

멜라닌생성억제제인 코직산 모노스테아레이트의 가수분해와 피부투과특성 및 *in vivo* 미백효과

하용호 · 유성운 · 김동섭* · 임세진** · 최영욱[#]

중앙대학교 약학대학, *식품의약품안전본부 독성연구소, **동덕여자대학교 약학대학

(Received November 6, 1997)

Hydrolysis, Skin Permeation and *In Vivo* Whitening Effect of Kojic Acid Monostearate as an Antimelanogenic Agent

Yong Ho Ha, Sung Un Yu, Dong Sup Kim*, Se Jin Lim** and Young Wook Choi[#]

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

*Toxicology Center, Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-020, Korea

**College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Abstract—Kojic acid, antimelanogenic agent, has been widely used in cosmetics to lighten the skin color. However, it has skin irritancy and instability against pH, temperature and light. To overcome these problems and optimize the molecular structure of kojic acid (KA), a prodrug, kojic acid monostearate (KMS), has been synthesized to modify the topical drug delivery in the point of sustained release of the parent drug via enzymatic hydrolysis during skin absorption. The prodrug was tested for enzymatic hydrolysis with cytosolic fraction of hairless mouse skin. From the *in vitro* skin permeation study through hairless mouse skin, we found that KMS was retained in the skin and generated KA continuously by the skin esterase cleavage. In addition, topical formulations of o/w type creams and polyolprepolymer-containing cream were further tested for whitening effects using *in vivo* yellow skin guinea pig model.

Keywords □ Kojic acid, Kojic acid monostearate, Prodrug, Hydrolysis, Skin permeation, Whitening effect, Antimelanogenic agent, Polyolprepolymer.

코직산(kojic acid)은 1907년 일본의 K. Saito에 의해 처음으로 보고되었으며,¹⁾ 당류에 미생물의 호기적 과정을 통해서 만들어진 pyrone으로 알칼리 수용액과 고온에서는 산화에 의해 개열하여 formic acid, oxalic acid, glycolic acid 등을 생성한다. 코직산의 작용 기전은 멜라닌 생성경로에서 중요한 tyrosinase의 Cu²⁺와 chelate를 형성함으로써 멜라닌 생합성 경로를 차단하거나 dopachrome tautomerase와 DHICA-oxidase에 간섭하여 멜라닌 중합체의 형성을 억제한다고 알려져있다.^{2,3)} 그러나 코직산은 공기중에서 매우 불

안정하고 산성에 기인한 피부자극의 단점을 가지고 있어 이러한 단점을 극복하기 위해 코직산의 여러 가지 지방산 유도체에 대한 연구들이 진행되었다.⁴⁻⁶⁾ 본 실험에서는 포화지방산인 stearic acid를 코직산의 2번 탄소에 위치한 1급 알코올성 히드록시기에 ester 결합을 시켜 코직산 모노스테아레이트를 합성함으로써 코직산의 단점인 불안정성과 피부자극을 극복할 수 있는 경피적 국소 약물전달시스템으로서의 프로드럭을 개발하고자 하였다. 따라서 합성된 프로드럭을 기기분석을 이용하여 확인하였으며, 실험동물을 이용하여 피부균질액으로부터 얻은 효소용액에서의 가수분해 및 피부확산 특성을 파악하였다. 별도로 코직산 및 코직산 모노스테아레이트를 함유하는 시험제제를 제조하여 기니피 모

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5609 (팩스) 02-816-7338

델에서의 미백효과를 평가하였으며, 이상의 실험으로부터 다소의 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

실험방법

시약 및 기기

약물로서 kojic acid(KA로 약함)는 일본 Tokyo Kasei Kogyo사로부터 구입하였고, 합성원료로 stearic acid는 미국 Aldrich사로부터 구입하여 사용하였고, 그 외의 시약은 분석용 특급 시약을 사용하였다.

합성한 kojic acid monostearate(KMS로 약함)는 미국 Perkin-Elmer사의 $^1\text{H-NMR}$ Spectrometer(684)와 독일 Bruker사의 FT-IR Spectrometer(PLX400)를 사용하여 확인하였고, 효소가수분해 실험에 쓰이는 skin의 cytosolic fraction을 얻기 위해 미국 Sonics & Materials사의 sonicator(Vibra Cell)와 이태리 Kontron instruments사의 ultracentrifuge(Centrifon T-1170)를 사용하였다. HPLC는 미국 TSP사의 degasser(SCM1000), pump(P4000), autosampler(AS1000), detector(UV1000), integrator(PC1000) 및 column oven(TC-50, Eppendorf, Germany)을 부착시켜 사용하였다.

프로드러의 합성

KA(2-hydroxymethyl-5-hydroxy-4-pyrone)는 4-pyrone을 모핵으로 하며 2번 탄소에 1차 알코올인 hydroxymethyl기와 5번 탄소에 엔올인 히드록시기등 모두 2개의 히드록시기를 갖는다. 이들을 모두 아실화하여 diester를 얻고자 하는 경우, KA를 염화아실과 피리딘 존재하에 반응시키면 된다. 그러나 KA내의 2개의 히드록시기중 어느 하나만을 아실화시킬 때는 위치선택적(regioselective)인 합성법이 요구된다. KMS의 합성은 500 ml 둥근바닥 플라스크에 stearic acid 129.54 g(454 mM)과 ZnCl_2 (무수물) 28.35 g(208 mM)을 넣고 160°C에서 균일하게 될 때까지 약 1시간 동안 교반하였다. 계속하여 KA 27.74 g(174 mM)을 가하여, 160°C에서 4시간 교반하고, 다시 130°C로 온도를 낮추면서 1시간 교반하였다. 반응 혼합물을 초산에철에 녹인 후 분별깔대기에서 물과 brine으로 진탕하여 세척하고, 황산마그네슘(무수물)으로 건조한 후 여과하여 그 여액을 감압 농축하였다. 잔류물을 toluene-ethylacetate를 사용하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피를

실시하고, 용매를 제거한 후 건조시켜 미색의 결정을 얻었다. $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_5$; m.p. 90.8°C; TLC(Ethyl acetate : Hexane=1:1) R_f =0.33; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 0.84(t, J =6.8Hz, 3H), 1.22(m, 28H), 1.51(t, J =7.4, 2H), 2.37(t, J =7.4, 2H), 4.93(s, 2H), 6.43(s, 1H), 8.05(s, 1H), 9.20(s, 1H); IR(KBr, cm^{-1}) 3250, 1725, 1650, 1620.

효소용액의 제조

실험에서 사용한 hairless mouse의 피부는 3~4개월 생육시킨 Charles River 수컷 생쥐로서 피부에 상처나 긁힌 흔적이 없는 것으로 선택하였으며 경추탈골에 의해 고통 없이 죽인 다음 복부를 절개하여 전체 피부를 벗겨내고 여기에 붙어있는 지방 등은 37°C로 가운한 식염수용액에 담가 조심스럽게 제거하고 냉동보관하였으며 필요시마다 해동시켜 사용하였다.⁷⁻⁹⁾ 먼저 KH_2PO_4 와 Na_2HPO_4 를 함유한 pH 7.4의 phosphate buffered saline(이하 PBS) 용액을 제조하였고, 작은 절편으로 만든 피부에 4°C의 PBS를 가하여 skin/PBS(w/w)의 비율이 0.3이 되게 한 후 sonicator로 충분히 분해시켰다. 이와 같은 방법으로 얻은 피부균질액을 1차로 250×g에서 10분간 원심분리하여 등도 및 균질화되지 않은 세포 등을 제거하였다. 1차 원심분리 후의 상정액을 취하여 2차로 4°C, 100,000×g에서 30분간 원심분리하여 상정액을 취하고 냉동보관하였으며 필요시마다 해동시켜 사용하였다. 모든 효소용액은 4~7마리의 hairless mouse의 피부를 혼합하여 제조하였다.

가수분해

위에서 제조한 효소용액에 KMS를 용해시킨 디메틸포름아미드(DMF)용액 10%를 가하여 KMS의 최종 농도가 0.2 mM이 되게 하였다. 혼합용액을 각각 20°C, 37°C, 50°C 온도의 진탕수욕에서 교반하면서 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10시간마다 시료를 채취하여 동량의 에탄올을 가하여 제단백하고 원심분리하여 그 상정액을 0.45 μm PTFE 멤브레인 필터로 여과하여 그 여액중의 KA를 HPLC로 정량하였다. 이때 KA의 HPLC 분석은 Shiseido의 C_{18} Capcell Pak(4.6×250 mm, 5 μm)을 사용하여 검출파장 268 nm에서 측정하였고, 이동상은 3% acetonitrile과 97% PBS(pH 3.0)로 하고 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 20 μl 로 하였다.

피부투과

실험에서 사용한 hairless mouse skin은 효소용액의 제조와 동일한 방법으로 처리하여 얻은 피부를 4시간동안 PBS에 담근 다음 사용하였으며, 피부투과 실험장치는 Valia-Chien skin permeation cell을 제작하여 사용하였다.^{10, 11)} Donor측 시료는 KA의 경우 증류수, KMS의 경우는 물에 난용성인 점을 감안하여 mineral oil과 테트라히드로퓨란(THF) 혼액(4:1 v/v)을 사용하였으며, receptor측은 효소의 불활성화를 고려하여 가수분해시와 동일한 용액인 PBS와 DMF혼액(9:1 v/v)을 사용하였으며, 별도로 KA와 투과성 비교시험에는 KMS의 용해도를 고려하여 이소프로필 알코올(IPA) 80 ml와 THF 20 ml를 혼합한 용액에 span 20을 0.5 ml를 가한 혼합용액을 사용하였다. 37±1°C 수욕상에서 spin bar를 회전시키면서 6, 12, 24, 48, 72, 96시간마다 receptor쪽에서 micropipet을 이용하여 0.5 ml씩 정확히 채취하여 검액으로 하였으며 매회 채취 후 receptor측에 동일량의 혼합용액을 보충하여 주었다. 이때 donor측과 receptor측의 용량은 각각 12 ml씩이었으며, 확산에 유효한 피부면적은 약 2.54cm²이었다. 모든 검액은 0.45 μm PTFE 멤브레인 필터로 여과하고 그 여액중의 KA 및 KMS의 농도를 HPLC로 정량하였다. 이때 KA의 분석조건은 가수분해 실험과 동일하였으며, KMS의 분석은 C₁₈ Capcell Pak 칼럼을 사용하여 이동상은 95% acetonitrile과 5% PBS(pH 3.0)의 혼액, 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 20 μl로 하여 검출과장 268 nm에서 측정하였다.

시험제제의 제조

미백실험에 사용할 외용제제는 KA는 수용성이고 KMS는 지용성임을 감안하여 2가지 물질을 공통적으로 제형화 할 수 있는 크림제를 시험제제로 제조하였다. 유상으로는 광유, 스테아린산, 세토스테아릴 알코올 등을 사용하고 수상으로는 증류수, 글리세린, 프로필렌 글리콜 등을 사용하였으며, 일반적인 유제의 제법에 따라 75°C의 수욕에서 유상과 수상을 각각의 비커에 용해시킨 후 유상을 수상에 가하고 1000 rpm에서 5분간 교반한 다음 실온까지 서서히 냉각하여 O/W형의 크림을 만들었다. 이때 KA는 수상에 녹여 가하였고 KMS는 유상에 녹여 가하였으며, 약물의 함량은 각각 0.1 w/w%로 하였다. 별도로 피부각질 및 상피층에 대한 약물의 효과를 높이기 위해 고분자 첨가제로서 Polyolpre-

polymer(PP-15로 약함)를 6 w/w% 함유시킨 KMS cream(PP)을 같은 방법으로 제조하였으며, 약물을 함유하지 않은 크림제를 대조용으로 사용하였다.

미백효과

한 시료당 7마리의 기니피크의 등부위를 제모한 후 FS20S E-30 램프를 이용하여 UV-A(장파)와 UV-B(단파)를 광조사 면적 2×2 cm², 광조사 시간 10분동안 2 J/cm²로 3일 동안 1일 1회씩 조사하여 기니피크의 등을 검게 만들었다.¹²⁾ 4일째부터 각 시험제제를 매일 2회씩 도포하여 3주간의 피부색 변화를 비색계로 측정하여 lightness(L값)를 식(1)에 의하여 구하였으며, 미백효과는 lightness change(ΔL)를 식(2)에 의해 구하여 평가하였다.

$$L \text{ value} = 10\sqrt{Y} \quad (Y : \text{명도}) \quad (1)$$

$$\Delta L = \text{도포후 } t \text{일 후의 } L_{\text{값}} - \text{도포개시의 } L_{\text{값}} \quad (2)$$

결과 및 고찰

가수분해

KMS는 프로드럭이기 때문에 피부에 흡수될 때 피부내에 존재하는 효소에 의해 가수분해되어야 하며, 이 프로드럭이 KA의 에스테르 화합물이란 점에서 피부 에스테라제에 의해 가수분해되면서 KA를 지속적으로 유리시키고, 생성된 KA가 피부내 멜라닌세포에 작용하여 멜라닌 생성을 억제시킴으로서 미백효과를 가져올 것으로 기대할 수 있다. 따라서 피부 에스테라제를 함유하는 세포질분획을 제조하였고, 이 효소용액에 KMS를 녹이고 경시적 가수분해에 따른 KA의 생성량의 변화를 관찰하였다. 그러나 KMS는 매우 난용성이어서 효소용액에 그대로 녹일 수 없었으며, 효소의 활성에 영향을 주지 않는 범위 내에서 혼합용매로서 DMF를 10% 가하였다. 실제로 Fort와 Mitra⁷⁾는 난용성 약물의 가수분해실험을 위해 효소용액으로 DMF를 20% 함유하는 용액을 사용하였고 이때 에스테라제 활성이 유지되었다고 보고하였다. 특히 효소분자의 구조적 변화는 효소의 활성에 직접적인 영향을 미치는데, 낮은 온도에서는 이러한 구조적 변화가 가역적이지만 50°C 이상에서는 비가역적이다. 효소의 3차원적 구조를 형성하는 결합은 상대적으로 약해서 쉽게 파괴되어지며 높은 온도나 pH의 변화에 따라서

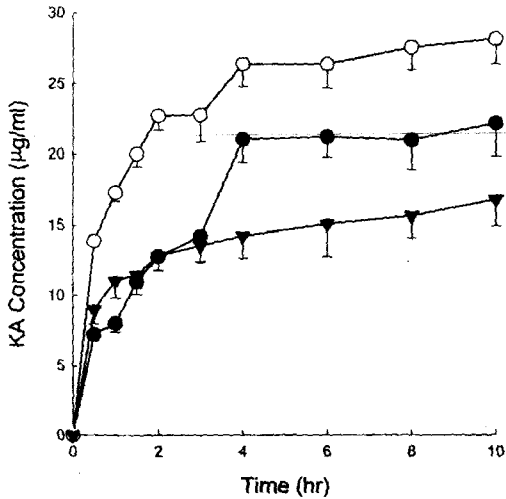


Fig. 1—Concentration change profile of KA as a function of time by enzymatic hydrolysis of KMS at different temperatures. ●: 20°C, ○: 37°C, ▼: 50°C.

이로 인한 효소의 변성이 일어난다.¹³⁾

가수분해실험에서 초기 4시간까지는 빠른 KA의 생성을 보이다가, 이후 10시간까지 지속적으로 KA를 유리시킴을 알 수 있었다(Fig. 1). 별도로 효소를 함유하지 않은 blank 용액에서 가수분해를 비교실험한 결과 KA의 생성이 관찰되지 않았으며, 따라서 KMS가 피부에 에스테라제에 의해 가수분해되는 것을 확인할 수 있었다. 이때 가수분해는 온도의존성을 보였는데 37°C에서는 실온에서의 가수분해속도에 비해 약 3배이상 빠르게 관찰되었고, 50°C에서는 오히려 효소활성이 급격히 저하되어 실온에서보다 2배이상 가수분해가 지연됨을 알 수 있었다. 전체적으로 10시간까지의 데이터를 세미로그 플롯하였을 때 직선이 성립되었으며, 따라서 1차 속도식에 따라 가수분해속도상수를 구하여 비교하였다. 즉 37°C에서 최고의 에스테라제 활성을 나타내었으며, 이때의 가수분해 속도상수는 0.4132 hr^{-1} 이었고, 가수분해 반감기는 1.68 시간으로 계산되었다(Table I). 따라서 프로드릭인 KMS는 피부에 흡수되면 에스테라제에 의해 비교적 빠르게 가수분해되면서 지속적으로 KA를 생성시킬 수 있을 것으로 판단되었다. 한편 50°C이상에서는 초기에 빠른 에스테라제 활성을 보이다가 시간이 지남에 따라 급격히 소실되었는데 이는 위에서 설명한 효소의 변성에 기인한 것으로 추정되었다. 그리고 KMS의 낮은 용해도로 인하여 KMS가 효소용

Table I—Hydrolysis rate constants(K) and half-life($t_{1/2}$) of KMS

Temp.	K (hr^{-1})*	$t_{1/2}$ (hr)
20°C	1.51×10^{-1}	4.60
37°C	4.13×10^{-1}	1.68
50°C	6.12×10^{-2}	11.3

* Obtained by first-order plot.

액중에서 완전히 용해되지 않은 상태로 분산되었기 때문에 KMS의 경시적 농도저하를 직접 관찰할 수는 없었다.

피부투과

Keratinocyte와 함께 표피를 구성하는 melanocyte는 표피 기저층에 전체적으로 고르게 분포되어있는 것으로 알려져 있으며,¹⁴⁾ KMS는 피부효소에 의해 가수분해됨이 이미 확인되었고 또 KA의 스테아린산 에스테르이기 때문에 지용성이 증가되어 피부에 쉽게 확산될 수 있을 것으로 예측된다. 따라서 피부에 적용할 때 각질층을 통과하여 살아있는 표피(viable epidermis)에까지 확산되어 에스테라제에 의해 가수분해를 받을 수 있는지를 평가하기 위해 경피확산 실험장치를 이용하여 KMS의 피부투과특성을 관찰하였다. Re-

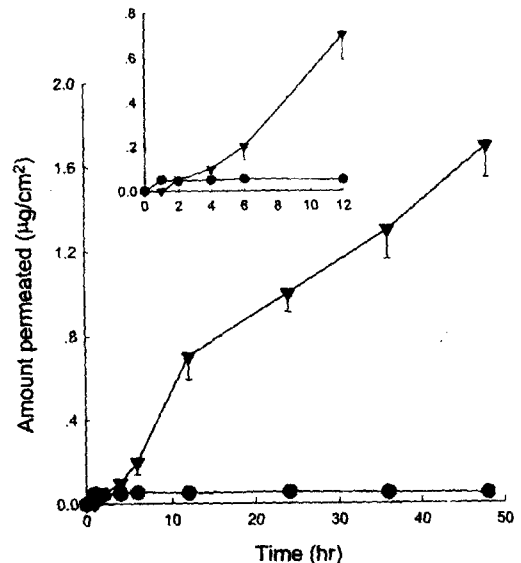


Fig. 2—In vitro skin permeation of KMS: Cumulative amount-time plot of KMS and KA in receptor medium of PBS/DMF (9:1 v/v). ▼: KA, ●: KMS.

ceptor 매질로서 PBS/DMF(9:1)를 사용하였을 때 전체적인 투과양상을 보면 KMS는 극히 소량만이 검출된 반면 KA는 지속적으로 증가하였다(Fig. 2). 따라서 KMS를 피부에 적용하면 에스터라제에 가수분해되면서 KA를 지속적으로 생성시킬 수 있음을 확인하였다. 또 12시간을 경계로 KA의 증가속도가 다소 늦어졌으며 삽입된 그래프를 보면 초기에 약 2.1시간의 lag-time이 있음을 알 수 있다. 즉 KMS 자체로서는 초기에 소량만이 투과된 다음 더 이상 증가되지 않았으나, 가수분해되어 생성되는 KA는 12시간까지 $0.068 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$, 그 이후에는 $0.028 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 의 flux를 나타내면서 지속적으로 증가되었다.

한편 KMS가 receptor 쪽에서 경시적으로 증가하지 않고 미량만이 검출된 이유는 KMS의 receptor 매질에 대한 낮은 용해도 때문인 것으로 추정되었으나, 이를 확인하기 위해 KMS가 충분히 용해될 수 있는 매질로서 IPA/THF(4:1 v/v) 혼액을 사용하여 동일한 조건에서 비교하였을 뿐만 아니라 대조실험으로서 KA의 피부투과성도 상호 비교하였다. 먼저 donor 측이 KA용액인 경우(Fig. 3A), KA 누적투과량은 경시적으로 지속적인 증가를 보이면서 $0.384 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 의 flux를 나타내어 KA 자체는 생체막을 통해 매우 쉽게 확산됨을 알 수 있었다. 그리고 donor 측이 KMS용액인 경우에는(Fig. 3B), receptor 매질이 PBS/DMF(9:1)일 때와는 다르게 KA가 거의 생성되지 않았으며 오히려 KMS의 누적투과량이 경시적으로 증가하였고 이때의 flux는 $0.228 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 로써 PBS/DMF의 경우보다 약 10배이상 증가하였다. 이러한 현상은 일차적으로 유기용매(IPA/THF) 조건에서 에스터라제가 불활성화되어 피부가 단순한 확산막으로서의 역할밖에 할 수 없었기 때문일 것이며 이차적으로는 donor 매질로의 약물의 분배가 증가되었기 때문인 것으로 해석되며, 결과적으로 receptor 쪽에서 KMS 누적투과량이 증가하고 KA는 생성되지 못한 것으로 사료된다. 특히 KMS의 flux가 KA의 flux보다 작게 관찰되었는데, 그 이유는 일차적으로 KA에 비하여 KMS가 분자량이 커서 생체막을 통해 확산되기가 더 어려웠기 때문인 것으로 사료되며, 나아가 지용성인 KMS가 상대적으로 피부에 비교적 오래 저류되었을 가능성도 배제할 수 없었다.

이상의 결과로부터 KMS는 피부를 통해 확산될 수 있으며 피부의 생리구조를 고려할 때 주로 피부에 체류하면서 피부 에스터라제에 의해 가수분해되면서 KA를

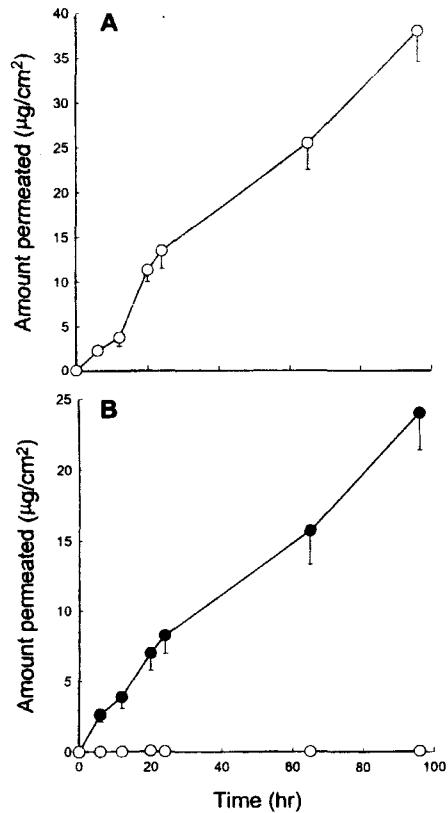


Fig. 3— *In vitro* skin permeation profiles of (A) KA and (B) KMS: Cumulative amount-time plot of KMS and KA in receptor medium of IPA/THF (4:1 v/v). ○: KA, ●: KMS.

지속적으로 생성시키는 피부투과특성을 가지는 것으로 결론지을 수 있다.

미백효과

KA는 산성이기 때문에 각질 박리효과를 가지고 있고 피부침투력이 좋으며, 친수성이기 때문에 표피(epidermis)에 오래 머무르지 않고 시간의존적으로 피부를 투과한다. 그러나, KMS는 위의 피부투과실험에서 확인되었듯이 KA보다 친수성이기 때문에 viable epidermis와 진피(dermis)에 잔류할 수 있는 가능성이 높아 피부내에 오랫동안 머물러 있을 것으로 사료되고, 이러한 피부체류성은 멜라닌 생성억제효과를 상승시킬 수 있을 것으로 기대되었다. 따라서 KA 및 KMS를 함유하는 시험제제로서 외용크림을 제조하였으며, 별도로 첨가제로서 PP-15를 가하여 크림을 제조하고 실험동물에 적용하여 미백효과를 비교평가 하였다. PP-15는 평균분자

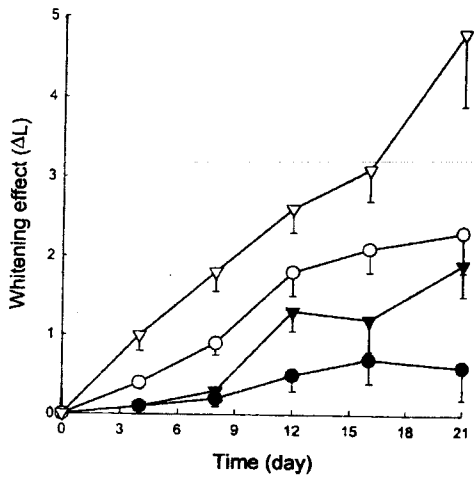


Fig. 4—Whitening effect (ΔL : lightness change) of different creams. ●: control, ○: KA cream, ▼: KMS cream, ▽: KMS cream (PP).

량 1,800으로 무색, 무향, 2,500~3,000 cps의 매우 안정한 수용성물질로서 *in vitro* 상에서 피부에 거의 흡수가 되지 않고 전연성과 부드러운 촉감 및 피부건조 개선 효과를 가지고 있으며, 약물을 각질층과 살아있는 표피층, 피부상층부에 오랫동안 머물게 하는 특징을 가지고 있는 폴리머이다.¹⁵⁾

미백효과는 검게 그을린 기니픽의 등피부에 각 크림을 도포하고 피부색이 점차 원래대로 회복되면서 밝아지는 정도를 lightness change(ΔL)로서 비교하였으며, 그 결과는 Fig. 4와 같다. 대조군에 비하여 각 시험제들이 모두 미백효과가 있는 것으로 나타났으며, KA cream과 KMS cream이 거의 비슷한 미백효과를 보였고 PP-15를 함유하는 KMS cream(PP)이 가장 우수한 효과를 나타내었다. 이것은 PP-15가 KMS를 표피상층에 효율적으로 국재화(localization)시켜 viable epidermis층의 에스터라제에 의해서 가수분해되면서 KA를 지속적으로 생성시켰기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 KMS는 KA의 미백작용은 그대로 유지하면서 산성에 기인한 KA의 피부자극은 줄일 수 있을 것으로 기대되며, 이러한 피부자극완화에 대해서는 향후 크림제 뿐 아니라 다양한 제형의 외용제제를 제조하여 국소독성시험을 통해 더 검토할 예정이다.

결 론

KA의 프로드럭으로서 KMS를 성공적으로 합성 할

수 있었으며, 합성된 KMS는 피부균질액으로부터 얻은 효소용액중에서 가수분해되어 KA를 유리시켰고 37°C에서의 가수분해 속도정수는 0.4132 hr^{-1} 이었고 가수분해 반감기는 1.68시간으로서, 프로드럭인 KMS는 피부에 흡수되어 에스터라제에 의해 비교적 빠르게 가수분해됨을 알 수 있었다. 그리고 경피확산 실험장치를 이용하여 KMS의 피부투과특성을 관찰한 결과, receptor 매질로서 PBS/DMF(9:1)를 사용하였을 때 KMS 자체로서는 초기에 소량만이 투과된 다음 더 이상 증가되지 않았으나 가수분해되어 생성되는 KA는 12시간까지 $0.068 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$, 그 이후에는 $0.028 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 의 flux를 나타내면서 지속적으로 증가됨으로써 KMS는 피부의 생리구조를 고려할 때 주로 피부 각질 및 상피층에 체류하면서 skin esterase에 의해 가수분해되면서 KA를 지속적으로 생성시키는 피부투과특성을 가지는 것으로 결론지을 수 있었다. 한편 *in vivo* 미백실험결과로부터 KMS는 KA의 미백작용은 그대로 유지하면서 산성에 기인한 KA의 피부자극은 줄일 수 있을 것으로 기대되었으며, 특히 Polyolprepolymer를 함유한 KMS 크림은 미백효과가 매우 우수하여 앞으로 이상의 결과들을 기초로 한 외용제제의 개발이 더욱 필요하다고 사료된다.

문 헌

- 1) Beelik, A. : Kojic acid, *Adv. Carbohydr. Chem.* **11**, 145 (1956).
- 2) Mishima, Y., Hatta, S., Ohyama, Y. and Inazu, M. : Induction of melanogenesis suppresion: Cellular pharmacology and mode of differential action, *Pigment Cell Research* **1**, 367 (1988).
- 3) Ohyama, Y., Wilczek, A. and Mishima, Y. : New melanogenesis inhibition of kojic acid, *Jap. J. Dermat.* **103**, 359 (1993).
- 4) Higa, Y. : 色白化粧品, Japan Patent, Publication SHOWA 59-33207 (1984).
- 5) Nagai, J. : 色白化粧品, Japan Patent, Publication SHOWA 60-9722 (1985).
- 6) Hatae, S. : 色白化粧品, Japan Patent, Publication SHOWA 64-83010 (1989).
- 7) Fort, J. J. and Mitra, A. K. : Effects of epidermal/dermal separation methods and ester chain configuration on the bioconversion of a homologous

- series of methotrexate dialkyl esters in dermal and epidermal homogenates of hairless mouse skin, *Int. J. Pharm.* **102**, 241 (1994).
- 8) Yu, C. D., Fox, J. L., Higuchi, W. I. and Ho, N. F. H. : Physical model evaluation of topical pro-drug delivery-simultaneous transport and bio-conversion of vidarabines-5'-valerate IV: Distribution of esterase and deaminase enzymes in hairless mouse skin, *J. Pharm. Sci.* **69**, 772 (1980).
 - 9) Zhou, X. H. and Po, A. Li Wan : Comparison of enzymic activities of tissues lining portals of drug absorption, using the rat as a model, *Int. J. Pharm.* **62**, 259 (1990).
 - 10) Chien, Y. W. : Transdermal Drug Delivery and Delivery Systems, "Novel Drug Delivery System", Marcel Dekker, p. 301 (1992).
 - 11) Ruland, A. and Kreuter, J. : Influence of various penetration enhancers on the in vitro permeation of amino acids across hairless mouse skin, *Int. J. Pharm.* **85**, 7 (1992).
 - 12) Kawai, M. : Screening and clinical evaluation methods of depigmentating agents, *Fragrance Journal* **14**, 93 (1995).
 - 13) Kopecek, J. and Rejmanová, P. : Enzymatically degradable bonds in synthetic polymers, "Controlled Drug Delivery", 1, CRC Press, p. 81 (1983).
 - 14) Mishima, Y. and Shibata, T. : Mechanism in the process of melanin polymer formation and its controlling factors, *Fragrance Journal* **6**, 8 (1990).
 - 15) Quigley, John W. and Bucks, Daniel A. W. : Polyolprepolymer: A Cutaneous Retention and Deposition Technology, "Applications of Polymeric Materials for Novel Pharmaceutical Technology", The 6th KSP Seminar, p. 37 (1996).