

## 새로운 노화 방지 성분으로서 글루쿠로닉 애씨드의 기능과 화장품 응용

이 근 수<sup>†</sup> · 김 진 화 · 이 천 일 · 표 형 배 · 이 공 주\*

한불화장품(주) 기술연구소, \*이화여자대학교 약학부

### Application of Glucuronic Acid with New Cosmetic Active Ingredient

Geun-Soo Lee<sup>†</sup>, Jin-Wha Kim, Chun-Il Lee, Hyeong-Bae Pyo, and Kong-Joo Lee\*

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co., 72-7, Yongsung-ri, Umsung-gun, Chungbuk 369-830, Korea

\*College of Pharmacy, Ewha Womans University

**요약:** 피부 세포는 외부의 유해 요소 즉, 스트레스 환경에 노출되었을 때 세포 자신을 보호하기 위하여 다양한 방어 및 복구 체계를 가지고 있는데 그 중 하나가 보호단백질인 열충격단백질 70 kDa의 발현이다. Glucuronic acid를 피부세포에 다양한 농도로 전처리한 다음 유해자극(열, 활성산소)을 주었을 경우, western blotting을 통해 0.12% 농도에서 세포 내 열충격단백질이 발현됨을 알 수 있었다. 그리고 confocal microscopy 및 세포생존을 실험을 이용하여 열 및 활성 산소에 대한 우수한 세포보호 효과를 확인하였다. 또한 마우스 피부를 이용하여 glucuronic acid 및 수중유(O/W)형 에멀전에 적용하였을 때 경피 흡수 양상을 비교한 결과, glucuronic acid는 빠른 경피흡수거동을 보였다(투과속도 0.83114 mg/cm<sup>2</sup>/h, 지연시간 1.2 h, 분배계수 0.114). 에멀전에서는 투과속도는 0.04153 μg/cm<sup>2</sup>/h, 누적투과량은 1456.25 μg/cm<sup>2</sup>로 감소하였지만 지연시간은 2.48 h으로 증가하였고 지속적인 경피흡수(서방성)를 보였다.

**Abstract:** Exposure to elevated temperatures, chemical (active oxygen), or physical stress (UV light) induces immediate physiological response, the expression of heat shock proteins in cells. Thus, cells with elevated Heat Shock Protein levels become more tolerant to stress conditions that are otherwise lethal. First, we studied on the new function of glucuronic acid (GA) as preventive material of skin aging. The application of the GA shows significant induction of Heat Shock Protein 70 kDa (HSP 70 kDa) in contrast to cells without it. GA at the concentration which can induce HSP 70 kDa, protects the cell death induced by second stress (heat shock and hydrogen peroxide) in NIH3T3 cells. Second, we studied on *in vitro* transdermal permeation characteristic of GA through the excised mouse skin. In this study, we compared the skin permeability of GA in water with O/W emulsion. As a result, skin permeation parameters of GA shows lag time 1.2 h, partition coefficient 0.114, permeation flux rate 0.83114 mg/cm<sup>2</sup>/h. In case of lag time, O/W emulsion containing GA increase 2.48 h. Also, the total accumulation permeation content decreased in contrast to GA solution after 24 h. But it has long-term permeability of glucuronic acid. These results suggest that glucuronic acid could be a good cosmetic active ingredient.

**Keywords:** glucuronic acid, heat shock protein, anti-aging, o/w emulsion, long-term permeability

## 1. 서 론

세포는 외부의 유해 요소 즉, 스트레스 환경에 노출되었을 때 세포 자신을 보호하기 위하여 다양한 방어 및 복구 체계를 가지고 있다. 특히 피부세포는 다양한 외부적 자극에 노출되어 있으므로, 이러한 자극으로부터 세포를 보호하는 것은 세포의 노화나 사멸을 방지하는데 중요하다 할 수 있다. 세포가 열 충격, 자외선, 산화제, 저

산소증, 중금속과 같은 다양한 외적 스트레스 요인에 노출되었을 때 예정된 세포 사멸이 유도된다는 것이 널리 알려져 있다.

1962년 초파리 세포에서 처음으로 열 충격에 의해 특이적으로 합성이 증가되는 단백질이라 하여 열충격 단백질이라 명명된 Heat Shock Protein (HSP)가 발견되었다. 최근 여러 연구를 통해 *in vivo* 또는 *in vitro* 상태에서 열충격단백질을 과발현시키면 매우 강한 독성의 외부 스트레스로부터 섬유아세포를 방어한다고 보고되고 있다 [1-5]. 이러한 열충격단백질의 발현이 피부 노화를 지연

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: bluewin2@chol.com)

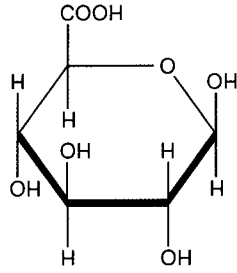


Figure 1. Structural formula of glucuronic acid (M.W. 194.1).

시켜 준다는 연구보고도 있다[6]. 최근 외적 스트레스 인자에 대해 열충격단백질의 발현을 유도하는 물질로 sodium arsenite, salicylic acid, 7-dehydrocholesterol의 기능을 보고되고 있다[7,8].

한편 이러한 생리활성물질들이 적절한 기능이 발휘되기 위해서는 목적 물질의 경피 흡수 거동이 중요하다. 결국 피부 장벽을 적절하게 제어하지 못한다면 목적활성 성분은 그 기능을 효과적으로 발휘할 수 없다. Glucuronic acid와 같이 이온화 상태의 수용성 약물은 경피흡수속도가 각질을 통한 것보다 빠르고 주로 피부 각질세포 사이의 간극을 통하여 표피를 통과한다고 보고되고 있다[9,10]. 그러나 피부의 생물학적 배리어 기능과 투과성은 서로 상반되는 피부의 기능으로 정상 피부에서의 투과성은 현저히 낮다. 더욱이 수용성약물의 경우, 경피흡수효율이 양호하더라도 예민할 내에 포함되어 피부에 도포 시에는 제제를 구성하는 유, 수용성 물질들의 경쟁적 피부 흡수 현상에 의해 목표로 하는 활성 성분의 피부 흡수가 제한을 받게 된다. 따라서 약물이 피부에서 기능을 효과적으로 발휘하기 위해서는 제제를 통한 약물의 서방성을 실현하는 것이 중요하다.

따라서 본 연구에서는 새로운 노화방지 성분으로서 glucuronic acid의 열충격단백질 발현을 통하여 외부 스트레스 인자에 대한 피부 섬유아세포 방어 효과 및 마우스 피부에서 경피흡수거동과 제제와의 관계를 확인하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 실험 재료 및 기기

Glucuronic acid ( $C_6H_{10}O_7$ ; M.W. 194.01)는 ACROS (미국)에서 공급받아 사용 하였으며 그 외 실험에 사용된 재료는 시약 등급 혹은 화장품 등급의 것들을 사용하였다 (Figure 1).

세포주의 선정 및 배양은 NIH3T3 (mouse fibroblast)에 10% 혈청, 100  $\mu$ g/mL 스트렙토마이신, 100 units/mL 페니실린 G가 함유된 DMEM 완전배지를 첨가하여 5%  $CO_2$ -95% air의 37°C 배양기에서 배양하였다. 경피흡수

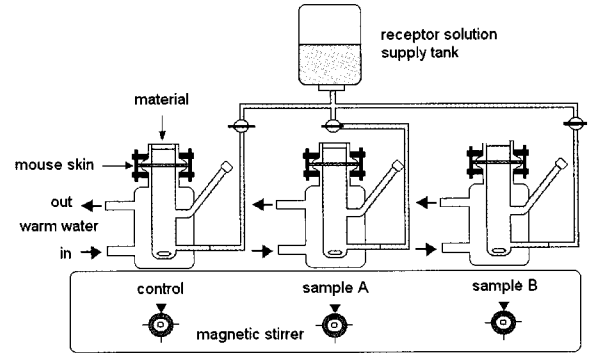


Figure 2. Transdermal permeation system.

실험에 사용되는 생체막은 마우스 스킨을 제모 후 적출(2 × 2 cm)하여 사용하였다. 그리고 경피 흡수되는 glucuronic acid의 농도 변화는 액체크로마토그래프(Dionex co., 미국)로 전기화학검출기를 이용하여 정량하였다. 경피 흡수 장치는 수직형의 Keshary-chien diffusion cell을 사용하였다(Figure 2).

### 2.2. 열충격단백질(HSP70kDa) 발현 실험

#### 2.2.1. 세포 생존율 실험

자극(열, 활성산소)을 주고 24 h 회복시킨 세포를 96 well plate에 같은 수를 심었다. 48 h 후, 10% trichloroacetic acid (TCA)를 첨가하여 4°C에서 1 h 동안 정지시킴으로서 단백질을 침전시켰다. 물로 씻은 후, 공기 중에 말려 단백질을 플레이트 바닥에 고정시켰다. 고정된 세포에 SRB 용액을 넣어 단백질을 염색시킨 후 공기 중에 말렸다. 단백질과 결합된 염료는 10 mM Tris base (pH 10.5)를 사용하여 용해시키고 565 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

#### 2.2.2. Glucuronic acid에 의한 열충격단백질 유도

NIH3T3 (mouse fibroblast) 약  $7 \times 10^5$ 의 세포를 1xHBSS 완충용액으로 두 번 씻은 후, 다양한 농도의 glucuronic acid 수용액을 다양한 시간으로 처리하여 MTT 분석하여 세포에 대한 독성을 확인하였다. 세포에 대한 독성은 거의 없으면서 열충격단백질을 유도할 수 있는 농도를 선택하여 세포에 30 min간 처리한 후, 15 h 회복시킨 세포를 수집하였다. 세포에 2 Gel sample buffer를 처리하여 세포를 용해시킨 후, 동량의 단백질을 11% SDS-PAGE에 걸었다. 열충격단백질 유도는 단일 클론 열충격단백질 항체와 GAM-HRP 항체를 사용하여 확인하였다.

**Table 1.** Composition of Formulations

Components	Glu. sol.	Glu. product
Oil phase		
Sodium acyl glutamate	-	1.00
Glyceryl stearate SE	-	1.00
Dimethicone	-	0.30
Squalane	-	10.0
Cetyl alcohol	-	1.50
Tocopheryl acetate	-	0.50
Water phase		
Triethanolamine	-	3.34
Xanthan gum	-	0.10
Butylene glycol	-	15.0
Paraben	-	0.20
Glucuronic acid	5.00	5.00
Purified water	q.s to 100	q.s to 100
pH	3.00	4.55
Viscosity(cps)	-	1500

2.2.3. [<sup>35</sup>S]-Methionine의 시간적 표지에 의해 변화된 단백질 합성 확인

Glucuronic acid를 처리하여 단백질 합성 체계에 변화를 주는지 확인하기 위하여 물질의 처리 후, 세포 내 단백질 합성 양상을 [<sup>35</sup>S]-methionine (1 uci/mL)이 함유된 methionine free DMEM 배지에서 1 h 동안 배양함으로써 확인하였다. 표지된 단백질은 SDS-PAGE에서 분리한 후, BAS2500 (Fujiphotofilm Co. Ltd., 일본)을 사용하여 정량하였다.

2.2.4. 외부 스트레스 방어 효과 확인

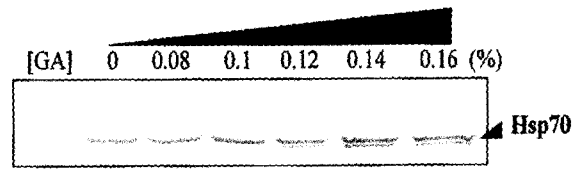
0.12% (6 mM) Glucuronic acid를 전처리한 후, 15 h 회복시킨 세포에 60 min간 열충격(45°C) 또는 10 mM hydrogen peroxide를 처리한다. 이렇게 자극을 준 세포를 70% 에탄올을 첨가하고 -4°C에서 1일 정지시켜 고정하였다. 고정된 세포를 수집하여 DNA만을 PI염색하고 프래파라이트를 만들어 confocal microscopy를 사용하여 세포의 변화된 형태를 비교하였다.

2.3. Glucuronic Acid의 경피흡수 거동 실험

2.3.1. Glucuronic Acid의 경피흡수실험

본 실험에 사용된 시료는 glucuronic acid 수용액과 독자적으로 개발한 수중유형(O/W)의 에멀전 처방을 사용하였으며, 처방 구성 성분들은 일반적으로 사용되는 화장품 등급의 원료를 사용하였다(Table 1).

수용체에는 정제수를 사용하였으며, 실온에서 외부상은 37 ± 0.5°C로 온도를 유지하여 체온과 동일한 상태를 유지



**Figure 3.** Effect of glucuronic acid (GA) on heat shock protein 70 kDa induction.

토록 하였으며 내부상은 magnetic bar로 일정하게 교반하였다. 수용체와 접촉하는 생체막의 면적은 2 cm<sup>2</sup>이며 두께는 0.5 mm, 수용체의 용량은 10 mL이다. 준비된 시료(glucuronic acid 수용액, glucuronic acid 함유 에멀전)에는 glucuronic acid를 각각 5% 적용하였다. 각각의 시료 1 mL을 경피흡수장치의 생체막 표면에 투여하고 일정 시간 간격(1, 2, 4, 8, 24 h)으로 1 mL의 시료를 채취함과 동시에 동량의 정제수를 보충하였다. 투과된 glucuronic acid의 함량은 HPLC를 이용하여 정량하였다.

2.3.2. 유/수분 분배계수(k)의 측정[11]

약물의 분배계수 k는 계(state) 내에서 물질의 거동을 예측하기 위해 사용되는 중요한 무차원 계수이다.

$$k = C_{io}/C_w$$

C<sub>io</sub> : n-옥탄올 속에 녹아있는 glucuronic acid의 농도

C<sub>w</sub> : 물속에 녹아있는 glucuronic acid의 농도

n-옥탄올과 순수를 25°C에서 12 h 진탕하여 상호 포화시킨 후 각 층을 분리하였다. Glucuronic acid 2% 수용액을 유리관에 500 μL 넣고 나서 n-옥탄올과 정제수를 각각 10 mL씩 넣고 밀봉한 다음 30 min 동안 진탕하여 평형에 도달시킨다. 이것을 원심분리 한 후 각각의 glucuronic acid의 함량을 HPLC를 이용하여 정량한다.

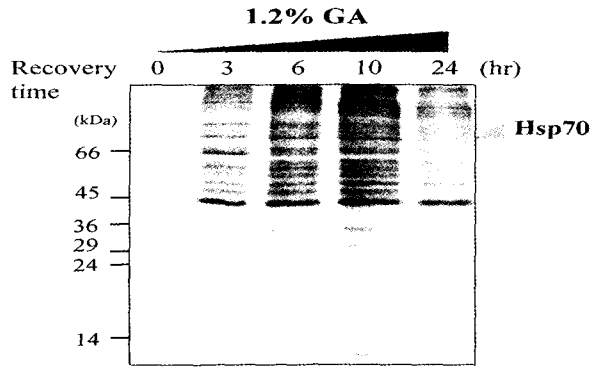
2.3.3. 수용체중 Glucuronic Acid 정량 및 경피 흡수 파라미터의 계산[11,12].

각 시료의 glucuronic acid가 마우스 피부를 통해 시간당 투과되는 농도를 HPLC를 이용하여 정량 한 다음, 시간에 대한 함수 그래프를 그려 지연시간(T<sub>L</sub>) 및 투과속도(J<sub>s</sub>), 확산계수(D) 등을 구한다.

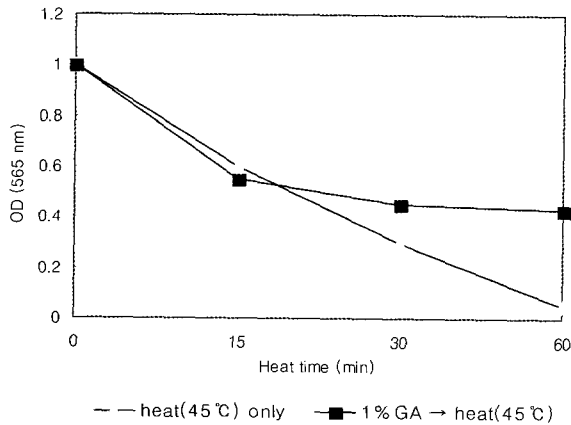
3. 결과 및 고찰

3.1. Glucuronic Acid에 의한 열충격단백질의 발현

Glucuronic acid의 농도 변화에 따른 열충격단백질의 유도를 western blotting을 통해 확인하였다. 0.1%부터 0.16% 사이의 농도에서 열충격단백질(70 kDa)의 발현이 유도되었다. 0.16%에서는 glucuronic acid가 오히려 세포



**Figure 4.** Detection of protein synthesis by [<sup>35</sup>S]-methionine pulse labelling. Cells were stimulated with 6 mM glucuronic acid (GA) and covered various times. Patterns of cellular protein synthesis were determined by [<sup>35</sup>S]-methionine pulse labelling.

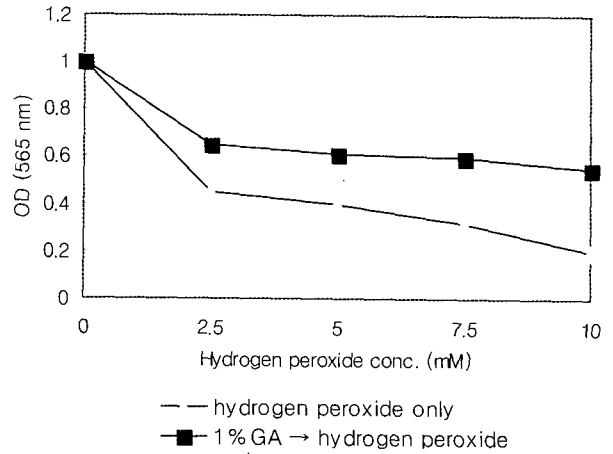


**Figure 5.** Protective effects of glucuronic acid (GA) to heat shock. After GA treated on NIH3T3, cells were recovered for 15 h and treated heat shock at 45°C by the ELISA reader (565 nm).

에 강한 스트레스로 작용한다. 따라서 약한 스트레스가 되면서도 동시에 열충격단백질의 발현을 효과적으로 유도하는 glucuronic acid의 최적 농도는 0.12%였다(Figure 3).

### 3.2. [<sup>35</sup>S]-Methionine의 시간적 표지에 의해 변화된 단백질 합성 확인

1.2% Glucuronic acid를 처리한 다음, 회복시간에(0, 3, 6, 10, 24 h) 따른 새로운 단백질 합성 변화를 pulse label 을 통해 알아보았다. Glucuronic acid를 처리하자마자 단백질 합성이 거의 억제되는 것을 볼 수 있다(Figure 4). 그러나 약 3 h 후 열충격단백질 발현이 유도되면서 다른 단백질 합성도 유도되는 것을 볼 수 있다. 24 h 후에는 열충격단백질의 발현이 정지되면서 동시에 다른 단백질



**Figure 6.** Protective effects of glucuronic acid (GA) to hydrogen peroxide. After GA treated on NIH3T3, cells were recovered for 15 h and treated heat shock at H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by the ELISA reader (565 nm).

의 발현도 감소되는 것을 확인하였다. 이것은 western blotting을 통해 시간 경과에 따른 열충격단백질 발현 실험 결과와 동일하였다.

### 3.3. Glucuronic Acid의 열 및 활성산소에 대한 방어 효과

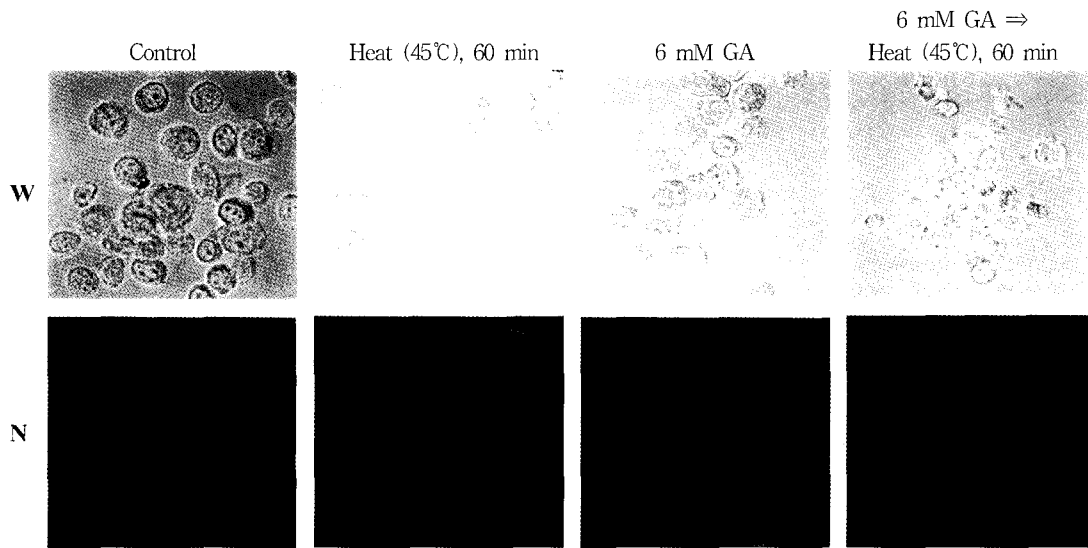
1% Glucuronic acid를 전처리하여 15 h 회복시킨 세포에 15, 30, 45, 60 min간 열충격(45°C)을 준 결과, 열충격 시간이 증가할수록 glucuronic acid의 전처리에 의해 세포가 사멸하지 않고 생존함을 볼 수 있었다(Figure 5). 이는 glucuronic acid에 의해 세포가 내성을 나타내는 것으로 판단된다. 또한 0, 1.25, 2.5, 5 mM의 hydrogen peroxide를 처리한 경우에도 마찬가지로 낮은 농도에서부터 대조군에 비해 확실히 세포의 생존율에 차이가 나는 것을 볼 수 있었다(Figure 6). 그리고 nuclear fragmentation이 일어난 세포를 직접 confocal microscopy를 사용하여 세포의 변화된 형태를 관찰한 결과, 0.12% (6 mM) glucuronic acid를 전처리한 세포는 강한 2차 스트레스(열, 활성산소)로 인해 발생하는 세포 사멸에 대하여 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Figure 7, 8).

### 3.4. Glucuronic Acid의 분배계수(k)의 측정

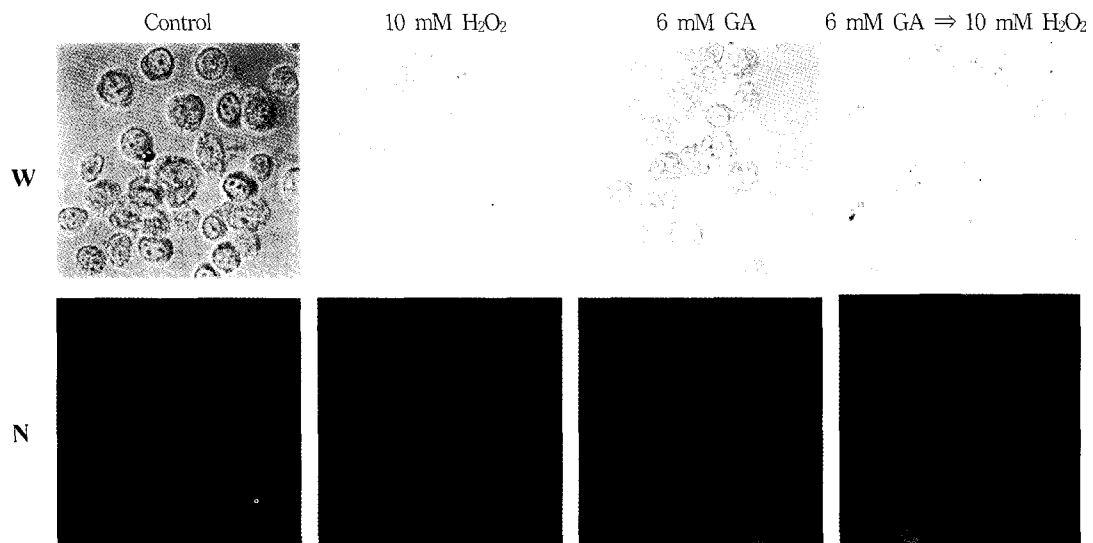
n-옥탄올과 HPLC를 사용하여 glucuronic acid의 유/수 분배계수의 측정 결과, 0.114로 나타났으며 chloroacetic acid와 유사한 분배계수를 갖고 있음을 알 수 있었다(Table 2)[13].

### 3.5. Glucuronic Acid의 경피흡수거동

각 조건별 마우스 피부를 통해 경피 흡수되는 glucuronic



**Figure 7.** Protection effects of glucuronic acid to heat shock (45°C). After glucuronic acid (GA) treated on NIH3T3, cells were recovered for 15 h and treated heat shock at 45°C by the confocal microscopy. W (white), N (normal).



**Figure 8.** Protection effects of glucuronic acid to hydrogen peroxide. After glucuronic acid (GA) treated on NIH3T3, cells were recovered for 15 h and treated heat shock at H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by the confocal microscopy. W (white), N (normal).

**Table 2.** Comparison of Measured and Calculated Partition Coefficient (25°C)

Material	Log <i>k</i> <sub>ow</sub>
Chloroacetic acid	0.134
Propanol	0.483
Propinoic acid	0.253
Ethanol	-0.072
Trimerhylamine	0.515
Glucuronic acid*	0.114

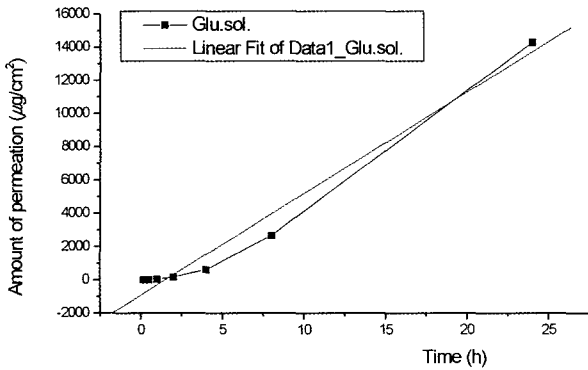
\* Measured partition coefficient

acid의 투과 파라미터들은 다음과 같다(Table 3).

Glucuronic acid는 수용액 상태에서 빠른 경피 흡수 거동을 보였다(Figure 9). 그러나 수중유(O/W)형 에멀전에 적용하였을 경우, glucuronic acid의 투과속도는 0.1453 μg/cm<sup>2</sup>/h로 약 20배 감소하였고 누적투과량 역시 1456.25 μg/cm<sup>2</sup>으로 24 h 후 약 10배 감소하였지만 지연시간이 2.48 h으로 증가하였다(Figure 10). 그 이유는 glucuronic acid 외에 처방 구성 성분들이 생체막에 추가로 흡수되면서 생체막 내의 총약물농도가 증가하여 glucuronic acid

**Table 3.** Transdermal Permeation Parameters of Samples

Sample	Lag time T <sub>L</sub> (h)	Flux J <sub>s</sub> (μg/cm <sup>2</sup> /h)	Diffusion coefficient D (cm <sup>2</sup> /h)	dQ/dt (μg/L/h)
Glu. sol.	1.20	0.83114	3.472×10 <sup>-2</sup>	9.20
Glu. product	2.48	0.04153	1.680×10 <sup>-2</sup>	0.95



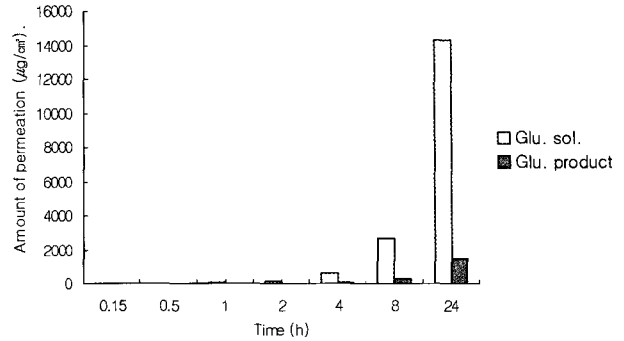
**Figure 9.** Transdermal permeation profile of glucuronic acid. Glu. sol.: 5% glucuronic acid water solution.

에 대한 생체막의 초기 저항이 커졌기 때문이다[14].

#### 4. 결 론

열충격 단백질은 구조 및 기능에 대한 연구를 통해 단백질 합성, 분해와 같은 과정에서 분자 샤페론으로 작용을 하는 것이 확인되었다. 유전자 발현은 발병원적 자극이나 환경 스트레스에 의해 유도가 되며, 열충격 단백질이 과발현 되면 세포 내 신호 전달 과정이 억제되거나 효소활성 변화 등을 초래하여, 치명적인 자극으로부터 세포를 보호하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 열충격 단백질은 정상적인 경우나 발병원적인 조건 하에서 세포 내 곳곳에 분포한다고 알려져 있다. 이러한 사실들은 열충격단백질이 생물체의 생존에 중요한 역할을 하고 있다는 것을 나타낸다. 본 연구를 통해, glucuronic acid는 열충격단백질의 발현을 유도하였으며 이를 세포에 전처리하였을 때 강한 외부 스트레스(열, 활성산소)로부터 우수한 세포 사멸 방어 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 따라서 glucuronic acid는 세포에 거의 독성이 없으면서도 피부에 유해한 자극으로부터 피부 세포를 보호해 주는 새로운 노화 방지 성분으로서 기능을 확인하였다.

그리고 glucuronic acid의 마우스 피부 적용 시 경피흡수거동을 실험한 결과, glucuronic acid는 수용액 상태에서 원활하고 빠른 경피 흡수 거동을 보였다. 이러한 경피 흡수 양상은 유기산의 일종인 glucuronic acid 자체의 이



**Figure 10.** Transdermal permeation profile of glucuronic acid samples. Glu. sol.: 5% glucuronic acid water solution. Glu. product: 5% glucuronic acid + O/W emulsion.

온화 정도에 의해 피부장벽기능이 이완되기 때문에 판단되며 그 정도가 과해지면 피부에서 자극을 유발할 가능성이 높다[15]. 그러므로 피부에 대한 자극은 없으면서 피부에서 오랫동안 흡수 양상을 지속하도록 하는 제재화 과정이 중요하다. 자체 개발한 수중유(O/W)형 에멀전의 마우스 피부에서 glucuronic acid의 경피흡수양상을 보면, glucuronic acid의 투과속도 및 확산계수, 지연시간, 누적 경피흡수량 등이 큰 폭으로 감소하였지만 지속적인 경피 흡수거동(서방성)을 보였다. 따라서 제재화 과정을 통해 glucuronic acid를 효율적으로 피부에 적용시킬 수 있었다.

이상으로 본 연구를 통해, glucuronic acid는 효과적인 주름개선 신성분으로 이를 함유한 제재 역시 피부 세포에는 거의 독성이 없으면서도 외부유해인자(노화요소)로부터 피부를 보호해 주는 주름개선 화장품으로 그 적용이 기대된다.

#### 감사의 글

본 연구의 일부는 이화여자대학교 분자생명과학부 세포신호전달연구센터와 공동으로 수행하였으며 이에 감사드립니다.

#### 참 고 문 헌

1. K. J. Lee, Signaling components in stress-induced apoptosis, 6th IUBMB seoul conference, *Molecular & Cellular Networks* (1999).
2. P. James, Functional specificity among HSP70 molecular chaperones, *Science*, **275**, 387 (1997).
3. S. Friedhelm, HSP expression and UV light induced damage in cultured human skin cells, 20th IFSCC congress, **1**, 133 (1998).
4. R. S. Williams and J. A. Thomas, Human heat shock

- protein 70 (hsp70) protects murine cells from injury during metabolic stress, *J. Clin. Invest.*, **92**, 503 (1993).
5. M. K. Simon, A. Reikerstorfer, and A. Schwarz, Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblast, *J. Clin. Invest.*, **95**, 926 (1995).
  6. S. I. Rattan, Repeated mild heat shock delays aging in cultured human skin fibroasts, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **45**, 753 (1998).
  7. T. Mammone, N. Muizzuddin, and E. Goyarts, Normal human epidermal keratinocytes with 7-hydrocholesterol express increased levels of heat shock protein, *J. Cosmet. Sci.*, **55**(2), 149 (2004).
  8. G. C. Li, Induction of thermotolerance and enhanced heat shock protein synthesis in chinese hamster fibroblast by sodium arsenite and ethanol, *J. Cell. Physiol.*, **115**, 116 (1985).
  9. A. M. Kroon and C. Bogert, Antibacteria drug and their interference with the biogenesis of mitochondria in animal and human cell, *Pharmacol. Weekbl. Sci.*, **5**, 81 (1983).
  10. A. C. Williams and B. W. Barry, Skin absorption enhancers, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carr. Sys.*, **9**(3), 305 (1992).
  11. 김대덕, 조홍, 김미경, 이치호, 테스토스테론의 경피흡수제제 개발, *한국피부장벽학회지*, **2**(1), 43 (2000).
  12. A. Mirsa and S. Gang, Formulation of transdermal system for biphasic delivery of testosterone, *J. Control Release*, **39**, 1 (1996).
  13. S. J. Park and J. M. Back, Prediction of partition coefficient for some organic compounds using UNIFAC, *J. Ind. Eng. Chem.*, **6**(2), 100 (2000).
  14. 용철순, 이종달, 최한곤, 경피흡수에 영향을 미치는 인자, *한국피부장벽학회지*, **2**(1), 49 (2000).
  15. H. Nogami and M. Hanano, Absorption and excretion of drugs, *Chem. Pharm. Bull.*, **10**(3), 1962 (1962).