

Vitabrid-C 를 함유한 피부 미백용 트윈케익 파우더 개발

이선영¹, 양재훈^{1,2}, 한양수¹, 이승화³, 홍성호³, *최진호^{1,2}

¹ (주)나노하이브리드

² 서울대학교 자연과학대학 화학부

³ 나드리 화장품 주식회사

요 약

비타민 C(L-ascorbic acid)는 강한 항산화성, 피부에 대한 높은 안전성으로 인해 피부의 노화 방지, 미백, 주름 개선 등의 기능성 화장품 원료로써 많은 관심이 있는 물질이지만, 화학적으로 매우 불안정하여 쉽게 산화, 분해되므로 화장품 제형으로 포함시키는데 곤란한 문제가 있다. 본 연구에서는 비타민 C 의 안정성에 대한 단점을 보완하기 위하여 생체 및 피부 친화성이 우수한 무기물을 사용하여 비타민 C 를 캡슐화(encapsulation)한 분말상의 유-무기 복합물질 Vitabrid-C 를 합성하고, 이를 함유하는 피부 미백용 트윈케익 파우더를 개발하였다. 우선 Vitabrid-C 는 수용액상에서 비타민 C 를 수화된 산화아연(ZnO)으로 1 차 캡슐화하여 나노입자를 형성시키고, 그 표면을 실리카(silica) 나노 입자로 한번 더 코팅하여 표면의 껍질이 다공특성을 갖는 분말을 제조함으로써 완성하였다. 이렇게 제조된 Vitabrid-C 는 순수 비타민 C 에 비해 우수한 안정성을 보였으며, 캡슐 내 비타민 C 가 서서히 방출되는 서방특성을 발휘하였다. 또한 Vitabrid-C 는 입자의 크기가 미세하고 균일하여 트윈케익 처방에 용이하게 적용할 수 있었다. Vitabrid-C 와 순수 비타민 C 의 생화학적 동등성에 대한 평가는 tyrosinase 억제능(L-DOPA oxidase 억제) 및 DPPH 항산화 실험을 통하여 비교하였다. 트윈 케익 처방에 적용된 Vitabrid-C 에서 비타민 C 의 피부 투과경향을 Franz diffusion cell 법을 이용하여 확인하였다. 또한 Vitabrid-C 가 포함된 트윈케익을 건강한 피부를 가진 25 세 이상되는 여성의 전박에 색소 침착을 유도한 후 피부색 개선 효과 평가를 통해 임상적 효능을 평가하였다.

1. 서 론

인간의 피부는 크게 진피와 외피로 구성되어 있으며, 자연적 노화 및 외부적 요인에 의해 피부세포의 증식작용이나 신진대사 작용이 약화되어 피부 주름의 증가 및 색소 침착, 피부조직의 탄력 저하 등이 나타나게 된다. 특히 기미, 주근깨, 검버섯 등 색소침착에 의한 피부색의 변화는 과도한 자외선 노출, 공해, 스트레스, 흡연 등의 다양한 원인에 의해 발생하며 주로 피부 조직 내 멜라닌 세포가 과다하게 형성되어 발생한다. 한국, 일본, 중국과 같은 동양 여성들은 하얀 피부에 대한 선호 때문에 화장을 통한 피부색 및 색소 침착 개선에 대한 욕구가 상당히 높은 편이다.

비타민 C는 대표적인 수용성 비타민으로서 항산화 특성 및 다양한 신진대사에서의 역할이 중요해 인체에 필수불가결한 물질이다. 그러나 식물이나 기타 동물과는 달리 영양류인 인간의 경우 비타민 C의 체내 합성이 불가능하기 때문에 반드시 음식을 통한 섭취가 필요하다. 비타민 C는 이렇게 체내 여러 신진대사 및 촉매로써의 역할 뿐만 아니라 사람의 피부에 있어서는 콜라겐 생합성 과정에 필수적인 성분으로 노화방지, 피부 주름 개선, 기미/주근깨 등의 색소 침착 개선, 피부 수분 조절 및 자외선 차단에 매우 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 특히 색소 침착의 원인이 되는 멜라닌 색소의 환원을 통한 탈색 반응 또는 멜라닌 색소 침착에 관여하는 효소인 타이로시나제의 활성을 억제함으로써 색소침착을 방지하여 미백 효과를 나타낸다. 이러한 탁월한 피부개선 효과에도 불구하고 비타민 C는 활성 산소, 햇빛, 수분, 열, 금속이온, 염기성 물질 등 외부환경에 극히 불안정하여 쉽게 분해되어 생리적 활성을 잃고, 변색 및 변취가 발생하는 치명적 단점을 가지고 있어 제품 응용에 많은 제약이 있다.¹⁻⁶

이러한 비타민 C의 안정성을 개선하기 위하여 magnesium ascorbyl phosphate, ascorbyl palmitate, ascorbyl glycoside 등 비타민 C 유도체가 사용되지만 효소에 의한 순수 비타민 C(L-ascrobic acid)로의 전환이 미흡하고 효능이 불확실하다는 단점이 있다. 또한 마이크로 에멀전, 다중 에멀전, 리포솜, 젤라틴 캡슐, 고분자 캡슐 등 주로 유기물에 의한 안정화를 시도하였으나 궁극적인 안정화는 이루지 못하였다.⁷⁻¹⁰

본 연구에서는 비타민 C의 안정화 및 서방성을 이용한 효과적인 피부로의 전달을 위해 생체 및 피부 친화성이 뛰어난 무기 화합물을 이용 신규 나노 캡슐화 기술을 통해 Vitabrid-C를 개발하였으며, 물리화학적, 생화학적 평가를 수행하였다. 또한 Vitabrid-C를 이용한 트윈 케익 제형 제조 후 이의 피부 투과 특성 및 피부 미백 효과를 관찰하였다.

2. 실험

2.1. 비타민 C의 캡슐화

비타민 C의 캡슐화는 이미 보고된 바와 같이 수용액상에서 공침법에 의해 합성하였다.¹¹ 캡슐 물질로는 양이온성 표면 전하를 갖는 수화된 산화아연, $ZnO \cdot xH_2O$, 을 이용하였다. 2차원 구조를 갖는 무기물(ZnO)-비타민 C의 1차 복합 물질은 우선 $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 를 수용액에 용해시킨 후 염기($NaOH$ 수용액)를 첨가하여 수용액 중에 미리 용해시킨 비타민 C 분자와 공침을 통해 나노크기를 갖는 적층 물질을 제조하였다. 이렇게 합성된 1차 비타민 C-무기 혼합물질을 충분히 세척한 후 에탄올 용매에 재분산시켰다. 여기에 SiO_2 의 전구물질인 tetraethoxyorthosilicate(TEOS, $Si(OC_2H_5)_4$)를 첨가하고 교반함으로써 1차 혼합물질의 표면에 SiO_2 가 가수분해에 의해 피착되도록 하였다. 반응이 완료된 후 캡슐화된 물질은 다시 에탄올 용매로 충분히 세척 후, 진공 건조기에서 건조하여 분말상 Vitabrid-C를 제조하였다.

2.2. Vitabrid-C를 이용 트윈케익 제형 제조

Vitabrid-C를 함유한 트윈케익 제형의 기본 조성물 및 함유량은 표 1에 정리하여 놓았다. 트윈케익 제조 공정은 먼저 D상과 E상을 균일하게 용해, 혼합하여 준비하고, A상과 B상을 혼합기에 투입하고 700±50 rpm으로 3분간 혼합한 후, C상과 D+E상을 65 ~ 70°C에서 순서대로 분무하였다. 유상 분무가 끝나며 혼합기를 1200±50 rpm으로 5분간 혼합하여 Vitabrid-C를 함유한 트윈케익을 제조하였다.

2.3. Vitabrid-C의 평가

2.3.1 Vitabrid-C의 물리 화학적 특성 평가

Vitabrid-C의 결정구조는 X-선 회절분석(Philips PW 3710 diffractometer)을 이용하여 수행하였으며, 입자의 모양, 크기 및 입도 분포는 전계 방사형 주사전자현미경(FE-SEM, Hitachi S-4300)을 사용하여 관찰하였다.

무기 캡슐에 의해 안정화된 비타민 C의 함량은 자외선 흡광 분석기(UV spectroscopy, Perkin-Elmer Lambda 35)를 사용하여 정량하였다. 이 때 분석 용액은 Vitabrid-C 분말(~ 0.1g)을 0.1N HCl 수용액(100mL)에 용해 시킨 후 적절히 희석하여 제조하였으며, 0.2µm nylon filter로 여과한 후 흡광 세기를 측정하여 정량하였다.

트윈케익 내 비타민 C의 함량은 액체크로마토그래피(HPLC, Agilent 1100 series)를 이용하여 측정하였다. 그 밖의 분석 조건은 컬럼으로 XDB-C18(4.6×250mm, ZORBAX Eclipse), 용매의 유속은 1.0mL/min, 시료 주입량은 20μL, 측정 파장은 245nm, 이동상의 조건은 0.15mM 에틸렌다이아민테트라아세트산(EDTA), 25mM KH₂PO₄(pH 2.5)로 하였다. 분석 용액 제조를 위한 전처리 조건은 트윈케익 시료(~ 0.4g)를 pH 2.5 EDTA 용액(1mL 에탄올 /100mL, 0.01g dithiothreitol /L 함유) 100mL 에 첨가하고, 약 10 분정도 sonication 하여 시료 내 비타민 C가 완전히 용출된 용액을 제조하여 0.2μm PTFE filter 로 여과하여 사용하였다.

2.3.2. 서방성 평가 방법

Vitabrid-C 내 비타민 C의 서방성 특성은 0.08% NaCl 수용액 50mL 에 Vitabrid-C 0.1g 을 첨가하여 분산시킨 후 25°C, 50rpm 으로 교반하면서 일정 시간 마다 방출된 비타민 C를 자외선 흡광 분석을 이용해 측정하였다.

2. 4. 항산화능 평가 방법

2.4.1. L-DOPA oxidase 억제능 평가 방법

Vitabrid-C 및 순수 비타민 C의 L-DOPA oxidase(tyrosinase) 억제능 평가는 spectrophotometry(SUNRISE reader)를 이용하여 비교하였다.¹²⁻¹⁵ 먼저 L-DOPA oxidase 억제능 측정 방법은 0.1M 인산완충용액(PBS, pH 6.8), 4mM L-DOPA(β-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine)에 Vitabrid-C(0.1, 1.0, 10, 100μg/mL) 현탁 수용액과 대조군으로 비타민 C(L-ascorbic acid 0.1, 1.0, 10, 100μg/mL) 수용액을 얼음 중탕에 고정 시킨 후 tyrosinase 20μL를 각각의 용액에 넣고 475nm에서 초기 흡광도를 측정하였다(A, C : 반응전 시료 및 대조군의 흡광도). 여기에 4mM의 L-DOPA를 40μL씩 넣어 혼합하고, 37°C에서 10분 반응 시킨 후 475nm에서 흡광도를 측정하였다(B, D : 반응 후 시료 및 대조군의 흡광도). L-DOPA oxidase 억제능값은 다음 식을 통해 구하였다.

$$\text{Tyrosinase \& DOPA oxidase inhibition(\%)} = [1 - \{ (B - A) / (D - C) \}] \times 100$$

2.4.2. DPPH 평가 방법

Vitabrid-C와 순수 비타민 C의 DPPH 라디칼 소거특성은 기존 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다.¹⁷⁻¹⁸ 먼저 70% 에탄올에 Vitabrid-C(0.1, 1.0, 10, 100μg/mL)와 대조군으로서 비타민 C(0.1, 1.0, 10, 100μg/mL)를 넣고 얼음중탕에 고정시킨다. 수용액을 잘 섞어준 후

spcetrophotometer 를 이용하여 517nm 에서 초기 흡광도를 측정한다(A, C : 반응 전 시료 및 대조군의 흡광도) . 0.15M DPPH(2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl) 용액 80 μ L 를 넣고 실온에서 20 분 반응시킨 후 517nm 에서 흡광도를 측정한다(B, D : 반응 후 시료 및 대조군의 흡광도). DPPH 라디칼 소거 활성값은 다음 식을 통해 구하였다.

$$\text{라디칼 소거 활성 (\%)} = [1 - \{(B - A) / (D - C)\}] \times 100$$

2.5. 피부 투과 실험

Viabrid-C 함유 트윈케익 제형을 Franz diffusion cell(유효면적 : 0.64cm², 수용상의 부피 : 5.2mL)을 이용하여 비타민 C 의 피부 투과 실험을 수행하였다.¹⁹⁻²¹ 수용액상은 0.025M potassium phosphate 용액 1L 에 dithiothreitol(DTT) 10mg, EDTA 41.4mg 을 첨가하여 용해시킨 수용액(pH 4.5)을 사용하였다. 먼저 수용액상을 Franz diffusion cell 에 채우고 32 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 로 유지시킨 다음 피부를 장착하고 피부의 표피층 쪽에 0.8% NaCl 수용액 0.05mL 를 도포한 후 Viabrid-C 함유 O/W 제형(비타민 C 1.0% 함유), Vitabrid-C 함유 트윈케익 제형(시험제품, 비타민 C 0.5% 함유), Vitabrid-C 미함유 트윈케익 제형(대조제품)을 도포하였다. 피부는 4 주령의 hairless mouse 로부터 피부층만을 적출한 다음 진피층의 지방층을 제거한 후 사용하였다. 피부를 확산 장치에 장착한 후 실험이 진행되는 동안 수용액상은 자석 교반기를 이용하여 600rpm 으로 교반하였으며, 투과된 비타민 C 의 정량을 위하여 도포 후 일정시간 경과된 시점에 수용액상 전액(5.2mL)을 취한 후 HPLC 로 정량하였으며, Franz diffusion cell 은 다시 수용액상으로 채워 보충하였다.

2.6. 임상 평가 방법

Vitabrid-C 2% 함유 트윈케익 제형(비타민 C 0.5% 함유)의 피부 미백 효능을 확인하기 위해서 임상실험을 8주간 수행하였다. 먼저 건강한 피부를 가진 25 세 이상의 여성 23 명을 대상으로 하였으며, 선정된 피험자들의 등 부위에 자외선을 조사하여 MED(Minimal Erythema Dose, 최소홍반량)를 결정하고 각각의 2MED 를 전박에 조사하여 인공 색소 침착을 유발하였다. 색소 침착 부위에 총 8 주간 Vitabrid-C 미함유 트윈케익(대조제품)과 Vitabrid-C 함유 트윈케익(시험제품)을 적용하여 2 주, 4 주, 6 주, 8 주 적용시점에서 피부색(멜라닌 지수) 및 피부 자극, 사용감 등을 평가하였다. 제품의 사용법은 8 주 동안 아침, 저녁 손질 시 대조제품과 시험제품을 인공색소침착 부위(팔 안쪽)에 바르게 하였다. 또한 처치 부위에 따른 오차를 줄이기 위해 피험자 번호를 짝수, 홀수 2 그룹으로 나누어 홀수 그룹은 위로부터 시험제품,

대조제품 순으로 바르게 하고 짝수 그룹은 위로부터 대조제품, 시험제품 순으로 바르게 하였다. 시험 부위의 피부색을 Mexameter MX 18(Courage + Khazaka, Germany)를 이용하여 멜라닌 지수(melanin index)를 측정하였다. 정확성과 반복성을 위해 외부의 온도, 습도에 따른 피부색의 변화를 최소화하기 위해 온도 20~22°C, 습도 45~50%의 항온 항습 상태에서 20 분간 적응을 한 후 측정하였다. 측정한 멜라닌 지수의 통계 분석 방법은 SPSS package program 의 paired t-test(유효 편차 $p < 0.05$)와 unpaired t-test(independent t-test, 유효 편차 $p < 0.05$)를 이용하여 검증하였다. 또한 연구에 참여한 피험자 특징, 안전성과 효능에 관한 설문 평가의 분석은 기술적 통계를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 비타민 C 무기 나노 캡슐화 반응

피부 친화형 층상 무기물을 이용한 비타민 C의 캡슐화 반응은 수용액 상에서의 공침법을 이용하여 수행하였다. 비타민 C는 약산성($pK_1 = 4.17$) 물질로서 수용액 상에서 $pH > pK_1$ 이 되면 수소가 해리 되어 음이온성 화합물인 L-ascorbate 종으로 변환된다. 전술한 바와 같이 층상 산화아연 무기물은 그 표면이 양으로 하전되어 있기 때문에 공침 반응 중에 음이온성 비타민 C 분자가 층상 무기물 표면에 피착되고, 반응이 진행됨에 따라 적층 구조를 형성하게 된다. 이와 같은 적층구조의 형성 유무는 X-선 회절 분석을 통하여 확인하였는데, 비타민 C 분자가 층상 무기물 사이에 단일층으로 평행하게 배열되어 있음을 확인할 수 있었다.²² 한편 1 차 비타민 C-무기 혼합물질을 나노 크기의 실리카 입자로 코팅을 하는 경우 X-선 회절 분석 결과 규칙적인 적층 구조가 매우 약화된 형태 즉, 무정형에 가까운 결정 구조를 갖는 물질이 얻어졌음을 알 수 있었다.

Fig. 1 은 나노 크기의 실리카 입자로 개질된 비타민 C-무기 혼합물질(Vitabrid-C)의 전개 방사형 주사전자현미경 관찰 결과를 나타낸 것이다. 그림으로부터 볼 수 있는 바와 같이 Vitabrid-C 입자는 미세 실리카 입자가 표면에 다공 구조를 이루면서 피착되어 있음을 관찰할 수 있다. 또한 Vitabrid-C 입자는 대략 구형에 가까운 응집체를 형성하고 있고, 그 응집체의 크기는 500 nm 정도임을 확인할 수 있다. 원소 분석 결과 Vitabrid-C는 40.7wt% SiO₂, 29.0wt% ZnO, 25.0wt% 비타민 C, 5.3wt% 물로 되어 있음을 자외선 흡광 분석, 원소 분석, 유도 쌍극자 플라즈마 분석법을 통하여 확인하였다.

3.2. Vitabrid-C 의 서방 특성

Fig. 2 는 용출된 비타민 C 에 대한 자외선 흡광 곡선이고, Vitabrid-C 의 시간에 따른 용출 거동을 함께 도시하였다. Vitabrid-C 로부터 비타민 C 의 용출은 그래프에서 볼 수 있는 바와 같이 시간에 따라 제어된 형태로 용출 됨을 알 수 있었다. 이것은 양이온성 표면 전하를 갖는 무기물 표면에 고정화되어 있던 음이온성 비타민 C 분자가 용액 중에 존재하는 음이온성 화학종인 염소 이온과의 이온 교환을 통해 나타나는 현상으로 해석할 수 있다. 이것은 Vitabrid-C 를 화장품 제형에 응용하는 경우 활성 성분인 비타민 C 의 서방특성을 구현할 수 있음을 의미하며 이에 따른 효능의 극대화 또는 지속성을 도모할 수 있음을 나타내는 것이다. 한편 용출된 비타민 C 와 순수 비타민 C 의 자외선 흡광 분석을 비교하면 두개의 흡광 곡선이 거의 일치함을 알 수 있는데 이것은 무기 캡슐에 의한 비타민 C 의 고정화, 또는 캡슐로부터의 용출 과정에서 비타민 C 분자 자체는 어떠한 화학적 변성 없이 고유한 물리 화학적 동등성을 유지하고 있음을 의미한다.

3.3. Vitabrid-C 의 항산화능

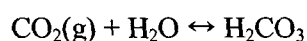
무기물에 의해 캡슐화된 비타민 C 의 생화학적 동등성을 확인하기 위하여 멜라닌 생성 효소인 L-DOPA oxidase 억제능과 DPPH 라디칼 소거특성을 Vitabrid-C 분말과 순수 비타민 C 를 이용하여 비교하였다. 평가 결과는 표 2 에 각각 정리하여 놓았으며, Vitabrid-C 와 비타민 C 가 같은 중량에서 동등한 항산화능이 있음을 확인 할 수 있었다. 이것은 역시 무기 캡슐에 의한 비타민 C 의 안정화가 비타민 C 고유의 생리화학적 성질에는 영향이 없음을 나타내는 것이며, 또 캡슐 내의 비타민 C 는 다공 형태의 캡슐 물질을 통해서 외부로의 용출이 용이하게 일어날 수 있음을 뒷받침하는 결과로 해석할 수 있다.

3.4. 피부투과 특성

Fig. 3 은 Viabrid-C 함유 O/W 제형(비타민 C 1.0% 함유), Vitabrid-C 함유 트윈케익(시험제품, 비타민 C 0.5% 함유), Vitabrid-C 미함유 트윈케익(대조제품)에 대한 경피 투과 곡선을 나타내었다. 우선 Viabrid-C 함유 O/W 제형과 시험제품은 경피 투과를 통한 비타민 C 가 검출이 되었으며 투과율은 Viabrid-C 함유 O/W 제형이 크게 관찰되었다. 이것은 Viabrid-C 함유 O/W 제형의 경우 피부와 직접적으로 접촉이 가능하여 비교적 효과적인 비타민 C 의 용출 및 피부로의 전달이 가능하기 때문으로 판단된다. 비록 트윈케익 제형 내 포함되어 있는 비타민 C 는 처방상 혼입되는 Vitabrid-C 이외의 물질들로 인하여 투과율이 좀 감소하기는

하지만 대조제품과 비교하면 분명히 트윈케익 입자로부터 비타민 C가 용출되어 피부로 전달, 경피 흡수가 일어남을 확인할 수 있다.

Fig. 4는 Vitabrid-C를 함유하고 있는 트윈케익 제형에 있어서 생리활성 성분인 비타민 C의 용출 및 피부 투과 메커니즘에 대한 모식도를 나타내었다. Vitabrid-C가 피부 표면에 도포되면 Vitabrid-C 입자는 피부 최외각층인 각질층, 모공 및 땀샘과 같은 부분으로 전달되고 여기에서 비타민 C가 용출된다. Vitabrid-C에서 비타민 C가 용출되는 경로는 다음의 세가지로 크게 구분하여 설명할 수 있다. 땀샘에서 분비되는 땀(NaCl)과의 치환, 인간 피부의 표피에 존재하는 지방산등의 피부노폐물에 의한 치환, 공기 중에 포함되어 있는 이산화탄소에 의한 치환 등이 Vitabrid-C 내에 존재하는 비타민 C의 용출을 일으키는 주요한 원인이 된다. 첫번째로는 피부에서 분비되는 땀에 의한 치환반응으로 그림에서와 같이 땀구멍에 Vitabrid-C 입자가 함침되면 주위에 존재하는 땀 내 주성분인 Na⁺와 Cl⁻ 이온 가운데, 특히 음이온 성분인 염소 이온이 내상 무기물질인 ZnO 표면과의 친화도가 매우 높기 때문에 표면 다공구조를 통해 캡슐 내로 이동하고, 이동된 염소이온은 이미 무기층간 표면에 고정화되어 있는 비타민 C 분자와 치환반응을 일으켜 비타민 C를 외부로 용출시키게 된다. 두번째는 피지 내에는 다량의 지방산(stearic acid, oleic acid 등)이 존재하고 이런 지방산은 Vitabrid-C 입자 표면에 실리카 나노 입자의 코팅에 의해 형성된 다공구조를 통하여 피부로부터 Vitabrid-C 입자로 흡착이 일어나고, 흡착된 유기 지방산 물질은 확산을 통해 캡슐 내로 이동된다. 캡슐 내로 이동된 유기물질은 내상 무기 층간 표면에 흡착되어 있던 비타민 C 분자를 치환시켜 역으로 비타민 C 분자가 다공성 캡슐을 통해 피부로 방출된다. 실제 0.1% stearic acid 혼합 수용액(에탄올 10%) 50mL를 이용한 비타민 C의 용출 실험 결과 3시간 동안 약 30% 정도의 비타민 C가 캡슐로부터 용출됨을 확인할 수 있었으며, NaCl에 의한 치환보다는 적은양이지만 캡슐 내 비타민 C의 용출에 기여함을 나타내는 것이다. 마지막으로 공기 중에 포함되어 있는 이산화탄소(CO₂)는 피부 표면에 존재하면 수분에 용해되어(Henry's law) 탄산(H₂CO₃)을 형성하게 된다. 이렇게 형성된 탄산은 물 존재 하에서 자동적으로 H⁺와 CO₃²⁻로 이온화 되며, 이온화된 탄산이온(CO₃²⁻)은 역시 다공성 외곽 구조를 통해 캡슐 내로 확산되어 무기 층간 표면에 고정화 되어 있는 비타민 C와의 치환반응을 통해 비타민 C를 캡슐 밖으로 용출시키는 역할을 하게 된다. 공기 중 이산화탄소의 부분압(P_{CO2})은 10⁻³⁵으로 Henry's law에 따르면 이산화탄소가 물에 용해된 평형식은 다음과 같다.²³



$$K_H = [\text{H}_2\text{CO}_3] / P_{\text{CO}_2} = 10^{-1.5} \text{ (25 }^\circ\text{C)}, \quad K_H : \text{Henry's constant}$$

그러므로 $[H_2CO_3] = P_{CO_2} \times 10^{-1.5} = 10^{-5.0}$ 이 된다. 본 연구에서는 실제 탈이온 증류수에 공기를 통과시킴으로써 공기중의 이산화탄소가 수용액 중에 충분히 용해되게 한 후 Vitabrid-C로부터 비타민 C의 용출정도를 시험하였으며 3시간 후 ~ 5% 정도의 비타민 C 용출을 확인할 수 있었다. 이와 같은 세가지 주요한 원인에 의해 용출된 비타민 C는 통상적인 비타민 C의 피부 투과 과정을 통해 피부 깊숙이 전달되게 된다. Franz diffusion cell과 같은 *in vitro* 실험에서는 피부 노폐물에 의한 비타민 C 용출은 크게 기여할 수 없지만 소량 첨가하는 NaCl 용액, Franz diffusion cell 내 용액의 경피로의 확산, 공기 중 CO₂의 영향에 의해 용출, 경피 투과가 일어나는 것으로 해석할 수 있다.

3.5. 임상 효능 평가

Vitabrid-C 2% 함유 트윈케익 제형(비타민 C 0.5% 함유)의 피부색 개선 효과를 확인하기 위해 임상 효능 평가를 8주간 수행하였다. 표 3에 Vitabrid-C 미함유 트윈케익(대조제품)과 Vitabrid-C 함유 트윈케익(시험제품)간에 각 시점 별 사용전 대비 멜라닌 지수 변화량의 평균 및 independent t-test를 실시하여 분석된 p-value를 정리하여 놓았다. 대조군과 시험군 모두에서 사용 기간에 따라 멜라닌 지수가 감소하였는데 8주 시점에서는 시험군이 대조군에 비해 통계적으로 유의한 감소 효과를 보였으며(p < 0.05), Vitabrid-C를 포함하는 트윈케익 제품의 피부 미백 효능을 임상적으로 검증할 수 있었다.

표 4는 피검자를 대상으로 시점별 설문 평가 결과이다. 설문 평가 결과를 보면 각 시점에서 대조군에 비해 시험군에서 미백 효과가 높다고 응답하였으며, 미백효과 경험비율은 사용기간이 길어질수록 높아짐을 확인할 수 있었다. 이외에도 사용감, 퍼짐성, 밀착감에 대한 응답 결과 시험군이 우수하였으며 사용기간이 길어짐에 따라 역시 긍정적 응답 비율이 증가함을 알 수 있었다. 한편 피험자 중 총 시험기간 동안 일시적으로라도 부작용을 경험한 피험자는 1명으로서 시험제품과 대조제품에 대해 2주 사용 후 각질이 생긴 경우이다. 이러한 증상은 이후 관찰되지 않았으므로 자외선 조사 결과 생긴 각질 현상이라고 사료된다.

4. 결 론

피부에 안전하면서도 피부색 개선 효과가 우수한 순수 비타민 C를 생체 및 피부 친화성이 탁월한 무기물질을 사용하여 캡슐화함으로써 순수 비타민 C의 약점인 안정성을 향상시킬 수

있었으며, 독특한 메커니즘에 의한 서방 특성을 갖는 Vitabrid-C 를 합성하였다. 무기 물질을 이용한 캡슐화 및 방출 과정에서 순수한 비타민 C의 물리 화학적 특성 및 생리 활성에 대한 변화, 변성은 관찰되지 않았으며, L-DOPA oxidase 억제능과 DPPH 라디칼 소거능 평가 결과 Vitabrid-C도 순수 비타민 C와 동등한 항산화능을 가지고 있음을 확인하였다. 또한 서방성을 갖는 미세 Vitabrid-C 입자를 함유한 트윈케익 제형에서도 효과적인 경피 투과가 일어남을 알 수 있었다. Vitabrid-C 함유 트윈케익의 피부색 개선 시험 결과 통계적으로 유의한 미백 효과가 있음을 임상적으로 검증할 수 있었다.

감사의 글

비타민 C 항산화능 평가에 도움을 주신 서울대 의과대학 피부과학교실 박경찬 교수, 임상평가에 도움을 주신 더마프로의 고재숙 박사, 김은정씨와 경피 투과 시험을 도와주신 아이큐어의 최영권 박사께 감사드리며, 본 연구가 부분적으로 보건복지부 Korea Health 21 R&D project(02-PJ1-PG1-CH11-0001)에 의해 수행되었음을 밝힙니다.

참고 문헌

1. L. J. Machlin, *Handbook of vitamins*, 2nd ed.; Marcel Dekker, Inc. (1991)
2. J.A. Drisko; J. Chapman; V.J. Hunter, *Gynecologic Oncology*, 88, 434, (2003)
3. A. Bossi; S.A. Piletsky; E.V. Piletska; P.G. Righetti; A.P.F. Turner, *Anal. Chem.*, 72, 4296,(2000)
4. I. Yamamoto; A. Tai; Y. Fujinami; K. Sasaki; S. Okazaki, *J. Med. Chem.* 45, 462,(2002)
5. H. Tsuchiya; C.J. Bates, *J. Nurt. Biochem.*, 9, 402(1998)
6. Y. Horino; S. Takahashi; T. Miura; Y. Takahashi, *Life Science*, 71, 3031(2002)
7. M. Gallarate; M.E. Carlotti; M. Trotta; S. Bovo, *Int. J. Pharm.*, 188, 233(1999)
8. R. Austria; A. Semenzato; A. Bettero, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15, 795(1997)
9. P. Spiclin; M. Gasperlin; V. Kmetec, *Int. J. Pharm.*, 222, 271(2001)
10. A. Semenzato; R. Austria; C. Dall'Aglio; A. Bettero, *J. Chromatogr. A*, 705, 385(1995)
11. S.H. Hwang; Y.S. Han; J.H. Choy, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 22, 1019(2001)
12. L. Yu, *J. Agric. Food Chem.*, in press, (2003)
13. N. Yokochi; T. Morita; T. Yagi, *J. Agric. Food Chem.*, in press, (2003)
14. I. Kubo; I. Kinoshita, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4121(1999)
15. M. Jimenez; S. Chazarra; J. Escribano; J. Cabanes; Garcia-Carmona, F. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4060(2001)
16. Y. Tachibana; H. Kikuzaki; N.H. Lajis; N. Nakatani, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5589(2001)
17. D.O. Kim; K.W. Lee; H.J. Lee; C.Y. Lee, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3713(2002)
18. Y. Sawai; J.H. Moon, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 6247(2000)
19. J.C. Oliver; S. Raouan; W. Couet, *Int. J. Pharm.*, 252, 133(2003)
20. S. Peltaola; P. Saarinen-Savolainen; J. Kiesvaara; T.M. Suhonen; A. Urtti, *Int. J. Pharm.*, 254, 99(2003)
21. D.S. Shaker; A.H. Ghanem; S.K. Li; K.S. Warner; F.M. Hashem; W.I. Higuchi, *Int. J. Pharm.*, 253, 13(2003)
22. J.H. Yang; S. Y. Lee; Y. S. Han; K. C. Park; J. H. Choy, *Bull. Korean Chem. Soc.*, in press (2003)
23. M. M. Morel, *Principles of Aquatic Chemistry*, John Wiley & Son(1983)

표 1. Vitabrid-C 함유 트윈 케익 제형 처방

조성물	함량(%)
A 상	
Talc	To 100
Sericite	35.00
Mica	15.00
TiO ₂	14.00
Silica	4.00
Nylon	2.00
B 상	
Iron Oxide Black	0.10
Iron Oxide Blue	0.10
Iron Oxide Red	0.50
Iron Oxide Yellow	2.00
C 상	
Silicon oil	10.00
D 상	
Methyl paraben	적량
Butyl paraben	적량
Octylmethoxycinnamate	1.00
Squalane	1.00
Hexyl Laurate	4.00
E 상	
향	적량

표 2. Vitabrid-C 와 순수 비타민 C 의 L-DOPA oxidase 항산화능 및 DPPH 라디칼 소거 특성

Concentration	L-DOPA Oxidase Activity (%)		DPPH Test (%)	
	비타민 C (대조군)	Vitabrid-C	비타민 C (대조군)	Vitabrid-C
0.1 µg/mL	9.9	8.7	2.6	0.8
1 µg/mL	20.5	22.9	11.2	11.5
10 µg/mL	45.8	46.8	69.5	68.2
100 µg/mL	100	99.7	88.3	88.3

표 3. 시점 별 멜라닌 지수의 변화량

시점	시료	Mean	Standard deviation	Standard Error Mean	Mean Difference	p
2 주	대조제품	-9.75	18.67	3.89	2.64	0.650
	시험제품	-12.39	20.47	4.27		
4 주	대조제품	-13.99	25.00	5.21	13.20	0.075
	시험제품	-27.19	24.14	5.03		
6 주	대조제품	-27.16	27.63	5.76	14.26	0.104
	시험제품	-41.42	30.63	6.39		
8 주	대조제품	-33.62	25.83	5.39	16.81	0.042*
	시험제품	-50.43	28.52	5.95		

표 4. Vitabrid-C 함유 트윈케익에 관한 설문 평가 결과

미백효과

사용 기간	대조군		시험군	
	frequency	%	frequency	%
제품 사용 2 주 후	2	8.70	13	56.52
제품 사용 4 주 후	3	13.04	17	73.91
제품 사용 6 주 후	3	13.04	15	65.22
제품 사용 8 주 후	1	4.35	20	86.96

사용감

사용 기간	대조군		시험군	
	frequency	%	frequency	%
제품 사용 2 주 후	14	60.87	20	86.96
제품 사용 4 주 후	16	69.57	23	100
제품 사용 6 주 후	17	73.91	23	100
제품 사용 8 주 후	18	78.26	23	100

피집성

사용 기간	대조군		시험군	
	frequency	%	frequency	%
제품 사용 2 주 후	18	78.26	17	73.91
제품 사용 4 주 후	14	60.87	20	86.96
제품 사용 6 주 후	19	82.61	22	95.65
제품 사용 8 주 후	19	82.61	23	100

밀착감

사용 기간	대조군		시험군	
	frequency	%	frequency	%
제품 사용 2 주 후	14	60.87	18	78.26
제품 사용 4 주 후	13	56.52	18	78.26
제품 사용 6 주 후	15	65.22	19	82.61
제품 사용 8 주 후	18	78.26	22	95.65

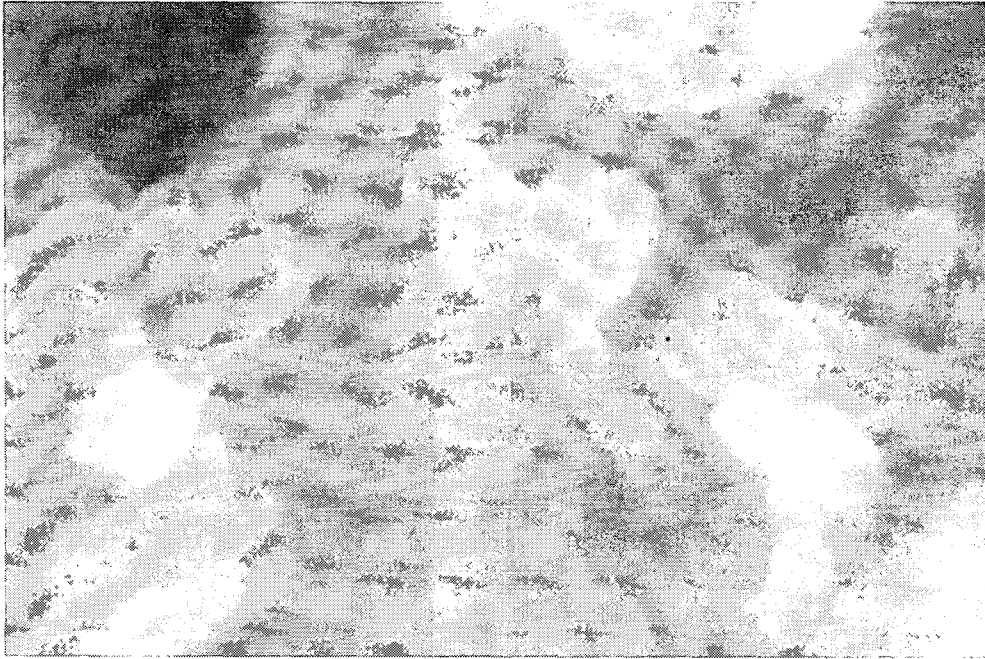


Fig. 1 Vitabrid-C 의 전계 방사형 주사 전자현미경 사진

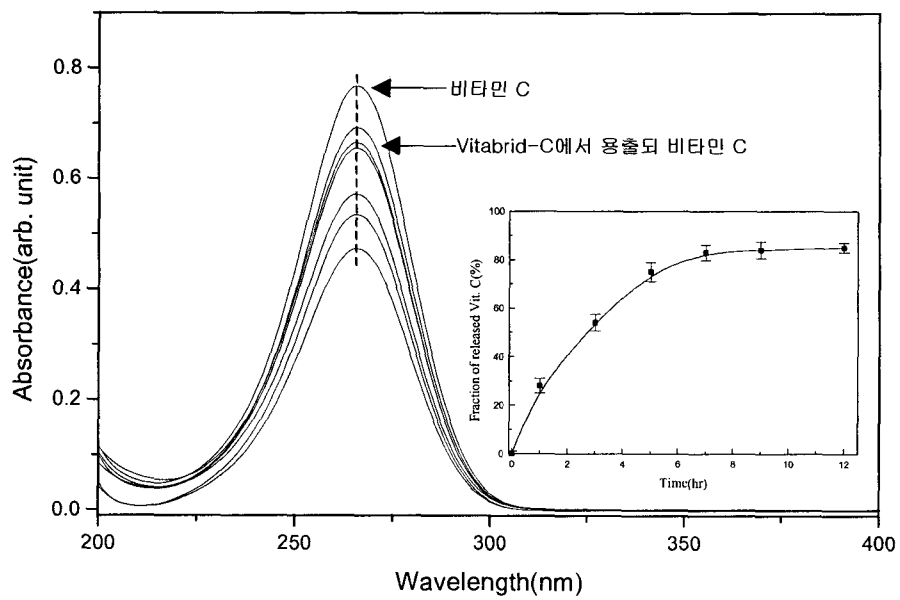


Fig. 2 Vitabrid-C 시간에 따른 용출 거동

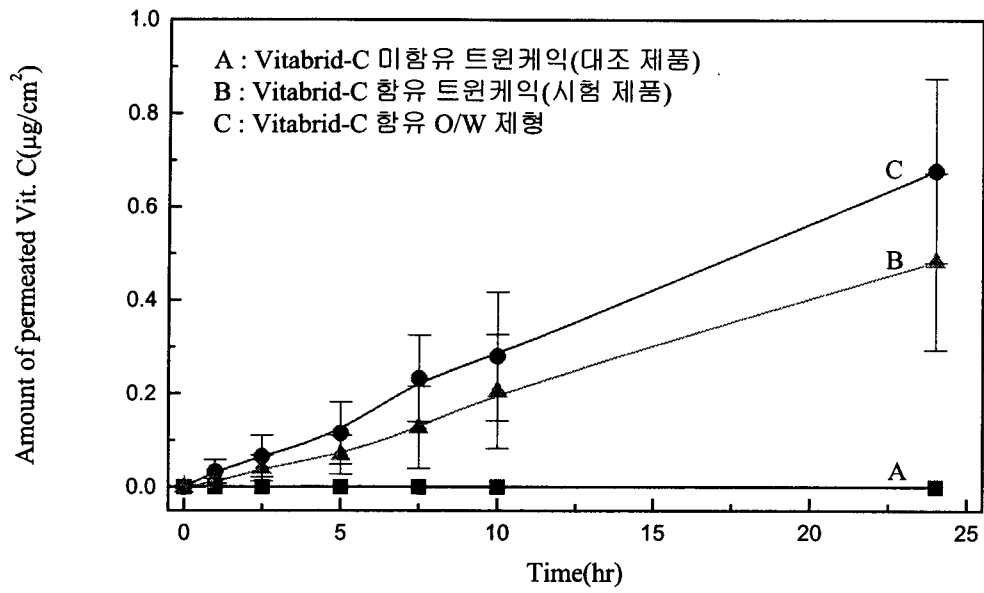


Fig. 3 피부 투과 profile

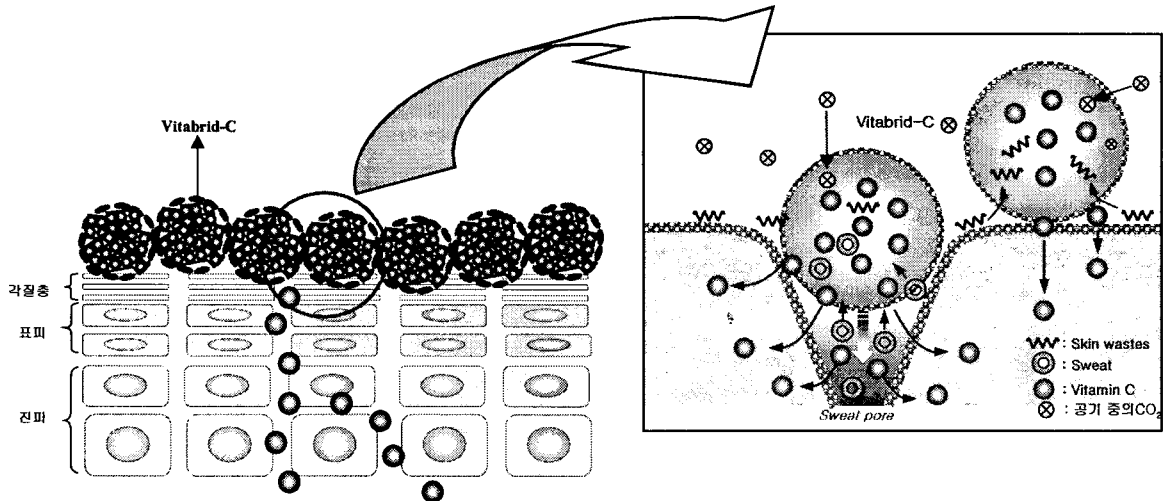


Fig. 4 피부에서 Vitabrid-C 함유 트윈케익 제형의 비타민 C 분자의 용출 및 피부 투과 메커니즘