

Monoolein액정상이 Retinylpalmitate의 안정성과 경피전달에 미치는 효과에 관한 연구

이경금 · 강명주* · 최영욱*† · 이재휘*†
중앙대학교 의약식품대학원, * 중앙대학교 약학대학
(2007년 7월 31일 접수 · 2007년 8월 14일 승인)

Study on the Influence of Cubic Liquid Crystalline Phases of Monoolein on the Stability and Transdermal Delivery of Retinylpalmitate

Kyoung Gum Lee, Myung Joo Kang*, Young Wook Choi*† and Jaehwi Lee*†

Graduate School of Food and Drug Administration, Chung-Ang University, 221 Heuksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

*College of Pharmacy, Chung-Ang University, 221 Heuksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

(Received July 31, 2007 · Accepted August 14, 2007)

ABSTRACT – Retinoids have many important and diverse functions and particularly, have been widely used as anti-aging agent and for the treatment of acne and psoriasis in cosmetics. However, retinoids have low stability against the air, light, water, oxygen and heat, thus, to stabilize the retinoids in formulations is very critical procedure. In this study, cubic liquid crystalline phase of monoolein was applied to stabilize the retinylpalmitate (RP) and to enhance the transdermal permeation. Cubic liquid crystalline phase significantly enhanced the stability of RP. After 15 days, the content of RP in the cubic formulation was 94.7% while the content of RP in ethanol solution was below 0.5% at room temperature. Although BHT containing crystalline phase showed the slightly increased stability of RP, there were no significant differences in RP stability between with or without antioxidants (ascorbic acid, α -tocopherol, BHT, BHA) at 40°C. The skin retention of RP in crystalline formulations was approximately 5.3~6.4 times greater than that of o/w cream formulation. Incorporation of RP into cubic liquid crystalline phase of monoolein effectively stabilized the RP and worked as excellent topical vehicle for RP. Liquid crystalline phase is considered to be suitable formulation for RP for topical delivery system as a stabilizer and permeation enhancing agent.

Key words – Retinoids, Monoolein, Liquid crystalline phase, Transdermal delivery, Stability, Antioxidants

Retinoids는 비타민 A의 유도체로서 성장과 생존에 필수적인 물질로, 시각과 면역 계 그리고 상피 조직의 분화에 영향을 주는 물질이다. 특히 피부 주름 개선 효과가 탁월하여 기능성 화장품으로 널리 개발, 시판되고 있다.¹⁾ 주름 형성의 증가는 섬유아세포(fibroblast)의 감소 또는 기능저하, 콜라겐의 감소 또는 합성 능력 저하, 변성 엘라스틴의 축적 등에 의해 피부의 탄력이 감소함으로써 나타나게 된다. Retinoids는 피부의 과각화를 막아주고, 표피층의 DNA를 활성화시켜 단백질의 생합성을 촉진시키고 세포의 재생을 촉진함으로써 광노화(photoaging)된 피부치료에 탁월한 효과를 보이는 것으로 입증 되었다.¹⁾ 또한 세포 간 지질의 과산화를 예방하고, 여드름 피부에 있어서도 효과가 탁월한 것으로 보고되었다.²⁾

Retonoids는 기능성 성분으로 화장품 제제에 다년간 사용되고 있으나 열, 수분, 공기, 광선 등 외부 요인과 접촉 시

매우 불안정하여 사용에 제한을 받고 있다.³⁾ 따라서, 제형 개발을 통한 retinoids의 안정성 확보는 화장품 및 제약 산업에 있어서 매우 중요하다고 할 수 있다. 지금까지 liposome⁴⁾, cyclodextrin complex⁵⁾, multiple emulsion 및 palmitic acid나 acetic acid와의 ester 형태인 retinylpalmitate, retinylacetate⁶⁾ 등의 물리화학적 안정화 방법들이 적용되어왔으나 안정성은 여전히 문제점으로 남아있는 실정이다.⁷⁾

Monoolein은 글리세롤 1분자와 올레인산 1분자가 결합된 형태로 왁스 상의 양친매성 극성 지질이다. 양친매성의 극성 지질들이 물과 혼합되면 열역학적으로 안정한 지질 이중층이 자발적으로 형성되듯이, monoolein 역시 수화에 의해 약물전달시스템으로 사용될 수 있는 액정상을 자발적으로 형성한다. 특히 실온에서 monoolein에 물(20-45%, w/w)을 혼합할 때 형성되는 큐빅 액정상은 구조적 특성상 활성성분을 보호하고 가용화 효과 및 유효성분의 방출을 조절, 유지하며 피부 침투를 증대시키는 효과적인 피부 약물 전달 수송체로 화장품이나 의약품산업에 널리 활용될 수 있는 장점이 있다.^{8,9)} 따라서 retinoids를 큐빅 액정상에 봉입함으로써 약물의 불안

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)820-5609 (Y.W. Choi), 02)820-5606 (J. Lee)
E-mail : ywchoi@cau.ac.kr (Y.W. Choi), jaehwi@cau.ac.kr (J. Lee)

정성을 개선하고, 또한 약물의 피부 투과 촉진을 통해 그 효과를 증진시킬 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 화장품 산업에서 널리 사용되고 있는 retinylpalmitate를 retinoids 모델로 선정하여 이를 monoolein 큐빅 액정상에 봉입한 후 retinylpalmitate의 안정성을 평가하고 경피 투과 실험을 실시하였다. 또한 수종의 항산화제를 retinylpalmitate 함유 액정상에 첨가하여 retinylpalmitate의 안정성 및 경피 전달 효과에 미치는 영향도 평가하였다. 이를 통해 monoolein 큐빅 액정상의 화장품 제제 또는 피부외 용제의 기재로서의 응용가능성을 검토하였다.

실험 방법

실험재료

Retinylpalmitate(순도 97%, 이하 RP)는 시그마 알드리치사에서 구입하였으며 액정상의 원료인 monoolein (RYOL MG 19)은 Danisco Culter (Denmark)로부터 구입하였다. 항산화제로 사용한 butylatedhydroxytoluene (BHT), butylatedhydroxyanisole (BHA), α -tocopherol, ascorbic acid는 시그마 알드리치사에서 구입을 하였으며, 분석에 사용된 메탄올, 에탄올, 이소프로필알콜 등은 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ)사로부터 구입하였다.

RP를 봉입한 monoolein 큐빅 액정상 제조

RP를 봉입한 monoolein 큐빅 액정상의 monoolein과 물의 조성비는 65:34.5 (v/v, %), RP는 0.5 (w/v, %)로 하였다. 먼저 monoolein을 40°C에서 녹인 후 RP를 넣고 온도를 유지하며 충분히 혼합한 후 동일 온도의 물을 가하였다. 갈색 vial을 사용하여 차광이 되도록 하였으며, 수분 손실이 없도록 완전히 밀폐시킨 후 제형 내 monoolein과 물이 상평형에 이르도록 실온에서 2-3일간 보관하였다.

항산화제가 첨가된 monoolein 큐빅 액정상 제조

현재 화장품에서 사용빈도가 높은 항산화제(BHT, BHA, α -tocopherol, ascorbic acid)를 액정상에 첨가하고 항산화제의 액정상 내 RP에 대한 안정성을 평가하였다. 또한 농도의 의존성을 알아보기 위해 0.3%, 0.5%, 1.0%로 항산화제의 비율을 달리하여 실험하였다. 지용성 항산화제인 BHT, BHA, α -tocopherol의 경우는 40°C에서 monoolein과 RP를 혼합한 후 40°C의 물을 가하여 제조하였으며, 수용성인 ascorbic acid는 물에 미리 녹인 후 녹아있는 monoolein 및 RP의 혼합액에 가하여 액정상을 제조하였다. 이를 실온에서 2-3일간 보관한 후 이를 이용하여 다음 실험을 진행하였다.

큐빅 액정상 내 RP의 안정성 평가

RP의 저장 온도에 따른 안정성을 확인하기 위해 각각 실온 (25°C)과 40°C 항온조에 샘플을 넣고 0, 3, 6, 9, 12, 15일 간격으로 제형 내의 RP 잔존량을 HPLC로 측정함으로써 약물의 안정성을 평가하였다. 동량의 RP를 용해한 ethanol solution을 대조군으로 삼아 그 안정성을 동일 조건에서 측정하고 이를 비교하였다. RP 잔존량 측정은 각 시료별로 0.1 g을 취하여 에탄올:이소프로필알콜 (1:1) 혼액에 용해한 후 HPLC로 정량하였다.

HPLC 분석

Hitachi사 (Japan)의 HPLC기기(모델명:Elite Lachrome)를 사용하였다. 컬럼은 Capcell Pak C₁₈(15 cm×4.6 mm, 5 μ m, Shiseido, Japan), 이동상은 100% 메탄올을 사용하였고, 측정파장은 UV 320 nm, 유속은 1.5 mL/min, 주입량은 50 μ L 이었다.

검량선 작성을 위해 RP 10 mg을 정밀하게 달아 에탄올:이소프로필알콜 (1:1 v/v%)혼액에 넣고 충분히 교반하여 보존액을 제조하였으며 단계별로 희석하여 10~50 μ g/mL 농도에서 검량선을 작성하였다.

경피 투과 실험

Monoolein 큐빅 액정상의 경피 투과 촉진 효과 여부를 in vitro상에서 측정하였다. 또한 투과 증진 효과를 비교하기 위해 대조군으로 동량의 RP를 함유한 100% 에탄올 및 수중 유형 크림 (Table 1)을 제조하여 투과 정도를 측정하였다.

경피 전달 측정을 위해 한림동물(경기도 소재)에서 구입한 8-10주령(200-300 g)의 랫트를 사용하였다. 에테르로 안락사 시킨 후 사지를 고정하여 털을 제거하고 표피가 손상되지 않도록 주의 깊게 면도를 한 후 피하지방을 최대한 분리, 제거하여 피부를 획득하였으며 이를 PBS(20 mM

Table 1-Formulations of Oil in Water Cream

구분	Formulation (%)	
	Formulation (%)	Value
Oil phase	GMO	4.0
	Retinylpalmitate	0.5
	Cetyl alcohol	6.0
	Labrafac CC	8.0
	White vaseline	10.5
	Propylene glycol	10.0
Aqueous phase	Tween 80	7.0
	Water	54.0
Total		100.0

phosphate buffer solution, pH 7.4)로 세척한 후 -70°C 에서 보관하였다. 보관된 피부 조직을 경피 전달 실험 1시간 전 상온에서 서서히 녹인 후, Franz 확산 셀의 donor와 receiver compartment 사이에 평평하게 올려놓고 클램프로 고정하였다. 실험에 사용된 Franz 확산 셀의 receiver compartment와 접촉하는 피부의 면적은 2.14 cm^2 , receiver compartment의 용량은 11 mL이며 receiver phase는 투과된 RP의 용해를 위해 에탄올과 증류수의 7:3 (v/v%) 용액을 사용하였고 항온순환 펌프로 물을 순환시켜 receiver phase가 $36.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 유지되게 하였다. 이후, 각각의 시료를 1.0 g씩 donor compartment의 피부 표면에 가하고 빛을 차단하기 위해 Franz 확산 셀 전체를 알루미늄 호일로 차광시켰다. 이후 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간 마다 0.5 mL씩 샘플을 취하고 즉시 동량의 receiver phase를 채워 주었다. 채취한 시료는 HPLC를 이용하여 정량하였다.

경피 침적 실험

투과실험이 끝난 후, 스킨을 분리하여 표면에 남아있는 시료를 PBS로 2-3차례 세척한 후 시료와 접촉했던 피부 부위를 오려내어 24시간 동안 실온에서 건조하였다. 완전히 건조된 피부를 미세하게 자른 후 5 mL 메탄올을 넣고 homogenizer(Ultra turrax mixer T25 basic, IKA Inc., Germany)로 19000 rpm에서 5분간 분쇄한 후 24시간 동안 교반하여 RP를 추출하였다. 추출액을 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 시린지 필터로 여과한 후 HPLC로 정량하였다.

또한 RP를 함유한 큐빅 액정상과 BHT(0.5%)를 함께 봉입한 RP 함유 큐빅 액정상을 각각 차광과 빛에 노출한 조건에서 6, 12, 24시간 별 경피 침적량을 비교함으로써 경피 전달시 차광조건에서와 빛에 노출시켰을 때 항산화제의 첨가가 제형 내 RP의 안정성과 투과에 미치는 영향을 살펴보고 있다.

결과 및 고찰

큐빅 액정상 내 RP의 안정성

25°C 와 40°C 에서의 RP의 안정성을 측정하였다(Figure 1). 대조군인 에탄올 용액 내의 RP는 40°C 에서 급격히 분해되기 시작하여 9일 후에는 모두 분해되었다. 25°C 에서도 급격히 분해되어 15일 경과 후 잔존량은 처음량의 0.5%에 불과하였다. 반면 25°C 조건에서 큐빅 액정상에 봉입한 RP의 함유량은 15일 경과 후에도 매우 안정함을 보였다. 이는 monoolein 액정상 내 RP가 효과적으로 봉입되어 있으며 외부 환경과의 접촉이 최소화됨으로써 RP의 안정성 증대에 기

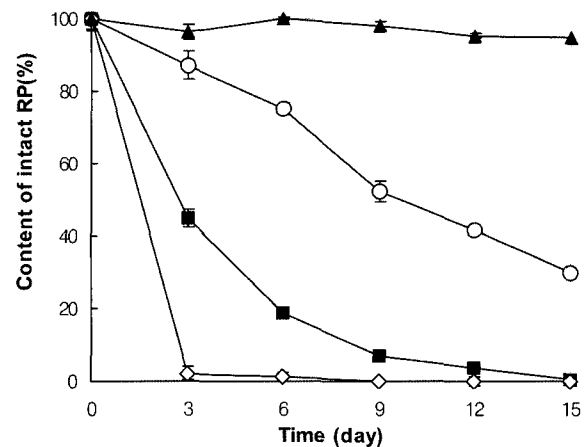


Figure 1—Content of intact RP during storage in cubic liquid crystalline phase at 25°C (▲), 40°C (○) and in ethanol solution at 25°C (■), 40°C (◇).

여한 것으로 생각된다. 40°C 에서 액정상 내 RP의 분해속도는 에탄올 용액에 비해 매우 느리며 에탄올 용액에서 보다 매우 안정성이 뛰어나다는 것을 알 수 있다.

항산화제가 큐빅 액정상 내 RP 안정성에 미치는 영향

40°C 온도 조건하에서 항산화제의 첨가가 액정에 봉입된 RP의 안정성에 기여하는 효과를 알아보기 위해 항산화제의 종류 및 농도 별 의존도를 관찰하였다(Figure 2). BHT 0.3%, 0.5% 및 1.0% 첨가한 제형에서의 15일 경과 후 RP 잔존량은 각각 36.8%, 36.9%, 36.6%로 항산화제를 사용하지 않은 큐빅 액정상의 잔존량인 29.9%에 비해 6.7~7.0% 정도 높은 수치를 나타내 비교적 약한 항산화력을 보이나 통계적으로 유의성은 없으며 농도별 함유량의 차이 또한 없었다(Figure 2.a). BHA 0.3%, 0.5%, 1.0% 농도별 RP의 잔존량은 각각 31.7%, 30.0%, 25.5%이었으며 (Figure 2.b), α -tocopherol 0.3%, 0.5%, 1.0% 농도별 RP의 잔존량은 30.0%, 29.8%, 25.1%로 측정되었다(Figure 2.c).

지용성 항산화제인 BHT, BHA, α -tocopherol에 비해 수용성 항산화제인 ascorbic acid의 RP 대한 항산화력은 저조한 것으로 측정되었다(Figure 2.d). Ascorbic acid 0.3%, 0.5%, 1.0%를 첨가한 제형에서의 RP의 잔존량은 17.4%, 12.0%, 9.0%로 항산화제를 사용하지 않은 것보다 12.5~20.9%의 낮은 잔존량을 보였다. 수용성 항산화제 보다 지용성 항산화제가 안정화 효과가 높은 것은 액정 구조상 지용성 항산화제가 RP와 지용성 영역내에 같이 존재함으로써 보다 직접적으로 RP의 안정화에 참여한 것으로 사료된다. 반면 수용성 항산화제는 큐빅 액정상의 water 채널에 주로 존재함으로써 지용성 영역에 존재하는 RP와의 접촉빈도가 낮

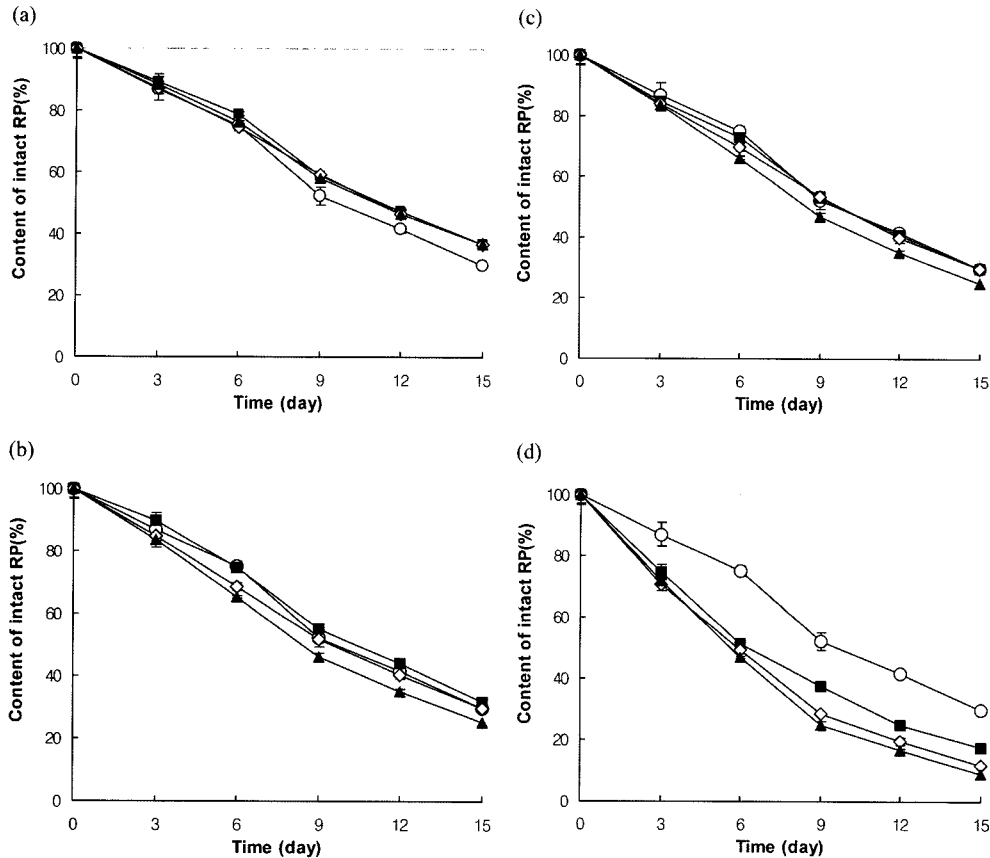


Figure 2—Content of intact RP loaded in cubic liquid crystalline phase together with BHT (a), BHA (b), α -tocopherol (c) and ascorbic acid (d) at 40:0.3% (■), 0.5% (◇), 1.0% (▲), 0% (○).

은 것으로 사료된다.

경피 투과

경피 투과 실험 결과 24시간 경과 후 아주 극미량의 RP가 검출될 뿐, 거의 투과가 일어나지 않았다. 이는 RP가 피부 친화력이 크기 때문에 투과는 거의 이루어 지지 않은 것으로 사료된다.¹⁰⁾ 이 결과는 고휘지질 나노입자에 봉입한 retinol을 고농도로 돼지의 피부에 투여했음에도 불구하고 투과는 매우 낮았다는 기존 보고와도 유사한 것으로 사료된다.¹¹⁾

경피 침적

투여 제형에 따른 RP의 피부 침적량을 관찰하였다(Figure 3). 0.5% RP-에탄올 용액, 큐빅 액정상, BHT를 첨가한 큐빅 액정상, 수중 유형 크림 제형에서 모두 시간의 경과에 따라 RP 피부 침적량이 점차 증가하는 것으로 측정되었다. 에탄올 용액에서 RP는 쉽게 분해되지만 에탄올 용액이 피부에 매우 용이하게 스며들 수 있기 때문에 투여 초반에 빠르게 침투하였던 것으로 생각된다. 시간이 지남에 따라 큐빅 액정상과 0.5% BHT를 첨가한 큐빅 액정상의 RP 침적량이 점차

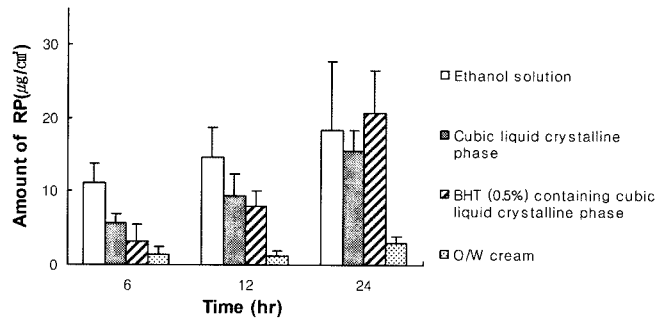


Figure 3—The accumulative amount of RP in skin from formulations at the end of the in vitro permeation studies.

증가하였으며 24시간에서의 피부 침적량은 에탄올 용액 및 큐빅 액정상, BHT를 첨가한 큐빅 액정상에서 유사한 것으로 측정되었다. 특히 RPC는 충분히 피부로 이동할 수 있는 시간이 확보된 24시간 이후 대조군으로 제조한 수중 유형 크림의 RP의 침투량에 비해 5.3~6.4배 정도 뛰어난 것으로 나타났다. 이는 따라서 monoolein의 액정상은 RP의 피부 투과에 있어 매우 효과적인 전달 제형인 것으로 사료된다.

광안정성 극복을 위해 국내 대부분의 화장품 업체가 고가

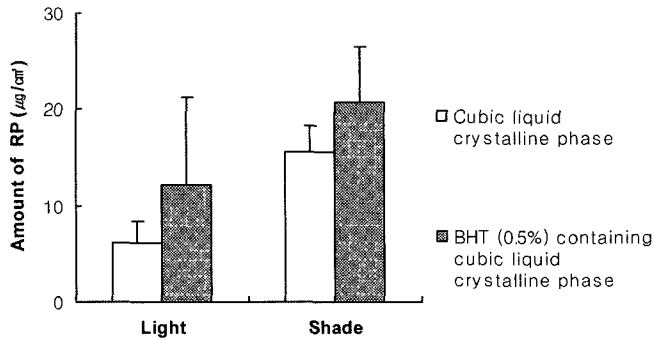


Figure 4—Effect of light on the chemical stability of RP in cubic liquid crystalline phase.

의 β -cyclodextrin으로 retinol을 캡슐화 하였으나 피부 침투력이 떨어진다는 보고를 감안할 때¹¹⁾ monoolein의 액정상은 안정성 향상과 피부 침투력 증가 기능을 동시에 가진 RP전달에 있어 우수한 제형이라고 할 수 있다.

경피 침적시 항산화제가 빛에 대하여 제형내의 RP의 산화를 추가적으로 제어할 수 있는지를 관찰하기 위해 큐빅 액정상과 비교군으로 0.5% BHT를 첨가한 큐빅 액정상을 각각 차광과 빛에 노출 조건하에서 실험하였다(Figure 4). 두 제형에서 모두 빛에 노출된 경우 약물의 불안정으로 인해 약물의 침적량이 감소한 것을 확인할 수 있다. 항산화제가 없는 큐빅 액정상의 경우, 차광했을 경우 15.63 ± 2.68 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 인데 비해, 빛에 노출시는 6.09 ± 2.29 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)로 침적량이 절반가까이 감소하는 것으로 측정되었으며 0.5% BHT를 첨가한 큐빅 액정상 또한 차광 조건하에서 보다 높은 침적량을 보임을 확인할 수 있다.

결 론

본 연구에서는 피부 주름 개선 효과 등이 입증된 RP를 monoolein 큐빅 액정상에 봉입하고 그 안정성 및 경피 투과 및 침적 효과를 측정함으로써 향후 화장품 제제 및 피부 의용제로서의 응용 가능성을 검토하였다.

RP를 봉입한 큐빅 액정상은 15일간 실온 보존 시 94.7%의 RP 함유율을 보임으로써 액정상이 RP의 안정성을 유지하는데 효과적인 제형임을 확인하였으며 지속적으로 약물의 방출, 투과를 증진, 침적시킴으로써 피부 친화성과 안정성을 극대화한 피부 약물 전달 수송체임을 확인하였다. 특히 실온에서 높은 안정성을 보였으며 크림 제형 등에 비해 높은 피부 침적량을 보임을 확인하였다. 또한 항산화제의 첨가가 monoolein 액정상에 봉입된 RP의 안정성 증대에 미치는 효과가 통계적 유의성이 없음을 볼 때 monoolein 액정상은 항산화제를 쓰지 않아도 자체적으로 RP의 안정성을 높이 유

지할 수 있는 우수한 제형으로 판단된다.

따라서, retinoids와 같은 유효성분의 불안정성을 개선하기 위해서는 항산화제 등의 화학적 처리만으로는 어렵기 때문에 monoolein 액정과 같이 외부 환경과의 차단효과가 우수한 제형 개발이 이루어져야 할 것으로 사료되며 monoolein 액정상은 RP의 보관 및 피부 전달에 있어서 매우 효과적인 수단이 될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 서울시의 Seoul R&BD Program의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) A. Kligmann, Topical tretinoin: indications safety, and effectiveness, *Cutis.*, **39**, 486-488 (1987).
- 2) R. Ruhl and H. Nau, Dertermination of adapalene (CD271/DifferinR) and retinol in plasma and tissue by on-line solid-phase extraction and HPLC analysis, *Chromatographia.*, **45**, 269-274 (1997).
- 3) T. Tsunoda and K. Takabayashi, Stability of all-trans-retinol in cream, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **46**, 191-198 (1995).
- 4) M. Mezei, Liposomes as penetration promoters and localizers of topically applied drugs. *Drug Permeation Enhancement*, Dekker, New York, 171-197 (1993).
- 5) D. Duchene and F. Glomot, Pharmaceutical applications of cyclodextrins. *Cyclodextrins and their Industrial Uses*, Editions de Santei, Paris (1987).
- 6) O. Faruque and DM. Walker, The relative biological potencies of retinyl palmitate and beta-carotene for the milk-fed lamb, *Br J Nutr.*, **24**(1), 23-28 (1970).
- 7) L. B. Lopes, Joao, L. C. Lopes and D. C. R. Oliverira, Liquid crystallin phases of momoolein and water for topical delivery of cyclosporin A : Characterization and study of in vitro and in vivo delivery, *Eur J Pharm Biopharm.*, **63**(2), 146-155 (2006).
- 8) I. Y. Kim, The effect of Nano capsulated ursolic acid on epidermal penetration and anti-wrinkle M.S. *Thesis for Environmental Engineering*, Soongsil University (2005).
- 9) S. T. Hyde, Bicontinuous structures in lyotropic liquid crystals and crystalline hyperbolic surfaces, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, **1**(5), 653-662 (1996).
- 10) V. Jennings, A. Gysler, M. S. Korting and S. H. Gohla, Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin, *Eur J Pharm Biopharm.*, **49**(3), 211-218 (2000).
- 11) 보건복지부, 생리활성물질인 retinoid 계열의 항암제 개발. 보건 의료기술 연구개발사업 최종보고서 02-PJ1-PG11-VN01-SV01-0019 (2003).