

레조시놀다이펜틸에터를 함유한 O/W 나노에멀전의 경피흡수 및 미백 효능 효과 연구

차영권*¹ · 조현대¹ · 조완구² · 변상요^{3†}

¹㈜코스메카코리아 기술연구원, ²전주대학교 바이오기능성식품학과

³아주대학교 응용생명공학과

(2017년 5월 8일 접수: 2017년 6월 14일 수정: 2017년 6월 20일 채택)

Studies on skin whitening efficacy and skin permeation using O/W Nanoemulsion system with Resorcinol Dipentyl Ether

Young Kwon Cha*¹ · Hyun Dae Cho¹ · Wan Goo Cho² · Sang Yo Byun^{3†}

¹Cosmecca Korea, CIR Center, 7F, Tower A, KoreaBioPark, 700 Daewangpangyo-ro,
Bundang-gu, Seongnam-si, 461-380, Korea

²Department of Functional Food & Biotechnology, Jeonju University,
303 Cheonjam-ro, Wansan-gu, Jeonju, 560-759, Korea

³Cosmetic Science Major, Applied Biotechnology Department, Graduate School,
Ajou University, Gyeonggi-do 16499, Korea

(Received May 8, 2017; Revised June 14, 2017; Accepted June 20, 2017)

요약 : 본 연구에서는 피부미백제로 개발된 레조시놀다이펜틸에터[1,3-di(pentyloxy)benzene]를 함유하여 조성 상전이 방법(Phase Inversion Composition, PIC)방법으로 제조된 RS-Nanoemulsion의 경피흡수 및 피부 미백 효능효과에 대해서 연구하였다. 지표성분인 1,3-di(pentyloxy)benzene를 mineral oil에 용해한 대조시료와 일반 O/W유화법으로 제조된 RS-emulsion시료를 비교 대상으로 인체 피부에 대한 경피 흡수시험을 수행하였다. 시험결과, RS-Nanoemulsion 시료는 지표성분인 1,3-di(pentyloxy)benzene를 mineral oil에 용해한 대조시료와 RS-emulsion 시료에 비해 통계적으로 유의하게 높은 지표 성분 경피 투과율을 나타내었다. RS-Nanoemulsion을 O/W크림에 함유하여 만든 크림 제형의 피부임상시험을 통하여 그 유효성을 평가하고자 하였으며, 상기 시험결과 시험제품과 대조제품 모두 8주간의 시험기간에 특별한 이상반응이 관찰되지 않아 안전한 제품으로 확인되었고, 사용 8주 후 평가에서 대조제품 사용에 비해 시험제품이 통계적으로 유의한 수준으로 피부미백에 도움을 주는 효과가 있는 것을 확인하였다.

주제어 : 레조시놀다이펜틸에터, 조성상전이, 나노에멀전, 경피흡수, 미백효과

†Corresponding author
(E-mail: ykcha001@cosmecca.com)

Abstract : In this study, we investigated the effect on the increase of *In vitro* skin permeation experiments and *In-vivo* skin whitening efficacy using a O/W nanoemulsion produced via PIC(Phase Inversion Composition) with 1,3-di(pentyloxy)benzene. skin permeation experiments of RS-nanoemulsion formulated with selected condition was evaluated compared to mineral oil containing 1,3-di(pentyloxy)benzene and normal O/W type RS-emulsion. Compared to mineral oil with 1,3-di(pentyloxy)benzene and RS-emulsion, RS-Nanoemulsion has a statistically significant high percutaneous absorption in terms of index substance, which is 1,3-di(pentyloxy)benzene. In vivo test were prepared in the system of O/W cream containing RS-nanoemulsion. There was no adverse reactions in both samples. After 8 weeks, the subjects was evaluated by a dermatologist's scoring and Chromameter. In conclusion, the testing product showed statistically improvement ($p < 0.05$) compared to the controlled product and proved its whitening efficacy.

Keywords : Resorcinol dipentyl ether, Phase inversion composition, Nanoemulsion, skin permeation, Whitening efficacy

1. 서론

멜라닌은 피부를 보호하는 중요한 방어수단이나, 자외선, 호르몬 또는 약물 부작용 등의 여러 가지 요인으로, 멜라닌이 과도하게 합성되어 피부 표면에 침착되면, 기미, 주근깨 등의 원하지 않는 색소 침착을 유발하게 된다. 따라서, 이러한 색소 침착을 방지 및 해결하기 위해 멜라닌 합성을 조절 및 저해하는 알부틴(arbutin), 하이드로퀴논(hydroquinone), 비타민 C 유도체 (vitamin C derivatives) 등의 물질이 개발되어 왔으나 효과가 충분하지 않거나 피부 자극 등의 안전성, 제형내의 안정성 등의 한계로 화장품 제형에는 제한적으로 사용되어 왔다 [1,2]. 필자 등은 유기 합성 방법을 활용하여 에스테르 형태의 레조시놀다이펜틸에터[1,3-di(pentyloxy)benzene]미백제를 개발하여 보고하였다. 레조시놀다이펜틸에터는 레조시놀(Resorcinol)과 펜틸브로마이드(Pentyl Bromide)의 알킬화(Alkylation)반응으로 제조되어지며, 반응결과물을 고진공 감압 조건에서 증류 정제를 통하여 99.5% 이상의 고순도 물질로 수득하였으며, 세포 내 멜라닌 생성 억제율이 우수한 것으로 보고하였다 [2].

나노에멀전은 입경이 20 ~ 200 nm 정도로 입자 크기가 작기 때문에 반투명한 외관을 갖는다 [3]. 따라서 마이크로에멀전과는 다르게 나노에멀전은 열역학적으로 안정하지 않지만, 계면활성제의 낮은 농도로 장시간 안정할 수 있어, 산업적으로 중요한 의미가 있는 의약품, 화장품 및

농업 분야에서 다양하게 응용되고 있다 [4-6]. 일반적으로 나노에멀전은 전단력을 가진 믹서를 이용하여 계에 기계적인 에너지를 가하는 고압 유화기 또는 초음파 등과 같이 높은 에너지를 사용하는 방법으로 제조된다 [7]. 그러나 저에너지를 이용한 유화 방법이 최근 관심의 대상이 되고 있는데 이들 방법은 미세한 입경의 나노에멀전 제조는 물론 입자크기 분포의 폭이 적은 에멀전을 얻을 수 있다 [8,9].

기능성 화장품의 소재개발 단계에서 소재의 피부 투과 즉, 경피 흡수 여부는 소재의 기능성 효과와 함께, 실제 피부에서의 효능 효과 여부를 판단하는 필수적인 과정으로 인식하고 있다. 현재까지 다양한 경피 흡수 효능 측정법이 개발 되었다. 피부흡수시험법은 생체 내(*in vivo*)시험과 생체 외(*in vitro*)시험 두 가지로 구분된다. 생체 내 시험방법은 전신 순환의 일반사항과 대사 정보를 얻을 수 있다는 장점이 있으나 살아있는 동물을 사용해야 하고, 초기 흡수 상을 구분하기 어려우며, 실험에 사용하는 랫드 등 다른 종과 인체 피부의 투과도가 차이나는 단점이 있다 [10-12]. 생체 외 피부흡수시험방법은 시험물질이 피부를 통과하여 용액저장소로 이동한 양을 측정하는 방법으로, 인체 피부 또는 다른 종의 피부를 사용할 수 있고 시험물질에 대하여 반복 측정이 가능하며 실험동물을 사용하지 않고 연구가 가능하다. 또한 사용할 수 있는 시험물질의 범위가 넓고 윤리적 이유로 생체 내 시험으로는 평가할 수 없는 피부 손상과 피부 흡수에 대한 관계에 대하여

연구할 수 있는 장점이 있다 [13,14].

본 연구에서는 Franz cell 시험법을 통해 경피흡수 평가를 하였으며, Franz cell 시험법은 피부 혹은 피부대용품의 한쪽 면에 경피 제제를 도포하거나 붙이고 다른쪽에는 피부 내 체액의 성분으로 구성 되거나 또는 특정 시험법에 따라 제조된 용액을 접촉시킴으로써 특정 성분의 투과도를 측정하는 시험법이다 [15]. 이때 용액의 온도는 피부 내 온도와 같은 37°C를 유지하며 Auto-sampler를 이용 하여 시간대 별로 용출 액을 채취하여 HPLC, UV 등을 통하여 함량을 분석하였다.

화장품의 미백 효과를 평가하기 위한 인체 시험은 크게 인공색소 침착 후 미백 효능평가 시험 (Efficacy evaluation on induced pigmentation) 과 과색소침착증에서의 미백 효능평가 시험 (Efficacy evaluation on hypermelanosis)으로 분류되며, 전자의 경우 색소침착을 원하는 정도로 인공적으로 유도할 수 있다는 점에서 효능 평가에 이점이 있으나 피험자의 위험이 다소 크며 시험이 까다롭고 더 긴 기간이 소요될 수 있고, 후자의 경우 시험이 간편하고 피험자의 위험이 적지만 객관적인 효능평가가 더 어려울 수 있다.

본 연구는 신규 미백제인 레조시놀다이펜틸에터를 조성상전이 유화방법을 이용하여 안정한 RS-Nanoemulsion을 제조하여, Franz cell 시험법을 통해 경피흡수 평가를 하였으며, RS-Nanoemulsion을 O/W 크림 제형에 함유하여 인공색소 침착 후 미백 효과 평가시험을 통해 유효성과 사용 안전성을 평가하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시약

Table 1에서 실험에 사용된 원료를 정리하였다. 화장품용 원료는 각 생산업체로부터 받아 그대로 사용 하였으며, 백색 무취의 1,3-di(pentyloxy)benzene은 순도 99.5%시료를 사용하였다.

2.2 RS-Nanoemulsion의 제조

비이온성 계면활성제인 Polysorbate 80와 Sorbitan Oleate을 Euphorbia Cerifera Wax와 Ethylhexyl methoxycinnamate 혼합하여 80°C로 용해하고 1,3-di(pentyloxy)benzene를 첨가하여 오일상을 제조하였다. 수상은 EDTA-2Na와 Butylene Glycol을 물에 용해하여 제조하였으며 오일상에 수상을 첨가하기 위하여 열판 자석 교

반기를 사용하였다. 유화는 80-82°C에서 진행하였으며 수상을 오일상에 첨가하기 전 각각 80°C로 가열하였다. 혼합은 400 rpm으로 하였으며 100g을 제조할 때 분당 수상을 40g 정도의 속도로 첨가하였다. 유화온도의 유지를 위하여 물중탕을 활용하였다.

2.3. 시료내 1,3-di(pentyloxy)benzene의 함량분석

본 실험에 적용된 대조군은 mineral oil에 1,3-di(pentyloxy)benzene을 3wt% 용해하여 제조하였으며, RS-Nanoemulsion 실험방법 2.2에 언급 하였으며(Table 2), RS-Emulsion은 일반 O/W유화법으로 제조하였다 (Table 3). 지표성분인 1,3-di(pentyloxy)benzene의 제품내 함량을 Table 4에 나타내었다.

2.4. 경피흡수 재료 및 실험방법

실험에 이용한 인간 피부 조직 (kin No. PEA0881D009 (PEA088), BIOPREDIC International, France)은 56세 여성으로부터 채취된 직경 1.6cm 크기의 원형 피부 조직을 사용 직전까지 -20°C에서 보관하였으며, 시험에 사용할 피부의 교류 전기 저항이 정상 범위인지 확인한 후 실험에 사용하였다. 피부 투과 장치 (FDC-6T, Logan, USA)를 이용하였으며, 각 시료는 농축기 (Hypervap concentrator, Interface, Korea)와 고성능액체크로마토그래피 (HPLC: Agilent 1260 Infinity HPLC system)를 이용하여 1,3-di(pentyloxy)benzene의 함량을 확인하였다.

시험 중 수용액의 온도를 $32 \pm 1^\circ\text{C}$ 정도로 일정하게 유지하였으며, 시험 중 장치의 습도는 30-50%로 유지하였다. 수용부 (receptor chamber) 상부에 human skin을 올려놓은 후, 수용액을 채우고 30분간 피부를 안정화시키면서 표면을 건조시켰다. 수용부에 맞춰 시료를 도포한 후, 도포 1, 3, 6, 10, 24시간 경과 후 수용부의 수용액 전량을 각각 채취 하여 농축한 후 HPLC로 정량분석 실시하였다.

Human skin 표면에 잔존하는 시료 및 기구 세척을 통해 잔존 시료를 회수한 후 그 양을 확인 하였으며, Human skin 내 흡수되어 있는 시료의 양을 확인하기 위해 시험에 사용한 skin을 세척한 후 homogenizer로 분쇄하여 50% ethanol solution로 1시간 동안 sonication을 통해 회수하고 그 양을 확인 하였다.

Table 1. List of Used Reagents

| Chemical name | Trade name | Company |
|--|----------------------|-------------------------------|
| Polysorbate 80 | Tween 80 | KAO(Japan) |
| Sorbitan Oleate | Span 80 | Croda(UK) |
| Euphorbia Cerifera (Candelilla) Wax | Candellila wax | Toa Kasei(Japan) |
| Ehylhexyl methoxycinnamate | Parsol MCX | ROCHE(Switzerland) |
| Polyglyceryl-10 Stearate | S-Face S-1001 P | Sakamoto Yakuhin Kogyo(Japan) |
| Polyacrylate-13 & Polyisobutene & Polysorbate-20 | SEPIPLUS 400 | SEPPIC(FRANCE) |
| Cetearyl Alcohol | LANETTE O | BASF(Germany) |
| Glyceryl Stearate & PEG-100 Stearate | RHEODOL MS 165V | KAO(Japan) |
| Caprylic/Capric Triglyceride | CRODAMOL GTCC | Croda(UK) |
| Octyldodecyl Myristate | O.D.M. | KOKYU ALCOHOL (Japan) |
| Mineral oil | LILY-70 | KUKDONG OIL(KOREA) |
| Dimethicone | SILICON OIL KF96-6CS | Shin Etsu(Japan) |
| Tocopheryl Acetate | VITAMIN E.ACETATE | Merck(Germany) |
| Phenoxyethanol | SEPICIDE LD | SEPPIC(FRANCE) |
| 1,2-Hexanediol | KMO-6 | OSAKA ORGANIC CHEMICAL(Japan) |
| 1,3 Butylene glycol | 1,3-Butylene glycol | Daicel(Japan) |
| Glycerin | Glycerin | LG H&H(Korea) |
| EDTA-2Na | EDTA-2Na | AKZO(Netherlands) |

Table 2. Composition of RS-Nanoemulsion Samples

| Chemical name | FUNCTION | wt% |
|-------------------------------------|----------------------|-------|
| Disodium EDTA | Chelating Agent | 0.02 |
| Butylene Glycol | Humectant | 5.00 |
| Polysorbate 80 | Surfactant | 4.50 |
| Sorbitan Oleate | Surfactant | 0.50 |
| Euphorbia Cerifera (Candelilla) Wax | Emulsion Stabilizer | 3.00 |
| Ehylhexyl methoxycinnamate | Emulsion Stabilizer | 2.00 |
| 1,3-di(pentyloxy)benzene | Skin Whitening Agent | 3.00 |
| D.I WATER | Solvent | 81.98 |

Table 3. Composition of RS-emulsion Samples.

| Chemical name | FUNCTION | wt% |
|--|----------------------------|-------|
| Disodium EDTA | Chelating Agent | 0.02 |
| Butylene Glycol | Humectant | 5.00 |
| Polyglyceryl-10 Stearate | Surfactant | 0.50 |
| Glycerine | Humectant | 5.00 |
| Polyacrylate-13 & Polyisobutene & Polysorbate-20 | Viscosity Increasing Agent | 0.30 |
| Cetearyl Alcohol | Emulsion Stabilizer | 1.20 |
| Glyceryl Stearate & PEG-100 Stearate | Surfactant | 0.20 |
| Caprylic/Capric Triglyceride | Skin-Conditioning Agent | 8.00 |
| Octyldodecyl Myristate | Skin-Conditioning Agent | 1.00 |
| Dimethicone | Skin-Conditioning Agent | 0.30 |
| Tocopheryl Acetate | Antioxidant | 0.10 |
| Phenoxyethanol | Preservative | 0.50 |
| 1,3-di(pentyloxy)benzene | Skin Whitening Agent | 3.00 |
| 1,2-Hexanediol | Skin Whitening Agent | 2.00 |
| D.I WATER | Solvent | 72.88 |

Table 4. Determination of active ingredient content in samples.

| Samples | Area(mV*s) | Contents ratio for standard(%) | Content(%) |
|-----------------|------------|--------------------------------|------------|
| Control | 20.701 | 102.98 | 3.09 |
| RS-Emulsion | 19.969 | 99.34 | 2.98 |
| RS-Nanoemulsion | 19.638 | 97.70 | 2.93 |
| Standard | 20.101 | 100.00 | 3.00 |

2.5. 피부 미백효능 평가 실험

피부 미백 효능평가 실험은 식품의약품안전처 미백 기능성 화장품의 유효성 평가를 위한 가이드라인의 규정 ‘미백 개선 효능 평가 시험 방법 및 기준’에 따라 실험을 수행하였으며, 이 실험은 인공색소 침착 후 미백 효과 평가 실험 (Efficacy evaluation on induced pigmentation)으로 피험자 수는 통계적으로 비교가 가능하기 위해 20명 이상의 유효데이터를 확보하도록 하며, 대조군을 사용 시 이중 맹검법을 원칙으로 하였다. 평균 42세의 건강한 성인 여성을 대상으로 시험부위의 최소 흉반량 판정 및 자외선 조사를 4일간 진행하였으며, 8주간 제품을 1일 2회 도포하도록 하였다. 이후 시험부위의 사진촬영과 미백개선을 평

가하기 위한 기기 측정 및 안전성 평가, 설문 평가 병행하여 제품의 효과 및 안전성을 평가하였다. 시험부위의 피부 색상은 두 명의 피부과 전문의에 의해 평가 되었다. 자외선 조사에 의한 마지막 인공 색소침착 후 0주경과 후, 4주경과 후, 6주경과 후, 8주경과 후 피험자들 대상으로 8단계로 구분하여 평가하였다.

3. 결과 및 토의

3.1. RS-Nanoemulsion의 제조 및 안정성

신규미백제인 1,3-di(pentyloxy)benzene을 함유하여 선정된 최적의 나노에멀전 조건하에서 조

성 상전이 유화방법으로 제조된 RS-Nanoemulsion을 각 온도에 보관하면서 안정성을 관찰하였다. 초기 형성된 입자는 약 256nm이며 (Fig. 1), 이후 8주 동안 입도의 변화가 관찰되지 않았다. 또한 각 온도별로 시간에 대한 안정성을 8주 동안 관찰 한 결과 물리적인 외관의 변색이나 변취 현상 등은 관찰되지 않았다 (Table 5).

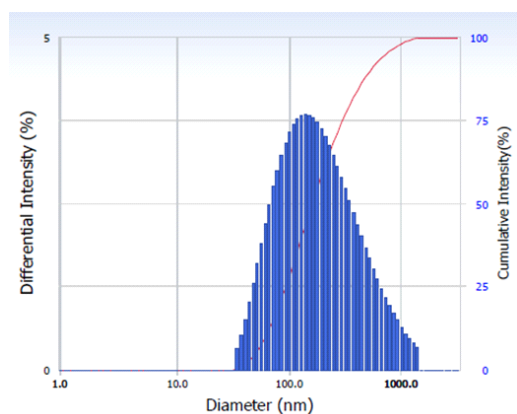


Fig. 1. Droplet diameter analysis of RS-Nanoemulsion stored at 25°C (0week)

3.2. 대조군 시료(Solution in mineral oil)

경피 투과 실험 결과

본 시험의 지표성분인 1,3-di(pentyloxy)benzene을 mineral oil에 용해한 대조시료를 대상으로 인체 피부에 대한 경피 흡수실험을 수행한 결과를 Table 6 및 Fig. 2에 나타내었다. 실험결과, 1,3-di(pentyloxy)benzene은 실험 시작부터 약 10시간 경과 시까지 Diffusion (Permeation) coefficient가 $5.79 \pm 3.09 \times 10^{-11} \sim 8.23 \pm 0.75 \times 10^{-10}(\text{cm}^2/\text{s})$ 범위를 나타내며, 초기 1시간 경과 시에 가장 높고 이후 통계적으로 유의한 수준으로 감소하는 경향을 나타내어, 이후 10시간부터 24시간 경과 시점까지의 경피투과율은 지속적으로 감소하는 양상을 나타내었다.

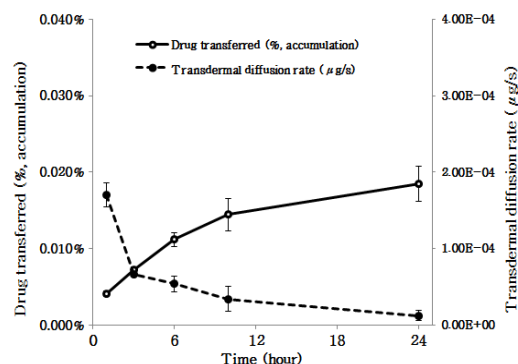


Fig. 2. Transdermal absorption experiments of solution in mineral oil for time.

Table 5. Stability of RS-Nanoemulsion Samples

| Condition | | week | 0week | 2weeks | 4weeks | 6weeks | 8weeks |
|------------------|-------|--------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| RS-Nano emulsion | 4°C | pH | 5.54 | 5.60 | 5.61 | 5.62 | 5.59 |
| | | Color & Odor | Good | Good | Good | Good | Good |
| | 25°C | pH | 5.54 | 5.61 | 5.62 | 5.62 | 5.58 |
| | | Viscosity | 980 | 900 | 920 | 880 | 900 |
| | | Color & Odor | Good | Good | Good | Good | Good |
| | 44°C | pH | 5.54 | 5.62 | 5.62 | 5.62 | 5.75 |
| | | Color & Odor | Good | Good | Good | Good | Good |
| | 50°C | pH | 5.54 | 5.63 | 5.62 | 5.62 | 5.82 |
| | | Color & Odor | Good | Good | Good | Good | Good |
| | Cycle | pH | 5.54 | 5.60 | 5.60 | 5.62 | 5.62 |
| | | Color & Odor | Good | Good | Good | Good | Good |

Table 6. Results of transdermal absorption experiments of solution in mineral oil

| Time (h) | Drug concentration in receptor ($\mu\text{g/ml}$) | Transferred drug in receptor (μg) | Net transferred drug (μg) | Drug transferred (% accumulation) | Transdermal diffusion rate ($\mu\text{g/s}$) | Flux ($\mu\text{g/s}\cdot\text{cm}^2$) | Diffusion coefficient (cm^2/s) |
|----------|---|--|--|-----------------------------------|--|--|--|
| 1 | 0.1022 ± 0.0093 | 0.6131 ± 0.0561 | 0.6131 ± 0.0561 | 0.00409 ± 0.00037 | 1.70 ± 0.16 $\times 10^{-5}$ | 2.54 ± 0.23 $\times 10^{-4}$ | 8.23 ± 0.75 $\times 10^{-10}$ |
| 3 | 0.0796 ± 0.0036 | 0.4778 ± 0.0215 | 1.0909 ± 0.0541 | 0.00727 ± 0.00036 | 6.64 ± 0.30 $\times 10^{-5}$ | 9.90 ± 0.45 $\times 10^{-5}$ | 3.21 ± 0.14 $\times 10^{-10}$ |
| 6 | 0.0971 ± 0.0185 | 0.5827 ± 0.0093 | 1.6736 ± 0.1404 | 0.01116 ± 0.00094 | 5.40 ± 1.03 $\times 10^{-5}$ | 8.05 ± 1.54 $\times 10^{-5}$ | 2.61 ± 0.50 $\times 10^{-10}$ |
| 10 | 0.0817 ± 0.0389 | 0.4900 ± 0.2333 | 2.1635 ± 0.3162 | 0.01442 ± 0.00211 | 3.40 ± 1.62 $\times 10^{-5}$ | 5.08 ± 2.42 $\times 10^{-5}$ | 1.64 ± 0.78 $\times 10^{-10}$ |
| 24 | 0.1006 ± 0.0537 | 0.6038 ± 0.3224 | 2.7673 ± 0.3496 | 0.01845 ± 0.00233 | 1.20 ± 0.64 $\times 10^{-5}$ | 1.79 ± 0.95 $\times 10^{-5}$ | 5.79 ± 3.09 $\times 10^{-11}$ |

Table 7. Results of transdermal absorption experiments of RS-Emulsion

| Time (h) | Drug concentration in receptor ($\mu\text{g/ml}$) | Transferred drug in receptor (μg) | Net transferred drug (μg) | Drug transferred (% accumulation) | Transdermal diffusion rate ($\mu\text{g/s}$) | Flux ($\mu\text{g/s}\cdot\text{cm}^2$) | Diffusion coefficient (cm^2/s) |
|----------|---|--|--|-----------------------------------|--|--|--|
| 1 | 0.0485 ± 0.0227 | 0.2912 ± 0.1360 | 0.2912 ± 0.1360 | 0.00194 ± 0.00091 | 8.09 ± 3.78 $\times 10^{-5}$ | 1.21 ± 0.56 $\times 10^{-4}$ | 4.05 ± 1.89 $\times 10^{-10}$ |
| 3 | 0.0584 ± 0.0231 | 0.3502 ± 0.1385 | 0.6414 ± 0.2167 | 0.00428 ± 0.00144 | 4.86 ± 1.92 $\times 10^{-5}$ | 7.26 ± 2.87 $\times 10^{-5}$ | 2.44 ± 0.96 $\times 10^{-10}$ |
| 6 | 0.0684 ± 0.0235 | 0.4103 ± 0.1412 | 1.0517 ± 0.3508 | 0.00701 ± 0.00234 | 3.80 ± 1.31 $\times 10^{-5}$ | 5.67 ± 1.95 $\times 10^{-5}$ | 1.90 ± 0.65 $\times 10^{-10}$ |
| 10 | 0.1019 ± 0.0439 | 0.6111 ± 0.2637 | 1.6628 ± 0.0961 | 0.01109 ± 0.00064 | 4.24 ± 1.83 $\times 10^{-5}$ | 6.33 ± 2.73 $\times 10^{-5}$ | 2.13 ± 0.92 $\times 10^{-10}$ |
| 24 | 0.0976 ± 0.0747 | 0.5857 ± 0.4482 | 2.2485 ± 0.3838 | 0.01499 ± 0.00256 | 1.12 ± 0.89 $\times 10^{-5}$ | 1.73 ± 1.33 $\times 10^{-5}$ | 5.82 ± 4.45 $\times 10^{-11}$ |

3.3. RS-Emulsion 시료 경피 투과 실험 결과

RS-Emulsion 시료를 대상으로 인체 피부에 대한 경피 흡수실험을 수행한 결과를 Table 7, Fig. 3에 나타내었다. 실험결과, mineral oil에 용해한 대조시료와 유사하게 1,3-di(pentyloxy)benzene은 Diffusion coefficient 가 초기 1시간 경과 시에 상대적으로 높았으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. 다만 초기 1시간 경과 후와 24시간 경과 후의 Diffusion coefficient가 통계적으로 유의하게 차이나, 24시간 경과 시점까지의 경피투과율은 지속적으로 감소하는 양상을 나타내었다. Diffusion coefficient는 $5.82 \pm 4.45 \times 10^{-11} \sim 4.05 \pm 1.89 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ 범위를 나타내었다.

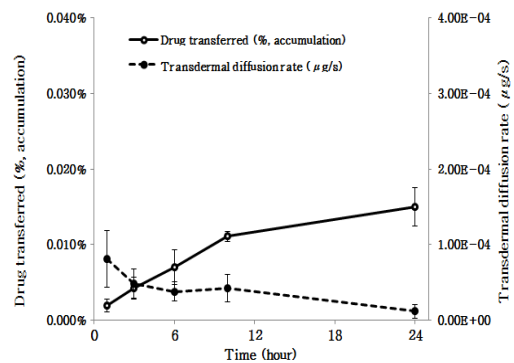


Fig. 3. Transdermal absorption experiments of Rs-emulsion for time.

3.4. RS-Nanoemulsion 시료의 경피 투과 시험 결과

RS-Nanoemulsion 시료를 대상으로 인체 피부에 대한 경피 흡수실험을 수행한 결과를 Table 8 및 Fig. 4에 나타내었다. 실험결과, 1,3-di(pentyloxy) benzene은 실험 시작부터 약 24 경과 시까지 Diffusion coefficient 가 $1.09 \pm 6.68 \sim 14.31 \pm 5.47 \times 10^{-10}(\text{cm}^2/\text{s})$ 범위를 나타내며, 초기 1시간 경과 시에 가장 높고 이후 통계적으로 유의한 수준으로 감소하는 경향을 나타내어, 이후 10시간부터 24시간 경과 시점까지의 경피투과율은 지속적으로 감소하는 양상을 나타내었다.

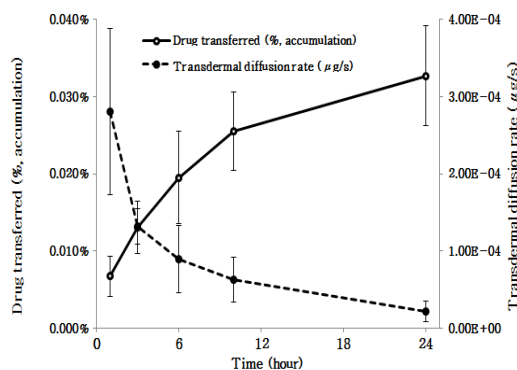


Fig. 4. Transdermal absorption experiments of Rs-nanoemulsion for time

3.5 시료간 시간별 경피 투과 양상의 비교

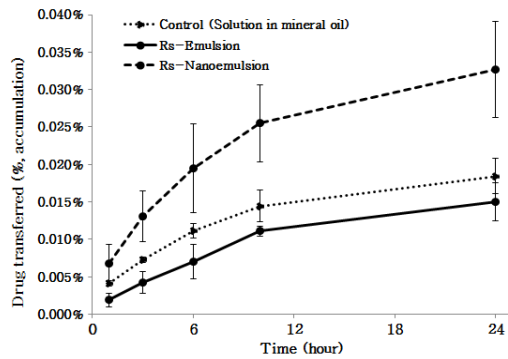
본 실험의 지표성분인 1,3-di(pentyloxy) benzene을 mineral oil에 용해한 대조시료와 RS-emulsion, RS-Nanoemulsion 시료를 대상으로 인체 피부에 대한 경피 흡수실험 결과를 비교한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 그 결과, RS-Nanoemulsion 시료는 mineral oil에 용해한 대조시료 대비 1.77배, RS-emulsion 대비 2.18 배의 경피투과 특성을 나타내는 것을 확인하였다. 특히 RS-Nanoemulsion 시료는 3시간에서 6시간 경과 시점까지는 mineral oil에 용해한 대조시료 1.50배, RS-emulsion 4.00배로 빠르고 높은 경피투과계수를 나타내었으며, RS-Nanoemulsion 시료가 mineral oil에 용해한 대조시료와 일반 O/W 에멀전인 RS-emulsion에 비해 우수한 1,3-di(pentyloxy)benzene 경피투과 특성이 있다는 것을 확인하였다.

3.6. 신규 미백제를 함유한 나노에멀전의 피부 미백 효능 평가

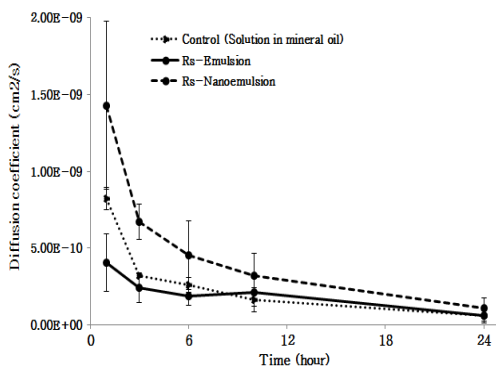
RS-Nanoemulsion을 O/W크림에 함유하여 만든 크림 제형을 피부 미백개선 효능평가를 위한 인체 적용 실험에 적용하였다. 평균 42세의 여성 지원자 20명을 대상으로 8주 동안 인체 적용 실험을 수행하였고, 대조군으로 placebo크림을 사용하였다.

Table 8. Results of transdermal absorption experiments of RS-Nanoemulsion

| Time (h) | Drug concentration in receptor (μg/ml) | Transferred drug in receptor (μg) | Net transferred drug (μg) | Drug transferred (% accumulation) | Transdermal diffusion rate (μg/s) | Flux (μg/s·cm ²) | Diffusion coefficient (cm ² /s) |
|----------|--|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--|
| 1 | 0.1684 ± 0.0644 | 1.0105 ± 0.3865 | 1.0105 ± 0.3865 | 0.00674 ± 0.00258 | 2.81 ± 1.07 × 10 ⁻⁴ | 4.19 ± 1.60 × 10 ⁻⁴ | 1.43 ± 5.47 × 10 ⁻⁹ |
| 3 | 0.1585 ± 0.0272 | 0.9510 ± 0.1634 | 1.9615 ± 0.5129 | 0.01308 ± 0.00342 | 2.72 ± 0.71 × 10 ⁻⁴ | 4.07 ± 1.06 × 10 ⁻⁴ | 6.73 ± 1.16 × 10 ⁻¹⁰ |
| 6 | 0.1602 ± 0.0783 | 0.9610 ± 0.4698 | 2.9224 ± 0.8954 | 0.01948 ± 0.00597 | 2.71 ± 0.83 × 10 ⁻⁵ | 4.04 ± 1.24 × 10 ⁻⁴ | 4.53 ± 2.22 × 10 ⁻¹⁰ |
| 10 | 0.1504 ± 0.0702 | 0.9023 ± 0.4214 | 3.8248 ± 0.7683 | 0.02550 ± 0.00512 | 2.66 ± 0.53 × 10 ⁻⁵ | 3.96 ± 0.80 × 10 ⁻⁵ | 3.19 ± 1.49 × 10 ⁻¹⁰ |
| 24 | 0.1800 ± 0.1101 | 1.0801 ± 0.6605 | 4.9049 ± 0.9660 | 0.03270 ± 0.00644 | 9.73 ± 1.92 × 10 ⁻⁵ | 1.45 ± 0.29 × 10 ⁻⁵ | 1.09 ± 6.68 × 10 ⁻¹⁰ |



(A)



(B)

Fig. 5. Comparison of real-time transcutaneous permeation patterns.

(A) Transferred drug (% accumulation),
(B) Diffusion coefficient

Fig. 6은 피부과 전문의의 육안평가를 한 결과치를 보여주고 있고 Fig. 7은 Mexameter MX-18기기를 통해 멜라닌 수치변화를 나타내었다. 사용 4주 후부터 시험제품 사용부위에서 대조제품 사용부위에 비해 통계적으로 유의한 수준의 미백 효과를 전문가의 육안으로 확인 가능하였다 (Fig. 8). Mexameter MX-18기기에 의한 색소감소정도 및 멜라닌 수치의 감소량 비교 통계처리 결과를 도표화 한 것으로 사용 2주 후부터 시험제품 사용부위에서 대조제품 사용부위에 비해 통계적으로 유의한 수준의 멜라닌 색소 감소를 확인할 수 있었다 (Fig. 9). 또한 시험기간 동안 피시험자들의 피부안전성 평가를 한 결과 시험기간 동안에는 특별한 이상 증상이 발생하지 않았다 (Table 9).

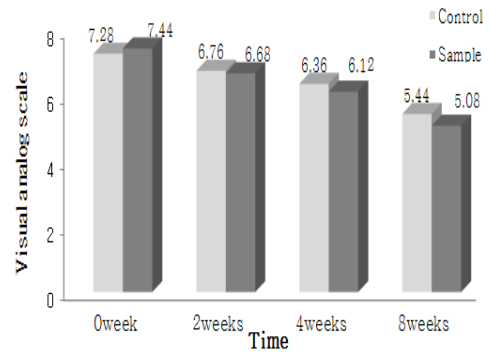


Fig. 6. Changes in the visual evaluation values between the control and sample.

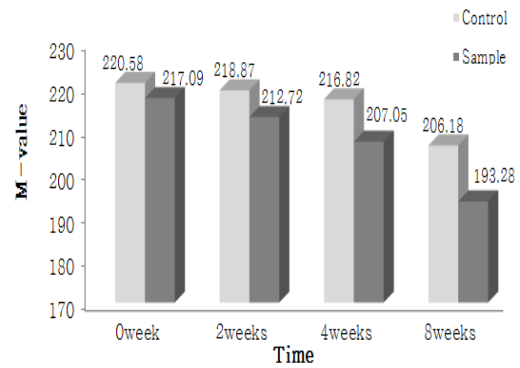


Fig. 7. Changes in measured Mexameter values between control and sample.

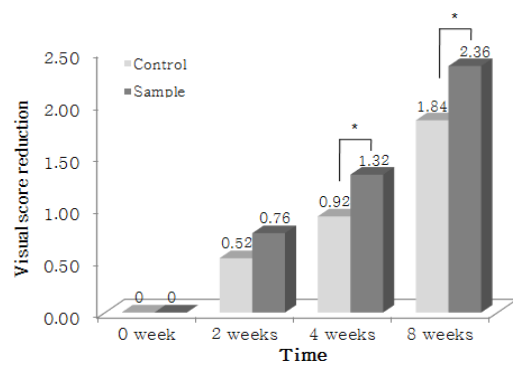


Fig. 8. Degree of pigmentation reduction of visual evaluation (* $P < 0.05$)

Table 9. Evaluation of skin safety during the test

| | Erythema | Edema | Exfoliation | Itchy | Tingling | Purosis | Stiff | Prick | Other abnormal |
|--------------|----------|-------|-------------|-------|----------|---------|-------|-------|----------------|
| Mild case | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 중등증 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Serious case | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

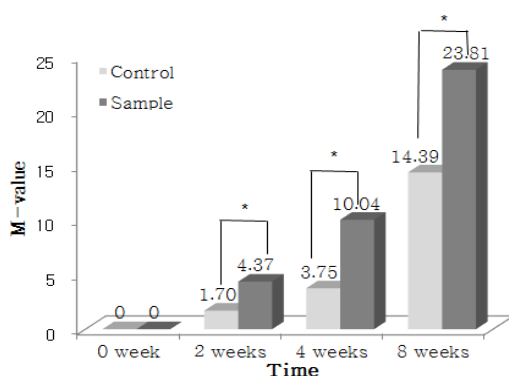


Fig. 9. Degree of pigmentation reduction of Mexameter(M-value)(* $P < 0.05$)

4. 결론

1,3-di(pentyloxy)benzene을 함유하여 PIC방법으로 제조된 RS-Nanoemulsion의 안정성을 8주 동안 관찰 한 결과 물리적인 외관의 변색이나 변취 현상등은 관찰되지 않았으며, 경피흡수 생체외 실험에서 지표성분인 1,3-di(pentyloxy)benzene을 mineral oil에 용해한 대조시료와 일반 O/W 유화법으로 제조된 RS-emulsion시료를 비교 대상으로 하여 인체 피부에 대한 경피 흡수시험을 수행하였다. 시험결과, mineral oil에 용해한 대조시료와 RS-Nanoemulsion의 경우, Diffusion coefficient가 시험 시작부터 약 초기 1시간 경과 시에 가장 높고 이후 통계적으로 유의한 수준으로 감소하는 경향을 나타내어, 이후 10시간부터 24시간 경과 시점까지의 경피투과율은 지속적으로 감소하는 양상을 나타내었다. 특히 RS-Nanoemulsion 시료는 1,3-di(pentyloxy)benzene에 대한 Diffusion coefficient가 시험 시작부터 약 24 경과 시까지 $1.09 \pm 6.68 \sim$

$14.31 \pm 5.47 \times 10^{-10}(\text{cm}^2/\text{s})$ 범위를 나타내며, RS-Nanoemulsion 시료는 mineral oil에 용해한 대조시료 대비 1.77배, RS-emulsion 대비 2.18 배의 경피투과 특성을 나타내는 것을 확인하였으며, 경피투과 촉진 화장품으로서의 가능성을 나타내었다.

RS-Nanoemulsion 함유한 크림제형을 총 8주간의 시험기간 동안 25명의 피험자들을 대상으로 제품의 피부 미백 효능 시험을 시행하였으며 실험 결과 시험부위와 대조부위 모두 8주간의 시험기간 동안 색소침착의 정도가 감소하는 양상을 보였으나, 시험부위에서 Visual analog scale의 점수 감소 정도가 더 큰 것으로 나타났으며 사용 4주차부터 통계적으로 유의한 수준으로 확인되었다. 기기평가에서는 시험부위와 대조부위 모두 8주간의 시험기간 동안 M-value가 감소하는 양상을 보였으나 그 감소치의 크기는 시험부위에서 더 큰 것으로 나타났으며, 시험 2주차부터 8주차까지 통계적으로 유의한 수준의 차이임이 확인되었다. 종합해보면 시험물질에 포함되어 있는 지표 성분 레조시놀다이펜틸에터[1,3-di(pentyloxy)benzene]는 효과적인 미백 효과를 가지고 있는 것으로 판단할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 HN12C0056)

References

1. S. Briganti, E. Camera, and M. Picardo, "Chemical and instrumental approaches to

- treat hyperpigmentation”, *Pigment. Cell. Res.*, Vol.16, No.2 pp. 101–110, (2003).
2. W. G. Cho, C. T. Kim, S. H. Choi, and Y. K. Cha, Report of global cosmetic projects of Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (Project No.HN12C0056), (2014).
 3. A. Forgiarini, J. Esquena, C. Gonzalez, and C. Solans, “Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature”, *Langmuir*, Vol.17, No.7 pp. 2076–2083. (2001).
 4. P. Fernandez, V. Andre, J. Rieger, and A. Kuhnle, “Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion”, *Colloids Surf.*, Vol.251, pp. 53–58, (2004).
 5. W. Liu, D. Sun, C. Li, Q. Liu, and J. Xu, “Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method”, *J. Colloid Interface Sci.*, Vol.303, No.2 pp. 557–563, (2006).
 6. O. Sonnevile-Aubrun, D. Babayan, D. Bordeaux, P. Lindner, G. Rata, and B. Cabane, “Phase transition pathways for the production of 100 nm oil-in-water emulsions”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, Vol.11, No.1 pp. 101–110. 2009.
 7. Elsayed MA, Abdallah Y, Naggat F, Khalafallah M, “Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery”, *Int. J. Pharm.*, Vol.332, No.1–2 pp. 60–66, (2006).
 8. Honeywell-Nguyen PL, Bouwstra JA, “Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery”, *Drug Discovery Today:Technologies*, Vol.2, No.1 pp. 67–74, (2005).
 9. J. H. Kim, H. J. Yang, B. R. Won, Y. J. Ahn, M. K. Kang, and S. N. Park, “Preparation of Vitamin E Acetate Nano-emulsion and In Vitro Research Regarding Vitamin E Acetate Transdermal Delivery System which Use Franz Diffusion Cell”, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, Vol.35, No.2 pp. 91–101, (2009).
 10. OECD (2004). Test Guideline 428: Skin absorption: in vitro Method. OECD, Paris.
 11. OECD (2004). Test Guideline 427: Skin absorption: in vivo Method. OECD, Paris.
 12. OECD (2004). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
 13. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W, “Test Guidelines for In Vitro Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients”, *Food Chem Toxicol*, Vol.37, No.1–2 pp. 191–205, (1999).
 14. Jewell C, Heylings JR, Clowes, HM. And Williams, FM, “Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro”, *Arch Toxicol*, Nol.74, No.7 pp. 356–365, (2000).
 15. KFDA (2010). Guideline for in vitro Skin Absorption method. KFDA, Seoul.