높이기 위하여 양자를 병용하여 활용이 가능하다. 조성물에 포함된 폴리머 카본 나이트라이드는 제조 방법에 따라 다양한 색상으로의 조절이 가능한 특징을 가지므로, 이를 활용하는 경우 원하는 색상의 화장료 조성물로의 조절이 가능하여 개개인의 피부톤에 따라 적합한 색상으로의 메이크업 효과를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1A는 일 양상에서 기재된 제조 방법을 통해 폴리머 카본 나이트라이드를 제조한 경우, 다양한 색상의 결정형을 제조할 수 있음을 나타낸 도면이다.

도 1B는 종래 노란색인 폴리머 카본나이트라이드에서 일 양상에서 기재된 제조 방법을 통해 폴리머 카본 나이트라이드를 제조한 경우 흰색의 폴리머 카본나이트라이드를 제조할 수 있음을 확인한 도이다.

도 2는 CN-400-4 및 CN-550-2 샘플에 대한 X 선 광전자 분광법으로 확인한 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 3은 자외선 차단 응용을 위해 선택된 PCN 샘플인 CN-400-4 및 CN-550-2의 X-선 회절 분석(XRD)을 통해 확인한 결과(도 3A), CN-350-2, CN-400-0.5, CN-400-1, CN-400-2, 및 CN-400-8의 XRD 패턴과 CN-400-4 및 CN-550-2의 XRD를 확인한 결과(도 3B) 및 축중합 온도를 400으로 한 PCN의 XRD를 확인한 결과(도 3C)를 나타낸 도이다.

도 4는 PCN 샘플의 화학 구조를 FT-IR 분광법으로 확인한 결과로서, CN-400-4 및 CN-550-2의 IR를 확인한 결과(도 4A), CN-350-2, CN-400-0.5, CN-400-1, CN-400-2, CN-400-8, CN-400-4 및 CN-550-2의 IR 값을 동시에 확인한 결과(도 4B)에 나타낸 결과를 확인한 도이다.

도 5는 CN-400-4를 SEM 현미경으로 표면을 확인한 결과(도 5A), TEM 현미경으로 확인한 결과(도 5B). AFM 현미경으로 확인한 결과(도 5C) 및 이의 입자의 높이를 확인한 결과(도 5D)에 나타낸 도이다.

도 6은 CN-400-2를 SEM 현미경으로 표면을 확인한 결과(도 6A), TEM 현미경으로 확인한 결과(도 6B). AFM 현미

경으로 확인한 결과(도 6C) 및 이의 입자의 높이를 확인한 결과(도 6D)에 나타낸 도이다.

도 7은 CN-550-2를 SEM 현미경으로 표면을 확인한 결과(도 7A), TEM 현미경으로 확인한 결과(도 7B). AFM 현미경으로 확인한 결과(도 7C) 및 이의 입자의 높이를 확인한 결과(도 7D)에 나타낸 도이다.

도 8은 합성된 PCN의 ROS 생성 경향은 염료 그라데이션 포텐셜 값을 분석하여 상용 TiO_2 및 ZnO 입자와 비교하는 실험을 수행한 결과와 UVR 흡수 효과를 확인한 결과와 본 발명의 조성물과 상용화된 자외선 차단제 조성물과 병용한 경우의 투과 스펙트럼을 확인한 결과이며, ROS와 RhB의 반응을 확인한 결과(도 8A), 쿠마린 용액 및 형광 7- 하이드록시 쿠마린 화합물의 형광 스펙트럼을 확인한 결과(도 8B), PCN, TiO_2 및 ZnO에 대한 UV-Vis 확산 반사 스펙트럼을 확인한 결과(도 8C)와, 10 wt%의 PCN와 SPF 지수 15를 가지는 종래의 자외선 차단 조성물을 병용한 경우, 조성물의 투과 스펙트럼을 확인한 결과(도 8D)를 나타낸 도이다.

도 9는 PCN을 사용한 경우 세포 독성을 확인한 것으로, 배아 섬유아세포 세포주인 NIH-3T3 세포로 3-(4,5- 디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT) 분석으로 평가하고 결과(도 9A) 및 동일한 실험조건으로 양성 대조군으로 ZnO를 사용하고, 이를 통한 실험 결과(도 9B) 및 인간 피부 섬유아세포인 HS-68 세포주에서 세포 생존율을 확인하는 실험을 수행한 결과(도 9C)를 나타낸 도이다.

도 10은 CN-400-4을 사용한 경우 세포에서의 생존력을 Life/Dead세포 이미징으로도 평가한 결과(도 10A 및 10B)와 ROS 지표인 dihydroxyethidium (DHE)을 시각화에 사용하고, 이를 확인한 결과(도 10C)를 확인한 도이다.

도 11은 FCM에서 CN-400-4을 처리하여 4 시간 배양한 경우를 미처리군인 대조군과 비교하여 피부 손상 정도를 확인하기 위한 H&E 염색을 수행하고, 이를 확인한 결과를 확인한 도이다.

도 12는 CN400-4의 도포한 경우 및 대조군인 미처리군의 피부 표면의 형태를 관찰하기 위해 FCM의 단면을 SEM으로 확인한 결과를 확인한 도이다.

도 13은 CN400-4 패치의 반응을 피험자에게 첩포시험하여 피부자극을 평가한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 본 발명의 여러 실험예 및 실시예들의 각각 특징들이 부분적으로 또는 전체적으로 서로 결합 또는 조합 가능하며, 당업자가 충분히 이해할 수 있듯이 기술적으로 다양한 연동 및 구동이 가능하며, 각 실험예 및 실시예들이 서로에 대하여 독립적으로 실시 가능할 수도 있고 연관 관계로 함께 실시 가능할 수도 있다.

[0035] 구성요소를 해석함에 있어서, 별도의 명시적 기재가 없더라도 오차 범위를 포함하는 것으로 해석한다.

[0036] 본 발명의 실험예 및 실시예를 설명하기 위한 도면에 개시된 형상, 크기, 비율, 각도, 개수 등은 예시적인 것이므로 본 발명이 도시된 사항에 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명은 생략한다. 본 명세서 상에서 언급된 '포함한다', '갖는다', '이루어진다' 등이 사용되는 경우 '~만'이 사용되지 않는 이상 다른 부분이 추가될 수 있다. 구성요소를 단수로 표현한 경우에 특별히 명시적인 기재 사항이 없는 한 복수를 포함하는 경우를 포함한다.

[0038] 이하 실험예 및 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실험예 및 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실험예 및 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0040] **실시예 1. 실험재료의 확인**

[0041] TiO2 (P-25, Degussa)는 Degussa사에서 구입했으며 ZnO는 Alfa-Aesar사에서 구입하였다. 자외선 차단제인 아보벤존 (Avobenzone, 카탈로그 번호 PHR 1073) 및 옥시벤존 (Oxybenzone, 카탈로그 번호 H36206)의 유기 UV 필터 성분은 Sigma-Aldrich (미국)에서 구입하였다.

[0042] 보습 크림은 니베아에서, 선크림은 비오템 lait solaire hydratant SPF 15를 구입하여 사용하였다.

[0043] Dulbecco의 Modified Eagle 's Medium (DMEM), 인산염 완충 식염수 (PBS) 1X pH 7.4 용액, 소 태아 혈청 (FBS), 페니실린/스트렙토마이신 및 NIH-3T3 세포 배양에 대한 live/dead 분석은 Gibco by Life technologies

에서 구입하였다. 디하이드록시에티듐 (Dihydroxyethidium : DHE) 및 중성 완충 포르말린 용액 (NBF 용액, 10 %)은 미국 Sigma Aldrich에서 구입하였다. 3- (4,5-디메틸티아졸-2-일) -2,5- 디페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT)는 ACROS Organics에서 구입했습니다. Mitotracker deep red는 미국 Thermo fisher에서 구입하였다. 인공 피부는 대한민국 APURES Co. Ltd의 Micropig® Franz Cell Membrane (FCM)에서 구입하여 사용하였다.

[0045] **실시예 2. 폴리머 카본 나이트라이드(Polymeric carbon nitride: PCN)의 합성**

[0046] 본 실시예에서 사용한 PCN은 주변 압력 하에서 Aldrich에서 구입한 농도가 99%의 요소(Urea)를 열처리하여 준비하였다. 전구체로는 멜라민(Melamine), 디시안디아미드(Dicyandiamide), 사이안아마이드(Cyanamide), 요소(Urea)를 사용하였으며 전구체를 가열로(Chamber Furnace UAF, Lenton)에 넣어 450 ℃ 내지 550 ℃의 온도 조건으로 0.5 시간 내지 8시간 동안 Muffle Furnace (Chamber Furnace UAF, Lenton)에 넣고 가열하여 축중합 반응을 완료하였다. 생성물을 탈이온수로 세척하여 잔류 종(species)을 제거한 다음 80 ℃에서 밤새 건조시켜 하기 실시예에서 사용하는 PCN을 제조하였다. 상기와 같은 일 양상의 방법으로 제조하여 최종적으로 확인된 PCN을 도 1A 및 도 1B에 나타내었다. 도 1A에 나타낸 바와 같이, 일 양상의 방법으로 제조된 결정형의 경우, 온도 조건이나 제조 과정에서 첨가제를 넣음으로 인해, 다양한 색상으로 제조할 수 있었다. 또한, 도 1B에서 확인한 바와 같이, 종래의 방법 대비 일 양상의 방법을 통하여 제조한 경우 종래의 노란색에서 흰색을 PCN이 제조될 수 있음을 확인하였으며, 이와 같이 제조된 흰색의 PCN은 제조된 용액 내에서 쉽게 분산이 되는 것을 확인하였다. 이하 본 실시예에서 제조된 PCN으로 이의 특성을 확인하는 실험을 수행하였다.

[0048] **실시예 3. 결정화를 중심으로 PCN의 물리적 특성의 확인**

[0049] **3.1 PCN의 광전자 분광법 (XPS)을 통한 특성의 확인**

[0050] PCN 기반 UV 필터에 기반한 구조를 X 선 광전자 분광법 (XPS)으로 확인하였다. CN-400-4 및 CN-550-2 샘플에 대한 스펙트럼을 도 2에 나타내었다.

[0051] 도 2의 데이터를 통해 샘플 표면의 C, N 및 O 원소의 상대 원자 %를 그에 따라 계산하였다. 도 1에서 확인한 바와 같이, 스캔 스펙트럼을 통해 두 샘플 모두에 탄소, 질소 및 산소가 포함되어 있음을 확인하였다. CN-400-4에 있어서, C는 288eV에서, N은 398eV에서, O는 531eV에서 피크가 나타나는 확인하였다. CN-550-4에 있어서, C는 288eV에서, N은 398eV에서, O는 532eV에서 피크가 나타나는 확인하였다. 상기 도 2에 있어서, CN-550-2 샘플의 작은 산소 피크는 이 샘플에 존재하는 부분적으로 중합된 미량의 요소 때문에 발생하게 되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, CN-400-4에 대한 XPS 스펙트럼에서는 상당히 높은 농도의 산소가 관찰되었고, 고농도의 산소는 부분적으로 중합된 요소에서 화학적으로 결합된 산소 종(species) 때문임을 확인할 수 있었다.

[0053] **3.2 PCN의 X-선 회절 분석(XRD)을 통한 특성의 확인**

[0054] 다양한 물리적, 화학적, 광학적 및 전자적 구조 특성을 가진 다양한 PCN를 서로 다른 중합조건에서 공기 중 요소의 열 응축을 통해 합성되었다. 제조된 중합된 카본 질화물은 트리아진 기반 결정 구조를 가지므로, 최종 제품은 고분자질화탄소 (polymeric carbon nitride : PCN)로 특성화할 수 있었다. X 선 회절 (X-ray diffraction : XRD) 패턴을 40kV 및 30mA에서 모노크로메이트된 (monochromated) Cu Kα (l = 0.1541nm) 방사선을 사용하는 X선 회절계 (X'Pert PRO MPD, PANalytical)로 수집하였다.

[0055] X-선 회절 분석(XRD)을 통해 대기압 하의 다양한 온도에서 축중합 공정에 의해 제조된 PCN 샘플의 결정 구조를 분석하였다. 자외선 차단 응용을 위해 선택된 PCN 샘플인 CN-400-4 및 CN-550-2의 XRD를 확인한 결과를 도 3A에 이외 PCN 샘플과 함께 CN-350-2, CN-400-0.5, CN-400-1, CN-400-2, 및 CN-400-8의 XRD 패턴과 CN-400-4 및 CN-550-2의 XRD를 확인한 결과를 도 3B에 나타내었고, 축중합 온도를 400으로 한 PCN의 XRD를 확인한 결과를 도 3C에 나타내었다.

[0056] 도 3A에서 확인한 바와 같이, 400℃에서 4시간 동안 축중합된 PCN인 CN-400-4는 다른 불순물상 없이 두 개의 뚜렷한 회절 피크가 10.7656° 및 27.4316° 에서 나타나는 것을 확인하였다. 또한 550 ℃ 에서 2 시간 동안 축중합하여 제조한 PCN인 CN-550-2의 XRD 패턴은 다른 불순물상 없이 두 개의 뚜렷한 회절 피크가 13.6516° 및 27.4316° 에서 나타나는 것을 확인할 수 있었다. CN-550-2 샘플의 XRD 패턴은 (002) 플레인에서 27.4° 에 강

한 피크를 가지는 벌크 그래피틱 카본 나이트라이드(g-C3N4) 와 유사한 것을 확인하였고, 이는 0.326 nm d-spacing을 갖는 접합된 방향족 세그먼트의 층간 적층에 기인한 것임을 확인하였다. 이러한 층간 적층을 통하여 CN-550-2 샘플이 결정질 흑연 (d = 0.335 nm)과 유사하고 그래핀 단위 (d = 0.353 nm)가 있는 탄소의 패킹보다 더 단단하여 PCN이 구조적 안정성이 나타나는 것임을 확인하였다.

[0057] (100) 플레인의 13.6516 ° 에서 약한 피크는 CN-550-2 샘플에 대해 반복된 단위가 0.618 nm 인 평면 구조 패킹 모티프에 해당하는 것이나, CN-400-4를 비롯한 기타 PCN의 XRD 패턴에서는 누락된 것을 확인할 수 있었다.

[0058] 이는 하소 온도가 400 ℃ 이하일 때 요소의 불완전하거나 부분적인 중축합 때문임을 확인할 수 있었다. XRD 결정 구조 결과의 평가에서 CN-400-4 및 CN-550-2 샘플에 포함된 요소가 벌크 g-C3N4으로의 각각 부분적 및 완전한 변환이 이루어지게 됨을 확인하였다. 이것은 주로 더 높은 온도에서 요소가 완전한 열 응축이 이루어지기 때문임을 확인하였다.

[0059] 도 3B에서 확인한 바와 같이, 350℃에서 2시간 동안 축중합된 PCN인 CN-350-2은 10.7656° , 19.8006° , 29.7456° 에서 나타나는 것을 확인하였고, 400℃에서 0.5시간 동안 축중합된 PCN인 CN-400-0.5은 10.7396° , 29.7456° 에서 나타나는 것을 확인하였고, 400℃에서 1시간 동안 축중합된 PCN인 CN-400-1은 10.7006° , 22.1406° , 27.8606° 에서 나타나는 것을 확인하였고, 400℃에서 2시간 동안 축중합된 PCN인 CN-400-2은 10.6356° , 27.8216° 에서 나타나는 것을 확인하였고, 400℃에서 4시간 동안 축중합된 PCN인 CN-400-4은 10.7266° , 27.5096° 에서 나타나는 것을 확인하였고, 400℃에서 8시간 동안 축중합된 PCN인 CN-400-8은 27.1586° 에서 나타나는 것을 확인하였고, 550℃에서 2시간 동안 축중합된 PCN인 CN-550-2은 13.8076° , 27.1586° 에서 나타나는 것을 확인하였다.

[0060] 또한 도 3C에서 확인한 바와 같이, 400℃에서 0.5시간 동안 축중합된 PCN인 CN-400-0.5은 10.7526° , 29.9146 ° 에서 나타나는 것을 확인하였고, 400℃에서 1시간 동안 축중합된 PCN인 CN-400-1은 10.6746° , 27.7956° 에서 나타나는 것을 확인하였고, 400℃에서 2시간 동안 축중합된 PCN인 CN-400-2은 10.6876° , 27.7046 ° 에서 나타나는 것을 확인하였고, 400℃에서 4시간 동안 축중합된 PCN인 CN-400-4은 10.7266° , 27.3666° 에서 나타나는 것을 확인하였고, 400℃에서 8시간 동안 축중합된 PCN인 CN-400-8은 27.2236° 에서 나타나는 것을 확인하였다.

[0062] **3.3 PCN의 FT-IR 분광법을 통한 특성의 확인**

[0063] PCN의 결정 구조 분석을 구체적으로 확인하기 위하여, PCN 샘플의 화학 구조를 FT-IR 분광법으로 확인하기 위하여 FT-IR 스펙트럼을 CN-400-4 및 CN-550-2의 IR를 확인한 결과를 도 4A에 나타내고, CN-350-2, CN-400-0.5, CN-400-1, CN-400-2, CN-400-8, CN-400-4 및 CN-550-2의 IR 값을 동시에 확인한 결과를 도 4B에 나타내었다.

[0064] 도 4A에서 확인한 바와 같이, CN-550-2는 810cm^{-1}, 890cm^{-1}, 1240cm^{-1}, 1317cm^{-1}, 1410cm^{-1}, 1456cm^{-1}, 1560cm^{-1}, 1635cm^{-1}, 3250cm^{-1}에서 값이 나타나는 것을 확인하였다. CN-400-4는 808cm^{-1}, 1270cm^{-1}, 1323cm^{-1}, 1420cm^{-1}, 1560cm^{-1}, 1612cm^{-1}, 3105cm^{-1}, 3330cm^{-1}에서 값이 나타나는 것을 확인하였다. CN-550-2의 FTIR 스펙트럼은 벌크 g-C3N4의 스펙트럼과 유사하지만 CN-400-4 샘플 (400 ℃에서 4 시간 동안 열 응축)의 흡수 대역은 넓은 피크가 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 IR 피크를 확인한 결과를 XRD 연구와 유사하게 FT-IR 분석은 중간 생성물 형성과 불완전 중합도 때문임을 확인할 수 있었다.

[0065] 도 4B에서 확인한 바와 같이, CN-350-2는 775cm^{-1}, 1417cm^{-1}, 1456cm^{-1}, 1691cm^{-1}, 1730cm^{-1}, 3074cm^{-1}, 3311cm^{-1}에서 값이 나타나는 것을 확인하였다. CN-400-0.5는 777cm^{-1}, 1677cm^{-1}, 1735cm^{-1}, 3085cm^{-1}, 3315cm^{-1}에서 값이 나타나는 것을 확인하였다. CN-400-1는 777cm^{-1}, 1467cm^{-1}, 1666cm^{-1}, 1734cm^{-1}, 3120cm^{-1}, 3320cm^{-1}에서 값이 나타나는 것을 확인하였다. CN-400-2는 777cm^{-1}, 1465cm^{-1}, 1660cm^{-1}, 1734cm^{-1}, 3085cm^{-1}, 3330cm^{-1}에서 값이 나타나는 것을 확인하였다. CN-400-4는 810cm^{-1}, 1270cm^{-1}, 1420cm^{-1}, 1612cm^{-1}, 3105cm^{-1}, 3330cm^{-1}에서 값이 나타나는 것을 확인하였다. CN-400-8는 810cm^{-1}, 1265cm^{-1}, 1325cm^{-1}, 1417cm^{-1}, 1618cm^{-1}, 3230cm^{-1}에서 값이 나타나는 것을 확인하였다. CN-550-2는 810cm^{-1}, 1240cm^{-1}, 1317cm^{-1}, 1410cm^{-1}, 1560cm^{-1}, 1635cm^{-1}, 3250cm^{-1}에서 값이 나타나는 것을 확인하였다.

[0067] **실시예 4. PCN의 표면 형태 및 미세 구조의 확인**

[0068] 주사 전사 현미경(SEM) 이미지는 전계 방출 (field emission: FE)-SEM (JEOL JSM-7401F, JEOL)으로 수득하였다. 분말 샘플을 스퍼터(Hitachi Sputter, E-1045)에 의해 얇은 Pt 층으로 코팅하고 주사 전자 현미경(SEM)으로 검사하였다.

[0069] 이질적인 UV 필터 입자의 표면은 자외선 차단제를 함유하는 금속 산화물에서 일반적으로 우려되는 불투명도를 해소하는 자외선 차단제를 제조하는데 중요한 역할을 한다. CN-400-4, CN-400-2 및 CN-550-2의 표면 형태 및 미세 구조를 확인하기 위하여, 전계 방출 주사 전자 현미경 (FE-SEM) 및 투과 전자 현미경 (TEM)으로 분석하였고, 원자력 현미경 (AFM)으로 확인한 결과, 및 이를 통해 합성된 PCN 2D 얇은 나노 시트의 두께를 측정한 결과를 각각 도 5, 6 및 7에 나타내었다.

[0070] 도 5A, 6A, 및 7A에서 확인한 바와 같이, FE-SEM 현미경 사진은 상대적으로 거친 표면 형태를 가진 계층 구조 폴리머 스캐폴드를 표시하여 두 샘플의 시트 구조에 기여하는 것을 확인하고, 이를 통해 중합 조건과 관련된 PCN의 거친 표면 형태를 확인하였다. 도 5B, 6B, 및 7B에서 확인한 바와 같이 TEM 이미지에서 3가지 PCN 샘플은 모두 표면에 약간의 잔물결과 주름이 있는 구겨진 2 차원 나노 시트인 것을 확인할 수 있었고, TEM 이미지는 또한 PCN 시트가 시트 크기가 수 나노 미터에서 마이크로 미터까지 다양한 매끄러운 질감으로 높은 투명도를 가지고 있음을 확인하였다.

[0071] 도 5C 내지 5D, 6C 내지 6D, 및 7C 내지 7D에서 확인한 바와 같이, AFM 이미지 및 해당 높이 프로필을 분석한 결과, CN-400-4 및 CN-550-2 샘플에서는 PCN 2D 나노 시트의 두께가 ~ 4nm로, CN-400-2 샘플에서는 나노 시트의 두께가 ~ 5nm로 세가지 샘플 모두 피부 표면을 효과적으로 커버하는데 유용한 나노 시트의 두께를 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

[0073] **실시예 5. 활성 산소 종의 정량 및 정성 분석을 통한 PCN의 ROS 생성 억제 효과의 확인**

[0074] **5.1 광화학 염료 분해**

[0075] RhB의 광촉매 분해는 Pyrex 반응기에서 수행되었고, 광원으로는 1 태양 필터 (Oriel)가 장착된 300W Xe 램프 (Xe Arc 램프 소스, Oriel)를 사용하였다. 광도를 실리콘 검출기 (Peccell Technologies, Japan)를 사용하여 100mW / cm^2로 측정하였다. 10mg의 분말을 100mL의 탈이온수및 1mg의 RhB를 포함하는 RhB 용액에 첨가한 다음 10분 동안 초음파로 분산시켰다. 흡착/탈착 평형을 확인하기 위해 현탁액을 어두운 곳에서 24 시간동안 계속 교반하면서 보관하였다. 24 시간 후, 조명을 가하고 RhB의 광촉매 분해를 수행하였다. 평형 점을 포함하여 1시간의 반응 동안 10 분 간격으로 5mL의 현탁액을 추출하였다. 추출된 현탁액을 20분동안 원심 분리하여 분말을 침전시켰다. 원심 분리 후, UV-3600, Shimadzu를 사용하여 UV-Vis 스펙트럼으로 상기 용액의 흡광도를 수집하였다. 광촉매 활성을 552nm의 흡수 피크 강도 변화와 비교하였다.

[0077] **5.2 형광 프로브 방법**

[0078] OH 라디칼을 형광 프로브 방법을 사용하여 측정하였다. 쿠마린(Coumarin)은 OH 라디칼과 반응하여 455nm에서 형광 피크를 갖는 움벨리페론(umbelliferone)을 형성하므로 자외선 차단제에서 TiO_2, ZnO 및 PCN에 의해 생성되는 OH 라디칼을 감지하기 위해 쿠마린을 사용하였다. 따라서, 이 방법을 사용하면 모든 샘플의 455nm에서 형광 강도를 비교하여 어떤 샘플이 더 높은 농도의 OH 라디칼을 생성하는지 알 수 있었다. 50mg의 TiO_2, ZnO 및 PCN을 20mL의 0.03mM 쿠마린 용액에 첨가하였다. 현탁액은 1 개의 태양 필터가 있는 Xe Lamp에서 100mW/cm^2의 강도로 120 초 동안 조사되었다. 조사 전 및 조사 후 60 초 및 120 초에 5mL의 현탁액을 추출하였다. 추출 된 현탁액을 20분 동안 원심분리 하였다. 그리고 움벨리페론의 형광 스펙트럼은 형광 강도 측정기(Cary Eclipse, Varian)로 얻었다. 이후 455nm에서의 형광 강도가 보정을 통해 움벨리페론에 비례하는지 확인하였다.

[0080] **5.3 상용된 UV 필터에 활용되는 TiO2 및 ZnO와의 비교를 통한 PCN의 ROS 생성 억제 효과의 확인**

[0081] 일부 무기, 고분자 및 생체 접착성 물질의 매트릭스 내 UV 필터의 캡슐화 또는 코팅은 ROS의 생성을 방지할 수

는 없지만 효과적으로 제거할 수 있는 것으로 알려져 있다. 다만, UV 필터를 100 % 캡슐화하는 것은 쉬운 과정이 아니며 UV 필터의 덮개가 없는 경우, 표면은 여전히 ROS를 생성할 수 있으므로, ROS 생성을 방지하기 위하여, 고효율 플랫 밴드 위치 엔지니어링 PCN UV 필터를 제조하였다. PCN에서 생성된 ROS의 농도는 낮은데, 이는 바람직하지 않은 플랫 밴드 위치 (전도 밴드 (CB) 및 원자가 밴드 (VB))로 인해 O2와 H_2O를 각각 O_2·- 및 ·OH로 환원 및 산화시키기 때문이며, 따라서 발생한 ROS의 감금은 필요하지 않다. UV 필터에 대한 광생성 ROS의 농도는 상업용 자외선 차단제에서 UV 필터의 적용에 결정적인 역할을 하므로 높은 수준의 감도와 정확성 O_2·- 및 ·OH의 정성 및 정량적 평가를 위해 많은 ROS 분석 방법이 적용하였다. ROS 생성을 정확히 측정하기 위하여 화학적 분석, 직접 염료 분해, 형광 제품 검출에 의한 광 발광 분광법 및 UV 가시 흡수 분광법으로 정량화 분석을 수행하였다.

[0082] 합성된 PCN의 ROS 생성 경향은 염료 그라데이션 포텐셜 값을 분석하여 상용 TiO_2 및 ZnO 입자와 비교하는 실험을 수행하고 이를 도 8에 나타내었다. 1 차 ROS는 반응성이 높아 반응 용액에 존재하는 유기 분자 또는 염료와 빠르게 반응하였고, 합성된 PCN과 비교하여 이러한 상용화된 UV 필터의 광촉매 염료 분해 경향을 UV 가시 광선 조사 하에서 수용액에서 로다민 B (rhodamine B:RhB)의 광분해를 확인하여, ROS 생성을 평가했습니다. 합성된 필터와 및 상용 UV 필터에 대한 ROS와 RhB의 반응을 도 8A에 나타내었다.

[0083] 도 8A에서 확인한 바와 같이, PCN 현탁액에서 느린 RhB 염료 분해 속도는 광 조사시 PCN 나노 시트에서 ROS 생성량이 상당히 작은 것을 확인하였다. 그러나 에서는 강한 광화학 염료 분해 활성을 확인할 수 있었다. 특히 도 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, TiO_2 입자가 RhB 용액에 첨가되었을 때, 60 분의 조사 이후에 거의 50 %의 RhB 분해가 나타났고, ZnO 입자가 첨가된 경우는 약 95 %까지 염료 분해가 나타나, 이러한 금속 산화물의 경우에서는 ROS 생성률이 높은 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통하여 TiO_2 및 ZnO는 ROS (O_2 ·- 및 ·OH)를 모두 생성하기에 적합한 플랫 밴드 위치를 가지고 있는 반면 PCN은 ·OH를 생성하는 데 비효율적이고 O_2·-생성 가능성이 거의 없음을 확인할 수 있었다.

[0084] UV 필터에 대한 ·OH 및 O_2·- 라디칼 농도를 추가로 정량화하기 위해 광 발광 분광법(photoluminescence spectroscopy)과 XTT 비색 실험을 각각 수행하였다. PCN, TiO_2 및 ZnO 현탁 용액에서 UV 가시 광선 조사 하 1 시간 및 2 시간 동안 반응시킨 후, 쿠마린과 ·OH의 반응에서 생성된 쿠마린 용액 및 형광 7- 하이드록시 쿠마린 화합물의 형광 스펙트럼을 확인하고 이를 도 8B에 나타내었다.

[0085] 도 8B에서 확인한 바와 같이, 7- 하이드록시 쿠마린에 대한 λ455 nm에 해당하는 점선 화살표는 광화학 반응 과정에서 ·OH 라디칼 농도의 상승에 따른 피크 강도의 증가를 나타내는 것이며, 이는 광 화학 반응 과정 동안 ·OH 라디칼의 농도가 상승하는 것과 동일한 결과를 나타내는 것임을 확인하였다. 염료 분해 실험에 대한 결과인 도 8A과 도 8B에서 확인한 바와 같이, 광 발광 실험 결과로 ZnO가 가장 광활성 물질임을 확인할 수 있었다. ·OH 라디칼의 농도는 탈 이온수에서 7-hydroxycoumarin에 대한 검량선을 사용하여 정량화되었습니다. 이러한 결과를 통하여, 제조한 PCN 으로 제조된 UV 필터는 OH 라디칼 생성량이 없거나 무시할 수 있을 정도로 적어 ·OH 라디칼 생성을 하지 않으므로, 합성된 PCN UV 필터는 발암성 ROS이 없이 활용할 수 있음을 확인하였다.

[0086] 상기 실시예에서 확인한 바와 같이, ROS 분석 결과를 통하여 PCN UV 필터는 상용화 된 TiO_2 및 ZnO UV 필터보다 훨씬 적게 ROS 생성을 하고, 이러한 생성된 ROS의 양은 ROS 생성이 없다고 볼 수 있을 정도이므로, ROS 생성을 억제하기 위해 표면 차폐 및 캡슐화가 필요하지 않고 바로 자외선을 차단할 수 있는 제품에 사용할 수 있음을 확인하였다.

[0088] **실시예 6. 자외선차단제로서 PCN이 가지는 흡광도와 투과도 및 자외선 차단 계수**

[0089] **6.1 UVR 흡광도 측정**

[0090] 분말 샘플의 UV-Vis 확산 반사 스펙트럼은 적분구 (ISR-240A, Shimadzu)가 장착 된 UV-Vis 확산 반사 분광광도계 (UV-3600, Shimadzu)를 사용하여 얻었고, $BaSO_4$를 기준으로 사용하였다. 샘플의 밴드 갭 에너지를 확산 반사 스펙트럼의 Kubelka-Munk 변환으로 인한 Tauc- 플롯에 의해 결정하였다.

[0092] **6.2 자외선 차단 계수 (SPF) 및 자외선 A (PA)로부터의 보호 측정.**

[0093] CN 샘플을 24시간 동안 600rpm에서 자기 교반기를 사용하여 보습 크림 또는 선 스크린과 혼합하였다. 전체 블렌딩 프로세스를 어두운 방에서 실온에서 진행하였다. CN과 기존 UV 필터 성분 간의 시너지 효과를 조사하기 위해 아보벤존과 옥시벤존을 선택하였다. CN과 UV 필터는 동시에 크림과 혼합되었다. 혼합 후 CN 혼합 샘플을 깨끗한 석영판 표면에 부착된 3M 트랜스포어 테이프($7.5cm^2$)에 적용하였다. 샘플 ($2\ mg/cm^2$)을 분포시킨 다음 골무 코팅된 손가락으로 플레이트 표면을 천천히 문지르면서 전체 표면에 펼쳤다. 준비된 샘플을 암실에서 건조하여 20분 동안 빛을 차단하였다.

[0094] UV 투과율을 고체 시료 홀더 (Agilent Technologies, USA)가 장착된 Cary 50 UV-vis 분광 광도계를 사용하여 측정하였다. 각 샘플에 대해 4 개의 스팟을 스캔했으며 각 데이터를 UVB (290-320 nm)에서 UVA (320-400 nm)까지의 범위에서 측정하였다. 모든 투과율 데이터를 1nm 간격으로 수집하였다. 자외선 투과율을 측정한 후 다음 방정식을 사용하여 자외선 차단 계수 (SPF)의 체외 평가를 수행하였다.

[0095] $$\mathrm{SPF} = \sum_{290}^{400} E_\lambda S_\lambda \Big/ \sum_{290}^{400} E_\lambda S_\lambda T_\lambda$$

[0096] 여기서 Eλ는 홍반 스펙트럼 효과, Sλ는 태양 스펙트럼 효과, Tλ는 샘플의 스펙트럼 투과율이다.

[0097] 또한 다음 식을 이용하여 UVA 보호 계수 (UVA PF) 평가를 수행하였다.

[0098] $$\text{UVA PF} = \sum_{320}^{400} E_\lambda I_\lambda \Delta\lambda \Big/ \sum_{320}^{400} E_\lambda I_\lambda T_\lambda \Delta\lambda$$

[0099] 여기서 Iλ는 UVA에 대한 생물학적 작용 스펙트럼입니다. 이 경우 Eλ와 Iλ는 모든 UVA 파장에 대해 1과 같다.

[0101] **6.3 상용된 UV 필터에 활용되는 TiO2 및 ZnO와의 비교를 통한 PCN의 UVR 흡수 효과의 확인**

[0102] 이외 UV 로부터 피부를 보호할 수 있기 위하여는 자외선을 흡수하여 햇빛의 유해한 영향을 방지하여야 하므로, 제조된 PCN을 통한 자외선 흡수 정도를 UVR 흡수 효율을 측정하여 자외선 차단 물질 효과를 확인하여, PCN, TiO_2 및 ZnO에 대한 UV-Vis 확산 반사 스펙트럼을 확인하고, 결과를 도 8C에 나타내었다.

[0103] 도 8C에서 확인한 바와 같이, TiO_2 입자는 주로 UVB 영역까지만 흡수하는 경향을 나타났으나, 반면 ZnO는 비교적 낮은 흡광도로 UVA영역까지 커버하는 것을 확인하였다. 그러나 합성된 PCN은 전체 UV 스펙트럼 (200-400 nm)을 가장 높은 정도로 커버하며, 이는 유해한 UVA 및 UVB 방사선으로부터 피부를 보호할 수 있는 있음을 확인하였다.

[0105] **6.4 종래의 자외선 차단제와 제조된 PCN을 병용한 시료의 UVR 흡수 상승 효과의 확인**

[0106] 상용화된 종래의 자외선 차단제와 제조된 PCN을 병용, 즉 동시에 포함하는 경우, 상승 효과가 나타나는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0107] 구체적으로 10 중량%(wt%)의 PCN을 SPF15의 자외선 차단제를 배합하였을 때 SPF지수와 PA지수가 얼마나 상승할 수 있는지를 알아보기 위하여 투과 스펙트럼을 확인하는 실험을 수행하였고, 이를 도 8D에 나타내었다.

[0108] 도 8D에서 확인한 바와 같이, 자외선 영역에 해당하는 280nm 내지 400nm에 해당하는 빛을 약 95%이상으로 흡수하여 이를 통과하여 투과되는 자외선은 거의 없는 것을 확인할 수 있었다. 특히, UVB에 해당하는 280-315 nm 영역에서는 거의 약 99%에 해당하는 현저한 자외선 흡수 효과를 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 흡수효과를 확인한 경우, UVB영역의 흡수지표는 50이상으로 SPF 50+를 보였으며, UVA영역의 흡수지표는 30이상으로 PA++++를 보이는 것을 확인하였다.

[0110] **실시예 7. PCN의 자외선차단제로의 생물학적 응용 확인**

[0111] **7.1 바이오-애플리케이션(Bio-applications)을 위한 UV 방사원 및 MTT의 분석 조건의 확인**

[0112] UV 방사원(radiation source)은 300W 램프 태양광 자극기 (91160, Newport)이며 1 개의 태양 광이 조사되었다. MTT 분석을 다중 모드 마이크로 플레이트 리더 (SpectraMax M5e, Molecular Devices)에서 수득하였다.

[0114] **7.2 PCN의 세포 독성 확인**

[0115] **세포 배양**

[0116] NIH-3T3 세포는 아메리칸-타입 컬쳐 컬렉션(ATCC, USA)에서 구입하였다. 세포를 10 % 소태아혈청 (FBS), 100 U/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신이 보충된 DMEM 배지에서 배양하였다. 모든 세포를 5 % CO_2의 가습 환경에서 37 ℃로 배양하였다. MTT 분석을 위해, 세포는 웰당 5 * 10^3 세포의 밀도로 96- 웰 플레이트에 시딩되었다. 24 시간 시딩 후, 일련의 농도 (5 가지 농도 및 대조군)의 샘플 용액을 각 웰에 첨가하였다. 1 시간 배양 후, 1 분간 빛을 조사한 후 5 시간 더 배양하였다. 10 μL MTT 용액 (5 mg/mL)을 각 웰에 첨가하고 37 ℃에서 2 일 동안 배양하고 추가로 4 시간 동안 배양한 다음 100 μL의 SDS-HCl 용액을 첨가하여 환원 반응을 중지하고 보라색 포르 마잔을 용해시켰다. 595 nm에서 각 웰의 흡광도를 다중 모드 마이크로 플레이트 리더로 측정하였다. 세포 독성 분석은 3 회 수행되었고 3 회 측정의 평균값이 수득하였다.

[0118] **NIH-3T3 세포의 CLSM 이미지 (ROS 생성)**

[0119] 공 초점 레이저 스캐닝 현미경 (CLSM) 이미지를 ZIESS의 LSM 780으로 수득하였다. 1 * 10^4 밀도의 NIH-3T3 세포를 ROS 생성 실험을 위해 8 웰 Lab-tek II 챔버 커버 글래스 (Nunc)에 시딩하였다. 세포 배양기에서 24 시간 동안 NIH-3T3 세포를 성장시킨 후, 20 μg / ml의 나노 입자를 배지와 함께 세포에 첨가하였다. 1 시간 배양 후, 빛을 1 분 동안 세포에 조사하였다. 배지를 사용하여 5 시간 더 배양 한 후, Hela 세포를 3 회 세척하였다. 미토트레커 딥 레드를 사용하여 1 μM 농도에서 10 분 동안 미토콘드리아를 염색하였다. 완성된 배지로 세포를 세척하고 즉시 CLSM용 배지에 세포를 보관하였다.

[0121] **Live/dead 분석**

[0122] Live/dead 분석 이미지를 evos 형광 현미경으로 수득하였다. 5 * 10^4 밀도의 NIH-3T3 Live/dead 분석을 위해 24 웰 세포 배양 플레이트에 시딩하였다. 세포 배양기에서 24 시간 동안 NIH-3T3 세포를 성장시킨 후, 20 μg / ml의 나노 입자를 배지와 함께 세포에 첨가하였다. 1 시간 배양 후, 빛을 1 분 동안 세포에 조사하였다. 5 시간 더 배양한 후 배지를 사용하여 Hela 세포를 3회 세척하였다. 1μM 농도에서 10 분 동안 미토콘드리아를 염색하기 위해 Live/dead 분석을 사용하였다. 완성된 배지로 세포를 세척하였다. 배지는 제조업체의 프로토콜에 따라 LIVE/DEAD 이미징 솔루션 혼합물로 대체되었다. 세포배양물을 20분 동안 배양하고 녹색 (살아있는 세포) 및 적색 (사멸된 세포) 채널을 사용하여 형광 현미경으로 이미지화하였다.

[0124] **PCN의 실제적인 세포 독성 확인 결과**

[0125] 자외선 차단 용도를 가지는 제조된 PCN이 생물학적인 응용이 가능할 수 있는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 제조된 PCN 중 CN-400-4을 사용하는 경우, 세포 독성이 발생하는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 생물학적인 독성을 평가하기 위해, 세포 생존력 확인 실험을 배아 섬유아세포 세포주인 NIH-3T3 세포로 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT) 분석으로 평가하고 결과를 도 9A에, 동일한 실험조건으로 양성 대조군으로 ZnO를 사용하고, 이를 통한 실험 결과를 도 9B에 나타내었다.

[0126] 도 9A에서 확인한 바와 같이, CN-400-4는 NIH-3T3 세포에 대해 무독성이며 최대 50 μg/ml 농도를 사용한 경우에도 24시간 동안 배양하기 위해 UV 조사를 수행한 경우에도 세포에 대한 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다. 반면, 도 9B에서 확인한 바와 같이, CN-400-4와 비교하여 양성 대조군인 ZnO 나노 입자는 10μg/ml에서 NIH-3T3 세포가 50 %의 생존율을 보였고, UV를 조사한 경우, 생존율이 감소하여 40 % 미만의 생존율이 나타나는 것을 확인하였다.

[0127] 또한 제조된 CN-400-4의 인체 피부 세포에 대한 독성을 추가적으로 알아보기 위하여 인간 피부 섬유아세포인 HS-68 세포주를 선택하고, 세포 독성을 확인하고 세포 생존율을 확인하는 실험을 수행하였고, 이의 실험결과를 도 9C에 나타내었다.

[0128] 도 9C에서 확인한 바와 같이, CN-400-4는 최대 10㎍/ml 농도에서도 인체 피부 세포주인 HS-68 세포에서도 독성이 나타나지 않아, 생존율이 약 90%이상에 해당하는 것임을 확인하였다.

[0129] 또한 CN-400-4을 사용한 경우 세포에서의 생존력을 Life/Dead세포 이미징으로도 평가하였고 도 10A 및 10B에 나타내었다. 도 10A 및 10B에서 확인한 바와 같이, UV를 포함한 빛을 조사한 경우, 6 시간 동안 배양한 후 CN-400-4는 처리되지 않은 NIH-3T3 세포와 비교한 경우에도 유사한 정도로 독성이 없어, 밝은 녹색 형광인 생존세포를 나타냈으며, 사멸 세포를 나타내는 적색 형광에 대해서는 거의 나타내지 않음을 확인하였다. 아울러, CN-400-4가 세포에서도 활성 산소 종 (ROS)을 거의 생성하지 않음을 입증하기 위해 세포 내부의 ROS 지표인 dihydroxyethidium (DHE)을 시각화에 사용하고, 이를 도 10C에 나타내었다. 도 10C에서 확인한 바와 같이, CN-400-4는 광 조사 하에서 미처리군인 대조군인 NIH-3T3와 유사하게 광 조사한 경우에도 NIH-3T3에서 ROS를 생성하지 않는 것을 확인하였다.

[0131] **7.4 PCN의 자외선 차단제로서의 피부 보호 확인**

[0132] **Micropig®Franz Cell Membrane (FCM)에 대한 UV 노출 (조직학적 분석)**

[0133] 2cm × 2cm × 600㎛ 크기의 Micropig®Franz Cell Membrane (FCM)을 APURES Co. Ltd.에서 구입하여 이를 사용하였다. 나노 입자를 FCM이 포함된 12 개의 웰에 첨가하였다. 1 시간 배양 후 30 분 동안 태양 광 시뮬레이터로 빛을 조사하였다. 3시간 더 배양 한 후, PBS로 3 회 세척하였다. FCM을 NBF 용액에 밤새 보관하였다. 조직화학적 염색을 위해, 고정된 종양을 농도 구배 에탄올 세척에 의해 탈수시켰고 파라핀 블록에 삽입하고 절편화하여 H & E 염색으로 염색하고 분석하였다.

[0135] **FCM의 SEM 이미지를 통한 PCN의 생체 외 피부 침투 프로브의 확인**

[0136] CN-400-4 나노 입자를 FCM이 포함된 12 개의 웰에 첨가하고, PBS 용액을 FCM에 첨가하였다. 4시간 배양 후, PBS로 3회 세척하였다. 세척된 FCM을 동결 건조하여 SEM을 측정하였다. hitachi sputter를 사용하여 60 초 동안 20mA 전류로 Pt 스퍼터 코팅으로 샘플을 준비하였다.

[0138] **PCN의 피부 보호 효과의 확인**

[0139] 효과적인 자외선 차단제로서의 효과를 나타내기 위하여는 표피에 침투하지 않고 피부 표면인 각질층에 남아 있어야 한다. 이에, CN-400-4를 피부에 도포한 경우, 인공 피부 막 (Franz Cell Membrane, FCM)에서 표피에 남아 있으면서 효과적으로 UV로 인한 피부 손상을 나타내지 않는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. CN-400-4를 인공피부에 도포한 경우, 30분 광조사 하에 FCM에서 4 시간 배양한 후 PBS로 3 회 세척한 후, 피부 손상 정도를 확인하기 위한 H&E 염색을 수행하고, 이를 확인한 결과를 도 11에 나타내었다.

[0140] 도 11에서 확인한 바와 같이, CN-400-4는 피부 표면 각질층에 남아있으므로, 우측 도면에서 확인한 바와 같이, UV가 조사된 경우에도 피부의 손상없이 보호한 것을 확인하였으나, 반면 대조군(좌측 도면)에서는 UV 조사로 인한 각질층이 찢어지고 표피가 손상되는 피부손상이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, CN-400-4는 각질층에 남아 있어, UV로 인한 피부 손상을 효과적으로 방어할 수 있어 이를 도포한 경우, 각질층과 표피의 손상이 나타나지 않음을 확인하였다.

[0141] 아울러, 피부 표피에 침투하지 않고 피부 표면에 효과적으로 남아있는지를 확인하기 위하여 피부 표면에서 CN-400-4의 도포한 경우 피부 표면의 형태를 관찰하기 위해 FCM의 피부 표면을 주사 전자 현미경 (SEM)으로 확인하였다. CN-400-4 샘플을 FCM에 처리하고 PBS로 3 회 세척한 후 FCM을 동결 건조하여 SEM을 확인하고 이를 도 12에 나타내었다.

[0142] 도 12의 아래도면에서 확인한 바와 같이, CN-400-4는 화살표로 표시된 각질층과 CN-400-4 사이의 상호 작용을 개선하여 시트 구조로 각질층의 가장 바깥 쪽 표면에 남아 있는 것을 확인하였다. 반면, 도 12의 위쪽의 도면에

서 확인한 바와 같이, CN-400-4의 처리군과는 달리 미처리 FCM의 표면은 표면에 고르지 않은 패턴없이 매끄러운 피부를 보여주는 확인하였다.

[0144] **7.5 자외선 차단제로서 PCN의 안정성을 확인하기 위한 인체 피부 첩포실험(패치테스트)의 결과**

[0145] IRB승인 하에 세명대학교 바이오 산업 임상 시험 센터에서 수행하였고. 세명대학교 바이오 산업 임상 시험 센터에서 인체 피부에 사용 가능함을 인증받았다. 30 분, 24 시간, 48 시간 후 30 명 모두 피부 자극을 보이지 않은 것을 확인하였다. 본 실험은 국제 접촉 피부염 연구위원회(International Contact Dematitis Research Group: ICDRG)의 기준에 따라 수행 및 인증되었다. 실제적으로 CN-400-4이 실제적인 피부 첩포에서도 자극이 나타나지 않는지를 확인하기 위한 첩포실험을 수행하였다. 30 명을 대상으로 CN-400-4 패치를 제조하고, 30 분, 24 시간, 48 시간 후 세 번에 걸쳐 피험자의 피부에서 CN-400-4 패치의 반응을 확인하였고, 이를 도 13에 나타내었다.

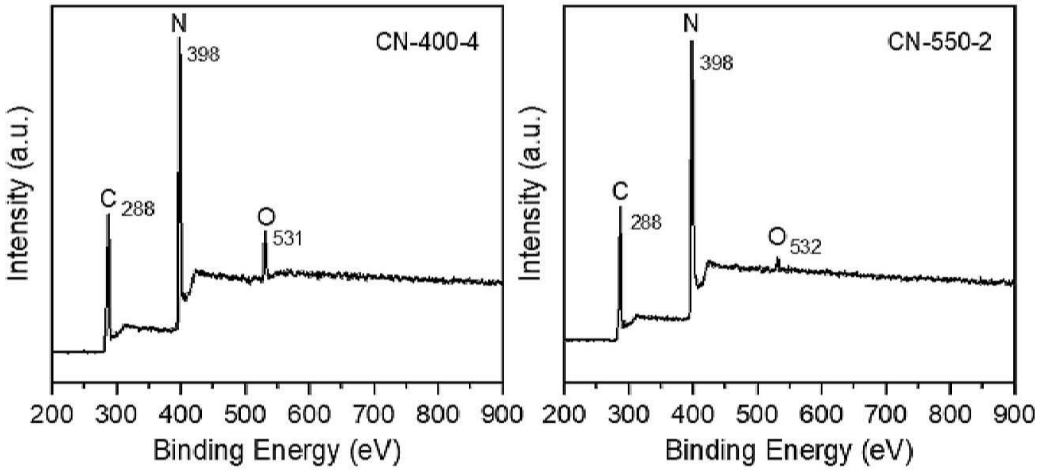
[0146] 도 13에서 확인한 바와 같이, CN-400-4 패치는 피험자인 30 명 모두에게 100 % 음성으로서 피부자극이 없는 것을 확인하였다. 따라서 CN-400-4는 무독성이면서, 피부 자극이 없어 인체 피부에도 효과적으로 사용할 수 있는 안전성이 확보된 것을 확인할 수 있었다.

도면

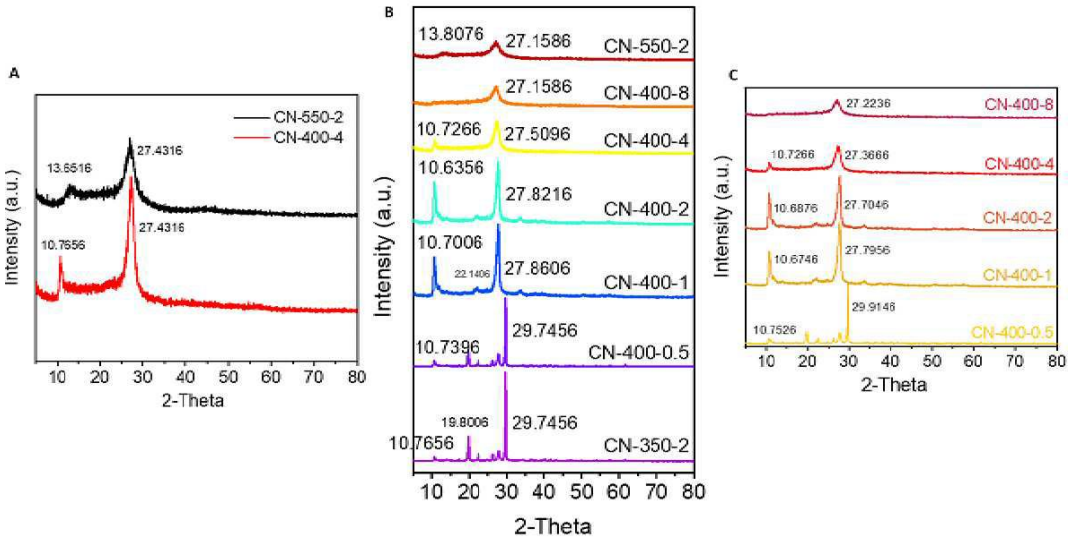
도면1



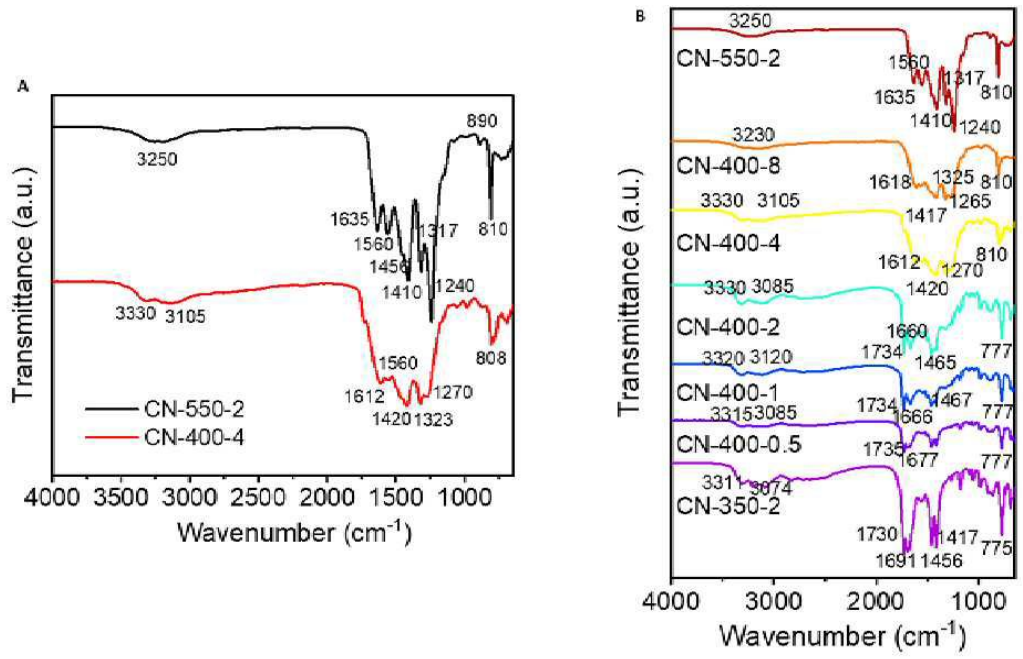
도면2


CN-400-4
N
398
C
288
O
531
Intensity (a.u.)
200 300 400 500 600 700 800 900
Binding Energy (eV)
CN-550-2
N
398
C
288
O
532
Intensity (a.u.)
200 300 400 500 600 700 800 900
Binding Energy (eV)

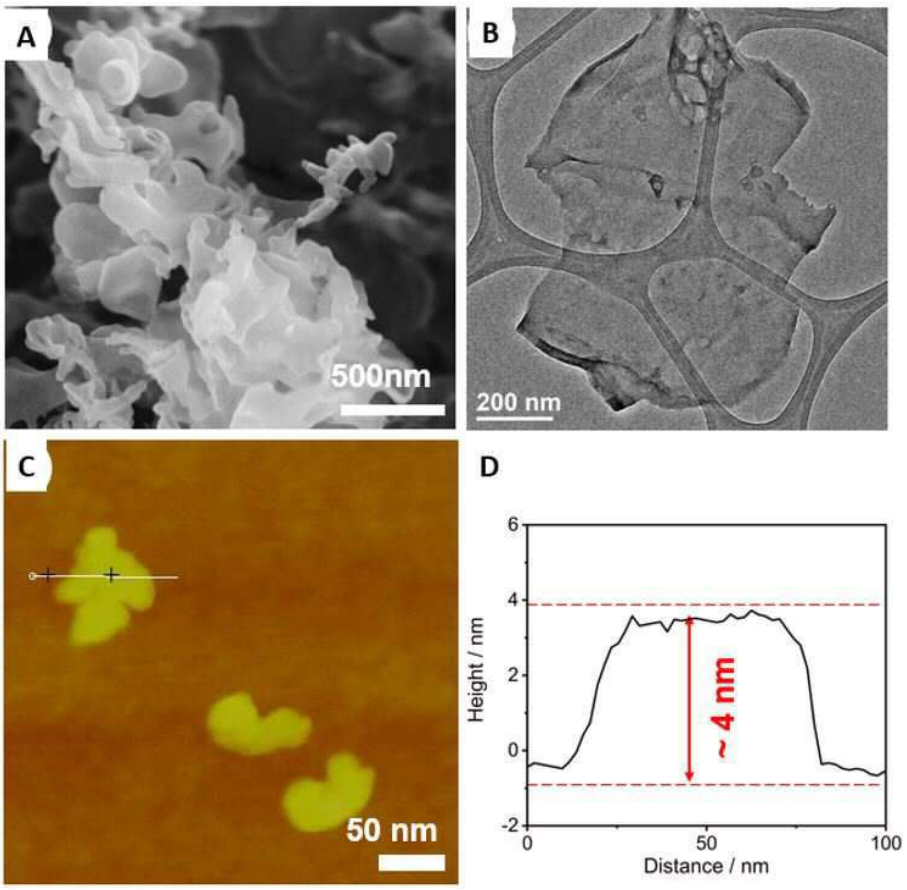
도면3


A
CN-550-2
CN-400-4
13.5516
27.4316
27.4316
10.7656
Intensity (a.u.)
10 20 30 40 50 60 70 80
2-Theta
B
13.8076
27.1586
CN-550-2
27.1586
CN-400-8
10.7266
27.5096
CN-400-4
10.6356
27.8216
CN-400-2
10.7006
22.1406
27.8606
CN-400-1
10.7396
29.7456
CN-400-0.5
19.8006
29.7456
10.7656
CN-350-2
Intensity (a.u.)
10 20 30 40 50 60 70 80
2-Theta
C
27.2236
CN-400-8
10.7266
27.3666
CN-400-4
10.6876
27.7046
CN-400-2
10.6746
27.7956
CN-400-1
29.9146
10.7526
CN-400-0.5
Intensity (a.u.)
10 20 30 40 50 60 70 80
2-Theta

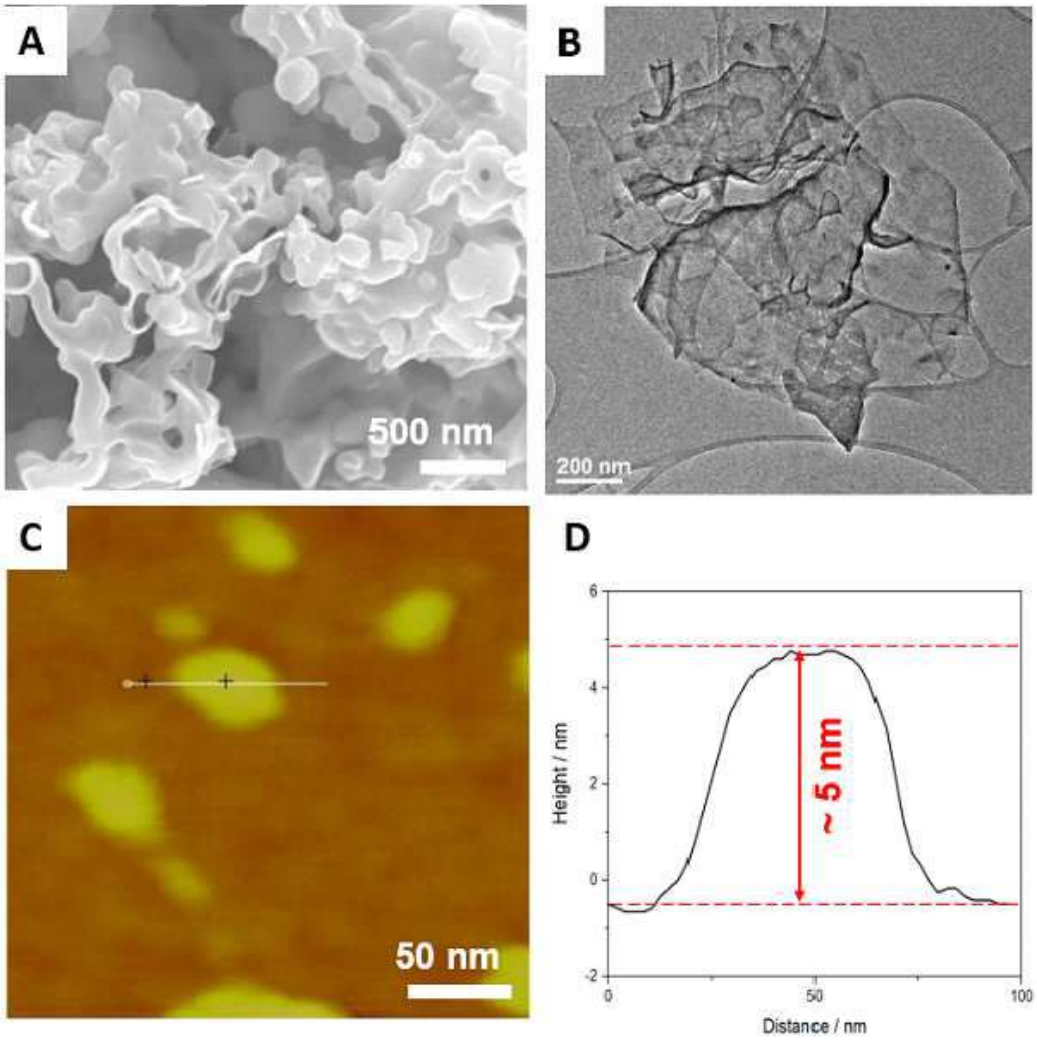
도면4


A
Transmittance (a.u.)
3250
890
1635
1560
1456
1317
810
1410
1240
3330 3105
1560
808
1612
1270
1420 1323
CN-550-2
CN-400-4
4000 3500 3000 2500 2000 1500 1000
Wavenumber (cm-1)
B
Transmittance (a.u.)
3250
CN-550-2
1560
1635
1317
810
1410
1240
3230
CN-400-8
1618
1325
810
1265
3330 3105
1417
CN-400-4
1612
1270
810
3330 3085
1420
CN-400-2
1660
1734
1465
777
3320 3120
CN-400-1
1734
1467
777
33153085
1666
CN-400-0.5
1735
1677
777
331
3074
CN-350-2
1730
1417
775
1691 1456
4000 3000 2000 1000
Wavenumber (cm-1)

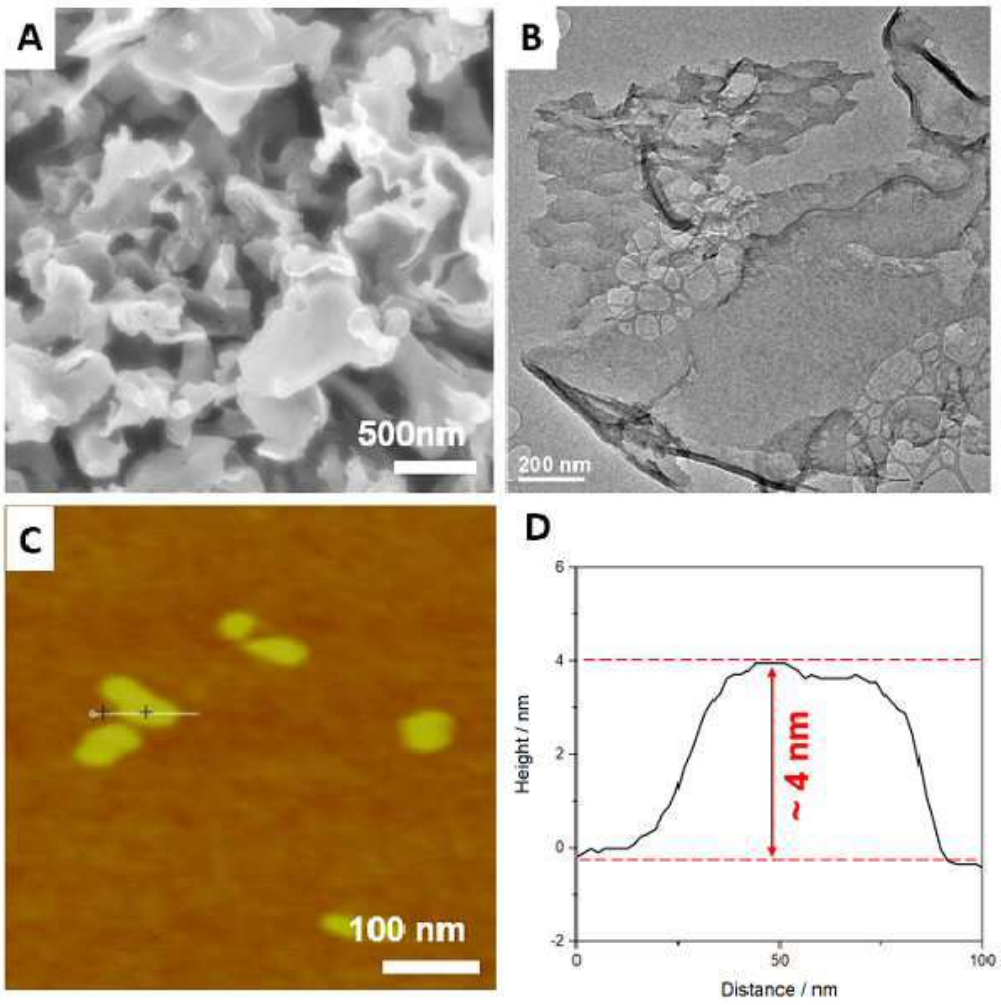
도면5


A
500nm
B
200 nm
C
50 nm
D
Height / nm
6
4
2
0
-2
~ 4 nm
0
50
100
Distance / nm

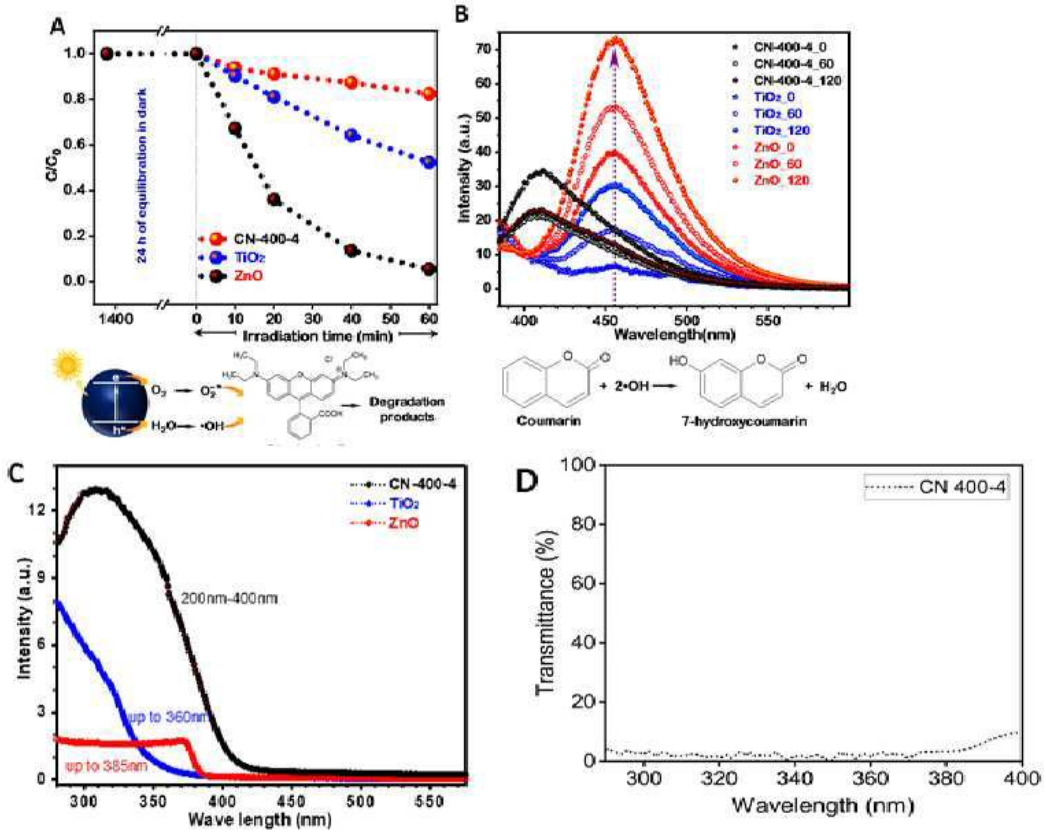
도면6


A
500 nm
B
200 nm
C
50 nm
D
Height / nm
Distance / nm
~ 5 nm
6
4
2
0
-2
0
50
100

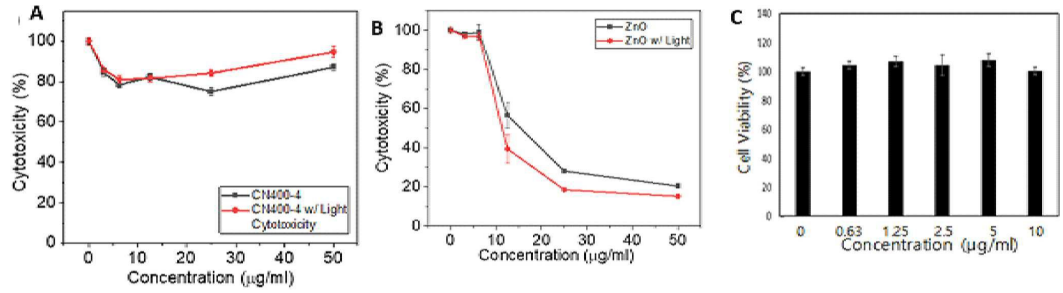
도면7


A
500nm
B
200 nm
C
100 nm
D
Height / nm
Distance / nm
~ 4 nm
6
4
2
0
-2
0
50
100

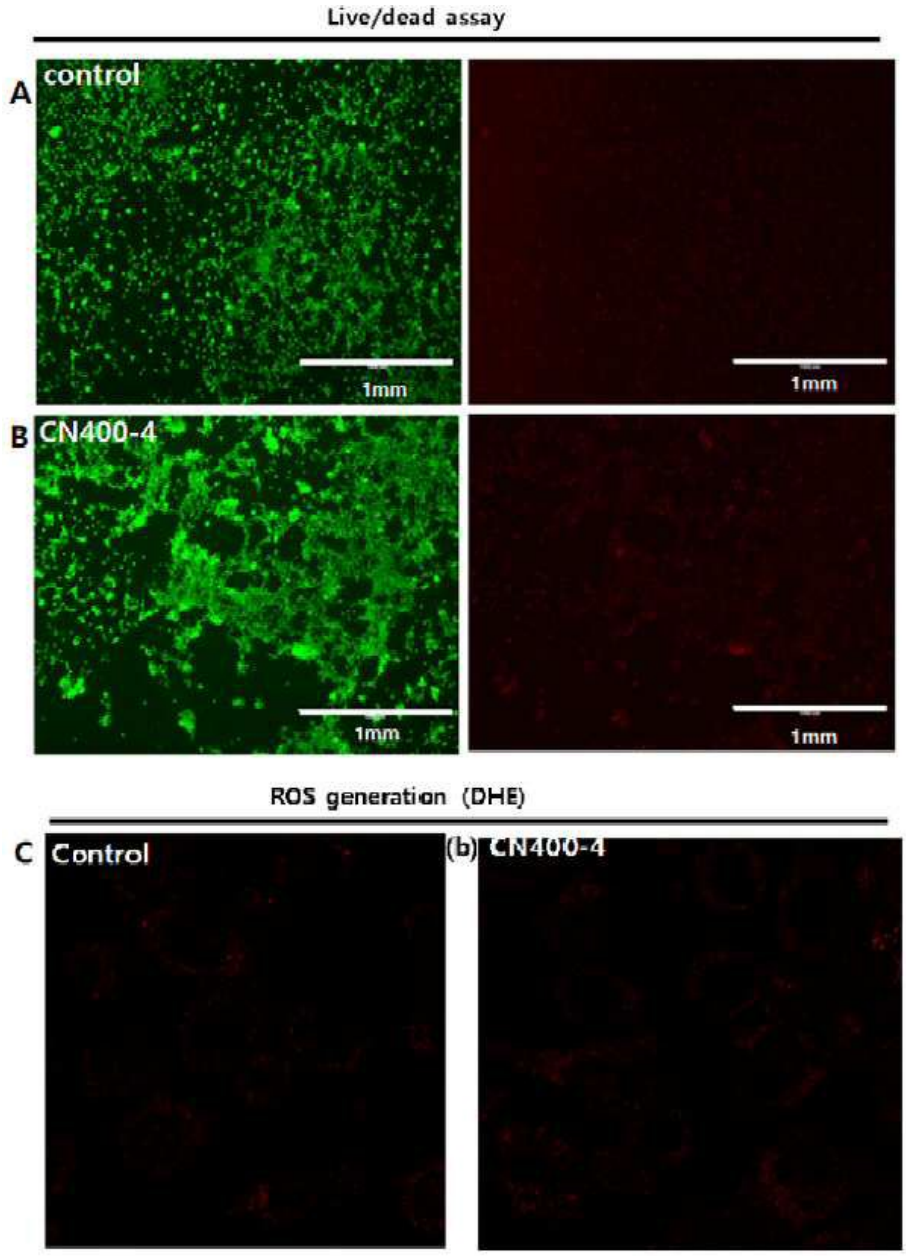
도면8


A
C/C0
24 h of equilibration in dark
CN-400-4
TiO2
ZnO
Irradiation time (min)
B
Intensity (a.u.)
CN-400-4_0
CN-400-4_60
CN-400-4_120
TiO2_0
TiO2_60
TiO2_120
ZnO_0
ZnO_60
ZnO_120
Wavelength(nm)
Degradation products
Coumarin
7-hydroxycoumarin
C
CN-400-4
TiO2
ZnO
200nm-400nm
up to 360nm
up to 385nm
Intensity (a.u.)
Wave length (nm)
D
CN 400-4
Transmittance (%)
Wavelength (nm)

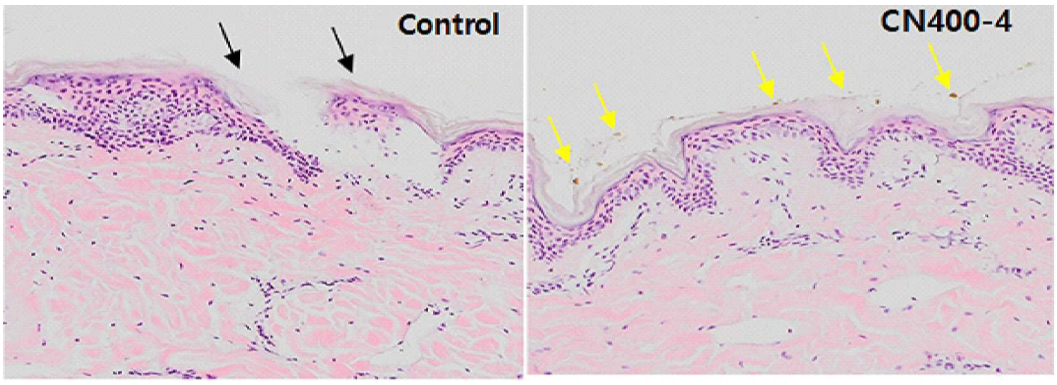
도면9


A
Cytotoxicity (%)
CN400-4
CN400-4 w/ Light
Cytotoxicity
Concentration (μg/ml)
B
Cytotoxicity (%)
ZnO
ZnO w/ Light
Concentration (μg/ml)
C
Cell Viability (%)
Concentration (μg/ml)

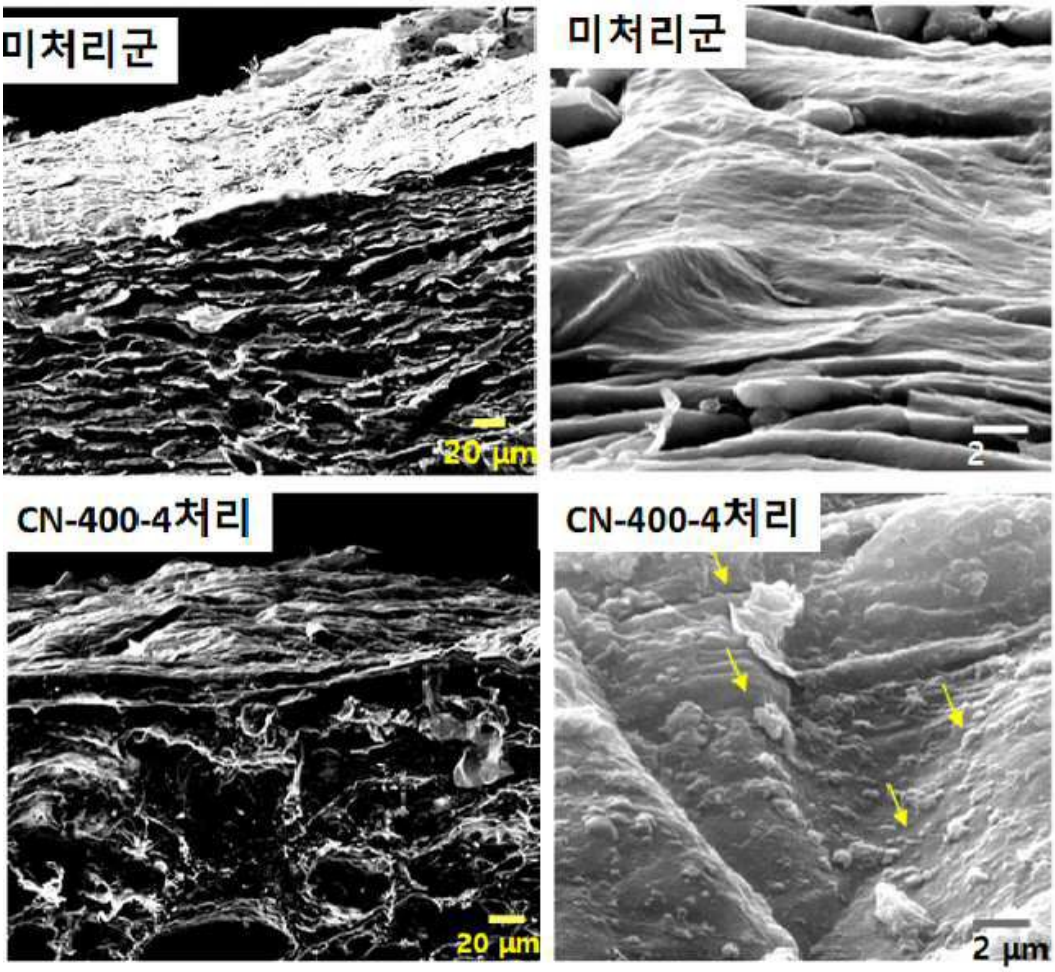
도면10


Live/dead assay
A
control
1mm
1mm
B
CN400-4
1mm
1mm
ROS generation (DHE)
C
Control
(b)
CN400-4

도면11


Control
CN400-4

도면12



도면13

Table 8. 첩포시험(Patch Test) 결과

No.	Initial	제품명	4	
		30 분 후	24 시간 후	48 시간 후
1	KJI	-	-	-
2	JJI	-	-	-
3	YJS	-	-	-
4	LJY	-	-	-
5	MKH	-	-	-
6	KYO	-	-	-
7	GJS	-	-	-
8	HM	-	-	-
9	HYJ	-	-	-
10	LBO	-	-	-
11	PMJ	-	-	-
12	RIS	-	-	-
13	KJS	-	-	-
14	KSJ	-	-	-
15	PJO	-	-	-
16	JHJ	-	-	-
17	CHJ	-	-	-
18	KJY	-	-	-
19	LMJ	-	-	-
20	JJH	-	-	-
21	LHN	-	-	-
22	LKS	-	-	-
23	JYJ	-	-	-
24	YHS	-	-	-
25	KAR	-	-	-
26	SYJ	-	-	-
27	GSH	-	-	-
28	KHS	-	-	-
29	JHJ-2	-	-	-
30	YYM	-	-	-
반응도	±	0	0	0
	+	0	0	0
	++	0	0	0
	+++	0	0	0
Mean score :			0.00	
판 정			무자극	