

올레아노익산의 폴리글리세릴계 나노에멀전에서의 안정화 및 인체적용 유효성평가에 대한 연구

한상근^{1,2} · 이동규^{1†}

¹충북대학교 공과대학 공업화학과, ²한국콜마 피부과학연구소
(2015년 2월 23일 접수; 2015년 3월 10일 수정; 2015년 3월 12일 채택)

Study of stabilizing and efficacy evaluation in human of Oleanolic acid with poly-glyceryl nano emulsion system

Sang-Keun Han^{1,2} · Dong-Kyu Lee^{1†}

¹Department of Industrial Engineering Chemistry, College of Engineering,
Chungbuk National University, Gaesin-dong, Cheongju-si, Korea

²Skin Research Institute, Korea Kolmar Corporation, 12-11, Dugogae-gil, Sejong-si, Korea
(Received February 23, 2015; Revised March 10, 2015; Accepted March 12, 2015)

요약 : 올레아놀릭산은 항암, 신항혈관 생성방지, 항염증, 항산화 및 주름 개선효과가 알려져 있다. 본 연구자들은 천연에서 분리한 올레아놀릭산의 항산화효과에 주목하여 연구하였고 미백효과가 있음을 확인하였다. 본 연구에서는 천연유래의 폴리글리세릴계 계면활성제를 사용하여 간단한 교반만으로 올레아놀릭산을 안정화하였고 고가의 장비인 마이크로플루다이지를 이용하여 제조한 레시틴리포솜과 경피흡수투과율을 비교하였다. 0.4% 올레아놀릭산을 안정화한 폴리글리세릴 나노에멀전의 12시간 후 경피흡수투과율은 95%였다. 레시틴 리포솜은 92%로 유사하였으나 폴리글리세릴 나노에멀전은 3시간 경피 흡수투과율이 65%로 레시틴리포솜의 45%에 비해 속방성의 특징을 보였다. 인체대상 임상시험결과 올레아놀릭산을 무배합한 대조군에 비해 올레아놀릭산을 배합한 폴리글리세릴 나노에멀전은 MEXAMETER의 한 멜라닌 색소감소효과가 2주차 25%, 4주차 58%, 8주차 58%이상 높았다.

주제어 : 올레아놀릭산, 미백, 천연유래 계면활성제, 폴리글리세릴계 나노에멀전

Abstract : Oleanolic acid is known as which anti-cancer, anti-sinhang angiogenic, anti-inflammatory, antioxidant and anti-wrinkle effects. We focused on the antioxidant activity of oleanolic acid was separated from the natural plant and It was confirmed that the whitening effect. In this study, oleanolic acid was stabilized by polyglyceryl surfactant which from natural origin with only a simple stirring operation, and compared with lecithin liposome that was manufactured with high cost facility. The transdermal transition rate of 0.4% oleanolic acid polyglyceryl nanoemulsion was 95%, and it was similar with lecithin liposome of 92%. 65% of 3hr transdermal

[†]Corresponding author
(E-mail: dklee@cbnu.ac.kr)

transition rate of polyglyceryl nanoemulsion indicate characteristics of quick release, compared with 45% of lecithin liposome's 3hr transdermal transition rate. In the in-vivo clinical trial test, polyglyceryl nanoemulsion of 0.4% oleanolic acid was higher 25% in 2nd week, 58% in 4th and 8th weeks than non-added oleanolic acid emulsion.

Keywords : Oleanolic acid, Whitening effect, lecithin liposome, polyglyceryl nanoemulsion

1. Introduction

생명공학 기술의 발달과 함께 인간의 평균수명이 길어지면서 건강하고 아름다운 삶에 대한 욕구가 꾸준히 늘고 있다. 특히 삶의 질이 변화함으로 인해 사람들의 생활패턴이 서구화되고 외형적인 미의 기준 또한 서구적인 것을 추구하는 방향으로 변화되고 있다. 서구적인 미의 기준으로 대표적인 것은 뚜렷한 이목구비와 하얀 피부가 있는데, 특히 어두운 피부색을 가진 동양인들은 하얀 피부를 가꾸는데 많은 관심을 쏟고 있다. 이로 인하여 미백과 관련된 화장품시장은 매우 큰 폭으로 매년 증가하고 있다.

멜라닌은 피부와 머리카락의 색상을 결정하는 주요한 인자이며 자외선으로부터 피부세포를 보호하기 위한 역할을 가지고 있다[1]. 그러나 과도한 멜라닌의 축적은 주근깨, 기미, 피부반점 등과 같은 과 색소 현상을 유발한다[2, 3]. 타이로신으로부터 형성되는 멜라닌 생합성은 타이로시네즈의 촉매작용을 통해 일어나는 초기 반응으로 시작되며, tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환시키는 작용을 하며, tyrosinase related protein-1 (TRP-1)은 DHICA를 indole-5,6-quinone-2-carboxy acid로 전환시키는 DHICA oxidase 작용을 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)는 DOPAchrome 을 DHICA로 전환시키는 역할을 한다. 최근에는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 뿐만 아니라 microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 등과 같은 단백질을 이용하여 melanin 합성 억제에 대한 연구가 이루어지고 있다. 사람의 피부는 가장 크고 다양한 화학적 물리적 환경의 위해성으로부터 생체 내부기관을 방어하는 첫번째 방어선이다. 이러한 피부는 표피층, 진피층, 피하지방으로 구분되어 각층의 긴밀한 협조에 의해서 다양한 피부항상성을 유지하고 있다. 사람의 피부색을 결정하는 멜라닌은 표피의 기저층에 존재하는 멜라노사

이트의 멜라노솜에서 형성되어 사람 피부색을 결정하게 되는데, 피부색의 변화는 이러한 멜라닌세포 수의 변화, 멜라닌 소체의 생산이나 구조의 이상, 멜라닌 소체의 멜라닌화 이상, 각질세포의 이동 정도 및 멜라닌의 소실되는 정도 등 여러 가지 요인에 의하여 결정되는데 이들은 유전, 대사, 내분비, 영양, 염증, 감염, 종양, 물리적 및 화학적 요인들에 의하여 크게 좌우된다. 멜라닌은 멜라닌 세포에서 효소 및 비효소적 산화반응을 거쳐 생산되며, 관련 단백질인 티로시나제 및 티로시나제 관련 단백질 1, 2에 의하여 타이로신 하이드록시라제(tyrosine hydroxylase), 도파 옥시다제(DOPA oxidase) 등의 생합성과정을 통하여 형성된다. 멜라닌 세포는 피의 염증, 내분비 이상, 신경성 요인, UV 등에 의해 활성화되는데 세포 표면의 여러가지 수용체인 melanocortin-1 receptor(MC1R), frizzled endothelin receptor, steel factor/C-kit receptor 등이 존재하여 이들 수용체가 자극되면 세포 내로 신호가 전달되어 MITF가 발현되어 티로시나제와 같은 멜라닌 관련 단백질의 발현을 증대시키게 된다. 미백 물질의 개발은 위와 같은 멜라닌 생성 기작을 저해하는 물질을 개발하는 것으로 현재 많은 물질들이 개발되어 있으나, 강한 독성, 낮은 안정성 및 피부-투과성, 불충분한 활성으로 인해 현존하는 미백제의 사용이 제한되고 있다. 합성 티로시나제 저해제의 부작용으로 인해, 천연물로부터 부작용이 적고 효과가 좋은 새로운 티로시나제 저해제 개발에 많은 관심을 가지고 있다.

올레아놀릭산은 하이드록시 펜타사이클릭 테르펜(hydroxypentacyclic terpen)의 한 종류로서 기존의 화장품 분야에서 우수한 피부 노화 방지효과를 나타내며, 사과 또는 배와 같은 많은 천연 식물에서 발견되는 대표적인 천연 유래의 주름기능성 원료로 이용되고 있다[4]. 본 연구자들은 올레아놀릭산의 항산화효과에 주목하여 B-16-F-10 흑색종 세포에서의 멜라닌합성저해

효과를 연구하여 피부 미백화장품의 기능성원료로의 가능성을 확인하였다[5]. 그러나 올레아놀릭산은 용해도가 낮고 일반적인 에멀전에서는 석출이 쉬워 레시틴을 이용한 나노에멀전을 통해 안정화하는 방법이 연구되고 있으나 레시틴을 이용한 나노에멀전은 천연유래의 계면활성제를 사용함으로 피부에 안전하고 효율적인 안정화를 이룰 수는 있으나 고가의 장비인 마이크로폴루다이저나 APV 등의 고압유화기를 이용해야 하므로 상업화에 경제적으로 어려운 단점이 있다[6]. 이에 본 연구자들은 고가의 고압유화장비를 사용하지 않는 폴리글리세릴계 계면활성제를 이용한 나노에멀전에 올레아놀릭산을 안정화함으로써 피부에 안전하며 효율적으로 약물을 피부에 전달할 수 있는 시스템을 개발하였다. 폴리글리세릴계 나노에멀전 시스템에 안정화한 올레아놀릭산의 봉입효율과 피부전달효율을 검증하고 사람에게 적용하여 미백기능성 화장품으로써의 가능성을 확인하였다.

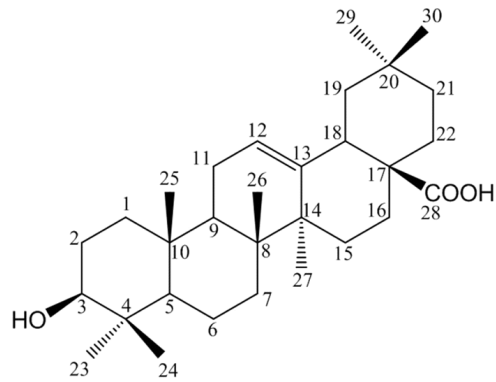


Fig. 2. Scheme of Oleanolic acid.

2. Experiments

2.1 Materials

본 연구에 사용된 올레아놀릭산은 GFC를 통하여 공급 받았으며, 레시틴을 이용한 리포솜은 Table 1에 나타내었고, 폴리글리세릴 나노리포솜에 사용한 원료들은 Table 2에 나타내었다.

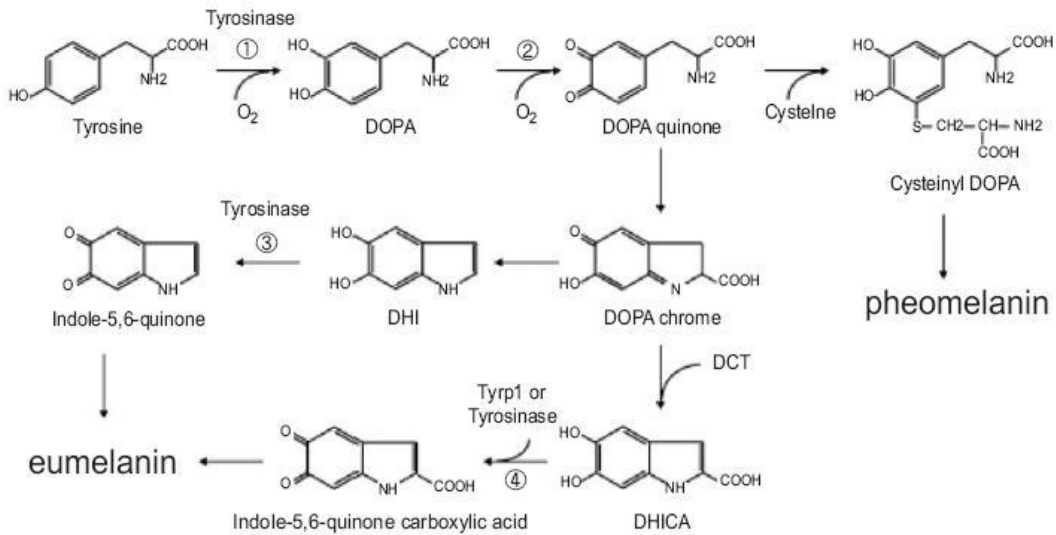


Fig. 1. Pathway to melanin synthesis.

Table 1. Materials for lecithin liposome

구분	성분	배합량(중량%)
유상부	올레아놀릭산	0.4
	디카프릴카보네이트	8.0
	스쿠알란	8.0
지질부	1,3-부틸렌글리콜	14.0
	인지질	1.5
	스테아린산	0.5
	세탄올	1.0
수상부	정제수	To 100
	글리세린	3.5
방부제 및 점증제부	카보머(K.O.H 중화 후, 2% solution)	10.0
	방부제	0.5

- 1) 올레아놀릭산 : Oleanolic acid, 대한민국,
- 2) 디카프릴카보네이트 : CETIOL CC, 독일국, 코그니스사(Cognis)사
- 3) 스쿠알란 : 일본국, 키시모토사(Kishimoto)
- 4) 1,3-부틸렌글리콜 : 일본국, 다이셀사(Daicel)
- 5) 인지질 : 리포이드(Lipoid S75-3, Lipoid S75, 독일국, Lipoid사),
- 6) 스테아린산: Emersol 132(스테아린산 : 팔미탄산 = 46 : 54), 독일국, 코그니스(Cognis)사
- 7) 세탄올, Lorol C-16, 독일국, 코그니스(Cognis)사
- 8) 글리세린: 독일국 헨켈사(Henkel)
- 9) 카보머, Carbopol, 독일국, 비에프굿리치(B.F Goodrich)
- 10) K.O.H : 포타슘하이드록사이드, 대한민국(UNION)

2.2 Method

2.2.1 레시틴 리포솜의 제조

유상용해조에 올레아놀릭산을 디카프릴카보네이트에 47°C로 가온교반하여 용해시키고, 여기에 스쿠알란을 투입하여 혼합하고 70°C까지 가온교반하여 균일하게 용해시키고, 진공유화조에 Table 1에 나타난 함량으로 지질용해부를 투입하여 80°C로 가온하여 용해시켜 준비하였다. 수상용해조에 수상부를 투입하여 50°C로 가온용해하여 준비하였다. 올레아놀릭산 용해부를 지질용해부에 투입하여 호모믹서 2,500rpm으로 1차유화하여 제 1차 마이크로캡슐상을 만들고, 이를 50°C로 냉각한 후에 수상부를 투입하여 온도를 50°C로 유지하면서 패들(Paddle)로 혼합한 후, 50°C에서 고압형 유화기에 투입하여 1,000bar의 압력으로 3회 처리하는 것에 의해 2차유화시켜

리포솜을 형성하고 여기에 방부제 및 점증제를 투입하여 원하는 점도를 형성시킨후 이를 28°C까지 패들(paddle)을 이용하여 교반하면서 냉각시켰다.

2.2.2 폴리글리세릴계 나노에멀전의 제조

유상용해조에 올레아놀릭산과 스쿠알란을 투입하여 85°C로 가온하여 용해시키고, 수상용해조에 정제수와 수상성분을 투입하여 85°C로 가온하여 용해시킨후 유상을 진공유화조에 투입후 교반하면서 수상을 투입한다. 수상부의 투입이 완료되면 호모믹서 2500rpm으로 10분간 유화한다. 유화가 완료되면 30°C까지 냉각하였다.

2.2.3 경피투과효율 측정

경피투과효율은 레시틴 리포솜과 폴리글리세릴 나노에멀전을 0.1g 동일한 양으로 실제 사람의

Table 2. Materials for Polyglyceryl nano-emulsion

구분	성분	배합량(중량%)
유상부	올레아놀릭산	0.4
	스쿠알란	4.0
계면활성제 및 수상부	폴리글리세릴-10 올레이트	1.4
	폴리글리세릴-2 올레이트	0.7
	글리세린	4.0
	1,3-부틸렌글리콜	4.0
	정제수	To 100
	방부제	0.5

- 1) 올레아놀릭산 : Oleanolic acid, 대한민국,
- 2) 스쿠알란 : 일본국, 키시모토사(Kishimoto)
- 3) 폴리글리세릴-10 올레이트 : 대한민국, 일신웰스
- 4) 폴리글리세릴-2 올레이트 : 대한민국, 일신웰스
- 5) 글리세린 : 독일국 헨켈사(Henkel)
- 6) 1,3-부틸렌글리콜 : 일본국, 다이셀사(Daicel)

피부(65세 남자 등판, Hans Biomed)를 장착시킨 Enhancer cell(ERWEKA, 독일국)DP 넣고, 여기에 염화나트륨으로 pH 7.0 정도의 완충용액을 500ML을 채우고, 온도를 실제 사람의 체온과 유사한 37°C로 조정하여 12시간 동안 60, 120, 180, 240, 360, 540, 720분 간격으로 올레아놀릭산의 용출량을 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, 일본국, Shimadzu, LG-10VP)를 이용하여 관찰하였다. 실험은 Rege, PR 등에 의해 시행된 방법과 유사한 방법으로 측정하였다[7].

2.2.3 인체적용시험

인체적용시험은 한국콜마 한방소재연구소에서 8주간 시행하였다. 대상자는 35 ~ 55세의 정상적인 피부를 가진 한국의 여성을 대상으로 하였으며, 자외선 조사기 (Multiport solar simulator 601 v25 300w, solar light, USA)를 이용하여 조사한 후 Mexameter(The Mexameter MX18, CK electronic GMBH, Germany)를 이용하여 홍반의 감소정도를 측정하고 연구자가 육안으로 관찰하여 각각의 육안적 평가 값 및 기기 평가값 (Mexameter, M value)의 정도차이를 SPSS(version 19.0.0) 프로그램의 Mann-Whitney 검정을 이용하여 분석 검증하였다. 입

상자는 조사후, 2주, 4주, 8주 방문하여 기기를 이용하여 멜라닌의 감소를 측정하였으며, 통계적 유의성을 위하여 p-value 0.05보다 작은 경우 유의성이 있는 것으로 하였다.

3. Results & Discussion

3.1. 레시틴 리포솜과 폴리글리세릴

나노에멀전의 입도 분포

레시틴을 이용한 리포솜의 입도분석결과 100 ~ 500nm 크기의 약간 불균일한 입도 분포를 갖는 입자를 관찰할 수 있었다. Fig 3.에 입도분포 결과를 나타내었다. 입도가 불균일한 이유는 레시틴 입자의 반발력을 줄일수 있는 음이온계면활성제의 배제로 인하여 500nm이상의 입자가 관찰되었으며, 이는 음이온계면활성제의 배합으로 해결할 수 있을 것으로 예상된다.

폴리글리세릴계 계면활성제를 이용한 나노에멀전의 입도분포분석 결과 평균 40nm의 균일한 입자가 관찰되었으며, 이는 적정량의 계면활성제의 농도와 유효온도에 따라서 조절이 가능하다. Fig. 4.에 입도분포결과를 나타내었다.

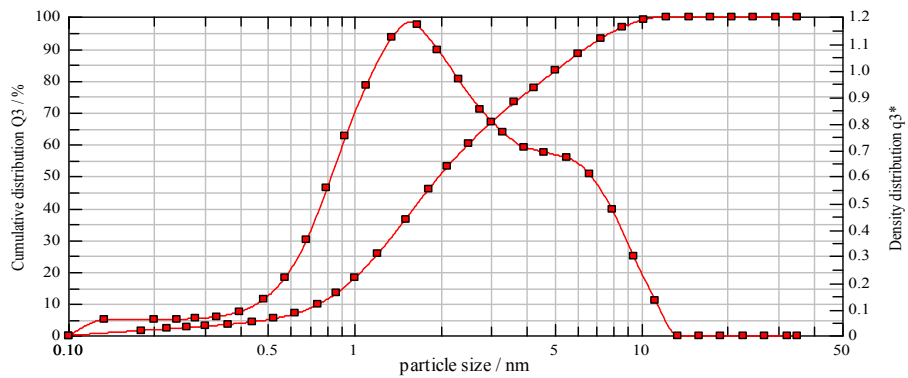


Fig. 3. Particle size analysis of lecithin liposome.

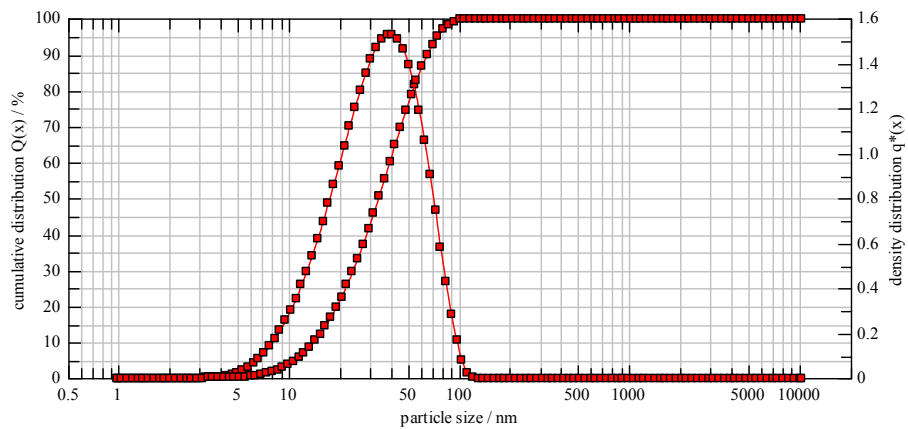


Fig. 4. Particle size analysis of Polyglyceryl nano liposome.

3.2. 레시틴 리포솜과 폴리글리세릴 나노에멀전의 경피흡수율 측정 비교

올레아놀릭산을 안정화한 레시틴 리포솜과 폴리글리세릴 나노에멀전의 경피흡수율을 측정하기

위해 각 샘플을 시간대별로 HPLC를 이용하여 자동 측정된 결과를 Fig. 4.에 나타내었다. Fig. 5.에서 레시틴을 이용한 리포솜을 12시간 후 약 92%의 경피흡수율을 보인것에 비해 폴리글리세

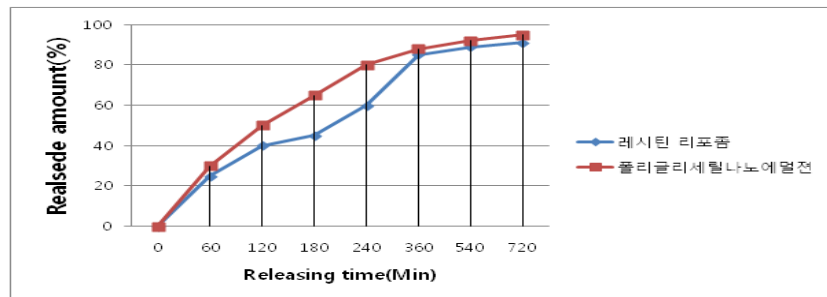


Fig. 5. Picture of wet-process coating.

릴 나노에멀전은 95%의 경피 흡수율을 보였다. 레시틴 리포솜이 초기 3시간동안 50%미만의 흡수율을 보인것에 비해 폴리글리세릴 나노에멀전은 60%이상의 흡수율을 보였다. 레시틴 리포솜은 초기 경피흡수율이 낮고 후기 경피 흡수율이 높은 전형적인 서방성의 경피흡수형태를 보인 반면 폴리글리세릴 나노에멀전은 초기 경피흡수율이 높고 후기의 경피흡수율 증가 속도가 낮은 속방성 경피흡수형태를 보였다.

3.3 폴리글리세릴 나노에멀전의 임상시험 결과

일반에멀전과 폴리글리세릴나노에멀전을 매일 2회 도포하여 8주간 관찰 하였으며, 폴리글리세릴 나노에멀전의 평균 멜라닌 수치변화는 222.01에서 178.12로 19.8% 감소하였다. Fig. 6. 에 폴리글리세릴 나노에멀전의 멜라닌 수치변화를 나타내으며 Table 3에 Mexameter 측정수치를 이용해 대조군과의 비교평가한 멜라닌 색소감소 정도를 나타내었다. Fig. 7.의 임상사진에서 8주후 색소의 침착정도가 완화된 것을 관찰할 수 있었다.

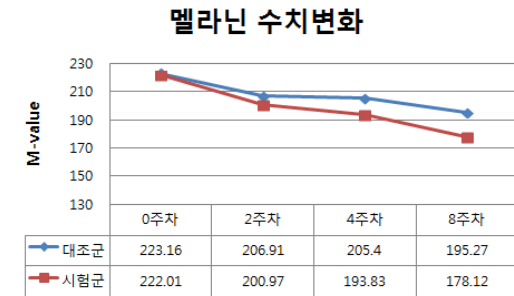


Fig. 6. 폴리글리세릴 나노에멀전의 멜라닌 수치 변화.

4. Conclusion

본 논문에서는 종래 주름개선 기능성원료로 사용되던 올레아놀릭산의 미백효능을 검증함으로써 미백개선 기능성 원료로의 이용가능성을 확인하였다. 고가의 마이크로폴루다이저등 고압호모믹서를 사용한 레시틴 리포솜의 경피흡수율 92%에 비하여 경피흡수율이 95%로 높고 서방성의 특징을 가지는 레시틴 리포솜에 비해 입도가 50 ~

Table 3. 멜라닌 색소 감소 정도, Mexameter 측정수치-대조군과의 비교 평가

	0주	2주	4주	8주
대조군(일반에멀전)	-	16.25	17.76	27.89
폴리글리세릴나노에멀전	-	21.04	28.19	43.89
P-value	-	0.168	0.006	<0.001

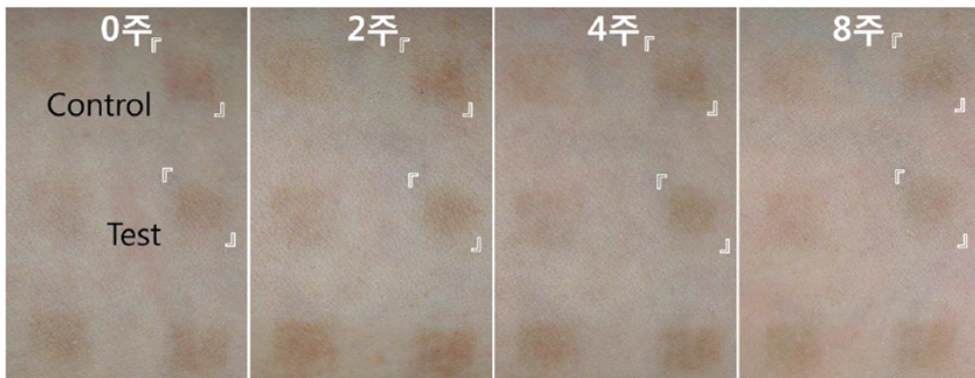


Fig. 7. 폴리글리세릴 나노에멀전의 임상사진.

100nm로 작은 특성으로 인해 속방성의 특성을 가지는 폴리글리세릴계 계면활성제를 이용한 나노에멀전을 제조하였다. 폴리글리세릴계 나노에멀전은 천연유래의 계면활성제로 피부에 안전하고, 고가의 마이크로폴루다이를 통과하지 않으므로 제조원가가 저렴하여 미백기능성 화장품 산업에서 가격경쟁력을 확보하고 시장확대 가능성이 기대된다.

References

1. H. J. Mu, The effects of polydatin isolated from polygonum cuspidatum on melanogenesis and wrinkle formation, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **37**(4), 327 (2011).
2. J. S. Chen, C. Wei, and M. R. Marxhal, Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase, *J. Agr. Food Chem.*, **58**, 79 (1991).
3. K. Urabe, P. Aroca, K. Tsukamoto, D. Mascagna, A. Paulumbo, G. Prota, and V. J. Hering, The inherent cytotoxicity of melanin precursors, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1221**, 272 (1994).
4. J. Liu, Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, *J. Ethnopharm.*, **49**(2), 57 (1995).
5. S. K. Han, Y. G. Kim, H. C. Kang, J. R. Huh, J. Y. Kim, N. I. Beak, D. K. Lee, D. G. Lee, Oleanolic Acid from *Fragaria ananassa* calyx Leads to Inhibition of α -MSH-induced Melanogenesis in B16-F10 Melanoma Cells, *J. Soc. App. Bio. Chemistry*, **57**(6), 735 (2014).
6. B. S. Pi, D. W. Choi, S. I. Park, J. Nam, Y. J. Kim, S. H. Han, Development of a Solubilization Product Containing Oleanolic Acid with Hydrogenated Lecithin, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **37**(4), 289 (2011).
7. Rege, P.R., Vilivalam, V.D., Collins, C.C., Development in release testing of topical dosage forms: use of the Enhancer cell with a sampling, *J. of phar. and biochem. analy.*, **17**, 1225 (1998).